



República Federativa do Brasil  
Ministério da Indústria, Comércio Exterior  
e Serviços  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102012004619-9 A2

(22) Data do Depósito: 01/03/2012

(43) Data da Publicação: 03/04/2018



**(54) Título:** COMPOSIÇÃO E PASTA INDUTORA DE EXSUDAÇÃO AUMENTADA DE OLEORESINA E PROCESSO PARA A PRODUÇÃO AUMENTADA DE OLEORESINA EM CONÍFERAS VIVAS

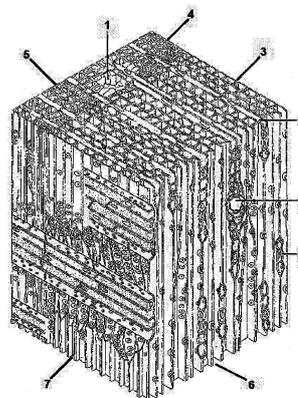
**(51) Int. Cl.:** A01N 59/02; A01N 59/16; A01G 23/10; C09F 1/00

**(52) CPC:** A01N 59/02,A01N 59/16,A01G 23/10, C09F 1/00

**(73) Titular(es):** FLOPAL - FLORESTADORA PALMARES LTDA, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**(72) Inventor(es):** KELLY CRISTINE DA SILVA RODRIGUES CORREA; PAULO CÉSAR NUNES AZEVEDO; ARTHUR GERMANO FETT NETO

**(57) Resumo:** COMPOSIÇÃO E PASTA INDUTORA DE EXSUDAÇÃO AUMENTADA DE OLEORESINA E PROCESSO PARA A PRODUÇÃO AUMENTADA DE OLEORESINA EM CONÍFERAS VIVAS É descrita uma composição de pasta indutora de exsudação aumentada de oleoresina em coníferas vivas, a composição, à base de ácido sulfúrico aquoso entre 15-30% vol/vole aditivos usuais, compreendendo adicionalmente entre 0,1 e 2000 mL-1 de pelo menos um co-fator metálico de terpeno sintases ou componente de receptores de etileno, dito co-fator sendo selecionado dentre Cu, Mn, Fe e K. O processo de produção aumentada de oleoresina compreende aplicar a composição de pasta da invenção a pelo menos uma estria (20) obtida por ferimento causado no tronco (10) das ditas coníferas vivas, e coletar em saco plástico (40) a oleoresina (50) com rendimento aumentado em relação a processos do estado da técnica.



**COMPOSIÇÃO E PASTA INDUTORA DE EXSUDAÇÃO AUMENTADA  
DE OLEORESINA E PROCESSO PARA A PRODUÇÃO AUMENTADA  
DE OLEORESINA EM CONÍFERAS VIVAS**

**CAMPO DA INVENÇÃO**

5 A presente invenção pertence ao campo das composições de pastas indutoras de exsudação de oleoresina em coníferas, mais especificamente, a composições de pastas indutoras de exsudação à base de ácido sulfúrico contendo pelo menos um co-fator metálico (de terpeno ciclasas e de receptores de etileno), as pastas indutoras sendo  
10 aplicadas sobre as estrias de ferimento realizadas na casca de coníferas vivas, a oleoresina sendo liberada a partir dessas estrias de ferimento.

**FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO**

*Pinus elliottii* Engelm é uma conífera pertencente à família Pinaceae de gimnospermas, característica pela produção de resina em  
15 todos os seus gêneros. Nativa do sudeste dos EUA (Langenheim, J. 2003. Plant Resins: Chemical Evolution Ecology Ethnobotany. Oregon: Timber Press, Inc., 2003. 586pp.), essa espécie, amplamente cultivada em plantações subtropicais do Brasil, Índia e China, é usada na produção de resina e na indústria moveleira.

20 A resina sintetizada por espécies de coníferas é um exemplo de fonte natural abundante de terpenos. Terpenos são metabólitos secundários derivados biossinteticamente de um composto de cinco carbonos, o isopentenil pirofosfato – IPP - (Dudareva, N., Pichersky, E. and Gershenzon, G. 2004. Biochemistry of plant volatiles. Plant Physiol.  
25 135: 1893-1902) e constituem a maior família de produtos naturais existente, com cerca de 30.000 metabólitos (Langenheim, J. 2003. Plant Resins: Chemical Evolution Ecology Ethnobotany. Oregon: Timber Press, Inc., 2003. 586pp.). Os terpenos desempenham importantes funções na planta: atuam na atração de polinizadores e dispersores de sementes

(óleos essenciais e carotenóides), na sinalização e defesa contra injúria ou ferimento (compostos antibióticos e fitoalexinas), contra a herbivoria (repelentes), nas interações químicas entre plantas (alelopatia) agindo como fitotoxinas competitivas, atuam também como reguladores de crescimento (giberelinas e ácido abscísico), exercem papel essencial na fotossíntese (pigmentos fotossintéticos como os carotenóides) e são componentes estruturais de membranas celulares (fitoesteróis). Além disso, alguns terpenos constituem metabólitos farmacologicamente importantes como, por exemplo, o agente anti-tumoral *taxol* (Mahmoud, S.S. and Croteau, R.B. 2002. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. Trends in Plant Science 7: 366-373), e outros são extensivamente empregados na indústria química fina de sabores e fragrâncias (Swift, K.A.D. 2004. Catalytic transformations of the major terpene feedstocks. Topics in Catalysis 27: 143-155).

A resina das coníferas é composta de turpentina (ou terebintina), a fração volátil mono e sesquiterpênica, e de rosina (ou breu), a fração não-volátil diterpênica. Em *Pinus elliotii* a terebintina é composta principalmente de  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno e a rosina por ácidos abiéticos e pimáricos.

Tanto a terebintina quanto o breu apresentam grande demanda pelo comércio internacional. A produção mundial de óleo de terebintina em 1995 foi de cerca de 230.000 toneladas, e vem aumentando a cada ano. A terebintina pode ser fracionalmente destilada para gerar seus constituintes majoritários,  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno em estado puro.

Monoterpenos, amplamente distribuídos na natureza (com mais de 400 estruturas) e principais componentes da fração volátil da resina de coníferas constituem adequados substratos precursores, os quais são materiais ideais de partida para a produção biotecnológica de Aromas

Naturais, compostos orgânicos voláteis encontrados em alimentos e perfumes, os quais produzem seu caráter organoléptico distintivo. Os aromas terpenóides variam amplamente e incluem o floral, o frutífero (cítrico), o mentolado e o apimentado. Diferentes isômeros de um dado terpenóide podem ter aromas variáveis. Dessa forma, a transformação microbiológica de monoterpenos facilmente disponíveis (presentes em altas concentrações na terebintina, por exemplo) e de baixo custo, como  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno, têm interesse comercial significante para a aplicação na indústria de aromatizantes e flavorizantes (Hagedorn, S. & Kaphammer, B. 1994. Microbial biocatalysis in the generation of flavor and fragrance chemicals. Annu. Rev. Microbiol. 48:773-800), a qual consome aproximadamente 30.000 toneladas de pinenos por ano, utilizadas para produzir uma diversa gama de produtos. O potencial de pinenos, componentes majoritários da terebintina, como precursores de combustíveis também é relevante na produção de biocombustível de alta densidade para aviação (Harvey, B.G. et al., High density renewable fuels based on the selective dimerization of pinenes. Energy Fuels 24: 267-273, 2010.)

A rosina de *Pinus* tem abundante aplicação industrial incluindo a produção de borrachas sintéticas, colas, materiais adesivos, material à prova d'água, tintas de impressora, revestimentos, revestimentos de papel, emulsificadores de polimerização, entre outros.

O significado ecológico da síntese da resina está diretamente relacionado ao mecanismo de defesa da planta contra os insetos predadores da casca e seus fungos patogênicos, agentes responsáveis pelas principais doenças que afetam as espécies de coníferas no hemisfério Norte. Populações de besouros da casca (Coleoptera: Scolytidae) são muitas vezes as mais importantes e agressivas pestes

em florestas de coníferas. O ciclo de vida dos besouros da casca começa com a fase de dispersão, quando besouros pioneiros (adultos) abandonam a árvore (morta previamente), escolhem e atacam um novo hospedeiro utilizando recursos táteis, visuais e, principalmente,  
5 olfativos.

Muitas espécies têm habilidade de transformar compostos da terebintina em derivados oxigenados que são empregados como atrativos sexuais ou feromônios de agregação para sinalizar ataque em massa em um hospedeiro selecionado. A partir do estabelecimento do  
10 primeiro orifício, galerias vão sendo formadas através do tecido cambial onde os insetos copulam e deixam seus ovos que deverão eclodir e iniciar nova fase de dispersão no tempo determinado. Concomitantemente com a penetração inicial, ocorre a inoculação de fungos patogênicos, geralmente da Classe Ophiostomataceae, para os  
15 quais o besouro serve como vetor.

Mecanismos de resistência à invasão por besouros da casca, furadores de madeira e fungos patogênicos em coníferas incluem a secreção de oleoresina e aumento na síntese de fenólicos em torno da zona do ferimento promovido pela invasão.

20 Dependendo da espécie, a produção de resina pode ser amplamente constitutiva (resina primária), composta de material produzido e estocado em estruturas secretoras especializadas, ou induzida (resina secundária) como resultado de injúria ou ferimento.

A casca (periderme e floema secundário) é a primeira linha de  
25 defesa contra os organismos invasores do tronco juntamente com o sistema de oleoresina constitutiva e a resposta de defesa induzida. A oleoresina mobilizada aos sítios de infecção e injúria ou ferimento atua como proteção contra herbívoros e patógenos, em função da sua toxicidade e ação deterrente. Depois da exposição à atmosfera, os

compostos voláteis mono- e sequiterpênicos evaporam, enquanto que os ácidos diterpênicos, responsáveis pela viscosidade da resina, polimerizam selando o ferimento e aumentando a possibilidade de aprisionamento dos organismos invasores na resina.

