



MOU
547.631.4
C456a
TES. MEM

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Química

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**“Análise dos Compostos Fenólicos da Madeira do
E. grandis e do *E. urophilla* do Triângulo Mineiro”**

Aluno: Roberto Chang

Orientador: Evandro Afonso do Nascimento

Novembro de 2000

SISBI/UFU



1000204134



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

ALUNO: ROBERTO CHANG

NÚMERO DE MATRÍCULA: 5981426-5

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA ORGÂNICA

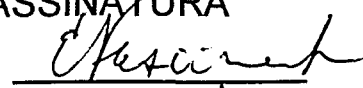
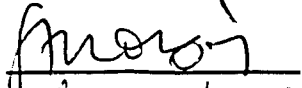

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: NÍVEL MESTRADO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

**“ANÁLISE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DA MADEIRA DO
E. GRANDIS E DO E. UROPHILLA DO TRIÂNGULO
MINEIRO”.**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Evandro Afonso do Nascimento

A Dissertação foi **APROVADA** em reunião pública, realizada no Anfiteatro do Bloco X do Campus Santa Mônica, em 10 de novembro de 2000, às 14:00 horas, com a seguinte Banca Examinadora:

NOME:	ASSINATURA
Prof. Dr. Evandro A. do Nascimento (Orientador-UFU)	
Prof. Dr. Sérgio Antônio Lemos de Moraes (UFU)	
Profa. Dra. Dorila Piló-Veloso	UFMG) 

Uberlândia, 10 de novembro de 2000.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Evandro Afonso do Nascimento pela sua orientação, suporte e profissionalismo demonstrados.
- Ao Prof. Sérgio Antônio Lemos de Moraes por sua co-orientação.
- Ao Instituto de Química, aos professores e técnicos diretamente envolvidos.
- A CIF-Tangará e SEAP pelo suporte e pelas amostras de madeira.
- Ao CIFOR/INIA, UFMG e CETEC-MG pelas análises feitas.
- Aos colegas de mestrado pelo companheirismo e ajuda.
- À FAPEMIG/FIEMG pela bolsa de mestrado concedida.

SUMÁRIO

Capítulo 1 - Introdução e revisão bibliográfica	1
1.1. Histórico da utilização da madeira e de seus extrativos	1
1.2. Taninos	2
1.2.1. Taninos condensados	2
1.2.2. Taninos hidrolisáveis	4
1.3. Classificação dos compostos fenólicos	5
1.3.1. C_6C_0	5
1.3.2. C_6C_1	5
1.3.3. C_6C_2	6
1.3.4. C_6C_3	6
1.3.5. $C_6C_{0-2}C_6$	7
1.3.6. $C_6C_3C_6$ (Flavonóides)	8
1.4. A madeira e seus constituintes	10
1.5. O eucalipto	13
1.6. Extração da madeira	14
1.7. A rota sintética	16
1.8. Métodos analíticos e ensaios	17
1.8.1. Determinação da umidade	17
1.8.2. Ensaios espectrofotométricos na região do UV-Visível	17
1.8.2.1. Determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu	18
1.8.2.2. Determinação de proantocianidinas pelo método da vanilina	19
1.8.2.3. Determinação de flavonóides em teor de quercetina	20
1.8.3. Espectroscopia no Infravermelho	20
1.8.4. Separação em colunas cromatográficas	21
1.8.5. Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM)	21
1.8.6. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	21
1.8.7. Determinação de proantocianidinas pelo método do butanol-ácido	22
1.8.8. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	23
1.8.9. Determinação de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio (CHN)	23
1.9. Estudo de compostos fenólicos e taninos da madeira de eucalipto	24
1.10. Objetivo	24
Capítulo 2 - Parte Experimental	26
2.1. O corte da madeira	26
2.2. Procedimentos analíticos	27
2.2.1. Umidade	28
2.3. Extração da madeira	28
2.3.1. Extração da madeira com benzeno/etanol	29
2.3.2. Extração da madeira com água	29

2.3.3.	Determinação da Lignina de Klason	30
2.3.4.	Determinação da holocelulose	30
2.4.	Teor de extrativos	31
2.5.	Obtenção do extrato liofilizado	31
2.6.	Separação em colunas cromatográficas e análise por CG/EM	31
2.7.	Ensaio colorimétricos	32
2.7.1.	Ensaio de determinação do teor de fenóis totais	32
2.7.2.	Ensaio para determinação do teor de flavonóides em equivalentes de quercetina	32
2.7.3.	Determinação de proantocianidinas pelo método da vanilina	32
2.8.	Espectroscopia no Infravermelho	33
2.9.	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas	33
2.10.	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	34
2.10.1.	INIA-Madri	34
2.10.2.	CETEC-BH	35
2.10.3.	Ensaio de hidrólise de proantocianidinas com Butanol/HCl	36
2.11.	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	36
2.12.	Determinação de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio (CHN)	37
Capítulo 3 - Resultados e Discussões		38
3.1.	Umidade	38
3.2.	Holocelulose, lignina de Klason e extrativos (benzeno/etanol, água quente e acetona/água)	38
3.3.	Ensaio espectrofotométricos	40
3.3.1.	Determinação de flavonóides em teor de quercetina	40
3.3.2.	Determinação dos fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteau	41
3.3.3.	Determinação de proantocianidinas pelo método da vanilina	42
3.4.	Espectroscopia no Infravermelho	43
3.5.	CG/EM	45
3.6.	CLAE	51
3.7.	RMN	57
3.8.	CHN	64
Capítulo 4 - Conclusões		65
Capítulo 5 - Apêndices		68
Apêndice A		68
Apêndice B		98
Capítulo 6 - Produção científica sobre a dissertação		99
Capítulo 7 - Bibliografia		100

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figuras

1.	A numeração convencional e a estrutura básica de um flavonóide (A) e um flavan-3-ol (B).	3
2.	A procianidina, um tanino condensado com ligação 4,8.	3
3.	Estrutura do padrão de profisetinidina comercialmente disponível.	4
4.	Ácidos presentes nos taninos hidrolisáveis.	4
5.	Estruturas do (1) pirogallol, (2) catecol, (3) floroglucinol, (4) resorcinol, (5) hidroquinona.	5
6.	Estruturas do (1) ácido gálico, (2) ácido salicílico, (3) aldeído salicílico, (4) ácido protocatéquico.	5
7.	Estruturas do (1) ácido para-cumárico, (2) ácido caféico, (3) ácido ferúlico e (4) ácido sinapílico.	6
8.	Estruturas do (1) ácido nordihidroguaiarético (NDGA) e (2) pinoresinol formadas pela dimerização de duas estruturas C ₆ C ₃ .	6
9.	Estruturas da (1) umbeliferona e (2) aesculetina.	7
10.	Estruturas da (1) benzopirano-4-ona, (2) aloesina, (3) eugenina.	7
11.	Estruturas da (1) aloenina, (2) pinosilvina e (3) hidrangeol.	7
12.	As diferentes variações dos flavonóides.	8
13.	Algumas antocianidinas e suas espécies de origem.	9
14.	Esquema geral dos componentes da madeira.	11
15.	Diagrama de operações para obtenção da madeira livre de extrativos.	15
16.	Inter-relações entre os tipos de monômeros de flavonóides propostas por Wong.	16
17.	Reação da vanilina com o anel A da proantocianidina.	19
18.	Formação do complexo de flavonóides com cloreto de alumínio.	20
19.	Reações de formação de antocianidinas a partir de taninos condensados proposto por Porter.	23
20.	Etapas da extração da madeira e fluxograma das análises feitas.	26
21.	Diagrama de operações da sequência A de extração.	28
22.	Absorvância versus concentração de quercetina.	40
23.	Absorvância versus concentração de ácido gálico.	41
24.	Absorvância versus concentração de catequina.	42
25.	Espectro no infravermelho do extrato L1 do <i>E. grandis</i> , em KBr.	43
26.	Espectro no infravermelho do extrato L1 do <i>E. urophilla</i> , em KBr.	44
27.	Cromatograma gasoso do extrato étereo obtido a partir do extrato E1 do <i>E. grandis</i> .	49
28.	Cromatograma gasoso da fração 8 (acetona) obtida a partir do extrato E1 do <i>E. grandis</i> após separação em coluna de sephadex.	49
29.	Cromatograma gasoso do extrato clorofórmico obtido a partir do extrato E1 do <i>E. urophilla</i> .	49
30.	Cromatograma gasoso da fração 3 (etanol) obtida a partir do extrato E1 do <i>E. urophilla</i> após separação em coluna de sephadex.	50

31.	Cromatograma líquido do extrato L2 do <i>E. grandis</i> no canal 325±150 nm.	51
32.	Cromatograma líquido do extrato L2 do <i>E. grandis</i> no canal 365±4 nm.	52
33.	Cromatograma líquido do extrato L2 do <i>E. urophilla</i> no canal 325±150 nm.	52
34.	Cromatograma líquido do extrato L2 do <i>E. urophilla</i> no canal 365±4 nm.	53
35.	Cromatograma líquido do produto resultante da hidrólise do extrato L2 do <i>E. grandis</i> com butanol-ácido, no canal 525 nm.	55
36.	Cromatograma líquido do produto resultante da hidrólise do extrato L2 do <i>E. urophilla</i> com butanol-ácido, no canal 525 nm.	55
37.	Cromatograma líquido do produto resultante da hidrólise do extrato L1 do <i>E. grandis</i> com butanol-ácido, no canal 270 nm.	56
38.	Cromatograma líquido do produto resultante da hidrólise do extrato L1 do <i>E. urophilla</i> com butanol-ácido, no canal 270 nm.	57
39.	Espectro de RMN do C-13 no estado sólido do extrato acetona/água do <i>E. grandis</i> .	58
40.	Espectro de RMN do C-13 no estado sólido do extrato acetona/água do <i>E. urophilla</i> .	58
41.	Estruturas da (A) procianidina e (B) prodelphinidina.	60
42.	Deslocamentos químicos do C-13 dos galotaninos e elagitatinos.	61
43.	Espectro de RMN do C-13 do extrato aquoso em acetona/água deuterada do <i>E. grandis</i> .	62
44.	Espectro de RMN H-1 do extrato aquoso em acetona/água deuterada do <i>E. grandis</i> .	63

Tabelas

1.	Composição química das madeiras	10
2.	Extrativos e componentes macromoleculares	13
3.	Faixas de absorção para flavonóides na região do UV/Visível	18
4.	Parâmetros da análise por CG-EM	34
5.	Condições da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – INIA	35
6.	Condições da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CETEC-BH	35
7.	Teores de umidade	38
8.	Valores da holocelulose, lignina de Klason e extrativos da madeira	39
9.	Rendimento da extração da madeira na mistura acetona/água	39
10.	Bandas no IV dos extratos aquosos de <i>E. grandis</i> e <i>E. urophila</i> .	45
11.	Compostos extraídos com éter do extratos E1 do <i>E. grandis</i> e do <i>E. urophilla</i> .	46
12.	Compostos extraídos com clorofórmio do extrato E1 do <i>E. grandis</i> e <i>E. urophilla</i> .	46
13.	Compostos extraídos nas frações etanol/acetona dos extratos E1 do <i>E. grandis</i> e do <i>E. urophilla</i> após separação em coluna de sephadex.	47
14.	Componentes identificados por CLAE nos extratos L2 do <i>E. grandis</i> e do <i>E. urophilla</i> .	54
15.	Atribuição dos principais picos dos espectros de RMN do C-13 no estado sólido dos extratos E1 do <i>E. grandis</i> e do <i>E. urophilla</i>	59
16.	Deslocamentos químicos dos carbonos de flavonóides	60
17.	Resultados de CHN	64

RESUMO

Os compostos fenólicos têm sido estudados há muito tempo. A descoberta da atividade biológica de vários compostos fenólicos isolados de plantas e o advento de novas técnicas analíticas e espectroscópicas como a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a ressonância magnética nuclear (RMN) têm contribuído para um estudo mais eficiente dos compostos de maior polaridade, tanto quantitativa quanto qualitativamente.

Ultimamente os compostos fenólicos da madeira de eucalipto têm sido objeto de estudo pela ótima adaptação desta árvore às condições climáticas brasileiras e seu bom rendimento na indústria de celulose. A madeira de eucalipto também é usada como lenha, na fabricação de carvão, na fabricação de móveis e na construção civil.

O objetivo primário deste trabalho foi caracterizar os compostos fenólicos e outros extrativos existentes na madeira das espécies de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*, cultivadas no cerrado do Triângulo Mineiro.

Os taninos hidrolisados (galotaninos e elagitaninos), taninos condensados e flavonóides foram os principais componentes, apesar de álcoois, ácidos carboxílicos, ácidos graxos, ésteres e açúcares também terem sido identificados. Vários açúcares, flavonóides e outros compostos não puderam ser identificados. A catequina e a hidroquinona foram os compostos fenólicos mais abundantes encontrados por CG/EM e a procianidina foi a principal proantocianidina presente nos extratos estudados.

A quantificação de fenóis totais e proantocianidinas foi obtida por espectroscopia no ultravioleta. Os resultados estavam de acordo com os reportados por outros pesquisadores, ou seja, os resultados mostraram similaridades com outras espécies estudadas, independente de sua localização geográfica.

A espectroscopia no infravermelho e principalmente a ressonância magnética nuclear confirmaram e complementaram os resultados obtidos por CG/EM e CLAE para os vários extratos.

ABSTRACT

The phenolic compounds have been studied since a long time. The discovery of biological activity of many phenolic compounds isolated from plants and allied with new analytical and spectroscopic techniques such as Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (GC/MS), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Nuclear Magnetic Resonance have contributed to a more efficient study of increased polarity compounds, in a quantitative and qualitative ways.

Most recently, the phenolic compounds from Eucalyptus wood have become a case study due to the good adaptation of this tree to Brazil's climate and good yield in cellulose industry. Eucalyptus wood is also used as firewood, in charcoal production, for furniture manufacturing and civil constructions.

The primary objective of the present work was to characterize the phenolic compounds and other extractives of the species *Eucalyptus grandis* and *urophilla* harvested in a region called cerrado (savannah) in Triângulo Mineiro.

Hydrolyzed (gallotannins and elagitannins), condensed tannins and flavonoids were the main components but alcohols, carboxylic acids, fat acids, esters and sugars were also identified. Many unknown sugars, flavonoids and other components could not be identified. Catequin and hydroquinone were the most abundant phenolic compounds found by CG/MS and procyanidin was the main proanthocyanidin present in the studied extracts.

Total phenols and proanthocyanidins quantification were carried out by ultraviolet spectroscopy. The obtained results were in good agreement with those obtained by others researchers, i.e., the results have shown similarities between the studied species, independent of geographic origin.

Infrared and specially Nuclear Magnetic Resonance spectroscopies confirmed and complemented the results obtained by GC/MS and HPLC for the various extracts.

Capítulo 1 – Introdução e revisão bibliográfica

1.1. Histórico da utilização da madeira e de seus extrativos

A madeira é usada desde os primórdios da civilização em diversas aplicações como material básico para a construção civil, utensílios, ferramentas e fonte de energia. Nos dias de hoje, a madeira é a principal matéria-prima da indústria de celulose. A casca e o lenho de algumas espécies são fontes importantes de extrativos comerciais como os taninos e as resinas.

Os egípcios já se valiam do suco extraído da destilação da madeira, em processos de embalsamamento¹.

Uma das mais antigas atividades envolvendo compostos fenólicos é, sem dúvida, a transformação da pele de animais em couro. Os métodos originais primitivos para a preservação das peles consistiam, provavelmente, na simples secagem ao ar e ao sol¹. A descoberta dos efeitos tanantes das folhas, dos ramos e cascas de certas árvores em água, foi provavelmente acidental¹. Bliss² apontou a existência de registros gravados desta técnica há mais de 10.000 anos atrás.

No século XVIII, o termo “tanino” era 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. Atualmente são empregados sais inorgânicos de alumínio, cromo, taninos sintéticos e taninos vegetais para se curtir as peles.

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 nas cascas, 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. Esta sensação resulta da interação entre os taninos e as proteínas da saliva com os tecidos mucosos da boca³. Haslam³, 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^{4,5,6}.

Bate-Smith⁷ reformulou o termo tanino como: “compostos fenólicos solúveis em

água, com massas moleculares entre 500 e 3000, que além de passar pelas reações usuais dos grupos fenólicos, tem como propriedades especiais a capacidade de precipitar alcalóides, gelatina e outras proteínas”. Uma definição mais recente foi dada por Haslam³: 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, esses 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 que os taninos hidrolisáveis possuem massa em torno de 3000 u.

Markham⁸ comenta que muitos taninos são derivados de flavonóides e que os flavonóides constituem um dos maiores grupos de fenóis que existem na natureza.

Como alguns extratos de árvores não apresentavam as características de precipitação de proteínas e outras substâncias existentes em plantas de pequeno porte apresentavam algumas propriedades em comum, os compostos fenólicos tiveram que ser reclassificados, embora os termos tanino, polifenóis e compostos polifenólicos sejam empregados como sinônimos. Percebe-se por parte dos autores consultados, uma indefinição de conceitos que mistura os conceitos de taninos com compostos fenólicos e polifenólicos, que são tratados em sua maioria como sinônimos.

1.2. Taninos

1.2.1. Taninos condensados

Taninos condensados (ou proantocianidinas) são polímeros de unidades de flavonóides do tipo flavan-3-ol. O esqueleto básico de um flavonóide e uma estrutura do tipo flavan-3-ol são mostrados na Figura 1.

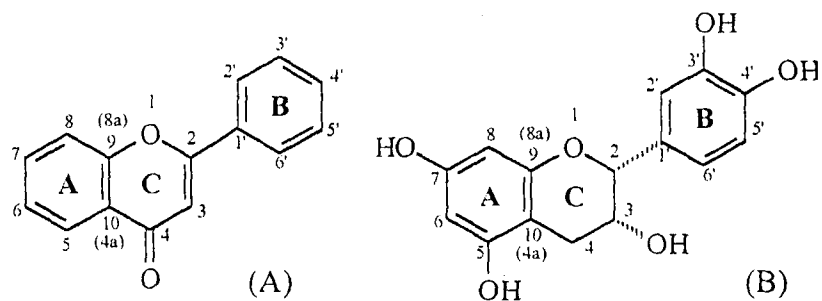


Figura 1 – A numeração convencionada e a estrutura básica de um flavonóide (A) e um flavan-3-ol (B).

As estruturas do tipo flavan-3-ol são ligadas por ligações carbono-carbono, as quais não sofrem hidrólise. Os taninos condensados são mais distribuídos na natureza que os taninos hidrolisáveis. A grande diversidade estrutural das proantocianidinas é uma consequência dos vários padrões de substituição e estereoquímica das subunidades de flavanol. Esta complexidade ainda é resultado da diversidade de posições onde a ligação interflavânica pode ocorrer e da variação estereoquímica desta ligação. A procianidina encontrada no sorgo é o mais simples representante dos taninos condensados⁹. A Figura 2 mostra a procianidina com ligações 4,8.

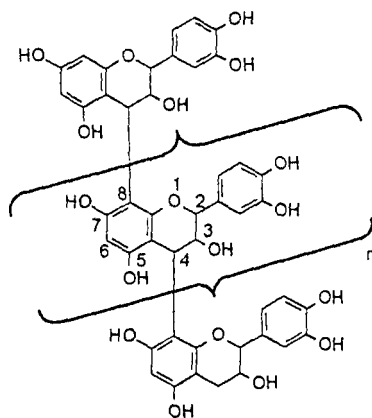


Figura 2 - A procianidina, um tanino condensado com ligação 4,8.

O único padrão comercialmente⁹ disponível de taninos condensados é a profisetinidina encontrado na casca do Quebracho (*Schinopsis spp.*), que é uma mistura complexa de compostos fenólicos mostrada na Figura 3.

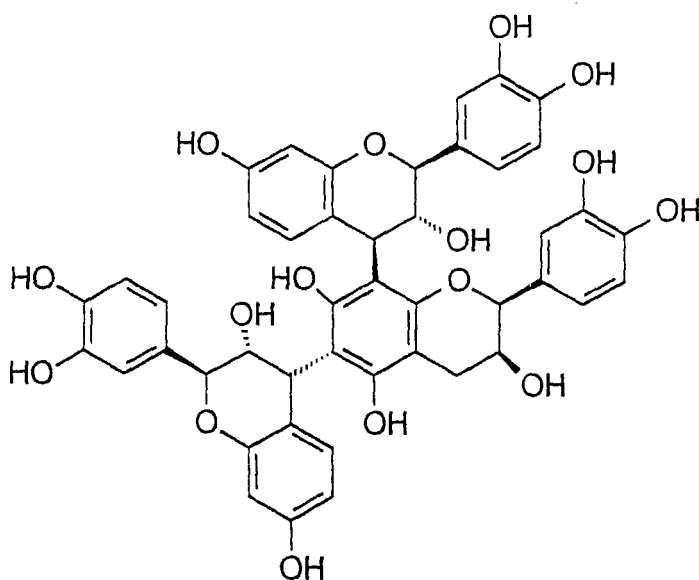


Figura 3 – Estrutura do padrão de profisetinidina comercialmente disponível.

As proantocianidinas liberam antocianidinas de cores características quando tratadas com ácidos minerais.

1.2.2. Taninos hidrolisáveis

Os taninos hidrolisáveis são assim denominados por sua ruptura mediante hidrólise, resultando os ácidos fenólicos como o ácido gálico, o ácido elágico, o ácido hexahidroxidifênico e açúcares. A Figura 4 mostra as estruturas desses ácidos.

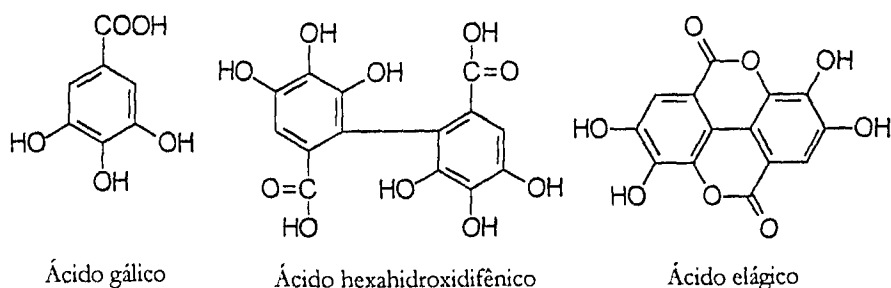


Figura 4 – Ácidos presentes nos taninos hidrolisáveis.

A união de duas moléculas de ácido gálico forma o ácido hexahidroxidifênico (ou DDHP), que por sua vez forma o ácido elágico por lactonização. Se o ácido elágico estiver ligado ao açúcar tem-se um elagitanino; se for o ácido gálico, um galotanino. Estes taninos podem ser hidrolisados por ácidos, bases, água quente ou enzimas.

1.3. Classificação dos compostos fenólicos

Além dos taninos, os compostos fenólicos podem ser classificados¹⁰ em subgrupos de acordo com o número de carbonos e a presença da cadeia lateral.

1.3.1. C₆C₀

Os mais simples compostos fenólicos encontrados são derivados do pirogalol, floroglucinol ou variantes da substituição do catecol, resorcinol e hidroquinona, mostrados na Figura 5.

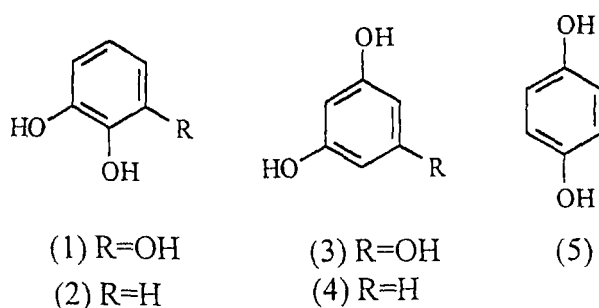


Figura 5 – Estruturas do (1) pirogalol, (2) catecol, (3) floroglucinol, (4) resorcinol, (5) hidroquinona.

1.3.2. C₆C₁

O mais importante fenol deste subgrupo é o ácido gálico, no qual a cadeia lateral é composta pelo carbono do ácido carboxílico. O ácido gálico se dimeriza e forma o ácido elágico que são os compostos fenólicos mais comuns dentro da classe dos taninos hidrolisáveis. Pela sua acidez característica, são capazes de reagir com compostos que possuem grupos hidroxila (como álcoois e fenóis) de modo a formarem ésteres. Algumas compostos importantes desta subclasse estão apresentados na Figura 6.

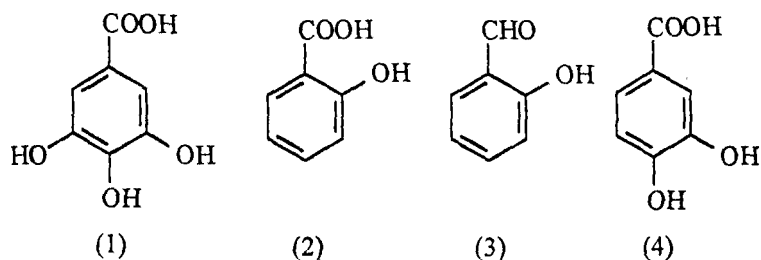


Figura 6 –Estruturas do (1) ácido gálico, (2) ácido salicílico, (3) aldeído salicílico, (4) ácido protocatéquico.

1.3.3. C₆C₂

As acetofenonas são o grupo mais comum desta subclasse mas são menos abundantes que os grupos C₆C₁ e C₆C₃. Exemplos desta subclasse são a xantoxilina e o ácido p-hidróxifenilacético.

1.3.4. C₆C₃

Esta subclasse é geralmente chamada de fenilpropanóides ou fenilpropenóides, dependendo da existência do grupo fenilpropano ou fenilpropeno. Os mais conhecidos são os ácidos hidroxicinâmicos como o ácido para-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico e o ácido sinapílico, mostrados na Figura 7.

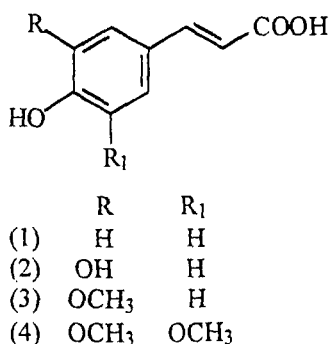


Figura 7 – Estruturas do (1) ácido para-cumárico, (2) ácido caféico, (3) ácido ferúlico e (4) ácido sinapílico.

As lignanas são formadas quando ocorre a dimerização de duas estruturas do tipo C₆C₃. Os precursores são as unidades fenilpropano ou fenilpropeno, que formam as estruturas dispostas na Figura 8.

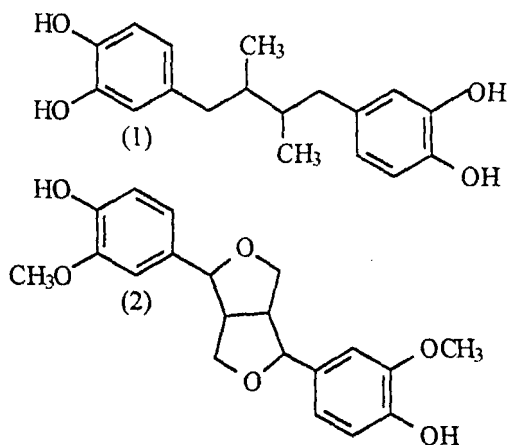


Figura 8 – Estruturas do (1) ácido nordiidroguaiarético (NDGA) e (2) pinoresinol formadas pela dimerização de duas estruturas C₆C₃.

As cumarinas são formadas quando o sistema C_6C_3 sofre uma ciclização. As cumarinas mais comuns são mostradas na Figura 9.

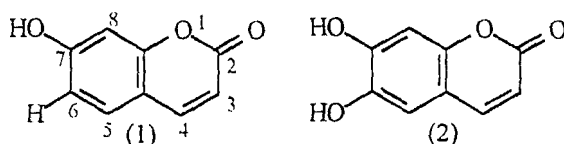


Figura 9 – Estruturas da (1) umbeliferona e (2) aesculetina.

O sistema de anéis benzopirânicos é muito comum no reino vegetal mas é mais facilmente encontrado na forma benzopirân-4-ona do que a forma benzopirân-2-ona das cumarinas. Substituições do tipo alquila formam compostos geralmente chamados de cromonas, mostrados na Figura 10.

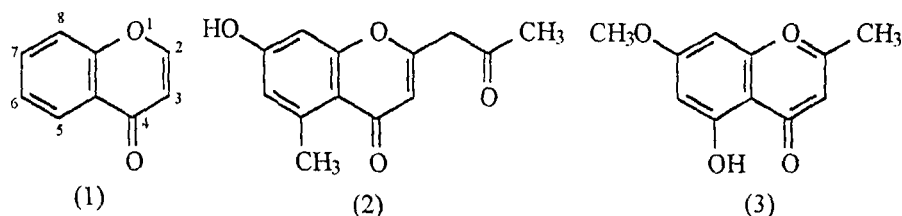


Figura 10 – Estruturas da (1) benzopirân-4-ona, (2) aloesina, (3) eugenina.

1.3.5. $C_6C_{0-2}C_6$

Este grupo heterogêneo contém diversas variantes frequentemente encontradas em plantas superiores, com relação ao número de carbonos do anel central, que podem ter 2, 1 ou nenhum carbono. Fazem parte deste grupo os estilbenos, as isocumarinas e os compostos bicíclicos do tipo aril-pironas, exemplificados e mostrados na Figura 11.

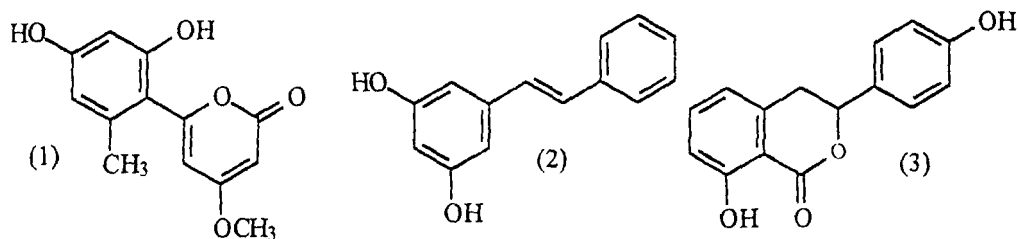


Figura 11 – Estruturas da (1) aloenina, (2) pinosilvina e (3) hidrangeol.

1.3.6. C₆C₃C₆ (Flavonóides)

A Figura 1 mostra a estrutura básica de um flavonóide¹¹ e a Figura 12 apresenta os vários tipos existentes.

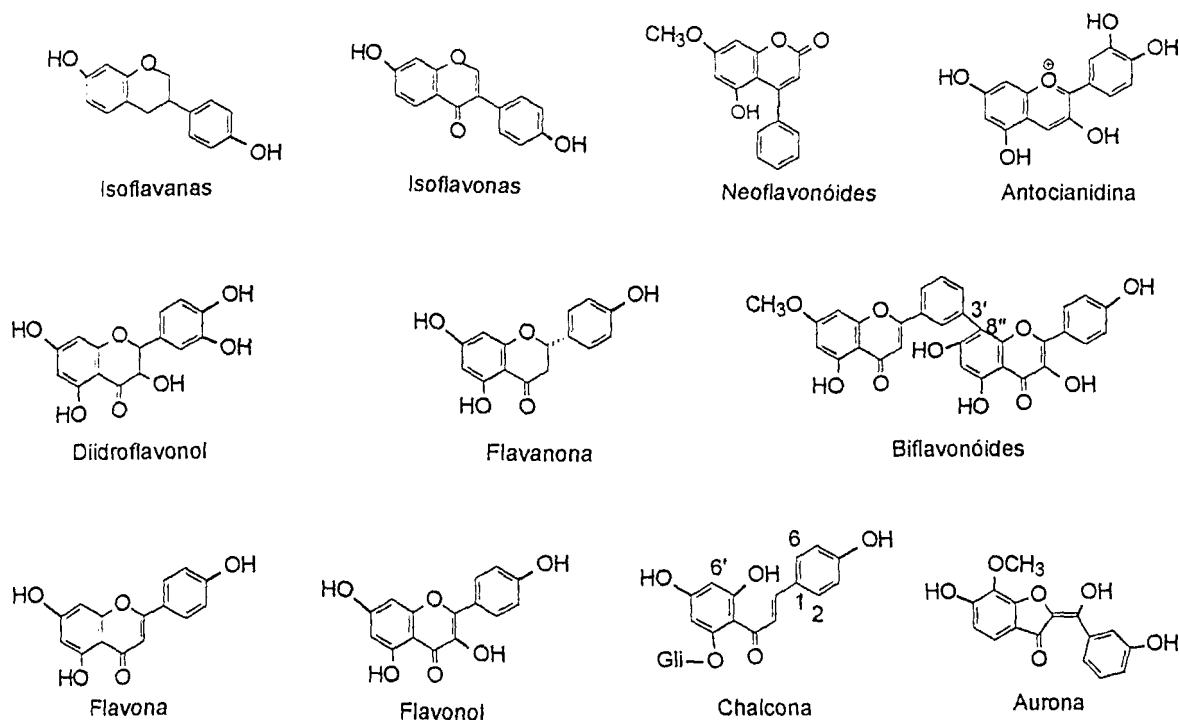


Figura 12 – As diferentes variações dos flavonóides.

As antocianidinas que são liberadas na hidrólise ácida dos taninos condensados também estão incluídas nesta classificação. Quando as antocianidinas estão ligadas a açúcares são denominadas de antocianinas. O termo antocianina vem do grego antos + cianos (azul escuro) e data de 1839. As antocianidinas são os pigmentos responsáveis pelas colorações diferenciadas das folhas, frutos, flores, sucos e vinhos em uma gama que passa pelas cores rosa, escarlate, vermelho, lilás, violeta e azul.

No século 17 havia a idéia de que os pigmentos vermelhos existentes nas plantas fossem produtos de oxidação da clorofila¹². Wigand¹³ argumentou que as antocianinas, não tinham relação com a clorofila, e que eram formadas a partir de compostos incolores. Maumené¹⁴ deu uma importante sustentação para a existência de precursores incolores das antocianinas. Uvas secas com ácido sulfúrico não mudavam de coloração e, quando expostas ao ar, adquiriam uma coloração avermelhada. Esta observação permitiu concluir que deveria ocorrer a oxidação ou a hidratação de algum composto cromogênico. As antocianinas foram consideradas como escudo protetor das folhas contra a luz forte por Johow¹⁵, enquanto Keny¹⁶ considerou que, por este fato, havia a transformação de luz em calor.

Sturgeon e Mitten¹⁷ provaram que pinhas arroxeadas (*Abies concolor*) tinham temperaturas internas menores que se comparadas às pinhas verdes, quando expostas à luz solar direta.

Onslow¹⁸ foi um dos pioneiros no estudo das antocianidinas no início deste século.

Wheldale¹⁹ e vários outros cientistas tentaram relacionar a herança das cores de flores com características químicas específicas, mas era uma tarefa difícil para a época, por causa da complexa mistura de componentes ainda desconhecidos. O termo “leucocianidina” foi inicialmente usado por Rosenheim²⁰ para identificar compostos isolados de folhas jovens de vinhedos. Estas folhas, ao serem tratadas com ácido, eram facilmente convertidas em antocianidinas. Esta observação levou ao ensaio do butanol-ácido no qual extratos vegetais são submetidos a ácidos minerais fortes na presença de álcool para a liberação das antocianidinas através da hidrólise das proantocianidinas.

As antocianidinas mais abundantes em folhas e flores são a cianidina, a delfinidina e a pelargonidina. A cianidina e a delfinidina formam polímeros chamados de procianidina (PC) e prodelfinidina (PD), que podem ocorrer dimerizadas ou misturadas em proporções variadas.

Na Figura 13, estão apresentadas algumas antocianidinas¹¹ com as espécies de plantas nas quais estes compostos foram identificados inicialmente (exceto fisetinidina).

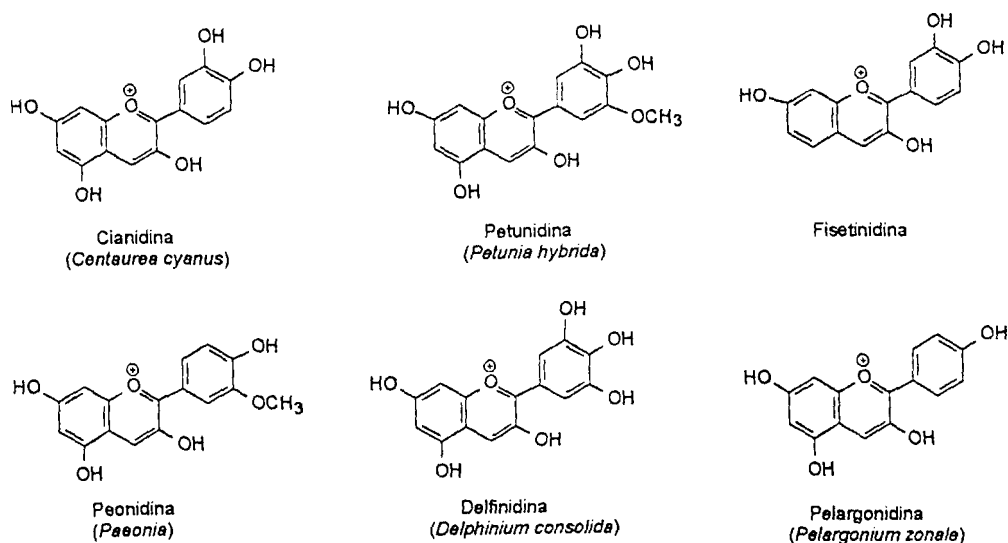


Figura 13 – Algumas antocianidinas e suas espécies de origem

Os compostos fenólicos e os taninos são considerados como produtos de metabolismo secundário das plantas. Isto se deve ao fato dos compostos fenólicos não

apresentarem uma função distinta, como suporte ou substância vital para a planta. Algumas teorias tentam explicar a presença dos metabólitos secundários como um simples material de descarte ou com a função de proteção contra herbívoros e microorganismos ou ainda como suporte para outros organismos (aleloquímica e sinalização química).

Aires²¹ estudou a diversidade e as atividades anti-herbívoro dos taninos condensados.

Diversas atividades biológicas dos flavonóides são do conhecimento dos pesquisadores como a fixação do nitrogênio no solo, como estimulantes para a postura de ovos (fato observado em borboletas, besouros e pássaros) e como agente antifungo, antibactéria, antivirais, etc¹¹.

Swift et al.²² descobriram que os compostos fenólicos são produzidos principalmente em plantas que vivem em solos ácidos e pobres em nutrientes. Estes compostos fenólicos se ligam a proteínas formando complexos resistentes à decomposição, e que são mais difíceis de se decompor quanto piores forem as condições do solo.

1.4. A madeira e seus constituintes

As madeiras podem ser classificadas quanto à sua estrutura celular²³. As madeiras “moles” (do inglês softwood) possuem uma estrutura relativamente simples que consistem de 90 a 95 % de traqueídeos, que são células finas alongadas, arranjadas longitudinalmente, e responsáveis pelo transporte de água e nutrientes. Os outros 5 a 10% são compostos de células do parênquima epitelial que secretam resinas nos canais resiníferos. As madeiras “duras” (hardwood) possuem uma estrutura celular mais complexa onde existem vários tipos de células especializadas com funções diferentes, como suporte, condução e armazenamento. Esta classificação nada tem a ver com dureza física das madeiras²⁴. As coníferas são exemplos clássicos de “softwood” e o eucalipto é do tipo “hardwood”.

A composição química²⁵ das madeiras é mostrada na Tabela 1 e Figura 14.

Tabela 1- Composição química das madeiras

Componentes	Porcentagem aproximada
Celulose	50
Hemiceluloses	20-30
Lignina	15 a 35
Constituintes menores (Metabólitos secundários)	< 10

Estes valores podem variar dependendo da espécie estudada, da região geográfica e do clima e de outros fatores, mas sempre se situam próximos dos mostrados na Tabela 1.

A madeira tem sido extensivamente estudada nos seus aspectos morfológicos e químicos. A Figura 14 mostra um esquema geral dos componentes da madeira. A maior parte da madeira é constituída de polissacarídeos.

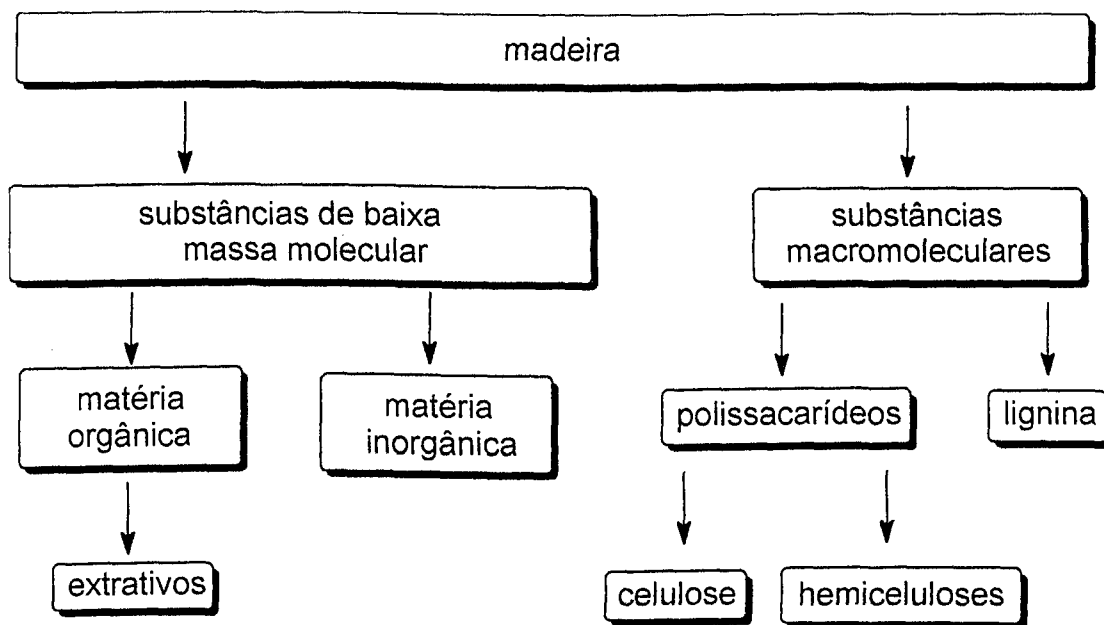


Figura 14 - Esquema geral dos componentes da madeira.

