

Recebido: 18-05-2018 Aceito: 22-09-2018 Publicado: 21-11-2018

Editorado por: Bruno Dufau Mattos

Uso de RMN de ^{13}C para identificação da madeira de *Corymbia citriodora*

Karine Machado das Neves¹, Lorena de Andrade Pinto¹, Gabriela Fontes Mayrinck Cupertino¹, Natália Dias de Souza¹, Ananias Francisco Dias Júnior^{2*}

¹Departamento de Produtos Florestais - Instituto de Floresta, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brasil.

²Departamento de Ciências Florestais e da Madeira, Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES, Brasil.

RESUMO A classificação do gênero *Eucalyptus* é relativamente complexa, visto que as espécies desse gênero apresentam características anatômicas e morfológicas muito parecidas, trazendo muitas vezes dúvidas sobre a sua origem botânica. Estudos baseados em características morfológicas e moleculares levaram a uma nova reclassificação do gênero *Eucalyptus*, onde algumas espécies foram excluídas, e passaram a pertencer a um novo gênero, o *Corymbia*. A utilização da Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C (RMN de ^{13}C), tem sido testada como uma nova ferramenta para contribuir com a identificação de madeiras. Diante disso, este trabalho teve como objetivo identificar a espécie de *Corymbia citriodora* usando-se da técnica de RMN de ^{13}C , com base nas variações espectrais dos extrativos da região do cerne do lenho. Sinais característicos e específicos foram encontrados para a espécie *Corymbia citriodora* e nenhum sinal característico foi detectado para o gênero *Eucalyptus*. A RMN de ^{13}C poderá constituir uma ferramenta auxiliar para os métodos de identificação de madeiras, tendo em vista que foram encontrados sinais característicos específicos para a espécie *Corymbia citriodora*.

Palavras-chave: Identificação de madeiras; gênero *Eucalyptus*; extrativos da madeira.

^{13}C NMR use for species identification of *Corymbia citriodora* wood

ABSTRACT The classification of the *Eucalyptus* genus is relatively complex, since the species of these genus present very similar anatomical and morphological characteristics, often causing doubts about its botanical origin. Studies based on morphological and molecular characteristics have resulted in a new reclassification of the genus *Eucalyptus* and some species were excluded, to form a new genus, *Corymbia*. The use of ^{13}C Carbon Nuclear Magnetic Resonance (^{13}C NMR) has been tested as a new tool to contribute to the identification of wood. The aim of this work was to identify the species of *Corymbia citriodora* through the ^{13}C NMR technique, based on the spectral variations. Characteristic and specific signals were found for the species *Corymbia citriodora* and no characteristic signal was detected for the genus *Eucalyptus*. ^{13}C NMR may be an auxiliary tool for wood identification methods, since specific characteristic signals have been found for the *Corymbia citriodora* specie.

Keywords: Wood identification; *Eucalyptus* genus; wood extractives.

Introdução

A utilização da madeira de reflorestamento, principalmente, a de eucalipto, vem crescendo devido ao melhor conhecimento de suas propriedades, maior divulgação e à crescente preocupação com a preservação das florestas nativas (FERREIRA et al., 2004; AMAZONAS,

2018), além destas madeiras possuem preço competitivo, comparado às madeiras nativas. O uso do gênero *Eucalyptus* para suprir a demanda de madeira está relacionado às vantagens que este oferece, além do rápido crescimento e ocorrência de grande diversidade de espécies, possibilitando

a sua adaptação em diferentes tipos de clima e solo (ANGELI, 2006; DIAS JÚNIOR et al., 2013).

Estudos baseados na análise filogenética e nas características morfológicas e moleculares permitiram uma nova reclassificação. Hill e Johnson (1995), propuseram a exclusão das espécies chamadas de *bloodwood* (madeira vermelha) e formaram com estas um novo gênero denominado *Corymbia*. Este gênero ocupa um lugar de destaque no segmento de plantas aromáticas, se destacando também por colocar o Brasil como o maior produtor mundial de óleo essencial obtido de suas folhas (BOLAND et al., 1994; HUANG et al., 2015). Entre as espécies que foram reclassificadas está o *Eucalyptus citriodora*, que passou a ser denominado *Corymbia citriodora*. As espécies do gênero *Corymbia*, mas difundidas no Brasil são: *Corymbia citriodora*, *Corymbia torelliana* e *Corymbia maculata*.

