

CARACTERIZAÇÃO DOS ÁCIDOS URÔNICOS DA MADEIRA DE *EUCALYPTUS UROGRANDIS*

Onel Reis Lopes^{1*}, Andréia S. Magaton², Paulo Henrique Damasceno Morais¹, Jorge Luiz Colodette¹ e Dorila Piló Veloso².

¹Laboratório de Celulose e Papel – Universidade Federal de Viçosa (*onel@vicosa.ufv.br);

²Departamento de Química – Universidade Federal de Minas Gerais

Abstract

This work aimed at identifying glucuronic acid, 4-O-methylglucuronic acid and galacturonic acid of *Eucalyptus urograndis* wood through acid methanolysis-GC-MS. The acid methanolysis (2M HCl/MeOH) was applied to wood meal and followed by silylation. Afterwards, the sample was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The method allowed for good separation and unequivocal identification of the wood different uronic acids. It was determined that the *E. urograndis* wood presents the three uronic acids commonly found in hardwoods, with the 4-O-methylglucuronic acid being by far the most significant one.

Resumo

Este trabalho teve como objetivo identificar o ácido glicourônico, o ácido 4-O-metilglicourônico e o ácido galactourônico da madeira de *Eucalyptus Urograndis* por metanólise-GC-MS. A metanólise ácida (2M HCl/MeOH) foi aplicado à amostra de madeira e seguida por sililação. Em seguida, a amostra foi analisada por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (GC-MS). O método permitiu uma boa separação e a identificação inequívoca dos diferentes ácidos urônicos da madeira. Foi determinado que a madeira do *Eucalyptus Urograndis* apresenta os três ácidos urônicos encontrados geralmente nas hardwoods, com o ácido 4-O-metilglicourônico apresentando valores mais significativos.

Keywords: Uronic Acids, Methanolysis, *Eucalyptus urograndis*

INTRODUÇÃO

Os ácidos urônicos, incluindo os glicourônicos e os 4-O-metilglicurônicos, ligados a unidades de xilose nas macromoléculas de hemiceluloses e os galacturônicos, principal constituinte das pectinas, representam uma fração significativa da madeira, em média cerca de 4-5% do seu peso. Destes ácidos, o 4-O-metilglicurônico tem recebido grande destaque devido recentes descobertas sobre sua influência no processo de produção de celulose (TELEMAN et al., 1995). Para melhor entender o comportamento destes ácidos nas operações industriais é necessário inicialmente proceder a análises qualitativas e quantitativas destes. O método convencional para a análise de hemiceluloses consiste em hidrólise ácida seguida por separação dos açúcares componentes por cromatografia líquido ou gasosa. O problema deste método é que não é apropriado para a detecção de unidades de ácidos urônicos, porque este pode ser descarboxilado e então degradado durante a hidrólise ácida. Uma alternativa para a clivagem das ligações glicosídicas com mínima degradação das hemiceluloses é a metanólise. A metanólise das hemiceluloses da madeira, seguida por sililação e separação por cromatografia gasosa (CG), foi aplicada com sucesso para a análise quantitativa de açúcares totais das hemiceluloses e pectinas (SUNDBERG et al., 1996) em softwoods. No entanto, não há na literatura estudo dos ácidos urônicos da madeira do eucalipto, a principal matéria-prima utilizada na indústria de celulose nacional. Dentro deste contexto, este estudo teve como objetivo identificar os principais ácidos urônicos presentes na madeira do *E. urograndis*, utilizando metanólise ácida, sililação e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

