



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
DEPARTAMENTO DE PRODUTOS FLORESTAIS

VINÍCIUS CADETE BERNARDES

**ANÁLISE QUÍMICA COMPARATIVA DO NÓ DA MADEIRA DE *Pinus
elliottii* var. *elliottii* PELO MÉTODO DE ACIDÓLISE**

DEISE AMARAL DE DEUS
ORIENTADORA

SEROPÉDICA - RJ
JUNHO – 2016



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
DEPARTAMENTO DE PRODUTOS FLORESTAIS

VINÍCIUS CADETE BERNARDES

**ANÁLISE QUÍMICA COMPARATIVA DO NÓ DA MADEIRA DE *Pinus
elliottii* var. *elliottii* PELO MÉTODO DE ACIDÓLISE**

Monografia apresentada ao curso de Engenharia Florestal, como requisito parcial para a obtenção do Título de Engenheiro Florestal, Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Prof^a Dra. Deise Amaral de Deus
ORIENTADORA

SEROPÉDICA - RJ
JUNHO - 2016

ANÁLISE QUÍMICA COMPARATIVA DO NÓ DA MADEIRA DE
***Pinus elliottii* var *elliottii* PELO MÉTODO DE ACIDÓLISE**

Vinícius Cadete Bernardes

APROVADA EM 09 /06 / 2016

Profª Dra. Deise Amaral de Deus

UFRA/CCP

Orientadora

MSc Bruno Couto da Silva

UFRRJ/IF/DPF

Membro

MSc Gisely de Lima Oliveira

UFRRJ/IF/DPF

Membro

DEDICATÓRIA

Esta monografia é dedicada ao falecido professor Dr. Heber dos Santos Abreu. Que foi um grande exemplo para todos nós. Como pesquisador, como homem, como professor, como profissional, em tudo poderíamos absorver um pouco de aprendizado em sua companhia.

Um homem rico em conhecimento e que era apaixonado pelo que fazia, pois sempre fazia com muito gosto e orgulho. Gostaria de ter tido a honra de realizar este trabalho ao lado dele, pois devo a ele muito do que pude aprender, pensar e refletir. Porém, nestas condições, fiz o possível para realizar o trabalho que planejávamos para monografia em sua memória.

AGRADECIMENTO

Em meu primeiro agradecimento gostaria de fazê-lo a meu Amado Jesus Cristo, sem o qual não chegaria até aqui. O agradeço por estar comigo quando todos estavam e por permanecer quando ninguém estava. Por me colocar de pé toda vez que eu estava caído. Eu sei que Ele nunca me deixará, por isso o agradeço. Eu agradeço pela oportunidade que Ele me deu de viver a Rural.

Agradeço aos meus pais, Adriana Cadete Bernardes e José Franco Bernardes que não mediram esforços para me manter na faculdade e sempre com muito orgulho olhavam pra mim, mesmo quando eu desanimava no meio das dificuldades. Por entender que minha ausência às vezes se fazia necessária e sempre me receberem com alegria de volta em casa. Agradeço a eles por me preparem para essa vida universitária, ensinando-me a morar sozinho desde pequeno quando eu e meu irmão ficávamos sozinhos em casa.

Agradeço a meu irmão Luis Felipe Cadete Bernardes, que mesmo a distância não pode diminuir o amor que sinto por ele e muita admiração.

Nesta homenagem também quero mencionar Mayara Mendes Leal, o nome que para mim significa amor e que me ensinou a amar, a qual compartilho minha felicidade agora e no futuro. Obrigado pelos sorrisos, pelas brincadeiras, pela parceria, pelo amor e amizade, pelo significado da palavra empatia e por ser quem eu tanto amo.

Agradeço a minha Orientadora Deise Amaral de Deus, que sempre me motivou, me aconselhou na vida acadêmica. Sou muito grato por ter sido um grande referencial para mim e por poder realizar um novo trabalho, nos qual eu pude crescer bastante.

Agradeço a equipe do Laboratório de Química da Madeira, que me acompanham desde o meu primeiro período e viram meu desenvolvimento acadêmico, especialmente a professora Natália Dias que tem sido uma grande referência para mim, além de ser uma ótima amiga para todos.

Agradeço ao melhor técnico e funcionário do IF, José Carlos, que sempre se prontificou a ajudar todos os alunos de igual modo. Que sempre dá um jeito de nos ajudar até mesmo nos feriados, sua ajuda foi uma das mais relevantes para realização deste trabalho.

Agradeço a Missão Evangélica do Brasil da Rua 4, durante esses 4 anos eu cresci muito e certamente vocês me proporcionaram isso.

Agradeço ao Grupo de Extensão Alfa e Ômega Rural os quais me mostraram como entender melhor as pessoas, como conhecer a Deus na universidade e como ser movimento até que cada pessoa conheça alguém que verdadeiramente segue a Cristo. Vocês marcaram minha vida e eu lhes sou muito grato, principalmente pela viagem ao Panamá e por todas as experiências ali vivenciadas. Ao meu grande amigo, Erick Trigueiro, a quem eu amo como um irmão e que sempre se dedica as pessoas.

Agradeço “Os de Casa”, Flávio Andrade e Mariane Lima, Mayara Christine, Caio Rodrigues, Hugo de Jesus. Vocês “tão” no coração.

Também gostaria de mostrar minha gratidão ao Grupo de Extensão Aliança Bíblica Universitária pela amizade que deu força e pelo fortalecimento da fé que nos sustentou. Aos amigos que ali cultivei como Lucas Santiago e Luísa Heidenfelder, Fernanda Apolinário.

Também sou grato pelos momentos vividos com a tia Maristela, Gisely, Bruno e Michel, são pessoas que acompanharam uma boa parte da minha vida acadêmica.

RESUMO

Neste trabalho foram utilizadas amostras de madeira de *Pinus elliottii* var. *elliottii* provenientes de duas regiões a 50% da altura comercial, uma composta por madeira de nó e outro livre de nó. O objetivo foi a identificação e comparação das ligações presentes na molécula de lignina utilizando o método da acidólise como pré-tratamento e a ressonância magnética nuclear de ^{13}C para a caracterização das moléculas presentes na amostra. A acidólise é o refluxo a 90°C de uma mistura de dioxano-água (9:1, v/v) e ácido clorídrico (HCl) 0,2M que é capaz de causar a clivagem seletiva de aril glicerol- β -aril éter e alguns outros tipos de ligações éter lábeis solubilizar a lignina, realizando a quebra de suas ligações, dentre elas a mais fácil de ser rompida é a β -O-4. Os sinais gerados pela ressonância magnética nuclear permitiram identificar as ligações β -1, β -O-4 e β -5 no material composto por nó, enquanto o material sem nó não revelou sinais da ligação β -O-4 ou OCH_3 . Com base nos dados da literatura e com os espectros gerados pela ressonância magnética nuclear, pôde ser proposto um modelo de algumas estruturas presentes na molécula da lignina fragmentada pela acidólise.

Palavras chave: Acidólise, dioxano, ^{13}C , lignina, nós

ABSTRACT

In this study, we used samples of wood of *Pinus elliottii* var. *elliottii* from two regions of 50% of the commercial time, one composed of knot wood and other non-knot. The objective was the identification and comparison of lignin bonds present in the molecule using acidolysis method as pretreatment and ^{13}C nuclear magnetic resonance for the characterization of molecules present in the sample. The acidolysis is refluxed at 90°C in a mixture of dioxane-water 9: 1 (v/ v) and hydrochloric acid (HCl) 0.2M that is able to cause selective cleavage of aryl glycerol β -aryl ether and some other types of labile ether linkages solubilize the lignin, performing the breaking of connections among them easier to be broken is the β -O-4. The signals generated by nuclear magnetic resonance allowed the identification of β -1, β -O-4 and β -5 linkages in the composite material per knot, while non-knot material didn't reveal signs of OCH_3 or β -O-4 binding. Based on literature data and spectra generated by nuclear magnetic resonance, it was proposed a model of some structures present in the molecule of the fragmented lignin by acidolysis.

Keywords: Acidolysis, dioxane, ^{13}C , lignin, knots

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. NÓ	2
2.2. MÉTODOS DE ANÁLISE DE LIGNINA	4
2.3. ACIDÓLISE	4
2.4. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DO CARBONO 13 (RMN ¹³C)	7
3. MATERIAL E MÉTODO	9
3.1. OBTENÇÃO DA MADEIRA LIVRE DE EXTRATIVOS	9
3.2. ACIDÓLISE	10
3.3. RMN ¹³C	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
4.1. MATERIAL COM NÓ	15
4.2. MATERIAL SEM NÓ	17
5. CONCLUSÃO	23
6. REFERÊNCIAS	24

1. INTRODUÇÃO

A formação de nós faz parte da fisiologia e do desenvolvimento natural da árvore, seja por características genéticas ou por fatores ambientais que induzem a ramificação. No entanto, em espécies florestais de interesse comercial, a presença de nós representa um problema por ocasionar redução de resistência mecânica de peças e aumento de consumo de reagentes químicos para a remoção da lignina presente em sua estrutura, que é mais abundante e complexa do que em madeira livre de nós (AMARAL, 2014).

Dentre as espécies florestais comerciais em que a presença de nós representa maior prejuízo econômico, as espécies do gênero *Pinus* são as mais frequentes. Este gênero pertence à família Pinaceae, grupo das gimnospermas, e engloba mais de 100 espécies com grande potencial a ser explorado (EMBRAPA, 2011).

No Brasil, ocupam 1,59 milhões de hectares, concentrando-se principalmente no Paraná (42 %), Santa Catarina (34 %) e São Paulo (20%) (IBÁ, 2015), sendo a espécie *Pinus elliotti* uma das mais utilizadas comercialmente, representando até 58 % dos plantios florestais de algumas regiões do país (RIO GRANDE DO SUL, 2013). Sua madeira, originalmente destinada à produção de celulose, também atende a produção de madeira serrada, de lâminas de madeira, de painéis dos tipos aglomerados, compensados, MDF, OSB e a extração de resina (PALERMO *et al.*, 2013; CADEMARTORI *et al.*, 2012, EMBRAPA, 2011).

Na indústria de celulose a elevada quantidade de lignina presente no nó promove uma blindagem mais rígida na celulose. Como resultado, polpas celulósicas produzidas a partir de espécies com elevado teor de nós são mais escuras, consomem mais reagentes químicos, necessitam passar por processos de refino e produzem papel de menor qualidade; o que reduz a produtividade e ocasiona custo adicional à produção da pasta celulósica. A solução para esse problema tem sido identificar a presença do nó nas toras através de equipamentos específicos como scanners e retirá-los antes do processo de polpação (HOLMBOM, 2003); o que representa aumento de custos.

A análise química da lignina, por exemplo, a lignina residual de polpas kraft, fornece importantes informações da sua reatividade frente aos reagentes utilizados nos processos de branqueamento (VENTORIM *et al.*, 2014). Estudando quimicamente a lignina presente no nó, é possível supor que, através de pré-tratamentos ou reagentes químicos específicos seria possível quebrar a molécula de lignina e acessar a celulose, evitando desta forma a necessidade de eliminar o nó da cadeia produtiva de indústrias de pasta celulósica e reduzir, conseqüentemente, os custos com reagentes nos processos de branqueamento das polpas.