5 Dependendo da espécie, a biossíntese da oleoresina constitutiva pode ser localizada em ductos resiníferos ou cistos ("blisters"), compostos de células epiteliais que delimitam uma cavidade central de estocagem.

10 Células de resina espalhadas através do tronco, como as de *Thuja plicata* (Cupressaceae) são os tipos mais simples de estruturas compartimentalizadas contendo resina. *Sequoia sempervirens* (Taxodiaceae) e os abetos verdadeiros como *Abies grandis* (Pinaceae) acumulam resina em cistos (estruturas como bolsas) localizados na madeira e na casca delimitados por uma camada de células epiteliais.

15 Douglas Fir (*Pseudotsuga menziesii*), *Larix occidentalis* e Colorado blue spruce (*Picea pungens*) dispõem de uma rede de passagens constrictas de resina e ductos através do tronco. Espécies de *Pinus* contêm a mais elaborada rede interconectada de ductos localizados através da madeira e da casca.

20 Os ductos resiníferos são estruturas alongadas constituídas por células epiteliais que delimitam uma cavidade de paredes não lignificadas (vide Figura 1). Adjacentes às células epiteliais, ocorrem células relativamente espessas denominadas células da bainha, ricas em substâncias pécticas. Os ductos ocorrem no xilema secundário de *Pinus* e são horizontais (dispostos radialmente) e verticais. Em *Pinus*, os canais de resina são longos e de distribuição muitas vezes dispersa. Esses canais são particularmente aqueles produzidos em resposta a injúria/ferimento (resina induzida, oriunda de ductos traumáticos), por esse motivo são mais abundantes na região próxima ao sítio do dano

25

(apresentam maior densidade por área de madeira), para impedirem (selarem) a “entrada” e reduzirem a chance de sucesso do predador/patógeno (de maneira localizada), tornando-se mais dispersos (com menor densidade) à medida que se afastam do centro do dano (onde predominam os ductos constitutivos, que ocorrem naturalmente em *Pinus*) e devem ser considerados como sendo (pelo menos em parte) controlados por fatores externos.

Auxinas induzem a formação de ductos verticais de resina, assim como promovem o crescimento radial da madeira. A formação de ductos verticais induzidos não inicia imediatamente após a aplicação destes indutores de diferenciação, mas somente cerca de um mês depois, à semelhança com o “*time gap*” verificado entre o início da atividade cambial e a formação do ducto em condições naturais. No primeiro anel de crescimento, os ductos se desenvolvem do câmbio imediatamente após a formação de 0-4 camadas de traqueídeos; o aumento no número de canais se dá por divisão tangencial. Os ductos radiais se localizam dentro de raios com modelo fusiforme e podem estabelecer conexões com os ductos verticais. Não existem ductos verticais no floema e conexões entre ductos verticais ocorrem somente no mesmo plano radial.

Em espécies que carecem de ductos e passagens extensivas de resina estocada (*Abies*, *Tsuga*, *Cedrus*, etc.) a defesa contra a infestação por besouros da casca deve ser baseada na produção de resina induzida, a qual não é realizada por células epiteliais de estruturas secretoras, mas preferencialmente por células de parênquima que circundam o sítio da injúria (esses gêneros não são estriados comercialmente). Abetos que carecem de um sistema de ductos interconectado ainda podem formar ductos traumáticos, os quais normalmente estão ausentes em tecidos não injuriados.

Economicamente, coníferas (particularmente *Pinus* spp.) vêm sendo quimicamente estimuladas para a produção de resina desde a década de 70 (McReynolds, R.D. and Kossuth, S.V. 1982. CEPA (2-chloroethylphosphonic acid) in sulfuric acid paste increases oleoresin yields. Forest Service, United States Department of Agriculture, Southeastern Forest Experiment Station, Olustee, FL, U.S.A. 32072).

A extração de resina no Brasil iniciou a partir da década de 80, em florestas de *P. elliottii* implantadas com a utilização dos incentivos fiscais das décadas de 60 e 70. Atualmente, o Brasil juntamente com a Indonésia compõe o segundo lugar em exportação mundial de goma resina, sendo que a China ocupa o primeiro posto nesse ranking. Em 2010/2011, a produção brasileira de goma resina está estimada em 87.000 toneladas, movimentando cerca de 102 milhões de dólares americanos; a maior produção de goma resina ocorre em São Paulo (~49%) e no Rio Grande do Sul (~21%) ([www.aresb.com.br](http://www.aresb.com.br), acesso em 20/10/2011).

A produção de resina em escala comercial é uma atividade essencialmente extrativista e rentável, em função do alto valor agregado da resina. Fazendas de resinagem constituem grandes extensões de terra com elevado número de árvores em franca atividade resineira. A produção anual média por indivíduo varia de 2,0 a 5,0 Kg, e o valor de mercado de uma tonelada de resina bruta gira em torno de US\$ 300,00. Em 2010, o preço médio da goma resina brasileira foi de U\$ 1177,13 a tonelada ([www.aresb.com.br](http://www.aresb.com.br)).

Qualidade e quantidade dos componentes da resina são atributos decisivos na escolha da espécie de *Pinus* para a extração em nível comercial. Os critérios de qualidade do breu são geralmente avaliados segundo padrões utilizados no comércio internacional, mas não definidos como padrões definitivos e/ou obrigatórios. Apesar disso, foram descritos

métodos padrões de teste de qualidade de cor de rosina (segundo a escala de cores do Departamento de Agricultura dos EUA, USDA) e “*point of softening*” que usualmente situa-se entre a faixa de 70 e 80°C. Índices de acidez e de saponificação também são indicativos de  
5 qualidade, sendo que, quanto maiores forem esses valores, melhor a qualidade da rosina.

Segundo a Organização Internacional de Padronização (ISO) as principais propriedades físicas requeridas para a avaliação da terebintina - para fins de utilização como solvente – são: a densidade relativa, o  
10 índice de refração, a destilação (%v/v), o resíduo de evaporação (%m/m), o resíduo em volume (%v/v), o valor ácido e o ponto de ignição (*flash point*) em °C.

A terebintina comprada pela indústria química como fonte de isolamento para subsequente conversão em óleo de pinho, fragrâncias e  
15 compostos aromatizantes, entre outros derivados, é avaliada com base na sua composição detalhada, sendo que há maior demanda por aquela que contém conteúdo superior de pineno na sua constituição. *Pinus radiata* possui a maior quantidade (melhor qualidade) de pineno constituinte da turpentina (mais de 95%), mas é muito pobre em termos  
20 de rendimento (produção) de resina. Por esse motivo, *P. elliotii*, com a segunda melhor qualidade de terebintina (aproximadamente 90% de pineno) e o segundo melhor rendimento de resina das espécies de *Pinus* estudadas (inferior apenas a *P. caribaea*, com alta quantidade, mas má  
25 qualidade de resina) é ampla e preferencialmente cultivado e indicado para a prática da extração em escala comercial.

Dessa forma, embora todos os pinheiros sejam capazes de produzir resina, tanto a qualidade quanto a quantidade da terebintina e do breu podem variar consideravelmente entre as espécies de *Pinus*, em

função do componente genético (próprio de cada espécie) que exerce papel importante na determinação da produção e composição da resina.

Além disso, composição e a quantidade da oleoresina pré-formada dependem do status fisiológico da planta, estação e condições ambientais.

Muitas das respostas induzíveis resultam de alterações na expressão gênica que influenciam a regulação bioquímica da síntese, *turnover*, e transporte de metabólitos secundários. Se a regulação interna é muito forte, respostas induzíveis resultam tanto do estímulo ambiental (ferimento) quanto do genótipo da planta.

Para fins comerciais, dependendo da espécie de pinheiro resinada, a quantidade de resina depende de alguns fatores. Os mais importantes incluem irradiância, temperatura do ambiente, índice e frequência pluviométrica, diâmetro do tronco e tamanho da copa da árvore, método de extração e duração da estação resineira. Além disso, diferentes árvores dentro de populações de uma mesma espécie variam quimicamente, sendo que árvores individuais podem variar ao longo das estações em resposta ao estresse ambiental e em função da idade.

A extração comercial de resina é feita no tronco de árvores com crescimento secundário desenvolvido. Em regiões temperadas, a atividade de extração de resina é sazonal e se estende da primavera ao outono em clima mediterrâneo, as chamadas estações de crescimento. No sul do Brasil, no entanto, pode-se resinar o ano todo, com o inverno representando entre 20 e 25% da resina anual. Uma área de aproximadamente 10 cm (em Portugal - sistema de face estreita) ou 20-25 cm de largura (nos EUA, Brasil e outros países – face ampla) e 2,5-5,0 cm de altura de casca é removida (quinzenalmente) de uma face do tronco próxima ao chão (vide Figura 2).

A resina extraída dos canais resiníferos é coletada em diversos tipos de recipientes (sacos plásticos, materiais metálicos) presos com um arame em volta da base do ferimento. Para estimular e manter o fluxo da resina, uma pasta contendo ácido sulfúrico é aplicada na superfície fresca do ferimento. Além de ácido sulfúrico (entre 40 e 60% originalmente), a pasta pode conter lubrificante (para prevenir a secagem), emulsificante (para evitar a separação das fases líquida e oleosa) e sílica pirogênica (a qual atua como agente espessante).

Diversos agentes sinalizadores estão envolvidos nos mecanismos de defesa vegetal no processo de produção de resina, tais como etileno, e os clássicos mensageiros secundários ácido jasmônico e, possivelmente, ácido salicílico. Porém, outros fatores (intrínsecos e/ou extrínsecos) podem interagir e determinar alterações quantitativas e/ou qualitativas relevantes para o rendimento de resina.