MATERIAL E MÉTODOS

A amostra de madeira do *Eucalyptus urograndis* foi coletada de árvore com sete anos de idade, proveniente da região de Mucuri, na Bahia. A madeira foi transformada em serragem e esta foi submetida à extração em soxhlet utilizando-se etanol: tolueno 1:2 para remoção dos extrativos, que podem interferir na análise. Foram pesados aproximadamente 10 mg de serragem livre-de-extrativos e submetidos à metanólise ácida por adição de 2 mL da solução 2 mol.L⁻¹ de HCl/Metanol a 100 °C, por 3 horas. Em seguida, 100 µL de piridina foi adicionado para neutralizar a solução ácida e 1,0 mL da solução foi

transferido para tubos de micro reação. A solução foi evaporada e a amostra foi dissolvida por adição de 50µL de piridina e submetida à silição, por adição de 100 µL de *N,O*-Bis(trimetilsilil)-Trifluoroacetamida (BSTFA) com 1% trimetilclorosilano (TMCS) à uma temperatura de 80 °C por 20 minutos. Finalmente, a amostra siliada foi analisada por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG/EM). Os padrões dos ácidos urônicos também foram submetidos à metanólise, silição e análise no GC/EM para auxiliar na identificação dos ácidos urônicos da madeira. As análises qualitativas dos ácidos urônicos foram realizadas em aparelho GC/EM PQ5050A da marca SHIMADZU usando coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30m; 0,25mm de diâmetro interno; espessura de 0,25µm) e hélio como gás de arraste com fluxo de 1,3 mL/min. A temperatura do injetor foi 290°C com temperatura inicial aumentando de 40°C a 130°C na razão de 9°C/min e de 130°C a 290°C na razão de 2°C/min. A temperatura final permaneceu em 290°C por 10 min. A temperatura do detector foi de 290°C e a temperatura de interface do sistema CG/EM foi de 290°C. O detector de massas operou com ionização por impacto de elétrons de 70 eV e varredura de massas entre os intervalos de 20 e 600 Da.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, foi realizado um estudo dos espectros de massa dos padrões dos ácidos glicurônico, 4-*O*-metilglicurônico e galacturônico. Os espectros obtidos foram comparados com espectros existentes no banco de dados do aparelho GC/EM e com dados da literatura. Os ácidos urônicos, após sofrerem metanólise e silição dão origem a mais de um pico nos cromatogramas. O Quadro 1 mostra os tempos de retenção dos picos encontrados nos cromatogramas de cada ácido urônico.

Quadro 1- Tempos de Retenção (t_R) dos picos encontrados nos cromatogramas dos ácidos urônicos.

Ácido Glicurônico t_R (min)	Ácido 4- <i>O</i> -metilglicurônico t_R (min)	Ácido Galacturônico t_R (min)
28,74	30,65	29,73
29,69	30,96	31,50
36,56		34,80
37,14		35,24