A celulose é um polissacarídeo linear que é o principal^{23,24} componente da madeira. É um polímero de alta massa molecular constituído unicamente por unidades β -D-glucose ligados entre si pela ligação 1,4. A hemicelulose também é um polissacarídeo, mas que é constituído por vários tipos de unidades de açúcar, resultando em um polímero ramificado e de cadeia curta. A hemicelulose e a celulose têm a função de material de suporte nas paredes celulares. A quantidade de hemicelulose existente se situa entre 20 e 30 % em massa de madeira seca, variando de madeira para madeira.

A lignina^{23,24} é um importante componente de todas as madeiras. É constituída de um sistema aromático composto de unidades fenil-propanóides. É de natureza amorfa e geralmente insolúvel em solventes comuns. A lignina difere dos polissacarídeos por sua resistência à hidrólise ácida e sua grande reatividade frente a oxidantes e outros reagentes. A lignina está localizada entre as paredes celulares e é responsável pela rigidez destas paredes. A indústria de papel e celulose procura obter papéis de alta qualidade através da remoção da lignina.

A holocelulose²⁶ é o produto obtido ao se fazer uma deslignificação (máxima remoção de lignina possível) de modo que todos os polissacarídeos sejam preservados.

Os extrativos²⁴ constituem uma das partes mais interessante no estudo dos componentes da madeira. Apesar de constituírem aproximadamente menos de 10 % da massa de madeira, eles podem ter grande influência no rendimento e nas propriedades da madeira processada. Por definição²⁴, os extrativos são as substâncias que são removidas da madeira pela extração com solventes neutros. Os extrativos são considerados como partes não-essenciais das paredes celulares. Aparentemente estes extrativos não desempenham nenhum papel vital para as plantas, e desta forma, estes extrativos foram tratados como produtos de um metabolismo secundário.

Já foram identificados mais de 100.000 compostos em produtos naturais, muitos dos quais encontrados em uma ou algumas espécies²⁷.

Estes extrativos são classificados²⁸ como compostos aromáticos polifenólicos, terpenos, ácidos alifáticos, álcoois, substâncias inorgânicas e outros componentes menores, como hormônios, etc. Estes extrativos foram classificados por Kurth²⁸ como materiais que seriam solúveis em éter etílico, álcool etílico e água. Não existe um solvente único capaz de remover todas as substâncias classificadas como extrativos. Desta forma, é necessário efetuar várias seqüências de extrações com solventes apropriados a fim de se remover os extrativos desejados.

A parte inorgânica é obtida na forma de cinzas pela incineração da madeira a 600-850 °C, e os principais metais encontrados são potássio, cálcio, e magnésio. Este estudo não é muito apropriado pelo baixo valor de cinzas da madeira (1 %) e pelos resultados nem sempre reprodutíveis.

O uso do ácido sulfúrico para a determinação da lignina foi aplicado inicialmente por Klason²⁴. Embora este método tenha sido extensivamente modificado, a lignina isolada com a ajuda de ácido é chamada de Lignina de Klason. Esta lignina é obtida com a utilização de ácido sulfúrico concentrado a 72 % até que os polissacarídeos inicialmente formados e hidrolisados não se precipitem mais sob diluição. A mistura ácida é então diluída com água e aquecida até que a hidrólise seja completa.

Ritter and Kurth²⁹ foram os primeiros a usar o termo holocelulose para definir o produto obtido após a remoção da lignina da madeira. A partir deles, três métodos de determinação da holocelulose surgiram: pelo método de cloração, método de cloração

modificado e o método usando dióxido de cloro ou clorito (cloritação). Um tempo de quatro horas de cloritação são suficientes para madeiras coníferas. Madeiras decíduas freqüentemente requerem somente três horas.

Na Tabela 2 encontram-se os constituintes de algumas madeiras pertencentes a zonas climáticas variadas:

Tabela 2 – Extrativos e componentes macromoleculares²⁶

Madeiras	Extrativos			
	Holocelulose (%)	Lignina (%)	Benzeno/ etanol (%)	Água quente (%)
<i>Picea abies</i> (s)	80,9	27,3	2,0	2,0
<i>Pinus oocarpa</i> (s,tr) **	80,3	25,2	4,4 *	4,3
<i>Acer japonicum</i> (h,t)	81,7	20,7	1,9	4,3
<i>Pterygota macrocarpa</i> (h,t)	78,1	22,7	2,6	2,6

(s=softwood, h=hardwood, t=temperada, tr=tropical)

* tolueno/etanol 2:1, ** dados fornecidos por Melo³⁰.

1.5. O eucalipto

Eucalipto vem do grego eu (bem) + kalyptos (coberto). O eucalipto é uma árvore perene e o seu tronco alto se mantém ano após ano. O tronco possui galhos e ramos aéreos com folhas verdes por todo ano e em sua base reside um sistema radicular. Suas folhas são sempre verdes e cerosas para evitar a perda de água durante a estação seca.

O eucalipto pertence à família *Myrtaceae* dentro da ordem das *Myrtales* e na escala evolutiva é classificado como pertencente à classe das Angiospermas. É uma planta nativa da Austrália que mostrou rápido crescimento e boa adaptação ao solo brasileiro. É uma árvore dicotiledônea sendo que suas folhas são bipartidas por um nervo central e possuem glândulas de óleo. O eucalipto é hermafrodita e seus principais agentes de polinização são os insetos, dentre os quais as abelhas. O eucalipto não é capaz de fixar o nitrogênio no solo e é intolerante quanto à sombra.

Existem mais de 500 espécies de eucalipto. São cultivadas em regiões temperadas e tropicais. O eucalipto tem-se mostrado de grande importância econômica para as indústrias de papel e celulose.

As partes aproveitáveis dos eucaliptos são a casca, a madeira e as folhas. O óleo de eucalipto é extraído das folhas de eucalipto, enquanto o tronco (casca e madeira) é separado para o processamento industrial. A casca, removida em um processo mecânico, é queimada

para o fornecimento de energia. A madeira propriamente dita segue para o processamento, que pode ser tanto para a indústria de celulose como para a de móveis ou esteio para construção civil ou de cercas.

A madeira de eucalipto serve também para a queima, principalmente em cerâmicas.

Ela pode ser utilizada sem nenhum tratamento, mas a impregnação de metais pesados aumenta a sua durabilidade e contribui para a diminuição da área devastada, uma vez que reduz a demanda de madeiras nobres. O conhecimento da constituição dos compostos fenólicos do eucalipto pode melhorar o processo de impregnação de metais ou substituí-lo por outro de menor impacto ambiental.

As espécies mais odoríferas como o *Eucalyptus citriodora* fornecem um óleo essencial que é utilizado em produtos de limpeza ou ainda como substância ativa e odorífera na Aromaterapia.

O tronco de eucalipto serve ainda como substrato para o cultivo do cogumelo Shiitake iniciado na década de 80. Dentre as centenas de espécies desta planta, quatro são cultivadas extensamente para produção de celulose *Eucalyptus urograndis*, *E. urophilla*, *E. saligna* e *E. grandis* e as três últimas prestam-se igualmente bem para o cultivo de shiitake³¹.

A área cultivada de eucalipto no Brasil atinge proporções gigantescas e incalculáveis. Além do grande número de áreas cultivadas por particulares na década de 70 (que receberam incentivos fiscais do governo brasileiro), as empresas que dependem do eucalipto no seu processo produtivo passaram a cultivá-lo em fazendas próprias ou terceirizadas. As indústrias de papel fornecem as mudas e os insumos, quando o cultivo é terceirizado, e têm prioridade na compra da madeira. A área e as condições destas reservas são guardadas como segredo industrial e de mercado. Estima-se que a área plantada de eucalipto no Brasil supere a marca dos 4 milhões de hectares.

1.6. Extração da madeira

O método mais comum de extração é conhecido como percolação, onde um solvente se faz passar através de um material permeável, neste caso, a madeira. Pode ser feita a temperaturas mais elevadas para a quantificação dos extrativos ou à temperatura ambiente, quando se necessita preservar ao máximo estes extrativos.

Muitas seqüências de extração²⁴ foram testadas para a remoção dos extrativos como:

- 1) éter, benzeno/etanol e água quente.

- 2) éter, benzeno/etanol, etanol 50 % frio e água fria.
- 3) etanol/benzeno, etanol e água quente.
- 4) etanol/benzeno, éter e água quente.
- 5) éter, etanol, acetona e água.
- 6) água, éter e etanol.
- 7) água fria, água quente e éter.

Como os extrativos possuem composições variadas, não existe uma sequência de extrações aplicável a todas as madeiras. A Figura 15 mostra um diagrama dos procedimentos efetuados para a obtenção da madeira livre de extrativos.

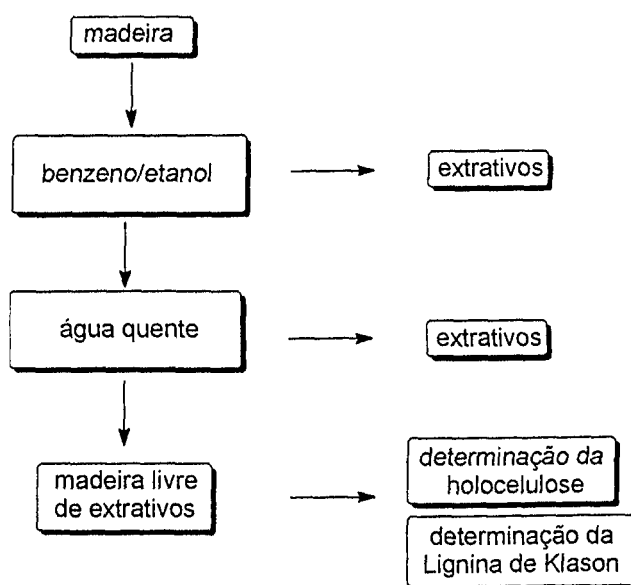


Figura 15– Diagrama de operações para obtenção da madeira livre de extrativos.

A quantificação dos extrativos é feita após uma sequência benzeno/etanol 2:1, seguida de água quente. Os extrativos obtidos pela extração com benzeno/etanol e os extrativos obtidos com água quente são quantificados separadamente. A madeira obtida após esta sequência de extrações é chamada de madeira livre de extrativos (extractive-free wood). Esta madeira é matéria-prima para a determinação da lignina de Klason e dos polissacarídeos.

Os compostos fenólicos geralmente são extraídos com o uso de solventes mais polares como a acetona e os álcoois, contudo, uma solução contendo 70% de acetona e 30% água é uma mistura de solventes mais eficiente que a acetona pura³² e de maior rendimento que os solventes alcoólicos. A acetona inibe a interação entre taninos e proteínas e por isso deve ser evitado o uso da acetona em ensaios onde ocorra a precipitação de proteínas⁹.

1.7. A rota biossintética

Há uma clara evidência para a existência de caminhos biossintéticos diferentes para a síntese dos ácidos benzóicos na natureza³.

Na tentativa de se propor uma “única” rota biossintética para a produção destes flavonóides, Markham⁸ propôs a incorporação das rotas do shikimato e a do acetato-malonato por Hahlbrock e Grisebach³³ e por Wong³⁴, mostrado na Figura 16.

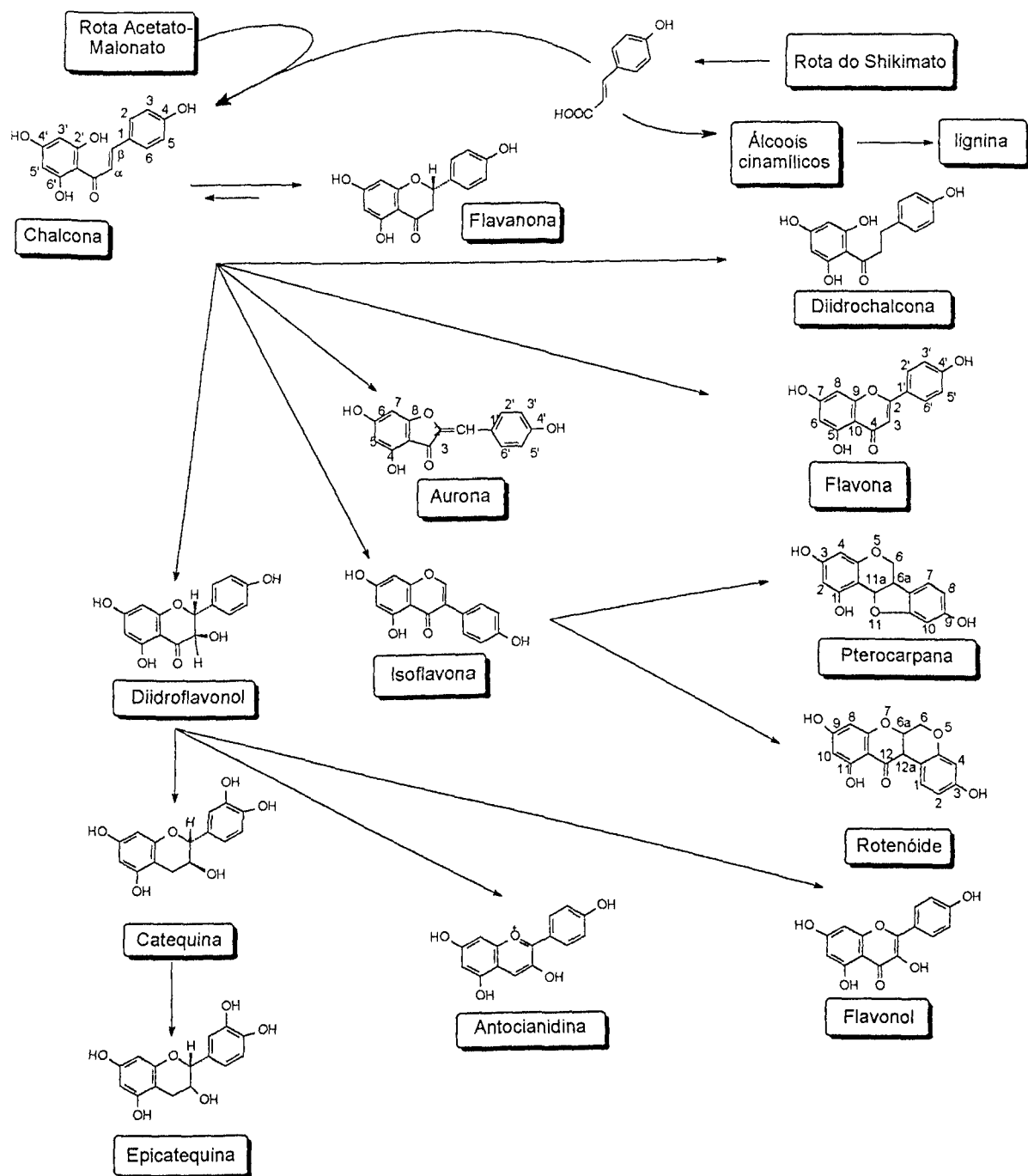


Figura 16 – Inter-relações entre os tipos de monômeros de flavonóides propostas por Wong³⁴.

Existem outras rotas que tentam explicar a origem dos compostos fenólicos como as baseadas unicamente na rota da acetil coenzima A e a baseada no ácido shikímico. A rota descrita por Wong³⁴ mostra a formação de muitos tipos de metabólitos secundários pela combinação de duas rotas: a do shikimato e a do acetato, explicando principalmente a formação de flavonóides.

1.8. Métodos analíticos e ensaios

1.8.1. Determinação da umidade

Como a madeira e a celulose têm a característica de retenção de umidade e de solventes orgânicos, a determinação dos extrativos não pode ser feita pela repesagem da madeira antes e depois da extração. Os solventes orgânicos e ácidos/bases poderiam ser lavados com água, mas algumas frações solúveis em água seriam removidas com este procedimento. Por isto, a madeira utilizada na determinação de umidade foi descartada.

1.8.2. Ensaios espectrofotométricos na região do UV-Visível

A principal função da espectrofotometria no UV-Visível é identificar e quantificar grupos de substâncias que exibem a característica de absorver luz na faixa compreendida entre 200 a 850 nm. Esta medida permite a determinação da concentração de uma substância em particular ou um grupo cromóforo. A espectroscopia na faixa do visível (400 a 850 nm) para compostos fenólicos só é possível através de uma reação específica de modo a se obter um produto colorido em proporção linear ou direta à quantidade de material fenólico presente nas amostras. Estes ensaios colorimétricos têm pontos de absorção máximos pré-definidos.

Primordialmente são feitos quatro ensaios com a ajuda de um espectrofotômetro:

- 1) Determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu.
- 2) Determinação de proantocianidinas pelo método da vanilina.
- 3) Determinação de flavonóides em teor de quercetina.
- 4) Determinação de proantocianidinas pelo método do butanol-ácido.

A espectroscopia de absorção no ultravioleta fornece uma noção da estrutura do composto através dos seus grupos cromóforos. Não é possível identificar os compostos, mas é possível determinar algumas características importantes, como o local onde os açúcares

estão ligados e a classe os flavonóides pertencem. Vários autores padronizam e descrevem este trabalho com detalhes como Mabry et al.³⁵ e Markham⁸. Além disso, existem outros trabalhos com dados em vários comprimentos de onda: Jurd³⁶; Mabry e Markham³⁷; Harbone³⁸. As várias classes de flavonóides ainda estão separadas pelo tipo de espectro de absorção⁸.

O espectro de flavonóides é geralmente determinado em metanol. Ele consiste de duas bandas de absorção nas faixas entre 300-550 nm (banda I) e entre 240-285 nm (banda II). A posição precisa e as intensidades relativas destes máximos fornecem informações acerca da natureza do flavonóide e de seu padrão de oxigenação. As duas bandas são formadas de acordo com as duplas ligações existentes nos anéis A e B e sua conjugação com o anel C.

A Tabela 3 mostra as faixas de absorção de algumas classes de flavonóides⁸:

Tabela 3 - Faixas de absorção para flavonóides na região do UV/Visível

Banda II (nm)	Banda I (nm)	Tipo de flavonóide
250-280	310-350	Flavona
250-280	330-360	Flavonols (3-OH substituídos)
250-280	350-385	Flavonols (3-OH livres)
245-275	ombro 310-330 pico em 320	Isoflavonas Isoflavonas (5-deoxi-6,7-dioxigenadas)
275-295	ombro 300-330	Flavanonas e dihidroflavonols
230-270 (baixa intensidade)	340-390	Chalconas
230-270 (baixa intensidade)	380-430	Auronas
270-280	465-560	Antocianidinas e antocianinas

1.8.2.1. Determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu

O ensaio para a determinação de fenóis totais emprega o reagente de Folin-Ciocalteu, que nada mais é que uma solução ácida de polímeros complexos dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstístico. Este reagente de cor amarela oxida os fenolatos e reduz os ácidos deste reativo para dar lugar a um complexo azul de molibdênio-tungstênio. A natureza destes complexos foi parcialmente explicada por Singleton e Rossi³⁹. Este reagente pode ser feito em laboratório ou comprado em empresas que comercializam produtos

químicos e é mais conhecido como reagente para fenóis.

O reagente de Folin-Ciocalteu reage com fenóis formando grupos cromogênicos que podem ser detectados espectrofotometricamente. Pode ainda ser usado na forma de spray em certos procedimentos cromatográficos. O aparecimento de cor é devido ao fato da transferência de elétrons em meio básico reduzir o complexo do ácido hexavalente fosfomolibdídico e fosfotungstístico.

1.8.2.2. Determinação de proantocianidinas pelo método da vanilina

Este ensaio é amplamente utilizado na determinação quantitativa de taninos condensados em extratos vegetais e se baseia na reação da vanilina com o anel A substituído na posição meta de um flavanol que leva à formação de um grupo cromóforo que absorve na faixa em torno de 500 nm. A Figura 17 mostra a reação da vanilina com uma proantocianidina.

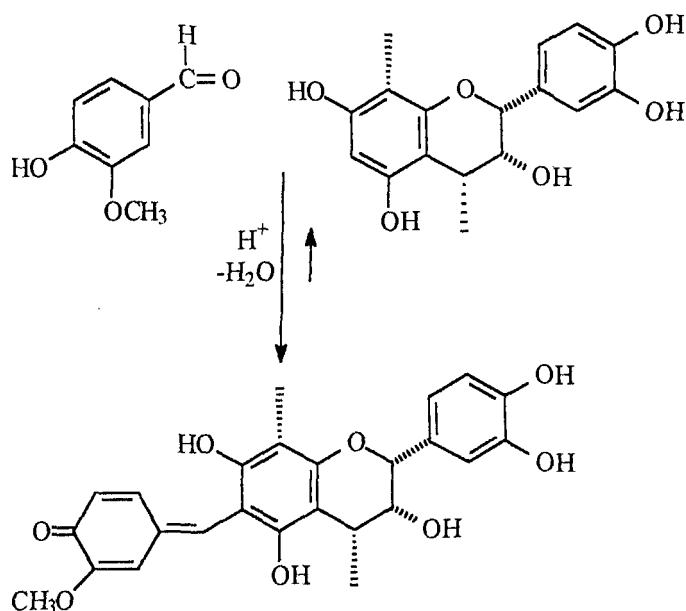


Figura 17 – Reação da vanilina com o anel A da proantocianidina.

Este ensaio foi inicialmente utilizado por Goldstein e Swain⁴⁰ e apresenta bons resultados quando acompanhado de curva de calibração representativa com catequina em concentrações onde a absorvância final seja inferior a 1.

Este teste é específico para proantocianidinas e se baseia na reação da vanilina com o anel A hidroxilado na posição 5 de flavanóis. Uma das vantagens de se usar este método é que como o padrão de substituição do anel B não interfere nesta análise, tanto as proantocianidinas como as delphinidinas são quantificadas.

Deste modo, forma-se um grupo cromóforo que apresenta uma forte banda de absorção no comprimento de onda em torno de 500 nm. O número de grupos flavanols é proporcional à absorbância da solução⁴⁰.

1.8.2.3. Determinação de flavonóides em teor de quercetina

Algumas reações específicas permitem verificar quais tipos de flavonóides estão presentes em uma solução. Uma das análises reproduzidas por este trabalho foi o conteúdo de flavonóides em teor de quercetina, que é baseado na farmacopéia alemã⁴¹ para ensaios com plantas. Woisky⁴² usou este método para quantificar os constituintes naturais da própolis e utilizar os resultados para fazer um controle de qualidade químico para tinturas e amostras cruas de própolis. O reagente usado foi o cloreto de alumínio em meio metanólico que serve como agente de deslocamento batocrômico (50-60 nm) e forma um grupo cromogênico com o alumínio tal como mostrado na Figura 18.

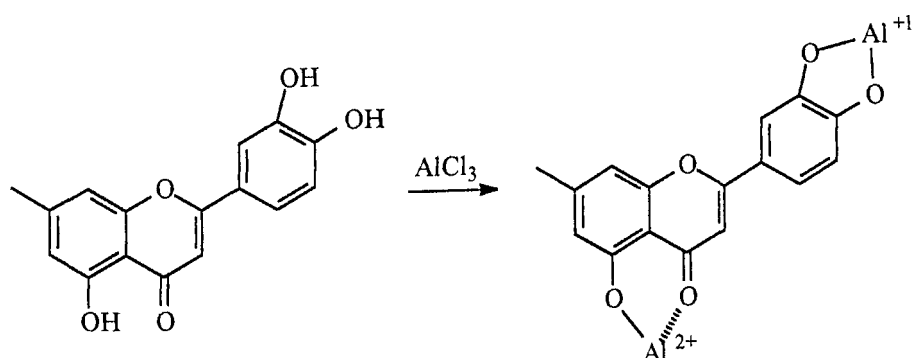


Figura 18 – Formação do complexo de flavonóides com cloreto de alumínio¹⁰.

1.8.3. Espectroscopia no Infravermelho

A absorção de energia característica de grupos funcionais na região do infravermelho tem permitido há décadas o conhecimento dos diferentes grupos funcionais existentes em uma molécula e suas substituições. Muitos flavonóides respondem às análises no ultravioleta e por isso o infravermelho é pouco usado. Entretanto, algumas características da estrutura dos flavonóides podem ser reveladas por espectroscopia no infravermelho⁴³. Foo⁴⁴ estudou as particularidades dos espectros de infravermelho de cianidinas e delfinidinas, bem como as conformações das substituições nos anéis aromáticos.

1.8.4. Separação em colunas cromatográficas para análise por CG/EM

O uso de colunas cromatográficas para separar extratos de diversas plantas foi extensamente revisto por Thompson et al.⁴⁵. Existem vários meios de separação como a celulose, a sílica-gel, o sephadex e a poliamida. O procedimento se baseia na simples colocação do extrato no alto de uma coluna cromatográfica já estabilizada em um solvente e faz-se passar outro solvente (ou uma mistura deles) de polaridade diferente. As frações são coletadas e analisadas separadamente por CG/EM normalmente após derivatização para aumentar a volatilidade das substâncias. Uma das desvantagens descritas por Waterman⁴⁶ é o fato de que alguns taninos podem ficar ficam adsorvidos definitivamente na coluna.

O uso do Sephadex LH-20 é de grande interesse particular no estudo dos compostos fenólicos⁴⁵. Embora este empacotamento de coluna seja comparativamente caro, este material pode ser extensivamente usado e reaproveitado indefinidamente. Basta que a coluna seja lavada e estabilizada em solvente apropriado. Deve-se ter cuidado para não se sobrecarregar a coluna com excesso de material. A carga de material deve ser compatível com a quantidade de recheio da coluna. Os solventes mais apropriados para a eluição dos compostos fenólicos foram a acetona e etanol⁴⁷.

1.8.5. Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas

Os desenvolvimentos recentes da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas estão permitindo analisar compostos de massas moleculares elevadas e isto tem facilitado a identificação de substâncias pouco voláteis ou não-voláteis como os flavonóides e taninos. Markham⁸, Hedín e Phillips⁴⁸ empregaram esta técnica na identificação de flavonóides.

1.8.6. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises por CLAE têm permitido um grande avanço no estudo dos compostos fenólicos porque elas prescindem da volatilização dos compostos. Alguns melhoramentos como recheios específicos para colunas, colunas de fase reversa e detectores mais sensíveis como o detector de arranjo de diodos (DAD-Diode Array Detector) têm possibilitado a separação de misturas complexas com alto grau de resolução e o acompanhamento simultâneo dos espectros de UV das substâncias. Recentemente foi superada uma grande limitação da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas por meio do

desenvolvimento de novas bombas de vácuo altamente eficientes que permitem evaporar a solução líquida que sai do cromatógrafo de maneira instantânea. O inconveniente da CLAE/EM é o elevado preço dos aparelhos disponíveis no mercado.

Os eluentes mais usados nas análises de compostos fenólicos são misturas de metanol/água acidificadas com ácido acético, ácido fórmico ou ácido fosfórico⁴⁹.

1.8.7. Determinação de proantocianidinas pelo método do butanol-ácido

Este método degrada as proantocianidinas transformando-se em antocianidinas. Foi originalmente descrito por Swain e Hillis⁵⁰ e posteriormente difundida por Bate-Smith⁵¹. É um método simples e específico para a quantificação indireta de proantocianidinas. Ele se baseia na clivagem oxidativa das ligações interflavânicas em soluções alcoólicas com ácidos minerais aquecidos, que levam à formação de antocianidinas coloridas. As condições da reação devem ser bem controladas. A presença de íons metálicos pode catalisar a reação e a presença de água pode inibir a reação⁵². Sais de ferro são adicionados para catalisar a reação. Este método é especialmente seletivo na determinação de taninos condensados na presença de taninos hidrolisáveis. A hidrólise de proantocianidinas a antocianidinas se produz mediante uma auto-oxidação seguida da ruptura das ligações interflavânicas, catalisada por ácido. A identificação destes compostos foi possível através de análises por CLAE e comparação com padrões previamente analisados nas mesmas condições. A reação de formação das antocianidinas a partir dos taninos condensados é mostrada na Figura 19.

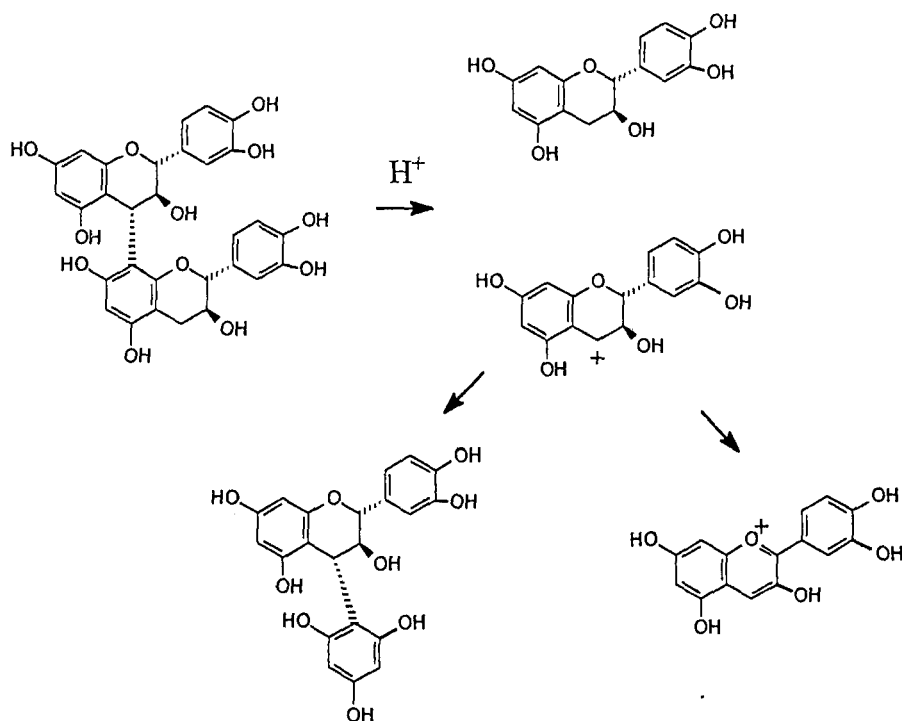


Figura 19 – Reações de formação de antocianidinas a partir de taninos condensados proposto por Porter⁵².

1.8.8. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

O deslocamento químico dos carbonos de proantocianidinas foi estudado por Porter⁵³. Nascimento e colaboradores^{54,55} estudaram o extrato aquoso do eucalipto por RMN de C-13 no estado sólido. O uso da espectroscopia de RMN na investigação dos flavonóides foi amplamente estudado por Agrawal⁵⁶ onde foram feitas tabelas com os deslocamentos químicos dos carbonos pertencentes às várias classes de flavonóides. Hawker⁵⁷, Haslam⁵⁸ e Levy⁵⁹ também contribuíram com trabalhos de RMN na elucidação da estrutura de compostos fenólicos.

1.8.9. Determinação de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio (CHN)

Esta técnica é muito acurada e indica as quantidades de carbono, hidrogênio, e nitrogênio existentes em uma amostra orgânica. O princípio da análise elementar é baseado na combustão completa do composto a uma temperatura de 925 °C em presença de oxigênio puro. O carbono, o hidrogênio e o nitrogênio são oxidados e um detector de condutividade térmica quantifica os óxidos formados. O oxigênio é obtido pela diferença dos valores obtidos.

Inicialmente, ocorre a preparação da amostra (pesagem) e a calibração do aparelho com uso de padrões.

1.9. Estudo de compostos fenólicos e taninos da madeira de eucalipto

Garcia-Vallejo e colaboradores^{60,61,62,63} estudaram pioneira e extensivamente os compostos fenólicos e os taninos da madeira e da casca de várias espécies de eucalipto cultivadas na Espanha, por CLAE e CG/EM. Foram feitos estudos comparativos qualitativos e quantitativo de compostos fenólicos assim como verificação de mudanças nos seus constituintes com relação à região onde o eucalipto foi cultivado. O ácido gálico, o ácido elágico e os elagitaninos (derivados do ácido elágico) foram os produtos em maior abundância.

Este estudo envolveu ensaios colorimétricos para a determinação de fenóis totais, proantocianidinas e elagitaninos existentes nas madeiras de eucalipto.

Nascimento e colaboradores^{54,55} fizeram um estudo preliminar dos compostos fenólicos extraídos com água da madeira do *E. grandis* de 12 anos, cultivada no cerrado do Triângulo Mineiro, por espectroscopia no infravermelho, RMN, cromatografias líquida e gasosa e ensaios químicos. Foram detectados os ácidos elágico e gálico e proantocianidinas, além dos derivados do ácido elágico.

Drumond⁶⁴ fez o estudo químico e espectroscópico dos compostos fenólicos e da lignina da madeira de algumas espécies de eucalipto cultivadas no Brasil.

A madeira de eucalipto é matéria-prima para muitas indústrias no Brasil. O conhecimento dos compostos fenólicos nela presentes é o ponto de partida para se entender suas reações. Este conhecimento poderá contribuir para melhorar o processo de fabricação de polpa celulósica e o tratamento do eucalipto para aumentar a sua durabilidade. Por outro lado, o conhecimento da química dos compostos fenólicos da madeira poderá contribuir para o entendimento da resistência elevada e durabilidade de algumas espécies deste material orgânico renovável.

1.10. Objetivo

A literatura não registra estudos comparativos de extrativos de origem fenólica de espécies de eucalipto cultivadas sob as mesmas condições. Na presente dissertação, *E. grandis* e *E. urophilla* cultivadas no Triângulo Mineiro são analisadas quimicamente, dando-se ênfase especial aos compostos fenólicos. Esta investigação pode mostrar a presença de marcadores químicos que permitirão diferenciar as duas espécies de eucalipto através de ensaios espectroscópicos ou cromatográficos.

Capítulo 2 – Parte experimental

A Figura 20 mostra as etapas de extração e o fluxograma das análises feitas com as madeiras do *E. grandis* e do *E. urophilla*.

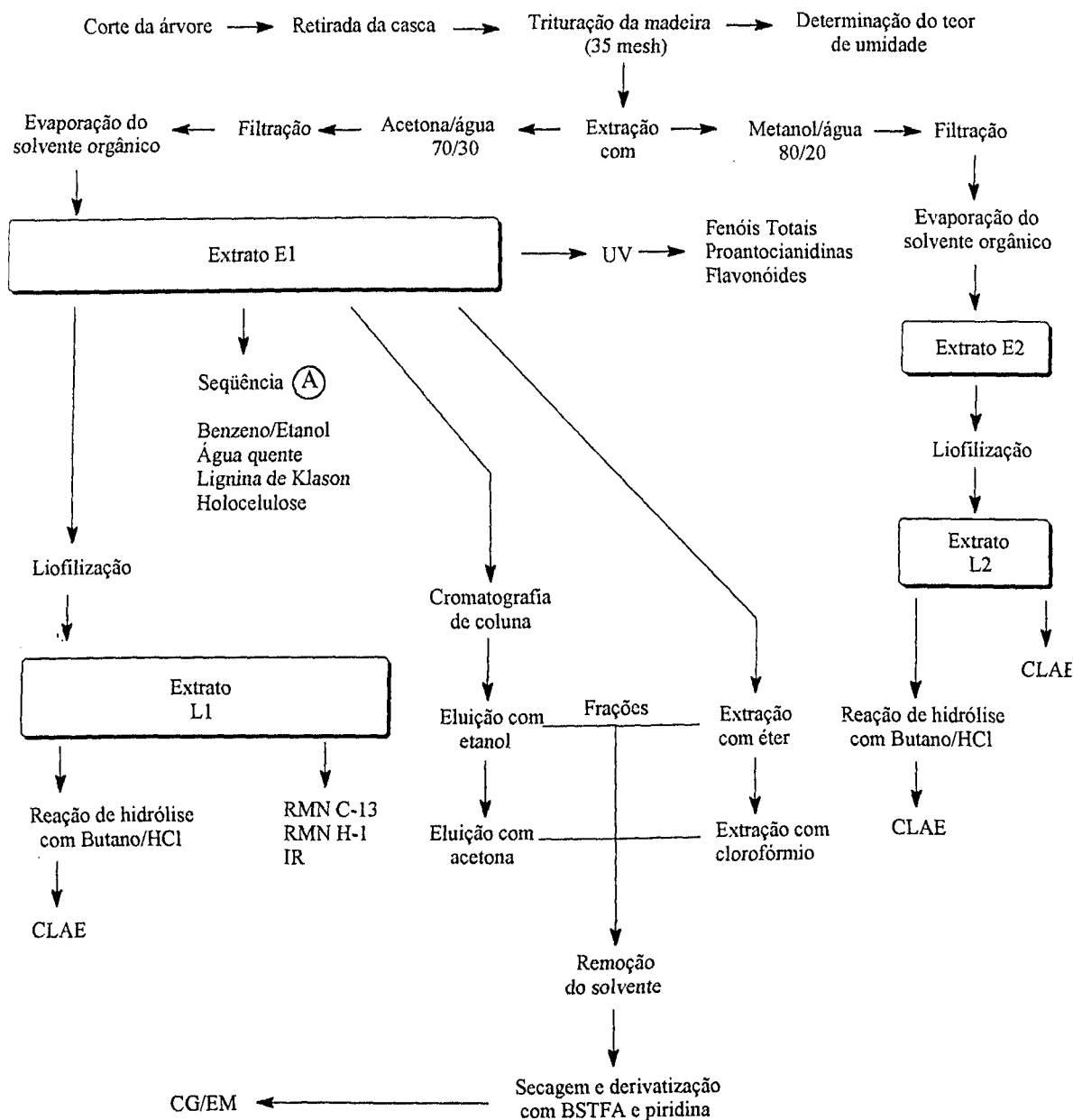


Figura 20 – Etapas de extração e fluxograma das análises feitas.

2.1. O corte da madeira

As amostras de *Eucalyptus grandis* e *urophilla* foram obtidas a partir dos troncos de eucaliptos com seis anos de idade, tendo se efetuado o corte a um metro a partir do solo. Os troncos passaram por um período de secagem à temperatura ambiente por aproximadamente

quatro meses, pois há evidências que comprovam a necessidade de secagem para a remoção do excesso de água, que por muitas vezes dificulta o estudo de produtos de origem vegetal^{20,33}. A casca foi removida manualmente e a madeira foi triturada em um triturador mecânico e passada por um conjunto de peneiras de 35 mesh. As madeiras foram acondicionadas em sacos plásticos que foram fechados e guardados em local apropriado, e utilizadas de acordo com a necessidade. As madeiras foram fornecidas pela empresa CIF-Tangará Companhia de Integração Florestal Ltda. de Uberlândia (em março de 1998).

Os trabalhos a seguir referem-se às duas espécies de madeiras, mesmo quando tratadas no singular.

2.2. Procedimentos analíticos

Os reagentes usados eram de classificação PA, para análises simples, e de grau cromatográfico para análises espectroscópicas e cromatográficas.

A determinação dos componentes macromoleculares das madeiras (seqüência A) foi efetuada conforme a Figura 21, obtendo-se os valores dos extrativos solúveis na mistura Benzeno/etanol, extrativos solúveis em água quente, lignina de Klason e holocelulose por diferença. O procedimento usado para a quantificação destes extrativos é conhecido como pesagem à peso constante, onde inicialmente um vial limpo (ou outro frasco apropriado para a coleta) foi colocado em uma estufa a 105 °C para a remoção de água, por um prazo aproximado de 8 a 12 horas. Depois disto, o vial foi resfriado em um dessecador à temperatura ambiente e sua massa foi medida em uma balança analítica. O vial retornou para a estufa e este procedimento de secagem/pesagem foi feito até que a massa do vial não se alterasse significativamente. O extrativo em solução foi colocado no vial e este passa ao processo de remoção do solvente, que pode ser por evaporação à pressão reduzida (nunca acima de 38 °C para obtenção dos extratos E1 e E2) em um rotavapor, ou evaporação em estufa (a 105 °C para a seqüência A). Depois de seco, o vial foi novamente pesado e o procedimento de secagem e pesagem foi feito até que a massa do vial com o extrativo não se alterasse. A massa de extrativos foi obtida pela diferença entre as massas do vial vazio e com o material. Os extrativos da seqüência A foram descartados uma vez que esta seqüência serve apenas para quantificar estes extrativos macromoleculares.

Os extratos E1 e E2 foram guardados em refrigeração e isolados da luz direta e utilizados de acordo com as necessidades das análises mostradas na Figura 20.

2.2.1. Umidade

Para determinação da umidade existente na madeira, utilizou-se uma balança de luz infravermelha da marca Kett, modelo FD-600. As amostras foram deixadas a uma temperatura de 105 °C por 15 minutos, ou até que o teor de umidade ficasse constante. Fez-se a troca dos pratos da balança entre as medições e um intervalo entre as medições. A umidade da madeira deve ser conhecida a fim de que a água existente na madeira não seja quantificada como produto em algumas análises executadas. A massa utilizada faz referência à massa seca, subtraindo-se a porcentagem de água e tomando-se uma massa maior para compensar a umidade. As variações climáticas podem interferir na umidade da madeira.

