

ESTUDO QUÍMICO DA LIGNINA DE *Paullinia rubiginosa*

Heber dos Santos Abreu¹; Andréia da Costa Oertel²

RESUMO: Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a relação entre o perfil estrutural da lignina de Björkman e a propriedade de maleabilidade do lenho de *Paullinia rubiginosa*. A análise foi realizada através dos métodos espectrométricos de RMN ¹H e infravermelho. O teor de metoxila foi determinado pelo método de RMN ¹H. O valor calculado foi de 18,97%, demonstrando a existência de alta concentração de unidades guaiacil na lignina (Björkman) de *Paullinia rubiginosa*. Os dados sugerem a existência de um sistema rígido para a lignina de *Paullinia rubiginosa*.

PALAVRAS-CHAVE: *Paullinia rubiginosa*, RMN ¹H, Lignina, maleabilidade

CHEMICAL STUDY OF LIGNIN OF *Paullinia rubiginosa*

ABSTRACT: This work was carried out with propose to evaluate the relation between structural profile of Björkman lignin and the malleability property of the xylem of *Paullinia rubiginosa*. The analysis was carried out by mean of ¹H NMR and infrared spectroscopy methods. The methoxyl content was also determined by ¹H NMR method. The calculated value was of 18.97%. It revealed a high guaiacyl unit concentration in the Björkman lignin of *Paullinia rubiginosa*. The data suggest the existence of a rigid system for *Paullinia rubiginosa* lignin.

KEY-WORDS: *Paullinia rubiginosa*, ¹H NMR, Lignin, malleability

1. INTRODUÇÃO

Ligninas são substâncias de estruturas complexas, macromoléculas tridimensionais de origem fenilpropanóidica constituídas de unidades básicas de p-hidroxifenil-propano, guaiacilpropano e siringilpropano,

encontradas na maioria das plantas superiores em concentração mais alta na lamela média do que nas subcamadas da parede secundária dos traqueóides, vasos, fibras, etc. Elas se enquadram entre as substâncias naturais mais abundante da face da terra, ocupando cerca de 30% dos

¹ Professor do Departamento de Produtos Florestais-Instituto de Florestas-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

² Aluna do Curso de Engenharia Florestal- Instituto de Florestas -Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

carbonos da biosfera (Fengel e Wegener 1984) e são exclusivamente formadas dentro da parede celular. Além disso, diferentes teores de lignina e diferentes formulações constitucionais baseados em unidades de *p*-hidroxifenilpropano, guaiacilpropano e siringilpropano foram observados em diferentes taxons de espécies arbóreas (Albuquerque, Abreu e Andrade, 1995). Estudos recentes demonstram a existência de expressões de gens relacionados à lignificação durante o estágio de diferenciação celular. Certamente estes argumentos devem contribuir na elucidação do mecanismo de controle constitucional e no processo de deposição da lignina na parede celular. Todavia, estes estudos são realizados sobre um restrito número de exemplares vegetativos (Fukuda, 1996). Neste contexto, a biodiversidade vegetal parece ser um caminho aberto a novas investigações sobre a elucidação do modelo estrutural, do caminho biossintético na formação da lignina e conseqüentemente dos agentes controladores deste processo. As ligninas, cuja composição decorre da combinação dos álcoois coniferílico e *p*-cumarílico, apresentam estruturas moleculares de natureza mais complexa (Forss e Fremer, 1983) do que se as mesmas fossem constituídas da combinação dos precursores álcoois coniferílico e sinapílico (Abreu, 1994; Higuchi, Shimada e Nakatsubo, 1977 e Whethen e Sederoff, 1995) (Figura 1). Provavelmente o aumento do número de ligações intermonoméricas apresenta um papel importante neste contexto. Essa variação composicional constitui também um indicativo dos valores da concentração da unidade subestrutural β -

O-4 (éter fenilglicerol- β -aril) (Hwang, 1985). Essa unidade tem sido considerada de base estrutural nas ligninas isoladas de plantas. O parâmetro analítico utilizado na avaliação do perfil estrutural da lignina de *Paullinia rubiginosa* baseou-se na porcentagem do grupo metoxila. Este grupo funcional tem sido referido como indicativo na diagnose composicional das ligninas isoladas de plantas (Sarkanen e Ludwig, 1971).