Os ácidos glicurônicos e galacturônicos, por formarem lactonas, apresentam 4 picos nos cromatogramas. O anel de lactona, que é uma furanose é formado juntamente com o anel de piranose. Dessa forma, em solução há quatro formas cíclicas, que correspondem às formas anoméricas metil α e metil β -furonosídeo e piranosídeo (DOCO et al., 2001). O ácido 4-*O*-metilglicurônico não forma lactonas, pois o carbono C4 se encontra ligado um grupo metoxila que não permite a lactonização. Isto explica a presença de apenas dois picos nos seus cromatogramas, que correspondem às formas anoméricas metil α e metil β -piranosídeo. Os picos que apresentaram tempo de retenção 28,74 e 29,69 minutos no cromatograma do ácido glicurônico foram identificados como os anômeros α e β do anel furonosídico dos derivados trimetilsililados. Os fragmentos mais característicos dos espectros de massa destes picos são o íon molecular m/z 147 $[(CH_3)_3SiOSi^+(CH_3)_2]$, m/z 89 $[CH_3OSi^+(CH_3)_2]$ e o pico base m/z 73 $[Si^+(CH_3)_3]$. O pico m/z 147 é devido a um rearranjo do grupo trimetilsilil dando origem ao fragmento $[(CH_3)_3SiOSi^+(CH_3)_2]$ (DEJONGH et al. 1969). A presença do m/z 230 em ambos os casos é característico principalmente de lactonas persililadas (BLETON, 1996). A origem deste íon se dá a partir do íon $[M-15]^+$. A explicação para o surgimento do pico m/z 89 é a metoxilação do carbono C1 na metanólise. Assim sendo, após a perda do radical metila, um rearranjo envolvendo um anel de seis membros, favorece a migração do grupo TMSO do C3, levando à formação do íon m/z 89. Os picos que apresentaram tempo de retenção 36,56 e 37,14 minutos no cromatograma do ácido glicurônico foram identificados como os anômeros α e β do anel piranosídico dos derivados trimetilsililados. Os fragmentos mais característicos para os picos do ácido glicurônico são o íon molecular m/z 217 $[(CH_3)_3SiO-CH=CH-C^+H-OSi(CH_3)_3]$, m/z 204 $[(CH_3)_3SiO=CH-CH-OSi(CH_3)_3]$, m/z 159 $[(CH_3)_3SiOCH=CH-CH=O^+-CH_3]$, m/z 147 $[(CH_3)_3SiOSi^+(CH_3)_2]$ e o pico base m/z 73 $[Si^+(CH_3)_3]$. A fragmentação que leva ao íon m/z 217 origina-se da perda do carbono C6 seguida de um rearranjo por um anel de quatro membros. O pico m/z 204 é muito comum em carboidratos derivatizados com o grupo trimetilsilil (DEJONGH et al. 1969). O íon m/z 159 apresenta maior intensidade nos açúcares ácidos (7-13% do pico base) que os espectros dos açúcares neutros (BLETON, et al.,1996). Neste caso, o ácido glicurônico apresentou 7,6% de intensidade em

relação ao pico base, estando de acordo com a literatura (BLETON, et al.,1996). Já o ácido galacturônico apresentou 5,9% de intensidade relativa. O pico base m/z 73 se dá pela perda dos íons trimetilsilil a partir do fragmento $[M]^+$. Os espectros de massa dos derivados do ácido galacturônico foram muito semelhantes aos espectros dos derivados do ácido glicurônico. Estes ácidos podem ser diferenciados utilizando-se a relação dos picos m/z 204 e m/z 217 nos espectros dos derivados piranosídicos. Se a relação for maior que 1, pode-se dizer que refere-se aos derivados do ácido galacturônico e se for menor que 1 é característico de ácido glicurônico (BLETON et al.,1996). De fato, a relação destes dois picos para o padrão do ácido glicurônico é 0,53 e para o padrão do ácido galacturônico é 1,29. O cromatograma do ácido 4-*O*-metilglicurônico apresenta apenas os picos referentes aos derivados piranosídicos α e β . Os fragmentos mais característicos para o derivado do ácido 4-*O*-metilglicurônico são m/z 234 e o m/z 159. A alta intensidade do pico m/z 159 é característico somente do derivado do ácido 4-*O*-metilglicurônico (BLETON et al.,1996). A Figura 1 mostra o espectro de massa do derivado do ácido 4-*O*-metilglicurônico com tempo de retenção de 30,96 minutos.

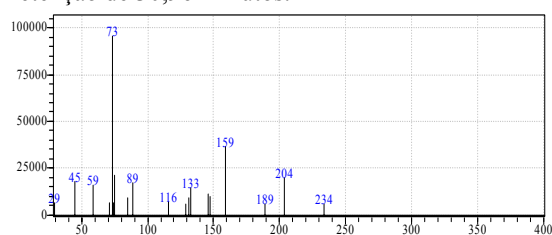


Figura 1. Espectro de massa do derivado do ácido 4-*O*-metilglicurônico com t_R de 30,96 minutos.

A partir deste estudo de caracterização dos ácidos urônicos e identificação dos seus tempos de retenção foi possível analisá-los no cromatograma da madeira de *E. urograndis*, que foi submetida à metanólise e silição. A Figura 2 apresenta o cromatograma da amostra de *E. urograndis*.