2.3. Extração da madeira

Drummond e colaboradores⁶⁴ descreveram um método de extração com base em soluções de acetona/água na proporção 70:30 onde 100 gramas de madeira absolutamente secas (a.s.) eram tratadas com 1500 mL de solvente (1050 mL de acetona e 450 mL de água). As soluções foram deixadas em repouso por um período de 24 horas na ausência de luz. A fase orgânica foi removida com a ajuda de um rotavapor, obtendo-se o extrato E1. O extrato E2 foi obtido com a mistura metanol/água na proporção 80:20 de modo análogo ao do extrato E1. A temperatura de obtenção destes extratos nunca excedeu a temperatura de 38°C, diferentemente dos extratos da seqüência A, que foram secos para quantificação a 105 °C e descartados. A seqüência A é mostrada na Figura 21.

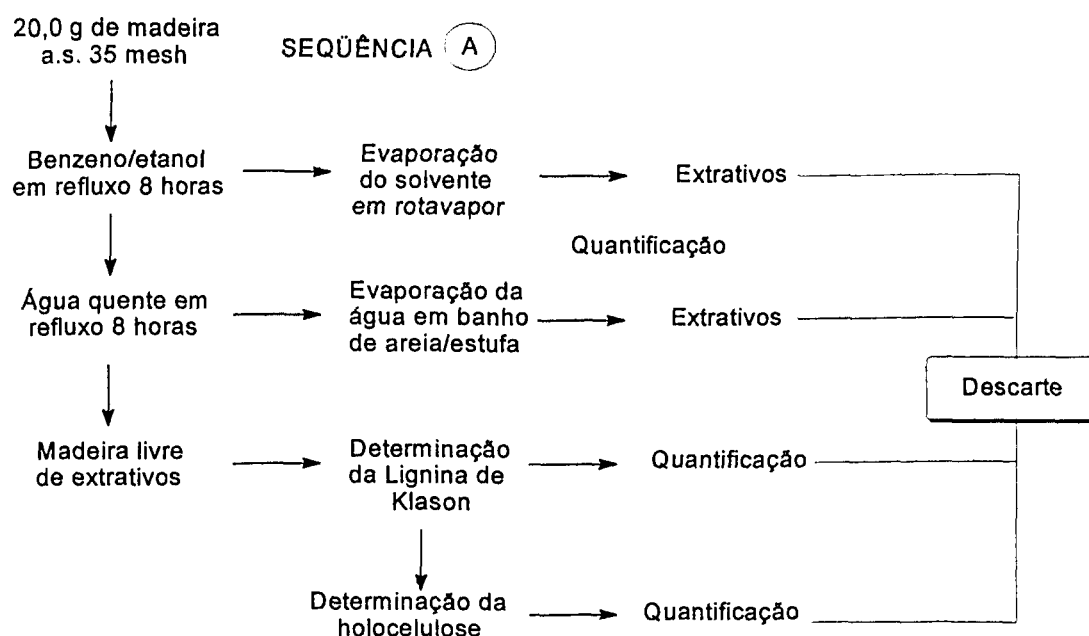


Figura 21 – Diagrama de operações da seqüência A de extração.

A sequência A serviu apenas para quantificar os extrativos e fornecer um conhecimento geral das madeiras estudadas, enquanto o estudo dos compostos fenólicos foi baseado nos extratos E1, E2, L1 e L2.

2.3.1. Extração da madeira com benzeno/etanol (seqüência A)

A partir de uma massa de 20,0 gramas de madeira a.s. em um cartucho de papel, fez-se refluxo por oito horas em um soxhlet com condensador refrigerado com água, em um balão de 1000 mL com pedras de ebulição, em uma manta de aquecimento elétrica. No balão, colocou-se um volume de 750 mL de solução benzeno/etanol na proporção de 2:1. Notou-se que os extrativos estavam sendo extraídos da madeira pela mudança de coloração do líquido que retorna do soxhlet para o balão. Terminada a extração, a solução foi concentrada em um rotavapor e depois transferida para um balão de 125 mL previamente tarado, sendo novamente concentrada em um rotavapor até a secura. Em seguida, o balão contendo o resíduo final foi levado à estufa (105 °C) até peso constante. Secou-se o cartucho à temperatura ambiente.

2.3.2. Extração da madeira com água (seqüência A)

Aproveitou-se o mesmo cartucho da seqüência com a mistura de solvente benzeno/etanol para a extração com água. Fez-se refluxo por oito horas em um soxhlet com condensador refrigerado com água, em um balão de 1000 mL com pedras de ebulição, em uma manta de aquecimento elétrica. No balão, colocaram-se um volume de 750 mL de água. Notou-se que os extrativos estavam sendo extraídos da madeira pela mudança de coloração do líquido que retorna do soxhlet para o balão. Terminada a extração, a solução foi concentrada em um banho de areia para a evaporação da água e um volume reduzido foi transferido para um béquer de 100 mL previamente tarado. A solução foi levada à secura em estufa (a 105 °C) até que o béquer com o resíduo final atingisse peso constante.

Como o volume de água a ser concentrado no rotavapor era muito grande e de difícil remoção, a retirada de água foi feita com a ajuda de um banho de areia, até que o volume da solução fosse pequeno o bastante para ser transferido para um béquer previamente tarado e seco até peso constante.

2.3.3. Determinação da Lignina de Klason (seqüência A)

Para se quantificar a lignina de Klason, a madeira deve estar livre de extrativos. O cartucho de madeira utilizado passou por uma seqüência de extrações com a mistura de solventes benzeno/etanol na proporção de 2:1 e depois com água quente, ambos em refluxo por um tempo de oito horas.

A massa de 1,000 g de madeira a.s. (e livre de extrativos proveniente do cartucho usado na seqüência de extração benzeno/etanol 2:1 e água) foi colocada em um béquer e 15 ml de ácido sulfúrico a 72 % foram lentamente adicionados, com agitação. A mistura ficou em repouso por duas horas à temperatura ambiente com agitação freqüente. O material foi levado para dentro de um balão de fundo redondo de 1000 mL e adicionaram-se 560,0 mL de água para a diluição do ácido sulfúrico até à concentração de 3 %. A solução passou por um refluxo de quatro horas. A lignina que é insolúvel passou por uma decantação e a solução foi filtrada em um funil de placa porosa (de granulometria fina número 3, previamente seco em uma estufa a 105 °C e pesado até peso constante). A lignina foi lavada com água quente para remoção do ácido livre (500 mL ou mais se necessário). O funil com a lignina foi seco na estufa a 105 °C por 2 horas, e posteriormente resfriado no dessecador e pesado até que a sua massa fosse constante. A diferença de massa do filtro foi a massa de lignina de Klason obtida. A determinação da lignina de Klason foi feita segundo as normas da Tappi (T13 m-54)⁶⁵.

2.3.4. Determinação da holocelulose (seqüência A)

Uma porção de 5,0 g de madeira seca (40-60 mesh) foi pesada e transferida para um erlenmeyer de 250 mL. A madeira utilizada deve estar isenta de extrativos, removidos nos dois passos iniciais da seqüência A. Adicionaram-se água destilada (160,0 mL), ácido acético glacial (1,0 mL) e reagente clorito de sódio (1,5 g no padrão PA) nesta seqüência. Este experimento foi feito em uma capela bem ventilada. Um erlenmeyer de 50 mL foi invertido e colocado no gargalo do frasco de reação (para evitar a saída prematura do gás) e colocado em um banho-maria a 70-80 °C. O frasco foi aquecido por uma hora nesta temperatura sendo agitado eventualmente para homogeneizar o meio reacional. Depois, sem resfriar, mais uma alíquota de ácido acético glacial foi adicionada (1,0 mL), seguida de outra adição de clorito de sódio (1,5 g). O aquecimento continuou a 70-80 °C por mais uma hora. Ao fim da terceira, quarta e quinta horas, as adições de ácido acético e clorito de sódio foram

repetidas. Ao fim da cloritação, o frasco foi colocado em um banho de gelo até que o conteúdo tivesse abaixo de 10 °C. A holocelulose foi separada por filtração em um filtro de placa porosa previamente tarado, e lavada com acetona e água gelada, e secada em estufa a 105 °C. Fez-se a pesagem até peso constante e a diferença em relação ao filtro forneceu a quantidade de holocelulose obtida.

2.4. Teor de extrativos

Adicionaram-se em um béquer 20,0 gramas de madeira a.s. e 375,0 mL de solução acetona/água na proporção 70/30 por 24 horas na ausência de luz e com agitação. Separou-se o sólido por filtração e a solução foi transferida para um balão de fundo redondo. Removeu-se a acetona em um rota-vapor à pressão reduzida e com o banho de água à temperatura de 38 °C. Quando toda acetona foi removida, ficou-se com o extrato E1. Uma parte deste extrato foi liofilizada (L1) e usada de acordo com as necessidades.

Nas análises feitas no INIA, a extração de 10,0 gramas de madeira a.s. foi feita com 300,0 mL da mistura de solvente metanol/água (80:20) por 24 horas na ausência de luz e sem agitação. Separou-se o sólido por filtração e a solução foi transferida para um balão de fundo redondo. Removeu-se o metanol em um rota-vapor à pressão reduzida e com o banho de água à temperatura de 38 °C. Quando todo metanol foi removido, ficou-se com o extrato E2. Todo o extrato foi liofilizado (L2) e usado de acordo com as necessidades.

2.5. Obtenção do extrato liofilizado

Os extratos E1 e E2 devem estar isentos de solventes orgânicos, que podem dificultar o processo de liofilização. Os extratos aquosos (E1 e E2) foram congelados em um freezer e depois imediatamente levados ao liofilizador. Depois de 24 horas, obteve-se os extratos liofilizados L1 e L2. Na liofilização o material congelado foi levado a uma temperatura de 60 °C negativos e submetido a alto vácuo. A água sublimou e o resultado foi um pó seco pronto para ser usado em análises.

2.6. Separação em colunas cromatográficas e análise por CG/EM

A relação das massas utilizadas foi de 1,5 gramas do extrato E1 para 50 gramas de Sephadex em um tubo de vidro de 2,0 cm de largura por 12,0 cm de altura. Eluiu-se primeiro com etanol e fez-se o acompanhamento das frações em espectrofotômetro marca Hitachi

modelo U-2000 UV-Vis até que somente o eluente (etanol) estivesse eluindo. Depois procedeu-se a eluição com a acetona. Este processo foi feito com os extratos das duas madeiras. Foram coletadas trinta e duas frações em etanol e sete em acetona para o *E. urophilla* e três frações em etanol e sete em acetona para o *E. grandis*. As frações (de 5mL cada) foram secas em uma estufa a 40 °C e depois redissolvidas com piridina e derivatizadas com BSTFA (bis-trimetil-silil-trifluoro-acetamida) por 15 minutos à temperatura ambiente e analisadas por CG/EM.

2.7. Ensaios colorimétricos

2.7.1. Ensaio de determinação do teor de fenóis totais

Em um tubo de ensaio, adicionaram-se 0,5 mL do extrato E1, 2,5 mL de uma solução aquosa a 10 % do reativo de Folin-Ciocalteu e 2,0 mL de uma solução recém preparada de carbonato de sódio a 7,5 %. Manteve-se esta mistura em um banho-maria a uma temperatura de 50 °C por 5 minutos. Esfriou-se a amostra e fez-se a medida de sua absorvância a 760 nm contra um branco contendo os reagentes e água no lugar da amostra. Juntamente com estas medidas, fez-se a preparação de uma reta de calibração com soluções aquosas de ácido gálico nas concentrações compatíveis com as determinações a serem feitas. As soluções para a construção da reta passaram pelas mesmas condições das amostras. A leitura foi feita contra um branco.

2.7.2. Ensaio para determinação do teor de flavonóides em equivalentes de quercetina

A 2,0 mL de extrato E1, adicionaram-se 20,0 mL de metanol e 1,0 mL de cloreto de alumínio a 5 %, e completou-se o volume até 50,0 mL com metanol. Depois de 30 minutos, a absorvância foi lida a 425 nm. A curva de calibração foi feita com soluções de quercetina em metanol em diversas concentrações. A leitura foi feita contra um em branco.

2.7.3. Determinação de proantocianidinas pelo método da vanilina

A 1 mL do extrato E1, em um tubo de ensaio, adicionaram-se 2 mL de uma solução recém-preparada de vanilina em ácido sulfúrico 70 % na concentração de 1,0 g/100 mL. Aqueceu-se a solução resultante em banho-maria a 50 °C por 15 minutos. Mediu-se a

absorvância a 500 nm. Juntamente com os extratos E1 das duas madeiras, preparou-se uma curva de calibração com catequina em diversas concentrações na faixa de 5 a 50 microgramas. Tanto as amostras quanto os padrões da curva de calibração passaram pelo mesmo tratamento. A leitura foi feita contra um branco.

2.8. Espectroscopia no Infravermelho

O extrato liofilizado foi misturado com brometo de potássio na proporção de 1:99 e triturado em um cadinho de ágata. Em seguida, uma porção foi prensada em uma prensa hidráulica a uma pressão de 2500 kg/m² por 20 segundos. A seguir, a amostra foi colocada no suporte próprio do aparelho e analisada.

2.9. Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas

O cromatógrafo gasoso usado é da marca Shimadzu, modelo GC-17A acoplado a um detector do tipo espectrômetro de massas de mesma marca, modelo GCMS-QP5000 com uma biblioteca de mais de 140.000 espectros de massa, dotado de colunas DB-5 ou DB-1 da marca J&W de 30 m de comprimento por 0,25 mm de diâmetro interno e espessura da película de 1 µm. O fluxo de gás carrier (Hélio) foi de 1,0 mL por minuto.

Foram feitos dois tipos de análise por CG/EM. Um grupo de injeções foi feito com as frações do extrato E1 que foram eluídas com acetona e etanol em uma pré-coluna contendo Sephadex LH-20.

O outro grupo de análises foi feito com outra porção do extrato E1 lavado com éter e clorofórmio. O extrato E1 foi colocado em um funil de separação e lavado com três alíquotas de 5 mL de éter. A fração em éter foi separada e lavou-se a solução restante do funil com nova alíquota, até que novas lavagens não extraíssem mais constituintes, denotado pelo não-aparecimento de fase colorida. As frações em éter foram misturadas em um balão e o éter foi removido em um rota-vapor a 38 °C. O resíduo do balão foi redissolvido em piridina e derivatizado com BSTFA. Após 15 minutos à temperatura ambiente, o resíduo foi analisado por CG/EM. A solução que ainda ficou no funil de separação foi transferida para um balão e este levado ao rota-vapor para retirada do éter residual. Depois, fez-se a lavagem de maneira análoga com o clorofórmio e posterior análise por CG/EM. Este procedimento foi feito para as duas espécies de eucalipto.

Os parâmetros de execução desta análise são dados na Tabela 4.

Tabela 4 – parâmetros da análise por CG/EM

Parâmetro	Temperatura (°C)
Forno	inicial a 100
Coluna DB-5 ou DB-1	Inicial a 100 e aumentando a razão de 8,0 C / min.; final a 285
Injetor	250
Detector (interface)	270
Tempo total de corrida: 70 min.	

2.10. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

2.10.1. INIA-Madri

Estas análises foram realizadas no Centro de Investigações florestais (CIFOR) do Instituto Nacional de Investigações Agrárias (INIA) de Madrid na Espanha. Foram analisadas duas amostras de madeira do *E. grandis* e do *E. urophila*. As análises foram feitas em um equipamento HP Chemstation modelo 1050 M, com sistema de bomba quaternária, injetor automático e equipado com detector de fotodiodos (diode-array) modelo 1040 M e estação de tratamento de dados. A coluna usada foi Hypersil ODS de 200X4 mm de d.i. e com partículas de 5 µm.

O sistema de eluentes usado foi a mistura metanol/ácido fosfórico 999:1 e água/ácido fosfórico 999:1. Nestas análises o fluxo foi mantido a 1 mL/minuto, o forno da coluna foi mantido a 30 °C e o volume de injeção programado foi de 20 µL. Os solventes utilizados foram de grau cromatográfico e a água bidestilada e purificada pelo sistema Milli Q da Millipore.

Os extratos L2 das duas madeiras foram separadamente redissolvidos em metanol, passados por um filtro descartável de 0,45 µm e injetados no aparelho. Os resultados foram comparados com a biblioteca de padrões (vide apêndice A, p. 68) existente na estação de tratamento de dados do aparelho.

As condições de análise em gradiente usadas foram as descritas na Tabela 5.

Tabela 5 – Condições da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Tempo (min)	% MeOH:H ₃ PO ₄ (999:1)	% H ₂ O:H ₃ PO ₄ (999:1)
0	35	65
80	60	40
90	100	0
95	100	0
100	0	100
105	0	100

2.10.2. CETEC-BH

Estas análises foram realizadas na Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC) em Belo Horizonte em um cromatógrafo líquido da marca Hewlett-Packard, modelo 1050, com sistema de bomba quaternária, injetor automático e detector UV série 1050, equipado com forno para coluna da série 1100. A coluna usada foi a Lichrospher 100 RP-18 de 250X4 mm de d.i. com partículas de 5 µm. O aparelho cromatógrafo líquido utilizado no CETEC é dotado de um detector ultravioleta simples. Foram analisados os produtos da reação de hidrólise com butanol/ácido dos extratos liofilizados obtidos a partir da mistura acetona/água das madeiras do *E. grandis* e do *E. urophila*. As condições de análise em gradiente usadas foram as descritas na Tabela 6.

Tabela 6 – Condições da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência no CETEC –BH

Tempo (min)	MeOH:H ₃ PO ₄ (999:1)	H ₂ O:H ₃ PO ₄ (999:1)
0	35%	65%
30	100%	0%
35	100%	0%

O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min. com volume injetado de 100 µL, estando a temperatura do forno estabilizada a 30 °C. Os solventes foram acidificados com ácido fosfórico a uma concentração de 0,1 %. Este gradiente foi proposto por apresentar menor tempo de corrida e melhores resultados quanto à estabilização da coluna.

Os padrões utilizados (vide apêndice B, p. 98) seguiram o mesmo padrão de preparação, exceto alguns padrões insolúveis em metanol-água, que foram solubilizados em outros solventes semelhantes, como metanol puro, etanol, etc.

2.10.3. Ensaio de hidrólise de proantocianidinas com Butanol/HCl

Estas análises foram feitas tanto no INIA como no CETEC. O método empregado foi basicamente o descrito por Swain e Hillis⁵⁸, com as modificações recomendadas por Porter et al⁶⁰.

A 20,0 mg dos extratos L1 e L2 adicionaram-se 1,0 mL de n-BuOH-HCl concentrado (95:5, v/v) e 40 µL de uma solução de sulfato férrico amoniacal em HCl 2M, de concentração 2%. A reação ocorreu em tubos crimpados a 105 °C por uma hora. Uma vez terminado o tempo de reação, as amostras foram levadas à secura total com leve aquecimento na capela. O resíduo foi redissolvido com 1 mL de MeOH acidificado com HCl (0,1%). Esta solução foi filtrada com uma seringa com filtros descartáveis de 0,45 µm e analisada por cromatografia líquida de alta eficiência. O aparelho do INIA possui biblioteca com banco de dados (vide apêndice A, p. 68) e o aparelho do CETEC possui uma lista de padrões baseado no tempo de retenção (vide apêndice B, p. 98).

2.11. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Foram feitos espectros de RMN de C-13 do extrato liofilizado do *E. grandis* nos estados sólido e líquido e somente no estado sólido para o extrato liofilizado do *E. urophilla*.

A espectroscopia de RMN de C-13 foi feita no espectrofotômetro AVANCE DRX-400 do LAREMAR, do Departamento de Química da UFMG. As condições de análise utilizadas na ressonância em estado sólido foram: frequência de 100,6 MHz; sequência de pulsos utilizada VACP, intervalo de pulso de 0,1 s, tempo de aquisição de 25 ms, rotação do rotor de 5.000 Hz e foram acumulados 1.520 espectros.

A espectroscopia de RMN de C-13 na fase líquida foi feita na mistura de acetona/água deuteradas (95:5, v/v), na frequência de 100,6 MHz, valendo-se da sequência de pulsos ZGPG30, intervalo de pulso de 1,0 s e foram acumulados 18.240 espectros.

A espectroscopia de RMN de ¹H para o extrato acetona/água do *E. grandis* foi feito a 400,0 MHz, também em acetona/água deuteradas. Foram acumulados 8 espectros.

2.12. Determinação de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio (CHN)

A quantidade de amostra analisada foi em torno de 1-1,5 mg e o aparelho utilizado foi um analisador de elementos da Perkin-Elmer modelo 2400 CHN da série II do Instituto de Química da USP-São Paulo.

Capítulo 3 - Resultados e Discussões

3.1. Umidade

As médias dos valores de umidade obtidas estão descritas na Tabela 7.

Tabela 7 - Teores de umidade

Data	Teor de umidade (%)	
	<i>E. grandis</i>	<i>E. urophilla</i>
Jan. 98	61,0	30,8
Jan. 99	11,3	11,1
Ago. 99	12,5	9,5
Dez. 99	10,6	9,9
Jan 2000	10,3	6,0

Antes de qualquer análise a partir da massa seca, fez-se sempre o cálculo do teor de umidade, para evitar que a massa de água seja considerada como madeira.

Os valores encontrados na Tabela 7 indicam que a umidade reduziu-se sensivelmente nos dois casos estudados. Essa perda de água não interfere na execução das análises. O excesso de água, pelo contrário, impede a obtenção da madeira em pedaços menores.

3.2. Holocelulose, lignina de Klason e extrativos (benzeno/etanol, água quente e acetona/água).

Na Tabela 8 encontram-se os valores percentuais da holocelulose, lignina e extrativos obtidos na madeira do *E. grandis* e do *E. urophilla*. A soma de todos os constituintes do *E. grandis* ou do *E. urophilla* perfazem mais de 110 %. O aumento destes valores é explicado tanto pelo valor atribuído à holocelulose que ainda contém restos de lignina quanto pela quantidade de extrativos (que não foram removidos com a mistura benzeno/etanol e água quente) que estão presentes na lignina de Klason.

Tabela 8 - Valores da holocelulose, lignina de Klason e extrativos da madeira

Madeiras	Extrato Benzeno/etanólico (%)	Extrato aquoso (%)	Lignina (%)	Holocelulose (%)
<i>E. grandis</i>	1,49	2,9	26,1	83,5
<i>E. urophilla</i>	2,06	2,9	26,0	82,1

As massas de holocelulose e de lignina de Klason se encontram dentro das faixas encontradas para outras espécies de eucalipto e outras madeiras duras²⁶. A quantidade de extrativos foi baixa para as duas espécies de eucalipto, tanto com benzeno/etanol quanto com água. Este fato aliado à elevada quantidade de holocelulose capacitam estas madeiras como boas para a produção de celulose. Entretanto, os rendimentos de extração mostrados na Tabela 9 contrariam esta afirmação. Há que considerar, porém, que esta mistura de solventes extrai parte da lignina e por isto o rendimento aumenta.

Tabela 9 - Rendimento da extração da madeira na mistura acetona/água

Amostras de madeira	Teor de extrativos das madeiras em acetona/água (%)
<i>E. grandis</i>	7,83
<i>E. urophilla</i>	12,20

Algumas espécies de eucalipto investigadas por Garcia-Vallejo^{60,61,62,63} e colaboradores forneceram valores máximos de 10, 20 e até 30 % em massa de extrativos obtidos a partir de extratos em metanol/água, mas na média geral, estes percentuais não ultrapassam 4% de extrativos.

Desta forma, a quantidade de extrativos de *E. grandis* e *E. urophilla* obtida no presente trabalho é em média, maior que as obtidas por Garcia-Vallejo^{60,61,62,63} e colaboradores, que analisaram os polifenóis de algumas espécies de eucalipto cultivadas na Espanha. Deve-se ressaltar que os extratos obtidos por Garcia-Vallejo^{60,61,62,63} e colaboradores foram obtidos com a mistura metanol/água (80:20) enquanto que os extratos que estão sendo comparados foram obtidos com a mistura acetona/água (70:30).

Nascimento⁶⁶ obteve valores de 37,8 % para a lignina de Klason, 79,5 % para a holocelulose e 10 % extrativos em água quente (a partir da madeira bruta) ao estudar o *E. grandis* de 12 anos de idade. A diferença nestes valores, pode ser atribuída ao compostos

fenólicos e outros extrativos ainda presentes. A idade deste espécime estudado (6 anos a mais) é um parâmetro a ser considerado na diferença dos valores para lignina de Klason, holocelulose e extrativos obtidos com água quente.

3.3. Ensaio espectrofotométrico

3.3.1. Determinação de flavonóides em teor de quercetina

A partir da determinação das absorvâncias obtidas para amostras de concentração conhecida, foi traçado um gráfico da absorvância pela concentração em microgramas/mL mostrado na Figura 22.

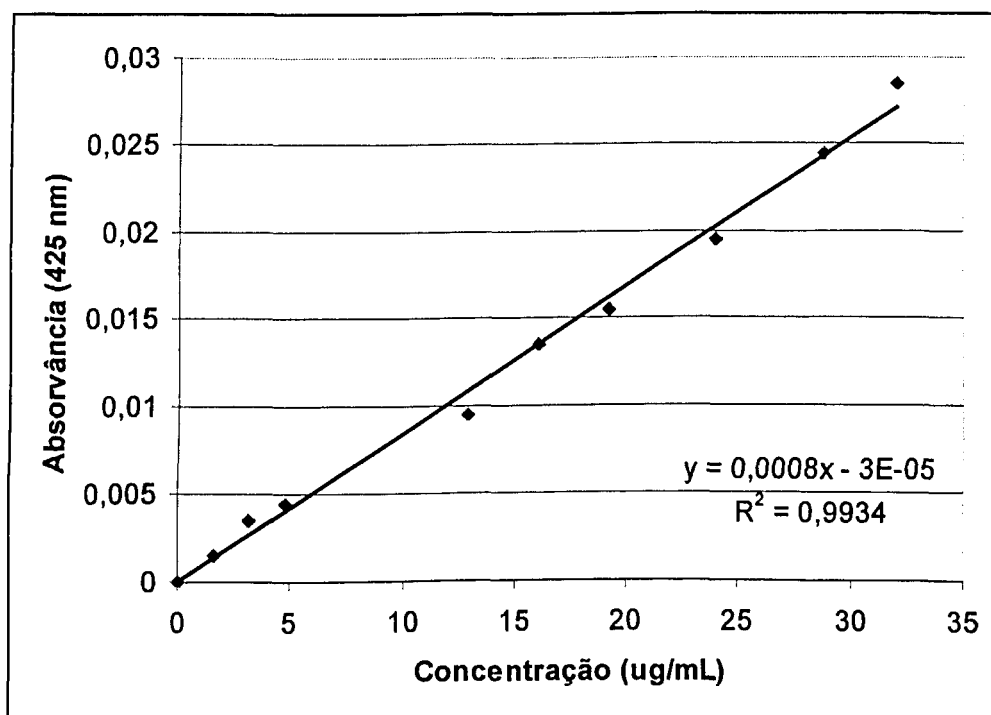


Figura 22 – Absorvância versus concentração de quercetina.

Com base nos valores obtidos para as amostras do *E. grandis* e do *E. urophilla*, os teores foram de:

E. grandis = 27,51 µg de flavonóides em equivalentes de quercetina por grama de madeira seca (A=0,018).

E. urophilla = 17,70 µg de flavonóides em equivalentes de quercetina por grama de madeira seca (A=0,015).

Não existem trabalhos de determinação de flavonóides em teor de quercetina feitos em madeira de eucalipto ou em outras madeiras disponíveis para comparação.

3.3.2. Determinação dos fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu

A partir da determinação das absorvâncias obtidas para amostras de concentração conhecida, foi traçado um gráfico da absorvância pela concentração em microgramas mostrado na Figura 23.

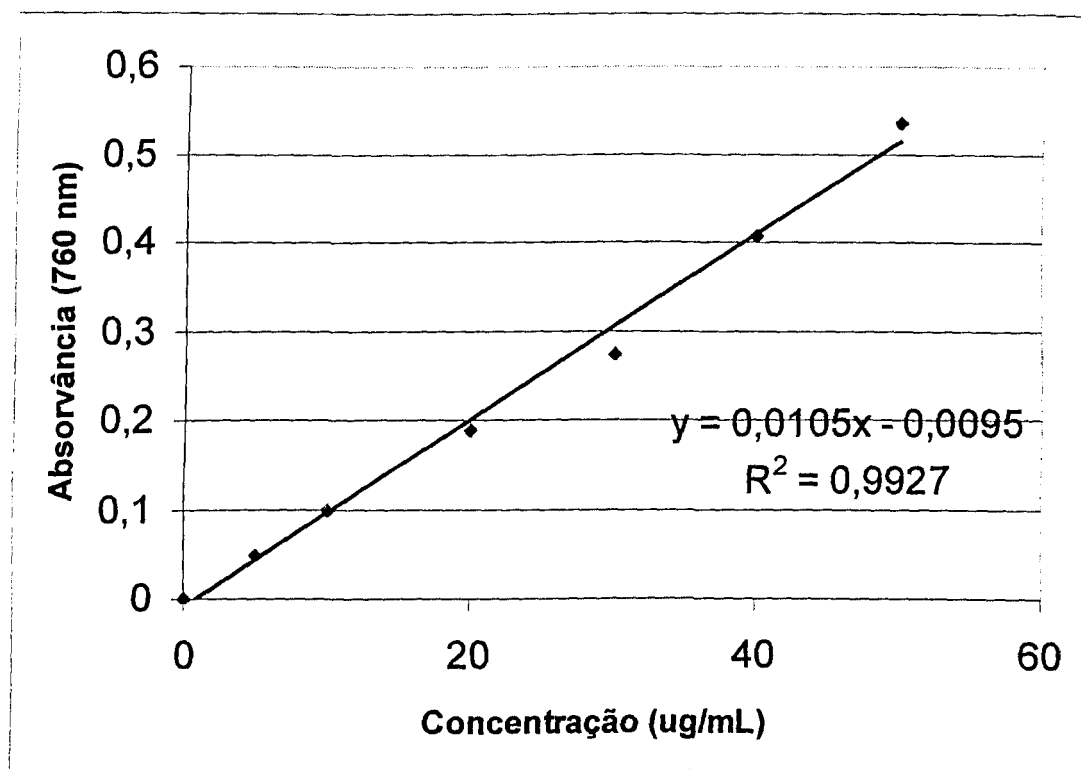


Figura 23 – Absorvância versus concentração de ácido gálico.

Os valores obtidos para as madeiras de *E. grandis* e *E. urophilla* foram:

E. grandis = 3,28 mg de equivalentes de ácido gálico/g de madeira seca ($A=0,174$).

E. urophilla = 4,12 mg de equivalentes de ácido gálico/g de madeira seca ($A=0,221$).

As duas espécies apresentam quantidades próximas de fenóis totais.

Os resultados obtidos estão condizentes com Garcia-Vallejo^{60,61,62,63} e colaboradores que encontraram valores em uma larga faixa desde amostras com 1,5 até amostras com valores de 190 mg de fenóis totais expressos em equivalentes de quercetina e valores máximos de até 10 mg em equivalentes de ácido gálico, que foi o padrão utilizado.

3.3.3. Determinação de proantocianidinas pelo método da vanilina

A partir da determinação das absorbâncias obtidas para amostras de concentração conhecida, foi traçado um gráfico da absorbância pela concentração em microgramas mostrado na Figura 24.

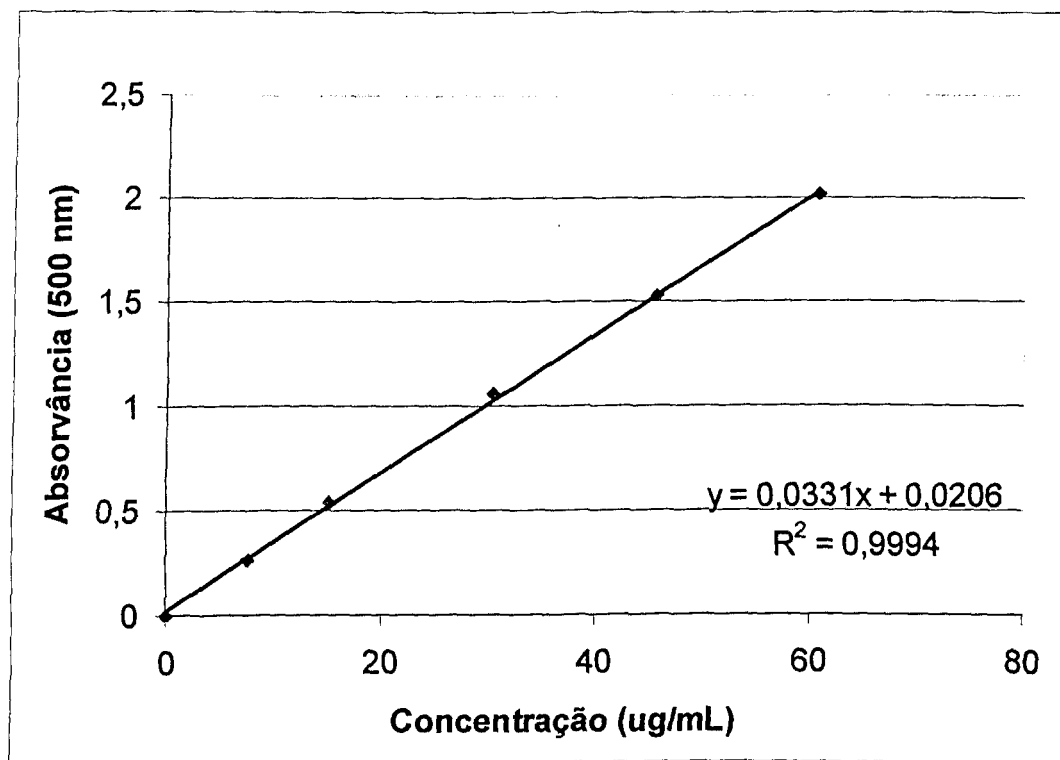


Figura 24 - Absorvância versus concentração de catequina.

Os valores obtidos para as madeiras de *E. grandis* e *E. urophilla* foram:

E. grandis = 2,9 mg de equivalentes de catequina/g de madeira seca ($A=0,538$).

E. urophilla = 3,0 mg de equivalentes de catequina/g de madeira seca ($A=0,549$).

Os valores obtidos para as duas madeiras foram muito próximos, o que indica quantidades de proantocianidinas semelhantes, impedindo o uso deste ensaio para a diferenciação entre estas espécies de eucalipto.

Os valores encontrados por Garcia-Vallejo^{60,61,62,63} e colaboradores estão na faixa entre 2,5 e 6,5 mg enquanto Nascimento⁵⁵ e colaboradores encontraram valores próximos de 7,0 mg de catequina por grama de madeira seca. Garcia-Vallejo^{60,61,62,63} e colaboradores estudaram diversas espécies de eucalipto (*E. camaldulensis*, *rudis* e *globulus*) cultivados na Espanha e Nascimento⁵⁵ e colaboradores trabalharam com o *E. grandis* de 12 anos de idade (extratos obtidos com água quente). Como os solventes utilizados nos métodos de extração foram diferentes (acetona/água, metanol/água e água quente) era de se esperar uma ligeira diferença nos resultados obtidos. A água quente pode facilitar a degradação dos

taninos⁵⁵. Além disso, Nascimento⁵⁵ e colaboradores não utilizaram metanol, o que certamente afeta a composição do extrato.

3.4. Espectroscopia no Infravermelho

As Figuras 25 e 26 mostram os espectros no infravermelho do *E. grandis* e do *E. urophilla*. A Tabela 10 apresenta as atribuições correspondentes.

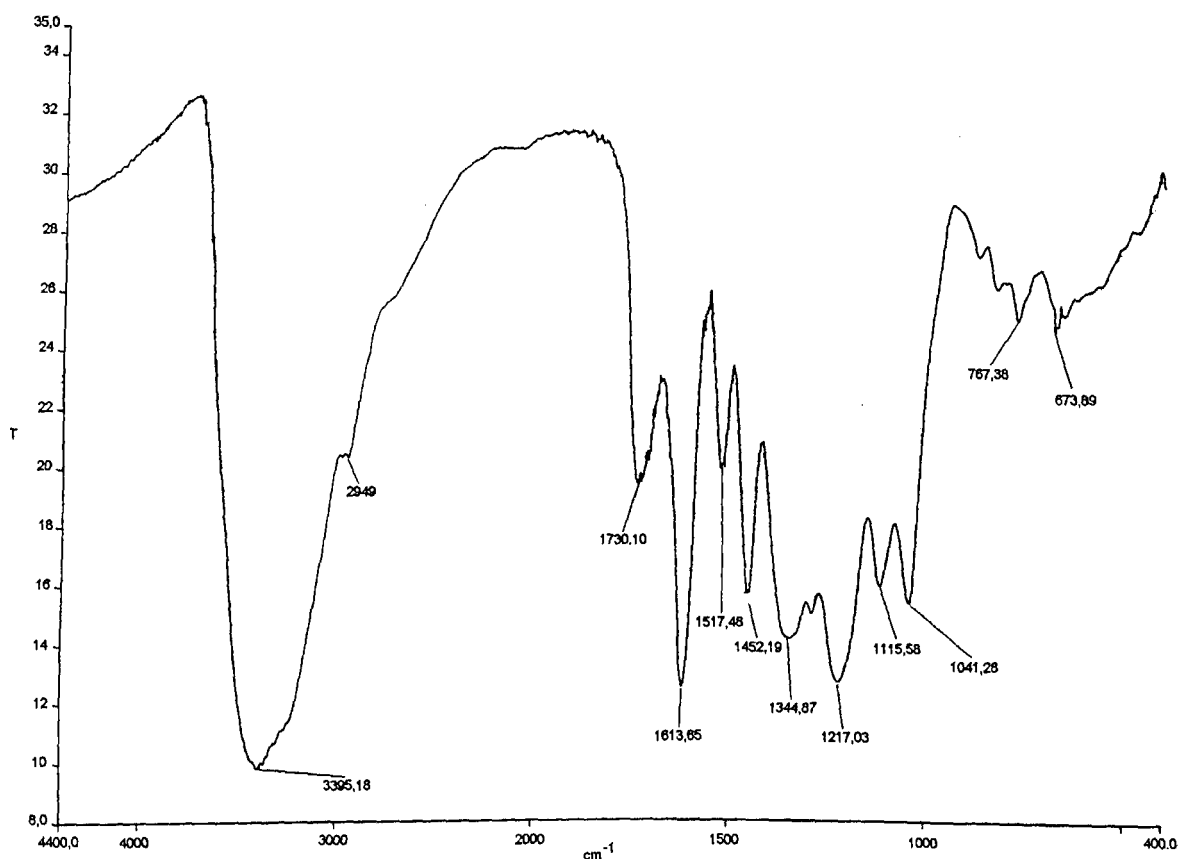


Figura 25 – Espectro no infravermelho do extrato L1 do *E. grandis*, em KBr.

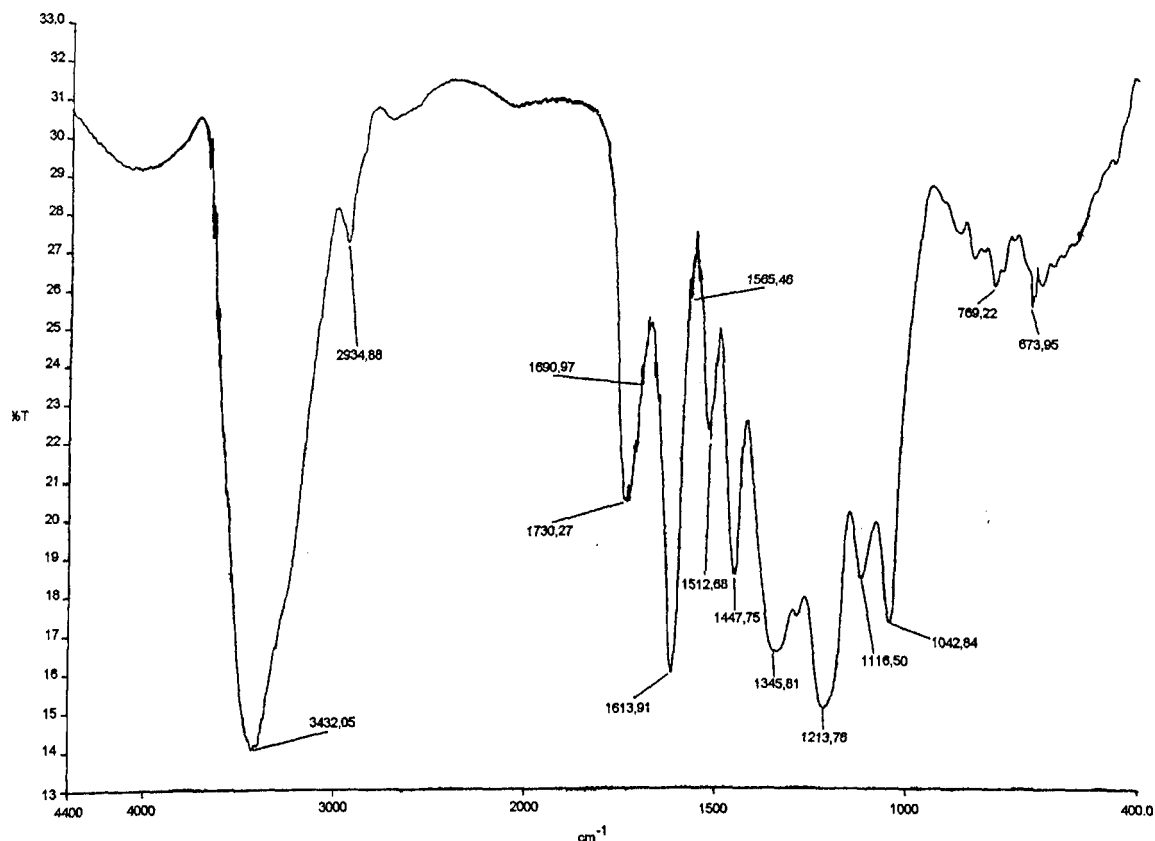


Figura 26 – Espectro no infravermelho do extrato L1 do *E. urophilla*, em KBr.

