

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Centro de Desenvolvimento Tecnológico**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais**

**Dissertação**



**Biossíntese e caracterização de nanopartículas de óxido de cobre (CuO) e  
óxido de zinco (ZnO) mediada por extratos foliares de *Eucalyptus* sp**

**NIDRIA DIAS CRUZ**

**Pelotas, 2019**

**Nidria Dias Cruz**

**Biossíntese e caracterização de nanopartículas de óxido de cobre (CuO) e óxido de zinco (ZnO) mediada por extratos foliares de *Eucalyptus* sp**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador: Darci Alberto Gatto

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

C955b Cruz, Nidria Dias

Biossíntese e caracterização de nanopartículas de óxido de cobre (CuO) e óxido de zinco (ZnO) mediada por extratos foliares de eucalyptus sp / Nidria Dias Cruz ; Darci Alberto Gatto, orientador. — Pelotas, 2019.

81 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Síntese verde. 2. Óxidos metálicos. 3. Xilófagos. 4. Preservação da madeira. I. Gatto, Darci Alberto, orient. II. Título.

CDD : 620.11063

Nidria Dias Cruz

Biossíntese e caracterização de nanopartículas de óxido de cobre (CuO) e óxido de zinco (ZnO) mediada por extratos foliares de *Eucalyptus* sp

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 18/02/2019

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Darci Alberto Gatto (Orientador)

Doutor em Engenharia Florestal pela Universidade Federal de Santa Maria

---

Prof. Dr. Rogério Antônio Freitag (Banca 1)

Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Maria

---

Dr. André Luiz Missio (Banca 2)

Doutor em Engenharia Florestal pela Universidade Federal de Santa Maria

---

Prof. Dr. Rafael Beltrame (Suplente)

Doutor em Engenharia Florestal pela Universidade Federal de Santa Maria

**Dedico este trabalho aos meus pais  
Cleia e José, por todo o amor e apoio  
que sempre me deram.**

## **Agradecimentos**

Á Deus em primeiro lugar, pela minha existência e por todas as oportunidades de aprendizado e evolução;

A minha mãe, Cleia, por todos os puxões de orelha durante minha vida, que me fizeram ser a pessoa que sou hoje. Serei eternamente grata pela “mãe ruim” que tive, que me ensinou desde cedo a ser independente e caminhar com minhas próprias pernas, mostrando que a vida não é fácil de ser vivida, mas que vale a pena;

Ao meu pai, José Albano, por todo auxílio e incentivo durante a minha vida, espero que este seja mais um motivo de orgulho e sinal de gratidão por tudo;

Ao meu marido, Roger, por aguentar todos os meus surtos, momentos de estresse e não me deixar cair, sabendo que os momentos ruins passarão e que o amor que sentimos permanecerá;

Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos, por serem minha base, a família com a qual eu sei que vou sempre poder contar;

A família do meu marido, que me acolheu e ajuda sempre que pode;

Aos meus amigos, por serem meus eternos apoiadores, por todos os momentos de descontração que me ajudam a erguer a cabeça e seguir em frente. Obrigada por me fazerem acreditar mais em mim mesma;

Á Universidade Federal de Pelotas, ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais e ao curso de Engenharia Industrial Madeireira, pela oportunidade;

Ao Centro de Microscopia do Sul (CEME-SUL) da Universidade Federal do Rio Grande pela disponibilidade da infraestrutura para a realização deste trabalho;

Ao meu orientador, Darci Gatto, por ter confiado e acreditado no meu trabalho.

Aos colegas do grupo Ciência da Madeira, por toda a ajuda. Principalmente ao Ezequiel e Laíse, que desde o início foram a minha alegria, obrigada por toda a ajuda e todas as risadas que tornaram essa jornada mais leve;

**OBRIGADA!**

***“Isso também passará. Não sobrecarregues os teus dias com preocupações desnecessárias, a fim de que não percas a oportunidade de viver com alegria.”***

**(Chico Xavier)**

## RESUMO

**CRUZ, Nidria Dias.** Biossíntese e caracterização de nanopartículas de óxido de cobre (CuO) e óxido de zinco (ZnO) mediada por extratos foliares de *Eucalyptus* sp. 2019. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

O gênero *Eucalyptus* é amplamente difundido por todo o Brasil, correspondendo a aproximadamente 70% da área de florestas plantadas. Isso deve-se a questões de adaptação ao clima e qualidade da madeira proveniente das espécies desse gênero. Entretanto, diversas partes que compõem essas árvores, como as folhas, possuem usos restritos, dificultando sua utilização, salvo as espécies as quais possibilitam a extração dos óleos essenciais. Logo, o objetivo deste estudo foi obter o maior rendimento em compostos fenólicos através da extração aquosa de folhas de *Eucalyptus dunnii* e *Eucalyptus grandis* e, posteriormente, utilizar esses extratos para a biossíntese de nanopartículas (NPs) de óxido de cobre (CuO) e óxido de zinco (ZnO). Os melhores parâmetros de extração de fenólicos obtidos através de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), foram de 80 °C e 75 min para o *E. dunnii* e 72,7 °C e 45 min para o *E. grandis*. Dois métodos de síntese foram utilizados para obter as NPs. No Método I em que a síntese ocorreu a temperatura ambiente por 24 h e as partículas foram apenas secas a 100 °C, não apresentou picos de difração de raio-X, tendo assim comportamento de material amorfo para os dois óxidos. Constatado isso, realizou-se tratamento térmico em forno tipo mufla a 700 °C para o CuO e 500 °C para o ZnO, que passaram a apresentar cristalinidade e diâmetros de partículas de 19,88 e 26,47 nm respectivamente. No Método II, onde se utilizou maior concentração de sal precursor e temperatura de 80 °C por 20 min com agitação magnética vigorosa e posterior queima a 500 °C, as NPs apresentaram comportamento de materiais cristalinos. Os diâmetros foram de 24,72 e 25,28 nm para CuO sintetizado com *E. dunnii* e *E. grandis*, respectivamente, e 32,24 nm para ZnO sintetizada com *E. dunnii*. Através de análises de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) determinou-se que os possíveis compostos envolvidos na síntese e estabilização das NPs são fenólicos, ácidos carboxílicos, álcoois e proteínas. As nanopartículas sintetizadas pelo Método II com extrato de *E. dunnii* foram testadas contra os fungos xilófagos de podridão branca *Trametes versicolor* e *Phanerochaete chrysosporium*, as CuO NPs inibiram entre 98-100% do crescimento do fungo *P. chrysosporium* em todas as concentrações testadas, porém o *T. versicolor* apresentou certa resistência em que a concentração mais alta inibiu 72,7% e a mais baixa apenas 10,87%. As ZnO NPs inibiram 100% o *P. chrysosporium* em todas as concentrações, além de apresentarem maior eficiência contra o *T. versicolor*, inibindo entre 81 e 93% o crescimento do mesmo. Sendo assim, conclui-se que as nanopartículas de óxidos biossintetizados através de extratos fenólicos de folhas de *Eucalyptus* são antifúngicos eficientes, podendo ser futuramente utilizados na preservação da madeira.

**Palavras-chave:** síntese verde, óxidos metálicos, xilófagos, preservação da madeira

## ABSTRACT

**CRUZ, Nidria Dias.** Biosynthesis and characterization of copper oxide (CuO) and zinc oxide (ZnO) nanoparticles using *Eucalyptus* sp. leaf extract. 2019. 81 f. Dissertation (Master Degree in Ciência e Engenharia de Materiais) Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

The *Eucalyptus* genus is widely distributed throughout Brazil, corresponding to approximately 70% of the area of planted forests. This is due to questions of adaptation to the climate and the quality of wood from species of this genus. However, several parts that make up these trees, such as leaves, have restricted uses, difficulting to use them, except for the species that allow the extraction of essential oils. Therefore, the objective of this study was to obtain the highest yield of phenolic compounds through the aqueous extraction of *Eucalyptus dunnii* Maiden and *Eucalyptus grandis* Hill leaves and then to use these extracts for the biosynthesis of copper oxide (CuO) and zinc oxide (ZnO) nanoparticles (NPs). The best phenolic extraction parameters obtained through Rotational Central Compound Design (RCCD) were 80 °C and 75 min for *E. dunnii* and 72.7 °C and 45 min for *E. grandis*. Two methods of synthesis were used to obtain the NPs. In Method I in which the synthesis occurred at room temperature for 24 h the particles were only dried at 100 °C, where were not obtained X-ray diffraction peaks, having thus behavior of amorphous material for the two oxides. Verified this, was carried out thermal treatment in a muffle furnace at 700 °C for CuO and 500 °C for ZnO, which presented crystallinity and particle diameters of 19.88 and 26.47 nm respectively. In Method II, which was used higher concentration of precursor salt, temperature of 80 °C for 20 min with vigorous magnetic agitation and later burning at 500 °C, the NPs presented behavior of crystalline materials. The diameters were 24.72 and 25.28 nm for CuO synthesized with *E. dunnii* and *E. grandis*, respectively, and 32.24 nm for ZnO synthesized with *E. dunnii*. Through Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) analyzes it was determined that the possible compounds involved in the synthesis and stabilization of NPs are phenolic, carboxylic acids, alcohols and proteins. The nanoparticles synthesized by Method II with *E. dunnii* extract were tested against the xylophagous fungi of the white rot *Trametes versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium*. The CuO NPs inhibited between 98-100% of *P. chrysosporium* fungus growth at all concentrations tested, however the *T. versicolor* showed some resistance to the NPs in which the highest concentration inhibited 72.7% and the lowest concentration only 10.87%. The ZnO NPs inhibited 100% *P. chrysosporium* in all concentrations, in addition to being more efficient against the *T. versicolor*, inhibiting between 81 and 93% its growth. Thus, it is concluded that the nanoparticles of oxides biosynthesized through *Eucalyptus* leaves phenolic extracts are efficient antifungal agents, may be used in the future on preservation of wood.

**Keywords:** green synthesis, metallic oxides, xylophagous, wood preservation

## Lista de Figuras

Figura 1 - Crescimento da área de florestas plantadas de <i>Eucalyptus</i> por ano no Brasil .....	15
Figura 2 - Processo esquemático das abordagens de síntese de nanopartículas ....	21
Figura 3 - Métodos de estabilização de nanopartículas .....	22
Figura 4 - Processo de síntese de nanopartículas pela abordagem <i>bottom-up</i> .....	23
Figura 5 - Mudança de coloração após a síntese de nanopartículas de CuO em que (A) é a coloração inicial, (B) após 6h do início da reação e (C) após 24 h. ....	25
Figura 6 - (A) Superfície de resposta e (B) gráfico de contorno ( <i>E. dunnii</i> ) .....	38
Figura 7 - (A) Superfície de resposta e (B) gráfico de contorno ( <i>E. grandis</i> ) .....	42
Figura 8 - Etapas da reação de síntese Método I. (A) acetato de cobre; (B) imediatamente após adição do extrato; (C) 24 h depois. ....	48
Figura 9 - Espectro UV-vis das CuO NPs sintetizadas pelo Método I .....	49
Figura 10 - Micrografias do MET das CuO NPs sintetizadas pelo Método I secas a 100 °C, em que (A) partículas, (B) matéria orgânica .....	50
Figura 11 - Micrografias do MET das CuO NPs sintetizadas pelo Método I após o tratamento térmico a 700 °C .....	50
Figura 12 - Difractogramas do CuO sintetizado pelo Método I antes e depois do tratamento térmico .....	51
Figura 13 - Difractogramas do CuO sintetizadas pelo Método II .....	52
Figura 14 - Espectros FTIR do CuO sintetizado pelo Método I .....	54
Figura 15 - Espectros FTIR do CuO sintetizado pelo Método II .....	54
Figura 16 - Curvas de crescimentos dos fungos (A) <i>T. versicolor</i> e (B) <i>P. chrysosporium</i> tratados com CuO .....	56
Figura 17 - Difractogramas de ZnO sintetizado pelo Método I antes e depois do tratamento térmico .....	62
Figura 18 - Difractograma de ZnO obtido pelo Método I e II .....	63
Figura 19 - Espectros FTIR do ZnO sintetizado pelo Método I e II .....	64
Figura 20 - Curvas de crescimentos dos fungos (A) <i>T. versicolor</i> e (B) <i>P. chrysosporium</i> tratados com ZnO .....	65

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Produtos não madeireiros de florestas plantadas no Brasil e suas aplicações .....	17
Tabela 2 - Pontos para construção da curva padrão de ácido gálico .....	32
Tabela 3 - Níveis codificados e reais das variáveis independentes .....	33
Tabela 4 - Matriz de combinações do DCCR 2 <sup>2</sup> .....	34
Tabela 5 - Matriz de ensaios utilizada no DCCR ( <i>E. dunnii</i> ) .....	35
Tabela 6 - Efeitos das variáveis independentes ( <i>E. dunnii</i> ) .....	35
Tabela 7 - Análise de variância ( <i>E. dunnii</i> ) .....	36
Tabela 8 - Comparação dos resultados experimentais e calculados ( <i>E. dunnii</i> ) .....	37
Tabela 9 - Matriz de ensaios utilizada no DCCR ( <i>E. grandis</i> ) .....	39
Tabela 10 - Efeitos das variáveis independentes ( <i>E. grandis</i> ) .....	40
Tabela 11 - Análise de variância ( <i>E. grandis</i> ) .....	40
Tabela 12 - Comparação dos resultados experimentais e calculados ( <i>E. grandis</i> ) .....	41
Tabela 13 - Grupos funcionais referentes aos picos do espectro FTIR .....	53
Tabela 14 - Inibição do crescimento de fungos xilófagos por CuO sintetizado pelo Método II com extrato de <i>E. dunnii</i> .....	56
Tabela 15 - Inibição do crescimento de fungos xilófagos por ZnO sintetizado pelo Método II com extrato de <i>E. dunnii</i> .....	65

## SUMÁRIO

1 Introdução geral .....	13
2 Revisão da Literatura .....	15
2.1 <i>Eucalyptus</i> .....	15
2.1.1 Extratos de <i>Eucalyptus</i> e suas aplicações .....	17
2.2 Nanopartículas metálicas.....	19
2.2.1 Métodos de síntese de nanopartículas .....	20
2.2.2 Nanopartículas de cobre .....	24
2.2.3 Nanopartículas de zinco.....	26
2.3 Óxidos metálicos na preservação da madeira .....	27
<b>CAPÍTULO 1 – Planejamento experimental para extração de composto fenólicos das folhas de <i>Eucalyptus</i> sp.....</b>	<b>30</b>
1 Introdução .....	30
2 Metodologia .....	31
2.1 Obtenção e processamento das folhas .....	31
2.2 Procedimento de extração .....	31
2.3 Quantificação de fenólicos totais.....	32
2.4 Planejamento experimental para extração de fenólicos .....	33
3 Resultados e discussão .....	35
3.1 <i>Eucalyptus dunnii</i> .....	35
3.2 <i>Eucalyptus grandis</i> .....	39
4 Conclusão.....	42
<b>CAPÍTULO 2 – Biossíntese e caracterização de nanopartículas de óxido de cobre (CuO).....</b>	<b>43</b>
1 Introdução .....	43
2 Materiais e métodos.....	44
2.1 Extração de compostos fenólicos.....	44
2.2 Biossíntese de nanopartículas de CuO .....	44
2.3 Caracterização das nanopartículas.....	45
2.4 Atividade antifúngica contra xilófagos .....	47
3 Resultados e discussão .....	48
3.1 Caracterização .....	48

3.2 Atividade antifúngica.....	55
4 Conclusão.....	58
<b>CAPÍTULO 3 – Biossíntese e caracterização de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO).....</b>	<b>59</b>
1 Introdução .....	59
2 Materiais e métodos.....	60
2.1 Extração de compostos fenólicos.....	60
2.2 Biossíntese de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO).....	60
2.3 Caracterização das nanopartículas.....	61
3 Resultados e discussão .....	61
3.1 Caracterização .....	61
3.2 Atividade antifúngica.....	64
4 Conclusão.....	67
Considerações finais .....	68
Referências .....	69

## 1 Introdução geral

O Brasil é referência mundial em florestas plantadas e a colheita destas florestas gera resíduos, dos quais a maior parte é formada por folhas, galhos e cascas somando quase 40 milhões de toneladas no ano de 2014 (IBÁ, 2015). Muitos estudos estão sendo realizados visando o aproveitamento desses resíduos para a geração de energia (cascas e galhos) e manutenção dos nutrientes do solo (todos os resíduos).

O gênero *Eucalyptus* ocupa mais de 72% da área total de florestas plantadas em território nacional (IBÁ, 2017). As folhas deste gênero, apesar de possuírem grande importância para a devolução de nutrientes ao solo, representam pequena parte da massa utilizada para tal fim, além de existirem outros resíduos florestais e industriais podem exercer esse papel com maior eficiência (Ferreira, 2012; Paes et al., 2013). Este fato permite a utilização das folhas para outras finalidades, como a extração de óleos essenciais e compostos fenólicos que possuem diversas aplicações nas indústrias de higiene, limpeza, cosméticos e fármacos (CIB, 2008).

Os constituintes das folhas, além de possuírem aplicações nas indústrias já citadas, também são capazes de mediar a redução de sais metálicos em solução aquosa, gerando a biossíntese de nanopartículas metálicas. Segundo Rocha (2010), utilizar a química verde aliada a nanotecnologia pode diminuir os impactos a saúde humana e ao meio ambiente, através da utilização de rotas de síntese que não necessitem de redutores químicos, solventes ou surfactantes, eliminando os resíduos tóxicos.

Diversos autores que utilizaram extratos vegetais para a biossíntese relataram que os principais agentes envolvidos na síntese são os compostos fenólicos, estando estes presentes na biomassa foliar. Ijaz et al. (2017) utilizaram o método de quantificação de compostos fenólicos nas nanopartículas obtidas através de extratos de *Abutilom indicum*, observando que com o acréscimo da concentração de nanopartículas, aumentava a concentração de fenólicos e a atividade antioxidante das nanopartículas de óxido de cobre biossintetizadas, provando assim que estes compostos podem estar diretamente ligados a síntese.

A biossíntese não utiliza químicos tóxicos, nem necessita de altas pressões, gerando nanopartículas de forma simples e mais barata, podendo produzir grandes

quantidades em curto período de tempo. Nanopartículas de óxido de cobre (CuO NPs) e óxido de zinco (ZnO NPs) tem sido amplamente estudadas por apresentarem diversas atividades biológicas tais como capacidade antioxidante, antifúngica, antibacteriana e inseticida (MANTANIS et al., 2014; IJAZ et al., 2017; MURALI et al., 2017).

Na indústria da madeira, os fungos apodrecedores representam um grande problema, pois são capazes de degradar totalmente a madeira, causar manchas e/ou a diminuição da resistência mecânica desse material, sendo responsáveis por enormes perdas econômicas neste setor (MORESCHI, 2013).

Existe uma crescente busca por novos produtos preservantes, para substituir os antigos a base de cromo e arsênico, mas que possuam a mesma ou maior eficiência contra agentes xilófagos como fungos e cupins. Neste sentido, diversos autores tem testado a eficiência de ZnO NPs e CuO NPs contra esses agentes, o zinco apresentando ação inseticida, com a diminuição da perda de massa de madeiras tratadas além da mortandade de cupins e o cobre com ação fungicida diminuindo a perda de massa de madeiras atacadas por fungos apodrecedores (CLAUSEN et al., 2011; MANTANIS et al., 2014).

Sendo assim, a utilização de extrato das folhas, que são geralmente ignoradas, para a síntese de nanopartículas de óxidos, pode gerar outra fonte de renda para as florestas plantadas já existentes, além de produzir material que pode ser aplicado como preservante da madeira, aumentando a durabilidade da mesma.

O objetivo deste estudo foi biossintetizar nanopartículas de óxidos (CuO e ZnO) utilizando extratos aquosos de *Eucalyptus* sp. como agentes redutores e estabilizantes.

Esperava-se obter NPs com diâmetros menores que 100 nm, com caráter cristalino e que apresentassem ação antifúngica contra fungos xilófagos, apodrecedores da madeira.

## 2 Revisão da Literatura

### 2.1 *Eucalyptus*

O gênero *Eucalyptus* tem origem na Austrália, Tasmânia e outras ilhas da Oceania, abrangendo mais de 700 espécies (WAUGH, 1998; ROCHA, 2000). O Brasil é atualmente um dos líderes mundiais em florestas plantadas, possuindo mais de 7,84 milhões de hectares, sendo mais de 72% dessa área do gênero *Eucalyptus* (IBÁ, 2017).

A Figura 1 apresenta o gráfico de crescimento da área plantada (milhões ha) de florestas de *Eucalyptus* no Brasil de 2004 a 2016, demonstrando o constante crescimento das áreas de reflorestamento que avançaram mais de 43,5% em 12 anos para este gênero (PINCELLI, 2011; ABRAF, 2013; IBÁ, 2014, 2015, 2017).

