

Lignina: uma importante tecnologia química da madeira

Lignina: an important chemical technology of the wood

Recebido: 09/12/2022 | Revisado: 19/12/2022 | Aceitado: 22/12/2022 | Publicado: 24/12/2022

Deise Amaral de Deus

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9041-2775>
Universidade Federal Rural da Amazônia, Brasil
E-mail: deiseamaral.ufra@gmail.com

André Scarambone Zaú

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6782-351X>
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Brasil
E-mail: andrezau@unirio.br

Graciela Ines Bolzon de Muniz

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4417-0178>
Universidade Federal do Paraná, Brasil
E-mail: graciela.ufpr@gmail.com

Silvana Nisgoski

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9595-9131>
Universidade Federal do Paraná, Brasil
E-mail: silvana.ufpr@gmail.com

Heber dos Santos Abreu (In memoriam)

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil

Dráuzio Correia Gama

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6357-0698>
MSc em Ciências Florestais, Brasil
E-mail: drauziogama@hotmail.com

Resumo

A madeira é um material formado por complexas estruturas organolignocelulósicas e com heterogeneidades químicas que variavelmente causa transtornos para a indústria de transformação e processamento. Portanto, o exame da constituição desse material deve ser amplamente investigado, além dos elementos anatômicos de formação com os constituintes químicos uma vez que suas propriedades tecnológicas estão intimamente relacionadas. Nesse contexto, o presente estudo tem por objetivo abordar informações relevantes a respeito da lignina (componente químico presente na madeira) com foco em sua importância tecnológica. Realizou-se uma revisão de literatura do tipo narrativa. Para a fundamentação teórica a cerca do estado da arte, da estrutura e dos parâmetros que influenciam variações de lignina e compostos fenólicos relacionados, utilizou-se de análise de conteúdo das fontes científicas disponíveis na literatura especializada. A revisão de literatura permitiu a compreensão estrutural da lignina e de suas aplicações; a demanda e expectativas por novas pesquisas e abordagens sobre métodos e técnicas para caracterização de lignina e análises utilizadas. O conhecimento da estrutura da lignina é prerrogativa subsidiária para pesquisas futuras e manipulação genética a contribuir na formação de lignina com estrutura molecular que permita aumentar a qualidade da madeira.

Palavras-chave: Madeira; Constituintes químicos; Resistência da madeira; Espectroscopia de ressonância.

Abstract

Wood is a material formed by complex organocellulosic structures and with chemical heterogeneities that variably causes disorders to the transformation and processing industry. Therefore, the examination of the constitution of this material should be widely investigated, in addition to the anatomical elements of formation with the chemical constituents since their technological properties are closely related. In this context, the present study aims to address relevant information about lignin (chemical component present in wood) focusing on its technological importance. A narrative literature review was performed. For the theoretical foundation about the state of the art, structure and parameters that influence variations in lignin and related phenolic compounds, the content analysis of the scientific sources available in the specialized literature was used. The literature review allowed the structural understanding of lignin and its applications; demand and expectations for new research and approaches to methods and techniques for lignin characterization and analysis used. Knowledge of the structure of lignin is a subsidiary prerogative for future research and genetic manipulation to contribute to the formation of lignin with molecular structure that allows to increase the quality of the wood.

Keywords: Wood; Chemical constituents; Wood resistance; Resonance spectroscopy.

1. Introdução

Devido à elevada complexidade da madeira e os transtornos que sua heterogeneidade causa para a indústria de transformação e processamento, o exame da constituição desse material deve ser amplamente investigado, uma vez que suas propriedades tecnológicas estão intimamente relacionadas, além dos elementos anatômicos de formação com os constituintes químicos (Lobão et al., 2004).

No processo de divisão celular, a primeira membrana de separação que surge entre o par de novas células é a lamela média, composta principalmente de pectato de cálcio e magnésio, cuja função é unir as células umas às outras. Sobre esta membrana acumulam-se microfibrilas de celulose formando uma trama irregular que constitui a parede primária, dotada de grande elasticidade e composta principalmente de pectina, hemicelulose e as microfibrilas de celulose (Burger & Richter, 1991). Não há diferenças significativas de composição química da madeira entre as diferentes espécies, sendo considerados componentes fundamentais, além de celulose e hemiceluloses, a lignina e os extrativos (Oliveira, 1997; Silva, 2002), sendo a lignina um componente estrutural principal das paredes celulares em plantas terrestres lenhosas (Vanholme et al., 2019).

Muitas propriedades físicas e mecânicas da madeira dependem da presença da lignina (Britez & Nogueira, 2006). Exemplo disto é a densidade básica. Definida como a massa seca por unidade de volume saturado (Evans & Ilic, 2001), é a forma mais utilizada para expressar características físicas da madeira (Vale et al., 2010) e está diretamente relacionada ao volume vazio dos poros (Burger & Richter, 1991).

Em termos químicos, a densidade da madeira é reflexo da porcentagem dos diferentes constituintes (celulose, hemiceluloses, lignina e extrativos). Scanavaca-Júnior e Garcia (2004), afirmam que a variabilidade da maior parte das propriedades mecânicas da madeira pode ser estimada com base na variação da densidade. Para Lobão et al. (2004), isso pode ser explicado porque as propriedades de resistência à flexão estática e o seu MOE (módulo de elasticidade) estão correlacionadas com a densidade, que está relacionada diretamente com as dimensões e composição química da célula. Estes autores afirmam que a resistência da madeira a alguma forma particular de aplicação de esforços é função da quantidade da parede celular e da proporção dos componentes químicos das células estabelecidos em cada espécie.

O teor de umidade, outro aspecto que constitui parâmetro de avaliação da qualidade da madeira, possui relação com a lignina. Alguns autores constataram que a umidade de equilíbrio depende de fatores como espécie, teor de celulose, quantidade de extrativos e porcentagem de lignina, entre outros (Gatto et al., 2008). Uma vez que a lignina é responsável pela impermeabilização da parede celular (Moura, 2008; Vidaurre et al., 2013), supostamente, células com maiores teores de impregnação por lignina apresentam menor absorção de umidade do ambiente, ocasionando maior resistência mecânica à madeira.

Diversos estudos tem sido importantes relacionados a lignina, a exemplo de estudos silviculturais e da biomassa das espécies florestais para a seleção de materiais genéticos que produzam biomassa energética em quantidade e na qualidade desejada (Lopes et al., 2017), bem como a administração nutricional das plantas lenhosas cultivadas adequada para o aumento de teores de lignina na madeira (Assis et al., 2018). Além de estudos bioquímicos sobre estrutura de lignina que permite melhorar o seu valor polimérico ou com vista para sua remoção mais simples dos polissacarídeos da parede celular (Ralph et al., 2019) ou revelar a evolução e a variação natural na incorporação de monômeros fenólicos 'não tradicionais', incluindo fenólicos além do monolignol via biossintética (Ralph et al., 2019).

Considerada como um subproduto na indústria de polpa, a lignina pode ser convertida em outros produtos de valor agregado, sendo visto como um material promissor devido a natureza biocompatível, barata e abundante, o que atrai a atenção de várias pesquisas (Chio et al., 2019; Yu & Kim, 2020).

Nesse contexto, o presente estudo tem por objetivo abordar informações relevantes a respeito da lignina com foco em sua importância tecnológica.

2. Metodologia

O estudo realizado consiste de uma revisão de literatura do tipo narrativa, como forma de estabelecer relações com produções anteriores e apontando novas perspectivas conforme Vosgerau e Romanowski (2014), a acerca do estado da arte, da estrutura, métodos de caracterização e dos parâmetros que influenciam as variações de lignina e possíveis aplicações.

Utilizou-se, como critério de seleção das informações a cerca de conceitos, definições, dados, caracterizações e usos, conhecimentos consolidados disponíveis na literatura especializada adequados ao tema do estudo abordado.

Para a fundamentação teórica, utilizou-se de análise de conteúdo das fontes científicas, a qual, segundo Pádua (2002) tende a viabilizar, a partir do conjunto de textos escritos, a compreensão do discurso científico e de sua regularidade de forma que explique o todo ou forneça elementos de caráter conclusivo ou comparativo.

A base de informação científica utilizada para o tema foi obtida por meio de periódicos nacionais e internacionais a partir de consulta nas plataformas do Google Acadêmico, periódicos da Capes e Springer sem distinção das formas de publicação (artigos científicos, livros, etc).

Como forma de ilustrar determinadas informações, foi empregado recurso visual de imagens adaptadas a partir de terceiros, devidamente referenciadas, imagens de própria autoria e confecção de quadros, com base em Rampazzo (2015).