Diferentes métodos de identificação podem ser utilizados levando em consideração os aspectos botânicos, anatômicos, genéticos, químicos e físicos. A utilização da técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN ^{13}C), tem sido testada com uma nova ferramenta para contribuir na identificação de espécies. A RMN ^{13}C tem sido aplicada para elucidar substâncias orgânicas que ocorrem em plantas (HARBONE, 1994; GOTTLIEB; YOSHIDAS, 1989; SAULNIER et al., 2013), principalmente, utilizando técnicas experimentais avançadas em 2D (LAMBERT; MAZZOLA, 2003; ZHANG et al., 2010).

Xia et al. (2018) estudou os carboidratos em extrativos de madeiras arqueológicas por meio de RMN, visando as respectivas identificações. Segundo os autores, em função do elevado valor econômico e cultural, a identificação dessas madeiras por meio dos seus constituintes químicos é uma tarefa difícil e técnicas não destrutivas e eficientes devem ser aplicadas. A RMN tem sido eficiente na elucidação das interações madeira-água e da dinâmica da água, fato que

fortalece o estudo dos extrativos como potenciais meios de identificação e diferenciação de espécies vegetais (WANG; LIU, 2012; PEEMOELLER et al., 2013).

A hipótese levantada é a de que a aplicação de RMN de ^{13}C permite a identificação de madeiras, com base na proporção de carbonos presentes nos extrativos e os seus deslocamentos químicos, que dificilmente se repete integralmente em outras. Diante do exposto, este estudo teve por objetivo analisar os extrativos do cerne da madeira de *Corymbia citriodora* (Hook) K. D. Hill & L. A. S. Johnson por meio da técnica de RMN de ^{13}C para fins de diferenciação botânica. Buscou-se ainda, verificar se a espécie apresenta sinais característicos do gênero *Eucalyptus*, através da avaliação do perfil espectral de RMN de ^{13}C .

Material e Métodos

Coleta do material lenhoso e preparo das amostras

A madeira utilizada foi proveniente de um povoamento florestal experimental situado na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. Foram selecionadas quatro árvores saudáveis da espécie *Corymbia citriodora* aleatoriamente, com idade aproximada de 15 anos. Foram seccionados discos com 5 cm de espessura, retirados na altura correspondente ao diâmetro a altura do peito (DAP).

Nos discos obtidos de cada árvore, foram identificadas as regiões da casca, do alburno, da zona de transição e do cerne. Para a análise da madeira utilizou-se a região do cerne, considerada a região com maior conteúdo de extrativos, baixa quantidade de água e células parenquimáticas mortas (YANG et al., 2004), além de que, após teste preliminares, verificou-se que os extratos orgânicos obtidos da referida região foram os mais significativos, por apresentarem um maior número de sinais de deslocamento químico (SOUZA et al., 2008; SOUZA et al., 2011).

Da região do cerne de cada disco foram obtidos cavacos de madeira utilizando-se um moinho de facas do tipo Willey, para que em seguida fossem convertidos em serragem. O material empregado nas análises químicas foi aquele que passou pela peneira de 40 *mesh* e o que ficou retido na peneira com malha de 60 *mesh*.

A extração em solvente orgânico foi feita por meio de *soxhlet*, utilizando-se 16 g de madeira moída seca ao ar livre e homogeneizada. O material foi acondicionado em um cartucho confeccionado com papel filtro e colocado dentro do tubo de extração. O solvente utilizado foi o cicloexano e este foi colocado em um balão de 1.000 ml. O tempo de extração foi de 48 horas ininterruptas. Logo após esse período, o balão de vidro contendo o material solúvel (extrato), foi concentrado em um rotavapor. Os concentrados foram transferidos para um recipiente até a completa evaporação do solvente em temperatura ambiente (ABREU et al., 2006).

