

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**CRISTIAN MEDRADO CANONICO**

**ATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS ACÍCULAS DE *Pinus* spp.  
COMO CONTROLE DA AÇÃO DO FUNGO APODRECEDOR DE MADEIRA -  
*Postia placenta* (Fr.)**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

**DOIS VIZINHOS – PR  
2021**

**CRISTIAN MEDRADO CANONICO**

**ATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS ACÍCULAS DE *Pinus* spp.  
COMO CONTROLE DA AÇÃO DO FUNGO APODRECEDOR DE MADEIRA -  
*Postia placenta* (Fr.)**

***ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL EXTRACTED FROM Pinus spp. HOW TO  
CONTROL THE ACTION OF WOOD ROTTING FUNGUS - Postia placenta (Fr.)***

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentada como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Florestal, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheiro Florestal.

Orientador: Prof. Dr.<sup>a</sup> Paula Fernandes Montanher

Co-orientador: Prof. MSc. Douglas Edson Carvalho



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



Ministério da Educação  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Campus Dois Vizinhos  
Curso de Engenharia Florestal



---

## TERMO DE APROVAÇÃO

### ATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS ACÍCULAS DE *Pinus spp.* COMO CONTROLE DA AÇÃO DO FUNGO APODRECEDOR DE MADEIRA - *Postia placenta* (Fr.)

por

**CRISTIAN MEDRADO CANONICO**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 26 de novembro de 2021, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Florestal. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos Professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o Trabalho aprovado.

---

Paula Fernandes Montanher  
Doutora - CEBB  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR

---

Michele Potrich  
Doutora - DIRPPG  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR

---

Paula Juliane Barbosa de Oliveira  
Doutoranda Agronomia (UTFPR-PB)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR

- O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Curso -

## **DOIS VIZINHOS - PR**

**2021**

### **AGADECIMENTOS**

Primeiramente, à Deus pelo dom da vida, sendo está repleta de saúde e bênçãos, sem a qual nada disso seria possível.

A Prof. Dr.<sup>a</sup> Paula Fernandes Montanher pelas orientações, oportunidade de crescimento profissional, da confiança em mim depositada, pela paciência em repassar seus ensinamentos e da sua amizade ao qual sou grato.

Ao Prof. MSc. Douglas Edson Carvalho por sua prestatividade, contribuições e conhecimentos compartilhados na elaboração deste projeto.

À minha família, por todo apoio durante esta caminhada, em especial aos meus pais, Lenilse Medrado Canonico e Josival Canonico, ao meu irmão Jefferson Diego Medrado Canonico, e a todos os demais familiares pelo carinho, incentivo, auxílio e paciência.

Ao Prof. Dr. Américo Wagner Júnior pelos conselhos, pela paciência e determinação a fim de repassar ensinamentos tanto técnicos quanto práticos e da sua amizade ao qual sou grato;

Em especial a minha namorada Noeli Cauvilla, por todo apoio demonstrado a mim, além dos seus conselhos e compreensão principalmente nesta fase final da graduação, além do carinho, convívio e toda a atenção destinada a mim.

Aos grandes amigo(a)s, Paula Barbosa, Isadora Bischoff, Douglas Alamino e Professor Dr. Lucas Domingues, os quais foi um presente adquirido durante a minha graduação e que hoje os considero como parte importante da minha vida. Obrigado por estarem, e sempre se fazerem presentes em todos os momentos desta minha caminhada acadêmica. Com vocês esta caminhada se tornou muito mais aprazível, cheia de alegria e muitos sorrisos, diversas músicas, momentos e muitas histórias inesquecíveis, as quais excedem a barreira da Universidade. Saibam que seja a onde Deus me levar sempre levarei vocês em meu coração.

Aos meus grandes amigos Felipe Schroeder e Henrique Moura Dias, por sua amizade durante minha graduação, do seu suporte no desenvolvimento deste trabalho, além dos momentos de lazer e cooperação nos momentos mais difíceis.

Aos Técnicos Juliano Zanella e Maira Casagrande por sempre estarem disponíveis para sanar quaisquer dúvidas e eventuais problemas relacionado ao meu trabalho de conclusão de curso.

E a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente contribuíram para a realização e desenvolvimento deste trabalho.

*Quando as neves caem e os  
ventos brancos sopram,  
o lobo solitário morre,*



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

mas a matilha sobrevive.

Eddard Stark



## RESUMO

Pesquisas relacionadas com a aplicação dos óleos essenciais proporcionam o conhecimento sobre as suas propriedades antimicrobianas, fornecendo informações importantes para a geração de novos produtos e a sua utilização final como um bioinseticida no controle biológico. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antifúngico do óleo essencial extraído das acículas de *Pinus* spp. no controle da ação do fungo apodrecedor de madeira *Postia placenta* (Fr.). As amostras foram coletadas e preparadas no laboratório da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *Campus* Dois Vizinhos. Para o teste de rendimento do óleo essencial extraído das acículas de *Pinus* spp. pesou-se em balança semi analítica 350 g de amostra de massa verde de acícula, após foi adicionado 1 litro de água destilada ao balão volumétrico, que posteriormente foram submetidas à hidrodestilação por quatro horas em extrator do tipo Clevenger modificado. Avaliando dois períodos diferentes de coleta das acículas para testar seu rendimento na extração do óleo essencial das acículas de *Pinus* spp.. Para a análise da estrutura vegetativa do fungo *P. placenta*, usou-se da técnica do micro cultivo. Para visualizar as estruturas, os esporos e as hifas, foram observados com auxílio do microscópio óptico Zen através do software ZEN- ZEISS, as estruturas reprodutivas do fungo foram observadas na objetiva de 40x, sendo assim fotografadas as estruturas de interesse. Com o intuito de avaliar o potencial antimicrobiano do óleo essencial contra o fungo *P. placenta*, foi utilizada a metodologia de Microdiluição em caldo em placas de Elisa para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Realizou-se sucessivas diluições, retirando 100 µL de extrato da primeira coluna e transferiu-se para o segundo poço, foi homogeneizada a solução e novamente retirado 100 µL do segundo poço e transferido para o terceiro. Este processo foi repetido até o ultimo poço. Com as soluções diluídas, foi adicionado 20 µL de solução fúngica já ajustada anteriormente em cada poço. As avaliações foram realizadas de acordo com coloração dos poços, onde a cor rosa ou com tons avermelhadas indicam a atividade respiratória celular, sugerindo a presença microbiana ativa. O estudo realizado através do ensaio de apodrecimento acelerado foi conduzido conforme a ASTM D 2017 – 05 com adaptações. Através do resultado do cálculo de rendimento da extração de óleos essenciais das acículas de *Pinus* spp., recomendamos que devesse proceder com a coleta das acículas no período da manhã e já submetidas ao processo de extração imediatamente. Já no estudo os esporos e as hifas, foram observados com auxílio do microscópio, sendo possível visualizar a presença das estruturas vegetativas do fungo *P. placenta*, além da presença das suas hifas bem definidas e a presença de esporos. Através da análise da Concentração Mínima Inibitória - MIC verificou-se que todas as concentrações testadas, causaram efeitos significativos no controle inibitório do fungo *P. placenta* através do óleo essencial extraído das acículas de *Pinus* spp.. As concentrações utilizadas de óleo essencial extraídos das acículas de *Pinus* spp., apresentaram efeitos significativos no controle do crescimento do fungo *P. placenta*.

**Palavras-chave:** Bioinseticida; Antifúngico; Extração; Rendimento;



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



## ABSTRACT

Research related to the application of essential oils provides knowledge about their antimicrobial properties, providing important information for the generation of new products and their final use as a bioinsecticide in biological control. The objective of this work was to evaluate the antifungal potential of essential oil extracted from *Pinus* spp. in the control of the action of the wood rot fungus *Postia placenta* (Fr.). The samples were collected and prepared in the laboratory of the Federal Technological University of Paraná, Campus Dois Vizinhos. For the performance test of essential oil extracted from *Pinus* spp. 350 g of green needle mass sample was weighed on a semi-analytical scale, after which 1 liter of distilled water was added to the volumetric flask, which were subsequently subjected to hydrodistillation for four hours in a modified Clevenger-type extractor. Evaluating two different periods of needle collection to test its performance in extracting the essential oil from *Pinus* spp. needles. For the analysis of the vegetative structure of the fungus *P. placenta*, the microculture technique was used. To visualize the structures, spores and hyphae were observed with the aid of a Zen optical microscope through the ZENZEISS software, the reproductive structures of the fungus were observed on a 40x objective, and the structures of interest were thus photographed. In order to evaluate the antimicrobial potential of the essential oil against the fungus *P. placenta*, the methodology of Microdilution in Broth in Elisa Plates was used to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). Successive dilutions were carried out, removing 100  $\mu$ L of extract from the first column and transferred to the second well, the solution was homogenized and again 100  $\mu$ L was removed from the second well and transferred to the third. This process was repeated until the last well. With the diluted solutions, 20  $\mu$ L of previously adjusted fungal solution was added to each well. The evaluations were carried out according to the color of the wells, where the pink color or with reddish tones indicate the cellular respiratory activity, suggesting the presence of active microbial. The study carried out through the accelerated rot test was conducted in accordance with ASTM D 2017 - 05 with adaptations. Through the result of the calculation of the yield of the extraction of essential oils from *Pinus* ssp. needles, we recommend that you should proceed with the collection of needles in the morning and have already undergone the extraction process immediately. In the study, the spores and hyphae were observed with the aid of a microscope, making it possible to visualize the presence of vegetative structures of the fungus *P. placenta*, in addition to the presence of its well-defined hyphae and the presence of spores. Through the analysis of the Minimum Inhibitory Concentration - MIC it was verified that all the tested concentrations caused significant effects in the inhibitory control of the fungus *P. placenta* through the essential oil extracted from *Pinus* spp.. The used concentrations of essential oil extracted from *Pinus* ssp. needles showed significant effects in controlling the growth of the fungus *P. placenta*.

**Keywords:** Bioinsecticide; Antifungal; Extraction; Performance;



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Áreas de florestas plantadas no Brasil por Estado e espécie .....	17
<b>Figura 2</b> - Área da UTFPR selecionada para a realização da coleta das amostras folhares para a extração do óleo essencial das acículas de <i>Pinus ssp.</i> ....	23
<b>Figura 3</b> - Ferramenta de poda utilizada nas coletas das acículas de <i>Pinus spp.</i> para extração do óleo essencial em laboratório. ....	24
<b>Figura 4</b> - Limpeza e preparo das amostras de acículas de <i>Pinus spp.</i> .....	24
<b>Figura 5</b> - Preparo das acículas de <i>Pinus ssp.</i> para serem inseridas no balão volumétrico para posteriormente ser utilizado no aparelho extrator do tipo Clevenger.....	25
<b>Figura 6</b> - Aparelho de extração de óleo essenciais do tipo Clevenger modificado.....	26
<b>Figura 7</b> - Demonstrativo de como foi posicionado as concentrações contendo as soluções de interesse na Placa de Elisa utilizada, para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	29
<b>Figura 8</b> - Corpos de prova confeccionadas a partir da madeira de <i>Pinus spp.</i> , sendo secados na câmara de secagem climatizada com circulação de ar. ....	30
<b>Figura 9</b> - Demonstração dos corpos de provas após serem dimensionados e identificados para serem levados a estufa de secagem com circulação de ar forçada .....	31
<b>Figura 10</b> - Demonstração dos corpos de provas na estufa de secagem com circulação de ar forçada .....	31
<b>Figura 11</b> - Demonstração dos efeitos da podridão branca na madeira, causados pela presença dos fungos xilófagos.....	32
<b>Figura 12</b> - Placas de suporte recebendo a inoculação com pequenos discos difusores do meio de cultura contendo o micélio do fungo <i>Postia placenta</i> (fr.).....	33
<b>Figura 13</b> - Realização de um teste de absorção dos corpos de provas, com objetivo de obter um tempo aproximado de imersão nas soluções contendo as concentrações de óleo essenciais .....	33
<b>Figura 14</b> - Realização da montagem do experimento, aonde os corpos de provas foram submergidos em cada soluções contendo as concentrações de óleo essenciais das acículas de <i>Pinus spp.</i> ....	34
<b>Figura 15</b> - Fotomicrografia das estruturas de crescimento do fungo <i>Postia placenta</i> , com hifas não septadas e a presença dos esporos.....	37
<b>Figura 16</b> - Determinação das concentrações inibitória mínima testadas em placa de Elisa através do óleo essencial frente ao fungo <i>Postia placenta</i> (fr.).....	38
<b>Figura 17</b> - Imagens do fungo <i>Postia placenta</i> (fr.) nas amostras de <i>Pinus spp.</i> sem nenhum tratamento (A) e com a presença de óleo essencial (B) na superfície da madeira .....	40
<b>Figura 18</b> - Demonstração dos corpos de provas de <i>Pinus spp.</i> após permaneceram em contato com os fungos na incubadora por 16 semanas. Amostra com a presença de óleo essencial na superfície da madeira (A) sem nenhum tipo de tratamento (B e C).....	41