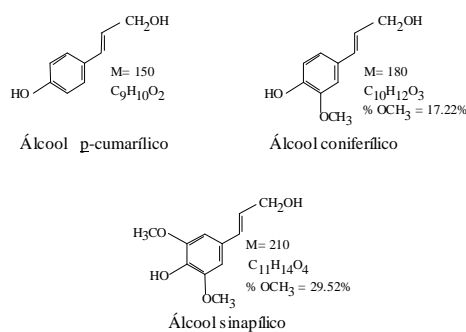


Figura 1.
Precusores da lignina.

Lignin precursors.

Uma característica peculiar às ligninas (presença de grupamento éster), cuja propriedade confere maior flexibilidade ao caule, foi observada em Poáceas e em *Pinus* (Eraso e Hartley, 1989; Lanfang e Terashima, 1991; Hahlbrock, 1990; Sarkanen, Chang e Allan, 1967). Neste trabalho, discutimos a relação entre a maleabilidade e a feição estrutural da lignina da liana (*Paullinia rubiginosa*). As lianas são conhecidas como trepadeiras lenhosas importante na estrutura de um ecossistema tropical, entretanto pouco estudadas em relação a sua biologia, química e morfologia

(Lima e Guesdes-Bruni, 1997). A espécie *Paullinia rubiginosa*, assim como outras lianas, constituem em um interessante exemplo para elucidação da feição estrutural das ligninas do lenho de plantas de mesma natureza morfológica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A espécie *Paullinia rubiginosa* é um arbusto escandente (trepadeira arbustiva), de caule simples, pertencente à família Sapindácea, ocorrendo na região sudeste do Brasil (Pio Corrêa, 1969). O material botânico referente à espécie citada foi coletado no campus da UFRRJ, no município de Seropédica, Estado Rio de Janeiro. A amostra (caule sem casca) foi seca em temperatura ambiente por um período de aproximadamente 2 meses, e em seguida foi moída em um moinho de martelo. Após a obtenção do pó de madeira, procedeu-se a homogeneização. 39g de pó (madeira seca) de 0,177-0,420 mm de diâmetro de partículas foi então pré-extraído, com acetona, e em seguida com água em um extrator do tipo Soxhlet. A primeira extração foi realizada com 300 ml de acetona destilada durante 60h ininterruptas. O processo de extração foi acompanhado por cromatografia em camada delgada de sílica até não haver mais indícios de presença de material solúvel em acetona. As placas cromatográficas foram reveladas em vapor de I₂. Após o término da extração, o material solúvel em acetona foi concentrado em um evaporador rotatório e depois armazenado. O pó de madeira livre de extrativos acetônico foi seco à temperatura ambiente durante 3 dias. Em seguida, esse

material foi então extraído com água destilada usando o mesmo procedimento anteriormente descrito. A extração foi completa em 86 horas ininterruptas. Após extração, o material solúvel foi concentrado em um evaporador rotatório e, em seguida, seco e armazenado. O material livre de extrativos acetônico e aquoso foi seco previamente por sucção a vácuo por alguns minutos e finalmente seco em um dessecador contendo anidrido fosfórico.

Do material livre de extrativos, isolou-se a lignina de *Paullinia rubiginosa*, utilizando o método de Björkman, conforme descrição original (Björkman, 1956). O resíduo sólido pós-extração (livre de extrativos) foi submetido à moagem seca em um moinho de bolas, do tipo giratório, de marca Marconi, durante um período de aproximadamente 30 dias ininterruptos. Após esse tratamento, o material em estudo (madeira moída) foi tratado com dioxano/H₂O, 95:5 (v/v) sob agitação magnética durante 96 horas ininterruptas. Em seguida, o resíduo sólido foi filtrado e dissolvido em ácido acético 90%. O material solúvel em ácido acético foi precipitado em éter etílico sob agitação magnética. Em seguida, a mistura foi centrifugada e o resíduo lavado por duas vezes em éter etílico e depois com éter de petróleo.