Muitos relatos têm indicado que a síntese de monoterpenos e a produção de etileno estão relacionadas entre si, com a injúria causada pelo ferimento, ou com o dano seguido da inoculação com fungos em espécies de *Pinus*. Por esse motivo, assim como o ácido sulfúrico, o Ethrel ou CEPA (ácido 2-cloro-etil-fosfônico), um composto liberador de etileno, tem sido utilizado como componente da pasta estimulante aplicada sobre a estria desde a década de 70.

Outros compostos como paraquat e o ácido salicílico, um conhecido mediador da expressão de vários genes relacionados à defesa, também têm sido utilizados como elicitores de resposta de defesa em espécies de coníferas. A aplicação comercial de jasmonato é limitada por seu alto custo.

O uso de ácido salicílico ou auxina na pasta indutora mostrou-se efetivo na indução de oleoresina em florestas comerciais de *P. elliotii* no sul do Brasil (vide Rodrigues, Kelly C. da Silva; Fett-Neto A.G. Oleoresin

yield of *Pinus elliottii* in a subtropical climate: seasonal variation and effect of auxin and salicylic acid based stimulant paste. *Industrial Crops and Products*, v. 30, p. 316-320, 2009).

5 Do ponto de vista comercial, pouco tem sido feito no que tange à otimização das pastas indutoras à base de ácido sulfúrico além da inclusão de precursor de etileno (notadamente o ácido 2 cloretil fosfônico ou ethrel).

10 Nos EUA, o U.S. Forest Service conduziu também diversos estudos envolvendo a aplicação do herbicida paraquat (sal bupiridílio), um gerador de ânion superóxido, que é normalmente aplicado algumas semanas antes do abate da árvore para extração da resina do tronco tombado. No sul do Brasil, usando o sistema de resinagem por estrias em painéis de troncos vivos, no entanto, o uso de paraquat mostrou-se ineficiente.

15 Diversas patentes descrevem adjuvantes que melhoram o desempenho de pastas indutoras de oleoresina em *Pinus*.

20 Assim, já em 1936 a patente U.S. 2.053.031 ensinava o aumento do rendimento de oleoresina causando um ferimento na casca da árvore e na madeira abaixo da casca, e aplicando estimulação com um agente químico; que pode ser uma base ou um sal, não explicitados, e coleta da resina produzida de modo aumentado em relação ao modo sem estimulação. Também são preconizados vários ferimentos na casca da árvore, a suficiente distância uns dos outros para aplicar a estimulação química de modo independente em cada ferimento.

25 Na patente U.S. 2.435.724 é descrito um processo para aumentar e prolongar o fluxo de oleoresina de árvores através do tratamento com soluções de ácido diclorofenóxiacético. Para a utilização do método são efetuados orifícios na casca da árvore e o produto de tratamento é vaporizado em solução ou suspensão. As plantas são tratadas três vezes

durante um período de 8 semanas, isto é, no início, após 2 semanas e após 6 semanas. Foram atingidos rendimentos melhorados em resina com o ácido diclorofenóxiacético e derivados entre 2,3 e 2,7 vezes aquele obtido por tratamento com um controle.

5 A patente U.S. 3.022.604 relata o emprego de derivados de uréia para estimular a produção de rosina de coníferas. Dentre estes derivados, são citados como úteis a N-t-butiluréia, N,N'-ditert-butiluréia, N,N'-dimetil uréia, imidazolona-2, dihidroimidazolona-2, metil imidazolona-2, 4,5-di-[fúril-(2)]-imidazolona-2, etc. Os compostos  
10 empregados não apresentam toxicidade à planta. São verificados aumentos de produção de rosina de cerca de 30% em relação ao controle sem derivado de uréia.

A patente U.S. 3.086.321 trata de um processo para o aumento da produção de oleoresina que compreende aplicar ao ferimento da casca  
15 de árvore uma composição que compreende 96 onças em volume de ácido sulfúrico a 50%, 16 onças em volume de querosene, 16 onças em volume de óleo mineral leve e traço de dicromato de sódio.

A patente U.S. 3.359.681 trata de composição e processo para a produção aumentada de resina de coníferas. A composição constitui uma  
20 pasta espessa e adesiva para ser aplicada a ferimentos preparados sobre a casca da árvore e compreende: um óleo mineral não fitotóxico contendo um tensoativo, um emulsificante como o cloreto de dimetil amônio, um eletrólito forte como uma solução a 60% em peso de ácido sulfúrico ou reguladores do crescimento de plantas como ácido 2,4-  
25 diclorofenoxiacético ou ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético, sílica gel para dar corpo e rigidez aos componentes líquidos e caulim comercial. No Exemplo fornecido, são empregados 90 mL de óleo mineral não tóxico, 25 mL de emulsificante cloreto de amônio, 4.000 mL de ácido sulfúrico a 60% em água, 1.000 g de sílica gel e 1.200 g de caulim.

O processo de preparação da pasta compreende as seguintes etapas sequenciais, efetuadas à temperatura de 70°F (21°C): a) misturar o emulsificante com o óleo mineral contendo tensoativo sob agitação a cerca de 500 rpm para formar uma emulsão oleosa; b) agitar o ácido sulfúrico a cerca de 750 rpm e adicionar lentamente ao mesmo a emulsão em óleo formada em a), obtendo uma mistura; c) aumentar a agitação da mistura resultante a cerca de 900 rpm e adicionar à mesma a sílica gel em bateladas de 25 g até dissolução completa da sílica gel, obtendo uma mistura; d) adicionar 600 g do caulim à mistura resultante e aumentar a agitação do mesmo até 1725 rpm; e) adicionar os 600 g restantes do caulim à mistura obtida em d); e f) continuar a agitação da mistura resultante.

A patente U.S. 3.858.354 trata de processo para a estimulação da produção de oleoresina de árvores vivas de *Pinus* pela adição ao ferimento da casca de árvore, de uma composição contendo ácido sulfúrico, um lignosulfito de amônio, sódio ou cálcio e opcionalmente uma proporção de uréia.

A patente U.S. 3.971.159 trata do tratamento químico de uma conífera viva através do contato de uma substância química embebida em um material fibroso absorvente, a substância sendo introduzida na árvore através de um furo praticado na mesma. A inclinação do furo efetuado é dada em graus. Podem ser feitos dois ou mais furos no tronco da árvore para introdução da substância de tratamento. A substância compreende um sal substituído de biperidílio.

A patente U.S. 3.991.515 ensina um método ou processo para a produção aumentada de oleoresina associada a material de células vivas de madeira com auxílio de uma dispersão diluída de amina primária em

C<sub>1-7</sub> como propilamina em concentração de cerca de 1-15% em peso em água.

Na antiga União Soviética, a pasta base para estimular a produção de resina em coníferas consistia de soluções aquosas de 0,2 a 0,4% de levedura comestível.

Diversas patentes foram produzidas relatando aumento de rendimento de resina em relação à tecnologia de estimulantes baseados em levedura comestível.

A patente SU 1173947 relata a produção de oleoresina em coníferas usando uma solução aquosa à base de extrato de milho 1-5%.

A patente SU 1197604 ensina a produção de resina em *Pinus* com uma solução aquosa de 1-10% de xarope de maltose, resultando em incrementos de produção de resina entre 7 e 30%.

A patente SU 1301358 relata o uso de hidroxilamina hidrocloreto (solução aquosa 0,1 a 1% de modo a resultar em 0,3-0,5 g por decímetro quadrado de madeira) para aumentar o rendimento de resina em 8 a 13 %.

A patente SU 1398795 descreve o uso de extrato de levedura pré-tratado com radiação UV, resultando em aumento de 11% no rendimento de resina de troncos de coníferas.

A patente SU 1528385 ensina o uso de estimulante de produção de resina contendo levedura comestível e cloreto de trimetil-cloreoetilamônio em solução aquosa, produzindo incrementos de 10-28%.

O uso de ácido 4-cloro-*N*-(2-furil-metil)-5-sulfamoil antranílico em suspensão aquosa a 0,65% é descrito como estimulante da produção de resina em coníferas na patente SU 1528391.

O uso de uma solução aquosa de nistatina (19-micosaminil-nistatinomida), relacionado aos antibióticos poliênicos, a 0,17% é descrito

na patente SU 1542485 como estimulante da produção de resina, especialmente durante o início da estação de resinagem local (Abril-Maio). A base desta tecnologia seria a capacidade de nistatina de aumentar a permeabilidade de membranas celulares à água, o que  
5 otimizaria o funcionamento das células secretoras dos canais resiníferos.

O uso de lodo resultante do processamento de madeira e produção de papel é descrito como um estimulador da produção de resina em coníferas na patente SU 1540732, enquanto o resíduo industrial micelial da produção de antibióticos é relatado na patente SU 1544288 como  
10 capaz de aumentar a produção em 37 a 70%.

A patente SU 1724100 ensina que o resíduo da produção de levedura de pão é um estimulador mais eficiente da produção de resina, se comparado à suspensão de levedura pura.

Todas as patentes soviéticas mencionadas, no entanto, não  
15 comparam rendimentos com o sistema mais largamente utilizado no mundo, que emprega pastas indutoras com ácido sulfúrico.

O primeiro registro de uso de substâncias geradoras de etileno ou acetileno para melhorar o rendimento de exsudatos de árvores aparece na patente GB1293934, de 1969, a qual descreve melhorias no  
20 rendimento de látex de seringueira (*Hevea brasiliensis*) usando tratamento químico local das incisões de tronco com acetileno (derivado de carbeto de cálcio), ácido 2-cloro-etil-fosfônico ou ácido 2,4,5 - tricloroetilfosfônico.