3. Desenvolvimento

3.1 Lignina

Em estudos realizados há mais de 150 anos, foi verificado o interesse científico e econômico sobre a lignina (Saliba et al., 2001). Payen (1838) foi o primeiro a reconhecer a natureza composta da madeira, relatando a existência de um “material incrustante” rico em carbono e incorporado à celulose, posteriormente chamado de lignina por Schulze (1865) (Adler, 1977). Peter Klason (1920) propôs que a lignina seria uma substância macromolecular constituída de unidades do álcool coniferílico e, Freudenberg (1968), propôs a primeira fórmula química para esta substância (Sjostrom, 1993). Diversos autores afirmam que a lignina permitiu a adaptação das plantas aquáticas ao ambiente terrestre (Monties, 1989; Barceló, 1997; Inoue et al., 1998). Acreditava-se que esta substância estava presente apenas em plantas vasculares e que vegetais primitivos como fungos, líquens e algas, não seriam lignificados (Fengel & Wegener, 1984).

Porém, em pesquisa com a alga vermelha *Calliarthroncheilos porioides* Manza, 1937 (Corallinales, Rhodophyta) foi observada a presença de parede secundária e lignina (Martone et al., 2009), o que demonstra que, mesmo com todos os estudos envolvendo esse polímero, ainda existem muitos aspectos a serem avaliados.

Lignina, do latim “*lignun*”, que significa madeira é um termo aplicado às macromoléculas que apresentam composição básica formada por unidades de p-hidroxifenil/cumaril (H), de guaiacil (g) e siringil (s) (Abreu et al., 2009), sendo esta uma descrição típica derivada da polimerização dos álcoois hidroxicinnâmílicos, p-comarilil, coniferil e álcool sinapil, respectivamente. No entanto, a lignina deriva também de vários outros monômeros aromáticos (Vanholme et al., 2019).

É detectada em maior quantidade na parede secundária de células, sobretudo nas fibras, vasos e traqueídes do xilema (Browning, 1967). Na periderme ocorre em menor quantidade associada à suberina onde age como uma barreira contra patógenos (Guimarães et al., 2003; Vanholme et al., 2019).

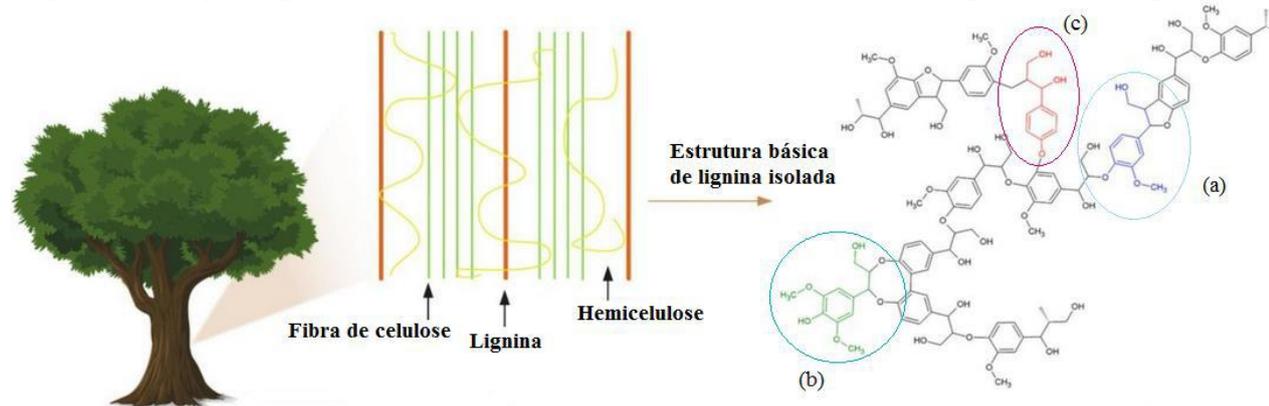
É um componente estrutural responsável por garantir rigidez e dureza ao conjunto de cadeias de celulose (Britez & Nogueira, 2006; Vanholme et al., 2019) e que confere à madeira propriedades de elasticidade e resistência; tendo como

principais funções nas plantas, a capacidade de unir as células umas as outras, a redução da permeabilidade da parede celular à água, a proteção da madeira contra microorganismos, contribui no suporte mecânico e facilita o transporte de água (Fengel & Wegener 2003; Klock et al., 2005; Vanholme et al., 2019).

A lignina é o polímero aromático mais abundante na natureza (Chio et al., 2019) e apresenta diferentes composições para coníferas e folhosas; sendo encontrada em maior quantidade em coníferas (Carvalho et al., 2009). Impossível de ser removida quantitativamente da estrutura da madeira sem considerável degradação, auxilia na redução de mudanças dimensionais das células e por ser bastante insolúvel, apresenta menor capacidade em absorver água que a celulose.

A deposição de lignina nos tecidos vegetais é denominada lignificação e é uma das fases finais de diferenciação das células do xilema, onde a lignina é depositada dentro da matriz de carboidratos da parede celular pelo preenchimento dos vazios interlamelares; tem início nos cantos da célula na lamela média e nas regiões S1, e se espalha através da parede secundária em direção ao lume (Donaldson, 2001), sendo variável entre as espécies, tecidos, estágio de desenvolvimento e localização celular. A disposição da lignina e de suas unidades básicas estruturais no tecido lenhoso pode ser observada na Figura 1.

Figura 1 - Arranjo da lignina no tecido lenhoso da madeira e suas unidades estruturais: guaiacil (a), siringil (b) e cumaril (c).



Fonte: Adaptado de Jędrzejczak et al. (2021).

Importante notar o detalhe em que se encontra a relação da lignina à celulose, ilustrando a configuração com que a lignina contribui para a rigidez que é peculiar ao tecido lenhoso, atuando como material aderente a celulose (Carpita & McCann, 2020). E de forma ramificada, a estrutura de hemicelulose se mostra interagindo facilmente com as fibras de celulose contribuindo, dessa forma, segundo Berglund et al. (2020), para a estabilidade da estrutura lignocelulósica. Em relação a disposição das três unidades estruturais básicas características da lignina, vistas na ilustração, elas ocorrem em ligações aleatórias sendo por isso responsáveis pela forma tridimensional e amorfa da lignina, conforme Dutta e Saha (2014).

Diversos autores afirmam que as propriedades tecnológicas da madeira são influenciadas diretamente pela quantidade e tipo de lignina presente na célula (Fosket, 1994; Lobão et al., 2004; Pilate et al., 2004). Segundo Boyd (1972) e Sales (1986), o surgimento das tensões de crescimento está intimamente ligado à lignificação das paredes celulares, uma vez que a lignina provoca o aumento irreversível de volume na parede secundária da célula. Bidlack et al. (1992) acreditam que a composição, estrutura molecular e orientação espacial da lignina contribuem significativamente para as propriedades da madeira. Para Moura e Brito (2001) e Vidaurre et al. (2013), o lenho de compressão, característico das coníferas, apresenta menor higroscopicidade por conter maior teor de lignina e menor teor de celulose, enquanto Abreu et al. (2009) supõem que uma mudança induzida em relação ao tipo de lignina (guaiacil ou siringil) pode estar relacionada com o aumento de resistência da madeira.

Além da relação com as propriedades tecnológicas supracitadas, a lignina também pode estar relacionada a alguns defeitos da madeira. Micic et al. (2000) sugerem a existência de estruturas moleculares da lignina em forma helicoidal e sugerem a hipótese de influência da lignina nas rachaduras. Para Abreu et al. (2009), diferentes desenhos estruturais em regiões de interface (parênquima x parênquima) são formados de acordo com a estrutura molecular da lignina e podem levar a comportamentos das células que contribuem para aumentar ou diminuir a resistência da madeira a defeitos.

Já na década de 1930, estudos com nós foram relatados por conter concentrações elevadas de produtos extraíveis (Hägglund & Larsson, 1937, citado por Holmbom et al., 2003). Boutelje (1966) determinou a distribuição de extrativos totais em troncos, ramos e nós de abeto (Holmbom et al., 2003). Willför et al., (2003a) constataram que extrato de nós de *Pinus silvestris* L., espécie predominante na Europa, contém 0,4-2,9% mais lignina que a madeira adjacente.

A lignina é encontrada principalmente nos nós dentro do tronco, diminuindo sua concentração à medida que sua localização se projeta para fora, nos ramos e variando a concentração entre nós da mesma árvore (Willför et al., 2003b). Em um estudo com mais de 30 nós provenientes de sete árvores de abeto da Noruega, esses autores encontraram de seis a 24% de ligninas na constituição dos nós. Eles verificaram que a concentração de ligninas no tecido do nó pode chegar a 100 vezes a quantidade observada no cerne do caule adjacente.