Acetilação: A acetilação foi realizada com 100 mg de amostra de lignina de Björkman de *Paullinia rubiginosa*, tratada com 1 ml de piridina/anidrido acético (1:1) durante 48 h. O processo de purificação transcorreu por centrifugação, e depois por sucessivas lavagens com éter etílico (Abreu e Freire, 1995). O espectro de RMN¹H de lignina não acetilada, de uma forma geral, apresenta

um perfil espectral extremamente complexo, impedindo qualquer atribuição que conduza a compreensão da estrutura química deste tipo de substância. A lignina acetilada tem sido a melhor opção para uma diagnose mais precisa em RMN¹H. O perfil pode ser traçado segundo os deslocamentos químicos dos sinais correspondentes aos prótons acetoxílicos (2,30-1,58 ppm), prótons aromáticos guaiacílicos e siringílicos (6,94-6,60 ppm) e também pelo sinal correspondente aos prótons metoxílicos.

Redução com NaBH₄: Esta reação foi realizada com o objetivo de eliminar a contribuição do estiramento de carbonilas sobre alguns sinais entre 1327 a 1223 cm⁻¹, assim como distinguir o tipo de carbonila (éster, cetônica e aldeídica) presente na lignina de *Paullinia rubiginosa*. Para isto, 32mg da amostra do material original foi submetido a uma reação de redução com NaBH₄, de acordo com Browning (1967). O processo de purificação se deu por precipitação e sucessivas lavagem com éter etílico e, em seguida, com éter de petróleo. O processo de lavagem se deu por repetidas centrifugações.

RMN¹H

Determinação do teor de metoxila: Os teores de metoxila foram determinados pelo método de RMN¹H (Abreu e Freire, 1995), utilizando lignina de Björkman acetilada. O espectro da lignina de *Paullinia rubiginosa* foi registrado em um aparelho Bruker 200 MHz em CDCl₃. Os sinais do espectro de RMN¹H, na região de 6.40-7.10 e 4.10-3.50 ppm correspondem aos prótons aromáticos e metoxílicos, respectivamente. Eles foram utilizados para a determinação do teor de

metoxila, pelo método de RMN¹H, que se aplica às ligninas de Björkman e/ou dioxano. Todas as determinações foram realizadas obedecendo as mesmas condições de tratamento.

INFRAVERMELHO

O espectro no infravermelho da lignina original foi registrado em um aparelho por dispersão ótica, de marca Perkin-Elmer, modelo 1420, utilizando 1 mg de amostra de lignina e 200 mg de KBr. Foram observados os principais sinais: 3500 cm⁻¹, 3000-2980 cm⁻¹, 1740 cm⁻¹, 1690 cm⁻¹, 1670 cm⁻¹, 1600 cm⁻¹, 1500 cm⁻¹, 1460 cm⁻¹, 1328 cm⁻¹, 1268 cm⁻¹, 1222 cm⁻¹ e 2126 cm⁻¹, enquanto o espectro da lignina original tratada com NaBH₄ foi registrado em um espectrômetro por transformada de Fourier, de marca Perkin-Elmer e modelo 1605, utilizando 1 mg de lignina e 200 mg de KBr.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

RMN¹H

A análise do espectro de RMN¹H da lignina (Björkman) acetilada de *Paullinia rubiginosa* (Figura 2) permitiu tecer algumas considerações de âmbito constitucional e estrutural. A presença dos sinais entre 6,40 e 7.10 ppm (Abreu e Freire, 1995) acenou para a existência de alta concentração de unidade guaiacila na lignina de *Paullinia rubiginosa*. A utilização da fórmula % OCH₃ = $\frac{28,28436-19,750047x}{13,025}$, onde x=H (Ar) / H (OCH₃) → x = 6,139/13,025 = 0,4713243, permitiu determinar a porcentagem do teor de metoxila para a lignina de *Paullinia rubiginosa*. A porcentagem determinada foi

de 18,97%. Os teores de metoxila das ligninas das madeiras mencionadas neste trabalho foram também determinados pelo método de RMN¹H.