A patente U.S. 4.203.253 diz respeito à estimulação da produção  
25 de oleoresina associada com células vivas que pode ser quimicamente induzida com a aplicação de compostos de etileno ou compostos geradores de etileno, dentre os quais o ácido 2-cloroetilfosfônico, CEPA ou Ethrel. Sais de bupiridílio podem ser usados em combinação, como diquat ou paraquat. Os produtos oleoresina são então recuperados da

árvore com rendimentos aumentados em relação aos rendimentos obtidos em ausência de estimulação. Compostos geradores de etileno são selecionados dentre o grupo que consiste de beta-hidroxiethylhidrazina, etilhidazina, sim-dietilhidrazina, não sim-bis (2-  
5 hidroxiethyl)hidrazina, aminomorfolina, 2-hidroxi-N-(2-hidroxiethyl)carbazinato, 2-(2-hidroxiethyl) semicarbazina, etil propil fosfonato, sulfato de monoetila, e ácido 2-cloroethylfosfônico. Este último composto está presente na composição em entre 1 a 5% em peso.

Os documentos de patentes tornam claro que novas estratégias de  
10 otimização de pasta indutora de resina não têm sido exploradas, embora a melhora de rendimento constitua uma meta importante para tornar a atividade resineira mais lucrativa.

A melhora de rendimento em florestas de produção média, sem  
15 melhoramento específico para produção de oleoresina é outra meta relevante, uma vez que o melhoramento genético com vistas à atividade resineira é incipiente, e a vasta maioria dos plantéis florestais usados atualmente para esta finalidade econômica não sofreu seleção ou melhoramento genético.

Assim, a técnica ainda necessita de processos de produção  
20 aumentada de oleoresina de coníferas por administração de pastas indutoras à base de ácido sulfúrico destinadas a serem aplicadas em árvores vivas, contendo aditivos indutores de custo inferior ao dos compostos geradores de etileno como CEPA ou Ethrel.

### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

25 De um modo amplo, a composição da invenção a ser aplicada em pelo menos uma estria ou corte obtida por ferimento de coníferas vivas de modo a obter rendimento aumentado em oleoresina sem alteração significativa na composição dos componentes majoritários da oleoresina (alfa e beta pineno) compreende, além de ingredientes usuais como

ácido sulfúrico aquoso a 15-30%, óleo mineral e sílica para proporcionar consistência para aderência à árvore, uma proporção entre 0,1 a 2000 mM L<sup>-1</sup> de pelo menos um metal (co-fator de terpeno sintases ou componente de receptores de etileno) selecionado dentre Cu, Mn, Fe, e K.

O pelo menos um co-fator metálico é aplicado sob forma de sais de ânions inorgânicos ou orgânicos.

Alternativamente o pelo menos um co-fator metálico é aplicado sob forma de óxidos dos metais.

Ainda alternativamente, para mais de um co-fator metálico aplicado sob forma de combinações, a mistura ou combinação compreende: *i*) co-fatores metálicos sob forma de sais selecionados dentre orgânicos e inorgânicos; *ii*) óxidos; e *iii*) combinações dos ditos sais e ditos óxidos, as combinações em todos os casos sendo efetuadas em qualquer proporção.

Já o processo para obtenção de oleoresina de coníferas vivas com rendimentos superiores aos obtidos com pasta indutora de exsudação desprovida do pelo menos um co-fator metálico presente na composição da invenção compreende preparar uma pasta indutora à base de ácido sulfúrico contendo o dito pelo menos um co-fator metálico e aplicar a mesma com auxílio de uma bisnaga ou similar em pelo menos um ferimento na casca da conífera uma proporção eficaz da dita composição da invenção e coletar a resina exsudada com rendimentos superiores.

A invenção provê, portanto, uma composição de pasta indutora de exsudação aumentada de oleoresina em coníferas vivas que compreende ácido sulfúrico diluído, óleo mineral, sílica e aditivos para atingir consistência e uma proporção eficaz de pelo menos um metal (co-fator de terpeno sintases ou componente de receptores de etileno) selecionado dentre Cu, Mn, Fe e K.

A invenção provê também uma composição de pasta indutora à base de ácido sulfúrico com exsudação aumentada de oleoresina em coníferas vivas que resulta em rendimento de oleoresina equivalente ao obtido com uma pasta controle com bom desempenho, porém com  
5 redução expressiva no custo de fabricação da pasta indutora, pois permite a eliminação do componente de maior custo na formulação de uma pasta controle de bom desempenho (o precursor de etileno ácido 2 cloroetil fosfônico – CEPA ou Ethrel).

A invenção provê ainda uma pasta indutora de exsudação de  
10 oleoresina à base de ácido sulfúrico para ser aplicada em coníferas vivas, a pasta contendo entre 0,1 e 2000 mM L<sup>-1</sup> de pelo menos um metal (co-fator de terpeno sintases ou componente de receptores de etileno) selecionado dentre Cu, Mn, Fe e K, o metal (pelo menos um) sendo utilizado sob forma de sais inorgânicos e orgânicos e de óxidos, de modo  
15 isolado ou combinados em qualquer proporção.

A invenção provê adicionalmente uma pasta indutora de exsudação aumentada de oleoresina para ser aplicada em coníferas vivas, a pasta sendo de baixo custo e modo de obtenção simples.

A invenção provê igualmente um processo para a produção  
20 aumentada, em relação a processos do estado da técnica à base de ácido sulfúrico, de oleoresina em coníferas vivas.

A invenção provê ainda um processo de baixo custo para a produção aumentada, em relação a processos do estado da técnica à base de ácido sulfúrico, da exsudação de oleoresina em coníferas vivas.

## 25 **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

A FIGURA 1 anexa é uma representação esquemática da anatomia do xilema secundário de caules de *Pinus*, com destaque para a presença de ductos resiníferos. Em (1), Ductos Resiníferos, em (2), Parênquima Radial, em (3) Lenho Precoce, em (4) Lenho Tardio, em (5)

Superfície Transversal, em (6), Superfície Tangencial, em (7) Superfície Radial.

A FIGURA 2 anexa mostra um diagrama de procedimento básico de resinagem em *Pinus*. Legenda: (10) tronco, (20) painel com estrias (cortes) seriadas geradas por operador usando ferramenta apropriada, (30) arame para fixação do saco plástico, (40) saco plástico coletor de oleoresina, (50) oleoresina acumulada.

A FIGURA 3 anexa retrata a produção de oleoresina com pasta estimulante comercial suplementada com diferentes metais. Legenda: Controle 1: estria ou corte na árvore (sem tratamento). Controle 2: Pasta comercial (com CEPA ou Ethrel). FIGURA 3A: Metal da Invenção: K. FIGURA 3B: Metal da invenção: Cu. FIGURA 3C: Metal da Invenção: Fe. FIGURA 3D: Mn. Barras compartilhando uma ou mais letras não diferem pelo teste de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

A FIGURA 4 anexa ilustra a produção de oleoresina com pasta estimulante suplementada com metais adjuvantes sem CEPA. Controle 1: estria ou corte na árvore (sem tratamento). Controle 2: Pasta comercial (com CEPA ou Ethrel). FIGURA 4A: Metal da Invenção: Mn. FIGURA 4B: Metal da invenção: K. FIGURA 4C: Metal da Invenção: Fe. Barras compartilhando uma ou mais letras não diferem pelo teste de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Na presente invenção as estrias efetuadas na casca de coníferas para recolher o exsudato resinoso são também denominados ferimentos, cortes ou injúria mecânica.

Ainda, os co-fatores metálicos são também denominados adjuvantes ou compostos adjuvantes.

Pasta indutora também é denominada pasta para exsudação aumentada de oleoresina de coníferas vivas.

Ainda, deve ser salientado que de preferência a composição e pasta da invenção se aplicam a árvores (coníferas) vivas, já que o  
5 sucesso da pasta indutora decorre da resposta do desempenho melhorado das terpeno-sintases em função da adição de seus co-fatores metálicos, ou seja, é essencial que as células estejam vivas (enzimas ativas) para a pasta funcionar nesses termos.

Com base nos conhecimentos bioquímicos, fisiológicos e  
10 ecoquímicos de *Pinus* já descritos, bem como em virtude do custo relativamente alto de CEPA ou Ethrel na composição da pasta indutora de resina, a presente invenção compreende uma composição e processo para exsudação aumentada por otimização da pasta indutora para incremento do rendimento de resina ou manutenção do rendimento atual  
15 com substituição parcial ou total de Ethrel, resultando em minimização de custos.

Um primeiro aspecto da invenção é a composição de pasta indutora contendo pelo menos um metal adjuvante para a exsudação aumentada de oleoresina em coníferas vivas.

20 Um segundo aspecto da invenção é a pasta indutora de exsudação aumentada de oleoresina em coníferas vivas contendo pelo menos um metal adjuvante.

Um terceiro aspecto da invenção é o processo para exsudação aumentada de oleoresina em coníferas vivas, o processo  
25 compreendendo prover uma composição de pasta da invenção e aplicar a mesma com auxílio de bisnaga sobre pelo menos um corte para resinagem realizado no tronco de árvores de coníferas vivas, particularmente do gênero *Pinus*, com a composição de pasta indutora de oleoresina contendo pelo menos um metal (co-fator de terpeno

sintases ou componente dos receptores de etileno) selecionado dentre K, Cu, Fe e Mn.

A seguir, serão descritos detalhadamente os reagentes e procedimentos envolvidos na composição e no processo inventivos.

5 Deve ficar bem claro para os especialistas que embora os experimentos que conduziram aos resultados apresentados no presente relatório sejam relativos à *Pinus elliottii* Engelm, os mesmos se aplicam igualmente bem a outras espécies de coníferas, incluindo: *P. caribaea* var. *hondurensis* *P. caribaea* var. *bahamensis*, *P. oocarpa*, *P. kesya*, sem  
10 estar limitadas a estas.

Adicionalmente, os especialistas compreenderão que os resultados obtidos através dos experimentos que conduziram ao presente pedido se aplicam a quaisquer pastas indutoras de exsudação de resina à base de ácido sulfúrico, de uso disseminado na técnica desta área do  
15 conhecimento, contendo os ingredientes usuais como sílica, caulim e/ou quaisquer outros espessantes e quaisquer aditivos reguladores da densidade, tensoativos, argilas e similares, tais pastas podendo conter ou não quaisquer outros adjuvantes de exsudação de oleoresina, os ingredientes citados sendo utilizados nas proporções praticadas e sendo  
20 combinados em qualquer ordem por meios manuais ou mecânicos.