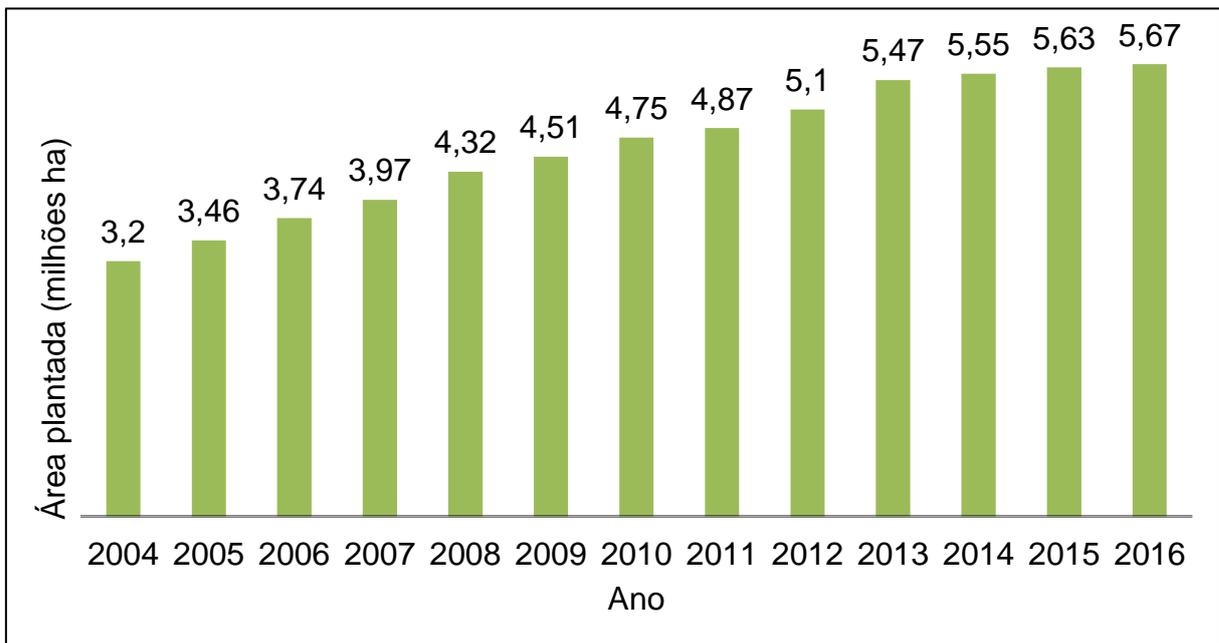


Figura 1 - Crescimento da área de florestas plantadas de *Eucalyptus* por ano no Brasil

As espécies de *Eucalyptus* possuem propriedades físicas, mecânicas e químicas muito distintas. Isso possibilita sua utilização para os mais diversos fins, como lenha, estacas, moirões, dormentes, carvão vegetal, celulose e papel, chapas de fibras, fabricação de móveis, geração de energia, medicamentos, entre outros (WILCKEN et al., 2008).

Na colheita destas florestas é utilizado apenas o fuste que possui interesse comercial, o qual tem início na base da tora até um diâmetro mínimo pré-estabelecido. O restante da árvore que não possui valor é deixado no campo como resíduo, estes são principalmente galhos, ponteiros, cascas e folhas (BRITO, 1995; PINCELLI, 2011).

Neste contexto, Do Canto (2009) classifica os resíduos florestais da seguinte forma: resíduos do manejo florestal e tratos silviculturais (desbastes, desramas e desbrotas), resíduos da colheita florestal (galhos, topos, cascas, folhas e outros resíduos) e resíduos do beneficiamento da madeira (resíduos de serraria, licor negro e etc). Esses resíduos somam em torno de 30% do peso total da árvore.

No ano de 2016, as empresas do setor de florestas plantadas geraram em torno de 47,8 milhões de toneladas de resíduos sólidos, 70,5 % deles (33,7 milhões de toneladas) são provenientes das atividades florestais, dos quais 99,7 % são cascas, galhos e folhas (IBÁ, 2017).

Existem diversos estudos com o objetivo de avaliar o aproveitamento de resíduos florestais de *Eucalyptus* para uso energético, porém muitos utilizam apenas troncos de dimensões não utilizáveis na indústria, galhos e cascas (PINCELLI, 2011; SANTIAGO, 2013; TEIXEIRA et al., 2016). As folhas são geralmente deixadas de lado nesse processo, permanecendo na área de exploração a fim de devolver nutrientes ao solo (PAES et al., 2013).

Ferreira (2012) realizou experimentos com os resíduos florestais, os quais eram compostos cascas, raízes, lenhos, galhos e folhas, tendo como finalidade a devolução de nutrientes ao solo. Apesar das folhas concentrarem a maior porcentagem de alguns nutrientes (C, N, P, K, S), elas representaram apenas 6,43 % da massa de resíduos aplicadas no solo, sendo que a casca, segundo componente mais rico em nutrientes, representou 31,43 % da massa. Além disso, Ferreira (2012) observou que a casca foi o componente mais significativo na manutenção dos nutrientes pela degradação dos resíduos, aumentando o estoque e a liberação dos nutrientes na área de aplicação.

Paes et al. (2013) utilizaram como adubo, além dos resíduos da colheita florestal, os provenientes do processo de fabricação da celulose e as cinzas das caldeiras de biomassa florestal. A remoção das cascas e galhos (maiores que 3 cm de diâmetro) resultou em 42 m<sup>3</sup>.ha<sup>-1</sup> a menos de madeira do que quando todo o

resíduo vegetal foi mantido. Ainda segundo os mesmos autores, a aplicação unicamente dos resíduos da produção de celulose e energia proporcionaram rendimentos em madeira de 295,1 m<sup>3</sup>.ha<sup>-1</sup>, cerca de apenas 20 m<sup>3</sup>.ha<sup>-1</sup> a menos que o tratamento que fez a aplicação desses resíduos juntamente com os resíduos florestais (folhas, ponteiros, galhos < 3 cm e serapilheira). Porém, os autores citam que a retirada das cascas e dos galhos maiores poderia acarretar no comprometimento do crescimento radicular das árvores e na absorção de água e nutrientes, pois estes são capazes de atenuar a compactação do solo causado pela ação dos implementos florestais.

A partir destes estudos, é possível observar que o manejo dos resíduos florestais tem grande importância para a devolução dos nutrientes e proteção do solo, porém a existência de outros resíduos gerados por processos industriais, que podem ter a mesma ação, possibilita o emprego das folhas para outros fins.

### 2.1.1 Extratos de *Eucalyptus* e suas aplicações

Segundo a IBÁ (2014), existem diversos tipos de produtos não madeireiros provenientes do setor de florestas plantadas do Brasil (Tabela 1), os quais podem ser aplicados em distintos segmentos industriais.

Tabela 1 - Produtos não madeireiros de florestas plantadas no Brasil e suas aplicações

<b>Principais produtos</b>	<b>Segmentos industriais</b>
Óleos; Essências; Corantes; Fitoterápicos; Fitocosméticos	Farmacêutica e cosméticos
Tanino; Gomas; Resinas; Tintas; Vernizes	Química, construção civil
Resinas; Fibra natural	Automobilística
Mel e cogumelos	Alimentício

Fonte: IBÁ, 2014

Algumas espécies de eucalipto possuem suas folhas utilizadas pela indústria farmacêutica, de limpeza e perfumaria, devido aos óleos essenciais presentes nas mesmas (DORAN, 1991).

São citadas na literatura aproximadamente 20 espécies de *Eucalyptus* que possuem óleos essenciais de interesse comercial devido aos seus constituintes químicos, esses óleos podem ser medicinais, óleos para perfumaria e óleos industriais (DORAN, 1991). Estes são responsáveis pelo cheiro da planta e fazem parte dos mecanismos de defesa contra fungos e insetos (LANGENHEIM, 1994).

Apesar de se encontrar na literatura muitas pesquisas com óleos essenciais, existe outra classe de compostos presentes nas folhas de *Eucalyptus* que podem despertar interesse por suas diversas aplicações, sendo estes os compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos presentes nas folhas são excelentes agentes antioxidantes, atividade diretamente ligada a propriedades antitumorais, antivirais e antibacterianas (BRUM, 2010). Fortes (2016) comprovou a atividade antioxidante de alguns compostos fenólicos isolados, os quais podem possuir atividade mais elevada que antioxidantes comerciais. Almeida et al. (2009) relataram a capacidade de extratos fenólicos de sequestrar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, as quais estão intimamente ligadas aos processos inflamatórios (ALMEIDA et al., 2009).

Além das folhas, as cascas e os frutos de algumas espécies de eucalipto são estudadas como possíveis fontes de compostos bioativos.

Os extratos fenólicos das cascas de *E. grandis*, *E. urograndis* e *E. maiden* possuem maior atividade antioxidante que o ácido ascórbico, importante antioxidante comercial, demonstrando que as espécies podem ser fontes alternativas de compostos fenólicos biologicamente ativos. Isso relaciona-se ao fato de que quanto maior o rendimento em compostos fenólicos, maior a atividade antioxidante (SANTOS et al., 2012).

Extratos dos frutos de eucalipto apresentaram atividade antioxidante e elevada ação antibacteriana contra bactérias patogênicas como *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (BOULEKBACHE-MAKHLOUF et al., 2013).

Além da utilização dos extratos desse gênero com interesse em atividades biológicas, já existem pesquisas quanto à utilização para biossíntese de nanopartículas metálicas.

Diversos estudos sintetizaram nanopartículas de prata (AgNPs) utilizando extratos foliares de *E. globulus*, *E. oleosa*, *E. urphylla*, *E. citriodora*, *E. robusta*, *E. chapmaniana* e *E. hybrida* (Safeda) (DUBEY et al., 2009; SULAIMAN et al., 2013; ALI et al., 2015; MO et al., 2015; POURMORTAZAVI et al., 2015). Os métodos de extração utilizados são principalmente extratos aquosos e aparato Soxhlet com metanol como solvente.

A principal aplicação de AgNPs biossintetizadas diz respeito a ação antimicrobiana contra diversos micro-organismos patogênicos que estas apresentam, incluindo aqueles que apresentam resistência aos antibióticos (SULAIMAN et al., 2013; ALI et al., 2015).

Wang et al. (2014) sintetizaram nanopartículas de ferro com extrato aquoso de *Eucalyptus*, porém não identificaram a espécie utilizada. O estudo teve como finalidade o tratamento de água residual proveniente da criação de suínos, e apresentou 71,7 % de remoção de nitrogênio e 84,5 % de remoção de DQO (demanda química de oxigênio), o que demonstra excelente potencial para o tratamento de águas eutrofizadas.

A síntese de nanopartículas de óxido de zinco foi descrita por Reddy e Mandal (2017) utilizando extrato foliar de *E. globulus*, as nanopartículas obtidas possuíam forma esférica e diâmetro entre 10-16 nm e apresentaram excelente atividade fotocatalítica para degradação de corantes orgânicos.

## 2.2 Nanopartículas metálicas

Nanopartículas são partículas que possuem uma ou mais dimensões na nanoescala ( $10^{-9}$  m), porém são geralmente considerados materiais nanoestruturados aqueles que estão na faixa entre 1 – 100 nm (MORIARTY, 2001; RAMSDEN, 2009). Segundo Cao (2004), com a evolução das técnicas de microscopia, abriram-se novos leques para as análises de caracterização, medição e processamento de nanomateriais, possibilitando o avanço nas pesquisas de desenvolvimento e novas aplicações.

Segundo Athar (2010), as aplicações para nanopartículas metálicas vem crescendo constantemente desde o início do século XXI. O autor cita algumas delas

como: aplicações médicas, catalisadores, desinfetantes, explosivos, filtração, protetores solares e cosméticos, revestimento e tecidos.

Dependendo da morfologia, do tamanho, da fase e de outras características as nanopartículas metálicas podem apresentar propriedades totalmente diferentes das partículas em tamanhos maiores do mesmo material (MORIARTY, 2001). A condutividade elétrica, reatividade química e atividade biológica são propriedades conhecidas por serem alteradas com a redução do tamanho (MORONES et al., 2005). Além disso, há diversas formas nas quais essas nanopartículas podem se apresentar, dependendo do método de síntese e do tipo de material (WANG, 2004; KAR et al., 2006).

### **2.2.1 Métodos de síntese de nanopartículas**

Existem duas abordagens para a síntese de nanomateriais, o *top-down* e o *bottom-up*. O *top-down* se baseia na desconstrução de macroestruturas até a obtenção de nanoestruturas através de técnicas que cortem, moem ou moldam os materiais. Enquanto que o *bottom-up* se baseia nas propriedades químicas das moléculas ou átomos, para reorganizar os mesmo e formar a nanoestrutura (ALBERNAZ, 2014). A Figura 2 ilustra os processos esquemáticos de síntese de nanopartículas.

As técnicas de ablação a laser, cauterização química, pulverização catódica e abrasão, por exemplo, são todas abordagens do método *top-down*. No *bottom-up* encontram-se as técnicas de sol-gel, redução química, deposição química em fase vapor, pirólise por spray ou laser e a recente redução por agentes biológicos, ou biossíntese (IRAVANI, 2011; ALBERNAZ, 2014).

O método de redução química utilizando compostos como hidrato de hidrazina, borohidreto de sódio e etilenoglicol, por exemplo, leva a absorção desses produtos químicos tóxicos na superfície das nanopartículas produzidas, aumentando a preocupação com a toxicidade das mesmas (IRAVANI, 2011).

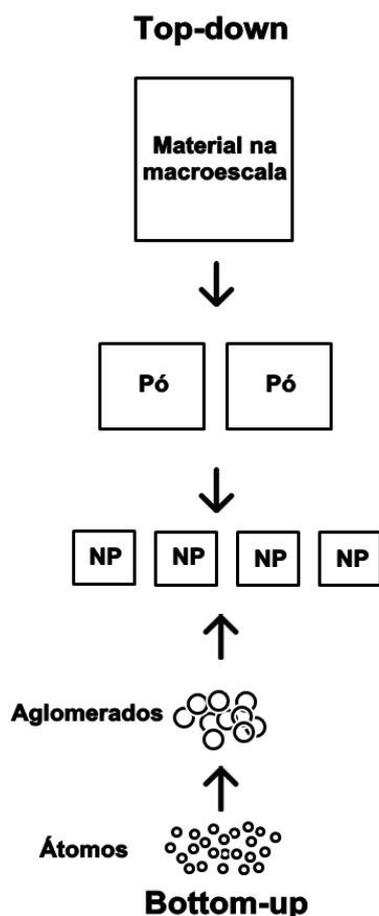


Figura 2 - Processo esquemático das abordagens de síntese de nanopartículas

Fonte: Autor, 2017

A presença de químicos tóxicos, a geração de resíduos e/ou o alto gasto de energia envolvidos nos mais diversos métodos de síntese limita a aplicação das nanopartículas em áreas onde esses resíduos são indesejados como na medicina e indústria de cosméticos (SAIFUDDIN et al., 2009; AZEVEDO et al., 2015).

A síntese de nanopartículas é realizada através de métodos físicos e químicos há muito tempo, porém recentemente o interesse por métodos mais amigáveis ao meio ambiente, que não utilizam matéria prima cara e não produzam resíduos tóxicos é crescente. Segundo Iravani (2011), o uso de organismos biológicos nessa área está em constante crescimento devido à facilidade de formação das nanopartículas e a ausência de resíduos tóxicos.

### 2.2.1.1 Biossíntese de nanopartículas

A biossíntese ou síntese verde possui o mesmo princípio que a redução química, reduzir sais metálicos em solução aquosa a nanopartículas metálicas. Este processo ocorre através da ação de agentes redutores e estabilizantes, com a função de tornar as nanopartículas termodinamicamente estáveis, evitando o crescimento de grandes aglomerados devido às forças de Van Der Waals (ROCHA, 2010; ANTUNES et al., 2013).

A estabilização pode ser eletrostática ou esteárica, sendo a eletrostática através de compostos contendo carga que se adsorvem na superfície das nanopartículas e a esteárica através da adição de compostos de alta massa molar (Figura 3) (ANTUNES et al., 2013).

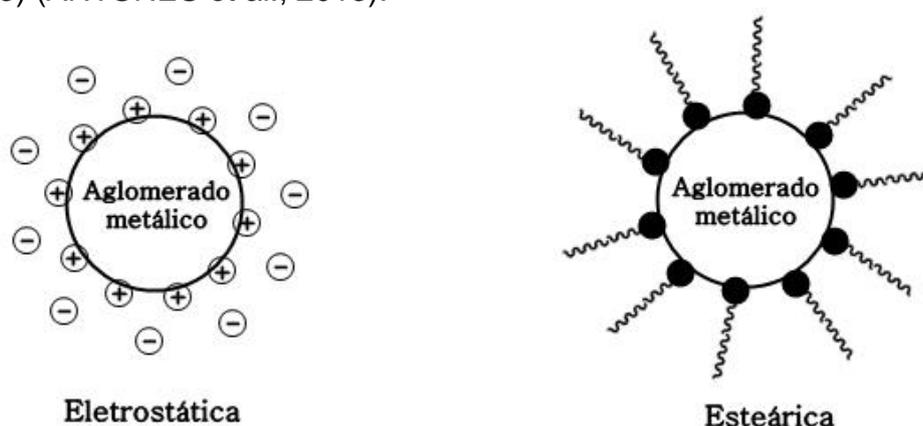


Figura 3 - Métodos de estabilização de nanopartículas

Fonte: Adaptado de MORENO-MAÑAS e PLEIXATS, 2003

Segundo Asmathunisha e Kathiresan (2013) diversos compostos oriundos de micro-organismos e/ou vegetais são capazes de sintetizar as nanopartículas, entre eles estão grupos carbonila, terpenóides, compostos fenólicos, flavonóides, aminas, amidas, proteínas, pigmentos e outro agentes redutores.

Geralmente esses processos de síntese através de extratos vegetais utilizam equipamentos simples, podendo produzir grandes quantidades de nanopartículas a baixo custo e em curto período de tempo, sem a utilização de solventes ou agentes redutores tóxicos (MENDES, 2015).

Como dito anteriormente a biossíntese se encontra dentro dos métodos que fazem parte da abordagem *bottom-up*. A formação de nanopartículas através dessa

abordagem ocorre em algumas etapas, estas são: geração de átomos, nucleação ou aglomerado inicial, crescimento do aglomerado até determinado volume e estabilização (MORENO-MAÑAS; PLEIXATS, 2003; HAN et al., 2009). A Figura 4 ilustra o processo de formação das nanopartículas a partir da redução de sais metálicos em meio aquoso com um metal genérico de carga zero.

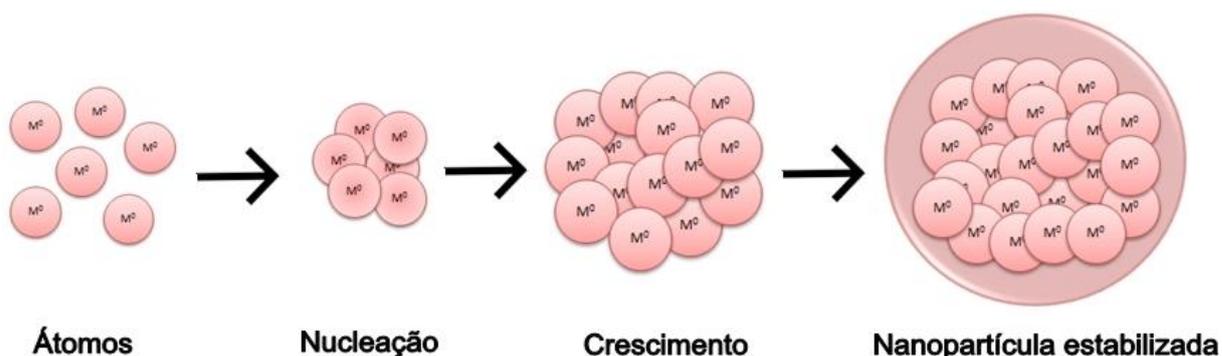


Figura 4 - Processo de síntese de nanopartículas pela abordagem *bottom-up*

Fonte: Autor, 2017

Diversos autores têm relatado a biossíntese de nanopartículas metálicas como prata, ouro, cobre e zinco através de extratos de plantas, bactérias, fungos, cianobactérias e microalgas. Fungos e bactérias podem produzir enzimas como a nitrato redutase e as hidrogenases, além de compostos como hidroquinonas, naftaquinonas e antraquinonas que são excelentes agentes redutores capazes de participar da síntese (SAIFUDDIN et al., 2009; JEEVAN et al., 2012; ANTUNES et al., 2013). Pigmentos como a ficocianina, polissacarídeos e proteínas de microalgas e cianobactérias também já foram relatados para a síntese de nanopartículas (GOVINDARAJU et al., 2008; PATEL et al., 2015).

Extratos vegetais têm se mostrado excelentes agentes redutores e estabilizantes para a síntese de nanopartículas metálicas, espécies como *Abutilon indicum*, *Carica papaya*, *Hylocereus polyrhizus*, *Tabernaemontana divaricate*, *Ceropegia candelabrum*, *Corriandrum sativum*, *Nyctanthes arbor-tristis*, *Eucalyptus oleosa*, *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus urophylla*, *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus robusta* já foram utilizados para sintetizar nanopartículas de cobre, zinco e prata (GNANASANGEETHA; SARALATHAMBAVANI, 2013; SANKAR et al., 2014; SIVARAJ et al., 2014b; ALI et al., 2015; MO et al., 2015; POURMORTAZAVI et al., 2015; JAMDAGNI et al., 2016; IJAZ et al., 2017; MURALI et al., 2017).

Sivaraj et al. (2014a) sintetizaram nanopartículas de CuO de forma esférica e com diâmetro de 26 nm através de extratos de *Acalypha indica*, enquanto Sankar et al. (2014) obtiveram nanopartículas em forma de haste e 140 nm utilizando extratos de *Carica papaya*. Murali et al. (2017) sintetizaram nanopartículas de ZnO com extrato de *Ceropegia candelabrum* que forma hexagonal e tamanho de 12-35 nm, e Gnanasangeetha e Saralathambavani (2013) obtiveram nanopartículas de 66 nm com morfologia cúbica a partir de extrato de *Corriandrum sativum*.

A biossíntese pode ser um excelente método de obtenção de nanopartículas das mais diversas formas e tamanhos, possuindo diversas aplicações. As variáveis do processo (pH, tempo de reação, concentração de sal metálico, volume de extrato e etc) podem ser otimizadas para a obtenção das nanopartículas com as características desejadas.

### **2.2.2 Nanopartículas de cobre**

O cobre é um elemento de transição e possui dois estados de oxidação, formando o óxido de cobre (I) (Cu<sub>2</sub>O) no estado +1 e o óxido de cobre (II) (CuO) no estado +2. O CuO é utilizado como pigmento, em baterias, eletrodos e tintas de navios, enquanto que suas nanopartículas podem ser empregadas em diversos segmentos da indústria por possuir diversas propriedades desejadas (RANGEL, 2014).