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Histórico de área plantada com gênero <i>Pinus</i> sp. em hectares, no período de 2010 a 2015 na região sul.....	17
<b>Tabela 2</b> - Metodologia utilizada na extração das amostras colhidas no período da manhã ...	26
<b>Tabela 3</b> - Metodologia utilizada na extração das amostras colhidas no período da tarde.....	27
<b>Tabela 4</b> - Quantidade obtida e porcentagem de rendimento dos óleos essenciais extraídos de acículas de <i>Pinus</i> spp. nos diferentes períodos de extração .....	36
<b>Tabela 5</b> - Análise de variância obtida a partir das médias do peso final para cada concentrações aplicadas nos tratamentos utilizado neste trabalho.....	39
<b>Tabela 6</b> - Valores médios de massa específica aparente a 12% de umidade por tratamento, antes e posteriormente serem submetidas à ação do fungo de podridão branca ( <i>P. placenta</i> ).40	

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

ACA – Arseniato de Cobre Amoniacal

CCA – Arseniato de Cobre Cromatado

CCB – Borato de Cobre Cromatado

Coef. - Coeficiente

CZC – Cloreto de Zinco Cromatado

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

NBR - Normas Brasileiras

PAF – Potencial Ataque Fúngico

UTFPR - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

## LISTA DE SÍMBOLOS

B – Biomassa

d – Densidade

m – Massa

R – Rendimento

v - Volume

VOE – Volume óleo Essencial





## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	15
2.1 Objetivo geral .....	15
2.2 Objetivos específicos .....	15
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
3.1 <i>Pinus</i> spp.....	16
3.1.1 Descrição da espécie.....	16
3.2.2 Mercado .....	16
3.2 Fungos Xilófagos.....	18
3.2.1 Potencial de ataque de fúngico.....	18
3.2.2 Prolemas com ataque de fungos apodrecedores na madeira de <i>Pinus</i> spp.....	18
3.3 Óleos essenciais .....	19
3.3.1 Método de extração.....	19
3.3.2 Mercado de óleos essenciais .....	20
3.3.3 Estudos relacionados com óleos essenciais.....	21
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
4.1 Fluxograma Metodologia.....	22
4.2 Descrição do local de estudo.....	23
4.3 Coleta e preparo das amostras vegetais.....	23
4.4 Extração e análise de rendimento do óleo essencial .....	25
4.5 Análise da estrutura vegetativa do fungo <i>Postia placenta</i> (Fr.).....	27
4.6 Concentração Inibitória Mínima - CIM .....	28
4.7 Estudo da Inibição do fungo .....	30
4.8 Análise estatística.....	35
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	36
5.1 Extração e análise de rendimento do Óleo Essencial.....	36
5.2 Análise da Estrutura Vegetativa do Fungo <i>Postia placenta</i> (Fr.) .....	37
5.3 Concentração Inibitória Mínima - CIM .....	38
5.4 Análise do Ataque do Fungo <i>Postia placenta</i> (Fr.) em madeira de <i>Pinus</i> spp. ....	39
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	43
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	44





## 1. INTRODUÇÃO

É perceptível que ao longo dos últimos anos o perfil do consumo de madeira oriunda das florestas plantadas, apresentou substanciais mudanças em função das formas e restrições de exploração. Principalmente em função da pressão sobre o desmatamento das florestas nativas. Sendo assim, as indústrias de base florestal passaram a utilizar espécies de rápido crescimento, buscando principalmente um ganho em produtividade, conseqüentemente, melhorias na qualidade da madeira. Dentre essas espécies de rápido crescimento, as espécies do gênero *Pinus* spp. tem ganhado um destaque no mercado florestal, podendo-se verificar uma crescente utilização e demanda pelo uso desta madeira pelas indústrias do setor.

Segundo dados do IBA (2020), o plantio de gênero *Pinus* spp. no Brasil teve um aumento de produtividade de 31,3 m<sup>3</sup>/ha de área plantada de acordo com seu relatório apresentado no ano anterior em 2019. Porém, danos causados pela clorose, ataque de macacos pregos, tombamento de mudas, podridão de raízes e a seca de ponteiros em plantios de *Pinus* no Sul do Brasil, chega a alcançar prejuízos significativos e os produtores de *Pinus* da região deixariam de colher aproximadamente 379,16 mil m<sup>3</sup> de madeiras anuais, ao final da rotação, simulando uma mortalidades de 20%.

Um estudo apresentado por Magalhães (2005), descreve que as diversas causas da degradação em produtos providos da madeira, os danos que acarreta grandes prejuízos é proporcionado pelo ataque de micro-organismos. Para a madeira de *Pinus* spp., os fungos de uma forma em geral, são os principais micro-organismos que tendem a proporcionar prejuízos em sua estrutura, pois esses são apodrecedores lignocelulíticos, que tendem a causar perda da resistência mecânica das peças de madeira. O que é capaz de acarretar graves prejuízos, sendo que os fungos são agentes biológicos que pode atacar a madeira em grandes proporções, em virtude da sua agilidade de esporulação.

Devido a essa suscetibilidade ao ataque de organismos xilófagos, o *Pinus* spp. é utilizado em ensaios de resistência a degradação, e suas características evidenciam a necessidade do uso de produtos para auxiliar na preservação da madeira de *Pinus* spp. (BARILLARI, 2002). O controle da deterioração de madeiras ocasionado por fungos é normalmente feito através do uso de produtos químicos, tóxicos aos micro-organismos. No entanto, a manipulação de produtos naturais, com alternativa para o controle do



desenvolvimento de fungos na madeira poderá ser uma prática economicamente viável no futuro.

Estudos com o uso de óleos essenciais vem se tornando uma estratégia promissora, uma vez que, além de apresentar propriedades antimicrobianas, revelou-se promissor para o controle alternativo de algumas doenças relatadas em plantas, devido a atividade fungitóxica presente nos óleos essenciais (PEREIRA *et al.*, 2011).

Pensando nesta linha alternativa de controle com a aplicação do óleo essencial, alguns estudos vêm obtendo bons resultados, testando a aplicabilidade do óleo essencial no controle de *Thaumastocoris peregrinus*, obtendo resultados promissores em relação ao controle de *T. peregrinus*, como descrito por Lorencetti *et al.* (2015). No trabalho descrito por Pires e Piccoli (2012), obtiveram em suas pesquisas bons resultados testando óleos essenciais como efeitos inibitórios no crescimento de bactérias e fungos.

Pesquisas relacionadas com a aplicação dos óleos essenciais, proporcionam o conhecimento sobre as suas propriedades antimicrobianas. Fornecendo informações importantes para as diversas fases do processamento industrial, bem como para a geração de novos produtos e a sua utilização final como um produto alternativo. Assim, a utilização do óleo essenciais como produtos bioinseticidas pode ser uma estratégia promissora para as indústrias.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antifúngico do óleo essencial extraído das acículas de *Pinus* spp. no controle da ação do fungo apodrecedor de madeira *Postia placenta* (Fr.).

### 2.2 Objetivos específicos

- Extrair e quantificar o rendimento do óleo essencial presente em acículas de *Pinus* spp.;
- Visualizar as estruturas reprodutivas do fungo *P. placenta* (fr.);
- Determinar a Concentração Mínima Inibitória - MIC no controle *in vitro* do fungo *P. placenta* (fr.);
- Avaliar o uso do óleo essencial das acículas de *Pinus* spp. como controle do fungo *P. placenta* na madeira de *Pinus* spp. por análise *in vitro*;

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 *Pinus* spp.

##### 3.1.1 Descrição da Espécie

O gênero *Pinus* pertence à ordem Coniferae, do grupo das Gymnospermae. Sua área de ocorrência natural alcança a região polar até os trópicos englobando os continentes da Europa, Ásia, América do Norte e Central, não ocorrendo naturalmente na América do Sul. Apresenta cerca de 105 espécies identificadas e devido à sua grande versatilidade possibilita o plantio em diferentes condições de ambiente (CI FLORESTAS, 2008), suas espécies representa uma importante fonte de matéria prima para a indústria de beneficiamento da madeira (FRAGA; JÚNIOR; GONÇALEZ, 2002).

Através do custo-benefício, atrelado com a sua adaptabilidade ao solo brasileiro, faz com que esta espécie consiga obter excelente valores de incremento, os quais são totalmente renováveis, sendo que sua matéria prima obtida é de ótima qualidade. Isso torna o *Pinus* sp. uma das madeiras mais utilizadas no Brasil, que vêm sendo plantada e comercializada desde a década de 60 (FACCIO, 2010).

A inserção das variedades de *Pinus* sp. no Brasil teve por objetivo criar uma base florestal em substituição ao tradicional pinheiro do paraná ( *Araucaria angustifolia* ), então intensamente explorada e com suas reservas naturais comprometidas, dando assim suporte ao programa de desenvolvimento do setor de celulose e papel na produção de polpas de fibras longas, fundamentais para papéis de alta resistência (FACCIO, 2010).

##### 3.1.2 Mercado

A partir do momento que o homem deixou de ser nômade, passou a empregar o uso da madeira para diversos fins, sendo esta, atualmente, uma das fontes mais utilizadas para produção de energia, celulose e papel, na construção para os meios urbano e rural, além do amplo uso nas indústrias de painéis e de móveis (PAES *et al.*, 2016).

Dessa forma o volume necessário de matéria prima é elevado, evidenciando a importância do gênero *Pinus*, principalmente pelo fato de ser renovável e mais acessível que as outras fontes de matéria-prima, além de sua exploração agredir menos o ambiente quando comparada à extração de materiais não renováveis (PAES *et al.*, 2016).



As florestas de *Pinus* sp. no Brasil ocupam cerca de 1,6 milhão de hectares, contudo a área total do gênero *Pinus* vem caindo ao decorrer dos últimos cinco anos, em uma taxa de 2,1% ao ano. (Tabela 1), devido a substituição desse por outras culturas florestais (IBÁ, 2020).

**Tabela 1 – Histórico de área plantada com gênero *Pinus* sp. em hectares, no período de 2010 a 2015 na região sul.**

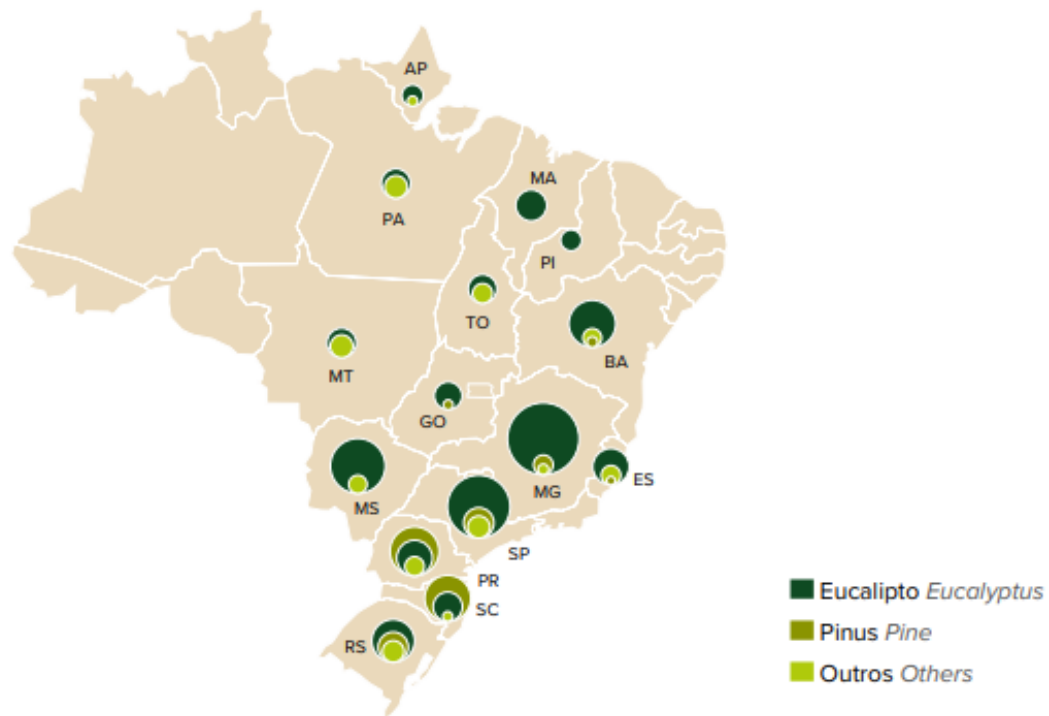
Estado	2010	2011	2012	2013	2014	2015
<b>Paraná</b>	<b>686,509</b>	<b>658,707</b>	<b>619,731</b>	<b>662,296</b>	<b>637,769</b>	<b>670,906</b>
Santa Catarina	545,592	538,254	593,377	540,542	541,162	542,662
Rio Grande do Sul	168,955	164,806	164,832	164,174	184,584	184,603
<b>Total</b>	<b>1401,056</b>	<b>1361,767</b>	<b>1377,94</b>	<b>1367,012</b>	<b>1363,515</b>	<b>1398,171</b>

Fonte: Adaptado IBÁ, 2020.