3.2 Parâmetros que influenciam a variação da lignina

Diferentes tipos de estresses abióticos, como deficiência mineral, déficit hídrico, radiação UV-B, atmosfera controlada de O₂, vento e baixas temperaturas são capazes de produzir respostas dos vegetais quanto à formação da lignina. Chen et al. (2002) e Lin et al. (2005), demonstraram em seus experimentos com *Raphanus sativus* L. e *Glycine max* (L.) Merrill que altas concentrações de cobre (Cu²⁺) induzem a biossíntese de ligninas a partir do aumento da atividade de peroxidases e lacases (enzimas que participam da biossíntese da lignina no vegetal), promovendo uma menor incidência de lignificação celular. Na ausência de cálcio (Ca²⁺) foi relatado o aumento na atividade de enzimas específicas com o consequente acúmulo de lignina e outras substâncias fenólicas (Teixeira et al., 2006).

Ghanati et al. (2005) observaram que a deficiência ou estresse mineral é capaz de promover uma maior ou menor lignificação dos tecidos lenhosos. Tratamentos com altas concentrações de boro provocaram o aumento dos conteúdos de lignina. Foi demonstrado que raízes de plantas de milho (*Zea mays* L.) em estresse hídrico aumentam a expressão de dois genes envolvidos na biossíntese de ligninas (Fan et al., 2006).

Esses autores verificaram que plantas com crescimento foliar comprometido devido ao estresse hídrico, mudam a zona de maior expressão de lignificação foliar em direção à base da folha. Para Vincent et al. (2005) há uma diminuição dos níveis de lignina, como uma medida adaptativa à seca, uma vez que a manutenção de altos níveis de lignina na ausência de crescimento poderia conduzir a lignificação para a região de alongamento da folha, comprometendo o retorno do crescimento após a re-hidratação.

O aumento da concentração de lignina foi relacionado à aclimação de *Phalaenopsis* spp. a diferentes níveis de fótons de luz (Ali et al., 2006). Hilal et al. (2004) acreditam que o aumento da atividade de peroxidases e de compostos fenólicos em tecidos epidérmicos de *Chenopodium quinoa* Willd. expostos a doses crescentes de radiação UVB seja um mecanismo de proteção utilizado por estas plantas. Möller et al. (2006) verificaram um aumento na concentração de lignina em caules de *Pinus radiata* D. Don que foram transferidos do escuro para um fotoperíodo de 16 horas. Su et al. (2005) verificaram um efeito da luz no acúmulo de lignina em *G. max*.

Outros autores também demonstraram o mesmo efeito positivo da luz na biossíntese de ligninas a partir do aumento da atividade de enzimas envolvidas nesta rota (Chen et al., 2002; HilaL et al., 2004).

A participação das ligninas em resposta a estresse causado por vento foi observada no trabalho de Hawkins e Boudet (2003). Plantas de *Eucalyptus dunnii* Maiden estressadas com vento tiveram aumento na atividade de enzimas envolvidas na etapa final de biossíntese dos monolignóis precursores de ligninas. Observou-se, também, em resposta ao vento, a formação de uma “zona de barreira” a partir do reforço das paredes celulares com lignina. Kim et al. (2006) demonstraram haver um aumento na expressão do gene para ferulato5-Hidroxilase (F5H), uma enzima envolvida na rota de biossíntese de ligninas em plantas expostas ao vento. Foram relatados também aumentos quantitativos de lignina (Kusumoto, 2005) e alterações na distribuição destas ao longo dos tecidos estressados com vento (Frankenstein, 2006).

Tratamentos de baixas temperaturas também são capazes de alterar os teores de ligninas e de seus precursores em inúmeras espécies. Isto foi demonstrado em plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) que expostas ao frio aumentaram o acúmulo de compostos fenólicos solúveis em suas folhas (Olenichenko & Zagorskina, 2005) e de ligninas em raízes (Zagorskina et al., 2005).

Foi constatado, em raízes de soja (*Glycine* sp.), um aumento da atividade de enzimas específicas da lignificação e dos níveis de ácido ferúlico, siríngico e *p*-hidroxibenzóico (envolvidos no processo de formação da lignina) durante a aclimação ao frio (Janas et al., 2000; Janas et al., 2002). Rigatto et al. (2004), ao estudar *Pinus taeda* L., provenientes de oito sítios com solos diferentes, concluiu que os atributos físicos do solo têm grande influência nas propriedades da madeira.

A idade é outro importante fator que influencia o teor de lignina (Trugilho et al., 1996; Trugilho et al., 2009). Silva et al. (2005) ao estudarem a influência da idade e da posição ao longo do tronco na composição química da madeira de *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden, verificaram que o teor de lignina total apresentou tendência crescente em relação à idade e à posição longitudinal, sentido base–topo; e que madeira de árvores mais jovens, tende a apresentar valores mais reduzidos que os encontrados nas madeiras mais maduras. Segundo estes autores existem um aumento sistemático do teor de lignina total da madeira com a idade, havendo uma tendência de estabilização, após certa idade da árvore.

3.3 Compostos fenólicos e lignina na região de madeira com nó e madeira sem nó

Apesar do predomínio de pesquisas em áreas voltadas para a tecnologia de produtos florestais, outras áreas de pesquisa vêm demonstrando interesse no potencial econômico de nós. O uso de metabólitos de plantas em produtos para cuidados pessoais, alimentos funcionais e novos medicamentos leva ao interesse pelo isolamento e caracterização desses compostos (Turley et al., 2006).

Materiais da árvore como madeira, folhas e cascas estão sendo estudados por conter antioxidantes fenólicos naturais e o nó de madeira, por conter grandes quantidades de compostos fenólicos, como Ligninas, Lignananas, Estilbenos e Flavonóides, também despertam interesse de indústrias farmacêuticas e alimentícias (Holmbom et al., 2003).

Extratos de nós de madeira macia são um recurso valioso, com potencial de utilização em alimentos, produtos farmacêuticos e biocidas naturais (Phelan et al., 2009). Espécies de pinheiros contêm uma elevada percentagem de Estilbenos nos nós, enquanto que os flavonóides são abundantes em nós de determinadas espécies de madeira dura (Holmbom et al., 2003).

Phelan et al. (2009) avaliando extratos de nós de *Pinus sitchensis* (Bong.) Carrière e *P. banksiana* Lamb., verificaram diferenças entre teores e tipos de lignanas e flavonóides, para as espécies. Segundo os autores, o extrato do nó de *P. banksiana* contém a menor quantidade de lignanas, enquanto o de *P. sitchensis* apresenta teor de lignanas três vezes mais alto. Flavonóides foram observados em maior quantidade em *P. banksiana* e estilbenos não foram observados em *P. sitchensis*.

Teores de fenóis foram similares entre as duas espécies. Essa pesquisa demonstrou ainda, que nós de coníferas apresentam propriedades antioxidantes por meio de transferência de elétrons e que estilbenos tem efeitos inibitórios diretos sobre o crescimento e oxidação em cultura de células humanas.

Compostos fenólicos oriundos de extratos de nós apresentam propriedades biológicas medicinais importantes, incluindo ação anti-tumoral, anti-oxidante e efeitos cardioprotetores (Thompson, 2000; Zern & Fernandez, 2005). Extratos de nó de madeira de *Pinus banksiana* (Lamb.) e *Pinus sitchensis* (Bong.) exercem efeitos específicos imunológicos, citoprotetores e imunomoduladores em células intestinais humanas (Pietarinen et al., 2006), enquanto que os estilbenos presentes em extratos de nós de *P. silvestris* são responsáveis pelos efeitos anti-bacterianos, ação antimicrobiana e as propriedades citotóxicas dessa espécie (Lindberg et al., 2004).

Em estudo com extratos de nós de duas espécies, potenciais efeitos protetores contra-oxidante, indução de lesão celular e danos no DNA foram avaliados (Phelan et al., 2009). Esses autores demonstraram que nós de coníferas, além de apresentarem propriedades antioxidantes, contêm estilbenos capazes de promover efeitos inibitórios diretos sobre a viabilidade e crescimento de células em cultura e que, extrato de nó de *P. banksiana* apresenta efeito mais toxicológico entre as espécies avaliadas.