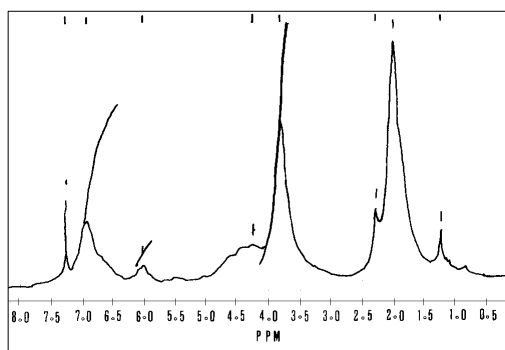


Figura 2.
Espectro de RMN¹H de lignina (Björkman) acetilada.

Espectro of RMN¹H of lignin (Björkman) acetylated.

Ao contrário das espécies citadas na Tabela 1, o teor de metoxila da lignina de *Paullinia rubiginosa* foi considerado relativamente baixo. Os sinais do espectro de RMN¹H de ligninas são normalmente considerados de extrema complexidade, portanto as atribuições geralmente são prejudicadas em detrimento da precisão da análise (Tabela 2). A extensão da largura e a concentração de vários sinais em uma só região espectral tornou praticamente inviável qualquer avaliação na região entre 5,50-4,10 ppm. Algumas considerações de natureza especulativas, principalmente em relação à presença da unidade estrutural β -O-4, são mencionadas. O sinal largo em torno de 6.0-6.1 foi atribuído aos prótons α

(acetobenzílicos) desta unidade estrutural que apresentam deslocamentos químicos em 6,01 ppm para a forma eritro e 6,06 ppm para a forma treo, quando o oxigênio fenólico de C-4 estiver ligado a um grupo alquila, e 6,06 para a forma eritro e em 6,1 para a forma treo, quando o oxigênio fenólico estiver ligado a um grupo acila (Abreu, 1990). Nesta região, também deve ser considerado o deslocamento químico dos prótons vinílicos da estrutura cinamaldeídica e de prótons α da unidade estrutural β -1. A dificuldade de observação dos sinais de prótons de carboidratos não descarta a possibilidade de existência dos mesmos na lignina de *Paullinia rubiginosa*, haja vista que, para tal, o material sob análise não sofreu qualquer tratamento químico à base de NaOH antes do isolamento da lignina, o que justificaria a ausência de contaminantes com base em carboidratos. Na Tabela 2, encontram-se as atribuições mais prováveis para estes sinais.

Tabela 1.
Comparação entre o teor de metoxila das ligninas de algumas madeiras tropicais e de *Paullinia rubiginosa*.

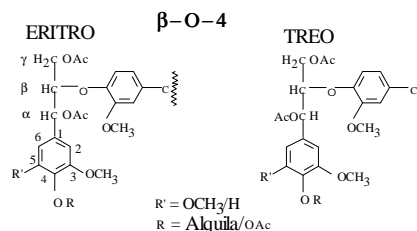
Comparison between methoxyl content of lignins of some tropical woods and of Paullinia rubiginosa.

Espécies	% (OCH ₃)/R MN ¹ H	Estrutura do caule
<i>Aspidosperma polyneuron</i>	22.35	Rígida
<i>Gallesia gorazema</i>	21.17	Rígida
<i>Peltogyne paniculata</i>	21.17	Rígida
<i>Lophanthera lactescens</i>	20.58	Rígida
<i>Aspidosperma macrocarpum</i>	19.59	Rígida
<i>Paullinia rubiginosa</i>	18,97	Flexível

Tabela 2

Atribuições dos sinais de RMN¹H da lignina (Björkman) acetilada de *Paullinia rubiginosa*.*Atributions of the signals of RMN¹H of lignin (Björkman) acetylade of Paullinia rubiginosa.*

SINAIS ppm	ATRIBUIÇÃO
6,94	Prótons aromáticos guaiacíflicos
6,60	Prótons aromáticos siringíflicos
6,01-6,11	Prótons α de β-O-4
4,60	Prótons β de β-O-4
4,43-1,8	Prótons alifáticos de várias outras unidades estruturais
3,75	Prótons metoxíflicos
2,30	Prótons acetoxíflicos aromáticos
2,19-1,58	Prótons acetoxíflicos alifáticos
1,26	Graxas contaminantes