Atualmente, cerca de 70% da madeira consumida pela indústria brasileira é proveniente de reflorestamento, o que representa uma alteração substancial comparada com anos anteriores, em que praticamente toda a matéria-prima era proveniente de florestas nativas (SOUZA; DEMENIGHI, 2017).

Segundo Shimizu (2008), as florestas de *Pinus* spp. tem maior predominância na região Sul do país (Figura 1) devido às condições climáticas, preferência industrial e contexto histórico da região, onde, anteriormente, se utilizava a araucária (*A. angustifolia*), que teria uma estrutura física de madeira mais semelhante ao *Pinus* sp., se tornando a principal espécie de importância econômica para o setor industrial madeireiro.

**Figura 1 – Áreas de florestas plantadas no Brasil por Estado e espécie.**



Fonte: IBÁ, 2020.

### 3.2 Fungos Xilófagos

De acordo com Moreschi (2013), fungos xilófagos são os agentes biológicos que atacam a madeira em maiores proporções, pois se desenvolvem com rapidez e ocorrem em quase todos os nichos ecológicos. A ocorrência se dá devido à abundância de fontes de alimentos, necessitando apenas de condições como temperatura ideal, alimento e um ambiente propício para o seu desenvolvimento.

Na madeira de *Pinus*, esse grupo de fungos são os principais agentes degradadores, esses agentes xilófagos podem, a grosso modo, serem divididos entre emboloradores, manchadores e apodrecedores, contribuindo para o surgimento da maioria das manchas, mofo, bolor e apodrecimento em madeira (MAGALHÃES, 2005).

#### 3.2.1 Potencial de ataque fúngico

Para que um determinado tipo de fungo se estabeleça na madeira e, uma vez instalado, possa se desenvolver e utilizar seus componentes, requer algumas condições básicas, que estão relacionadas às fontes de alimento, como o teor de umidade da madeira, o teor de umidade e a temperatura do ambiente, o oxigênio e o pH (MORESCHI, 2013).

Como o ambiente tem grande importância na ocorrência da degradação por agentes biodegradadores e deterioração abiótica na madeira, o mesmo material lenhoso pode apresentar caracterizações diferentes quando exposto a situações diferentes de ambiente, exemplo podemos citar a umidade, insolação, temperatura e vento (BAHIA, 2015).

A metodologia para conseguir dimensionar a possibilidade de degradação da madeira por fungos é denominada Potencial Ataque Fúngico (PAF), a qual visa apresentar o índice de degradação que o material poderá sofrer nas condições climáticas apresentadas em determinada região (CASAVECCHIA *et al.*, 2016).

### **3.2.2 Problemas com ataque de fungos apodrecedores na madeira de *Pinus* spp.**

De acordo com Moreschi (2011), os fungos que normalmente são encontrados e que podem causar prejuízo na madeira dividem-se em cinco categorias: podridão parda, podridão branca, podridão mole, mancha e bolor. As três primeiras podem ser agrupadas como fungos apodrecedores e são responsáveis pela perda de resistência da madeira. Os fungos apodrecedores são especializados em obter alimento da madeira, e os materiais orgânicos em questão são a celulose, hemiceluloses e lignina, constituintes do material lenhoso presente na madeira (MORAIS; COSTA, 2007).

Boa parte das madeiras são naturalmente resistentes à ação dos agentes xilófagos, entretanto, algumas madeiras como as de florestas plantadas não são resistentes e necessitam de tratamentos de preservação, no Brasil, a madeira de floresta plantada, quando tratada, tem pouco potencial de ser reciclada ou reaproveitada no final de seu ciclo de vida, devido à utilização de produtos químicos como preservantes, produtos estes contendo em suas composições o Arseniato de Cobre Amoniacal – ACA, Arseniato de Cobre Cromatado – CCA, Borato de Cobre Cromatado – CCB e Cloreto de Zinco Cromatado – CZC, na qual possui resíduos perigosos (SOUZA, 2013).

Ensaio laboratoriais já evidenciam que a madeira do *Pinus* apresenta, baixa resistência à degradação por fungos apodrecedores, principalmente quando é utilizada em ensaios de resistência a degradação por sua suscetibilidade ao ataque de organismos xilófagos, reforçando ainda mais que devido à baixa durabilidade natural e a suscetibilidade ao ataque de fungos, necessita do uso de produtos para preservação do *Pinus* (BARILLARI, 2002).

### **3.3 Óleos essenciais**

Desde a antiguidade o homem já isolava alguns compostos orgânicos, inicialmente aquecendo e mais tarde destilando em corrente de vapor, através dessas técnicas obtinha compostos que tinham odor característico, que passou a se denominar óleos essenciais (SOLOMONS, 1982; FIORIO; DALPOSSO, 2011). Os óleos essenciais são produtos de origem vegetal que, atribui-se como sendo de matéria prima, uma vez que extraídos de acordo

com processos físicos específicos, acabam tendo como produto um extrato líquido à temperatura ambiente, podendo apresentar de média a elevada viscosidade, de comportamento hidrofóbico, que exalam fragrâncias características das espécies de onde foram extraídos (SANTOS, 2011).

Estruturalmente os óleos essenciais são compostos aromáticos ou misturas complexas vindas de substâncias voláteis que podem ser extraídos de raízes, caules, folhas, flores ou de todas as partes das plantas, podendo ser insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, que contribuem para sua caracterização e isolamento do óleo (PIEROZAN et al., 2009; PIRES; PICCOLI, 2012). Essas extrações podem ocorrer por destilação de arraste a vapor, que é a técnica mais empregada, compressão de vegetais ou uso de solventes (PIRES; PICCOLI, 2012).

### **3.3.1 Método de extração**

Atualmente existem vários métodos para a extração de óleos essenciais, o que os diferencia é a forma que este irá extrair o óleo da planta. Além disso, alguns métodos são melhores para a extração de óleos em uma parte da planta, enquanto outro não servirá para essa parte ou mesmo não terá um rendimento satisfatório. Outro fator que influencia na escolha do método mais conveniente é a finalidade do óleo essencial obtido (OLIVEIRA; JOSE, 2007; FIORIO; DALPOSSO, 2011). Segundo Andrade (2016), o processo de extração utilizando o aparato Clevenger mostrou-se eficiente na obtenção dos óleos essenciais de espécies coletadas na Mata Atlântica.

O controle da qualidade dos óleos essenciais é feito por técnicas cromatográficas, utilizadas para identificação e a separação de componentes presentes em uma fase fixa ou suspensa, para tal reconhecimento em uma fase móvel, podemos destacar a Cromatografia em camada delgada, Cromatografia gasosa, Espectrometria de massas ou a Cromatografia líquida de alta eficiência (SERAFINI, 2002).

### **3.3.2 Mercado de óleos essenciais**

No Brasil a indústria de óleos essenciais teve início em 1927, quando se começou a extrair óleo essencial de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke), no entanto, somente no final da década de 30 que a indústria nacional se passou a se desenvolver (FIORIO; DALPOSSO, 2011). Os óleos essenciais possuem grande importância industrial e são empregados nas indústrias de perfumaria, cosmética, alimentícia e farmacêutica, sendo geralmente os componentes de ação terapêutica de plantas medicinais. Algumas substâncias presentes nos óleos essenciais possuem

alto valor comercial, neste caso, essas substâncias podem ser isoladas do óleo ou mesmo sintetizadas em laboratório, o mentol das espécies de *Mentha* é um exemplo disso (GASPARIN *et al.*, 2014).

O Brasil tem lugar de destaque na produção de óleo essenciais, ao lado da Índia, China e Indonésia, que são considerados os quatro grandes produtores mundiais. A posição do Brasil deve-se aos óleos essenciais obtidos de espécies cítricas, que são subprodutos da indústria de sucos. No passado, o país teve destaque como exportador de Óleo essencial de pau-rosa (*Aniba rosaeodora*), sassafrás (*Sassafras albidum*) e menta (*Mentha spicata*) (ANDRADE, 2016).

Quando se fala em produzir bens e produtos, o ser humano apresenta grande dificuldade em relacionar a preservação da biodiversidade com o objetivo de produção que se almeja. Para se obter produtos oriundos da natureza de forma abundante, é necessário entender seu desenvolvimento, adaptando-se a ele ou fazendo o mesmo se adaptar ao local de interesse.

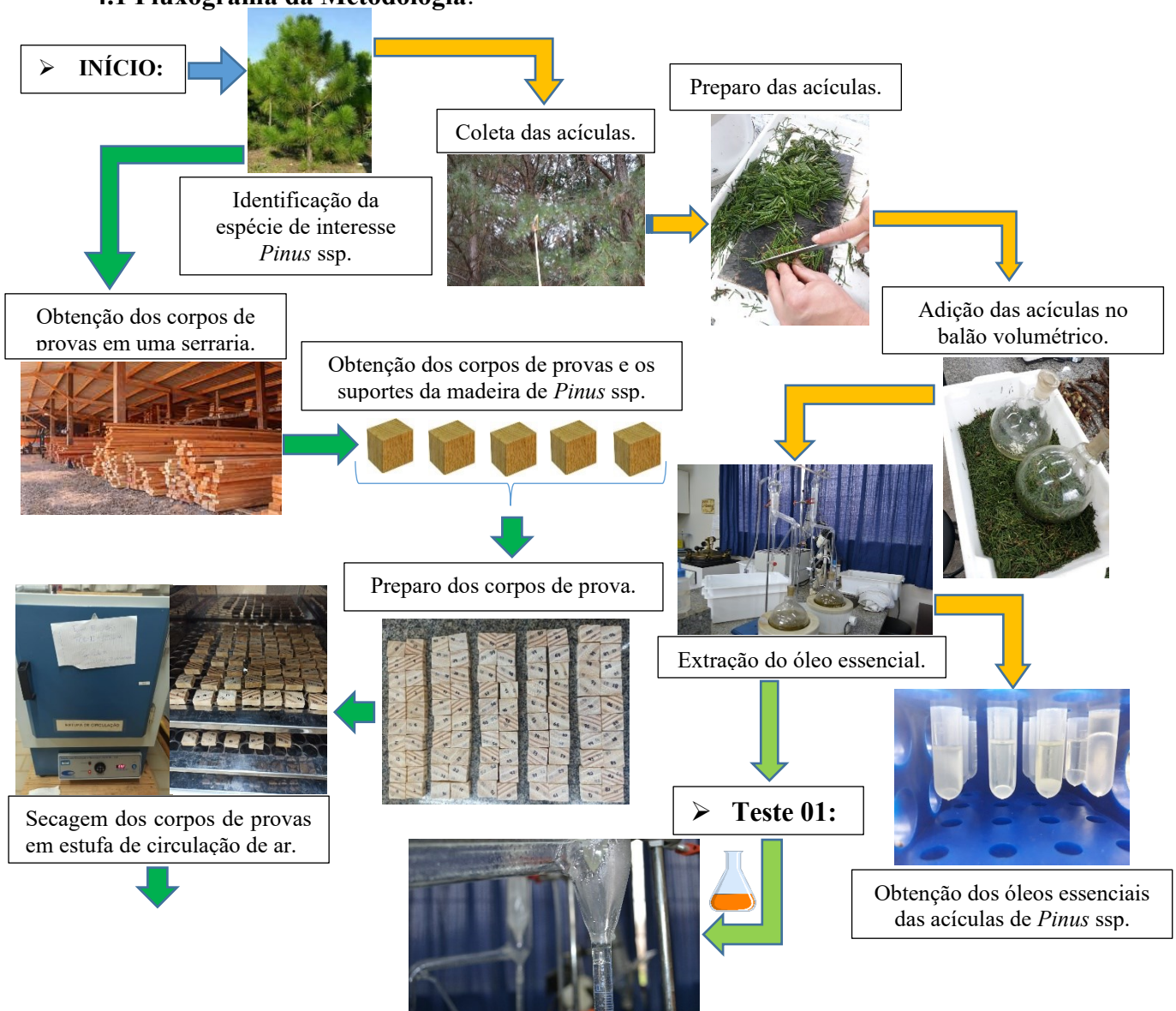
### **3.3.3 Estudos relacionados com óleos essenciais**