O estudo químico dos nós dessa espécie através de acidólise, além de favorecer a busca de soluções para minimizar prejuízos econômicos devido da presença de nós, pode facilitar a compreensão da estrutura da lignina que é mais abundante e mais complexa nos nós do que a lignina encontrada em qualquer outra região da árvore, o que configura um grande problema para indústrias do segmento celulósico (LACHENAL, 2004).

Além da questão dos prejuízos econômicos que a presença do nó pode acarretar, que por si, já justifica pesquisas no âmbito da química com este elemento; outro aspecto de elevada relevância é o fato de estudos demonstrarem que compostos químicos presentes no nó, incluindo a lignina, podem representar um recurso valioso, com potencial de utilização em alimentos, produtos farmacêuticos e biocidas naturais (PHELAN *et al.*, 2009; HOLMBOM *et al.*, 2003). A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais do gênero *Pinus*, por exemplo, já foi estudada por vários autores (CANILLAC; MONREY, 1996; LIS-BALCHIN *et al.*, 1998).

Em vista destes fatores, este trabalho tem por objetivo a caracterização estrutural do produto da acidólise obtido à partir de amostras de madeira da região do nó para identificação dos tipos de ligações da macromolécula de lignina presentes na madeira de nós de *Pinus elliottii* var. *elliottii*, comparando, a partir do mesmo método, com as ligações da macromolécula de lignina presentes na madeira livre de nós.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. NÓ

O nó pode ser definido como o ponto de interseção onde o ramo (ou galho) se conecta com o tronco (BUKSNOWITZ *et al.*, 2010). A formação do nó se dá a partir de uma gema lateral ligada à medula, que deixa de sofrer influência do hormônio auxina. Esse hormônio é produzido pela gema apical e tem efeito inibitório de crescimento em gemas laterais.

À medida que a árvore cresce, o ápice caulinar e a gema apical se afastam das gemas laterais e libera os mecanismos de desenvolvimento da gema lateral que, conseqüentemente, inicia o desenvolvimento do galho. Com o aumento do perímetro do tronco, o ramo da madeira assume a forma de um cone - o nó - que continua o seu desenvolvimento, porém mais lentamente, dentro do tronco. Cada nó é, portanto, uma parte de um ramo que se desenvolveu a partir da medula (HOADLEY, 2000).

Os anéis de crescimento do nó, assim como no tronco principal, são concêntricos e representam sistemas independentes dos anéis de crescimento do tronco principal. São formados principalmente por fibras de compressão que são morfológicamente distintas das fibras de madeira normais (SHIGO, 1985). A madeira com nó tem teor de umidade significativamente mais baixo e a densidade pode representar o dobro da densidade observada na madeira livre de nó (SAHLBERG, 1995).

Em algumas situações, como por restrições nutricionais ou físicas causadas por ramos superiores ou pouca incidência de luz, por exemplo, o ramo pode morrer. Neste caso, o ramo permanece na superfície do tronco com seu câmbio incapaz de adicionar mais perímetros.

Assim, subsequentes anéis de crescimento são adicionados a haste principal e simplesmente cerca a circunferência do ramo morto, que pode começar a apodrecer

(RODRÍGUEZ, 2009). Quando isto acontece, o nó presente nas peças oriundas de troncos com nós mortos ocasionam a depreciação da qualidade do produto de madeira, principalmente no que tange a utilização estrutural das peças. Por esse motivo, os mercados de produtos florestais desenvolveram classificações de qualidade de madeira para diferentes tipos e sanidades de nós encontrados nas peças de madeira (NBR 12.297/ABNT 1991; NBR 12.551/ABPM 2001).

Na utilização da madeira para a produção de celulose, o nó representa aumento dos custos de produção e redução da qualidade do produto final. Foi verificado que, estudando a influência das fibras de nós sobre as propriedades termomecânicas da polpa de *Picea abies*, os lenços de papel produzidos a partir de polpa com fibras de nós apresentaram menor resistência, menor absorção de luz, e propriedades da superfície inferiores aos lenços produzidos com polpa livres de fibras de nós (SAHLBERG, 1995). Estes efeitos estariam relacionados às propriedades morfológicas e, principalmente, à composição química do nó; no entanto, a ausência de estudos referentes a tais propriedades inviabilizou maior detalhamento do estudo (AMARAL, 2014)

Outros autores também relatam a importância de se estudar quimicamente o nó de madeira pelo potencial que eles apresentam de fornecer novos produtos de interesse econômico, seja na indústria farmacêutica, alimentícia (HOLMBOM *et al.*, 2003) ou química. THOMPSON (2000) e ZERN e FERNANDEZ (2005) verificaram que compostos fenólicos oriundos de extratos de nós apresentam propriedades biológicas medicinais importantes, incluindo ação anti-tumoral, anti-oxidante e efeitos cardioprotetores. PIETARINEN *et al.*, 2006 estudando extratos de nó de madeira de *Pinus banksiana* (Lamb.) e *Pinus sitchensis* (Bong.) observaram que os extratos de nós dessa espécie exercem efeitos específicos imunológicos, citoprotetores e imunomoduladores em células intestinais humanas; enquanto que LINDBERG *et al.*, (2004) observaram que os estilbenos presentes em extratos de nós de *P. silvestris* são responsáveis pelos efeitos anti-bacterianos, ação anti-microbiana e as propriedades citotóxicas dessa espécie. Em estudo com extratos de nós de duas espécies de pinus, potenciais efeitos protetores anti-oxidante, indução de lesão celular e danos no DNA foram avaliados por PHELAN *et al.*, 2009.

No aspecto da composição química, o conteúdo de compostos em um nó de madeira pode ser várias centenas de vezes maior que na madeira adjacente. Este conteúdo pode variar não só entre espécies, como entre nós na mesma árvore (PHELAN *et al.*, 2009). Em relação à lignina, em comparação com a madeira, o tecido do nó apresenta aumento do teor de lignina com o aumento do ângulo de microfibrilas (SHIGO, 1985; BUKSNOWITZ *et al.*, 2010).

Ligninas são encontradas principalmente nos nós dentro do tronco diminuindo sua concentração à medida que sua localização se projeta para fora, nos ramos; com concentrações variando mesmo entre nós da mesma árvore. (WILLFÖR *et al.*, 2003a). Em um estudo de mais de 30 nós provenientes de sete árvores de abeto da Noruega, WILLFÖR *et al.* (2003a) encontraram teor de lignina de 6% a 24%. Eles verificaram que os nós contêm muito mais ligninas do que a madeira do tronco comum, podendo chegar a 100 vezes a quantidade observada no cerne do caule adjacente.

2.2. MÉTODOS DE ANÁLISE DE LIGNINA

Existem diversos métodos para a identificação das estruturas de ligninas na madeira. De acordo com VENTORIM *et al.*, 2014, os principais são o nitrobenzeno, o óxido de cobre (CuO) e a acidólise. O método de nitrobenzeno caracteriza ligninas condensadas, enquanto o método de CuO é utilizado para caracterizar ligninas não-condensadas. Já a acidólise convencional é a técnica mais agressiva para as ligações β -O-4 (LACHENAL, 2004), uma das ligações de maior destaque no estudo da lignina.

O isolamento da lignina, por outro lado, é feito principalmente pela hidrólise enzimática, em que se usa enzimas a base de celulose e a hidrólise ácida, onde uma solução de ácido clorídrico em dioxano-água é usada; ou ainda, uma combinação dos dois métodos (ARGYROPOULOS *et al.*, 2002). No entanto, nenhum método fornece uma análise inteiramente confiável, devido às modificações ocorridas na estrutura da lignina durante seu isolamento; por isso é importante realizar mais análises para confirmar os resultados (VENTORIM *et al.*, 2014).

2.3. ACIDÓLISE

A acidólise é um método que caracteriza a clivagem das estruturas β -O-4 da lignina (BRUNOW *et al.*, 1993), uma das ligações de maior interesse na produção de celulose. Essas estruturas são mais fáceis de serem rompidas, possibilitando fazer a determinação dos fragmentos formados de ligações β -O-4 não condensadas da lignina. A técnica de acidólise em dioxano-água 82:18(v/v) com 0,1 N HCl sob refluxo é reconhecida como uma das técnicas mais comuns de análise de lignina (GELLERSTEDT, 1994a).

A técnica permite pequenas alterações na metodologia e é suficientemente representativa (LACHENAL, 2004). Em seu trabalho, LUNDQUIST e ERICSSON (1970) alteraram a concentração das soluções, a acidólise utilizou dioxano-água 9:1 (v/v) na presença de HCl de 0,005 a 0,2M, diferente do mencionado anteriormente, portanto a concentração das soluções está diretamente relacionada aos resultados, assim como cada material poderá reagir de forma diferente à concentração estabelecida.

A acidólise também pode ter resultados satisfatórios para a quantificação e caracterização da lignina. Um método de acidólise enzimática para preparação de lignina proposta por WU e ARGYROPOULOS (2003) foi aplicado para isolar a lignina de fibras de procedência não madeireira. (WU e ARGYROPOULOS, 2003; WANG e WU, 2006).

Segundo LIN e DENCE (1992), a acidólise é um método que degrada também a hemicelulose, que é uma das macromoléculas que compõem a madeira e que está situada na camada que fica entre a celulose e a lignina. A união entre a lignina e a hemicelulose forma o

complexo lignina-carboidrato (FIGURA 1). Na literatura é mostrado que a acidólise aquosa de madeira primeiramente causa a solubilização da reação de hemicelulose (HAHN-HAGERDAL, 2006; ARGYROPOULOS, 1994).

Madeiras de folhosas possuem uma nítida resistência à hidrólise ácida que pode ser devida a estrutura mais compactada da madeira (LI, 2010); as coníferas, por outro lado, têm menor resistência a hidrólise ácida.