Os espectros dos extratos L1 das duas espécies são praticamente superponíveis, revelando a presença de grupos hidroxila, carbonila, C-O e de baixa concentração de ligações C-H saturada. Estes espectros são semelhantes aos espectros de flavonóides e segundo Foo⁴⁴ um pico duplo por volta de 1535-1520 evidencia que os polifenóis estão constituídos fundamentalmente por procianidinas e prodelfinidinas, estas em proporção superior a 60 %. A proporção entre elas é dada pelos picos em 770 e 730 cm^{-1} . O pico em 770 cm^{-1} é devido a procianidinas e a presença de prodelfinidinas é indicada por um pico em 730 cm^{-1} . Sendo assim, a análise dos espectros das figuras 25 e 26 não permite conclusões confiáveis pois o desdobramento do pico em 1520-1535 cm^{-1} só é ligeiramente observado na Figura 26, assim como uma banda fraca em 730 cm^{-1} . Fica, portanto, em aberto se os extratos contêm prodelfinidinas.

Tabela 10 - Bandas no IV dos extratos aquosos do *E. grandis* e do *E. urophila*.

Atribuições	Bandas (cm ⁻¹)	
	<i>E. grandis</i>	<i>E. urophila</i>
Estiramento O-H	3422,1	3395,1
Estiramento C-H	2928	2932
C=O de aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos e ésteres	1740	1732,3
Anel aromático em geral	1616,5;1518,2	1612;1516
Estiramento C=C do anel	1457	1450
Deformação C-H ou deformação O-H no plano	1354	1348,4
Estiramento C-O	1219,2	1213,4
Estiramento C-O	1116,9	1116,9
Estiramento C-O-H	1043,6	1043,6
Deformação C-H fora do plano do anel aromático	767,8	763,9
Deformação de C=C do anel para fora do plano ou deformação de O-H	690-650	690-650
Fora do plano	673,89	673,95

Nascimento⁵⁵ e colaboradores também não puderam tirar maiores conclusões quando trabalharam com extratos do *E. grandis* de 12 anos por espectroscopia no IV.

3.5. CG/EM

As Tabelas 11 e 12 mostram os compostos encontrados por CG/EM nos extratos etéreo e clorofórmico, resultantes da extração do extrato E1, respectivamente.

Tabela 11 - Compostos extraídos com éter do extrato E1 do *E. grandis* e do *E. urophilla*.

Compostos	tempo de retenção (minutos)	
	<i>E. grandis</i>	<i>E. urophilla</i>
Ácido 2-hidróxi-isovalérico	7,808	-----
Ácido benzóico	-----	9,908
Hidroquinona	12,608	-----
Flavonóide desconhecido	21,175	21,200
Ácido palmítico	22,183	22,208
Catequina	43,350	43,383

Tabela 12 - Compostos extraídos com clorofórmio do extrato E1 do *E. grandis* e do *E. urophilla*.

Compostos	tempo de retenção (minutos)	
	<i>E. grandis</i>	<i>E. urophilla</i>
Glicerol	-----	7,033
Benzoato de metila	-----	7,367
Dimetil-éster do ácido tartrônico	8,850	-----
Cinamato de metila	-----	12,592
Composto desconhecido	-----	14,392
Composto desconhecido	-----	14,400
Composto desconhecido	15,600	-----
Palmitato de metila	-----	20,692
Ácido palmítico	22,142	-----
Oleato de metila	-----	23,067
Nonadecanoato de metila	-----	23,325
n-hexadecano	-----	25,733
n-heptadecano	-----	29,442
n-octacosano	-----	34,800
Eicosanoato de metila	-----	35,925
Eicosano	-----	42,892

Tabela 13 - Compostos extraídos nas frações etanol/acetona dos extratos E1 do *E. grandis* e do *E. urophilla* após separação em coluna de sephadex.

Compostos	tempo de retenção (minutos)	
	<i>E. grandis</i>	<i>E. urophilla</i>
Ácido láctico	3,358	-----
Flavonóide desconhecido	4,650	-----
Noreugenina	5,117	5,125
Açúcar desconhecido	-----	6,033
Glicerol tri tms	6,1	6,042
Ácido oxálico 2-TMS	-----	6,658
Flavonóide desconhecido	-----	8,017
Flavonóide desconhecido	9,183	9,383
Ácido málico	9,2	-----
Açúcar desconhecido	9,867	-----
Benzoato de benzila	-----	12,583
Açúcar desconhecido	13,167	-----
Ácido octanóico	14,2	-----
Arabinose	-----	14,250
Flavonóide desconhecido	-----	14,267
Ríbitol	-----	14,342
D-eritro-pentafuranose-2-deoxi-tris-o-tms	-----	14,633
Flavonóide desconhecido	-----	14,650
Ácido 4-hidróxi-cinâmico 2-TMS	-----	15,283
Flavonóide desconhecido	-----	15,467
Flavonóide desconhecido	15,842	15,858
Composto desconhecido	16,125	-----
Composto desconhecido	-----	16,692
Flavonóide desconhecido	16,783	-----
Ácido palmítico mono TMS	16,775	16,708
Ácido linoleico mono TMS	-----	18,633
Ácido oléico mono TMS	-----	18,733

Ácido esteárico mono TMS	19,117	19,058
Ácido pelargônico mono TMS	-----	21,217
Flavonóide desconhecido	22,058	-----
Flavonóide desconhecido	22,675	-----
Pico desconhecido	-----	22,233
Flavonóide desconhecido	24,300	-----
Catequina	26,475	26,425
Flavonóide desconhecido	27,392	-----
Flavonóide desconhecido	-----	30,433 e 30,650
Composto desconhecido	-----	34,100
Composto desconhecido	-----	35,858
Composto desconhecido	-----	37,725

A análise da Tabela 11 mostra que os extratos etéreos das duas madeiras apresentaram três substâncias iguais. Os extratos clorofórmicos (Tabela 12), no entanto, mostram que o *E. urophilla* é muito mais rico em constituintes que o *E. grandis*, o que confirma o maior rendimento de extrativos para esta madeira. Este fato mostra a sensibilidade da CG/EM e as limitações da espectroscopia no IV a qual fornece espectros muito parecidos para os extratos de ambas as madeiras.

A Tabela 13 apresenta os compostos identificados nos extratos aquosos dos *E. grandis* e *urophilla* após eluição em coluna Sephadex com etanol e acetona. Como era previsível, o *E. urophilla* possui mais constituintes que o *E. grandis*. Por outro lado, por se tratarem de eluentes polares, a quantidade de substâncias polares é expressivamente maior na Tabela 13 do que nas Tabelas 11 e 12. Assim, açúcares e flavonóides se destacam nas frações de etanol e acetona.

As Figuras 27, 28, 29 e 30 mostram quatro cromatogramas e os produtos identificados em cada um deles para diversas frações.

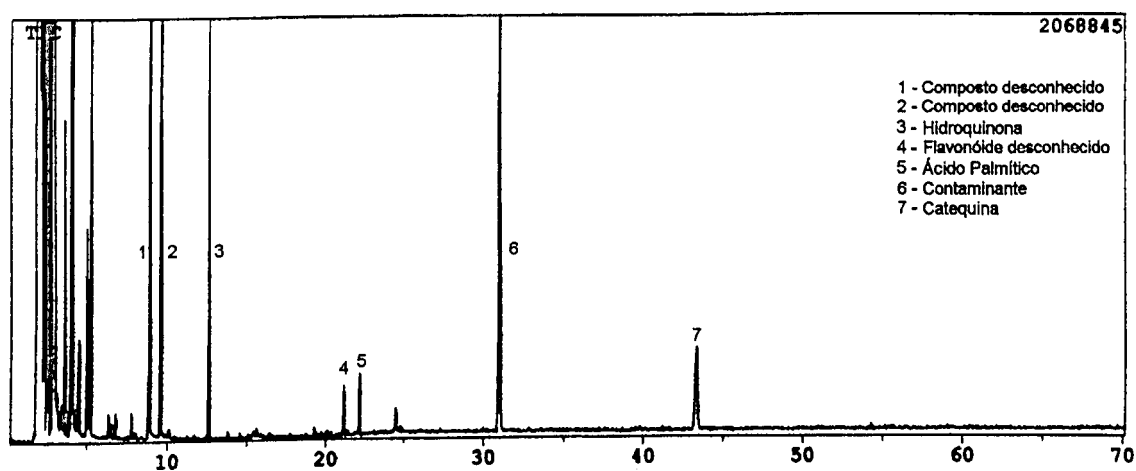


Figura 27 – Cromatograma gasoso do extrato etéreo obtido a partir do extrato E1 do *E. grandis*.

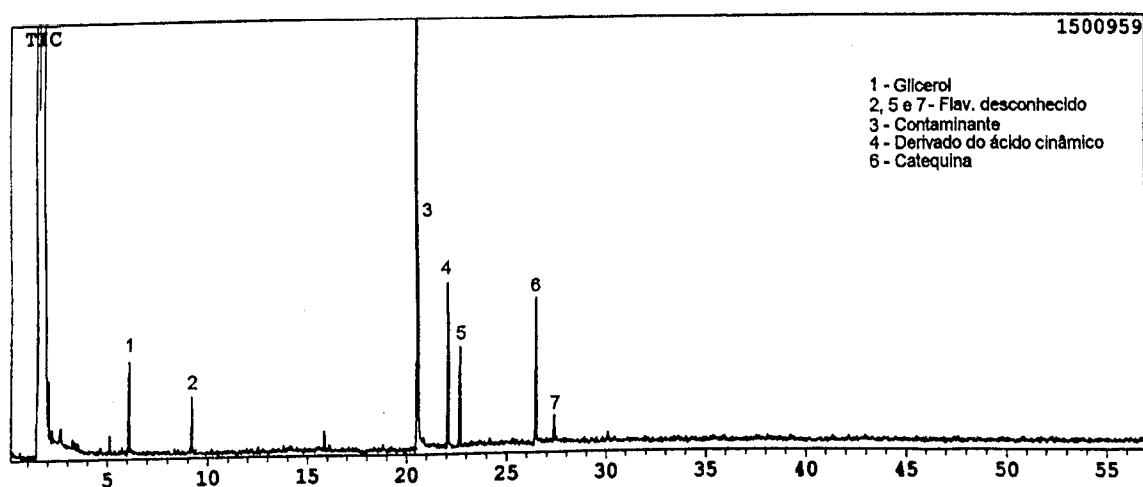


Figura 28 – Cromatograma gasoso da fração 8 (acetona) obtida a partir do extrato E1 do *E. grandis* após separação em coluna de sephadex.

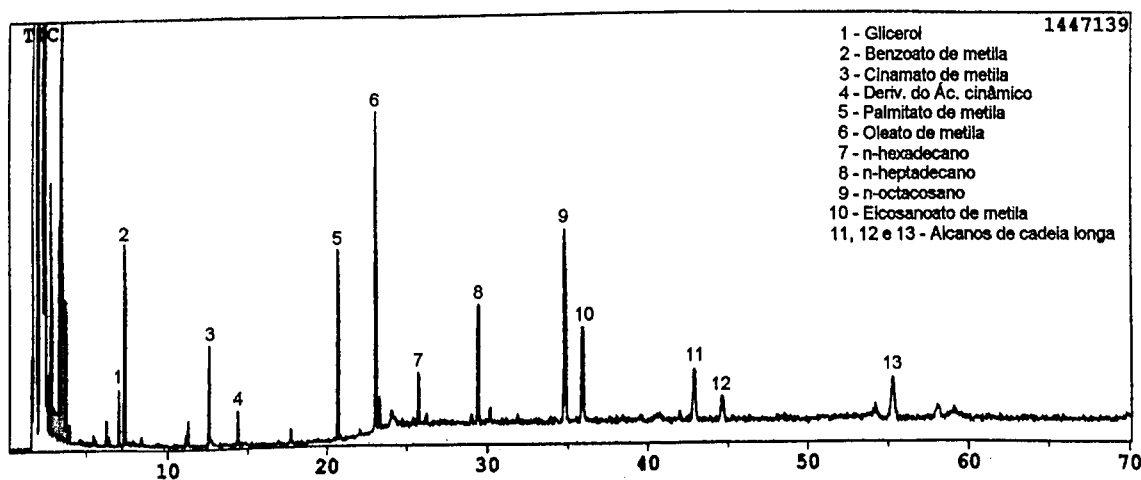


Figura 29 – Cromatograma gasoso do extrato clorofórmico obtido a partir do extrato E1 do *E. urophilla*.

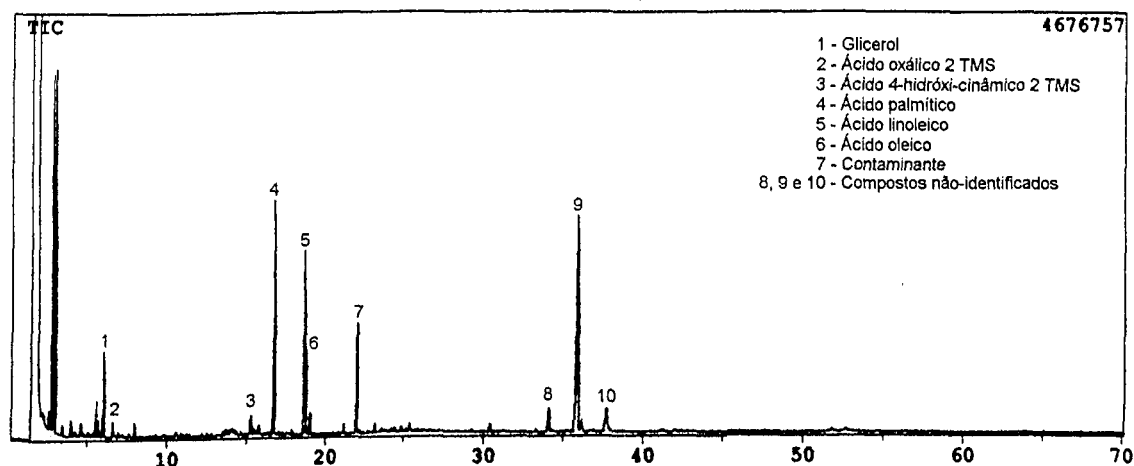


Figura 30 – Cromatograma gasoso da fração 3 (etanol) obtida a partir do extrato E1 do *E. urophilla* após separação em coluna de sephadex.

Vários constituintes dos extratos não puderam ser identificados como bem exemplifica a Figura 27. Mas as Tabelas 11, 12 e 13 comprovam que foram encontrados muitos compostos de diversas funções orgânicas como ésteres, álcoois, aldeídos, fenol, açúcares, ácidos carboxílicos, alcanos e vários flavonóides. Muitos compostos não puderam ser identificados por não constarem da biblioteca do aparelho.

A análise de flavonóides e polifenóis por CG/EM é difícil pelo seu pequeno fator de resposta e por sua baixa volatilidade.

As análises de CG/EM das frações que foram inicialmente separadas na coluna de sephadex foram feitas em uma coluna DB-1 enquanto as análises das amostras aquosas lavadas com éter e clorofórmio foram feitas em uma coluna DB-5, o que explica a diferença nos tempos de retenção obtidos entre uma análise e outra. Como a identificação não é apenas baseada nos tempos de retenção mas também no padrão de fragmentação das moléculas e ainda na injeção de padrões externos, a mudança de coluna não interferiu na identificação dos compostos existentes na madeira.

Alguns contaminantes de origem desconhecida foram identificados como o TBEP (tributóxi-etil fosfato) e o dioctil-ftalato que são substâncias mais conhecidas como plastificantes, as quais são praticamente impossíveis de serem eliminadas na cromatografia gasosa.

3.6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Alguns constituintes dos extratos aquosos das duas espécies de eucalipto estudadas apresentam massas molares elevadas e são polares, tornando-se difícil pois caracterizá-los por CG/EM, mesmo por meio de sililação. Nestes casos a CLAE se apresenta como uma ferramenta poderosa principalmente se acoplada à espectrometria de massas. Infelizmente não se contava com um equipamento deste tipo para a realização dos experimentos. Entretanto, foi possível utilizar um cromatógrafo líquido do Instituto Nacional de Investigações Agrárias de Madrid, que possuía uma biblioteca de compostos fenólicos mais comuns cujos espectros no UV são mostrados no apêndice A (p. XXX).

A partir dessa biblioteca pôde-se caracterizar muitos constituintes dos extratos. Os cromatogramas líquidos obtidos são mostrados nas Figuras 31, 32, 33 e 34, a seguir.

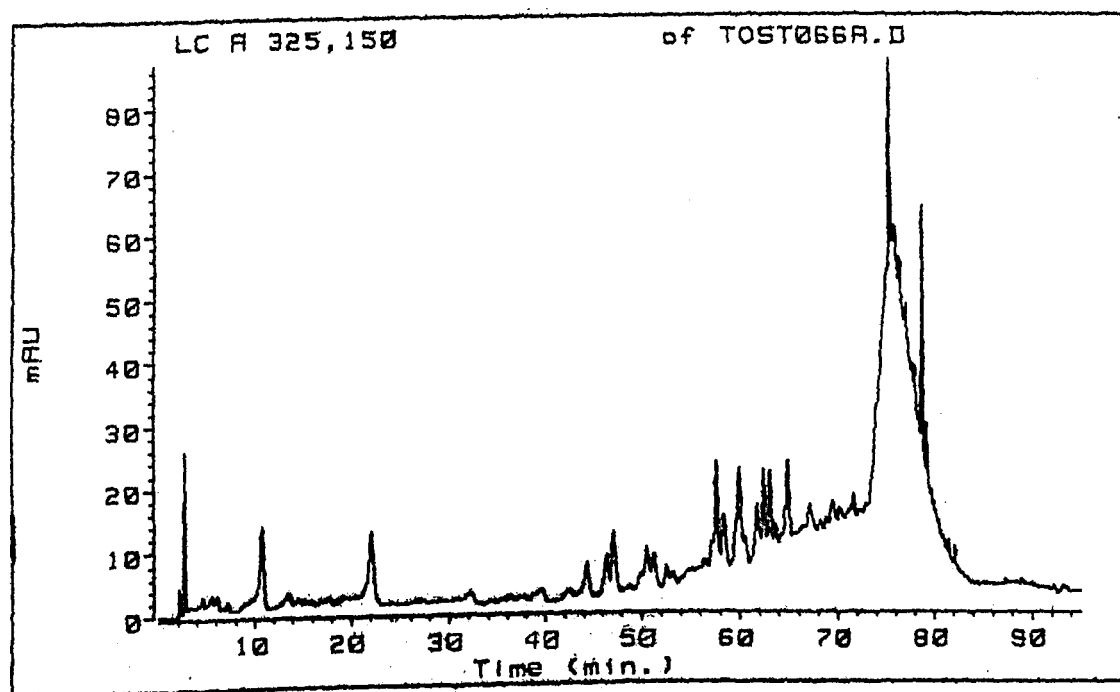


Figura 31 - Cromatograma líquido do extrato L2 do *E. grandis* no canal 325 ± 150 nm.

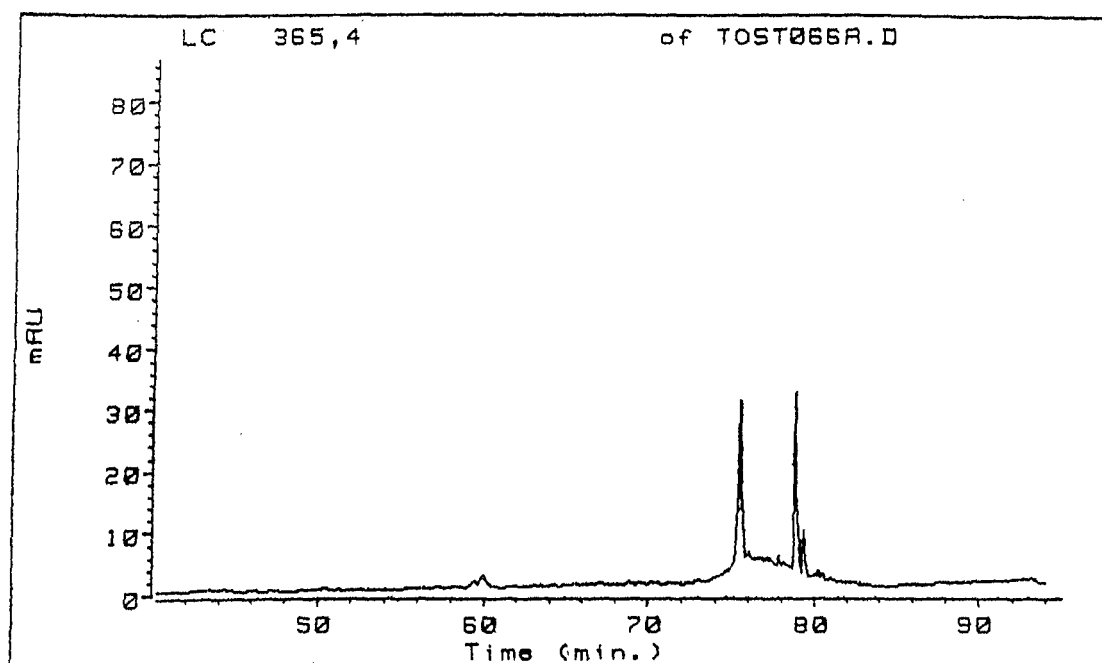


Figura 32 - Cromatograma líquido do extrato L2 do *E. grandis* no canal 365 ± 4 nm.

Nota-se nestes cromatogramas que o canal a 325 ± 150 nm capta muito mais componentes que a 365 ± 4 nm. Isto é óbvio porquanto o canal a 325 capta razoavelmente bem compostos que absorvem desde 175 nm até 475 nm ao passo que o de 365 nm tem uma tolerância de ± 4 nm.

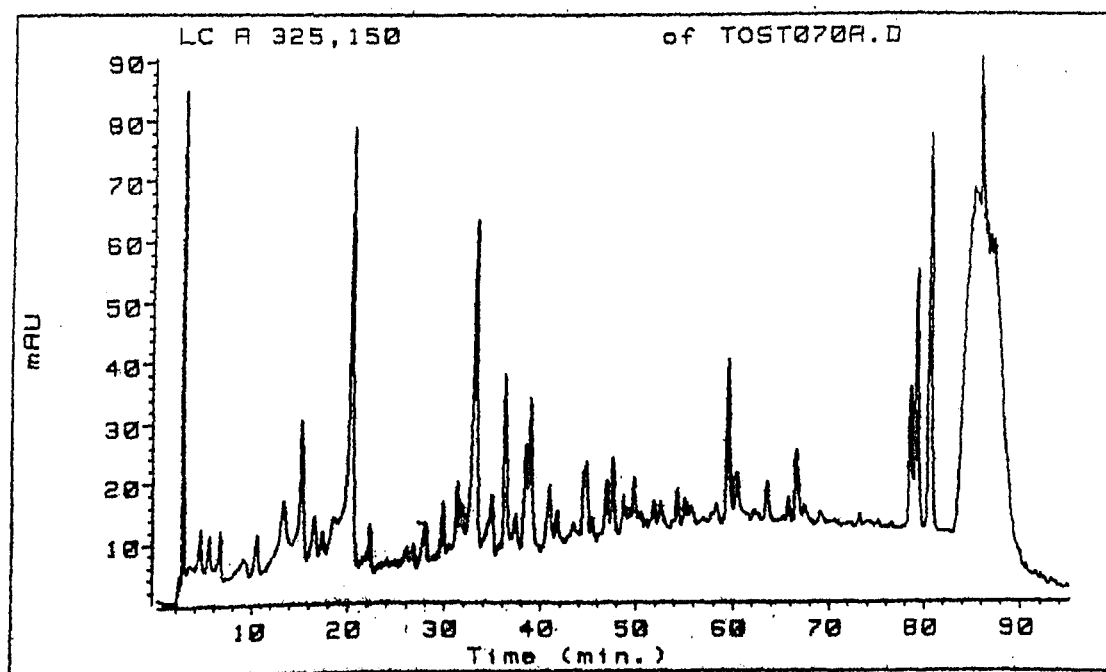


Figura 33 - Cromatograma líquido do extrato L2 do *E. urophilla* no canal 325 ± 150 nm.

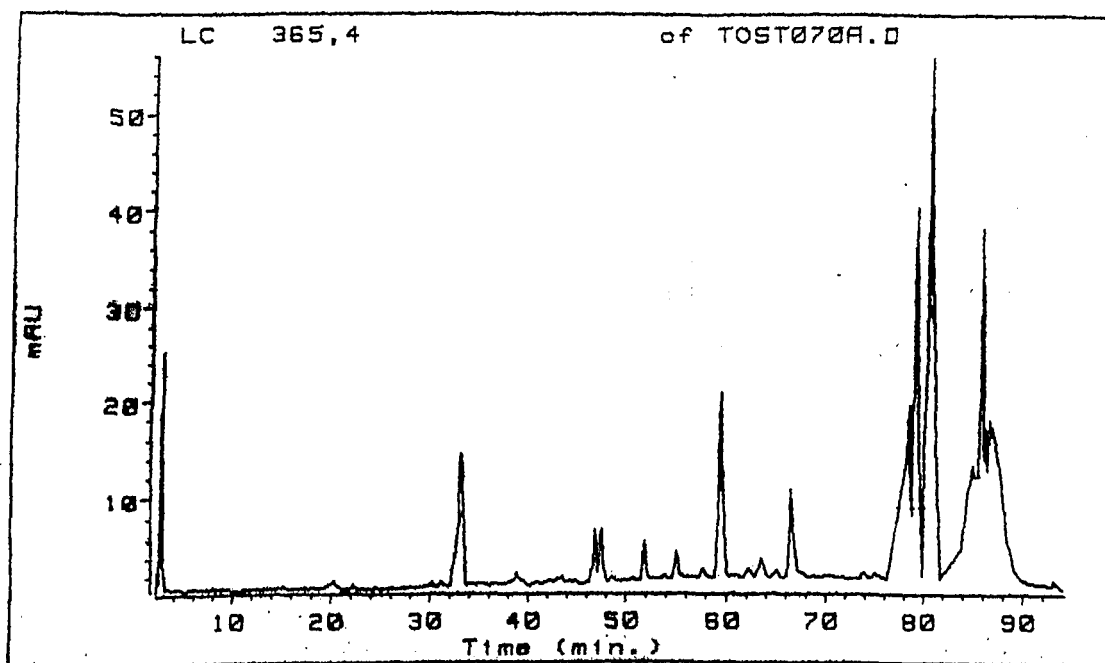


Figura 34 - Cromatograma líquido do extrato L2 de *E. urophilla* no canal 365±4 nm.

Por outro lado, os cromatogramas mostram que o extrato aquoso do *E. urophilla* é o mais rico em constituintes do que o *E. grandis*, constatação que vem a confirmar as observações já feitas neste trabalho.

A Tabela 14 apresenta os compostos identificados nos dois extratos. A maior parte, no entanto, não pôde ser caracterizada porque os espectros no UV não constavam da biblioteca do aparelho. Realmente não se tinha a ilusão, ao começar este estudo, de se identificar muitos componentes destes extratos, pois mais de 2000 flavonóides são conhecidos e a maioria deles não consta dos bancos de dados.

Tabela 14. Componentes identificados por CLAE nos extratos L2
do *E. grandis* e do *E. urophilla*

Componente	<i>E. grandis</i>	<i>E. urophilla</i>
Ácido gálico	x	x
Vanilina	x	
Ácido siríngico		x
Seringaldeído	x	x
Aldeído coníferílico		x
Flavona	x	x
Ácido Elágico	x	x
Galotaninos	x	x
Elagitaninos	x	x
Derivados do ácido cinâmico	x	x
Várias proantocianidinas	x	x
Catequina	x	x

Como se pode inferir da Tabela 14, existe grande concordância entre os resultados obtidos pela cromatografia líquida, pela CG/EM (Tabelas 11 a 13, p. 45 a 47) e pela espectroscopia no IV (Tabela 10, p.44).

Assim, foram detectados os ácidos gálico e elágico, elagitaninos, várias proantocianidinas, flavona, ácidos e aldeídos aromáticos e membros da família do ácido cinâmico (C₆C₃, p.6).

A fim de serem obtidos mais informações sobre a estrutura das proantocianidinas detectadas, fez-se a hidrólise ácida dos dois extratos estudados (L1 e L2). As Figuras 35 e 36 apresentam os cromatogramas líquidos das soluções resultantes da hidrólise. Foi utilizado o canal a 525 nm para melhor captação das proantocianidinas e antocianidinas.

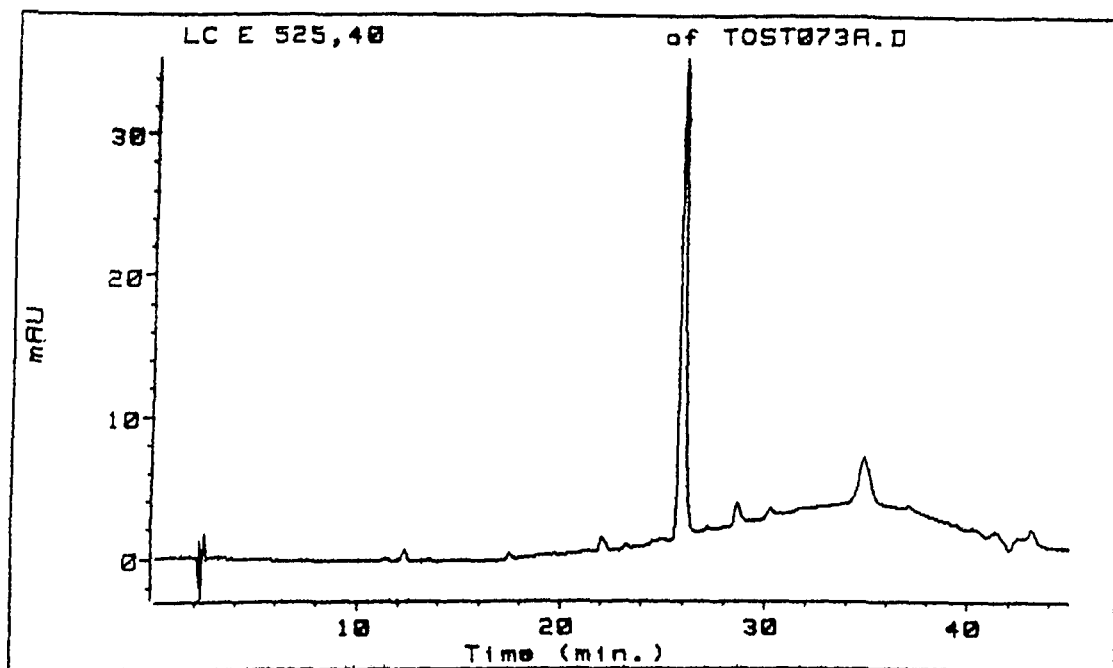


Figura 35 - Cromatograma líquido do produto resultante da hidrólise do extrato L2 do *E. grandis* com butanol-ácido (p.35), no canal 525 nm.

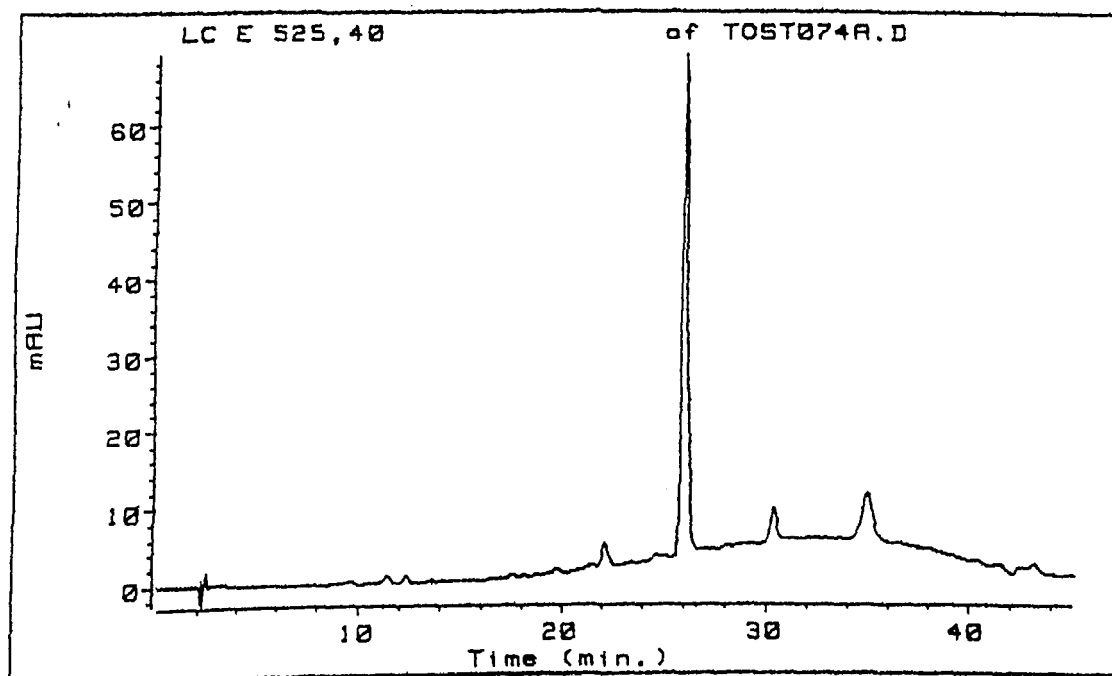


Figura 36 - Cromatograma líquido do produto resultante da hidrólise do extrato L2 do *E. urophilla* com butanol-ácido (p.35), no canal 525 nm

O pico encontrado a 26 minutos é devido à delfinidina (Figura 13, p. 9) e o situado a 35 minutos, à cianidina (Figura 13, p. 9). As outras antocianidinas observadas nos dois cromatogramas não puderam ser identificadas. Chama a atenção a maior intensidade da delfinidina com relação à cianidina, que foi mais abundante no extrato aquoso analisado

por Nascimento e colaboradores⁵⁴. Para esclarecer esta dúvida, foram realizados novos experimentos no cromatógrafo líquido do CETEC-BH valendo-se de padrões de cloretos de cianidina, fisetinidina (Figura 13, p. 9) e delphinidina. As Figuras 37 e 38 apresentam os cromatogramas líquidos das soluções resultantes da hidrólise ácida dos dois extratos estudados. O canal de detecção foi sintonizado a 270 nm (banda II, Tabela 3, p. 18) porque o aparelho não alcançava acima de 400 nm.

A comparação com os tempos de retenção dos padrões importados e outros (vide apêndice A e B, p. 66 e 96, respectivamente) permitiu identificar o ácido gálico (2,2 min.) e o ácido elágico (10,7 min.), a delphinidina (10,3 min.) e a cianidina (13,1). Infelizmente a delphinidina eluiu juntamente com o ácido elágico e uma nova análise foi solicitada aos colegas do Cetec-BH com os solventes e gradientes usados na Espanha, mas o aparelho havia sido desativado. Portanto, não foi ainda possível dirimir a dúvida se a delphinidina estava presente e em qual concentração.

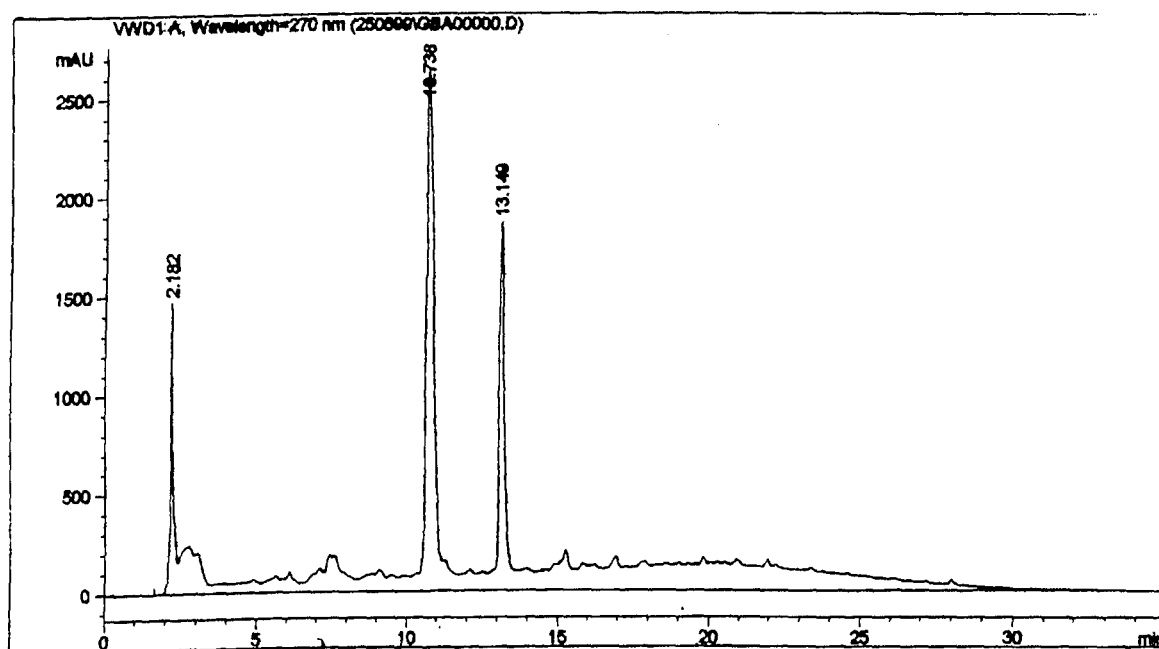


Figura 37 - Cromatograma líquido do produto resultante da hidrólise do extrato L1 do *E. grandis* com butanol-ácido (p.35), no canal 270 nm.

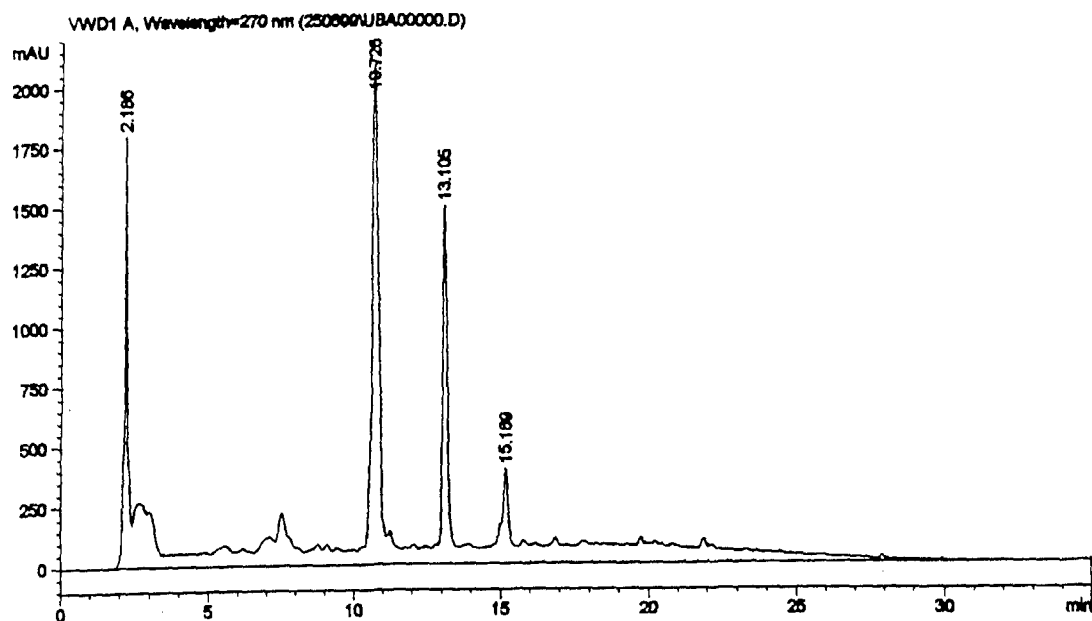


Figura 38 - Cromatograma líquido do produto resultante da hidrólise do extrato L2 do *E. urophilla* com butanol-ácido (p.35), no canal 270 nm.

Comparando-se os cromatogramas líquidos realizados no INIA e no CETEC-BH, verifica-se que os dois primeiros não trazem os ácidos gálico e elágico e os dois últimos sim. Isto era esperado porque os ácidos absorvem a 270 nm, mas não acima de 500 nm. Por outro lado, os eluentes utilizados em ambos os casos mostram cromatogramas semelhantes, ou seja, a hidrólise ácida produz antocianidinas em igual número, mas os tempos de retenção dos picos foram diferentes em função do gradiente empregado. Este fato pode ser observando ao se comparar os cromatogramas da Figura 35 com a 37 e a Figura 36 com a 38.

As demais antocianidinas não puderam ser identificadas por falta de padrões.

3.7. RMN

Os espectros de RMN do C-13 no estado sólido dos extratos acetona/água liofilizados do *E. grandis* e do *E. urophilla* estão apresentados nas Figuras 39 e 40. A semelhança entre os dois espectros é muito grande e confirma a similaridade dos resultados observados na espectroscopia no IV. Portanto, por estas duas técnicas não é possível diferenciar as duas espécies de eucalipto estudadas.

Os espectros mostrados nas Figuras 39 e 40 concordam bastante com os de procianidinas e prodelphinidinas na região compreendida entre δ 60-160⁵². A Tabela 15

apresenta as atribuições para os principais picos observados nestes espectros. Elas foram baseadas na Tabela 16⁵², na Figura 42³ e nos trabalhos de Porter⁵³ e Nascimento e colaboradores⁵⁴.

