

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANÁLISE DA LIGNINA E DOS POLIFENÓIS  
DA AROEIRA-PRETA (*Astronium urundeuva*)

Discente: Carla Regina Amorim dos Anjos Queiroz  
Professor orientador: Sérgio Antônio Lemos de Morais  
Co-orientador: Evandro Afonso do Nascimento

Uberlândia, janeiro de 2001.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA

547.992,  
Q30,  
TES/MEM

*DISSERTAÇÃO DE MESTRADO*

SISBI/UFU



1000204131

**Análise da lignina  
de madeira moída  
e dos polifenóis  
da Aroeira-Preta  
(*Astronium urundeuva*)**

Aluna: Carla Regina Amorim dos Anjos Queiroz  
Orientador: Sérgio Antônio Lemos de Moraes  
Co-orientador: Evandro Afonso do Nascimento

Uberlândia, janeiro de 2001.

*“Sabei que o Senhor é Deus; foi ele quem nos fez, e não nós, somos seu povo e ovelhas do seu pasto. Entrai pelas portas dele com louvor, e em seus átrios com hino; louvai-o e bendizei o seu nome. Porque o Senhor é bom, e eterna a sua misericórdia; e a sua verdade dura de geração a geração”.*

*Salmo 100: 3-5*

## Dedicatória

Aos meus pais  
José Evangelista e Maria Abadia  
e a *minha irmã* Eneida  
pelos anos de apoio, incentivo e dedicação.

Ao meu esposo Carlos Magno  
pelo amor e compreensão.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
INSTITUTO DE QUÍMICA

**ALUNA: CARLA REGINA AMORIM DOS ANJOS QUEIROZ**

**NÚMERO DE MATRÍCULA: 5982425-2**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA ORGÂNICA**

**PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: NÍVEL MESTRADO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:**

**“ANÁLISE DA LIGNINA E DOS POLIFENÓIS DA AROEIRA-  
PRETA (*Astronium urundeuva*)”.**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Sérgio Antônio Lemos de Moraes**

A Dissertação foi **APROVADA** em reunião pública, realizada no Anfiteatro do Bloco E do Campus Santa Mônica, em 09 de janeiro de 2001, às 14:00 horas, com a seguinte Banca Examinadora:

**NOME:**

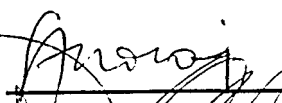


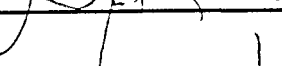


**ASSINATURA**

Prof. Dr. Sérgio A. Lemos de Moraes (Orientador-UFU)

Prof. Dr. Reinaldo Ruggiero

Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos

Uberlândia, 09 de janeiro de 2001.

(UFU)   
(UFPR)   
  
  
  


## Agradecimentos

- À Deus;
- Ao professor Sérgio Antônio Lemos de Moraes pela orientação;
- Ao professor Evandro Afonso do Nascimento pelas contribuições;
- Aos colegas de laboratório pela ajuda e companheirismo;
- Aos técnicos e funcionários que de alguma forma contribuíram para o bom andamento do trabalho;
- À FAPEMIG pela bolsa concedida.

## Índice Geral

	Página
Índice	i
Índice de Figuras	v
Índice de Tabelas	ix
Lista de Abreviaturas e Siglas	xi
Resumo	xiii
Abstract	xvi
<b>1        Introdução</b>	<b>1</b>
1.1      Celulose	1
1.2      Hemiceluloses (polioses)	4
1.3      Lignina	6
1.3.1    Aspectos gerais	6
1.3.2    Precursores de ligninas	8
1.3.3    Caracterização e estrutura de ligninas	8
1.3.4    Mecanismo biossintético proposto para formação da macromolécula de lignina	10
1.3.5    Lignina de madeira moída (LMM)	19
1.4      Constituintes menores	22
1.4.1    Extrativos	22
1.4.1.1   Resina	23
1.4.1.1.1 Taninos	28
1.4.1.1.2 Obtenção dos extrativos polifenólicos	30
1.4.1.1.3 Análise dos fenóis totais	32
1.4.1.1.4 Determinação de proantocianidinas	34
1.4.1.1.5 Determinação de 3-deoxi-proantocianidinas	36
1.4.1.2   Triglicerídeos, ceras e seus componentes	37
1.4.2    Não-extrativos	37

---

---

1.5	Aroeira-Preta – classificação botânica, descrição morfológica e características gerais da espécie estudada	38
<b>2</b>	<b>Procedimentos experimentais</b>	<b>48</b>
2.1	Obtenção e preparo da madeira de Aroeira-preta	48
2.2	Equipamentos utilizados	48
2.3	Metodologias	50
2.3.1	Análise dos componentes principais	50
2.3.1.1	Determinação da umidade	50
2.3.1.2	Processo de extração e purificação da lignina	50
2.3.1.3	Obtenção do extrato metanólico	50
2.3.1.4	Obtenção da holocelulose	51
2.3.1.5	Polissacarídeos de fácil e difícil hidrólise ( PFH e PDH )	51
2.3.1.6	Lignina de Klason	52
2.3.1.7	Lignina solúvel em ácido	52
2.3.1.8	Cinzas na madeira	53
2.3.2	Análise da lignina de madeira moída ( LMM )	54
2.3.2.1	Acetilação	54
2.3.2.2	Determinação de grupos metoxila	54
2.3.2.3	Reação de oximação (carbonilas totais)	57
2.3.2.4	Determinação de grupos hidroxílicos	58
2.3.2.5	Determinação de ligações $\alpha$ -O-4 e $\beta$ -O-4	60
2.3.2.6	Determinação relativa de unidades siringílicas e guaiacílicas	61
2.3.2.7	Distribuição de massas moleculares da LMM acetilada	61
2.3.2.8	Reação de oxidação da LMM com nitrobenzeno	62
2.3.2.9	Determinação da fórmula mínima	62
2.3.2.10	Análise da LMM por métodos espectroscópicos	62
2.3.3	Análise dos polifenóis da madeira	63
2.3.3.1	Obtenção dos extrativos polifenólicos	63
2.3.3.2	Determinação do teor de fenóis totais	63
2.3.3.3	Determinação de proantocianidinas	65

---



---

2.3.3.4	Determinação de 3-deoxi-proantocianidinas	65
<b>3</b>	<b>Resultados e discussões</b>	<b>67</b>
3.1	Composição da madeira	67
3.1.1	Extrativos	67
3.1.2	Holocelulose, polissacarídeos de fácil e difícil hidrólise	67
3.1.3	Lignina insolúvel em ácido (Klason)	69
3.1.4	Lignina solúvel em ácido	71
3.1.5	Cinzas na madeira	72
3.1.6	Análise por somatória	72
3.2	Resultados relativos à LMM	73
3.2.1	Obtenção da LMM	73
3.2.2	Análise elementar	74
3.2.3	Determinação de grupos metoxílicos	74
3.2.4	Determinação da fórmula mínima	78
3.2.5	Determinação de grupos carbonílicos	81
3.2.6	Determinação de grupos hidroxílicos	83
3.2.6.1	Hidroxilas fenólicas	83
3.2.6.2	Hidroxilas alifáticas	87
3.2.7	Determinação de ligações $\alpha$ -O-4 e $\beta$ -O-4	89
3.2.8	Determinações relativas de unidades siringílicas e guaiacílicas	92
3.2.9	Distribuição de massas moleculares	93
3.2.10	Oxidação da LMM com nitrobenzeno	94
3.2.11	Análise da LMM e dos extrativos por métodos espectroscópicos e cromatográficos	98
3.2.11.1	Infravermelho com transformada de Fourier ( IVTF )	98
3.2.11.2	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio ( RMN $^1\text{H}$ )	103

---

---

3.2.11.3	Ressonância Magnética Nuclear do carbono 13 em solução ( RMN $^{13}\text{C}$ )	106
3.2.11.4	Ressonância Magnética Nuclear do carbono 13 sólido ( RMN $^{13}\text{C}$ )	112
3.2.11.5	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	120
3.3	Análise dos polifenóis da madeira	122
3.3.1	Obtenção dos extrativos polifenólicos	122
3.3.2	Determinação de fenóis totais	123
3.3.2.1	Método Folin-Ciocalteau	123
3.3.2.2	Método Azul da Prússia modificado	124
3.3.3	Determinação de Proantocianidinas	125
3.3.3.1	Pelo método da vanilina	125
3.3.3.2	Pelo método butanol-ácido	127
3.3.4	Determinação de 3-deoxi-proantocianidinas	129
<b>4</b>	<b>Conclusões</b>	<b>131</b>
<b>5</b>	<b>Referências bibliográficas</b>	<b>135</b>
<b>6</b>	<b>Produção científica</b>	<b>143</b>

---

## Índice de figuras

Figura	Página
1.1 Estruturas representativas da $\beta$ -D-glucose	2
1.2 Formação de moléculas de celulose pela união de n unidades de $\beta$ -D-glucose	3
1.3 Esquema proposto para formação da fibra de celulose	3
1.4 Açúcares que compõem as hemiceluloses	4
1.5 Álcoois precursores de ligninas	9
1.6 Unidades básicas de C <sub>9</sub> em ligninas	9
1.7 Algumas subestruturas presentes em ligninas	11
1.8 Estruturas do ácido 3,4-dimetoxi-benzóico; 3,4-dimetoxi-1,5-benzodióico; 5,5'-difenil-3,4,4'-trimetoxi-1,1'-benzodióico	13
1.9 Produtos resultantes da reação parcial de desidrogenação do álcool coniferílico	14
1.10 Grupos finais do tipo coniferaldeído e álcool coniferílico	14
1.11 Desidrogenação do álcool coniferílico e estruturas de ressonância resultantes	15
1.12 Polimerização para formação da macromolécula de lignina	16
1.13 Polimerização para formação da lignina a partir do grupo final fenólico do tipo guaiacilglicerol- $\beta$ -aril-éter	18
1.14 Esquema estrutural proposto para lignina de <i>Picea abies</i>	20
1.15 Esquema estrutural proposto para lignina de <i>E. grandis</i>	21
1.16 Estrutura básica de vários terpenos	23
1.17 Exemplos de esteróides e triterpenóides na madeira	24
1.18 Exemplos de fenóis simples	24
1.19 Exemplos de lignanas	25
1.20 Exemplo de estilbeno	25
1.21 Exemplos de flavonóides	26
1.22 Exemplos de quinonas presentes nos extrativos	26

1.23	Ácidos presentes nos taninos hidrolisáveis	29
1.24	Estrutura e numeração convencionada de uma unidade flavonóide e flavan-3-ol	30
1.25	Exemplo de ligação C4-C8 na formação de proantocianidinas	30
1.26	Esboço para reação de oxidação que ocorre no ensaio do Azul da Prússia	34
1.27	Reação de condensação com a vanilina	35
1.28	Reação de hidrólise das proantocianidinas	36
1.29	Estrutura geral de 3-deoxi-flavans	37
1.30	Estrutura da apigenidina e luteolinidina	37
1.31	<i>Astronium urundeuva</i> segundo Pio Corrêa e folhagem de Aroeira-Preta procedente do município de Guapó	39
1.32	Tronco de <i>Astronium urundeuva</i> em Paraopeba (MG)	40
1.33	Corte em tronco de Aroeira-Preta mostrando casca, alburno e cerne	41
1.34	Fotomicrografias – corte tangencial e transversal	42
2.1	Absorvâncias relativas ( $A_i/A_{i_{1500}}$ ) de máximos característicos do espectro de IV em função de $OCH_3/C_9$	56
3.1	Equações representativas das reações que ocorrem na determinação de grupos metoxílicos pelo método Vieböck.	75
3.2	Espectro de IV característico da LMM usado para o cálculo do teor metoxilas	77
3.3	Possíveis subestruturas – presentes em ligninas – que contêm carbonilas	81
3.4	Reação de oximação da lignina	82
3.5	Gráfico da titulação condutivimétrica de hidroxilas fenólicas para LMM da Aroeira-Preta	84
3.6	Espectro diferencial obtido para cálculo do teor de hidroxilas fenólicas não-conjugadas	85
3.7	Duas subestruturas possíveis para as hidroxilas fenólicas conjugadas da Aroeira-Preta	86

---

3.8	Espectro de RMN $^1\text{H}$ para LMM acetilada	88
3.9	Hidrólise seletiva de ligações $\alpha$ -O-4 de em meio ácido e básico	89
3.10	Gráfico da titulação condutivimétrica de hidroxilas fenólicas, pós hidrólise ácida da LMM da <i>Astronium urundeuva</i>	90
3.11	Gráfico da titulação condutivimétrica de hidroxilas fenólicas, pós hidrólise alcalina severa da LMM da <i>Astronium urundeuva</i>	90
3.12	Exemplos de associação entre ligninas e hemiceluloses	92
3.13	GPC da LMM da <i>Astronium urundeuva</i>	93
3.14	Produtos da oxidação da lignina	95
3.15	Cromatograma dos produtos da oxidação da <i>Astronium urundeuva</i> com nitrobenzeno	96
3.16	Espectros de IVTF para LMM e extrato metanólico	100
3.17	Espectros de IVTF para o extrato aquoso	101
3.18	Espectro de RMN $^1\text{H}$ para LMM acetilada	104
3.19	Estruturas de $\beta$ -O-4 e pino e siringorresinólica	104
3.20	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ em dimetil sulfóxido para LMM não acetilada	106
3.21	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ para uma amostra de extrato metanólico	110
3.22	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ para uma amostra de extrato aquoso	110
3.23	Prováveis constituintes monoméricos das proantocianidinas presentes no extrato metanólico	111
3.24	RMN $^{13}\text{C}$ – sólido para Madeira de <i>Astronium urundeuva</i> bruta	113
3.25	RMN $^{13}\text{C}$ – sólido para LMM da <i>Astronium urundeuva</i>	114
3.26	RMN $^{13}\text{C}$ – sólido para lignina de Klason da madeira de <i>Astronium urundeuva</i> bruta	114
3.27	RMN $^{13}\text{C}$ – sólido para extrato metanólico da <i>Astronium urundeuva</i>	115
3.28	RMN $^{13}\text{C}$ – sólido para o extrato aquoso da <i>Astronium urundeuva</i>	116
3.29	Estruturas da profisetinidina e da prorrobinitinidina	116
3.30	RMN $^{13}\text{C}$ – sólido para holocelulose da madeira bruta	119

---

3.31	Cromatograma obtido por CLAE para fase aquosa da extração	120
3.32	Cromatograma obtido por CLAE para fase etérea obtida a partir do extrato aquoso	121
3.33	Gráfico comparativo do rendimento da extração de polifenóis em diferentes madeiras	122
3.34	Curva de calibração com ácido gálico	123
3.35	Curva de calibração para o ensaio de fenóis totais, em equivalentes de ácido gálico	124
3.36	Gráfico comparativo do teor de fenóis totais pelos métodos Folin-Ciocalteu e Azul da Prússia modificado	125
3.37	Curva de calibração com vanilina	126
3.38	Gráfico comparativo do teor de proantocianidinas em diversas espécies de madeira	127
3.39	Curva de calibração com delphinidina para cálculo do teor de proantocianidinas pelo método do butanol-ácido	127
3.40	Espectro de UV resultante da reação do extrato metanol-aquoso bruto e diluído com BuOH/HCl	128
3.41	Cromatograma da mistura resultante da reação do extrato aquoso com n-butanol/HCl	128
3.42	Espectros de UV obtidos na reação para verificação de 3-deoxi-proantocianidinas	129

## Índice de Tabelas

Tabela	Página
1.1 Composição química aproximada dos constituintes das madeiras	1
1.2 Teores relativos de hemicelulose em folhosas	5
1.3 Ligações encontradas nas estruturas de ligninas	10
1.4 Classificação dos terpenos	24
1.5 Flavonóides isolados de várias espécies de madeira	27
1.6 Caracteres anatômicos da Aroeira-Preta	43
1.7 Dados das propriedades físicas e mecânicas medidas para Aroeira-Preta	44
3.1 Extrativos da <i>Astronium urundeuva</i>	67
3.2 Resultados obtidos para holocelulose, PFH e PDH	68
3.3 Dados referentes a análise de madeiras de clima tropical	69
3.4 Valores encontrados para o teor de lignina de Klason na madeira de <i>Astronium urundeuva</i> e outras espécies vegetais	70
3.5 Resultados obtidos parra o cálculo do teor de lignina solúvel na madeira de <i>Astronium urundeuva</i>	71
3.6 Análise por somatória dos resultados obtidos a extração da madeira de <i>Astronium urundeuva</i> , holocelulose e polissacarídeos de fácil e difícil hidrólise	72
3.7 Análise elementar da LMM e do extrato aquoso da <i>Astronium urundeuva</i>	74
3.8 Porcentagens de grupos metoxílicos encontradas através do método Vieböck	75
3.9 Absorções de IV características da presença de grupos metoxílicos em ligninas	76
3.10 Dados do espectro de IV da LMM e valores calculados para a relação $\text{OCH}_3/\text{C}_9$	77
3.11 Teores de metoxilas para algumas espécies de madeira	78

---

3.12	Análise elementar para a LMM, descontando o teor de nitrogênio	79
3.13	Análise elementar para LMM oximada	82
3.14	Resultados obtidos na determinação de hidroxilas fenólicas não-conjugadas	86
3.15	Porcentagens de hidroxilas fenólicas encontradas após diferentes tipos de hidrólise, para <i>Astronium urundeuva</i>	91
3.16	Tempos de retenção para os padrões da oxidação da LMM	96
3.17	Compostos encontrados no cromatograma dos produtos da oxidação da LMM com nitrobenzeno	97
3.18	Atribuições para absorções de lignina no IV	99
3.19	Resumo das atribuições e porcentagens para os vários tipos de prótons da Aroeira-Preta acetilada	105
3.20	Atribuições dos sinais de RMN $^{13}\text{C}$ para LMM de madeiras duras	108
3.21	Deslocamentos químicos de RMN $^{13}\text{C}$ para hidroxilação do anel B	112
3.22	Deslocamentos e atribuições para RMN $^{13}\text{C}$ – sólido de ligninas	112
3.23	Deslocamentos de RMN $^{13}\text{C}$ de flavonóides	117
3.24	Atribuições dos principais sinais dos espectros de RMN $^{13}\text{C}$ – sólido dos extratos metanólico e aquoso da <i>A. urundeuva</i>	118
3.25	Rendimentos das extrações dos polifenóis	122
3.26	Absorvâncias relativas às amostras MA1 e MA2, no ensaio para determinação de 3-deoxi-proantocianidinas	130

---



## Lista de Abreviaturas e siglas

Símbolo	Significado
% C	Porcentagem de carbono
% C=O	Porcentagem de carbonilas
% G	Porcentagem de unidades Guaiacílicas
% H	Porcentagem de Hidrogênio
% N	Porcentagem de Nitrogênio
% O	Porcentagem de Oxigênio
% OCH <sub>3</sub>	Porcentagem de Grupos Metoxílicos
% OH	Porcentagem de hidroxilas
% S	Porcentagem de unidades Siringílicas
(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO	Acetona Deuterada
A	Absorvância
AA	Extrato acetona-aquoso
ABCP	Associação Brasileira de Celulose e Papel
BSTFA	Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
C <sub>9</sub>	Unidade fenilpropílica
CG/EM	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CPG	Cromatografia de Permeação em Gel
DMSO-d <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
<i>E.</i>	<i>Eucalyptus</i>
<i>f</i>	Fator de correção
g	Gramas
Hz	Hertz
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis
IV	Infravermelho

IVTF	Infravermelho com Transformada de Fourier
L	Litros
LK	Lignina de Klason
LMM	Lignina de Madeira Moída
m	Massa
MA	Extrato metanol-aquoso
mg	Miligramas
MHz	Mega Hertz
mL	Mililitros
N	Concentração Normal
nm	nanometros
PDH	Polissacarídeos de Difícil Hidrólise
PFH	Polissacarídeos de Fácil Hidrólise
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Segundos
THF	Tetra Hidrofurano
u.	Unidade de Massa Atômica
UV	Ultravioleta
V	Volume gasto na titulação de uma amostra
V <sub>b</sub>	Volume gasto na titulação de um branco

## Resumo

Esta dissertação apresenta o estudo químico da lignina de madeira moída (LMM) e dos polifenóis da madeira de Aroeira-Preta (*Astronium urundeuva*), cultivada no cerrado do Triângulo Mineiro.

Inicialmente a madeira moída passou por um processo de extração com os solventes benzeno, etanol/benzeno 2:1, água, NaOH 0,1 N, clorofórmio e acetona/água 9:1 para isolar a lignina. A LMM assim obtida foi submetida à análise dos grupos funcionais por via úmida (determinação de grupos metoxílicos, hidroxilas fenólicas e alifáticas, ligações  $\alpha$ -O-4 e  $\beta$ -O-4, carbonilas, oxidação com nitrobenzeno, fórmula mínima), por métodos espectroscópicos (como ultravioleta, infravermelho com transformada de Fourier e ressonâncias magnéticas protônica e de carbono 13) e cromatográficos (como cromatografia de permeação em gel e a cromatografia líquida de alta eficiência), possibilitando assim a quantificação e caracterização desses grupos.

Além disso, fez-se um estudo quantitativo dos teores de celulose, hemiceluloses e extrativos, complementando o estudo da madeira.

O estudo dos polifenóis foi feito com base em extratos acetona-aquoso e metanol-aquoso. Com estes, foram determinados os teores de fenóis totais e proantocianidinas.

O estudo acima permitiu concluir que a Aroeira-Preta é uma madeira com alto teor de extrativos, alto teor de hidroxilas fenólicas conjugadas e possivelmente sua LMM está condensada com os extrativos polifenólicos.

Apesar das dificuldades de análise do material vegetal proposto, o trabalho mostrou uma série de informações químicas que certamente contribuirão para um melhor aproveitamento dos recursos naturais brasileiros.

## Abstract

This work is based upon milled wood lignin (MWL) and phenolic compounds of the wood from Aroeira-Preta (*Astronium urundeuva*) harvested in the cerrado (savannah) in Triângulo Mineiro.

At first, the milled wood lignin was extracted with solvents (benzene, ethanol/benzene 2:1, sodium hydroxide 0,1 N, chloroform, and acetone/water 9:1) in order to isolate the lignin. The obtained MWL was analyzed by wet assays to find out the functional groups (as methoxylic group determination), phenolic and aliphatic hydroxyls,  $\alpha$ -O-4 and  $\beta$ -O-4 linkages, carbonyls, oxidation using nitrobenzene, minimum formula); by spectroscopic methods (as ultraviolet, Fourier Transformed Infrared and  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  Nuclear Magnetic Resonance) and chromatographic (as Gel Permeation Chromatography and High Performance Liquid Chromatography) that did the quantification and characterization of these groups possible.

Besides, a quantitative study upon celluloses, hemicelluloses and extractives were made, fulfilling the study of this wood.

The phenolic study was based on acetone/water and methanol/water extracts. The total phenols and proanthocyanidins levels were evaluated with these extracts.

This study concludes that this wood has a high extractive level, high conjugated phenolics hydroxyls level and possibly its MWL is condensed with polyphenolic extractives.

Although many problems have arisen in the study of the proposed vegetal material, this work has much chemical information that certainly will contribute for a better management of brazilian natural resources.

## 1 - Introdução

A madeira é um material de composição química bastante variável. Estas variações podem ser encontradas dentro de uma mesma espécie e, até mesmo, dentro de uma mesma árvore [1].

Todas as madeiras possuem três constituintes macromoleculares que formam sua parede celular: celulose, hemiceluloses e lignina [1, 2]. Além desses, encontram-se também (em menor proporção) os chamados “constituintes menores” ou “componentes secundários”, que possuem baixa massa molecular e incluem compostos inorgânicos e orgânicos de diversas funções químicas. Esses estão mais intimamente relacionados à espécie de madeira e dela depende o tipo e a quantidade [1, 2, 3].

A celulose é um componente mais ou menos uniforme para todas as madeiras, ao passo que a composição e as proporções de lignina e hemiceluloses das angiospermas (madeiras duras, porosas ou folhosas) são diferentes das gimnospermas (madeiras moles, resinosas ou coníferas) [1, 2].

A composição química aproximada das madeiras é mostrada na tabela 1.1 [3].

Tabela 1.1: Composição química  
aproximada dos constituintes das madeiras [3]

Componente	composição (%)
Celulose	50
Hemiceluloses	20
Lignina	15 a 35
Constituintes menores	Até 10

### 1.1 - Celulose

A celulose é o principal componente da parede celular. É um polissacarídeo linear formado por um único tipo de unidade de açúcar (monossacarídeo): a  $\beta$ -D-Glucose, cuja estrutura representativa é mostrada na

figura 1.1. Estas unidades se unem através de ligações glicosídicas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) para

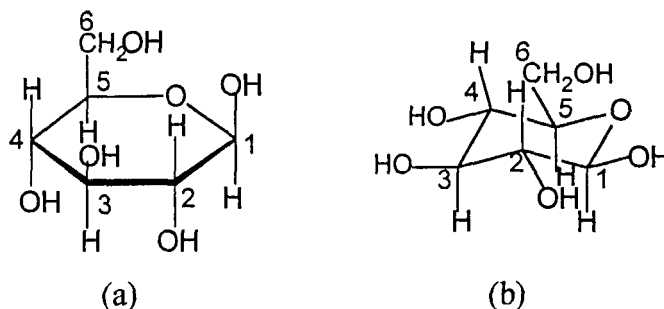


Figura 1.1: Estruturas representativas da  $\beta$ -D-Glucose:  
conformação de Haworth (a) e conformação de cadeira (b)

dar origem ao polímero celulose (figura 1.2). As moléculas de celulose são lineares e têm forte tendência de formar ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares. O primeiro tipo é responsável por certa rigidez das cadeias unitárias de celulose e o segundo tipo propicia a formação da fibra vegetal, mostrada no esquema da figura 1.3. Pode-se ver que as moléculas de celulose se unem para formar as microfibrilas, as microfibrilas se unem para formar as fibrilas, as quais unidas formam a fibra de celulose [3].

As microfibrilas possuem regiões cristalinas (altamente ordenadas) e regiões amorfas (pouco ordenadas). Na região cristalina, a fibra tem maior resistência à tração, ao alongamento e à solvatação. Na região amorfa, a fibra alcança sua maior flexibilidade [3].

A celulose se distingue analiticamente dos extrativos pela sua insolubilidade em água e solventes orgânicos, das hemiceluloses pela sua insolubilidade em soluções alcalinas aquosas e da lignina pela sua relativa resistência a agentes oxidantes e susceptibilidade à hidrólise por ácidos [1, 2].

Para que a celulose possa ser isolada das plantas ela deve ser separada dos extrativos, da lignina e dos outros compostos não celulósicos. Nos métodos comumente usados para o isolamento e determinação da celulose, os outros constituintes da madeira são removidos o mais completamente possível por técnicas de extração ou solubilização, deixando um resíduo que é constituído

praticamente por celulose pura. A etapa mais importante é a remoção da lignina, sendo, portanto, o isolamento da celulose um processo primariamente de deslignificação.

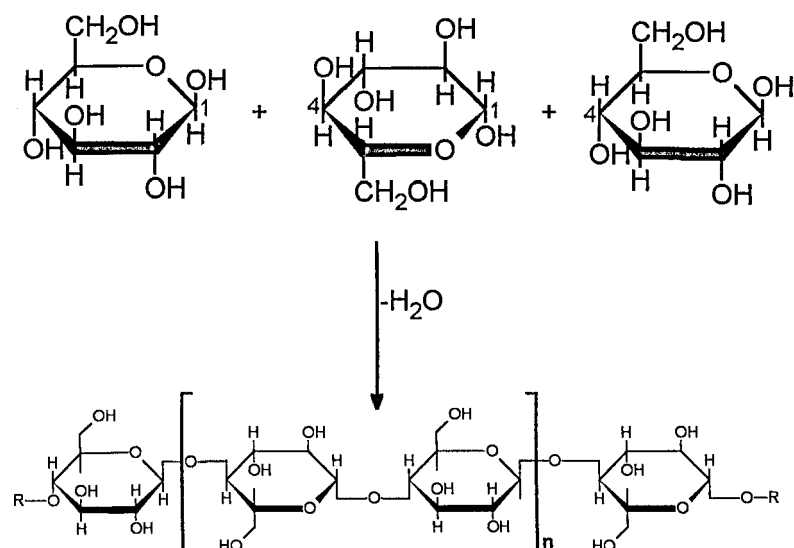


Figura 1.2: Formação de moléculas de celulose pela união de  $n$  unidades  $\beta$ -D-glucose [3].

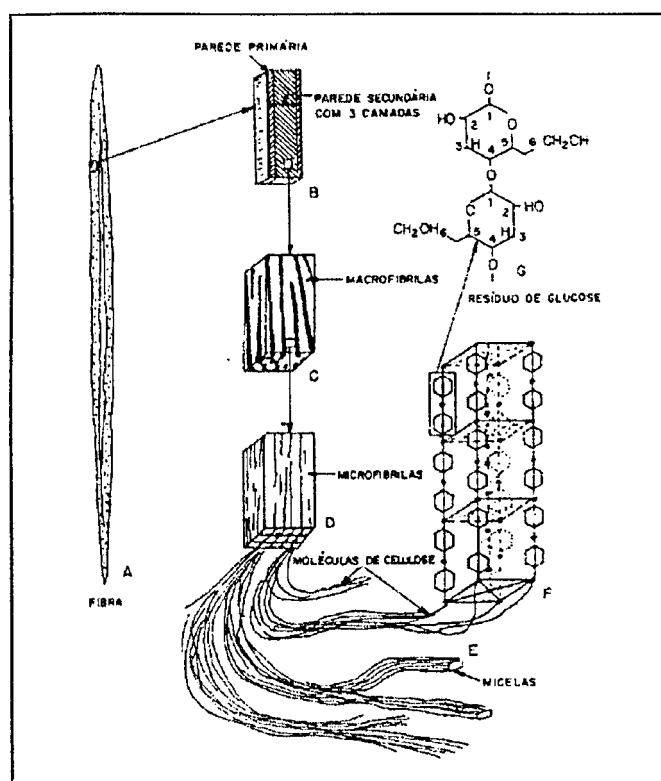


Figura 1.3: Esquema proposto para formação da fibra de celulose [3].

## 1.2 – Hemiceluloses (polioses)

São polissacarídeos heterogêneos formados de forma diferente da celulose. Apesar disso, as hemiceluloses possuem a mesma função estrutural na parede celular que a celulose. São relativamente fáceis de serem hidrolisadas por ácidos aos seus componentes monoméricos, a saber:  $\beta$ -D-xilopirranose,  $\beta$ -D-manopirranose,  $\beta$ -D-glicopirranose,  $\beta$ -D-arabinopirranose,  $\beta$ -D-galactopirranose, ácido  $\alpha$ -D-glucurônico, ácido  $\beta$ -D-galacturônico, e ácido  $\alpha$ -D-4-O-metilglucurônico, como mostrado na figura 1.4 [1].

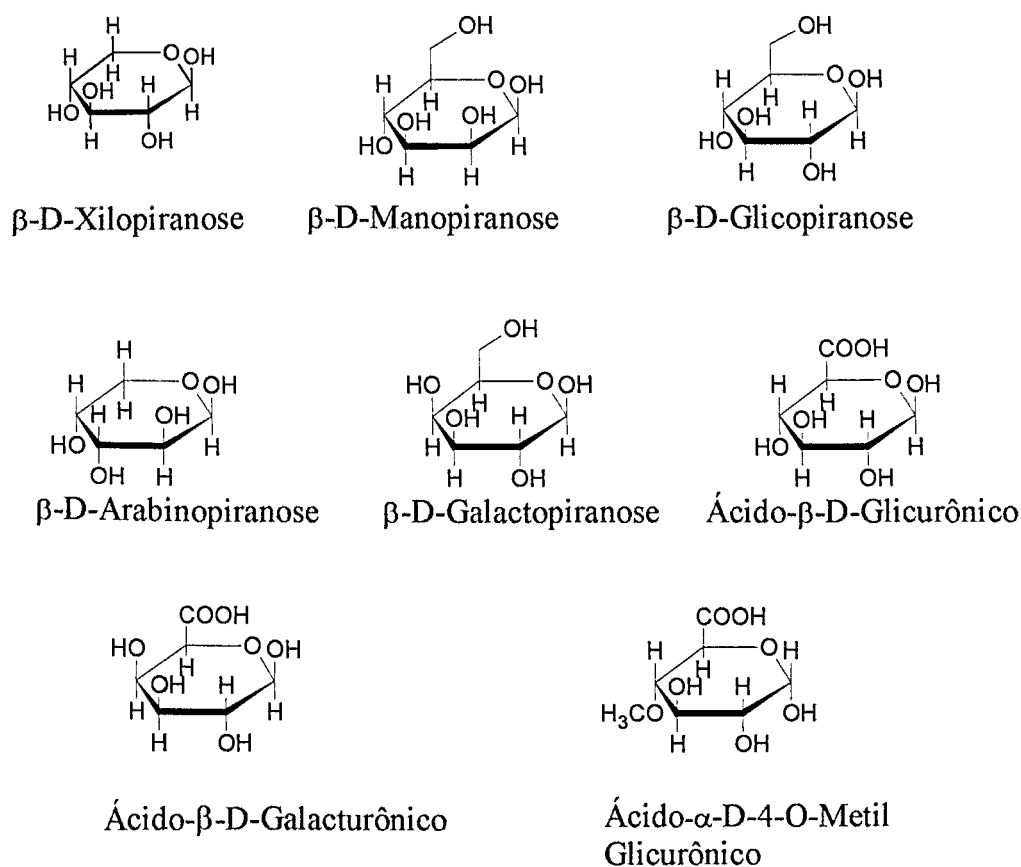


Figura 1.4: Açúcares que compõem as hemiceluloses.



Algumas das unidades de açúcar possuem apenas cinco átomos de carbono, sendo, portanto, denominadas pentoses; outras, porém, possuem seis átomos de carbono, sendo, então denominadas hexoses, gerando assim, pentosanas (polímeros formados pela condensação de pentoses) e hexosanas (polímeros formados pela condensação de hexoses) [1].

Um polissacarídeo que quando hidrolisado leva tanto a unidades de arabinose como de galactose, estando esta última em maior quantidade, é denominado arabinogalactana; outro que leva à arabinose, ao ácido glucurônico e principalmente à xilose é denominado arabinoglucuronoxilana e assim por diante [1].

As hemiceluloses são polímeros nos quais participam pelo menos dois tipos de unidades de açúcar [3]. Isoladas das madeiras, as hemiceluloses se apresentam como misturas complexas de polissacarídeos, sendo os mais importantes: glucuronoxilanas, arabinoglucuronoxilanas, glucomananas, arabinogalactanas e galactoglucomananas. Portanto, o termo hemiceluloses não designa um composto químico definido, mas sim uma classe de componentes polissacarídicos presentes em vegetais fibrosos, possuindo cada componente propriedades peculiares. Como no caso da celulose e da lignina, o teor e a proporção dos diferentes componentes encontrados nas hemiceluloses de madeira variam grandemente com a espécie e, provavelmente, também de árvore para árvore [3].

A tabela 1.2 apresenta a proporção aproximada das hemiceluloses em madeiras duras (folhosas).

Tabela 1.2: Teores relativos das hemiceluloses em folhosas [3].

Hemiceluloses	Ocorrência
4- <i>O</i> -metil-glucuronoxilana	20 - 35 %
Arabinoglucuronoxilana	Traços
Glucomanana	2 - 5 %
Galactoglucomanana	2 - 5 %
Arabinogalactana	1 - 2 %

As cadeias de hemiceluloses são bem menores do que as de celulose. As hemiceluloses possuem grupos laterais e são ramificadas em alguns casos.

As hemiceluloses são diferenciadas da celulose pela facilidade relativa à hidrólise por ácidos diluídos e pela solubilidade em soluções alcalinas aquosas. Entretanto, a interface entre celulose e hemiceluloses é difícil de ser determinada experimentalmente. Embora a maior porção das hemiceluloses seja prontamente hidrolisada e dissolvida por ácidos diluídos, a hidrólise completa só é possível com sérios ataques à celulose. A maior parte das hemiceluloses pode ser extraída por tratamento com soluções alcalinas aquosas (depois de removida a lignina), mas a celulose tende a reter fortemente as unidades de xilose e manose. O conteúdo desses açúcares pode ser reduzido em níveis muito baixos através de procedimentos exaustivos de extração, mas somente às custas da dissolução de uma porção da celulose [4].

Com relação aos extrativos, as hemiceluloses são diferenciadas pelo fato de serem insolúveis em solventes orgânicos neutros e, na sua grande maioria, insolúveis em água. Então, para se evitar possíveis contaminações durante o isolamento das hemiceluloses, utiliza-se a madeira previamente extraída com solventes orgânicos [4].

### 1.3 - Lignina

#### 1.3.1 - Aspectos Gerais

A palavra lignina vem do latim “*lignum*” e quer dizer madeira. Ela é uma substância amorfa, de natureza aromática e muito complexa, que constitui parte das paredes celulares e da lamela média de vegetais [4].

Atualmente, sabe-se que a lignina é o segundo material mais abundante no reino vegetal (vem depois da celulose), só não estando presente em vegetais primitivos como fungos, algas e líquens não lignificados. Basicamente, sua função é dar resistência mecânica (rigidez à parede celular) e proteção contra a ação de

microorganismos [1, 3, 5]. Atua como um agente permanente de ligação entre as células, gerando uma estrutura resistente ao impacto, compressão e dobra.

Por volta de 1838, Payen realizou experimentos tratando diferentes tipos de madeiras com ácido nítrico. Concluiu que todas tinham uma substância de composição semelhante à do amido. Este material foi denominado celulose. Contudo, foi observado que o conteúdo de carbono das madeiras era bem maior que o do amido; Payen denominou de “material incrustante” a substância responsável por esta diferença [1, 6]. Foi Schultz em 1857 quem deu o nome de lignina a esse material incrustante [4, 6].

Erdman, em 1866, chegou à conclusão de que os constituintes não celulósicos da madeira eram aromáticos, através da observação de que o catecol e o ácido protocatecóico são obtidos da fusão alcalina da madeira [4, 6].

Em 1874, Tiemann e Harrmann isolaram a coniferina do *cambium* de *Picea abies*, sugerindo que poderia estar vinculada à estrutura da lignina [4].

Em 1890, Benedikt e Bamberger determinaram a presença de grupos metoxila na madeira. Como não estavam presentes na celulose, eles inferiram que esses grupos poderiam estar associados à lignina, apesar da mesma ainda não ter sido isolada naquele tempo [4].

Atribui-se a Klason o primeiro método para isolar ligninas. Em 1907, ele obteve lignina removendo polissacarídeos por reação com ácido sulfúrico 70 % [5, 6]. O produto era lignina isolada, porém, de constituição química muito diferente da lignina “in natura” ou protolignina, devido às condições drásticas de reação.

Atualmente existem vários métodos de isolamento de ligninas, entre os quais pode-se citar: diretamente do vegetal, por reação química, por extração com solvente após moagem e pela ação de microorganismos [7]. A lignina chamada de Lignina de Madeira Moída (LMM) ou do inglês *Milled Wood Lignin* (MWL) [2] é a que mais se aproxima da protolignina (lignina genuinamente presente nos vegetais) e será esta a utilizada neste trabalho.

### 1.3.2 – Precursores da lignina

Em 1939, Freudenberg identificou a vanilina como produto de oxidação de madeiras moles com nitrobenzeno. Creighton e colaboradores, em 1944, identificaram, além da vanilina, o siringaldeído como produto de oxidação de madeiras duras. Da oxidação de gramíneas foi identificado um terceiro componente, o *p*-hidroxibenzaldeído, que pode estar também presente em madeiras moles e duras, porém em quantidades pequenas [6]. Dessa forma, a partir do estudo da oxidação com nitrobenzeno de madeiras duras, moles e gramíneas e as suas respectivas ligninas, estabeleceu-se que os álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico são os precursores nativos de ligninas (figura 1.5).

Klason propôs, baseado em muitos trabalhos, que a lignina era uma substância macromolecular a qual possuía como unidades básicas, dímeros do álcool coniferílico [8].

Em seus estudos, Freudenberg propôs que a lignina seria uma macromolécula vegetal constituída de unidades arilpropanóides, denominadas C<sub>9</sub>. A macromolécula de lignina tem estrutura tridimensional ramificada e suas unidades de repetição não são regulares ou ordenadas. Vem daí a dificuldade encontrada no estudo de ligninas. Além da irregularidade na repetição das unidades fenilpropanóides, a lignina pode sofrer modificações durante seu isolamento das paredes celulares [2, 5, 8]. Então, apesar do longo tempo em que vêm sendo estudadas, trazem muitas dúvidas que devem ser esclarecidas.

### 1.3.3 – Caracterização e estrutura de ligninas

É possível, através da quantificação dos aldeídos formados na reação de oxidação com nitrobenzeno, ter-se uma indicação da abundância relativa das unidades C<sub>9</sub> nas ligninas, a saber: *p*-hidroxifenilpropano, guaiacilpropano e siringilpropano [9, 10] (figura 1.6).

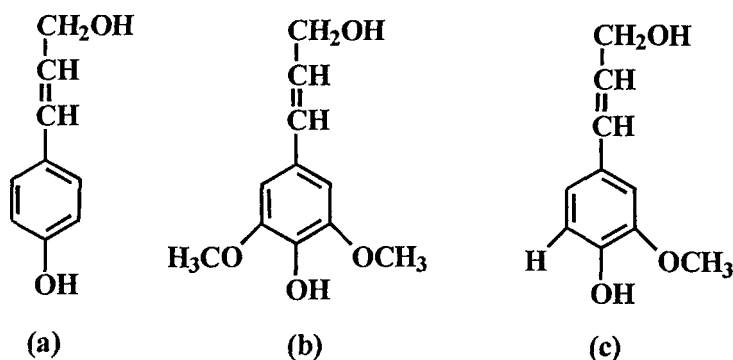


Figura 1.5: Álcoois precursores de ligninas: (a) álcool p-cumarílico, (b) álcool sinapílico, (c) álcool coniferílico.