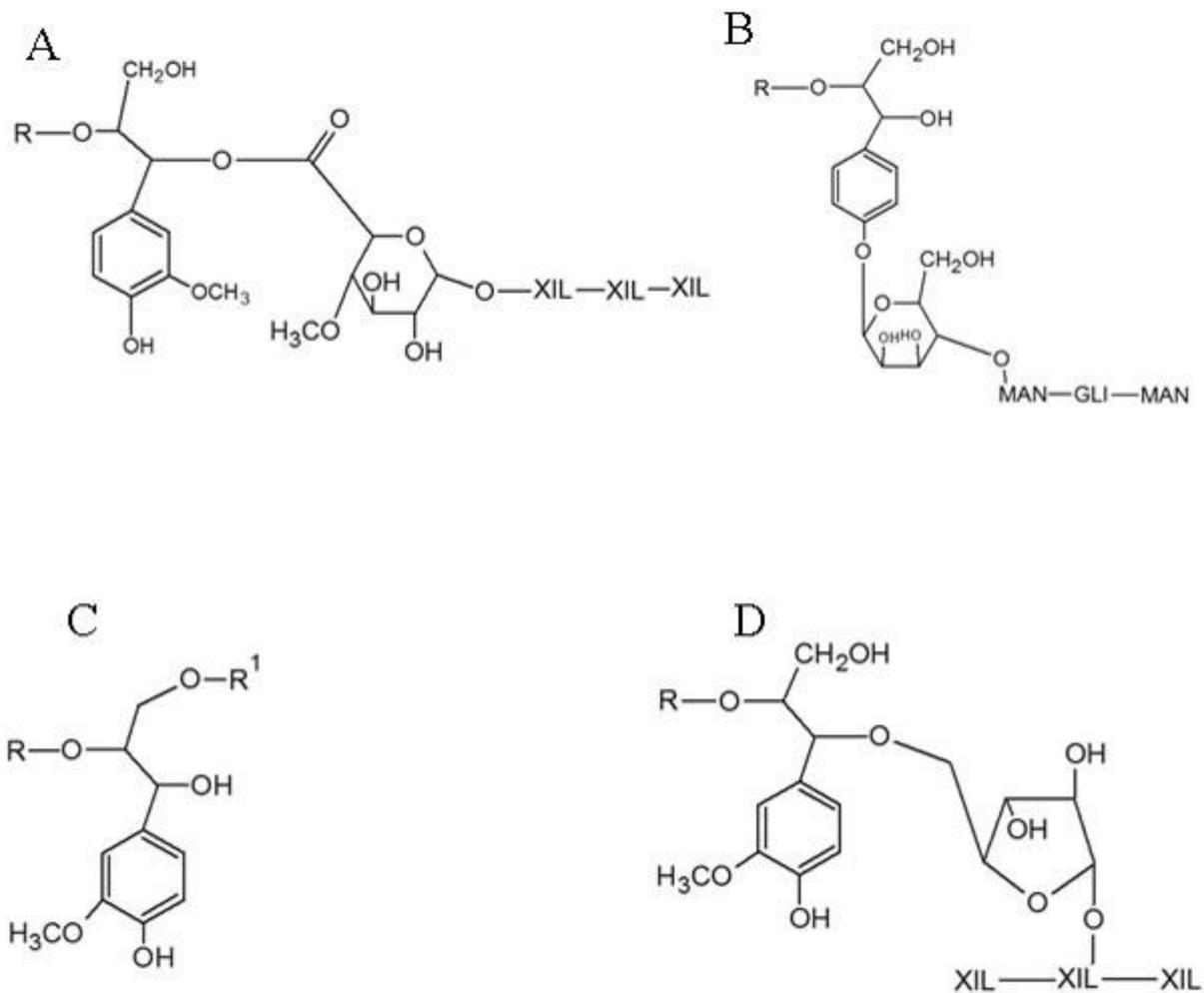


Figura 1: Tipos de ligação do complexo lignina-carboidrato descritas por Abreu (1994). A: Ligação éster (RCOOR) benzílica ; B: Ligação éter (ROR) fenólica ; C: Ligação éter em gama ; D: Ligação éter benzílica; R: Fenil propano R¹: Carboidrato .

LACHENAL *et al.* (1998) verificaram que a acidólise não é um método de isolamento de lignina, uma vez que as ligações β -O-4 são quebradas durante a reação, criando novas

estruturas fenólicas (FIGURA 2) e reduzindo o tamanho da molécula de lignina. Diferente do método de Klason que é capaz de isolar a lignina por degradar a celulose e hemicelulose, não fazendo somente quebra de ligações específicas, que é a característica da acidólise.

A lignina de madeira de folhosa possuindo uma alta razão de unidades siringil/guaiacil (S/G) invariavelmente mostra um alto conteúdo de ligações β -O-4, a qual é conhecida por resultar em uma estrutura linear relativa (ABREU *et al*, 2009). Em contraste, ligninas de coníferas, contendo principalmente unidades fenólicas guaiacil (G), é de baixo conteúdo de ligações β -O-4 com a maior abundância de estruturas ramificadas, fazendo mais ligações cruzadas (LI, 2010) visto que possui um maior conteúdo de sítio ativos disponíveis para ligação.

Segundo GELLERSTEDT *et al.* (1994b), a maioria das ligações presentes na lignina são do tipo fenilpropano- β -arila-éter, que são fragmentadas durante o cozimento *kraft* em quantidade maior que as unidades dos tipos condensadas. Conseqüentemente, assim como a análise de RMN da fração solúvel acetato de etila revelou a presença de 5-hidroximetilfurfural (148.71 ppm), acetol (148.4 ppm), 2-metoxi-4-metilfenol (139.96 ppm), catecol (138.94 ppm), e ácido acético (134.58 ppm), que são conhecidos por serem originados da reação de acidólise de polissacarídeos e lignina (PECINA, 1986; EHARA, 2005 ROMAN-LESHKOV, 2007; SIEVERS, 2009; LI, 2008; BINDER, 2009.) porque estas trocas químicas coincidem bem com aquelas de compostos identificados, anteriormente determinados (FU, 2007, 2008).

As reações de acidólise na presença de outros catalisadores de cloreto de hidrogênio (HCl) já foi estudado (Yasuda e Ota, 1987; KARLSSON *et al.*, 1988). Sucessivos estudos de degradação ácida da lignina forneceram conhecimento detalhado sobre as reações da lignina durante tratamentos com ácido (EDE e BRUNOW, 1989). Estudos da acidólise têm oferecido evidência para a ocorrência de elementos estruturais em ligninas de o β -O-4, β -5, β - β , β -1, gliceraldeído-2-arila-éter, 2 ariloxipropiofenone, cinamaldeído, ácido cinâmico, benzaldeido, o ácido benzóico, e tipos quinonóide (LIN e DENCE, 1992)

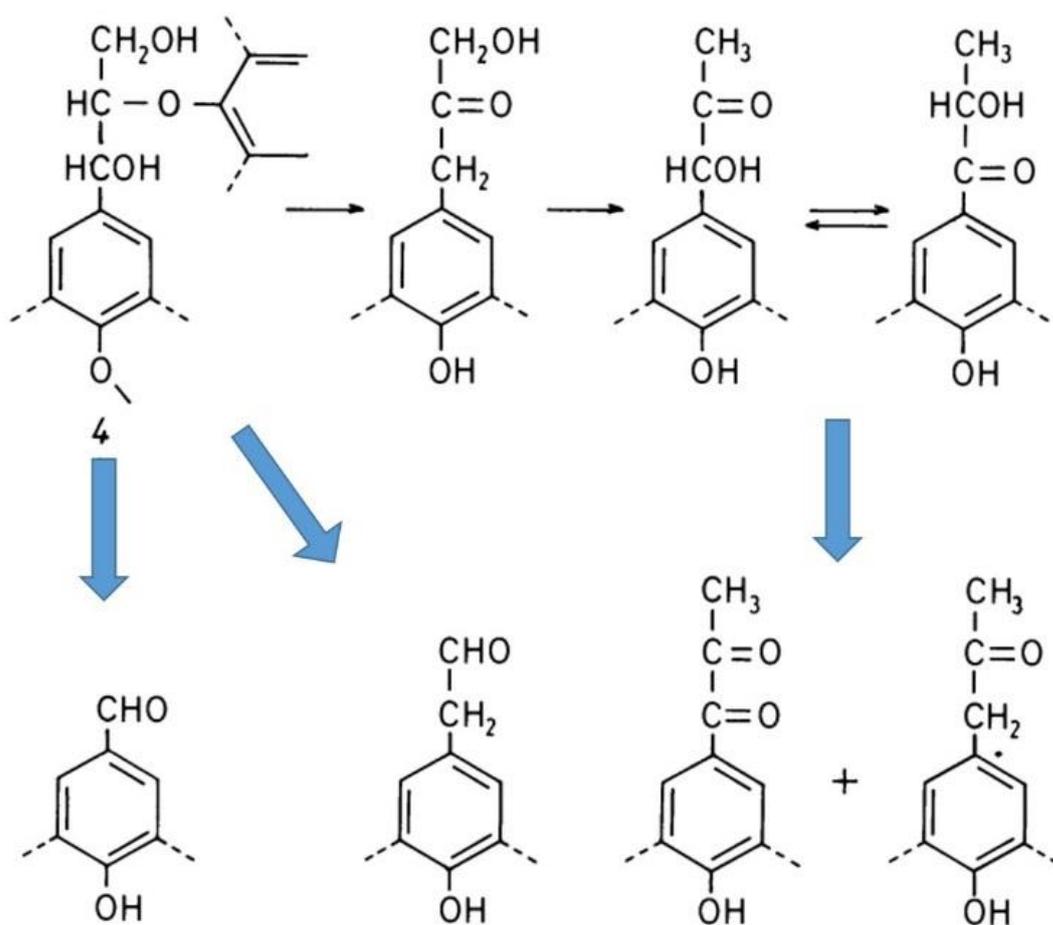


Figura 2: Fenóis monoméricos formados durante processo de acidólise na clivagem da ligação β -O-4 (LIN e DENCE, 1992).

A acidólise provoca a clivagem seletiva de éteres p-arila-glicerol-arila e alguns outros tipos de ligações de éter lábil, e esta tem sido utilizada em várias ocasiões, por exemplo, por KIRK e ADLER (1970). O tratamento de acidólise com reagente a 50 ° C (ADLER et al., 1968) tem sido utilizado em química lignina para a hidrólise seletiva de éteres benzil arilo não cíclicos.

2.4 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DO CARBONO 13 (RMN ^{13}C)

A espectroscopia por meio da ressonância magnética nuclear (RMN) é uma ferramenta analítica das mais valiosas para elucidar as estruturas moleculares dos componentes da parede celular, incluindo a lignina (RALPH et al., 1994; RALPH, 1998), pois possui uma alta resolução e especificidade (DANIELLE, 1982; KANITSKAYA et al. 1993; FUKAGAWA et

al., 1991;. RALPH *et al.*, 1999). A RMN é empregada tanto no estudo de ligninas extraídas (LU e RALPH, 1995) quanto em ligninas sintetizadas em laboratório (RALPH *et al.*, 1995).

A espectroscopia de RMN tem sido grandemente utilizada em estudos de análise estrutural de ligninas (HIMMELSBACH e BARTON II, 1980; HIMMELSBACH *et al.*, 1983; BARTON II, 1988; JUNG e HIMMELSBACH, 1989; SALIBA, 1998), isso se dá devido a sua capacidade de nos proporcionar a identificação de grupos funcionais. Os tipos de ressonância podem ser 2D, ^1H e ^{13}C como ferramenta de análise (RALPH *et al.*, 1999).

NIMZ (1976) apud MORAIS (1992), em estudos de lignina de madeira moída (LMM) da Faia (*Fagus sylvatica*), introduziu a RMN de ^{13}C para auxiliar na caracterização de ligninas. A presença de grupos metoxila em ligninas pode também ser avaliada por RMN de ^{13}C , apresentando sinais de ressonância do ^{13}C situados na região compreendida entre $\delta = 55$ a 57 (SALIBA, 2001). Esses sinais são extremamente importantes porque a metoxila compõe as unidades S e G da lignina.

A caracterização da estrutura de lignina de madeira moída por RMN de ^{13}C inclui bola de moagem, que permite tornar a lignina solúvel em solventes como dimetil sulfóxido-D-6. Foi confirmado que essa moagem anatomicamente destrói as paredes celulares de plantas (FENGEL *et al.*, 1978;. MAURER e FENGEL 1992; FUJIMOTO *et al.* 2005).