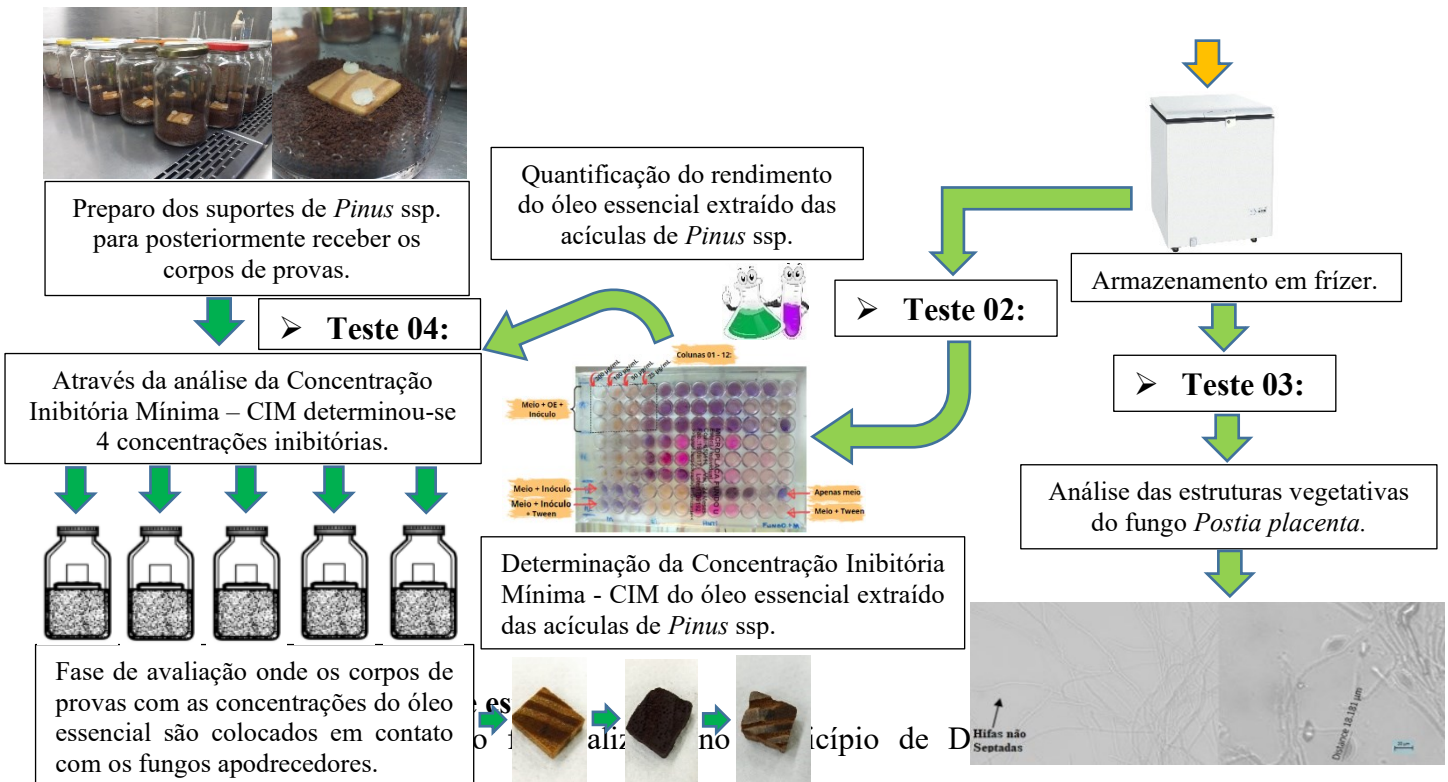
A área relacionada com óleos essenciais vem se tornando bastante promissora, na qual, estudos apontam a importância da composição química, além das propriedades biológicas e possíveis aplicações de óleos essenciais, que podem ser uma fonte de produtos naturais com importância econômica para a indústria de alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos (PIEROZAN *et al.*, 2009). Estudos com o uso de óleos essenciais extraídos de plantas medicinais vem se tornando uma estratégia promissora, uma vez que, além de apresentar propriedades antimicrobianas, revelou-se promissor para o controle alternativo em plantas, devido a atividade fungitóxica presente nos óleos essenciais (PEREIRA *et al.*, 2011).

O potencial do controle antifúngico está relacionado à composição química do óleo essencial, bem como à sensibilidade do patógeno a um ou mais constituintes em diferentes quantidades. Assim a identificação de metabolitos secundários nos óleos essenciais com atividade antifúngica constitui uma ferramenta útil para a síntese de novos produtos pela indústria química para a prevenção ao ataque de fungos (HOYOS *et al.*, 2012).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Fluxograma da Metodologia:





mesorregião sudoeste do Estado do Paraná, nas dependências da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR. Os trabalhos foram desenvolvidos nos laboratórios de Fisiologia Vegetal, Laboratório de microbiologia e no laboratório de Bioprocessos e Biotecnologia da própria instituição.

### 4.3 Coleta e preparo das amostras vegetais

A espécie arbórea selecionada para este estudo foi *Pinus*, sendo que as suas acículas foram coletadas na dependência da Universidade Tecnológica Federal do Paraná *Campus* Dois Vizinhos, mais especificamente próximo ao ginásio de esporte da Universidade (Figura 02). As acículas de *Pinus* spp. foram coletadas com auxílio de uma tesoura de poda de 5 m de comprimento (Figura 03), sendo em seguida, trazidas ao laboratório para a realização do preparo das amostras. As amostras de acículas de *Pinus* spp. foram coletadas no período da manhã 07:30 e para o estudo de rendimento do óleo essencial também foi coletado amostras no período da tarde, mais precisamente as 12:30 hrs.

**Figura 02: Área da UTFPR selecionada para a realização da coleta das amostras folhares para a extração do óleo essencial das acículas de *Pinus* spp.**



Fonte: Google Earth, 2021.

**Figura 03: Ferramenta de poda utilizada nas coletas das acículas de *Pinus* spp. para extração do óleo essencial em laboratório.**



Fonte: Google, 2021.



Fonte: Autor. UTFPR – Dois Vizinhos/2021.

As acículas coletadas a campo têm por critérios de seleção apresentar uma coloração de tons verde, evitando aquelas com tonalidades amarronzadas ou que sejam mais velhas, sem a presença de materiais lenhosos e não podendo apresentar impurezas dentro das amostras (Figura 04). Para que posteriormente, possam ser processadas (Figura 04) e servirem de amostras para a extração do óleo essencial, pois assim mitigamos fatores adversos na qualidade do óleo essencial a ser obtido.

**Figura 04: Limpeza e preparo das amostras das acículas de *Pinus* spp..**





Fonte: Autor. UTFPR – Dois Vizinhos/2021.

#### 4.4 Extração e análise de rendimento do óleo essencial

Após coletadas, as acículas ainda frescas de *Pinus* spp. foram fracionadas com cortes em tamanhos de 3 a 5 cm de comprimento (Figura 05), buscando proporcionar melhor manuseio ao inseri-las no balão volumétrico utilizado no aparelho de extração (Figura 05) para facilitar o processo de retirada das acículas de dentro do balão volumétrico após a extração. Posteriormente, foram pesadas em balança semi analítica 350g de amostra de massa verde de acícula, logo após foi adicionado 1 litro de água destilada ao balão volumétrico, em seguida foram submetidas à hidrodestilação por quatro horas em extrator do tipo Clevenger modificado (Figura 06).

**Figura 05: Preparo das acículas de *Pinus* spp. para serem inseridas no balão volumétrico para posteriormente ser utilizado no aparelho extrator do tipo Clevenger.**



Fonte: Autor. UTFPR – Dois Vizinhos/2021.

Posteriormente, através do processo de extração do óleo essencial, foram realizados testes de rendimento, afim de determinar o melhor período de extração buscando obter o máximo rendimento de Óleo essencial das acículas *Pinus* spp. utilizada neste estudo.

**Figura 06: Aparelho de extração de óleo essenciais do tipo Clevenger modificado.**



Fonte: Autor. UTFPR – Dois Vizinhos/2021.

Para a execução da análise de rendimento, buscou-se avaliar a produção eficiente do óleo essencial a partir de diferentes períodos de coleta das acículas de *Pinus* ssp., na qual realizou-se um teste coletando a amostra no período matutino, para em seguida submeter ao processo de extração do óleo.

O arcabouço empregado neste teste, pode ser melhor compreendido observando a Tabela 2, na qual descreve como ficou ordenado cada período de extração, reforçando que nesta etapa as acículas foram colhidas no período da manhã, com um período de extração de quatro horas para cada turno através do extrator de óleo essenciais Clevenger modificado.

**Tabela 2 – Metodologia utilizada na extração e análise de rendimento das amostras das acículas de *Pinus* ssp., amostras colhidas no período da manhã e submetidas a extração do óleo essencial em diferentes períodos.**

Períodos de Extração	Condição	Horários de Extração	Dia da Extração
Matutino	<b>T1</b>	08:00 às 12:00 hrs	17/08/2020
Vespertino	<b>T2</b>	13:00 às 17:00 hrs	17/08/2020
Matutino	<b>T3</b>	08:00 às 12:00 hrs	18/08/2020
Vespertino	<b>T4</b>	13:00 às 17:00 hrs	18/08/2020

Assim, como se realizou a coleta anterior no período matutino buscou-se realizar nova coleta no período vespertino seguindo os mesmos parâmetros realizados anteriormente para a coleta realizada no período da manhã, a disposição dos teste pode ser melhor observado na

Tabela 3, na qual realizou-se as coletas das amostras de acículas entre o intervalo das doze às treze horas para serem beneficiadas em laboratório através do extrator de óleo essenciais Clevenger modificado como descrito anteriormente, porém a extração iniciou-se no mesmo período da coleta, seguindo para o próximo dia no período da manhã, posteriormente no período da tarde e uma última extração no outro dia vindouro no seu período da manhã.

**Tabela 3 – Metodologia utilizada na extração e análise de rendimento das amostras das acículas de *Pinus* spp., amostras colhidas no período da tarde e submetidas a extração do óleo essencial em diferentes períodos do dia.**

Períodos de Extração	Condição	Horários de Extração	Dia da Extração
Vespertino	<b>T5</b>	13:00 às 17:00 hrs	19/08/2020
Matutino	<b>T6</b>	08:00 às 12:00 hrs	20/08/2020
Vespertino	<b>T7</b>	13:00 às 17:00 hrs	20/08/2020
Matutino	<b>T8</b>	08:00 às 12:00 hrs	21/08/2020

Os óleos obtidos foram coletados em Eppendorf® de 2 mL, sendo quantificado o rendimento para cada período de extração, em seguida os mesmos eram envolvidos com papel alumínio para evitar a oxidação, e armazenados em freezer de geladeira. O cálculo do rendimento em óleo essencial foi realizado com base em massa fresca, de acordo com a Equação 1, sugerida por Girard, Koehler e Netto (2007), com modificações.

$$R(\%) = \frac{VOE \cdot d}{B} \times 100$$

Em que  $R$  é o rendimento em OE (%),  $VOE$  é o volume de OE obtido (mL),  $d$  é a densidade do OE avaliado (g/mL) e  $B$  é biomassa vegetal utilizada na análise (g). Para análise da densidade foi utilizada a Equação 2.

$$d = \frac{m}{v}$$

Em que  $d$  é a densidade (g/mL),  $m$  é a massa obtida em gramas na pesagem de 1 mL de OE e  $v$  é o volume de OE utilizado na pesagem.