INFRAVERMELHO

O espectro no infravermelho da lignina (Björkman) original revelou a presença de vários sinais entre 3500-700 cm⁻¹, dentre os quais especial atenção foi dada àqueles localizados entre 1800 e 700 cm⁻¹. Nesta região, a presença dos sinais em 1328, 1268, 1222 e 1126 cm⁻¹, e suas respectivas intensidades, justificam a existência de alta concentração de unidades guaiacil (Abreu, 1997). O primeiro sinal desta classe de absorção, entre 1328-1126 cm⁻¹, apresentou uma intensidade relativamente mais baixa. O segundo e o terceiro foram significativamente superiores em intensidade ao primeiro sinal. O último sinal foi relativamente inferior aos padrões estabelecidos para ligninas ricas em unidades siringil (Abreu, 1997; Faix e Beinhoff, 1988). A presença de sinais na região entre 1650 e 1740 cm⁻¹ sugere a existência de carbonila de éster, de cetona não conjugada, de carbonila cetônica e/ou

aldeídica conjugada. A presença de grupamento éster poderia fortalecer a idéia de existência de propriedade de maleabilidade em *Paullinia rubiginosa*, se considerarmos que a presença deste grupo funcional sugere a existência de plasticidade em diversos materiais. A presença de carbonila cetônica foi atribuída ao processo de isolamento, provavelmente introduzida durante o processamento da moagem (moinho de bolas), realizado em presença de oxigênio (Figura 3). As atribuições desses sinais estão descritas na Tabela 3.

A existência de grupamento éster foi descartada após tratamento da lignina original com NaBH₄. O espectro da lignina (reduzida) advindo deste tratamento químico foi expressivamente diferente com base nas intensidades dos sinais entre 1740-1650 cm⁻¹, ao observar a ausência e a diminuição expressiva dos sinais correspondentes (Figura 4).

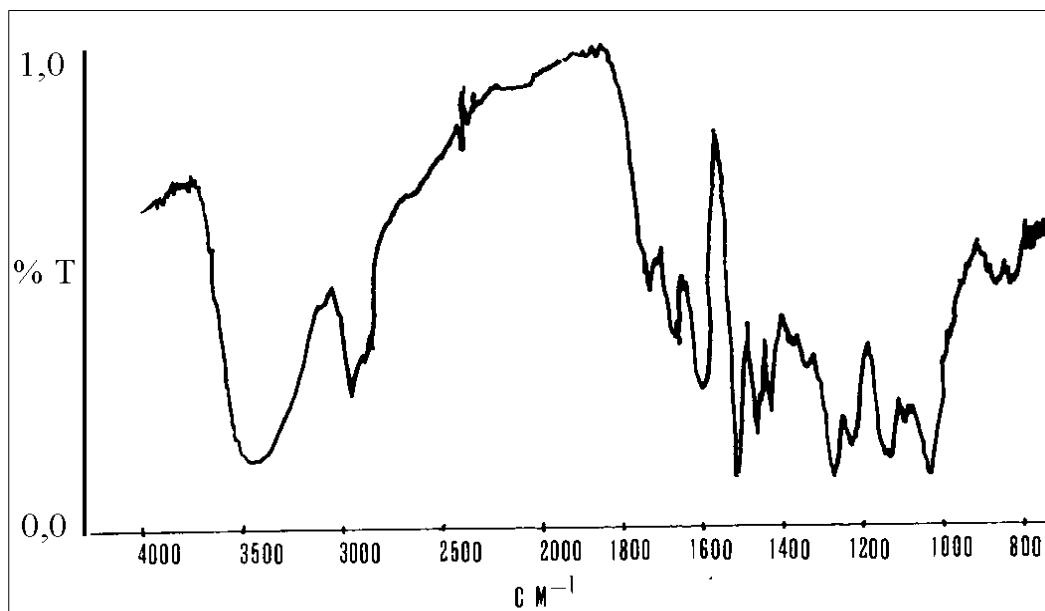


Figura 3.
Espectro no infravermelho da lignina (Björkman) de *Paullinia rubiginosa*.

Spectro in the infrared of the lignina of Paullinia rubiginosa.