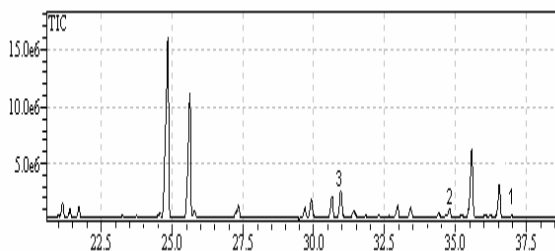


Figura 2. Cromatograma da amostra de *E. urograndis*, sendo 3, o ácido 4-*O*-

metilglicurônico, o 2 o ácido galacturônico e o 1, o ácido glicurônico.

Apesar dos ácidos urônicos apresentarem vários picos em seus cromatogramas, é possível selecionar apenas um dos picos para caracterização, pois a proporção entre os picos é sempre constante, mesmo variando-se a concentração das amostras de ácidos, conforme verificado em estudo anterior realizado em nosso laboratório (resultados não publicados). Neste cromatograma, podem-se verificar os picos com tempos de retenção 30,95 34,77 e 37,01 minutos, correspondentes aos ácidos 4-*O*-metilglicurônico, galacturônico e glicurônico, respectivamente. Pelo cromatograma da Figura 2 é possível verificar a presença do ácido 4-*O*-metilglicurônico em maior proporção em relação aos demais. A presença destes três ácidos urônicos na madeira de *E. urograndis* e o maior destaque do ácido 4-*O*-metilglicurônico revela que a madeira de eucalipto apresenta características similares às de outras folhosas já estudadas (SJÖSTRÖM, 1993).

CONCLUSÕES

As condições cromatográficas utilizadas neste estudo foram muito satisfatórias, visto que permitiu a obtenção de excelentes cromatogramas. A separação dos três principais ácidos urônicos da madeira de *Eucalyptus urograndis* foi satisfatória. Além disso, os espectros de massa obtidos permitiram identificar, de maneira inequívoca, os ácidos urônicos da madeira. Esse estudo consistiu a primeira etapa de um trabalho que objetiva a quantificação dos ácidos urônicos de seis espécies de madeira de eucalipto mais utilizadas para a produção de celulose na América do Sul.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, a FAPEMIG e a SIF, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLETON, J.; MEJANELLE, P.; SANSOULET, J.; GOURSAUD, S.; TCHAPLA, A. 1996. Characterization of neutral sugars and uronic acids after methanolysis and trimethylsilylation for recognition of plant gums. *Journal of Chromatography*. 27-49.
- DEJONGH, D.C.; RADFORD, T.; HRIBAR, J.D.; HANESSIAN, S.; BIEBER, M.; DAWSON, G.; SWEELEY, C.C. 1969. Analysis of

trimethylsilyl derivatives of carbohydrates by gas chromatography and mass spectrometry. J. Am. Chem. Soc. 91: 1728-1740.

DOCO, T.; O'NEILL, M.A.; PELLERIN, P. 2001. Determination of neutral and acidic glycosyl-residue compositions of plant polysaccharides by GC-EI-MS analysis of the trimethylsilyl methyl glycoside derivatives. Carbohydrates Polymers. 249-259.

SUNDBERG, A.; SUNDBERG, K.; LILLANDI, C.; HOLMBOM, B. 1996. Determination of hemicelluloses and pectins in wood and pulp fibres by acid methanolysis and gas chromatography. Nordic Pulp and Paper Research Journal, 4:216-220.

TELEMAN, A.; HARJUNPÄÄ, V.; TENKANEN, M.; BUCHERT, J.; HAUSALO, T.; DRAKENBERG, T.; VUORINEN, T. 1995. Characterization of 4-deoxy- β -L-threo-4-hex-4-enopyranosyluronic acid attached to xylan in pine kraft pulp and pulping liquor by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. Carbohydrate Research, 272:55-71.