O método pode determinar com precisão as estruturas das sub-unidades monoméricas, os grupos funcionais e o tipo de ligações químicas presentes nas moléculas (BAPTISTA, 2006), permitindo elucidar as estruturas moleculares de várias substâncias que ocorrem na madeira (SOUZA *et al.*, 2011).

É um método não destrutivo usado para análise qualitativa e quantitativa (ROBERT, 1992), que apresenta como principais vantagens a preparação muito simples e a facilidade de obtenção de dados das mais variadas formas e tamanhos (CIENFUEGOS e VAITSMAN, 2000).

O uso da RMN ^{13}C para a verificação estrutural de substâncias da madeira, assim como outras técnicas espectroscópicas avançadas, trouxe avanços significativos para a compreensão estrutural de substâncias encontradas em plantas (AMARAL, 2014). Nos espectros de RMN ^{13}C da lignina, segundo NIMZ *et al.* (1984) é possível identificar quatro zonas principais distintas cujos sinais são atribuídos conforme descrição abaixo:

200 – 165 ppm: grupos carbonílicos e carboxílicos;

165 – 100 ppm: carbonos aromáticos e olefínicos;

100 – 50 ppm: carbonos alifáticos ligados a átomos de oxigênio;

50 – 10 ppm: carbonos dos grupos $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$ das cadeias alifáticas saturadas.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. OBTENÇÃO DA MADEIRA LIVRE DE EXTRATIVOS

Foram estudadas cinco árvores de advindas de plantio comercial localizado a 47°04'39" de longitude oeste e 22°53'20" de latitude sul, na cidade de Agudos – SP. A madeira da espécie *Pinus elliottii* foi identificada e tombada sob nos de registros 10191, 10192, 10193, 10194, 10195, na Xiloteca do Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

De cada indivíduo foram retirados três discos contendo ao menos um nó/galho. Amostras das regiões do nó e regiões livres de nó foram retiradas dos discos. Dessas amostras foram obtidos pequenos cavacos de madeira com o auxílio de um facão. Com a utilização de um moinho de facas (FIGURA 3: A) do tipo Wiley 340 (Modelo TE 040), os cavacos foram convertidos em serragem.

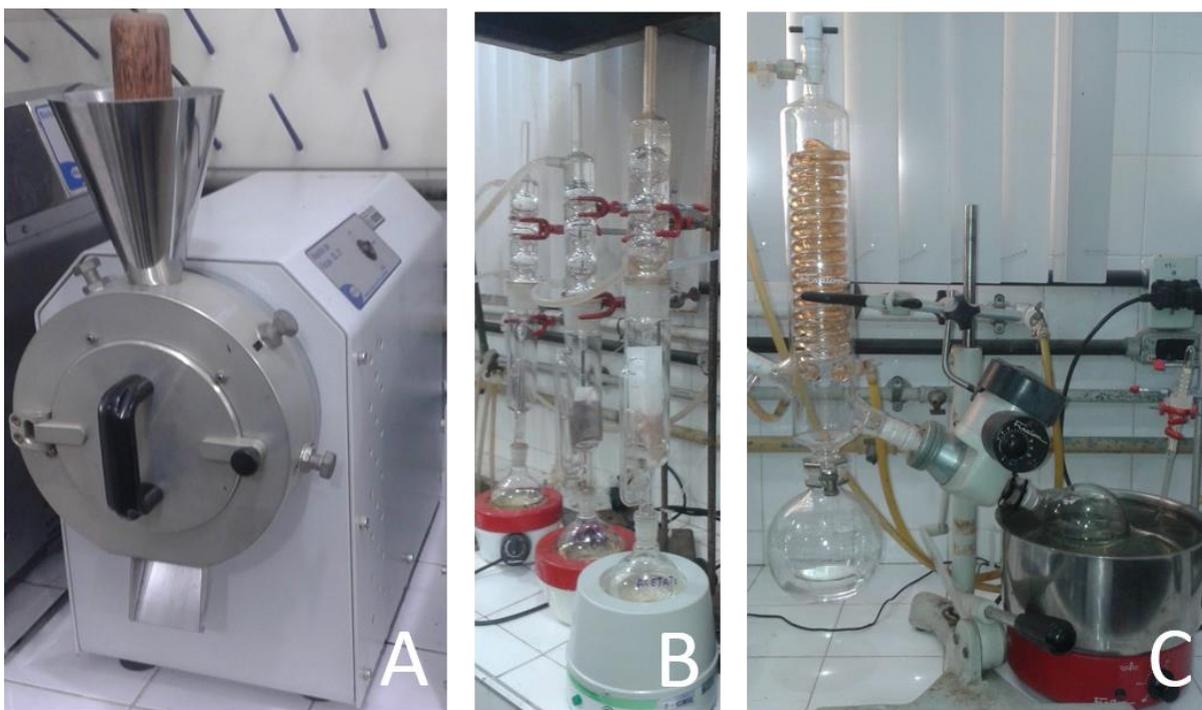


Figura 3: Equipamentos utilizados para a fase de extração da madeira. A: Moinho de facas; B: Sistema Soxhlet de extração; C: Rota-vapor.

No processo de extração do material, foi empregado o aparelho tipo Soxhlet (FIGURA 3: B), utilizando-se, separadamente, 25g de madeira moída e homogênea das partes do disco com e sem nó. O material foi acondicionado em cartucho confeccionado com papel-filtro e colocado dentro do tubo de extração. Os solventes foram colocados em balão de 500 mL, na

ordem crescente de polaridade (ciclohexano; acetado de etila; metanol). O tempo de extração para cada solvente foi de 24 horas ininterruptas (BROWNING, 1967).

Após esse período, o extrato foi concentrado em rotavapor (FIGURA 3: C) e os concentrados foram transferidos para um recipiente até a completa evaporação do solvente em temperatura ambiente. Após a completa evaporação do metanol do material em estufa a 105°C (FIGURA 4: A), a madeira livre de extrativos foi levada para um moinho de bolas (FIGURA 4: B) durante 24h até atingir a consistência de talco.

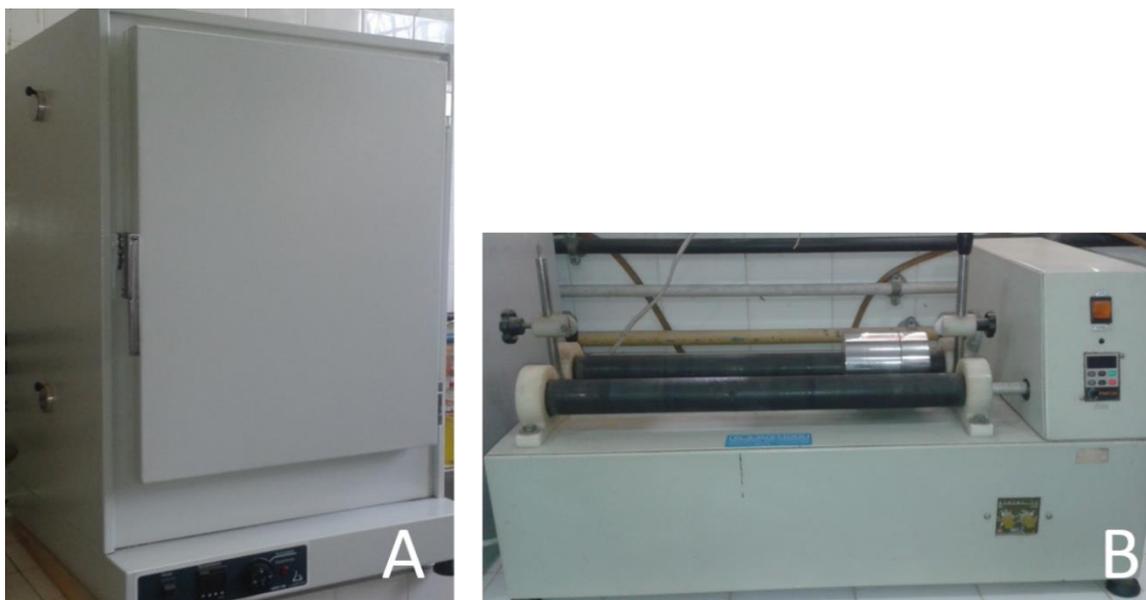


Figura 4: Equipamentos de secagem e maceração. A: Estufa; B: Moinho de bolas.

3.2. ACIDÓLISE

A acidólise foi feita utilizando o método descrito por LIN e DENCE (1992). A madeira livre de extrativos foi pesada com o auxílio da balança volumétrica de precisão com três casas decimais, foi coletado 0,2g de amostra e transferido para um balão volumétrico. Ao balão volumétrico, contendo o material moído pesado, foram adicionados 80 mL de 0,2M de HCl e 80mL de dioxano-água 9:1 (v/v). A solução dentro do balão foi agitada por uma barra magnética e aquecida com o auxílio de uma manta de aquecimento e o balão foi colocado dentro de um recipiente de porcelana contendo glicerina. A temperatura foi elevada a 90°C por quatro horas em uma estrutura composta por dois condensadores com uma bexiga contendo nitrogênio gasoso para evitar oxidação do material (FIGURA 5: A e B).

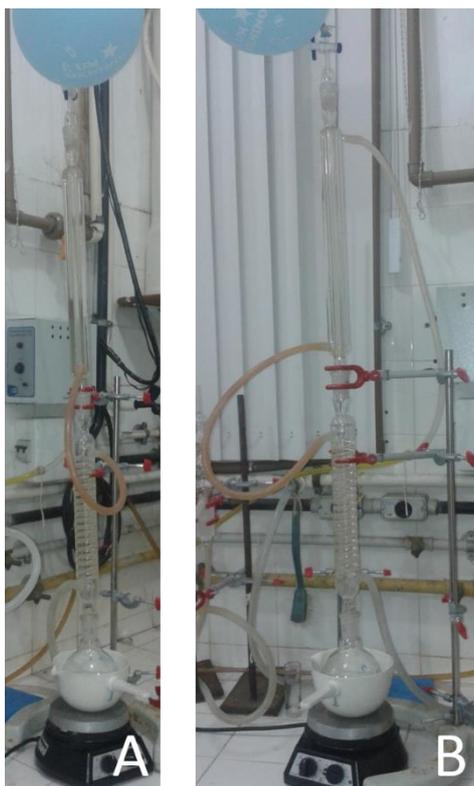


Figura 5: Sistema de refluxo utilizado para realizar a acidólise.

Após quatro horas, o material foi resfriado e, a solução teve seu pH ajustado em 3,5 com 0,4N de NaHCO_3 (bicarbonato de sódio) diluído em água. Com auxílio de um medidor de pH (FIGURA 6: A) e um agitador de barra magnética (FIGURA 6: B), a solução foi ajustada. Concluído o ajustamento do pH, foi realizada a extração com 400mL de clorofórmio dentro de um funil de separação, agitado por 30 segundos.