Ressonância magnética nuclear (RMN de ^{13}C)

Os espectros dos extrativos da madeira foram obtidos em um espectrômetro Varian Mercury plus (300 MHz para ^1H ; 75,46 MHz para ^{13}C). Os extratos foram dissolvidos em Clorofórmio Deuterado (CDCl_3) contendo TMS como

referência interna e os deslocamentos químicos (em ppm) na faixa de 10-210 ppm, para as absorções observadas dos espectros de RMN ^{13}C . A sonda de 5 mm de diâmetro interno foi utilizada à temperatura ambiente e pulso de 45° . O uso da técnica complementar APT (*Attached Proton Test*) com a sequência de pulsos auxiliou nas identificações e correlações dos carbonos (BREKTMAEIR; VOELTER, 1987).

A obtenção dos espectros foi realizada no Centro de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da Universidade de Brasília (UnB). A análise do perfil espectral foi feita através da observação dos sinais de deslocamentos químicos e da intensidade dos picos. O extrato de cicloexano foi escolhido para análise de RMN de ^{13}C pelo fato de apresentar baixa complexidade, facilidade na obtenção dos espectros, maior solubilidade em clorofórmio, tempo de obtenção dos espectros menor em relação aos outros extratos polares (SOUZA et al., 2008; SOUZA et al., 2011).

Os dados espectroscópicos de RMN ^{13}C foram definidos segundo as regiões dos espectros: alifática (0 a 55 ppm), olefinicas e aromáticas (110 a 155 ppm) e carbonílicas e acíclicas (> 155), como ilustrado na Figura 1 (NETO, 2004) (Figura 1).

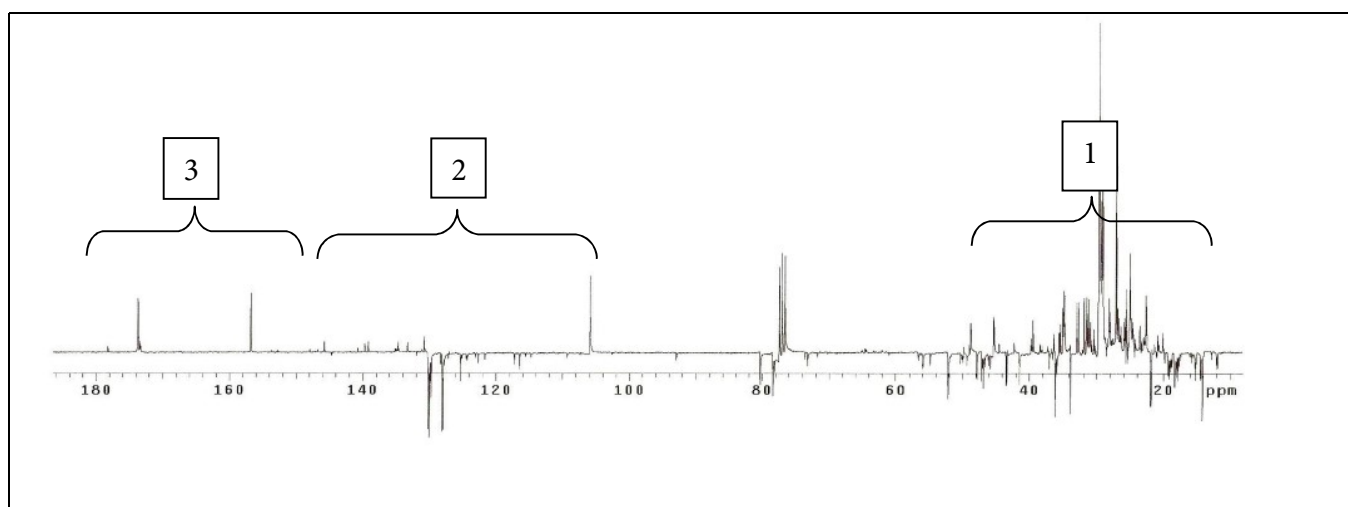


Figura 1. Regiões dos espectros de RMN ^{13}C : 1-região alifática; 2- região olefinicas e aromáticas, 3- região carbonílicas e acíclicas.
Figure 1. Regions of ^{13}C NMR spectra: 1-aliphatic region; 2-olefinic region, aromatic, 3-carbonyl and acyclic region.