Tabela 3.
Atribuições dos sinais no infravermelho

Atributions of the signals in the infrared.

SINAL CM ⁻¹	ATRIBUIÇÃO
1740-1720	Estiramento de C=O em cetonas não conjugadas e de grupo éster (freqüentemente de origem de carboidratos) e ou de grupos ácidos carboxílicos
1666	Estiramento de C=O de cetonas e aldeídos conjugados
1593	Vibração do esqueleto aromático com estiramento de C=O, S>G, G condensado> eterificado
1508	Vibração do esqueleto aromático
1464	Deformação assimétrica em -CH ₃ e CH ₂ -
1327	Vibração do anel siringílico com contribuição do estiramento de C=O e de estruturas condensadas
1269	Vibração do anel guaiaicílico com contribuição do estiramento de C=O
1223	Estiramento de C-O, C-C com estiramento de C=O sensível a substituição do anel aromático, G condensado>G eterificado
1126	Deformação (no plano) de C-H (típico de anel siringílico)

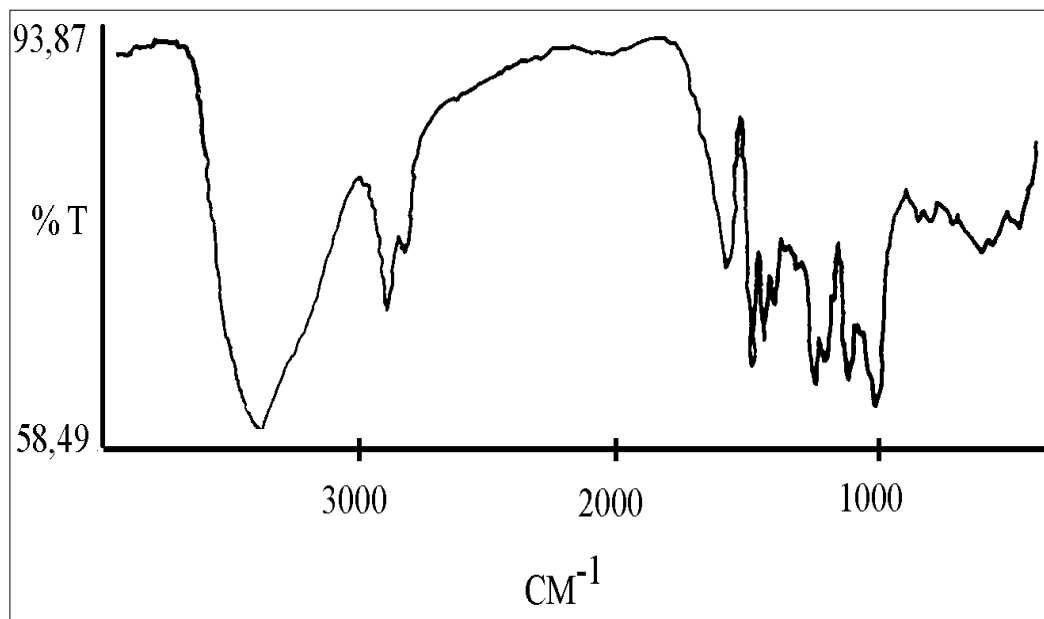


Figura 4.
Espectro no infravermelho da lignina (Björkman) de *Paullinia rubiginosa* tratada com NaBH_4

Espectro in the infrared of lignin of Paullinia rubiginosa under effect of NaBH_4 .

4. CONCLUSÃO

Os dados permitiram concluir que: a lignina de *Paullinia rubiginosa* detém alta complexidade estrutural dentre as espécies citadas na Tabela 1. A presença do grupamento éster e a sua influência sobre a maleabilidade do lenho de *Paullinia rubiginosa*, a princípio, foram descartadas. Por outro lado, os efeitos inerentes ao meio ambiente (luz), assim como a disputa por nutrientes, entre outros aspectos, devem favorecer a formação de tecidos especiais (reação), o que justificaria o baixo teor de

metoxila encontrado na lignina de *Paullinia rubiginosa*. Tal fato sugere uma reflexão mais profunda sobre a influência da lignina e a propriedade do lenho de *Paullinia rubiginosa*. As ligninas desse perfil estrutural provavelmente conferem maior rigidez ao sistema molecular. Obviamente, os aspectos de natureza anatômica e morfológica dos elementos estruturais presentes em *Paullinia rubiginosa* devem ser avaliados, e para tal devem ser considerados.