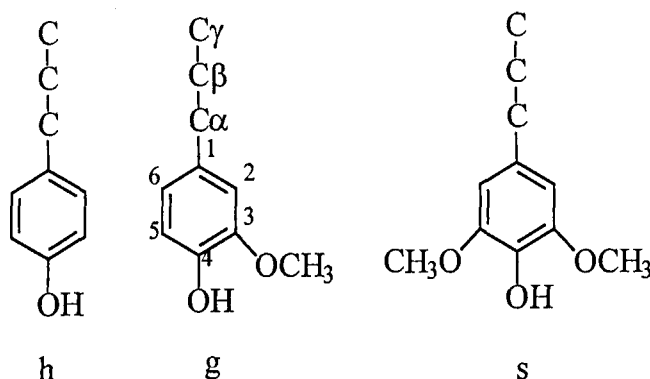


Figura 1.6: Unidades básicas de  $\text{C}_9$  em ligninas: (h) p-hidroxifenilpropano, (g) guaiacilpropano e (s)iringilpropano.

A análise dos produtos de reações de hidrólise, oxidação com nitrobenzeno e etanólise foram os principais responsáveis pela elucidação das substâncias arilpropanóides, que são as estruturas básicas de ligninas [5]. As principais estruturas encontradas em ligninas são mostradas na figura 1.7.

As madeiras duras ou angiospermas são geralmente formadas por unidades guaiacil- e iringilpropanóides, enquanto que madeiras moles ou gimnospermas são principalmente formadas por unidades guaiacilpropanóides.

Sabe-se ainda que a estrutura das ligninas pode ser diferente dependendo de sua localização no vegetal, contribuindo para isso fatores topoquímicos que influenciam na sua formação [2].

São vários os tipos de ligações químicas existentes nas ligninas. A tabela 1.3 mostra os tipos de ligações associadas aos respectivos esquemas de estrutura [9], apresentados na figura 1.7.

Tabela 1.3: Ligações encontradas nas estruturas de ligninas.

Tipo de ligação entre monômeros	Exemplo de estrutura (figura 1.7)
$\beta$ -O-4'	I
$\beta$ -O-4'	II
$\alpha$ -O-4'	III
$\beta$ -5'	IV
$\alpha, \beta, \gamma$ - C <sub>6</sub>	V
5-5'	VI
4-O-5'	VII
$\beta$ -1'	VIII
$\beta$ - $\beta$ '	IX
$\alpha$ - $\beta$	$\alpha$ -éster (X)
$\gamma$ - $\gamma$ '	$\gamma$ -éster (XI)

#### 1.3.4 - Mecanismo biossintético proposto para formação da macromolécula de lignina

Um novo desenvolvimento em química da lignina foi iniciado por Erdman que estudava a dimerização oxidativa de fenóis, especialmente do ponto de vista da biogênese de alguns produtos naturais [6]. Já era sabido de trabalhos anteriores que oxidantes como cloreto de ferro III poderiam remover um átomo de

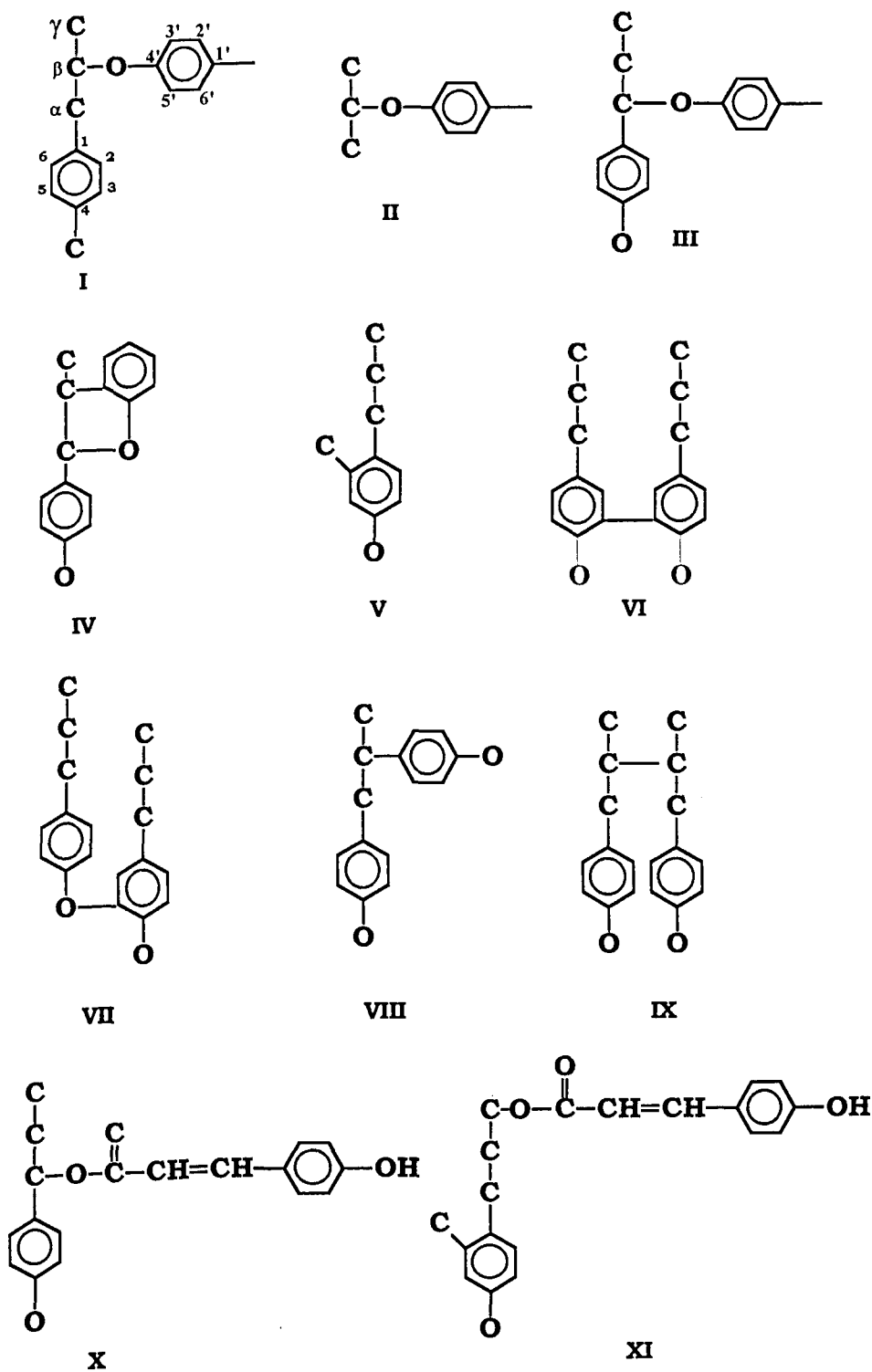


Figura 1.7: Algumas subestruturas presentes em ligninas.

hidrogênio de um fenol, produzindo então um radical livre que se estabiliza pelo acoplamento com outro radical dando um éter difenílico ou bifenílico. Erdman esperava que, tendo nas posições *orto* ou *para* uma cadeia lateral com uma dupla ligação conjugada com o anel, o fenol fosse capaz de se acoplar através do átomo de carbono  $\beta$ .

No final dos anos 30, a oxidação de álcoois coníferílicos na presença de cloreto de ferro III foi investigada por Freudenberg [6]. Foi obtido como resultado um produto amorfo cujo tratamento com álcali quente seguido por metilação e oxidação na presença de permanganato dava como produtos os ácido 3,4-dimetoxi-benzóico e 3,4-dimetoxi-1,5-benzodióico (figura 1.8). Os mesmos ácidos foram obtidos oxidando o desidrodiisoeugenol e a lignina. Isto sugeria a possibilidade de que lignina fosse formada pela desidrogenação do álcool coníferílico e compostos relacionados, de acordo com a hipótese de Erdman.

Em 1936, Freudenberg [6] já havia aquecido lignina de *Picea abies* com solução aquosa de hidróxido de potássio (70 %), promovendo clivagens hidrolíticas das ligações etéreas e em seqüência protegendo, através de reação de metilação, os grupos fenólicos liberados. A oxidação com permanganato do produto metilado, em pH entre 6 e 7, originou como produtos o ácido 3,4-dimetoxi-benzóico, em rendimento de 8 % com relação à lignina, e menores quantidades de ácido 3,4-dimetoxi-1,5-benzodióico e ácido 5,5'-difetil-3,4,4'-trimetoxi-1,1'-benzodióico (figura 1.8). A formação do ácido 3,4-dimetoxi-1,5-benzodióico dava grande suporte à possibilidade de ocorrência de estruturas condensadas  $\gamma$ -5' e  $\beta$ -5' na lignina. Comparativamente, o alto rendimento na formação do ácido 3,4-dimetoxi-benzóico indicava que ligações etéreas não cíclicas entre uma hidroxila presente na cadeia lateral e um grupo fenólico de unidades C<sub>9</sub> adjacentes eram também de grande ocorrência.

A desidrogenação do álcool coníferílico (figura 1.5) com ar na presença de enzima oxidase de origem fúngica, ou com peroxidase e peróxido de hidrogênio [6] dava um polímero que mostrava certas similaridades com a lignina de Björkman de *Picea abies*. Se a reação fosse interrompida antes que o polímero começasse a precipitar, uma mistura de produtos diméricos, triméricos e oligoméricos era obtida, sendo possível isolar cerca de 30 compostos e determinar



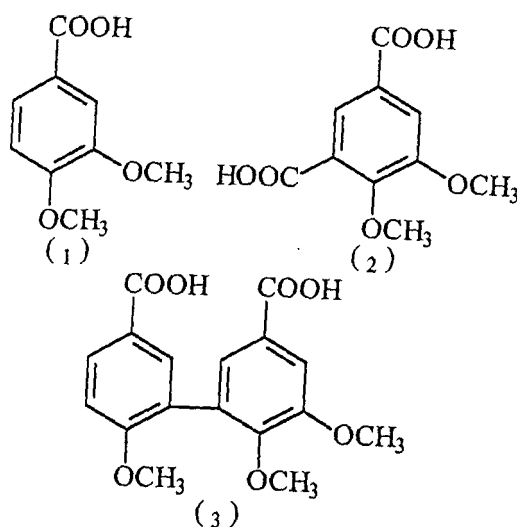


Figura 1.8: Estruturas do ácido 3,4-dimetoxi-benzóico (1), ácido 3,4-dimetóxi-1,5-benzodióico (2) e ácido 5,5'-difenil-3,4,4'-trimetoxi-1,1'-benzodióico (3)

suas estruturas. A figura 1.9 mostra os principais produtos que foram encontrados.

Como indicado pela figura 1.9, muitos dos dilignóis e oligolignóis, que poderiam ser isolados do sistema de desidrogenação, continham cadeias laterais insaturadas. Poderia-se portanto assumir que a formação da lignina envolvia posteriores desidrogenações desses dilignóis seguidas de acoplamentos dos radicais que se formavam, dando origem a ligações etéreas difenílicas ou alquil-arálicas. Se as ligninas fossem na verdade formadas de acordo com este princípio, seria de se esperar que ela contivesse um maior número de cadeias laterais insaturadas. Entretanto, a soma de unidades terminais do tipo álcool coniferílico e coniferaldeído na lignina de Björkman de *Picea abies* é limitada (figura 1.10).

O número limitado de grupos finais insaturados é de importância para o entendimento dos princípios que prevalecem na formação de ligninas por polimerização desidrogenativa do álcool coniferílico e dos álcoois cinâmicos mostrados na figura 1.5.

A desidrogenação enzimática é uma reação de transferência de um elétron resultando na formação de radicais fenóxi estabilizados por ressonância, como mostrado na figura 1.11. A estabilização final dos radicais ocorre pelo

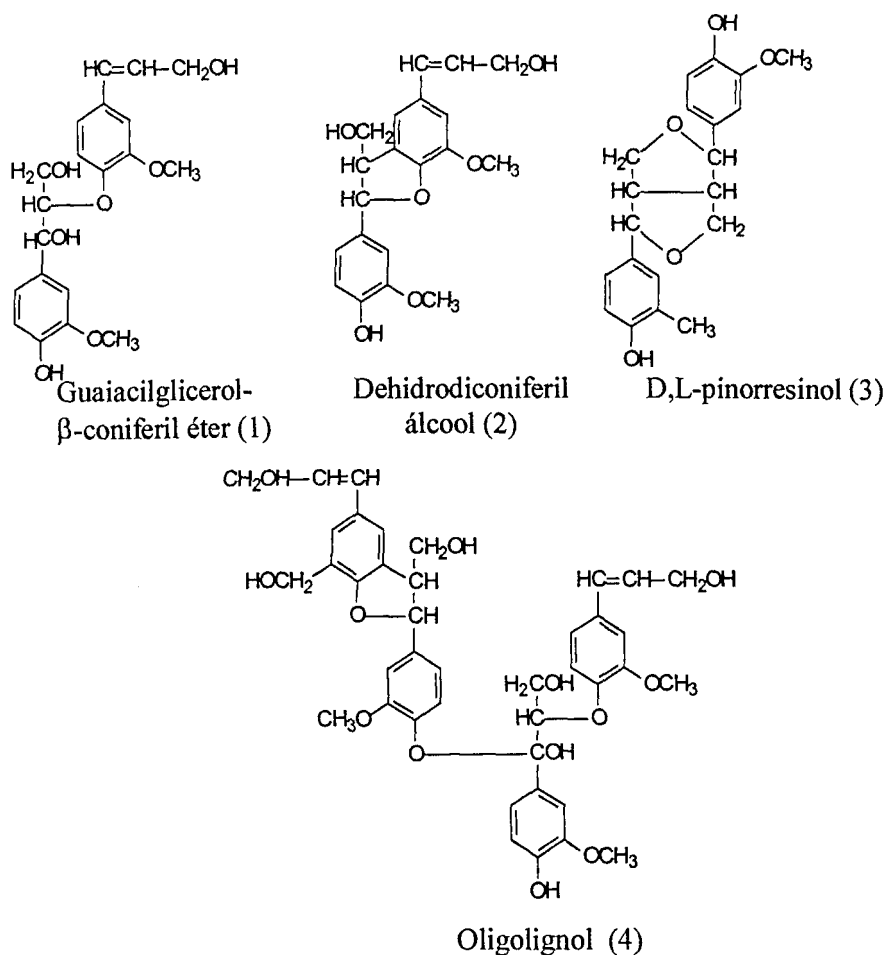


Figura 1.9: Produtos resultantes da reação parcial de desidrogenação do álcool coniferílico.

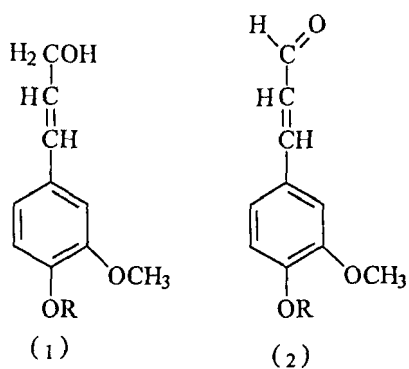


Figura 1.10: Grupos finais do tipo álcool coniferílico (1) e coniferaldeído (2). R = cadeia de lignina

acoplamento a um outro radical em qualquer uma das posições do elétron desemparelhado dado pelas estruturas de ressonância a, c, d e e. Produtos originários da estrutura de ressonância b não foram encontrados.

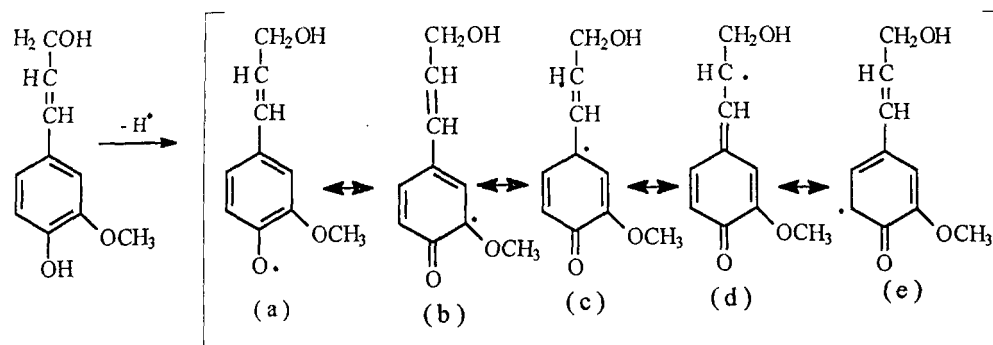


Figura 1.11: Desidrogenação do álcool coniferílico e estruturas de ressonância resultantes.

A formação da molécula de lignina começa com a dimerização dos radicais para dar um dos dilignóis mostrados na figura 1.9 (muitos outros dilignóis podem também ser formados). O contínuo crescimento da molécula ocorre predominantemente pelo acoplamento de radicais e polimerização. Na célula lignificante existe uma baixa concentração estacionária do monômero, álcool coniferílico. Portanto, uma dimerização dos radicais do monômero seria menos favorecida do que seus acoplamentos com radicais fenóxi formados pela desidrogenação de grupos finais fenólicos de dilignóis ou polímeros maiores, que são mais estáveis. O processo é ilustrado por dois exemplos nas figuras 1.12 e 1.13. Na figura 1.12, um radical de álcool coniferílico em sua forma de ressonância d é ligado por um acoplamento  $\beta$ -O-4 a um radical de grupo final a. O resultado deste acoplamento será um intermediário quinonametideo (1). Esses intermediários são muito reativos e reagem, por exemplo, pela adição de uma molécula de água para dar uma estrutura guaiacilglicerol- $\beta$ -aril éter (2).

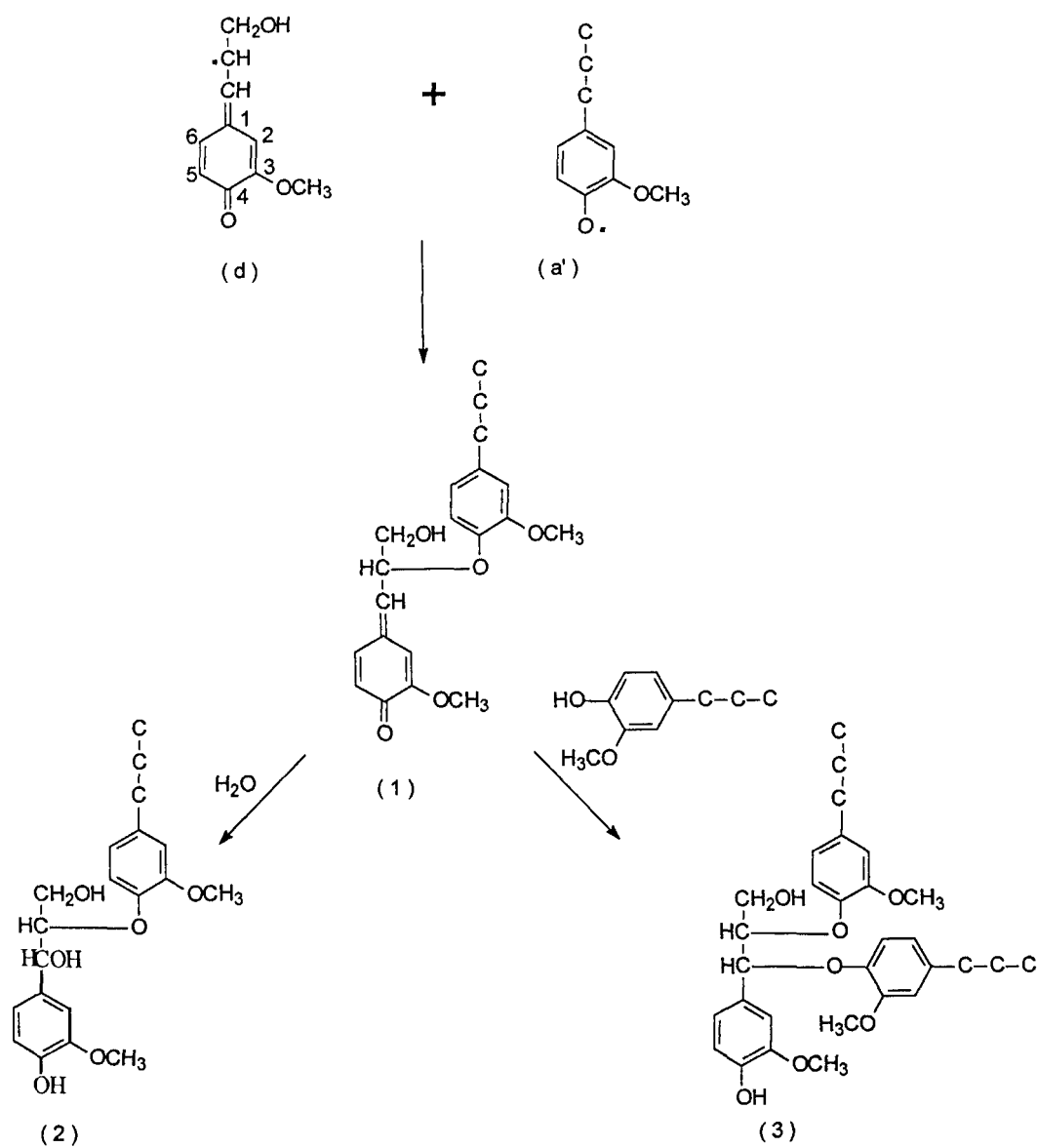


Figura 1.12: Polimerização para formação da macromolécula de lignina.

Essa sequência de reações é uma das mais freqüentes na síntese biológica de macromoléculas de lignina. O modo de acoplamento  $\beta$ -O-4 foi predito em um estágio primário por Erdman e Leopold [6].

Ao invés de água, um grupo hidroxil fenólico pode se adicionar à estrutura 1 (figura 1.12). Neste caso, uma estrutura guaiacilglicerol- $\alpha,\beta$ -diaril éter se formará. grupos benzil (ou  $\alpha$ -) benzil aril éter como indicado nesta estrutura foram achados por Freudenberg e Nimz [6] em oligolignóis, tal como o tetralignol (figura 1.9) formado pela desidrogenação do álcool coniferílico *in vitro*. Sua formação constitui um adicional, não desidrogenativo, modo de crescimento das moléculas de lignina.

No segundo exemplo ( figura 1.13 ), um grupo fenólico final do tipo guaiacilglicerol- $\beta$ -aril éter (1) é desidrogenado e ao radical que se forma (2), na sua estrutura de ressonância (3), é adicionado um radical proveniente do álcool coniferílico. O produto (4) de acoplamento  $\beta$ -5, na sua forma tautomérica (5), sofre um fechamento de anel intramolecular com a formação de um sistema fenilcumarânico (6).

Adições desidrogenativas contínuas dos radicais monoméricos aos grupos fenólicos finais, somente por acoplamento  $\beta$ -O-4 ou  $\beta$ -5 de acordo com as figuras 1.12 e 1.13, iriam resultar em seqüências de formatos lineares. Um tipo adicional de ligações monoméricas é o modo de acoplamento  $\beta$ -1. Além do mais, acoplamentos 5,5 dando estruturas difenílicas e acoplamentos 4-O-5 resultando em ligações etéreas diarílicas são importantes reações de crescimento, sendo a causa do aparecimento de ramificações na macromolécula.

Acoplamento difenil éter ou diaril éter são provavelmente preferenciais entre dois radicais de grupos terminais do que entre um radical de grupo terminal e radical monomérico. A possibilidade de qualquer um destes dois tipos de reações de acoplamento ocorrer, em relação à estrutura e potencial de oxidação dos reagentes envolvidos, foi estudada em modelos experimentais [6]. Ramificações no polímero são também ocasionadas por formações adicionais de estruturas benzil aril éter.

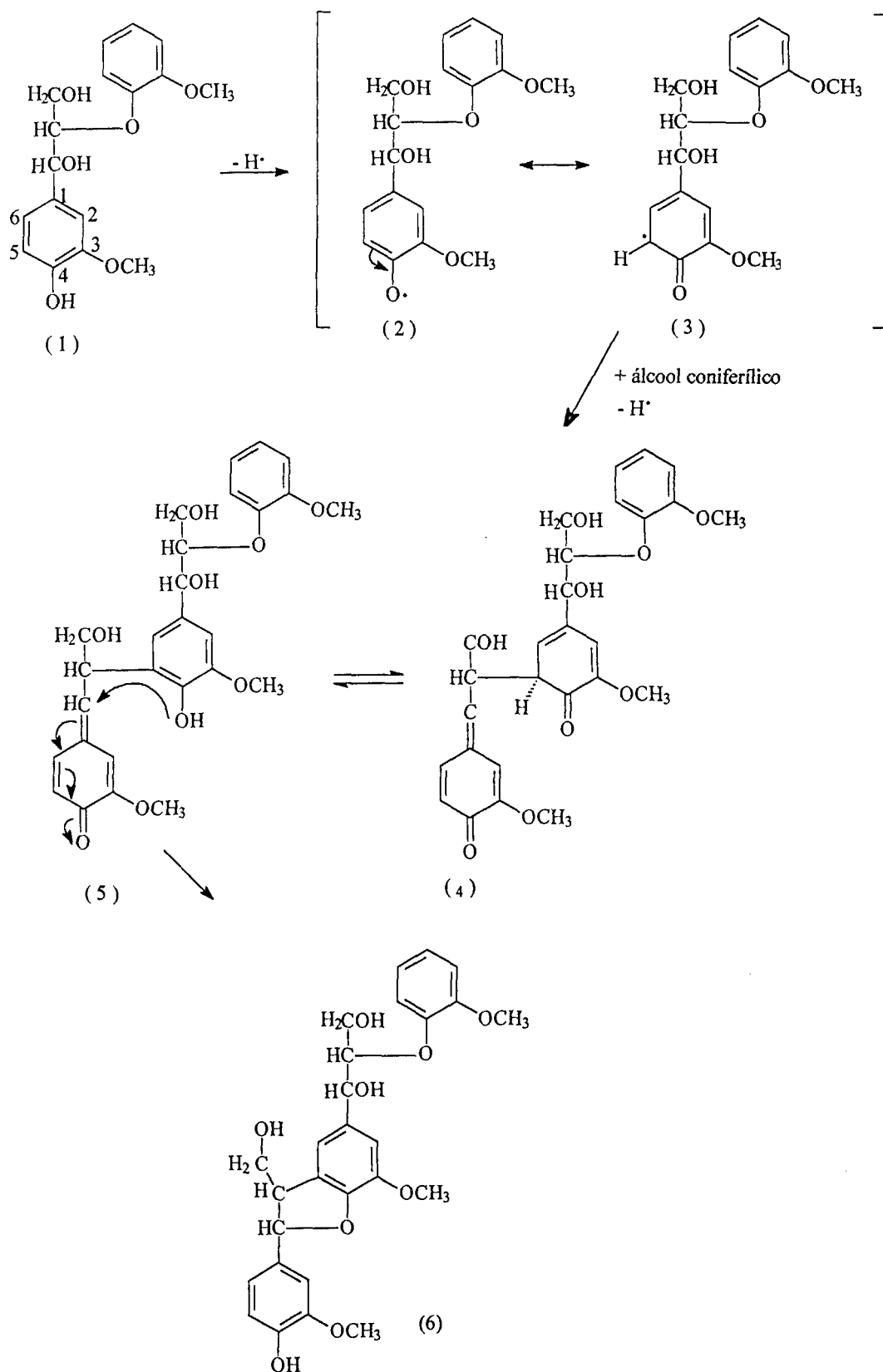


Figura 1.13: Polimerização para formação da lignina a partir de grupo final fenólico do tipo guaiacilglicerol- $\beta$ -aril éter.

### 1.3.5 - Lignina de madeira moída (LMM)

Diferentes métodos têm sido usados para isolar ligninas de madeiras. Apenas três deles, entretanto, demonstraram ser capazes de fornecer essencialmente uma lignina não muito modificada em sua estrutura química. O primeiro deles consiste na extração com solventes orgânicos e a lignina então obtida é denominada lignina de Brauns [11]. O segundo utiliza-se de uma moagem preliminar seguida por extração com solventes, sendo a lignina obtida denominada de lignina de madeira moída [11]. A porção de lignina solúvel poderia ser aumentada se a madeira finamente moída fosse tratada com enzimas hidrolíticas para remoção dos polissacarídeos. Isto consiste à base do terceiro método de isolamento e a lignina assim obtida é denominada lignina enzimática [12].

Espera-se que a moagem da madeira cause mudanças na lignina em extensões não muito bem conhecidas, como por exemplo, um ligeiro aumento no conteúdo de grupos carbonílicos [12]. O rendimento na obtenção da LMM representa cerca de 25% da lignina de Klason.

Foi sugerido que a lignina de madeira moída tem origem na lamela média ou ao menos que a lignina desta região morfológica é representativa nas amostras obtidas pelo método de isolamento. Muitas outras hipóteses e problemas relacionados à origem morfológica da LMM surgiram. Entretanto, a LMM parece ser representativa da lignina *in situ*, mesmo quando obtida sob baixos rendimentos [2, 5].

As figuras 1.14 e 1.15 apresentam estruturas propostas para representar fragmentos de ligninas de madeiras mole e dura, respectivamente. Tratam-se apenas de propostas para fragmentos onde aparecem as principais subestruturas da macromolécula, uma vez que as massas moleculares das ligninas são bastante elevadas, indicando que a molécula *in situ* apresenta uma quantidade maior de unidades C<sub>9</sub> do que a lignina isolada.

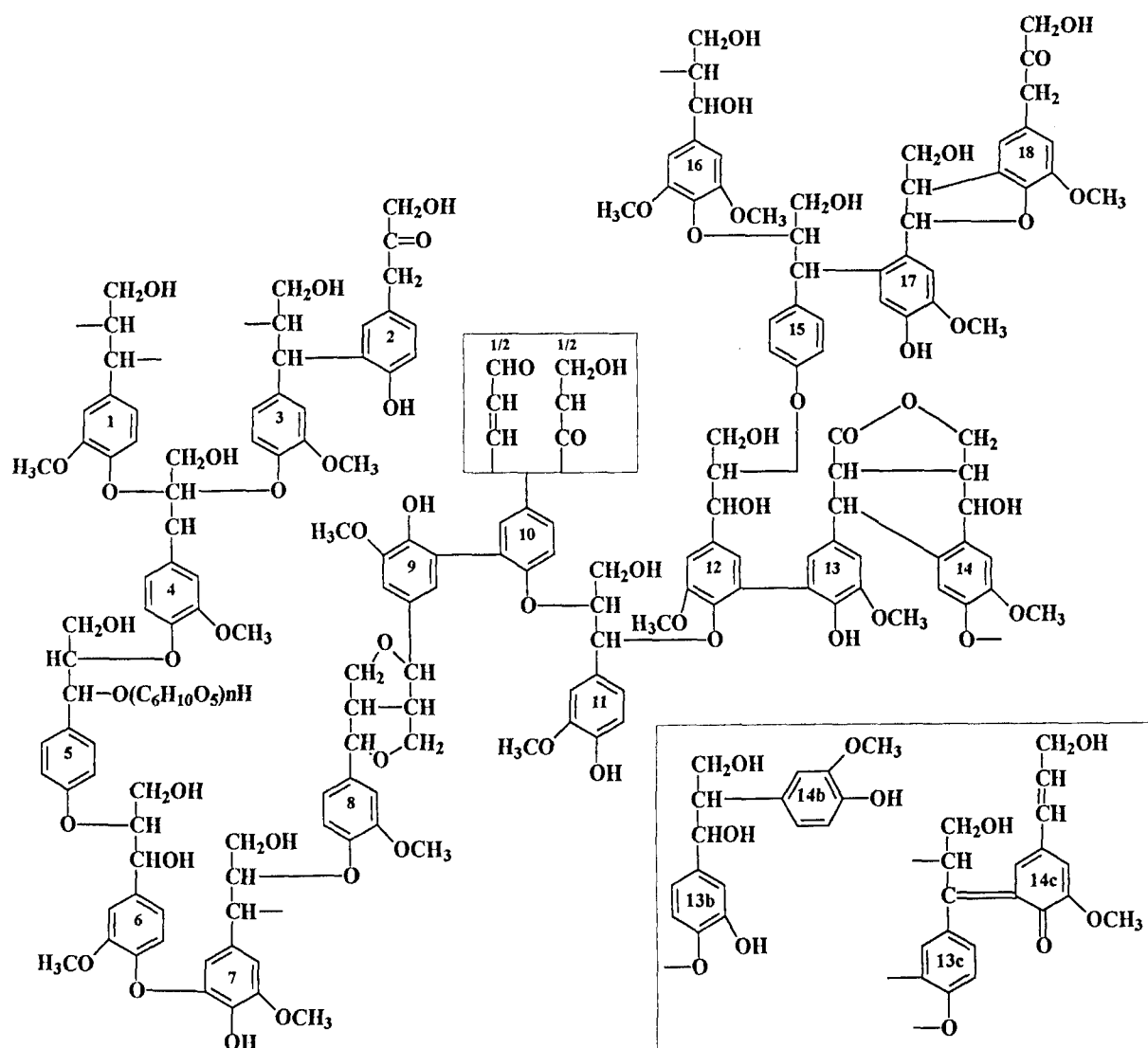


Figura 1.14: Esquema estrutural proposto para lignina de *Picea abies* (madeira mole) [6]



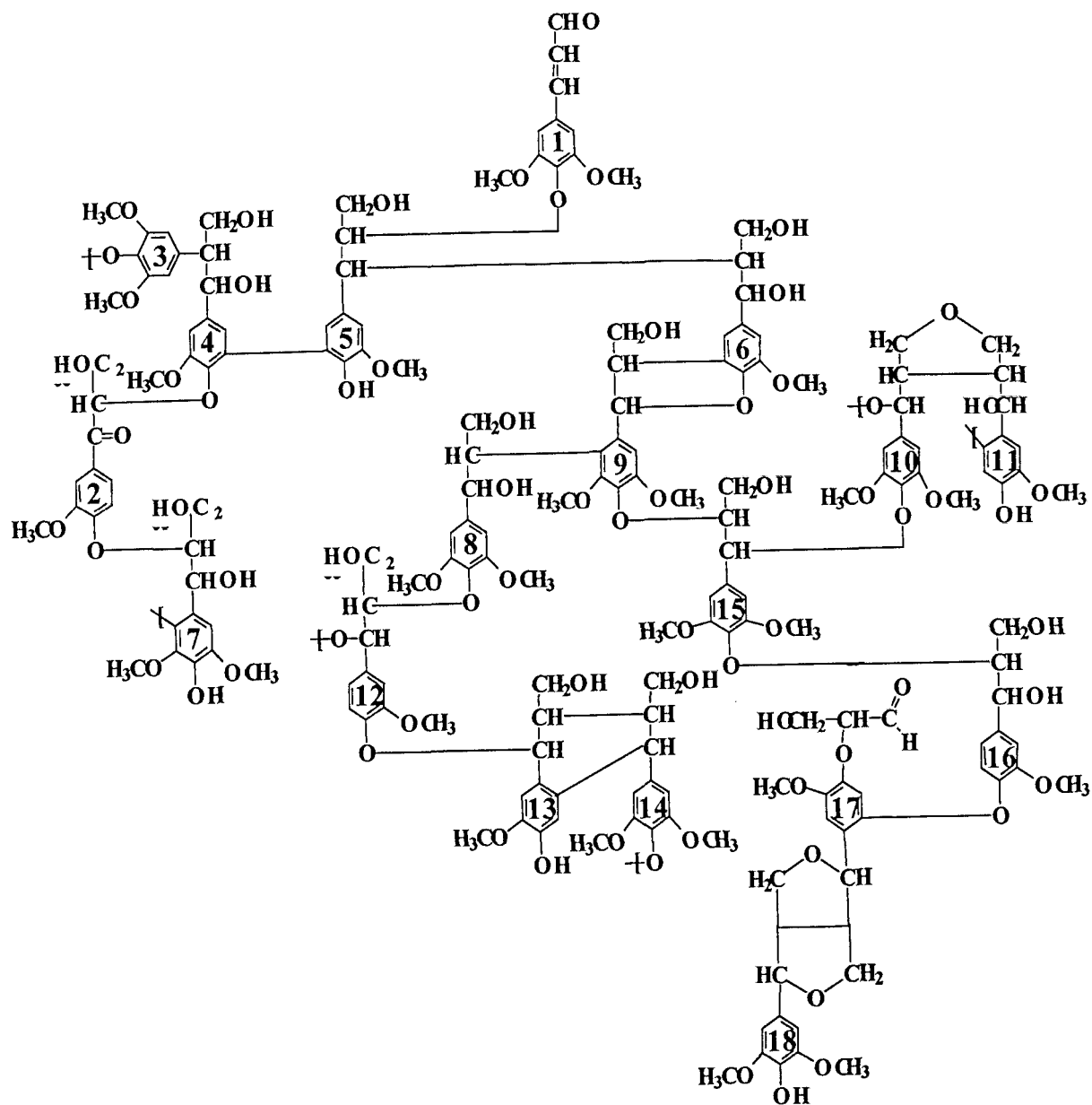


Figura 1.15: Esquema estrutural proposto para lignina de *Eucalyptus grandis* (madeira dura) [10]

#### 1.4 – Constituintes menores

Os constituintes menores podem ser considerados como constituintes não estruturais da madeira, quase exclusivamente compreendido por compostos extracelulares e de baixa massa molecular. Esses constituintes podem ser divididos em duas classes [3].

A primeira engloba materiais que podem ser chamados também de *extrativos*, por serem extraíveis (solúveis) em solventes orgânicos neutros, água ou volatilizados a vapor. Os extrativos compreendem um grande número de compostos, tanto lipofílicos quanto hidrofílicos [3].

A segunda classe engloba materiais que não são extraíveis com os agentes mencionados, como por exemplo compostos inorgânicos, substâncias pécnicas e proteínas [3].

Os constituintes menores são freqüentemente os responsáveis por determinadas características da planta como cor, cheiro, resistência natural ao apodrecimento, sabor e propriedades abrasivas. Sua composição e quantidade dependem de diversos fatores como espécie, idade da planta e região de ocorrência [1, 3].

##### 1.4.1 – Extrativos

Podem ser classificados em vários grupos de acordo com suas características estruturais, embora seja comum a ocorrência de sobreposição na classificação.

Uma das classes de extrativos é chamada resina. Este termo, entretanto, caracteriza mais a condição física do que designa compostos químicos. Chama-se resina uma série de compostos diferentes que inibem a cristalização. Podem ser componentes da resina: terpenos, lignanas, estilbenos, flavonóides e outros aromáticos [1, 2, 13].

Além desses, outros compostos que podem estar presentes nos extrativos são: gorduras, ceras, ácidos graxos, álcoois e hidrocarbonetos de alta massa molecular.

Assim, como já foi dito, o tipo de extrativo encontrado em madeiras depende da espécie e até mesmo das condições do exemplar estudado. Entretanto, é possível citar os tipos de extrativos mais comuns para angiospermas e gimnospermas, agrupando-os.

#### 1.4.1.1 – Resina

A resina é constituída por terpenos e por diversos tipos de compostos fenólicos.

a) Terpenos: Podem ser considerados como múltiplos da unidade de isopreno (2-metil-butadieno) e são um grupo de compostos largamente encontrado no reino vegetal (figura 1.16). A tabela 1.4 mostra o número de átomos de carbono relacionado ao número de unidades de isopreno e ao prefixo usado em sua nomenclatura.

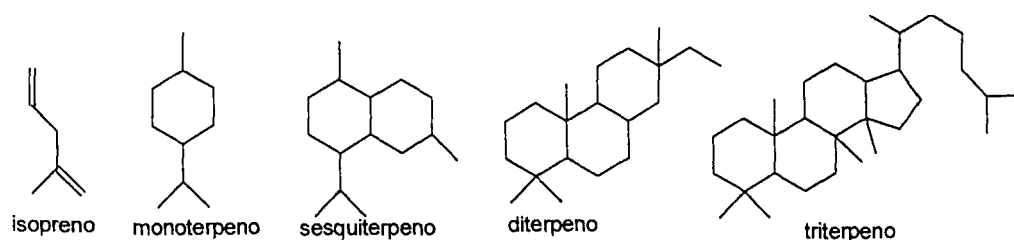


Figura 1.16: Estrutura básica de vários terpenos [2].

Para as angiospermas, é comum encontrar alguns monoterprenos e triterprenos. Grande parte dos triterprenos possuem uma estrutura esterano e por isso são chamados esteróides. Alguns exemplos são mostrados na figura 1.17, sendo que os diterprenos e sesquiterprenos são raros.

Muitas madeiras duras de clima tropical contêm glicosídeos de triterprenos e esteróides que produzem soluções espumosas em água e são chamados de saponinos. As agliconas dos saponinos são chamadas sapogeninos. Os sapogeninos triterpenóides são compostos pentacíclicos onde os esteróides sapogenínicos contêm um anel de 5 membros na maioria dos casos [2].