Resultados e Discussão

A análise do perfil espectral foi feita através da observação dos sinais de deslocamentos químicos e da intensidade dos picos. Os espectros dos extrativos do cerne da madeira foram considerados os mais representativos para o estudo de identificação do gênero *Corymbia*, pelo número de absorções de ^{13}C existentes, significando uma variedade de carbonos em termos de constituintes químicos, além da presença relevante de carbonos olefinicos/aromáticos na faixa entre 110 e 155 ppm.

Foram encontrados sinais semelhantes de deslocamentos químicos dos carbonos dos espectros dos extrativos do cerne nos indivíduos de *Corymbia citriodora*. A média desses valores representa os sinais específicos para a espécie estudada (Tabela 1).

Pode-se verificar que todos os indivíduos analisados apresentaram sinais característicos da região alifática (12 picos) e aromática (2 picos) e nenhum sinal da presença de carbonos carbonila/acila (155 a 220 ppm) (Tabela 1). Esses

valores dos deslocamentos dos espectros de RMN de ^{13}C , são claramente compatíveis com o ^{13}C do gênero *Corymbia*.

Valores discrepantes de deslocamentos químicos foram encontrados entre os espectros dos indivíduos estudados, podendo ser essas diferenças, estar relacionadas às baixas concentrações de alguns carbonos, ao tempo de aquisição dos espectros, aos fatores genéticos e, ou aos fatores ambientais. Vale ressaltar que variações na madeira ocorrem devido à idade, ao material genético, sítio, espaçamento, nutrição e interações ambientais (TRUGILHO et al., 2015).

As diferenças entre as espécies permitem até mesmo reclassificações, o que ocorreu com o *Eucalyptus citriodora*, que passou a ser denominado *Corymbia citriodora* mediante aos estudos baseados em características morfológicas e moleculares.

A ressonância magnética nuclear também pode explicar essa alteração, ao comparar os valores de deslocamentos químicos que representam a espécie *Corymbia citriodora* com os valores para o gênero *Eucalyptus* (Tabela 2) (SOUZA et al.,

Tabela 1. Deslocamentos químicos dos extratos do cerne da madeira de *Corymbia citriodora*.

Table 1. Chemical shifts of the extracts of the heartwood of *Corymbia citriodora*.

Indivíduo 1	Indivíduo 2	Indivíduo 3	Indivíduo 4	Média	Máximo	Mínimo
29,65	29,66	29,67	29,68	29,67	29,68	29,65
39,63	39,65	39,67	39,69	39,66	39,69	38,63
43,31	43,32	43,35	43,39	43,32	43,39	43,31
45,71	45,72	45,73	45,78	45,73	45,78	45,71
46,01	46,02	48,05	46,07	46,04	46,07	46,01
46,83	46,84	46,87	46,88	46,86	46,88	46,83
47,05	47,06	47,09	47,05	47,06	46,09	47,05
47,82	47,82	47,84	47,84	47,83	47,84	47,82
48,74	48,76	48,71	48,75	48,76	48,76	48,71
49,32	49,33	49,35	49,39	49,35	49,39	49,32
49,93	49,93	49,94	49,98	49,94	49,98	49,93
52,15	52,10	52,12	52,15	52,13	52,15	52,10
55,91	55,90	55,92	55,95	55,92	55,95	55,90
76,58	76,58	76,57	76,57	76,58	76,58	76,57
77,00	77,00	77,00	77,00	77,00	77,00	77,00
77,43	77,43	77,42	77,42	77,43	77,43	77,42
105,96	105,95	105,94	105,93	105,94	105,96	105,93
127,90	127,22	127,95	127,98	127,94	127,98	127,90
133,22	133,24	133,25	133,29	133,25	133,29	133,22

Tabela 2. Deslocamentos químicos dos espectros dos extratos cicloexânicos da região do cerne específicos do gênero *Eucalyptus* e da espécie *Corymbia citriodora*.