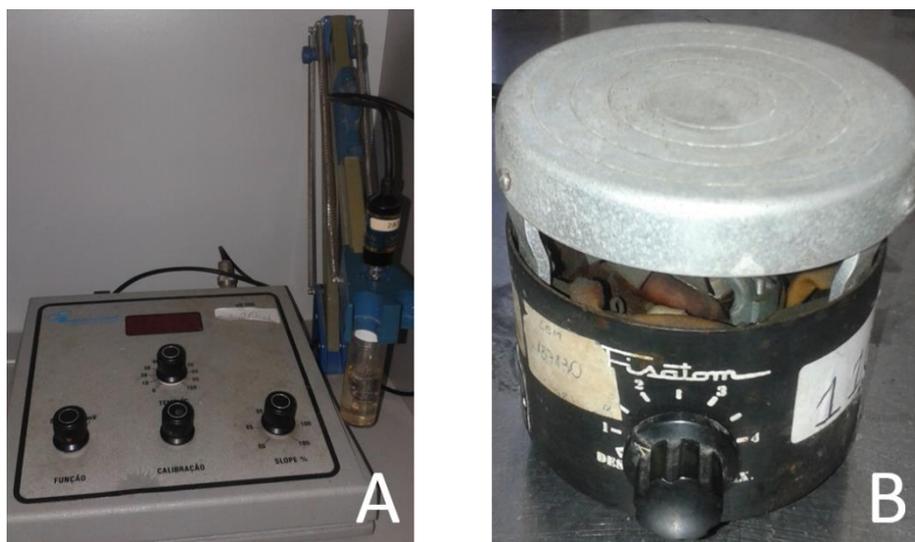


Figura 6: Equipamentos para ajuste de pH. A: Medidor de pH; B: Agitador de barra magnética.

A extração com clorofórmio foi feita por três vezes, retirando o extrato do clorofórmio que se depositava na parte inferior do funil (FIGURA 7: A). O extrato foi filtrado utilizando outro funil de separação fazendo-o passar por uma camada de sulfato de sódio anidrido e, posteriormente, uma camada de algodão e então o extrato foi recolhido em um novo balão volumétrico.

O extrato da acidólise foi concentrado utilizando um rota-vapor (FIGURA 3: C) e após a evaporação do clorofórmio foi recolhido em um recipiente de vidro o extrato concentrado. Em seguida, o recipiente foi colocado para secar por evaporação na capela, sendo o processo feito para regiões da madeira com e sem nó.



Figura 7: A: Funil de separação para extração com clorofórmio; B: Funil de separação em conjunto com um funil preenchido com algodão e sulfato de sódio anidrido

3.3. RMN ¹³C

Análise de Ressonância Magnética Nuclear do Carbono-13(RMN ¹³C) do produto da acidólise foi realizado junto ao Laboratório de Química, Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), em espectrômetro modelo DRX-500 operando a 125 MHz para o núcleo do ¹³C. Foram obtidos espectros RMN ¹³C das regiões de nós a 50% da altura comercial. Para efeito de comparação também foram obtidos espectros de RMN ¹³C da madeira livre de nós de regiões às mesmas alturas.

O material foi submetido à análise de ¹³C em estado líquido, diluído em clorofórmio deuterado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A FIGURA 8 contém os resultados dos espectros da região com nó e sem nó. Pode-se observar uma diferença no número de sinais em ambos os espectros, tendo o material com nó um maior número de picos. A interpretação dos espectros foi feita baseado nos estudos de LIN e DENCE (1992), WEN (2013) e AMARAL (2014)

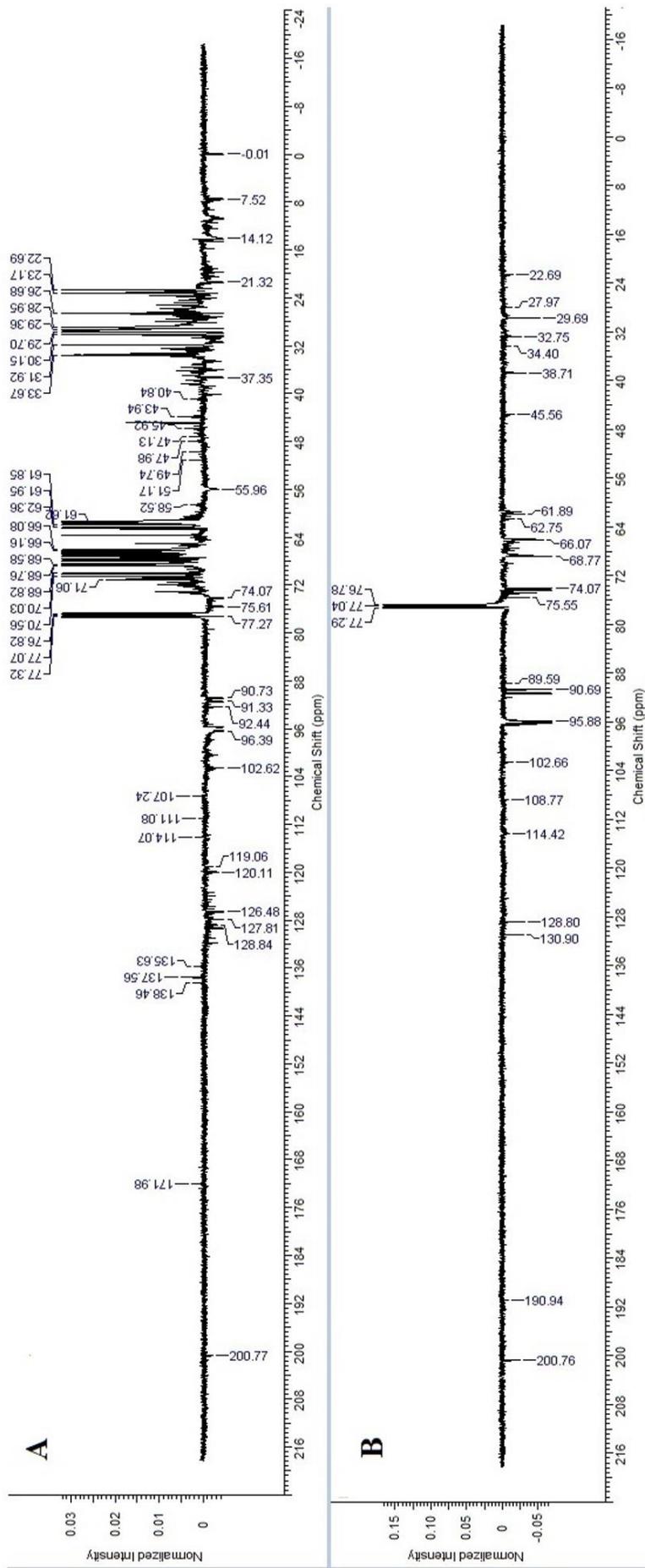


Figura 8: Espectros de Ressonância Magnética Nuclear do ^{13}C do material com nó (A) e material sem nó (B).

4.1. MATERIAL COM NÓ

O material com nó demonstrou maior complexidade devido a um número maior de sinais no espectro.

Tabela 1: Sinais de ^{13}C obtidos na amostra A (com nó presente).

No	(ppm)	Atribuição
1	20-38	CH_3 e $-\text{CH}_2$ em cadeias alifáticas saturadas (AMARAL, 2014)
2	14.0 - 29.2	CH_3 em cadeia <i>n</i> -propila; grupo CH_3 ou CH_2 em cadeia saturada; CH_2 em cadeia saturada alifática (WEN, 2013)
3	55,96	Metoxila da lignina (AMARAL, 2014)
4	61.83 - 61.95	C_6 da celulose cristalina; C_6 da celulose não cristalina; C_6 da hemicelulose; $-\text{OC}_\gamma\text{H}_2$ da lignina (AMARAL, 2014)
5	62.44	C_γ em unidade G tipo β -5, β -1 (WEN, 2013)
6	63.67	C_γ em unidades G tipo β -O-4 com $\text{C}_\alpha=\text{O}$ (WEN, 2013)
7	71.06	C_2 , C_3 e C_5 de celulose e hemicelulose (AMARAL, 2014); C_γ em unidades G tipo β -O-4 com $\text{C}_\alpha=\text{O}$ (WEN, 2013); C_α em β -O-4 G e S threo (LIN e DENCE, 1992)
8	111.08	C_2 em unidades G (WEN, 2013); C_2 em unidades G (LIN e DENCE, 1992)
9	114.07	C_5 e C_6 da lignina guaicólica (AMARAL, 2014); C_3/C_5 em benzoato de unidades H (LIN e DENCE, 1992)
10	120.3	C_6 em unidades G eterificadas e não eterificadas (LIN e DENCE, 1992)
11	126.3	C_β em cinamaldeído (LIN e DENCE, 1992)
12	128.84	C_α e C_β em $\text{Ar}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH}$, C_2/C_6 em unidades H; (WEN, 2013); C_α e C_β em $\text{ARCH}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH}$ (LIN e DENCE, 1992)
13	135.63	C_1 em lignina guaiacólica (AMARAL, 2014); C_1 em G β -O-4 eterificada (LIN e DENCE, 1992)
14	137.7	C_1 em S β - β (LIN e DENCE, 1992)
15	138,46	C_4 , S eterificada (WEN, 2013); C_1 em S β -O-4
16	171,98	Carboxila do éster de hemicelulose (AMARAL, 2014); $\text{C}=\text{O}$ em RCOOR alifático (LIN e DENCE, 1992)
17	210-200	não-conjugado $\text{C}=\text{O}$ em cetonas (LIN e DENCE, 1992)

CHEN (1988) também encontrou grupo metoxila (OCH_3) em seu trabalho com lignina de piaçava entre os picos 55-58 (ppm). Há evidência de lignina do tipo G devido ao sinal correspondente a metoxila.

Pode ser identificado a unidade H (FIGURA 9: A), e a unidade G em uma ligação β -1 (FIGURA 9: B), que compõem a lignina presente. Os sinais correspondentes às unidades S podem ser devidos a falta de precisão do espectro devido a amostra conter muitas substâncias e o pico gerado não ter grande intensidade.

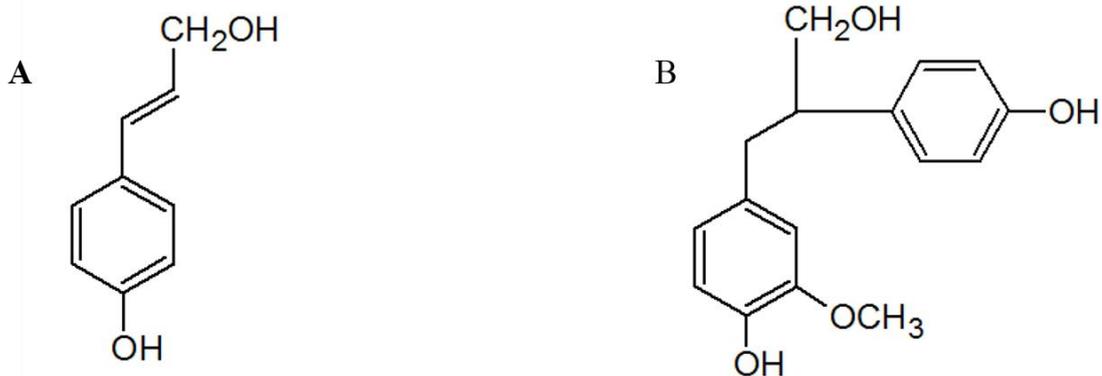


Figura 9: Sinais identificados nas moléculas presentes. A: Sinais identificados na unidade H; B: Unidade G formando uma ligação β -1;

A acidólise não foi capaz de degradar toda a celulose e hemicelulose presente no material, como pode ser visto na TABELA 1. Com base na TABELA 1, foi encontrado ligações do tipo β -5 (FIGURA 10: A) e β -O-4 (FIGURA 10: B) em unidades G.

