



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Faculdade de Ciências

Influência das condições de extração na atividade biológica de lenhina isolada de resíduos de cerejeira.

Marta Filipa Caseiro Tenreiro

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Medicinal
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof^a. Doutora Ana Paula Coelho Duarte

Coorientadora: Prof^a. Doutora Maria Emília da Costa Cabral Amaral

Covilhã, outubro de 2018

Agradecimentos

Quero demonstrar o meu profundo agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a realização desta dissertação pois não seria possível concretizá-la sem todo o apoio e ajuda.

Primeiramente quero agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Ana Paula Duarte, por toda a ajuda, esclarecimentos, sugestões e disponibilidade.

Agradeço de igual forma à minha coorientadora, professora Maria Emília Amaral, por toda a dedicação, disponibilidade, paciência e ajuda diária durante toda a elaboração do trabalho de forma a conseguir atingir os meus objetivos.

Ao professor Doutor Renato Boto pela ajuda e disponibilidade demonstrada na execução da ressonância magnética nuclear e por todos os conhecimentos transmitidos.

À professora Doutora Luiza Granadeiro pela disponibilidade e ajuda na realização da parte biológica.

À Sónia, ao Vasco, à Micaela e a todos os colegas de laboratório, pela ajuda, apoio e disponibilidade prestada ao longo deste ano.

Ao Sr. Fernando pela disponibilidade, simpatia e cedência da matéria prima necessária para a realização do estudo.

À Melani e ao Pedro pela amizade, por terem estado presentes nos bons e maus momentos, pela confiança, apoio e ajuda pois eles foram fundamentais para concluir esta etapa.

Ao Marco, por ter estado sempre presente neste percurso, por todo o apoio, compreensão e pela força que foi, sem dúvida, essencial.

Quero agradecer especialmente aos meus pais e à minha irmã por terem estado sempre ao meu lado em todos os momentos, por todos os conselhos, incentivo e força que me deram ao longo destes anos, devo-lhes tudo.

Por último, gostaria de agradecer, de um modo geral, a todos as familiares e amigos que, apesar de não estarem nomeados, foram importantes na concretização desta etapa.

Resumo

A lenhina é o segundo polímero natural mais abundante depois da celulose. Este constituinte das plantas é um componente subutilizado da biomassa vegetal renovável. A lenhina é um polímero multifuncional sintetizado por todas as plantas vasculares por acoplamento radical de grupos fenilhidroxipropanóides, rica em resíduos polifenólicos, possuindo potencial para ser usada como fonte natural de antioxidantes. Os resíduos da agricultura, como as podas dos pomares, sendo ricos em lenhina, representam uma importante matéria-prima para obtenção de antioxidantes. Assim, de modo a desenvolver um produto de valor acrescentado, os resíduos da poda de cerejeiras *Prunus avium* var. *Burlat* foram moídos e crivados para se obter um tamanho de partícula adequado. A amostra original foi analisada em termos da sua composição química geral e usando métodos diferentes de extração obtiveram-se várias amostras de lenhina. Estas foram analisadas em termos de rendimento de extração e caracterizadas espectroscopicamente por FTIR e RMN de ^1H e ^{13}C . As amostras mais promissoras foram analisadas quanto ao teor em fenóis totais e atividade antioxidante por diferentes técnicas. Para completar este trabalho foram efetuados estudos de viabilidade celular em linhas celulares de fibroblastos (NHDF) pelo teste do MTT e por doseamento da proteína através do método do ácido bicinconínico.

Concluiu-se que o método de extração que apresentou maior rendimento foi o que usou ácido fórmico, assistida com micro-ondas, variando os rendimentos das extrações para os diferentes métodos entre 5 e 18%. As maiores concentrações de compostos fenólicos foram encontradas nas extrações ácidas (182,55 e 244,32 mg equivalentes de ácido gálico/ g de matéria seca (GAE/g)), enquanto que as extrações alcalinas apresentaram valores inferiores (130,0 e 68,19 mg GAE/g). As amostras apresentaram atividade antioxidante muito forte quando extraídas com processos ácidos e moderada quando extraídas com processos alcalinos. Os resultados da viabilidade celular foram positivos tendo em conta que, quando em concentrações mais elevadas, a lenhina não apresentou efeitos citotóxicos nem aumentou a proliferação celular, reduzindo assim a probabilidade de ocorrência de mutações, sendo este facto explicado pela ausência de morte celular.

Palavras-chave

Prunus avium var. *Burlat*; lenhina; métodos de extração; fenóis totais; atividade antioxidante; ensaios de citotoxicidade.

Abstract

Lignin is the most abundant natural polymer after cellulose. This plant constituent is an underutilized component of renewable plant biomass. Lignin is a multifunctional polymer synthesized by all vascular plants by radical coupling of phenylhydroxypropanoid groups, rich in polyphenolic residues, having the potential to be used as a natural source of antioxidants. Agricultural residues, such as pruning of orchards, being rich in lignin, represent an important raw material for obtaining antioxidants. Thus, in order to develop a value-added product, residues of cherry pruning *Prunus avium* var. *Burlat* were milled and screened to obtain a suitable particle size. The original sample was analyzed in terms of general chemical composition and several lignin samples were obtained using different extraction methods. These were analyzed in terms of extraction yield and spectroscopically characterized by FTIR and ¹H- and ¹³C-NMR. The most promising samples were analyzed for total phenol content and antioxidant activity using several techniques. To complete this work, cell viability studies were made with fibroblasts cell lines (NHDF) using the MTT test and protein dosing via the bicinchoninic acid method.

It was concluded that the extraction method with the highest yield was the one using formic acid, assisted by microwave, with yields varying between 5 and 18%. The highest amounts of phenolic compounds were obtained by acidic extractions (182,55 e 244,32 mg of acid gallic equivalent per g of dry matter, (mgGAE/g)), while alkaline extractions exhibited the lowest values (130,5 and 244,32 mg GAE/g). Lignin samples presented very strong antioxidant activity when extracted by acid processes and moderated when extracted by alkaline processes. The results of cell viability were positive considering that at higher concentrations, lignin did not present cytotoxic effects nor increased cell proliferation, thus reducing the probability of occurrence of mutations, which is explained by the absence of cell death.

Keywords

Prunus avium cultivar *Burlat*; lignin; extraction methods; antioxidant activity, cytotoxicity assays

Índice

Capítulo 1 - Introdução geral	1
1.1. Química Medicinal e a descoberta de fármacos.....	2
1.2. A cerejeira	2
1.3. Composição química do material lenhocelulósico	3
1.3.1. Holocelulose	4
1.3.2. Compostos inorgânicos.....	6
1.3.3. Extrativos	7
1.3.4. Lenhina	7
1.4. Métodos de extração da lenhina	12
1.5. Caracterização das lenhinas	15
1.6. Avaliação da bioatividade da lenhina	17
1.6.1. Stress oxidativo vs. antioxidantes e compostos fenólicos	17
1.6.2. Ensaio de citotoxicidade da lenhina	20
Capítulo 2 - Objetivos.....	23
Capítulo 3- Parte experimental	25
3.1. Colheita, secagem e moagem	26
3.2. Determinação do teor de massa seca	26
3.3. Composição química dos ramos da cerejeira	26
3.3.1. Determinação do teor em lenhina	26
3.3.1.1. Lenhina insolúvel	26
3.3.1.2. Lenhina solúvel	27

3.3.2.	Determinação do teor de cinzas	28
3.3.3.	Determinação do teor de extrativos	28
3.3.4.	Determinação do teor de holocelulose	29
3.4.	Métodos de extração da lenhina	29
3.4.1.	Extração com água quente em banho termostático de polietilenoglicol (PEG) ..	30
3.4.1.1.	Método 1	30
3.4.1.2.	Método 2	30
3.4.1.3.	Método 3	30
3.4.1.4.	Método 4	31
3.4.1.5.	Método 5	31
3.4.2.	Extração com água quente assistida por micro-ondas	31
3.4.3.	Extração organosolvente	32
3.4.4.	Extrações em meio ácido.....	32
3.4.4.1.	Extração com ácido acético	32
3.4.4.2.	Extração com ácido fórmico	33
3.4.4.2.1.	Em banho de PEG	33
3.4.4.2.2.	Assistida por micro-ondas	33
3.4.5.	Extrações alcalinas com hidróxido de sódio	34
3.4.5.1.	Método 1	34
3.4.5.2.	Método 2	34
3.4.5.3.	Método 3	34
3.4.5.4.	Método 4	35
3.5.	Caracterização estrutural	35
3.5.1.	Espectrofotometria de Infravermelho com transformada de Fourier	35

3.5.2.	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	36
3.5.2.1.	Acetilação da lenhina	36
3.5.2.2.	Aquisição de espectros	36
3.6.	Determinação da atividade antioxidante - método do DPPH	37
3.6.1.	Método 1	38
3.6.2.	Método 2	38
3.6.3.	Método 3	38
3.7.	Determinação dos fenóis totais	40
3.8.	Avaliação da citotoxicidade	41
3.8.1.	Linha celular	41
3.8.2.	Ensaio de viabilidade celular (MTT)	43
3.8.3.	Doseamento de proteína	43
3.8.4.	Análise estatística	44
	Capítulo 4 - resultados e discussão	45
4.1.	Composição química dos ramos da cerejeira	46
4.2.	Rendimentos de extração da lenhina	46
4.2.1.	Extração com água quente.....	46
4.2.2.	Extração organosolv	48
4.2.3.	Extrações em meio ácido.....	48
4.2.4.	Extrações alcalinas com NaOH	49
4.3.	Análise espectrofotométrica de Infravermelho	52
4.3.1.	Comparação entre a madeira da cerejeira moída e a madeira da cerejeira moída e sem extrativos.....	54
4.3.2.	Lenhina de Klason	56

4.3.3.	Lenhina extraída pela água no método 5.....	57
4.3.4.	Lenhina extraída com ácido fórmico	58
4.3.5.	Lenhina extraída com ácido acético	59
4.3.6.	Lenhina extraída com NaOH 0,4; 0,7; 1,25 e 2 M através do método 4 das extrações em meio básico.....	60
4.4.	Seleção das amostras de lenhina	61
4.5.	Análise espectroscópica por RMN ¹ H e ¹³ C.....	63
4.6.	Determinação da atividade antioxidante - DPPH	65
4.7.	Quantificação dos compostos fenólicos.....	67
4.8.	Avaliação biológica	70
	Capítulo 5 - Comunicações	78
	Capítulo 6 - Referências bibliográficas	80
	Capítulo 7 - Anexos	89
	Anexo 1 - Determinação da atividade antioxidante - método 2	90
	Anexo 2 - Espectros de RMN de ¹ H e ¹³ C da lenhina obtida na extração com ácido acético...	102
	Anexo 3 - Comunicação em poster no âmbito desta dissertação.....	104
	Anexo 4 - Comunicação em poster no âmbito desta dissertação.....	105
	Anexo 5 - Comunicação oral no âmbito desta dissertação	106

Lista de Figuras

Figura 1.1: Esquema da representação da lenhina, hemicelulose e celulose na parede celular das plantas, adaptado de Sannigrahi, Pu e Ragauskas (2010).	4
Figura 1.2: Segmento da cadeia de celulose, adaptado de Eero Sjostrom (2003).	4
Figura 1.3: Estruturas propostas das diferentes ligações da lenhina às hemiceluloses: a) ligação benzil-éter, b) ligação glicosídica, c) ligação benzil-éster, adaptado de Koshijima e Watenabe (2003).	6
Figura 1.4: Representação esquemática das unidades estruturais da lenhina (a) e estrutura da lenhina (b) proposta por Adler (1977), adaptado de Tejado <i>et al.</i> (2007).	8
Figura 1.5: Ligações mais comuns da lenhina, adaptado de Patil, Tanguy e Yan (2015).	9
Figura 1.6: Representação esquemática dos três tipos de nanopartículas desenvolvidas, adaptado de Lievonen <i>et al.</i> (2016).	12
Figura 1.7: Alterações estruturais do complexo celulose-hemicelulose-lenhina determinadas pelo pré-tratamento, adaptado de Santos <i>et al.</i> (2012).	14
Figura 1.8: Formação da forma reduzida do DPPH, adaptado de Ebada <i>et al.</i> (2008).	19
Figura 1.9: Redução do MTT a Formazano, adaptado de Brescia e Banks (2009).	21
Figura 1.10: Formação do ião cuproso e do complexo púrpura a partir da reação com BCA, adaptado de Smith <i>et al.</i> (1985).	22
Figura 3.1: Esquema representativo das placas de 96 poços usadas nos ensaios de citotoxicidade.	42
Figura 4.1: Espectros das amostras de cerejeira moída e cerejeira livre de extrativos.	54
Figura 4.2: Espectro obtido da determinação da lenhina de Klason.	56
Figura 4.3: Espectro da lenhina extraída com água.	57
Figura 4.4: Espectros obtidos da lenhina extraída com ácido fórmico em banho de PEG, em micro-ondas com potências de 500 W e 600 W.	58
Figura 4.5: Espectro da lenhina extraída com ácido acético.	59

Figura 4.6: Espectros da lenhina extraída com NaOH de concentração 0,4 e 0,7 M.	60
Figura 4.7: Espectros da lenhina extraída com NaOH de concentração 1,25 e 2 M.	60
Figura 4.8: Gráficos relativos ao ensaio de MTT (a)), quantificação da proteína (b)) e à relação entre o ensaio MTT e quantificação da proteína (c)) em células NHDF quando expostas à lenhina extraída com ácido acético.	71
Figura 4.9: Gráficos relativos ao ensaio de MTT (a)), quantificação da proteína (b)) e à relação entre o ensaio MTT e quantificação da proteína (c)) em células NHDF quando expostas à lenhina extraída com ácido fórmico.	72
Figura 4.10: Gráficos relativos ao ensaio de MTT (a)), quantificação da proteína (b)) e à relação entre o ensaio MTT e quantificação da proteína (c)) em células NHDF quando expostas à lenhina extraída com NaOH 0,4 M.	73
Figura 4.11: Gráficos relativos ao ensaio de MTT (a)), quantificação da proteína (b)) e à relação entre o ensaio MTT e quantificação da proteína (c)) em células NHDF quando expostas à lenhina extraída com NaOH 0,7 M.	74