O conteúdo de compostos químicos em um nó de madeira pode ser várias centenas de vezes maior que na madeira adjacente, sendo que este conteúdo pode variar significativamente não só entre espécies, como entre nós na mesma árvore (Phelan et al., 2009). Estudos com mais de 50 espécies de árvores demonstram que os nós podem conter quantidades notavelmente mais elevadas de polifenóis do que a madeira adjacente ao nó, sendo que, para muitas espécies chegam a ser 20-100 vezes mais elevadas (Willför et al., 2003a Willför et al., 2003b). 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).

Desde os anos 1970, um grande número de lignanas também foi identificado, não só em espécies de madeira macia, mas também em espécies de madeira dura (Gottlieb & Yoshida, 1989). Estilbenos, flavonóides e lignanas são compostos eficazes no aprisionamento de radicais livres e apresentam atividade antioxidante variável dependendo da estrutura do composto (Pietarinen et al., 2006). Nós de *Pinus radiata* D. Don. e *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze demonstraram potencial para subprodutos a partir de seus extratos (Hillis & Inoue, 1968; Robert & Anderegg, 1974).

As Lignanas, que ocorrem de forma livre em nós, podem ser facilmente extraídas com o uso de etanol aquoso ou mesmo com água, podendo ser produzidas em larga escala a partir de nós nas fábricas de celulose e papel (Holmbom et al., 2003). Isso acarreta em facilidades para que pesquisas compreendam a sua bioatividade e forneçam bases para aplicações na medicina, nutrição, ou como antioxidantes naturais e biocidas (Phelan et al., 2009) ou em áreas de eletroquímicos e polímeros, além dos farmacológicos (Yu & Kim, 2020).

Spruce 7-hidroximatairesinol (HMR), forte antioxidante que possui ação inibidora para o crescimento de certos tumores, tem produção e comercialização como suplemento dietético nos Estados Unidos (Holmbom et al., 2003). Os mesmos autores afirmam que em uma grande fábrica de celulose usando madeira de abeto da Noruega, os nós são separados tornando possível a extração de 100 toneladas de HMR por ano.

Devido a questões de segurança alimentar e de demanda do mercado consumidor, tem havido um interesse considerável na substituição de antioxidantes sintéticos por alternativas naturais (Gülçin et al., 2006). Nesse sentido, o estudo das propriedades bioativas de extratos de nó de madeira pode apontar para novos produtos, o que configura uma área relativamente nova e promissora, com novos extratos de nós, especialmente de coníferas, a ser estudados e explorados, o que justifica investigações futuras (Phelan et al., 2009).

O estudo dos componentes químicos da madeira, em especial os nós apontam não somente para o melhor aproveitamento da madeira. Podem também indicar, sobretudo, novas fontes de utilização, incluindo a comercialização do nó de madeira como produto, com rentabilidade financeira maior do que a proporcionada pela destinação atual, além de fornecer subsídios para avanços nos mais diversos seguimentos de pesquisa, incluindo melhores estratégias de corte em serrarias (Tong et al., 2013). E que, na relação de derivados aplicados ao setor da construção, por exemplo, permite a substituição parcial de produtos petrolíferos por compósitos de lignina tornando os materiais finais e todo o setor de construção mais sustentável (Jędrzejczak et al., 2021).

3.4 Técnicas para caracterização de lignina

3.4.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{13}C

Dentre os métodos usados para caracterização estrutural elementar da madeira, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear do ^{13}C (RMN ^{13}C) é um dos mais reconhecidos (Nimz et al., 1984; Duarte et al., 2001). 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 & 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.

A imensa quantidade de absorções que representam todos os carbonos moleculares pode significar uma impressão quase digital de uma determinada madeira e a relação dos deslocamentos químicos dos carbonos, assim como o seu tipo, pode trazer informações que representam um retrato da composição, cujas características refletem a natureza do lenho (Souza et al., 2011).

A RMN permite determinar as propriedades de uma substância através da medida da interação de um campo eletromagnético com uma coleção de núcleos na presença de um campo magnético (Rodrigues, 2010). Na RMN a energia absorvida pelo espectro eletromagnético está relacionada às transições entre níveis de energia rotacionais dos núcleos componentes das substâncias (núcleos ou íons) contidas na amostra. A interação entre os núcleos e o campo magnético não depende apenas do tipo de núcleo, mas, também, do ambiente químico em que se encontra tal núcleo.

Como os núcleos em uma molécula são blindados fracamente pelas nuvens eletrônicas que os cercam, cuja densidade varia com o ambiente químico, a vizinhança deste núcleo interfere na frequência de transições do núcleo. Esta variação dá origem à absorção e frequência em posições diferentes no espectro de RMN, justificando a necessidade de análise cuidadosa dos espectros, para se obter informações precisas da dinâmica e estrutura molecular contida na amostra, bem como das interações inter e intramoleculares (Rodrigues, 2010). Segundo Preto (2007) o decaimento uniforme das intensidades dos núcleos de ^{13}C evidenciam a rigidez da estrutura molecular do material e Landucci et al. (1998), afirmam que a baixa intensidade está relacionada a altos teores de estruturas β -5 e β - β .

Os espectros de RMN ^{13}C das amostras de lignina são complexos, com sinais muitas vezes largos e sobrepostos, tornando-se difícil, em alguns casos, a identificação de um dado carbono ou um grupo de átomos de carbono (Baptista, 2006). Nos espectros de RMN ^{13}C dessa molécula, segundo Nimz et al. (1984) é possível identificar quatro zonas principais distintas cujos sinais são atribuídos conforme descrição abaixo (Quadro 1).

Quadro 1: Principais zonas espectrais de RMN 13C identificadas em ligninas.

Grupos Funcionais	Partes Por Milhão (ppm)
grupos carbonílicos e carboxílicos	200 – 165
carbonos aromáticos e olefínicos	165 – 100
carbonos alifáticos ligados a átomos de oxigênio	100 – 50
carbonos dos grupos –CH ₂ e –CH ₃ das cadeias alifáticas saturadas	50 – 10

Fonte: Autores (2015).

As estruturas fenólicas, que nos espectros de RMN 13C correspondem aos sinais a 147 e 149 ppm, são algumas das mais importantes unidades da lignina a serem estudadas. Frente aos reagentes de cozimento e branqueamento da pasta celulósica são mais reativas do que as estruturas não fenólicas, sendo importante estabelecer a relação entre elas para se pesquisar alterações químicas na macromolécula (Baptista, 2006).

3.4.2 Espectroscopia no infravermelho

A espectroscopia no infravermelho fornece evidências da presença de vários grupos funcionais na estrutura orgânica devido à interação das moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética em um processo de vibração, onde as ligações químicas apresentam frequências específicas, que vibram a níveis de energias definidos. Essas frequências são determinadas pela forma da molécula, seus níveis de energia e pela massa dos átomos que a constituem (Silveira, 2010).

O princípio de medição baseia-se no fato de a radiação infravermelha ser absorvida pelas ligações moleculares, como C-H, O-H, N-H, C=O, C-C, etc. As ligações covalentes que constituem as moléculas orgânicas estão em constantes movimentos axiais e angulares. A radiação no infravermelho faz com que átomos e grupos de átomos de compostos orgânicos vibrem com amplitude aumentada ao redor das ligações covalentes que os ligam.

O processo é quantizado e o espectro vibracional aparece como uma série de bandas, onde a mudança de nível de energia vibracional corresponde a uma série de mudanças de níveis de energia vibracional, fazendo com que as linhas se sobreponham dando origem às bandas observadas no espectro que podem ser apresentadas em número de ondas, utilizando a unidade centímetro inversas (cm⁻¹) ou em micrômetros (µm) (Silveira, 2010).

A região espectral do infravermelho possui radiação com números de onda num intervalo de 12.800 a 10 cm⁻¹, dividida em infravermelho próximo (12.800 a 4000 cm⁻¹), infravermelho médio (4000 a 200 cm⁻¹) e infravermelho distante de 200 a 10 cm⁻¹ (Cunha, 2006).

Ligações moleculares distintas e grupos funcionais presente em polissacarídeos, proteínas, lipídios, aromáticos e outros compostos dão origem a absorbância e aos números de onda específicos do espectro (Nelson & Cox, 2014). Todos os compostos dentro da amostra formam um espectro específico como uma impressão digital, sendo improvável a possibilidade de dois compostos diferentes terem o mesmo espectro no infravermelho (Silverstein et al., 1994).

Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), em combinação com análise multivariada, permite a análise da madeira sem longos processos de preparação da amostra e constitui fonte de informação para uma rápida avaliação da composição química das amostras de madeira (Chen et al., 2010), sendo utilizada desde o início da década de 1950, como ferramenta importante de análise de rotina para estudos químicos de lignina (Faix, 1992).