Conforme os documentos citados acima no presente relatório, as pastas indutoras de exsudação de oleoresina em coníferas vivas são em geral à base de ácido sulfúrico e outros ingredientes, como sílica, caulim, óleo mineral, Ethrel e outros adjuvantes tal como mais acima no presente  
25 relatório.

No caso da presente invenção a pasta utilizada como a composição Controle 2 (controle positivo) é uma pasta comercial à base de ácido sulfúrico 15-30% vol/vol à qual é adicionado CEPA (ácido 2-

cloroetil fosfônico) ou Ethrel em proporção de 3,0-4,5% em peso como adjuvante.

Nos experimentos da invenção o Controle 1 (controle negativo) constitui o exsudato obtido unicamente a partir da estria ou corte efetuado na árvore, sem aplicação de qualquer pasta indutora.

O CEPA ou Ethrel é um material de custo bastante elevado (conforme cotação da Sigma-Aldrich, 100 mg de CEPA [CAS number = 64844-57-1] custam R\$ 451,00) e seria assim interessante substituir em todo ou em parte a adição do mesmo à pasta indutora de exsudação utilizada nos ferimentos ou cortes de árvores para obter exsudação aumentada de oleoresina com igual eficiência a custo inferior.

Já os sais e óxidos de co-fatores de metais utilizados na composição de pasta conforme a invenção são de muito baixo custo, em média entre R\$ 0,0128 até 0,0212 por 100 mg.

O processo de preparação da composição conforme a invenção para a exsudação aumentada de oleoresina compreende combinar uma proporção entre 0,1 e 2000 mM L<sup>-1</sup> de pelo menos um co-fator (de terpeno sintases ou componente de receptores de etileno) metálico selecionado dentre Cu, Mn, Fe e K sob forma de sais ou óxidos, a ingredientes usuais das pastas indutoras à base de ácido sulfúrico, ou seja, uma solução aquosa de ácido sulfúrico entre 15-30% vol/vol, sílica, caulim, espessantes, óleo mineral e quaisquer aditivos conhecidos e necessários para a consistência da pasta, a combinação sendo efetuada sob agitação e à temperatura ambiente.

Conforme a invenção, os sais do pelo menos um co-fator metálico são selecionados dentre sais obtidos a partir do co-fator metálico e ânions inorgânicos selecionados dentre sulfatos, cloretos, nitratos, carbonatos e fosfatos, sem estarem limitados a estes.

Alternativamente, os sais do pelo menos um co-fator metálico são selecionados dentre sais obtidos a partir do dito pelo menos um co-fator metálico e ânions orgânicos selecionados dentre citrato, lactato e oxalato, sem estarem limitados a estes.

5 Ainda alternativamente, o pelo menos um co-fator de metal é utilizado sob forma de óxido.

E ainda alternativamente, uma combinação de co-fatores metálicos é utilizada, sob forma de sais inorgânicos, orgânicos e óxidos, em qualquer combinação entre si e em qualquer proporção.

10 Embora a proporção dos metais adjuvantes na pasta indutora possa variar dentro de amplos limites, considera-se uma faixa preferida para os metais Cu, Mn e Fe, entre 0,1 e 1000 mM L<sup>-1</sup> enquanto para o K esta faixa está entre 10 e 2000 mM L<sup>-1</sup>.

15 Ainda mais preferida é a faixa entre 0,2 e 500 mM L<sup>-1</sup> para Cu, Mn e Fe, e entre 20 e 1000 mM L<sup>-1</sup> para o K.

Portanto, o processo de preparação da composição de pasta indutora de exsudação aumentada de oleoresina em coníferas vivas conforme a invenção compreende a mistura ou combinação do ou dos sais do pelo menos um metal adjuvante à composição de pasta indutora por simples adição da quantidade determinada do dito pelo menos um metal adjuvante sob forma de um de seus sais a uma solução aquosa entre 15-30% de ácido sulfúrico, seguida da adição dos outros ingredientes da pasta e agitação da mistura dos ingredientes até a consistência ideal ser atingida.

20 25 A concentração de ácido sulfúrico aquoso utilizada não é crítica, podendo variar desde 15% vol/vol até 40-60% vol/vol, com um valor médio entre 15-30% vol/vol.

O sal do metal usado é de um único metal.

Alternativamente é usada uma mistura de sais de metais em qualquer proporção.

Alternativamente os co-fatores metálicos são aplicados sob forma de óxidos dos metais.

5 Ainda alternativamente, para mais de um co-fator metálico aplicado sob forma de combinações, a mistura ou combinação compreende: *i*) co-fatores metálicos sob forma de sais selecionados dentre orgânicos e inorgânicos; *ii*) óxidos; e *iii*) combinações dos ditos sais e ditos óxidos, as combinações em todos os casos sendo efetuadas entre sais dos dois  
10 tipos ou entre sais e óxidos em qualquer proporção.

Conforme a prática desta área tecnológica, a consistência ideal da composição de pasta e da pasta obtida é definida pela manutenção das propriedades físicas da pasta para a permanência desta no painel de extração de resina por, no mínimo, 14 dias após aplicação da mesma.

15 Os resultados experimentais indicam que os sais de metais são eficazes no aumento da exsudação de oleoresina mesmo em baixas proporções.

Durante a pesquisa que levou ao desenvolvimento do presente pedido, os Requerentes utilizaram composições da invenção que incluem  
20 o adjuvante CEPA ou Ethrel e pelo menos um sal de metal adjuvante proposto na invenção.

Os exsudatos obtidos a partir da aplicação destas composições de pastas e pastas foram quantificados.

25 Os resultados experimentais estão ilustrados nas Figuras 3A, 3B, 3C e 3D.

A fim de determinar o efeito específico do pelo menos um co-fator metálico sobre a exsudação de oleoresina, em um outro grupo de composições de pasta adjuvante as composições são isentas de CEPA ou Ethrel, contendo como adjuvante unicamente o pelo menos um sal de

metal (co-fator de terpeno sintases ou componente de receptores de etileno).

Os resultados experimentais estão ilustrados nas Figuras 4A, 4B e 4C.

5 Conforme pode ser visto a partir dos gráficos de barra das Figuras 3 e 4, a composição e pasta da invenção atingem excelentes resultados não somente em relação ao controle negativo, sem uso de qualquer pasta indutora, mas igualmente supera ligeiramente os excelentes resultados obtidos com a pasta indutora utilizada como controle positivo,  
10 que contém CEPA, o aditivo de custo altíssimo.

A obtenção de resina de árvores de *Pinus elliottii* Engelm. var. *elliottii* de 28 anos de idade é feita pelo método de estriação da casca ("bark streak") (Stubbs, J., Roberts, D.R. and Outcalt, K.W. 1984. Chemical Stimulation of lightwood in southern pines. General Technical  
15 Report SE-25. United States Department of Agriculture, Forest Service, Southeastern Forest Experiment Station, Asheville, North Carolina), conforme esquematizado na Figura 2.

Conforme a Figura 2, o padrão de estrias **(20)** que é aplicado com instrumento cortante ao tronco **(10)** e porção externa do tronco de *Pinus*,  
20 provoca a liberação de resina. Na superfície cortada, a qual é periodicamente ampliada de modo seqüencial e acrópeto (p. ex. semanalmente ou quinzenalmente), logo após o corte, aplica-se sobre cada uma das incisões uma fina camada de pasta indutora de resina que mantém e amplia a liberação da mesma. A resina escorre para baixo,  
25 sendo coletada em saco plástico **(40)** que é fixado ao tronco por meio de um arame **(30)**. O saco plástico coletor **(40)** é esvaziado e substituído na medida em que é preenchido totalmente com resina **(50)**.

No processo de obtenção de exsudato de coníferas vivas conforme a invenção a composição de pasta indutora de exsudação aumentada é

aplicada em pelo menos uma estria (20) do tronco (10) da conífera viva e a resina exsudada (50) em proporção aumentada em relação a resinas do estado da técnica é coletada em saco plástico (40).

5 Em geral, sem estar limitado a esta, a composição de pasta indutora é aplicada com auxílio de bisnaga.

Os experimentos que serviram de base para os dados do presente pedido foram conduzidos em árvores localizadas no estado do Rio Grande do Sul, município de São José do Norte (aproximadamente 32 graus sul de latitude e 52 graus oeste de longitude). As florestas usadas  
10 nos ensaios não haviam sido previamente resinadas. Embora não tenham sido explicitamente tratados no presente pedido, resultados equivalentes podem ser obtidos com florestas previamente resinadas, bem como com outras espécies de *Pinus* e seus híbridos.

Para todos os ensaios são usados dois tipos de controles:  
15 estriagem de casca sem aplicação de pasta indutora de resina (corte ou controle negativo – Controle 1 nas Tabelas e Figuras) e estriagem de casca com aplicação de pasta indutora comercial (pasta ou controle positivo- Controle 2 nas Tabelas e Figuras).

A pasta indutora comercial usada como controle é composta de:  
20 sílica pirogênica, emulsificador e os ingredientes ativos, ácido sulfúrico 15 -30% e ácido 2-cloro-etil-fosfônico (CEPA) 3,0 - 4,5%.

Pastas modificadas pela adição de diferentes adjuvantes foram aplicadas nos ferimentos do tronco de árvores submetidas aos tratamentos (Tabela 1).

25 A fim de evitar efeitos relevantes da irradiância solar e dos ventos, em todos os ensaios as 4 a 5 fileiras de árvores mais externas do perímetro florestal não são consideradas.