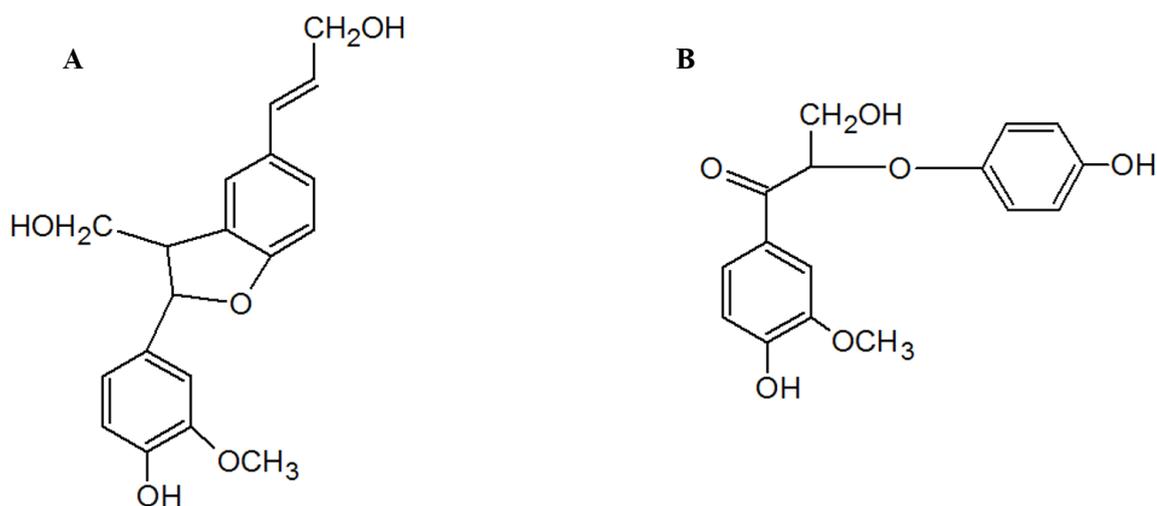


Figura 10: Sinais encontrados na molécula presente. A: Ligação β -5 na unidade G; B: Ligação β -O-4 com unidade G;

Foi identificado a presença de cinamaldeído (FIGURA 11), LIN e DENCE (1992) atribuem ao pico 126.3 (ppm; TABELA 1) essa função orgânica.

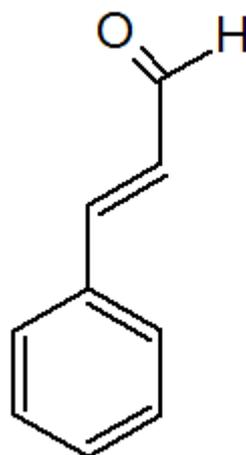


Figura 11: Cinamaldeído

4.2. MATERIAL SEM NÓ

Como pode ser observado na TABELA 2, o número de sinais foi menor, com ligação β -1 e β -5.

Tabela 2: Sinais de ^{13}C obtidos na amostra B (sem nó).

No	ppm	Atribuição
1	22.69 - 38.71	CH_3 e $-\text{CH}_2$ em cadeias alifáticas saturadas (AMARAL, 2014)
2	61.89	C_6 da celulose cristalina, da não cristalina da hemicelulose e ao $-\text{OC}_\gamma\text{H}_2$ da lignina; (AMARAL, 2014)
3	114.42	C_5 e C_6 da lignina guaiacólica. (AMARAL, 2014)
4	29.69	C em cadéias alifáticas; (WEN, 2013)
5	62.75	C_γ em unidades β -5 e β -1 do tipo G; (WEN, 2013)
6	114.42	C_5 nas unidades G; (WEN, 2013); C-3/C-5 em benzoato de unidades H (LIN e DENCE, 1992)
7	128.80	C_α e C_β em $\text{Ar}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH}$ ou C_2/C_6 em unidade do tipo H. (WEN, 2013); C_α e C_β em $\text{ARCH}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH}$ (LIN e DENCE, 1992)

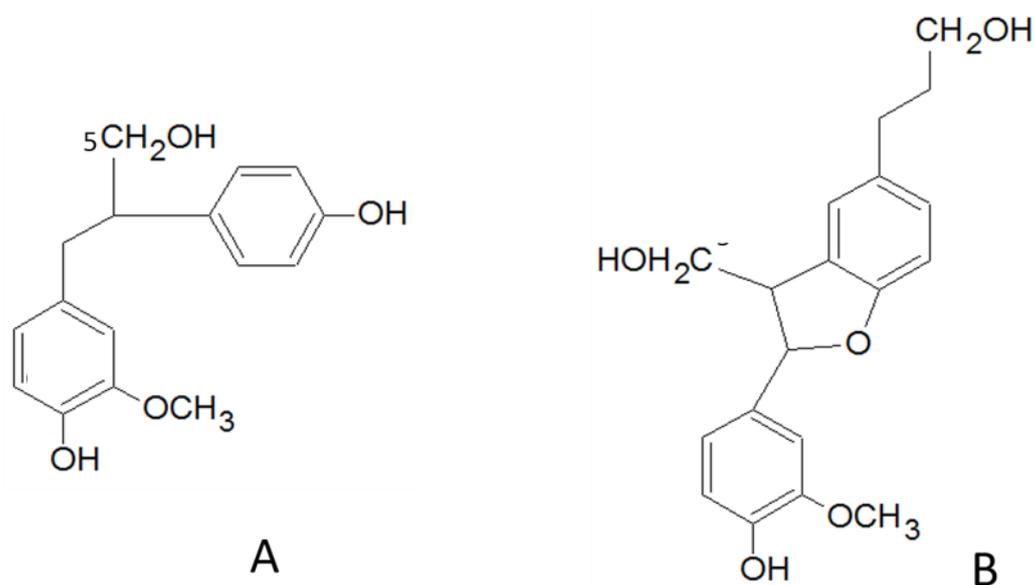


Figura 12: A Ligação β -1 com unidade G. B: Ligação β -5 com unidade G e unidade H.

Há evidências de unidades G (FIGURA 12: A e B) e ausência da unidade H. A acidólise não degradou totalmente a celulose e a hemicelulose, assim como ocorreu no material com nó. A presença da hemicelulose e lignina corroboram para a existência de complexos lignina-carboidratos na amostra analisada.

O espectro não revelou a existência de ligações β -O-4 nesta amostra, nem os sinais de metoxila foram revelados pelo espectro, porém estão implícitos, visto que há presença de unidade do tipo G, que possui metoxila.

Somente ligações β -1(FIGURA 12: A) e β -5 (FIGURA 12: B) ocorreram foram reveladas no espectro (TABELA 2).

Os resultados descritos por LIN e DENCE (1992) com AMARAL (2014) e WEN (2013) com relação ao pico 114. Para LIN e DENCE (1992) o sinal é atribuído ao benzoato da unidade H, enquanto AMARAL e WEN o atribuem a unidade G.

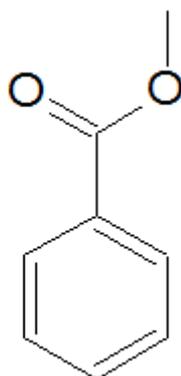


Figura 13: Benzoato de unidade H referente ao oitavo sinal.

AMARAL (2014) utilizou madeiras de *Pinus elliotii* como objeto de estudo fazendo ressonância magnética nuclear do ^{13}C , comparando diferentes seções ao longo do tronco. A atribuição dos sinais (TABELA 3) permite uma caracterização da estrutura molecular do material.

Tabela 3: Sinais indicando os deslocamentos químicos (ppm) de átomos de carbono no espectro RMN do ^{13}C de nós de *P. elliotii* var. *elliotii*, observados por AMARAL, 2014

Base (ppm)	Meio (ppm)	Topo (ppm)	Atribuições (adaptado de Baptista, 2006; Souza <i>et al.</i> 2011)
171,9	171,6	171,7	Carboxila do éster de hemicelulose
149,7	149,7	149,8	C ₃ da lignina guaiacólica
149,4	149,7	149,4	C ₃ de lignina guaiacólica
147,72	147,6	-	C ₁ e C ₄ de lignina guaiacólica
146,4	146,4	-	C ₄ da lignina guaiacólica
146,4	146,3	146,3	C ₄ de lignina guaiacólica
135,1	135,3	135	C ₁ em lignina guaiacólica
133,1	133	133	C ₁ em lignina guaiacólica
132,55	132,5	132,49	C ₂ da lignina guaiacólica
119,15	119,2	119,2	C ₆ da lignina guaiacólica
113,57	113,57	113,5	C ₅ e C ₆ da lignina guaiacólica
111,8	111,9	111,9	C ₂ de lignina guaiacólica
104,47	104,39	104,47	OC _β H ₂ da lignina

88,5	88,51	88,5	C ₄ da celulose cristalina
84,1	84	84	C _β em unidade guaiacólica
81,83	81,83	81,9	C ₄ da celulose não cristalina e
74,29	74,29	74,31	hemicelulose e -OC _β H ₂ da lignina
71,74	71,76	71,7	C ₂ , C ₃ e C ₅ de celulose e hemicelulose
64,46	64,46	64,39	C ₂ , C ₃ e C ₅ da celulose e C _α H ₂ da lignina
61,79	61,79	61,73	C ₆ da celulose cristalina; C ₆ da celulose não cristalina; C ₆ da hemicelulose; -OC _γ H ₂ da lignina
-	55,8	-	O- CH ₃
55,44	55,44	55,41	Metoxila da lignina
20-38	20-38	20-38	CH ₃ e - CH ₂ em cadeias alifáticas saturadas

Na TABELA 4, os sinais dos espectros são referentes à uma comparação da lignina acetilada e não acetilada, descritos por WEN (2013).