Lista de Gráficos

Gráfico 3.1: Curva de calibração do DPPH.	37
Gráfico 3.2: Curva de calibração utilizada para a determinação dos fenóis totais.	40
Gráfico 3.3: Curva de calibração para a determinação da proteína total.	43
Gráfico 6.1: Padrão Trolox para [DPPH]=0,200 mM.	90
Gráfico 6.2: Padrão Trolox para [DPPH]=0,1242 mM.	91
Gráfico 6.3: Padrão Trolox para [DPPH]=0,0800 mM.	91
Gráfico 6.4: Lenhina extraída com ácido acético para [DPPH]=0,200 mM.	92
Gráfico 6.5: Lenhina extraída com ácido acético para [DPPH]=0,1242 mM.	93
Gráfico 6.6: Lenhina extraída com ácido acético para [DPPH]=0,0800 mM.	94
Gráfico 6.7: Lenhina extraída com ácido fórmico para [DPPH]=0,200mM.	95
Gráfico 6.8: Lenhina extraída com ácido fórmico para [DPPH]=0,1242mM.	96
Gráfico 6.9: Lenhina extraída com ácido fórmico para [DPPH]=0,0800 mM.	96
Gráfico 6.10: Lenhina extraída com NaOH 0,4 M para [DPPH]=0,200 mM.	97
Gráfico 6.11: Lenhina extraída com NaOH 0,4 M para [DPPH]=0,1242 mM.	98
Gráfico 6.12: Lenhina extraída com NaOH 0,4 M para [DPPH]=0,0800 mM.	99
Gráfico 6.13: Lenhina extraída com NaOH 0,7 M para [DPPH]=0,200 mM.	100
Gráfico 6.14: Lenhina extraída com NaOH 0,7 M para [DPPH]=0,1242 mM.	100
Gráfico 6.15 Lenhina extraída com NaOH 0,7 M para [DPPH]=0,0800 mM.	101

Lista de Tabelas

Tabela 4.1 Composição química da cerejeira.	46
Tabela 4.2: Rendimento das extrações da lenhina com água.....	47
Tabela 4.3: Rendimentos das extrações da lenhina com processo organosolv.....	48
Tabela 4.4: Rendimentos obtidos nas extrações ácidas.	49
Tabela 4.5: Rendimentos obtidos nas extrações alcalinas com NaOH nas diferentes metodologias e concentrações.	50
Tabela 4.6: Tabela resumo com todos os tipos de extração e respectivos rendimentos.	51
Tabela 4.7: Referência das bandas típicas da lenhina em FTIR (Casas <i>et al.</i> 2012; Pandey 1999; Popescu <i>et al.</i> 2007).....	53
Tabela 4.8: Bandas características da cerejeira moída e da cerejeira livre de extrativos.	55
Tabela 4.9: Compilação das amostras caracterizadas por FTIR com respectivos rendimentos de extração.	62
Tabela 4.10: Desvios químicos de RMN ¹ H da lenhina não acetilada extraída com ácido acético.....	63
Tabela 4.11: Desvios químicos de RMN ¹³ C da lenhina não acetilada extraída com ácido acético.....	64
Tabela 4.12: Atividade sequestradora do radical DPPH dos extratos metanólicos das lenhinas em estudo.	66
Tabela 4.13: Propriedades antioxidantes das lenhinas em estudo.....	67
Tabela 4.14: Conteúdo de fenóis totais presentes nas lenhinas de cerejeira.	68
Tabela 4.15: Compilação dos resultados obtidos resultantes das extrações selecionadas anteriormente com os respectivos rendimentos, AAI e fenóis totais.	69
Tabela 6.1: Parâmetros da atividade antioxidante (CI ₅₀ e AAI) do padrão Trolox para [DPPH] = 0,2000 mM.....	90

Tabela 6.2: Parâmetros da atividade antioxidante (IC_{50} e AAI) do padrão Trolox para [DPPH] = 0,1242 mM.....	91
Tabela 6.3: Parâmetros da atividade antioxidante (IC_{50} e AAI) do padrão Trolox para [DPPH] = 0,0800 mM.....	92
Tabela 6.4: Resumo dos parâmetros da atividade antioxidante (CI_{50} e AAI) do padrão Trolox.	92
Tabela 6.5: Parâmetros da atividade antioxidante (IC_{50} e AAI) da lenhina extraída com ácido acético para [DPPH] = 0,200 mM.	93
Tabela 6.6: Parâmetros da atividade antioxidante (IC_{50} e AAI) da lenhina extraída com ácido acético para [DPPH] = 0,1242 mM.	93
Tabela 6.7: Parâmetros da atividade antioxidante (IC_{50} e AAI) da lenhina extraída com ácido acético para [DPPH] = 0,0800 mM.	94
Tabela 6.8: Resumo dos parâmetros da atividade antioxidante (CI_{50} e AAI) da lenhina extraída com ácido acético.	94
Tabela 6.9: Parâmetros da atividade antioxidante (IC_{50} e AAI) da lenhina extraída com ácido fórmico para [DPPH] = 0,200 mM.	95
Tabela 6.10: Parâmetros da atividade antioxidante (IC_{50} e AAI) da lenhina extraída com ácido fórmico para [DPPH] = 0,1242 mM.	96
Tabela 6.11: Parâmetros da atividade antioxidante (IC_{50} e AAI) da lenhina extraída com ácido fórmico para [DPPH] = 0,0800 mM.	97
Tabela 6.12: Resumo dos parâmetros da atividade antioxidante (CI_{50} e AAI) da lenhina extraída com ácido fórmico.....	97
Tabela 6.13: Parâmetros da atividade antioxidante (IC_{50} e AAI) da lenhina extraída com NaOH 0,4 M para [DPPH] = 0,200 mM.	98
Tabela 6.14: Parâmetros da atividade antioxidante (IC_{50} e AAI) da lenhina extraída com NaOH 0,4 M para [DPPH] = 0,1242 mM.	98
Tabela 6.15: Parâmetros da atividade antioxidante (IC_{50} e AAI) da lenhina extraída com NaOH 0,4 M para [DPPH] = 0,0800 mM.	99
Tabela 6.16: Resumo dos parâmetros da atividade antioxidante (CI_{50} e AAI) da lenhina extraída com NaOH 0,4 M.	99

Tabela 6.17: Parâmetros da atividade antioxidante (IC_{50} e AAI) da lenhina extraída com NaOH 0,7 M para [DPPH] = 0,200 mM.	100
Tabela 6.18: Parâmetros da atividade antioxidante (IC_{50} e AAI) da lenhina extraída com NaOH 0,7 M para [DPPH] = 0,1242 mM.	101
Tabela 6.19: Parâmetros da atividade antioxidante (IC_{50} e AAI) da lenhina extraída com NaOH 0,7 M para [DPPH] = 0,0800 mM.	101
Tabela 6.20: Resumo dos parâmetros da atividade antioxidante (CI_{50} e AAI) da lenhina extraída com NaOH 0,7 M.	101

Lista de Acrónimos, abreviaturas e símbolos

AAI	Índice de atividade antioxidante, do inglês - <i>Antioxidant activity index</i>
ADME	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albumina do soro de bovino - do inglês, <i>Bovine serum albumin</i>
CCF	Cromatografia em camada fina
CH ₃ COOH	Ácido acético
CI ₅₀	Concentração inibitória para metade da atividade máxima
cm ⁻¹	Número de onda
CO ₂	Dióxido de carbono
Cu	Cobre
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO - d ₆	Dimetilsulfóxido hexadeuterado
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EAG	Equivalentes de ácido gálico
FBS	Soro fetal de bovino - do inglês, <i>Fetal bovine serum</i>
FTIR	Infravermelho por transformada de Fourier - do inglês, <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
HCl	Ácido clorídrico
HSQC	Correlação heteronuclear a uma ligação - do inglês, <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IV	Infravermelho
KBr	Brometo de potássio
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NaClO ₂	Clorito de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NHDF	Fibroblastos normais da derme humana - do inglês <i>Normal Human Dermal Fibroblast</i>
PEG	Polietilenoglicol
P ₂ O ₅	Pentóxido de fósforo
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de próton
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono
ROS	Espécies reativas de oxigénio - do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	Rotações por minuto
TMS	Teor de massa seca
Unidade G	Unidade Guaiacil
Unidade S	Unidade Siringil
UV	Ultravioleta
δ	Desvio(s) químico(s) em RMN

Capítulo 1 - Introdução geral

1.1. Química Medicinal e a descoberta de fármacos

A química medicinal compreende a descoberta, desenvolvimento, identificação e a interpretação do modo de ação ao nível molecular, de compostos biologicamente ativos (Camille Wermuth, David Aldous e Pierre Raboisson 2015). Os produtos naturais vêm recuperando espaço e importância na indústria farmacêutica, seja *per se*, seja como fonte praticamente ilimitada de novos compostos (Amirkia *et al.* 2015; Dias *et al.* 2012).

O interesse científico na descoberta de fármacos baseada em produtos naturais está diretamente relacionado com os avanços científicos e tecnológicos no que diz respeito à percepção das doenças e dos mecanismos subjacentes, otimizando as moléculas naturais com estratégias de modificação sintética (Atanasov *et al.* 2015).

1.2. A cerejeira

Cerejeira é a designação dada a várias espécies de árvores, com origem no continente asiático, sendo estas frutíferas e produtoras de madeira nobre. Estas plantas pertencem à família das *Rosaceae*, subfamília *Prunoideae*, género *Prunus avium* (L.) (Silva e Alarcão 1999). A espécie estudada neste trabalho é a *Prunus avium* variedade *Burlat*.

As cerejeiras têm uma ampla distribuição geográfica tendo o seu cultivo como base a produção de cerejas, sendo estas uma fruta apreciada mundialmente. Estima-se que em 2017/2018 tenham sido produzidas cerca de 578 mil toneladas de cereja, sendo os principais produtores da União Europeia, a Polónia, a Itália e a Espanha (United States Department of Agriculture 2017). As cerejas podem ser consumidas após serem processadas ou serem comercializadas isoladamente, estando estas incluídas em diversos produtos alimentares nas mais diversas formas e, sobretudo, são consumidas como fruta fresca da época, uma vez que é sazonal (Gonçalves *et al.* 2017; United States Department of Agriculture 2017).

Em Portugal, estima-se que tenham sido produzidas cerca de 20 mil toneladas em 2017/2018, nomeadamente na região da Beira Interior, em particular nos concelhos do Fundão, Covilhã e Belmonte, tendo sido maioritariamente para consumo interno fresco (Serra *et al.* 2011; United States Department of Agriculture 2017).

A cerejeira requer solos profundos, frescos, ricos em matéria orgânica e condições edafoclimáticas particulares, sendo a sua produção de cereja condicionada por elevada precipitação, antes e após a maturação, e pela ocorrência de geadas primaveris (Serra *et al.* 2011).

Existem diversas variedades de cerejeira, cada uma delas com as suas características e época de colheita distintas. No caso da variedade *Burlat*, as cerejas produzidas são colhidas num curto período de tempo, sendo este compreendido entre o final do mês de abril e meados do mês de maio, apresentando estas um tamanho médio, uma pele vermelha e polpa dourada, sendo resistentes às chuvas e pragas quando em cultura (Fresh Fruit Portal 2014; Remón *et al.* 2004). Esta resistência favorece o facto desta variedade existir na região da Cova da Beira, uma vez que por vezes o seu clima é irregular.

As árvores são constituídas por uma parte subterrânea e uma aérea. A parte subterrânea compreende as raízes, sendo estas responsáveis pela absorção da água, suporte da parte aérea e armazenamento de compostos bioquímicos, enquanto que a parte aérea engloba o tronco, os ramos e as folhas (Alex. C. Wiedenhoeft 2005).

Em geral, as árvores frutíferas necessitam de ser podadas e as cerejeiras não são exceção. A poda tem como principal objetivo garantir uma maior e mais ampla exposição da árvore à luz solar otimizando assim a produção de frutos, facilitando a colheita destes e combatendo ou prevenindo qualquer tipo de pragas ou doenças que possam atingir as árvores (Grant 2018). A época da poda varia de espécie para espécie sendo que, neste caso, é aconselhável ser no inverno uma vez que a árvore está sem folhas e sem fruto (Grant 2018). Desta forma, uma vez que a cerejeira tem elevada representação na região da Cova da Beira e que é necessário efetuar a poda anualmente, ficam disponíveis os resíduos desta, os ramos. O objetivo deste trabalho é obter um produto de valor acrescentado a partir da lenhina de resíduos da poda de cerejeiras. Esta opção prevê valorizar assim a região e os resíduos que não apresentam, até ao momento, qualquer tipo de utilização.

1.3. Composição química do material lenhocelulósico

Botanicamente, as árvores são classificadas como gimnospérmicas (resinosas) e angiospérmicas dicotiledóneas (folhosas). Como exemplo de gimnospérmicas ou coníferas podem ser referidos os pinheiros (género *Pinus*), enquanto que nas angiospérmicas dicotiledóneas as árvores tipicamente folhosas com folha caduca, mais complexas, como por exemplo as cerejeiras (género *Prunus*) (Alex. C. Wiedenhoeft 2005).

Em termos químicos, a madeira é um material polimérico tridimensional constituído por componentes maioritários como a celulose, as hemiceluloses, a lenhina e, em proporções residuais, extrativos e compostos inorgânicos (Alex. C. Wiedenhoeft 2005). As gimnospérmicas apresentam cerca de 40-50 % de celulose, 20 % de hemicelulose e 25-35 % de lenhina enquanto que as angiospérmicas são constituídas por 40-50 % de celulose, 15-35 % de hemicelulose e 17-25 % de lenhina (Bodîrlău, Spiridon e Teacă 2007).

A figura 1.1 é representativa dos principais componentes da madeira bem como a sua localização na parede celular e a ligação entre eles.

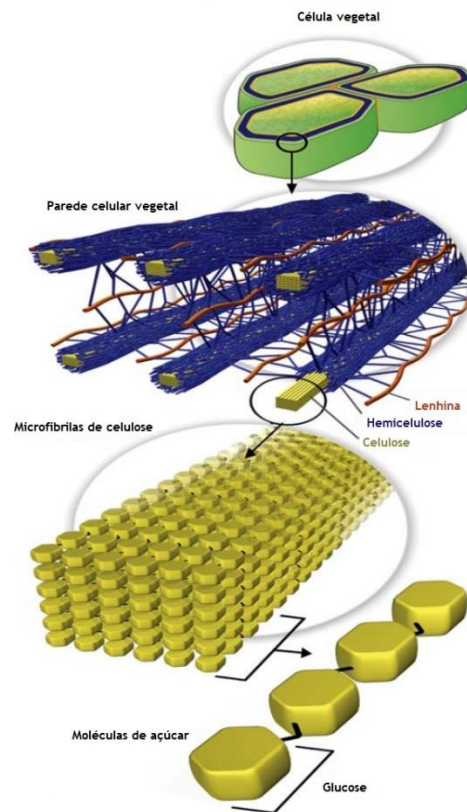


Figura 1.1: Esquema da representação da lenhina, hemicelulose e celulose na parede celular das plantas, adaptado de Sannigrahi, Pu e Ragauskas (2010).

1.3.1. Holocelulose

A combinação da celulose com as hemiceluloses é designada por holocelulose. Estes polissacáridos fazem parte da constituição dos materiais lignocelulósicos juntamente com outros polissacáridos como o amido e a pectina. (Alex. C. Wiedenhoeft 2005).