#### 4.5 Análise da estrutura reprodutiva do fungo *Postia placenta* (Fr.)

A execução deste trabalho foi realizada através da técnica do micro cultivo. Para a realização da análise das estruturas vegetativas do fungo *Postia placenta*, foi preparado 200 mL de meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) esterilizado em placas de Petri®, com fundo composto por papel filtro. Posteriormente foi vertido uma quantidade de meio de cultura em uma placa de Petri®, para em seguida formar os cubos através do meio BDA. Com a

solidificação do meio de cultura, realizou-se cortes retangulares, colocando-se sobre cada lâmina os cubos solidificados do meio BDA. Depois, com auxílio da alça, semeou-se os fungos *Postia placenta* (fr.), formando-se duas repetições, recobrando-os com uma lamínula.

Na sequência adicionou-se 3 mL de água destilada no papel filtro que compõe o fundo da placa, formando-se uma câmara úmida. As placas foram tampadas e acondicionadas em B.O.D., com temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por sete dias, com fotofase de 12 horas até a obtenção das estruturas de crescimento do fungo hifas e esporos. Após atingir os setes dias, retirou-se a lamínula com o auxílio de uma pinça, cuidadosamente, uma vez que é nelas que estão aderidos as hifas e os esporos do fungo.

Posteriormente foi adicionado uma gota de corante azul de lactofenol em nova lâmina e adicionando a lamínula com as estruturas das hifas dos fungos, formando-se a lâmina de interesse. Na lâmina onde cresceu o fungo com o meio com agar, se desprezou o cubo e, em seu lugar, pingou outra gota de corante azul e recobriu com lamínula tendo assim duas lamínulas preparadas para serem analisadas. Os esporos e as hifas, foram observados com auxílio do microscópio óptico Zen através do software ZEN- ZEISS, as estruturas reprodutivas do fungo foram observadas na objetiva de 40x, sendo assim fotografadas as estruturas de interesse.

#### **4.6 Concentração Inibitória Mínima - CIM**

Com o intuito de avaliar o potencial antifúngico do óleo essencial contra o fungo *Postia placenta* (fr.), foi utilizada a metodologia de Microdiluição em caldo em placas de 96 poços para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Os procedimentos experimentais envolvidos na determinação da CIM do óleo essencial das acículas de *Pinus* ssp. contra o fungo *P. placenta*, foi utilizada a norma M7-A6 (*Methodology for Agent Sensitivity Tests Antimicrobials by Dilution for Bacteria Aerobic Growth*) do CLSI (*Clinical & Laboratory Standards Institute*) (2003), com algumas adaptações. Onde os fungos foram cultivados em meio de B.D.A e mantida em B.O.D. a  $25^{\circ}\text{C}$  com fotofase de 12 horas, por período mínimo de sete dias, ou até a obtenção de esporulação, a qual foi acompanhada e monitorada periodicamente.

Posteriormente, sobre a colônia desenvolvida em placa de Petri<sup>®</sup>, adicionou-se 10 mL de água destilada estéril (formulada com 0,85% NaCl + 1% Tween<sup>®</sup> 80) e com o auxílio de uma colher estéril, foi realizado uma “raspagem” na mesma a fim de desprender as estruturas reprodutivas do fungo *P. placenta*. Foi então realizada filtração da solução fúngica em gaze estéril a fim de produzir solução livre de estruturas indesejadas.

Realizou-se a contagem das estruturas reprodutivas (conídios) com o auxílio de Câmara de Neubauer (hematocitômetro), sendo o inóculo posteriormente padronizado a fim de se obter solução com  $1 \times 10^6$  UFC/mL. Colocou-se meio de cultura + óleo essencial + Tween<sup>®</sup> 80 (1%) por meio da metodologia de micro diluição em caldo, após o ajuste da solução fúngica, os mesmos foram dispostos em microplacas de Elisa com 96 poços.

Para montagem do teste, foi adicionado na primeira coluna nos poços A, B e C (Figura 07) 200  $\mu$ L da solução do óleo essencial preparado em meio caldo de cultura. Nas demais poços (colunas 2-12), foi adicionado 100  $\mu$ L de meio de cultura caldo batata-dextrose. Após, realizou-se sucessivas diluições, retirando 100  $\mu$ L de extrato da primeira coluna (poço 1) e transferiu-se para o segundo poço, foi homogeneizada a solução e novamente retirado 100  $\mu$ L do segundo poço e transferido para o terceiro.

Este processo foi repetido até o último poço (12), onde após homogeneizado, foi removido 100  $\mu$ L da solução e descartado a mesma. Com as soluções diluídas, foi adicionado 20  $\mu$ L de solução fúngica já ajustada anteriormente em cada poço (Colunas 1-12). Para cada coluna foram realizadas triplicatas. A ordem de montagem das placas está detalhada na Figura 07.

**Figura 07: Demonstrativo de como foi posicionado as concentrações contendo as soluções de interesse na Placa de Elisa utilizada, para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).**



Fonte: Autor. UTFPR – Dois Vizinhos/2021.

Como controle, foi utilizado o cultivo do microrganismo (coluna G) através do meio de cultura mais o inóculo, o extrato puro (coluna G). Foi realizado teste com adição apenas do caldo, inóculo e Tween<sup>®</sup> 80 (coluna H), a fim de eliminar a hipótese de que o emulsificante possua algum efeito antifúngico.

Após a montagem, as placas foram armazenadas em /câmara do tipo B.O.D. à 25 °C e com fotoperíodo de 12 horas por 72 horas. Posteriormente, foi adicionado em todos os poços 20 µL de solução de resazurina sódica 0,01%, o qual indica a presença de células vivas. As avaliações foram realizadas de acordo com coloração dos poços, onde a cor rosa ou com tons avermelhadas indicam a atividade respiratória celular, sugerindo a presença microbiana ativa. Já para as colorações azuis, caracteriza a inatividade ou revela a morte celular do micro-organismo presente naquele poço.

#### 4.7 Análise do ataque do fungo *Postia placenta* (Fr.) em madeira de *Pinus* spp.

No estudo foram utilizadas madeiras de *Pinus* spp. tanto para a elaboração do suporte ao qual recebe o fungo de interesse, como os próprios corpos de provas testados com a aplicação do óleo essencial das acículas de *Pinus* spp.. O ensaio de apodrecimento acelerado foi conduzido no Laboratório de Microbiologia e o Laboratório de Fisiologia Vegetal, conforme a ASTM D 2017 – 05 (ASTM, 2005) com adaptações. Os corpos de provas devem ser imediatamente seca em uma câmara de secagem (65 °C) sem tratamento prévio, a massa específica aparente a 12% de umidade foi determinada a partir da massa e volume das amostras tomados após estabilização da umidade de equilíbrio das mesmas em câmara climatizada (Figura 08) à temperatura de  $20 \pm 2$  °C e umidade relativa de  $65 \pm 5\%$ .

**Figura 08:** Corpos de prova confeccionadas a partir da madeira de *Pinus* spp., sendo secados na câmara de secagem climatizada com circulação de ar.



Fonte: Autor. UTFPR – Dois Vizinhos/2021.

As amostras da madeira de *Pinus* spp. foram confeccionadas em pequenos blocos de madeira com dimensões de 25x25x9 mm (comprimento, largura e espessura), com tudo a madeira selecionada deve estar livre de nós e sem concentrações visíveis de resinas, e não deve mostrar evidências visíveis de colonização por fungos, manchas ou qualquer outro tipo de fungo (Figura 09).

**Figura 09: Demonstração dos corpos de provas após serem dimensionados e identificados para serem levados a estufa de secagem com circulação de ar forçada.**



Fonte: Autor. UTFPR – Dois Vizinhos/2021.

As amostras foram secas em estufa com circulação forçada de ar a  $50 \pm 2$  °C até massa constante (Figura 10). Para pesagem utilizou-se balança de 0,0001 g de precisão. Antes da exposição aos fungos as amostras foram condicionadas dentro de sacos plásticos e levados para esterilização em autoclave a 127 °C por 40 minutos.

**Figura 10: Demonstração dos corpos de provas na estufa de secagem com circulação de ar forçada.**

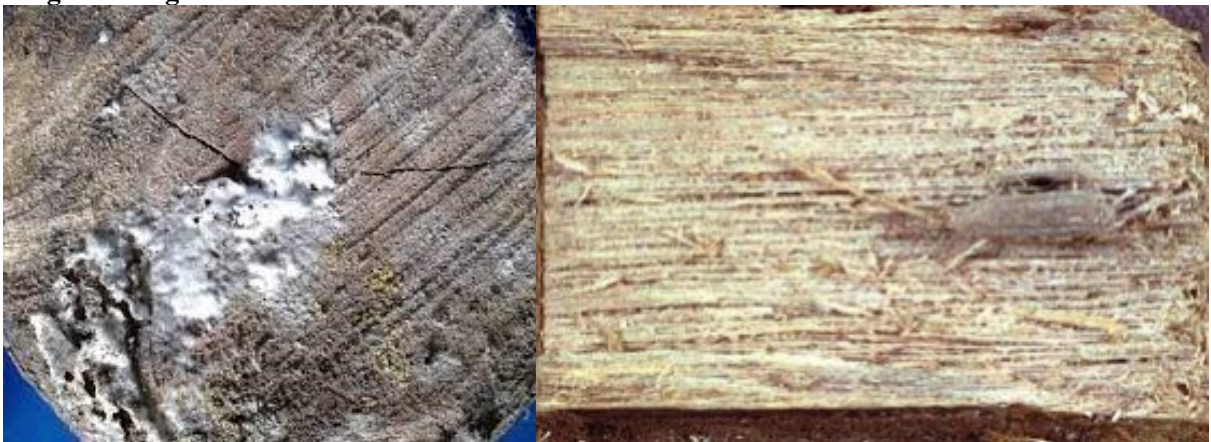


Fonte: Autor. UTFPR – Dois Vizinhos/2021.



Foi utilizado neste trabalho a inoculação do fungo xilófago *P. placenta* causador de podridão branca na madeira (Figura 11) como agente degradador da madeira. O fungo foi repicado em meio de cultura de B.D.A. e levado e mantida em B.O.D. ( $25 \pm 2$  °C e  $70 \pm 5\%$  de umidade relativa com fotoperíodo de 12 horas) até o micélio recobrir totalmente a superfície do meio (três semanas). No momento da inoculação o micélio foi fragmentado para facilitar o trabalho. Todas as operações de manipulação de fungos foram efetuadas assepticamente em capela de fluxo laminar vertical.

**Figura 11: Demonstração dos efeitos da podridão branca na madeira, causados pela presença dos fungos xilófagos.**

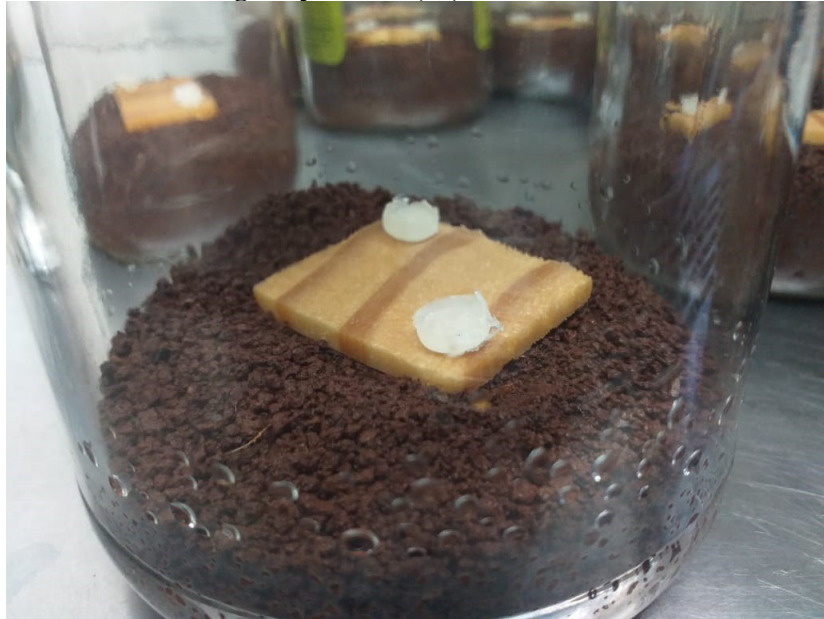


Fonte: Google imagens, 2021.

Os ensaios foram montados em frascos de vidro transparente com boca larga, tampa rosqueável, com capacidade de 250 mL, contendo 100 g de solo (horizonte B) peneirado (abertura de malha de 2 mm) livre de matéria orgânica. A sua umidade foi ajustada para 130% da capacidade de retenção de água com a adição de 34 mL de água deionizada por frasco. Em cada frasco, sobre o solo, foi colocada uma placa suporte com dimensões de  $35 \times 29 \times 3$  mm, sendo de alburno de *Pinus* spp..