Sintetizar nanopartículas de cobre em solução aquosa é um problema, pois o Cu<sup>0</sup> é facilmente oxidado na presença de ar e a temperatura ambiente, produzindo Cu<sub>2</sub>O em maiores quantidades que CuO (KIM et al., 2004). Segundo Yanase e Komiyama (1991) a oxidação de Cu<sup>0</sup> em Cu<sub>2</sub>O é rápida, ocorrendo então lentamente a formação de CuO.

As nanopartículas metálicas, como prata, ouro e cobre, apresentam uma propriedade denominada Ressonância Plasmônica de Superfície (RPS ou SPR), que ocorre quando estas são irradiadas por um feixe de luz e os elétrons de sua superfície começam a oscilar, absorvendo parte da luz visível irradiada. É devido a essa propriedade que ocorrem as mudanças de coloração nas soluções após a formação das nanopartículas. O espectro de absorção da luz UV criado por essa propriedade varia conforme o tamanho, a forma e a concentração das nanopartículas, podendo

ocorrer mudanças na intensidade da banda e o desvio do comprimento de onda máximo absorvido (PEREIRA, 2009; DANG et al., 2011).

As nanopartículas de CuO apresentam coloração característica em soluções coloidais e na literatura é possível encontrar diversas bandas nas quais estas apresentam o fenômeno SPR, entre elas estão 220-225, 570 e 700 nm, dependendo das variações na síntese, no tamanho e na forma geométrica (CHAN et al., 2007).

A Figura 5 demonstra mudança de coloração após a síntese de nanopartículas de CuO a partir do sal precursor  $\text{CuSO}_4$ , onde a coloração inicial é característica do sal precursor e a coloração final é característica das nanopartículas em solução devido ao fenômeno SPR.

Segundo Roy et al. (2016) a absorção da luz UV acompanhou a mudança de coloração, apresentando picos mais acentuados em um mesmo comprimento de onda ao longo do tempo, demonstrando que conforme as nanopartículas vão sendo sintetizadas ocorre o escurecimento da solução.

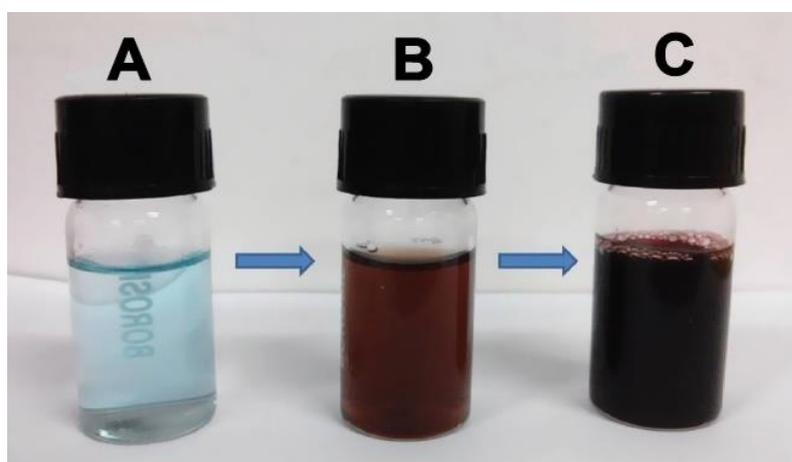


Figura 5 - Mudança de coloração após a síntese de nanopartículas de CuO em que (A) é a coloração inicial, (B) após 6h do início da reação e (C) após 24 h.

Fonte: ROY et al., 2016

O óxido de cobre (CuO) ou óxido cúprico é um composto de estrutura monoclinica e um semicondutor, é o mais simples composto de cobre e possui propriedades físicas e química bastante úteis, podendo ser aplicado em sensores de gás, catálise, baterias, conversão de energia solar entre outras. Sua atividade biológica vem sendo estudada por ser mais barato que outros metais utilizados para fins medicinais, ser facilmente misturado com polímeros e possuir elevada estabilidade de suas propriedades (REN et al., 2009).

Diversos estudos confirmaram alta atividade antimicrobiana das nanopartículas de CuO contra bactérias patogênicas, incluindo algumas que apresentam resistência a antibióticos, dentre elas estão *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus luteus* e fungos como *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger* (REN et al., 2009; RAMYADEVI et al., 2012; SIVARAJ et al., 2014a; ROY et al., 2016; IJAZ et al., 2017).

As nanopartículas de cobre além de apresentarem atividade contra patógenos humanos, também apresentam elevada atividade contra fungos apodrecedores da madeira como o *Trametes versicolor* responsável pela podridão branca, além de limitar o crescimento do fungo em painéis de aglomerados comerciais, também foi capaz de aumentar a dureza do material. Além disso, as nanopartículas de CuO foram mais eficazes que as AgNPs contra o fungo, necessitando de menores concentrações do material (TAGHIYARI et al., 2014).

Empresas norte americanas já produzem preservantes de madeira utilizando nanopartículas de carbonato de cobre em larga escala, no ano de 2008 os conservantes contendo cobre na nanoescala já faziam parte de 50% do mercado norte americano de preservantes, tornando-o um dos maiores usos industriais de nanopartículas no mundo (EVANS et al., 2008). O produto contendo de carbonato de cobre em 2008 já representava de 75 a 90% do mercado norte americano de preservantes a base de cobre, pois demonstrava menos lixiviação, redução da corrosão aos metais de fixação e necessitava de menor concentração para obter bons resultados (EVANS et al., 2008).

### **2.2.3 Nanopartículas de zinco**

O óxido de zinco (ZnO), um pó fino amorfo de cor branca, é um semicondutor altamente transparente a luz visível que possui estrutura cristalina hexagonal (wurtzita). Os nanomateriais de ZnO podem se apresentar de diferentes morfologias através da variação dos parâmetros de síntese (JANOTTI; VAN DE WALLE, 2009; MAYRINCK et al., 2014). Dentre essas morfologias estão nanobarras, nanofios, nanoesferas, nanoanéis, nanofolhas, nanofitas e nanotubos. As publicações

referentes aos diferentes métodos de síntese vem crescendo a cada ano (MAYRINCK et al., 2014).

Nanopartículas de zinco tem sido muito utilizadas na indústria de cosméticos porque são capazes de absorver e/ou dispersar a radiação ultravioleta. Este óxido metálico possui amplo espectro de absorção da luz UV e elevada fotoestabilidade, além de não causar irritabilidade à pele (CUSHING et al., 2004; ZHANG et al., 2012).

O ZnO também pode ser aplicado na fotocatalise, causando a degradação de pigmentos orgânicos poluentes. As nanoestruturas de ZnO são altamente estáveis física e quimicamente, possuem baixo custo e baixa toxicidade (MAYRINCK et al., 2014). Este material possui numerosas aplicações na indústria de produtos florestais e afins, como estabilização UV em revestimentos de madeira, anti-incrustante em tintas marinhas, dentre outras. O ZnO pode ser encontrado na natureza na forma de zincite mineral e está disponível comercialmente como pós moídos ou nanoesferas pirolizadas (CLAUSEN et al., 2011).

As nanopartículas de ZnO são amplamente estudadas quanto a sua ação antimicrobiana, bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis* e fungos como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans*, *Trichoderma harzianum* e *Rhizopus stolonifer* são suscetíveis a sua ação (GUNALAN et al., 2012; DOBRUCKA; DŁUGASZEWSKA, 2015; PRASHANTH et al., 2015; BASHA et al., 2016; TARANATH; PATIL, 2016; MURALI et al., 2017).

As ZnO NPs também apresentam atividade antioxidante, possuindo 60% de redução de radicais livres com a concentração de  $100\mu\text{g.mL}^{-1}$  (MURALI et al., 2017). Além de possuir ação antimicrobiana e antioxidante, as nanopartículas de ZnO também são eficazes contra insetos, como por exemplo os cupins subterrâneos *Reticulitermes flavipes*, apresentando de 93 a 100 % de mortalidade dos mesmos sem lixiviar da madeira tratada (CLAUSEN et al., 2011).

### **2.3 Óxidos metálicos na preservação da madeira**

A madeira, por ser um material de origem biológica, está suscetível ao ataque de organismos xilófagos, capazes de degradar os compostos presentes em sua

parede celular, podendo afetar seu rendimento e qualidade (MANTANIS et al., 2014). A deterioração da madeira é caracterizada, segundo Panshin e Zeeuw (1980) como a perda de resistência mecânica através da destruição ou alteração de seus componentes celulares pela ação de organismos xilófagos.

A degradação da madeira é parte importante de ciclos biológicos, em que os fungos basidiomicetos causadores do apodrecimento da madeira e outros agentes xilófagos são responsáveis por degradar esse material e devolver carbono e outros elementos ao solo e ao ar (KEL et al., 1990).

Os fungos de podridão branca possuem a capacidade de degradar todos os compostos orgânicos presentes na parede celular de plantas, sendo eles celulose, hemicelulose e lignina. A exemplo, o fungo *Phanerochaete chrysosporium* produz uma série de enzimas extracelulares capazes de degradar celulose e hemicelulose enquanto causam a despolimerização da lignina através de mecanismos oxidativos, causando grande perda de massa nos produtos madeireiros (KIRK; FARRELL, 1987).

Panshin e Zeeuw (1980) sugerem que as hifas penetram na madeira e excretam as enzimas responsáveis pela degradação dos componentes da parede celular. A medida que o fungo se desenvolve e causa o apodrecimento da madeira, esta vai mudando sua coloração, podendo ser para mais clara ou mais escura, dependendo do componente que mais tenha sido degradado (celulose ou lignina), além da perda de suas propriedades físicas e mecânicas. A madeira em avançado estado de podridão se torna mole, esponjosa e facilmente desintegrada (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Elementos químicos como o cobre, o zinco e o boro tem sido muito utilizados em produtos preservantes da madeira, os quais tem por objetivo aumentar a vida útil da mesma, através de suas ações contra organismos como fungos e cupins. A pesquisa por novos produtos preservantes se dá pela tendência de diminuir o uso de cromo e arsênico devido a problemas ambientais por sua toxicidade (KARTAL et al., 2009).

Kartal et al. (2009) aplicaram nanopartículas destes três elementos na madeira através de sistema vácuo-pressão e observaram que nanopartículas baseadas em zinco e cobre apresentaram baixas porcentagens de lixiviação, enquanto as baseadas em boro lixiviam em quase 100%. A característica de resistência a lixiviação, ou seja, permanecer na madeira tratada mesmo após chuvas ou em ambientes

aquáticos, é extremamente desejável para que o produto baseado nesses nanomateriais possa ser aplicado em madeiras que sejam utilizadas em áreas externas, sem causar danos ambientais e mantendo sua resistência a organismos xilófagos (CLAUSEN et al., 2011; MANTANIS et al., 2014).

O cobre e o zinco utilizados para o tratamento da madeira são elementos que se complementam. O cobre não possui ação satisfatória contra cupins, o tratamento com este material produziu perda de massa de 20% das amostras de madeira e 7% de mortalidade dos cupins, contra menos de 10% de perda de massa e 31% de mortalidade apresentado pelo tratamento com zinco (KARTAL et al., 2009). Com os fungos, essa lógica se inverte, apesar do zinco também apresentar ação fungicida, o cobre é mais eficiente (KARTAL et al., 2009; MANTANIS et al., 2014; NAIR et al., 2017).

## **CAPÍTULO 1 – Planejamento experimental para extração de composto fenólicos das folhas de *Eucalyptus* sp.**

### **1 Introdução**

Existe uma crescente procura por substituir produtos sintéticos nas mais diversas áreas da indústria, com os antioxidantes não é diferente, em razão disso a extração de compostos fenólicos de subprodutos florestais tem aumentado, o que contribui para que exista uma valorização desses subprodutos que são geralmente utilizados como biomassa para a geração de energia ou para enriquecimento e proteção do solo (MOTA et al., 2012; PIWOWARSKA; GONZÁLEZ-ALVAREZ, 2012; PROESTOS et al., 2008).

Os fenólicos são uma classe de compostos que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidrofílicos, incluindo seus grupos funcionais. Eles têm origem no metabolismo secundário das plantas e são essenciais para o crescimento e reprodução das mesmas (KAUR; KAPOOR, 2001; SHAHIDI; NACZK, 2004). Esses metabólitos estão ligados à defesa das plantas e apresentam atividade biológica contra herbívoros e micro-organismos, podendo ser utilizados como inseticidas e fungicidas (TAIZ; ZEIGER, 2004; NASS, 2007).

Os compostos fenólicos se encontram em todo o reino vegetal, como em frutas, folhas e cascas. Esses compostos são excelentes antioxidantes pois possuem a propriedade de doar elétrons e produzir radicais intermediários estáveis (ÁNGEL; GONZÁLEZ, 1999; CUVELIER et al., 1992). A atividade antioxidante pode auxiliar na prevenção de diversas doenças e também na conservação de alimentos (MAILLARD et al., 1996; GONZÁLEZ, 2002).

Apesar de serem compostos com ampla utilização, não existe uma metodologia única para extração dos mesmos, cada autor utiliza uma temperatura e tempo diferente. Kulkarni et al. (2015) utilizaram banho maria a 80 °C por 20 min, Almeida et al. (2009) utilizaram agitação de 500 rpm e 40 °C, Brum (2010) utilizou extrator Soxhlet, Reddy e Mandal (2017) utilizaram banho maria a 80 °C por 1h, todos para extração de fenólicos das folhas de espécies de *Eucalyptus*.

Em razão disso, o objetivo da realização do planejamento experimental foi variar a temperatura e o tempo de extração dentro de uma faixa utilizada na literatura e escolher o ensaio que obteve maior rendimento para a síntese das nanopartículas.

O planejamento realizado foi utilizado para escolher o melhor ensaio, porém foram calculados os parâmetros para determinar se a equação obtida através do mesmo pode, ou não, ser utilizada para prever as respostas utilizando-se temperaturas e tempos diferentes.

## **2 Metodologia**

### **2.1 Obtenção e processamento das folhas**

As folhas das espécies *Eucalyptus dunnii* Maiden e *Eucalyptus grandis* Hill foram obtidas em uma propriedade particular no interior da cidade de Morro Redondo, estado do Rio Grande do Sul. As árvores possuem de 4 a 7 anos de idade e encontram-se na mesma posição solar.

Após coletadas, as folhas foram secas em estufa com circulação forçada de ar por 48 h a 36 °C e moídas em moinho de facas tipo Willey. O pó não foi peneirado, sendo utilizadas todas as granulometrias para a extração, e manteve-se o mesmo sob refrigeração a 4° C e ao abrigo de luz, para evitar possíveis problemas com fotodegradação de compostos orgânicos.

### **2.2 Procedimento de extração**

Para a extração de compostos fenólicos, adicionou-se em erlenmeyers de 250 mL, 10g de folhas moídas e 100 mL de água deionizada, a extração se deu em banho termostático com as condições de cada ensaio (item 2.4).

Após o tempo de extração as soluções foram centrifugadas a 3200 rpm por 10 min e filtradas a vácuo com papel filtro de celulose, e os extratos transferidos para frascos com rosca e mantidos a 4°C na ausência de luz para posterior análise.

## 2.3 Quantificação de fenólicos totais

Determinou-se o teor de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu segundo metodologia adaptada de Singleton et al. (1999).

### 2.3.1 Construção da curva padrão de ácido gálico

A solução padrão de ácido gálico foi preparada diluindo-se 0,05g em 100 mL de metanol, obtendo-se concentração de 50 g.L<sup>-1</sup>. A partir dessa solução realizou-se as diluições como demonstradas na Tabela 2.

Tabela 2 - Pontos para construção da curva padrão de ácido gálico

Solução	V de solução padrão (mL)	V de metanol (mL)	Conc. Final (g.L <sup>-1</sup> )
0	0	10	0
1	0,5	9,5	0,025
2	1	9	0,05
3	2	8	0,1
4	3	7	0,15
5	4	6	0,2
6	5	5	0,25

Em tubos de ensaio foram acrescentados 0,1 mL de cada diluição, 3 mL de água destilada e 0,3 mL de reagente Folin Ciocalteu, a solução foi agitada e mantida em repouso por 3 min. Após o repouso acrescentou-se 2 mL de carbonato de sódio 7,5% (m/v) e envolveu-se os tubos em papel alumínio que são mantidos em banho-maria por 30 min a 37 °C. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro UV-vis (UV-2600, Shimadzu) com comprimento de onda de 765 nm.

### 2.2.2 Determinação de fenólicos totais nos extratos

Para a quantificação dos fenólicos totais as amostras foram diluídas em proporção 1:30 para possibilitar a leitura. O procedimento adotado é o mesmo utilizado

para a construção da curva padrão, substituindo-se as diluições da solução padrão pela amostra analisada. Para calcular os fenólicos totais utiliza-se a Equação 1.

$$\text{Fenólicos totais} \left( \frac{\text{mg}_{\text{EAG}}}{\text{g}_{\text{amostra}}} \right) = \frac{\text{Concentração em } (\text{mg}_{\text{EAG}})}{\text{massa da amostra (g)}} \quad (1)$$

Em que:

$\text{mg}_{\text{EAG}}$  = mg em equivalentes de ácido gálico

## 2.4 Planejamento experimental para extração de fenólicos

Para determinar as melhores condições de extração de compostos fenólicos realizou-se o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2<sup>2</sup>. Sendo o número de variáveis independentes igual a dois, o planejamento contou com quatro ensaios, três pontos centrais (PC) e quatro pontos axiais contendo um total de 11 ensaios que foram avaliados através do software Statistica 7.0 com análise de variância (ANOVA).

As duas variáveis independentes são temperatura ( $X_1$ ) e tempo de extração ( $X_2$ ). A variável dependente (resposta) é a concentração de fenólicos em  $\text{mg}_{\text{EAG}} \cdot \text{g}^{-1}$ .

A Tabela 3 apresenta os valores reais e codificados que foram analisados para determinar melhores condições para obter a maior concentração de compostos fenólicos.

Tabela 3 - Níveis codificados e reais das variáveis independentes

Variáveis independentes	Níveis codificados e reais das variáveis independentes				
	-1,4142	-1	0	+1	+1,4142
$X_1$ (T °C)	30	37,3	55	72,7	80
$X_2$ (Tempo em min)	30	43,2	75	106,8	120

A matriz de combinações dos 11 ensaios é apresentada na Tabela 4.

Após a obtenção dos resultados através do Software Statistica 7, alguns cálculos adicionais são feitos para determinar se o modelo matemático obtido pelo

planejamento pode ser considerado preditivo para o resultado quando se utiliza outras variações de tempo e temperatura

Tabela 4 - Matriz de combinações do DCCR 2<sup>2</sup>

Ensaio	X <sub>1</sub> (T °C)	X <sub>2</sub> (Tempo em min)
1	37,3 (-1)	43,2 (-1)
2	72,7 (+1)	43,2 (-1)
3	37,3 (-1)	106,8 (+1)
4	72,7 (+1)	106,8 (+1)
5	55 (0)	75 (0)
6	55 (0)	75 (0)
7	55 (0)	75 (0)
8	30 (-1,4142)	75 (0)
9	80 (+1,4142)	75 (0)
10	55 (0)	30 (-1,4142)
11	55 (0)	120 (+1,4142)

O primeiro passo foi realizar análise de variância para poder realizar as comparações entre os valores  $F_{\text{calculado}}$  e  $F_{\text{tabelado}}$ , Box et al. (1978) determinaram quais as relações entre  $F_{\text{cal}}/F_{\text{tab}}$  do modelo e da falta ajuste são as ideais para poder considerar o modelo como preditivo e válido.

Depois, é possível determinar o erro de ajuste (EA) e o erro relativo (ER) do modelo obtido, comparando-se os valores experimentais e os calculados através da equação gerada pelo modelo. Sendo que:

$$EA = CF_{\text{experimental}} - CF_{\text{calculada}} \quad (2)$$

$$ER = \frac{EA}{CF_{\text{experimental}}} \times 100 \quad (3)$$

Em que:

EA = erro de ajuste

$CF_{\text{experimental}}$  = concentração de fenólicos experimental

$CF_{\text{calculada}}$  = concentração de fenólicos calculada pela equação obtida

ER = erro relativo

### 3 Resultados e discussão

#### 3.1 *Eucalyptus dunnii*

A Tabela 5 apresenta a matriz utilizada para o planejamento experimental e os resultados de cada ensaio. O ensaio que obteve a maior concentração de compostos fenólicos foi o número 9, em que a temperatura era de 80 °C e o tempo de 75 min.

Tabela 5 - Matriz de ensaios utilizada no DCCR (*E. dunnii*)

Ensaio	X <sub>1</sub> (T °C)	X <sub>2</sub> (Tempo em min)	CF (mg <sub>EAG</sub> .g <sup>-1</sup> )
1	37,3 (-1)	43,2 (-1)	93,00
2	72,7 (+1)	43,2 (-1)	92,35
3	37,3 (-1)	106,8 (+1)	83,74
4	72,7 (+1)	106,8 (+1)	87,00
5	55 (0)	75 (0)	78,05
6	55 (0)	75 (0)	77,09
7	55 (0)	75 (0)	82,18
8	30 (-1,4142)	75 (0)	89,96
9	80 (+1,4142)	75 (0)	102,48
10	55 (0)	30 (-1,4142)	64,61
11	55 (0)	120 (+1,4142)	57,57

O Coeficiente de correlação (R<sup>2</sup>) foi de 0,84427 indicando que 84,43% da variação da resposta pode ser explicada pelo modelo. A Tabela 6 apresenta os efeitos e interações das variáveis independentes frente a variável dependente.

Tabela 6 - Efeitos das variáveis independentes (*E. dunnii*)

	Efeito	Erro puro	t (2)	p
Média	79,10653	1,561456	50,66204	0,000389*
Temperatura (linear)	2,53950	0,956197	2,65583	0,117340
Temperatura (quadrática)	11,14882	1,138112	9,79590	0,010261*
Tempo (linear)	-3,07078	0,956197	-3,21145	0,084809*
Tempo (quadrático)	-6,41651	1,138112	-5,63786	0,030050*
Temperatura x Tempo	0,97750	1,352260	0,72286	0,544867

Em que: \* (p<0,1) valores significativos a 90% de confiança.