Tabela 4: Sinais de Ressonância Magnética Nuclear comparados aos sinais obtidos a partir de lignina acetilada e não acetilada (WEN, 2013)

ppm	Atribuição	ppm	Atribuição
166.5	C ₉ em <i>p</i> -coumarato (PCE)	123.0	C ₆ , FE ester
160.0	C ₄ em PCE	122.6	C ₁ e C ₆ em unidades Ar-C(=O)C-C
144.7	C ₇ em PCE	119.4	C ₆ em unidades G
130.3	C ₂ /C ₆ em PCE	118.4	C ₆ em unidades G
125.1	C ₁ em PCE	115.1	C ₅ em unidades G
116.0	C ₃ / C ₅ em PCE	114.7	C ₅ em unidades G
115.0	C ₈ em PCE	111.1	C ₂ em unidades G
152.5	C ₃ /C ₅ , unidade S eterificada S	110.4	C ₂ em unidades G
149.7	C ₃ , unidade G eterificada	106.8	C ₂ /C ₆ , S com α-CO
148.4	C ₃ , unidade G	104.3	C ₂ / C ₆ , unidades S
148.0	C ₃ , unidade G	86.6	C _α em unidades G tipo β-5

146.8	C ₄ , G eterificada	84.6	C _β em tipo G de unidade β-O-4 (<i>threo</i>)
145.8	C ₄ , não eterificada G	83.8	C _β em tipo G de unidades β-O-4 (<i>erythro</i>)
145.0	C ₄ , eterificada 5-5	72.4	C _γ em β-β; C _γ , β-arila éter
143.3	C ₄ , não eterificado 5-5	71.8	C _α em tipo G de unidades β-O-4 (<i>erythro</i>)
138.2	C ₄ , S eterificada	71.2	C _α em tipo G de unidades β-O-4 (<i>threo</i>)
134.6	C ₁ , S eterificada; C ₁ , G eterificada	63.2	C _γ em unidades G tipo β-O-4 com α-C=O
133.4	C ₁ , S não- eterificada; C ₁ , G não-eterificada	62.8	C _γ em unidade G tipo β-5, β-1 units
132.4	C ₅ , eterificada 5-5	60.2	C _γ em unidades G tipo β-O-4
131.1	C ₁ , não-eterificado 5-5	55.6	C em Ar- OCH ₃
129.3	C _β em Ar-CH=CH-CHO	53.9	C _β em unidades β-β
128.0	C _α e C _β em Ar-CH=CH- CH ₂ OH	53.4	C _β em unidades β-5 units
128.1	C ₂ /C ₆ , em unidades H	36.8	Grupo CH ₃ , cetonas (conj) ou em alifático
125.9	-5/ C ₅ ' em não-eterificado 5-5	29.2	CH ₂ em cadeia alifática
122.6	C ₁ e C ₆ em Ar-C(=O)C-C	26.7	Grupo CH ₃ ou CH ₂ em cadeia saturada
125.9	C ₅ , não eterificado 5-5	14.0	C _γ H ₃ em cadeia <i>n</i> -propila

Lin e Dence (1992), em seu livro fazem análise do ¹³C de lignina de madeira moída, atribuindo aos sinais dos espectros (TABELA 5) suas funções orgânicas.

Tabela 5: Baseado nos estudos de LIN e DENCE (1992), também pode-se observar as seguintes atribuições:

δ em ppm	Atribuição	δ em ppm	Atribuição
210-200	não-conjugado C=O em cetonas	128.3-129.3	C _α e C _β em ARCH=CH-CH ₂ OH

194	C _γ HO em cinamaldeído	126.3	C _β em cinamaldeído
191.6	C _α HO em benzaldeído	121.5	C ₁ em benzoato de unidades H
171-173	C=O em RCOOR alifático	120.3	C ₆ em unidades G eterificadas e não eterificadas
165-167	C _α =O em ArCOOH	115.2	C ₅ em unidades G eterificadas e não eterificadas
162	C ₄ em Ar-COOH	114.6	C ₃ / C ₅ em benzoato de unidades H
152.9	C ₃ / C ₃ ' em eterificado unidades 5-5	111.4	C ₂ em unidades G
152.6	C _α em cinamaldeído	110.9	C ₂ em G-G unidades de estilbenos
152.1	C ₃ /C ₅ em S β-O-4	106.8-107	C ₂ / C ₆ em S com C _α =O ou C _α =C
149.1	C ₃ unidade G eterificada	104.5-106.8	C ₂ / C ₆ em S em geral
147.4	C ₄ em unidade G eterificada	103.6	C ₂ / C em β-β
147.1	C ₃ /C ₅ em S β-O-4 não eterificada	87.2	C _β em S β-O-4 threo
146.9	C ₃ em G não eterificada	87.2	C _α em β-5
145.3	C ₄ em G β-O-4 não eterificada	86	C _β em β-O-4 erythro
143.4	C ₄ /C ₄ ' em unidades 5-5 não eterificadas	85.3	C _α em β-β
138	C ₁ em S β-O-4 eterificada	84.5	C _β em G β-O-4threo
137.7	C ₁ em S β-β	83.5	C _β em G β-O-4 erythro
135.3	C ₁ em G β-O-4 eterificada	80-82	C _β e C _α β-O-4/ unidades C _α -O-4
134	C ₄ em S β-O-4eterificada e não eterificada	72.5	C _α em β-O-4 G e S erythro
133	C ₁ em G β-O-4 não eterificada	71.8	C _α em β-O-4 G e S erythro
132.4	C ₅ /C ₅ ' em unidades 5-5, C ₁ em S β-O-4 não eterificada	71.8	C _α em β-O-4 G e S threo
131	C ₂ / C ₆ em benzoato de unidades H	71.4	.C _α em β-O-4 G e S threo

5. CONCLUSÃO

Houve diferenças significativas entre os sinais do material com nó e sem nó em relação a análise de ^{13}C . No material sem nó não houve ocorrência de unidade H de ligações $\beta\text{-O-4}$, isso indica que há menor resistência a acidólise no material sem nó. O material com nó se mostrou mais resistente a acidólise, não sendo indicado para produção de celulose.

6. REFERÊNCIAS

- ADLER, E.; MIKSCH, G.E.; JOHANSSON, B. Über die Benzyl arylatherbindung im Lignin. I. Freilegung von phenolischem Hydroxyl in Ligninpräparaten durch Spaltung leicht hydrolysierbarer Alkyl-arylaterstrukturen. *Holzforschung*. 1968. 22: 171-174p
- ABREU, H. S. Biossíntese da lignina. In: **Complexos Lignina-carboidratos**. 1. ed. Rio de Janeiro: EDUR. 1994. Cap. 7. P 54-59.
- ABREU, H. S.; LATORRACA, J. V. F.; PEREIRA, R. P. W.; MONTEIRO, M. B. O.; ABREU, F. A.; AMPARADO, K. F. Supramolecular proposal of lignin structure and its relation with the wood properties. *An. Acad. Bras. Cienc.* 2009, *81*, 137.
- AMARAL, D. **ANATOQUÍMICA DE NÓS DE *Pinus elliottii* var. *elliottii***. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal), 2014. 153 f. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- ARGYROPOULOS, D. S. Quantitative phosphorus-31 NMR analysis of lignins, a new tool for the lignin chemist. *J. Wood Chem. Technol.* 1994, *14*, 45.
- ARGYROPOULOS, D. S.; SUN, Y.; PALUS, E. Isolation of residual kraft lignin in high yield and purity. *Journal of Pulp and Paper Science*, Montreal, v. 28, n. 2, p. 50-54, 2002.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12.297 (NB-1381)**: madeira serrada de coníferas provenientes de reflorestamento, para uso geral: medição e quantificação de defeitos. Rio de Janeiro, 1991. 6 p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12.551**: madeira serrada: terminologia. Rio de Janeiro, 2001. 10 p.
- BAPTISTA, C. M. C. **Influência das condições de cozimento sobre a estrutura da lenhina e a branqueabilidade da pasta kraft de *Pinus pinaster***. 481 p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade da Beira Interior, Lisboa, 2006.
- BARTON II, F.E. Chemistry of lignocellulose: Methods of analysis and consequences of structure. *Anim Feed Sci Technol*, v.21, p.279-286, 1988.
- BINDER, J. B.; RAINES, R. T. Simple Chemical Transformation of Lignocellulosic Biomass into Furans for Fuels and Chemicals. *J. Am. Chem.Soc.* 2009, *131*, 1979.
- BROWNING, B.L. **Methods of wood chemistry** – Interscience Publishers – New York, v.2. 800 p, 1967.
- BRUNOW, G.; LUNDQUIST, K.; GELLERSTEDT, G. **Lignin**. 4th ed., Dence: New York, 1993.612 p
- BUKSNOWITZ, C.; HACKSPIEL, C.; HOFSTETTER, K.; MÜLLER, U.; GINDL, W.; TEISCHINGER, A.; KONNERTH, J. Knots in trees: strain distribution in a naturally optimised structure. *Wood Science and Technology*, v. 44, p. 389-398, 2010.

CADEMARTORI, P.H.G.; GATTO, D.A.; STANGERLIN, D.M.; SCHNEID, E. , HAMM, L.G. QUALIDADE DA MADEIRA SERRADA DE *Pinus elliottii* ENGELM. PROCEDENTE DE FLORESTAS RESINADAS. *Cerne*, Lavras, v. 18, n. 4, p. 577-583, out./dez. 2012

CANILLAC, N.; MONREY, A. Sensitivity of *Listeria* to silver fir and maritime pine essential oils. *Sci. Aliments*, 14, 403-411, 1996.

CHEN, C. L.; Robert, D. In *Methods in Enzimology*, 161, Wood, W. A.; Kellog, S. T., Eds.; **Academic Press**; NewYork, 1988, p. 137.

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. **Análise instrumental**. Rio de Janeiro: Interciência; 2000. 606 p.

DANIELLE, R. Quantitative analysis of lignins by ¹³C NMR analysis, In: **Extended Abstracts: Canadian Wood Chemistry Symposium**, Chemical Institute of Canada / Technical Section, CPPA, Niagra Falls, Ontario, Canada, Sept. 13-15, 1982. pp. 63-66.

EDE, R.M.; BRUNOW, G. Formic acid/ peroxyformic acid pUlping. II. Synthesis of 3-aryl-2,3- dihydro-7-methoxy-2-benzofuranmethanols - model compounds for lignin acidolysis products. *Holzforschung* 1989. 43: p. 127-129

EHARA, K.; TAKADA, D.; SAKA, S. GC-MS and IR spectroscopic analyses of the lignin-derived products from softwood and hardwood treated in supercritical water. *J. Wood Sci.* 2005, 51, 256 p.

EMPRAPA. Cultivo de *Pinus*. **Sistemas de Produção**, 5. 2 ed, 2011. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 13 mar. 2014.

FENGEL, D., STOLL, M., AND WEGENER, G. (1978). "Studies on milled wood lignin from spruce Part II. Electron microscopic observations on the milled wood," *Wood Sci. Technol.* 12(2), 1978. 141p.

FU, Q.; ARGYROPOULOS, D. S.; TILOTTA, D.; LUCIAN., L. A. Elucidation of Products and Functional Group Distributions in Pyrolysis Oils of CCA Treated Wood Using a Novel ³¹P NMR Based Method. *Ind. Eng. Chem.Res.* 2007, 46, 5258

FU, Q.; ARGYROPOULOS, D. S.; TILOTTA, D.; LUCIAN, L. A. Understanding the Pyrolysis of CCA-Treated Wood, Part I. Effect of Metal Ions. *J.Anal. Appl. Pyrolysis* 2008, 81, 60.

FUJIMOTO, A.; MATSUMOTO, Y.; CHANG, H. M.; MESHITSUKA, G. (2005). Quantitative evaluation of milling effects on lignin structure during the isolation process of milled wood lignin, *J. Wood Sci.* 51, 2005. p 89-97.

FUKAGAWA, N., MESHITSUKA, G., AND ISHIZU, A. A two-dimensional NMR study of birch milled wood lignin. *J. Wood Chem. Technol.* 11(3), 1991. p, 373-396.