5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pelo apoio financeiro; ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da UFRRJ, pelo fornecimento dos espectros; à Prof. Marilena de Menezes Silva Conde do Departamento de Botânica da UFRRJ, pela identificação do material botânico e ao Departamento de Produtos Florestais do Instituto de Florestas da UFRRJ, pelo fornecimento das ligninas das madeiras tropicais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, H. dos S. . **Biossíntese de lignificação**. Rio de Janeiro: EDUR, 1994. 63p.
- ABREU, H.dos S. Estimativa por infravermelho da concentração da unidade estrutural β -O-4 em Angiospermas. **Química Nova**, São Paulo, 1997. (no prelo).
- ABREU, H. dos S. **Isolamento e caracterização de algumas ligninas guaiacíficas e siringíficas**. Campinas: USP, 1990. 211p. (Tese de Doutorado).
- ABREU, H. dos S.; E FREIRE, M. F. I. Methoxyl content determination of lignins by H^1 NMR, **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 67, Supl. 3, p.379-382, 1995.
- ALBUQUERQUE, C. E. C.; ABREU, dos S., ANDRADE, A. M. Heterogeneidade, ocorrência e distribuição geobotânica das ligninas no globo terrestre, **Revista da Universidade Rural, Série Ciências Exatas e da Terra**, Rio de Janeiro, v.17, n.1/2, p.1-3, 1995.
- BJÖRKMÄN, A. Studies on finely divided wood. **Svensk Papperstidning**, Stockholm, v. 3, p.477-485, 1956.
- BROWNING, B. L. **Methods of Wood Chemistry**. New York: Interscience Publishers, 1967. v.2, p.673-702.
- ERASO, F.; HARTLEY, R.D. Monomeric and dimeric phenolic constituents of plant cell wall-possible factors influencing wall biodegradability. **Journal of the Science Food Agriculture**, London, v.51, p.163-170, 1989.
- FAIX, O.; BEINHOF, O. **Journal of Wood chemistry and technology**, New York, v. 8, n. 4, p. 505-522, 1988.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood, chemistry ultrastructure, reactions**. New York: Walter de Gruyter, 1984. p.167-181.
- FORSS, K.; FREMER, K. E. Comments on nature of coniferous lignin, **Journal at Applied Polymer Science: Applied Polymer Symposium**, New York, n. 37, p. 531-547, 1983.
- FUKUDA, H. Xylogenesis: initiation, progression and cell death, **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. California, n. 47, p. 299-325, 1996.
- HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism, **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, California, n. 40, p. 347-369, 1989.
- HIGUCHI, T.; SHIMADA, M.; NAKATSUBO, F. *et al.* Difference in biosyntheses of guaiacy and syringy lignin in wood, **Wood Science and Technology**, New York, v. 11, p. 153-157, 1977.
- HWANG, H. R. A lignification mechanism, **Journal of Theoretical Biology**, London, n. 116, p. 21-44, 1985.
- LANFANG, H.; TERASHIMA, N. Formation and structure of lignin in monocotyledons, **Holzforschung**, Berlin, v. 45, n. 3, p. 191-198, 1991.
- LIMA, H.C.; GUEDES BRUNI, R. R. **Serra de Macaé de Cima: diversidade florística e conservação em Mata Atlântica**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 1997. p.75-87.
- PIO CORRÊA, M. **Dicionário das Plantas Utéis do Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1969. 295p.
- SARKANEN, K. V; CHANG, H-M; ALLAN, G.G. Species variation in lignin. **Tappi**, Atlanta, v. 50, n. 12, p. 583-587, 1967.
- SARKANEN, K. V.; LUDWIG, C.G. **Lignin occurrence, formation, structure and reactions**. New York: Wiley Interscience, 1971. 882p.
- WHETTEN, R.; SEDEROFF, R. Lignin biosynthesis. **The plant cell**, Rockville, v.7, p. 1001-1013, 1995.