Para a detecção de interações intermoleculares específicas em polímeros a FTIR é uma ferramenta poderosa para estudo das alterações observadas nos grupos hidroxilas, carbonilas, e éter, fornecendo evidência direta de interações específicas entre os componentes. No entanto, devido à estrutura complexa e a natureza amorfa da lignina, é difícil estudar

essas interações e o complexo sistema de ligações de hidrogênio nessa macromolécula é examinado a partir da comparação com compostos modelo (Kubo & Kadla, 2005).

A região de interesse no espectro IV de ligninas é compreendida entre 4000 e 700 cm^{-1} (Saliba et al., 2001) e a caracterização de picos de absorção se faz principalmente de modo qualitativo, por comparação com dados tabelados (Tai et al., 1990; Yang & Ying, 2011). Nesta metodologia de interpretação, compostos - modelo são usados como padrões ou para relacionar alguns picos de absorção. Dessa forma, as atribuições dos picos de absorção IV de ligninas são feitas estudando comparativamente os espectros IV de alguns de seus modelos (Tai et al., 1990).

3.4.3 Histoquímicos

A lignina pode ser localizada e analisada qualitativa e quantitativamente utilizando uma vasta gama de técnicas (Donaldson, 2001), incluindo testes histoquímicos Wiesner e Mäule (Lin & Dence, 1992), microscopia de fluorescência (Donaldson & Knox, 2012), entre outros. Os reagentes de Wiesner e Mäule são os mais utilizados como testes para analisar qualitativamente a lignina, por minimizarem a interferência de compostos fenólicos que possam limitar a precisão dos resultados (Dean, 1997).

Apoiados por métodos químicos mais rigorosos, como a espectroscopia de RMN, a coloração positiva nessas reações podem ser tomada como evidência segura para a presença de lignina nos tecidos vegetais (Lewis & Yamamoto, 1990). Seções cortadas à mão são submetidas aos testes Wiesner e Mäule para localizar padrões de deposição de lignina (Patten et al., 2005).

No teste Wiesner a detecção de lignina na parede celular é feita a partir da reação química de floroglucinol com HCl sob condições ácidas (Geiger & Fuggerera, 1979). O reagente é utilizado como um corante (rosa a vermelho) para detectar grupos terminais de p-hidroxicinamaldeído em lignina de tecidos de plantas e embora frequentemente citado como específico para coniferil aldeído, reage com todos os três aldeídos fenolpropanóidicos (Patten et al., 2005), podendo ser usado para a detecção específica de unidades finais aldeídicas que são montadas durante os primeiros estágios de lignificação da parede celular do xilema (Pomar et al., 2002). A coloração com o reagente de Wiesner é estendida além das células de diferenciação do xilema jovens para alcançar a camada de células dos elementos do protoxilema (Ros Barceló et al., 2000).

No teste Mäule, tratamentos sequenciais com permanganato de potássio, ácido clorídrico e hidróxido de amônio converte e identifica unidades guaiacílicas e siringílicas evidenciando-as pela coloração marrom nas gimnospermas, ou vermelha na lignina das angiospermas. Usado como um fixador primário para tecidos de planta (Mollenhauer, 1959), o permanganato de potássio atua como agente de contraste na determinação da localização da lignina potencializando o estudo da ultra-estrutura de lignina na madeira (Bland et al., 1971).

Ambos os testes permitem apenas visualização temporária de cor, o que limita o tempo para obtenção de imagens após a aplicação dos reagentes em 20 minutos (Patten et al., 2007). A microscopia com fluorescência é utilizada para identificação, localização e quantificação de substâncias com estruturas capazes de emitir fluorescência (Koch & Kleist, 2001).

Embora a lignina não tenha uma cor característica, as paredes celulares lignificadas são facilmente distinguidas pela sua fluorescência natural (Liu et al., 1994). A lignina apresenta uma ampla gama de emissão de fluorescência tanto com luz ultravioleta como com luz visível (Donaldson & Knox, 2012). Sua auto fluorescência está associada a estruturas fenilpropanóides, estilbenos e grupos carbonila que formam a macromolécula (Dean, 1997) e permite o mapeamento da organização desse polímero (Paës, 2014), sendo um método específico para sua localização (Donaldson, 2013).

É utilizada para investigar a modificação da parede celular, ocasionada pela distribuição de lignina em vários tipos de madeira ou durante a formação da madeira (De Micco et al., 2012). Além disso, contribui para a identificação de efeitos da transformação industrial em madeira e pasta de papel, a fotodegradação de superfícies de madeira (Pandey, 2005) e pode

fornecer informações químicas específicas para detectar a madeira de compressão dimensionando a proporção dessa em relação a madeira normal (Donaldson et al., 2010).

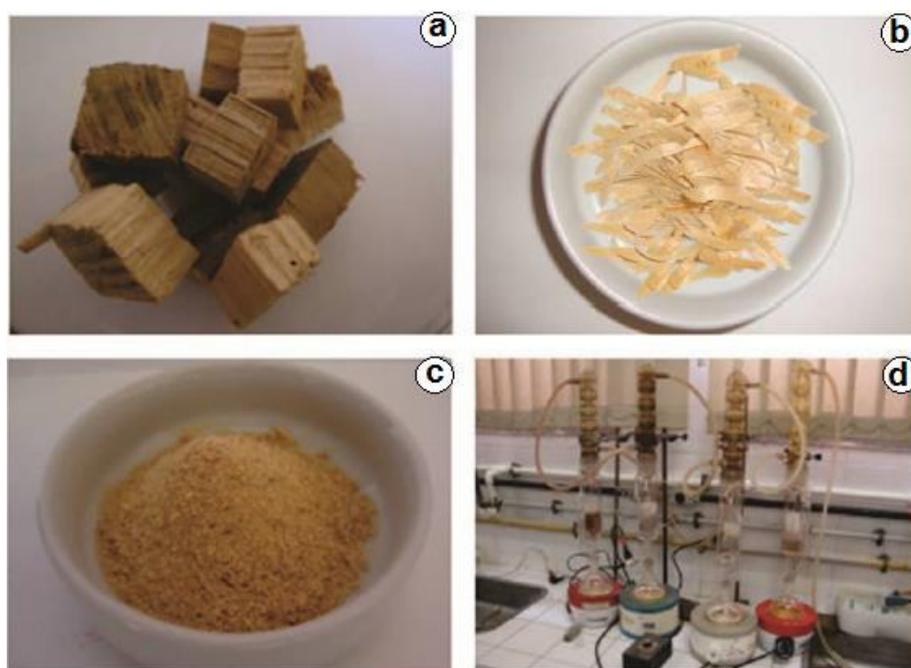
3.4.4 Análise quantitativa da lignina

3.4.4.1 Lignina Klason

Na análise quantitativa da lignina o método Klason é considerado padrão para estudo de tecidos lenhosos, sendo usado como método comparativo para avaliação de protocolos de outros métodos de quantificação (Dean, 1997). Neste método, pela hidrólise ácida, os polissacarídeos são removidos e a lignina é liberada como resíduo (Saliba et al., 2001).

A lignina Klason (lignina insolúvel em ácido) é determinada segundo a descrição de Abreu et al. (2006): transfere-se 300 mg de material livre de extrativo para tubo de ensaio e adiciona-se lentamente 3 mL de H₂SO₄ 72%. O material é agitado por 1 hora à temperatura entre 25 e 30°C, transferido para um balão de 250 mL e diluído em uma solução de H₂SO₄ a 15% em adição de 84 mL de água destilada; posteriormente é deixado em refluxo por 4 horas, permanecendo em repouso por 24 horas para sedimentar. Após o repouso, o resíduo é lavado com 500 mL de água destilada quente em um funil de placa sintetizada (Figura 2).

Figura 2 - Ilustração sequencial de material lenhoso de *Pinus elliottii* var. *elliottii* para a extração de lignina: (A) cavacos retirados dos discos, (B) fragmentação dos cavacos, (C) material convertido em serragem e (D) extração.



Fonte: Autores (2015).

A fitomassa lenhosa é fragmentada até obter um material 'macerado', tipo serragem, a fim de que a lignina desse material se torne o mais facilmente acessível pelos reagentes químicos em ação durante a degradação de sua estrutura quando em contato, possibilitando, posteriormente, condições de análise de forma mais confiável possível, gerando resultados satisfatórios.