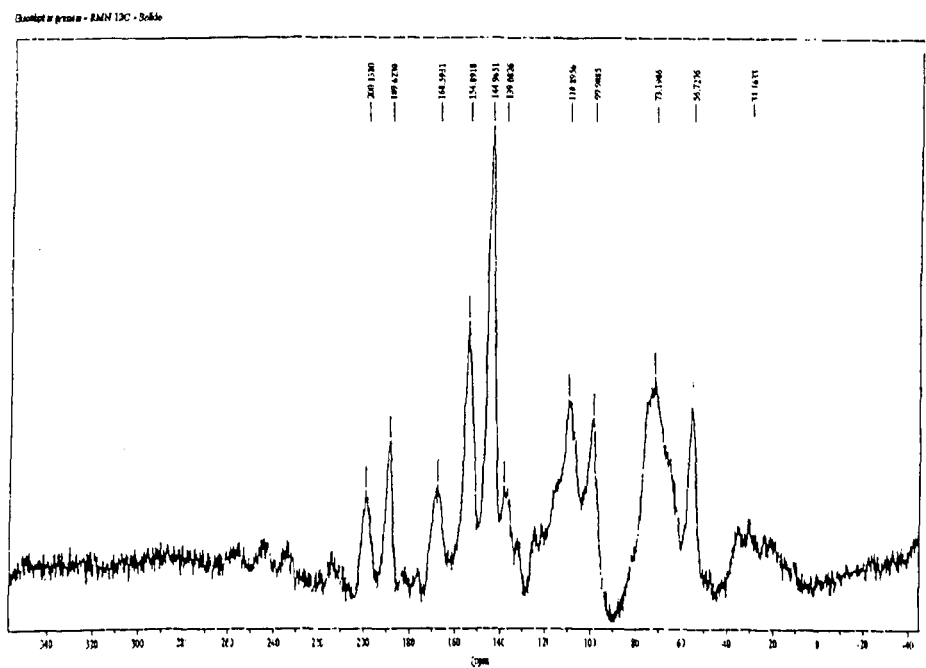


Figura 39 - Espectro de RMN do C-13 no estado sólido do extrato acetona/água do *E. grandis*.

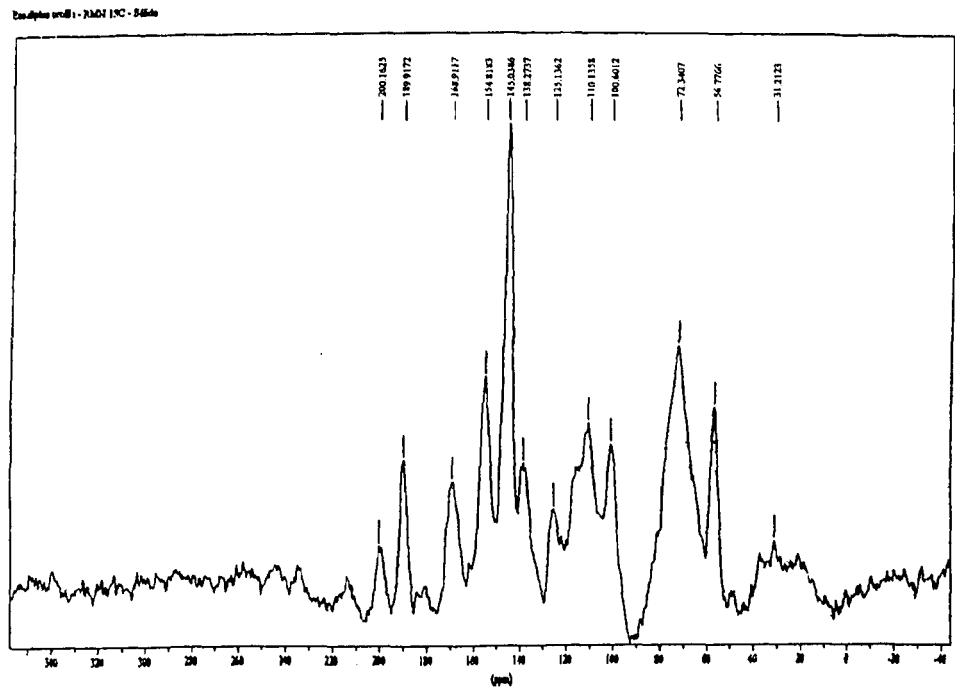


Figura 40 – Espectro de RMN do C-13 no estado sólido do extrato acetona/água de *E. urophilla*.

A comparação das Figuras 39 e 40 com o espectro em fase sólida do extrato aquoso do *E. grandis* de 12 anos⁵⁴, obtido com água quente após extração da madeira com benzeno/etanol indica grande semelhança até a região de δ 170. Esta constatação mostra que a extração a quente não altera significativamente as proantocianidinas e também que os extrativos de menor massa são responsáveis pelos sinais acima de δ 170.

Tabela 15 – Atribuição dos principais picos dos espectros de RMN do C-13 no estado sólido dos extratos E1 do *E. grandis* e do *E. urophilla*.

Atribuição dos picos	Deslocamento químico (ppm)	
	<i>E. grandis</i>	<i>E. urophilla</i>
Carbonila de flavanonas, diidroflavonóis	200,13	200,16
	189,62	189,91
Carbonila de ésteres e dos ácidos gálico e elágico	168,59	168,91
C5, C7 e C8a de PC e PD	154,89	154,81
C3' e C4' de PC; C3' e C5' de PD	144,96	145,03
C4 de ácidos, aldeídos e cetonas, aromáticos, ácido cinâmico e derivados	139,08	138,27
C1' de PC e PD; C4' de PD (ombro)	132	132
C1 de ácidos, aldeídos e cetonas, aromáticos, ácido cinâmico e derivados	125,13	125,13
C2', C5' e C6' de PC	120-115	120-115
C2' e C6' de PD	110,89	110,13
C6 e C8 não-substituídos de PC e PD	99,98	100,60
C2 de 2,3-trans PC e PD	82,0	82,0
C2 de 2,3-cis PC e PD	79,0	79,0
C3 de PC e PD	73,19	72,34
C3 de PC e PD	66,0	66,0
CH ₃ -O-Ar	56,72	56,77
C4 de PC e PD	38-28	38-28
C sp ³ de várias estruturas	28-15	28-10

As estruturas da procianidina e prodelfinidina são mostradas na figura 41.

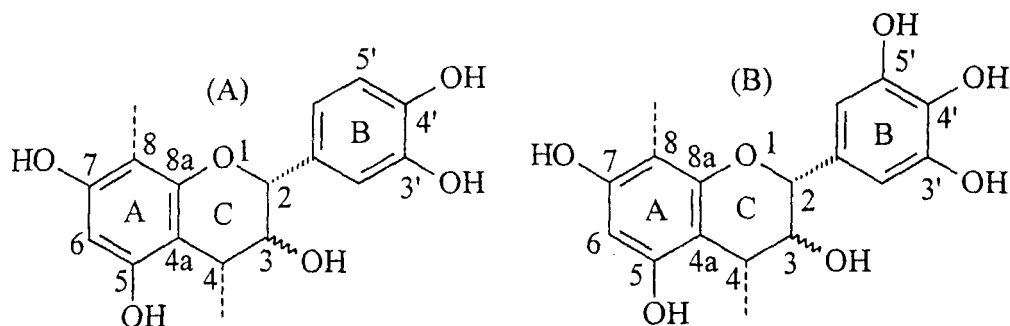


Figura 41 – Estruturas da (A) procianidina e (B) prodelfinidina.

Tabela 16 – Deslocamentos químicos dos carbonos de flavonóides⁵²

Sinais característicos de padrões de oxigenação no anel A						
	Número do carbono					
	4a	5	6	7	8	8a
Resorcinol (7-OH)	117	130	110	158	103	156
Floroglucinol (5,7-diOH)	102	157	97	157	96	156
Pirrogallol (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'-Hidróxi	131	129	116	157	116	129
3',4'-Dihidróxi	132	115	145	145	116	120
3',4',5'-Trihidróxi	131	108	146	133	146	108
Sinais característicos para padrões de oxigenação no anel C						
	2	3	4			
Fisetinidol	82,2	68,1	32,6			
Catequina	82,0	67,9	28,1			
Epicatequina (b)	79,1	66,8	28,6			
Epicatequina	79,4	66,9	29,1			
Catequina-4 α (a)	83,7	72,9	37,9			
Epicatequina-4 β (a)	76,6	72,6	36,5			
Epicatequina-3-O-Glcp (b)	78,2	73,3	24,2			
Epicatequina-3-O-Galato	77,8	69,7	26,4			
Catequina-4 α -ol	81,7	73,9	71,6			
4 β -Tiobenzil-epicatequina	74,4	70,3	42,9			
Epicatequina-(2 β -7,4 β -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.

(b) em acetona d₆. (c) As primeiras ressonâncias se referem à unidade superior e a segunda à unidade inferior da estrutura.

A análise mais detalhada da Tabela 16 mostra que os extratos estudados contêm prodelfinidinas porque estas apresentam absorção por volta de 110 ppm devido aos C2' e C6' do anel B. Como já era esperado, o sinal típico das procianidinas (C2', C5' e C6') aparecem entre 120-115 ppm. O sinal mais intenso de todos a 145 ppm assegura que as proantocianidinas são majoritárias em ambos os extratos. A presença de carboidratos é discreta porque o sinal característico do C1' de açúcares entre 105-95 ppm é fraco (ombro). Além disso, é possível inferir das figuras 39 e 40 a presença de ácidos, aldeídos e cetonas aromáticas, ácido cinâmico e derivados, uma presença expressiva de grupos metoxila (provavelmente de frações siringílicas de ligninas que se dissolvem bem em acetona/água) e componentes alifáticos, provavelmente de ceras⁶⁶.

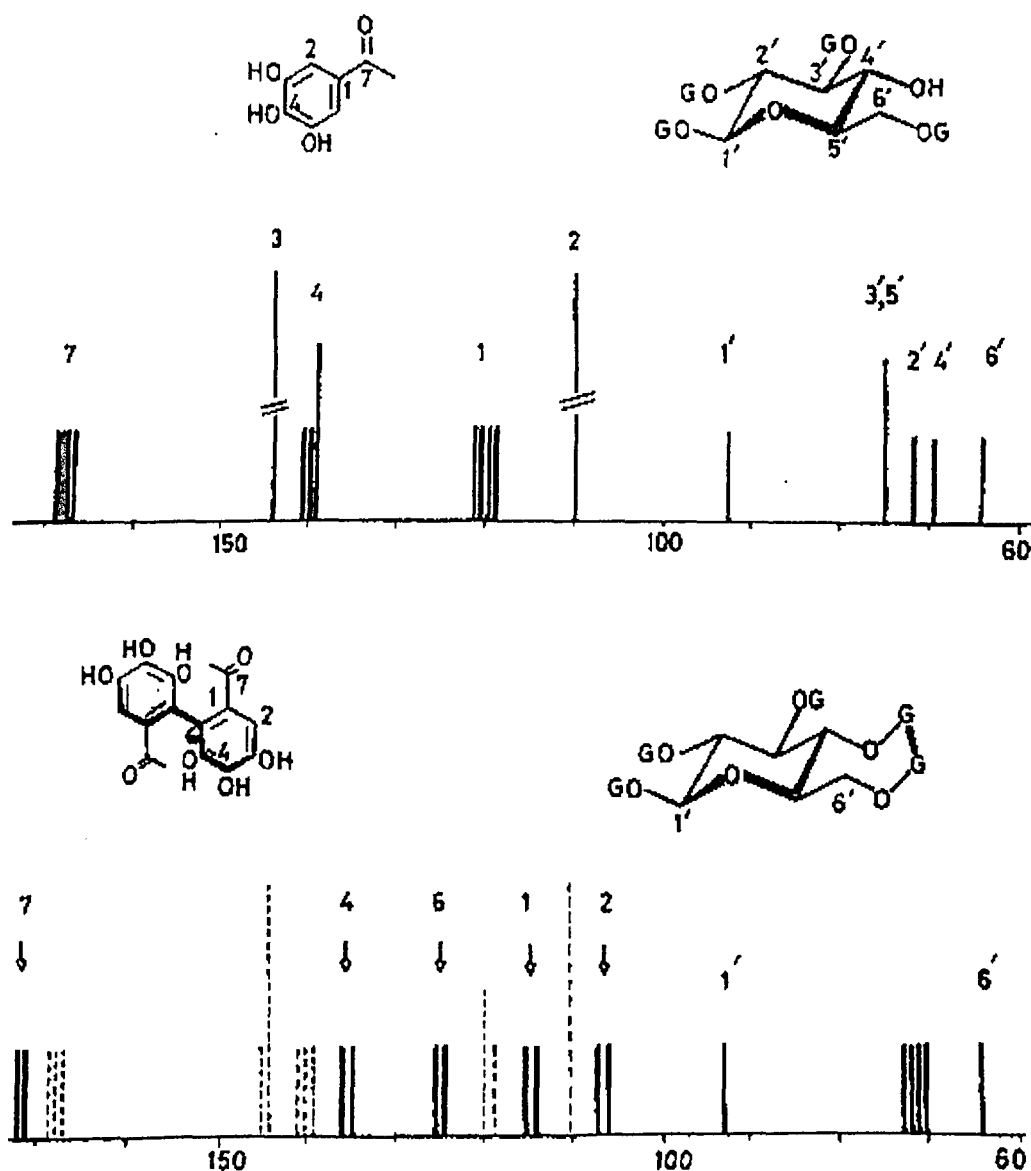


Figura 42 - Deslocamentos químicos do C-13 dos galotaninos e elagitaninos³.

A Figura 43 apresenta o espectro de RMN de C-13 em solução para o extrato acetona/água do *E. grandis* e a comparação com a Figura 39 (fase sólida) mostra que há uma boa concordância entre eles na região característica de proantocianidinas (δ 60-155). No espectro em fase líquida não apareceram os sinais devidos ao grupo C=O acima de δ 170. Isto pode ser por dois motivos: ou eles se dissolveram pouco na mistura de acetona:água e/ou seu tempo de relaxação é relativamente mais elevado e por isso demoram mais para serem captados. Como foram acumulados 18.444 espectros, a primeira hipótese é mais provável. Outro dado que confirma isto é que alguns sinais estão mais intensos na Figura 43 como por exemplo o do carbono metoxílico a δ 55-56 e o do carbono a δ 115. Seguramente as frações que contêm mais grupos metoxila se dissolveram melhor na mistura acetona/água.

Apesar disto, pode-se afirmar que o espectro considerado tem o perfil de proantocianidinas.

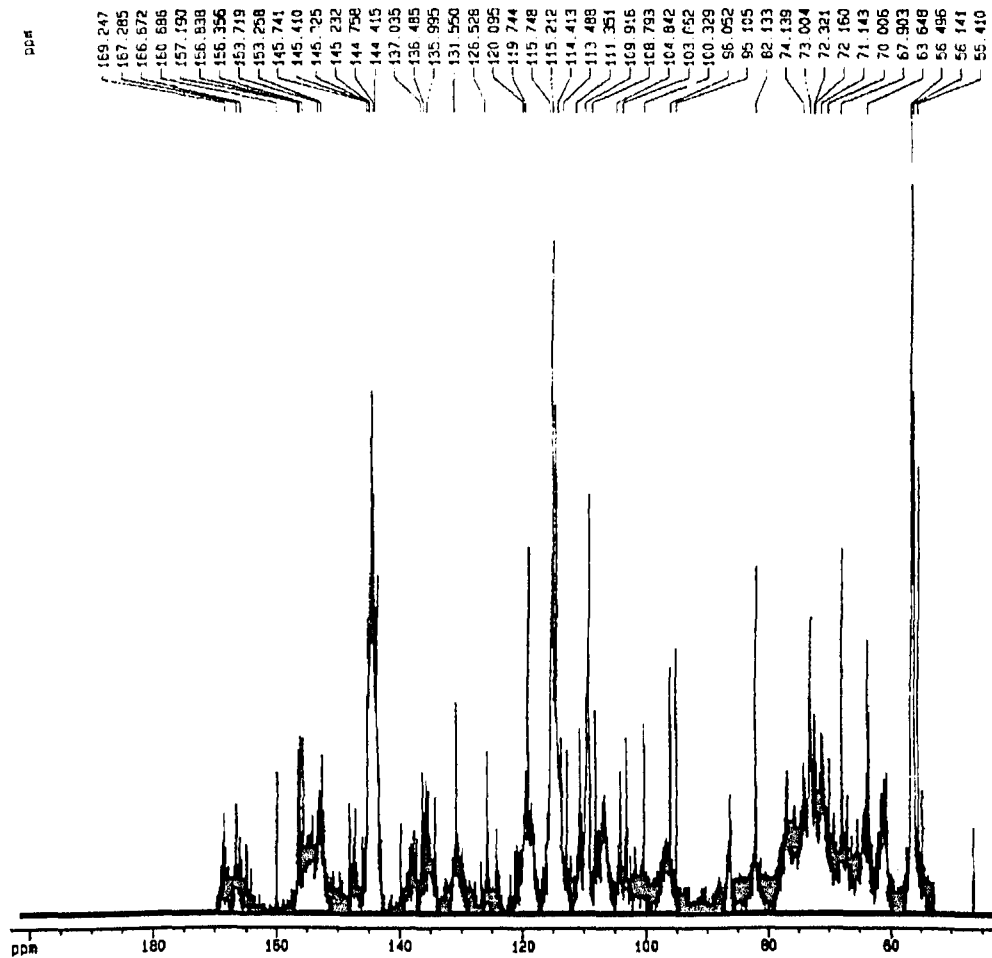


Figura 43 – Espectro de RMN do C-13 do extrato aquoso em acetona/água deuterada do *E. grandis*.

A Figura 44 apresenta o espectro de RMN H-1 do extrato acetona/água do *E. grandis*. Embora a ressonância magnética nuclear de Hidrogênio tenha menor resolução devido ao grande número de hidrogênios não-equivalentes e pequeno intervalo de ressonância, esta técnica é quantitativa, requer pouco tempo de máquina e dá uma visão sintética dos diversos tipos de hidrogênio presentes. Assim, na Figura 44 pode-se observar as três regiões características das proantocianidinas e taninos hidrolisáveis: hidrogênios aromáticos entre δ 7,5-6,5; hidrogênios ligados a carbonos sp^3 oxigenados de açúcares e proantocianidinas entre δ 6,0-3,5 e hidrogênios de carbonos sp^3 não-oxigenados, ligados e terminais e hidrogênios do anel C de proantocianidinas entre δ 5,0-2,5⁶⁷, respectivamente.

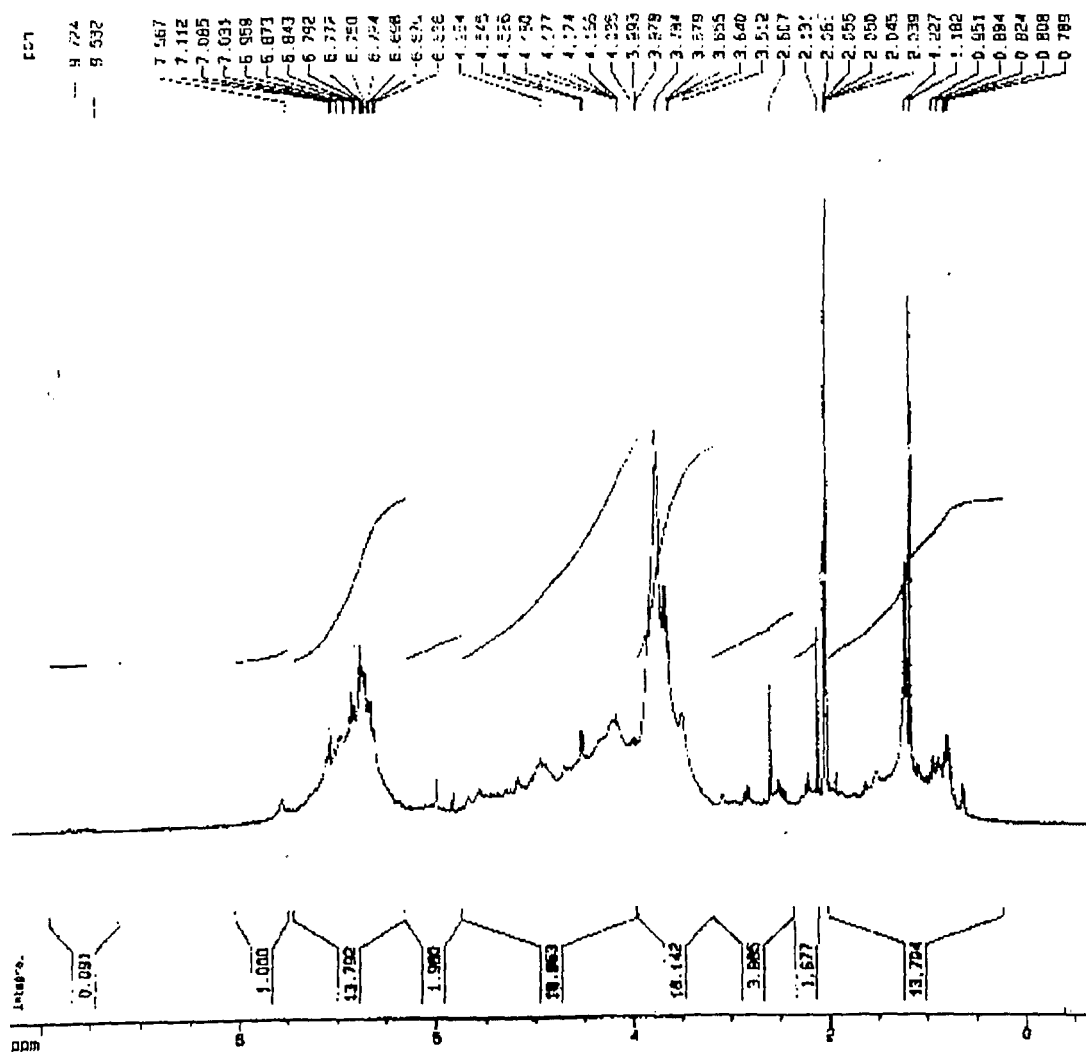


Figura 44 – Espectro de RMN H-1 do extrato aquoso em acetona/água deuterada do *E. grandis*.

Ainda na Figura 44 estão presentes sinais de hidrogênios de carbonos alifáticos

altamente blindados, não característicos de taninos, mas que pertencem a metabólitos que também são extraídos pela mistura acetona/água. Já foram mencionados vários na Tabela 15 mas é bom lembrar que as ceras contaminam a lignina de eucalipto quando ela é extraída com acetona/água⁶⁶.

3.8. CHN

Nas análises de CHN da madeira do *E. grandis* e do *E. urophilla*, obtiveram-se os resultados da Tabela 17:

Tabela 17: Resultados de CHN

	<i>E. grandis</i> (%)	<i>E. urophilla</i> (%)
Carbono	50,29	50,26
Hidrogênio	4,95	5,09
Nitrogênio	0,15	0,19
Oxigênio	44,61	44,46

Pode-se notar por estes dados que as composições das madeiras são muito semelhantes, por se tratarem de amostras da mesma espécie. Uma das limitações reside no fato de a amostra possuir outros elementos químicos que não são C, H e N, que serão quantificados por diferença como sendo o elemento químico Oxigênio. O conteúdo de nitrogênio das madeiras de eucalipto analisadas se encontra em torno do valor de 0,2 %²⁴ encontrado para as madeiras em geral.

Capítulo 4 – Conclusões

A mistura acetona/água possibilitou a obtenção de extratos ricos em compostos fenólicos. A espécie *E. urophilla* apresentou maior quantidade de extrativos do que a espécie *E. grandis*, contudo, essa diferença entre os extratos não pode ser utilizada para a diferenciação entre as espécies, dada a pequena variação existente.

A espectroscopia no ultravioleta permite uma boa avaliação, ainda que indireta, da quantidade de compostos fenólicos existentes nos extratos da madeira de eucalipto.

Os ensaios convencionais mostraram que os valores de fenóis totais e proantocianidinas estão condizentes com os valores encontrados para outras espécies de eucalipto (*camaldulensis*, *globulus* e *rudis*) estudados na Espanha (extraídos com a mistura metanol/água) e o *E. grandis* de 12 anos (extraído com água quente) estudado no Brasil.

As análises espectroscópicas de RMN e IR reforçaram a presença das substâncias identificadas por CLAE e por CG/EM neste trabalho. Os extratos de *E. grandis* e *E. urophilla* forneceram resultados muito parecidos tanto quanto à espectroscopia de RMN e IV, o que leva à conclusão que estas técnicas não podem ser usadas para a diferenciação entre estas duas espécies de eucalipto. As análises por IV e principalmente por RMN permitiram identificar a presença das procianidinas e prodelfinidinas nos dois extratos de madeira, em função das absorções apresentadas por volta de 145 e 110 ppm.

A análise por CG/EM foi a que apresentou melhores resultados quanto à identificação dos constituintes dos extratos, apesar do reduzido número de padrões de flavonóides da biblioteca existente no aparelho. Foram identificados desde compostos fenólicos simples como a hidroquinona e flavonóides como a catequina. Foram ainda identificados álcoois (glicerol), ácidos (benzóico, 4-hidróxi-cinâmico, 2-hidróxi-isovalérico), ácidos graxos (palmítico, esteárico, oléico e pelargônico) e seus ésteres, e açúcares (ribitol e arabinose).

Foram identificados por CLAE os ácidos gálico, elágico, siríngico, catequina, flavona, derivados do ácido cinâmico, várias proantocianidinas, além dos galotaninos e elagitaninos.

O que nos chama a atenção é que os compostos só podem ser analisados por CG/EM com o aparelho em condições consideradas ótimas. Além de o aparelho estar devidamente calibrado e com boa sensibilidade (baixa razão sinal/ruído), os extratos de madeira devem ser preferencialmente pré-separados em uma coluna de sephadex ou sílica.

Nada impede a análise direta dos extratos de madeira, mas corre-se o risco de se obter poucos resultados. Além disto, alguns compostos fenólicos ficam ligados definitivamente às colunas, o que leva à subestimação⁴⁶. Ainda assim, o uso de colunas de pré-separação das amostras melhorou a resolução dos picos, facilitando a separação e identificação dos compostos existentes nas amostras.

A análise por CLAE evidenciou a presença dos ácidos gálico e elágico assim como de seus derivados (galotaninos e elagitaninos). Foram ainda identificados a vanilina, o ácido siríngico e o seringaldeído e proantocianidinas. A cianidina, delphinidina e outras antocianidinas foram identificadas nos extratos das duas madeiras estudadas após hidrólise com butanol/ácido clorídrico.

A análise por CLAE depende de detectores cada vez mais sensíveis e o detector de matriz de diodos (diode-array) é um requisito mínimo imprescindível para a análise dos compostos fenólicos em geral.

Os compostos de cadeia polimérica que não podem ser analisados por CG/EM (que tem como limitação natural o tamanho da cadeia a ser analisada) devem ser preferencialmente analisados por CLAE, e os voláteis e volatilizáveis por derivatização por CG/EM. Nada seria possível sem a existência conjunta de uma biblioteca confiável de padrões para a identificação dos compostos fenólicos, tanto para a CLAE quanto para a CG/EM.

Não foi possível a diferenciação entre os extratos de madeira das espécies *grandis* e *urophilla* através de ensaios espectrofotométricos convencionais, mas os métodos cromatográficos (como CLAE e CG/EM) permitiram a diferenciação entre os extratos das duas espécies de eucalipto. Por CLAE, os cromatogramas dos extratos L2 das duas espécies de eucalipto possuem perfis muito diferentes e por CG/EM a quantidade de compostos encontrados na espécie *urophilla* foi muito maior que a encontrada na espécie *grandis*, para extratos obtidos a partir da mistura acetona/água.

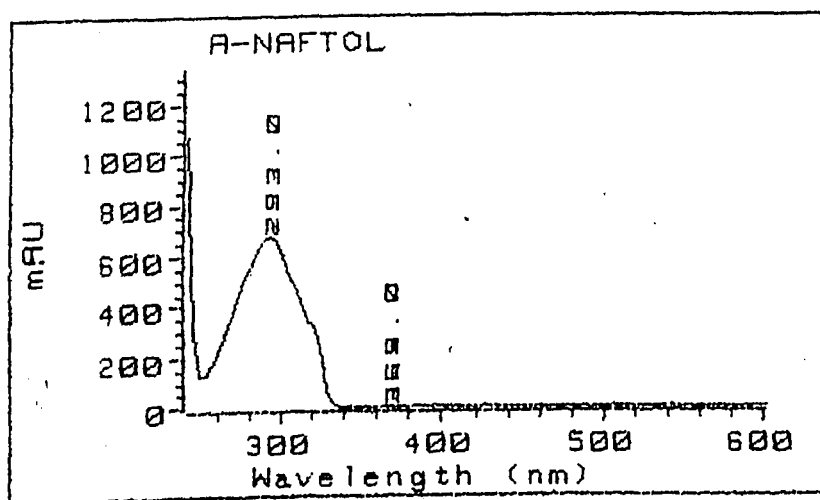
A falta de padrões para a criação de uma biblioteca de fragmentos de massa ou mesmo para a injeção e comparação como padrão externo são fatores que limitam o estudo dos compostos fenólicos. Infelizmente é impossível se ter todos os padrões de compostos que são descobertos, mas o aprimoramento das bibliotecas e a troca de informações com outros centros de pesquisa podem suprir esta deficiência.

Os Apêndices A (p. 67) e B (p.88) podem ser usados como referência, ao serem comparados com dados obtidos com a mesma metodologia e em equipamentos semelhantes. O tipo de coluna, a existência ou ausência de forno para coluna e os eluentes utilizados devem seguir a metodologia descrita, a fim de minimizar as diferenças entre os tempos de retenção.

Capítulo 5 – Apêndices

Apêndice A

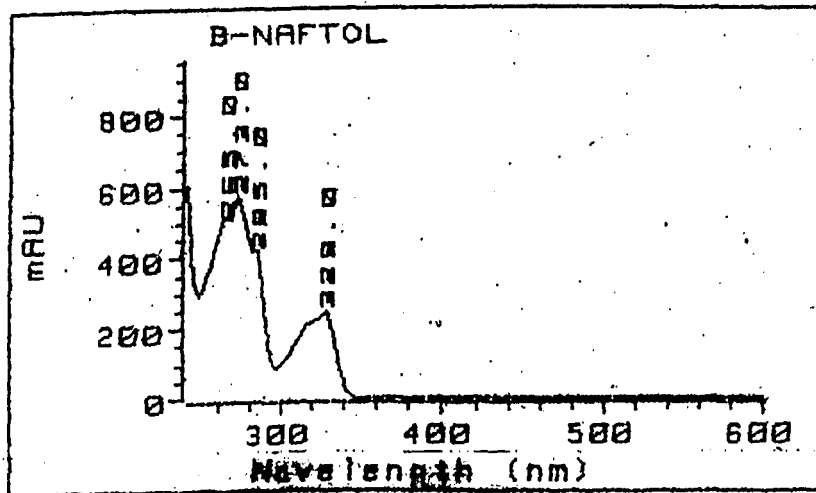
Espectros no UV/Vis e tempos de retenção de alguns compostos fenólicos e aromáticos obtidos por CLAE (p. 33) nas condições dadas pela Tabela 5, p. 34.



Entry : 82
Time : 21.298
ID * : 0

Comp. ID :

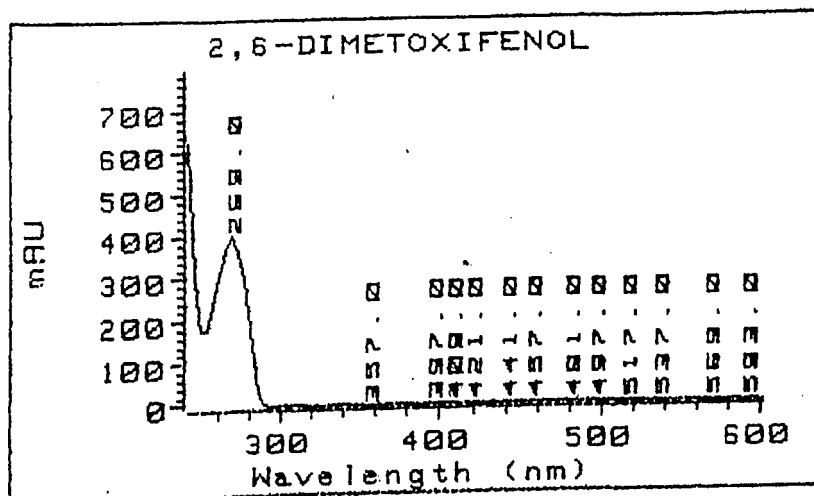
Info :



Entry : 83
Time : 20.473
ID * : 0

Comp. ID :

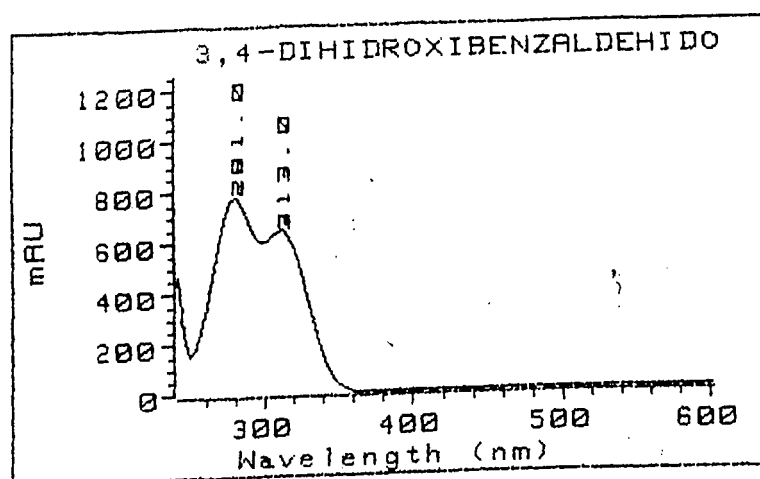
Info :



Entry : 66
Time : 13.149
ID # : 0

Comp. ID :

Info :



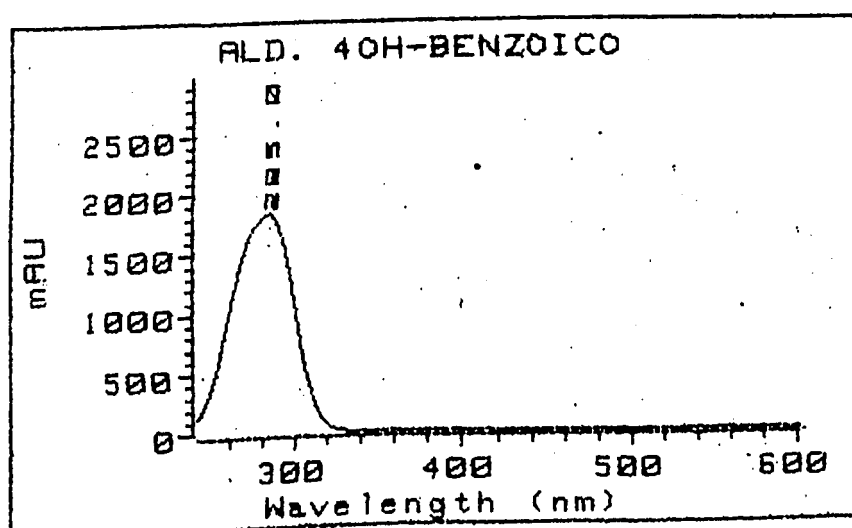
Entry : 49
Time : 8.374
ID # : 0

Comp. ID :

CARMEN GOMEZ CORDOBES

Info :

27-1-93



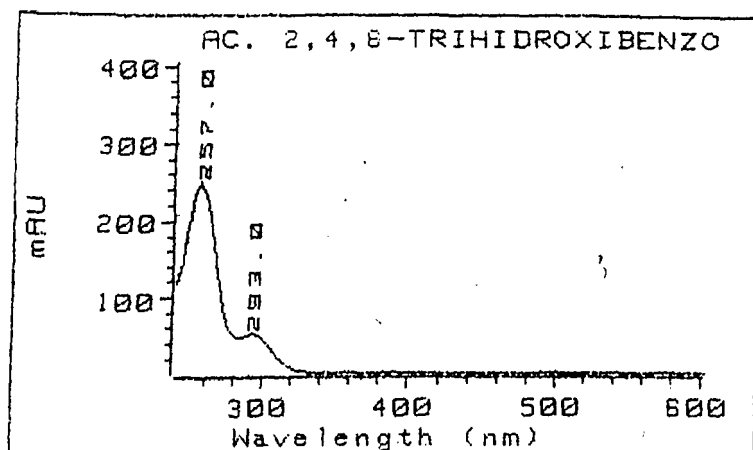
Entry : 70
Time : 9.187
ID # : 0

Comp. ID :

IFI

Info :

5 MAYO 94



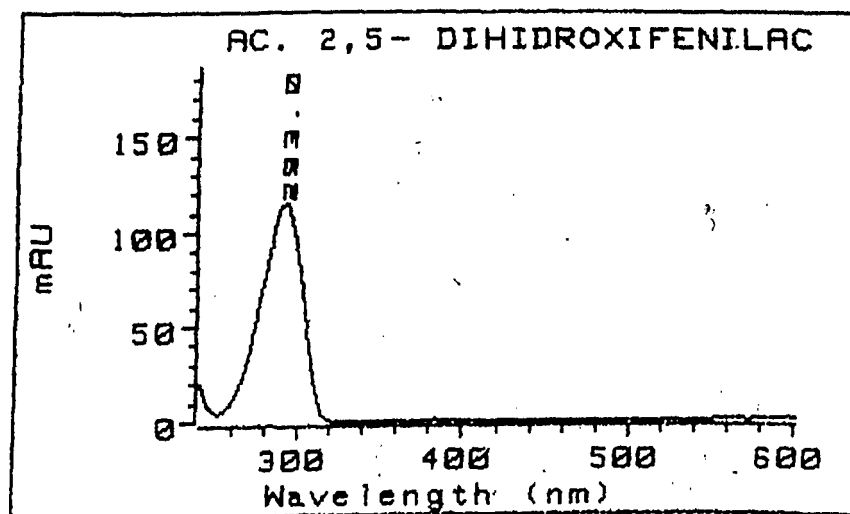
Entry : 53
Time : 2.424
ID # : 0

Comp. ID :

ALDRICH

Info :

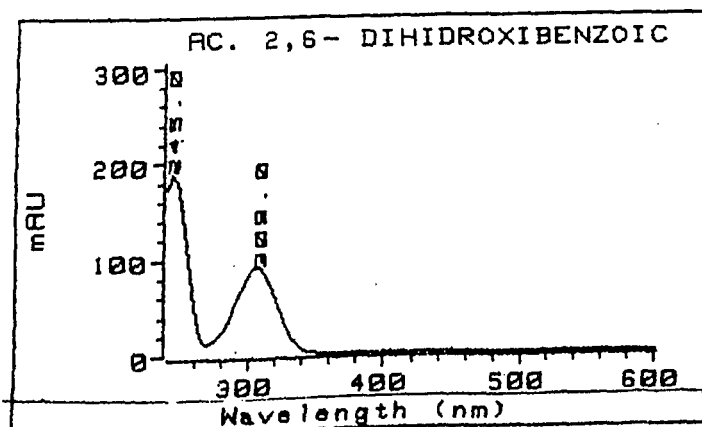
PRIMERO DE TRES PICOS



Entry : 3
Time : 3.937
ID # : 0

Comp. ID :

Info :

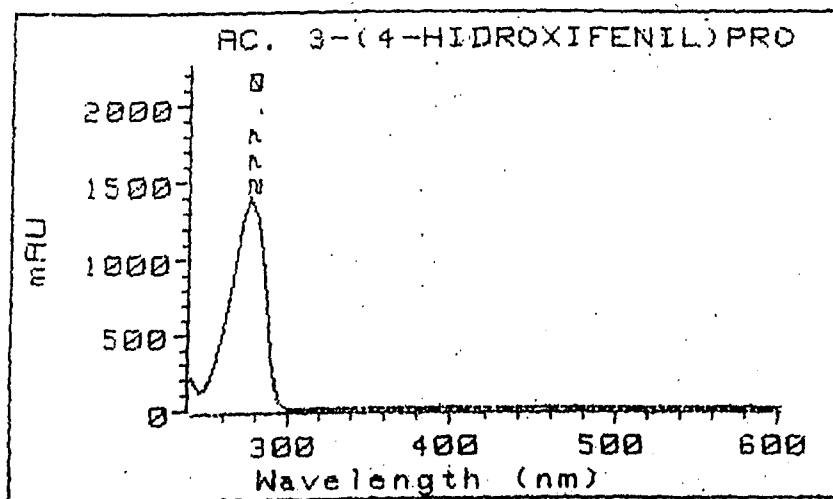


Entry : 2
Time : 4.740
ID # : 0

Comp. ID :

PRIMERO DE DOS PICOS (TR=5

Info :