GELLERSTEDT, G.; J. PRANDA, J.; LIN E.L. **Molecular properties of residual birch Technol.** 14 (4). 1994a. p. 467–482.

GELLERSTEDT, G.; PRANDA, J.; LINDFORS, E-L. Structural and molecular properties of residual birch kraft lignins. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 14,n. 4, p. 467-482.1994b.

HAHN-HAGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDEN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanols. The fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends Biotechnol.** 2006, 24, 549 p.

HIMMELSBACH, D.S., BARTON II, F.E. ¹³C Nuclear magnetic resonance of grass lignins. **J Agric Food Chem**, v.28, p.1203-1208, 1980.

HIMMELSBACH, D.S., BARTON II, F.E., WINDHAM, W.R. Comparison of carbohydrate, lignin and protein ratios between grass species by cross polarization-magic angle spinning carbon-13 nuclear magnetic resonance. **J Agric Food Chem**, v.31, p.401-404, 1983.

HOADLEY, R. B. **Understanding wood: a craftsman's guide to wood technology.** The Taunton Press, 293 p, 2000.

HOLMBOM, B.; ECKERMAN, C.; EKLUND, P.; HEMMING, J.; NISULA, L.; REUNANEN, M.; SJÖHOLM, R.; SUNDBERG, A.; SUNDBERG, K.; WILLFÖR, S. Knots in trees – A new rich source of lignans. **Phytochemistry Reviews**, n. 2, p. 331-340, 2003.

HOO, L.H.; SARKANEN, K.V.; ANDERSON, C.D. (1983) Formation of C¹³C¹³-enol ethers in the acidcatalyzed hydrolysis of erythro-veratrylglycerol-p-(2-methoxyphenyl) ether. **J Wood Chem Technol** 1983. 13: p. 223-243

IBÁ - Indústria Brasileira de Árvores. **Relatório de 2015. cap. 5. Áreas de Árvores Plantadas.** São Paulo.2015. 77p.

JUNG, H.J.G., HIMMELSBACH, D.S. Isolation and characterization of wheat straw lignin. **J Agric Food Chem**, v.37, p.81-87, 1989.

KANITSKAYA, L. V.; MEDVEDEVA, S. A.; ZAKAZOV, A. N.; ROKHIN, A. V.; BABKIN, V. A.; KALABIN, G. A. Quantitative ¹H, ¹³C NMR spectroscopy of lignin, In: **Proceedings of the 7th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry**, Beijing, China, May 25-28, Vol. III, 1993. p. 489-494.

KARLSSON, O.; LUNDQUIST, K.; MEULLER, S.; WESTLID, K. On the acidolytic cleavage of arylglycerol aryl ethers. **Acta Chern Scand.**1988. B42: p. 48-51

KIRK, T.K.; ADLER, E. Methoxyl-deficient structural elements in lignin of sweetgum decayed by a brown-rot fungus. **Acta Chern Scand**1970 24: p. 3379-3390

LACHENAL, D.; SEVILLANO, R. M.; GEORGE, J. Understanding the structure of residual lignin. A key to process in pulping and bleaching. In: FORUM ASSOCIATE MEMBERS, 3., 1998, Grenoble. Anais... Grenoble: CTP, 1998. 15 p.

LACHENAL, D.; Isolation of residual lignin from softwood kraft pulp. Advantages of the acetic acid acidolysis method; **C. R. Biologies** 327 (2004) 911–916 p.

LI, B.; Acidolysis of Wood in Ionic Liquids, **Ind. Eng. Chem. Res.** 2010, 49, p. 3126–3136

LI, B.; ASIKKALA, J.; FILPPONEN, I.; ARGYROPOULOS, D. S. Factors Affecting Wood Dissolution and Regeneration of Ionic Liquids **Ind. Eng. Chem. Res.** 2010, DOI: 10.1021/ie901560p.

LI, C.; WANG, Q.; ZHAO, Z. K. Acid in ionic liquid: An efficient system for hydrolysis of lignocelluloses. **Green Chem.** 2008, 10, 177 p.

LIN, S. Y.; DENCE, C. W. Methods In Lignin Chemistry. In: LUNDQUIST, K. **Acidolysis**; 1. Ed. *New York*: State University of New York: College of Environmental Science and Forestry, 1992. Cap 6. p. 289-298

LIN, S. Y.; DENCE, C. W. Methods In Lignin Chemistry. In: D. ROBERT. **Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry**; 1. Ed. *New York*: State University of New York: College of Environmental Science and Forestry, 1992. Cap 5.4. p. 250-271

LIS-BALCHIN, M.; DEANS, S. G.; EAGLESHAM, E. Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. **Flavour Fragr. J.**, 13, 98-104, 1998.

LU, F.; RALPH, J. ¹³C NMR studies on a new method for lignin characterization. Madison: United States Department of Agriculture, Dairy Forage Research: Center. Research Summaries. 1995. p. 45-46.

LUNDQUIST, K.; ERICSSON, L. Acid degradation of lignin. III. Formation of formaldehyde. *Acta Chern Scand* 1970. 24:3681-3686

MORAIS, S.A.L. **Contribuição ao estudo químico e espectroscópico da lignina de madeira moída do Eucalyptus grandis: Isolamento, quantificação e análise estrutural.** Belo Horizonte, 1992. 260p. Tese (Doutorado em Química) - UFMG/ICEx, 1992.

MAURER, A., AND FENGEL, D. On the origin of milled wood lignin. Pt. 1: The influence of ball-milling on the ultrastructure of wood cell walls and the solubility of lignin. *Holzforschung* 46(5), 1992. p. 417.

NIMZ, H. H.; TSCHIRNER U.; STÄHLE, M.; LEHMANN, R.; SCHLOSSER, M. Carbon-13 NMR spectra of lignins, comparison of structural units in spruce and beech lignin. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 4, n. 3, p. 265- 284p. 1984.

PALERMO, G.P.M.; LATORRACA, J.V.F.; SEVERO, E.T.D.; NASCIMENTO, A.M.; REZENDE, M. A. DELIMITAÇÃO ENTRE OS LENHOS JUVENIL E ADULTO DE *Pinus elliottii* ENGELM. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.37, n.1, p.191-200, 2013

PECINA, R.; BURTSCHER, P.; BONN, G.; BOBLETER, O. GC-MS and HPLC analyses of lignin degradation products in biomass hydrolyzates. **Fresenius J. Anal. Chem.** 1986, 325, 461.

PHELAN, M.; AHERNE, S. A.; WONG, A.; O'BRIEN, N. M. Bioactive properties of wood knot extracts on cultured human cells. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, n. 6, p.1245-1251, 2009.

RALPH, J.; HATFIELD, R. D.; QUIDEAU, S.; HELM, R. F.; GRABBER, J. H.; JUNG, H. G. Pathway of p-coumaric acid incorporation into maize lignin as revealed by NMR. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 166, p. 9448-9456, 1994

RALPH, J.; Zhang, Y.; EDE, R. M. Preparation and value of synthetic lignins with NMR-invisible methoxyl groups. . Madison: United States Department of Agriculture, **Dairy Forage Research Center. Research Summaries**. 1995. p. 38-40.

RALPH, J. 3D NMR experiments for use in cell wall research. Madison: United States Department of Agriculture, . **Dairy Forage Research Center. Research Summaries** 1998. p. 46-50

RALPH, J., MARITA, J., RALPH, S. A., HATFIELD, R. D., LU, F., EDE, R. M., PENG, J., QUIDEAU, S., HELM, R. F., GRABBER, J. H., KIM, H., JIMENEZ-MONTEON, G., ZHANG, Y., JUNG, H. J. G., LANDUCCI, L. L., MACKAY, J. J., SEDEROFF, R. R., CHAPPLE, C., AND BOUDET, A. M. Solution-state NMR of lignins. In: **Advances in Lignocellulosics Characterization**, Argyropoulos, D. S. (ed.), TAPPI Press, Atlanta, GA, 1999 p. 55-108.

RIO GRANDE DO SUL. **Projeto radiografia da agropecuária gaúcha (período 1997/2012)**. Porto Alegre: CORAG, 2013.

ROBERT, J.; ANDEREGG, R. J.; J. W. Lignans, the major component of resin from *Araucaria angustifolia* knots. **Holzforschung**, v. 28, n. 5, 1974. p. 171-175.

ROMAN-LESHKOV, Y.; BARRETT, C. J.; LIU, Z. Y.; A., D. J. Production of dimethylfuran for liquid fuels from biomass-derived carbohydrates. **Nature** 2007, 447, 982p.

SAHLBERG, U. Influence of knot fibers on TMP properties. **Tappi journal**. V. 78, n. 5, p.162-168, 1995.

SALIBA, E.O.S., RODRIGUEZ, N.M., BARRETO, S.L.T., *et al.* Isolation and infrared spectroscopic characterization of lignin from boter corn and soybean agricultural residues. **Arq BrasMe.d Vet Zootec**, v.50, n.6, p.727-730, 1998.

SALIBA, E.O. LIGNINAS – MÉTODOS DE OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.5, p.917-928, 2001

SHIGO A. L. How tree branches are attached to trunks. **Canadian Journal of Botany**, n. 63, v. 8, p.1391-1401, 1985.

SIEVERS, C.; VALENZUELA-OLARTE, M. B.; MARZIALETTI, T.; MUSIN, I.; AGRAWAL, P. K.; JONES, C. W. Ionic-liquid-phase hydrolysis of pine wood. **Ind. Eng. Chem. Res.** 2009, 48, 1277.

TORGET, R.; WALTER, P.; HIMMEL, M.; GROHMANN, K. Dilute-acid pretreatment of corn residues and short-rotation woody crops. **Appl. Biochem.Biotechnol.** 1991, 28, p. 75.

VENTORIM G.; COELHO A.; COLODETTE, J. L.; ALVES, E. F.; COMELATO, J. S. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DAS ANÁLISES DA LIGNINA RESIDUAL PELOS MÉTODOS DE NITROBENZENO, ÓXIDO DE COBRE E ACIDÓLISE. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 24, n. 1, p. 205-210, 2014

WANG, S. G.; WU, S. B. (). "Separation and characteristics of enzymatic/ acidolysis lignin," *J. South China Univ. Technol. (Natural Sci. Ed.)*. 34, 2006. 101-104p.

WEN, J.L., Recent Advances in Characterization of Lignin Polymer by Solution-State Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Methodology. *Materials*. 2013, 6, 359-391 p.; doi:10.3390/ma6010359

WILLFÖR, S.; HEMMING, J.; REUNANEN, M.; HOLMBOM, B. Phenolic and lipophilic extractives in Scots pine knots and stem wood. **Holzforschung**, v. 57, n. 4, p. 359-372, 2003. (a)

WU, S. B., AND ARGYROPOULOS, D. S. An improved method for isolating residual Kraft lignin in high yield and purity. **J. Pulp Paper Sci.** 29, 2003. 235-239p.

YASUDA, S.; OTA, K. (1987) Chemical structures of sulfuric acid lignin. X. Reaction of syringylglycerol-fJ-syringyl ether and condensation of syringyl nucleus with guaiacyl lignin model compounds in sulfuric acid. **Holzforschung**. 1987. 41 :59-65