4. Considerações Finais

A compreensão sobre a lignina permite vislumbrar possibilidades de ampliar ainda mais o conhecimento sobre mecanismos que interagem nas propriedades físicas e químicas da madeira e na sua resistência nas zonas de interface nó-madeira, permitindo estimar, de forma mais precisa, as forças atuantes nessas regiões. Permite ainda desenvolver estratégias para reduzir prejuízos causados pela presença de nós em peças de madeira, além de ampliar estudos sobre potenciais medicinais e alimentares, dentre outros.

O conhecimento da estrutura da lignina é prerrogativa para pesquisas futuras e para eventual manipulação genética, de maneira a contribuir para a formação de lignina com uma estrutura molecular que permita aumentar a qualidade da madeira nos seus diferentes fins de interesse, seja energético, seja para o uso de peças de madeira, por exemplo.

Referências

- Abreu, H. S., Carvalho, A. M., Monteiro, M. B. O., Pereira, R. P. W., Silva, H. R., Souza, K. C. A., Amparado, K. F. & Chalita, D. B. (2006). Métodos de análise em química da madeira. *Floresta e Ambiente*, Série técnica, 01-20.
- Abreu, H. S., Latorraca, J. V., Pereira, R. P. W., Monteiro, M. B. O., Abreu, F. A. & Amparado, K. F. (2009). A Supramolecular Proposal of Ligninin Structure And its Relation with the Wood Properties. *Academia Brasileira de Ciência*, 81(1), 137-142.
- Adler, E. (1977). Lignin chemistry - past, present and future. *Wood Science and Technology*, 11(3), 169-218.
- Ali, M. B., Khatun, S., Hahn, E. J. & Paek, K. Y. (2006). Enhancement of phenylpropanoid enzymes and lignin in *Phalaenopsis* or chid and their influence on plant acclimatisation at different levels of photosynthetic photon flux. *Plant Growth Regulation*, 49(2-3), 137-146.
- Anderegg, R. J. & Rowe, J. W. (1974). Lignans, the major component of resin from *Araucaria angustifolia* knots. *Holzforchung*, 28(5), 171-175.
- Assis, C. O., Trugilho, P. F., Goulart, S. L., Assis, M. R. D. & Bianchi, M. L. (2017). Efeito da Aplicação de Nitrogênio na Produção e Qualidade da Madeira e Carvão Vegetal de um Híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. *Floresta e Ambiente*, 25(1), e00117914.
- Baptista, C. M. C. (2006). *Influência das condições de cozimento sobre a estrutura da lenhina e a branqueabilidade da pasta kraft de Pinus pinaster*. Tese (Doutorado em Química) - Universidade da Beira Interior, Lisboa, 481 p.
- Barceló, A. R. (1997). Lignification in plant cell-walls. *International Review of Cytology*, 176, 87-132.
- Berglund, J., Mikkelsen, D., Flanagan, B. M., Dhital, S., Gaunitz, S., Henriksson, G., Lindström, M. E., Yakubov, G. E., Gidley, M. J. & Vilaplana, F. (2020). Wood hemicelluloses exert distinct biomechanical contributions to cellulose fibrillar networks. *Nature communications*, 11(1), 1-16.
- Bidlack, J., Malone, M. & Benson, R. (1992). Molecular structure and component integration of secondary cell wall in plants. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*, 72, 51-56.
- Bland, D. E., Foster, R. C. & Logan, A. F. (1971). The mechanism of permanganate and osmium tetroxide fixation and the distribution of lignin in the cell wall of *Pinus radiata*. *Holzforchung*, 25(5), 137-143.
- Boyd, J. D. (1972). The growth stresses, evidence of a origin in differentiation and lignification. *Wood Science and Technology*, 6, 251-262.
- Britez, C. A. & Nogueira, V. (2006). *Inter-relação entre as propriedades e a microestrutura das madeiras*. Departamento de Engenharia de Construção Civil – Universidade de São Paulo, 25 p.
- Browning, B. L. (1967). *Methods of wood chemistry* – Interscience Publishers – New York, v. 2, 800 p.
- Burger, L. M. & Richter, H. G. (1991). *Anatomia da madeira*. São Paulo, Nobel, 154 p.
- Carpita, N. C. & McCann, M. C. (2020). Redesigning plant cell walls for the biomass-based bioeconomy. *Journal of Biological Chemistry*, 295(44), 15144-15157.
- Carvalho, W., Canilha, L., Ferraz, A. & Milagres, A. M. F. (2009). Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. *Química Nova*, 32(8), 2191-2195.
- Chen, H., Ferrari, C., Angiuli, M., Yao, J., Raspi, C. & Bramanti, E. (2010). Qualitative and quantitative analysis of wood samples by Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 772-778.
- Chen, Y. A., Shin, J. W. & Liu, Z. H. (2002). Effect of light on peroxidase and lignin synthesis in mungbean hypocotyls. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(1), 33-39.
- Chio, C., Sain, M. & Qin, W. (2019). Lignin utilization, a review of lignin depolymerization from various aspects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 107, 232-249.

- Cienfuegos, F. & Vaitsman, D. (2000). *Análise instrumental*. Rio de Janeiro, Interciência, 606 p.
- Cunha, F. C. (2006). *Modelos de calibração multivariada associados à espectroscopia vibracional para análise de misturas diesel-óleos vegetais*. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade de Brasília, Brasília, 108 p.
- De Micco, V., Ruel, K., Joseleau, J. P., Grimma-Pettenati, J. & Aronne, G. (2012). Xylem anatomy and cell wall ultra structure of *Nicotiana tabacum* L. after genetic modification through transcriptional activator EGMYP2. *IAWA*, 33, 269-286.
- Dean, J. F. D. (1997). *Lignin analysis*. In, Dashek, W. V. (Ed.). *Methods in plant biochemistry and molecular biology*. Boca Raton, CRC Press, 199-215.
- Donaldson, L. (2013). Softwood and hardwood lignin fluorescence spectra of wood cell walls in different mounting media. *Iawa*, 34(1), 3-19.
- Donaldson, L. A. & Knox, J. P. (2012). Localization of cell wall polysaccharides in normal and compression wood of *Radiata Pine*, relationships with lignification and microfibril orientation. *Plant Physiology*, 158(2), 642-653.
- Donaldson, L. A. (2001). Lignification and lignin topochemistry — an ultrastructural view. *Phytochemistry*, 57(6), 859-873.
- Donaldson, L. A., Radotić, R., Kalauzi, A., Djikanović, D. & Jeremić, M. (2010). Quantification of compression wood severity in tracheids of *Pinus radiata* D. Don using confocal fluorescence imaging and spectral deconvolution. *Journal of Structural Biology*, 169(1), 106-115.
- Duarte, A. P., Robert, D. & Lachenal, D. (2001). *Eucalyptus globulus* kraft pulp residual lignins. Part 2. Modification of residual lignin structure in oxygen bleaching. *Holzforschung*, 55(6), 645-651.
- Dutta, S., Wu, K. C. W. & Saha, B. (2014). Emerging strategies for breaking the 3D amorphous network of lignin. *Catalysis Science & Technology*, 4(11), 3785-3799.
- Evans, R. & Ilic, J. (2001). Rapid prediction of wood stiffness from microfibril angle and density. *Forest Products Journal*, 51(3), 53-57.
- Faix, O. (1992). Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Methods in Lignin Chemistry*. Springer Series in Wood Science, 83-109.
- Fan, L., Linker, R., Gepstein, S., Tanimoto, E., Yamamoto, R. & Neumann, P. M. (2006). Progressive inhibition by water deficit of cell wall extensibility and growth along the elongation zone of maize roots is related to increased lignin metabolism and progressive stelar accumulation of wall phenolics. *Plant Physiology*, 140(2), 603-612.
- Fengel, D. & Wegener, G. (1984). *Wood, chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter, Berlin, 613p.
- Fosket, D. E. (1994). *Plant growth and development, a molecular approach*. San Diego, Academic Press, 580p.
- Frankenstein, C., Schmitt, U. & Koch, G. (2006). Topochemical studies on modified lignin distribution in the xylem of poplar (*Populus* spp.) after wounding. *Annals of Botany*, 97, 195-204.
- Freudenberg, K. (1968). *Constitution and biosynthesis of lignin*. In, Freudenberg, K., Neish, A. C. (eds.). *Wood, chemistry, ultrastructure, reactions*. Berlin & New York, Walter de Gruyter, Cap. 2.
- Gatto D. A., Calegari, L., Santini, E. J., Stangerlin, D.M., Trevisan, R. & Oliveira, R. S. (2008). Propriedades da madeira de *Pinus elliottii* Engelm submetida a diferentes temperaturas de secagem. *Revista Cerne*, 14(3), 220-226.
- Geiger, H. & Fuggerera, H. (1979). On the chemistry of the Wiesner reaction on lignin. *Naturforsch*, 34(b), 1471-1472.
- Gottlieb, O. O. & Yoshida, M. (1989). Lignans. In, Rowe, J. W. (ed.). *Natural products of Wood plants*. Springer Berlin Heidelberg, 7, 439-511.
- Guimarães, C. S., Lacorte, C. & Brasileiro, A. C. M. (2003). Transformação genética em espécies florestais. *Ciência Florestal*, 13(1), 167-178.
- Gülçin, I., Elias, R., Gepdiremen, A. & Boyer, L. (2006). Antioxidant activity of lignans from fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.). *European Food Research and Technology*, 223(6), 759-767.
- Hägglund, E. & Larsson, S. (1937). Om grankvistens kemiska sammansättning och dess förhållande vid sulfitkocknings processen. *Svensk Papperstidn*, 40, 356-360.
- Hawkins, S. & Boudet, A. (2003). Defence lignin' and hydroxycinnamyl alcohol dehydrogenase activities in wounded *Eucalyptus dunnii*. *Forest Pathology*, 33(2), 91-104.
- Hilal, M., Parrado, M. F., Rosa, M., Gallardo, M. & Orce, L. (2004). Epidermal lignin deposition in quinoa cotyledons in response to UV-B radiation. *Photochemistry and Photobiology*, 79(2), 205-210.
- Hillis, W. E. & Inoue, T. (1968). The formation of polyphenols in trees-IV, The polyphenols formed in *Pinus radiata* after *Sirex* attack. *Phytochemistry*, 7(1), 13-22.
- Holmbom, B., Eckerman, C., Eklund, P., Hemming, J., Nisula, L., Reunanen, M., Sjöholm, R., Sundberg, A., Sundberg, K. & Willför, S. (2003). Knots in trees – A new rich source of lignans. *Phytochemistry Reviews*, 2, 331-340.
- Inoue, K., Sewalt, V. J. H., Ballance, G. M., Ni, W., Stürzer, C. & Dixon, R. A. (1998). Developmental expression and substrate specificities of alfalfa caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase in relation to lignification. *Plant Physiology*, 117(3), 761-770.
- Janas, K. M., Cvikrová, M., Palagiewicz, A. & Eder, J. (2000). Alterations in phenylpropanoid content in soybean roots during low temperature acclimation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(7-8), 587-593.