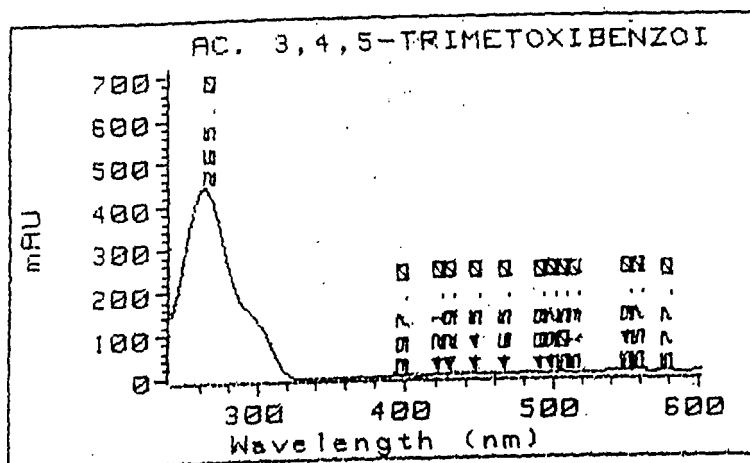
Entry : 77
Time : 10.045
ID # : 0

Comp. ID :

ALDRICH

Info :

9-95



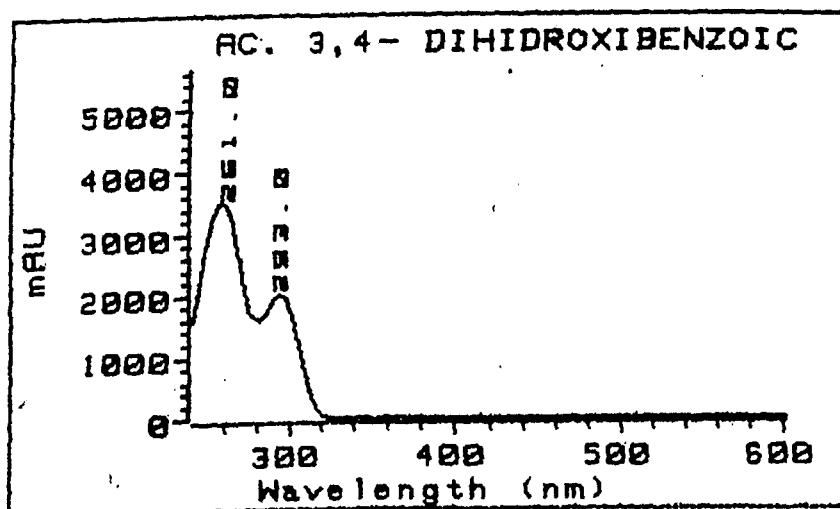
Entry : 50
Time : 15.910
ID # : 0

Comp. ID :

CARMEN GOMEZ CORDOBA

Info :

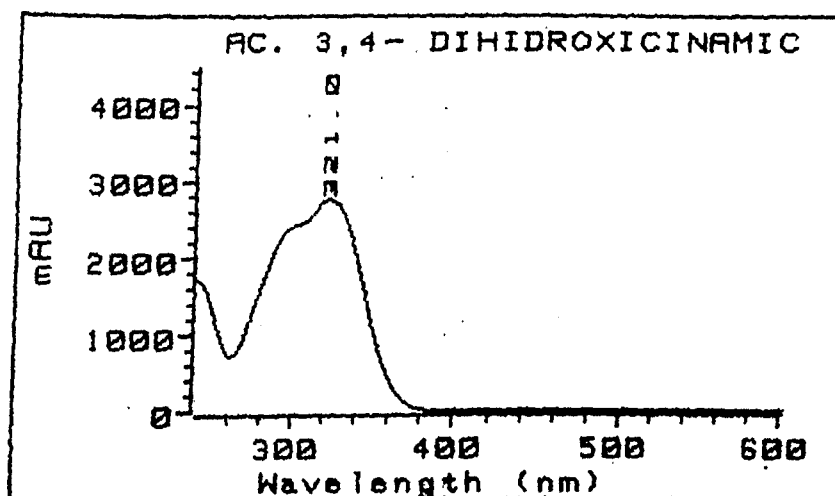
27-1-93



Entry : 5
Time : 5.296
ID # : 0

Comp. ID :

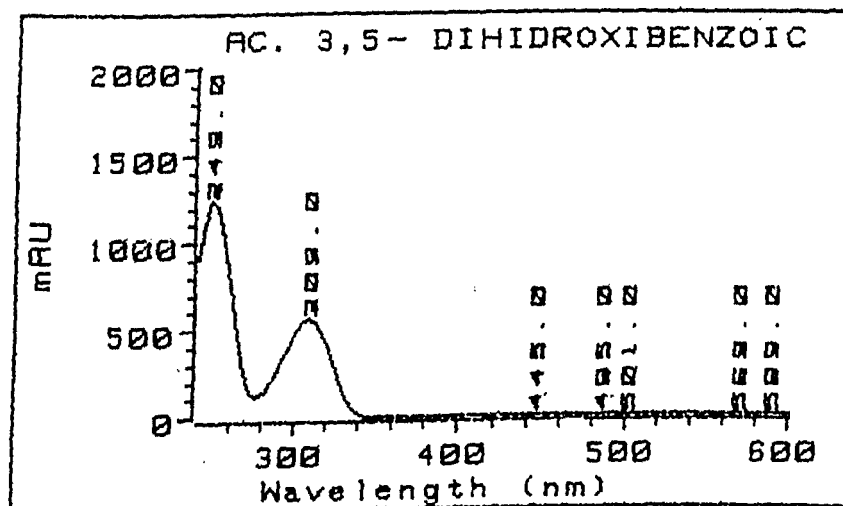
Info :



Entry : 4
Time : 8.133
ID # : 0

Comp. ID :

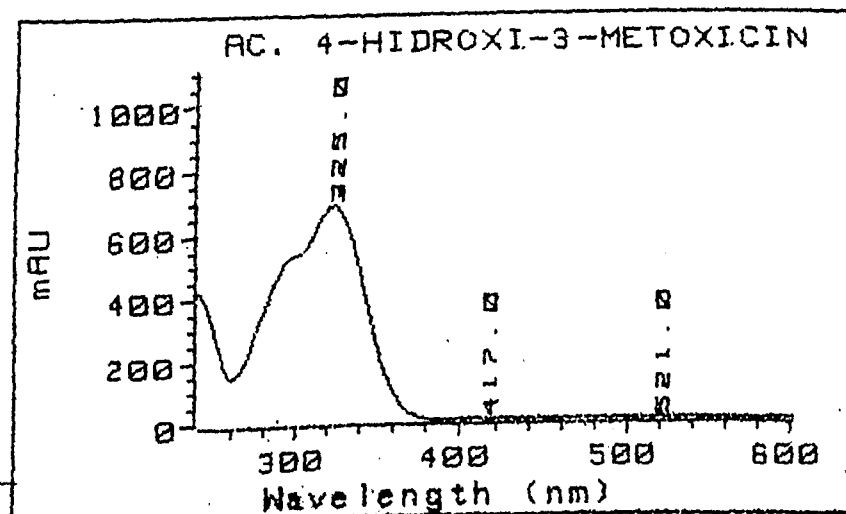
Info :



Entry : 1
Time : 2.364
ID # : 0

Comp. ID :

Info :



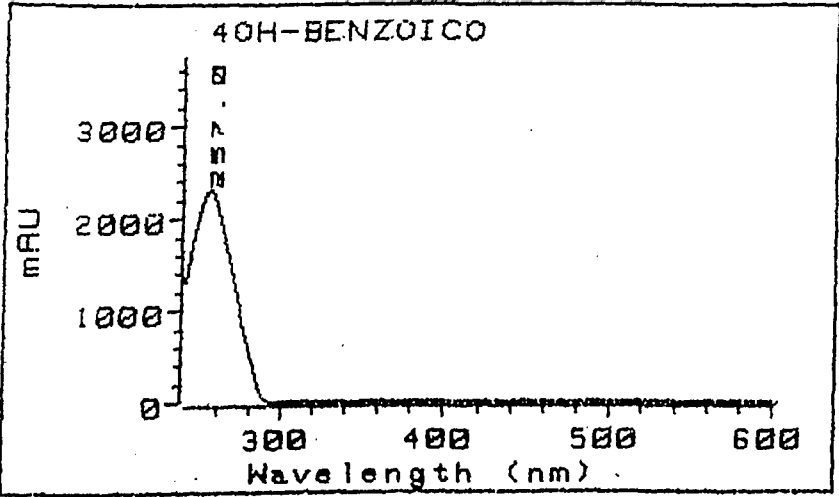
Entry : 52
Time : 12.652
ID # : 0

Comp. ID :

ALDRICH

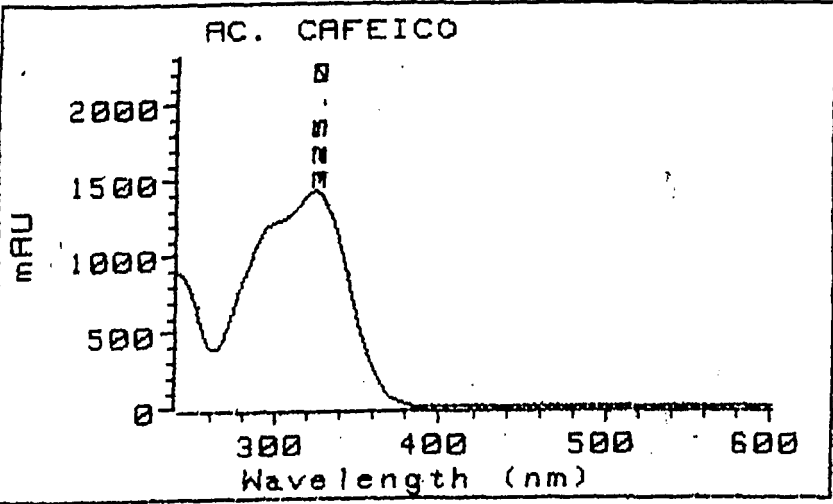
Info :

1-2-93



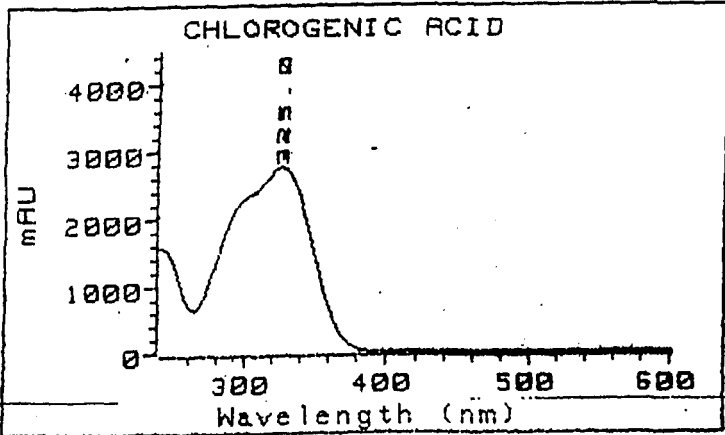
Entry : 67
Time : 8.320
ID # : 0

Comp. ID :
IFI
Info :



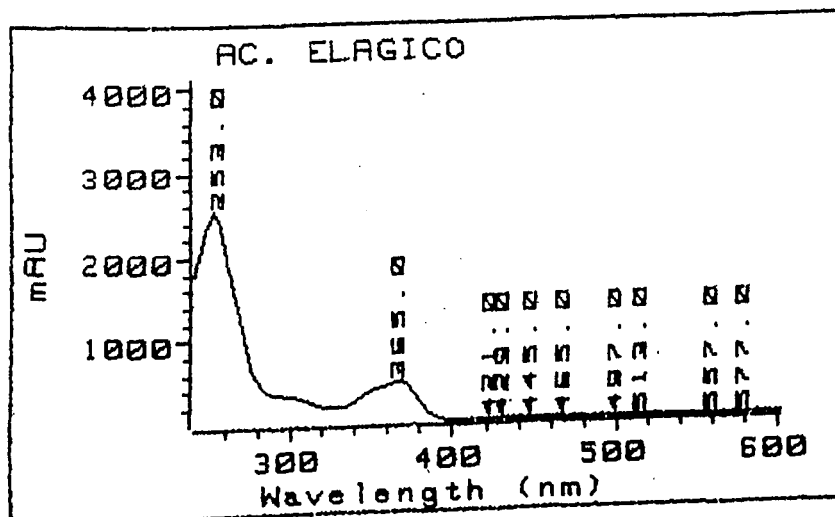
Entry : 11
Time : 9.072
ID # : 0

Comp. ID :
Info :



Entry : 48
Time : 8.943
ID # : 0

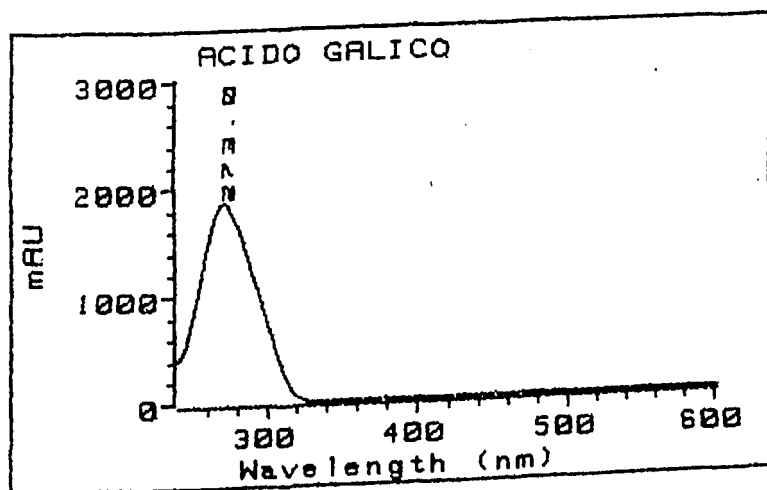
Comp. ID :
FLUKA
Info :
3 PICOS. TR DEL MAS ALTO



Entry : 12
Time : 16.228
ID # : 0

Comp. ID :

Info :

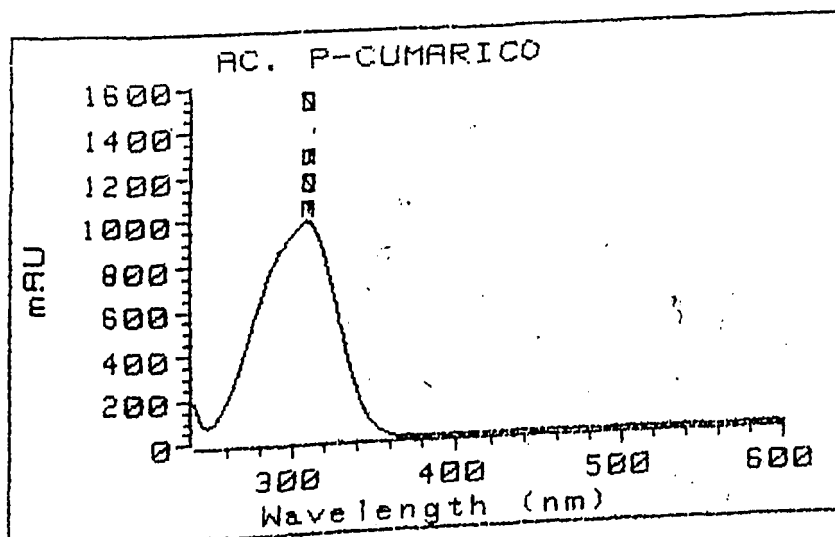


Entry : 13
Time : 3.427
ID # : 0

Comp. ID :

SEGUNDO DE DOS PICOS

Info :



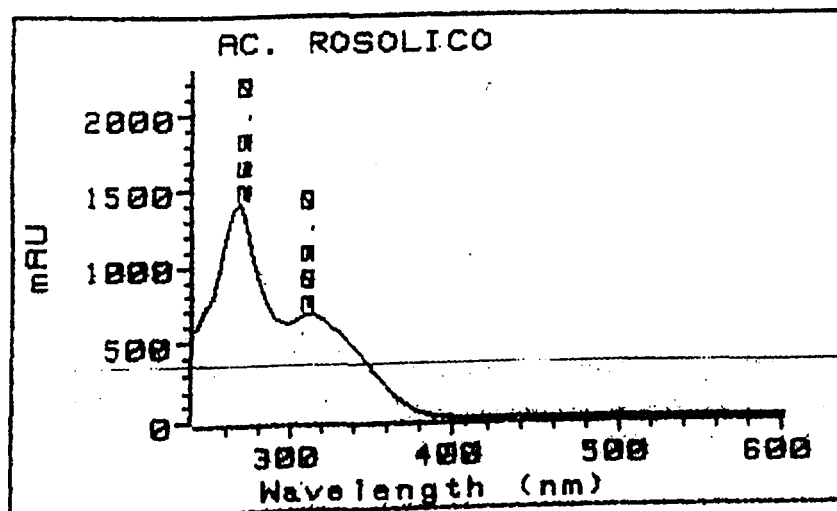
Entry : 76
Time : 12.943
ID # : 0

Comp. ID :

FLUKA

Info :

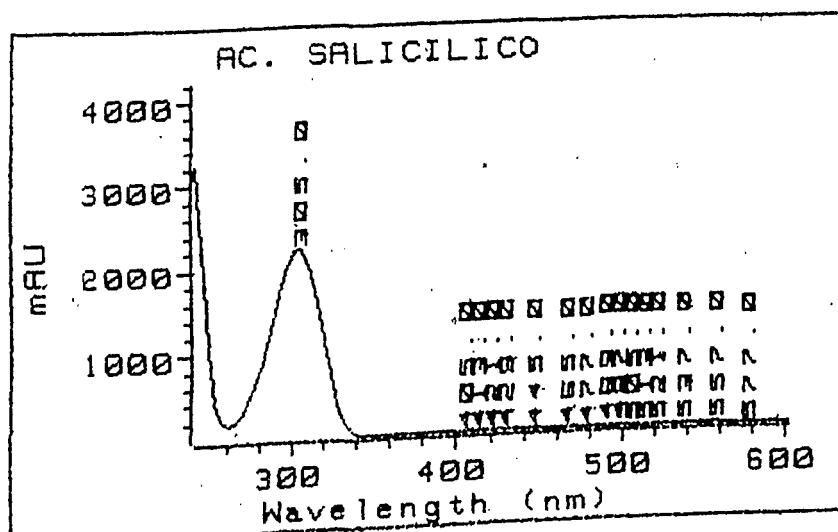
9-95



Entry : 6
Time : 33.311
ID # : 0

Comp. ID :

Info :



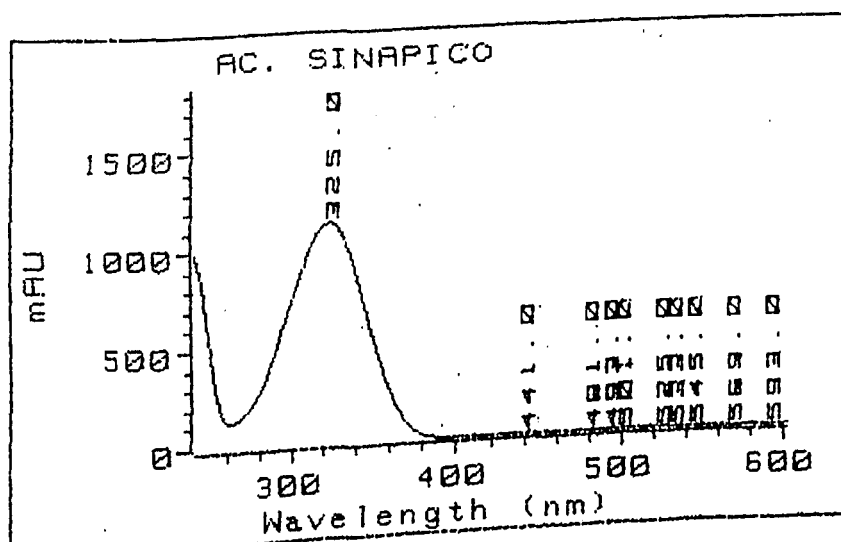
Entry : 51
Time : 13.384
ID # : 0

Comp. ID :

MAY AND BAKER

Info :

1-2-93

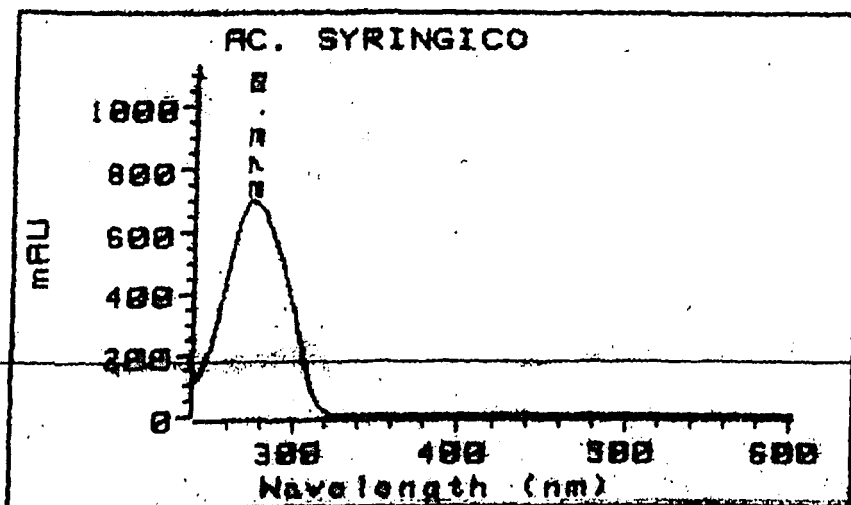


Entry : 62
Time : 14.075
ID # : 0

Comp. ID :

14-3-94

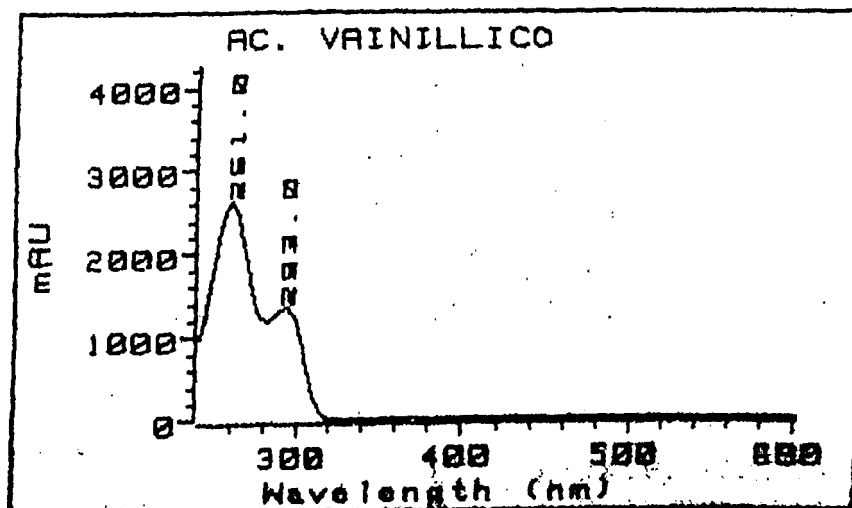
Info :



Entry : 10
Time : 8.647
ID # : 0

Comp. ID :

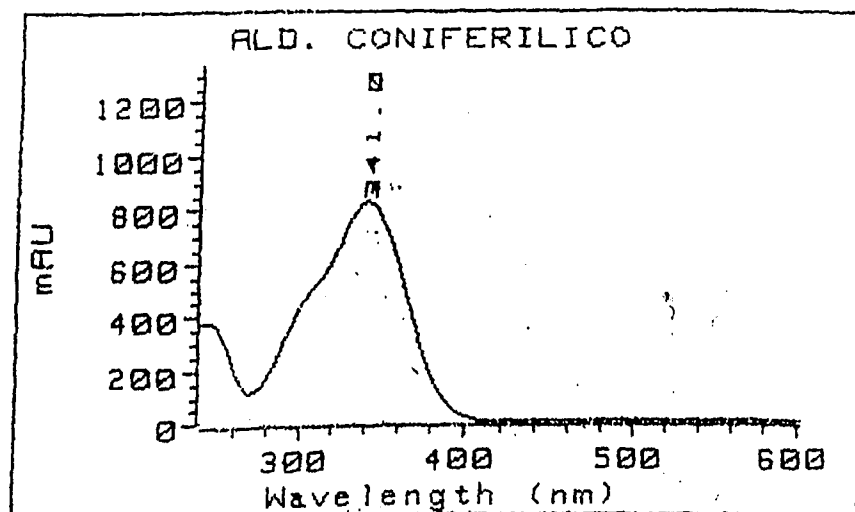
Info :



Entry : 8
Time : 8.614
ID # : 0

Comp. ID :

Info :



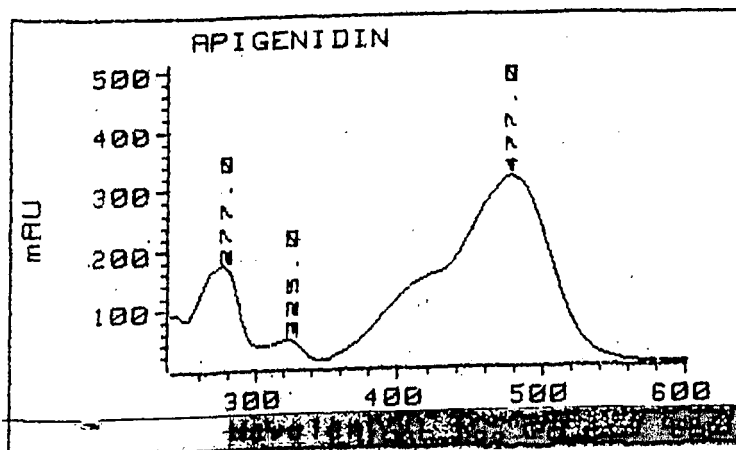
Entry : 68
Time : 14.699
ID # : 0

Comp. ID :

IFI

Info :

5 MAYO 94



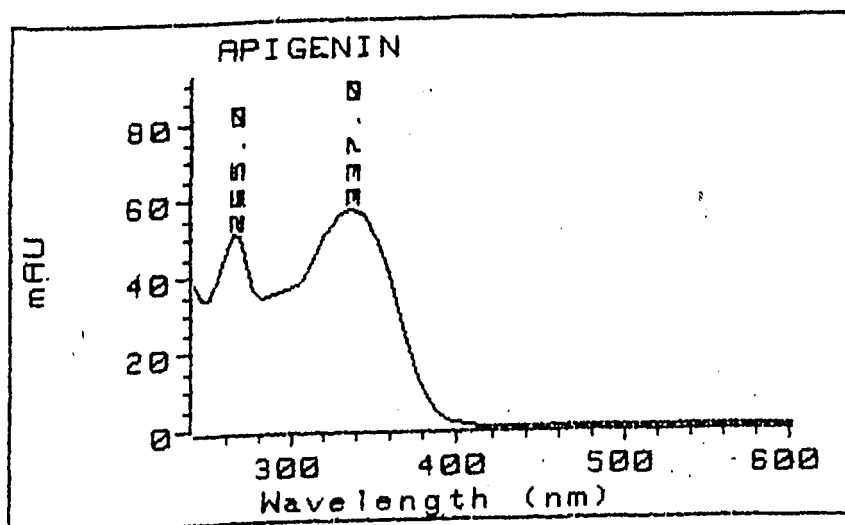
Entry : 87
Time : 27.858
ID # : 0

Comp. ID :

2-96

Info :

COLUMNA NUEVA. MET-HCL

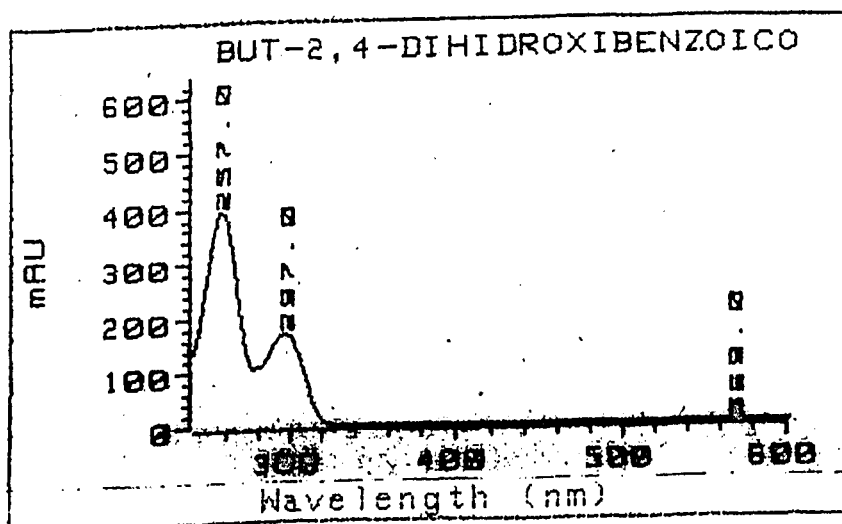


Entry : 19
Time : 23.908
ID # : 0

Comp. ID :

SIGMA A3145

Info :



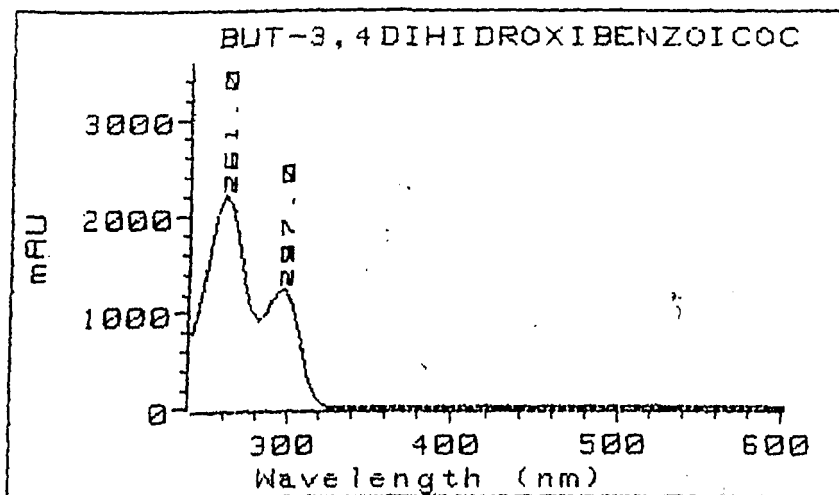
Entry : 56
Time : 29.106
ID # : 0

Comp. ID :

LAB

Info :

OCTUBRE 1993



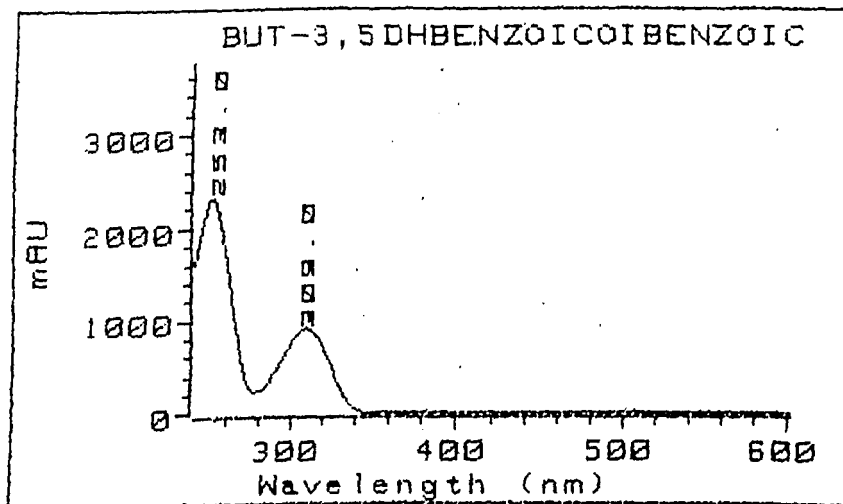
Entry : 57
Time : 23.407
ID # : 0

Comp. ID :

LAB

Info :

OCTUBRE 1993



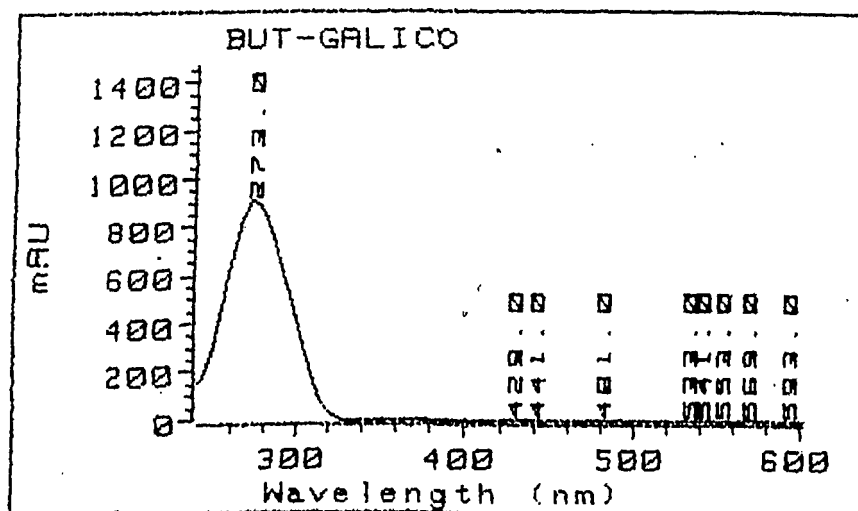
Entry : 58
Time : 21.757
ID # : 0

Comp. ID :

LAB

Info :

OCTUBRE 1993



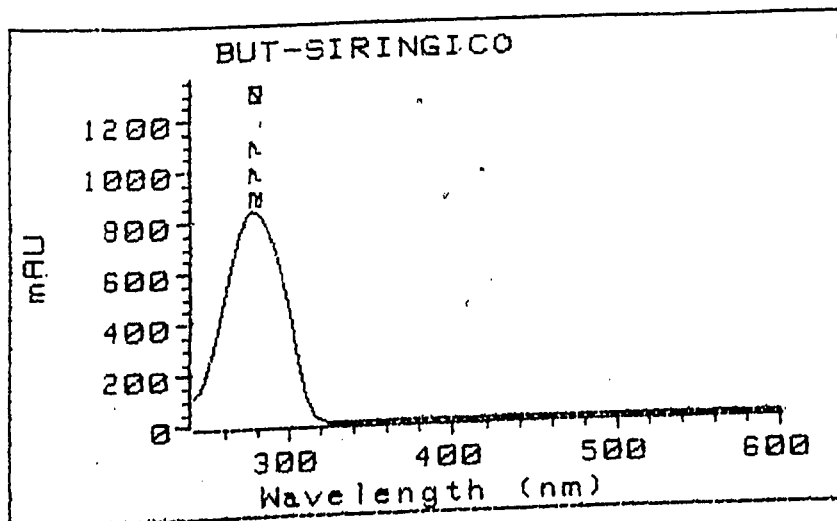
Entry : 55
Time : 17.581
ID # : 0

Comp. ID :

LAB

Info :

OCTUBRE 1993



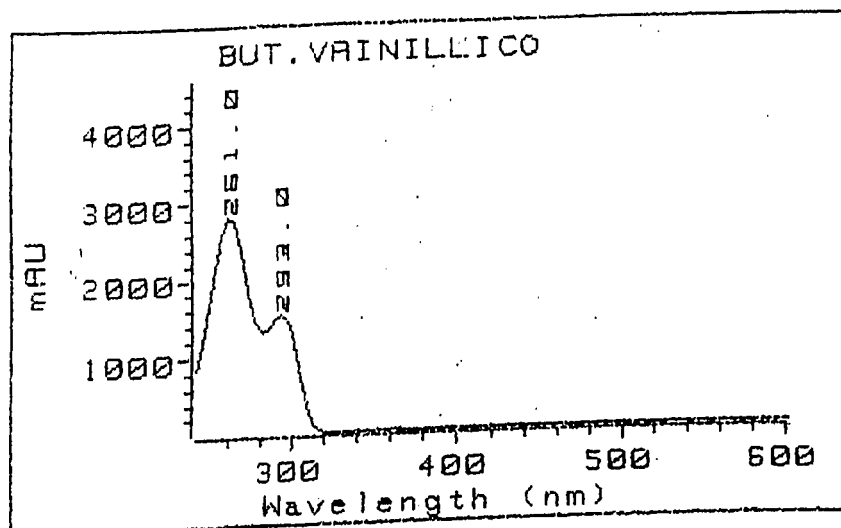
Entry : 59
Time : 26.839
ID # : 0

Comp. ID :

LAB

Info :

OCTUBRE 1993

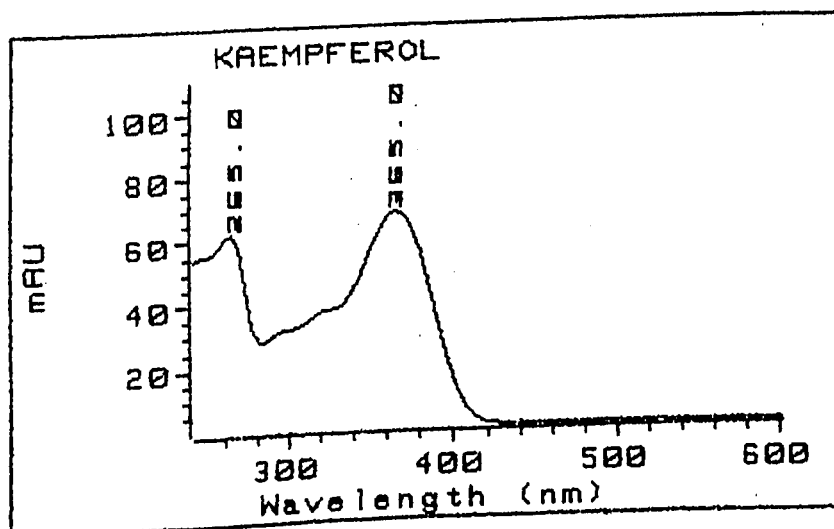


Entry : 54
Time : 27.070
ID # : 0

Comp. ID :

Info :

OCTUBRE 1993



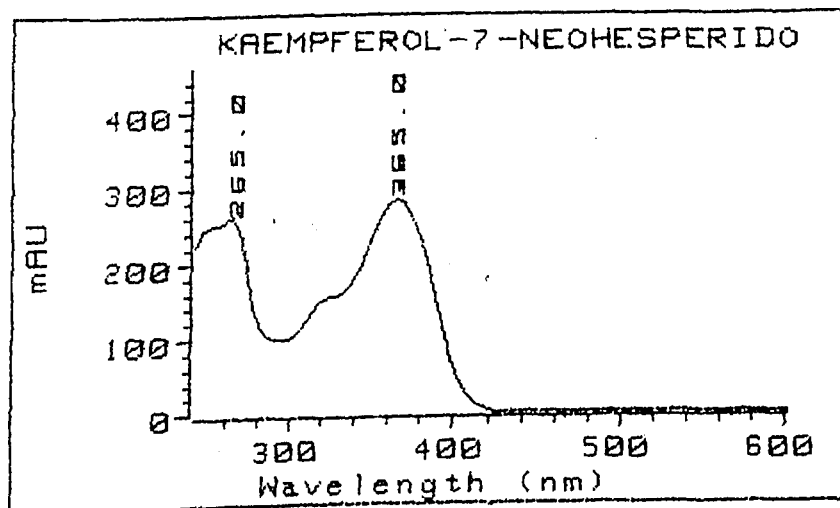
Entry : 16
Time : 23.334
ID # : 0

Comp. ID :

SIGMA K0125

Info :

1:20

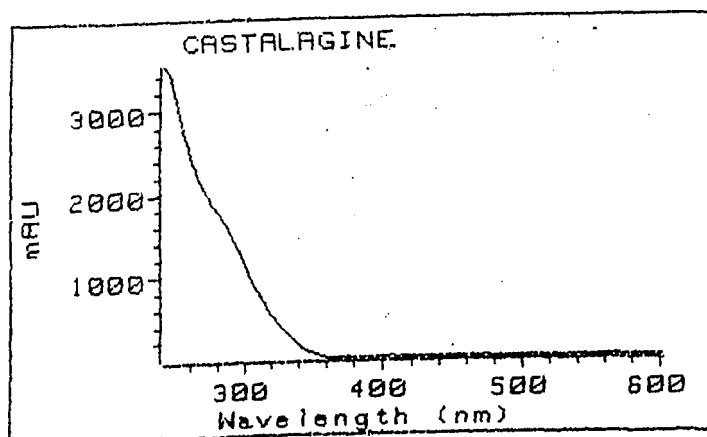


Entry : 35
Time : 16.326
ID # : 0

Comp. ID :

ROTH

Info :



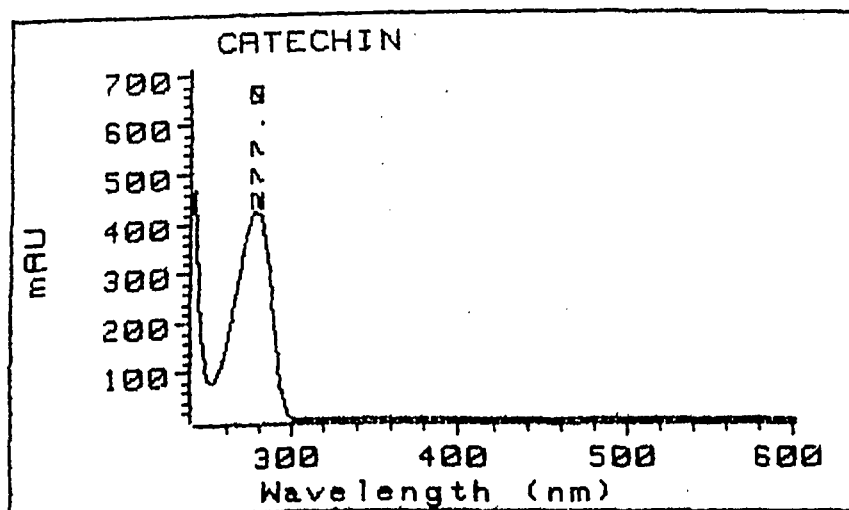
Entry : 89
Time : 21.657
ID # : 0

Comp. ID :

SCALBERT

Info :