Observando-se a coluna “efeito” na Tabela 6, a variável temperatura (quadrática) possuem efeito positivo, indicando que valores mais altos de temperatura produzem maior concentração de fenólicos, este fato se comprova ao notar que os ensaios que utilizaram temperaturas entre 30 e 55 °C, tiveram como resultados concentrações mais baixas que os que utilizaram 72,7 e 80 °C, com exceção do ensaio 1. Em relação ao tempo (linear e quadrático), este possui efeito negativo, indicando que os menores valores de tempo podem produzir resultados melhores, não sendo necessário manter a solução em altas temperaturas por longos períodos de tempo para obter bons resultados. Os ensaios 3, 4 e 11 que possuem os maiores tempos de extração não obtiveram os melhores resultados.

A 90% de confiança, as variáveis significativas do modelo foram a média, a temperatura quadrática e o tempo (linear e quadrático), ao se apresentarem significativas ( $p < 0,1$ ) as variáveis quadráticas indicam que há curvatura na superfície de resposta, ou seja, a relação entre as variáveis independentes com a dependente não é linear.

Através da análise de variância (Tabela 7) é possível calcular os valores de F, Box et al. (1978) determinaram que para um modelo matemático ser considerado válido e preditivo a relação entre o F calculado e o F tabelado ( $F_{cal}/F_{tab}$ ) da regressão deveria ser superior a 3, a do modelo proposto para a extração de compostos fenólicos de *E. dunnii* foi de 8,46, sendo superior ao exigido. Porém, os autores também determinaram que a relação entre o  $F_{cal}/F_{tab}$  da falta de ajuste deveria ser inferior a 0,10 para que o modelo seja considerado bem ajustado, a deste modelo apresentou valor de 1,22, mostrando que possui falta de ajuste, não sendo o modelo ideal para prever o comportamento dos dados.

Tabela 7 - Análise de variância (*E. dunnii*)

Fonte	SQ	GL	QM	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub> *
Regressão	1255,9793	4	313,9948	26,89741	3,180763
Resíduos	70,0428	6	11,6738	$F_{cal}/F_{tab} = 8,46$	
Falta de ajuste	246,160	3	82,05332	11,218	9,16179
Erro puro	14,629	2	7,314433	$F_{cal}/F_{tab} = 1,22$	
Total	1674,6166				

Em que: SQ é a soma dos quadrados, GL são os graus de liberdade e QM é o quadrado médio; \*F regressão (0,1;4;6), F falta de ajuste (0,1;3;2).

Ainda assim, foram calculados os valores de concentração de fenólicos obtidos pelo modelo, para poder determinar os erros de ajuste e relativo, a partir das equações utilizando todas as variáveis (Eq 3) e apenas as significativas (Eq 4).

$$CF_1 = 79,1065 + 2,5395X_1 + 11,1488X_1^2 - 3,07078X_2 - 6,41651X_2^2 + 0,97750X_1X_2 \quad (4)$$

$$CF_2 = 79,1065 + 11,1488X_1^2 - 3,07078X_2 - 6,41651X_2^2 \quad (5)$$

Através da Tabela 8 pode-se comparar os resultados experimentais e calculados para a variável resposta, além dos erros referentes a diferença entre eles.

Tabela 8 - Comparação dos resultados experimentais e calculados (*E. dunni*)

Ensaio	Exp (mgEAG.g <sup>-1</sup> )	CF <sub>1</sub> (mgEAG.g <sup>-1</sup> )	Erro de ajuste	Erro relativo	CF <sub>2</sub> (mgEAG.g <sup>-1</sup> )	Erro de ajuste	Erro relativo
1	93,00	85,35	7,66	8,23	86,91	6,09	6,55
2	92,35	88,47	3,88	4,20	86,91	5,44	5,89
3	83,74	77,25	6,49	7,75	80,77	2,98	3,55
4	87,00	84,29	2,72	3,13	80,77	6,24	7,17
5	78,05	79,11	-1,06	1,36	79,11	-1,06	1,36
6	77,09	79,11	-2,02	2,61	79,11	-2,02	2,61
7	82,18	79,11	3,07	3,74	79,11	3,07	3,74
8	89,96	97,81	-7,85	8,73	101,40	-11,44	12,72
9	102,48	105,00	-2,51	2,45	101,40	1,08	1,05
10	64,61	70,62	-6,00	9,29	70,62	-6,00	9,29
11	57,57	61,93	-4,36	7,58	61,93	-4,36	7,58
Menor e maior erro relativo			1,36 – 9,29%		1,36 – 12,72%		

Em que: Exp é o resultado experimental, CF<sub>1</sub> é o resultado obtido pela equação com todas as variáveis, CF<sub>2</sub> é o resultado utilizando apenas as variáveis significativas, erro de ajuste é a diferença entre o valor experimental e o teórico e o erro relativo é a porcentagem da variação do erro de ajuste.

O erro relativo para a equação utilizando todas as variáveis (CF<sub>1</sub>) apresentou variação máxima de 9,29%, ou seja, a maior diferença entre o valor calculado e o experimental não chegou a 10%. Para a equação que utiliza apenas as variáveis

significativas do modelo a variação máxima sobe para 12,72%. Portanto, a equação que possui todas as variáveis se ajusta melhor para prever a concentração de fenólicos utilizando outros valores para as variáveis independentes.

Após estas análises plotou-se o gráfico 3D da superfície de resposta (Figura 6A) e o gráfico de contorno (Figura 6B) obtido através da equação gerada pelo modelo.

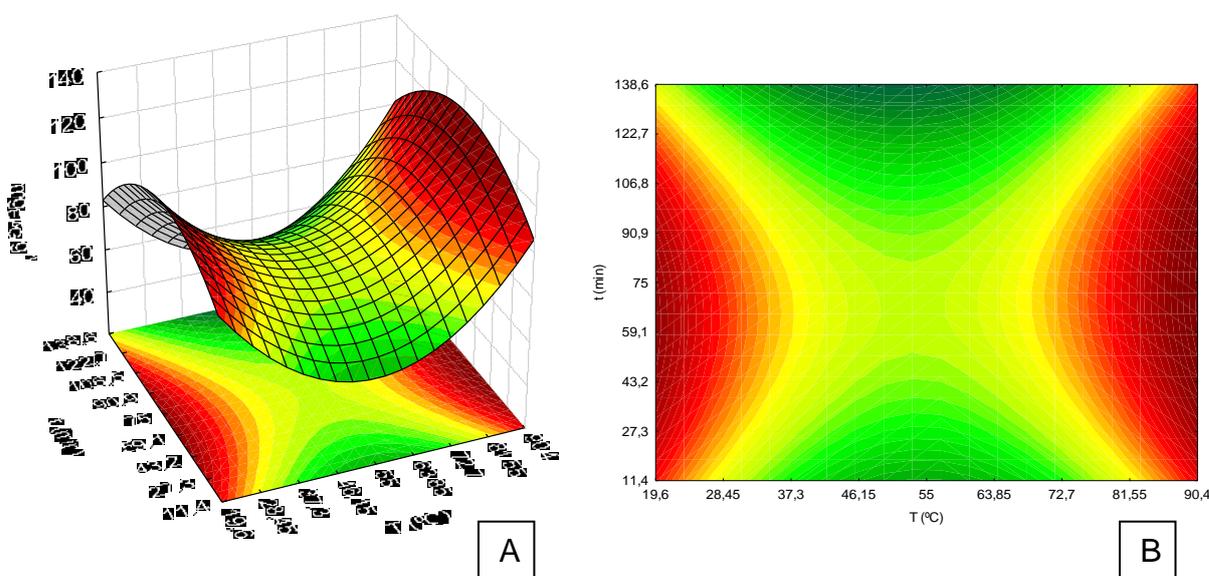


Figura 6 - (A) Superfície de resposta e (B) gráfico de contorno (*E. dunnii*)

O gráfico apresenta regiões de cores diferentes, onde em verde se encontram os menores valores da variável resposta e em vermelho os maiores. A parte central onde se encontram os pontos centrais escolhidos (55°C e 75 min) está amarelada, indicando que não são os melhores valores. Se a extração fosse otimizada, essa região central deveria ser o ponto mais alto do gráfico, indicando que o ponto central é a melhor resposta do modelo.

A partir do gráfico de contorno (Figura 6B), observa-se que as regiões de coloração vermelha mais escura estão nas duas laterais, e praticamente centralizadas, indicando que o tempo no ponto central pode ser o ideal, porém a temperatura deverá ser variada na região mais alta (acima de 80 °C), ou na região mais baixa (abaixo dos 30 °C).

Neste trabalho, o objetivo era escolher, dentre os ensaios, aquele que apresentou melhor resposta para a concentração de fenólicos, porém através da

superfície de resposta e do gráfico de contorno pode-se determinar outros valores de temperatura e tempo para futuramente realizar um planejamento experimental com o objetivo de otimizar o processo de extração.

### 3.2 *Eucalyptus grandis*

A Tabela 9 apresenta a matriz de ensaio com os resultados para o *E. grandis*. Através dela observa-se que o melhor resultado foi obtido para o ensaio 2 (72,7 °C e 43,2 min).

O coeficiente de correlação para o modelo foi de  $R^2$  0,77728, ou seja, 77,73% da variação dos dados pode ser explicada pelo modelo. Este número já fornece um indício de que as condições de extração de compostos fenólicos variam entre espécies do gênero *Eucalyptus*, pois os modelos para o *E. dunnii* e *E. grandis* possuem a mesma variação de temperatura e tempo e obtiveram resposta muito diferentes.

Tabela 9 - Matriz de ensaios utilizada no DCCR (*E. grandis*)

Ensaio	X <sub>1</sub> (T °C)	X <sub>2</sub> (Tempo em min)	CF (mg <sub>EAG</sub> .g <sup>-1</sup> )
1	37,3 (-1)	43,2 (-1)	34,00
2	72,7 (+1)	43,2 (-1)	75,05
3	37,3 (-1)	106,8 (+1)	52,4
4	72,7 (+1)	106,8 (+1)	53,57
5	55 (0)	75 (0)	53,57
6	55 (0)	75 (0)	41,18
7	55 (0)	75 (0)	42,92
8	30 (-1,4142)	75 (0)	35,61
9	80 (+1,4142)	75 (0)	47,74
10	55 (0)	30 (-1,4142)	48,05
11	55 (0)	120 (+1,4142)	56,66

A Tabela 10 apresenta os efeitos de cada variável independente na variável dependente (resposta). Dentre as variáveis consideradas significativas a 90% de confiança estão a média, a temperatura linear e a interação entre a temperatura e o tempo. Diferente dos resultados obtidos para o *E. dunnii*, as variáveis quadráticas não apresentaram significância indicando que não há curvatura na superfície de resposta.

Tabela 10 - Efeitos das variáveis independentes (*E. grandis*)

	Efeito	Erro puro	t (2)	p
Média	45,88991	3,872712	11,84955	0,007047*
Temperatura (linear)	7,42185	2,371554	3,12953	0,088725*
Temperatura (quadrática)	-0,42247	2,822736	-0,14967	0,894757
Tempo (linear)	1,13704	2,371554	0,47945	0,678927
Tempo (quadrático)	4,91763	2,822736	1,74215	0,223606
Temperatura x Tempo	-9,97000	3,353867	-2,97269	0,096980*

Os efeitos das variáveis significativas são positivos para temperatura linear, indicando que temperaturas maiores produziram maiores concentrações de fenólicos, e negativo para a interação entre as variáveis, indicando que a interação entre o tempo e a temperatura influencia negativamente na resposta.

O valor da relação  $F_{cal}/F_{tab}$  (Tabela 11) da regressão no caso do modelo para *E. grandis* o valor foi de 2,47, ficando abaixo do ideal. Para a falta de ajuste a relação  $F_{cal}/F_{tab}$  deveria ser inferior a 0,10, a deste modelo foi de 0,16 ficando pouco acima do ideal para o modelo ser considerado válido.

Tabela 11 - Análise de variância (*E. grandis*)

Fonte	SQ	GL	QM	$F_{calculado}$	$F_{tabelado}^*$
Regressão	838,2705	2	419,1352	7,683869	3,113118
Resíduos	436,3794	8	54,54742	$F_{cal}/F_{tab} = 2,47$	
Falta de ajuste	198,481	3	66,16046	1,470438	9,16179
Erro puro	89,987	2	44,9937	$F_{cal}/F_{tab} = 0,16$	
Total	1295,2305				

Em que: SQ é a soma dos quadrados, GL são os graus de liberdade e QM é o quadrado médio; \*F regressão (0,1;2;8), F falta de ajuste (0,1;3;2).

Ainda assim, foram realizados os mesmos cálculos com as equações do modelo obtido, para determinar os erros de ajuste e relativo. A equação 6 corresponde ao modelo com todas as variáveis e a equação 7 corresponde ao modelo que utiliza apenas as variáveis significativas.

$$CF_1 = 45,88991 + 7,42185X_1 - 0,42247X_1^2 + 1,13704X_2 + 4,91763X_2^2 - 9,97X_1X_2 \quad (6)$$

$$CF_2 = 45,88991 + 7,42185X_1 - 9,97X_1X_2 \quad (7)$$

Diferentemente do *E. dunnii*, o modelo obtido para o *E. grandis* apresenta o erro relativo mais acentuado (Tabela 12), sendo o máximo para o modelo com todas as variáveis de 16,34% e apenas com as variáveis significativas de 19,09%.

Tabela 12 - Comparação dos resultados experimentais e calculados (*E. grandis*)

Ensaio	Exp (mg <sub>EAG</sub> .g <sup>-1</sup> )	CF <sub>1</sub> (mg <sub>EAG</sub> .g <sup>-1</sup> )	Erro de ajuste	Erro relativo	CF <sub>2</sub> (mg <sub>EAG</sub> .g <sup>-1</sup> )	Erro de ajuste	Erro relativo
1	34,00	31,86	2,14	6,31	28,50	5,50	16,18
2	75,05	66,64	8,41	11,21	63,28	11,77	15,68
3	52,4	54,07	-1,67	3,19	48,44	3,96	7,56
4	53,57	48,97	4,60	8,58	43,34	10,23	19,09
5	53,57	45,89	7,68	14,34	45,89	7,68	14,34
6	41,18	45,89	-4,71	11,44	45,89	-4,71	11,44
7	42,92	45,89	-2,97	6,92	45,89	-2,97	6,92
8	35,61	34,55	1,06	2,98	35,39	0,22	0,61
9	47,74	55,54	-7,80	16,34	56,39	-8,65	18,11
10	48,05	54,12	-6,07	12,63	45,89	2,16	4,50
11	56,66	57,33	-0,67	1,19	45,89	10,77	19,01
Menor e maior erro relativo			1,19 – 16,34%		0,61 – 19,09%		

Em que: Exp é o resultado experimental, CF<sub>1</sub> é o resultado obtido pela equação com todas as variáveis, CF<sub>2</sub> é o resultado utilizando apenas as variáveis significativas, erro de ajuste é a diferença entre o valor experimental e o teórico e o erro relativo é a porcentagem da variação do erro de ajuste.

Nos dois gráficos (Figura 7A e 7B) as regiões em vermelho apresentam os melhores resultados, estando em temperaturas mais altas e tempos menores ou tempos maiores e temperaturas menores.

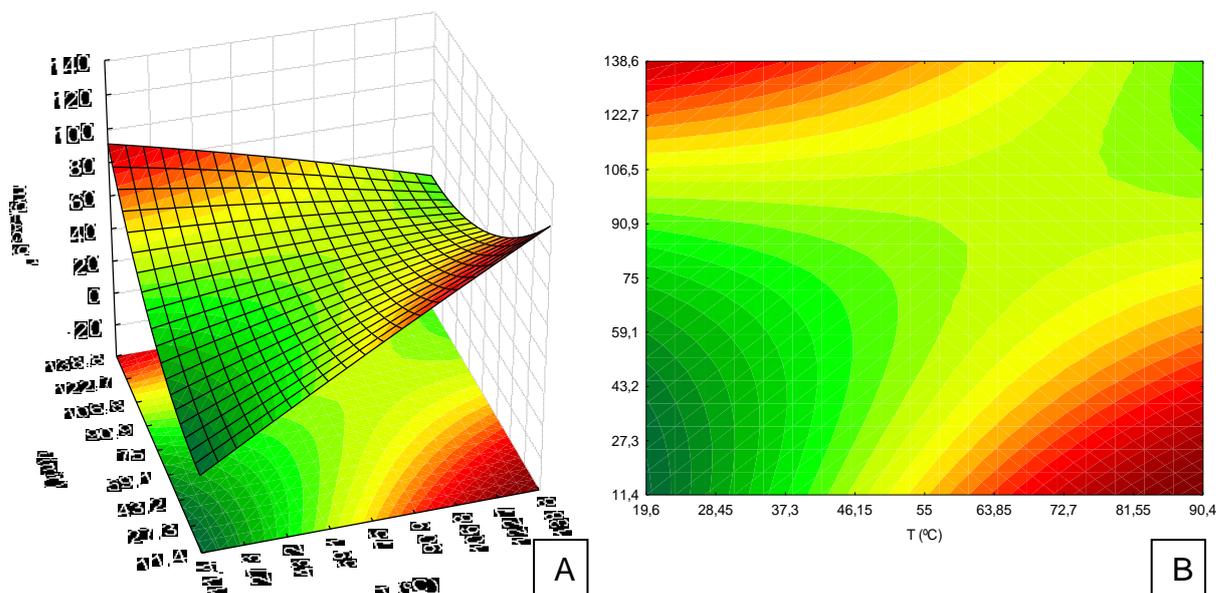


Figura 7 - (A) Superfície de resposta e (B) gráfico de contorno (*E. grandis*)

Se tratando de material biológico, temperaturas muito altas podem causar a degradação dos mesmos, portanto temperaturas acima dos 100 °C podem não ser viáveis para extração de fenólicos.

#### 4 Conclusão

Os modelos matemáticos obtidos para as duas espécies de *Eucalyptus*, apesar de utilizarem as mesmas condições de temperatura e tempo em todos os ensaios, resultaram em respostas bem diferentes. O modelo do *E. dunnii* se ajustou melhor, sendo capaz de explicar 84,43% da variação dos dados, enquanto o modelo do *E. grandis* explicou 77,73%.

Esta diferença comprova o motivo pelo qual foi realizado o planejamento em separado para as duas espécies, o ensaio que obteve melhor resultado para o *E. dunnii* (80 °C e 75 min) não foi o mesmo que obteve o melhor para o *E. grandis* (72,7 °C e 43,2 min), sendo necessária uma metodologia diferente para cada espécie.

## **CAPÍTULO 2 – Biossíntese e caracterização de nanopartículas de óxido de cobre (CuO)**

### **1 Introdução**

A pesquisa relacionada a síntese de nanopartículas metálicas utilizando extratos vegetais tem crescido ano após ano, já foram utilizados extratos de flores, folhas e cascas de diversas espécies para tal fim. A biossíntese, ou síntese verde de nanopartículas não utiliza solventes tóxicos, nem condições extremas como elevadas pressões e temperaturas (NORUZI, 2015).

O mecanismo exato da síntese de nanopartículas por extratos de plantas ainda não foi elucidado, mas sugere-se que proteínas, aminoácidos, ácidos orgânicos, vitaminas e ainda metabólitos secundários como flavonoides, polifenóis, polissacarídeos dentre outros são os responsáveis por reduzir os sais metálicos e estabilizar as nanopartículas, realizando as duas funções ao mesmo tempo (DUAN et al., 2015).

Noruzi (2015) sugere que a biossíntese utilizando extrato de plantas é mais adequada para produção em grande escala do que a utilização de micro-organismos, segundo o autor as plantas são mais seguras e levam menos tempo para realizar a síntese, já os micro-organismos muitos são patogênicos e levam vários dias para conseguirem reduzir os sais metálicos.

Extratos de diferentes plantas já foram utilizados para sintetizar CuO NPs para as mais diversas aplicações, como antifúngica, antibacteriana, anticâncer e degradação de corantes (SANKAR et al., 2014; SIVARAJ et al., 2014b; SHENDE et al., 2015; ROY et al., 2016). Na preservação da madeira as CuO NPs obtidas comercialmente apresentaram excelente atividade contra fungos de podridão branca e parda, mas não possuem atividade semelhante contra cupins (KARTAL et al., 2009; MANTANIS et al., 2014).

Apesar de se encontrar na literatura diversos dados relacionados a ação de CuO NPs contra fungos apodrecedores da madeira, estes são geralmente relacionados a NPs de origem comercial ou sintetizadas quimicamente. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi produzir CuO NPs utilizando extrato aquoso das folhas de

duas espécies de *Eucalyptus* para aplicação como agente antifúngico na preservação da madeira.

## 2 Materiais e métodos

### 2.1 Extração de compostos fenólicos

Os parâmetros de extração de compostos fenólicos das folhas de *E. dunnii* e *E. grandis* foram determinados conforme descrito no Capítulo 1.

Foram adicionados em enrlenmeyer de 250 mL, 10g de folhas moídas e 100 mL de água deionizada e levados ao banho termostático. Os parâmetros foram de 80 °C e 75 min para o *E. dunnii* e 72,7 °C e 43,2 min para o *E. grandis*.

Transcorrido o tempo de extração, os extratos foram filtrados a vácuo com papel filtro de celulose e armazenados em refrigerador até a utilização na síntese.

### 2.2 Biossíntese de nanopartículas de CuO

#### 2.2.1 Método I

Para sintetizar as nanopartículas de CuO o sal precursor foi acetato de cobre dihidratado ( $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) na concentração de 0,5 mM. Para tanto, 0,01g de sal foram adicionados em 80 mL de água deionizada, a solução foi agitada até completa solubilização do sal e então foram adicionados 20 mL de extrato aquoso de *E. dunnii* sob agitação magnética constante por 24h, a solução foi centrifugada e lavada 2x com água deionizada, o precipitado foi seco em estufa a 100 °C. O pó de coloração preta obtido foi dispersado com auxílio de almofariz e pistilo e armazenado até realização das análises.