A celulose é o polissacárido mais abundante na natureza, apresentando-se como um homopolímero linear formado por unidades de β -D-anidroglicopiranosose ligadas entre si por ligações β -(1 \rightarrow 4) glicosídicas (Alex. C. Wiedenhoeft 2005). Na figura 1.2 apresenta-se uma estrutura parcial da celulose:

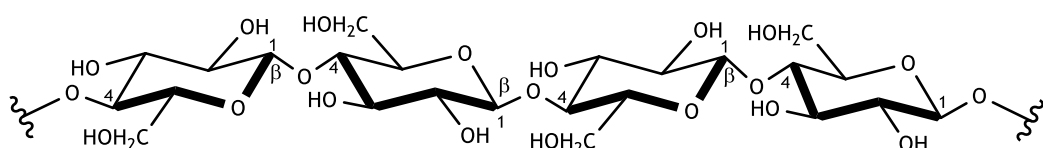


Figura 1.2: Segmento da cadeia de celulose, adaptado de Eero Sjostrom (2003).

Devido às ligações por pontes de hidrogénio intra e intermoleculares, as moléculas de celulose agregam-se em microfibrilas que formam regiões altamente ordenadas (cristalinas) e regiões menos ordenadas (amorfas), originando assim um polímero de elevado peso molecular, com uma estrutura linear (Alex. C. Wiedenhoeft 2005; Eero Sjoström 2003). Estas estruturas fibrosas rígidas favorecem alta resistência, sendo este o principal componente da parede celular, apresentando insolubilidade a uma grande variedade de solventes (Eero Sjoström 2003).

As hemiceluloses são um conjunto de heteropolímeros compostos por unidades monoméricas com cinco átomos de carbono (xilose e arabinose) e seis átomos de carbono (glucose, manose e galactose), além de ácidos hexurónicos (Alex. C. Wiedenhoeft 2005; Belgacem e Gandini 2008). Estes polissacáridos distinguem-se da celulose por apresentarem baixo peso molecular e serem constituídos por diferentes tipos de unidades de açúcares, classificando-se em quatro grupos, sendo estas xilanas (unidades de D-xilose ligadas por ligações β -1,4), mananas (unidade de D-manose ligadas por ligações β -1,4), arabinanas (unidades de L-arabinose, ligadas por ligações α -1,5) e galactanas (unidades de D-galactose, ligadas por ligações β -1,3) (Alex. C. Wiedenhoeft 2005; Belgacem e Gandini 2008). Estes compostos estão intimamente ligados com a celulose e com a lenhina, contribuindo assim para a rigidez da parede celular das plantas, estando presentes em grandes quantidades quando a árvore se encontra sob stresse (Alex. C. Wiedenhoeft 2005; Belgacem e Gandini 2008).

As holoceluloses ligam-se às estruturas químicas da lenhina por ligações benzil-éter, glicosídicas e benzil-éster tal como se ilustra na figura 1.3 (Koshijima e Takashi 2003).

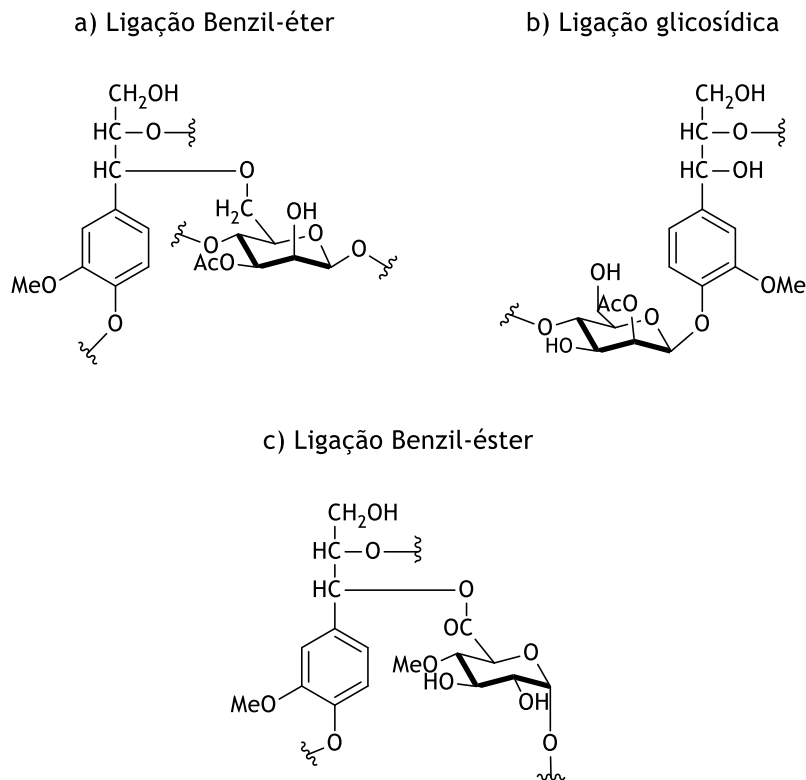


Figura 1.3: Estruturas propostas das diferentes ligações da lenhina às hemiceluloses: a) ligação benzil-éter, b) ligação glicosídica, c) ligação benzil-éster, adaptado de Koshijima e Watenabe (2003).

1.3.2. Compostos inorgânicos

O conteúdo inorgânico da madeira, normalmente designado por teor de cinzas, mede os sais minerais e compostos inorgânicos presentes após combustão a 575 ± 5 °C (Alex. C. Wiedenhoft 2005). Os elementos químicos são variados, sendo estes essenciais para o crescimento da árvore. Ca, Mg e K constituem cerca de 80 % das cinzas, estando estes presentes como oxalatos, carbonatos ou sulfatos. No entanto, existem outros elementos, tais como Na, Si, B, Mn, Fe, Mo, Cu, Zn, Ag, Al, Ba, Co, Cr, Ni, Pb, Rb, Sr, Ti, Au, Ga, In, La, Li, Sn, V e Zr que estão presentes em menores quantidades (Rowell 2012). Estes elementos são adquiridos através das raízes e transportados ao longo da árvore, variando as quantidades destes de espécie para espécie e de acordo com as condições ambientais (Alex. C. Wiedenhoft 2005; Eero Sjostrom 2003).

Entre as gimnospérmicas e as angiospérmicas não difere muito o teor de cinzas sendo de cerca de $0,3 \pm 0,1$ % para as gimnospérmicas e $0,5 \pm 0,3$ % para as angiospérmicas dicotiledóneas (Rowell 2012).

1.3.3. Extrativos

Os extrativos da madeira são componentes não estruturais, sendo estes produzidos pela árvore e têm como função proteger contra os stresses ambientais (Kirker *et al.* 2013). Estes são constituídos por compostos fenólicos, ceras, gorduras, terpenos e esteroides, sendo alguns destes comercialmente muito interessantes, podendo ser empregues como agentes terapêuticos, aditivos, fertilizantes e revestimentos de frutas (Alex. C. Wiedenhoeft 2005; Eero Sjoström 2003).

Estes compostos podem ser extraídos da madeira usando solventes, principalmente orgânicos, tais como tolueno, etanol e éter (Rowell 2012).

As gimnospérmicas apresentam geralmente um teor de extrativos superior às angiospérmicas. Na literatura é referido que estes compostos são responsáveis pela cor, odor e rigidez da madeira (Rowell 2012).

1.3.4. Lenhina

A lenhina é o segundo polímero natural mais abundante uma vez que o primeiro é a celulose. Ela está presente em grandes quantidades na parede celular das plantas preenchendo as lacunas entre a celulose, hemiceluloses e pectina, conferindo assim resistência mecânica, especialmente em tecidos lenhosos (Agrawal, Kaushik e Biswas 2014; Boeriu *et al.* 2004; Watkins *et al.* 2015). Desta forma, a lenhina é essencial à sobrevivência das plantas visto que fornece um reforço estrutural e confere impermeabilidade aos tecidos lenhosos, permitindo assim que as plantas se mantenham em pé, reforçando também a parede celular proporcionando uma boa condução da água e dos nutrientes necessários, bem como ajuda na orientação dos caules e ramos, tanto em tensões mecânicas como no redirecionamento para a luz solar (Norman G. Lewis e Laurence B. Davin 1998). Além da lenhina caracteristicamente presente durante o desenvolvimento da planta, a sua biossíntese pode ser induzida devido ao stress biótico e abiótico, como por exemplo, ferimentos, infeções patogénicas, stress metabólico e perturbações na parede celular (Vanholme *et al.* 2010).

A lenhina surge por um processo de lenhificação, iniciada por um processo enzimático, a partir de três precursores monolignóis, os álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (figura 1.4 a)). Estes originam unidades de fenilpropano do tipo hidroxifenilpropano, guaiacilpropano e seringilpropano (Alex. C. Wiedenhoeft 2005; Lin e Dence 1992; Watkins *et al.* 2015). A complexidade da estrutura da lenhina está esquematizada na figura 1.4 b), não permitindo assim determinar o seu verdadeiro peso molecular pois não é uma estrutura constante (Alex. C. Wiedenhoeft 2005; Lin e Dence 1992; Watkins *et al.* 2015).

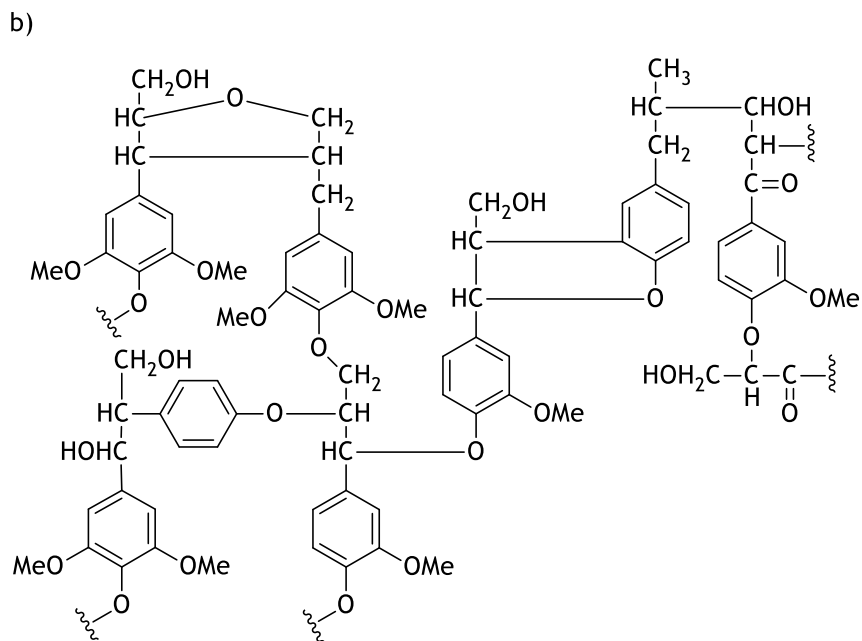
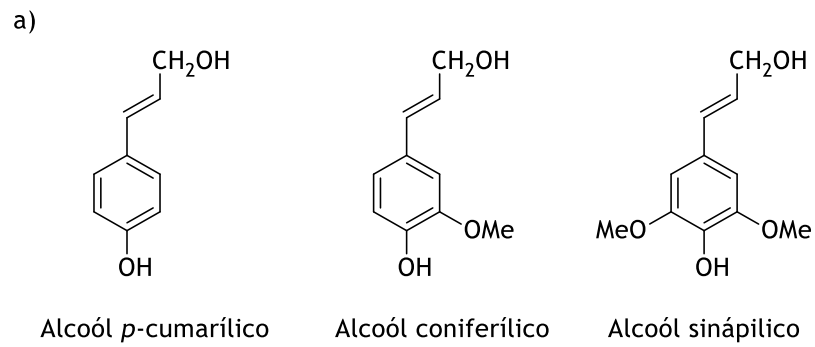


Figura 1.4: Representação esquemática das unidades estruturais da lenhina (a) e estrutura da lenhina (b) proposta por Adler (1977), adaptado de Tejado *et al.* (2007).

As estruturas químicas que compreendem a lenhina estão unidas por ligações carbono-carbono e ligações éter, sendo as mais comuns a β -O-4, β -1, 4-O-5 e α -O-4, como ilustrado na figura 1.5, dando assim origem à estrutura tridimensional e amorfa característica da lenhina (Lin e Dence 1992).

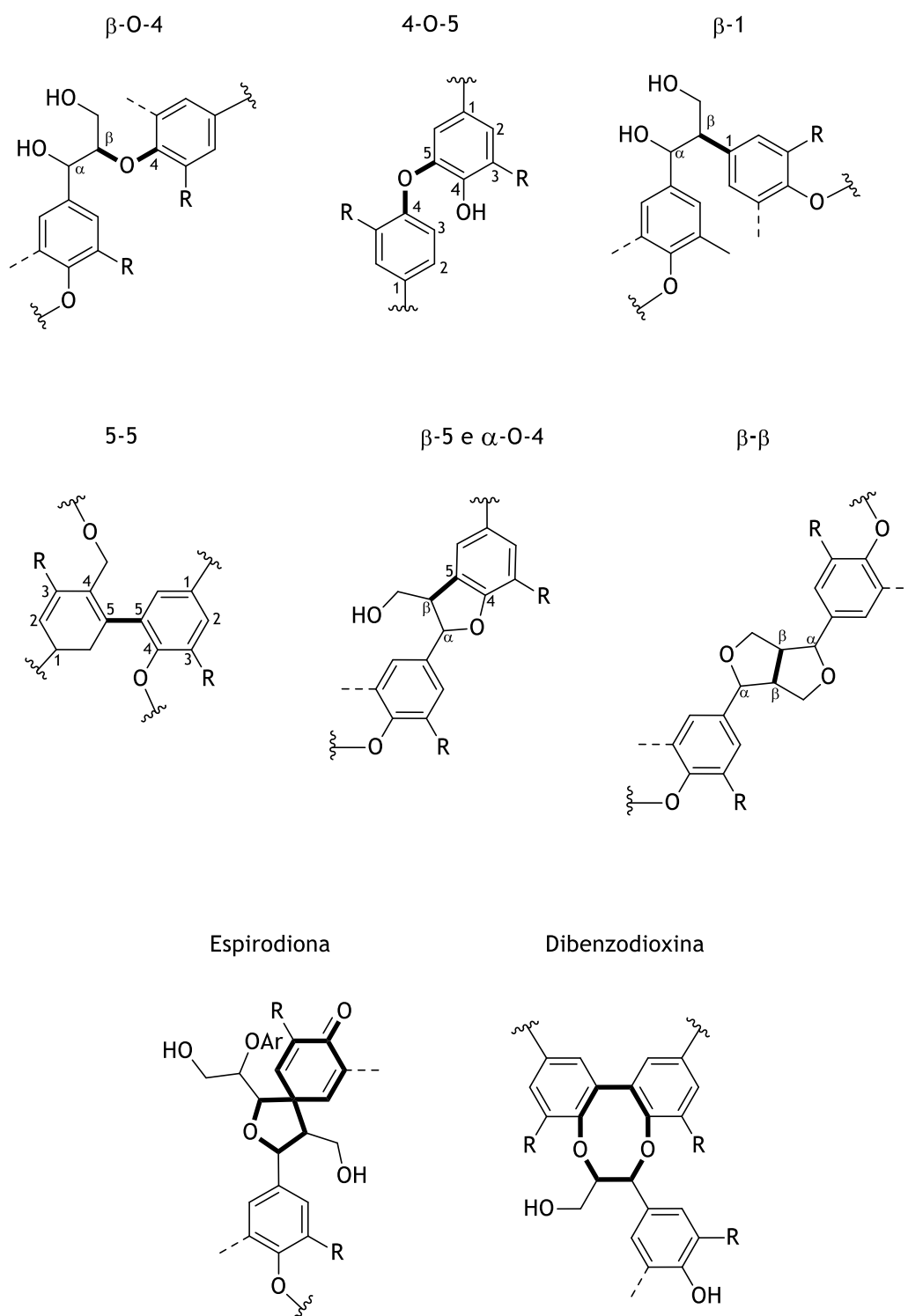


Figura 1.5: Ligações mais comuns da lenhina, adaptado de Patil, Tanguy e Yan (2015).