GRAD. SCAL. 2-96. COLUMN A

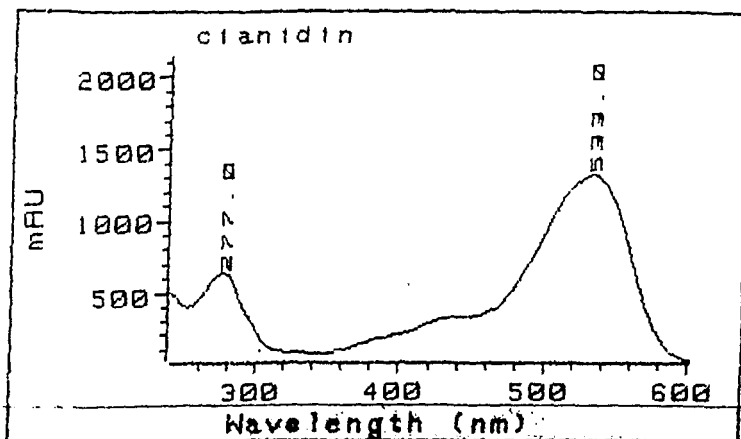


Entry : 20
Time : 4.222
ID # : 0

Comp. ID :

SIGMA C1788

Info :



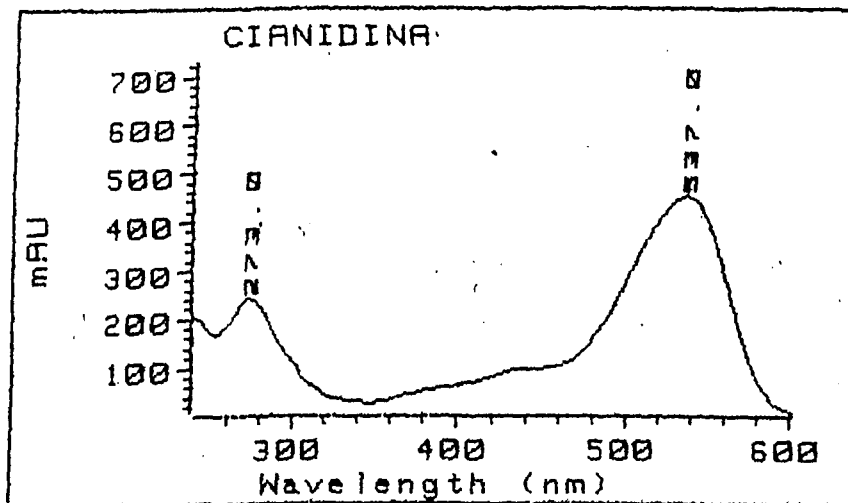
Entry : 36
Time : 24.075
ID # : 0

Comp. ID :

2-96

Info :

COLUMNA NUEVA. MET-HCL



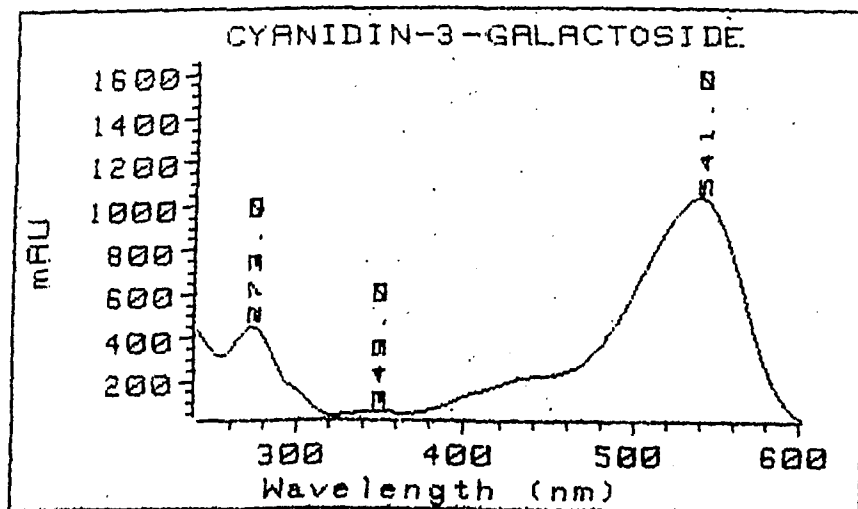
Entry : 39
Time : 33.127
ID # : 0

Comp. ID :

APIN

Info :

OCTUBRE 1993

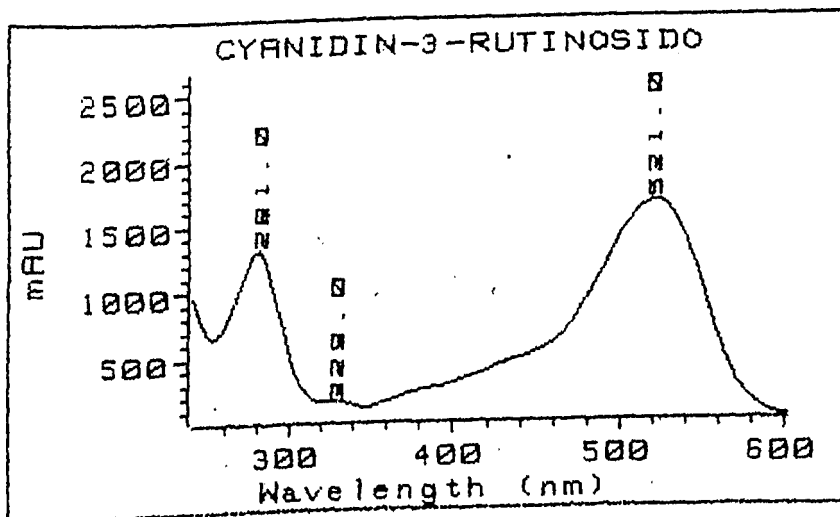


Entry : 38
Time : 22.243
ID # : 0

Comp. ID :

APIN N0147C

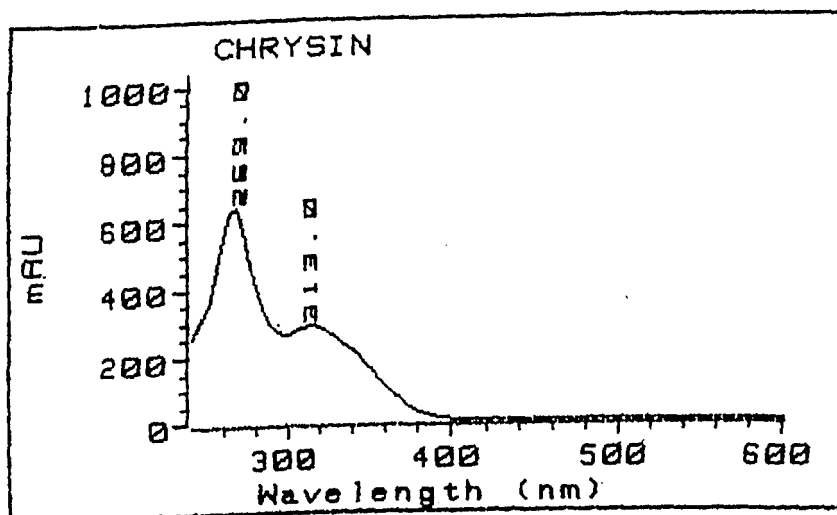
Info :



Entry : 43
Time : 15.255
ID # : 0

Comp. ID :
APIN N0149C

Info :

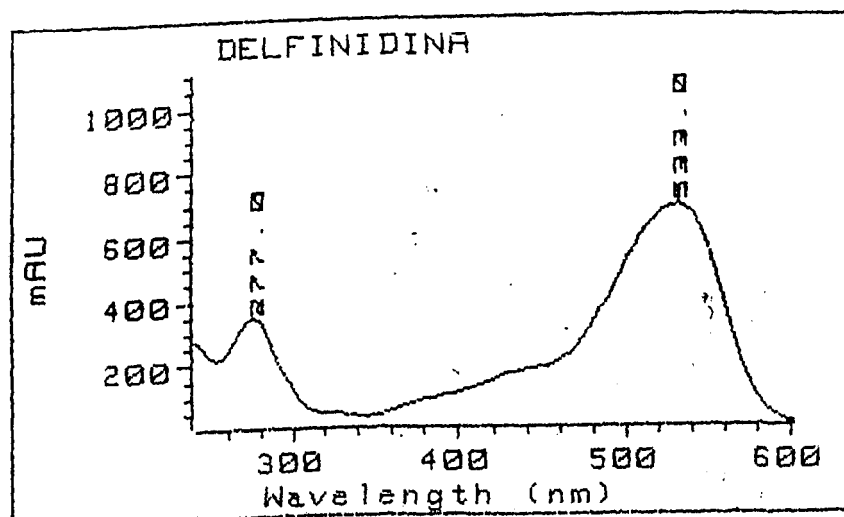


Entry : 18
Time : 28.447
ID # : 0

Comp. ID :
SIGMA C3018

Info :

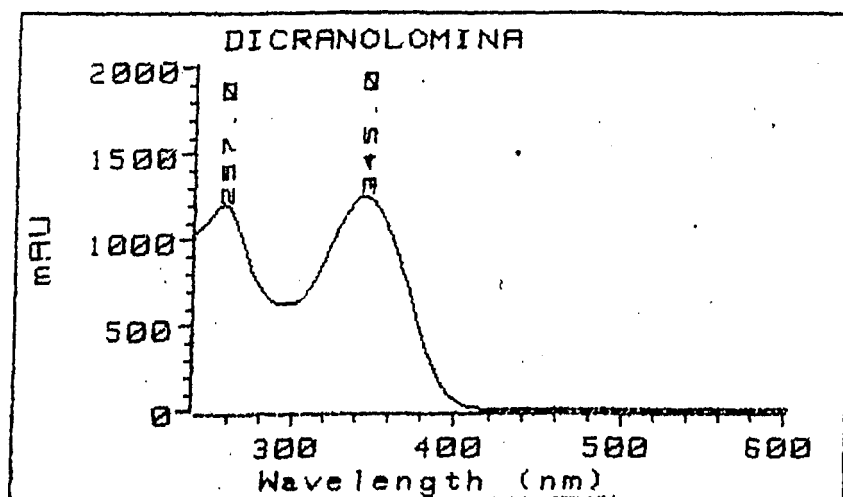
1:20



Entry : 41
Time : 27.483
ID # : 0

Comp. ID :

Info :

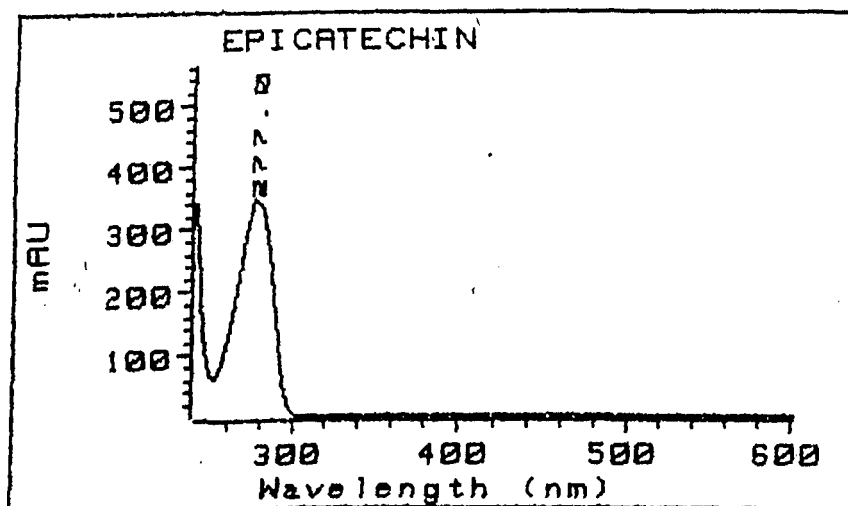


Entry : 74
Time : 21.847
ID # : 0

Comp. ID :

Info :

ANTONIO

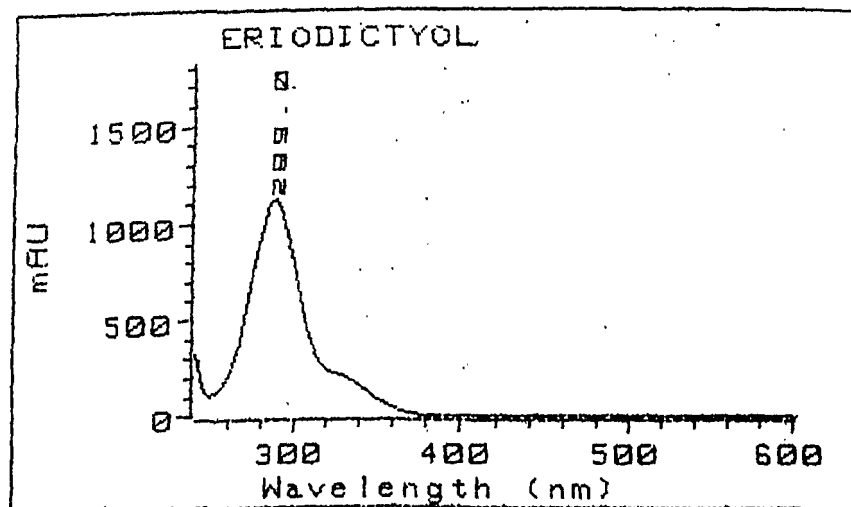


Entry : 21
Time : 7.550
ID # : 0

Comp. ID :

SIGMA E1753

Info :

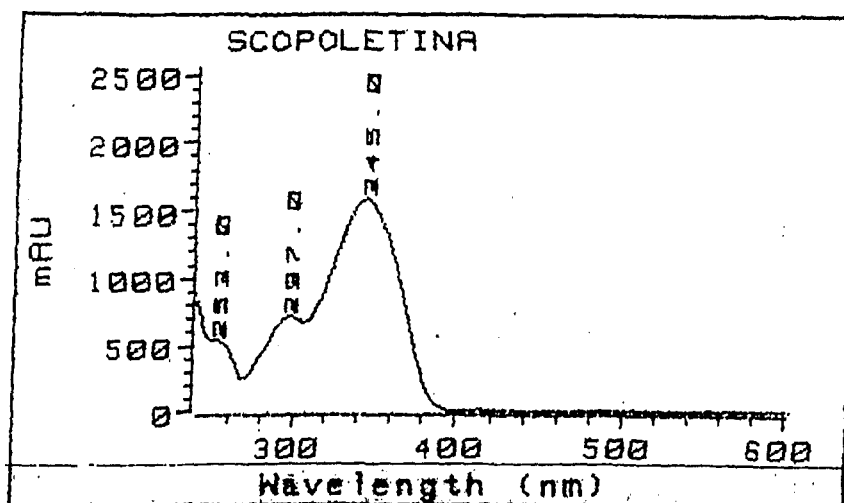


Entry : 46
Time : 17.644
ID # : 0

Comp. ID :

ROTH

Info :



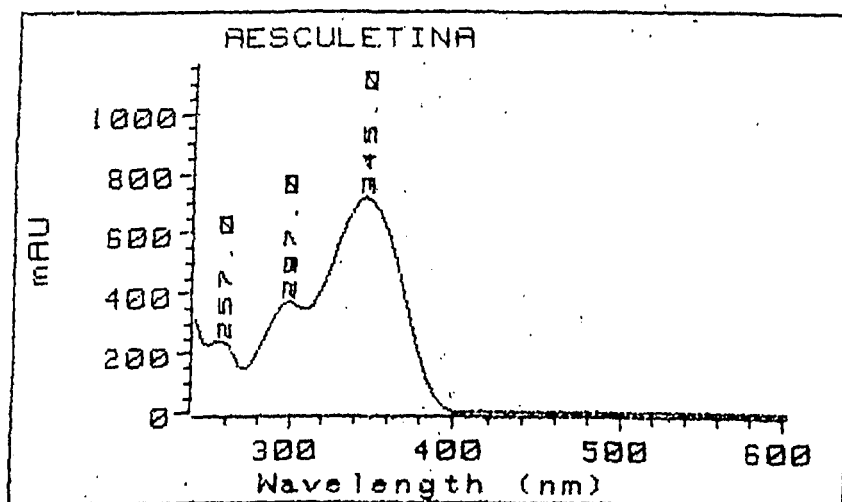
Entry : 71
Time : 13.549
ID # : 0

Comp. ID :

IFI

Info :

5 MAYO 94



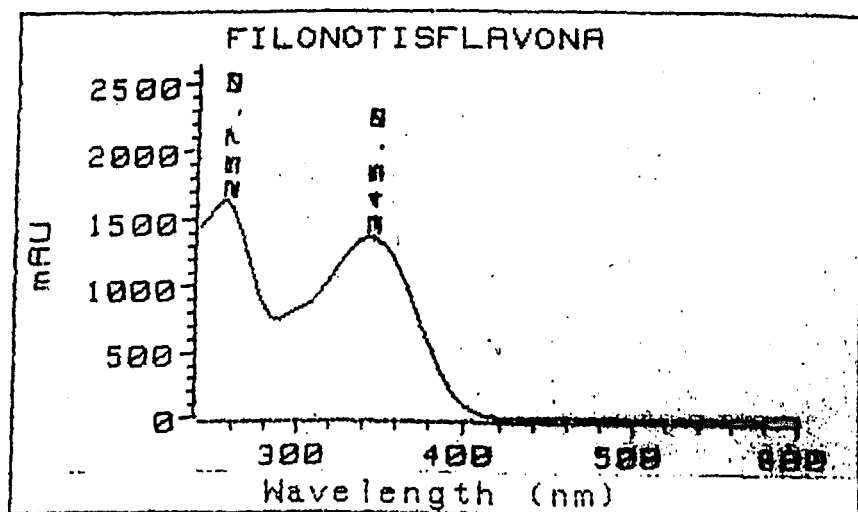
Entry : 69
Time : 9.139
ID # : 0

Comp. ID :

IFI

Info :

5 MAYO 94

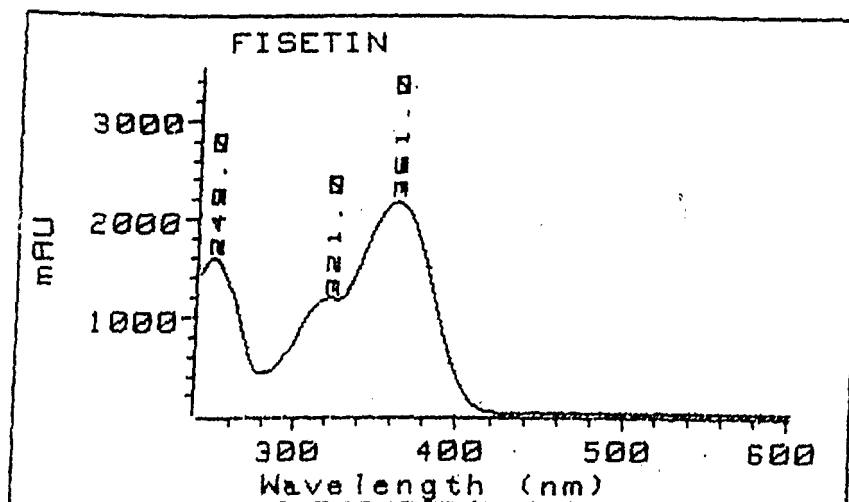


Entry : 75
Time : 21.677
ID # : 0

Comp. ID :

Info :

ANTONIO

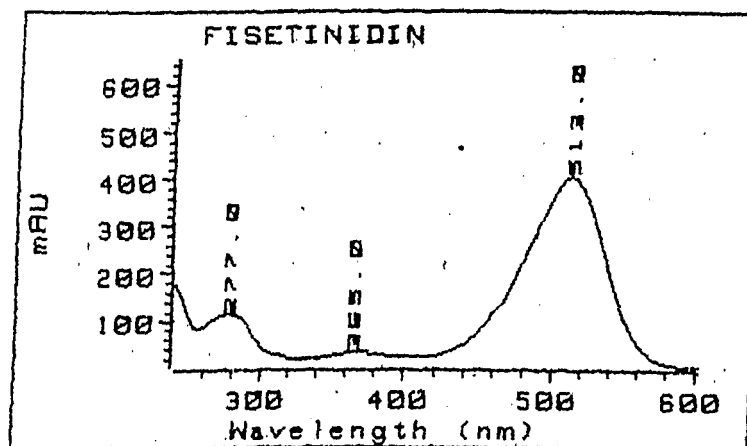


Entry : 15
Time : 17.891
ID # : 0

Comp. ID :
ALDRICH F50-5

Info :

1:5

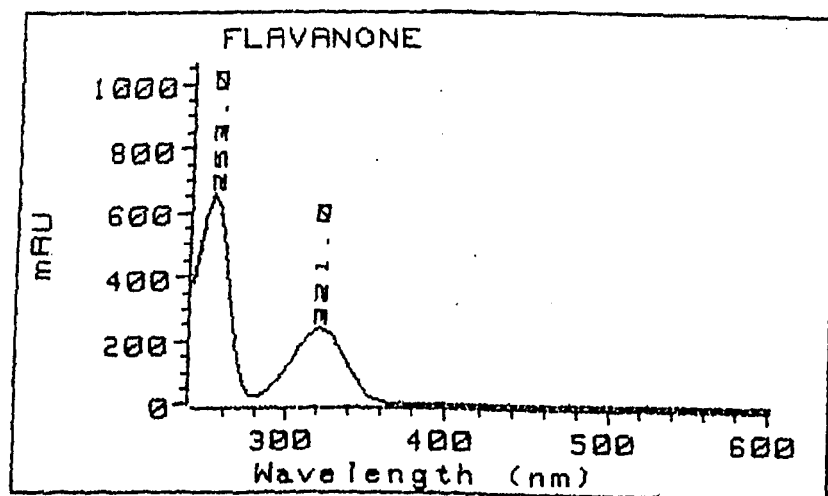


Entry : 86
Time : 23.315
ID # : 0

Comp. ID :
2-96

Info :

COLUMNA NUEVA. MET-HCL

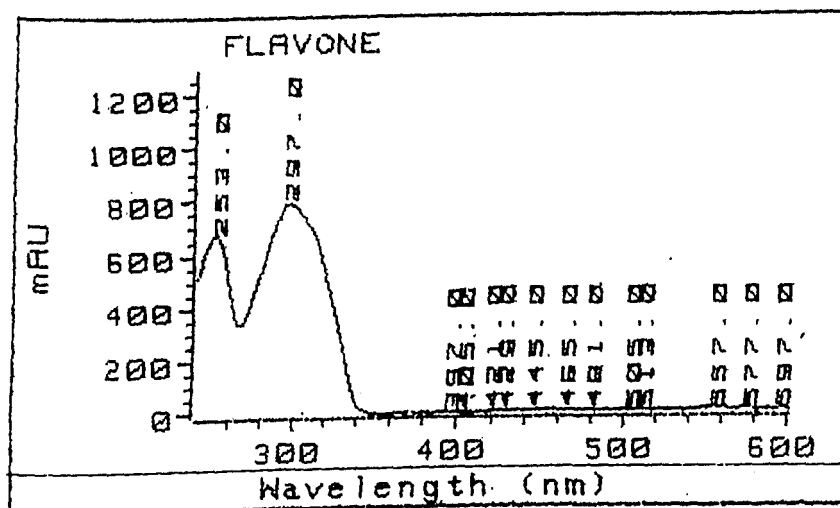


Entry : 24
Time : 29.218
ID # : 0

Comp. ID :
ALDRICH 10.203-2

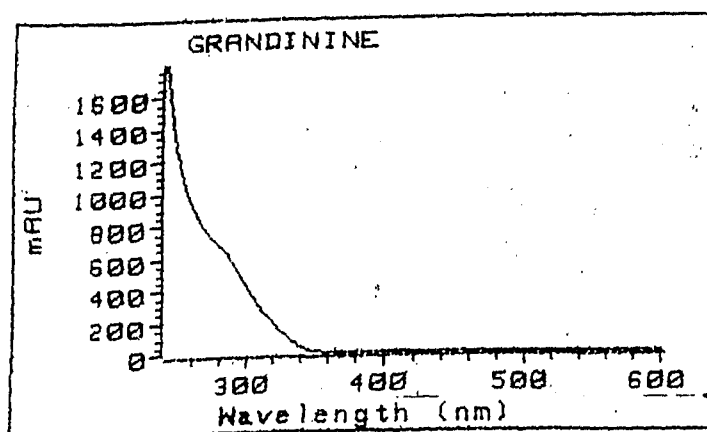
Info :

1:20



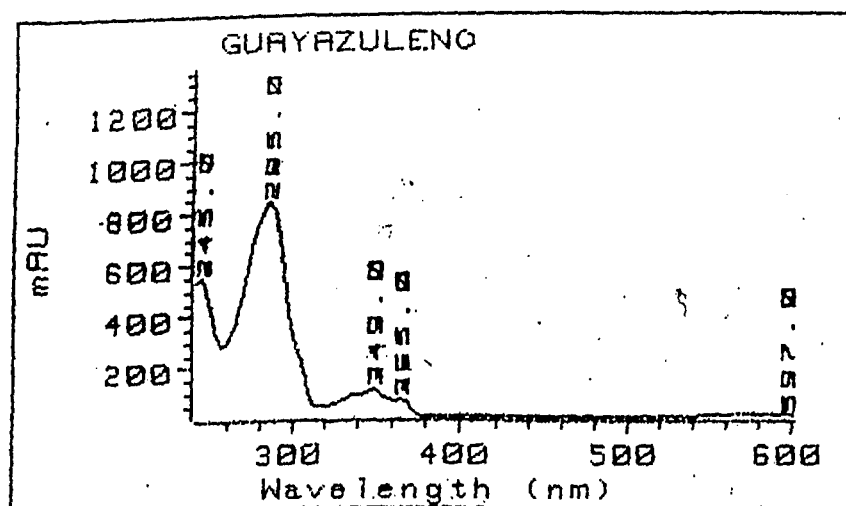
Entry : 44
Time : 29.123
ID # : 0

Comp. ID :
SIGMA F2003
Info :



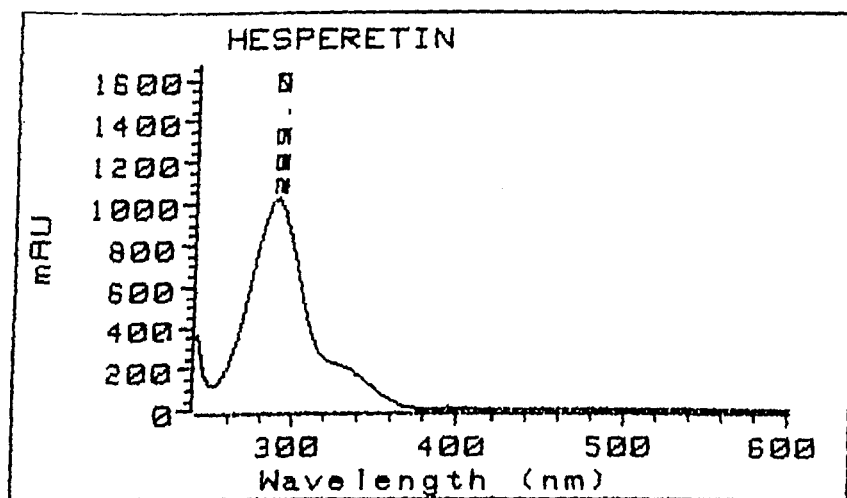
Entry : 91
Time : 13.693
ID # : 0

Comp. ID :
SCALBERT
Info :
GRAD. SCAL. 2-96. COLUMNNA



Entry : 80
Time : 37.941
ID # : 0

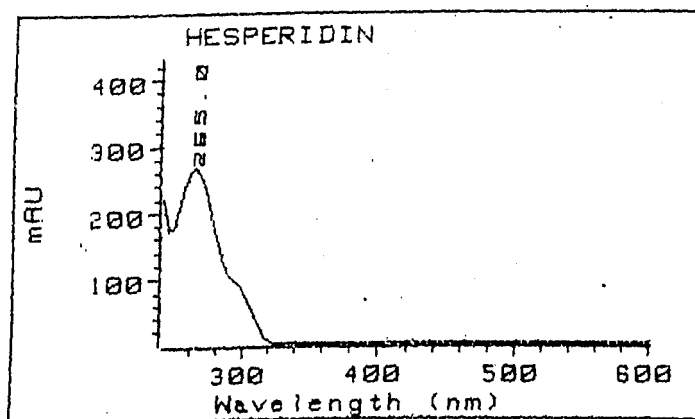
Comp. ID :
Info :



Entry : 25
Time : 21.592
ID # : 0

Comp. ID :
SIGMA H4125

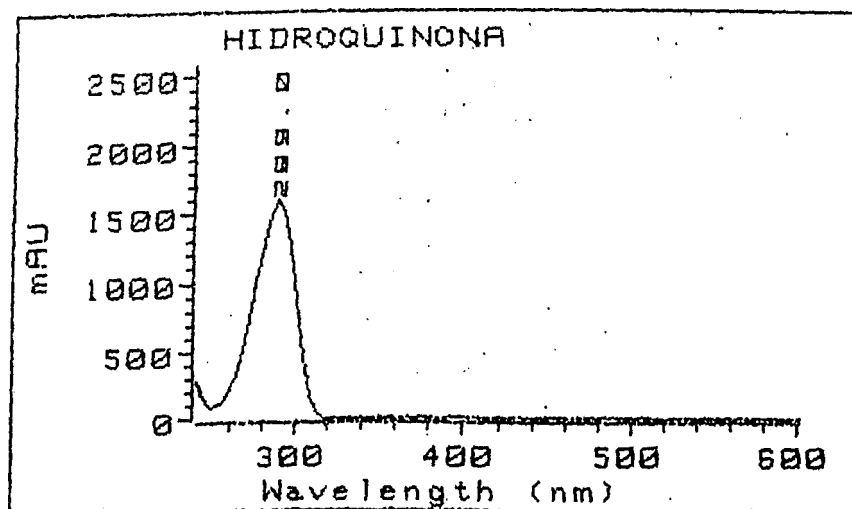
Info :



Entry : 42
Time : 2.908
ID # : 0

Comp. ID :
SIGMA H5254

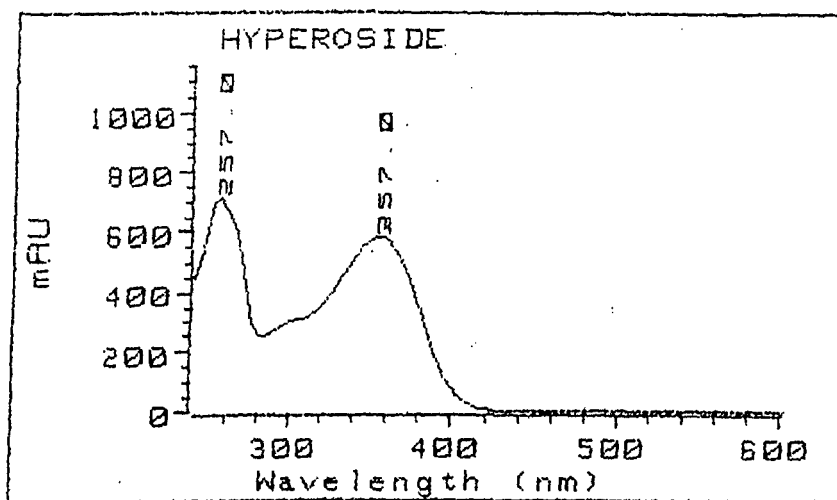
Info :
PATRON BASTANTE HIDROLIZAD



Entry : 93
Time : 3.977
ID # : 0

Comp. ID :

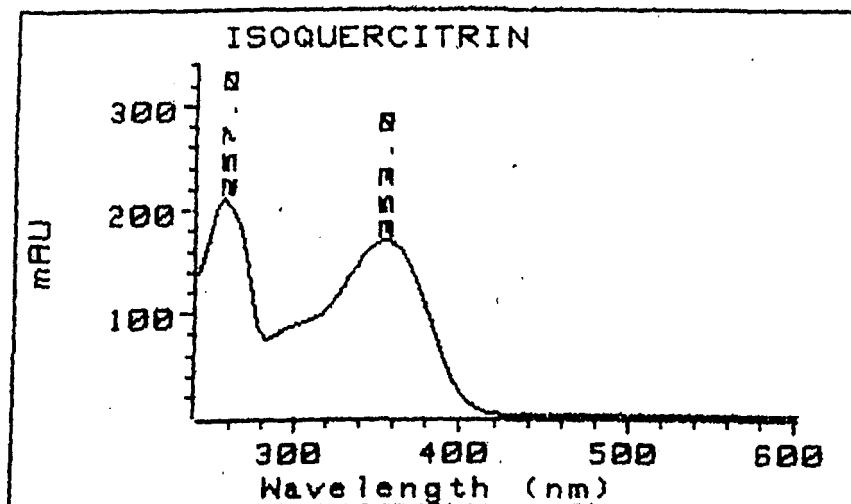
Info :



Entry : 34
Time : 15.414
ID # : 0

Comp. ID :
APIN N0175-1H

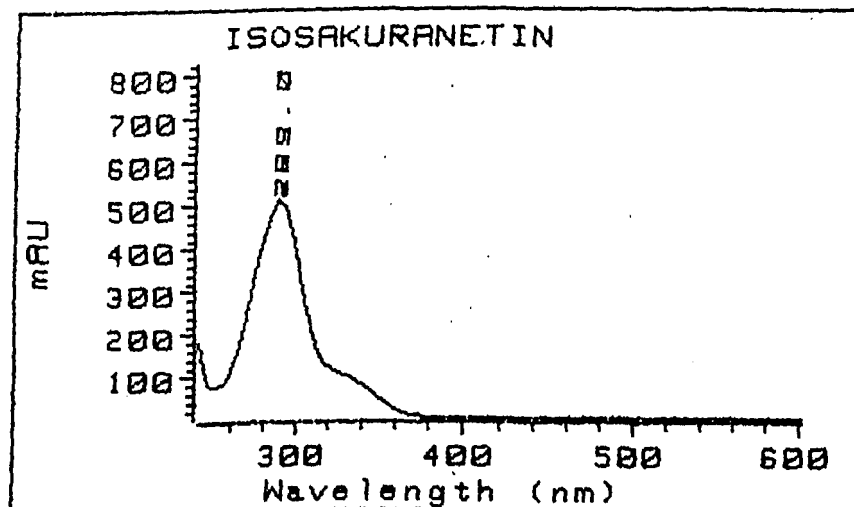
Info :



Entry : 31
Time : 15.790
ID # : 0

Comp. ID :
APIN N0035-1Q

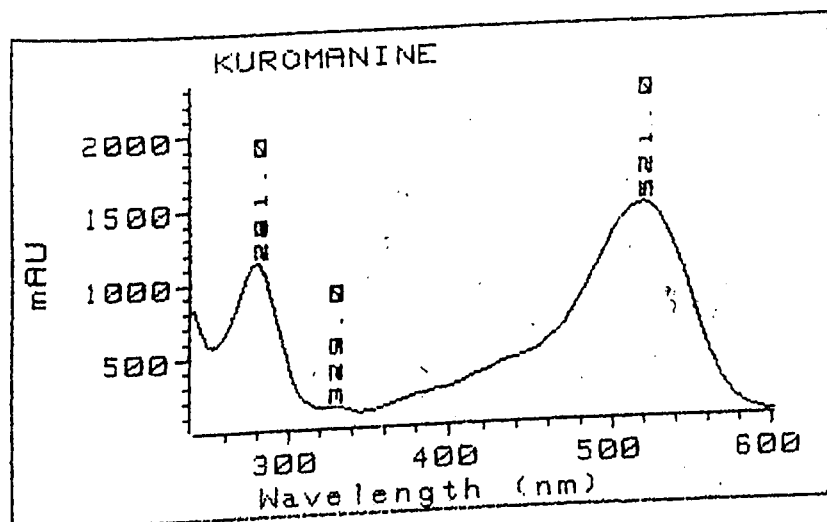
Info :



Entry : 28
Time : 26.728
ID # : 0

Comp. ID :
APIN N0045-1C

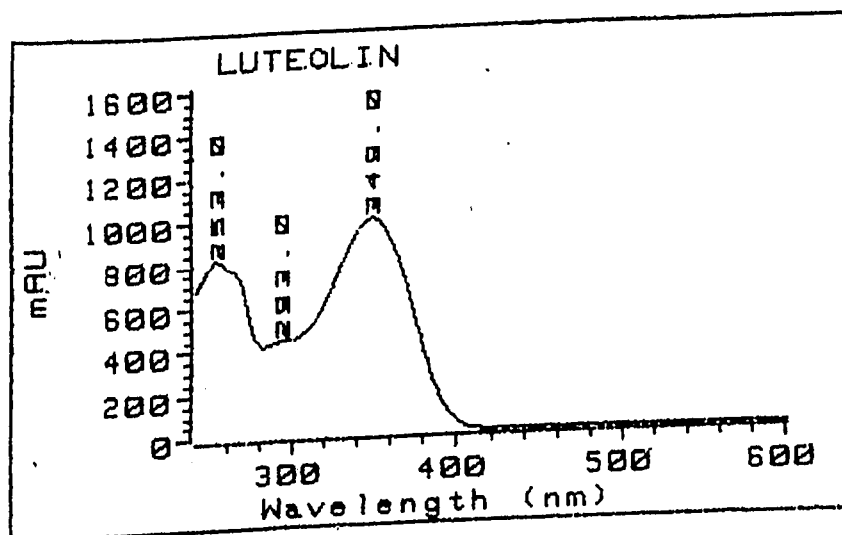
Info :



Entry : 37
 Time : 14.707
 ID # : 0

Comp. ID :
 APIN N0145C

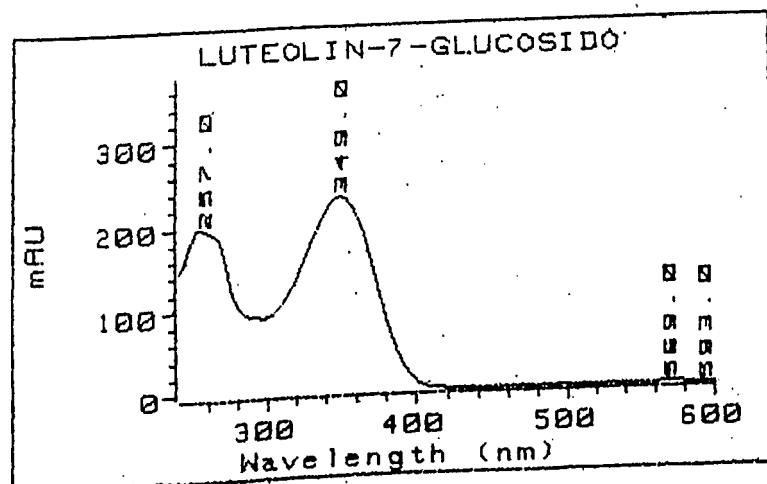
Info :



Entry : 17
 Time : 21.531
 ID # : 0

Comp. ID :
 ROTH

Info :

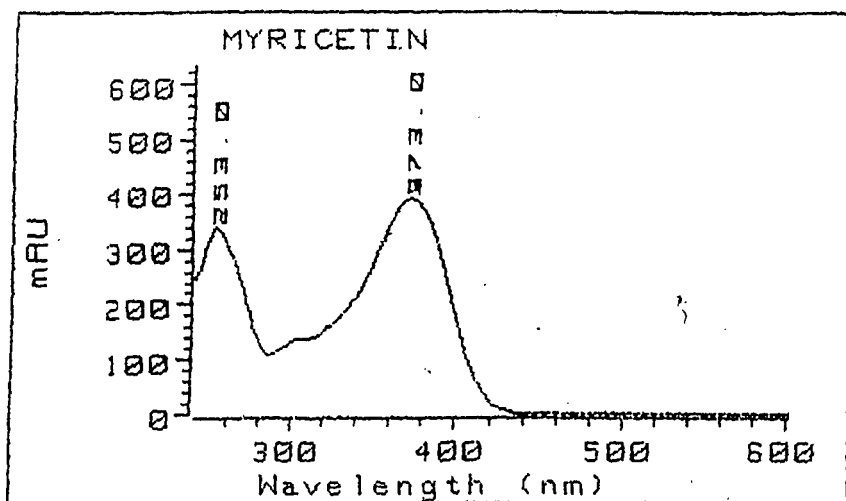


Entry : 73
 Time : 16.619
 ID # : 0

Comp. ID :

Info :