Este método de síntese, com poucas diferenças, é utilizado pela maioria dos artigos de biossíntese com extratos foliares, porém, as partículas obtidas tiveram caráter amorfo e não apresentaram picos de absorção no espectro UV, em razão disso realizou-se tratamento térmico em forno tipo mufla de 700 °C por 4h.

### **2.2.2 Método II**

Neste método de síntese, baseado no trabalho de Rehana et al. (2017), foram utilizados 1,57g de sal precursor e 20 mL de extrato de *E. dunnii* e *E. grandis* sob agitação magnética vigorosa e na temperatura de 80°C por 20 min. Transcorrido o tempo de síntese a amostra foi levada a mufla ainda fria, ligou-se a mesma que possui taxa de aquecimento de aproximadamente 12°C/min até 500°C na qual permaneceu durante 2h.

O procedimento de aquecimento da mufla foi adotado para evitar a fervura imediata e consequente aumento de volume da solução, a qual poderia virar dentro da mufla.

O pó de coloração preta obtido foi dispersado com auxílio de almofariz e pistilo e armazenado até realizações das análises.

## **2.3 Caracterização das nanopartículas**

### **2.3.1 Espectroscopia UV-Vis**

A técnica foi utilizada para identificar a formação de nanopartículas através das propriedades ópticas de absorção em banda característica das nanopartículas de CuO.

As leituras de absorbância foram realizadas na faixa de 200 a 800 nm em espectrofotômetro UV-vis (UV-2600, Shimadzu) pertencente à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Pelotas. O extrato também foi analisado para desconsiderar qualquer interferência na banda de absorção das nanopartículas.

### **2.3.2 Difração de raio-X**

Para determinar a estrutura cristalina dos dois óxidos realizou-se a análise no Difratorômetro de Raios X (Bruker, D8 Advance) pertencente ao Centro de Microscopia da Região Sul (CEME-SUL) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG),

utilizando radiação Cu  $K_{\alpha 1}$  ( $\lambda=1,5418\text{\AA}$ ), com 40 kV e 340 mA em um intervalo de 10 a 90° com varredura de 0.05°/min.

O arquivo CIF utilizado para identificar os picos cristalinos dos difratogramas foi obtido da base de dados de acesso livre COD (Crystallography Open Database). Sendo que a geração dos difratogramas, visualização da estrutura tridimensional e dos planos hkl foi realizada através do software Mercury 4.0.0.

Posteriormente, determinou-se o tamanho de cristalito através da equação de Debye-Scherrer (Equação 8) (KLUG, 1962).

$$D_{h,k,l} = \frac{k \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos\theta} \quad (8)$$

Em que:

$D_{h,k,l}$  = diâmetro do cristalito;

$k$  = fator de forma da esfera (0,89);

$\theta$  = ângulo de difração;

$\beta$  = metade da largura total (FWHM) do pico;

$\lambda$  = comprimento de onda de raios-X.

### 2.3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A morfologia e o tamanho das nanopartículas de CuO foram determinados através de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). A análise foi realizada no Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) (Jeol JEM-1400, Japão) operando a 100 kV em alto vácuo. O MET é pertencente ao Centro de Microscopia da Região Sul (CEME-SUL) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

A amostra foi preparada através da dispersão das nanopartículas em água Milli-Q em banho de ultrassom por 20 min. Após a dispersão, pingou-se duas gotas em um filme de carbono amorfo, sustentado em grade de cobre com 3,0 mm de diâmetro e as amostras foram mantidas em dessecador até completa evaporação do solvente.

As imagens obtidas foram analisadas através do Software Image J 1.50i.

### 2.3.4 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

A análise foi realizada para determinar os grupos funcionais ligados às nanopartículas após a síntese e o tratamento térmico, o que permitiu ter um indício de quais são os compostos responsáveis por estabilizar as mesmas.

O pó obtido após a secagem e/ou tratamento térmico e a amostra de extrato foram analisados em um equipamento FTIR modelo Jasco 4100 equipado com refletância total atenuada (ATR) pertencente ao Laboratório de Propriedades Físicas e Mecânicas da Madeira da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Os espectros de FTIR foram recolhidos com gama de  $4000\text{ cm}^{-1}$  até  $600\text{ cm}^{-1}$  com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ .

### 2.4 Atividade antifúngica contra xilófagos

Para determinar a atividade das nanopartículas contra fungos xilófagos foi realizado um teste rápido em que as nanopartículas biossintetizadas foram suspensas em álcool etílico e vertidas sobre o meio de cultivo ágar-batata-dextrose (BDA) estéril e já rígido na placa de petri. Após a secagem do solvente, foi disposto no centro da placa de petri discos de micélio dos fungos com aproximadamente 6 mm de diâmetro.

As concentrações de CuO NPs testadas foram de 1000, 500 e  $250\text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$  de meio e os fungos utilizados foram *Trametes versicolor* cepa LPF-108 e *Phanerochaete chrysosporium* cepa LPF-105.

Os diâmetros de crescimento dos fungos foram medidos a cada 24h com auxílio de paquímetro digital até que o fungo da placa controle ocupasse todo o espaço útil (84 mm) de meio de cultivo, e a porcentagem de inibição foi calculada conforme a Eq 9 utilizada por Gopalakrishnan et al. (1997).

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left( \frac{\text{diâmetro (mm) do tratado}}{\text{diâmetro (mm) do controle}} \times 100 \right) \quad (9)$$

### 2.4.1 Análise estatística

Para determinar se existe diferença significativa entre as diferentes concentrações de NPs testadas, realizou-se a análise da variância (ANOVA), executando-se o teste de comparação de médias LSD de Fisher. As análises estatísticas foram desenvolvidas utilizando probabilidade de erro de 5% com auxílio do software Statgraphics Centurion.

## 3 Resultados e discussão

### 3.1 Caracterização

O Método I, apesar de ocorrer a mudança de coloração da reação para marrom avermelhado (Figura 8) como muitos autores citam ser indício da síntese de CuO NPs, a solução não apresentou pico característico das mesmas no espectro UV-vis e apresentou caráter amorfo na difração de raio X, além de morfologia retangular na microscopia eletrônica de transmissão.

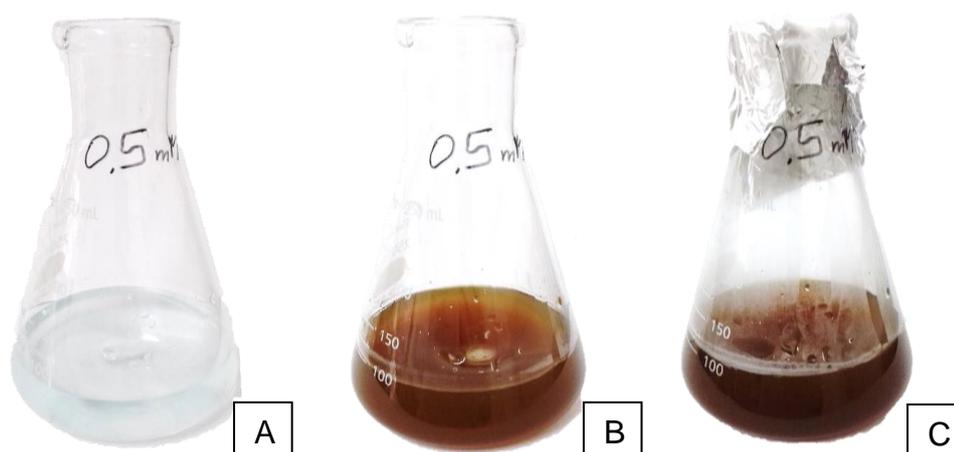


Figura 8 - Etapas da reação de síntese Método I. (A) acetato de cobre; (B) imediatamente após adição do extrato; (C) 24 h depois.

. A ressonância plasmônica de superfície, fenômeno pelo qual ocorre a absorção em determinado comprimento de onda depende do tamanho e da dispersão das nanopartículas. Em razão disso, há na literatura diversas bandas consideradas

característica das nanopartículas de cobre como em torno de 220-225nm e em 570 e 700nm (CHAN et al., 2007; DANG et al., 2011; SIVARAJ et al., 2014a; ROY et al., 2016).

Comparando o espectro do extrato e da solução de síntese de nanopartículas (Figura 9), além do espectro da água deionizada, verifica-se que o único pico presente é do próprio extrato, além da zona de ruído em que até o espectro da água apresenta oscilações.

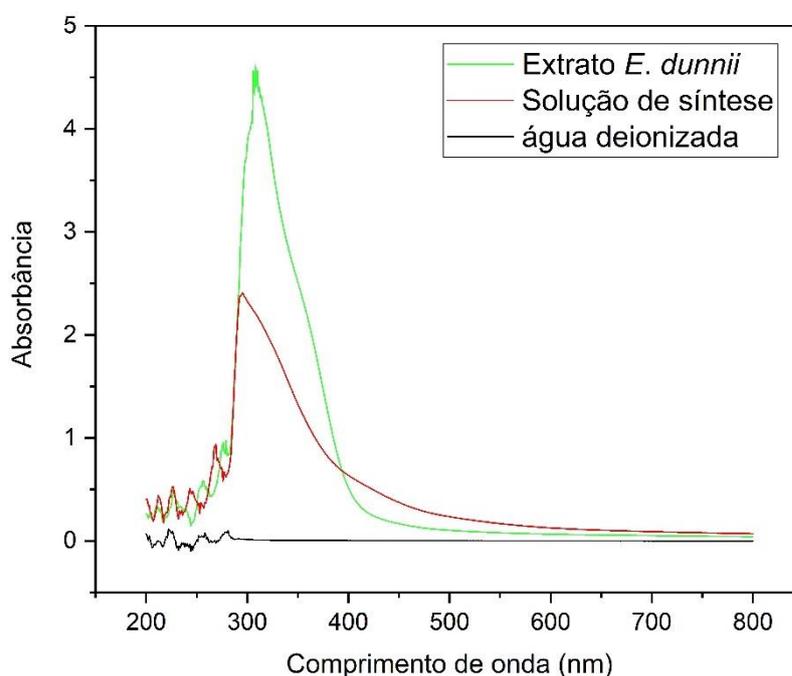


Figura 9 - Espectro UV-vis das CuO NPs sintetizadas pelo Método I

Alguns autores indicam que CuO NPs podem absorver em comprimento de onda em torno de 200 e 300 nm (GNANAVEL et al., 2017; NAIKA et al., 2015; SIVARAJ et al., 2014), porém os artigos de síntese química, sem utilização de extratos, relatam apenas entre 500 e 700 nm (DANG et al., 2011; KUMAR et al., 2013).

Nas micrografias do MET antes do tratamento térmico (Figura 10A) as nanopartículas apresentaram morfologia retangular, diferente das morfologias da maioria dos trabalhos relacionados a biossíntese, que é esférica, além de tamanho médio acima de 100 nm.

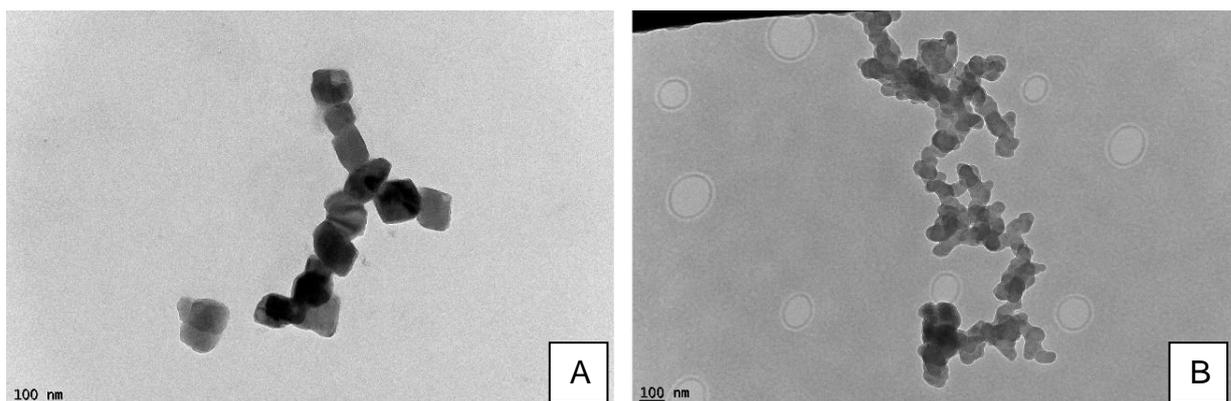


Figura 10 - Micrografias do MET das CuO NPs sintetizadas pelo Método I secas a 100 °C, em que (A) partículas, (B) matéria orgânica

A morfologia encontrada é provavelmente referente ao sal precursor que não reduziu, Ren et al. (2009) também obtiveram CuO NPs de morfologia retangular através do método de termo plasma, porém estas possuíam tamanhos entre 22 e 94 nm. Além das partículas também é possível observar matéria orgânica presente na amostra (Figura 10B) proveniente do extrato após a secagem a 100 °C.

As micrografias da amostra após o tratamento térmico (Figura 11) demonstram a morfologia esférica das NPs, porém estas possuem diâmetros muito pequenos para serem medidos, pois o equipamento utilizado não possui resolução o suficiente para tal.

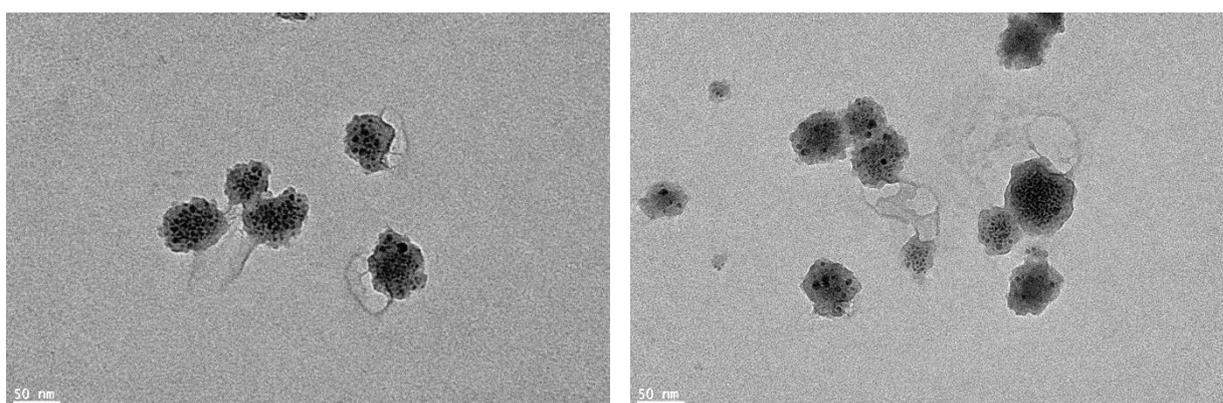


Figura 11 - Micrografias do MET das CuO NPs sintetizadas pelo Método I após o tratamento térmico a 700 °C

Observa-se que as NPs aparentam estarem em pequenos aglomerados e envoltas por algum composto. Esta aglomeração de partículas pequenas, formando morfologias esféricas maiores é semelhante a observada por Karimi e Mohsenzadeh (2015) e Prabhu et al. (2017) na Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

A Figura 12 apresenta os difratogramas para as amostras obtidas no Método I de síntese, onde CuO 100 °C refere-se a amostra seca, sem tratamento e CuO 700 °C refere-se a amostra após o tratamento térmico.

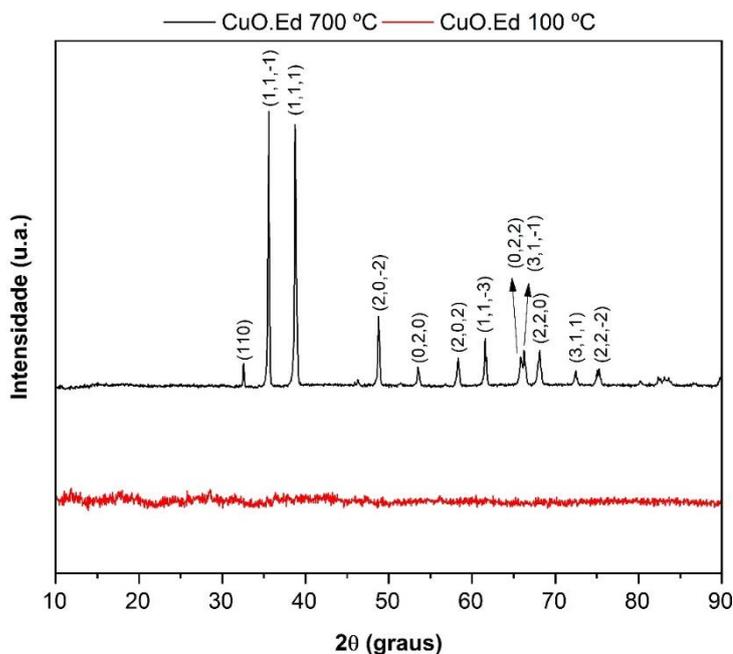


Figura 12 - Difratogramas do CuO sintetizado pelo Método I antes e depois do tratamento térmico

Os picos de difração estão localizados em 32,57, 35,59, 38,78, 48,79, 53,54, 58,31, 61,56, 65,83, 66,27, 68,12, 72,42, 75,27° e os respectivos planos referente a eles estão identificados na figura, o padrão é de partículas esféricas de fase monoclinica e a estrutura cristalina é cúbica de face centrada, foi utilizado como referência o COD ID 7212242.

A amostra sem tratamento térmico possui caráter de material amorfo, não apresentando nenhum pico de difração característico. Resultados semelhantes estão presentes na literatura onde, apesar de citar como cristalino o CuO obtido pela biossíntese utilizando *Carica papaya* como agente redutor, Sankar et al., (2014) obtiveram difratograma semelhante a amostra de CuO sem tratamento térmico. O mesmo tipo de difratograma apresentou Wang et al. (2014b) para biossíntese de nanopartículas de ferro utilizando extrato de *Eucalyptus* sp, possuindo características de material amorfo quando não há calcinação após a síntese.

O diâmetro médio de cristalito obtido através da equação de Debye-Scherrer para a amostra calcinada a 700 °C foi de 19,79 nm, similar com os 16,78 nm encontrados por Ijaz et al. (2017) e inferiores aos 26 nm encontrados por Sivaraj et al. (2014a) e os 46 nm de Sivaraj et al. (2014b).

Na preparação da amostra para a análise de MET, o CuO por não ser solúvel em água, decanta no fundo do eppendorf utilizado. Em razão disso, e para evitar a concentração em demasiado no grid, esperou-se ocorrer a decantação da maioria das partículas, para pegar com auxílio da pipeta de pasteur apenas as que permaneceram em suspensão por mais tempo. Este pode ser o motivo pelo qual as NPs que aparecem no MET serem menores que os resultados obtidos pelo DRX, já que o diâmetro médio calculado a partir do difratograma é uma aproximação e as partículas que decantaram podem ser maiores.

A Figura 13 apresenta os difratogramas obtidos pelo Método II, no qual foram utilizadas as duas espécies de *Eucalyptus*, além de comparar com a amostra do Método I calcinada.

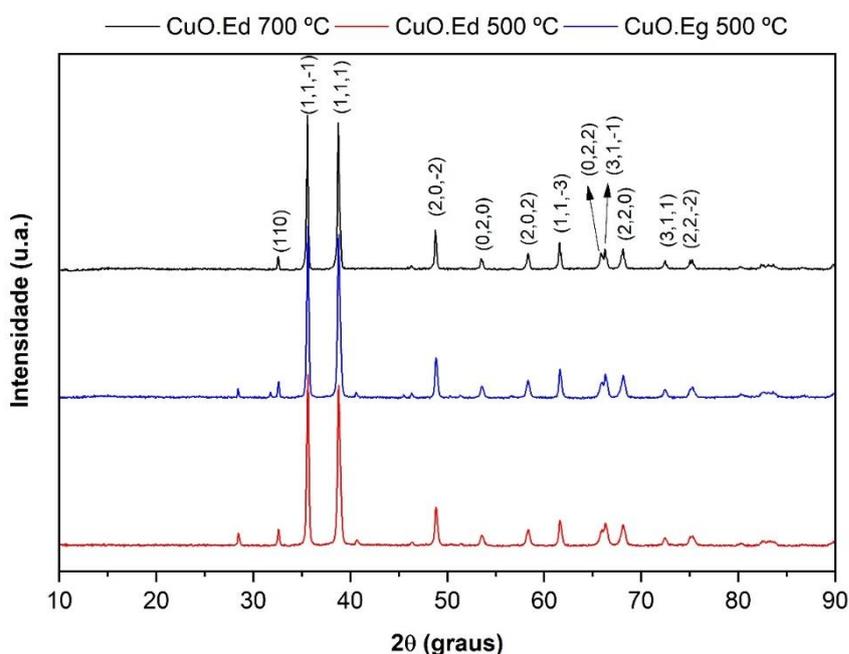


Figura 13 - Difratogramas do CuO sintetizadas pelo Método II

Os difratogramas de todas as amostras são semelhantes, inclusive nas intensidades dos picos, porém nas duas amostras sintetizadas pelo Método II apareceu um pico em torno de 28,45° que não é característico do CuO, indício de que

há algum contaminante, possivelmente seja o óxido cuproso ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) estado de menor oxidação que o  $\text{CuO}$ . Antes das soluções do Método II serem levadas a mufla, houve a formação de pó vermelho precipitado, outro indício da síntese de  $\text{Cu}_2\text{O}$  que possivelmente possa continuar neste mesmo estado de oxidação apesar do tratamento térmico.

Os diâmetros de cristalito obtido para as partículas obtidas com extrato de *E. dunnii* e *E. grandis* foram 24,73 e 25,28 nm respectivamente. Rehana et al. (2017) utilizando método de síntese semelhante obtiveram partículas biossintetizadas por extratos de diferentes plantas com diâmetros entre 9,8 e 10,77 nm.