Desta forma, as ligações carbono-carbono tornam difícil a fragmentação da lenhina, sendo usadas as ligações éter para a degradar de forma a se obterem estruturas com características da lenhina original (Lin e Dence 1992; Mansouri e Salvadó 2006). Assim, a lenhina é o termo genérico de um amplo grupo de estruturas aromáticas resultantes do acoplamento metabólico oxidativo de 4-hidroxifenilpropanóides (Vanholme *et al.* 2010).

A composição, em termos de unidades precursoras da lenhina, para as diferentes espécies é distinta. As gimnospérmicas apresentam na sua constituição cerca de 95 % de unidades do álcool coniferílico, compreendendo em quantidades vestigiais unidades do álcool *p*-cumarílico e unidades derivadas do álcool sinapílico. As angiospérmicas dicotiledóneas são compostas por unidades derivadas do álcool coniferílico e sinapílico (Lin e Dence 1992).

Nos últimos anos, tem existido uma extensa investigação na melhoria dos processos de extração e de caracterização das estruturas presentes na lenhina, bem como das propriedades funcionais e do desenvolvimento de novas aplicações (Boeriu *et al.* 2004). A literatura refere que a lenhina é uma molécula versátil, possui diversas propriedades benéficas, tais como anticancerígena, antioxidante, antifúngica e antibiótica podendo, desta forma, ser utilizada como estabilizante de alimentos, na produção de baunilha e em formulações de medicamentos (Boeriu *et al.* 2004; Samuel *et al.* 2010).

A diversidade de grupos funcionais presentes na estrutura química da lenhina permite uma ampla utilização, de entre as quais se destaca o uso dispersante em misturas de cimento e gesso, emulsificante, agente quelante para a remoção de metais pesados de efluentes industriais, produção de fibras de carbono, produção de reagentes químicos fenólicos e na produção de materiais plásticos uma vez que polímeros à base de lenhina são combinados de forma a aumentar a biodegradabilidade (Agrawal *et al.* 2014; Lignimatch 2010).

A indústria de papel e de pasta está também interessada em melhorar os processos de produção com o objetivo de recuperar e isolar a lenhina para promover o desenvolvimento de recursos biocompatíveis e renováveis (Agrawal *et al.* 2014)

Tendo em conta a elevada disponibilidade da lenhina e as suas diversas aplicações, poderá ser viável a utilização sustentável deste composto como fonte renovável de compostos aromáticos na natureza que pode gerar diversos componentes químicos de forma a substituir os derivados de petróleo sendo esta menos tóxica e com um custo mais reduzido (Lignimatch 2010; Tejado *et al.* 2007).

No conceito de bio economia que propõe o uso inteligente dos recursos biológicos, espera-se que os químicos de base biológica cresçam significativamente e que a cota na produção global destes passe para cerca de 9% até 2020 (Smolarski 2012).

Posto isto, os potenciais benefícios ambientais no uso da lenhina são elevados. A quantidade de lenhina disponível para o uso em produtos de valor acrescentado é difícil de estimar pois esta depende do isolamento da lenhina nos setores da celulose e agrícola (Lignimatch 2010).

Atualmente a lenhina é ainda muito pouco valorizada e está disponível em larga escala pois a quantidade total na biosfera é cerca de 300 biliões de toneladas e cresce cerca de 20 biliões

por ano (Smolarski 2012). Só entre 2010 e 2012, a indústria de papel e celulose produziu cerca de 50 milhões de toneladas de lenhina sendo usada apenas 2 % (cerca de 1 milhão de toneladas) em produtos de baixo valor comercial, tais como quelantes e dispersantes, tendo sido a restante queimada como combustível de baixo valor (Smolarski 2012).

Tendo em conta a disponibilidade e todas as mais valias da lenhina, a indústria está a começar a investigar cada vez mais o seu potencial, podendo esta tornar-se o principal recurso aromático renovável para a indústria química no futuro (Smolarski 2012).

À medida que os custos tecnológicos de isolamento e purificação da lenhina diminuem, torna-se cada vez mais aliciente a produção de produtos à base de lenhina e comercializá-los a um preço equivalente ao dos biocombustíveis (Smolarski 2012). Além disso, a indústria irá focar-se mais na lenhina à medida que o petróleo atinge novos preços insustentáveis (Smolarski 2012).

Daqui a cerca de uma década, espera-se que investigadores e agentes da indústria vejam, no isolamento e purificação da lenhina, a produção de químicos, materiais e compostos farmacologicamente ativos de valor acrescentado (Smolarski 2012).

No entanto, algumas dúvidas se levantam, tais como qual a melhor estratégia para o aproveitamento e utilização da lenhina, quais as tecnologias mais rentáveis, quais as empresas em que compensará o investimento e o que se pode esperar desta evolução em termos económicos a curto, médio e longo prazo (Smolarski 2012).

Ao nível farmacológico, a lenhina extraída das árvores, mostrou capacidade antioxidante elevada, reduzindo a produção de radicais livres e apresentando a capacidade de estabilizar reações induzidas pelo oxigénio e pelos radicais (Barapatre *et al.* 2016).

Ao longo dos anos, diversos autores têm demonstrado a capacidade de libertação controlada de diferentes pesticidas e herbicidas a partir de nanopartículas à base de lenhina (Vinardell e Mitjans 2017). Desta forma, as nanopartículas à base de lenhina poderão ser usadas nos sistemas de libertação de fármacos, na medicina humana, uma vez que não apresentam toxicidade e são biodegradáveis. Assim sendo, podem aplicar-se como estabilizadores de formulações cosméticas e terapêuticas e na libertação de fármacos, substituindo assim nanomateriais não-biodegradáveis e potencialmente tóxicos de forma a minimizar os riscos pós-utilização (Frangville *et al.* 2012; Vinardell e Mitjans 2017).

Foram produzidas nanopartículas de lenhina, de morfologia esférica e estáveis ao longo do tempo sem que fosse necessária modificação química da lenhina (Lievonon *et al.* 2016). Lievonon *et al.* (2016) usaram uma quantidade limitada de solventes orgânicos para produzir estas nanopartículas com dispersão aquosa amiga do ambiente.

Uma das principais preocupações ao nível de desenvolvimento de fármacos é na carcinogénese. Os fármacos usados para estas patologias são usualmente administrados em quimioterapias citotóxicas convencionais e em fármacos molecularmente direcionados (Lievonon *et al.* 2016). No entanto, existem algumas limitações, nomeadamente na libertação inespecífica do fármaco, na baixa concentração que atinge o local do tumor, na citotoxicidade subjacente aos tecidos em desenvolvimento e na criação de uma resistência aos fármacos (Lievonon *et al.* 2016). De forma a superar estes obstáculos, Lievonon *et al.* (2016) procuraram desenvolver nanopartículas à base de lenhina pura (pLNPs), com o complexo lenhina-ferro (III) (Fe-LNPs) e com o complexo lenhina-Óxido de ferro (II,III) (Fe_3O_4 -LNPs), como ilustrado na figura 1.6.

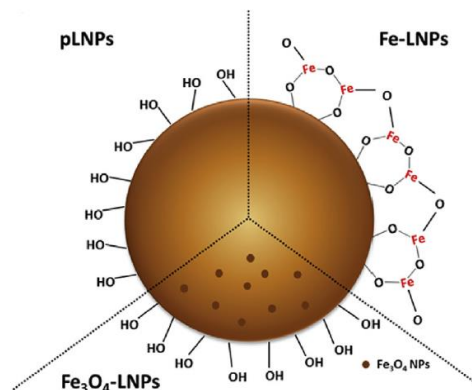


Figura 1.6: Representação esquemática dos três tipos de nanopartículas desenvolvidas, adaptado de Lievonon *et al.* (2016).

Estas nanopartículas apresentaram estabilidade, biocompatibilidade, baixa citotoxicidade e capacidade de inclusão de fármacos pouco solúveis em água e citotóxicos, sendo estes libertados pela variação do pH (Lievonon *et al.* 2016).

1.4. Métodos de extração da lenhina

Como referido anteriormente, a lenhina apresenta uma vasta gama de utilizações, sendo esta completamente isolada do material vegetal através de diversas formas de extração, cada uma delas com suas particularidades, com o objetivo de reduzir ou eliminar as interferências causadas pelos outros constituintes (Lin e Dence 1992). De uma forma ideal, a lenhina teria de ser isolada e recuperada livre de contaminantes e quimicamente inalterada, não existindo atualmente nenhum processo de extração que englobe estes requisitos na totalidade (Lin e Dence 1992; Rowell 2012). Consequentemente, não é conhecida a fórmula química definitiva da lenhina e, o seu conteúdo no material vegetal pode não corresponder à totalidade (Lin e Dence 1992).

A hidrólise ácida da madeira e da celulose é um dos métodos mais comuns de quantificação da lenhina. As pesquisas sobre este método surgiram no início do ano de 1900. Em 1923, Peter Klason sugeriu um método próximo do que é atualmente usado, o qual diferia pela concentração de ácido sulfúrico e pela temperatura, que eram mais baixas (Nicholson, Leavitt e Francis 2014). Seborg e Mitchell (1928) foram os responsáveis pela otimização do método proposto por Peter Klason, tendo sido aceite e atualmente ainda é usado. O conteúdo médio de lenhina solúvel e insolúvel na madeira varia entre as espécies, tendo as gimnospérmicas cerca de $28,8 \pm 2,6$ % e as angiospérmicas 23 ± 3 % (Lin e Dence 1992; Rowell 2012).

Neste método, os componentes da madeira são removidos por hidrólise ácida com ácido sulfúrico a 72 % e a fração de lenhina isolada é designada por lenhina insolúvel, frequentemente classificada como lenhina de Klason (Lin e Dence 1992).

O rendimento e a composição da lenhina isolada por este processo estão diretamente relacionados com a concentração do ácido sulfúrico adicionado e com a temperatura do tratamento. Se a concentração de ácido for inferior a 65 %, os hidratos de carbono podem não ser completamente hidrolisados tal como se a temperatura da reação for baixa mas, por outro lado, se a concentração de ácido for superior a 80 %, os hidratos de carbono podem ser convertidos em produtos de degradação e em compostos insolúveis (Lin e Dence 1992). O filtrado obtido na determinação da lenhina insolúvel também pode conter uma porção de lenhina solubilizada, sendo aproximadamente de 0,2 a 0,5 % em gimnospérmicas e de 3 a 5 % nas angiospérmicas (Lin e Dence 1992).

A hidrólise ácida da madeira origina produtos de degradação de hidratos de carbono tais como o furfural e o hidroximetilfurfural, sendo estes detetados na leitura espectrofotométrica a 280 nm. Desta forma, para evitar interferência desses compostos, efetua-se a quantificação da lenhina solúvel a 205 nm nas angiospérmicas e a 200 nm nas gimnospérmicas (Lin e Dence 1992).

Contudo, este processo é usado apenas para a quantificação da lenhina e não para o isolamento e aplicação posterior uma vez que a molécula fica demasiado degradada devido às condições ácidas e à temperatura elevada a que é exposta no decorrer do método.

Diversos autores extraíram lenhina recorrendo a diferentes métodos químicos, nomeadamente com água quente, organosolv, solventes ácidos e alcalinos (Alvira *et al.* 2010; Faustino *et al.* 2010). Com o intuito de isolar a lenhina torna-se necessário efetuar uma pré-extração da madeira para remover alguns componentes, aumentando assim a eficácia e precisão da extração (Alvira *et al.* 2010). Na obtenção de biocombustível, os pré-tratamentos químicos utilizam mecanismos específicos e necessitam de ácidos, bases, solventes orgânicos ou vapor água para que ocorra modificação química e estrutural da parede celular, tal como representado na figura 1.7 (Brodeur *et al.* 2011; Santos *et al.* 2012).

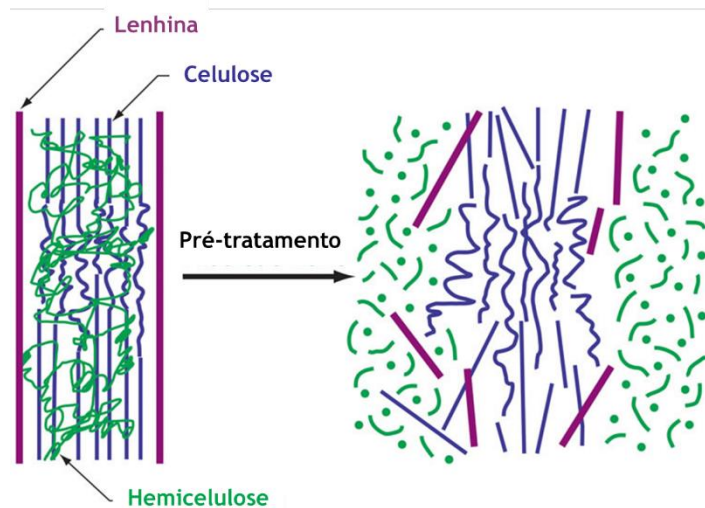


Figura 1.7: Alterações estruturais do complexo celulose-hemicelulose-lenhina determinadas pelo pré-tratamento, adaptado de Santos *et al.* (2012).

Contudo, os métodos de pré-tratamento possuem vantagens e desvantagens. O pré-tratamento alcalino apresenta como vantagem a remoção eficiente da lenhina, mas, tem como desvantagem a alteração da sua estrutura química (Brodeur *et al.* 2011). Relativamente ao pré-tratamento ácido, apresenta um rendimento de lenhina elevado e solubiliza hemiceluloses, enquanto que apresenta como desvantagem o elevado custo dos reagentes, sendo necessário a sua recuperação (Brodeur *et al.* 2011). A pré-extração com solventes orgânicos é vantajosa pois provoca a hidrólise da lenhina e das hemiceluloses e requer condições suaves, nomeadamente baixa temperatura, mas, tem como desvantagem o custo dos solventes, sendo necessária a sua recuperação e reciclagem. (Brodeur *et al.* 2011)

Atualmente, são conhecidos vários métodos para a obtenção da lenhina e, independentemente dos métodos de extração, ocorre fragmentação da estrutura polimérica, gerando compostos com menor peso molecular.

Aadil *et al.* (2014) efetuou a extração da lenhina da acácia (árvore da classe da cerejeira, angiospérmica) e obteve amostra de lenhina que caracterizaram por FTIR. Por outro lado, García *et al.* (2017) utilizaram a água e temperatura elevada de extração e conseguiram obter rendimentos de extração de lenhina na ordem dos 7%.