Table 2. Chemical shifts of the spectra of the cyclohexane extracts from the heartwood region of the genus *Eucalyptus* and the species *Corymbia citriodora*.

Deslocamentos químicos (ppm)	
<i>Eucalyptus</i> spp.	<i>Corymbia citriodora</i>
11,82	Nd
11,94	Nd
14,10	Nd
19,00	Nd
22,67	Nd
23,01	Nd
24,69	Nd
25,97	Nd
27,17	Nd
28,22	Nd
Nd	29,67
31,89	Nd
36,12	Nd
Nd	39,66
Nd	43,32
Nd	45,73
Nd	46,04
Nd	46,86
Nd	47,06
Nd	47,83
Nd	48,76
Nd	49,35
Nd	49,94
Nd	52,13
Nd	55,92
Nd	76,58
Nd	77,00
Nd	77,43
Nd	105,94
109,26	Nd
123,02	Nd
Nd	127,94
Nd	133,25

Em que: Nd = não detectado.

2008; SOUZA et al., 2011; WANG; LIU, 2012; PEEMOELLER et al., 2013).

Pode-se verificar que nenhum sinal de deslocamento químico que caracteriza o gênero *Eucalyptus* foi encontrado na espécie *Corymbia citriodora*, designando a sua atribuição genealógica ao gênero *Eucalyptus*, e que a técnica de RMN ^{13}C permitiu eficientemente essa distinção. É possível que essa ausência de sinais característicos para o *Eucalyptus* esteja

atribuída a presença de algum lipídios nos extrativos da madeira (PEEMOELLER et al., 2013).

Conclusões

Verifica-se que a RMN de ^{13}C é uma ferramenta eficiente para os métodos de identificação de madeiras, tendo em vista

que foram encontrados sinais característicos específicos para os extrativos da madeira de *Corymbia citriodora*.

Referências

AMAZONAS, N. T.; FORRESTER, D. I.; SILVA, C. C.; ALMEIDA, D. R. A.; RODRIGUES, R. R.; BRANCALION, P. H. S. High diversity mixed plantations of *Eucalyptus* and native trees: An interface between production and restoration for the tropics. **Forest Ecology and Management**, n. 417, p. 247–256, 2018.

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. Métodos de análise em química da madeira. **Floresta e Ambiente** (Série técnica). 2006, 20p.

ANGELI, A. **Indicações para escolha de espécies de *Eucalyptus***. Revista da Madeira, v. 16, n. 95, p. 78-80, 2006.

BOLAND, D. J.; BROOKER, M. H.; CHIPPENDALE, G. M. **Forest trees of Australia**. 4. ed. Meubourne: CSIRO, 1994. 703p.

BREITMAIER, E.; VOELTER, W. **Carbon-13 NMR Spectroscopy: high resolution methods and applications in organic chemistry and biochemistry**. 3 ed. New York: VCH Publishers, 1987.400p.

COSTA NETO, C. **Análise Orgânica: métodos e procedimentos para a caracterização de organoquímios**, Rio de Janeiro: Editora UFRJ, 2004. 728p.

DIAS JÚNIOR, A. F.; SANTOS, P. V.; PACE, J. H. C.; CARVALHO, A. M.; LATORRACA, J. V. F. Caracterização da madeira de quatro espécies florestais para uso em movelaria. **Ciência da Madeira**, v. 4, n. 1, p. 93-107, 2013.

FERREIRA, S.; LIMA, J. T.; ROSADO, S. C. S.; TRUGILHO, P. F. Influência de métodos de desdobros tangenciais no rendimento e na qualidade da madeira de clones de *Eucalyptus* sp. **Revista Cerne**, v.10, n.1, p.10-21, 2004.