O diâmetro médio obtido pelo Método I foi entre 5 e 6 nm menor que o obtido para o Método II. Porém, ao realizar análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), as partículas sintetizadas pelo Método II formaram grandes agregados, impossibilitando a visualização de partículas dispersas e interagindo com o feixe de elétrons. Isso pode ter ocorrido devido a alta concentração de sal precursor, em que a concentração de extrato não foi suficiente para estabilizar as partículas obtidas, causando maior agregação.

Para determinar os possíveis compostos provenientes dos extratos ligados as nanopartículas após a síntese, foi realizada análise de FTIR. Os picos encontrados e as ligações as quais eles representam estão identificados na Tabela 13.

Tabela 13 - Grupos funcionais referentes aos picos do espectro FTIR

Pico	Identificação
3343 – 3295 2129	O-H de grupos fenólicos, álcoois e ácidos carboxílicos; C≡C alcino
1738 – 1731	C=O de ácidos carboxílicos, aldeídos, éster; amidas de enzimas e proteínas
1640 – 1566	C=O amidas; N-H de aminas primárias; C=C de anéis aromáticos e alcenos;
1423 – 1444	C-H alcanos; Nitro (R-NO <sub>2</sub> )
1368 – 1359	Nitro (R-NO <sub>2</sub> )
1219 – 1221	C-N de aminas; C-O éster, éter, álcoois, ácidos carboxílicos e anidridos
1031 - 1044	C-N de aminas alifáticas; C-O de álcoois e fenóis

Fonte:(PAVIA et al., 2010)

A Figura 14 apresenta os espectros do extrato de *E. dunnii* e amostras do Método I antes e depois do tratamento térmico. A Figura 15 apresenta os espectros das NPs sintetizadas pelo Método II, além do extrato aquoso. Os dois extratos apresentaram alta semelhança, apenas deslocando os picos em no máximo  $5\text{ cm}^{-1}$ , em razão disso escolheu-se por manter apenas um espectro de extrato para não poluir o gráfico.

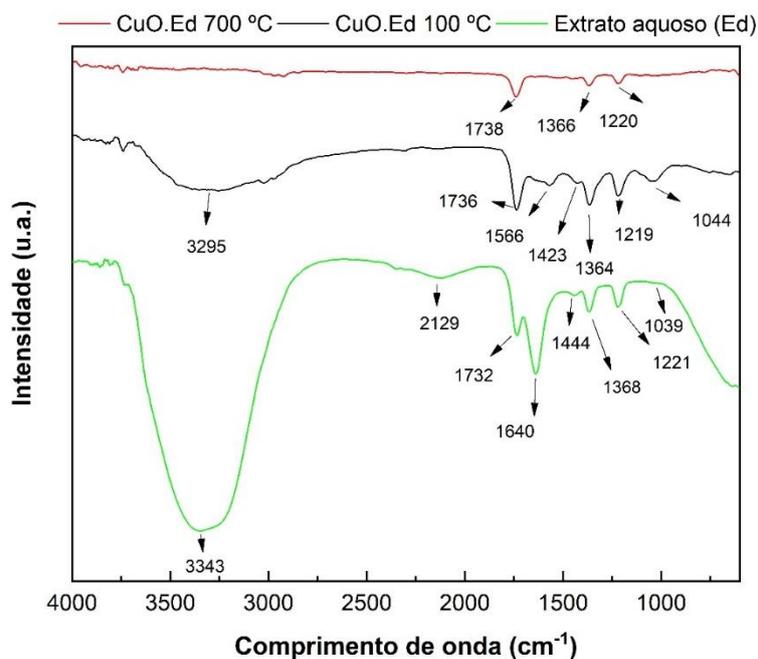


Figura 14 - Espectros FTIR do CuO sintetizado pelo Método I

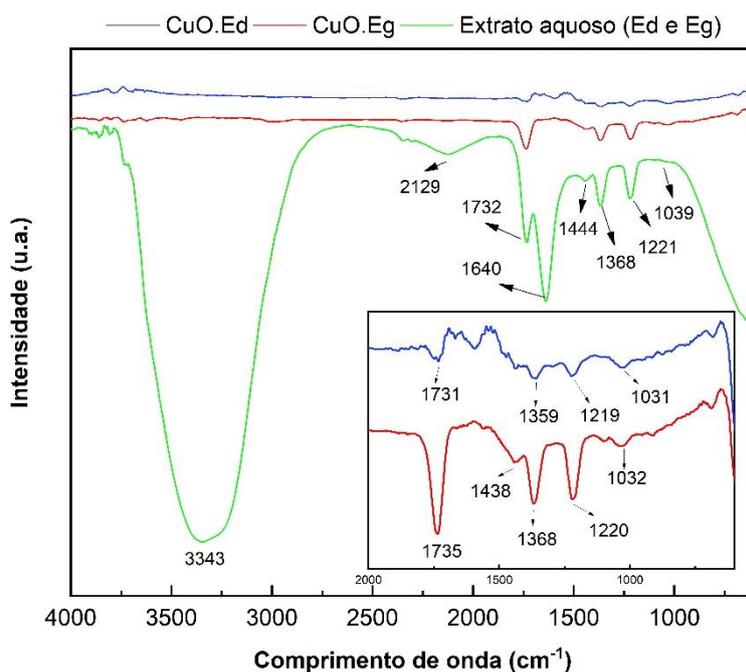


Figura 15 - Espectros FTIR do CuO sintetizado pelo Método II

Nasrollahzadeh et al. (2014) sugere que compostos com funcionais O-H e N-O podem agir como agentes redutores para a síntese de NPs, doando elétrons aos metais com carga positiva, que ficam com carga zero e se unem, causando o efeito de nucleação, até determinado tamanho em que os compostos ainda presentes se ligam as NPs estabilizando-as.

Através da comparação entre os espectros se observa que na amostra não calcinada ainda havia muita matéria orgânica presente, e após a calcinação poucos picos restaram, sendo estes  $1738\text{ cm}^{-1}$  correspondendo a ácidos carboxílicos, aldeídos conjugados ou ainda proteínas,  $1366\text{ cm}^{-1}$  de grupos nitro, e  $1220$  ligações C-O que podem ser de éster, éter, álcoois e ácidos carboxílicos.

Os espectros das NPs sintetizadas pelo método II apresentam diferenças entre si, os picos que restaram após a síntese são praticamente iguais, porém possuem intensidades diferentes. As CuO NPs sintetizadas com extrato de *E. dunnii* provavelmente possuem menos matéria orgânica ligada, apesar do extrato possuir maior concentração de compostos fenólicos, este fato pode indicar que existem outros compostos orgânicos ligados a estabilização das partículas, os quais podem estar presentes em maior quantidade no extrato de *E. grandis*.

Os picos de maior intensidade presentes nos espectros das NPs sintetizadas pelo Método II são os mesmos que os presentes nas NPs do Método I. Os picos menos acentuados em  $1031$  e  $1438\text{ cm}^{-1}$  indicam a presença de compostos aromáticos.

Autores que obtiveram resultados semelhantes indicam que estes picos nas nanopartículas biossintetizadas são indícios de que compostos fenólicos, flavonoides e proteínas estão envolvidos na estabilização das partículas, evitando a aglomeração das mesmas (HARNE et al., 2012; ROY et al., 2016; SIVARAJ et al., 2014a).

### **3.2 Atividade antifúngica**

Para o teste de atividade antifúngica foram utilizados dois fungos de podridão branca porque este tipo de fungo tem a capacidade de degradar os dois principais componentes da madeira, celulose e lignina, e causar grandes perdas para o setor madeireiro.

A curva de crescimento do fungo *T. versicolor* do controle e dos tratamentos (Figura 16a) demonstra que quanto maior a concentração de nanopartículas, maior a inibição do crescimento do fungo.

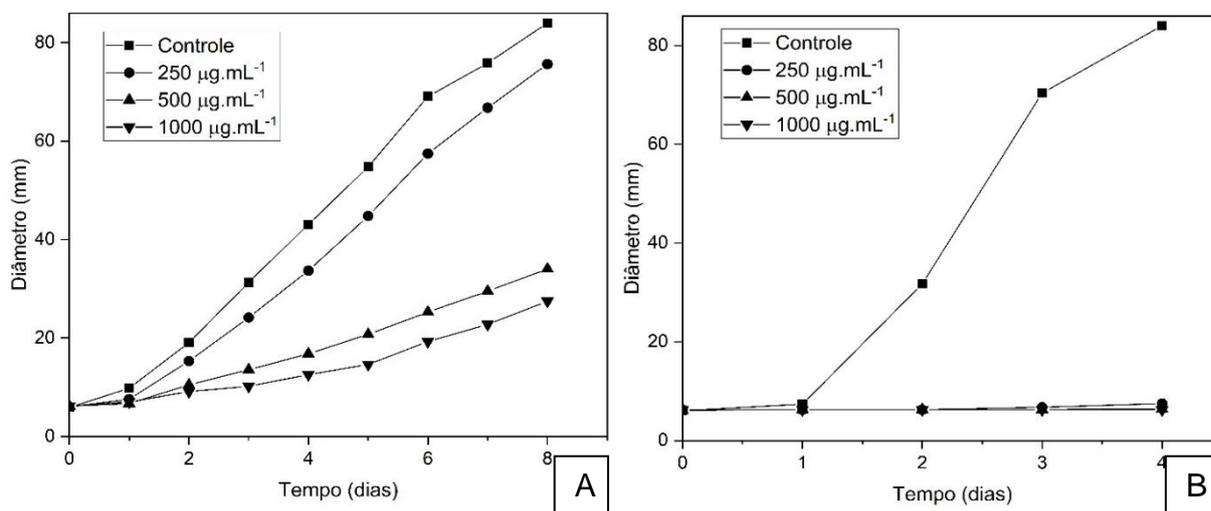


Figura 16 - Curvas de crescimentos dos fungos (A) *T. versicolor* e (B) *P. chrysosporium* tratados com CuO

Analisando-se a Tabela 14 nenhuma das concentrações testadas foi capaz de inibir completamente o crescimento do fungo *T. versicolor*, sendo a concentração de 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  o melhor resultado inibindo em 72,7% o crescimento micelial. Porém o *P. chrysosporium* foi fortemente inibido em todas as concentrações testadas.

Tabela 14 - Inibição do crescimento de fungos xilófagos por CuO sintetizado pelo Método II com extrato de *E. dunnii*

Concentração ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	% inibição	
	<i>T. versicolor</i>	<i>P. chrysosporium</i>
250	10,87 <sup>b</sup> ( $\pm 6,55$ )	97,28 <sup>a</sup> ( $\pm 3,54$ )
500	64,32 <sup>a</sup> ( $\pm 26,88$ )	99,54 <sup>a</sup> ( $\pm 0,45$ )
1000	72,70 <sup>a</sup> ( $\pm 17,33$ )	100 <sup>a</sup> ( $\pm 0,00$ )

Em que: médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente em 5% de erro, conforme o teste F ( $p < 0,05$ ) e LSD Fisher.

O fungo *P. chrysosporium* apresentou maior susceptibilidade a ação as CuO NPs e o desvio padrão não foi muito acentuado, porém o *T. versicolor* além de ser mais resistente a ação das NPs também apresentou desvio padrão relevante nas concentrações de 500 e 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Por essa razão, não houve diferença significativa entre estas concentrações.

O cobre em pequenas concentrações pode não apresentar ação contra fungos mais resistentes e acabar agindo apenas como micronutriente, essencial para a atividade de algumas enzimas, porém em altas concentrações é tóxico para a maioria das células (PAŘIL et al., 2017). Outros autores indicam que CuO NPs apresentam excelente atividade contra fungos de podridão branca, incluindo *T. versicolor*, neste estudo o mesmo fungo apresentou relativa resistência, claramente relacionada a concentração. Pařil et al. (2017) utilizaram concentrações de 1000 a 3000  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de CuO NPs em madeiras tratadas, afim evitar a perda de massa pela podridão causada por *T. versicolor*, e observaram que na menor concentração houve mínima perda de massa relacionada a ele.

Fungos de podridão parda tem apresentado maior resistência a CuO e ZnO NPs, em que a madeira tratada perde mais de 30% de massa no ensaio de apodrecimento, as nanopartículas baseadas em boro são mais eficazes, tendo as madeiras tratadas menos de 10% de perda de massa, porém essas partículas são facilmente lixiviáveis (KARTAL et al., 2009; MANTANIS et al., 2014).

O fungo *P. chrysosporium* apresentou alta susceptibilidade a nanotubos de carbono, extrativos de espécies tropicais da África, extrativos de espécies brasileiras e extratos de *Streptomyces* (SANTANA, 2011; MOUNGUENGUI et al., 2016; SHARMA et al., 2016; MING et al., 2018).

As CuO NPs biossintetizadas neste estudo apresentam relevante atividade contra fungos de podridão branca, porém cada fungo possui comportamento próprio frente a ação destas. Futuramente deve-se testar concentrações maiores contra o *T. versicolor*, afim de determinar a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento deste fungo.

## 4 Conclusão

O método mais utilizado na literatura só foi capaz de biossintetizar nanopartículas de óxido de cobre (CuO NPs) após o tratamento térmico, apesar de haver mudança de coloração na solução de síntese, a mesma não apresentou picos característicos de absorção no espectro UV-visível, tinha caráter amorfo na análise de difração de raio-X (DRX) e morfologia retangular com tamanhos acima de 100 nm.

Após a calcinação a 700 °C, o DRX apresentou caráter cristalino, com diversos picos de difração característicos do CuO, e diâmetros de partículas de 19,79 nm. O segundo método testado, com calcinação a 500 °C, também apresentou material cristalino e diâmetros menores, entre 24 e 26 nm.

Todas as amostras apresentaram picos referentes ao extrato na análise FTIR, indicando que mesmo após o tratamento térmico ainda existe material orgânico ligado as nanopartículas estabilizando-as.

As CuO NPs sintetizadas pelo Método II utilizando extrato de *E. dunnii*, apresentaram excelente atividade antifúngica contra o *P. chrysosporium*, inibindo o crescimento do mesmo em todas as concentrações acima de 97%, sendo que na maior concentração o mesmo foi completamente inibido. O *T. versicolor* apresentou maior resistência as CuO NPs, onde a menor concentração inibiu apenas 10% e maior 72,7%.

Com estes resultados conclui-se que CuO NPs podem ser sintetizadas utilizando-se extrato de folhas de *Eucalyptus* sp., porém o método mais utilizado para biossíntese pode não ser o ideal neste caso, necessitando de tratamento térmico para obter material cristalino. Além disso, as CuO NPs sintetizadas podem ser utilizadas como agente antifúngico no tratamento contra fungos apodrecedores da madeira.

## CAPÍTULO 3 – Biossíntese e caracterização de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO)

### 1 Introdução

A biossíntese de nanopartículas tem atraído grande interesse de pesquisadores que procuram métodos mais simples de síntese e que não deixem resíduos de solventes e químicos tóxicos, permitindo a aplicação destas NPs em áreas como a medicina, cosméticos e alimentos (MAHANTY et al., 2013; DOBRUCKA; DŁUGASZEWSKA, 2016; MATINISE et al., 2017).

Nanopartículas de óxido de zinco já foram eficientemente sintetizadas com extratos de várias espécies vegetais como *Trifolium platense*, *Moringa oleifera*, *Nyctanthes arbor-tristis*, *Ocimum basilicum*, *Ceropegia candelabrum*, *Azadirachta indica* e *Eucalyptus globulus* (SALAM; SIVARAJ; VENCKATESH, 2014; ELUMALAI; VELMURUGAN, 2015; DOBRUCKA; DŁUGASZEWSKA, 2016; MATINISE et al., 2017; MURALI et al., 2017; REDDY; MANDAL, 2017).

Dentre as aplicações das ZnO NPs está sua ação contra micro-organismos como bactérias e fungos. Micro-organismos patogênicos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis* são suscetíveis sua ação (ELUMALAI; VELMURUGAN, 2015; DOBRUCKA; DŁUGASZEWSKA, 2016).

Além de apresentar ação antimicrobiana contra patogênicos, as ZnO NPs também possuem atividade antifúngica contra fungos xilófagos como *Trametes versicolor* e *Gloeophyllum trabeum*, sendo capazes de diminuir consideravelmente a perda de massa de madeiras impregnadas (KARTAL; GREEN; CLAUSEN, 2009; MANTANIS et al., 2014; TERZI et al., 2016).

Apesar de ZnO NPs apresentarem ação contra fungos xilófagos em estudos anteriores, todas as partículas testadas eram de origem comercial ou sintetizadas por métodos químicos. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi biossintetizar ZnO NPs utilizando extrato de *Eucalyptus dunnii* para aplicação contra fungos apodrecedores da madeira.

## 2 Materiais e métodos

### 2.1 Extração de compostos fenólicos

Os parâmetros de extração de compostos fenólicos das folhas de *E. dunnii* foram determinados conforme o planejamento experimental descrito no Capítulo I.

Foram adicionados em enrlenmeyer de 250 mL, 10g de folhas moídas e 100 mL de água deionizada e levados ao banho termostático a 80 °C por 75 min.

Transcorrido o tempo de extração, os extratos foram filtrados a vácuo com papel filtro de celulose e armazenados em refrigerador até a utilização na síntese.

### 2.2 Biossíntese de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO)

#### 2.2.1 Método I

Para sintetizar as nanopartículas de ZnO o sal precursor foi acetato de zinco dihidratado ( $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Para tanto, utilizou-se 50 mL de uma solução de 5 mM do sal precursor e 50 mL de extrato de *E. dunnii*, a solução foi mantida sob agitação magnética por 24 h, e após esse período o precipitado obtido foi centrifugado e lavado 2x com água deionizada. Após a lavagem foi seco em estufa a 100 °C.

O pó obtido era de coloração avermelhada e apresentou caráter amorfo na difração de raio X, em razão disso foi levado ao forno tipo mufla a 500 °C por 2h.

Novamente, esta metodologia de síntese é semelhante à descrita em artigos relacionados a biossíntese de nanopartículas de ZnO, porém não resultou partículas cristalinas e foi necessário realizar o tratamento térmico.

#### 2.2.2 Método II

Neste método de síntese, baseado no trabalho de Rehana et al. (2017), foram utilizados 1,57g de sal precursor e 20 mL de extrato de *E. dunnii* sob agitação magnética vigorosa e na temperatura de 80°C por 20 min. Transcorrido o tempo de síntese a amostra foi levada a mufla ainda fria, ligou-se a mesma que possui taxa de

aquecimento de aproximadamente  $12\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  até  $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ , na qual permaneceu durante 2h.

O procedimento de aquecimento da mufla foi adotado para evitar a fervura imediata e consequente aumento de volume da solução, a qual poderia virar dentro da mufla.

O pó de coloração acinzentada obtido foi dispersado com auxílio de almofariz e pistilo e armazenado até realizações das análises.

### **2.3 Caracterização das nanopartículas**

As metodologias de caracterização das partículas de ZnO foram Difração de Raio-X, Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e atividade antifúngica contra xilófagos, foram realizadas conforme os itens 2.3.2, 2.3.4 e 2.4 do Capítulo II.

Evitou-se descrever novamente as metodologias para não tornar o trabalho repetitivo. Não se utilizou da Espectroscopia UV-vis porque outros autores descrevem a absorção de ZnO na região de 300 nm, a mesma região em que aparece o pico referente ao extrato, causando sobreposição (SINGH et al., 2011; MURALI et al., 2017).

## **3 Resultados e discussão**

### **3.1 Caracterização**

O método I de síntese, assim como ocorreu com o CuO, também não foi capaz de resultar em material cristalino. A Figura 17 demonstra os difratogramas referentes a amostra seca a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  e após o tratamento térmico a  $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Todos os picos são referentes ao óxido de zinco (ZnO) e estão localizados em  $31,77$ ,  $34,43$ ,  $36,26$ ,  $47,54$ ,  $56,58$ ,  $62,84$ ,  $66,35$ ,  $67,92$ ,  $69,06$ ,  $72,56$ ,  $76,92$ ,  $81,39$  e  $89,57^{\circ}$  característicos da estrutura cristalina hexagonal tipo wurtzita, foi utilizada como referência a ficha COD ID 2300450.

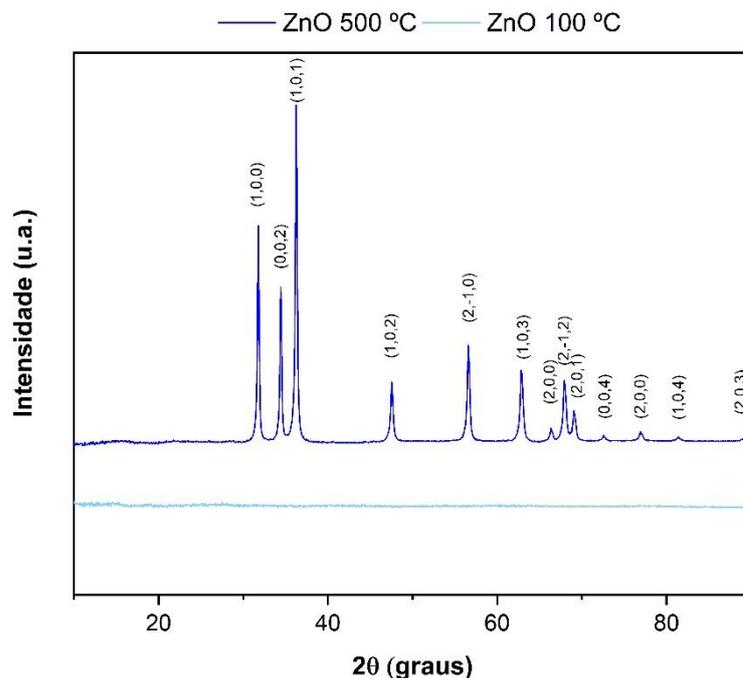


Figura 17 - Difratomogramas de ZnO sintetizado pelo Método I antes e depois do tratamento térmico

Diferentemente do que se encontra na literatura para biossíntese de CuO NPs, em que não é realizado tratamento térmico, a maioria dos autores que sintetizam ZnO NPs via extrato de plantas utilizam tratamento após a síntese com temperaturas entre 400 e 500 °C (ELUMALAI; VELMURUGAN, 2015; MURALI et al., 2017).