Quanto à extração organosolv, Santos *et al.* (2015) obtiveram valores médios de 80 % de lenhina de eucalipto (*Eucalyptus paniculata* Sm, *Eucalyptus botryoides* Sm e *Eucalyptus tereticornis* Smith), não tendo constatado que esta extração tenha provocado alterações na capacidade antioxidante das amostras obtidas.

Em extrações ácidas, Gong *et al.* (2016) recorreram ao ácido acético para a extração da lenhina, tendo efetuado uma pré-extração em água. Neste método, obtiveram um rendimento

de extração da lenhina de *Dendrocalamus Latiforus* de cerca de 5 %. No entanto, Zhou *et al.* (2012) utilizaram um micro-ondas de síntese e ácido fórmico para extrair a lenhina da bétula, tendo sido obtidos rendimentos que variaram entre 20 a 90 %, dependendo da potência induzida à amostra e do tempo de extração.

Extrações alcalinas foram realizadas por Aadil *et al.* (2014), tendo variado as concentrações de NaOH entre 0,1 a 0,4 M e, a amostra de lenhina obtida foi caracterizada por FTIR.

1.5. Caraterização das lenhinas

As lenhinas isoladas livres de polissacáridos e extrativos podem ser caracterizadas por diferentes tipos de técnicas, tais como, análise espectroscópica, por espectrofotometria do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H e ^{13}C). Estas técnicas permitem avaliar e determinar o percentual de grupos metoxilícos e outros grupos funcionais, conduzindo à sua estrutura.

1.5.1. Análise espectroscópica

1.5.1.1. Espectrofotometria de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A radiação infravermelha (IV) corresponde a uma região do espectro eletromagnético situada entre a zona do visível e das radiações micro-ondas, estando compreendida entre 4000 e 400 cm^{-1} . Ao ser incidida radiação eletromagnética na amostra, há geração de sinais que podem ser observados num espectro. Neste tipo de espectro, através das bandas apresentadas, consegue-se determinar os tipos de ligações químicas, grupos funcionais e a concentração das moléculas na amostra tendo em conta a intensidade das bandas (Oliveira *et al.* 2001; Smith 2011).

A espectrofotometria de infravermelho tem sido uma ferramenta muito útil para a obtenção de informações sobre os constituintes da madeira e as mudanças químicas que ocorrem ao longo dos tratamentos (Pandey 1999). Esta é conhecida por ser sensível a características estruturais, sendo uma técnica usada rotineiramente por químicos e bioquímicos (Popescu *et al.* 2007). Este método apresenta como principais vantagens ser rápido e fácil, não destrutivo, sensível, de custo reduzido e fornece espectros ricos em informação (Popescu *et al.* 2007; Smith 2011). Contudo, também apresenta desvantagens tais como não conseguir detetar algumas moléculas, nomeadamente átomos individuais como hélio e argon; em misturas o espectro fica mais complexo e dificulta a correspondência das bandas à molécula; a água torna complicada a análise uma vez que as suas bandas são amplas e intensas (Smith 2011). As

amostras podem ser analisadas no estado líquido, gasoso ou sólido podendo, no último caso, ser comprimidas por si só ou com KBr (Smith 2011).

No caso da lenhina, a região de interesse varia entre 4000 e 700 cm^{-1} . A caracterização das bandas de IV é efetuada de modo qualitativo por comparação com bases de dados disponíveis (Oliveira *et al.* 2001). Uma vez que a lenhina é um polímero amorfo constituído por monómeros com estrutura química complexa e de distribuição variável, apenas se conseguem identificar as principais ligações químicas da sua estrutura (Oliveira *et al.* 2001). Este método permite também encontrar discrepâncias estruturais das lenhinas isoladas de diferentes métodos (Derkacheva e Sukhov 2008).

1.5.1.2. Ressonância magnética nuclear (RMN)

Um dos métodos mais confiáveis para estudar as características estruturais de compostos químicos é a espectroscopia de RMN (Sette, Lange e Crestini 2013).

A espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C tem demonstrado ser um método confiável e abrangente no domínio da química da madeira, tendo facilitado a investigação da estrutura de polímeros complexos, tal como a lenhina (Wen *et al.* 2013). Habitualmente, são usados entre 20000 a 30000 scans em equipamentos de 400 a 600 MHz (Wen *et al.* 2013)

O espectro de ^1H tem como principais vantagens o facto de não serem necessárias alterações da lenhina, requer uma pequena quantidade de amostra e um curto período de tempo na aquisição do espectro (Wen *et al.* 2013). No entanto, devido à elevada complexidade da lenhina, à diversidade dos prótons e irregularidade das ligações entre as unidades, o espectro de ^1H da lenhina apresenta sobreposições sendo difícil identificar todos os sinais com precisão (Wen *et al.* 2013).

Os espectros de ^{13}C fornecem diversas informações tais como a presença de carbonos aromáticos e alifáticos condensados ou não condensados mas apresentam como desvantagem o facto de ser necessário um longo período de tempo para a aquisição do espectro (Balakshin e Capanema 2015; Wen *et al.* 2013).

Espectros HSQC (heteronuclear single quantum coherence) aumentam muito a resoluções dos espectros uma vez que, por serem bidimensionais, são mais versáteis e ilustram as características estruturais, as ligações existentes entre os monómeros e as transformações das frações extraídas da lenhina sendo então uma ferramenta amplamente utilizada na caracterização estrutural da lenhina (Wen *et al.* 2013; Yuan *et al.* 2011). Este método é vantajoso pois os prótons sobrepostos diretamente ligados a carbonos com diferentes desvios são separados, tendo sido uma fonte valiosa também na identificação das ligações entre as estruturas químicas presentes no polímero da lenhina (Wen *et al.* 2013).

Antes de se efetuar o espectro há condições que têm que ser respeitadas, tais como ter a lenhina livre de contaminantes e a concentração da lenhina no solvente deve ser a mais elevada possível de forma a maximizar a relação sinal - ruído e minimizar as distorções da lenhina (Wen *et al.* 2013). À preparação da amostra é adicionado acetilacetato de crómio (III) para proporcionar um relaxamento completo de todos os núcleos da amostra de forma a obter-se um espectro mais preciso e com sinais mais definidos (Wen *et al.* 2013).

De forma a identificar melhor os grupos hidroxilo procede-se à acetilação da lenhina e efetua-se o RMN dessas amostras (Wen *et al.* 2013).

1.6. Avaliação da bioatividade da lenhina

1.6.1. Stress oxidativo vs. antioxidantes e compostos fenólicos

Entende-se como stress oxidativo o distúrbio ocorrido no equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes, ou seja, quando o equilíbrio tende para a produção de radicais livres, podendo estes oxidar e danificar lípidos celulares, proteínas e DNA, afetando o seu funcionamento, conduzindo assim à citotoxicidade, genotoxicidade e até à carcinogénese caso as células modificadas proliferem (Betteridge 2000; Ferreira e Abreu 2007; François 2014). O stress oxidativo pode ser originado por exercício físico intenso, poluentes ambientais, processos de inflamação, presença de xenobióticos no organismo e em situações relacionadas com doenças tais como cancro, diabetes, cirrose, doenças cardiovasculares e desordens do foro neurológico (Ferreira e Abreu 2007). Desta forma, os radicais livres estão assim associados a várias doenças e ao envelhecimento (Valko *et al.* 2007).

Em organismos aeróbios há constante produção de radicais livres durante o funcionamento normal da célula, geralmente na forma de espécies reativas de oxigénio (ROS), sendo estas removidas pelas defesas antioxidantes da célula que compreendem enzimas como a superóxido dismutase, a catalase e a peroxidase, e moléculas não enzimáticas indispensáveis no funcionamento normal do organismo como carotenos, flavonoides e vitaminas (Dasgupta e Klein 2014; Betteridge 2000; Ferreira e Abreu 2007).

Os radicais livres podem ser definidos como uma espécie química que contém eletrões desemparelhados e onde a reatividade é aumentada pelos eletrões emparelhados presentes no átomo ou molécula (Betteridge 2000). Estes podem ser produzidos por vários processos bioquímicos diferentes tais como a redução do oxigénio molecular durante a respiração aeróbia produzindo radicais superóxido e hidroxilo; subprodutos da oxidação de catecolaminas que podem reduzir o oxigénio molecular a superóxido; e a produção de óxido nítrico pelo endotélio vascular e outras células (Betteridge 2000).

No entanto, os ROS podem ser benéficos para a célula, em concentrações moderadas, uma vez que estão envolvidos em diversos processos fisiológicos, sinalização e regulação (Ferreira e Abreu 2007).

As mitocôndrias são uma das principais fontes de ROS mas também são dos primeiros alvos de ataque destes radicais uma vez que a cadeia respiratória é composta por proteínas transmembranares na membrana mitocondrial interna e a formação de ROS ocorre perto da membrana (Ferreira e Abreu 2007). Desta forma, os lípidos da membrana estão disponíveis para os ROS e sensíveis a ataques de radicais livres, promovendo a peroxidação lipídica (Ferreira e Abreu 2007).

Tendo em conta que o stress oxidativo está associado ao envelhecimento, atualmente existe um grande interesse no desenvolvimento de terapias antienvhecimento de forma a reduzir a carga oxidativa ou aumentar a defesa do hospedeiro pela suplementação através de agentes farmacológicos (Finkel e Holbrook 2000). Usualmente, o uso tópico e oral de antioxidantes reforça a ação de moléculas endógenas na proteção contra ROS, sendo o uso de cosméticos formulados com antioxidantes os mais comercializados mundialmente (Lorencini *et al.* 2014; Ramos-e-Silva *et al.* 2013). Entre uma diversa gama de compostos testados, os mais relevantes são os extratos de produtos naturais, sendo que o extrato de chá verde se evidencia uma vez que é rico em polifenóis que parecem assegurar a eficácia dos produtos (Lorencini *et al.* 2014).

Os antioxidantes são definidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações comparativamente ao substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação desse substrato (Niki 2010). Desta forma, são responsáveis por reduzir os radicais livres, evitando assim danos ao nível celular, podendo também ajudar na inibição da inflamação e proporcionam proteção contra danos causados por radiações. Por exemplo, de forma a evitar o cancro da pele, tendo assim um papel importante na manutenção e prevenção da saúde humana e na prevenção da deterioração de alimentos (Molyneux 2004; Ramos-e-Silva *et al.* 2013).

Os antioxidantes podem ser classificados como preventivos ou sequestrantes, sendo que os preventivos funcionam como defesa primária, suprimindo a formação de espécies reativas de oxigénio enquanto que os sequestrantes, como por exemplo os compostos fenólicos e as aminas aromáticas, removem espécies reativas antes que estas ataquem as moléculas biológicas (Niki 2010).

O interesse nas fontes naturais de moléculas antioxidantes para o uso em alimentos, bebidas e cosmética tem despertado interesse nos últimos anos. Como exemplo de aplicação destes, os protetores solares não são totalmente eficazes contra os danos causados pela radiação ultravioleta (UV) então, os antioxidantes tornam-se fundamentais na prevenção e terapia do

envelhecimento da pele, estando a ser incorporados nestes produtos (Ramos-e-Silva *et al.* 2013).

A capacidade antioxidante dos produtos naturais está relacionada com a presença de compostos fenólicos que estão amplamente distribuídos e detêm a capacidade de sequestrar radicais livres por transferência de eletrões (Silva *et al.* 2006). Desta forma, vários estudos relatam os compostos fenólicos estão diretamente relacionados com a atividade antioxidante (Silva *et al.* 2006).

Atualmente, a preferência de antioxidantes deriva de produtos de fontes naturais ao invés das sintéticas (Molyneux 2004). A lenhina apresenta um efeito antioxidante devido à ação sequestradora de radicais livres da sua estrutura fenólica (Dizhbite *et al.* 2004). De forma a caracterizar a atividade antioxidante de compostos fenólicos naturais foram desenvolvidos vários métodos, sendo o mais comum o do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (Dizhbite *et al.* 2004; Molyneux 2004). Este método é rápido, prático e estável e aplica-se para determinar a capacidade antioxidante de um composto em sequestrar radicais livres (Luís, Domingues e Duarte 2011; Machado *et al.* 2008).

A reação da figura 1.8 corresponde à reação radicalar do DPPH.

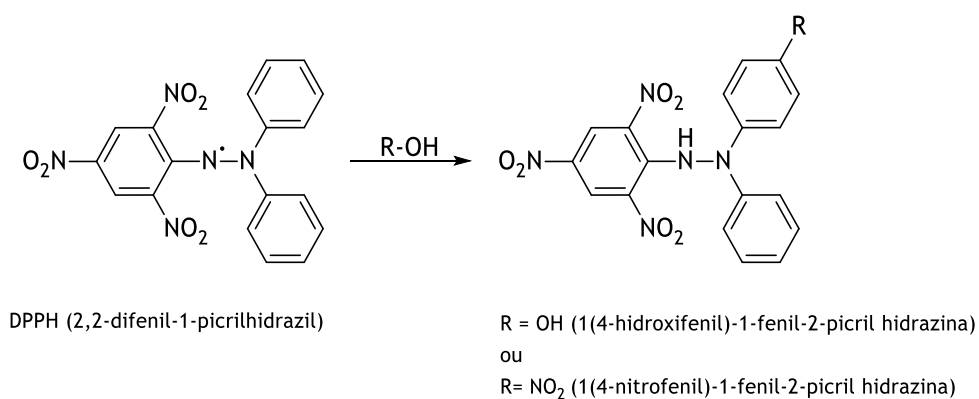


Figura 1.8: Formação da forma reduzida do DPPH, adaptado de Ebada *et al.* (2008).

A reação baseia-se na redução de cor que ocorre quando a solução metanólica de DPPH é colocada a reagir com uma substância que pode doar um átomo de hidrogénio, reduzindo assim o DPPH, com perda da cor violeta para uma coloração amarela que absorve a 517 nm, havendo uma diminuição da absorvância proporcional ao aumento da capacidade antioxidante (Ebada *et al.* 2008; Molyneux 2004).

Através das absorvâncias obtidas determina-se a percentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres que corresponde à quantidade de DPPH consumido pelo antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50 %, denominando-

se concentração inibitória (CI_{50}) (Scherer e Godoy 2009). Quanto mais DPPH for reduzido pela amostra, maior será a CI_{50} , dando origem a uma maior atividade antioxidante (Scherer e Godoy 2009).

A lenhina é um composto natural de estrutura polifenólica com átomos de hidrogénio disponíveis para captar radicais livres (An *et al.* 2017).

Os fenóis são compostos amplamente encontrados no reino vegetal, atuando principalmente como atratores para polinizadores, fornecem a pigmentação das plantas, conferem proteção contra as radiações UV e são antioxidantes (Blainski *et al.* 2013)

Atualmente o interesse nos compostos fenólicos tem vindo a aumentar devido à capacidade destas moléculas em sequestrar radicais prejudiciais à saúde humana (Neves, Alencar, e Carpes 2009). Na comercialização e aplicação de extratos fenólicos naturais, a estabilidade do poder antioxidante deve ser cuidadosamente investigada durante o armazenamento a curto e médio prazo (Neves *et al.* 2009).