Tabela 1.4: Classificação dos terpenos

Prefixo	Hemi	Mono	Sesqui	Di	Sester	Tri	Tetra	Poli
Nº de átomos de carbono	5	10	15	20	25	30	40	>40
Número de unidades de isopreno (C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> )	1	2	3	4	5	6	8	>8

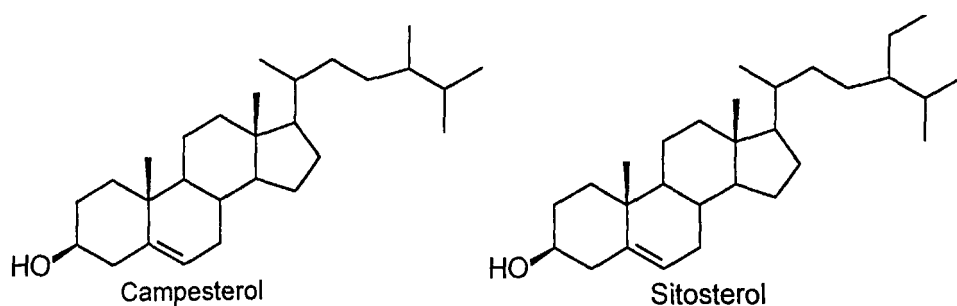


Figura 1.17 Exemplos de esteróides e triterpenóides na madeira.

*b) Compostos fenólicos:* Compreendem desde fenóis simples (figura 1.18) até sistemas de fenóis mais complexos, como por exemplo: lignanas (figura 1.19), estilbenos (figura 1.20), flavonóides (figura 1.21), quinonas (figura 1.22) e taninos (item 1.4.1.1.1).

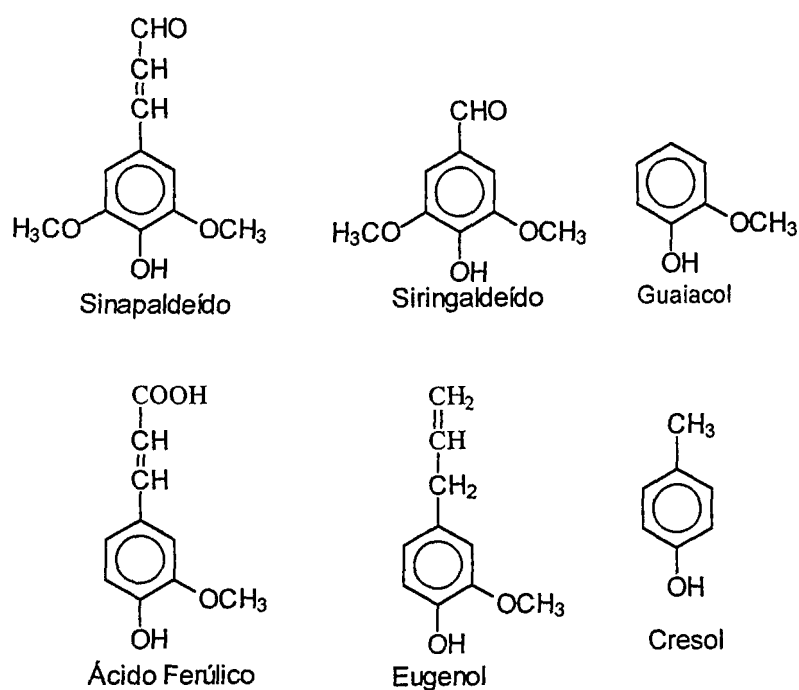


Figura 1.18: Exemplos de fenóis simples.

- Lignanas: São formadas pelo acoplamento oxidativo de 2 unidades fenilpropano ( $C_6C_3$ ). Exemplos são apresentados na figura 1.19.

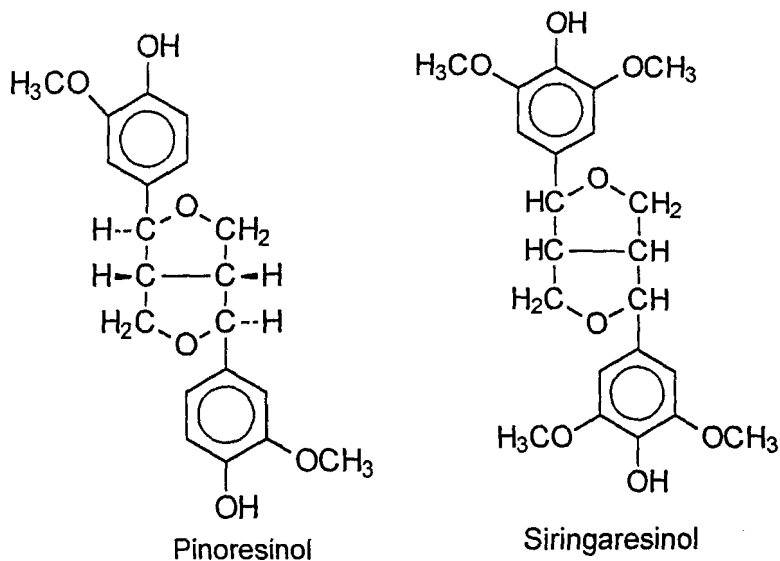


Figura 1.19: Exemplos de lignanas

- Estilbenos: São derivados do 1,2- difeniletileno, possuindo ligação dupla conjugada no sistema. Exemplo: pinosilvina (figura 1.20)

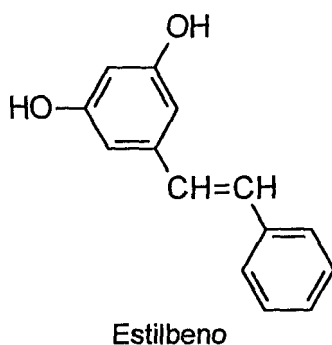


Figura 1.20: Exemplo de estilbeno: pinosilvina

- Flavonóides: Compostos típicos com esqueleto carbônico do tipo  $C_6C_3C_6$ . Os flavonóides podem ser derivados da flavona, que é interpretada com 2-fenil-benzopirona. Seus derivados que contêm anel pirano hidratado são chamados flavanas. Também são derivados da estrutura básica flavona as flavanonas e as isoflavanonas. Estruturas contendo um anel pirona aberto são chamadas chalconas e estes com anel furanona são chamados auronas

(tabela 1.5). Encontram-se em várias madeiras representantes da maioria desses derivados das flavonas. Alguns flavonóides são responsáveis pela determinação da cor da respectiva madeira, como por exemplo, fisetina, morina e santal. A maioria dos extrativos das madeiras ditas “coloridas” (como as vermelhas, azuis e amarelas) são flavonóides e compostos correlatos. Somente flavonóides do tipo flavan-3-ol e flavan-3,4-diol participam da formação de taninos condensados, os quais consistem de 3 a 8 unidades formadoras (flavonóides) [1, 2]. A catequina é um exemplo de flavonóide importante, por ser precursora de taninos condensados. Exemplos são mostrados pela figura 1.21

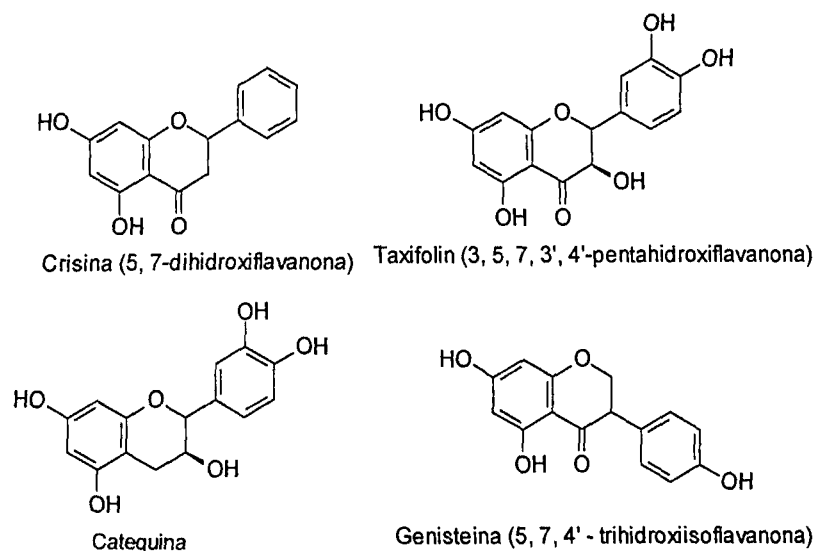


Figura 1.21 - Exemplos de flavonóides (extrativos fenólicos)

- Quinonas: Compostos aromáticos com duas carbonilas, usualmente uma oposta à outra no anel (figura 1.22).

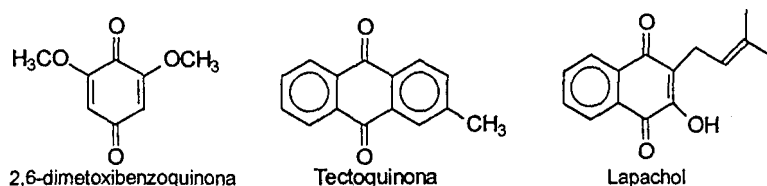
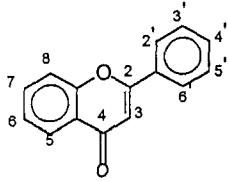
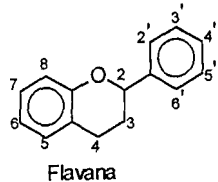
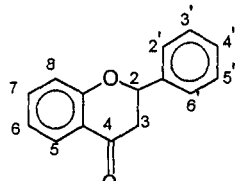
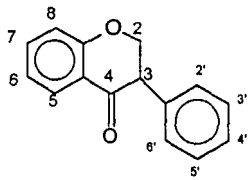
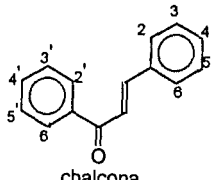
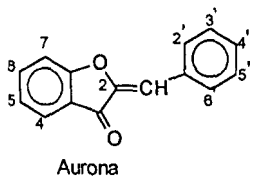


Figura 1.22: Exemplos de quinonas presentes nos extrativos.

Tabela 1.5: Flavonóides isolados de várias espécies de madeira [2].

Estrutura básica	Posição OH	Nome	Ocorrência
 Flavona	3,7,3',4' 3,5,7,4' 3,7,3',4',5' 3,5,7,3',4' 3,5,7,2',4'	Fisetina Kaempferol Robinetina Quercetina Morina	Acácia, Rhus, Schinopsis Afzelia Acácia, Robinia, Schinopsis Acácia, Aesculus, Quercus Chlorophora
 Flavana	3,7,3',4' 3,4,7,3',4' 3,5,7,3',4' 3,4,5,7,3',4'	Fisetinidol Molisacacidina Catequina Leucocianidina	Acácia Acácia, Gleditsia Acácia, Schinopsis Schinopsis
 Flavanona	7,3',4' 3,7,3',4'	Butina Fustina	Acácia Acácia, Schinopsis
 Isoflavanona	5,4',(7) 5,3',4',(7)	Prunetina Santal	Prunus, Pterocarpus Pterocarpus, Santalum
 chalcona	3,4,2',4' 3,4,2',3',4' alfa,3,4,2',4'	Buteína Okanina Pentahidroxi-chalcona	Acácia, Pseudosindora Cyclicodiscus Peltogyne, tetrachylobium
 Aurona	6,3',4' 6,3',4',(4) 2,6,3',4' 2,6,3',(4')	Sulferetina Rengasina Tetrahidroxi- benzilcumaranona Metoxi-trihidroxi- Benzilcumaranona	Pseudosindora Melanorroeia, Pseudosindora Schinopsis Schinopsis

#### 1.4.1.1.1 - Taninos

O termo “tanino” foi o nome dado à infusão de cascas de árvores como o carvalho e a castanheira, na qual as peles de animais eram tratadas para a obtenção de couros maleáveis e de grande durabilidade.

Os taninos foram inicialmente identificados pelo seu sabor adstringente e pela sua capacidade de precipitar proteínas solúveis. Eles são encontrados em muitas plantas usadas pelo homem na forma de ervas medicinais, na alimentação e na fabricação de bebidas. Nas plantas, os taninos podem ser encontrados em raízes, flores, frutos, folhas e na madeira. Eles contribuem para o sabor adstringente em comidas e bebidas, como aquele sentido ao se consumir o vinho tinto, chás e frutas verdes. Haslam [14] descreve os métodos de obtenção e caracterização de vários compostos fenólicos de plantas. Alguns investigadores provaram que os taninos servem para proteger as plantas contra os herbívoros e doenças patogênicas [15, 16, 17].

Uma definição usada nos dias de hoje foi dada por Haslam [14], segundo a qual o termo polifenóis designa os metabólitos secundários de natureza polifenólica extraídos de plantas, também chamados de taninos vegetais, e que foram classificados em dois grupos principais: as proantocianidinas e os poliésteres baseados no ácido gálico e no ácido hexaidróxidifênico e seus derivados. Mais recentemente, os grupos foram renomeados para taninos condensados e taninos hidrolisáveis, respectivamente, por suas características. Os taninos condensados possuem massa molecular aproximada de 20.000 u., enquanto os taninos hidrolisáveis possuem massa em torno de 3000 u..

Markham [18] comenta que muitos taninos são derivados de flavonóides e que os flavonóides constituem um dos maiores grupos de fenóis existentes na natureza.

Percebe-se por parte dos autores consultados, uma indefinição que mistura os conceitos de taninos com compostos fenólicos e polifenólicos, que são tratados em sua maioria como sinônimos.



- Taninos hidrolisáveis [19, 20]: São ésteres do ácido gálico e seus dímeros (ácido digálico ou hexaidroxidifênico e elágico) com monossacarídeos, principalmente a glucose. Normalmente, os taninos hidrolisáveis são divididos em galotaninos (produzem ácido gálico após hidrólise) e elagitaninos (produzem ácido elágico após hidrólise). Esse tipo de tanino não é muito comum em madeiras, se comparado aos taninos condensados. A figura 1.23 mostra os ácidos presentes nos taninos hidrolisáveis.

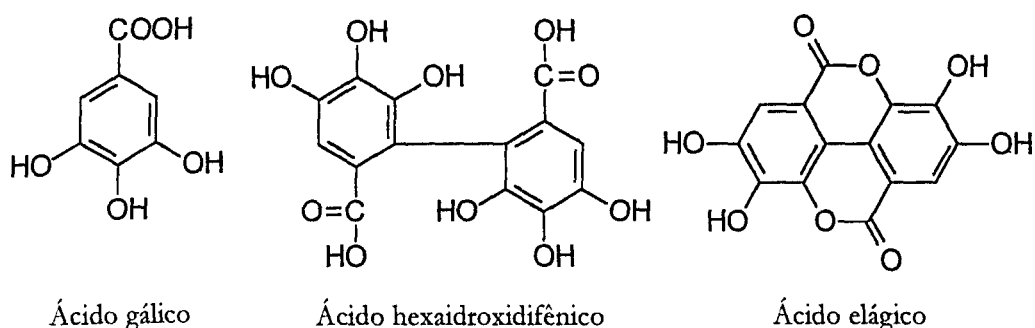


Figura 1.23: Ácidos presentes nos taninos hidrolisáveis

- Taninos condensados (ou proantocianidinas) [19, 20]: São polímeros dos flavonóides (figura 3.24) e são largamente difundidos no reino vegetal. A estrutura destes é formada pela ligação de uma série de monômeros baseados na unidade flavan-3-ol (figura 3.24) ou por um derivado desta. Esta ligação ocorre normalmente entre os carbono 4 de uma estrutura e 8 da outra (figura 3.25). Variações podem ocorrer através do diferente número de monômeros ligados, da posição de ocorrência das ligações, do padrão de oxigenação nos anéis A e B da unidade flavan-3-ol e da estereoquímica dos substituintes do anel C.

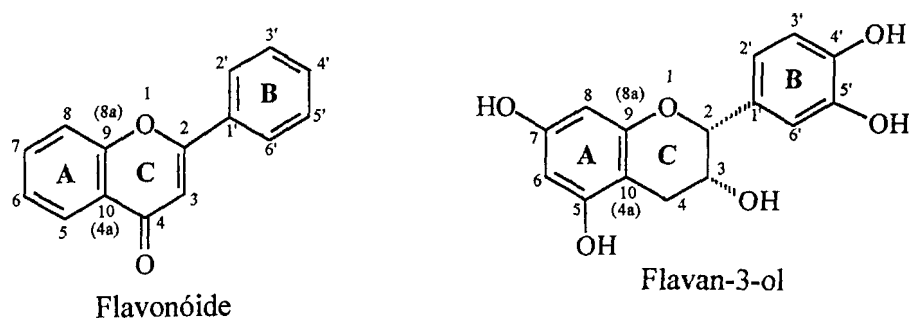


Figura 1.24: Estrutura e numeração convencional de uma unidade flavonóide e flavan-3-ol

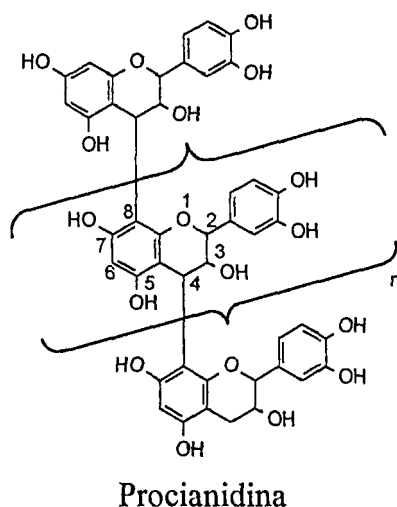


Figura 1.25: Exemplo de ligação C4-C8 na formação de proantocianidinas

#### 1.4.1.1.2 – Obtenção dos extrativos polifenólicos

A análise dos polifenóis de madeiras envolve a extração dos mesmos seguida de ensaios quali- e quantitativos para determinação de seus constituintes.

A extração é um processo que tem por objetivo retirar da madeira alguns de seus constituintes (chamados extratos ou extrativos). Essa extração se dá basicamente através da solubilização desses constituintes usando diferentes solventes [21, 22].

São poucos os estudos acerca dos melhores solventes para extrair os extrativos polifenólicos (taninos) de plantas. Ainda assim, os estudos existentes não são concordantes.

Em literatura [21, 22], descreve-se como os melhores solventes para extração de taninos as misturas: metanol-água, metanol-ácido e acetona-água. Apesar da descrição, essas recomendações não são baseadas em estudos estimativos da eficácia da extração. Estes estudos também não trazem recomendações acerca da influência da temperatura e da exposição à luz. Quanto ao tempo de extração, também não há consenso, visto que as extrações podem durar desde alguns minutos até vários dias. Para o primeiro caso espera-se que haja uma menor modificação estrutural (degradação química), enquanto que, para o segundo, deve haver um incremento no rendimento da extração.

Porém, sua utilização ainda é questionável para a extração de taninos hidrolizáveis [23, 24] e taninos condensados, cujo rendimento é considerado baixo para algumas espécies de plantas [25-27].

Para alguns autores, o metanol é utilizado de maneira satisfatória para a obtenção de polifenóis monoméricos e poliméricos da madeira de *Eucalyptus* e outras espécies arbóreas [28, 29].

Por outro lado, a mistura acetona-água tem sido utilizada com mais frequência para obtenção tanto de taninos condensados quanto hidrolizáveis da madeira [30]. No entanto, essa mistura não apresenta bons rendimentos de extração para todas as plantas e a estabilidade dos taninos condensados nessa mistura é questionável [21].

A água, quando misturada a solventes orgânicos aumenta o rendimento de extração dos polifenóis ao mesmo tempo que facilita sua degradação depois da extração [24, 31]. Devido a estas dificuldades e a falta de estudos sistemáticos, o teor de água na mistura acetona-água tem sido praticamente arbitrária.

Trabalhos mais recentes [21, 22] têm concluído que a acetona aquosa é superior ao metanol aquoso para extrair taninos condensados e fenóis totais, embora a estabilidade dos taninos condensados seja menor na acetona aquosa e seja também afetada pela temperatura e pelo tempo de exposição à luz.

## 1.4.1.1.3 – Análise dos fenóis totais

## a – Método Folin-Ciocalteu [32]

O método utilizado para esta determinação está baseado nos estudos de Singleton e Rossi [33]. Eles estudaram as características dos reagentes de Folin-Denis e Folin-Ciocalteu, modificando este último para que se tornasse mais sensível e seletivo frente aos fenóis.

O reagente de Folin-Ciocalteu é uma solução amarela constituída de uma mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfowolfrânico.

A reação que ocorre é uma oxido-redução. Os fenóis são oxidados e os ácidos são reduzidos, dando lugar a formação de um complexo de cor azul e de natureza ainda não esclarecida. Sabe-se que a reação é uma redução parcial do estado de valência +6 a +5, tanto para o Molibdênio quanto para o Wolfrânio. A redução ao mais baixo estado de valência destruiria o complexo formado.

Na reação usa-se excesso do reagente Folin-Ciocalteu. Essa necessidade ocorre porque em meio alcalino tanto o reagente quanto o complexo formado são instáveis. O pH alcalino é requerido porque nessas condições os fenóis são oxidados rapidamente.

## b – Método Azul da Prússia Modificado [34]

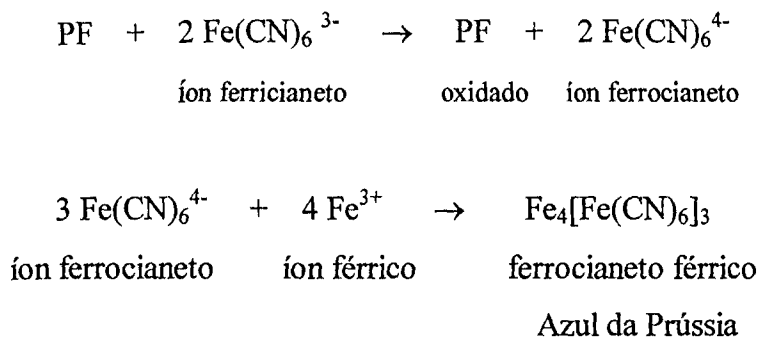
O método para determinação de fenóis totais conhecido como “Azul da Prússia” foi proposto por Price e Butler [35]. Segundo seus estudos, a mistura entre as soluções de ferricianeto de potássio  $\{K_3Fe(CN)_6\}$  e de cloreto férrico  $\{FeCl_3\}$  em HCl 0,1 N possibilita a determinação do teor de fenóis totais em plantas. Neste método, a cor obtida na solução seria proporcional à quantidade de polifenóis presentes.

Em 1980, o método sofreu a modificação proposta por Budini et al [36]. Até então, o método era usado por ser fácil, rápido e econômico, embora apresentasse duas desvantagens: a formação de um precipitado após curto tempo de incubação e o aumento da densidade de cor com o tempo.

Em 1992, Graham [37] desenvolveu um reagente estabilizante para a reação. Este estabilizante eliminou as desvantagens do método. Foram utilizados dois reagentes combinados para impedir tanto o aumento na densidade de cor quanto a formação de precipitados. Para o primeiro caso, utilizou-se o ácido fosfórico, que é um quelante estável para o ferro. Para o segundo, utilizou a goma arábica, um hidrocolóide de proteção.

Os polifenóis (PF) reagem com os íons ferricianeto  $\{\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}\}$  e são oxidados, enquanto que os íons ferricianeto são reduzidos aos íons ferrocianeto  $\{\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}\}$ . Os íons ferrocianeto reagem então com os íons férrico  $\{\text{Fe}^{3+}\}$  para formar o complexo ferrocianeto férrico  $\{\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3\}$ , o qual é conhecido como Azul da Prússia (AP).

A reação redox usa excesso de íons férrico e pode ser resumida a seguir [38, 39]:



A oxidação dos PF envolve reações químicas complexas [40-43] onde o cloreto férrico age como um oxidante que transfere um elétron. A remoção de um átomo de hidrogênio do grupo hidroxila fenólico deve ser o primeiro passo da reação. Isso resulta na formação do radical fenoxil mesomérico  $\{\text{ArO}^\bullet\}$  o qual deve dimerizar ou reagir com outros radicais para formar, em ordem decrescente de importância, novas ligações C-C, C-O e O-O. A formação de radicais intermediários resulta em uma mistura contendo vários tetrahidroxibifenis e quinonas, como o esboçado abaixo para o catecol (figura 1.26) [40, 42]:

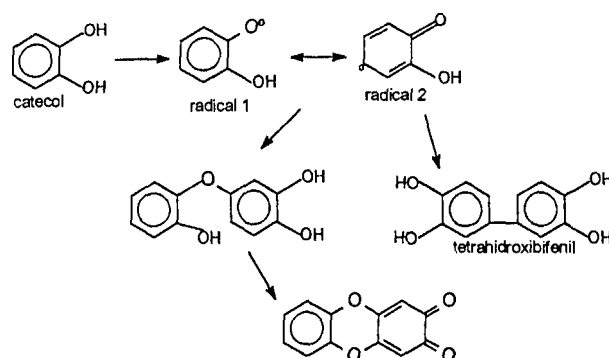


Figura 1.26: Esboço para a reação de oxidação que ocorre no ensaio do Azul da Prússia [34].

#### 1.4.1.1.4 – Determinação de Proantocianidinas

##### a – Pelo Método da Vanilina

O método de quantificação de taninos através da reação com a vanilina foi originalmente descrito em 1971 por Burns [44]. Esse método já foi largamente utilizado e sua principal vantagem é a especificidade para uma estreita faixa de flavonóides e dihidrochalconas que possuam ligação simples na posição 2,3 e grupos hidroxila livres orientados na posição *meta* no anel B. Outros métodos para determinação de proantocianidinas detectam qualquer fenol, como por exemplo, o Azul da Prússia, o Folin-Denis e o Folin-Ciocalteu.

A reação com a vanilina envolve um aldeído aromático (vanilina) com um anel de flavonóides *meta*-substituído, dando como produto um aduto vermelho. Nessa reação, esquematizada na figura 1.27, a condensação não supõe a ruptura do polímero.

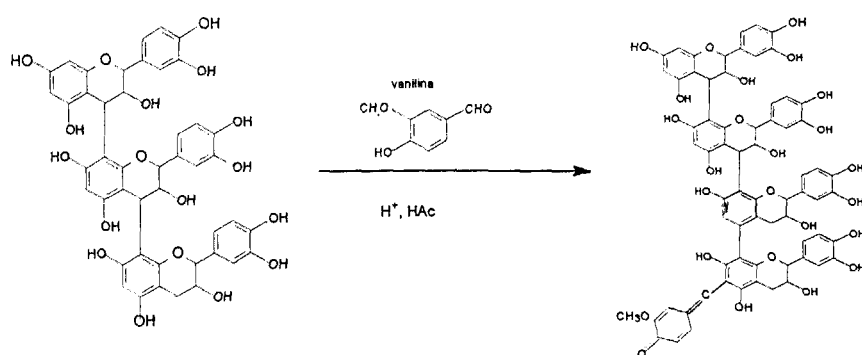


Figura 1.27: Reação de condensação com a vanilina.

O meio da reação é diverso segundo os métodos distintos que se acham descritos. O preferido tem sido H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 70 % ao invés da mistura metanol-ácido clorídrico e metanol-ácido acético. No caso do metanol-ácido clorídrico, sabe-se que ele resulta em rendimentos inferiores ao obtido com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e ainda a curva obtida nesse meio é linear, o que não foi observado com metanol-ácido clorídrico [44].

#### b – Método butanol-ácido

A técnica em que se baseia este experimento é a investigação da composição de polímeros de proantocianidinas através do estudo dos produtos da sua degradação oxidativa.

A degradação oxidativa das proantocianidinas, que as transforma em antocianidinas, tem sido feita por aquecimento do polímero em *n*-butanol/ácido clorídrico (95:5 v/v). Este método foi descrito originalmente por Swain e Hillis [45] e a reação é esquematizada na figura 1.28 [46].

O procedimento proposto por Swain e Hillis [45] tem alguns inconvenientes. Pesquisadores [46] têm relatado a dificuldade em reproduzir os rendimentos em antocianidinas e também a dificuldade para relacionar o rendimento em antocianidinas com a concentração inicial de proantocianidinas. Assim, algumas modificações têm sido sugeridas, sendo que a mais aceita é a proposta por Porter *et al.* [46]. Tendo realizado um estudo sobre o mecanismo da reação, estes autores conservaram o meio da reação proposto inicialmente, mas

introduziram ligeiras modificações que têm permitido aumentar tanto a reprodutibilidade quando o rendimento da reação.

A hidrólise de proantocianidinas em antocianidinas é produzida por auto-oxidação seguida da ruptura das ligações interflavânicas, catalisada por ácido. O rendimento de antocianidinas é muito afetado pela presença de traços de íons de metais de transição e também depende da concentração de água na mistura de reação. É conveniente, então, adicionar sais de ferro no meio reacional.

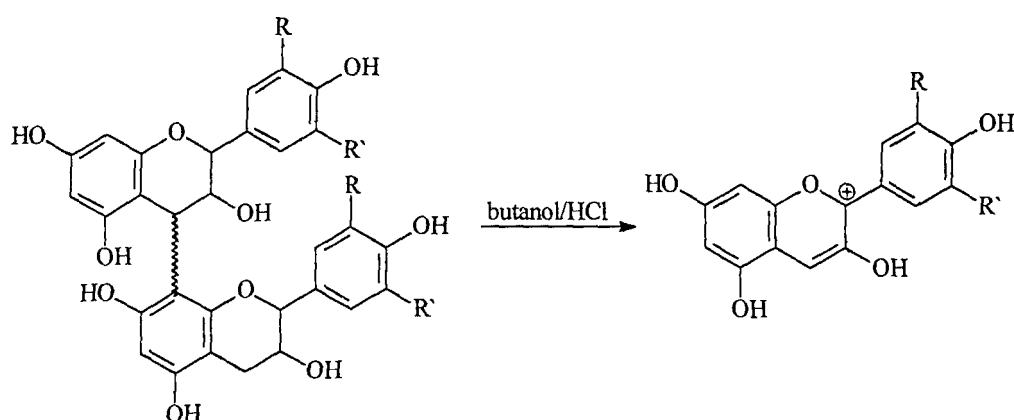


Figura 1.28: Reação de hidrólise das proantocianidinas.

#### 1.4.1.1.5 – Determinação de 3-deoxi-proantocianidinas [47]

As 3-deoxi-proantocianidinas são polímeros compreendidos por monômeros 3-deoxi-flavans (figura 1.29). As 3-deoxi-proantocianidinas se convertem em 3-deoxi-antocianidinas (apigenidina,  $\lambda_{\max}$  485 nm e luteolinidina,  $\lambda_{\max}$  495 nm) (figura 1.30) através de quebra oxidativa. As 3-deoxi-antocianidinas são liberadas por tratamento brando em álcool acidificado e são destruídas com aquecimento.



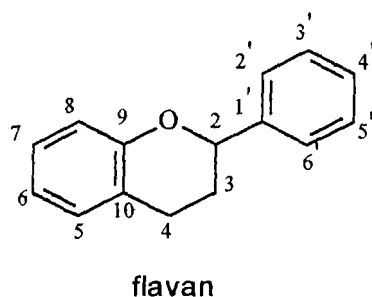


Figura 1.29: Estrutura geral de 3-deoxi-flavans [48]

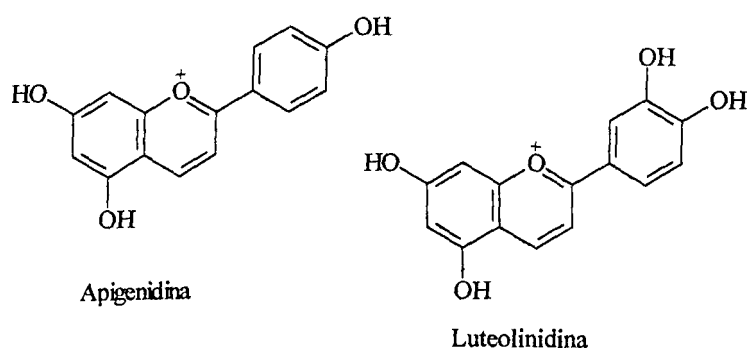


Figura 1.30: Estrutura da apigenidina e da luteolinidina [49]

#### 1.4.1.2 - Triglicerídeos, ceras e seus componentes

Triglicerídeos são definidos como ésteres de ácidos carboxílicos (ácidos graxos) com glicerol, enquanto que ceras são ésteres de ácidos graxos com álcoois de alta massa molecular. Triglicerídeos (gorduras ou óleos) e ceras são extraíveis da madeira com solventes orgânicos (éter de petróleo, acetona, éter dietílico, etc.) [3].

Nos extrativos de folhosas pode-se ainda encontrar aminoácidos, açúcares solúveis e alcalóides.

#### 1.4.2 - Não –extrativos

São compostos inorgânicos e pectinas.

1.5 - A Aroeira-Preta (*Astronium urundeuva*). Classificação botânica, descrição morfológica, usos e características gerais da espécie estudada.

O termo Aroeira tem sido usado, historicamente, para designar plantas classificadas em três gêneros da família *Anacardiaceae*: *lithea*, *schinus* e *astronium*, de lenho muito duro, com algumas aplicações medicinais e conhecidas pelas reações alérgicas que provocam [50].

O gênero *Astronium* se subdivide em cerca de dez espécies distribuídas desde o México até a Argentina, sendo muito importante no Brasil [51].

A Aroeira-Preta é também conhecida popularmente como Aroeira, Aroeira-do-Sertão, Aroeira-da-Serra, Aroeira-do-Campo, Aroeira-Legítima, Urundeuva, Urindeuva ou Arindeuva no Brasil; Urundel e Urundey na Argentina, Urundey-mi, Urundey-pitá ou Urundey-Ybá no Paraguai e Cuchi na Bolívia, além de Pau-Zebra, Chibatan, Gibatão, Ubatan e Ubatão [50-53].

O nome Aroeira é citado por Moraes e Freitas [52] como sendo uma “corrutela” de araras e da terminação eira, significando “árvore da arara”, por ser essa a planta onde a ave preferencialmente pousa e vive. Já o nome Urundeuva, que tem origem na língua guarani, significa “incorrutível na água”.

Sua designação botânica é *Astronium urundeuva* (Fr. All.) Engl. e possui ainda os sinônimos *Astronium juglandifolium* griseb. e *Myracrodruon urundeuva* (Fr. All.) [50, 53]. A figura 1.31 mostra duas folhagens de Aroeira-Preta [53, 54].

É encontrada no México central, Colômbia, Venezuela, Trinidad, Guiana Inglesa, Equador, Bolívia, Argentina, Paraguai e em quase todos os estados brasileiros, mas, principalmente, no oeste dos estados da Bahia, Minas Gerais e São Paulo, sul dos Estados do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás, além de Paraná, Santa Catarina, Espírito Santo e Rio de Janeiro [53, 55, 56].

Está presente em formações secas e abertas e também em formações muito úmidas e fechadas, como a caatinga, o cerrado e florestas pluviais com até 2000 mm anuais de chuva [51].

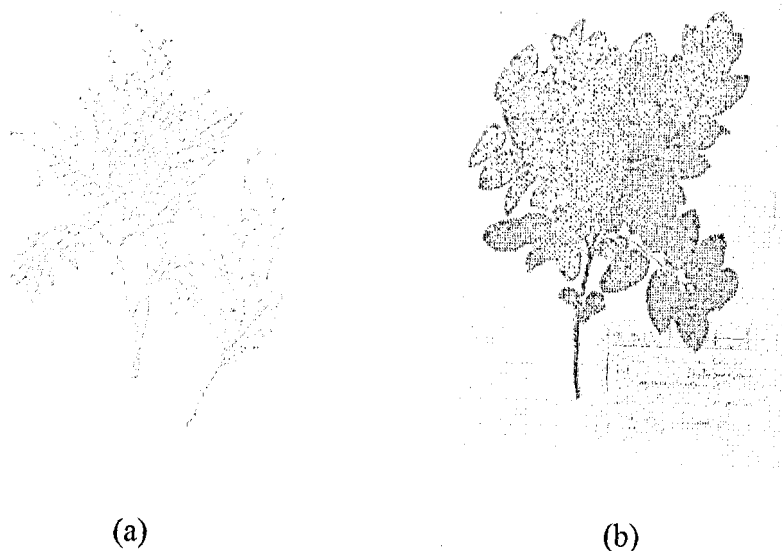


Figura 1.31: (a) *Astronium urundeuva*, segundo Pio Corrêa [54]; (b) Folhagem de Aroeira-Preta procedente do município de Guapó, GO, [55].

Não é muito exigente ao meio, desde que os solos sejam de origem calcárea. Nos domínios dos afloramentos calcáreos podem ser encontrados maciços de Aroeira-Preta [57].

Seu porte varia de acordo com a região em que se encontra. É uma árvore pequena (5 m x 15 cm) no cerrado e caatinga e grande (30 m x 100 cm) na floresta pluvial, com fuste reto e ramos pendentes [50, 57].

Sua casca é castanho-escura, subdividida em placas escamiformes nos troncos mais idosos; nas árvores mais jovens a casca é íntegra, cinzenta e coberta de lenticelas grosseiras (figura 1.32) [51].

As folhas da Aroeira-Preta possuem de 7-15 folíolos oblongos ou ovados, largos, com ápice arredondado ou curtamente acuminado, a base orbicular e um pouco oblíqua, subcoriáceas, com nervação delicada, ciliados, em ambas as faces mais ou menos providos de pelos, levemente serrado-crenados [57].



Figura 1.32: Tronco de *Astronium urundeuva* em Paraopeba (MG) [51].

A inflorescência é muito congesta nas pontas dos ramos desfolhados, racemosa, com cerca de 10-15 cm e pouco pilosa; as flores formam pequenos fascículos inseridos ao longo dos eixos dos racemos.

As flores são pequenas, vermelhas, hermafroditas masculinas, com pelos brancacentos, dispostos em grandes panículas terminais. Fruto globoso, pequenino, 3-4 mm de diâmetro, tipo drupa globoso-oval.

Possui sépalas crescentes, com diâmetro de 2 a 2,5 cm, cálice duas ou mais vezes maior que ele, glabro, as vezes apresentando vestígios dos cílios nas pétalas [51, 57].

A madeira de Aroeira-Preta (cerne) é de cor bege-rosada ou pardo-avermelhada-clara quando fresca. Caso contrário, sua cor varia de pardo-avermelhada até muito escura, podendo apresentar manchas alongadas e escuras. Sua superfície é lisa, compacta e brilhante e seu sabor adstringente [51].

Possui alburno de cor amarelo-rosado ou pardo-amarelado, o qual é facilmente atacado pelos insetos (figura 1.33) [58].

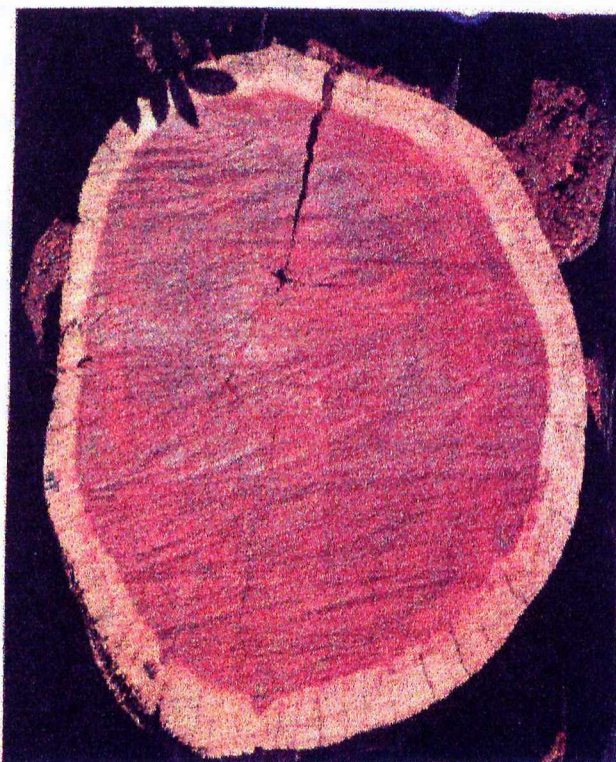


Figura 1.33: Corte em tronco de Aroeira-Preta, mostrando casca, alburno e cerne [58].

Tida como madeira de lei, muito pesada, dura, elástica, imune a cupins, recebe excelente polimento. Quando seca, é difícil de ser trabalhada [51, 53, 55].

Estudos realizados pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), demonstraram que a Aroeira-Preta é “melhor que o concreto” no que diz respeito a resistência: enquanto  $1\text{cm}^2$  de concreto suporta uma carga de 250 Kgf, a Aroeira-Preta agüenta 696 Kgf. Isso quer dizer que um pedaço de Aroeira-Preta do tamanho de uma caixa de fósforos suporta 6 toneladas de carga sem se deformar [58].

Não há ensaios científicos acerca da sua durabilidade, característica tida como mais importante que a resistência e a dureza. Entretanto, mesmo em contato

com solo e umidade, diz-se popularmente que a aroeira “dura a vida toda e mais cem anos”, o que pode ser visto em velhas casas com esteios de Aroeira-Preta – perfeitos – com mais de 200 anos [58].

A característica de durabilidade é encontrada em apenas 1 a 5% das madeiras e apenas cerca de 1% são muito duráveis. De acordo com testes realizados pelo IPT ela foi classificada como durável, ou seja, foi inclusa no fechadíssimo grupo das madeiras chamadas imputrescíveis [58].

Em testes comparativos de durabilidade, um rolete de Aroeira-Preta não teve perda de massa após oito meses em caixa previamente contaminada com fungos, ao passo que um rolete de *pinus*, no mesmo tempo vira pó em 60% de sua consistência [58]. Seus caracteres anatômicos estão sumariamente descritos na tabela 1.6 [56], enquanto que a figura 1.34 mostra os seus cortes transversal e tangencial.