Nos ensaios são usadas 40 a 50 árvores por tratamento com diâmetro médio à altura do peito de 22 cm. Após o término de cada

estação de resinagem, sacos plásticos coletores de resina são pesados após a cuidadosa remoção da água de chuva superficial.

Um total de 5060 árvores foi testado.

Os ensaios foram conduzidos nas terras da empresa FLORESTAL PALMARES LTDA.

Na Tabela 1 a seguir são listados os adjuvantes de pasta indutora avaliados, bem como o racional para o emprego dos mesmos na composição de pastas otimizadas.

10

TABELA 1

Adjuvante	Faixas de Concentração	Atividade biológica
Cobre (Cu)	0,1 – 1000 mM L <sup>-1</sup>	Cu: Co-fator de Receptores de etileno
Mn (Manganês)	0,1 – 1000 mM L <sup>-1</sup>	Mn <sup>2+</sup> Co-fator de Monoterpeno sintases
Fe (Ferro)	0,1 – 1000 mM L <sup>-1</sup>	Fe <sup>2+</sup> : Co-fator de Monoterpeno sintases
K (Potássio)	10 – 2000 mM L <sup>-1</sup>	K <sup>+</sup> : Co-fator de Monoterpeno sintases

Amostras de resina recém-produzida foram obtidas de troncos de 90 árvores de dois sítios diferentes.

Cada amostra consistiu de uma mistura de igual proporção de resina fresca (produzida nas últimas 24hs) de 10 árvores individuais submetidas ao mesmo tratamento.

As coletas foram feitas sempre à tarde para evitar possíveis efeitos circadianos.

Imediatamente após a coleta, as amostras de resina foram congeladas e armazenadas em ultra-freezer a (-80°C) em frascos completamente selados até análise.

Para análise, 0,1 g de resina foi transferida para um novo frasco ao qual adicionou-se 1 mL de dietil éter.

As mesmas análises foram feitas com uma diluição diferente (0,08 g de resina em 10 mL de dietil éter), fornecendo resultados similares.

5 Após agitar com uma espátula, a amostra foi mantida em um banho ultrassônico a temperatura ambiente por 20 minutos. As amostras foram limpas passando-as por colunas de extração de fase sólida de sílica Extract clean<sup>®</sup> (Altech Inc. Columbia, MD, USA, 500mg/8.0mL). Uma solução clara foi obtida e diretamente injetada no aparelho de GC.

10 A análise de GC quantitativa foi conduzida usando um cromatógrafo gasoso Perkin Elmer Autosystem XL equipado com software TotalChrom<sup>™</sup>, usando coluna capilar de sílica DB-1 (25 m x 0.25 mm). As temperaturas do injetor e do detector foram 220°C e 250°C, respectivamente. A temperatura do forno foi programada de 60°C  
15 (3 min) até 300°C a 15°C/min. Nitrogênio foi usado como gás carreador (1,3 mL/min) e o volume de injeção foi 3 µL.

As percentagens de composição foram obtidas a partir de medidas de integração eletrônicas usando detecção de ionização de chama (FID) sem ter em conta os fatores de resposta relativos.

20 Para quantificação de alfa e beta pineno na resina, curvas padrão foram geradas com padrões autênticos de monoterpenos (Sigma, USA).

Análises quantitativas foram realizadas usando um cromatógrafo Shimadzu acoplado a um quadrupolo sistema MS (QP 5000), equipado com uma coluna capilar DB-5 de sílica fusionada (30 m x 0.25 mm x 0.25  
25 µm, J & W Scientific). O gás carreador foi hélio e o fluxo, 1 mL/min. Os parâmetros operacionais do espectrômetro de massa foram: voltagem de ionização = 70 eV, temperatura da fonte de íons = 250°C. As temperaturas do injetor e detector foram ajustadas em 220°C e 250°C,

respectivamente. A temperatura do forno foi programada de 60°C (3 min) até 300°C a 15°C/min.

A identificação de compostos foi feita por comparação com índices de retenção (determinados em relação aos tempos de retenção de uma série de *n*-alcanos) e espectros de massa com aqueles de amostras autênticas com dados da literatura.

As análises estatísticas dos dados foram feitas por análise de variância simples (ANOVA) seguida de teste de Tukey. Dados foram transformados quando necessário para atender os requisitos de homogeneidade de variância da ANOVA. Em todos os casos usou-se  $P \leq 0.05$  (Sokal, R.R. and Rohlf, F.J. 1981. Biometry. W.H. Freeman, San Francisco, 859p.).

Alguns adjuvantes metálicos testados em conjunto com CEPA na pasta indutora aumentaram de modo significativo a produção de resina, como pode ser visto nas Figuras 3A, 3B, 3C e 3D.

No entanto, os adjuvantes não reduzem o rendimento em relação ao controle positivo nas concentrações quando não são estimulatórios.

Os adjuvantes com melhor efeito estimulatório foram potássio, ferro e cobre.

A terebintina de resina de *Pinus elliottii* var. *elliottii* induzida por pasta comercial suplementada ou não com metais não tem composição alterada de forma significativa em seus componentes majoritários (alfa e beta pineno), tendo sido observada diferença estatística entre os tratamentos somente para o canfeno, conforme os dados de concentração de terpenos obtidos por GC-MS de amostras de resina. Todos os tratamentos continham CEPA.

Estes dados são exemplificados na Tabela 2 a seguir.

## TABELA 2

Concentração%						
Tratamento	$\alpha$ -pineno	canfeno	$\beta$ -pineno	mirreno	$\beta$ -felandreno	metil-chavicol*
Mn	83,27 a	2,29 abcd	101,44 a	1,68 a	8,77 a	2,10 a
Fe	77,58 a	2,60 abc	106,50 a	1,98 a	6,80 a	1,15 a
K	86,54 a	3,34 ab	92,91 a	3,83 a	9,45 a	2,31 a
Cu	84,65 a	3,68 a	100,07 a	1,43 a	7,11 a	1,85 a
C1	81,65 a	1,10 cd	99,45 a	1,82 a	10,53 a	2,84 a
C2	86,62 a	0,97 d	104,24 a	1,25 a	5,28 a	0,76 a

C1 = Controle 1: controle negativo

C2 = Controle 2: controle positivo

5 Números na mesma coluna compartilhando uma ou mais letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ou Dunnett's C\* ( $P \leq 0.05$ ).

Cada valor representa a média de 10 árvores.

A combinação de adjuvantes da invenção na pasta com CEPA mostrou efeito similar aos adjuvantes fornecidos individualmente.

10 Já o efeito de adjuvantes individuais em pasta sem CEPA na produção de resina foi equivalente ao da pasta comercial contendo CEPA, o que é altamente promissor tendo em vista o custo irrisório dos sais de metais co-fatores em relação ao produto CEPA.

Estes dados são exemplificados nas Figuras 4A, 4B e 4C.

15 Conforme a Tabela 2 acima, a análise cromatográfica da composição de monoterpenos majoritários de oleoresina mostrou que a presença de co-fatores metálicos em pasta indutora na ausência de CEPA não mudou de forma significativa a composição em relação à pasta comercial.

20 Os dados mostram que a adição de adjuvantes metálicos envolvidos como co-fatores na atividade de terpeno sintases de coníferas ou como integrantes de proteínas receptoras de etileno na pasta indutora de resina pode melhorar o rendimento em peso de oleoresina, sem

alterar de forma expressiva a composição dos terpenos majoritários da terebintina, alfa e beta pineno.

Adicionalmente, é possível eliminar o componente da pasta indutora de maior custo - ácido 2 cloroetil fosfônico (CEPA) - da  
5 composição da pasta e substituir o mesmo por co-fatores metálicos conforme proposto na composição, pasta e processo de obtenção de oleoresina aumentada de coníferas vivas conforme o presente pedido.

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição de pasta indutora de exsudação aumentada de oleoresina em coníferas vivas compreendendo solução aquosa de ácido sulfúrico entre 15-30% vol/vol e aditivos selecionados dentre sílica, caulim, óleo mineral, espessantes e similares, dita  
5 composição sendo caracterizada por compreender adicionalmente a adição de entre 0,1 e 2000 mM L<sup>-1</sup> de pelo menos um co-fator metálico de terpeno sintases ou componente de receptores de etileno, o pelo menos um metal sendo selecionado dentre Cu, Mn,  
10 Fe e K.
2. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por as proporções de Cu, Mn e Fe estarem entre 0,1 e 500 mM L<sup>-1</sup> enquanto a proporção de K está entre 10 e 2000 mM L<sup>-1</sup> de pasta indutora.
- 15 3. Composição de pasta indutora de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por a faixa para Cu, Mn e Fe estar entre 0,2 e 300 mM L<sup>-1</sup> e a faixa para o K estar entre 20 e 1000 mM L<sup>-1</sup> de pasta.
4. Composição de pasta indutora de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por o pelo menos um co-fator metálico ser utilizado  
20 sob forma de um sal do dito pelo menos um metal.
5. Composição de pasta indutora de acordo com a reivindicação 4, caracterizada por os ânions dos ditos sais do pelo menos um co-fator metálico serem inorgânicos.
- 25 6. Composição de pasta indutora de acordo com a reivindicação 5, caracterizada por ditos ânions inorgânicos serem selecionados dentre sulfatos, cloretos, nitratos, carbonatos e fosfatos.