A determinação quantitativa dos compostos fenólicos é realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, que usa um reagente com o mesmo nome, cujos componentes principais são o molibdato de sódio e tungstato de sódio (Everette *et al.* 2010). A reação baseia-se na transferência de eletrões, em meio alcalino, dos compostos fenólicos para o complexo fosfotúngstico-fosfomolibdénio que altera a cor de amarelo para azul, cuja absorção máxima depende da solução alcalina e da concentração de compostos fenólicos a 765 nm (Ainsworth e Gillespie 2007; Blainski *et al.* 2013).

1.6.2. Ensaios de citotoxicidade da lenhina

No desenvolvimento de fármacos é comum realizarem-se ensaios de viabilidade e citotoxicidade celular *in vitro* de forma a prever a toxicidade de uma gama de substâncias, sendo considerados dos métodos pré-clínicos mais amplamente usados (Gilbert D. F, Friedrich O. 2017; Niu e Wang 2015; Ugartondo, Mitjans e Vinardell 2008). Assim, está relacionado com a cultura de linhas celulares onde são testadas, por exemplo, moléculas sintéticas e extratos naturais complexos ou isolados (Gilbert e Friedrich 2017). Através das linhas celulares, novos agentes terapêuticos podem ser testados e avaliados quanto aos seus potenciais efeitos terapêuticos tal como o seu mecanismo identificado, de forma rápida e rigorosa (Allen *et al.* 2005). Estes modelos tornam-se vantajosos uma vez que possuem preços mais baixos do que ensaios clínicos e são facilmente manipuláveis (Niu e Wang 2015).

Neste trabalho foi usada a linha celular de fibroblastos normais da derme humana (NHDF) num ensaio de viabilidade celular pelo MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazolil-2) -2,5-difeniltetrazólio) e quantificação da proteína pelo método do ácido bicinonínico (BCA).

A epiderme é a parte mais exposta da pele, entrando em contacto direto com o ambiente externo, sofrendo constantes agressões, sendo necessária a renovação contínua que passa pela multiplicação das células proliferativas na camada interna, a derme (Lorencini *et al.* 2014).

Desta forma, estas células são importantes como modelos *in vitro* uma vez que é através da pele que se dá a entrada de alguns compostos para o sistema vascular humano e pelo facto de a derme ter um papel importante no sistema de renovação celular e na manutenção da integridade da pele (Patlolla, Patlolla e Tchounwou 2010).

O ensaio MTT é um teste colorimétrico usado para avaliar a viabilidade celular ou citotoxicidade. O MTT apresenta grupos laterais lipofílicos e carga positiva que lhe confere a possibilidade de passar a membrana celular, onde vai ser reduzido nas células viáveis por redutases mitocondriais formando assim cristais de formazano insolúveis, passando de amarelo para cor púrpura (Figura 1.9) (Gilbert e Friedrich 2017; Shoemaker, Cohen e Campbell 2004). Os cristais são dissolvidos em DMSO e é efetuada a leitura a 570 nm, onde a quantidade de cristais reflete a atividade metabólica mitocondrial que está relacionada com o número de células viáveis (Brescia e Banks 2009; Jaszczyszyn e Gasiorowski 2008).

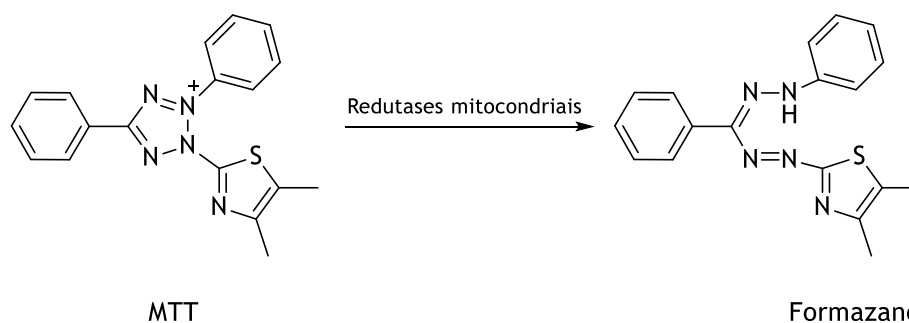
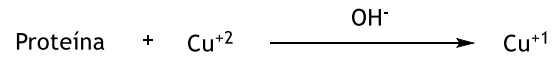


Figura 1.9: Redução do MTT a Formazano, adaptado de Brescia e Banks (2009).

O ensaio da quantificação da proteína pelo método do ácido bicinonínico (BCA) é um método colorimétrico de quantificação da proteína total que se baseia na formação de complexos proteína-cobre em meio alcalino (Bainor *et al.* 2011). Este método compreende dois passos, onde o primeiro diz respeito à redução de Cu^{+2} a Cu^{+1} pelas proteínas e o segundo passo corresponde à reação entre o BCA e o catião cuproso (Cu^{+1}) (Molla, Momekov e Manolov 2018; Smith *et al.* 1985). O produto da reação apresenta cor púrpura, sendo resultado da quelação

de duas moléculas de BCA com um íon cuproso, tal como representado na figura 1.10 (Molla *et al.* 2018; Smith *et al.* 1985). Este complexo é solúvel em água e apresenta absorvância a 562 nm que é linear com concentrações crescentes de proteína, ao longo de uma extensa gama de concentrações de 25 a 1000 µg/mL (Molla *et al.* 2018; Smith *et al.* 1985).

Passo 1:



Passo 2:

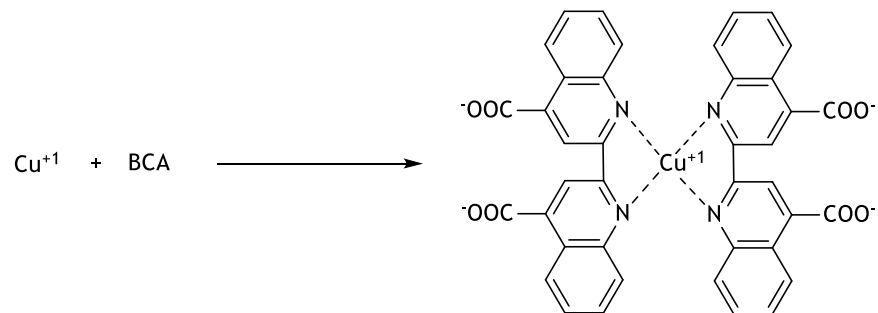


Figura 1.10: Formação do íon cuproso e do complexo púrpura a partir da reação com BCA, adaptado de Smith *et al.* (1985).

Capítulo 2 - Objetivos

Esta dissertação tem como principal objetivo obter um produto de valor acrescentado a partir da lenhina isolada dos resíduos da poda da cerejeira. Desta forma, procederam-se aos seguintes objetivos secundários:

- Caraterização química dos ramos da cerejeira;
- Extração da lenhina dos ramos da cerejeira através de diferentes metodologias variando os solventes de extração e as concentrações.
- Caracterizar as diversas amostras obtidas por FTIR, RMN de ^1H e ^{13}C .
- Avaliar a lenhina quanto à atividade antioxidante (DPPH), fenóis totais (Folin-Ciocalteu) e avaliação biológica (MTT e BCA).

Capítulo 3- Parte experimental

3.1. Colheita, secagem e moagem

Os ramos da cerejeira foram colhidos na região da Cova da Beira, no Ginjal, concelho de Belmonte, em outubro de 2017. A amostra obtida foi cortada em frações de 3/4 cm e colocada a secar numa estufa ventilada a 30 °C durante três dias. Posteriormente, procedeu-se à moagem da amostra no moinho de lâminas, com um crivo de 2 mm, de modo a obter um pó grosseiro. Este foi posteriormente peneirado usando o crivo de peneiras e as frações com granulometria entre 40-60 mesh foram usadas nos processos de extração (Gong *et al.* 2016; Zhou *et al.* 2012).

3.2. Determinação do teor de massa seca

Após homogeneização das amostras obtidas, procedeu-se à determinação do teor de massa seca (TMS) recorrendo a uma balança com infravermelhos (IV). Para tal, colocou-se uma pequena quantidade de amostra em pó num disco de alumínio, durante 1 hora a 105 °C, e monitorizou-se a perda de peso do material, visualizado na balança como TMS.

O valor obtido foi de $92,79 \pm 0,03\%$, sendo este é usado para correção do valor das massas a pesar para as diferentes caracterizações e extrações de forma a obter-se o valor exato da massa absolutamente seca.

3.3. Composição química dos ramos da cerejeira

3.3.1. Determinação do teor em lenhina

O teor em lenhina para a mostra é obtido através do somatório da lenhina solúvel determinada espectroscopicamente e da lenhina insolúvel determinada pela gravimetria.

3.3.1.1. Lenhina insolúvel

O teor de lenhina insolúvel presente na amostra foi determinado de acordo com a norma TAPPI T222 om-02 (*Acid-insoluble lignin in wood and pulp*). Resumidamente, pesou-se 1 g de amostra para um erlenmeyer, adicionou-se 15 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 72% e colocou-se num banho de ultrassons durante 10 minutos com monitorização da temperatura entre os 10 e os 15 °C. Posteriormente, os erlenmeyers foram cobertos com um vidro de relógio e colocados num banho termostastizado a 25 °C durante 2h e 30min, agitando-se frequentemente a amostra com uma vareta de vidro. De seguida, o material foi transferido para um balão de fundo redondo com esmerilado, adicionou-se 300 mL de água destilada e

colocou-se em refluxo durante 4 h. Filtrou-se a amostra num funil de porosidade 4, recolhendo-se o filtrado para a determinação do teor de lenhina solúvel. Efetuaram-se lavagens sucessivas com água destilada fervente até pH neutro. Secou-se na estufa a 105 ± 2 °C até massa constante. Os ensaios foram realizados em triplicado.

O cálculo do teor de lenhina insolúvel (Li %) foi efetuado recorrendo à seguinte equação:

$$Li (\%) = \frac{R}{A} \times 100 \quad (1)$$

Onde R corresponde à massa do resíduo insolúvel seco (g) e A à massa da amostra extraída, expressa em matéria seca (g).

3.3.1.2. Lenhina solúvel

Uma parte da lenhina presente na amostra é solubilizada e, desta forma, é necessário efetuar a quantificação desta através do filtrado da amostra, de acordo com o referido Norma TAPPI UM-250 e pelo procedimento descrito por Lin e Dence (1992). Neste método, mediu-se o volume total dos filtrados e procedeu-se à leitura das absorvâncias a 205 nm, usando-se uma solução de H₂SO₄ a 3% como branco. As absorvâncias medidas dever estar entre 0,2 e 0,7. Como os valores obtidos foram superiores ao estabelecidos, procedeu-se a uma diluição da amostra de 1:10. As leituras foram efetuadas em triplicado.

A concentração de lenhina no filtrado, LS (gL⁻¹), é calculada a partir da seguinte expressão da lei de Beer:

$$LS (gL^{-1}) = \frac{A}{b \times a} \quad (2)$$

Onde A é a absorvância média, b o percurso ótico (cm) e a corresponde à absortividade da lenhina (L/g⁻¹ cm⁻¹).

Tendo em conta que se procedeu à diluição do filtrado, teve que se atender ao fator de diluição:

$$D = \frac{V_d}{V_0} \quad (3)$$

Onde D = fator de diluição; V_d = volume total do filtrado diluído (mL); V₀ = volume do filtrado ácido usado (mL).

Resultando na expressão final:

$$LS \text{ (gL}^{-1}\text{)} = \left(\frac{A}{b \times a} \right) \times D \text{ (4)}$$

O teor de lenhina solúvel (Ls (%)) presente na amostra é então calculado de acordo com a equação (5).

$$Ls \text{ (\%)} = \frac{LS \times V \times 100}{1000 \times W} \text{ (5)}$$

Onde Ls (%) = teor de lenhina solúvel; LS = concentração da lenhina no filtrado ácido (g/L); V = volume total do filtrado ácido (mL); W = massa da amostra, expressa em matéria seca (g).

3.3.2. Determinação do teor de cinzas

O teor de cinzas foi determinado segundo a norma TAPPI 211 om-93 (*Ash in wood, pulp, paper and paperboard: combustion at 525 °C*). Os cadinhos foram colocados na mufla a 525 °C, numa rampa de aquecimento de 7 h e 15 min de forma a ficarem completamente secos. Posteriormente foram retirados, colocados no exsicador a arrefecer e foram pesados até massa constante. Para a amostra pesou-se aproximadamente 4 g de amostra para cada cadinho, e procedeu-se de modo similar. O ensaio foi realizado em triplicado. O resíduo obtido (cinzas) foi pesado e calculou-se o teor de cinzas usando a equação:

$$C \text{ (\%)} = \frac{A}{B} \times 100 \text{ (6)}$$

Onde C = teor de cinzas (%); A = massa das cinzas (g); B = massa da amostra, expressa em matéria seca (g).

3.3.3. Determinação do teor de extrativos

Na determinação do teor de extrativos recorreu-se à extração em Soxhlet, de acordo com o referido por Mounquengui (2016) e pela Norma TAPPI T 204 cm-97 (*Solvent extractives of wood and pulp*). Introduziu-se cerca de 2 g de madeira seca moída nos cartuchos de celulose usados na extração, adicionou-se 150 mL da mistura tolueno/etanol (2:1) num balão de fundo redondo e procedeu-se à extração, que correspondeu a cerca de 10 ciclos por extrator. A extração foi efetuada em triplicado.

Após a extração, o solvente foi transferido para um balão de fundo redondo, tarado e pesado, tendo sido acoplado a um evaporador rotativo com banho termostastizado a 40 °C e pressão

77 mbar. O resíduo extraído foi seco na estufa a 110 ± 5 °C durante 1h e posteriormente colocado no exsiccador até arrefecimento completo para se efetuar a pesagem.

Realizou-se um ensaio em branco da mistura dos solventes utilizados na extração, de forma a corrigir os resultados.

O cálculo do teor de extrativos (E (%)) foi efetuado da seguinte forma:

$$E (\%) = \frac{W_e - W_b}{W_a} \times 100 \quad (7)$$

Onde W_e = massa do resíduo seco extraído (g); W_b = massa do resíduo seco do branco (g); W_a = massa da amostra, expresso em matéria seca (g).

3.3.4. Determinação do teor de holocelulose

O conteúdo de holocelulose foi determinado pelo método do clorito ácido descrito Browning (Rowell 2012). Pesou-se aproximadamente 1 g de amostra livre de extrativos para um balão de fundo redondo com esmerilado de duas tubuladuras. Adicionou-se 32 mL de água destilada, 0,750 g de clorito de sódio (NaClO_2), 0,3 mL de ácido acético glacial (CH_3COOH) e colocou-se em refluxo com agitação, num banho termostastizado de polietilenoglicol (PEG), a 70 °C. Após 60 e 120 min foram adicionadas as mesmas porções de NaClO_2 e CH_3COOH e deixou-se reagir durante mais 1 h. Posteriormente, arrefeceu-se o balão num banho de gelo durante 5 min de forma a promover a precipitação. O sólido foi filtrado a vácuo num funil de porosidade 4 e efetuaram-se duas lavagens, uma com 100 mL de água destilada gelada e outra com 150 mL de acetona a 50 %. Os ensaios foram realizados em triplicado.