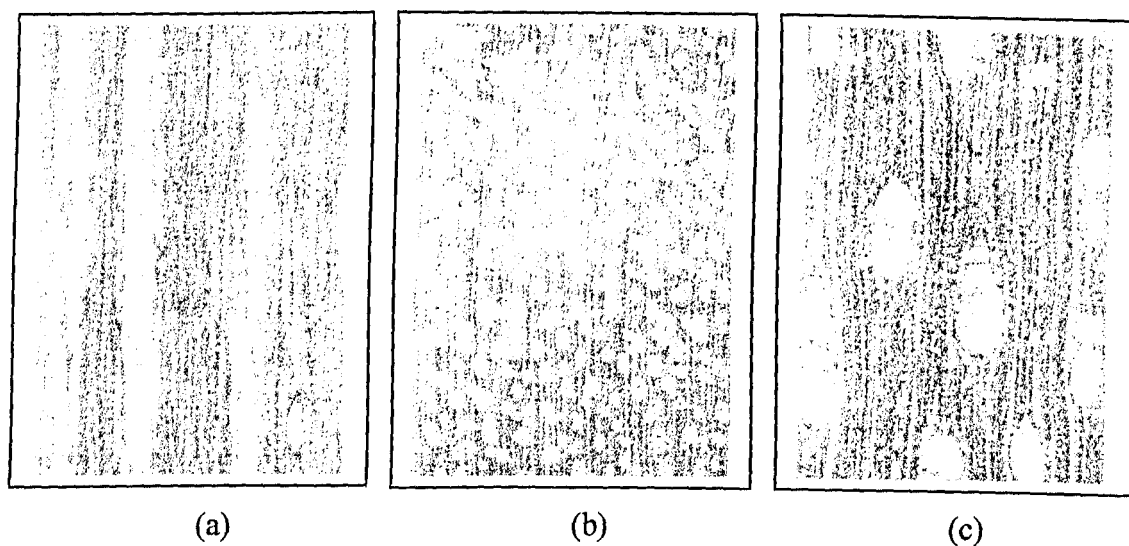


Figura 1.34: Fotomicrografias: (a) corte tangencial – 50x; (b) corte transversal – 10x; (c) corte transversal – 50x [56].

Tabela 1.6: Caracteres anatômicos da Aroeira-Preta [56].

Parênquima axial	Indistinto mesmo sob lente;
Parênquima paratraqueal	Muito escasso, constituído de algumas células em contato com os vasos;
Parênquima marginal	Ocasionalmente presente;
Poros/vasos	Pouco visíveis a olho nu, com distribuição uniforme; numerosos a muito numerosos; solitários e geminados; pequenos a médios; geralmente obstruídos totalmente por tilos brilhantes;
Raios	No topo, finos, numerosos, irregularmente afastados, visíveis sob lente. Na face tangencial, pouco visíveis mesmo sob lente, irregularmente dispostos, sem contraste na face radial;
Fibras	Com paredes muito espessas, pontuações muito simples, ou com aréolas aparentes, pouco distintas;
Canais secretores	Esparsos, pequenos, em alguns raios, que aparecem na face tangencial como pontos pretos;
Camadas de crescimento	Ocasionalmente presentes, caracterizadas por fibras de paredes achatadas e mais espessas ou pelas linhas tangenciais do parênquima marginal.

A tabela 1.7 mostra as propriedades físicas da Aroeira-Preta, com amostra obtida no município de São Joaquim da Barra, extremo nordeste do estado de São Paulo, bem como do norte do Estado do Paraná [56].

Tabela 1.7: Dados das propriedades físicas e mecânicas  
medidas para Aroeira-Preta [56].

Propriedades físicas				Classificação
Massa específica aparente (densidade) a 15% de umidade (g/cm³)			1,19	Muito pesada
Contrações (%) (do p.s.f. até 0% de umidade)	Radial		3,8	Média
	Tangencial		7,2	Baixa
	Volumétrica		12,6	Média
	Coeficiente de retrabilidade volumétrica		0,54	médio
Propriedades Mecânicas				Classificação
Compressão axial	Limite de resistência (kgf/cm²)	Madeira verde	696	Alto
		Madeira a 15% de umidade	842	Alto
	Coeficiente de influência da umidade (%)		2,4	Baixo
	Limite de proporcionalidade Madeira verde (kgf/cm²)		468	Alto
	Coeficiente de qualidade σ/100 a 15% de umidade		7,1	Médio
	Módulo de elasticidade Madeira verde (kgf/cm²)		109.200	Alto
	Flexão estática	Limite de resistência (kgf/cm²)	Madeira verde	1.351
Madeira a 15% de umidade			1.601	Alto
Relação L/F – madeira verde		37	Alta	
Limite de proporcionalidade Madeira verde (kgf/cm²)		643	Alto	
Módulo de elasticidade Madeira verde (kgf/cm²)		149.000	Alto	
Choque (madeira seca ao ar)	Trabalho absorvido (Kgf.m)		3,75	Médio
	Coeficiente de resistência R		0,61	Médio
	Cota dinâmica R/D²		0,42	Baixa
Cisalhamento (madeira verde) Kgf			188	Alto
Dureza Janka (madeira verde) Kgf			1.126	Alta
Tração normal às fibras – Kgf/cm²			120	Alta
Fendilhamento – madeira verde Kgf/cm²			12,6	Alto



As qualidades citadas da Aroeira-Preta têm relação com sua alta densidade (tabela 1.7). Neste caso, a alta densidade da Aroeira-Preta tem a ver com a espessura da parede celular, que chega a 90% do espaço (contra 30 % em madeiras médias ou 10 % em madeiras leves), restando apenas 10 % para luz, ainda bastante obstruída por membranas, depósitos de essências ou resinas, e outras partículas, tudo muito comprimido, de forma a não haver mesmo espaço vazio [58].

No item retratibilidade (tabela 1.7), apesar do valor 3,8 ser considerado médio, ele é muito significativo para uma madeira tão pesada. A retratibilidade mostra quanto a madeira se contrai com a perda de água (passagem de verde até seca). Normalmente, madeiras densas possuem alto índice retrátil e quanto melhor a madeira, menor a retratibilidade. Para uma densidade de  $1,19 \text{ g/cm}^3$  a retratibilidade deveria estar entre 7,5 e 7,7, valores bem maiores que o mensurado [58].

Além das propriedades mecânicas que formam uma barreira física de proteção, existe também uma barreira química, formada por substâncias produzidas pela própria árvore, denominados extrativos, os quais possuem efeito fungicida e inseticida. Essas substâncias se formam principalmente no processo de transformação do alburno em cerne, e assim, residem no cerne [52, 58]. Por isso, é o cerne da Aroeira-Preta que é resistente aos diversos tipos de desgaste (químico, biológico, físico). Então, é necessário aos exploradores dessa madeira fazerem uma “lapidação” do mourão, deixando somente o cerne vermelho. Caso isso não seja feito e o tronco da madeira abatida seja deixado no solo da mata, ela fica sujeita a uma coleobroca (*Coleoptero brasiliensis* = *Hamaticherus leicordarire*) capaz de perfura-lá [57, 59].

Devido a todas essas características ela é muito usada em cercas, currais, andaimes, construções civis, obras hidráulicas, moendas de engenho, armações de pontes, postes, dormentes de primeira classe, mourões, esteios, estacas, marcenaria e carpintaria. Esta madeira não fende facilmente e oferece bonita superfície ao envernizamento [50-59]. Além desses usos, também é descrita como planta apícola, e sua casca (rica em taninos) pode ser usada no curtimento de peles de animais na indústria de couros.

Suas folhas quando maduras são utilizadas na alimentação do gado nos sertões nordestinos [52] e é considerada boa para reabilitação de áreas mineradoras de bauxita, arborização de estradas, parques, avenidas e praças [52].

Pode ser usada para produção de álcool, coque e carvão. Segundo Nogueira [52], a lenha é de boa qualidade, mas a madeira tem dificuldades ao queimar, sendo que o fogo quando em pastagens, raramente mata as espécies existentes. Seu poder calorífico é de 4.852 Kcal/Kg.

Na medicina popular possui vários outros usos, como: casca com propriedades balsâmicas, tônica, anti-hemorragica, nas metrorragias, vias respiratórias e urinárias, anti-diarreica, anti-inflamatória e cicatrizante, contra úlceras e alergias. A resina amarelo-clara é medicamento de larga aplicação entre os sertanejos, como tônico nos casos onde se usam as cascas [52, 53, 58, 60, 61].

Muitos estudos têm sido efetuados no sentido de comprovar cientificamente a eficácia da Aroeira-Preta em suas muitas utilidades na medicina popular, e os resultados têm confirmado suas diversas aplicações [62].

Menezes, Rao e colaboradores [63] avaliaram o efeito protetor da casca de Aroeira-Preta em lesão hepática induzida por tetracloreto de carbono. Concluíram ser eficaz porque não houve necrose dos tecidos estudados e muito pouco infiltrado inflamatório nas seções de fígado dos ratos tratados [63]. Esses mesmos autores concluíram que o extrato destanificado (por poliamida) possui propriedades anti-histamínica e anti-bradicinina [64].

O extrato alcoólico foi estudado em sua possível ação anti-inflamatória. Foi tido como eficaz, visto que os ratos tratados com esse extrato não tiveram as áreas estudadas necrosadas [65].

O extrato aquoso da casca da Aroeira-Preta foi considerado efetivo em atividade anti-diarreica e contra ulcerações gastrointestinais. [66, 67].

Na tentativa de isolamento do princípio ativo da Aroeira-Preta foi verificada a presença de 80 % de taninos no extrato hidroalcoólico, acentuada atividade no extrato destanificado por poliamida, no extrato acetato de etila e em frações deste extrato separada em CCD-preparativa [68].

Estudos de Rao e colaboradores [69] reforçam o dito da medicina popular acerca dos efeitos benéficos da Aroeira-Preta contra desordens gástricas.

Existem vários estudos relatando condições ideais de armazenagem de sementes, plantio, preparo do solo, taxas de crescimento, recuperação florestal da espécie nativa, mas mesmo com todos esses estudos e com tantas qualidades e usos, a Aroeira-Preta está listada pelo IBAMA como uma espécie em risco de extinção [61, 70-76].

Apesar da riqueza da madeira em questão, não foi possível encontrar na literatura estudos químicos a respeito da Aroeira-Preta, principalmente a respeito da sua lignina, seus extrativos polifenólicos e da possível ligação das propriedades acima mencionadas com a sua constituição química.

Portanto, o objetivo desse trabalho é o estudo químico da lignina e dos polifenóis da Aroeira-Preta.

## 2 - Procedimentos Experimentais

### 2.1 - Obtenção e preparo da madeira de Aroeira-Preta

Para os ensaios realizados neste trabalho, foi utilizado um tronco seco de madeira de aproximadamente 30 anos. Dele foram retirados casca e alburno, ficando apenas o cerne de cor avermelhada para o estudo. Do tronco foram cortados filetes de madeira para armazenagem e posterior preparo para uso. A armazenagem foi feita em presença de ar e em temperatura ambiente. Os filetes foram transformados em cavacos com a utilização de uma serra elétrica.

Os cavacos foram introduzidos em moinho de bolas de porcelana com o objetivo de transformá-los em serragem e pó. Eles permaneceram no moinho por 20 dias, durante 6 horas por dia em média.

A serragem obtida no moinho de bolas foi peneirada de modo a ser classificada segundo seu tamanho. O intervalo de granulometria obtido para o estudo da madeira foi:  $32 < \text{serragem} < 100$  mesh (malhas/polegada).

A determinação do teor de umidade é um passo prévio para todos os procedimentos experimentais, visto que, para análises quantitativas, é necessário sempre descontar o teor de água que é pesado junto às amostras de madeira analisadas.

### 2.2 -Equipamentos utilizados:

#### 2.2.1 - Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (IVTF)

Os espectrômetros usados foram da marca Shimadzu, modelo FTIR 8101 do IQ/UFU e modelo FTIR Mattson Instruments da UFMG.

#### 2.2.2 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  e RMN  $^1\text{H}$  foram obtidos em um espectrômetro Bruker que se encontra na UFMG, operando a 400 MHz para hidrogênio e 100 MHz para carbono.

### 2.2.3 – Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Foi utilizado um cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 1050 M, com sistema de bombeio quaternário, injetor automático, detector de fotodiodos modelo 1040 M e estação de tratamento de dados. O detector foi programado para receber informação do canal de uso geral a 325nm (com uma largura de banda de 150 nm, o que permite captar espectros de todos compostos que apresentam absorção no UV) e de canais específicos a  $280 \pm 2$  nm, característico de catequinas, proantocianidinas, flavanonas e diidroflavonóides. A coluna empregada foi do tipo Hypersil ODS, de 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro de partícula.

### 2.2.4 - Ressonância magnética nuclear do carbono-13 no estado sólido (RMN $^{13}\text{C}$ )

A RMN do  $^{13}\text{C}$  com polarização cruzada e rotação em torno do ângulo mágico foi realizada num aparelho da firma Bruker à frequência de 75,4 MHz, pulso de 5 $\mu\text{s}$ , intervalo entre pulsos de 1,4 s, tempo de contato de 200 a 2500  $\mu\text{s}$ , velocidade de rotação no ângulo mágico de 4466 Hz e 1095 pulsos.

### 2.2.5 - Microanálise:

As análises elementares foram realizadas em analisador de elementos da Perkin-Elmer modelo 2400 CHN da série II do Instituto de Química da USP – São Paulo, onde foram determinados os teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio das amostras.

## 2.3 – Metodologias

### 2.3.1 – A análise dos principais componentes

#### 2.3.1.1 – Determinação da umidade

A determinação da umidade foi feita em balança própria, da marca Quimis (Moisture Determination Balance FD – modelo 600).

#### 2.3.1.2 – Processo de extração e purificação da lignina

O processo de obtenção de lignina de madeira moída deu-se de acordo com a adaptação feita por Moraes [77]. 100,000 g de madeira de aroeira-preta previamente preparada (item 2.1) passou por rota extrativa sólido/líquido, em extrator soxhlet, com a seguinte seqüência de solventes: benzeno, etanol-benzeno 2:1, água. A madeira foi então colocada em béquer para sofrer extração com NaOH 0,1 N a frio. Neutralizou-se com ácido acético 0,1 N. Filtrou-se a madeira e lavou-se com água destilada até pH neutro. Passou então por nova extração com clorofórmio e acetona-água 9:1, v/v obtendo-se assim a  $LMM_{bruta}$ . Essa lignina bruta foi purificada por dissolução com NaOH 0,1 N, neutralização com ácido acético 0,1 N, filtração e lavagem com água destilada até pH neutro, secagem a 70 °C, nova lavagem com clorofórmio e secagem. A lignina após purificação foi utilizada nos ensaios descritos a seguir. Devido ao baixíssimo rendimento desse tipo de lignina, várias extrações como esta foram feitas para obtenção de amostra suficiente para os ensaios realizados.

A madeira que passou por essa extração com solventes foi chamada “madeira livre de extrativos” e também foi utilizada para diversos procedimentos descritos a seguir.

#### 2.3.1.3 – Obtenção do extrato metanólico

Colocou-se em um béquer de 1000 mL 50g de aroeira-preta (< 60 mesh) e 300 mL de metanol. Deixou-se sob agitação durante 24 horas à temperatura ambiente. Após esse tempo filtrou-se o extrato metanólico. Esse extrato foi então evaporado em rotaevaporador a 40 °C e em seguida secado em estufa a 48 °C por 12 horas.

#### 2.3.1.4 – Obtenção da holocelulose

5,00 gramas da madeira, livre de extrativos e seca, foram colocados em um balão e adicionou-se 100 mL de água destilada. O balão foi posto em banho-maria, sendo a temperatura do banho controlada a 75 °C. Adicionou-se então 0,5 mL de ácido acético e 0,75 g de clorito de sódio, nesta ordem. Esperou-se 1 hora para que a reação se completasse, adicionando-se outra vez 0,5 mL de ácido acético e 0,75 g de clorito de sódio, seguidos de uma hora de espera para a reação. Esse processo foi repetido por mais duas vezes. A mistura foi então resfriada a 10 °C, filtrada em funil de placa porosa previamente tarado e lavada com água destilada a 5 °C até que o resíduo fibroso apresentasse uma coloração esbranquiçada. O cadinho contendo o resíduo fibroso foi então seco em estufa a 105 °C por um tempo mínimo de 6 horas, resfriado em dessecador e pesado para se quantificar o rendimento da holocelulose. O mesmo procedimento foi executado com a madeira moída bruta.

O teor de holocelulose na madeira é calculado através da equação 1:

$$\%(holocelulose) = \frac{100 \times H}{P} \quad \text{equação 1}$$

onde: H = Peso da holocelulose absolutamente seca (a.s.) em g

P = Peso da serragem inicial (a.s.) em g

#### 2.3.1.5 – Polissacarídeos de fácil e difícil hidrólise ( PFH e PDH )

Foi usado o método de Kiesel-Semiganovski [78], que consiste no refluxo de 4,00 g madeira moída (bruta e extraída) para 200 mL de HCl 2 % durante 3 horas. O resíduo foi lavado a quente. A diferença de peso correspondeu aos carboidratos de fácil hidrólise. Então, o resíduo foi transferido para um béquer e a

ele adicionou-se 40 mL de ácido sulfúrico 80 %. Houve repouso de 2,5 horas com agitação periódica. A mistura foi transferida para um balão onde completou-se o volume para 1 L e o sistema foi deixado em refluxo por 3 horas. A mistura foi filtrada e o resíduo lavado e seco a 105 °C. A massa perdida é devida aos polissacarídeos de difícil hidrólise.

#### 2.3.1.6 - Lignina de Klason

Para a obtenção da lignina de Klason (ou lignina insolúvel em ácido) foi seguido o procedimento da norma ABCP M10/71, com modificações na forma de extração da madeira.

Utilizou-se para este ensaio amostra de madeira livre de extrativos e amostra de madeira bruta. 4,00 g da madeira foram transferidos a um balão e a esta massa foram adicionados 15 mL de ácido sulfúrico (72 %), lentamente e sob agitação. A amostra foi então conservada durante 2 horas em um banho à temperatura ambiente, agitando-a freqüentemente. Ao conteúdo do balão foi então adicionado 560 mL de água destilada, para diluir a solução do ácido à 3 %. O sistema foi então posto para fervura, sob refluxo, para que não ocorresse perda de água por evaporação, e conseqüentemente, concentração da solução de ácido. Ao final da operação, o sistema foi deixado em repouso para sedimentação do material insolúvel, filtrado em cadinho com fundo poroso previamente tarado e lavado com 500 mL de água destilada quente. Em seguida, foi seco em estufa a 105 °C, por 12 horas e, pesado para quantificação do resíduo insolúvel, denominado lignina de Klason.

#### 2.3.1.7 - Lignina solúvel em ácido

A lignina solúvel é aquela que permanece no filtrado obtido no procedimento para a determinação da lignina de Klason.

A partir de uma alíquota do filtrado, fez-se uma leitura em um aparelho ultravioleta (UV). Pelos valores de absorvância, em comprimentos de onda a 215



e 280 nm, lidos no espectro então obtido, a concentração de uma amostra qualquer é calculada segundo a equação 2 [5]:

$$A = acb;$$

Equação 2

onde:

A = absorvância

b = caminho percorrido pela luz através da amostra (cm)

a = absortividade ( $L \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$ )

c = concentração (g/L)

Para ligninas, substituindo-se dados de a e b, chegou-se à relação número 3:

$$C_L = \frac{4,53(A_{215} - A_{280})}{300}$$

Equação 3

onde

$C_L$  = Concentração de lignina [g/L]

$A_{215}$  = Absorvância a 215 nm

$A_{280}$  = Absorvância a 280 nm

#### 2.3.1.8 – Cinzas da madeira.

Para a obtenção do teor de cinzas da madeira moída de *A. urundeuva* utilizou-se a norma ABCP M11/77 sem modificações.

Cadinhos com tampas resistentes a altas temperaturas foram colocados em uma mufla e aquecidos a  $575 \pm 25$  °C por uma hora. Após esse período, foram esfriados em dessecador e pesados com precisão de 0,1 mg. Então, 5,00 g das amostras de madeira absolutamente secas foram colocadas nos cadinhos e estes foram tampados e levados à mufla aquecendo-se a mesma à temperatura de 575 °C durante 1 hora, permitindo-se assim a incineração inicial. Mantendo a mufla à temperatura de 575 °C, foram retiradas as tampas e deixaram-se as amostras calcinando por 3 horas. Verificando-se a ausência total de partículas de carvão nas

cinzas, os cadinhos juntamente com as tampas foram retirados da mufla, esfriados em dessecador até a temperatura ambiente e pesados com precisão de 0,1 mg. O teor de cinzas foi calculado segundo a equação 4:

$$C = \frac{P_c}{P} \times 100 \quad \text{equação 4}$$

onde:

C = Teor de cinzas (%)

P<sub>c</sub> = Peso das cinzas (g)

P = Peso da amostra sem umidade (g)

### 2.3.2 – Análise da lignina de madeira moída (LMM)

#### 2.3.2.1 - Acetilação

Em um balão foram colocados 0,100 mg de lignina, seca em estufa a 70 °C por 12 horas, e 10 mL de mistura de anidrido acético:piridina (1:1, v/v). Em seguida deixou-se a solução resultante sob refluxo a 50 °C por 24 horas. Ao final deste tempo a solução foi diluída com água até que houvesse a formação de precipitado. O sistema foi então filtrado, e o precipitado obtido foi lavado seguidamente com água, solução de ácido clorídrico diluída (10 %) e novamente com água. O precipitado foi posto para secar em estufa a 70 °C, até peso constante.

#### 2.3.2.2 – Determinação de grupos metoxila

Por método químico:

Cerca de 2 a 6 mg de amostra foram pesadas no balão de reação. Adicionou-se 0,1 g de fenol. Acrescentou-se à mistura 1,2 g de iodeto de potássio e 2 mL de ácido fosfórico. Lubrificou-se as juntas do balão com o ácido fosfórico para evitar o escapamento de gás, acoplando-se a elas o condensador, o tubo contendo Ascarite e

o tubo de saída para gás, conectado a um frasco com solução de absorção. A solução de absorção é composta por 200 mL de ácido acético, 1 mL de bromo e 20 g de acetato de sódio. Aqueceu-se, então, o sistema de reação por 1 hora, a 200°C, sob atmosfera inerte, produzida por fluxo de nitrogênio, que foi arrastando o iodeto de metila formado. Após esse tempo, desligou-se o aquecimento, transferindo-se o conteúdo dos frascos de absorção para um erlenmeyer de 150 mL, contendo 10 mL de solução de acetato de sódio a 20%. Os frascos de absorção foram, então, reunidos com a solução principal. Para remover o excesso de bromo da solução de absorção, foram adicionados 2 mL de ácido fórmico 2%, sob agitação, e o sistema foi deixado em repouso por 5 minutos. Em seguida, adicionaram-se 5 mL de ácido sulfúrico 10 % e 0,1 g de iodeto de potássio, agitando-se e deixando-se o frasco em repouso por 10 minutos, no escuro. O iodo liberado foi titulado usando-se uma microbureta ( $\pm 0,01$ ) contendo solução de tiossulfato de sódio 0,02 N. Quase ao final da titulação, quando a solução mostrou-se amarelo-clara, foram adicionados 2 mL de solução de amido (0,5 %). Uma prova em branco foi realizada nas mesmas condições.

A percentagem de grupos metoxílicos é determinada pela equação 5 [77].

$$\%OCH_3 = \frac{(V_s - V_b) \times 517,06 \times f \times N}{m} \quad \text{equação 5}$$

onde:

$V_s$  = volume de tiossulfato de sódio gasto na titulação da amostra;

$V_b$  = volume de tiossulfato de sódio gasto na titulação do branco;

$f$  = fator de correção na padronização da solução de tiossulfato de sódio;

$N$  = normalidade da solução de tiossulfato de sódio;

$m$  = quantidade da amostra em mg.

Por infravermelho com transformada de Fourier:

A determinação da relação  $OCH_3/C_9$  foi feita através da espectrometria no IV, empregando a linha de base e calculando as razões das absorbâncias das bandas

de absorções principais em relação à utilizada como padrão-interno ( $A_i/A_{1508\text{ cm}^{-1}}$ ), conforme sugerido por Sarkanen e colaboradores [79, 80, 81].

Os valores das absorvâncias são calculados pela equação número 6:

$$A_i = \log I_0/I$$

Equação 6

Onde:  $i$  = pico de absorção de determinada frequência

$A_i$  = absorvância de  $i$

$I$  = valor da transmissão no ponto máximo

$I_0$  = valor da transmissão de  $I$  até a linha de base

A partir de cálculos aplicando a relação  $A_i/A_{1500\text{ cm}^{-1}}$ , Sarkanen e colaboradores propuseram a avaliação da presença de grupos metoxila em ligninas [79-81], como mostrado pela figura 2.1.

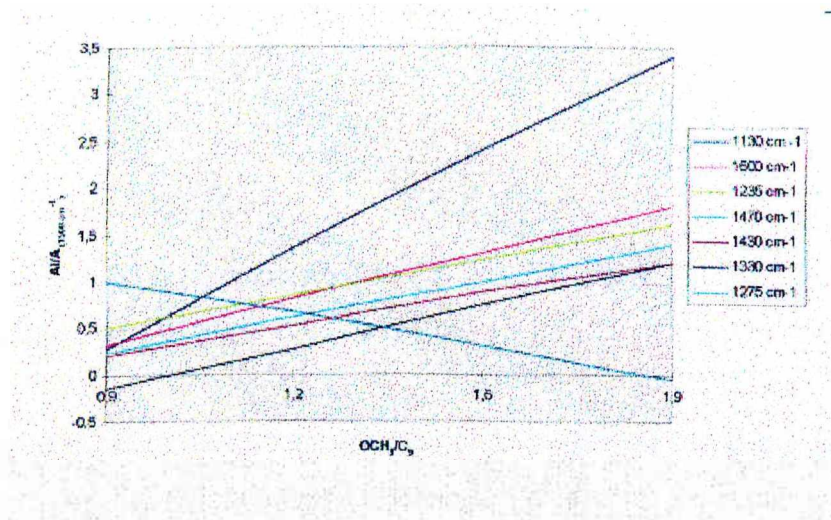


Figura 2.1: Absorvâncias relativas ( $A_i/A_{1500\text{ cm}^{-1}}$ ) de máximos característicos do espectro no IV em função de  $\text{OCH}_3/\text{C}_9$ .

O teor de metoxilas é calculado pela equação 7 [8]:

$$\%OCH_3 = \frac{d \times 2,584 \times \%C}{d + 9} \quad \text{equação 7}$$

onde:  $d$  = média do valor  $OCH_3/C_9$

### 2.3.2.3 – Reação de oximação (carbonilas totais).

Em balão de 50,0 mL contendo 0,200 g de hidroxilamina e 15 mL de piridina foram adicionados 0,200 g de LMM. A solução foi mantida em refluxo a 95 °C por 24 horas. Após resfriamento, adicionou-se 15 mL de água, o que levou à formação de um precipitado. Esse foi filtrado e lavado com 15 mL de HCl 10 %, em seguida com água, até pH neutro. Finalmente foi deixado num dessecador por 3 dias, após o que foi posto para secar em estufa, a 50 °C até peso constante.

O cálculo é feito através da equação 8 [10]:

$$\%(C=O) = \frac{186,2(N_1 - N)}{93,4 - (N_1 - N)} \quad \text{equação 8}$$

onde:

$N_1$  = percentagem de nitrogênio após a reação de oximação

$N$  = percentagem de nitrogênio antes da reação

A partir do valor de carbonilas totais, pode-se calcular o seu teor por mol de metoxilas ( $C=O/OCH_3$ ), utilizando a equação 9 e também a quantidade molar por unidade  $C_9$  ( $C=O/C_9$ ), utilizando a equação 10.

$$(C=O/OCH_3) = \frac{31 \times (OCH_3)}{28 \times (\%OCH_3)} \quad \text{equação 9}$$

$$(C=O/C_9) = (C=O/OCH_3) \times (n^\circ OCH_3/C_9) \quad \text{equação 10}$$

onde:  $n^{\circ}\text{OCH}_3/\text{C}_9$  = quantidade molar de metoxilas/fórmula mínima

#### 2.3.2.4 – Determinação de grupos hidroxílicos

##### a) Hidroxilas fenólicas

- Hidroxilas fenólicas totais:

Utilizou-se o método condutivimétrico. 80,50 mg de LMM foram solubilizadas em 30 mL de mistura acetona:etanol:água 5:10:15 (v/v/v). Colocou-se esta solução em balão de 2 bocas, em uma das quais introduziu-se o eletrodo do condutivímetro. Ao balão foi ainda conectada uma microbureta. Anotou-se o valor inicial indicado no condutivímetro e, após a adição de cada gota de hidróxido de sódio, foram registrados os valores das respectivas condutâncias. Antes de cada leitura, a solução foi devidamente agitada e deixada estabilizar.

A percentagem de hidroxilas fenólicas totais pode ser determinada diretamente pela equação número 11 [7, 10].

$$\%OH_{\text{fenólicas total}} = \frac{N \times V \times 1700}{m} \quad \text{Equação 11}$$

onde:

$N$  = normalidade da solução de hidróxido de sódio

$V$  = volume de hidróxido de sódio em mililitros, gastos na titulação

$m$  = massa da amostra em miligramas

Também é possível expressar o total de hidroxilas fenólicas por unidade fenilpropílica, através da equação nº 12.

$$OH_{\text{fenólicas total} / C_9} = \frac{N \times V \times MM / C_9}{m} \quad \text{Equação 12}$$

onde  $N$ ,  $V$  e  $m$  são os mesmos da equação 11 e  $MM/C_9$  é a massa molecular da lignina por  $C_9$ .

Outra forma de expressar o teor de hidroxilas como função de um mol de grupos metoxílicos. Para isso utiliza-se a expressão nº 13 [12].

$$OH_{\text{fenólicototal} / OCH_3} \left( \frac{\text{molsOH}}{\text{molsOCH}_3} \right) = \frac{31 \times (\%OH_{\text{fenólicototal}})}{17 \times (\%OCH_3)} \quad \text{equação 13}$$

- Hidroxilas fenólicas não-conjugadas (livres):

Dissolveu-se, em balão volumétrico de 10,0 mL, 0,025 g de LMM em solução tampão de pH 12. Retirou-se uma alíquota de 2,0 mL e rediluiu-se a 50,0 mL com solução tampão de pH 12. Retirou-se outra alíquota de 2,0 mL e esta foi tratada com ácido sulfúrico 0,1 N. A solução foi então diluída a 50,0 mL com solução tampão de pH 6. A partir dessas duas amostras (em pH 12 e em pH 6), registrou-se o espectro diferencial de UV, sendo empregado como padrão de referência a solução de pH 6.

As soluções foram preparadas da seguinte forma:

Tampão de pH 6: 495 mL de fosfato de potássio monobásico 0,2 N com 113 mL de NaOH 0,1 N, diluindo tudo para 2,0 L.

Tampão pH 12: 12,4 g de ácido bórico foram dissolvidas e diluídas para 2,0 L com solução de NaOH 0,1 N.

Os cálculos são feitos com base nas equações abaixo:

$$OH_{\text{fenóliconãoconjugado}} = \frac{1700}{4100} \Delta a_{\text{max}} \quad \text{Equação 14}$$

onde:  $\Delta a_{\text{max}}$  = absortividade no espectro diferencial da amostra a 300 nm, que no caso da *A. urundeuva* foi igual a 0,447 L/g.cm.

A equação 15 fornece o conteúdo molar por  $C_9$ .

$$OH_{\text{fenóliconãoconjugado} / C_9} = \frac{\Delta a_{\text{max}} \times MM / C_9}{4100} \quad \text{Equação 15}$$

- Grupos hidroxílicos fenólicos conjugados:

Foram obtidos por diferença entre as hidroxilas fenólicas totais e as hidroxilas fenólicas não-conjugadas (livres).

#### b) Hidroxilas totais

Devido à pouca reatividade da LMM acetilada da *A. urundeuva*, foi utilizada a espectroscopia de ressonância magnética de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) para esta determinação.

Para estes espectros foi usada uma frequência de 400 MHz, usando  $\text{CDCl}_3$  como solvente; aquisição de pulso a 0,1 s.

#### c) Hidroxilas alifáticas:

Obtida pela diferença entre o conteúdo total de hidroxilas e o teor de hidroxilas fenólicas totais.

### 2.3.2.5 – Determinação de ligações $\alpha$ -O-4 e $\beta$ -O-4

#### a) Hidrólise das ligações $\alpha$ -O-4 totais

À 0,200 g de LMM foram adicionados 10 mL de ácido acético 2 N. A mistura foi mantida a 100 °C, com agitação, por 2 horas, em reator Parr. Após resfriamento, o precipitado foi filtrado, lavado até pH neutro e seco a 70 °C. Uma massa exatamente conhecida foi então pesada e diluída na mistura acetona-etanol-água 5:10:15, (v/v/v). Essa mistura foi então titulada condutivimetricamente com NaOH 0,1 N.

#### b – Determinação de ligações $\alpha$ -O-4 e $\beta$ -O-4 totais



Colocou-se 0,200 g de LMM no reator Parr e adicionou-se 10 mL de NaOH 2 N. A reação permaneceu sob agitação, a 170 °C por 2 horas. Após resfriamento, adicionou-se HCl 3 N até que o pH da solução chegasse a 3,0. Então, o precipitado formado foi filtrado e lavado com água até pH neutro e posto em estufa para secar a 70 °C. Uma massa exatamente conhecida foi então pesada e diluída na mistura acetona-etanol-água 5:10:15, (v/v/v). E a mistura titulada condutivimetricamente com NaOH 0,52 N.

#### 2.3.2.6 – Determinação relativa de unidades siringílicas e guaiacílicas

A percentagem de unidades guaiacílicas em relação às siringílicas pode ser determinada pela equação número 16.

$$\%G = 100 \times (2 - n^{\circ}OCH_3 / C_9)$$

Equação 16

#### 2.3.2.7 - Distribuição de massas moleculares da LMM acetilada

A estimativa da distribuição de massas moleculares relativas foi feita através da análise em cromatografia por permeação de gel (CPG). Uma solução da amostra da lignina acetilada (1 mg/mL de THF) foi injetada em um cromatógrafo WATERS ASSOCIATES CPG, equipado com três colunas PL-gel (10 µm; 30 cm de comprimento; 7.8 “d. i.”; 500 Å + 10<sup>3</sup> Å + 10<sup>4</sup> Å) conectadas em série a uma bomba CLAE (WATERS M45), de modo a aumentar a porosidade. A detecção foi feita a 254 nm, utilizando para isso um detector ultravioleta (MOD. 440/010 – WATERS ASSOCIATES). As colunas foram calibradas usando padrões de poliestireno na faixa de 106 a 450.000 u.. A taxa de vazão de THF (grau CLAE) foi 1 mL/min, sendo a carga da amostra de 1,0 e 1,5 mg/mL. Os resultados foram processados em um módulo de dados da WATERS ASSOCIATES.

### 2.3.2.8 - Reação de oxidação da LMM com nitrobenzeno

Para a oxidação da LMM com nitrobenzeno foi utilizado um reator Parr de 300 mL. Foram colocados 0,025 g de lignina, 9 mL de solução de NaOH 2,5 N e 1 mL de nitrobenzeno no reator, que foi fechado e deixado a 170 °C durante 3 horas para que a reação ocorresse. Ao final desse tempo, a mistura oxidada foi submetida a uma extração contínua com clorofórmio durante 3 horas, a fim de eliminar o excesso de nitrobenzeno. Em seguida, utilizando-se de uma solução de HCl 3,0 N, a mistura foi acidificada a pH 3 – 4 e, novamente, submetida à extração contínua com clorofórmio por 20 horas. Do extrato clorofórmico, evaporou-se o solvente e o resíduo obtido foi dissolvido em 16 mL de diclorometano. 3 mL da solução assim obtida foram transferidos a um vidrinho de reação de capacidade de 5 mL, e a este foi adicionado 1 mL de BSTFA (Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida) como agente sililante. Para que a reação se processasse, o frasco foi fechado e mantido a 70 °C por 1 hora. Os produtos foram identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), empregando as seguintes condições: Coluna: DB5; Comprimento: 30 m; Diâmetro: 0,25 mm; Gás de arraste: He (22,9 mL/min); Temperatura do forno: 60 °C; Temperatura de injeção: 200 °C; Temperatura da interface: 270 °C; Pressão da coluna: 10,1 psi. Programa de temperatura do forno: 60 °C (1 min); 60 – 250 °C (5 °C/min); 255 °C (10 min), 260 °C (1 min).

Amostras padrões de vanilina, siringaldeído e p-hidroxibenzaldeído foram injetadas sob as mesmas condições de injeção dos produtos de oxidação.

### 2.3.2.9 - Determinação da fórmula mínima

A fim de ter a fórmula mínima da LMM em termos das unidades  $C_3C_6$  ou  $C_9$  é preciso ter o conhecimento das percentagens de C, H, O e de grupos metoxila ( $OCH_3$ ), presentes na lignina.

### 2.3.2.10 – Análise da LMM por métodos espectroscópicos

As análises feitas com a LMM seguiram o protocolo descrito nos itens 2.2.1 a 2.2.4.

### 2.3.3 – Análise dos polifenóis

#### 2.3.3.1 – Obtenção dos extrativos polifenólicos

##### a) Metanol-água 8:2 (v/v)

10,000 g da madeira moída de *A. urundeuva* foram colocadas em um béquer com 300 mL da mistura metanol-água 8:2 (v/v). A mistura foi deixada por 24 horas em temperatura ambiente, com agitação e no escuro, quando foi filtrada. Do filtrado obtido retirou-se uma alíquota de 10 mL para cálculo de rendimento. Essa alíquota foi levada à secura em béquer previamente tarado e sua massa foi pesada após 18 horas em estufa a 105 °C. O restante do filtrado obtido foi evaporado à temperatura igual ou inferior a 40 °C para eliminar o metanol. Todos os ensaios para determinação de polifenóis foram feitos com esta amostra (MA1) e com sua duplicata obtida de forma semelhante (MA2).

##### b) Acetona-água 7:3 (v/v)

10,000 g de madeira moída foram colocadas em béquer com 300 mL da mistura acetona-água 7:3 (v/v). A mistura foi deixada por 24 horas em temperatura ambiente, com agitação e no escuro, quando foi filtrada. Do filtrado obtido retirou-se uma alíquota de 10 mL para cálculo de rendimento. Essa alíquota foi levada à secura em béquer previamente tarado e sua massa foi pesada após 18 horas em estufa a 105 °C. O restante foi evaporado à temperatura inferior ou igual a 40 °C para eliminar a acetona. Todos os ensaios para determinação de polifenóis foram feitos com esta amostra (AA1) e sua duplicata obtida da mesma forma (AA2).

#### 2.3.3.2 – Determinação do teor de fenóis totais

a) Pelo método do Azul da Prússia modificado.

Soluções:

- Goma arábica 1%: Suspensão de 1,0 g de goma arábica em cerca de 80 mL de água destilada levada à ebulição por 25 minutos. A mistura foi filtrada a vácuo e o filtrado levado ao volume de 100 mL. A solução foi guardada em refrigerador.
- Solução de ferricianeto de potássio 0,016 M: Feita pela dissolução de 5,260 g de ferricianeto de potássio para 1,0 L de solução em água destilada.
- Solução de cloreto férrico 0,02 M em HCl 0,10 M: Utiliza-se 8,3 mL do ácido concentrado para 1,0 L de solução. Para o cloreto férrico utiliza-se 5,404 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dissolvido em 1,0 L da solução de HCl 0,10 M.
- Solução de ácido fosfórico: Uma parte de ácido fosfórico 85 % para duas partes de água destilada.

Procedimento:

Em 0,10 mL de amostra adicionaram-se 1,0 mL de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  0,016 M e 1,0 mL de  $\text{FeCl}_3$  em HCl 0,1 N. Agitou-se e deixou-se em temperatura ambiente por 15 minutos. Adicionou-se 3,0 mL de solução de ácido fosfórico e deixou-se em temperatura ambiente por 2 minutos. Adicionou-se, então, 2,0 mL de goma arábica e fez-se a medida da absorvância da solução a 700 nm.

Com este procedimento foi obtida uma curva de calibração com ácido gálico e posteriormente foram feitas as determinações de fenóis totais nas amostras (AA e MA). Incluiu-se também um branco, o qual foi usado como referência para todas as leituras no UV.

b – Pelo método Folin-Ciocalteu

Retirou-se 0,10 mL dos extratos brutos ( AA e MA ) e diluiu-se com água até o volume de 50,0 mL. Desta solução retirou-se uma alíquota de 0,5 mL que foi transferida para um tubo de ensaio. Adicionou-se 2,5 mL de uma solução aquosa do

reagente de Folin-Ciocalteu a 10 % e 2,0 mL de carbonato de sódio a 7,5 %. A mistura foi mantida por 5 minutos em banho-maria a 50 °C. Leu-se a absorvância a 760 nm. Procedeu-se de forma semelhante com as soluções padrão de ácido gálico (1-50 microgramas/mL) e com o branco.

#### 2.3.3.3 – Determinação de Proantocianidinas

##### a - Pelo método da vanilina

Em tubo de ensaio, colocou-se 1,0 mL de cada extrato bruto ( MA e AA ) e adicionou-se 2,0 mL de solução de vanilina em ácido sulfúrico a 70 % (m/m). A mistura foi colocada em banho de água a 20 °C por um período de 15 minutos. Fez-se a leitura da absorvância a 500 nm.

O mesmo procedimento foi seguido para execução da curva de calibração, utilizando como padrão a catequina, em faixa de concentração de 2,5 a 40 µg/mL.