7. Composição de pasta indutora de acordo com a reivindicação 4, caracterizada por os ânions dos ditos sais do pelo menos um co-fator metálico serem orgânicos.
- 5 8. Composição de pasta indutora de acordo com a reivindicação 7, caracterizada por ditos ânions orgânicos serem selecionados dentre citratos, lactatos e oxalatos.
9. Composição de pasta indutora de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por o pelo menos um co-fator metálico ser utilizado sob forma de óxido do dito pelo menos um metal.
- 10 10. Composição de pasta indutora de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por compreender uma mistura de co-fatores metálicos, onde a mistura compreende: *i*) co-fatores metálicos sob forma de sais selecionados dentre orgânicos e inorgânicos; *ii*) óxidos; e *iii*) combinações dos ditos sais e ditos óxidos, as combinações entre sais dos dois tipos ou entre sais e óxidos e em todos os casos sendo efetuadas em qualquer proporção.
- 15 11. Composição de pasta indutora de acordo com todas as reivindicações anteriores, caracterizada por ser preparada por adição do pelo menos um dito co-fator metálico à solução aquosa a 15-30% vol/vol de ácido sulfúrico, seguida da adição dos outros ingredientes da composição e homogeneização por agitação da mistura à temperatura ambiente.
- 20 12. Pasta indutora de exsudação aumentada de oleoresina em coníferas vivas resultante da composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por compreender entre 0,1 e 2000 mM L<sup>-1</sup> de pelo menos um co-fator metálico de terpeno sintases ou componente de receptores de etileno, o dito pelo menos um metal sendo selecionado dentre Cu, Mn, Fe e K.
- 25

13. Pasta indutora de acordo com a reivindicação 12, caracterizada por as proporções de Cu, Mn e Fe estarem entre 0,1 e 1000 mM L<sup>-1</sup> enquanto a proporção de K está entre 10 e 2000 mM L<sup>-1</sup> de pasta indutora.
- 5 14. Pasta indutora de acordo com a reivindicação 13, caracterizada por a proporção para Cu, Mn e Fe estar entre 0,2 e 500 mM L<sup>-1</sup> e a proporção para o K estar entre 20 e 1000 mM L<sup>-1</sup> de pasta.
15. Pasta indutora de acordo com a reivindicação 12, caracterizada por o pelo menos um co-fator metálico ser utilizado sob forma de  
10 um sal do dito pelo menos um metal.
16. Pasta indutora de acordo com a reivindicação 16, caracterizada por o ânion do dito sal do pelo menos um co-fator metálico ser inorgânico.
- 15 17. Pasta indutora de acordo com a reivindicação 16, caracterizada por o ânion inorgânico ser selecionado dentre sulfato, cloreto, nitrato, carbonato e fosfato.
18. Pasta indutora de acordo com a reivindicação 15, caracterizada por os ditos ânions dos sais dos co-fatores metálicos serem orgânicos.
- 20 19. Pasta indutora de acordo com a reivindicação 18, caracterizada por os ditos ânions orgânicos serem selecionados dentre citratos, lactatos e oxalatos.
- 25 20. Pasta indutora de acordo com a reivindicação 12, caracterizada por compreender uma mistura de co-fatores metálicos, onde a mistura compreende: *i*) co-fatores metálicos sob forma de sais selecionados dentre orgânicos e inorgânicos; *ii*) óxidos; e *iii*) combinações dos ditos sais e ditos óxidos, as combinações em todos os casos sendo efetuadas entre sais dos dois tipos ou entre sais e óxidos e em qualquer proporção.

21. Processo para a produção aumentada de oleoresina em coníferas vivas com auxílio da composição de acordo com a reivindicação 1, dito processo sendo caracterizado por compreender prover dita composição e aplicar a mesma com auxílio de bisnaga a pelo menos uma estria **(20)** obtida por ferimento causado no tronco **(10)** das ditas coníferas vivas, e coletar em saco plástico **(40)** a oleoresina **(50)** com rendimento aumentado em relação a processos do estado da técnica.