Matinise et al. (2017) observou o mesmo padrão de difração para amostras secas a 100 °C e calcinadas a 500 °C, em que a amostra apenas seca apresentou picos pouco distinguíveis, enquanto a amostra calcinada possuiu alta cristalinidade com todos os picos sobressalentes.

Os difratogramas das amostras de ZnO sintetizadas pelo Método I e II (Figura 18) possuem os mesmos picos, porém os picos referentes ao Método II são mais intensos. Matinise et al. (2017) sugerem que este comportamento se deve ao aumento da concentração de ZnO, o que faz com que um maior número de partículas estejam orientada no mesmo plano.

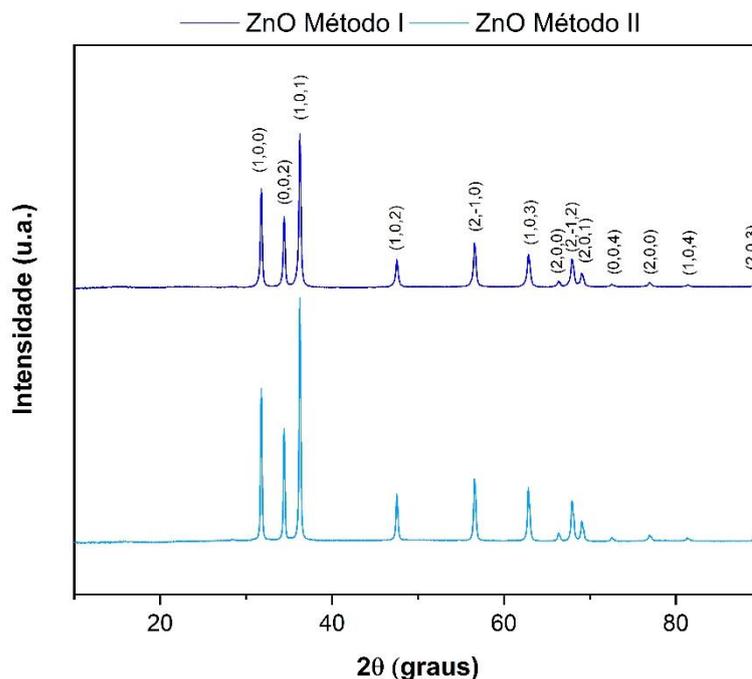


Figura 18 - Difratoograma de ZnO obtido pelo Método I e II

O diâmetro médio das partículas obtidas foi de 26,47 nm para o Método I e 32,24 nm para o Método II, maiores que os 11,6 nm encontrados por Reddy et al. (2017) utilizando *Eucalyptus globulus* e os 18 nm de Elumalai e Velmurugan (2015) utilizando *Azadirachta indica*, porém menores que os 50, 66 e 70 nm obtidos através da biossíntese com extratos de *Ocimum basilicum*, *Corriandrum* e *Trifolium pretense* respectivamente (DOBRUCKA; DŁUGASZEWSKA, 2015; GNANASANGEETHA; SARALATHAMBAVANI, 2013; SALAM et al., 2014).

Além disso, corrobora com os resultados de Martinise et al. (2017) que variaram a concentração do sal precursor (nitrato de zinco) entre 0,3444-10,333 g e observaram que quanto menor a concentração de zinco na síntese, menor o diâmetro das partículas obtidas, o qual variou entre 12,27-30,51 nm.

Os espectros FTIR (Figura 19) foram semelhantes aos obtidos para as CuO NPs, sendo os picos um pouco deslocados. Os espectros para a amostra seca e a calcinada demonstram também o mesmo padrão, em que a amostra seca possui mais picos semelhantes ao extrato, indicando que ainda há grande presença de matéria orgânica, porém na amostra calcinada, apenas três picos do extrato permanecem bem distinguíveis.

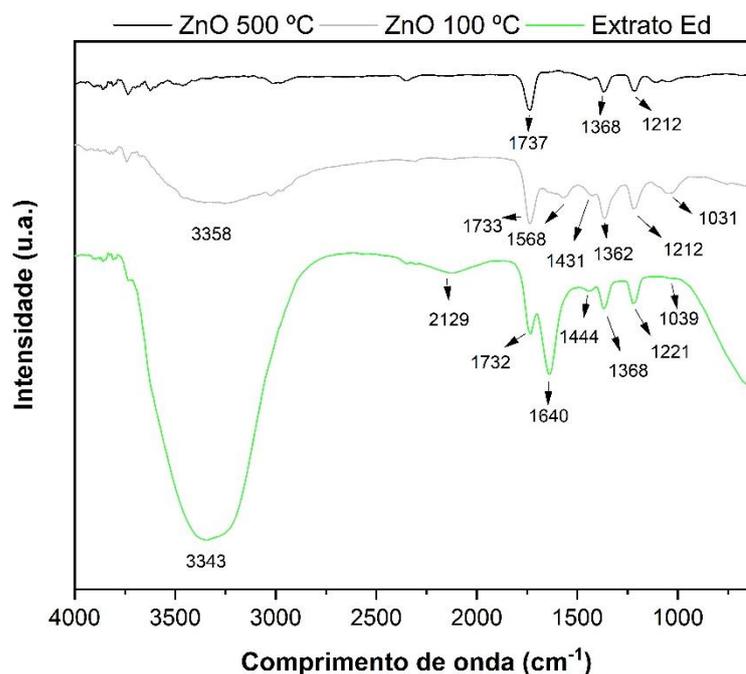


Figura 19 - Espectros FTIR do ZnO sintetizado pelo Método I e II

Os picos relacionados ao extrato foram identificados na página 51 no Capítulo II, os picos presentes na amostra calcinada são provenientes de  $1737\text{ cm}^{-1}$  de ligações C=O de ácidos carboxílicos e aldeídos ou ainda proteínas,  $1368\text{ cm}^{-1}$  C-N de grupos nitro, além de  $1212$  de ligações C-O de éster, álcoois e ácidos carboxílicos.

Reddy et al (2017) observaram mais picos remanescentes do extrato de *E. globulus* nas ZnO NPs biossintetizadas. Mesmo após tratamento de 2h a  $400\text{ °C}$  ainda restaram picos referentes a fenóis, ácidos carboxílicos e álcoois.

Elumalai e Velmurugan (2015) Indica a presença de polióis, terpenóides, proteínas, álcoois, cetonas e ácidos carboxílicos nas ZnO NPs biossintetizadas através dos picos remanescentes do extrato de *A. indica*, além de indicar que as proteínas podem ser as responsáveis pela estabilização das NPs, formando um revestimento em torno das mesmas.

### 3.2 Atividade antifúngica

As ZnO NPs biossintetizadas inibiram 100% do crescimento do fungo *P. chrysosporium* em todas as concentrações (Tabela 15), demonstrando excelente atividade contra este xilófago. Porém, assim como no caso das CuO NPs nenhuma

concentração foi capaz de inibir totalmente o desenvolvimento do *T. versicolor*, mas este foi mais suscetível a ação das ZnO NPs.

Tabela 15 - Inibição do crescimento de fungos xilófagos por ZnO sintetizado pelo Método II com extrato de *E. dunnii*

Concentração ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	% inibição	
	<i>T. versicolor</i>	<i>P. chrysosporium</i>
250	81,07 <sup>a</sup> ( $\pm 9,61$ )	100 <sup>a</sup> ( $\pm 0,00$ )
500	82,74 <sup>a</sup> ( $\pm 3,10$ )	100 <sup>a</sup> ( $\pm 0,00$ )
1000	92,72 <sup>a</sup> ( $\pm 6,83$ )	100 <sup>a</sup> ( $\pm 0,00$ )

Em que: médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente em 5% de erro, conforme o teste F ( $p < 0,05$ ) e LSD Fisher.

As concentrações de ZnO NPs testadas apresentaram excelente atividade contra os dois fungos testados (Figura 20), em que mesmo a menor foi capaz de inibir em 80% o *T. versicolor* e 100% o *P. chrysosporium*. Todas as concentrações não apresentaram diferença significativa entre si, principalmente devido ao desvio padrão da inibição do *T. versicolor*, que apesar de ser menos acentuado que o obtido para as CuO NPs ainda chega a quase 10%.

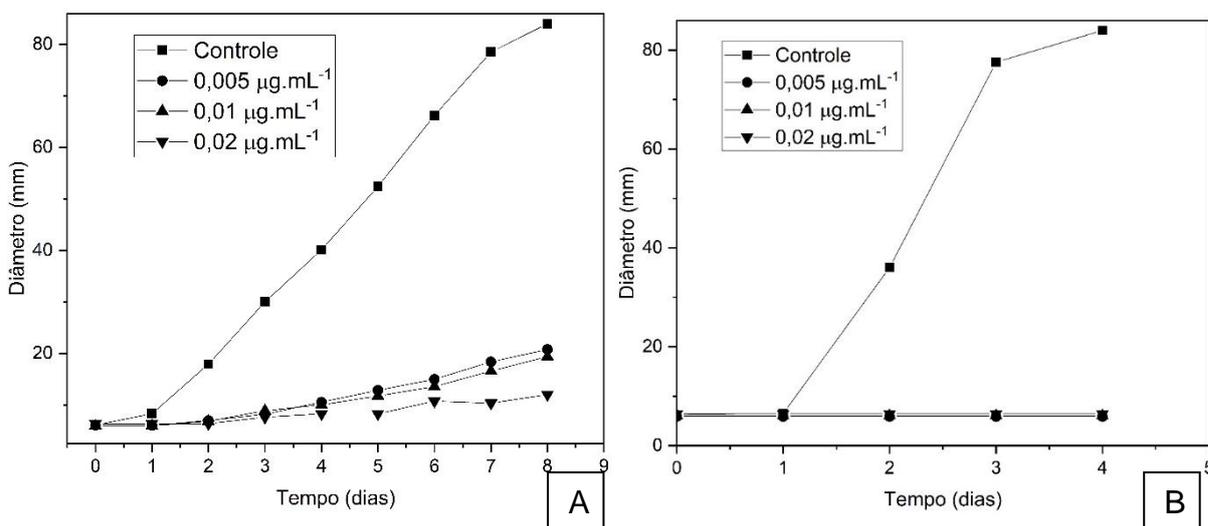


Figura 20 - Curvas de crescimentos dos fungos (A) *T. versicolor* e (B) *P. chrysosporium* tratados com ZnO

Estes resultados diferem do observado por Kartal et al. (2009) em madeiras impregnadas, em que NPs de CuO são capazes de inibir a perda de massa por *T. versicolor* mais efetivamente que as ZnO NPs. Porém, Mantanis et al. (2014)

demonstrou que, apesar de obter resultados muito semelhantes, as ZnO NPs foram mais eficazes que as CuO NPs contra o mesmo fungo.

As diferenças nas atividades antifúngicas podem estar associadas ao diâmetro das partículas, Kartal et al. (2009) cita a utilização de NPs em torno de 80 nm e Mantanis et al. (2014) de 30 nm. Neste estudo as ZnO NPs apresentaram melhor ação antifúngica que as CuO NPs, mas o diâmetro médio é de 12 nm maior. Possivelmente, quanto maior as CuO NPs utilizadas, menor a ação antifúngica das mesmas, o que pode não afetar tanto na ação das ZnO NPs.

O mecanismo de ação das NPs contra bactérias e fungos não é bem elucidado. Alguns autores indicam que, em bactérias, as espécies reativas de oxigênio geradas pela presença de NPs causa danos a parede celular, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Além de serem capazes de reduzir a capacidade de replicação do DNA (NEL et al., 2006).

A ação fungicida é ainda menos conhecida, He et al. (2011) indicam que ZnO NPs são capazes de causar deformação na estrutura das hifas fúngicas de *Botrytis cinerea* e danificar os conídios do fungo *Penicillium expansum*. Através de análises de Espectroscopia Raman, identificaram uma maior produção de carboidratos e ácidos nucleicos por *B. cinerea* como reação ao estresse causado pela presença das NPs. Ao contrário, o *P. expansum* teve as bandas atribuídas a proteínas, lipídeos e carboidratos drasticamente diminuídas, sendo o crescimento do fungo totalmente inibido.

## 4 Conclusão

O Método que não utiliza tratamento térmico também não foi capaz de gerar material cristalino na síntese de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO NPs). As amostras dos dois métodos após o tratamento a 500 °C são cristalinas com forma hexagonal tipo wurtzita.

As ZnO NPs obtidas após o tratamento térmico possuem diâmetro menor que as sintetizadas pelo Método II, sendo de 26,47 e 32,24 nm respectivamente.

Através da análise de FTIR sugere-se que os compostos envolvidos na estabilização das nanopartículas podem ser ácidos carboxílicos, proteínas e polifenóis.

Os fungos apodrecedores da madeira testados neste estudo apresentaram alta susceptibilidade as ZnO NPs, ficando em 100% de inibição para todas as concentrações testadas contra o *Phanerochaete chrysosporium* e entre 80 e 92% contra o *Trametes versicolor*.

Portanto, conclui-se que o extrato aquoso de *Eucalyptus dunnii* pode ser utilizado para a síntese de ZnO NPs com característica cristalina e ação antifúngica.

## Considerações finais

O método mais utilizado na literatura para a biossíntese de nanopartículas de óxido de cobre (CuO NPs) com extrato de plantas não apresentou picos característicos de absorção na espectroscopia UV-vis e a difração de raio-X foi característica de material amorfo. Porém, após o tratamento térmico a 700 °C as partículas apresentaram diversos picos de difração característicos de CuO e diâmetro médio de 19,79 nm.

O mesmo ocorreu para a síntese de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO NPs) em que o mesmo método foi utilizado, sendo que as NPs só apresentaram caráter cristalino após tratamento térmico a 500 °C e possuem diâmetro médio de 26,47 nm.

Ao se utilizar o segundo método de síntese, os dois óxidos apresentaram caráter cristalino e diâmetro médios entre 24 e 26 nm para as CuO NPs sintetizadas com os dois extratos de *Eucalyptus*, e 32,24 nm para as ZnO NPs sintetizadas com extrato de *E. dunnii*.

Através das análises de Espectroscopia de Infravermelho (FTIR), pode-se afirmar que mesmo após o tratamento térmico ainda restam compostos provenientes do extrato presentes nas NPs, podendo estes serem proteínas, ácidos carboxílicos, álcoois e polifenóis.

Os dois óxidos inibiram completamente o crescimento micelial do fungo *Phanerochaete chrysosporium*. O fungo *Trametes versicolor* apresentou relativa resistência, a maior concentração de CuO testada inibiu 72% do crescimento, enquanto que a de ZnO inibiu 92%, sendo o fungo mais suscetível a ação das ZnO NPs.

Conclui-se que os dois óxidos biossintetizados possuem potencial aplicação na preservação da madeira, necessitando de estudos mais aprofundados para determinar suas ações para inibir a perda de massa causada pelos organismos xilófagos.

## Referências

ABRAF, Associação Brasileira de Produtos de Florestas Plantadas. **Anuário Estatístico: Ano base 2012**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.ipef.br/estatisticas/relatorios/anuario-abraf13-br.pdf>>.

ALBERNAZ, Vanessa Lima. **Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização físicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico**. 2014. 121 f. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2014.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. New York: John Wiley & Sons, 1996. 869 p.

ALI, K.; AHMED, B.; DWIVEDI, S.; SAQUIB, Q.; AL-KHEDHAIRY, A. A.; MUSARRAT, J. Microwave accelerated green synthesis of stable silver nanoparticles with *Eucalyptus globulus* leaf extract and their antibacterial and antibiofilm activity on clinical isolates. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–20, 2015.

ALMEIDA, I. F.; FERNANDES, E.; LIMA, J. L. F. C.; VALENTAO, P.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R. M.; COSTA, P. C.; BAHIA, M. F. Oxygen and Nitrogen Reactive Species Are Effectively Scavenged by *Eucalyptus Globulus* Leaf Water Extract. **Journal of medicinal food**, v. 12, n. 1, p. 175–183, fev. 2009.

ÁNGEL, M. H.; GONZÁLEZ, E. A. P. Plantas que contienen polifenoles. Antioxidantes dentro del estilo de vida. **Revista cubana de investigaciones biomédicas**, v. 18, n. 1, p. 12-14, 1999.

ANTUNES, F. S.; DAL'ACQUA, N.; BERGMANN, C. P.; GIOVANELA, M. Síntese, caracterização e aplicação de nanopartículas de prata como agentes antimicrobianos. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 9, n. 1, p. 20–26, 2013.

ASMATHUNISHA, N.; KATHIRESAN, K. A review on biosynthesis of nanoparticles by marine organisms. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 103, p. 283–287, 2013.

ATHAR, T. Chapter 14 - Metal Oxide Nanopowder BT - Emerging Nanotechnologies

for Manufacturing. In: **Micro and Nano Technologies**. Boston: William Andrew Publishing, 2010. p. 325–385.

AZEVEDO, A. P. G. B.; ADATI, F. M.; SANTOS, G. S.; CARVALHO, G. C.; VENTURELLI, P. N.; DIAS, R. F.; SANT'ANNA FILHO, C. Análise do potencial mercadológico de nanopartículas de prata de origem biológica por mapeamento de tecnologias e produtos em documentos de patentes. **Cadernos de Prospecção**, v. 8, n. 3, p. 431–440, 30 set. 2015.

BASHA, S. K.; LAKSHMI, K. V.; KUMARI, V. S. Ammonia sensor and antibacterial activities of green zinc oxide nanoparticles. **Sensing and Bio-Sensing Research**, v. 10, p. 34–40, 2016.

BOULEKBACHE-MAKHLOUF, L.; SLIMANI, S.; MADANI, K. Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of fruits of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria. **Industrial Crops and Products**, v. 41, n. 1, p. 85–89, jan. 2013.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. Statistics for experimenters. 1978.

BRITO, E. O. Estimativa da produção de resíduos na indústria brasileira de serraria e laminação de madeira. **Revista da Madeira**, v. 4, n. 26, p. 34–39, 1995.

BRUM, L. F. W. **Obtenção e avaliação de extratos de folhas de eucalipto (*Eucalyptus dives*) como potenciais antioxidantes em alimentos**. 2010. 135 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

CAO, G. **Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications**. Londres: Imperial College Press, 2004.

CHAN, G. H.; ZHAO, J.; HICKS, E. M.; SCHATZ, G. C.; VAN DUYN, R. P. Plasmonic Properties of Copper Nanoparticles Fabricated by Nanosphere Lithography. **Nano Letters**, v. 7, n. 7, p. 1947–1952, jul. 2007.

CIB, Conselho de Informações Sobre Biotecnologia. **GUIA DO EUCALIPTO: OPORTUNIDADES PARA UM DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL**. [s.l: s.n.]. Disponível em: < [http://cib.org.br/wp-content/uploads/2011/10/Guia\\_do\\_Eucalipto\\_junho\\_2008.pdf](http://cib.org.br/wp-content/uploads/2011/10/Guia_do_Eucalipto_junho_2008.pdf)>.

CLAUSEN, C. A.; KARTAL, S. N.; ARANGO, R. A.; GREEN, F. The role of particle size of particulate nano-zinc oxide wood preservatives on termite mortality and leach resistance. **Nanoscale Research Letters**, v. 6, n. 1, p. 427, 15 jun. 2011.

CUSHING, B. L.; KOLESNICHENKO, V. L.; O'CONNOR, C. J. Recent Advances in the Liquid-Phase Syntheses of Inorganic Nanoparticles. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 9, p. 3893–3946, 1 set. 2004.

CUVELIER, M.-E.; RICHARD, H.; BERSET, C. Comparison of the Antioxidative Activity of Some Acid-phenols: Structure-Activity Relationship. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 56, n. 2, p. 324–325, 12 jan. 1992.

DANG, T. M. D.; LE, T. T. T.; FRIBOURG-BLANC, E.; DANG, M. C. Synthesis and optical properties of copper nanoparticles prepared by a chemical reduction method. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 2, n. 1, 7 mar. 2011.

DO CANTO, J. L. **Colheita mecanizada de biomassa florestal para energia**. 2009. 127 f. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, 2009.

DOBRUCKA, R.; DŁUGASZEWSKA, J. Biosynthesis and antibacterial activity of ZnO nanoparticles using *Trifolium pratense* flower extract. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 4, p. 517–523, 2016.

DORAN, J. C. **Commercial sources, uses, formation, and biology. Eucalyptus leaf oils, use, chemistry, distillation and marketing**. In: BOLAND, D. J.; BROPHY, J. J.; HOUSE, A. P. N. (Ed.). [s.l.] Inkarta Press: Melbourne, 1991. p. 11–28.

DUAN, H.; WANG, D.; LI, Y. Green chemistry for nanoparticle synthesis. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 16, p. 5778–5792, 3 ago. 2015.

DUBEY, M.; BHADAURIA, S.; KUSHWAH, B. S. Green synthesis of nanosilver particles from extract of *Eucalyptus hybrida* (Safeda) leaf. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 4, n. 3, p. 537–543, 2009.

ELUMALAI, K.; VELMURUGAN, S. Green synthesis, characterization and antimicrobial activities of zinc oxide nanoparticles from the leaf extract of *Azadirachta indica* (L.). **Applied Surface Science**, v. 345, p. 329–336, 2015.

EVANS, P.; MATSUNAGA, H.; KIGUCHI, M. Large-scale application of nanotechnology for wood protection. **Nature Nanotechnology**, v. 3, n. 10, p. 577–577, out. 2008.

FERREIRA, G. W. D. **Resíduos da colheita do eucalipto : Ciclagem de nutrientes e uso da Espectroscopia do Infravermelho próximo para predição da composição química**. 2012. 65 f. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Viçosa, 2012.

FORTES, G. A. C. **Isolamento, identificação, antioxidante e variabilidade temporal de compostos fenólicos de folhas de *Eucalyptus microcorys* F . Muell.** 2016. 103 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, 2016.