- Janas, K. M., Cvikrová, M., Palagiewicz, A., Szafranska, K. & Posmyk, M. M. (2002). Constitutive elevated accumulation of phenylpropanoids in soybean roots at low temperature. *Plant Science*, 163(2), 369-373.
- Jędrzejczak, P., Collins, M. N., Jesionowski, T. & Klapiszewski, Ł. (2021). The role of lignin and lignin-based materials in sustainable construction—a comprehensive review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 187, 624-650.
- Kim, Y. J., Kim, D. G., Lee, S. H. & Lee, I. (2006). Wound-induced expression of the ferulate 5-hydroxylase gene in *Camptotheca acuminata*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760(2), 182-190.
- Klason, P. (1920). Über Lignin und Lignin-Reaktionen. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 53(5), 706-711.
- Klock, U., Muniz, G. I. B., Hernandez, J. A. & Andrade, A. S. (2005). *Apostila de química da madeira*. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 86p.
- Koch, G. & Kleist, G. (2001). Application of scanning UV microspectrophotometry to localise lignins and phenolic extractives in plant cell walls. *Holzforschung*, 55, 563-567.
- Kubo, S. & Kadla, J. K. (2005). Hydrogen bonding in lignin, a fourier transform infrared model compound study. *Biomacromolecules*, 6, 2815-2821.
- Kusumoto, D. (2005). Concentrations of lignin and wall-bound ferulic acid after wounding in the phloem of *Chamaecyparis obtuse*. *Trees*, 19(4), 451-456.
- Landucci, L. L., Ralph, S. A. & Ammel, K. E. (1998). ¹³C NMR characterization of guaiacyl, guaiacyl/syringyl and syringyl dehydrogenation polymers. *Holzforschung*, 52(2), 160-170.
- Lewis, N. G. & Yamamoto, E. (1990). Lignin, occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 41, 455-496.
- Lin, C. C., Chen, L. M. & Liu, Z. H. (2005). Rapid effect of copper on lignin biosynthesis in soybean roots. *Plant Science*, 168(3), 855-861.
- Lindberg, L. E., Willför, S. M. & Holmbom, B. R. (2004). Antibacterial effects of knot wood extractives on paper mill bacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31(3), 137-147.
- Liu, L., Dean, J. F. D., Friedman, W. E. & Eriksson, K-E. L. (1994). A laccase-like phenoxidase is correlated with lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* tissues. *Plant Journal*, 6(2), 213-224.
- Lobão, M. S., Lúcia, R. M. D., Moreira, M. S. S. & Gomes, A. (2004). Caracterização das propriedades físico-mecânicas da madeira de Eucalipto com diferentes densidades. *Revista Árvore*, 20(6), 889-894.
- Lopes, E. D., de Laia, M. L., dos Santos, A. S., Soares, G. M., Leite, R. W. P. & Martins, N. de S. (2017). Influência do espaçamento de plantio na produção energética de clones de *Corymbia* e *Eucalyptus*. *Floresta*, 47(1), 95-104.
- Martone, P. T., Estevez, J. M., Lu, F., Ruel, K., Denny, M. W., Somerville, C. & Ralph J. (2009). Discovery of Lignin in Seaweed Reveals Convergent Evolution of Cell-Wall Architecture. *Current Biology*, 19(2), 169-175.
- Micic, M., Milorad, J., Radotic, K., Mavers, M. & Leblanc, R. M. (2000). A Visualization of artificial lignin supramolecular structures. *Scanning*, 22(5), 288-294.
- Mollenhauer, H. (1959). Permanganate fixation of plant cells. *Biophysical and Biochemical Cytology*, 6(3), 431-436.
- Möller, R., Ball, R. D., Henderson, A. R., Modzel, G. & Find, J. (2006). Effect of light and activated charcoal on tracheary element differentiation in callus cultures of *Pinus Radiata* D. Don. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84(2), 161-171.
- Monties, B. (1989). Molecular structure and biochemical properties of lignins in relation with possible self-organization of lignin network. *Annales des Sciences Forestières*, 46(suppl), 846-855.
- Moura, J. C. M. (2008). *Controle do teor de lignina em Eucalyptus, variação interespecífica e induzida por frio*. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 99 p.
- Moura, L. F. & Brito, J. O. (2001). Influência da desrama artificial sobre a densidade básica, a composição química e as características das traqueídes da madeira de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* Barr. Et. Golf. *Revista Árvore*, 25(3), 369-374.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2014). *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. Artmed, 1336 p.
- Nimz, H. H., Tschirner U., Stähle, M., Lehmann, R. & Schlosser, M. (1984). Carbon-13 NMR spectra of lignins, comparison of structural units in spruce and beech lignin. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 4(3), 265-284.
- Olenichenko, N. A. & Zagoskina, N. V. (2005). Response of winter wheat to cold, Production of phenolic compounds and L-phenylalanine ammonia lyase activity. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41(6), 600-603.
- Oliveira, J. T. S. (1997). *Caracterização da madeira de eucalipto para construção civil*. Tese (Doutorado em Engenharia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 429 p.
- Pádua, E. M. M. D. (2002). Análise de conteúdo, análise de discurso: questões teórico-metodológicas. *Revista de Educação PUC-Campinas*, 13, 21-30.
- Paës, G. (2014). Fluorescent probes for exploring plant cell wall deconstruction, a review. *Molecules*, 19, 9380-9402.