##### b – Pelo método butanol-ácido

Colocou-se em tubo de reação 0,5 mL de cada extrato bruto (MA e AA), adicionou-se 1,0 mL de n-butanol-ácido clorídrico 95:5 ( v/v ), 40 µL de reagente férrico a 2% (m/v) ( $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  em HCl 2 M). Fechou-se o tubo de reação e este foi colocado em estufa a 95 °C por 1 hora. Terminado o prazo da reação, a mistura foi levada à secura sob vácuo. O resíduo foi então rediluído em metanol e foi feita a leitura de sua absorvância feita a 550 nm.

#### 2.3.3.4 – Determinação de 3-deoxi-proantocianidinas.

Em tubo de ensaio foram misturados 0,1 mL de amostra (AA e MA), 10 mL de butanol ácido ou branco e 0,2 mL de sulfato férrico amoniacal a 2 % em HCl 2 N. O branco foi constituído de uma mistura de 15 mL de ácido acético 0,1 N, 15 mL de metanol e 70 mL de n-butanol.

A absorvância de cada amostra com butanol-ácido foi comparada a absorvância daquela amostra com o branco. Amostras contendo 3-deoxiproantocianidinas terão absorvância muito maior em butanol-ácido do que com o branco.

### 3 – Resultados e discussões

#### 3.1 – Composição da madeira

##### 3.1.1 – Extrativos

Os extrativos compreendem uma grande diversidade de compostos. As proporções exibem ampla variação e alguns desses componentes são encontrados em quantidades significativas em apenas alguns gêneros ou espécies. Então, as madeiras são melhor definidas pela natureza e quantidade dos extrativos do que pelas proporções dos componentes da parede celular [4].

Os resultados obtidos com a retirada dos extrativos da madeira de *A. urundeuva* são mostrados na tabela 3.1. A madeira, após passar pela extração com solventes, foi denominada madeira extraída ou madeira livre de extrativos.

Tabela 3.1: Extrativos da *A. urundeuva*

Extratos	Percentagens (%)*
benzênico	3,5
etanol-benzeno 2:1	17,0
Aquoso	6,2
quino**	12,9
Clorofórmio	0,7
Total	40,3
metanol <sup>#</sup>	23,9

\* em relação a massa inicial de madeira a.s.; \*\* quino = resíduo obtido pela lavagem da madeira com NaOH 0,1N; # extração isolada

##### 3.1.2 – Holocelulose, polissacarídeos de fácil e difícil hidrólise (PFH e PDH)

Os métodos usados atualmente para determinação de holocelulose não podem ser considerados perfeitos, pois todos geram uma pequena perda de

carboidratos (que são solubilizados) e retém parte da lignina que deveria ser solubilizada (lignina residual).

Idealmente, a holocelulose é definida como a porção total de polissacarídeos da madeira, isto é, a madeira livre de extrativos menos a lignina, e a soma lignina mais holocelulose deveria ser igual a 100%. De maneira similar, a soma em uma madeira não extraída seria: holocelulose + lignina + cinzas + extrativos = 100 %. Entretanto, essas somas não são muito precisas. Preparações de holocelulose retém pequenas quantidades de materiais diferentes dos carboidratos. Lignina residual ou produtos de degradação da lignina permanecem e incrementam o teor de holocelulose, principalmente quando a deslignificação total é evitada para minimizar as perdas de polissacarídeos. Pequenas quantidades de constituintes inorgânicos também permanecem retidos na holocelulose [4].

Ritter e colaboradores foram os primeiros pesquisadores a conseguirem isolar a celulose, pela remoção da lignina. Eles utilizaram tratamentos alternados de cloração e extração alcalina em soluções alcoólicas. O produto obtido, constituído por celulose e hemiceluloses originalmente presentes na madeira, foi chamado de holocelulose [4].

A tabela 3.2 mostra os resultados obtidos na determinação da holocelulose e polissacarídeos de fácil (hemiceluloses) e difícil hidrólise (celulose).

Tabela 3.2: Resultados obtidos para holocelulose, PFH e PDH

	Aroeira-Preta bruta	Aroeira-Preta extraída
Polissacarídeos de fácil hidrólise (PFH) (%)	16,6	23,0
Polissacarídeos de difícil hidrólise (PDH) (%)	27,8	42,6
Holocelulose (%)	61,7	73,4

Ao compararmos os valores obtidos para *A. urundeuva*, pode-se concluir que os valores estão abaixo da média para madeiras duras de clima tropical (tabela 3.3).



Tabela 3.3 Dados referentes à análise de madeiras de clima tropical  
(valores em percentagens) [2, 7, 82].

Nome vulgar	Nome científico	holocelulose	celulose	hemiceluloses	lignina	ext. etanol-benzeno	ext. aquoso a quente	Cinzas
Obeche	<i>Triplochiton sceroxylon</i>	77,2	47,8	20,1	21,3	12,6	4,2	1,8
Kefe	<i>Pterygotamacrocarpa</i>	78,1	44,9	25,1	22,7	2,6	2,6	1,3
Afzélia	<i>Afzelia africana</i> Smith	-	35,8	-	28,0	9,1	5,3	1,9
Eucalipto	<i>Eucalyptus grandis</i> *	80,1	-	-	28,5	-	-	-
Eucalipto	<i>Eucalyptus grandis</i> **	-	39,0	14,6	28,7	1,2	10,0	0,3
Eucalipto	<i>Eucalyptus grandis</i> ***	-	48,7	21,7	27,2	-	-	-

\*(8 anos, incluindo a casca), \*\* (7 anos), \*\*\* (3 anos)

Apesar de muito dura, a Aroeira-Preta contém um baixo teor de celulose, como pode ser visto pela comparação dos dados contidos nas tabelas 3.2 e 3.3.

### 3.1.3 – Lignina insolúvel em ácido (lignina de Klason)

O método mais usado para determinação da lignina total de um dado vegetal se baseia na hidrólise da madeira com ácido sulfúrico 68 a 78 %. Através dessa reação, os polissacarídeos são hidrolisados e liberados da macromolécula de lignina. Essa lignina total é também denominada de lignina de Klason (LK), já que está sendo obtida pelo método originalmente proposto por Klason.

A maioria das espécies vegetais, principalmente as madeiras duras, apresentam uma percentagem de lignina solúvel em ácido sulfúrico 72 % que pode variar de 25-60 %, com relação ao conteúdo total de lignina. A diluição com água, levando a concentração para 3 %, favorece a precipitação de grande parcela da lignina. Mesmo assim, nem toda lignina é precipitada e uma certa parte ainda permanece como lignina solúvel [5].

Fatores interdependentes como concentração do ácido, tempo de reação e temperatura afetam o rendimento e a composição da lignina isolada.

Em madeiras duras, a quantidade de lignina isolável por este procedimento pode variar entre 19 a 28 %, em relação à quantidade de madeira utilizada

inicialmente. A tabela 3.4 fornece dados relatados na literatura para diferentes vegetais livres de extrativos (pré-extraídos) [2] e para *A. urundeuva*.

Tabela 3.4: Valores encontrados para o teor de lignina Klason na madeira de *A. urundeuva* e outras espécies vegetais.

Espécie Vegetal	% LK
<i>A. urundeuva</i> (bruta)	43,6
<i>A. urundeuva</i> (extraída)	28,1
<i>Acacia mollissima</i>	25,4
<i>Robinia pseudoacacia</i>	21,1
<i>Ulmus americana</i>	29,0
<i>Eucalyptus regnans</i>	17,7

No isolamento da lignina por hidrólise ácida, outras substâncias que são insolúveis, ou se tornam insolúveis sob tratamento ácido, ou ainda que se combinam com a lignina durante o tratamento ácido, podem aparecer erroneamente como lignina. Como exemplo, podem-se citar os produtos de degradação de carboidratos e proteínas, alguns constituintes minerais, extrativos polifenólicos e lignanas. Os taninos (materiais polifenólicos) podem se condensar com a lignina durante o tratamento ácido. O catecol e o ácido tânico formam produtos insolúveis com a lignina e a produção de “lignina artificial” já foi demonstrada pela reação de açúcares com floroglucinol, pirocatecol e outros compostos fenólicos na presença de ácidos [5].

Por causa de todos esses interferentes as pré-extrações são recomendadas. Deve ser reconhecido também que as pré-extrações podem remover materiais que poderiam ser considerados como lignina (por exemplo: a lignina nativa – Brauns [11] – foi removida por extração com etanol).

Entretanto, a possibilidade de remover parte da lignina é compensada pela possibilidade de erro de maior magnitude se os extrativos não forem removidos. Isso pode ser bem exemplificado pelo valor de 43,6 % para LK da *A. urundeuva* bruta, valor esse que é bem maior que o obtido para madeira extraída. Como essa madeira é rica em extrativos e estes não foram previamente isolados neste ensaio,

pode-se dizer que o valor acima obtido é representativo da LK + extrativos. Esse resultado é ainda maior que o obtido por Moraes [13] para o *E. grandis* do cerrado, que chega a 40 % de LK + extrativos. Browning já citava a dificuldade de análise dos constituintes principais do *E. regnans* pela presença de substâncias polifenólicas que penetravam nos vasos e células parenquimáticas e ocupavam parcialmente as fibras daquela madeira [4]. Por este alto conteúdo, pode-se dizer também que a madeira é imprópria para produção industrial de celulose. Já o valor de 28,1 % encontrado para madeira extraída está dentro do esperado para madeiras duras.

#### 3.1.4 – Lignina solúvel em ácido

“Lignina solúvel” é o nome que se dá aos resíduos solúveis contidos no filtrado da determinação da LK. Essas substâncias são assim chamadas devido à presença de substâncias que caracterizam a lignina.

A presença da lignina solúvel pode ser determinada através da leitura de sua absorvância em aparelho de espectrometria no ultravioleta. O espectro obtido é muito semelhante a soluções de lignina. A partir de uma alíquota do filtrado, calculou-se o teor de lignina solúvel, de acordo com o método descrito no item 2.3.1.7 deste trabalho. A tabela 3.5 apresenta os resultados calculados para a lignina solúvel.

Tabela 3.5: Resultados obtidos para o cálculo do teor de lignina solúvel na madeira de *A. urundeuva*.

	Média das Abs <sub>215</sub>	Média das Abs <sub>280</sub>	Teor de lignina solúvel (g/L)	Porcen- tagem*
<i>A. urundeuva</i> (bruta)	2,38	1,34	0,016	1,60
<i>A. urundeuva</i> (extraída)	2,30	1,03	0,019	1,76

\* em relação ao teor inicial de madeira

Na literatura, encontra-se que o teor de lignina solúvel para madeiras duras é de 1- 4 %, perfazendo uma porção significativa do total [5]. O valor encontrado para a *A. urundeuva* está dentro do intervalo descrito em literatura.

## 3.1.5 – Cinzas na madeira

Os íons cálcio, potássio, magnésio, sulfato, fosfato, carbonato e silicato estão entre os principais componentes das cinzas da madeira.

Fez-se a determinação das cinzas na madeira da *A. urundeuva* por duas vezes, obtendo-se um valor médio de 1,46 %. Esse valor é bastante elevado em relação ao teor de cinzas para madeiras descrito em literatura, que é, em média, 0,5 % [2]. Através deste resultado pode-se afirmar que esta madeira possui um elevado teor de compostos inorgânicos, ou foi de alguma forma contaminada, por exemplo, durante o processo de moagem em moinho de bolas ou devido a longa exposição ao tempo.

## 3.1.6 – Análise por somatória

Utilizando os dados já descritos nos itens 3.1.1 a 3.1.4 pode-se fazer uma análise por somatória, que representa uma avaliação dos dados experimentais cuja interpretação pode ser de grande valor no julgamento da validade dos métodos analíticos utilizados [4, 13].

Tabela 3.6: Análise por somatória dos resultados obtidos na extração da madeira de *A. urundeuva*, em percentagem.

	Madeira bruta <sup>#</sup>	Madeira extraída <sup>#</sup>
Holocelulose + LK	105,3	101,5
Holocelulose + LK + extrativos <sup>(*)</sup>	133,2	101,5
PFH + PDH + LK	88,0	93,7
PFH + PDH + LK + extrativos <sup>(*)</sup>	115,9	93,7

(\*) Refere-se a soma dos extrativos menos o quino (equivale a 27,9 %),  
# para cálculos de holocelulose, LK, PFH e PDH

Se todos os componentes da madeira fossem rigorosamente determinados, ou seja, se nenhum for esquecido e se não houver sobreposição por causa da deficiência dos métodos analíticos, a soma de todos os componentes deveria ser

bem próxima de 100 %. Entretanto, valores de 100 % são considerados fortuitos nesse tipo de análise e totais entre 95 e 102 % não são incomuns, como mostrado na tabela 3.3, onde a soma dos componentes da madeira varia entre 97,6 e 108 % [4, 13].

A análise por somatória mostrada na primeira linha da tabela 3.6 revela valores coerentes com o esperado. Isso porque ao considerar que a LK está condensada com polifenóis, o valor de 105,3 % para a soma dos componentes da madeira bruta está dentro do erro previsto em literatura. Para a madeira livre de extrativos, o valor para esta soma é ainda mais próximo de 100 %, evidenciando que aqui não houve sobreposição de resultados nem interferência dos extrativos da madeira.

A segunda e a quarta linha da tabela apresentam valores bem maiores que 100 %, reforçando a suposição de que a LK estaria condensada com polifenóis. Logo, os extrativos estariam sendo contados duas vezes.

Já a terceira linha da tabela mostra que o método usado para determinação de PFH e PDH não foi eficiente para a madeira bruta (principalmente). Provavelmente, houve interferência dos extrativos e a reação não foi completa, não permitindo boa quantificação. Por isso, o valor bem abaixo de 100 % para as somas mostradas, o que não representa a realidade [4, 13].

Os elevados valores obtidos para o teor de extrativos não são suficientes para justificar a dureza e resistência da madeira a ataques mecânicos e biológicos. Isto porque pode-se citar exemplos de madeiras como *Eucalyptus grandis* que possui aproximadamente 40 % de lignina mais extrativos e é uma madeira de degradação fácil em clima tropical [13]. A grande resistência e durabilidade da *A. urundeuva* deve ser devida principalmente a estrutura da lignina ou mais provavelmente a composição dos polifenóis presentes.

### 3.2 – Resultados relativos à LMM

#### 3.2.1 – Obtenção da LMM

O processo de obtenção da lignina de madeira moída (LMM) constitui-se basicamente da moagem da madeira em moinho de bolas seguida da remoção dos constituintes menores (extrativos) por meio da dissolução com solventes orgânicos neutros. A remoção dos extrativos é necessária para obtenção de uma LMM mais pura [10]. Foi obtido um teor de 0,42 % de LMM em relação ao teor inicial de madeira absolutamente seca (a.s.).

### 3.2.2 – Análise elementar da LMM e do extrato aquoso

Os resultados obtidos com a microanálise são mostrados na tabela 3.7.

Tabela 3.7: Análise elementar da LMM e do extrato aquoso da *A. urundeuva*.

	% C	% H	% O <sup>(*)</sup>	% N
E. aquoso	50,78	5,40	43,41	0,41
LMM	59,50	4,38	35,35	0,77

<sup>(\*)</sup> Valores obtidos por diferença

Esta análise será utilizada para cálculos e considerações posteriores.

### 3.2.3 – Determinação de grupos metoxílicos

A lignina e seus derivados são caracterizados pelo teor de metoxilas e essa determinação é uma ferramenta de grande valor para o estudo da química da lignina.

Um dos primeiros métodos para determinação de grupos metoxílicos foi desenvolvido por Zeisel. Posteriormente, Vieböck e colaboradores desenvolveram um método mais eficiente, baseado na reação da amostra com ácido iodídrico, formando iodeto de metila. Após o tempo de reação, o produto é tratado com solução de ácido acético, acetato de sódio e bromo. Assim, o iodeto de metila formado é convertido em ácido iódico pela oxidação com bromo, enquanto o sulfeto de hidrogênio, se presente, é oxidado a ácido sulfúrico, não interferindo na análise de grupos metoxílicos. O processo global está representado na figura 3.1.

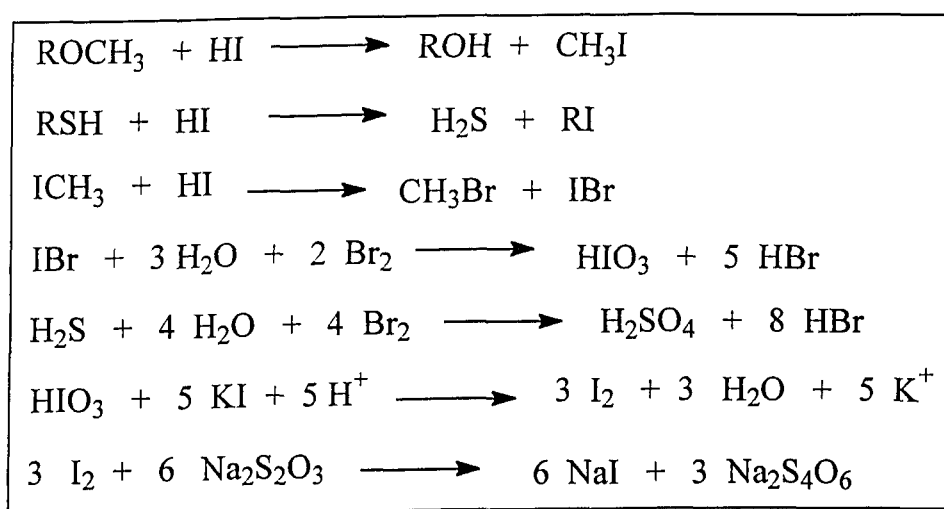


Figura 3.1: Equações representativas das reações que ocorrem na determinação de grupos metoxílicos pelo método Vieböck.

O bromo remanescente no final da reação é reduzido pela adição de ácido fórmico, produzindo ácido bromídrico. Este é simultaneamente neutralizado pelo acetato de sódio presente em solução de absorção. Finalmente, o iodo formado é titulado com uma solução padronizada de tiosulfato de sódio, usando solução de amido como indicador.

A determinação de grupos metoxílicos nesse trabalho foi realizada para os extratos aquoso, metanólico e LMM pelo método acima descrito. Os resultados encontrados nas titulações são mostrados na tabela 3.8.

Tabela 3.8: percentagem de grupos metoxílicos encontradas através do método Vieböck.

Amostra	% OCH <sub>3</sub> <sup>(*)</sup>
LMM	18,9
Extrato aquoso	3,9
Extrato metanólico	5,6

\* Valor médio das duplicatas

Pela tabela 3.8 observa-se que os extratos apresentaram um baixo teor de grupos metoxílicos, o que está de acordo com a natureza polifenólica dessas frações [14, 83].

A presença de um teor maior de grupos metoxílicos para o extrato metanólico sugere a presença de um pouco de lignina.

O cálculo do número de grupos metoxílicos para LMM foi feito também usando o resultado da análise por espectroscopia no infravermelho (IV).

No espectro de IV, a presença de picos de absorção de metoxilas é observada em algumas regiões características, as quais estão selecionadas na tabela 3.9.

A determinação de metoxilas pelo método IV se baseia nas absorvidades de vários picos do espectro que são avaliadas a partir das linhas de base traçadas arbitrariamente através dos mínimos em cada banda de absorção [77, 79, 80, 81].

Tabela 3.9: Absorções de IV características da presença de grupos metoxila em ligninas.

Frequência, $\nu$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição
2920-2820	Deformação axial C-H metílico
1470-1460	Deformação angular assimétrica de C-H de grupos metílicos
1330-1325	Respiração do anel siringila com deformação de C-O
1275-1270	Respiração do anel guaiacila com deformação de C-O

A figura 3.2 apresenta o espectro de IV da LMM, com as linhas de base traçadas.



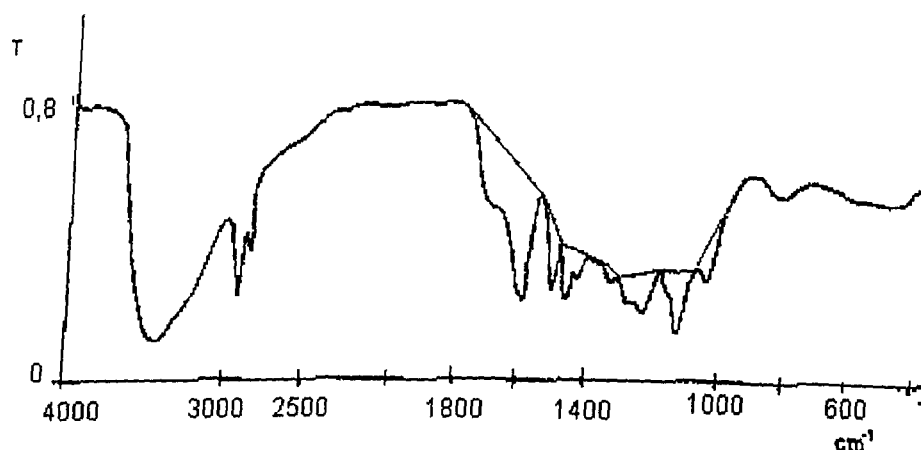


Figura 3.2: Espectro de IV característico da LMM  
usado para o cálculo do teor de metoxilas.

O pico máximo observado a  $1508\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao pico que apresenta a menor variação com a estrutura, funcionando como pico de referência. Assim, as absorvâncias dos outros máximos individuais  $1600$ ,  $1460$ ,  $1430$ ,  $1335$ ,  $1275$ ,  $1225$  e  $1125\text{ cm}^{-1}$ , são divididos pelo máximo  $1508\text{ cm}^{-1}$ .

A tabela 3.10 apresenta os resultados dos cálculos efetuados, bem como o teor de metoxilas por  $C_9$  para a LMM.

Tabela 3.10: Dados do espectro IV da LMM  
e valores calculados para a relação  $OCH_3/C_9$ .

$\text{cm}^{-1}$	$I_0$	$I$	$A_i$	$A_i/A_{i1508}$	$OCH_3/C_9$
1508	43	23,5	0,26	-	-
1600	57	20	0,39	1,5	1,63
1460	33	23,5	0,15	0,60	1,21
1430	30	26,5	0,05	0,19	0,9
1335	30	26,0	0,06	0,23	1,20
1275	28,5	19,5	0,16	0,62	1,22
1225	29	17,5	0,22	0,85	1,24
1125	30	12,0	0,40	1,54	1,32
Média					1,25

Com o valor médio para  $\text{OCH}_3/\text{C}_9$  (1,25) e a percentagem de carbono (% C = 59,96) pode-se calcular o teor de metoxilas de acordo com a equação 7 (item 2.3.2.2)

Então:

$$\% \text{OCH}_3 \approx 19,0 \%$$

O teor aproximadamente de 19,0 % está de acordo com o valor encontrado pelo método Vieböck (vide tabela 3.8) e com o valor normalmente encontrado para ligninas de madeiras duras [5], que varia de 18,0 a 22,0 %. A tabela 3.11 compara alguns valores da literatura para o teor de metoxilas de diferentes tipos de madeira.

Tabela 3.11: Teores de metoxilas para algumas espécies de madeira [2].

LMM	Tipo de madeira	%OCH <sub>3</sub>
<i>E. grandis</i>	dura	22,0
<i>Picea abies</i>	mole	15,8
<i>Fagus silvatica</i>	dura	21,4
<i>E. regnans</i>	dura	22,9
<i>E. tetradonta</i>	dura	20,4
<i>A. urundeuva</i>	dura	19,0

### 3.2.4 – Determinação da fórmula mínima da *A. urundeuva*.

Freudenberg e Neish desenvolveram uma série de cálculos que permitiram o estudo de fórmulas mínimas de ligninas. Por essa metodologia, os grupos metoxila são normalmente expressos como uma unidade separada dos demais átomos de C, H e O presentes no resto da macromolécula [2, 6]. A fórmula mínima é fundamentada na sua unidade fenilpropílica ( $\text{C}_9$ ), e é determinada conhecendo-se os teores de C, H, O e  $\text{OCH}_3$ .

A presença de grupos metoxila isolados dos demais átomos de O, C e H se justifica por estarem estes presentes em mais de 95 % das unidades monoméricas que constituem a macromolécula (exceto para as gramíneas).

Na tabela 3.12 temos a análise elementar para a lignina em questão, já descontado o valor para o nitrogênio e a tabela 3.8 apresenta a porcentagem de OCH<sub>3</sub>.

Tabela 3.12: Análise elementar para a LMM,  
descontando o teor de nitrogênio

Componente	%	% descontando o nitrogênio
C	59,50	59,96
H	4,38	4,41
N	0,77	-
O	35,35	35,62

Sabendo que a fórmula mínima para a lignina pode ser considerada como função de sua unidade básica C<sub>3</sub>C<sub>6</sub> ou C<sub>9</sub>, propõe-se escrevê-la na forma da equação 17:

{ C<sub>x</sub> H<sub>y</sub> O<sub>z</sub> (OCH<sub>3</sub>)<sub>d</sub> }<sub>n</sub>

equação 17

onde n.x = 9

Então:

Para H: [ 276,6 (%H) – 27 (%OCH<sub>3</sub>) ] / [ 2,584 (%C) - (%OCH<sub>3</sub>) ]

H = 5,2

Para O: [ 17,46 (%O) – 9 (%OCH<sub>3</sub>) ] / [ 2,584 (%C) - (%OCH<sub>3</sub>) ]

O = 3,3

Para OCH<sub>3</sub>: [ 9 (%OCH<sub>3</sub>) ] / [ 2,584 (%C) - (%OCH<sub>3</sub>) ]

OCH<sub>3</sub> = 1,3

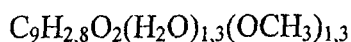
Então: C<sub>9</sub>H<sub>5,2</sub>O<sub>3,3</sub>(OCH<sub>3</sub>)<sub>1,3</sub>

A unidade C<sub>9</sub> da lignina de *A. urundeuva* apresenta uma massa molecular de 206,3 u..

Ao se observar os três álcoois precursores de ligninas, nota-se que ao retirar os oxigênios do grupo metoxila de todos eles resta um teor de oxigênio igual a dois átomos por unidade  $C_9$ . Então, quando se verifica a presença de uma quantidade maior que 2 oxigênios (que é o previsto teoricamente) [8], diz-se que tal excesso é devido à moléculas de água adicionadas durante o processo de formação da macromolécula de lignina.

Essas moléculas são adicionadas através de álcoois benzílicos, carbonilas  $\alpha$  e subestruturas pinorresinólicas, entre outras. Para madeiras moles, a quantidade adicionada é cerca de 0,3 a 0,5 mols de água/ $C_9$  e, para madeiras duras, é de 0,5 a 0,9 mols de água/ $C_9$  [84].

Então, rearranjando-se a fórmula mínima da LMM da *A. urundeuva* de modo a isolar 2 oxigênios, obtém-se:



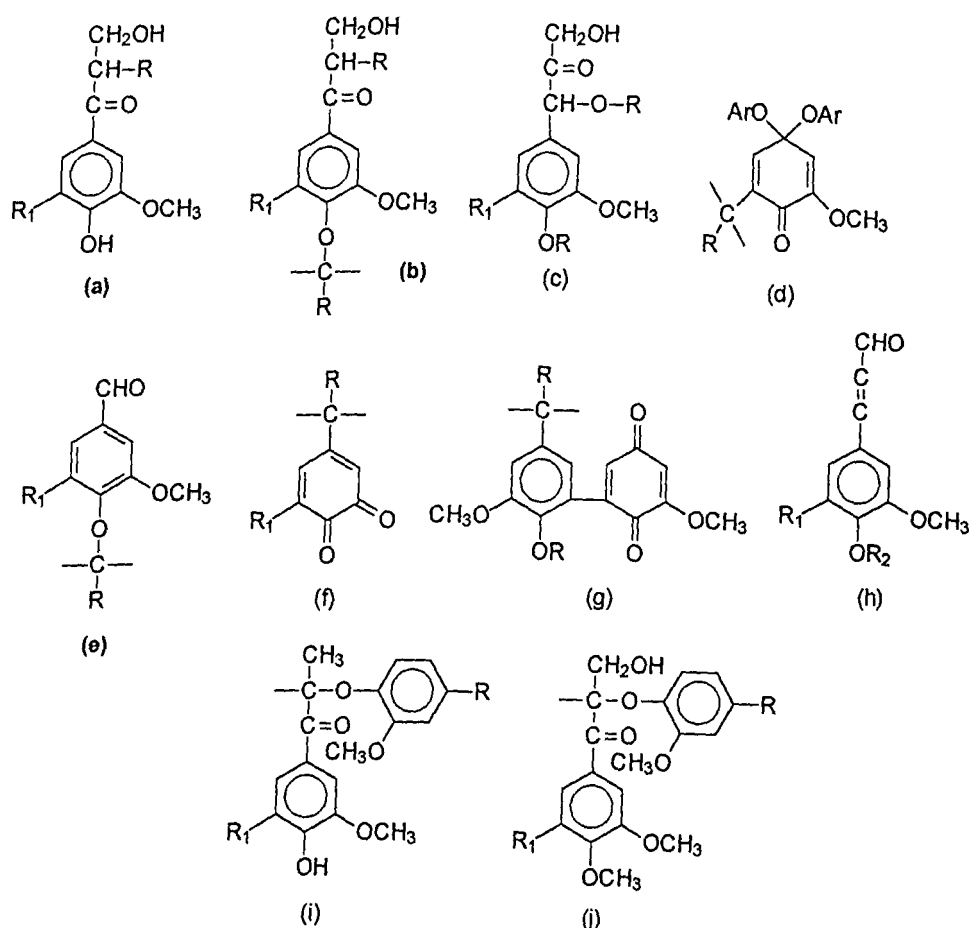
Esta fórmula mínima difere da fórmula mínima proposta por Freudenberg e Neish. Segundo eles, uma lignina pura deve ter fórmula mínima  $C_9H_{8-x}O_2(H_2O)_{<1}(OCH_3)_x$ , onde  $x$  é menor ou igual a 1,5. A partir da fórmula mínima pode-se deduzir que o conteúdo de oxigênio é demasiadamente alto e o teor de hidrogênio baixo. Isso significa que a LMM deve possuir contaminantes com um alto teor de oxigênios e baixo de hidrogênios, provavelmente, polifenóis.

Pode-se notar também através da fórmula obtida que o número de grupos metoxílicos por unidade  $C_9$  é maior que 1. Isso permite concluir que, durante a formação da macromolécula de lignina, houve a participação do álcool sinapílico (que possui 2 mols de metoxila/ $C_9$ ). Isso porque quando há participação apenas do álcool coniferílico, o teor de metoxilas/ $C_9$  deve ser igual a 1 e se o teor de metoxilas for menor que 1, indica que houve a participação do álcool p-cumarílico. Essas considerações indicam que a LMM da Aroeira-Preta é do tipo guaiacil-siringila, com aproximadamente 30 % de unidades siringila.

## 3.2.5 – Determinação de grupos carbonílicos

Os grupos carbonílicos ( $C=O$ ) podem estar ou não conjugados com o anel aromático nas ligninas. Estes grupos, juntamente com grupos hidroxila fenólicos, possibilitam a formação de sistemas conjugados que contribuem para a coloração, não só da própria lignina, como também de polpas de celulose contaminadas com lignina e resultantes dos processos sulfito, Kraft e organossolve [1, 85].

As carbonilas conjugadas estão presentes na posição  $\alpha$  ou em subestruturas cinâmlicas, enquanto que as localizadas na posição  $\beta$  estão sempre isoladas. A figura 3.3 apresenta as principais subestruturas que contêm carbonilas, tanto em LMM quanto em ligninas técnicas [7].



Onde: R e R<sub>2</sub> são cadeias de ligninas e R<sub>1</sub> = H ou OCH<sub>3</sub>

Figura 3.3: Possíveis subestruturas - presentes em ligninas - que contêm carbonilas

As subestruturas a, b, c, h, i e j são características da LMM, enquanto as ligninas técnicas contêm unidades benzaldeídicas (e) e derivados de quinonas (d, f e g).

O conteúdo total de carbonilas é determinado utilizando-se a reação de oximação e calculando a quantidade de nitrogênio adicionada após esta reação. Assim, a hidroxilamina reage com todos os tipos de carbonila presentes na macromolécula de lignina. A figura 3.4 representa a reação que ocorre.



Figura 3.4: Reação de oximação da lignina

Os resultados obtidos através da análise elementar da LMM oximada encontram-se na tabela 3.13, donde chega-se a um valor de 5,5 % de carbonilas totais.

Tabela 3.13: Análise elementar para LMM oximada.

%C	%H	%O <sup>(*)</sup>	%N
54,8	4,7	37,3	3,2

(\*) Valor obtido por diferença

Calculando-se também o teor de carbonilas por mol de metoxila e por unidade fenilpropílica, chegou-se ao seguinte resultado:

$$\text{C=O/OCH}_3 = 0,32$$

$$\text{C=O/C}_9 = 0,41$$

5,5 % da macromolécula da lignina da *A. urundeuva* é constituída de grupos carbonílicos, o que dá uma quantidade molar de 0,41 por unidade C<sub>9</sub>. Isso significa que, em cada 100 unidades C<sub>9</sub>, estão presentes 41 grupos carbonílicos.

A quantidade molar total de carbonila/C<sub>9</sub> tanto para madeiras duras quanto madeiras moles é descrita como variando em torno de 0,2/C<sub>9</sub> [77]. Concluímos

então, que para *A. urundeuva* o valor encontrado é bastante alto, chegando ao dobro do normalmente encontrado. Esse teor é muito importante pois há suposição de que a LMM está impregnada com polifenóis e estes possuem grupos carbonílicos em excesso.

### 3.2.6 – Determinação de grupos hidroxílicos

A presença de grupos hidroxílicos pode ser determinada por alquilação (formando éteres) ou por acilação (formando ésteres). Uma parte dos grupos hidroxílicos é fenólica e os demais possuem características alifáticas. Alguns do tipo alifático podem ser formados por enolização dos grupos carboxílicos.

Muitas das reações mais comuns da lignina envolvem ganho ou perda do grupo hidroxílico e por isso é importante a sua determinação [4].

As hidroxilas fenólicas podem ser responsáveis pela cor residual presente na polpa de celulose contaminada com lignina, resultante da polpação de madeiras. Nesse caso, essas hidroxilas propiciam a formação de derivados de quinonas e catecóis. As hidroxilas fenólicas, juntamente com os álcoois benzílicos, são responsáveis pela solubilização inicial de ligninas durante o processo Kraft [1]. Nos álcoois precursores de ligninas encontram-se uma hidroxila fenólica e uma alifática, estando esta última ligada ao carbono  $\gamma$ . Porém, os estudos de ligninas indicam que as hidroxilas fenólicas estão presentes em apenas 20 a 40% destes monômeros, evidenciando que a maioria foi eterificada durante o processo de polimerização.

#### 3.2.6.1 – Hidroxilas fenólicas

A determinação de hidroxilas fenólicas foi feita pelo método da titulação condutivimétrica, que oferece as vantagens de utilizar solventes aquosos neutros (facilitando a dissolução da amostra) e de ter a medida do ponto de equivalência facilitada. As reações envolvidas são de neutralização das hidroxilas fenólicas, por hidróxido de sódio.

A figura 3.5 mostra o gráfico obtido com a titulação. O ponto de interseção entre as duas retas indica o ponto de equivalência [7, 10]:

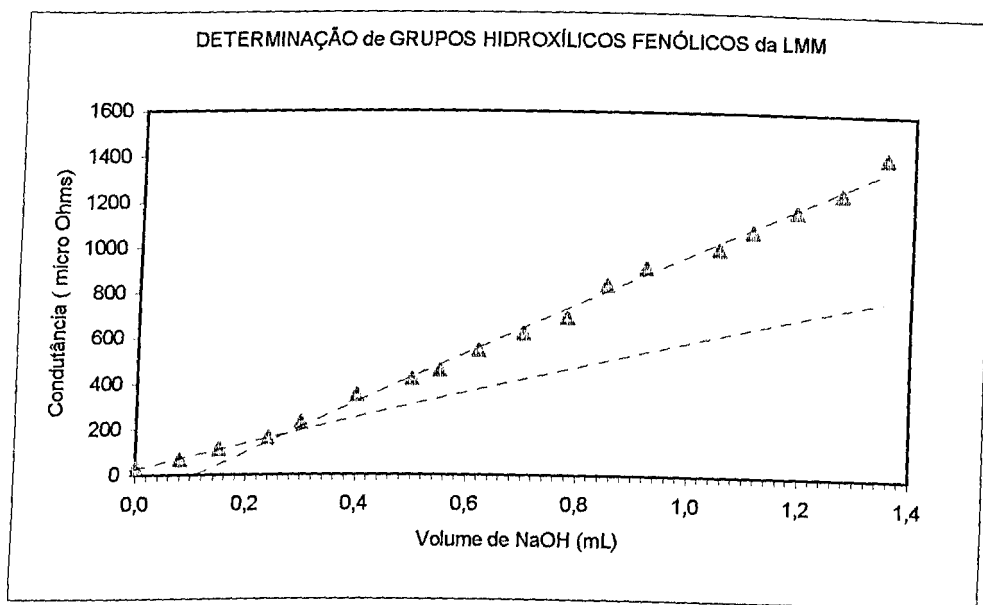


Figura 3.5: Gráfico da titulação condutivimétrica de hidroxilas fenólicas para a LMM da *A. urundeuva*.

Então:

Para a LMM: % OH =  $[0,558.0,27.1700] / 80,5 = 3,2 \%$  (equação 11, item 2.3.2.4)

Calculando-se o teor de hidroxilas fenólicas por unidade fenilpropílica chegou-se ao valor de 0,38 e o teor de hidroxilas fenólicas por mol de metoxilas é igual a 0,31 (equações 12 e 13, item 2.3.2.4).

A percentagem de OH igual a 3,2 % para ligninas é muito elevada, pois normalmente é menor que de 2 %. Isto indica que a lignina pode estar contaminada com polifenóis, ou que, durante o processo de isolamento da LMM, um pouco das ligações  $\alpha$ -O-4 ou  $\beta$ -O-4 foram hidrolizadas. Entretanto, o teor de 0,38 hidroxilas fenólicas por unidade fenilpropílica está dentro da faixa normalmente encontrada para ligninas, que fica entre 0,2 e 0,4 mol por unidade. Apesar disso, alguns autores afirmam que a quantidade de hidroxilas fenólicas na protolignina "*in situ*" é de aproximadamente 0,1 mol/C<sub>9</sub> e que a percentagem mais



alta seria devida ao processo de moagem a que a madeira é submetida inicialmente e que resulta na hidrólise de ligações  $\alpha$ -O-4 e  $\beta$ -O-4 [12, 86, 87].

É possível estimar a quantidade de hidroxilas fenólicas não conjugadas através da espectrometria no ultravioleta (UV) [88]. Esta quantificação é baseada no fato das hidroxilas fenólicas apresentarem efeito batocrômico no UV, em presença de solução alcalina. O espectro resultante da subtração entre o espectro do composto neutro e o ionizado é denominado espectro-diferença. Para ligninas, o espectro assim obtido exibe três máximos de absorção: aproximadamente em 250, 300 e 350-400 nm. O máximo em 250 nm corresponde à superposição de bandas e o máximo em 300 nm é característico de fenolatos não conjugados. A figura 3.6 mostra o espectro-diferença obtido para a *A. urundeuva*.

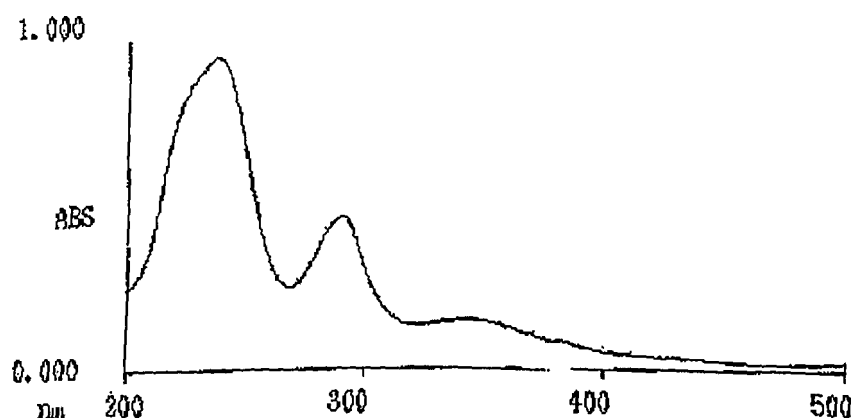


Figura 3.6: Espectro diferencial obtido para cálculo do teor de hidroxilas fenólicas não-conjugadas da LMM da *A. urundeuva*.

A determinação do teor de hidroxilas fenólicas não-conjugadas é feita utilizando-se a absortividade máxima no espectro diferença, levando-se em conta a lignina estudada em função de valores médios para absortividade molar, obtidos com a ajuda de espectros-diferença de compostos-modelo (equação 14).

O número de mols de hidroxilas fenólicas não-conjugadas por mol de grupos metoxílicos é fornecido pela equação 13. Utilizando os dados obtidos e as equações 13, 14 e 15 foram determinados os resultados mostrados na tabela 3.14.

Nesta tabela estão incluídos também os resultados para hidroxilas fenólicas conjugadas, os quais foram obtidos por diferença entre o teor de hidroxilas fenólicas totais e hidroxilas fenólicas não-conjugadas.

Tabela 3.14: Resultados obtidos na determinação de hidroxilas fenólicas não-conjugadas.

Tipo de hidroxila fenólica	% OH fenólico	OH <sub>fen</sub> /C <sub>9</sub>	OH <sub>fen</sub> /OCH <sub>3</sub>
OH <sub>fen</sub> total	3,20	0,38	0,31
OH <sub>fen</sub> não-conjugado	0,19	0,022	0,018
OH <sub>fen</sub> conjugado (por diferença)	3,01	0,36	0,29

Em resumo, pode-se dizer que para cada 100 unidades fenilpropílicas, 38 possuem hidroxilas fenólicas, das quais aproximadamente 36 são conjugadas e 2 não o são.