A seguir os frascos foram autoclavados a 127 °C por 45 minutos e após o resfriamento em cada frasco foram inoculados com pequenos discos difusores do meio de cultura contendo o micélio do fungo *P. placenta* (Figura 12). Posteriormente, os frascos foram levados à B.O.D. ( $25 \pm 2$  °C e  $70 \pm 5\%$  de umidade relativa com fotoperíodo de 12 horas) até o micélio cobrir completamente a placa suporte (aproximadamente quatro semanas).

**Figura 12:** Placas de suporte recebendo a inoculação com pequenos discos difusores do meio de cultura contendo o micélio do fungo *P. placenta* (fr.).



Fonte: Autor. UTFPR – Dois Vizinhos/2021.

Enquanto se aguarda os suportes que receberam as amostras com as devidas concentrações serem colonizados pelo fungo *P. placenta*, realizou-se a confecção de uma curva de absorção através da imersão (Figura 13), com o intuito de determinar um tempo ideal para imergir os corpos de provas nas soluções contendo as concentrações de óleo essencial de acículas de *Pinus* ssp. determinada na análise da CIM, anteriormente já realizada.

**Figura 13:** Realização de um teste de absorção dos corpos de provas, com objetivo de obter um tempo aproximado de imersão nas soluções contendo as concentrações de óleo essenciais.



Fonte: Autor. UTFPR – Dois Vizinhos/2021.

Após a colonização das placas suporte de todos os frascos, levou-se os materiais para a capela de fluxo laminar (Figura 14), para a montagem do experimento, a onde foi adicionado um corpo de prova em cada frasco. Posteriormente as amostras foram mantidas em B.O.D. ( $25 \pm 2$  °C e  $70 \pm 5\%$  de umidade relativa com fotoperíodo de 12 horas). As amostras permaneceram em contato com os fungos na incubadora por 16 semanas.

**Figura 14: Realização da montagem do experimento, aonde os corpos de provas foram submergidos em cada soluções contendo as concentrações de óleo essenciais das acículas de *Pinus* spp.**



Fonte: Autor. UTFPR – Dois Vizinhos/2021.

Após passar o período de avaliação do experimento do ataque do fungo *P. placenta* em madeira de *Pinus* spp. as amostras foram retiradas dos seus respectivos frascos de ensaio. O micélio aderido foi suavemente removido e os corpos de prova foram novamente aclimatizados e pesados sob as mesmas condições anteriores ao teste. Por meio da diferença de massa seca inicial e a final, na qual obtem-se a perda de massa e assim, conseguimos determinar qual das concentrações de óleo essencial extraídos das acículas de *Pinus* spp. alcançaram melhores resultados.

A amostra de madeira de *Pinus* spp. foi avaliada quanto ao índice de susceptibilidade ao ataque do fungo xilófago *P. placenta* (fr.), que relaciona a perda e massa de uma determinada

espécie de interesse. Foram ensaiadas 20 amostras por tratamento testados a partir das concentrações obtidas pelo teste da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

#### **4.8 Análise estatística**

Observou-se que não houve diferença estatística entre si após ser realizado a análise de variância entre os tratamentos. Realizou-se então, algumas transformações com: BoxCox, Raiz Quadrada, Log, Seno e Coseno, porém, nenhuma das transformações deram normalidade dos dados. Por isso, optou-se por usar um teste não paramétrico (Kruskal Wallis) a 5% de significância e posteriormente o teste Dunn para comparação de médias.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Extração e análise de rendimento do óleo essencial

Para a etapa comparativa entre os períodos de extração das acículas de *Pinus* spp., observou-se o bom rendimento em ambos períodos de extração (matutino e vespertino), e a partir da extração do óleo essencial, através do auxílio do cálculo de massa, possibilitou ajustar e calcular a porcentagem de rendimento da extração nos diferentes períodos, chegando aos valores observados na Tabela 4.

Os melhores resultados foram obtidos quando as acículas de *Pinus* spp. são coletadas e já beneficiadas imediatamente, ou seja, quanto mais rápido submeter ao processo de extração mais ganho de óleo essencial se obtém, comparando esse fator, acaba se destacando principalmente os períodos da tarde, onde foi realizado a coleta da amostra e logo submetida ao processo de extração. No período matutino a quantidade de óleo obtido foi 6,40 % maior que período vespertino. Porém, para o rendimento o período vespertino foi 9,25 % maior que o matutino de acordo com as fórmulas demonstrada na metodologia.

**Tabela 4 – Quantidade obtida e porcentagem de rendimento dos óleos essenciais extraídos de acículas de *Pinus* spp. nos diferentes períodos de extração.**

<b>Condição:</b>	<b>Qnt. Obtida (ml)</b>	<b>Rendimento (%)</b>	<b>Condição:</b>	<b>Qnt. Obtida (ml)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<b>T1</b>	0,7391	0,3645	<b>T5</b>	1,4049	0,8109
<b>T2</b>	0,8108	0,7328	<b>T6</b>	1,3239	0,4865
<b>T3</b>	0,7931	0,3460	<b>T7</b>	0,1401	0,5309
<b>T4</b>	0,8789	0,5494	<b>T8</b>	0,1468	0,3674
<b>Total:</b>	3,2219	1,9928	<b>Total:</b>	3,0157	2,1957

Porém as acículas colhidas no período da manhã, mantiveram seu rendimento constante em comparação com a coleta da amostra no período da tarde. Por este fator comparando-se o resultado final da quantidade total obtida de óleo essencial, notamos que quando executamos a coletas de manhã conseguimos obter um volume melhor dos óleos essenciais das acículas, quando comparado com o período vespertino, resultados próximos encontrado por Zheljzkov; Astatkie; Schlegel (2012) com a espécie de *Pinus ponderosa*. Contudo, as acículas colhidas no período da tarde apresentaram um maior rendimento em relação ao período de coleta realizado de manhã, o que pode ser observado pelos altos valores obtidos nos tratamentos T5 e T6.

Oliveira *et al.* (2011) encontraram resultados próximos com a extração de óleo essencial de espécies de citronelas (*Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon nardus*) resultado expresso em seu trabalho, através das médias dos seus resultados. Antonelo (2021) obteve rendimentos de

extração de óleo essencial variando entre 0,015% para *Calypttranthes concinna*, (guamirim-facho) até 0,817% para *Myrcia oblongata* (guamirim) testando a avaliação do rendimento em termos de óleos essenciais de algumas espécies da família Myrtaceae.

Segundo Burt (2004), podemos encontrar variações no rendimento de óleo essencial entre plantas pertencentes à mesma espécie, o que podem ser atribuídas, principalmente, nas diferenças de épocas de colheita da matéria prima a ser submetida a extração do óleo essencial, os tipos de solo ao qual a espécie se encontra, o clima da região e até mesmo a umidade relativa do ar.

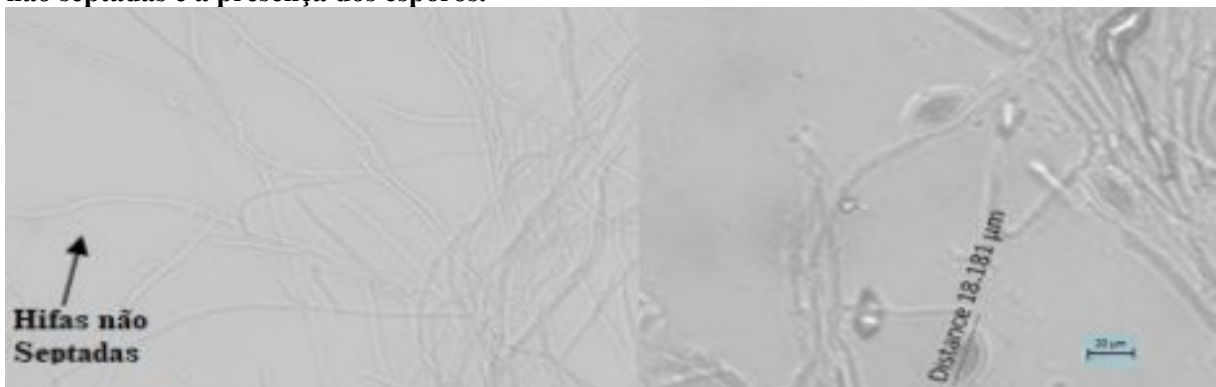
Outro fator que pode ter interferido no bom rendimento do óleo essencial de *Pinus* ssp. é o menor conteúdo de água presente em suas folhas (acículas), devido o tempo de inatividade, o que permite que a corrente de vapor gerada no extrator possa arrastar com mais eficiência as substâncias voláteis armazenadas nas células do material ainda verde (GASPARIN *et al.*, 2014).

De uma forma geral, os resultados obtidos experimentalmente neste trabalho foram satisfatórios, pois superou em larga escala de rendimento quando comparado com outros trabalhos relatados na literatura, sendo que a variação interespecífica do rendimento em termos de óleo essencial é um fenômeno ocorrente em inúmeros grupos taxonômicos.

## 5.2 Análise da estrutura reprodutiva do fungo *Postia placenta* (Fr.)

Através da observação no microscópio óptico por meio do software ZEN- ZEISS, pode verificar a presença de estruturas vegetativas do fungo *P. placenta* (Figura 15), notando-se a presença das suas estruturas de crescimento.

**Figura 15 – Fotomicrografia das estruturas de crescimento do fungo *Postia placenta*, com hifas não septadas e a presença dos esporos.**



Fonte: Autor. UTFPR – Dois Vizinhos/2021.

A identificação fúngica é realizada principalmente através das suas estruturas reprodutivas, como por exemplo, a presença de hifas e dos esporos. Mesmo a técnica do micro

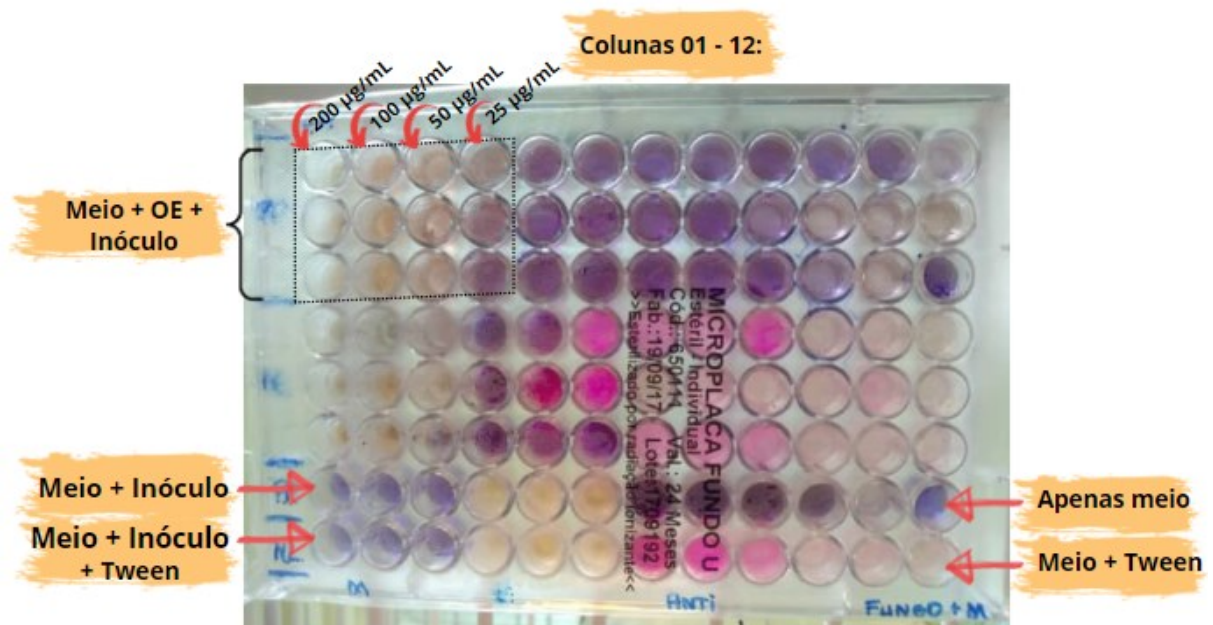
cultivo já ser uma técnica consolidada na área da biotecnologia, para este estudo se fez necessário a identificação das estruturas vegetativas e reprodutivas desse micro-organismo devido a escassez de informação na literatura.