- Pandey, K. K. (2005). Study of the effect of photo-irradiation on the surface chemistry of wood. *Polymer Degradation and Stability*, 90(1), 9-2005.
- Patten, A. M., Cardenas, C. L., Cochrane, F. C., Laskar, D. D., Bedgar, D. L., Davin, L. B. & Lewis, N. G. (2005). Reassessment of effects on lignification and vascular development in the *irx4 Arabidopsis* mutant. *Phytochemistry*, 66(17), 2092-2107.
- Patten, A. N., Jourdes, M., Brown, E. E., Laborie, M. P., Davin, L. B. & Lewis, N. G. (2007). Reaction tissue formation and stem tensile modulus properties in wild-type and p-coumarate-3-hydroxylase down regulated lines of alfalfa, *Medicago sativa* (Fabaceae). *American Journal of Botany*, 94(6), 912-925.
- Payen, A. (1938). "Hand Book of ceramics and composites". In, Cherimisinoff, N. P. (Ed.). *Lignocellulosic fiber reinforced polymer composite*. New York, Marcel Decker, 1, 339.
- Phelan, M., Aherne, S. A., Wong, A. & O'Brien, N. M. (2009). Bioactive properties of wood knot extracts on cultured human cells. *Journal of Medicinal Food*, 12(6), 1245-1251.
- Pietarinen, S. P., Willför, S. M., Ahotupa, M. O., Hemming, J. E. & Holmbom, B. R. (2006). Knot wood and bark extracts, strong antioxidants from waste materials. *Journal of Wood Science*, 52(5), 436-444.
- Pilate, G., Chabbert, B., Cathala, B., Yoshinaga, A., Leple, J. C., Laurans, F., Lapierre, C. & Ruel, K. (2004). Lignification and tension wood. *Compte sRendus Biologies*, 327(9), 889-901.
- Pomar, F., Merino, F. & Ros Barceló, A. (2002). O-4-Linked coniferyl and sinapyl aldehydes in lignifying cell walls are the main targets of the Wiesner (phloroglucinol-HCl) reaction. *Protoplasma*, 220, 17-28.
- Preto, M. S. M. (2007). *Avaliação dos componentes do capim navalha por RMN*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Polímeros) – Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 62 p.
- Ralph, J., Lapierre, C. & Boerjan, W. (2019). Lignin structure and its engineering. *Current opinion in biotechnology*, 56,240-249.
- Rampazzo, L (2015). Metodologia científica: para alunos dos cursos de graduação e pós-graduação. 8 ed. São Paulo: edições Loyola, 2015. 154p.
- Rigatto, P. A., Dedecek, R. A. & Matos, J. L. M. (2004). Influência dos atributos do solo sobre a qualidade da madeira de *Pinus taeda* para produção de celulose kraft. *Revista Árvore*, 28(2), 267-273.
- Robert, D. (1992). *Carbon-13 nuclear magnetic resonance. Methods in lignin chemistry*. Lin, S. Y., Dence, C. W. (Eds.), Springer Series in Wood Science, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Capítulos 5-4, 250- 273.
- Rodrigues, E. D. (2010). *Estratégias de aumento de eficiência da análise de produtos naturais por espectroscopia de ressonância magnética nuclear*. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 231 p.
- Ros Barceló, A., Pomar, F. & Pedreño, M. A. (2000). Competitive inhibitor-dissected histochemistry of the peroxidase responsible for syringyl lignin biosynthesis in *Z. elegans* xylem. *Australian Journal of Plant Physiology*, 27, 1101-1107.
- Saliba, E. O. S., Rodrigues, M. N., Morais, S. A. L. & Piló-Veloso, D. (2001). Ligninas - métodos de obtenção e caracterização química. *Ciência Rural*, 31(5), 917-928.
- Scanavaca-Junior, L. & Garcia, J. N. (2004). Determinação das propriedades físicas e mecânicas da madeira de *Eucalyptus urophylla*. *Scientia Forestalis*, 65, 120-129.
- Silva, J. C. (2002). *Caracterização da madeira de Eucalyptus grandis Hill ex. Maiden, de diferentes idades, visando a sua utilização na indústria moveleira*. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 160 p.
- Silva, J. C., Matos, J. L. M., Oliveira, J. T. & Evangelista, W. V. (2005). Influência da idade e da posição ao longo do tronco na composição química da madeira de *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden. *Revista Árvore*, 29(3), 455-460.
- Silveira, A. J. A. (2010). *Química Orgânica Teórica*. Belém, UFPA, 342 p.
- Silverstein, R. M. (1994). Espectrometria no infravermelho. In, Silverstein, R. M., Bassler, G. C., Morrill, T. C. (Org.). Alencastro, R. B. (Trad.). *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. 5. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, Cap. 3, 530p.
- Sjostrom, F. (1993). *Wood chemistry fundamentals and application*. New York, Academic Press, 223p.
- Souza, N. D., Abreu, H. S., Elias, T. F., Latorraca, J. F. L. & Maeda, J. M. (2011). Dados de carbono molecular do extrato ciclo-hexano da madeira de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blacke por RMN de ¹³C. *Floresta e Ambiente*, 18(2), 186-197.
- Su, G., An, Z., Zhang, W. & Liu, Y. (2005). Light promotes the synthesis of lignin through the production of H₂O₂ mediated by diamine oxidases in soybean hypocotyls. *Journal of Plant Physiology*, 162, 1297-1303.
- Tai, D. S., Chen, C. L. & Gatzl, J. S. (1990). Chemistry of Delignification During Kraft Pulping of Bamboos. *Wood Chemistry and Technology*, 10(1), 75-99.
- Teixeira, A. F., Andrade, A. B., Ferrarese - Filho, O. & Ferrarese, M. L. L. (2006). Role of calcium on phenolic compounds and enzymes related to lignification in soybean (*Glycine max* L.) root growth. *Plant Growth Regulation*, 49(1), 69-76.
- Thompson, L. U. (2000). Lignans and isoflavones. In, Eisenbrand, G., Dayan, A. D., Elias, P. S., Grunow, W. & Schlatter, J. (Ed.). *Carcinogenic/anticarcinogenic factors in food, novel concepts?* Germany, DFG symposium, 348-364.
- Tong, Q., Duchesne, I., Belley, D., Beaudoin, M. & Swift, E. (2013). Characterization of knots in plantation white spruce. *Wood and Fiber Science*, 45, 84-97.

- Trugilho, P. F. (2009). Densidade básica e estimativa de massa seca e de lignina na madeira em espécies de *Eucalyptus*. *Ciência e Agrotecnologia*, 33, 1228-1239.
- Trugilho, P. F., Lima, J. T. & Mendes, L. M. (1996). Influência da idade nas características físico-químicas e anatômicas da madeira de *Eucalyptus saligna*. *Revista Cerne*, 2(1), 94-111.
- Turley, D. B., Chaudhry, Q., Watkins, R. W., Clark, J. H. & Deswarte, F. E. I. (2006). Chemical products from temperate forest tree species - Developing strategies for exploitation. *Industrial Crops and Products*, 24, 238-243.
- Vale, A. T., Dias, I. S. & Santana, M. A. E. (2010). Relações entre propriedades químicas, físicas e energéticas da madeira de cinco espécies de cerrado. *Ciência Florestal*, 20(1), 137-146.
- Vanholme, R., de Meester, B., Ralph, J. & Boerjan, W. (2019). Lignin biosynthesis and its integration into metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*, 56, 230-239.
- Vidaurre, G. B., Lombardi, L. R., Nutto, L., Nistal, F. J. F., Oliveira, J. T. S. & Arantes, M. D. C. (2013). Propriedades da madeira de reação. *Floresta e Ambiente*, 20, 1-37.
- Vincent, D., Lapierre, C., Pollet, B., Cornic, G., Negroni, L. & Zivy, M. (2005). Water deficits affect caffeate O-Methyltransferase, lignification, and related enzymes in maize leaves. A proteomic investigation. *Plant Physiology*, 137(3), 949-960.
- Vosgerau, D. S. A. R. & Romanowski, J. P. (2014). Estudos de revisão: implicações conceituais e metodológicas. *Revista diálogo educacional*, 14(41), 165-189.
- Willför, S., Hemming, J., Reunanen, M. & Holmbom, B. (2003a). Phenolic and lipophilic extractives in Scots pine knots and stem wood. *Holzforschung*, 57(4), 359-372.
- Willför, S., Nisula, L., Hemming, J., Reunanen, M. & Holmbom, B. (2003b). Bioactive phenolic substances in industrially important tree species. Part 1, Knots and stem wood of different spruce species. *Holzforschung*, 58(4), 335-344.
- Yang, D. & Ying, Y. (2011). Applications of Raman Spectroscopy in Agricultural Products and Food Analysis, A Review. *Applied Spectroscopy Reviews*, 46(7), 539-560.
- Yu, O. & Kim, K. H. (2020). Lignin to materials, A focused review on recent novel lignin applications. *Applied Sciences*, 10-13(4626), 2-16.
- Zagoskina, N. V., Olenichenko, N. A., Klimov, S. V., Astakhova, N. V., Zhivukhina, E. A. & Trunova, T. I. (2005). The effects of cold acclimation of winter wheat plants on changes in CO₂ exchange and phenolic compound formation. *Russian Journal of Plant Physiology*, 52(3), 320-325.
- Zern, T. L. & Fernandez, M. L. (2005). Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 135, 2291-2294.