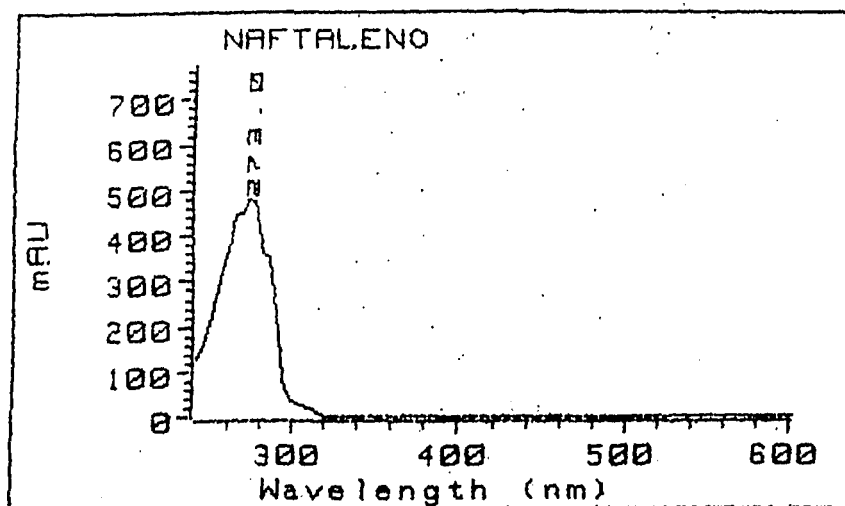
TR TOMADO EL 12-7-95



Entry : 45
Time : 17.375
ID # : 0

Comp. ID :
SIGMA M6760

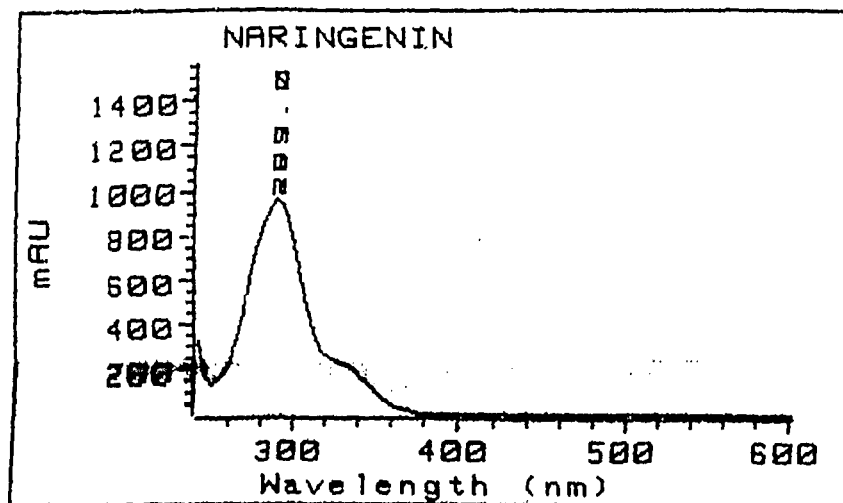
Info :
1:20



Entry : 81
Time : 28.336
ID # : 0

Comp. ID :

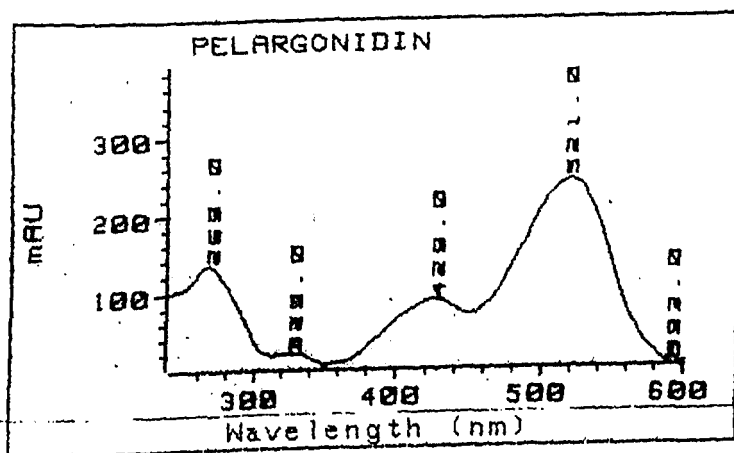
Info :



Entry : 26
Time : 20.493
ID # : 0

Comp. ID :
SIGMA N1251

Info :



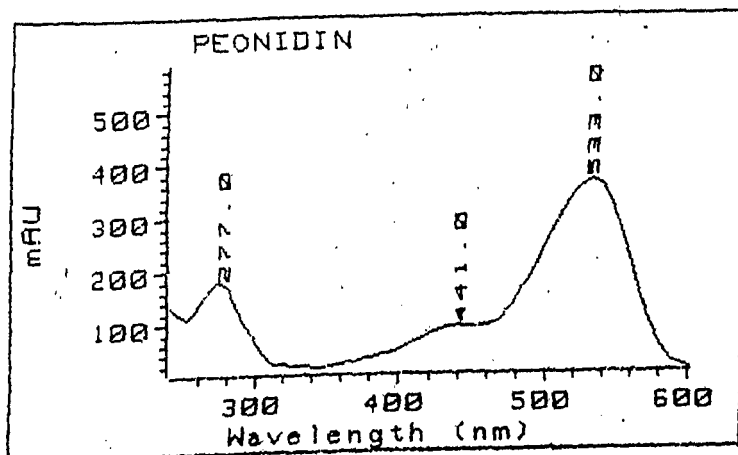
Entry : 40
Time : 29.475
ID # : 0

Comp. ID :

2-96

Info :

COLUMN NUEVA. MET-HCI



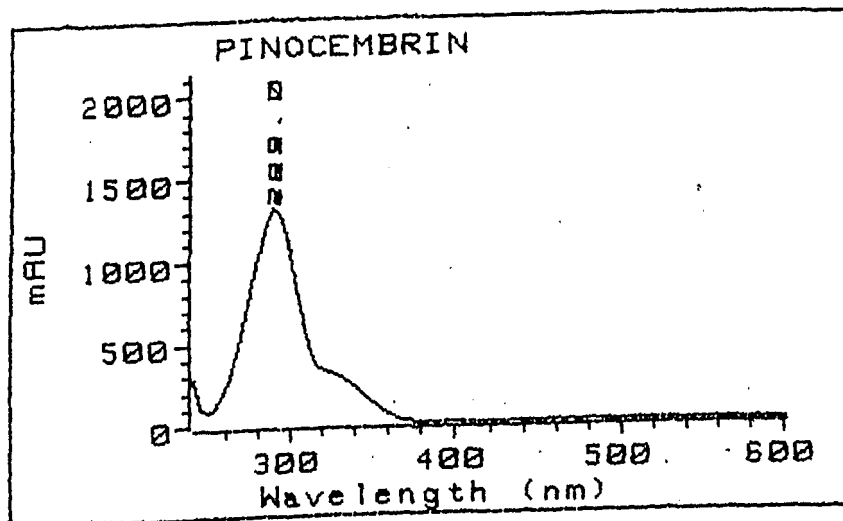
Entry : 85
Time : 30.021
ID # : 0

Comp. ID :

2-96

Info :

COLUMN NUEVA. MET-HCL

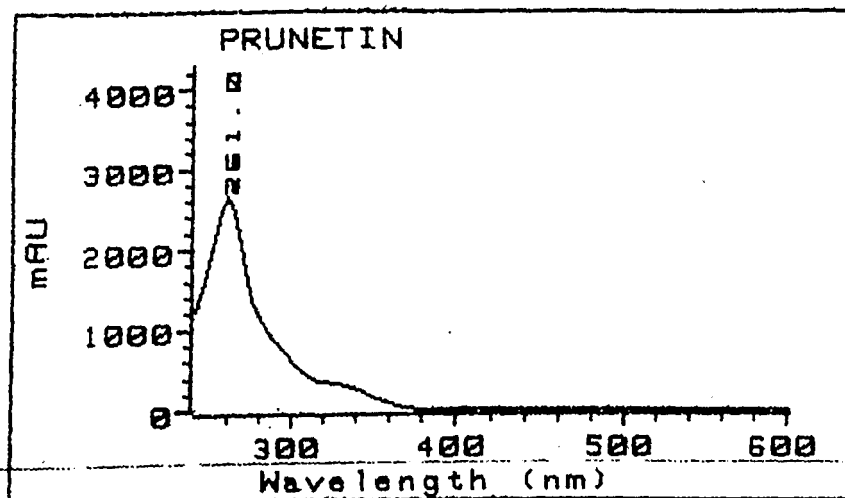


Entry : 27
Time : 26.683
ID # : 0

Comp. ID :

APIN N0075

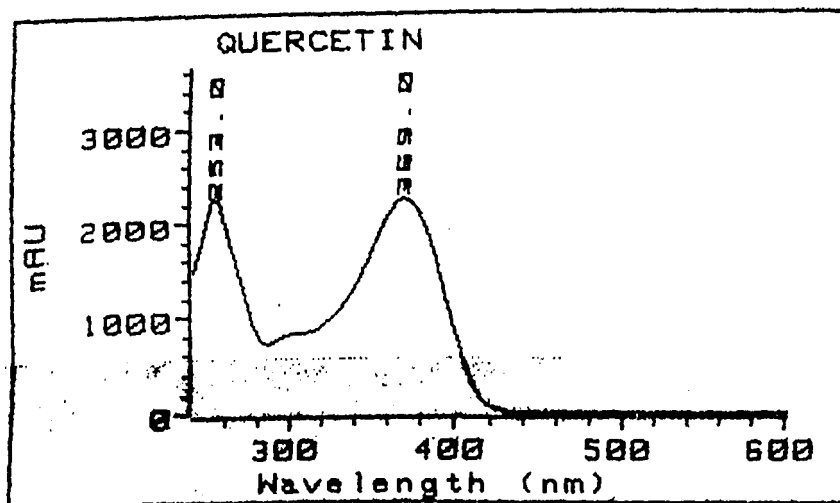
Info :



Entry : 22
Time : 27.749
ID # : 0

Comp. ID :

Info :



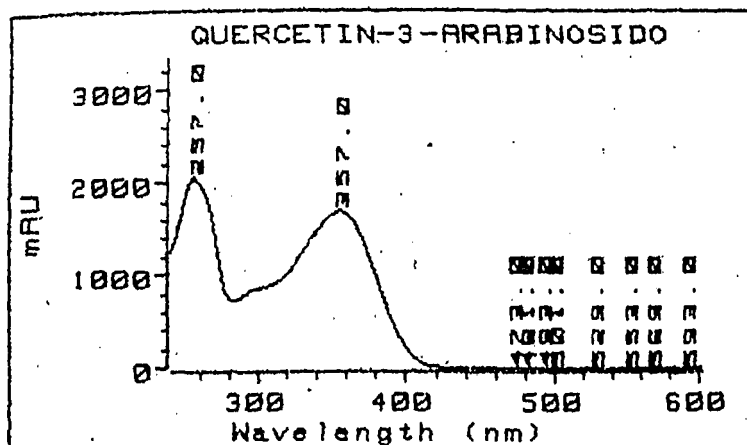
Entry : 14
Time : 20.260
ID # : 0

Comp. ID :

SIGMA Q0125

Info :

CONC.



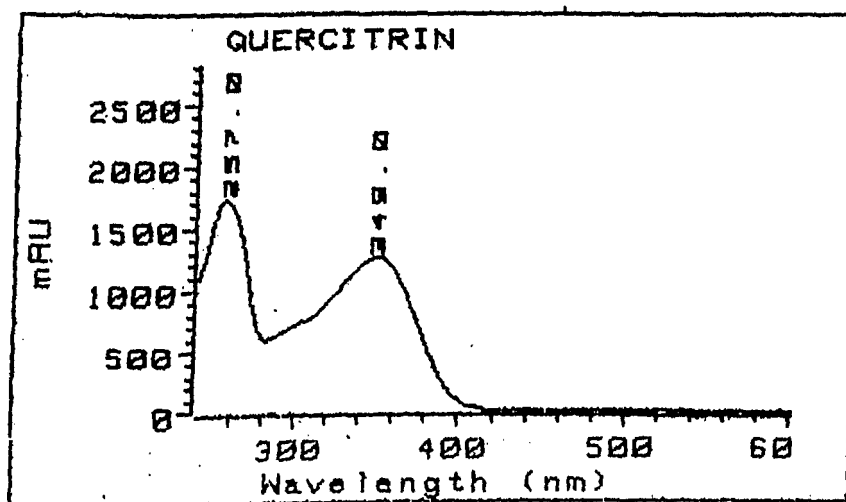
Entry : 94
Time : 18.572
ID # : 0

Comp. ID :

EXTRASYNTHÈSE

Info :

MARIBEL ESTRELLA 10/96

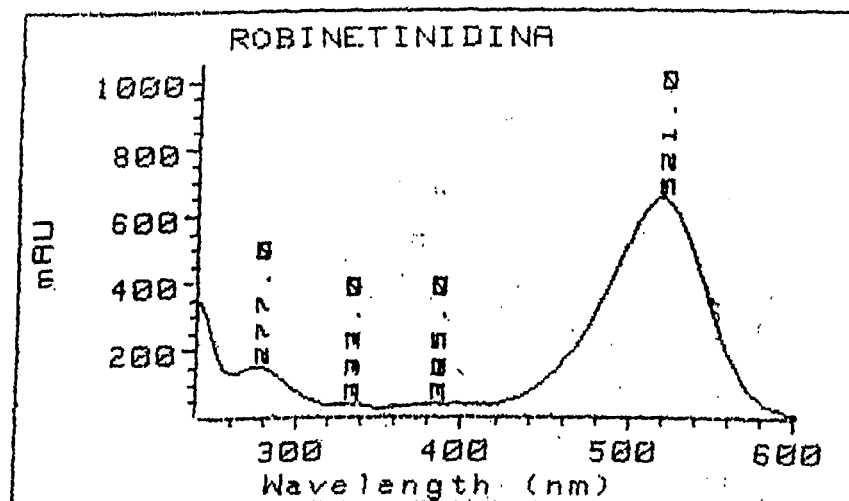


Entry : 32
Time : 17.506
ID # : 0

Comp. ID :

ROTH

Info :



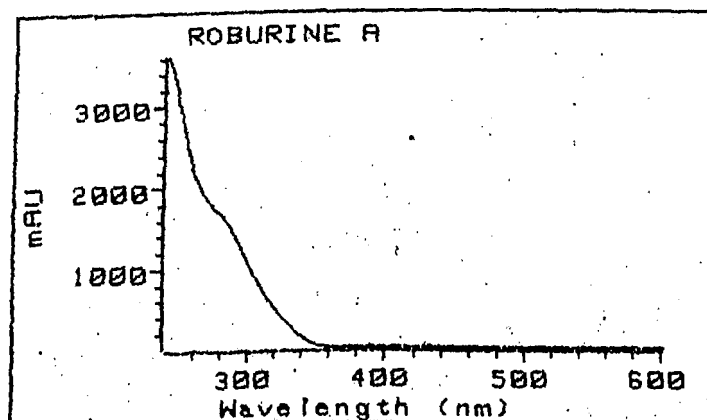
Entry : 84
Time : 18.821
ID # : 0

Comp. ID :

2-96

Info :

COLUMNA NUEVA



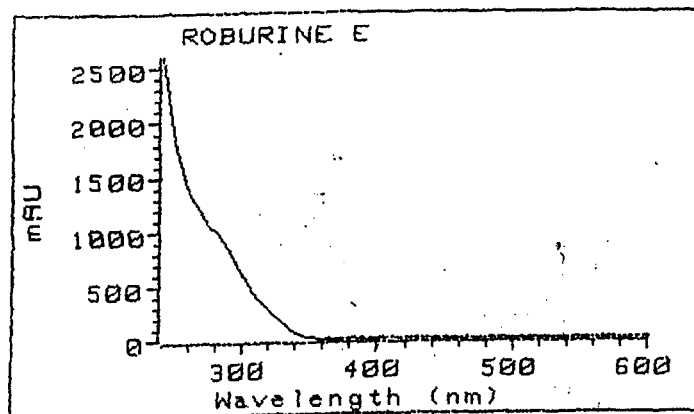
Entry : 90
Time : 10.442
ID # : 0

Comp. ID :

SCALBERT

Info :

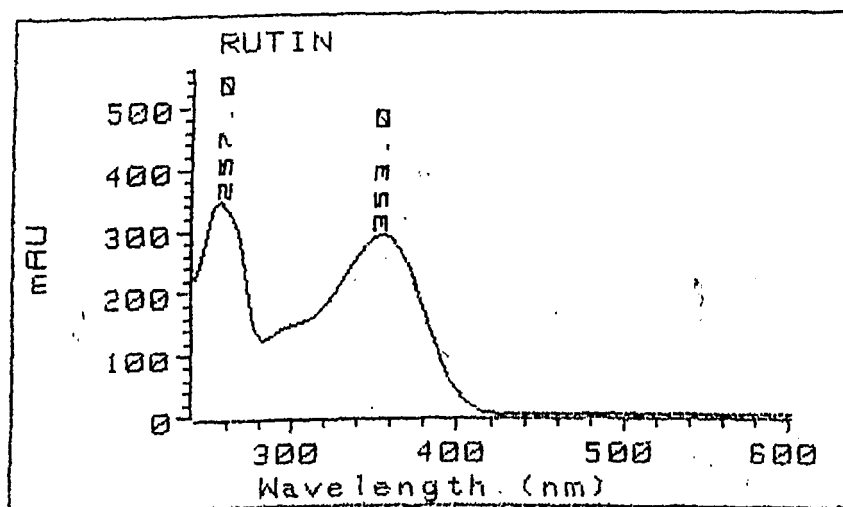
GRAD. SCAL. 2-96. COLUMNA



Entry : 92
Time : 17.494
ID # : 0

Comp. ID :
SCALBERT

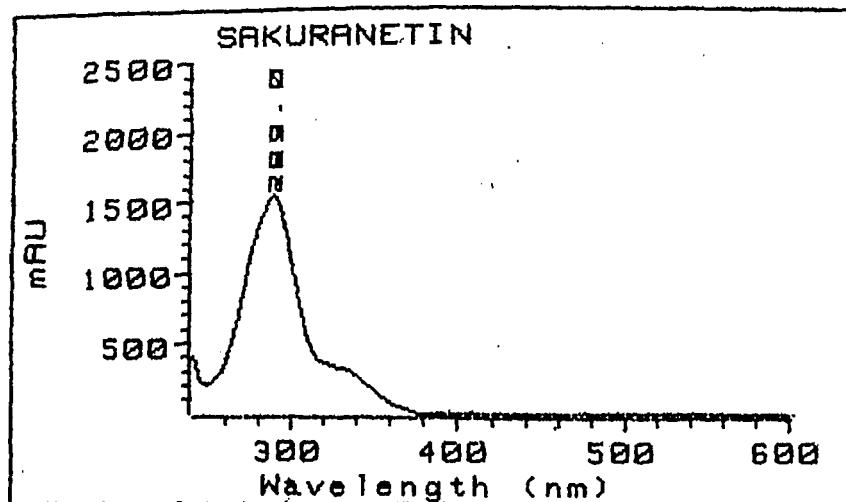
Info :
GRAD. SACAL. 2-96. COLUMN



Entry : 33
Time : 15.702
ID # : 0

Comp. ID :
SIGMA R9000

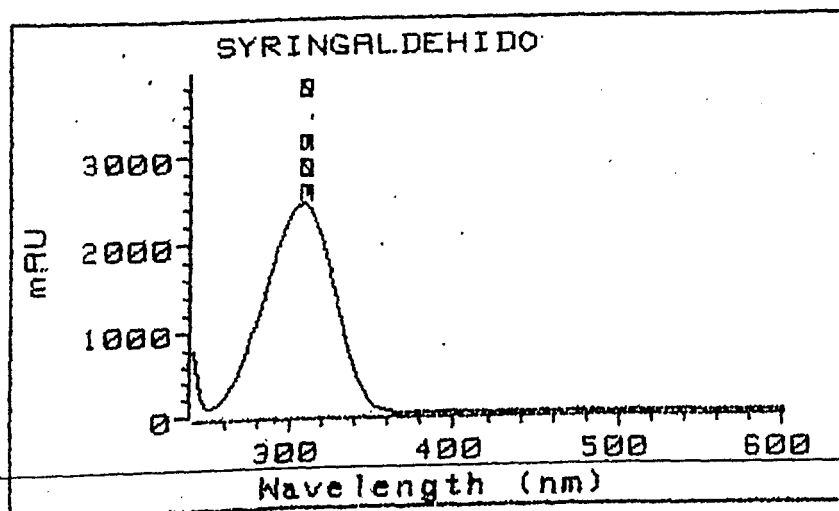
Info :



Entry : 29
Time : 26.448
ID # : 0

Comp. ID :
APIN N00055

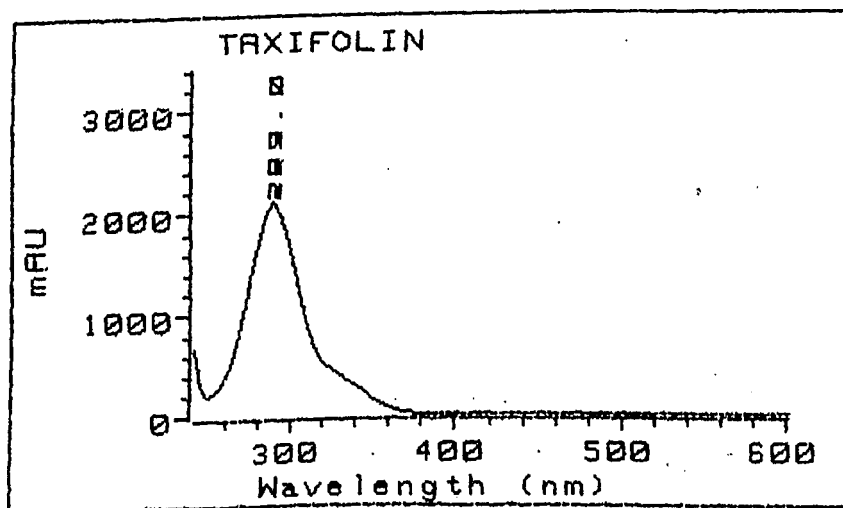
Info :



Entry : 60
Time : 10.604
ID # : 0

Comp. ID :

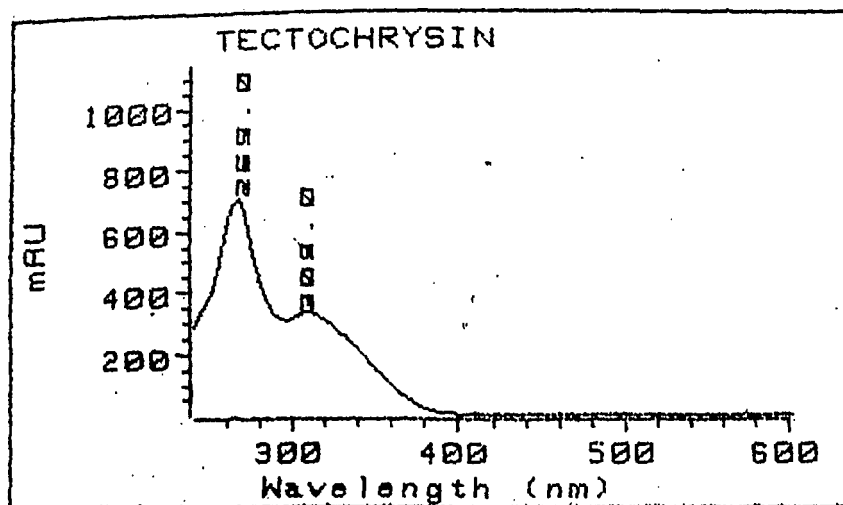
Info :



Entry : 23
Time : 11.658
ID # : 0

Comp. ID :

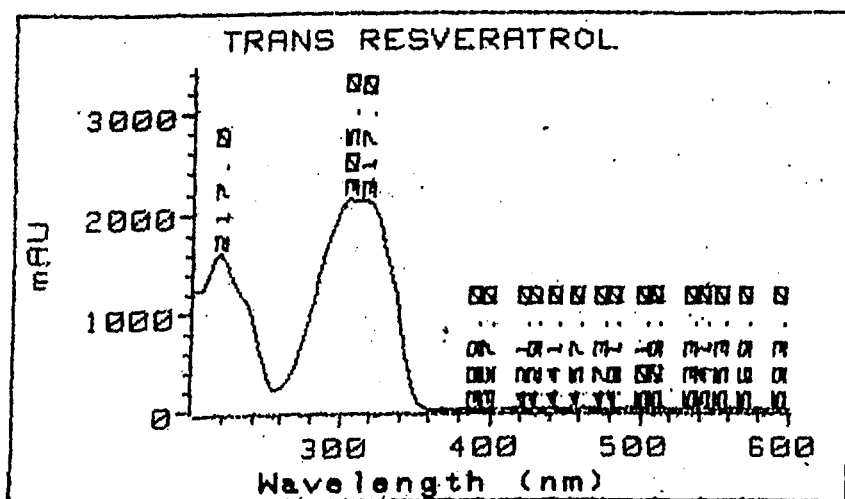
Info :



Entry : 47
Time : 33.917
ID # : 0

Comp. ID :

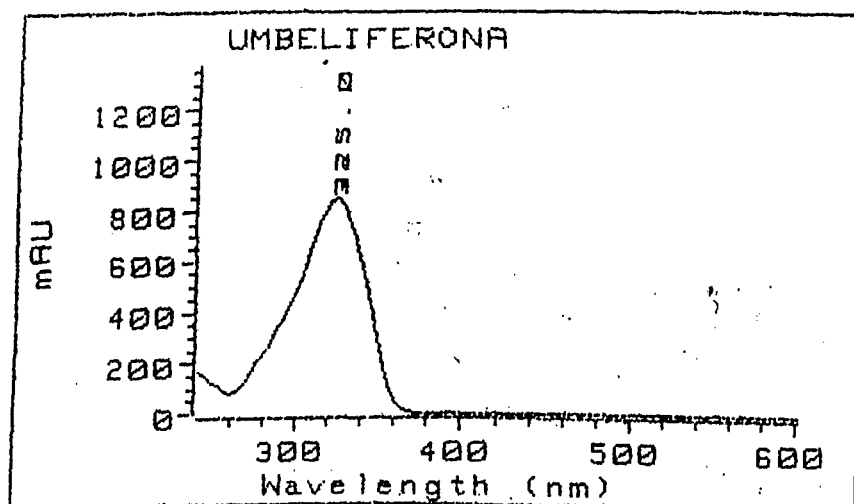
Info :



Entry : 95
Time : 17.443
ID # : 0

Comp. ID :

Info :



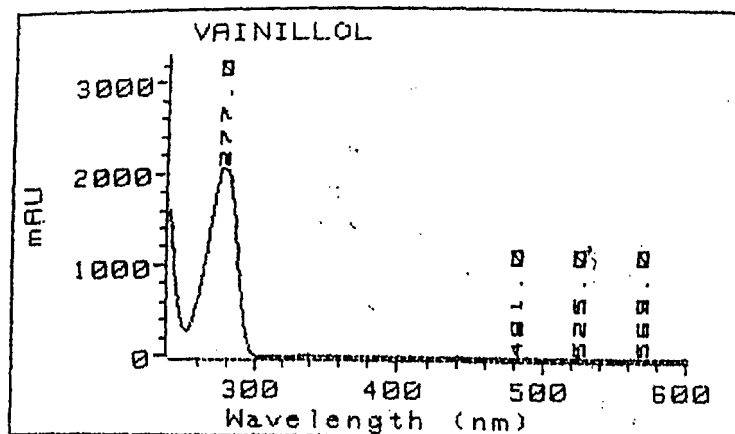
Entry : 72
Time : 12.573
ID # : 0

Comp. ID :

IFI

Info :

5 MAYO 94



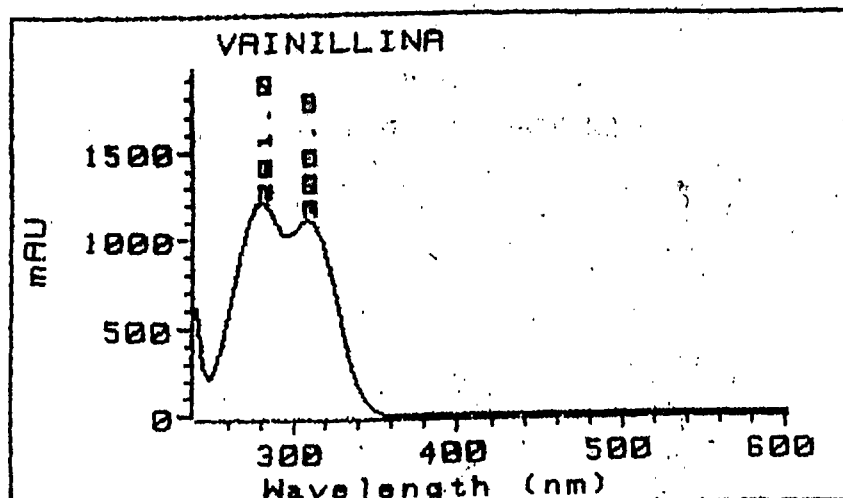
Entry : 61
Time : 5.981
ID # : 0

Comp. ID :

MARI CARMEN GOMEZ CORDO

Info :

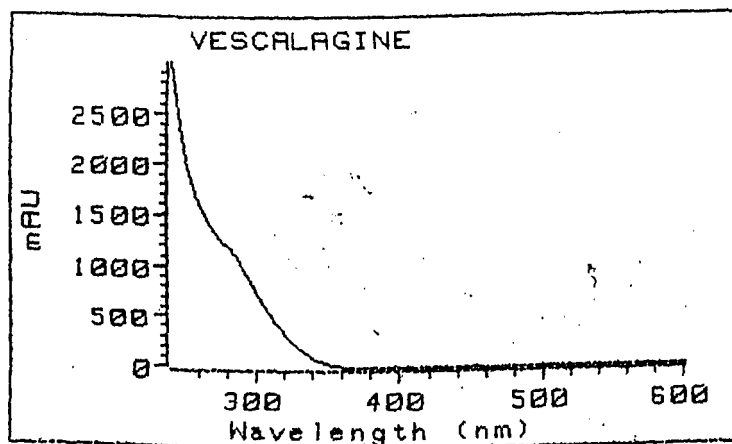
14-3-94



Entry : 7
Time : 10.250
ID # : 0

Comp. ID :

Info :



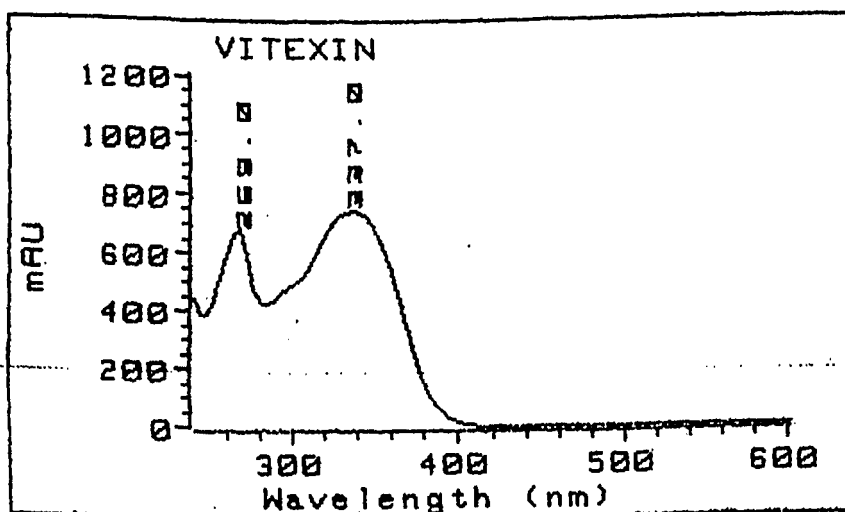
Entry : 88
Time : 16.194
ID # : 0

Comp. ID :

SCALBERT

Info :

GRAD. SCAL.2-96.COLUMNA



Entry : 30
Time : 13.245
ID # : 0

Comp. ID :

ROTH

Info :

Apêndice B – Padrões e tempos de retenção de alguns compostos fenólicos e aromáticos analisados por CLAE nas condições descritas na Tabela 6, p. 35.

Padrões analisados por HPLC no CETEC-BH	Tempo de retenção (minutos)
Ácidos e aldeídos fenólicos	
Ac. m-anísico	11,8
Ac. Benzóico	10,6
Ac. Cafeico	5,5
Ac. Protocatequínico	3,7
Ac. Elágico	10,7
Ac. Eudésmico	9,8
Ac. Gálico	2,7
Ac. 3-hidróxi-4,5-dimetóxi-benzóico	6,6
Ac. p-hidróxi-benzóico	5,3
Ac. siríngico	5,6
Ac. verátrico	8,4
Protocatequinaldeído	4,4
p-hidróxi-benzaldeído	6,1
Siringaldeído	6,5
Vanilina	6,6
Flavonóides	
Catequina	3,4
Epicatequina	4,6
Fisetina	11,9
Flavanona	22,6
Flavona	22,8
Naringenina	14,3
Naringina	8,9
Prunetina	21,2
Quercetina hidratada	14,3
Rutina hidratada	9,7
Rutina triidratada	9,6
Fenóis simples	
Catecol	4,7
Floroglucinol	2,5
Resorcinol	3,8
Outros	
3,5-dimetóxi-4-hidroxiacetofenona	7,4
4-hidróxicumarina	11,9

Capítulo 6 - Produção científica sobre a dissertação

1) XIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química – M.G. com a apresentação do trabalho em painel intitulado “Análise dos taninos das madeiras de *Eucalyptus grandis* e *urophilla* por HPLC” de autoria de Roberto Chang e Evandro Afonso do Nascimento.

2) 6º Simpósio Europeu de Lignocelulósicos e Polpa em Paris, França, com a apresentação do trabalho em painel intitulado “Estudo do conteúdo fenólico de diferentes madeiras de *Eucalyptus*” de autoria de Vera Lúcia Alves, Débora C. Hollerbach, Luciana T. Duarte, Mariza G. Drumond, Evandro A. do Nascimento, Roberto Chang e Dorila Piló Veloso.

CAPÍTULO 7 - BIBLIOGRAFIA

1. Shreve, R. N. *Indústrias de Processos Químicos*, Guanabara Koogan, São Paulo, 1977.
2. Bliss, E. D. em *Chemistry and Significance of Condensed Tannins*; Hemingway R. W.; Karchesy, J. J., Eds.; Plenum Press, Nova Iorque, 1989, p. 493.
3. Haslam, E. *Plant Polyphenols*; Cambridge University Press, Cambridge, 1989.
4. Schultz, J. C. *Ecology* 1988, 69, 896.
5. Bernays, E. A.; Cooper-Driver, G.; Bilgener, M. *Adv Ecol. Res.* 1989, 19, 263.
6. Harborne, J. B.; Palo, R. T.; Robbins, C. T. em *Plant defenses against Mammalian Herbivory*, CRC Press, Boca Raton, 1991, p. 45.
7. Bate-Smith, E.C.; Swain, T. em *Comparative biochemistry*; Mason, H. S.; Florkin, A. M., Eds.; Academic Press, Nova Iorque, 1962, p. 755.
8. Markham, K. R. *Techniques of Flavonoid identification*; Academic Press, Londres, 1982.
9. Hagerman, A. E.; Zhao, Y.; Johnson, S. *American Chemical Society*, 1977, 209.

10. Waterman P.G.; Mole, S. *Analysis of phenolic plant metabolites*; Blackwell Scientific Publications; Londres, 1994.
11. Bohm, B. A. *Introduction to flavonoids*; Harwood Academic Publishers; Vancouver, 1998.
12. Macaire-Princep. *Mém. Soc. Phys.* **1828**, 4, 43.
13. Wigand, A. *Bot. Ztg.* **1862**, 20, 121.
14. Maumené, E. J. *Sur l'oenocyanine*; C. R. Acad. Sci.; Paris, 1882.
15. Johow, F. *Bot. Ztg.* **1884**, 15, 282.
16. Keny, L. *Zur physiologischen Bedeutung des Anthocyanins*; 1892.
17. Sturgeon, K. B.; Mitten, J. B. *Amer. J. Bot.* **1980**, 67, 1040.
18. Onslow, M. W. *The anthocyanin pigments of Plants*; Cambridge University Press, Cambridge, 1925.
19. Wheldale, M. in *The colours and pigments of flowers with special reference to genetics*; Proc. royal Soc.; Londres, 1909, p.44.
20. Rosenheim, O. *Biochem. Journal* **1920**, 1280.
21. Aires, Matthew P. et al. *Ecological Society of America* **1997**, 17.
22. Swift, M. J.; Heal, O. W.; Anderson J. M. *Decomposition in terrestrial ecosystems*; University of California Press; Berkeley, 1979.

23. Sjostrom, E. *Wood Chemistry Fundamentals and Applications*; Academic Press; Londres, 1981.
24. Browning, B.L. *Methods of wood chemistry*; Institute of Paper Chemistry, Appleton, 1967.
25. D'Almeida, M.L.O. em *Composição Química dos materiais Lignocelulósicos, Celulose e Papel*; IPT; 1988, São Paulo, p. 46.
26. Fengel, D.; Wegener, G. *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reaction*; Walter de Gruyter; Berlim, 1983.
27. Buckingham, J. *Dictionary of Natural Products*; Chapman & Hall; Londres, 1993.
28. Kurth, E. F. *Ind. Eng. Chem.* **1939**, 11, 203.
29. Ritter, G. J.; Kurth, E. F. *Ind Eng. Chem* **1933**, 25, 1250.
30. Melo, D. C.; Morais, S. A. L. *Projeto de Iniciação Científica*; Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2000.
31. Angelis, D. F.; Angelis, C.; Góes, A.C.L.; Fontanetti, S. *Fundamentos de tecnologia da produção de shiitake*; COPCO (Cooperativa de Economia e Crédito Mútuo da UNESP do Câmpus de Rio Claro), 1998.
32. Naczk, M; Shahidi, F.; Sullivan, A. *Food chemistry* **1992**, 45, 51.
33. Hahlbrock, H.; Grisebach, H. *The Flavonoids*; Harborne, J. B.; Mabry, T. J.; Mabry, H., Eds.; Chapman & Hall; Londres, 1975, p. 866.

34. Wong, E. *Phytochemistry* **1976**, 5, 463.
35. Mabry, T. J.; Markham, K. R.; Thomas, M. B. *The systematic identification of flavonóides*; Springer-Verlag; Nova Iorque, 1970.
36. Jurd, L. em *The Chemistry of Flavonoid Compounds*, Geissman, T. A., Ed.; The Macmillan Company; New York, 1962, p. 107.
37. Markham, K. R.; Mabry, T. J. em *The Flavonoids*; Harborne, J. B.; Mabry, T. J.; Mabry, H., Eds.; Chapman & Hall, Londres, 1975, p. 45.
38. Harborne, J. B. em *Methods in Polyphenol Chemistry*; Pridham, J. B., Ed.; The Macmillan Company, New York, 1964, p. 13.
39. Singleton, V. L.; Rossi, J. A. *American Society for Enology and Viticulture*, **1965**, 16, 144.
40. Goldstein, J. L.; Swain, T. *Phytochemistry* **1963**, 2, 371.
41. Deutscher Apotheker Verlag, *Deutsches Arzneibuch*; Gogi-Verlag GmbH; Stuttgart, 1978.
42. Woisky, R. G.; Salatino, A. *Journal of Apicultural Research* **1998**, 37, 99.
43. Wagner, H. em *Methods in Polyphenol chemistry*, Pridham, J. B., Ed.; The Macmillan Company, Nova Iorque, 1964, p. 37.
44. Foo, L. Y. *Phytochemistry* **1981**, 6, 1397.
45. Thompson, J. F.; Honda, S. I. *The botanical reviews* **1959**, 25, 1.
46. Waterman, P.G.; Mole, S. *Oecologia* **1987**, 72, 137.

47. Strumeyer M. J. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1975**, 23, 909.
48. Hedin, P. A.; Phillips, V. A. *Journal do Agricultural and Food Chemistry* **1992**, 40, 507.
49. Scalbert, A.; Duval, L.; Peng, S,M; Monties, B.; Penhoat, C. *Journal of Chromatography* **1990**, 502, 107.
50. Swain, T.; Hillis, W. E. *Journal of Science and Food Chemistry* **1959**, 10, 63.
51. Bate-Smith, E. C. *Phytochemistry* **1973**, 12, 970.
52. Porter, L. J.; Hrstich, L. N.; Chan, B. C. *Phytochemistry* **1986**, 25, 223.
53. Porter, L. J. *Tannins in Methods in Plant Biochemistry*; Academic Press, Nova Iorque, 1989.
54. Nascimento, E. A.; Morais, S.A.L.; Garcia-Vallejo, M. C.; Cadahia, E. F.; Conde, E. M.; Fernandez, M. B. *Ciência e Engenharia*; **1996** 2, 19.
55. Nascimento, E. A.; Morais, S.A.L.; Garcia-Vallejo, M. C.; Cadahia, E. F.; Conde, E. M.; Fernandez, M. B. *Ciência e Engenharia*; **1996**, 2, 13.
56. Agrawal, Pavan K. *Carbon-13 NMR of flavonoids*; Elsevier, Londres, 1989.

57. Hawker, G. E.; Smith, C. Z.; Utley, J. H. P.; Vargas, R. R.; Viertler, H. *Holzforschung* **1993**, 47, 302.
58. Haslam, E.; Saunders, C.M.; Bonet, S.I.; Steynberg, J.P.; Ferreira, D. *Tetrahedron* **1996**, 52, 6003.
59. Levy, G. C.; Nelson, G. L. *Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance for Organic Chemists*, John Wiley & Sons, Nova Iorque, 1972.
60. Garcia-Vallejo, M. C.; Cadahia, E. F.; Conde, E. M.; Fernandez, M. B. *Holzforschung* **1995**, 49, 411.
61. Garcia-Vallejo, M. C.; Cadahia, E. F.; Conde, E. M.; Fernandez, M. B. *Holz als Roh und Werkstoff*, **1996**, 54, 175.
62. Garcia-Vallejo, M. C.; Cadahia, E. F.; Conde, E. M.; Fernandez, M. B. *Holzforschung* **1997**, 51, 119.
63. Garcia-Vallejo, M. C.; Cadahia, E. F.; Conde, E. M.; Fernandez, M. B. *Holzforschung* **1997**, 51, 125.
64. Drumond, M.G. *Relatório Final do Projeto CEX 2038/95*; Belo Horizonte, 1999, em preparação.
65. Tappi, *Norma para a obtenção da lignina solúvel em ácido*, T13 m-54.
66. Morais, S. A. L.; Nascimento, E. A.; Veloso, D. P. *Química Nova* **1993**, 16, 435.
67. Saunders, C. M.; Bonnet, S. L.; Steynberg, J. P.; Ferreira, D. *Tetrahedron*, **1996**, 6000.