Observou-se que os esporos do fungo *P. placenta* são menores com presença de hifas não septadas nas suas estruturas de crescimento, o que acaba auxiliando na identificação desse micro-organismo. Enaltecendo ainda mais a relevância desse estudo, uma vez que, trabalhos que analisa a estrutura reprodutiva do fungo *P. placenta*, ainda é escasso encontrar resultados em literatura que possibilite localizar imagens realizadas por microscópio a presença dessas estruturas vegetativas deste fungo.

### 5.3 Concentração Inibitória Mínima – CIM

Após a microdiluição avaliando o fungo *P. placenta* na placa de Elisa, foi adicionado a resazurina sódica para evidenciar a atividade microbiana em cada tubo presente na placa. A resazurina é um corante que evidencia a presença de crescimento microbiano, sendo um indicador de oxidorredução, em que a coloração azul indica ausência de crescimento microbiano, enquanto que a cor vermelha representa a presença de células viáveis em crescimento, dessa maneira, é possível determinar a menor concentração de óleo capaz de inibir o crescimento dos micro-organismos utilizados no teste. (Bonan et al., 2010).

**Figura 16 – Determinação das concentrações inibitória mínima testadas em placa de Elisa através do óleo essencial frente ao fungo *Postia placenta* (fr.).**



Fonte: Autor. UTFPR – Dois Vizinhos/2021.

Os resultados do teste de Concentração Inibitória Mínima do óleo essencial de acículas de *Pinus* spp., apresentou um excelente potencial antifúngico frente ao fungo *Postia placenta* (fr.). Para este teste, todas as concentrações exerceram atividade inibidora do crescimento microbiano, por terem apresentado uma coloração azulada.

Porém, devido ao fato da rápida oxidação da resazurina, as primeiras quatro colunas cujas as concentrações são de 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL e 25 µg/mL, posteriormente apresentou uma abrupta descolorização, sendo assim, decidiu-se selecionar essas quatro concentrações para ser testadas neste trabalho, buscando averiguar se houve algum outro fator responsável por trás deste acontecimento.

#### 5.4 Análise do ataque do fungo *P. placenta* em madeira de *Pinus* spp.

Em seguida, são apresentados os resultados e discussão sobre a caracterização das amostras ao qual receberam as concentrações do óleo essencial das acículas de *Pinus* spp., atuando como um preservante sobre a superfície da madeira *Pinus* spp.. Demonstrando os resultados das médias, devido as percas de massa entre as amostras obtidas após o fim do experimento (Tabela 05). Ao analisar os resultados médios de perda de massa entre as médias do peso final para os testes com o fungo *P. placenta*.

**Tabela 5 – Análise de variância obtida a partir das médias do peso final para cada concentrações aplicadas nos tratamentos utilizado neste trabalho.**

Tratamentos	Concentração de OE (µg/mL)	Médias Peso final <sup>ns</sup>
T1	200	3,149540
T2	100	3,027044
T2	50	3,075829
T4	25	3,082211
T5	0	2,956356

NS - Não significativo, CV = 8,25 %.

Devido as médias do peso final não apresentarem um resultado significativo entre si, pois não foi o suficiente para apresentar diferença estatisticamente significativa a 5% de probabilidade. Realizou-se uma segunda análise testando as médias dos pesos obtidas antes do tratamento, com as médias dos pesos das amostras após a realização do tratamento com as concentrações de óleo essencial, resultado este que podem ser observados a seguir na Tabela 06. Nesta análise realizou-se o teste apenas entre os pesos iniciais e finais de cada tratamento.



**Tabela 6 – Valores médios de massa específica aparente a 12% de umidade por tratamento, antes e posteriormente serem submetidas à ação do fungo de podridão branca (*P. placenta*).**

Tratamento	Concentração de OE (µg/mL)	Peso Inicial	Peso Final (g)	p valor*
T1	200	3,2	3,1	> 0,05
T2	100	3,1	3,0	> 0,05
T3	50	3,1	3,1	< 0,05
T4	25	3,2	3,1	< 0,05
T5	0	3,2	2,8	< 0,05

\* Significativo a 5 % pelo Teste de Wilcoxon ( $p \leq 0,05$ ).

Com isso podemos observar que para os tratamentos (T1 e o T2) com as maiores concentrações de óleos essenciais, apresentaram valores das médias diferentes entre o peso inicial comparado com o peso final, por que apresentou valor menor que  $< 0,05$ . O que não ocorreu no tratamento considerado como testemunha, pois apresentou uma menor perda de massa, algo já esperado pois o mesmo não recebeu nenhuma aplicação de óleo essencial.

Através dos dados estatísticos que apresentaram diferença entre os pesos inicial e final de cada tratamento, visualmente também pode-se notar a importância de se realizar algum tratamento contra o ataque de fungos xilófagos (Figura 17), como este tratamento testado neste caso para o fungo de podridão branca *P. placenta* (fr.).

**Figura 17 – Imagens do fungo *P. placenta* (fr.) nas amostras de *Pinus* ssp. sem nenhum tratamento (A) e com a presença de óleo essencial (B) na superfície da madeira.**

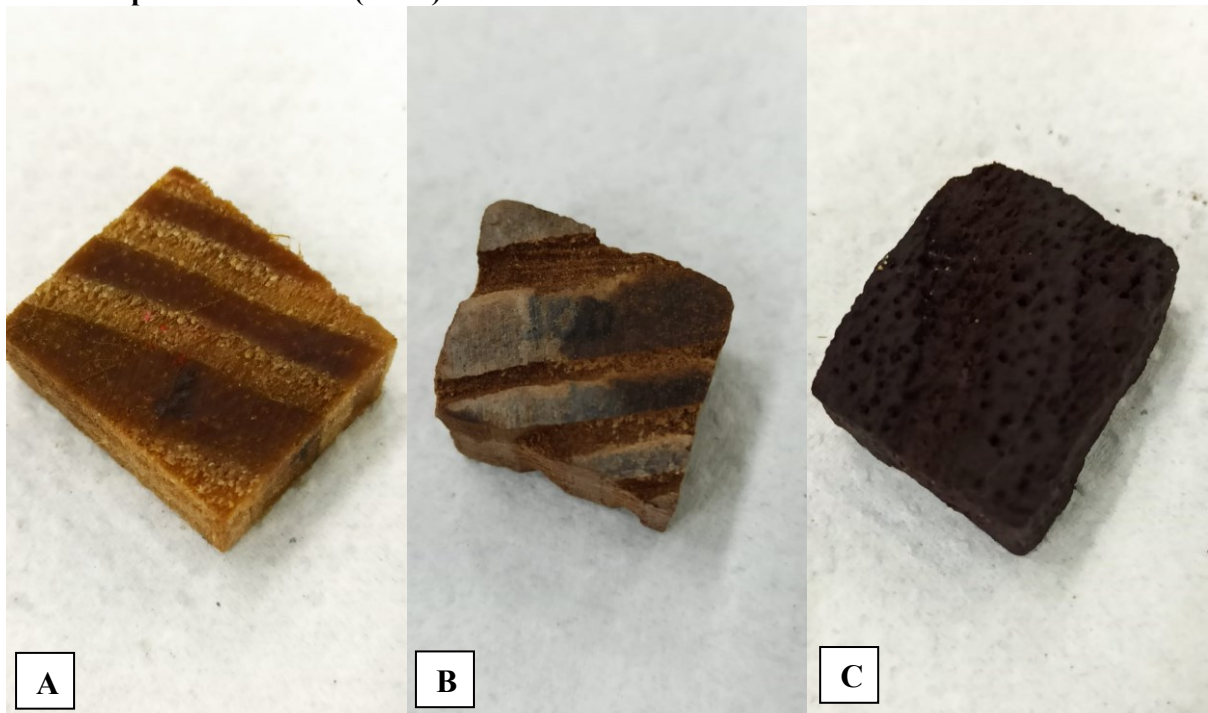


Fonte: Autor. UTFPR – Dois Vizinhos/2021.

Após o período de 16 semanas, as amostras foram retiradas dos frascos de ensaio, e o micélio do fungo *P. placenta* aderido na superfície da madeira foi suavemente removido.

Constatando que as amostras de *Pinus* spp. utilizadas neste estudo submetidas em diferentes concentrações de óleo essencial, diferiram entre aquelas que receberam a adição do óleo essencial em sua superfície, daquelas amostras que não teve nenhuma adição (testemunha), pelo elevado nível de degradação observadas nas amostras (Figura 18), sendo o único tratamento que teve mais perda de massa através dos valores das médias finais.

**Figura 18 – Demonstração dos corpos de provas de *Pinus* spp. após permaneceram em contato com os fungos na B.O.D. ( $25 \pm 2$  °C e  $70 \pm 5\%$  de umidade relativa com fotoperíodo de 12 horas) por 16 semanas. Amostra com a presença de óleo essencial na superfície da madeira (A) sem nenhum tipo de tratamento (B e C).**



Fonte: Autor. UTFPR – Dois Vizinhos/2021.

Vários produtos químicos e métodos de tratamento têm sido testados no combate e prevenção desses micro-organismos apodrecedores, sendo que os primeiros a serem sintetizados para essa finalidade foram aqueles à base de sais de sódio de fenóis clorados, como o pentaclorofenato e tetraclorofenato de sódio (COSTA, 1999).

Como por exemplo o estudo apresentado por Ziglio (2015), que através das amostras de madeira de *Pinus* sp. ao serem tratadas com preservantes extraídos da pimenta *Bhut jolokia*, demonstrou um retardo no desenvolvimento dos fungos *Paecilomyces variotti* e *Pycnosporus sanguineus*, fato este devido ao seu maior grau de pungência (alto teor de capsaicina). No mesmo estudo, as amostras com teor de umidade igual a 0% se mostraram menos susceptíveis

ao desenvolvimento dos fungos e mais protegidas quando comparadas às amostras com teor de umidade 12%.

Vários produtos e métodos de tratamento têm sido testados no combate e prevenção de micro-organismos apodrecedores, sendo que os primeiros a serem sintetizados para essa finalidade foram aqueles à base de sais de sódio de fenóis clorados, como o pentaclorofenato e tetraclorofenato de sódio (COSTA, 1999). Segundo Moreschi (2013), o controle da deterioração de madeiras suscetíveis a fungos é normalmente feito com o uso de produtos químicos, tóxicos aos organismos adaptados a este tipo de substrato. No entanto, a simples manipulação das variáveis necessárias para o desenvolvimento de fungos na madeira é uma das alternativas existentes e pode ser uma prática economicamente viável.

Propõe-se a aplicação de preservantes elaborados através das concentrações do óleo essencial extraído das acículas de *Pinus ssp.*, que posteriormente podem ser aplicados em superfícies de madeira, buscando evitar a proliferação do fungo *Postia placenta* (fr.) devido aos bons resultados obtidos neste trabalho.

## 6 CONCLUSÃO

- **Extração e análise de rendimento do óleo essencial**

O rendimento da extração de óleos essenciais das acículas de *Pinus* spp. deve-se proceder com a coleta no período da manhã, ficando recomendado através dos resultados obtidos que as amostras sejam coletadas e já submetidas ao processo de extração imediatamente.

- **Análise da estrutura reprodutiva do fungo *P. placenta* (Fr.)**

Através da observação por meio da microscopia, foi possível visualizar as estruturas vegetativas do fungo *P. placenta* (fr.), além da presença das suas hifas bem definidas e a presença de esporos.

- **Concentração Inibitória Mínima – CIM**

As análises da Concentração Mínima Inibitória indicaram que todas as concentrações diluídas em placas de Elisa tiveram efeitos significativos para o controle do fungo *P. placenta* para o uso do óleo essencial extraído das acículas de *Pinus* spp..

- **Análise do ataque do fungo *P. placenta* (Fr.) em madeira de *Pinus* spp.**

As concentrações utilizadas de óleo essencial extraídos das acículas de *Pinus* spp., apresentaram efeitos significativos no controle do crescimento do fungo *P. placenta*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJAYI, E. O.; SADIMENKO, A. P.; AFOLAYAN, A. J.; **GC–MS evaluation of Cymbopogon citratus (DC) Stapf oil obtained using modified hydrodistillation and microwave extraction methods.** Food Chemistry 209, p. 262-266, 2016.

**American Society for Testing and Materials - ASTM.** ASTM D-2017: standard method of accelerated laboratory test of natural decay resistance of woods. Philadelphia;. 5p. Annual Book of ASTM Standard, 2005.