O resultado de 36 unidades de OH<sub>fenólico</sub> conjugado pode ser devido à imprecisão do método que emprega um limitado número de compostos-modelo. Considerando que realmente a LMM da *A. urundeuva* possui 3,01 unidades de OH<sub>fenólico</sub> conjugadas, duas possíveis subestruturas com hidroxilas fenólicas conjugadas são apresentadas na figura 3.7.

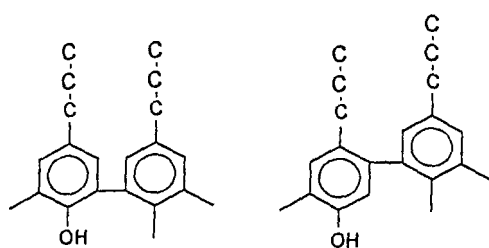


Figura 3.7: Duas subestruturas possíveis para as hidroxilas fenólicas conjugadas da *A. urundeuva*.

A presença de polifenóis contaminando a LMM também justificaria a presença das hidroxilas fenólicas conjugadas, uma vez que esses polifenóis se constituem de anéis aromáticos muitas vezes condensados, tais como: ácido elágico, crisina, taxifolina, genisteína, etc. [1].

## 3.2.6.2 – Hidroxilas alifáticas

Durante o processo de polimerização para formação da macromolécula de lignina, a maior parte das hidroxilas alifáticas (provenientes de seus precursores básicos que possuem OH alifáticos terminais ligados ao carbono  $\gamma$ ) permanece intacta, ao contrário do que ocorre com as hidroxilas fenólicas.

Isso significa que as hidroxilas alifáticas têm papel secundário na polimerização desidrogenativa de formação das ligninas. Entretanto, elas possuem papel importante no que se refere as suas propriedades, como solubilidade e propriedades adesivas [6, 8].

Além das hidroxilas dos carbonos  $\gamma$  da cadeia alifática das unidades fenilpropílicas, existe também a presença de hidroxilas ligadas aos carbonos  $\alpha$ . Já os carbonos  $\beta$  não apresentam hidroxilas livres.

Existem autores que acreditam que as ligninas “in situ” teriam pouquíssimas hidroxilas em carbonos  $\alpha$ . Provavelmente, há ligações benzil-arílicas do tipo  $\alpha$ -O-4 que sofreriam hidrólise durante a moagem da madeira, resultando nas hidroxilas benzílicas livres.

Na maioria dos casos, a porcentagem de hidroxilas alifáticas é determinada por diferença entre o conteúdo total de hidroxilas e o total de hidroxilas fenólicas. O teor de hidroxilas totais seria determinado pela reação de acetilação com anidrido acético:piridina, seguida da hidrólise dos acetatos formados na lignina acetilada e da titulação com hidróxido de sódio padrão do ácido formado. Entretanto, através desse método não foi possível obter resultado satisfatório para *A. urundeuva*. A hidrólise dos grupos acetílicos da LMM acetilada mostrou-se muito difícil, devido a pouca solubilidade dessa durante a reação de hidrólise.

Então, utilizou-se o espectro de ressonância magnética nuclear protônica acetilada (RMN  $^1\text{H}$ ) para determinar tanto o teor de hidroxilas totais quanto o teor de hidroxilas alifáticas.

A figura 3.8 mostra o espectro obtido.

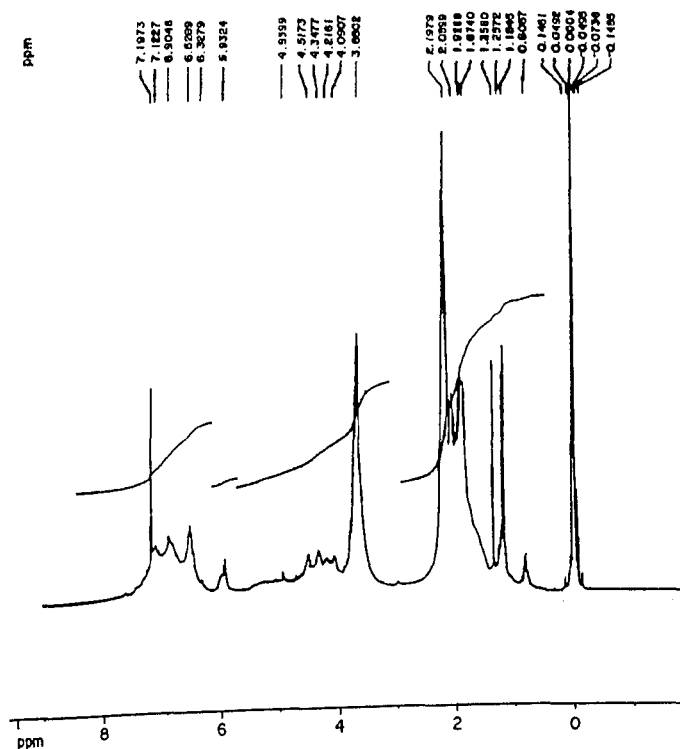


Figura 3.8: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  para LMM acetilada.

Através da integração dos sinais referentes a acetatos aromáticos (2,6-2,1  $\delta$ ) e acetatos alifáticos (2,1-1,5  $\delta$ ) e usando também o teor de hidroxilas fenólicas já conhecido, chegou-se aos seguintes resultados:

$$\% \text{OH}_{\text{alifático total}} = 4,8 \%$$

$$\% \text{OH}_{\text{total}} = 8,0 \%$$

Utilizando a equação 13 é possível calcular o teor de hidroxilas totais e alifáticas por mol de metoxilas. O seguinte resultado foi encontrado:

$$\text{OH}_{\text{alifático total}} / \text{OCH}_3 = 0,46$$

$$\text{OH}_{\text{total}} / \text{OCH}_3 = 0,77$$

Outras considerações acerca do espectro de RMN  $^1\text{H}$  serão feitas posteriormente.

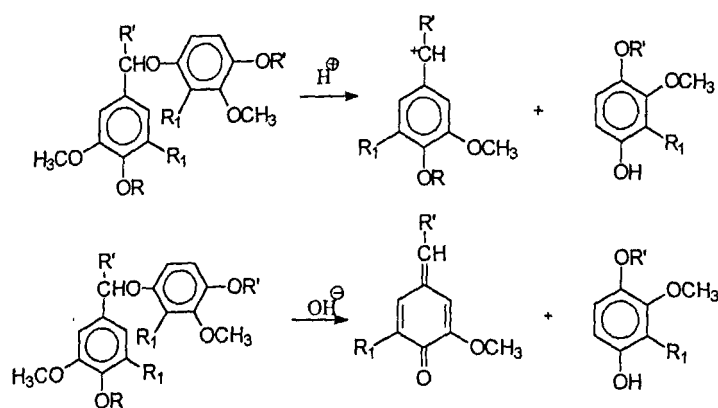
3.2.7 – Determinação das ligações  $\alpha$ -O-4 e  $\beta$ -O-4

A maior parte das ligações entre monômeros de lignina são do tipo alquil-áril (60-70%), mais especificamente chamadas de ligações  $\alpha$ -O-4 e  $\beta$ -O-4. A maioria dessas ligações só são hidrolisadas em condições rigorosas de reação. Por isso, o estudo de ligninas por degradação química não é muito fácil [6, 10, 89].

As ligações  $\alpha$ -O-4 e  $\beta$ -O-4 são formadas através do acoplamento de radicais específicos produzidos durante o processo de biopolimerização desidrogenativa, que leva à formação da macromolécula de lignina a partir dos álcoois precursores, conforme a figura 1.12.

Miksche, em 1972 [90], conseguiu demonstrar com seus experimentos que as ligações benzil-árilas  $\alpha$ -O-4, possuindo hidroxila fenólica livre no carbono 4 ( $C_4$ ), são seletivamente rompidas se submetidas a uma hidrólise com álcali diluído (solução de NaOH 0,1 M) à temperatura ambiente, durante 24 horas [89]. Já no caso do tratamento com ácido fraco (ácido acético 2 N), tanto as ligações eterificadas como aquelas que possuem uma hidroxila livre no  $C_4$  são hidrolisadas. Assim, as porcentagens dessas ligações podem ser determinadas medindo-se o aumento de hidroxilas fenólicas livres, resultante dos tratamentos descritos acima.

As reações envolvidas nesse processo são esquematizadas na figura 3.9.



Meio ácido: R' = cadeia de lignina; R = H ou cadeia de lignina; R<sub>1</sub> = H ou OCH<sub>3</sub>

Meio básico: R' = cadeia de lignina; R = H; R<sub>1</sub> = H ou OCH<sub>3</sub>

Figura 3.9: Hidrólise seletiva de ligações  $\alpha$ -O-4

de ligninas em meio ácido e básico, respectivamente.

Como mostrado na figura 3.9, em condições ácidas as subestruturas contendo ligações  $\alpha$ -O-4 são hidrolisadas formando novas hidroxilas fenólicas e ions benzílicos estabilizados pela deslocalização da carga positiva no anel aromático. Já em condições básicas (brandas), as subestruturas contendo uma hidroxila fenólica livre em C<sub>4</sub> são hidrolisadas, gerando derivados de quinonas e também novas hidroxilas fenólicas.

A hidrólise com álcali em condições severas (com solução de NaOH 2 N a 170 °C) propicia o rompimento tanto das ligações  $\alpha$ -O-4 quanto das  $\beta$ -O-4.

Neste trabalho foram realizadas as três hidrólises descritas acima, mas devido ao baixo rendimento da hidrólise alcalina branda, não foi possível obter resultado acerca do teor de ligações  $\alpha$ -O-4 com OH livre no C<sub>4</sub>.

As figuras 3.10 e 3.11 mostram os gráficos obtidos com as titulações condutivimétricas para determinação de ligações  $\alpha$ -O-4 totais e  $\alpha$ -O-4 e  $\beta$ -O-4 totais, respectivamente.

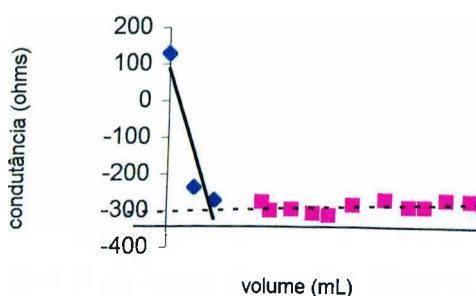


Figura 3.10: Gráfico da titulação condutivimétrica de hidroxilas fenólicas, após hidrólise ácida da LMM da *A. urundeuva*.

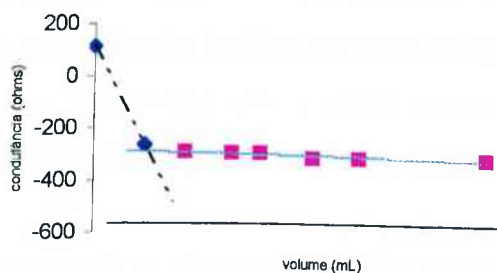


Figura 3.11: Gráfico da titulação condutivimétrica de hidroxilas fenólicas, após hidrólise alcalina severa da LMM da *A. urundeuva*.

A partir dos valores totais de hidroxilas fenólicas calculados antes e depois das respectivas hidrólises mencionadas acima, obtém-se por diferença as percentagens de hidroxilas formadas para cada reação. Da mesma forma, são calculadas também as quantidades molares por  $C_9$  e as quantidades por mol de metoxila. As relações utilizadas são as de número 11, 12 e 13, respectivamente. Os resultados obtidos estão relatados na tabela 3.15.

Tabela 3.15: Percentagens de hidroxilas fenólicas encontradas após diferentes tipos de hidrólise, para LMM da *A. urundeuva*.

	% OH <sub>fen</sub> total	OH <sub>fen</sub> /C <sub>9</sub>	OH ( $\alpha$ -O-4)/ C <sub>9</sub>	OH ( $\alpha$ -O-4 + $\beta$ -O-4)/C <sub>9</sub>
Início	3,20	0,38	0,38	0,38
Após hidrólise ácida	3,74	0,45	0,07	-
Após hid. alcalina severa	10,54	1,27	-	0,82

Através desses resultados, de cada 100 unidades fenilpropílicas tem-se um total de 7 unidades possuindo ligações  $\alpha$ -O-4 e 82 unidades possuindo ligações do tipo  $\alpha$ -O-4 +  $\beta$ -O-4.

Na literatura [1, 2, 6], o teor de ligações  $\alpha$ -O-4 para madeiras duras é de 6-8 % e de ligações  $\beta$ -O-4 é de cerca de 60 %. Observa-se o teor elevado de ligações  $\beta$ -O-4 para *A. urundeuva*, ao passo que as ligações  $\alpha$ -O-4 estão dentro do descrito para madeiras duras.

A soma das hidroxilas fenólicas provenientes da hidrólise das ligações  $\alpha$ -O-4 +  $\beta$ -O-4 e fenóis livres somam 120/100 unidades  $C_9$ . Isso sugere que há presença de mais de uma hidroxila fenólica por anel aromático, o que é evidente em polifenóis. Portanto, é provável que a LMM possua polifenóis que estão associados a ela ou por ligação ou por interação ou apenas como contaminante de difícil separação.

Deve-se salientar que a associação lignina-carboidrato (hemiceluloses) formando um complexo onde a lignina e as hemiceluloses estão ligados, já é bastante citado na literatura [1]. Alguns exemplos são mostrados na figura 3.12.

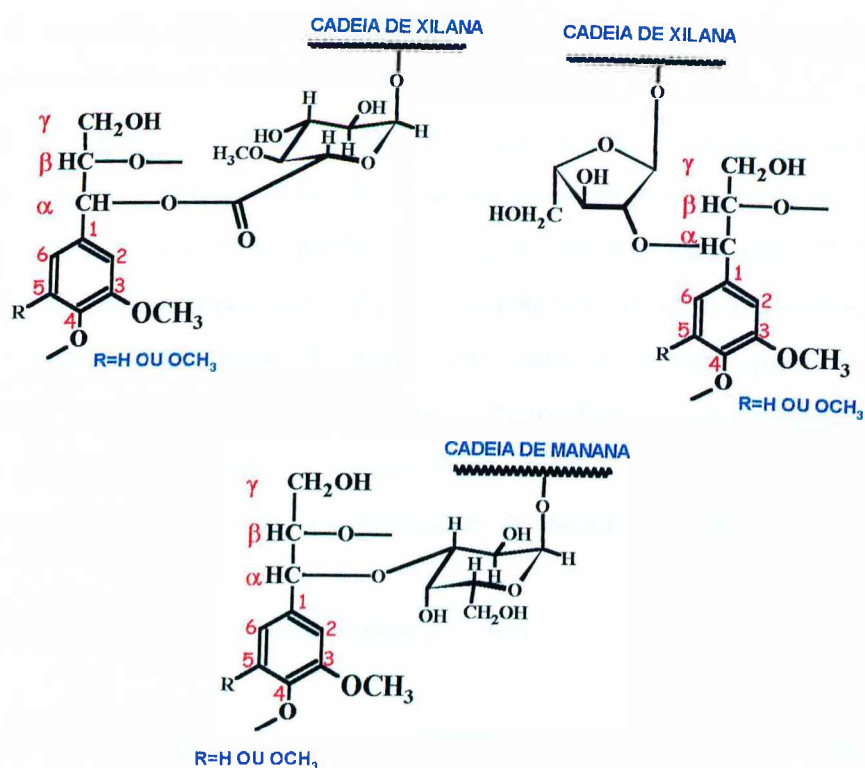


Figura 3.12: Exemplos de associação entre ligninas e hemiceluloses.

### 3.2.8- Determinações relativas de unidades siringílicas e guaiacílicas.

O teor de grupos metoxílicos de uma lignina pode ser usado para analisar a relação entre os teores de grupos guaiacílicos e siringílicos que a mesma possui. Para isso, é necessário lembrar que para cada unidade guaiacílica, o número de metoxilas é igual a um e, para cada unidade siringílica, o número de metoxilas é igual a dois.

Como a quantidade molar de metoxilas por unidade fenilpropílica é igual a 1,3 para *A. urundeuva* (item 3.2.4), substituindo-se esse valor na equação 16, encontra-se um valor de 70 % de grupos guaiacílicos, em relação ao total destas duas unidades (ou seja, entre 100 % de grupos guaiacílicos e siringílicos, 70 % corresponde aos guaiacílicos e 30 % aos siringílicos).

A variabilidade nos teores de grupos guaiacílicos, siringílicos e p-hidroxifenílicos é muito mais observada em madeiras duras do que em madeiras



moles. O conteúdo de grupos siringílicos de madeiras duras típicas (ou seja, ligninas Guaiacil-Siringil – GS) varia entre 20 e 60 % [2].

Isso significa que, para a LMM da *A. urundeuva*, o teor encontrado está dentro do intervalo previsto na literatura, apesar de serem mais comuns teores em torno de 50 % G e 50 % S para madeiras de *Eucalyptus* de clima tropical [77].

Esse resultado mostra que o teor de siringila não serve para classificar uma madeira quanto a sua dureza. Se assim fosse, seria de esperar que a Aroeira apresentasse um teor muito alto de grupos metoxílicos e, conseqüentemente, unidades siringílicas. Portanto, a dureza dessa madeira deve estar associada a outros fatores, entre eles a elevada porcentagem de extrativos polifenólicos.

### 3.2.9 – Distribuição de massas moleculares [77, 91]

Para compreender melhor as propriedades de ligninas, é necessário um método apropriado para estimar sua massa molecular (MM) ou a distribuição de massas moleculares [77, 91].

As distribuições de massas moleculares podem ser expressas de várias formas, cada uma apresentando um significado físico diferente. As principais são: massa molecular média numérica ( $\overline{MM}_n$ ), média em peso ( $\overline{MM}_w$ ) e média em peso Z ( $\overline{MM}_z$ ).

Para a macromolécula de lignina de madeira moída da *A. urundeuva* acetilada, através da análise de cromatografia por permeação de gel (CPG), obteve-se o cromatograma mostrado na figura 3.13 e os resultados descritos na seqüência.

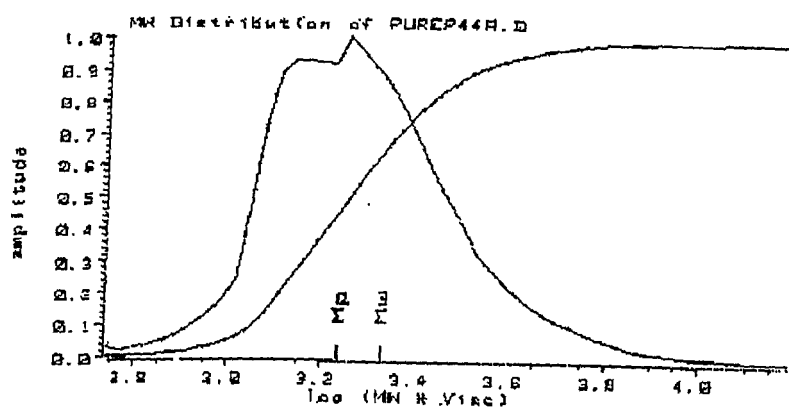


Figura 3.13: GPC da lignina de madeira moída da *A. urundeuva*.

$$\overline{MM}_n = 1.763 \text{ u.}$$

$$\overline{MM}_w = 2.181 \text{ u.}$$

$$\overline{MM}_z = 2.906 \text{ u.}$$

Polidispersão: 3,5

$$M_p = 1.765$$

$$M_w/M_n = 1,24$$

$$M_z/M_w = 1,33$$

O valor encontrado de 2.181 u. para  $\overline{MM}_w$  da LMM de *A. urundeuva* é bem inferior ao relatado para outras espécies, onde varia entre 13.400 e 22.000 u. [77, 91].

O principal fator que pode ter contribuído para o baixo valor da MM para LMM é a baixa solubilidade dessa lignina (mesmo acetilada) em THF. Assim, a fração de LMM acetilada solúvel pode ter dissolvido apenas os fragmentos menores. Outra possibilidade é que os polifenóis que a constituem tenham influenciado nesse resultado, pois são facilmente acetiláveis e por isso mais solúveis.

#### 3.2.10 – Oxidação da LMM com nitrobenzeno

A oxidação de ligninas com nitrobenzeno em solução alcalina foi introduzida por Freudenberg e colaboradores em 1939, com o objetivo de se obter mais evidências da natureza aromática da lignina, que já havia sido estabelecida pela oxidação com permanganato de potássio em 1936 pelos mesmos pesquisadores [8, 12].

Na oxidação com nitrobenzeno, madeiras moles comuns e suas ligninas levam à formação da vanilina como produto principal, numa faixa de 24-28 % de rendimento. Além da vanilina, quantidades insignificantes de p-hidroxibenzaldeído e siringaldeído podem ser obtidas. Para madeiras duras, é comum encontrar vanilina e siringaldeído como produtos principais. Para o caso

de gramíneas, os três produtos citados acima são obtidos como produtos principais.

A oxidação com nitrobenzeno é importante tanto em termos de caracterização da lignina (fornece informações acerca das quantidades mínimas e das quantidades relativas de unidades não condensadas de p-hidroxifenil, guaiacil e siringilpropano presentes na lignina) quanto em termos da taxonomia vascular das plantas. Alguns produtos da oxidação da lignina são mostrados na figura 3.14.

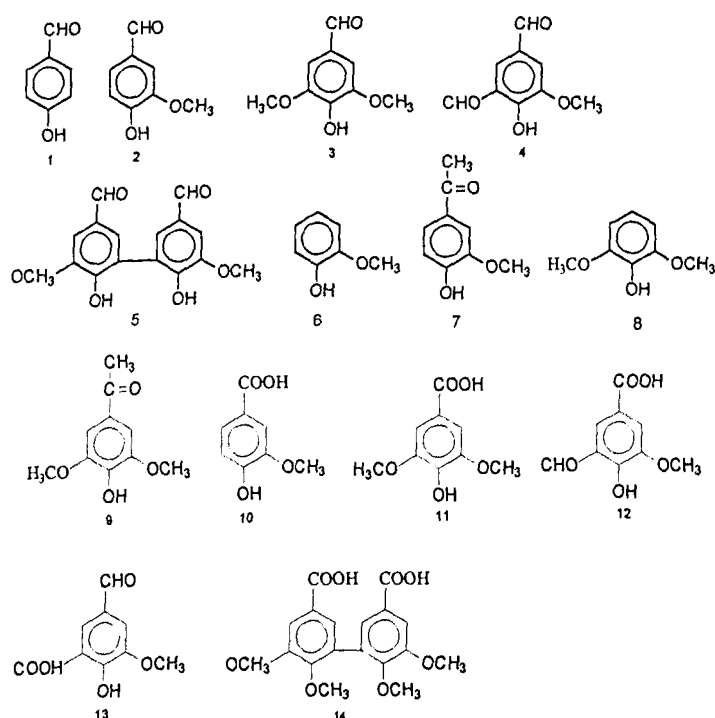


Figura: 3.14: Produtos da oxidação da lignina (1-p-hidroxibenzaldeído; 2- vanilina; 3-siringaldeído; 4- 5-formilvanilina; 5- desidrovaniлина; 6- guaiacol; 7- acetoguaiacona; 8-siringol; 9- acetosiringona; 10- ácido vanílico; 11- ácido siringílico; 12- ácido 5-formilvanílico; 13- 5-carboxivanilina; 14- ácido desidrodiverátrico )

O mecanismo de reação para oxidação de ligninas com nitrobenzeno ainda não é bem entendido. Por exemplo, estudos mostram que embora o nitrobenzeno em solução alcalina tenha sido descrito como um oxidante que transfere dois elétrons, investigações mais recentes relatam que o nitrobenzeno age transferindo apenas um elétron [12].

A figura 3.15 mostra o cromatograma obtido com a oxidação da LMM.

Os tempos de retenção para a vanilina, p-hidroxibenzaldeído, siringaldeído e benzofenona (padrão interno), quando injetados nas condições especificadas e no programa utilizado nesse trabalho (item 2.3.2.7), estão mostrados na tabela 3.16.

Tabela 3.16: Tempos de retenção para os padrões da oxidação da LMM com os padrões

Padrões	t. de retenção(min )
p-hidroxibenzaldeído	31,050
Vanilina	41,967
Benzofenona	46,000
Siringaldeído	48,233

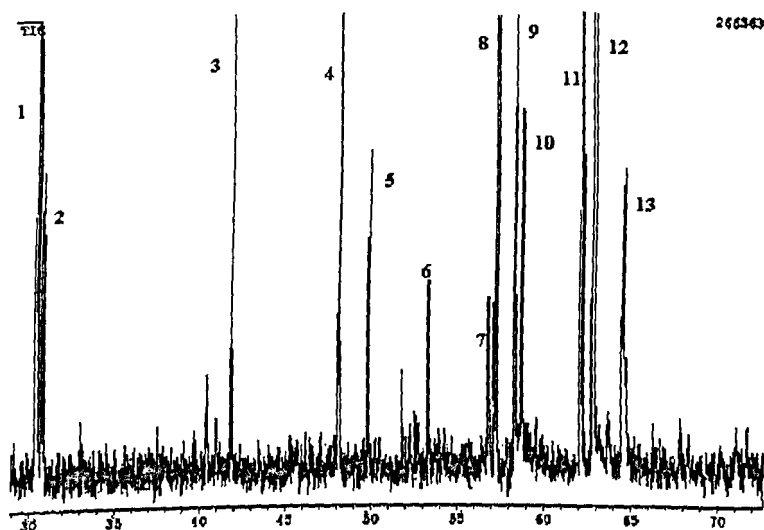


Figura 3.15: Cromatograma dos produtos da oxidação da LMM da *A. urundeuva* com nitrobenzeno.

A oxidação de madeiras moles produz como principal produto a vanilina. Para madeiras duras (e suas ligninas) a vanilina e o siringaldeído constituem os produtos principais e em ambos os tipos de madeira quantidades menores de outros produtos também são encontrados [12].

Para *A. urundeuva* foram encontrados vanilina e siringaldeído (picos 3 e 4 respectivamente) bem como diversos outros produtos que, ao contrário do que se esperava, estavam em concentrações maiores que os produtos principais.

A tabela 3.17 relaciona os picos assinalados na figura 3.15 com os produtos correspondentes a eles, segundo o banco de dados da biblioteca do equipamento de CG/EM, o qual possui 140 mil espectros de massas de compostos padrões.

Tabela 3.17: Compostos encontrados no cromatograma dos produtos da oxidação da LMM com nitrobenzeno.

Pico (fig. 3.19)	Tempo de retenção	Composto	Índice de similaridade	Composto (fig. 3.17)
1	30,367	?	-	-
2	30,742	p-hidroxibenzaldeído	70	1
3	41,833	Vanilina	82	2
4	48,100	Sirigaldeído	80	3
5	49,817	Ácido vanílico	-	10
6	53,308	?	-	-
7	56,833	?	-	-
8	57,283	Ácido siringílico	69	11
9	58,342	Ácido 3,4-diidroxi-benzóico	-	-
10	58,742	?	-	-
11	62,150	?	-	-
12	62,842	Ácido 3,4-diidroxi-benzóico	-	-
13	64,567	Desidro-p-benzaldeído	-	-

Os resultados mostram que a *A. urundeuva* é uma madeira incomum e pode ser considerada uma exceção à regra, como os gêneros *Welwitschia*, *Ephedra*, *Gnetum*, *Tetraclinis* e *Podocarpus*, que são madeiras moles e possuem como produto principal de oxidação vanilina e siringaldeído [12]. Isso porque além dos produtos esperados para oxidação da LMM da *A. urundeuva* (vanilina e

siringaldeído) foram encontrados vários outros picos, e entre eles o referente ao p-hidroxibenzaldeído que, nessas concentrações, aparece em ligninas de gramíneas. Outros picos referentes a compostos que deveriam ter concentração inferior aos picos dos produtos principais apareceram em altas concentrações [2].

### 3.2.11 – Análise da LMM e dos extrativos da madeira de *A. urundeuva* por métodos espectroscópicos e cromatográficos

O infravermelho com transformada de Fourier e as ressonâncias magnéticas nucleares estão dentre os métodos físicos mais aplicados ao estudo de ligninas [10, 92, 93].

#### 3.2.11.1 - Infravermelho com transformada de Fourier

A principal utilização da espectroscopia no IV está relacionada à análise qualitativa de grupos funcionais. Para este tipo de análise, é relatado em literatura que as ligninas possuem absorção característica em torno de  $1500\text{ cm}^{-1}$  aproximadamente constante, fazendo com que essa banda seja usada como padrão interno para a determinação empírica da quantidade de metoxilas presentes na lignina.

Já no caso do IVTF, por ser uma técnica mais moderna, possibilita a determinação de outros grupos funcionais presentes em macromoléculas de ligninas. A caracterização desses grupos se faz principalmente por comparação com dados tabelados [12, 92-98] resultantes do estudo de compostos-modelo e ligninas com grupos funcionais já bem caracterizados por métodos químicos.

A tabela 3.18 mostra as principais atribuições referentes às bandas de absorção no IV para ligninas [12, 92, 95, 97].

Tabela 3.18: Atribuições para absorções de lignina no IV.

Madeiras moles	Madeiras duras	ATRIBUIÇÕES
Comprimento de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )		
3400	3400	grupos hidroxílicos
3000	3000	C-H aromático
2936	2936	C-H alifático
2850	2850	C-H alifático
1720-1700	1720-1690	C=O não conjugada
1675-1660	1660-1650	C=O conjugadas
1605	1600	C-C anéis aromáticos
1515-1510	1505-1510	C-C anéis aromáticos
1470-1460	1470-1460	C-H grupos metílicos
1430-1415	1430-1415	C-C anéis aromáticos C-H grupos metílicos
-	1330-1325	C-O anéis aromáticos OH álcoois prim. e sec.
1270	1275	C-O anéis guaiacílicos
-	1240-1230	C-O anéis siringílicos C-O anéis guaiacílicos
1140	1140-1120	C-H anéis guaiacílicos C-H anéis siringílicos
1085	1085	C-O álcoois secund. C-O éteres alquil-arila
1035	1035-1030	C-O éteres alquílico C-O éteres alquil-arila C-O álcoois primários C-H anéis guaiacílicos
865-815	915-815	C-H aromáticos

A figura 3.16 mostra os espectros de IVTF para a LMM e para o extrato metanólico e a figura 3.17 o espectro referente ao extrato aquoso.

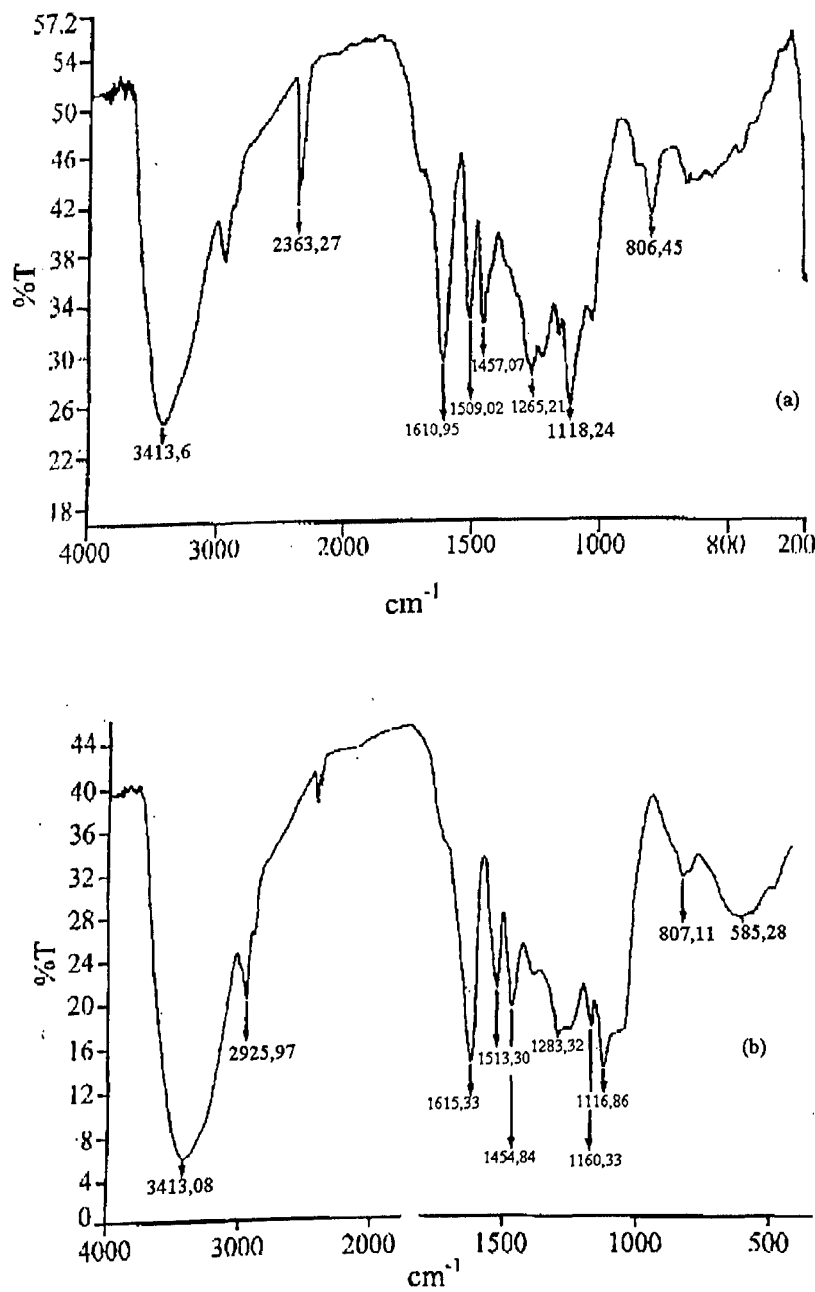


Figura 3.16: Espectros de IVTF para: (a) LMM e (b) extrato metanólico



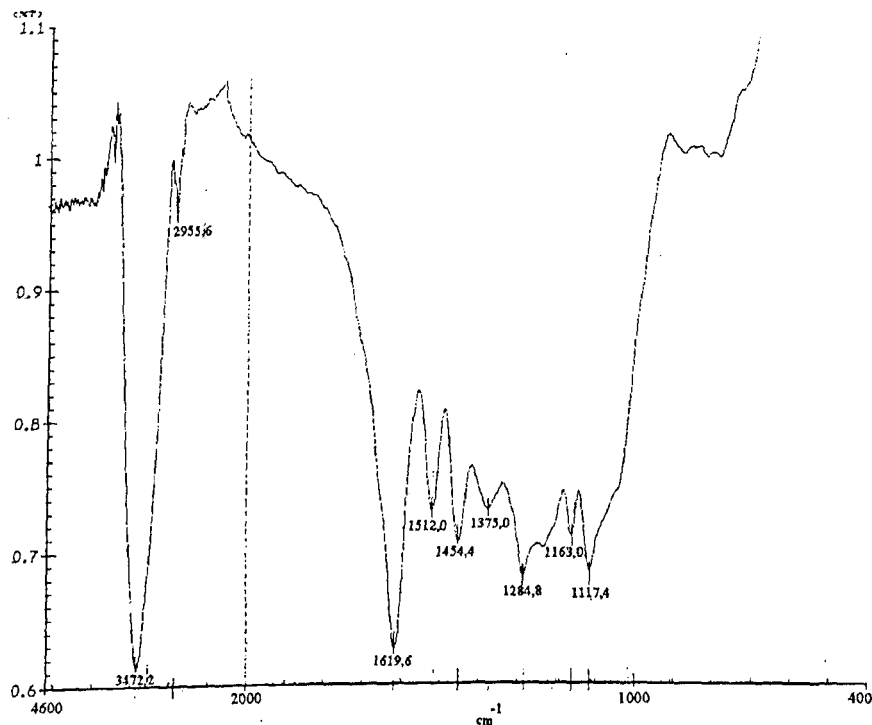


Figura 3.17: Espectro de IVTF para o extrato aquoso.

No espectro da LMM da *A. urundeuva* tem-se uma grande banda de absorção a  $3413,6\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento dos grupos hidroxila livres e, em  $2940,3\text{ cm}^{-1}$ , uma banda referente ao estiramento de ligações C-H de grupos metílicos e metilênicos. A banda em  $1716,3\text{ cm}^{-1}$  é característica de carbonilas não-conjugadas.

As bandas a  $1610,9$  e  $1502,0\text{ cm}^{-1}$  são referentes ao estiramento dos carbonos do esqueleto aromático e também à deformação axial de ligações C=O. Em  $1457,0\text{ cm}^{-1}$ , tem-se a banda referente à deformação angular assimétrica das ligações C-H em grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ .

A banda em  $1380,4\text{ cm}^{-1}$  refere-se ao estiramento de C-H alifático em  $\text{CH}_3$ . A banda em  $1263,1\text{ cm}^{-1}$  é referente à deformação de anéis guaiacílicos e estiramento de C=O.

Em  $1226,3\text{ cm}^{-1}$  tem-se o estiramento de ligações C-O, C-C e C=O e a indicação de que os anéis guaiacílicos condensados existem em maior quantidade que os anéis guaiacílicos eterificados.

A banda em  $1166,5\text{ cm}^{-1}$  é característica de ligninas hidroxifenil-guaiacil-siringílicas, o que reforça o resultado obtido na oxidação da LMM com

nitrobenzeno, onde foram obtidos picos referentes aos três álcoois precursores da lignina oxidados.

Em  $1128,0\text{ cm}^{-1}$  apresenta-se a banda referente à deformação de ligações C-H de aromáticos no plano, típico de grupos siringílicos.

A banda em  $1038,3\text{ cm}^{-1}$  é devida à deformação de C-H aromático no plano e sua intensidade indica que os grupos guaiacílicos existem em maior quantidade que os grupos siringílicos, reforçando a relação G/S obtida para essa madeira (item 3.2.8).

A banda em  $1600\text{ cm}^{-1}$  possui intensidade constante nas três amostras analisadas (figura 3.18). A banda em  $1500\text{ cm}^{-1}$  diminui sua intensidade à medida que aumenta o teor de extrativos. Moraes e Nascimento [99] citam que a relação entre essas bandas pode ser utilizada para determinar o teor de extrativos nas amostras. Quanto maior a relação entre as duas bandas, maior o conteúdo de extrativos. Pelos espectros analisados, o extrato aquoso possui o maior conteúdo de extrativos (relação  $1600/1500\text{ cm}^{-1} = 2,3$ ). O extrato metanólico possui essa mesma relação igual a 1,5, indicando que possui uma quantidade de extrativos menor em relação ao extrato aquoso. Esse resultado pode ser confirmado pelo teor de grupos metoxílicos calculados para cada um desses extratos (tabela 3.8). O extrato aquoso, por possuir maiores características de extrativos polifenólicos, possui um teor de grupos metoxílicos inferior ao calculado para o extrato metanólico.

O extrato metanol-aquoso apresenta um aumento do sinal de deformação axial de C-O ( $1288,0\text{ cm}^{-1}$ ) e também do sinal referente ao estiramento das ligações dos carbonos do anel aromático em relação ao espectro da LMM. Isso é um indicativo de que nesse extrato existe uma maior condensação dos anéis aromáticos, ou seja, foram retirados da madeira polifenóis.

Observação semelhante pode ser feita para o extrato aquoso, que já é característico de um extrato polifenólico.

Desses três espectros é possível concluir que o espectro da LMM da Aroeira-preta é representativo de sua lignina devido ao perfil da banda na região de “impressão digital”. Já o espectro do extrato metanol-aquoso é característico de taninos, porém ainda um pouco contaminado com lignina. O espectro do extrato aquoso é característico de taninos.

### 3.2.11.2 – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN $^1\text{H}$ )

A espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$  pode ser usada para caracterização e classificação de ligninas e também para determinação de sua estrutura. Então, a partir do espectro de RMN  $^1\text{H}$  é possível obter um grande número de informações acerca de ligninas. Um dos primeiros estudos através dessa técnica foi feito por Ludwig [100]. Porém, muitas foram as melhorias implementadas por Lundquist e muitos são os estudos envolvendo RMN  $^1\text{H}$  de ligninas atualmente [12, 92, 93].

A principal vantagem da utilização do RMN  $^1\text{H}$  no estudo de ligninas está na possibilidade do cálculo, a partir do espectro, do número total de prótons ligados à cadeias alifáticas e aos núcleos aromáticos. Pode-se, ainda, obter uma estimativa do número de prótons metoxílicos. Devido à dificuldade de solubilização de ligninas nos solventes usualmente mais empregados para obtenção de espectros de RMN  $^1\text{H}$ , procede-se a sua acetilação. Uma vez acetilada a lignina, o derivado obtido torna-se bastante solúvel nos solventes orgânicos.

Os resultados de RMN  $^1\text{H}$  para LMM acetilada encontram-se na figura 3.18.

Os extrativos, mesmo acetilados, não foram solúveis o suficiente para fazer o estudo de RMN  $^1\text{H}$ . Até mesmo a LMM acetilada mostrou-se pouco solúvel, o que demonstra a natureza complexa tanto dos extrativos como da LMM obtida da madeira de *A. urundeuva*.

Importantes informações podem ser obtidas a partir do espectro mostrado na figura 3.18. Comparando-se os sinais referentes aos prótons aromáticos de unidades guaiacílicas (7,12 e 6,90  $\delta$ ) com aquele referente aos prótons de unidades siringílicas (6,53  $\delta$ ) nota-se que o primeiro sinal é maior do que o segundo. Esse resultado reafirma os dados obtidos no espectro de IVTF e no cálculo do teor de G/S, considerando 100 % dessas duas unidades.

No intervalo de 6,20 a 4,50  $\delta$  apresentam-se sinais de baixa intensidade, referentes a  $\text{H}_\alpha$  e  $\text{H}_\beta$  de subestruturas como unidades  $\beta$ -O-4 pino e siringoresinólicas (figura 3.19).