O teor de holocelulose (H (%)) é determinado através da seguinte expressão:

$$H (\%) = \frac{A}{B} \times 100 \quad (8)$$

Onde A = massa obtida de holocelulose e B = massa da amostra, expressa em matéria seca (g).

3.4. Métodos de extração da lenhina

Diferentes metodologias sólido-líquido foram feitas para extrair a lenhina das amostras dos ramos de cerejeira usando processos aquosos, organosolv, ácidos e alcalinos. As extrações foram realizadas em sistema de refluxo, com banho termostastizado e assistida em micro-ondas, de acordo com os métodos a seguir descritos. Algumas das extrações testadas

apresentaram resultados positivos, enquanto que outras não se mostraram vantajosas, pois os rendimentos de extração foram demasiados baixos.

3.4.1. Extração com água quente em banho termostastizado de polietilenoglicol (PEG)

3.4.1.1. Método 1

A extração da lenhina procedeu-se de acordo com o descrito por Aadil *et al.* (2014). Numa proporção sólido: líquido de 1:15 colocada em refluxo durante 45 min a 120 °C. Recuperou-se o filtrado por filtração a vácuo e concentrou-se no evaporador rotativo até se obter um volume final de 50 mL. Mediu-se o pH do filtrado e ajustou-se o pH para pH= 5,5 recorrendo a uma solução de HCl 5M. Numa ampola de decantação, efetuaram-se 3 extrações líquido-líquido com etanol. Posteriormente reduziu-se o pH para 1,5 - 2 e colocou-se a amostra em refrigeração durante a noite, de forma a promover a precipitação da lenhina solubilizada. Procedeu-se à filtração do sólido obtido num funil de porosidade 4 e secou-se em estufa ventilada a 40 °C.

3.4.1.2. Método 2

Neste método, a extração inicial foi efetuada com as mesmas condições referidas anteriormente até à redução do pH até 5,5. Posteriormente, a fração líquida foi vertida em água destilada na proporção 1:10 e reduziu-se o pH com HCl 5 M até pH 1,55. A amostra foi colocada a 4 °C para precipitar da lenhina presente. O sólido obtido foi filtrado num funil de porosidade 4 e seco na estufa a 40 °C em ciclos de 30 min, até massa constante.

3.4.1.3. Método 3

O método de extração aqui descrito foi baseado no trabalho realizado por García *et al.* (2017). Para a extração da lenhina usou-se uma razão sólido: líquido de 1:10 e deixou-se reagir durante 30 min, num banho termostastizado a 173 °C, com agitação magnética. As frações resultantes, sólido e líquido, foram separadas por filtração a vácuo num funil de porosidade 2. Com recurso ao evaporador rotativo, concentrou-se a fração líquida até um volume final de 50 mL. Mediu-se o pH do concentrado (5,59) e a lenhina foi recuperada por precipitação através da adição de 150 mL de água gelada ácida (pH 2 ajustado com H₂SO₄), tendo diminuído o pH para 2. Colocou-se a mistura a 4 °C durante a noite, centrifugou-se o precipitado obtido a 4000 rpm durante 30 min e lavou-se com 100 mL de água acidificada. O produto obtido foi colocado a secar na estufa a 40 °C.

3.4.1.4. Método 4

Este método foi adaptado de García *et al.* (2017). Num balão de fundo redondo com esmerilado, foi adicionada uma razão de 1:10 de amostra de cerejeira e água destilada ácida (pH 1,94 ajustado com H₂SO₄). Colocou-se em aquecimento num banho termostastizado a 173 °C, durante 30 min e com agitação magnética. O líquido foi recuperado por filtração a vácuo num funil de porosidade 2 e concentrado no evaporador rotativo até volume de 50 mL. À fração líquida obtida, mediu-se o pH (2,68) e adicionaram-se gotas de H₂SO₄ concentrado, obtendo-se um pH final de 0,9. Colocou-se a 4°C e centrifugou-se a 4000 rpm durante 30 min. O sólido resultante foi lavado num funil de porosidade 4 com 100 mL de água acidificada e colocou-se a secar na estufa a 40 °C até massa constante.

3.4.1.5. Método 5

No presente método procedeu-se a uma adaptação de García *et al.* (2017). Numa razão de 1:10 (m/v), colocou-se madeira de cerejeira seca e água ácida (pH 1,94 ajustado com H₂SO₄) e colocou-se em aquecimento a 165 °C num banho de PEG, durante 45 min, com agitação magnética constante. O sólido foi separado do líquido por filtração a vácuo com recurso a um funil de porosidade 2 e lavado com 150 mL de água ácida (pH 1,94 ajustado com H₂SO₄). O filtrado e a lavagens foram recolhidas e juntas e mediu-se o pH (1,74) que foi reduzido por adição de H₂SO₄ concentrado, passando para 0,95. A amostra foi colocada numa arca congeladora durante 20 min e posteriormente colocada a 4 °C durante a noite. O sólido obtido foi centrifugado a 4000 rpm durante 1 h e lavado com água ácida, tendo sido colocado na estufa a 40 °C até massa constante.

3.4.2. Extração com água quente assistida por micro-ondas

Através de uma adaptação do descrito por Zhou *et al.* (2012), recorreu-se ao equipamento Milestone MultiSYNTH Single and Multi-Mode Microwave Synthesis System, equipado com sistema de agitação magnética e condensador de refrigeração.

Introduziu-se madeira num balão de fundo redondo com esmerilado e água destilada ácida (pH 2, ajustado com H₂SO₄) numa proporção de 1:10 e iniciou-se uma rampa de aumento de potência até se atingir 600 W, onde permaneceu durante 30 min. Findo este tempo, procedeu-se ao arrefecimento da amostra e filtrou-se a vácuo num funil de porosidade 2. O filtrado foi concentrado com recurso ao evaporador rotativo até se obter um volume final de 8 mL. O concentrado foi vertido em água destilada, reduziu-se o pH até 1,5 e colocou-se em refrigeração para que ocorresse a precipitação da lenhina.

3.4.3. Extração organosolv

O processo organosolv utilizado foi adaptado de Santos *et al.* (2015) e Abdul Khalil *et al.* (2011). Pesou-se cerca de 10 g de amostra para um balão de fundo redondo com esmerilado, adicionou-se uma solução etanol/água (60/40 % volume) e colocou-se em aquecimento num banho de PEG, com sistema de refluxo, a 173 °C durante 90 min. Findo o tempo de extração, a amostra foi filtrada num funil com porosidade 2, lavando-se o sólido com 100 mL de mistura etanol/água (60/40 % volume) e posteriormente com 100 mL de água destilada. Efetuou-se a medição do pH do conjugado filtrado e lavagens e precipitou-se a lenhina por adição de H₂SO₄ 4,84 M até se obter pH 2. A mistura foi colocada em refrigeração durante a noite de forma a promover a precipitação da lenhina. O precipitado foi filtrado a vácuo num funil de porosidade 4 e lavado com água destilada até que o filtrado apresentasse pH neutro. A lenhina obtida foi seca na estufa a 40 °C.

Numa segunda extração por este método, procedeu-se da forma referida anteriormente, alterando-se apenas a técnica de recuperação da lenhina precipitada. Neste caso, a lenhina que precipitou foi recuperada por centrifugação a 4000 rpm durante 1 h.

3.4.4. Extrações em meio ácido

3.4.4.1. Extração com ácido acético

A extração da lenhina com ácido acético foi descrita por Gong *et al.* (2016) inclui duas partes distintas: um pré-tratamento com água quente seguida da extração com ácido acético (CH₃COOH) e ácido clorídrico (HCl). Pesou-se aproximadamente 10 g de amostra, expressa em matéria seca, e adicionou-se 100 mL de água destilada, de modo a corresponder à proporção sólido - líquido 1:10 (g/mL). Colocou-se em aquecimento a 95 °C, num banho de PEG, durante 2 h. O resultado do pré-tratamento foi separado por filtração a vácuo através de um funil de porosidade 2. Efetuaram-se duas lavagens com 100 mL de água destilada a 95 °C e colocou-se a secar o sólido obtido durante a noite na estufa a 60 °C.

Após o processo de pré-tratamento, procedeu-se à segunda etapa de extração da lenhina colocando, num balão de fundo redondo com esmerilado, 10 g de sólido obtido na pré-extração, 200 mL de ácido acético a 87 % e 0,51 mL de ácido clorídrico a 37%. Submeteu-se a um sistema de refluxo num banho de PEG a 114 ± 2 °C, com agitação magnética, durante 80 min. Concluído o processo, colocou-se o balão sob água corrente de forma a arrefecer e filtrou-se a vácuo num funil com porosidade 2. O sólido foi lavado sucessivamente com 150 mL de CH₃COOH 87 % e 300 mL de água destilada. O filtrado e as águas de lavagens foram concentrados no evaporador rotativo, com banho termostastizado a 40 °C e pressão 90 mbar, até se obter o volume final de 50 mL. O concentrado foi vertido em 500 mL de água destilada

para que o produto precipitasse. A lenhina foi recolhida por centrifugação a 4000 rpm durante 1 h, efetuaram-se duas lavagens com 100 mL de água destilada ácida (pH 2, ajustado com H₂SO₄) e colocou-se na estufa a secar a 40 °C até a massa da amostra estabilizar tendo sido posteriormente colocada a secar sobre vácuo com P₂O₅ a 40 °C.

3.4.4.2. Extração com ácido fórmico

Zhou *et al.* (2012) recorreram à extração ácida de forma a remover a lenhina da amostra livre e extrativos. Usou-se o processo em banho de PEG e assistida por micro-ondas, usando ácido fórmico a 88 %.

3.4.4.2.1. Em banho de PEG

Num balão de fundo redondo com esmerilado, colocou-se a amostra e o ácido fórmico numa razão 1:10 e deixou-se reagir durante 1 h. Findo este tempo filtrou-se a mistura obtida a vácuo num funil de porosidade 2 e realizaram-se lavagens com 125 mL de ácido fórmico e 150 mL de água destilada. Ambos os filtrados foram misturados e concentrados no evaporador rotativo à pressão de vapor de 47 mbar até se obter 8 mL, tendo sido estes vertidos em 60 mL de água destilada para promover a precipitação da lenhina solubilizada. O precipitado foi recolhido por centrifugação a 4000 rpm, durante 1 h, lavou-se sucessivamente com água ácida (pH 2, ajustado com H₂SO₄) e colocou-se a secar na estufa a 40 °C.

3.4.4.2.2. Assistida por micro-ondas

Na extração assistida por micro-ondas da lenhina da cerejeira foram utilizadas as potências de 500 e 600 W. O micro-ondas usado funciona em modo simples sendo um micro-ondas de síntese, equipado com sistema de agitação magnética e condensador de refrigeração com água. Num balão de fundo redondo, colocou-se a amostra livre de extrativos, numa razão solido-líquido 1:10 (g/mL), iniciou-se o processo de aumento gradual da potência até atingir desejada, onde permaneceu a extrair durante 30 min com posterior diminuição da potência de forma a diminuir também a temperatura no interior do balão de fundo redondo. A mistura obtida foi filtrada a vácuo num funil com porosidade 2 e foram efetuadas lavagens com 125 mL de ácido fórmico 88 % e 150 mL de água destilada. Juntou-se o filtrado e as lavagens e concentraram-se no evaporador rotativo, a pressão reduzida até se obter um volume final de 8 mL. O concentrado foi vertido em 60 mL de água destilada para precipitar a lenhina dissolvida. Subsequentemente, a lenhina precipitada foi recuperada por centrifugação a 4000 rpm durante 1 h, lavou-se com água ácida (pH 2), colocou-se a secar na estufa a 40 °C e posteriormente a vácuo com P₂O₅ a 40 °C.

3.4.5. Extrações alcalinas com hidróxido de sódio

A extração da lenhina por processos alcalinos foi efetuada com recurso a vários métodos descritos e adaptados e com diferentes concentrações de hidróxido de sódio (NaOH).

3.4.5.1. Método 1

Nesta extração alcalina, a lenhina da cerejeira em estudo foi extraída com uma solução de NaOH 0,4 M de acordo com Aadil *et al.* (2014). Utilizou-se uma proporção de 1:15 (m/v), colocou-se em refluxo com banho termostático a 120 °C e com agitação magnética durante 45 min. O líquido foi separado da parte sólida por filtração a vácuo e o filtrado foi concentrado até 50 mL. Mediu-se o pH do concentrado e reduziu-se até 5,5 com uma solução de HCl 5 M. Efetuaram-se 3 extrações líquido-líquido, numa ampola de decantação, onde se observou uma separação nítida de duas fases, uma turva e uma límpida. A fração turva foi reprecipitada através de uma diminuição do pH até 1,30 e do arrefecimento a 4 °C durante a noite. Uma vez que a precipitação não ocorreu, a amostra foi novamente concentrada até 50 mL, vertida em água destilada numa proporção de 1:10 e colocada a 4 °C durante 3 dias. O precipitado formado foi filtrado num funil de porosidade 2, com um papel de filtro acoplado de forma a conseguir recuperar-se toda a lenhina presente no precipitado. O sólido obtido foi seco na estufa a 40 °C, tendo sido efetuados ciclos de 30 min, até uma massa constante.

3.4.5.2. Método 2

Este método de extração da lenhina foi inicialmente igual ao descrito anteriormente, mas, quando se efetuou a extração líquido-líquido foi recolhida a fração mais límpida apresentada na ampola de decantação. Reduziu-se o pH desta fração até 1,73, verteu-se em água destilada numa proporção 1:10 e colocou-se a 4 °C para promover a formação de precipitado.

3.4.5.3. Método 3

Nesta extração utilizaram-se as mesmas condições referidas no método 1 e procedeu-se de igual forma até à redução do pH até 5,5. Após este passo, a fração líquida foi vertida em água destilada na proporção 1:10 e submeteu-se a uma nova redução de pH com HCl 5 M até pH 1,91. A amostra foi colocada a 4 °C para promover a precipitação da lenhina extraída da amostra. O sólido obtido foi seco na estufa a 40 °C em ciclos de 30 min até se obter massa constante.

3.4.5.4. Método 4

O método posteriormente descrito foi adaptado de Gong *et al.* (2016) e consistiu em duas etapas: uma pré-extração da madeira de cerejeira e uma segunda etapa com extração de lenhina com diferentes concentrações de solução aquosa de NaOH (0,4 M, 0,7 M, 1,25 M e 2 M), sendo estas testadas separadamente.

A pré-extração consiste num aquecimento em refluxo da mistura madeira / água destilada (1:10) num banho de PEG termostastizado a 100°C, durante 1 h e 20 min, com agitação magnética. O sólido foi filtrado num funil de porosidade 2, lavado 2 vezes com 100 mL de água destilada a 95 °C e colocou-se a secar durante a noite na estufa a 60 °C.