GOTTLIEB, O. R.; YOSHIDA, M. Natural Products of Woody Plants. In: ROWE, J. W. **Chemicals Extraneous to the lignocellulosic Cell Wall**. Berlin: Springer Verlag, 1989. p. 439-511.

HARBONE, J. B. **The flavonoids advances in research since 1986**. London: Chapman & Hall, 1994. 611p.

HILL, K. D.; JOHNSON, L. A. S. **Sistematic studies in eucalyptus**. A revision of the bloodwoods genus *Corymbia* (*Myrtaceae*). Telopea, v .6. p.173-505, 1995.

HUANG, H. C.; HO, Y. C.; LIM, J. M.; CHANG, T. Y.; HO, C. L.; CHANG, T. M. Investigation of the anti-melanogenic and antioxidant characteristics of *Eucalyptus camaldulensis* flower essential oil and determination of its chemical composition. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 10470-10490, 2015.

LAMBERT, J. B.; MAZZOLA, E. P. **Nuclear magnetic resonance spectroscopy: an introduction to principles, applications, and experimental methods**. Upper Saddle River: Pearson, 2003. 357p.

PEEMOELLER, H.; WEGLARZ, W. P.; HINEK, J.; HOLLY, R.; LEMAIRE, C.; TEYMOORI, R.; LIANG, J.; CRONE, J.; MANSOUR, F. K.; HARTLEY, I. D. NMR detection of liquid-like wood polymer component in dry aspen wood. **Polymer**, v. 54, p. 1524-1529, 2013.

SAULNIER, F.; DUBOIS, M.; CHARLET, K.; LAWRENCE, F.; BEAKOU, A. Direct fluorination applied to wood flour used as a reinforcement for polymers. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 642-646, 2013.

SOUZA, N. D.; ABREU, H. S.; CHALITA, D. B.; PAREIRA, D. S.; PAREIRA, V. F.; FERREIRA, J. C. F.; MITIYO, J. M.; RESCK, I. S. Perfil espectral dos carbonos do extrato ciclohexano da madeira de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden por RMN ¹³C. **Revista Ceres**, v. 55, p. 568-574, 2008.

SOUZA, N. D.; ABREU, H. S.; ELIAS, T. F.; LATORRACA, J. V. F.; MITIYO, J. M. Dados de carbono molecular do extrato ciclohexano da madeira de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blacke por RMN de ¹³C. **Floresta e Ambiente**, v. 18, p. 186-197, 2011.

TRUGILHO, P. F.; GOULART, S. L.; ASSIS, C. O.; COUTO, F. B. S.; ALVES, I. C. N.; PROTÁSSIO, T. P.; NAPOLI, A. Características de crescimento, composição química, física e estimativa de massa seca de madeira em clones e espécies de *Eucalyptus* jovens. **Ciência Rural**, v. 45, p.661-666, 2015.

WANG, Y.; LIU, S. J. Pretreatment technologies for biological and chemical conversion of woody biomass. **Tappi Journal**, v. 11, n. 1, p. 9–16, 2012.

XIA, Y.; CHENA, T. Y.; WENA, J. L.; ZHAO, Y. L.; QIU, J.; SUNA, R. C. Multi-analysis of chemical transformations of lignin macromolecules from waterlogged archaeological wood. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.119, p.407-416, 2018.

YANG, J.; KAMDEM, D.P.; KEAATHLEY, D. E.; HWAM, K. Seasonal changes in gene expression at the sapwood–heartwood transition zone of black locust (*Robinia pseudoacacia*) revealed by DNA microarray analysis. **Tree Physiology**. Heron Publishing, Canada, v. 24, p. 461-474, 2004.

ZHANG, W.; DUBOIS, M.; GUÉRIN, K.; BONNET, P.; KHARBACHE, H.; MASIN, F.; KHARITONOV, A. P. Effect of curvature on C F bonding in fluorinated carbons: from fullerene and derivatives to graphite. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, p. 1388–1398, 2010.