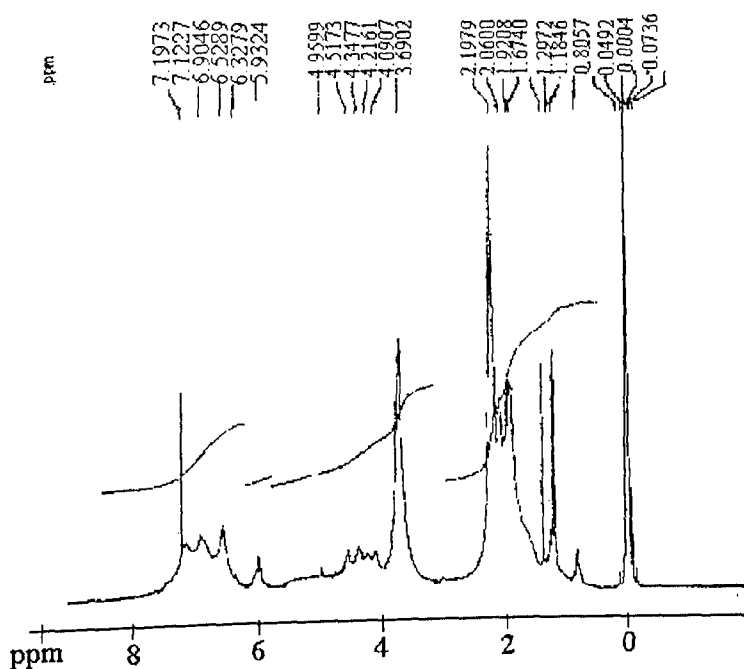


Figura 3.18: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  para LMM acetilada.

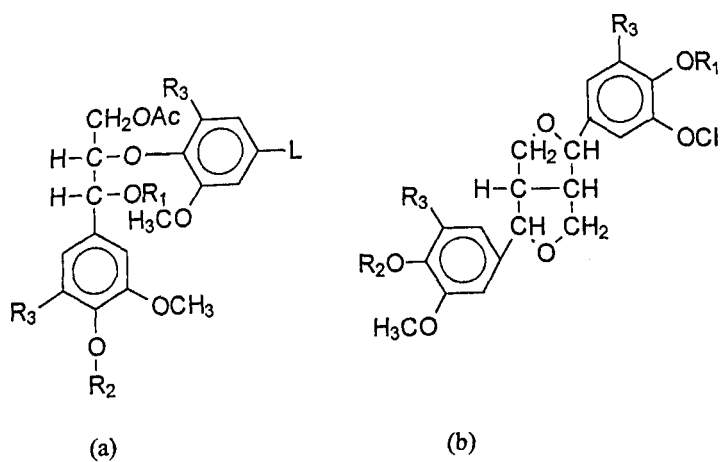


Figura 3.19: (a)  $\beta$ -O-4, onde:  $\text{R}_1$  ou  $\text{R}_2$  = grupo acetila ou cadeia de lignina;  $\text{R}_3$  = H ou  $\text{OCH}_3$ ; L = cadeia de lignina e (b) pino e siringorresinólica, onde:  $\text{R}_1$  e  $\text{R}_2$  = H ou cadeia de lignina,  $\text{R}_3$  = H ou cadeia de lignina.

O sinal em 3,68  $\delta$  é referente aos prótons metoxílicos. Sua porcentagem de 18,2 % muito se aproxima do teor encontrado para esse grupo por ensaios químicos (19 %).

Em 2,19  $\delta$  encontra-se o sinal referente aos acetatos de OH aromáticos e, em 1,87, 1,92 e 2,06  $\delta$ , sinais referentes aos acetatos de OH alifáticos. Esse grupo de sinais é o conjunto de maior intensidade em todo o espectro, excetuando-se o solvente. Através de sua integração e utilizando o teor de OH fenólico total da LMM, foi possível determinar o teor de OH alifático e também o conteúdo de OH total (item 3.2.6).

A tabela 3.19 mostra um resumo dos deslocamentos atribuídos para a *A. urundeuva* acetilada.

Tabela 3.19: Resumo das atribuições e porcentagens para os vários tipos de prótons da *A. urundeuva* acetilada.

Deslocamentos ( $\delta$ )	Atribuições	%
7,12; 6,90	Prótons aromáticos em unidades guaiacílicas	8,6
6,53	Prótons aromáticos em unidades siringílicas	5,5
6,32	H $\alpha$ em unidades $\beta$ -O-4	2,2
5,93	H $\alpha$ em estruturas $\beta$ -5 de fenil cumaranos, H $\alpha$ de subestruturas $\beta$ -O-4	2,9
4,52; 4,93	H $\beta$ de $\beta$ -O-4 (forma eritro) H $\alpha$ em pino e seringoresinol H $\beta$ de $\beta$ -O-4 (forma tréo)	5,7
4,09; 4,21; 4,34	H $\gamma$ em várias subestruturas	2,7
3,68	Prótons metoxílicos	18,2
-	H $\beta$ em subestruturas pino e siringorresinólicas	1,1
2,19	Acetatos aromáticos	18,58
1,87; 1,92; 2,06	Acetatos alifáticos	29,2
1,36; 1,26; 1,18; 0,81	Contaminantes alifáticos	5,4

3.2.11.3 – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ) em solução

Esta técnica permite a obtenção de dados mais detalhados a respeito da estrutura molecular das ligninas.

Os primeiros trabalhos usando esta técnica foram divulgados por Nimz e Lüdmann analisando a LMM da faia [89]. Nestes trabalhos foram usados compostos-modelo de ligninas para auxiliar a atribuição dos deslocamentos para esta madeira e para madeiras duras em geral.

A quantificação dos sinais de RMN  $^{13}\text{C}$  foi introduzido por Robert e Gagnaire em 1981 [101].

Estudos mais recentes têm contribuído com a elucidação de estruturas de materiais lignocelulósicos [12, 92, 93]

Neste trabalho será apresentado um estudo qualitativo de RMN  $^{13}\text{C}$ .

A figura 3.20 apresenta o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  obtido para a LMM. A análise deste espectro se baseará na tabela 3.20 [12, 77].

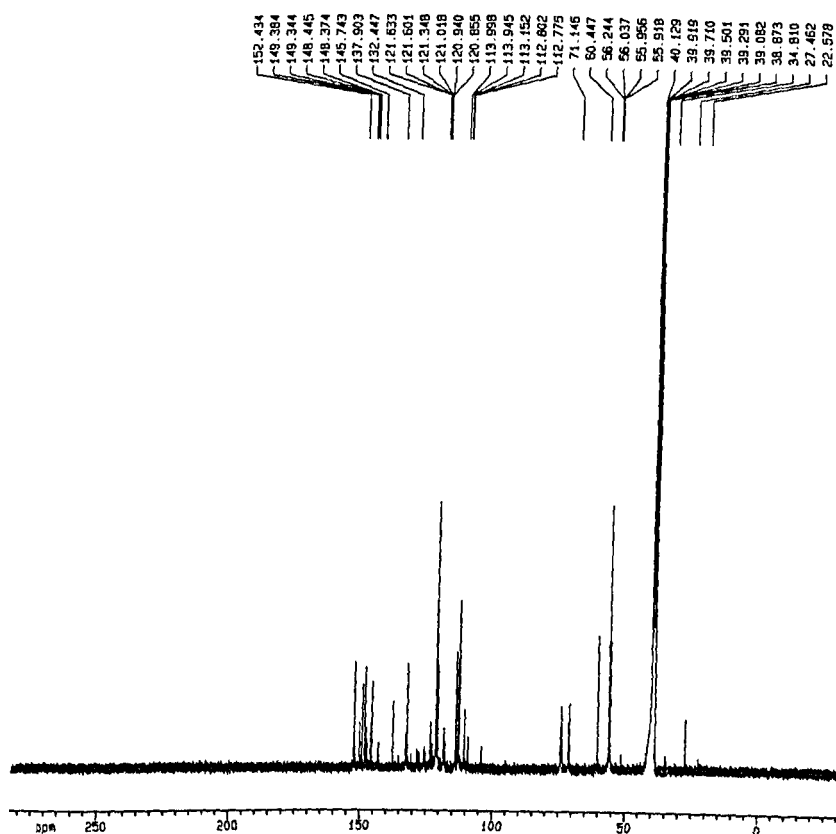


Figura 3.20: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da LMM não acetilada, em DMSO- $\text{d}_6$ .

Os sinais entre 34,8 - 22,6  $\delta$  indicam que ainda restam contaminantes, que podem ser por exemplo, cadeias carbônicas alifáticas longas.

Os picos médios estão compreendidos entre 60,4 e 55,9  $\delta$  e 121,6 e 120,9  $\delta$ . O primeiro grupo é correspondente a grupos metoxila de siringila e guaiacila eterificados ou não e C- $\gamma$  de ligações  $\beta$ -O-4 de siringilas ou guaiacilas eterificadas ou não, nas formas eritro ou tréo. O segundo grupo pode ser atribuído a C-6 de guaiacilas eterificados ou não e C-6 de subestruturas bifenílicas, que sabidamente são de difícil degradação [5, 85, 101].

Outras atribuições de média intensidade são as de 132,2  $\delta$ , correspondendo aos C-1 de guaiacila e siringila não eterificados; 145,7  $\delta$ , atribuído ao C-4 de guaiacilas não eterificadas; e 148,4 - 148,5  $\delta$ , atribuído ao C-4 de guaiacilas eterificadas, C-3 e C-5 de siringilas não eterificadas e C-3 de guaiacilas não eterificadas.

Os demais picos são de menor intensidade e seus deslocamentos são atribuídos a C- $\alpha$  de  $\beta$ -O-4 de siringila ou guaiacila na forma tréo e C- $\gamma$  de ligações  $\beta$ - $\beta$  de guaiacilas e siringilas eterificadas ou não. No intervalo de 112,2-115,2  $\delta$ , os deslocamentos são atribuídos a C-2 e C-5 de guaiacilas eterificadas e não eterificadas.

Entre 119,3 e 119,0  $\delta$ , o deslocamento corresponde ao C-6 de guaiacilas eterificadas ou não eterificadas.

A presença de C-1 em siringilas eterificadas está demonstrada pelo deslocamento em 137,9  $\delta$ . No intervalo 149,4-149,3  $\delta$  estão representados os C-3 de guaiacilas eterificadas. Por fim, C-3 e C-5 de siringilas eterificadas e C-3/C-5' de 5-5' estão presentes pelo sinal de deslocamento em 152,1  $\delta$ .

Os sinais a 121,6 - 121,0  $\delta$  podem corresponder, provavelmente, a C-6 de subestruturas bifenílicas eterificadas ou não e que podem também de alguma forma estar contribuindo para a maior resistência dessa madeira [5, 10, 85].

A presença de taninos (polifenóis) na LMM é confirmada pelo sinal de média intensidade a 145  $\delta$ . Normalmente, este sinal é fraco ou nem aparece em espectros de ligninas.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  mostrou ainda que a lignina não possui carboidratos como contaminantes, o que pode ser comprovado pela ausência do sinal entre 100 e 102  $\delta$ .

Os sinais em torno de 121  $\delta$  podem ser de C-6 de unidades bifenílicas [10, 85] ou, ainda, de C-2, C-5 e C-6 de procianidinas, o que indica que a LMM ainda pode estar contaminada por extrativos polifenólicos [83].

O sinal de baixa intensidade a 104  $\delta$ , devido aos C-2 e C-6 de unidades siringílicas, mostra que a solubilização da LMM em DMSO não foi boa.

Tabela 3.20: Atribuições dos sinais de RMN  $^{13}\text{C}$  para LMM de madeiras duras [12, 77].

Madeiras duras ( $\delta^{13}\text{C}$ )	<i>Astronium</i> <i>urundeuva</i>	Atribuições
193,6	-	$\alpha$ -CO e $\gamma$ -CHO
191	-	$\alpha$ -CHO
172	-	-C=CHO de ác. Carboxílicos alif.
169,6	-	-C=CHO de grupos acetílicos de xilanas.
152,9	-	C- $\alpha$ de Ar-CH=CH-CHO
152,9 – 152,2	152,1	C-3/C-5 de Se, C-3/C-5' DE 5-5'
149,5 – 149,2	149,4	C-3 de Ge
	149,3	
147,7 – 146,5	148,5	C-4 de Ge, C-3/C-5 de Sne, C-3 de Gne
	148,4	
145,5	145,7	C-4 de Gne
143,2	-	C-4' de subestr. Fenilcumarânicas ( $\beta$ -5)
		C-4/C-4' de 5-5'
138	137,9	C-1 de Se
136,1	-	C-4 de Se
135,6 - 135,0	-	C-1 de Ge, C-4 de Sne
132,2	132,2	C-1 de Gne, C-1 de Sne
130 - 128	-	C- $\alpha$ /C- $\beta$ em Ar-CH=CH-CH <sub>2</sub> OH
		C- $\beta$ em Ar-CH=CH-CHO
		C-2/C-6 de Hne, -CH=CH- de olefinas



	121,6	
	121,6	
-	121,4	Estruturas bifenílicas
	121,0	
119,3 - 119,0	120,9	
	120,9	C-6 de Ge e Gne
	114,0	
115,8 - 114,6	113,9	C-5 de Ge e Gne
	113,2	
112,2	-	C-2 de Ge e Gne
		C-2/C-6 de Se e Gne
106,8 - 103,5	-	C-2/C-6 de Se e Gne com $\alpha$ -C=O
101,9 - 101,6	-	C-1 de xilanas
87 - 86,2	-	C- $\beta$ de B-O-4 de S (forma eritro)
84,6 - 84	-	C- $\beta$ de B-O-4 de G (forma eritro)
76 - 73	-	C-2/C-3/C-4 de xilanas
		C- $\alpha$ de B-O-4 de S (forma eritro)
73,3 - 72,4	-	C- $\alpha$ de B-O-4 de G (forma eritro)
		C- $\alpha$ de B-O-4 de S ou G (forma Tréo)
71,6	71,2	C- $\gamma$ de $\beta$ - $\beta$ de G e S
		C- $\gamma$ de $\beta$ -O-4 de G com $\alpha$ -C=O
62,9 - 62,6	-	C- $\gamma$ de $\beta$ -5 e $\beta$ -1 de G e S
	60,5	
60,3	56,2	C- $\gamma$ de $\beta$ -O-4 de G ou S (formas eritro e tréo)
	56,0	
56	55,9	OCH <sub>3</sub> de G e S
54,2 - 53,8	-	C- $\beta$ de $\beta$ - de G e S
	40,1	C- $\beta$ de $\beta$ -5 de G e S
53,5	39,8 a 22,6	C- (contaminante alifático)
20,9	-	-CH <sub>3</sub> de grupos acetílicos de xilanas

Onde: Se, Ge = Unidades siringílicas e guaiacílicas eterificadas

Sne, Gne = Unidades siringílicas e guaiacílicas não eterificadas

S, G = Unidades siringílicas e guaiacílicas eterificadas ou não.

Foram obtidos também espectros para o extrato metanólico (figura 3.21) e extrato aquoso (figura 3.22).

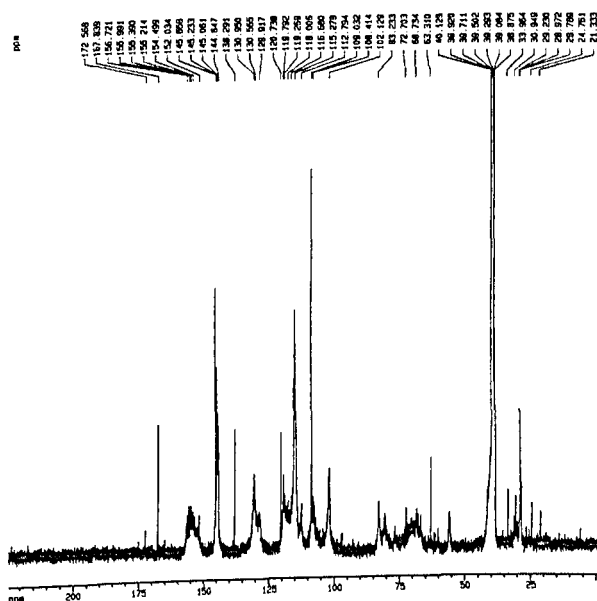


Figura 3.21: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para uma amostra de extrato metanólico, em DMSO- $\text{d}_6$ .

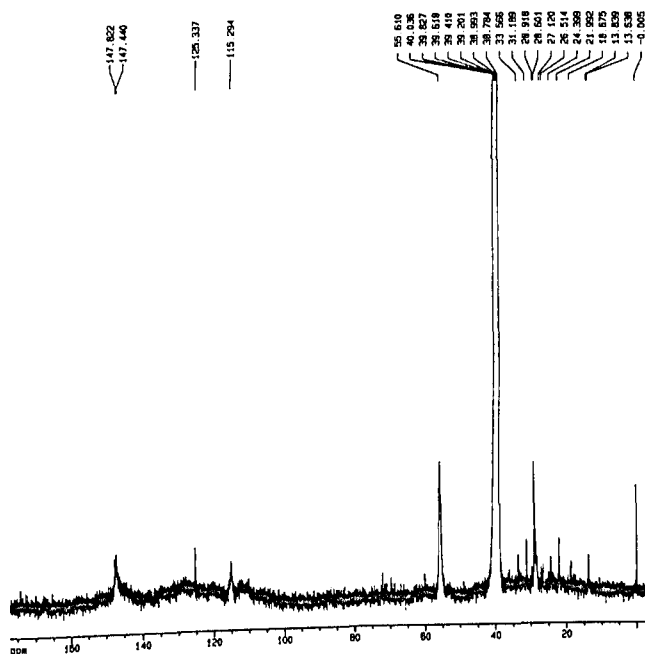
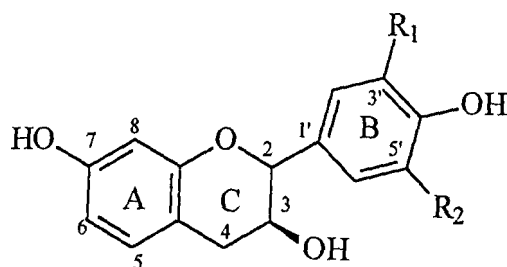


Figura 3.22: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para uma amostra de extrato aquoso, em DMSO- $\text{d}_6$ .

Pelos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  pode-se concluir que ambos contêm, fundamentalmente, polifenóis.

O extrato aquoso foi pouco solúvel e, por isso, o espectro não está bom. Sua análise será pormenorizada quando da análise de RMN  $^{13}\text{C}$  no estado sólido.

O extrato metanólico contém um pouco de lignina, que pode ser constatado por vários sinais de carbonos atribuídos aos deslocamentos químicos de ligninas, como, por exemplo, o sinal do carbono metoxílico a 56  $\delta$ . Entretanto, sua característica mais importante é o deslocamento em 102,82  $\delta$ . Este sinal é característico do carbono 8 do anel A de flavonóides [102]. Este deslocamento químico indica que a hidroxilação do anel A é do tipo resorcinol, isto é, somente o carbono 7 é hidroxilado. Este fato leva à conclusão de que as mais prováveis unidades monoméricas formadoras das proantocianidinas são o fisetidinol e o robinetidinol (figura 3.23).



R1 = OH, R2 = H; Fisetidinol

R1 = OH, R2 = OH; Robinetidinol

Figura 3.23: Prováveis constituintes monoméricos das proantocianidinas presentes no extrato metanólico.

No intuito de identificar qual dos monômeros ou se ambos estariam presentes no extrato metanólico, usaram-se os deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  relatados em literatura [102, 103] para o anel B. A tabela 3.21 apresenta estes deslocamentos e aqueles obtidos da figura 3.21. A análise da figura 3.23 mostra que ambas subestruturas poderiam estar presentes nos taninos condensados da *A. urundeuva*.

Tabela 3.21: Deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup>C para hidroxilação do anel B

Anel B	Átomo de carbono					
	1'	2'	3'	4'	5'	6'
3',4'-di-hidroxi	131,5 (132)	115,7 (115)	144,8 (145)	144,8 (145)	116,0 (116)	120,7 (120)
3',4',5'- tri-hidroxi	131,5 (132)	108,0 (108)	145,5 (146)	132,2* (133)	145,6 (146)	108,0 (108)

Os valores entre parêntesis são dados da literatura [102, 103] em (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO;  
os demais valores são médias obtidas da figura 3.22; \* não é média.

3.2.11.4- Ressonância Magnética de Carbono 13 no estado sólido (RMN <sup>13</sup>C-sólido).

A RMN <sup>13</sup>C no estado sólido é uma técnica experimental com grande potencial para caracterização de materiais como a madeira. Muitos estudos têm sido realizados, principalmente relacionados à lignina, à celulose e outros materiais de difícil solubilização [104-107].

Estes espectros são constituídos principalmente de bandas de absorção largas ao invés de bandas finas normalmente encontradas nos espectros de absorção de RMN <sup>13</sup>C em solução. As bandas largas são um reflexo da anisotropia do deslocamento químico que não é eliminada mesmo girando a amostra em altas rotações, imitando o comportamento das moléculas em solução. Apesar disso, a resolução obtida é suficiente para identificar vários componentes na madeira. Isso é exemplificado pela tabela 3.22.

Tabela 3.22: Deslocamentos e atribuições para RMN <sup>13</sup>C-sólido de ligninas [104]

Deslocamentos (δ-ppm)	Atribuições
180-220	Carbonos carbonílicos de aldeídos e cetonas
170-180	Grupos carboxílicos
120-160	Substituintes aromáticos da lignina
152-156	Carbonos aromáticos ligados a -OCH <sub>3</sub> e OH
105	C1 anomérico
60-100	Carbonos alifáticos ligados a oxigênio (C-O-C e C-OH)
55-60	Substituintes metoxílicos
20-30	Grupos metílicos e metilênicos

Neste trabalho foram obtidos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  - sólido para madeira de *A. urundeuva* bruta, LMM, LK, holocelulose, extratos aquoso e metanólico e os mesmos são mostrados nas figuras 3.24 a 3.28 e 3.30.

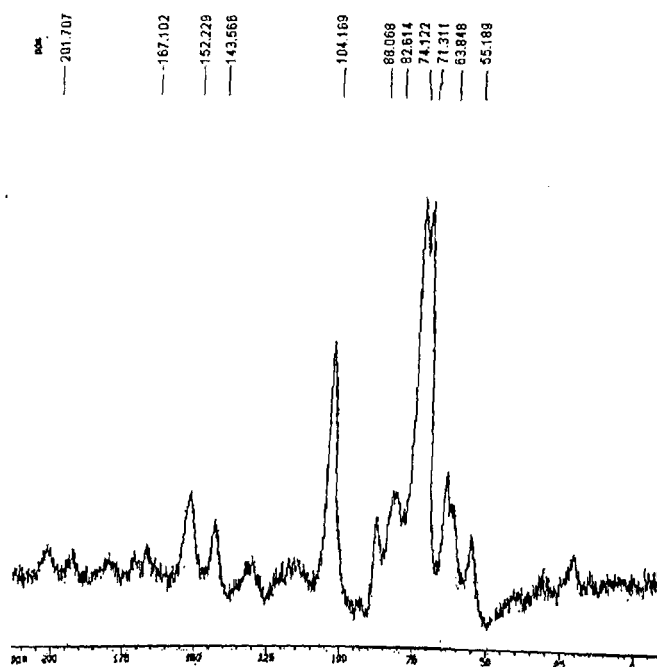


Figura 3.24: RMN  $^{13}\text{C}$ -sólido para madeira *A. urundeuva* bruta.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  no estado sólido para a madeira de *A. urundeuva* bruta mostra os deslocamentos dos principais grupos funcionais presentes. Na região de 210-160  $\delta$  encontram-se sinais referentes a carbonilas de extrativos (polifenóis, ácidos graxos, etc.) e ligninas. Entre 160 e 100  $\delta$  encontram-se sinais de carbonos  $\text{sp}^2$  de ligninas e polifenóis. Sinais de carbonos oxigenados do tipo  $\text{sp}^3$  de carboidratos, extrativos e ligninas são mostrados na região entre 90 e 60  $\delta$ . Os sinais de grupos metoxila encontram-se por volta de 56  $\delta$  e sinais inferiores a 56  $\delta$  são de carbonos  $\text{sp}^3$  não oxigenados.

Já o espectro mostrado na figura 3.25 é mais representativo da LMM que o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  em solução (figura 3.20). Aqui pode-se observar que o sinal a 104  $\delta$  de C-2 e C-6 de unidades siringílicas (S) aparece significativamente (como deveria ser). Também é nítido o sinal em 153  $\delta$ , devido a C-2 e C-6 de unidades S esterificadas. Com relação às de unidades guaiacílicas (G), são claros os sinais a 118

e 115  $\delta$ , referentes a C-6 e C-5, respectivamente. Os sinais em 77, 86 e 63  $\delta$  são devidos, respectivamente, a C- $\alpha$ , C- $\beta$  e C- $\gamma$  em ligações  $\beta$ -aryl-éter de cadeias laterais. Carbonos metoxílicos em cadeias aromáticas aparecem no sinal intenso a 55  $\delta$ . Além disso, é visível a contaminação da LMM por polifenóis (sinal intenso por volta de 145  $\delta$ ) e outros compostos (sinais  $> 160$   $\delta$ ).

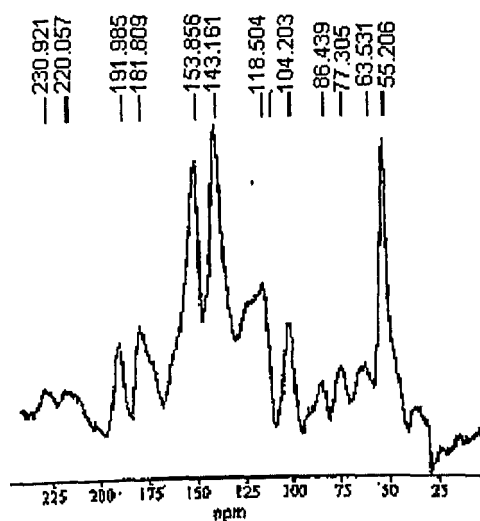


Figura 3.25: RMN<sup>13</sup>C-sólido para a LMM da *A. urundeuva*.

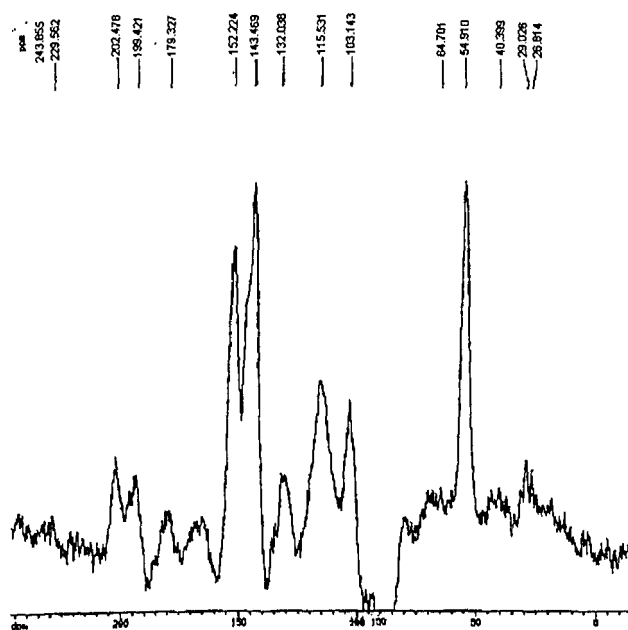


Figura 3.26: RMN<sup>13</sup>C-sólido para lignina de Klason da madeira *A. urundeuva* bruta.

Analisando-se a figura 3.26, que mostra o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  no estado sólido da lignina de Klason da madeira de *A. urundeuva* bruta, nota-se um sinal intenso referente a metoxilas (54,9  $\delta$ ), o que já era esperado por se tratar de lignina. Nota-se também o grande sinal referente aos extrativos polifenólicos (143,5  $\delta$ ) que, estando presente, indica que estes podem estar condensados com a lignina. Isso explicaria o alto rendimento obtido para o ensaio que calculou o teor de LK.

As figuras 3.27 e 3.28 são referentes aos extrativos polifenólicos. Estes espectros concordam com os de profisetinidinas e prorobinitinidinas na região entre 60-160  $\delta$  [108] (vide tabelas 3.24 e 3.26).

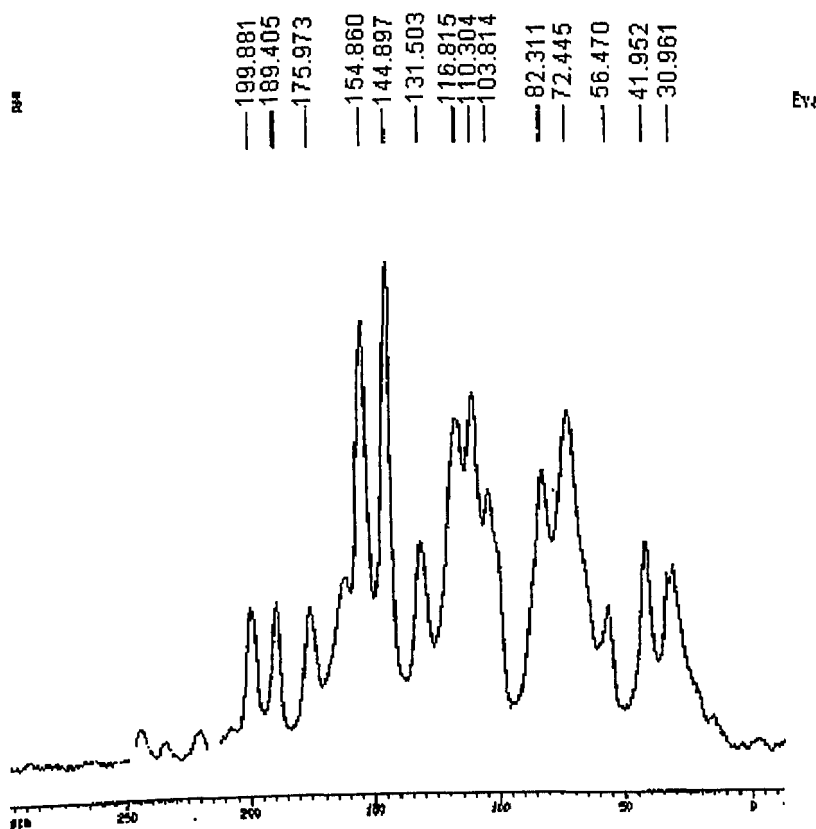


Figura 3.27: RMN  $^{13}\text{C}$ -sólido para o extrato metanólico da *A. urundeuva*.

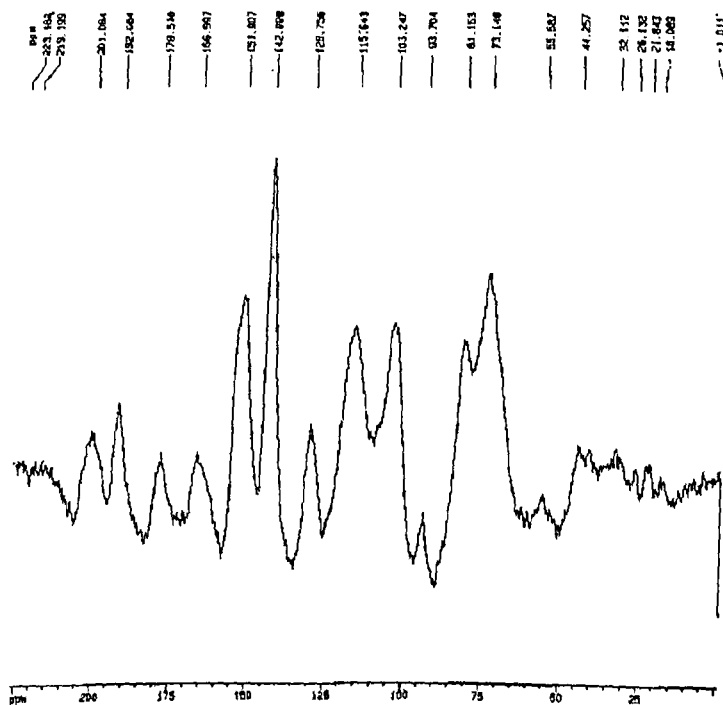


Figura 3.28: RMN  $^{13}\text{C}$  - sólido para o extrato aquoso da *A. urundeuva*.

As estruturas da profisetinidina e da prorobinitinidina são mostradas na figura 3.29.

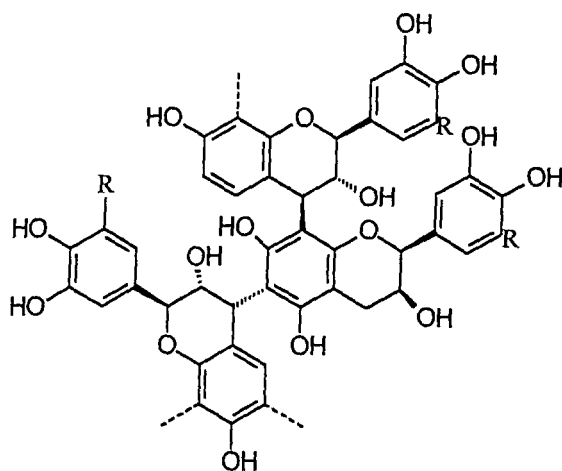


Figura 3.29: Estruturas da profisetinidina (PF) ( se  $\text{R} = \text{H}$  ) e da prorobinitinidina (PR) ( se  $\text{R} = \text{OH}$  )



A tabela 3.23 apresenta os deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$ -sólido de flavonóides [102, 108] e a tabela 3.24 [83, 102, 108] mostra as principais atribuições para os sinais mais intensos apresentados nas figuras 3.27 e 3.28.

Tabela 3.23: Deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  de flavonóides [102]

Sinais característicos de padrões de oxigenação do anel A						
	Número do carbono					
	4a	5	6	7	8	8a
Resorcinol (7-OH)	117	130	110	158	103	156
Florogurcinol (5,7-diOH)	102	157	97	157	96	156
Pirrogalol (7,8-diOH)	115	123	110	144	132	146
Sinais característicos de padrões de oxigenação no anel B						
	1'	2'	3'	4'	5'	6'
3'-hidroxi	131	129	116	157	116	129
3',4'-dihidroxi	132	115	145	145	116	120
3',4',5'-trihidroxi	131	108	146	133	146	108
Sinais característicos de padrões de oxigenação no anel C						
	2	3	4			
Fisetinidol	82,2	68,1	32,6			
Catequina	82	67,9	28,1			
Epicatequina (b)	79,1	66,8	28,6			
Epicatequina	79,4	66,9	29,1			
Catequina-4 $\alpha$ (a)	83,7	72,9	37,9			
Epicatequina-4 $\beta$ (a)	76,6	72,6	36,5			
Epicatequina-3-O-Glcp (b)	78,2	73,3	24,2			
Epicatequina-3O-Galato	77,8	69,7	26,4			
Catequina-4 $\alpha$ -ol	81,7	73,9	71,6			
4 $\beta$ -Tiobenzil-epicatequina	74,4	70,3	42,9			
Epicatequina-(2 $\beta$ -7,4 $\beta$ -8)	99,7	66,1	29,6			
Epicatequina (c)	80,8	67,3	28,6			

(a) uma unidade flavan-3-ol 4-substituída ligada a outro flavonóide em C-6 ou C-8 em acetona  $d_6$ . (c) As primeiras ressonâncias se referem à unidade superior e a segunda à unidade inferior da estrutura.

Tabela 3.24: Atribuições dos principais sinais dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  – sólido dos extratos metanólico e aquoso da *A. urundeuva*.

Atribuições	Deslocamentos ( $\delta$ )	
	E. metanólico	E. aquoso
Carbonilas de flavanonas, diidroflavonóis, cetonas e aldeídos	199,88 189,40	201,08 192,06
Carbonilas de ésteres e ácidos carboxílicos	175,97	178,51 166,59
C5, C7 e C8a	154,86	-
C3' e C4' de anéis B di-OH	144,89	142,99
C3' e C5' de anéis B tri-OH		
C5 de anel A mono-OH	131,50	129,75
C1', C2' e C6' de anel B mono-OH		
C1' de anel B di e tri-OH		
C4a anel A di-OH	116,81	115,64
C3' e C5' de anel B mono-OH		
C2' e C5' de anel B di-OH		
C6 de anel A mono ou di-OH	110,30	-
C2' e C6' de anel B tri-OH		
C8 de anel A mono-OH (7-OH)	103,81	103,24
?	-	93,70
C2 anel C fisetinidol ou catequina	82,31	81,15
C3 anel C	72,44	73,14
Metoxilas	56,47	55,58
?	-	44,25
C4 anel C	41,95	-
C4 anel C	30,96	32,11

A análise da tabela 3.24 leva à complementação e confirmação das informações já obtidas através da RMN  $^{13}\text{C}$  em solução. Portanto, além disso, a

presença do sinal em torno de 55  $\delta$  mostra que os grupos metoxílicos de ligninas estão ligados de alguma forma aos extrativos polifenólicos.

Finalmente, a figura 3.30 apresenta o espectro obtido para uma amostra de holocelulose da madeira bruta.

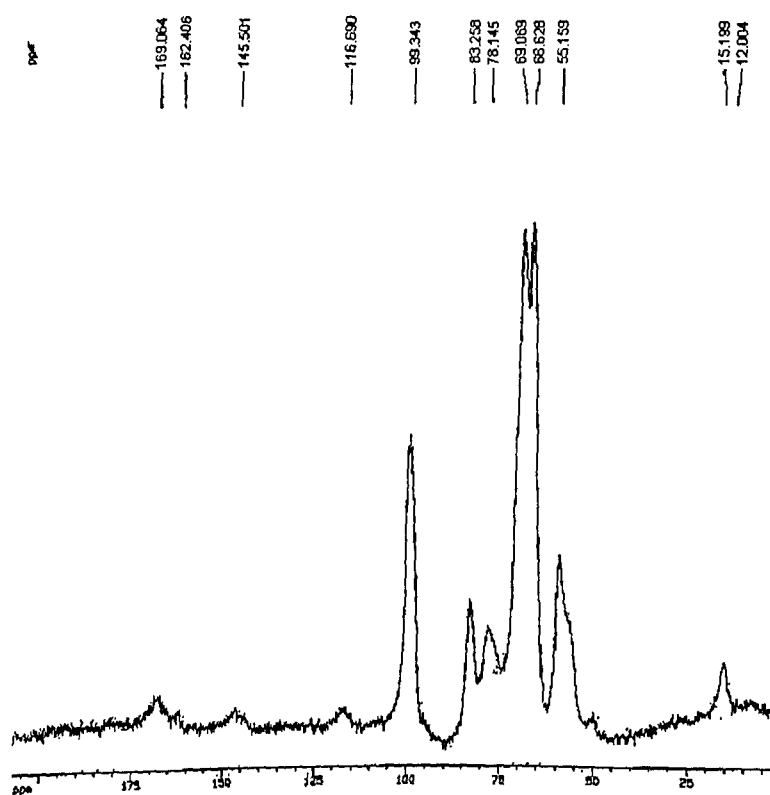


Figura 3.30: RMN  $^{13}\text{C}$ -sólido para holocelulose da madeira bruta.

Nesse espectro observa-se que o sinal de grupos metoxila em torno de 55  $\delta$  (ombro ao lado do sinal 59,16  $\delta$ ) e os sinais entre 115-120  $\delta$  e 143-150  $\delta$  (de ligninas e polifenóis) mostram que a holocelulose está contaminada, tal como foi sugerido anteriormente. Os sinais no intervalo entre 100 e 60  $\delta$  são referentes aos carbonos alifáticos das cadeias de celulose e hemiceluloses. Aparece também o sinal intenso do  $\text{C}_1$  anomérico, a 99,30  $\delta$ .

## 3.2.11.5 – Cromatografia líquida de alta eficiência ( CLAE )

Os princípios gerais da cromatografia líquida foram reportados por Tswett, em 1903 [12], descrevendo a adsorção cromatográfica para a separação de pigmentos naturais. Desde então, muitos progressos têm sido feitos e são muitas as técnicas empregadas em cromatografia líquida.

A CLAE é a técnica cromatográfica mais rápida, embora seja usada principalmente para separações analíticas (não-preparativas). Estudos feitos até hoje permitem fácil análise, identificação e quantificação dos constituintes de uma determinada amostra.

Neste trabalho foram estudadas as frações solúveis em água e em éter etílico do extrato metanol-aquoso da *A. urundeuva*.

Os cromatogramas obtidos são mostrados nas figuras 3.31 e 3.32.

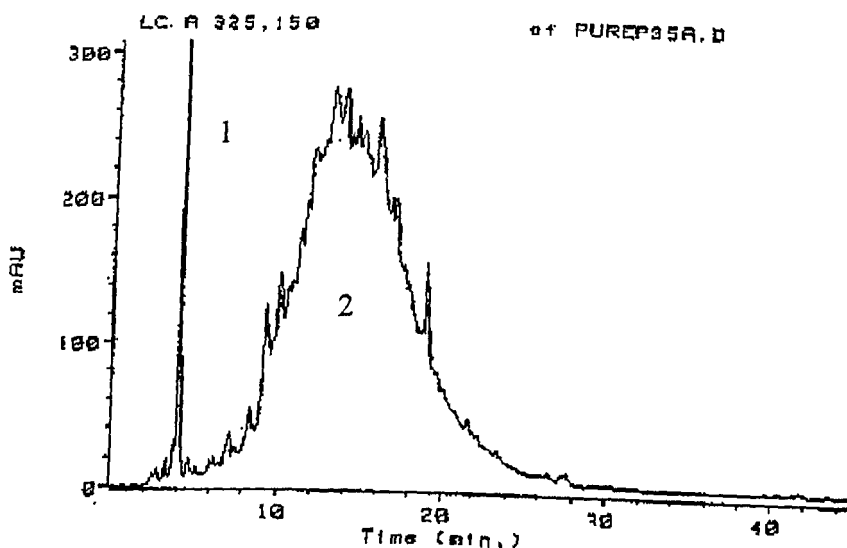


Figura 3.31: Cromatograma obtido por CLAE para a fase aquosa da extração.