GNANASANGEETHA, D.; SARALATHAMBAVANI, D. One Pot Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles via Chemical and Green Method. **Research Journal of Material Sciences**, v. 1, n. 7, p. 2320–6055, 2013.

GNANAVEL, V.; PALANICHAMY, V.; ROOPAN, S. M. Biosynthesis and characterization of copper oxide nanoparticles and its anticancer activity on human colon cancer cell lines (HCT-116). **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 171, p. 133–138, 2017.

GONZÁLEZ, S.-M. C. Compuestos polifenólicos efectos fisiológicos. Actividad antioxidante. **Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos**, n. 329, p. 29–40, 2002.

GOPALAKRISHNAN, G.; BANUMATHI, B.; SURESH, G. Evaluation of the antifungal activity of natural xanthenes from *Garcinia mangostana* and their synthetic derivatives. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 5, p. 519–524, 1997.

GOVINDARAJU, K.; BASHA, S. K.; KUMAR, V. G.; SINGARAVELU, G. Silver, gold and bimetallic nanoparticles production using single-cell protein (*Spirulina platensis*) Geitler. **Journal of Materials Science**, v. 43, n. 15, p. 5115–5122, 2008.

GUNALAN, S.; SIVARAJ, R.; RAJENDRAN, V. Green synthesized ZnO nanoparticles against bacterial and fungal pathogens. **Progress in Natural Science: Materials International**, v. 22, n. 6, p. 693–700, 2012.

HAN, J.; LIU, Y.; GUO, R. Reactive Template Method to Synthesize Gold

Nanoparticles with Controllable Size and Morphology Supported on Shells of Polymer Hollow Microspheres and Their Application for Aerobic Alcohol Oxidation in Water. **Advanced Functional Materials**, v. 19, n. 7, p. 1112–1117, 9 abr. 2009.

HARNE, S.; SHARMA, A.; DHAYGUDE, M.; JOGLEKAR, S.; KODAM, K.; HUDLIKAR, M. Novel route for rapid biosynthesis of copper nanoparticles using aqueous extract of *Calotropis procera* L. latex and their cytotoxicity on tumor cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 95, p. 284–288, 2012.

HE, L.; LIU, Y.; MUSTAPHA, A.; LIN, M. Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. **Microbiological Research**, v. 166, n. 3, p. 207–215, 2011.

IBÁ, Indústria Brasileira de Árvores. **Anuário Estatístico: Ano base 2013**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[http://www.ipef.br/estatisticas/relatorios/anuario-iba\\_2014.pdf](http://www.ipef.br/estatisticas/relatorios/anuario-iba_2014.pdf)>.

I

BÁ, Indústria Brasileira de Árvores. **Anuário Estatístico: Ano base 2014**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[http://www.ipef.br/estatisticas/relatorios/anuario-iba\\_2015.pdf](http://www.ipef.br/estatisticas/relatorios/anuario-iba_2015.pdf)>.

IBÁ, Indústria Brasileira de Árvores. **Anuário Estatístico: Ano base 2016**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA\\_RelatorioAnual2017.pdf](http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2017.pdf)>.

IJAZ, F.; SHAHID, S.; KHAN, S. A.; AHMAD, W.; ZAMAN, S. Green synthesis of copper oxide nanoparticles using *Abutilon indicum* leaf extract: Antimicrobial, antioxidant and photocatalytic dye degradation activities. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 4, p. 743, 4 maio 2017.

IRAVANI, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. **Green Chemistry**, v. 13, n. 10, p. 2638–2650, 2011.

JAMDAGNI, P.; KHATRI, P.; RANA, J. S. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using flower extract of *Nyctanthes arbor-tristis* and their antifungal activity. **Journal of King Saud University - Science**, 2016.

JANOTTI, A.; VAN DE WALLE, C. G. Fundamentals of zinc oxide as a semiconductor. **Reports on Progress in Physics**, v. 72, n. 12, p. 126501, 1 dez. 2009.

JEEVAN, P.; RAMYA, K.; RENA, A. E. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by culture supernatant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 72–76, 2012.

KAR, S.; PAL, B. N.; CHAUDHURI, S.; CHAKRAVORTY, D. One-Dimensional ZnO Nanostructure Arrays: Synthesis and Characterization. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 10, p. 4605–4611, mar. 2006.

KARIMI, J.; MOHSENZADEH, S. Rapid, Green, and Eco-Friendly Biosynthesis of Copper Nanoparticles Using Flower Extract of *Aloe Vera*. **Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry**, v. 45, p. 895–898, 2015.

KARTAL, S. N.; GREEN, F.; CLAUSEN, C. A. Do the unique properties of nanometals affect leachability or efficacy against fungi and termites? **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, n. 4, p. 490–495, 2009.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables - the millennium's health. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 36, n. 7, p. 703–725, 7 jul. 2001.

KEL, E.; BLANCHETTE, R. A.; ANDER, P. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. **Berlin: Germany**. 1990.

KIM, J. H.; EHRMAN, S. H.; GERMER, T. A. Influence of particle oxide coating on light scattering by submicron metal particles on silicon wafers. **Applied Physics Letters**, v. 84, n. 8, p. 1278–1280, 23 fev. 2004.

KIRK, T. K.; FARRELL, R. L. Enzymatic" combustion": the microbial degradation of lignin. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 465–501, 1987.

KLUG, A. H. L. **X-Ray Powder Procedures**. New York: Wiley, New York, 1962.

KULKARNI, V.; SURYAWANSHI, S.; KULKARNI, P. Biosynthesis of copper nanoparticles using aqueous extract of *Eucalyptus* sp . plant leaves. **Current Science**, v. 109, n. 2, p. 255–257, 2015.

KUMAR, A.; SAXENA, A.; DE, A.; SHANKAR, R.; MOZUMDAR, S. Facile synthesis of size-tunable copper and copper oxide nanoparticles using reverse

microemulsions. **RSC Advances**, v. 3, n. 15, p. 5015–5021, 2013.

LANGENHEIM, J. H. Higher plant terpenoids: A phytocentric overview of their ecological roles. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, n. 6, p. 1223–1280, 1994.

TEIXEIRA, C. M.; MARTINS, P. M.; YAMAMOTO, H.; CHRISOSTOMO, W.; YAMAJI, F. M. Chemical Characterization of *Eucalyptus* sp. Residues from Short- Rotation Forests for Bioenergy Production. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 5, p. 1693–1701, 2016.

MAHANTY, A.; MISHRA, S.; BOSU, R.; MAURYA, U. K.; NETAM, S. P.; SARKAR, B. Phytoextracts-synthesized silver nanoparticles inhibit bacterial fish pathogen *Aeromonas hydrophila*. **Indian journal of microbiology**, v. 53, n. 4, p. 438–446, 2013.

MAILLARD, M. N.; SOUM, M. H.; BOIVIN, P.; BERSET, C. Antioxidant Activity of Barley and Malt: Relationship with Phenolic Content. **LWT - Food Science and Technology**, v. 29, n. 3, p. 238–244, 1 maio 1996.

MANTANIS, G.; TERZI, E.; KARTAL, S. N.; PAPADOPOULUS, A. N. Evaluation of mold, decay and termite resistance of pine wood treated with zinc- and copper-based nanocompounds. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 90, p. 140–144, 2014.

MATINISE, N.; FUKU, X. G.; KAVIYARASU, K.; MAYEDWA, N.; MAAZA, M. ZnO nanoparticles via *Moringa oleifera* green synthesis: Physical properties & mechanism of formation. **Applied Surface Science**, v. 406, p. 339–347, 2017.

MAYRINCK, C.; RAPHAEL, E.; FERRARI, J. L.; SCHIAVON, M. A. Synthesis, Properties and Applications of Nanostructured Zinc Oxide. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 5, p. 1185–1204, 2014.

MENDES, M. S. da S. **Métodos “verdes” de produção de nanomateriais que promovem nanotecnologias sustentáveis**. 2015. 178 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, 2015.

MING, Z.; FENG, S.; YILIHAMU, A.; YANG, S.; MA, Q.; YANG, H.; BAI, Y.; YANG, A. Toxicity of carbon nanotubes to white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 162, p. 225–234, 2018.

MO, Y.; TANG, Y.; WANG, S.; LING, J.; ZHANG, H. Green synthesis of silver nanoparticles using eucalyptus leaf extract. **Materials Letters**, v. 144, p. 165–167, 2015.

MORENO-MAÑAS, M.; PLEIXATS, R. Formation of Carbon–Carbon Bonds under Catalysis by Transition-Metal Nanoparticles. **Accounts of Chemical Research**, v. 36, n. 8, p. 638–643, ago. 2003.

MORESCHI, J. C. **Biodegradação e Preservação da Madeira**. 4 ed. Curitiba: Departamento de Engenharia e Tecnologia Florestal da UFPR, v. 1, 2013. 49 p.

MORIARTY, P. Nanostructured materials. **Reports on Progress in Physics**, v. 64, n. 3, p. 297–381, 1 mar. 2001.

MORONES, J. R.; ELECHIGUERRA, J. L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J. B.; RAMIREZ, J. T.; YACAMAN, M. J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, n. 10, p. 2346–2353, 1 out. 2005.

MOTA, I.; PINTO, P. C. R.; NOVO, C.; SOUSA, G.; GUERREIRO, O.; GUERRA, A. R.; DUARTE, M. F.; RODRIGUES, A. E. Extraction of Polyphenolic Compounds from *Eucalyptus globulus* Bark: Process Optimization and Screening for Biological Activity. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 51, n. 20, p. 6991–7000, 23 maio 2012.

MOUNGUENGUI, S.; TCHINDA, J. B. S.; NDINKONTAR, M. K.; DUMARÇAV, S.; ATTÉKÉ, C.; PERRIN, D.; GELHAYE, E.; GÉRARDIN, P. Total phenolic and lignin contents, phytochemical screening, antioxidant and fungal inhibition properties of the heartwood extractives of ten Congo Basin tree species. **Annals of Forest Science**, v. 73, n. 2, p. 287–296, 2016.

MURALI, M.; MAHENDRA, C.; NAGABHUSHAN; RAJASHEKAR, N.; SUDARSHANA, M. S.; RAVEESHA, K. A.; AMRUTESH, K. N.. Antibacterial and antioxidant properties of biosynthesized zinc oxide nanoparticles from *Ceropegia candelabrum* L. – An endemic species. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 179, p. 104–109, maio 2017.

NAIKA, H. R.; LINGARAJU, K.; MANJUNATH, K.; KUMAR, D.; NAGARAJU, G.; SURESH, D.; NAGABHUSHANA, H.. Green synthesis of CuO nanoparticles using *Gloriosa superba* L. extract and their antibacterial activity. **Journal of Taibah University for Science**, v. 9, n. 1, p. 7–12, 2015.

NAIR, S.; PANDEY, K. K.; GIRIDHAR, B. N.; VIJAYALAKSHMI, G. Decay resistance of rubberwood (*Hevea brasiliensis*) impregnated with ZnO and CuO nanoparticles dispersed in propylene glycol. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 122, p. 100–106, 2017.

NASROLLAHZADEH, M.; SAJADI, S. M.; KHALAJ, M. Green synthesis of copper nanoparticles using aqueous extract of the leaves of *Euphorbia esula* L and their catalytic activity for ligand-free Ullmann-coupling reaction and reduction of 4-nitrophenol. **RSC Advances**, v. 4, n. 88, p. 47313–47318, 2014.

NASS, L. L. **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos genéticos e biotecnologia, 2007.

NEL, A. et al. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, n. 5761, p. 622–627, 2006.

NORUZI, M. Biosynthesis of gold nanoparticles using plant extracts. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 38, n. 1, p. 1–14, 2015.

PAES, F. A. S. V.; LIMA, A. M. N.; HAKAMADA, R. E.; BARROS, N. F. Impacto do manejo dos resíduos da colheita, do preparo do solo e da adubação na produtividade de Eucalipto. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 37, n. 4, p. 1081–1090, 2013.

PANSHIN, A. J.; ZEEUW, C. de. **Textbook of wood technology**. 4. ed. [s.l.] McGraw-Hill Book Co., 1980.

PAŘIL, P.; BAAR, J.; ČERMÁK, P.; RADEMACHER, P.; PRUCEK, R.; SIVERA, A.; PANÁČEK, A. Antifungal effects of copper and silver nanoparticles against white and brown-rot fungi. **Journal of Materials Science**, v. 52, n. 5, p. 2720–2729, 2017.

PATEL, V.; BERTHOLD, D.; PURANIK, P.; GANTAR, M. Screening of cyanobacteria and microalgae for their ability to synthesize silver nanoparticles with antibacterial activity. **Biotechnology Reports**, v. 5, p. 112–119, 2015.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia—Tradução da 4ª edição norte-americana**. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PEREIRA, M. K. **Ressonância de Plasmon de Superfície Localizado e Espalhamento Raman em Soluções Coloidais de Ouro**. 2009. 108 f. Dissertação (Mestrado em Física) - Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

PINCELLI, A. L. P. S. M. **Características dos resíduos da colheita de madeira de eucalipto e pinus, submetidos ao tratamento térmico, com foco na aplicação energética**. 2011. 126 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, 2011.

PIWOWARSKA, N.; GONZÁLEZ-ALVAREZ, J. Extraction of antioxidants from forestry biomass: Kinetics and optimization of extraction conditions. **Biomass and Bioenergy**, v. 43, p. 42–51, 1 ago. 2012.

POURMORTAZAVI, S. M.; TAGHDIRI, M.; MAKARI, V.; RAHIMI-NASRABADI, M. Procedure optimization for green synthesis of silver nanoparticles by aqueous extract of *Eucalyptus oleosa*. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 136, p. 1249–1254, 2015.

PRABHU, Y. T.; RAO, K. V.; SAI, V. S.; PAVANI, T. A facile biosynthesis of copper nanoparticles : A micro-structural and antibacterial activity investigation. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 21, n. 2, p. 180–185, 2017.

PRASHANTH, G. K.; PRASHANT, P. A.; UTPAL, B.; MANOJ, G.; NAGABHUSHANA, B. M.; ANANDA, S.; KRISHNAIAH, G. M.; SATHYANANDA, H. M. In vitro antibacterial and cytotoxicity studies of ZnO nanopowders prepared by combustion assisted facile green synthesis. **Karbala International Journal of Modern Science**, v. 1, n. 2, p. 67–77, out. 2015.

PROESTOS, C.; KAPSOKEFALOU, M.; KOMAITIS, M. Analysis of naturally occurring phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS After silylation. **Journal of Food Quality**, v. 31, n. 3, p. 402–414, 1 jun. 2008.

RAMSDEN, J. **Essentials of Nanotechnology**. [s.l.] Ventus Publishing ApS, 2009.

RAMYADEVI, J. et al. Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles. **Materials Letters**, v. 71, p. 114–116, 2012.

RANGEL, W. M. **Síntese de nanopartículas de óxido de cobre (II) pelo método**

**de coprecipitação**. 2014. 81 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

REDDY, S. B.; MANDAL, B. K. Facile green synthesis of zinc oxide nanoparticles by *Eucalyptus globulus* and their photocatalytic and antioxidant activity. **Advanced Powder Technology**, v. 28, n. 3, p. 785–797, 2017.

REHANA, D.; MAHENDIRAN, D.; KUMAR, R. S.; RAHIMAN, A. K.. Evaluation of antioxidant and anticancer activity of copper oxide nanoparticles synthesized using medicinally important plant extracts. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 89, p. 1067–1077, 2017.

REN, G. et al. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 6, p. 587–590, jun. 2009.

ROCHA, M. P. DA. ***Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden e *Eucalyptus dunnii* Maiden como Fontes de Matéria Prima para Serrarias**. 2000. Universidade Federal do Paraná, 2000.

ROCHA, R. R. **Química Verde : Síntese De Nanopartículas De Prata Utilizando Extratos Vegetais**. 2010. 186 f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

ROY, K.; SARKAR, C. K.; GHOSH, C. K. Antibacterial mechanism of biogenic copper nanoparticles synthesized using *Heliconia psittacorum* leaf extract. **Nanotechnology Reviews**, v. 5, n. 6, p. 529–536, 1 jan. 2016.

SAIFUDDIN, N.; WONG, C. W.; YASUMIRA, A. A. Rapid biosynthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of bacteria with microwave irradiation. **Journal of Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 61–70, 2009.

SALAM, H. A.; SIVARAJ, R.; VENCKATESH, R. Green synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles from *Ocimum basilicum* L. var. *purpurascens* Benth.-Lamiaceae leaf extract. **Materials Letters**, v. 131, p. 16–18, 2014.

SANKAR, R.; MANIKANDAN, P.; MALARVIZHI, V.; FATHIMA, T.; SHIVASHANGARI, K. S.; RAVIKUMAR, V.. Green synthesis of colloidal copper oxide nanoparticles using *Carica papaya* and its application in photocatalytic dye

degradation. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 121, n. 75, p. 746–750, mar. 2014.

SANTANA, A. L. B. D. **Estudo Químico, Antitermítico e Antifúngico da madeira de lei *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *Cebil* (Griseb.) von Reis Alt. (Angico-de-Caroço)**. 2011. 309 f. Tese (Doutorado em Química) - Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, 2011.

SANTIAGO, F. L. S. **Aproveitamento de resíduos florestais de *Eucalyptus* spp na indústria de fabricação de celulose para geração de energia térmica e elétrica**. 2013. 109 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, 2013.

SANTOS, S. A. O.; VILLAVARDE, J. J.; FREIRE, C. S. R.; DOMINGUES, M. R. M.; NETO, C. P.; SILVESTRE, A. J. D. Phenolic composition and antioxidant activity of *Eucalyptus grandis*, *E. urograndis* (*E. grandis* × *E. urophylla*) and *E. maidenii* bark extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 39, n. 1, p. 120–127, set. 2012.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**. [s.l.] CRC, 2004.

SHARMA, P.; CHOUDARY, B.; NAGPURE, A.; GUPTA, R. K. Antifungal potential of actinomycte isolate *Streptomyces exfoliatus* MT9 against wood-rotting fungi. **Journal of Environmental Biology**, v. 37, n. November, p. 1231–1237, 2016.

SHENDE, S.; INGLE, A. P.; GADE, A.; RAI, M. Green synthesis of copper nanoparticles by *Citrus medica* Linn. (Idilimbu) juice and its antimicrobial activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 865–873, 2015.

SINGH, R. P.; SHUKLA, V. K.; YADAV, R. S.; SHARMA, P. K.; SINGH, P. J.; PANDEY, A. C. Biological Approach Of Zinc Oxide Nanoparticles Formation And Its Characterization. **Advanced Materials Letters**, v. 2, n. 4, p. 313–317, 1 out. 2011.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–178, 1999.

SIVARAJ, R.; RAHMAN, P. K. S. M.; RAJIV, P.; NARENDHRAN, S.; VENCKATESH, R. Biosynthesis and characterization of *Acalypha indica* mediated copper oxide nanoparticles and evaluation of its antimicrobial and anticancer activity. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 129,

p. 255–258, ago. 2014a.

SIVARAJ, R.; RAHMAN, P. K. S. M.; RAJIV, P.; SALAM, H. A.; VENCKATESH, R. Biogenic copper oxide nanoparticles synthesis using *Tabernaemontana divaricate* leaf extract and its antibacterial activity against urinary tract pathogen.

**Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 133, p. 178–181, dez. 2014b.

SULAIMAN, G. M.; MOHAMMED W. H.; MARZOOG, T. R.; AL-AMIERY, A. A. A.; KADHUM, A. A. H.; MOHAMAD, A. B. Green synthesis, antimicrobial and cytotoxic effects of silver nanoparticles using *Eucalyptus chapmaniana* leaves extract. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 1, p. 58–63, 2013. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60024-6](http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60024-6)>.

TAGHIYARI, H. R.; MORADI-MALEK, B.; KOOKANDEH, M. G.; BIBALAN, O. F. Effects of silver and copper nanoparticles in particleboard to control *Trametes versicolor* fungus. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 94, n. November, p. 69–72, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.05.029>>.

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

TARANATH, T. C.; PATIL, B. N. *Limonia acidissima* L. leaf mediated synthesis of zinc oxide nanoparticles : A potent tool against *Mycobacterium tuberculosis*. **International Journal of Mycobacteriology**, v. 5, n. 2, p. 197-204, 2016.

TERZI, E.; KARTAL, S. N.; YILGÖR, N.; RAUTKARI, L.; YOSHUMIRA, T. Role of various nano-particles in prevention of fungal decay, mold growth and termite attack in wood, and their effect on weathering properties and water repellency. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 107, p. 77–87, 2016.

WANG, T.; JIN, X.; CHEN, Z.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. Green synthesis of Fe nanoparticles using eucalyptus leaf extracts for treatment of eutrophic wastewater. **Science of the Total Environment**, v. 466–467, p. 210–213, 2014a.

WANG, T.; LIN, J.; CHEN, Z.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. Green synthesized iron nanoparticles by green tea and eucalyptus leaves extracts used for removal of nitrate in aqueous solution. **Journal of Cleaner Production**, v. 83, p. 413–419, 2014b.

WANG, Z. L. Nanostructures of zinc oxide. **Materials Today**, v. 7, n. 6, p. 26–33, 2004.

WAUGH, G. Sawing of young, fast-grown eucalypts. In: Proceedings of First International Seminar on Solid Wood Products of High Technology, **Anais...**1998.

WILCKEN, C. F.; LIMA, A. C. V.; DIAS, T. K. R.; MASSON, M. V.; FILHO, P. J. F.; POGETTO, M. R. F. Guia Prático de Manejo de Plantações de Eucalipto. **Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais- FEPAF**, p. 25, 2008.

YANASE, A.; KOMIYAMA, H. In situ observation of oxidation and reduction of small supported copper particles using optical absorption and X-ray diffraction. **Surface Science**, v. 248, n. 1–2, p. 11–19, maio 1991.

ZHANG, Y.; RAM, M. K.; STEFANAKOS, E. K.; GOSWAMI, D. Y. Synthesis, Characterization, and Applications of ZnO Nanowires. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, p. 1–22, 2012.