FIGURAS

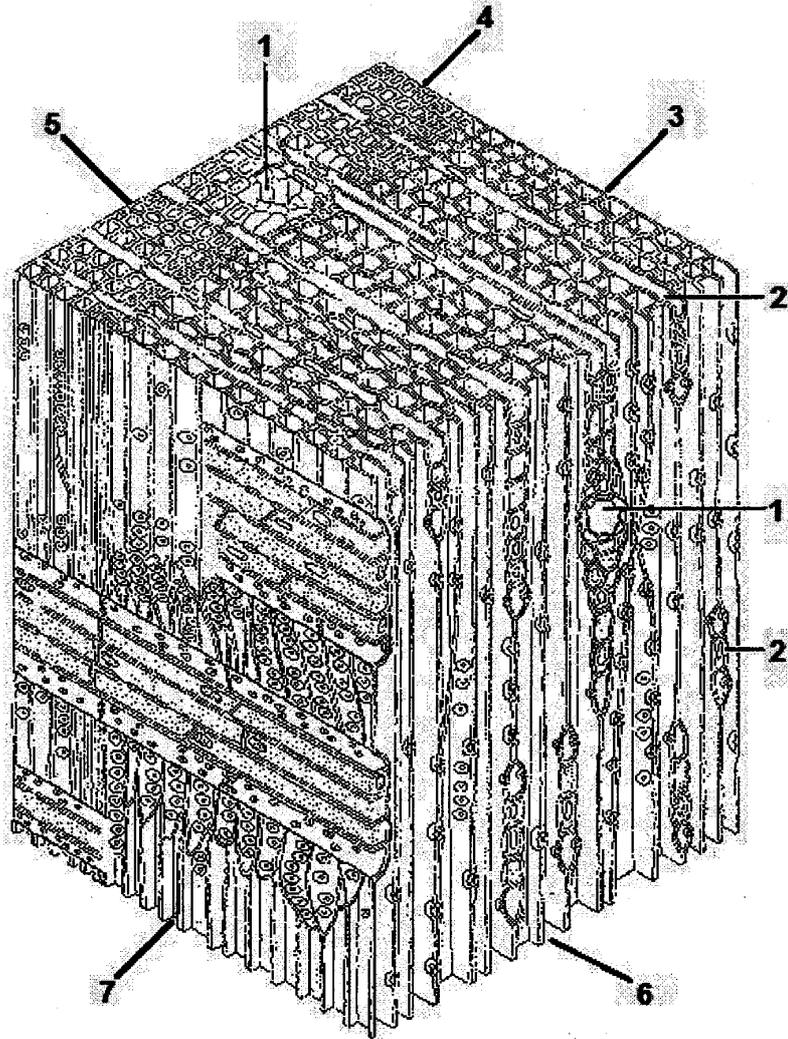


FIG. 1

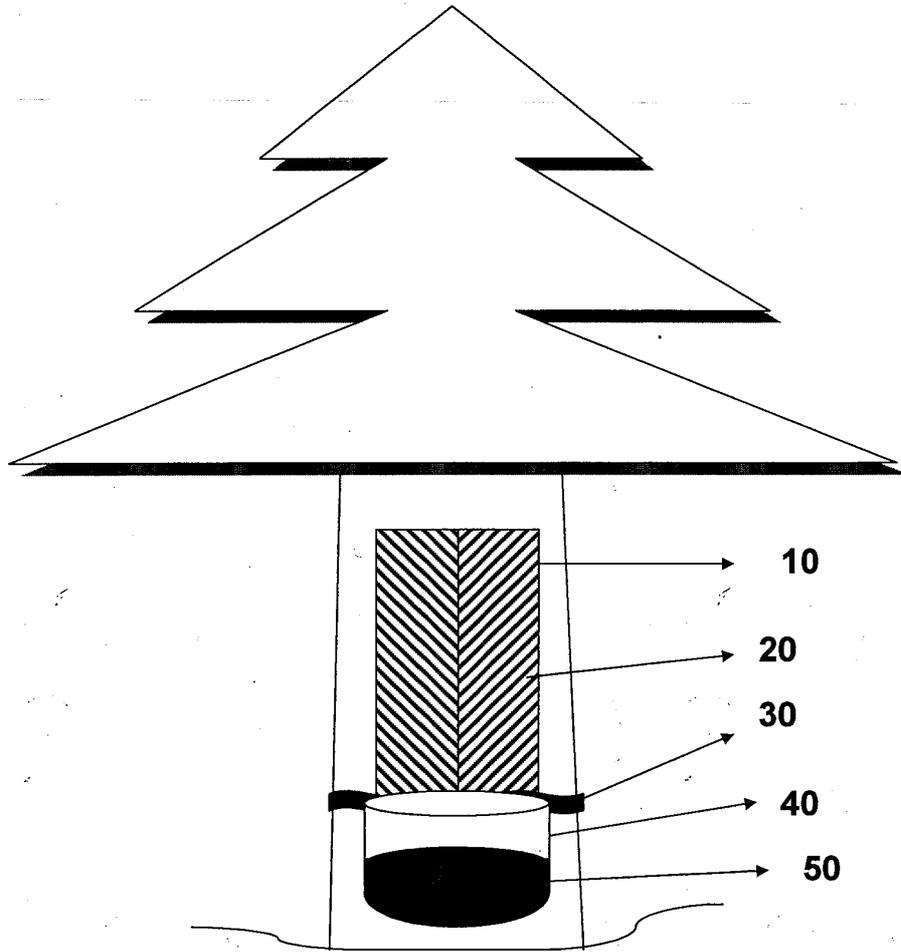


FIG. 2

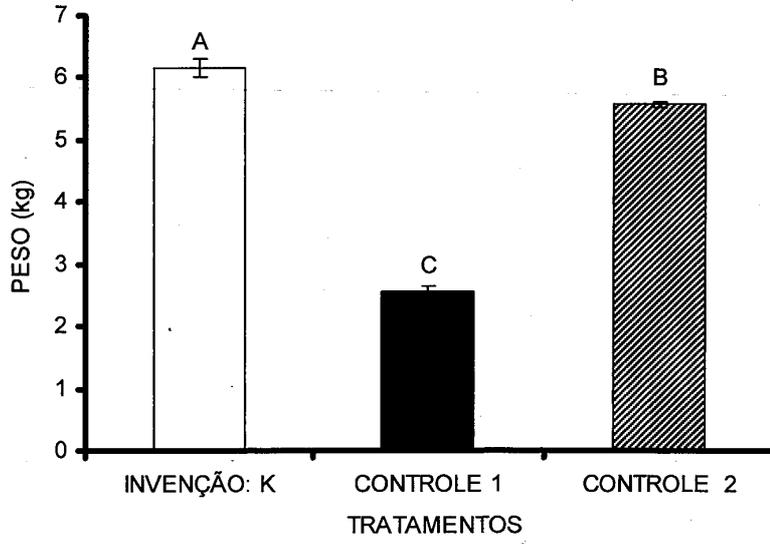


FIG. 3A

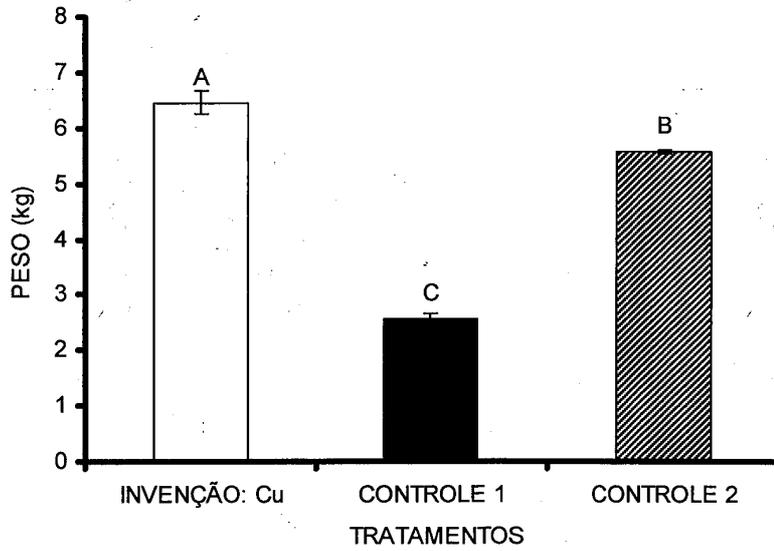


FIG. 3B

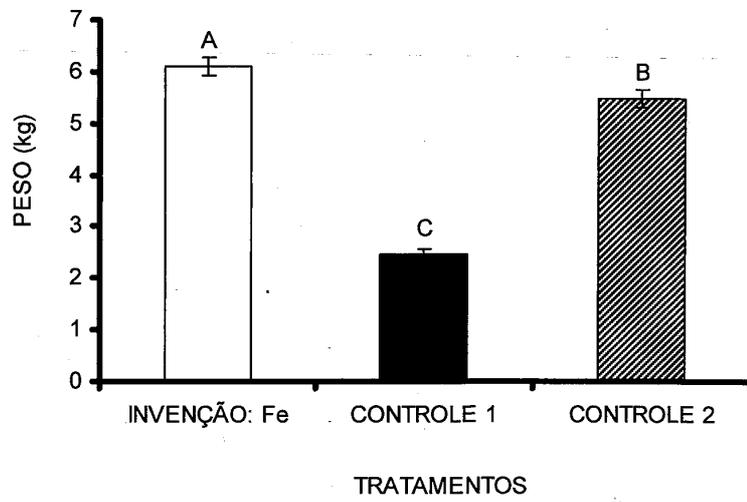


FIG. 3C

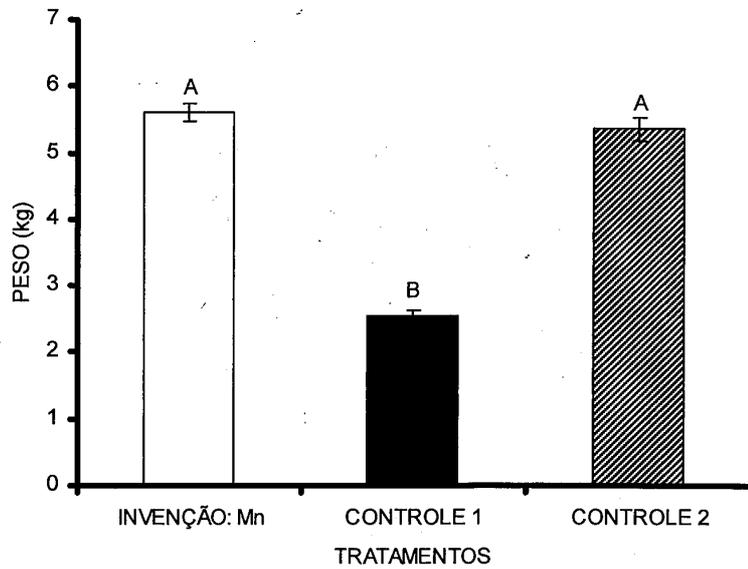


FIG. 3D

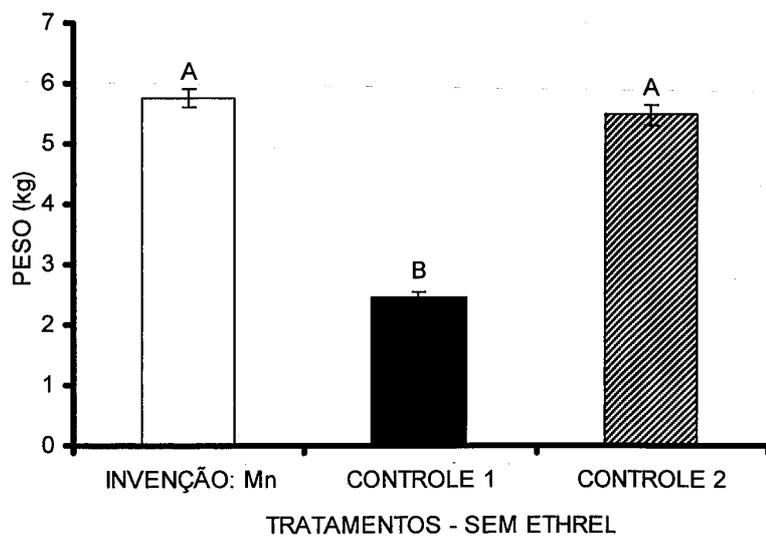


FIG. 4A

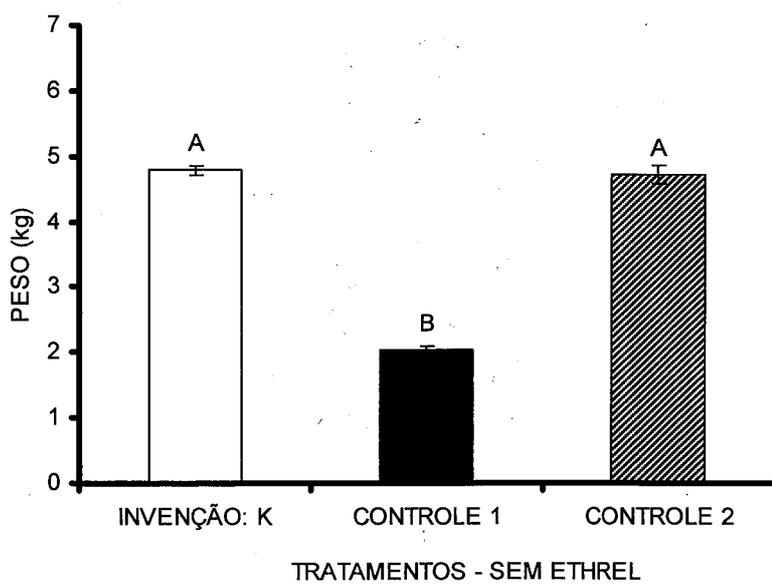


FIG. 4B

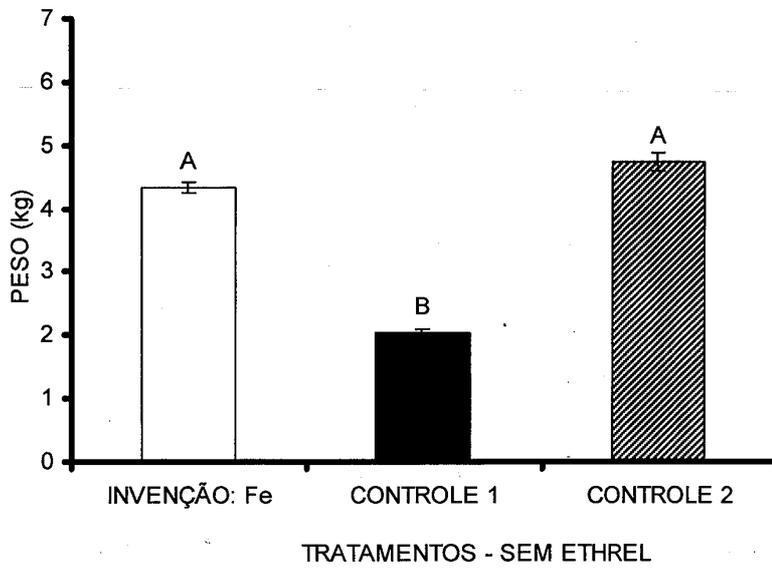


FIG. 4C

**RESUMO****COMPOSIÇÃO E PASTA INDUTORA DE EXSUDAÇÃO AUMENTADA DE OLEORESINA E PROCESSO PARA A PRODUÇÃO AUMENTADA DE OLEORESINA EM CONÍFERAS VIVAS**

5           É descrita uma composição de pasta indutora de exsudação aumentada de oleoresina em coníferas vivas, a composição, à base de ácido sulfúrico aquoso entre 15-30% vol/vol e aditivos usuais, compreendendo adicionalmente entre 0,1 e 2000 mM L<sup>-1</sup> de pelo menos um co-fator metálico de terpeno sintases ou componente de receptores  
10 de etileno, dito co-fator sendo selecionado dentre Cu, Mn, Fe e K.

          O processo de produção aumentada de oleoresina compreende aplicar a composição de pasta da invenção a pelo menos uma estria **(20)** obtida por ferimento causado no tronco **(10)** das ditas coníferas vivas, e coletar em saco plástico **(40)** a oleoresina **(50)** com rendimento  
15 aumentado em relação a processos do estado da técnica.