ANDRADE, M. A.; CARDOSO, M. das G.; BATISTA, L. R.; MALLET, A. C. T.; MACHADO, S. M. F.; **Óleos essenciais de Cymbopogon nardus, Cinnamomum zeylanicum e Zingiber officinale: composição, atividades antioxidante e antibacteriana.** Revista Ciência Agronômica, v. 43, n. 2, p. 399-408, abr-jun, 2012.

ANDRADE, P. M. DE; ALCOBA, A. E. T.; MELO, D. C. DE; JÚNIOR, W. G. F.; MIRANDA, M. L. D.; **Óleos Essenciais: Extração, Importância e Aplicações,** 8ª Jornada Científica e Tecnológica do IFSULDEMINAS, 5ª Simpósio de Pós-Graduação, 2016.

ANTONELO, F.A.; **Óleos essenciais de espécies nativas de myrtaceae: Caracterização química e atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica.** Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos – PR. 2021.

BAHIA, M. S. **Biodeterioração e a durabilidade da madeira: estudo de aspectos construtivos em Campo Mourão-PR.** Universidade Tecnológica Federal Do Paraná Departamento Acadêmico de Engenharia Civil curso de Engenharia Civil. Campo Mourão - PR, 2015.

BARILLARI, C. T.; **Durabilidade da madeira do gênero Pinus tratada com preservantes: Avaliação em campo de apodrecimento.** Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP, p. 68, 2002.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J.; **Anal. Biochem.**, 239, 70, 1996.

BERNARDI, C. **Caracterização química e potencial biotecnológico do extrato de alcachofra (Cynara scolymus L.) no tratamento de sementes.** 2020. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C.; **LWT -- Food Sci. Technol.**, p. 28, 25, 1995.

BURT, S. **Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review.** International Journal of Food Microbiology, v.94, n.3, p.223-53, 2004.

CI FLORESTAS – Centro de Inteligência em Florestas. **Pinus.** 2008. Disponível em: ><http://www.ciflorestas.com.br/texto.php?p=pinus><. Acessado em: 02/10/2017.

CASAVECCHIA, B. H.; SOUZA, A. P.; STANGERLIN, D. M.; MELO, R. R. **Potencial de ataque fúngico para madeiras no estado do Mato Grosso**. *Nativa*, Sinop, MT. *Pesquisas Agrárias e Ambientais*. v.4, n.3, p.156-161, 2016.

COSTA, A. F.; **Utilização de interações entre produtos químicos preservantes no desenvolvimento de formulações para a prevenção de fungos manchadores e emboloradores na madeira**. Dissertação (Doutorado em Ciências Florestais), Universidade Federal do Paraná – UFPR. Laboratório de Tecnologia da Madeira, Curitiba – PR, p. 01 - 115, 1999.

DESIGNATION: D1413 – 07<sup>1</sup>; **Standard Test Method for Wood Preservatives by Laboratory Soil-Block Cultures**. Editorial corrections were made throughout in April 2008.

DESIGNATION: D 2017 – 05; **Standard Test Method of Accelerated Laboratory Test of Natural Decay Resistance of Woods**. This standard is issued under the fixed designation D 2017.

ELANSARY, H. O.; SALEM, M. Z.; ASHMAWY, N. A.; YACOUT, M. M. **Chemical Composition, Antibacterial and Antioxidant Activities of Leaves Essential Oils from *Syzygium cumini* L., *Cupressus sempervirens* L. and *Lantana camara* L. from Egypt**. *Journal of Agricultural Science*, v. 4, n. 10, p. 144–152, 2012.

FACCIO, M. L. R.; **Importância do gênero *Pinus* spp. para o setor madeireiro no Brasil**. Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba – PR. Trabalho de Conclusão de Curso TCC, p. 10 – 62. Dezembro, 2010.

FIORIO, J. L.; DALPOSSO, P. V.; **A química dos óleos essenciais no ensino médio**. Trabalho de conclusão de curso, apresentado à Comissão de Diplomação do Curso de Licenciatura em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Pato Branco, como requisito parcial para obtenção do título de Licenciado em Química. p. 01-45, 2011.

FRAGA, D. G.; JÚNIOR, F. G. da S.; GONÇALEZ, J. C.; **Avaliação da polpação soda de *Pinus taeda* com adição de antraquinona**. Congresso IBERO Americano de investigação em celulose e papel. 2002.

GASPARIN, P.P.; ALVES, N.C.C.; CHRIST, D.; COELHO, S.R.M.; **Qualidade de folhas e rendimento de óleo essencial em hortelã pimenta (*Mentha X Piperita* L.) submetida ao processo de secagem em secador de leito fixo**. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.16, n.2, p.337-344, 2014.

GENOVESE, M. I.; SANTOS, R. J.; HASSIMOTTO, N. M. A.; LAJOLO, F. M. **Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas**. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 39, p. 167-169, 2003.

GIRARD, E. A.; KOEHLER, H. S.; NETTO, S. P. **Volume, biomassa e rendimento de óleos essenciais do craveiro (*Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum)**. *Revista Acadêmica Ciência Animal*, v. 5, n. 2, p. 147-165, 2007.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. **The chemistry behind antioxidant capacity assays.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 53, p. 1841–1856, 2005.

HOYOS, J. M. Á.; ALVES, E.; ROZWALKA, L. C.; de SOUZA, E. A.; ZEVIANI, W. M.; **Antifungal activity and ultrastructural alterations in *Pseudocercospora griseola* treated with essential oils.** Revista Ciência Agrotécnica, Lavras, v. 36, n. 3, p. 270-284, maio/jun., 2012.

IBÁ (Indústria Brasileira de Árvores) Poyry Consultoria em Gestão e Negócios Ltda; **O Relatório Ibá 2020.** Indústria Brasileira de Árvores. Disponível em:<[http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA\\_RelatorioAnual2016\\_.pdf](http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2016_.pdf)>. Acessado em: 02/10/2021.

KAWA, M.; SCHAPER, T. D.; DOLLARD, C. A.; SASNER, J. J. **Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 51, p. 1811-1815, 2003.

LORENCETTI, G. A. T.; MAZARO, S. M.; POTRICH, M.; LOZANO, R. L.; BARBOSA, L. R.; LUCKMANN, D.; DALLACORT, S.; **Produtos Alternativos para Controle de *Thaumastocoris peregrinus* e Indução de Resistência em Plantas.** Floresta e Ambiente. v. 22(4): p.541-548, 2015.

MA, X.; WU, H.; LIU, L.; YAO, Q.; WANG, S.; ZHAN, R.; XING, S.; ZHOU, Y.; **Sci. Hortic.** 129, p. 102. 2011.

MAGALHÃES, W. L. E.; **Controle de manchadores e apodrecedores da madeira de pinus.** II Seminário de Atualidades em Proteção Florestal. Controle de Incêndios, Pragas, Doenças e Plantas Invasoras em Áreas Florestais. Blumenau – SC, junho de 2005.

MEZZA, G. N.; BORGARELLO, A. V.; GROSSO, N. R.; FERNANDEZ, H.; PRAMPARO, M. C.; GAYOL, M. F.; **Antioxidant activity of rosemary essential oil fractions obtained by molecular distillation and their effect on oxidative stability of sunflower oil.** Elsevier Food Chemistry 242 (2018) p. 9-15, 2017.

MORAIS, F. M. de; COSTA, A. F.; **Alteração da cor aparente de madeiras submetidas ao ataque de fungos apodrecedores.** Brazilian Journal of Agricultural Sciences, v.2, n.1. p. 11, 2007.

MORESCHI, J. C.; **Biodegradação e preservação da madeira.** Departamento de Engenharia e Tecnologia Florestal da Universidade Federal do Paraná – UTFPR, Ed. 03, p. 28, 2011.

MORESCHI, J. C.; **Biodegradação e preservação da madeira: Biodegradação da Madeira.** Departamento de Engenharia e Tecnologia Florestal da Universidade Federal do Paraná – UTFPR, Ed. 04, v.1, abril de 2013.

NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically:** approved standard. Vollanova, PA, (NCCLS document. M7-A4). 1997.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard** — Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485- 6]. NCCLS,

940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

OLIVEIRA, S. M. M. de; JOSE, V. L. A.; **Processos de extração de óleos essenciais.** Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. Instituto de Tecnologia do Paraná, curso de Química na UFRR, setembro 2007.

OLIVEIRA, M.M.M.; BRUGNERA, D.F.; CARDOSO, M.G.; GUIMARÃES, L.G.L.; PICCOLI, R.H.; **Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*.** Departamento de Ciência dos Alimentos, Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.13, n.1, p.8-16, 2011.

PAES, J. B.; GUERRA, S. C. S.; Da SILVA L. F.; De OLIVEIRA, J. G. L.; TEAGO, G. B. S.; **Efeito do teor de extrativos na resistência natural de cinco madeiras ao ataque de cupins xilófagos.** Revista Ciência Florestal, Santa Maria, v. 26, n. 4, p. 1259 - 1269, 2016.

PEREIRA, R. B.; LUCAS, G. C.; PERINA, F. J.; RESENDE, M. L. V. de; ALVES, E.; **Potential of essential oils for the control of brown eye spot in coffee plants.** Revista Ciência Agrotécnica, Lavras, v. 35, n.01, p. 115-123, 2011.

PIEROZAN, M. K.; PAULETTI, G. F.; ROTA, L.; dos SANTOS, A. C.; LERIN, L. A.; DI LUCCIO, M.; MOSSI, A. J.; SERAFINI, L.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V.; **Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of salvia L. species.** Revista Ciência Tecnológica de Alimentos, Campinas, v. 29, n. 4, p.764-770, out./dez. 2009.

PIRES, T.C.; PICCOLI, R. H.; **Efeito inibitório de óleos essenciais do gênero *Citrus* sobre o crescimento de micro-organismos.** Revista do Instituto Adolfo Lutz, v.71, n.2, p. 378-385, 2012.

RUFINO, Maria do S. M.; et al. **Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS•+.** Comunicado Técnico 128. Embrapa - Fortaleza, CE, 2007.

R Development Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, UR <http://www.r-project.org>.

SANTOS, A. da S.; **Óleos Essenciais: Uma Abordagem Econômica e Industrial;** Rio de Janeiro: Editora InterciênciaLtda, p. 386, 2011.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Jr.; **Am. J. Enol. Vitic.** v.16, p. 158, 1956.

SOLOMONS, T. W. G. **Química orgânica.** v.4. Rio de Janeiro: LTC. 1982.

SOUZA, R. V. **Aspectos ambientais e de custo de produção do sistema plataforma em madeira para habitação de interesse social.** Estudo de caso em Florianópolis. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2013.

SOUZA, R. V.; DEMENIGHI, A. L.; **Tratamentos preservantes naturais de madeiras de floresta plantada para a construção civil.** Artigo Publicado em Mix Sustentável - Edição



05. V.03; n.1, p. 84 – 92, 2017.

SHIMIZU, J. Y. ***Pinus* na Silvicultura Brasileira**. Embrapa Florestas, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Colombo, PR, 2008.

SHIRWAIKAR, A.; SHIRWAIKAR, A.; RAJENDRAN, K.; PUNITHA, I. S. ***In Vitro* Antioxidant Studies on the Benzyl Tetra Isoquinoline Alkaloid Berberine**. Biological and Pharmaceutical Bulletin, v. 29, n. 9, p. 1906–1910, 2006.

SERAFINI, L. A.; DOS SANTOS, A. C. A.; TOUGUINHA, L. A.; AGOSTINI, G.; DALFOVO, V.; **Extrações e aplicações de óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais**. Caxias do Sul – RS, Editora: EDUCS, p.55, 2002.

VIEIRA, L. M.; SOUSA, M. S. B.; MANCINI-FILHO, J.; LIMA, A. D. **Fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* de polpas de frutos tropicais**. Revista brasileira de fruticultura, v. 33, n. 3, p. 888–897, 2011.

ZHELJAZKOV, V. D.; ASTATKIE, T.; SCHLEGEL, V.; **Effects of distillation time on the *Pinus ponderosa* essential oil yield, composition, and antioxidant activity**. HortScience, v.47 (6), p. 785-789, 2012.

ZIGLIO, A. C.; **Oleoresina de capsaicina como preservante natural de madeira de *Pinus* sp. contra a ação de fungos de podridão branca e de podridão mole**. Tese – Programa de pós-graduação em ciências e engenharia de materiais e áreas de concentração em desenvolvimento caracterização e aplicação de materiais. Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, p.103. 2015.