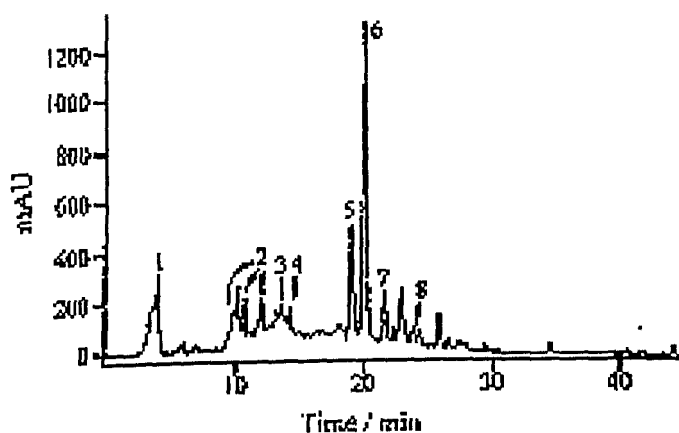


Figura 3.32 : Cromatograma obtido por CLAE par a fase etérea obtida a partir do extrato aquoso.

A figura 3.31 apresenta o cromatograma de CLAE do extrato aquoso após extração com éter. Observa-se um pico referente ao ácido gálico (1) e uma banda larga (2) que é composta por diferentes tipos de proantocianidinas [13, 83].

A figura 3.32 mostra o cromatograma de CLAE da fase etérea obtida a partir do extrato aquoso. O principal componente apresentado é a fisetina (5). Além desse composto foram identificados: ácido gálico e elágico (1 e 3 respectivamente), e concentrações menores de compostos apresentando espectros de UV característicos de flavanonas (2), flavonóis (7) e elagitaninos (6) [13, 83].

### 3.3 – Análise dos polifenóis da madeira

#### 3.3.1 – Obtenção dos extrativos polifenólicos

Devido às dificuldades de se definir um método ideal de extração de taninos para as muitas espécies de plantas existentes, partiu-se de dois diferentes caminhos de extração, sendo um em acetona aquosa e outro em metanol aquoso.

A tabela 3.25 traz os resultados médios obtidos com as extrações.

Tabela 3.25: Rendimentos das extrações dos polifenóis

Extrato	Rendimento (%)
(AA)Acetona-água 7:3 (v/v)	22,4
(MA)Metanol-água 4:1 (v/v)	18,7

Pelos dados obtidos, conclui-se que para *A. urundeuva* há diferença de 3,7 % no rendimento da extração sob condições semelhantes.

O rendimento obtido é bastante superior aos descritos para madeiras de *Eucalyptus* (*E. camaldulensis*, *E. globulus*, *E. rudis*, *E. grandis*, *E. urophila*) que variam entre 2,6 e 12,0 %, quando obtidos em metanol-aquoso [109-112] (figura 3.33).

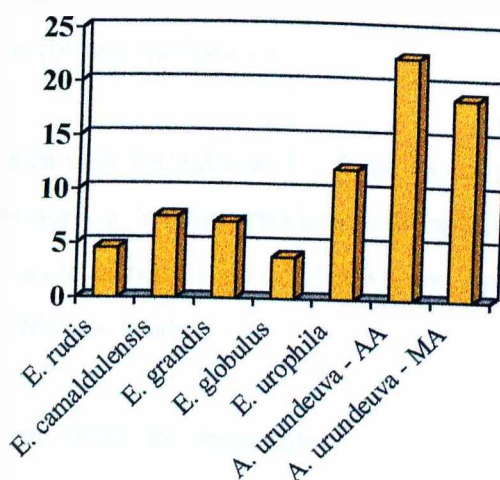


Figura 3.33: Gráfico comparativo do rendimento da extração de polifenóis em diferentes madeiras

### 3.3.2 – Determinação de fenóis totais

#### 3.3.2.1 – Pelo método Folin-Ciocalteu

A curva de calibração obtida no experimento é mostrada na figura 3.34.

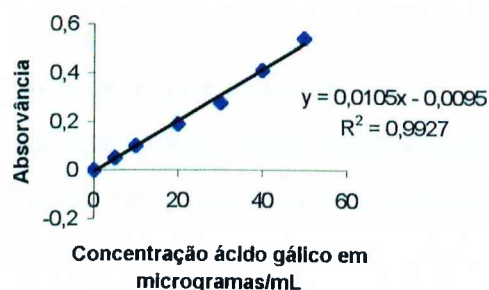


Figura 3.34: Curva de calibração com ácido gálico

Utilizando a reta obtida na curva de calibração e as absorvâncias lidas para cada amostra, foram obtidos os seguintes resultados:

AA: 43,8 mg fenóis totais/g madeira a.s..

MA: 37,7 mg fenóis totais/g madeira a.s..

Esse resultado mostra uma variação de 6,1 % entre um resultado e outro, sendo o extrato em acetona-água o de maior rendimento para este ensaio.

Outra forma de expressar os resultados obtidos é como uma porcentagem do teor de extrato bruto de polifenóis, a saber:

AA: 19,1 % do extrato bruto são fenóis totais.

MA: 20,2 % do extrato bruto são fenóis totais.

Conde [109] e Cadahia [110] encontraram valores médios entre 5,9 e 17,5 mg/g para o teor de fenóis totais da madeira de 3 espécies de *Eucalyptus*

(*E. camaldulensis*, *E. globulus* e *E. rudis*). Esses valores são muito inferiores aos encontrados para *A. urundeuva*.

Esses mesmos autores [111], estudando a composição tânica da casca das três espécies de *Eucalyptus* supra citadas, encontraram valores para o teor de fenóis totais entre 2,5 e 91,6 mg/g.

Pode-se concluir, portanto, que a madeira de *A. urundeuva* possui um teor de fenóis totais bem superior ao encontrado para as espécies de *Eucalyptus* estudadas.

Outra observação a ser feita é acerca da relação entre a porcentagem de extrativos e o conteúdo de fenóis totais. Assim como para madeiras de *Eucalyptus* o rendimento dos extrativos foi menor que para *A. urundeuva*, o conteúdo de fenóis totais seguiu o mesmo padrão.

### 3.3.2.2 – Método Azul da Prússia Modificado [34]

A curva obtida para calibração do experimento está mostrada na figura 3.35.

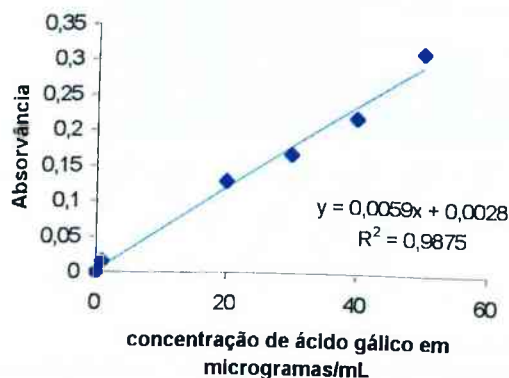


Figura 3.35: Curva de calibração para o ensaio de fenóis totais, em equivalentes de ácido gálico

Através da curva de calibração e das absorvâncias lidas, foram obtidos os seguintes teores de fenóis totais:



AA: 55,4 mg fenóis totais/g madeira a.s..

MA: 42,6 mg fenóis totais/g madeira a.s..

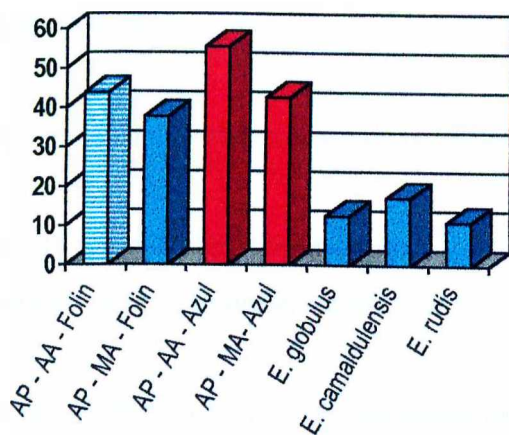
Com relação ao teor de extrato bruto:

AA: 24,7 % do extrato bruto são fenóis totais.

MA: 22,8 % do extrato bruto são fenóis totais.

Através desse resultado conclui-se que o ensaio para determinação de fenóis totais, pelo método do Azul da Prússia, produz maiores rendimentos tanto em AA quanto em MA e a análise dos resultados é semelhante àquela feita para o método Folin-Ciocalteu.

A figura 3.36 mostra uma comparação entre os dois métodos utilizados e madeiras de *Eucalyptus*.



Onde: AP = Aroeira-Preta; AA = extrato em acetona-água; MA = extrato metanol-água.

Barras vermelhas: pelo método Azul da Prússia Modificado; Barras azuis: pelo método Folin-Ciocalteu em extrato metanol-aquoso; Barra listrada: método Folin-Ciocalteu com extrato acetona-água

Figura 3.36: Gráfico comparativo teores de fenóis totais pelos métodos Folin-Ciocalteu e Azul da Prússia modificado. Rendimentos em porcentagem.

### 3.3.3 – Determinação de Proantocianidinas

#### 3.3.3.1 – Método da vanilina

Foi obtida uma curva de calibração com vanilina, nas mesmas condições do experimento, mostrada na figura 3.37.

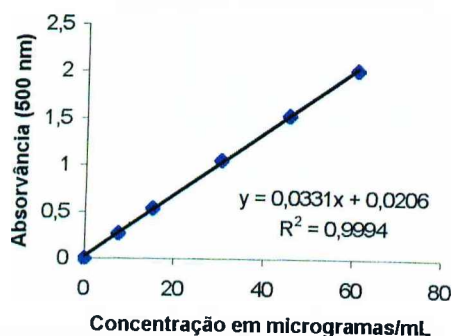


Figura 3.37: Curva de calibração com vanilina

O teor de proantocianidinas calculado para *A. urundeuva* foi o seguinte:

AA: 6,1 mg proantocianidinas/g madeira a.s..

MA: 31,2 mg proantocianidinas/g madeira a.s..

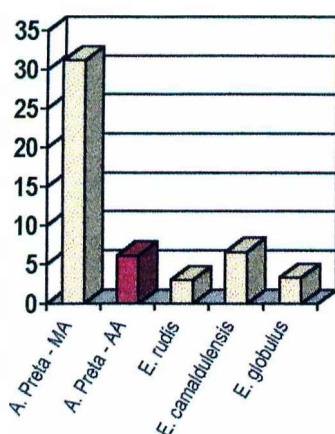
Em termos de porcentagem do extrato bruto de polifenóis:

AA: 2,7 % do extrato bruto são proantocianidinas

MA: 16,7 % do extrato bruto são proantocianidinas.

Ao contrário do obtido para o teor de fenóis totais (onde foram obtidos maiores rendimentos com o extrato AA), o teor de proantocianidinas foi maior no extrato metanol-aquoso. Esta diferença é significativa. Conclui-se portanto que, para esta espécie de madeira, as proantocianidinas devem ser extraídas em metanol-água.

Na literatura [110] para madeiras de *Eucalyptus* tratadas com o mesmo solvente (metanol-água, nas mesmas condições), os rendimentos variaram entre 0,72 e 6,58 mg/g. Esses valores são muito inferiores aos obtidos para *A. urundeuva* e mostram mais uma vez sua riqueza em compostos fenólicos. Um gráfico comparativo é mostrado na figura 3.38.



Onde: as barras de cor bege representam extratos em metanol-aquoso e a vermelha em acetona-aquosa.

Figura 3.38: Gráfico comparativo do teor de proantocianidinas em diversas espécies de madeira.

### 3.3.3.2 – Método butanol-ácido [113]

Neste experimento foi obtida a curva de calibração mostrada na figura 3.39.

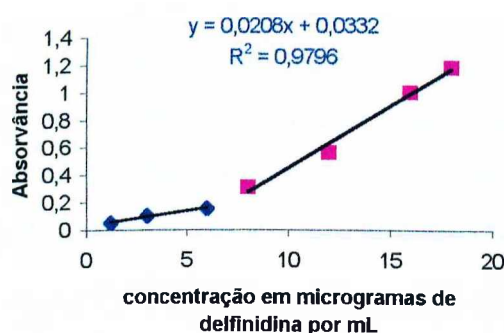


Figura 3.39: Curva de calibração com delfinidina para cálculo do teor de proantocianidinas pelo método butanol ácido.

A curva de calibração mostrada é bifásica e consiste de duas retas, um comportamento de reação já relatado por McFarlane [114], Stafford e Lester [115] e Porter [108]. Isso cria um problema pois a relação de Lambert-Beer entre a absorvância e a concentração de cianidina, só pode ser aplicada em baixas faixas de concentração (< 0,2).

As leituras de absorvância foram feitas contra branco contendo todos os reagentes, menos a amostra, que foi substituída por igual quantidade de água.

As amostras brutas (AA e MA) tiveram absorvância muito alta ( $> 2,5$ ) no comprimento de onda 550 nm, característico das antocianidinas resultantes da reação. Foram feitas diluições que levaram ao desaparecimento do pico em 550 nm, como mostrado na figura 3.40 para a amostra MA.

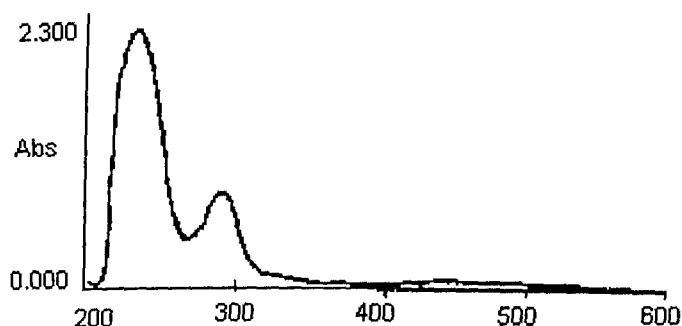


Figura 3.40: cromatograma UV resultante da reação do extrato MA bruto diluído com BuOH/HCl;

Não foi possível dessa forma a quantificação das proantocianidinas através desse experimento.

Apesar disso, tentou-se detectar através da mesma reação, os compostos monoméricos constituintes da estrutura polimérica das proantocianidinas.

Mesmo sob as severas condições de reação as proantocianidinas do extrato MA não foram degradadas, como mostrado no cromatograma da figura 3.41.

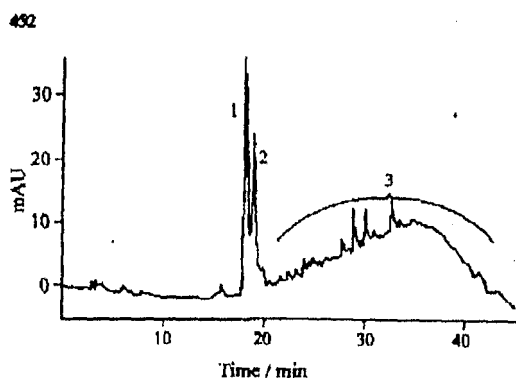


Figura 3.41: Cromatograma da mistura resultante da reação do extrato aquoso com n-butanol/HCl.

Foram detectados apenas ácido elágico (1), n-butilgalato (2) ( resultado do ácido gálico e n-butanol ) e proantocianidinas (3).

### 3.3.4 – Determinação de 3-deoxi-proantocianidinas [47]

A figura 3.42 mostra os espectros resultantes da reação para o extrato MA.

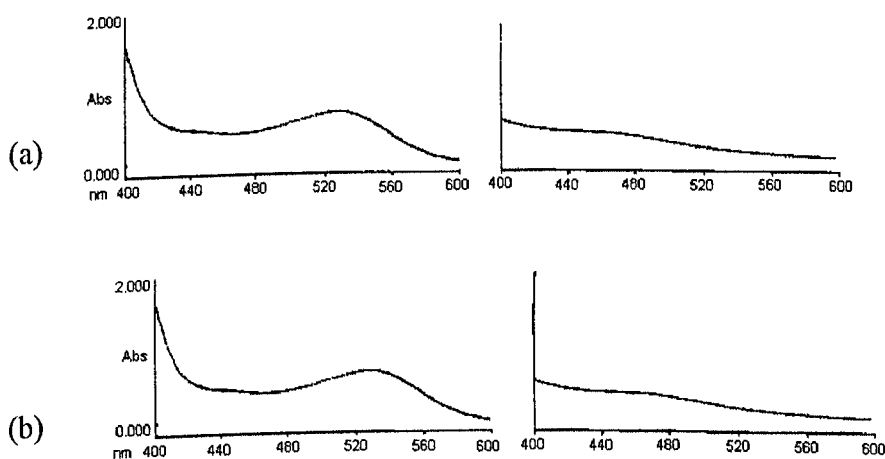


Figura 3.42: Espectros de UV obtidos na reação para verificação de 3-deoxi-proantocianidinas

- (a) amostra MA1 com butanol e amostra MA1 com branco respectivamente,  
(b) amostra MA2 com butanol e amostra MA2 com branco respectivamente.

A tabela 3.26 mostra os resultados obtidos com as absorvâncias a 485 nm (característico de apigenidinas) e 495 nm (característico de luteolinidinas).

Tabela 3.26: Absorvâncias relativas às amostras MA1 e MA2, no ensaio para determinação de 3-deoxi-proantocianidinas.

		MA1	MA2
$\lambda = 485 \text{ nm}$	Amostra + branco (contra ar)	0,207	0,180
	Amostra + butanol-ácido (contra ar)	0,276	0,240
	Amostra com Butanol-ácido contra amostra com branco	0,073	0,058
$\lambda = 495 \text{ nm}$	Amostra + branco (contra ar)	0,190	0,166
	Amostra + butanol-ácido (contra ar)	0,303	0,260
	Amostra com Butanol-ácido contra amostra com branco	0,117	0,093

A determinação da existência de 3-deoxi-proantocianidinas é feita basicamente por comparação da amostra com branco em relação a amostra com butanol-ácido. Para o comprimento de onda 485 nm, a diferença entre a amostra com branco e com butanol-ácido não foi significativa, o que permite concluir que nessas amostras não há presença de apigedinidinas. Já em 495 nm, a diferença de absorvância das amostras foi maior, o que leva a concluir que pode haver 3-deoxi-proantocianidinas do tipo luteolinidinas.

#### 4 – Conclusões

O resultado de 43,6 % para o cálculo da LK da madeira bruta é muito alto e indica que essa lignina está condensada com polifenóis. Entretanto, esse alto valor não é razão suficiente para justificar a dureza e a resistência da madeira a ataques mecânicos e biológicos. Isso porque existem madeiras como o *E. grandis* que apesar de possuir aproximadamente 40 % de lignina + extrativos, é de fácil degradação.

O resultado da análise por somatória foi de 101,5 % para a madeira livre de extrativos. Para a madeira bruta, o valor de 105,3 % é bem próximo do esperado, considerando-se que a LK está condensada com polifenóis. A grande resistência e durabilidade da *A. urundeuva* deve ser devida principalmente à composição dos polifenóis presentes.

Através do cálculo da fórmula mínima para *A. urundeuva* obteve-se o primeiro sinal do alto teor de oxigênios presentes na lignina, mostrando mais uma vez que esta deve possuir contaminantes oxigenados, provavelmente polifenóis. Também através da fórmula mínima concluiu-se que o número de grupos metoxila por C<sub>9</sub> é maior que 1 ( = 1,3 ). Com isso pode-se dizer que houve a participação do álcool sinapílico durante a formação da macromolécula de lignina.

A lignina obtida é do tipo guaiacil-siringila (G/S) com cerca de 30 % de unidades siringílicas. O teor de siringilas foi relativamente baixo até mesmo quando comparado com a madeira de *E. grandis*, que é de 50 %. Portanto, o teor dessa unidade também não é indicativo de sua dureza.

Os ensaios para determinação de grupos carbonílicos resultou em 5,5 % de carbonilas totais.

A determinação de hidroxilas fenólicas totais resultou em 3,2 %, valor acima do previsto em literatura. Esta é mais uma indicação de que a LMM pode estar contaminada com polifenóis. Outra possibilidade é que tenha havido hidrólise das ligações  $\alpha$ -O-4 e  $\beta$ -O-4 durante a moagem da madeira.

As hidroxilas fenólicas são em sua grande maioria conjugadas (0,36 em 0,38 OH<sub>fen</sub>/C<sub>9</sub>).

Através do resultado da hidrólise das ligações  $\alpha$ -O-4 e  $\beta$ -O-4 chegou-se a uma importante conclusão. Se a soma de OH fenólico proveniente das ligações  $\alpha$ -O-4 e  $\beta$ -O-4 + OH fenólico livre é igual a 120/100 C<sub>9</sub>, provavelmente houve hidrólise de -OCH<sub>3</sub> ou há presença de mais de uma hidroxila fenólica por anel aromático (o que é evidente em polifenóis). Portanto, o mais provável é que a LMM possua polifenóis associados a ela por ligação ou por interação (ligação de hidrogênio), ou ainda, apenas como contaminante de difícil separação.

A análise do cromatograma dos produtos da oxidação da LMM com nitrobenzeno mostra o quanto essa madeira é rica em constituintes incomuns. Além dos produtos esperados para esta oxidação (vanilina e siringaldeído), foram encontrados também o p-hidroxibenzaldeído, ácido vanílico, ácido siringílico, ácido 3,4-diidroxi-benzóico e o desidro-p-benzaldeído, entre outros que não puderam ser identificados.

No espectro de IVTF da LMM duas conclusões importantes puderam ser tiradas. O sinal em 1165,5 cm<sup>-1</sup> é característico de ligninas hidroxifenil-guaiacil-siringil, o que reforça o resultado obtido com a oxidação da LMM com nitrobenzeno, onde foram obtidos picos referentes aos 3 álcoois precursores da lignina oxidados.

A intensidade relativa do sinal em 1038,3 cm<sup>-1</sup> indica que os grupos guaiacílicos existem em maior quantidade que os siringílicos, reforçando a relação G/S obtida para essa madeira.

O extrato metanol-aquoso é constituído por polifenóis, o que pode ser observado pela banda característica a 1288,0 cm<sup>-1</sup>, referente à deformação axial de C-O, que indica que nesse extrato há maior condensação de anéis aromáticos.

A ressonância magnética nuclear de hidrogênio possibilitou o cálculo do teor de hidroxilas alifáticas. No espectro de RMN <sup>1</sup>H confirmou-se novamente a maior quantidade de grupos guaiacílicos em relação aos siringílicos. Isso se dá pela interpretação do sinal dos prótons guaiacílicos (7,12 e 6,90  $\delta$ ) maior que o de siringílicos (6,53  $\delta$ ).

Pelo sinal em 3,68  $\delta$  (que possui uma porcentagem de 18,2 %) pode-se reafirmar o teor de grupos metoxílicos anteriormente calculado por dois métodos.



O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  contribuiu com muitos detalhes a respeito da estrutura molecular da LMM. Novamente, houve indícios de contaminação da LMM por polifenóis, o que pode ser notado pelo sinal em torno de 121  $\delta$ , o qual pode ser atribuído a C-2, C-5 e C-6 de procianidinas.

Os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  sólido reafirmam suposições feitas anteriormente. As principais observações foram: observadas em relação aos sinais intensos referentes aos extrativos polifenólicos, que se mostraram presentes mesmo em amostras de lignina de Klason (LK); de madeira moída (LMM). Foram também observados sinais referentes aos grupos G/S em 153,9  $\delta$  e aos extrativos polifenólicos em 143,2  $\delta$ , indicando contaminação.

Tanto o espectro para o extrato metanólico quanto o espectro para o extrato aquoso mostraram baixo sinal a  $\approx 55 \delta$  (poucos grupos metoxílicos) e sinais referentes a polifenóis.

Todos os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  sólido levaram a um mesmo resultado: há contaminação na lignina por polifenóis e vice-versa.

A CLAE através do auxílio de padrões, possibilitou a identificação de vários compostos presentes nos extratos polifenólicos, entre eles o ácido gálico, a fisetina e procianidinas.

Tanto pelo método Folin-Ciocalteu quanto pelo Azul da Prússia modificado, o rendimento dos fenóis totais foi maior com a extração acetona-água. Em relação aos extrativos obtidos, obteve-se um teor de 20 % de fenóis totais.

Os teores de fenóis totais também foram altos se comparados à madeira de espécies de *Eucalyptus* e aproximaram-se mais dos teores obtidos com cascas de vegetais.

Já no caso das proantocianidinas, houve grande diferença no rendimento dos extratos acetona-água e metanol-água (25 %). O extrato em metanol-água teve maior rendimento (31,2 mg/g madeira a.s.), valor este muito superior aos descritos em literatura para o mesmo solvente (entre 0,72 e 6,58 mg/g).

Através desses resultados fica clara a riqueza dos polifenóis dessa madeira e a possibilidade de um maior aprofundamento em seu estudo.

Em síntese, o presente estudo possibilitou um bom conhecimento das propriedades específicas da LMM da *Astronium urundeuva* e da quantificação de seus polifenóis. Contribui assim para a compreensão mais profunda dessa madeira, rara e rica, no que diz respeito a sua constituição química.

## 5 – Referências Bibliográficas

- 1 – Sjöström, E. *Wood Chemistry, Fundamentals and Applications*, Academic Press, Inc., segunda ed., USA, 1993.
- 2 – Fengel, D.; Wegner, G. *Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions*; New York, 1984.
- 3 – D’Almeida, M.L.O. Em *Celulose e Papel – Tecnologia de fabricação da pasta celulósica*, IPT, São Paulo, 1988, 15.
- 4 – Browning, L. *Methods of Wood Chemistry*, New York, 1967.
- 5 – Sarkanen, K. V.; Ludwig, C. H. *Lignins: Occurrence, formation, and reactions*, New York, 1971.
- 6 – Adler, E. *Wood Science and Technology* 1977, 11, 169.
- 7 – Morais, S.A.L.; *Contribuição ao estudo químico de ligninas de Eucalyptus grandis*, Dissertação de mestrado, Belo Horizonte, 1987.
- 8 – Freudenberg, K; Neish; A. C. *Constitution and Biosynthesis of Lignins*, Springer-Verlag, Berlin, 1968.
- 9 - Chen, L. C. Em *Wood Structure and Composition*, New York, 1991.
- 10 – Morais, S. A. L.; Nascimento, E. A.; Veloso, D. P. *Química Nova* 1993, 16, 435.
- 11 – Brauns, F. E.; Brauns, D. A. *The chemistry of lignin*, Academic Press, New York, 1960.
- 12 – Lin, S. Y.; Dence, C. W. Em *Methods in lignin chemistry*, Springer-Verlag, Berlin, 1992.
- 13 – Morais, S. A. L.; et al *J. Braz. Chem. Society* 1999, 10, 6, 447.

- 
- 14 – Haslam, E. *Plant polyphenols*, Cambridge University Press, Cambridge, 1989.
- 15 – Schultz, J. C. *Ecology* **1998**, 69, 896.
- 16 – Bernays, E. A.; Cooper-Driver, G.; Bilgener, M. *Adv. Ecol. Res.* **1989**, 19, 263.
- 17 – Harbone, J. B.; Palo, R. T.; Robbins, C. T. Em *Plant Defenses Against Mammalian Herbivory*, CRC Press, Boca Raton, 1991.
- 18 – Markham, K. R. *Techniques of Flavonoid Identification*; Academic Press, Londres, 1982.
- 19 – Bohm, B. A. Em *Introduction to flavonoids*, Harwood Academic Publishers, Vancouver, 1988.
- 20 – Waterman, P.G.; Mole, S. Em *Analysis of phenolic plant metabolites*, Blackwell Scientific Publications, Londres, 1994.
- 21 – Cork, S.J.; Krockenberger, K. *J. of Chemical Ecology* **1991**, 17, 123.
- 22 – Hagerman, A.E. *J. of Chemical Ecology* **1988**, 14, 453.
- 23 – Haslam, E.; Haworth, R.D.; Mills, S.D.; Rogers, H.J.; Armitage, R.; Searle, T. *J. Chem. Soc.* **1961**, 1836.
- 24 – Swain, T. Em *Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites*, 1979, 657.
- 25 – Bate-Smith, E. C. *Phytochemistry* **1973**, 12, 1809.
- 26 - Bate-Smith, E. C. *Phytochemistry* **1975**, 14, 1107.
- 27 – Foo, L. Y.; Porter, L.J. *Phytochemistry* **1980**, 19, 1747.
- 28 - Hillis, et al. *Phytochemistry* **1974**, 13, 1951.
- 29 – Yazaki, Y.; Hillis, W. E. *Phytochemistry* **1976**, 15, 1180.
-

- 30 – Ohara, S.; Hemingway, R.W. *Holzforschung* **1989**, 43, 149.
- 31 – Lindroth, R.L.; Pajutee, M.S. *Oecologia* **1987**, 74, 144.
- 32 – Fernandez, E. C. *Estudio de la composicion tanica de Madera, corteza y hojas de Eucalyptus camaldulensis, E. globulus y E. rudis*, Tese de doutorado, Madrid, 1995.
- 33 – Singleton, V.L.; Rossi, J.A. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, 16, 144.
- 34 - Graham, H.D.; *J. Agric. Food Chem.* **1992**, 40, 801.
- 35 – Price, M.L.; Butler, L.G. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 25, 1268.
- 36 - Budini, R.; Tonelli, D.; Girotti, S. *J. Agric. Food Chem.* **1980**, 28, 1236.
- 37 – Grahm, H.D.; Zengotita, P.E.L. *J. Agric. Univ. Puerto Rico* **1982**, 66, 293.
- 38 – Curtman, L.J. Em *Quantitative Chemical Analysis*, New York, 1931, 194, 377.
- 39 - Brown, W.H. Em *Introduction to Organic and Biochemistry*, Monterey, 1987, 321A.
- 40 – Thompson, R.H. Em *Biochemistry of Phenolic Compounds* London, 1964.
- 41 – Mihailovic, M.L.; Cekovic, Z. Em *The chemistry of the hidroxyl Group*, New York, 1971, 516.
- 42 – Deshpande, S.S.; Cheryan, M.; Salunkhe, D.K. *Crit. Rev.Food Sci. Nutr.* **1986**, 24, 401.
- 43 – Harbone, J.E. Em *Methods in Plant Biochemistry*, New York, 1989.
- 44 – Burns, R.E. *Agron. J.* **1971**, 63, 511.
- 45 – Swain, T.; Hillis, W.E. *J. Sci. Food Agric.*, **1959**, 10:63-68
- 46 – Porter, L.J.; Wong, R.Y.; Chan, B.G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans* **1986**,

- 
- 47 – Stafford, H.A. Em *Flavonoid Metabolism*, CRC press, Boca Raton, 1990, 64-68, 80.
- 48 – Agraval, P. K. *Carbon-13 NMR of Flavonoids*, Amsterdam, 1989.
- 49 – Harbone, J. B. Em *The Flavonoids*; Chapman and Hall, Nova York, 1988.
- 50 – Heringer, E.P. *A Aroeira do Sertão*, 7º CNB, Instituto Agrônômico do leste, 1956.
- 51 – Rizzini, C. T. Em *Árvores e madeiras úteis do Brasil – Manual de dendrologia brasileira*, Ed. Edgard Blucher, São Paulo, 1985, 14.
- 52 – Moraes, M. L. T.; Freitas, M. L. M. *Resumos Embrapa-CPAO/Flora Sul*, Dourados-MS, 1997, 9.
- 53 – Corrêa, M. P. Em *Dicionário das Plantas úteis do Brasil e das Exóticas cultiváveis*, Ministério da Agricultura, 1984, v.6, 362.
- 54 – Mirandola Filho, A. e Mirandola, N.S.A. Em *Vegetais tintoriais do Brasil Central*, Ed. Líder, Goiânia, 1991, 29.
- 55 – Santos, E. Em *Nossas Madeiras*, Ed. Itatiaia, Belo Horizonte, 1987, 82.
- 56 – Mainieri, C.; Chimelo, J. P. Em *Fichas características de madeiras brasileiras*, IPT, São Paulo, 1989, 49.
- 57 – Heringer, E. P.; Ferreira, M. B. *Revista Cerrado* 1973, 5(22): 24.
- 58 – Ribeiro, J. H. *Revista Globo Rural* 1985, nov, 85.
- 59 – Daniel, O. *Revista Científica* 1994, 1, 47.
- 60 – Braga, R. *Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará*, UFRN, 4ª ed., 49.
- 61 – Medeiros, A. C. de S.; Mendes, M. A. S.; Ferreira, M. A. S. V.; Aragão, F. J. L. *Revista Brasileira de Sementes* 1992, 14, 51.
-

- 62 – Almeida, E. R. Em *Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos*, Ed. Hemus, São Paulo, 1993, 60.
- 63- Menezes, A. M. S.; Rao, V. S. N.; Gadelha, M. G. T.; Neto, B. L. O.; Matos, F. J. A. *IX simpósio de Plantas medicinais do Brasil, 1986*, UFRJ, 50.
- 64 – Menezes, A. M. S.; Rao, V. S. N., Gadelha, M. G. T., Bandeira, M. A. M.; Matos, F. J. A. *IX simpósio de Plantas medicinais do Brasil 1986*, UFRJ, 26.
- 65 – Rao, V. S. N.; Menezes, A. M. S.; Vasconcelos, F. A.; Almeida, P. R. C.; Fonteles, M. C. *Brazilian J Med Biol Res* 1986, 19, (4-5).
- 66 – Menezes, A. M. S.; Rao, V. S. N.; Fonteles, M. C. *Brazilian J Med Biol Res* 1985, 18 (5-6).
- 67 – Menezes, A. M. S; Rao, V. S. *Brazilian J Med Res* 1988, 21, 531.
- 68 – Matos, F. J. A.; Bandeira, M. A. M.; Rao, V. S. N.; Menezes, A. M. S. *IX simpósio de Plantas medicinais do Brasil 1986*, UFRJ, 89.
- 69 – Rao, V. S; Viana, G. S. B.; Menezes, A. M. S.; Gadelha, M. G. T. *Brazilian J Med Biol Res* 1987, 20, 803.
- 70 – Melo, J. T. *Aroeira: características e aspectos silviculturais*, Embrapa-CPAC, Planaltina - DF, 1991.
- 71 – Toledo Filho, D. V. *Boletim Técnico do Instituto Florestal* 1988, 42, 61.
- 72 – Medeiros, A. C. S.; Czarneski, C. M.; Freitas, G. F. *Revista do Instituto Florestal* 1992, 4, (2), 544.
- 73 – Melo, J. T. de; Lima, V. L. G. de F.; Ribeiro, J. F. *Desenvolvimento inicial de Astronium urundeuva (Fr. All.) Engl. (Aroeira) em diferentes tipos de solo da região dos cerrados*, Embrapa-CPAC, Planaltina - DF, 1981.

- 
- 74 – Medeiros, A. C. S.; Probert, R. J.; Sader, R.; Smith, R. D. *Seed Science & Technology* **1988**, 26, 289.
- 75 – Costa Filho, R. T. da *Revista do Instituto Florestal* **1992**, 4, (2), 537.
- 76 – Moraes, M. L. T. de; et al *Revista do Instituto Florestal* **1992**, 4, (4), 1241.
- 77 – Moraes, S.A.L.; *Contribuição ao estudo Químico e Espectroscópico da Lignina de Madeira Moída do Eucalyptus grandis: Isolamento, quantificação e Análise Estrutural*, Tese de doutorado, Belo Horizonte, 1992.
- 78 – Charkov, V. I.; Sapotnick, S. A.; Dmitrieva, O. P.; Tumanov, I. S. Em *Technology of chemical industries For Ind.*, Ed. Moscow, 1973.
- 79 – Sarkanen, K. V.; Chang, H. M.; Allan, G. G. *Tappi* **1967**, 50, 583.
- 80 - Sarkanen, K. V.; Chang, H. M.; Allan, G. G. *Tappi* **1967**, 50, 587.
- 81 - Sarkanen, K. V.; Chang, H. M.; Allan, G. G.; *Tappi* **1967**, 50, 572.
- 82 – Nascimento, E. A.; *Obtenção e caracterização do coque da lignina hidrolítica do E. grandis*, Tese de Doutorado, UFMG, 1989.
- 83 – Nascimento, E. A.; Moraes, S. A. L.; Cadahia, F.; Fernandez, S.; Conde, A-C.; Garcia, V. M. C. *Ciência e engenharia* **1996**, 5, 19.
- 84 – Chen, C. L. *Methods in Enzymology*, 1987, 161.
- 85 – Moraes, S.A.L.; Nascimento, E.A.; Chen, C.L.; Drumond, M.G.; Veloso, D.P. *Holzforshung* **1992**, 46, 127.
- 86 – Winston, M.H.; et al *Holzforshung* **1986**, 40, 45.
- 87 – Tai, D.-S.; et al *J. Wood Chem. Technol.* **1990**, 10, 111.
- 88 – Goldschimid, O. *Anal. Chem. Scand.* **1954**, 26, 1421.
- 89 – Nimz, H. *Byosynthesis and Structure of Lignins*, 1989.
- 90 – Miksche, G.E. *Acta Chem. Scand.* **1972**, 26, 4137.
-



- 91 – Quattrocchi, O. A.; Andrizzi, S. A.; Laba, R. F. *Introducción a la HPLC*; Artes Graficas Farro S.A, Buenos Aires, 1992.
- 92 – Vasquez, G.; Antorrena, G.; González, J.; Freire, S. *Holzforschung* 1997, 51, 158.
- 93 – Perra, B.; Haluk, J. P.; Metche, M. *Holzforschung* 1995, 49, 99.
- 94 – Hortling, B.; Tamminen, T.; Tentta, E. *Holzforschung* 1997, 51, 405.
- 95 – Rodrigues, J.; Faix, O.; Pereira, H. *Holzforschung* 1998, 52, 46.
- 96 – Collier, W.; Kalasinsky, V. F.; Schultz, T. P. *Holzforschung* 1997, 51, 167.
- 97 – Abreu, E. S. *Química Nova* 1997, 20, 6, 592.
- 98 – Pretsch, E.; Clerc, T.; Seibl, J.; Simon, W. *Tablas para la elucidacion estructural de compuestos organicos por metodos espectroscopicos*, Ed. Alhambra, Espanha, 1980.
- 99 – Morais, S. A. L.; Nascimento, E. A.; Pilo-Veloso, D. J. *Braz. Chem. Soc.* 1991, 2, 3, 129.
- 100 – Ludwig, C. H.; Nist, B. J.; McCarthy, J.C. *J. Am. Chem. Soc.* 1964, 86, 1196.
- 101 – Robert, D.; Gagnaire, D. *Proceedings of international Symposium on Wood and Pulping Chemistry*, Stockholm, 1981, 86.
- 102 – Porter, L. J. *Tannins em Methods in plant biochemistry*; Academic Press, Nova York, 1989.
- 103 – Steynberg, P. J.; Brandt, E. V.; Ferreira, D.; Hemingway, R. W. J. *Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1997, 1943.
- 104 – Taylor, M.G.; et al *Tappi Journal* 1983, 66, 6.
- 105 – Kim, Y. S.; Newman, R. H. *Holzforschung* 1995, 49, 109.

- 
- 106 – Terashima, N.; Atalla, R. H.; Vanderhart, D. L. *Phytochemistry* **1997**, 46, 5, 863.
- 107 – Martinez, A. T.; Almendros, G.; González-Vila, F. J.; Fründ, R. *Solid State Magnetic Nuclear Resonance* **1999**, 15, 41.
- 108 – Porter, J.L.; Hrstich, L.N.; Chan, B.G. *Phytochemistry* **1986**, 25, 223.
- 109 – Conde, E.; Cadahia, E.; et al *Holzforschung* **1995**, 49, 5.
- 110 - Conde, E.; Cadahia, E.; et al *Holzforschung* **1997**, 51, 2.
- 111 - Conde, E.; Cadahia, E.; et al; *Holz als Roh um Werksstoff* **1996**, 54, 175
- 112 – Chang, R.; *Análise dos Compostos Fenólicos da Madeira do E. grandis e do E. urophilla do Triângulo Mineiro*, Tese de mestrado, Uberlândia, 2000.
- 113 - Marton, J.; Alder, E. *Acta Chem. Scand.* **1961**, 15, 357.
- 114 – McFarlane, W.D. *J. Inst. Brewing* **1961**, 67, 502.
- 115 – Stafford, H.A.; Lester, H.H. *Plant Physiol.* **1980**, 66, 1085.

## Produção científica

- Como trabalho apresentado em congresso:

*VI Encontro de Iniciação Científica - Módulo PIBIC/CNPq*

Período: 15 -17 de outubro de 1997

Título do Trabalho: Estudos Preliminares dos Polifenóis e da Lignina da Aroeira-Preta (*Astronium urundeuva*).

*Quinto Simpósio Brasileiro Sobre Química de Ligninas e Outros Componentes da Madeira*

Período: 31/08 - 05/09 de 1997

Título do Trabalho: Preliminary Studies on Polyphenols and Lignin of *Astronium urundeuva* Wood.

*20ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ)*

Período: 24 - 27 de maio de 1997

Título do Trabalho: “ Estudo da Lignina e dos Extrativos Polifenólicos da Aroeira-Preta (*Astronium urundeuva*) ”.

- Como publicação em revista científica:

Título do artigo: Studies on Polyphenols and Lignin of *Astronium urundeuva* wood.

Referência: J. Braz. Chem. Society, v. 10, nº 6, 447-452, 1999.