Na segunda etapa, realizou-se a extração da lenhina presente na madeira pré extraída. Pesou-se cerca de 10 g de madeira, adicionou-se 200 mL da solução de NaOH da concentração requerida para cada extração e colocou-se em aquecimento a 120 °C durante 1 h. Findo o tempo de extração, separou-se o sólido por filtração a vácuo e efetuaram-se lavagens da amostra com 150 mL de solução de NaOH e 300 mL de água destilada, num funil de porosidade 2. O filtrado e as águas (líquidos) de lavagem recolhidos foram conjugados e concentrados com recurso ao evaporador rotativo a pressão 70 mbar e banho termostastizado a 40 °C. O concentrado foi vertido em água destilada na proporção de 1:10 e realizou-se o ajuste de pH com H₂SO₄ concentrado até se obter um valor de pH compreendido entre 1,5 - 2. A amostra foi colocada a 4 °C durante a noite para promover a formação do precipitado de lenhina, tendo sido posteriormente centrifugada durante 30 min a 4000 rpm para recuperar a lenhina obtida. O produto final foi lavado com 2 vezes 100 mL de água destilada ácida (pH 2 ajustado com H₂SO₄) num funil de porosidade 4. Após a lavagem, colocou-se na estufa a 40 °C até se obter massa constante e posteriormente secou-se a vácuo com P₂O₅ a 40 °C.

3.5. Caracterização estrutural

3.5.1. Espectrofotometria de Infravermelho com transformada de Fourier

As amostras em estudo foram analisadas através de espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Uma porção de cada amostra sólida foi prensada de forma a obter uma pastilha e colocou-se no espectrofotómetro Thermo Scientific Nicolet iS10 Fourier Spectrometer. A análise espectral foi realizada com resolução de 4 cm⁻¹, numa região compreendida entre 600-4000 cm⁻¹, tendo sido feitos 128 scans.

3.5.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

3.5.2.1. Acetilação da lenhina

As amostras de lenhina selecionadas para a análise espectroscópica foram submetidas a um processo de acetilação. De acordo com o descrito por Lin e Dence (1992), a 100 mg de lenhina, adicionou-se 1 mL de anidrido acético, 1 mL de piridina e deixou-se reagir à temperatura ambiente, durante a noite, com agitação magnética. Findo esse tempo, realizou-se uma cromatografia de camada fina (CCF) para se perceber se a reação já estaria terminada. Como eluente foi usada a mistura diclorometano/acetato de etilo (9:1) (v/v) e usou-se como revelador o iodo (Brunow e Lundquist 1987). Uma vez terminada a reação de acetilação, adicionaram-se 25 mL de etanol, deixou-se reagir à temperatura ambiente, com agitação magnética constante, durante 30 min, realizou-se uma CCF e evaporaram-se os solventes num evaporador rotativo a 145 mbar e banho a 40 °C. Após cada 30 min foi realizada uma CCF para verificar a existência de ácido acético formado pela reação e, uma vez que este já não aparecesse na mancha respetiva à lenhina acetilada, terminaram as lavagens ao produto obtido e procedeu-se à secagem com P₂O₅ para remover algum vestígio de piridina e ácido acético ainda presente na amostra.

Estes tratamentos das amostras de lenhina, não tiveram continuidade pois o equipamento de RMN avariou. Constituirá um dos nossos tópicos para trabalho futuro.

3.5.2.2. Aquisição de espectros

A espectroscopia de RMN de ¹H e ¹³C foi realizada na amostra resultante da extração com ácido acético descrita em 3.4.4.1..

Os espectros de RMN foram adquiridos no equipamento Brücker Avance III 600 sendo processados no software Topspin 3.1. Foi utilizado como solvente o dimetilsulfóxido hexadeuterado (DMSO-*d*₆), sendo ainda utilizados como padrão interno (DMSO-*d*₆, δ = 2,50 ppm e 39,52 ppm em RMN de ¹H e ¹³C, respetivamente).

Na preparação do tubo de RMN adicionou-se 60 mg da amostra da lenhina não modificada e 1,75 mg de acetilacetato de crómio (III) a 0,5 mL de DMSO-*d*₆.

3.6. Determinação da atividade antioxidante - método do DPPH

Na determinação da atividade antioxidante presente na cerejeira em estudo foi necessária a construção de uma curva de calibração. Para tal, preparou-se uma solução-mãe onde se dissolveram 21,4 mg de DPPH em 250 mL de metanol, obtendo-se uma concentração de 85,6 mg/L (Luís *et al.* 2011). A partir da solução inicial fizeram-se diluições sucessivas com diferentes concentrações de DPPH (4,28; 8,56; 17,12; 25,68; 34,24; 42,8; 51,36; 59,92; 68,48; 77,04 mg/L).

As absorvâncias destas soluções foram lidas a 517 nm, em triplicado, sendo o metanol usado para o ensaio em branco. Com os resultados obtidos, construiu-se a curva de calibração (gráfico 3.1) onde no eixo das abcissas se encontram as concentrações de DPPH e no eixo das ordenadas os valores das absorvâncias a 517 nm (Luís *et al.* 2011).

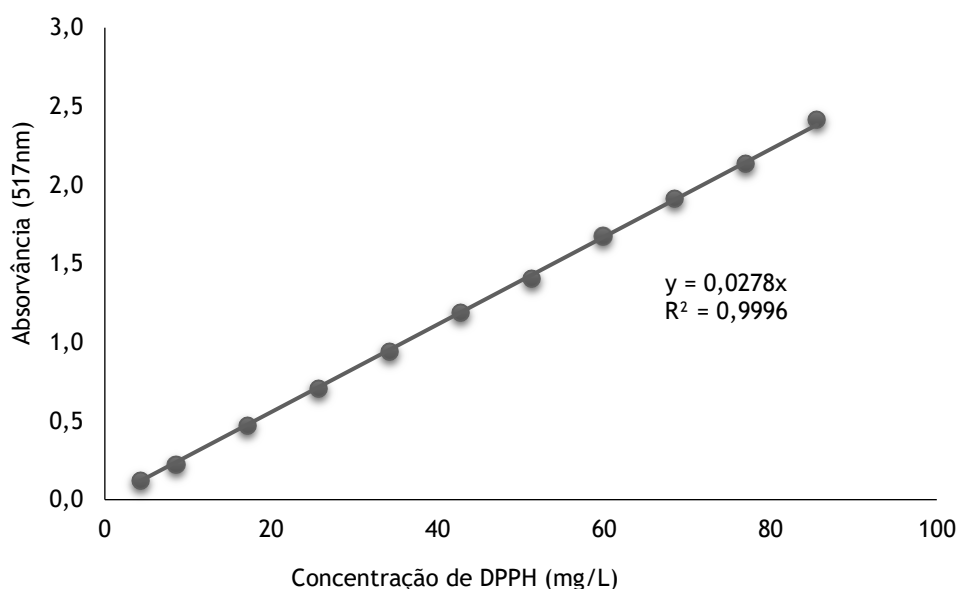


Gráfico 3.1: Curva de calibração do DPPH.

Para averiguar a sensibilidade do método e para comparar os valores obtidos relativos à atividade antioxidante das amostras em estudo, usou-se como controlo positivo o trolox, em metanol, para concentrações de: 100, 75, 50, 25, 10 e 5 mg/ml, procedendo-se de forma idêntica ao referido anteriormente (Luís *et al.* 2011; Scherer e Godoy 2009).

Na determinação da atividade antioxidante das lenhinas extraídas da cerejeira em estudo foram testados 3 métodos analíticos onde as condições foram variadas, tal como se descreve a seguir, tendo sido realizados todos os ensaios em triplicado.

3.6.1. Método 1

Neste método, de acordo com An *et al.* (2017), foi preparada uma solução-mãe com uma concentração de 1 mg/mL e fizeram-se 4 diluições a partir da inicial com concentrações de 0,8; 0,6; 0,4 e 0,2 mg/mL. Retiraram-se alíquotas de 6 mL de cada solução para um tubo de ensaio, onde se adicionaram 6 mL de solução de 0,15 mmol/L de DPPH em metanol. Deixou-se reagir no escuro, à temperatura ambiente, durante 30 min e foram lidas as absorvâncias a 517 nm, tendo sido realizado o ensaio em triplicado. O cálculo da atividade de eliminação de radicais livres (RSA (%)) foi feito de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{RSA (\%)} = \left(1 - \frac{A_s - A_b}{A_c}\right) \times 100 \quad (9)$$

Onde A_s = absorvância da mistura com a amostra; A_c = absorvância da mistura controle; A_b = absorvância da amostra com metanol.

3.6.2. Método 2

De acordo com o descrito por Aadil *et al.* (2014) foi preparada uma solução-mãe onde se dissolveram 24 mg de DPPH em 100 mL de metanol, retiraram-se desta solução 10 mL e adicionou-se 45 mL de metanol de modo a obter uma absorvância de $1,1 \pm 0,05$ a 517 nm.

A um volume de 2850 μL , adicionou-se 150 μL de uma solução de 1 mg/mL de lenhina. Usou-se o vórtex para homogeneizar a mistura, colocou-se a reagir no escuro, à temperatura ambiente, durante 20 min e mediram-se as absorvâncias a 517 nm. A atividade sequestradora (AS) dos compostos em estudo foi calculada através da fórmula:

$$\text{AS} = \left(\frac{A_0 - A_i}{A_0}\right) \times 100 \quad (10)$$

Onde A_0 = absorvância do controle; A_i = absorvância da amostra.

3.6.3. Método 3

Segundo Scherer e Godoy (2009), para a determinação das propriedades antioxidantes dos compostos em estudo, foram preparadas três soluções de DPPH em metanol com as concentrações de 0,2000; 0,1242 e 0,0800 mM.

Prepararam-se soluções dos compostos em estudo com concentrações de 25, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g/mL}$, a partir de uma solução-mãe de 250 $\mu\text{g/mL}$.

Para cada concentração das soluções preparadas foi adicionado 0,1 mL destas soluções e 3,9 mL de solução de DPPH, deixou-se reagir no escuro durante 90 minutos, à temperatura ambiente. Após o tempo de reação foram lidas as absorvâncias a 517 nm (Luís *et al.* 2011; Scherer e Godoy 2009).

Para o ensaio em branco usou-se o metanol e como controlo compreendia 0,1 mL de metanol e 3,9 mL de DPPH para cada solução de DPPH com concentração diferente.

Para a curva de calibração usou-se o padrão do trolox em metanol a concentrações de: 250, 200, 150, 100, 50 e 25 µg/mL, procedeu-se de forma idêntica ao referido anteriormente (Luís *et al.* 2011; Scherer e Godoy 2009).

Seguidamente, calculou-se a percentagem de inibição (%I), recorrendo-se à seguinte fórmula:

$$\%I = \frac{Abs_0 - Abs_1}{Abs_0} \times 100 \quad (11)$$

Onde Abs_0 corresponde à absorvância do controlo e Abs_1 à absorvância da amostra, após 90 minutos.

Para o cálculo da concentração de amostra necessária para ocorrer 50% de inibição (IC_{50}) representaram-se graficamente os valores da percentagem de inibição (%I) versus a concentração da amostra na célula do espectrofotómetro.

A atividade antioxidante foi determinada de acordo com o índice de atividade antioxidante (AAI) usando a seguinte fórmula:

$$AAI = \frac{[DPPH \text{ no controlo aos 90 minutos}]}{IC_{50}} \quad (12)$$

Onde a concentração de DPPH no controlo aos 90 minutos vem expressa em mg/mL.

Com base no valor obtido é possível classificar os extratos, quanto à sua atividade antioxidante, a partir de (Luís *et al.* 2011; Scherer e Godoy 2009):

AAI <0,5 - atividade antioxidante pobre

0,5 <AAI <1,0 - atividade antioxidante moderada

1,0 <AAI <2,0 - atividade antioxidante forte

AAI > 2,0 - atividade antioxidante muito forte.

3.7. Determinação dos fenóis totais

Na determinação da quantidade de fenóis totais para cada amostra construiu-se uma curva de calibração com um padrão fenólico, o ácido gálico. Assim, prepararam-se soluções de ácido gálico, em metanol, com diferentes concentrações (500, 400, 350, 300, 250, 225, 200, 150, 100, 50 e 25 mg/L).

O procedimento foi baseado na metodologia referida por Luís *et al.* (2011). A 50 µL das soluções anteriores, adicionaram-se 450 µL de água destilada e 2,5 ml de reagente de Folin-Ciocalteu 0,2 N, deixando-se reagir à temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente adicionaram-se 2 ml de uma solução aquosa de carbonato de sódio, com concentração de 75 g/L, e deixou-se reagir num banho de água termostastizado a 30 °C, durante uma hora e meia, com agitação constante. Para o ensaio em branco procedeu-se da mesma forma substituindo apenas os 50 µL iniciais por 50 µL de metanol

Após o tempo de reação foram lidas as absorvâncias a 765 nm. Os ensaios foram feitos em triplicado.

Este ensaio permitiu construir a curva de calibração que se apresenta no gráfico 3.2.

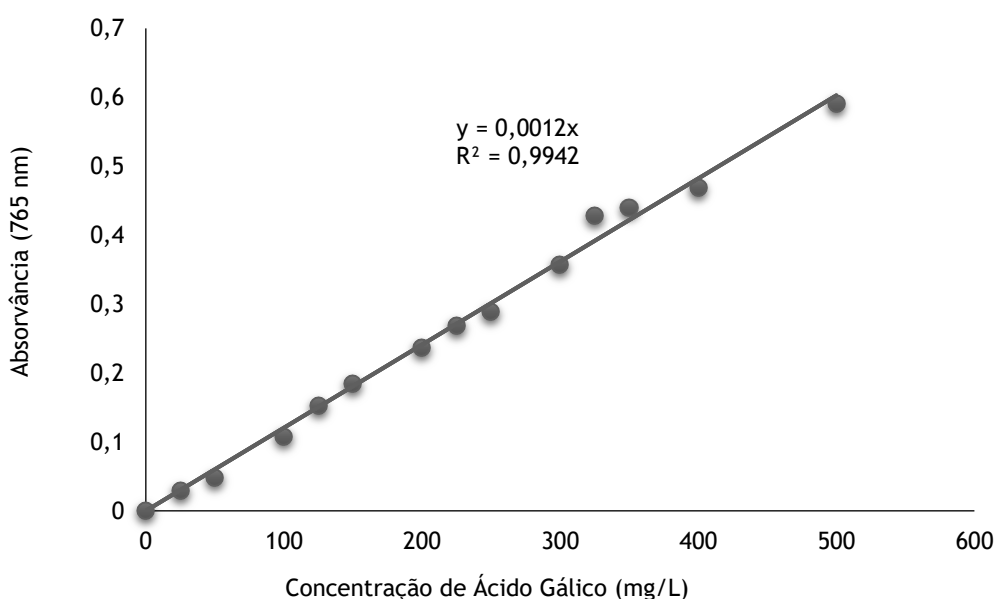


Gráfico 3.2: Curva de calibração utilizada para a determinação dos fenóis totais.

Na determinação dos fenóis totais das amostras em estudo, procedeu-se da forma anteriormente descrita, substituindo os 50 µL iniciais por 50 µL de cada uma das 4 amostras, tendo sido realizadas 6 leituras de cada amostra.

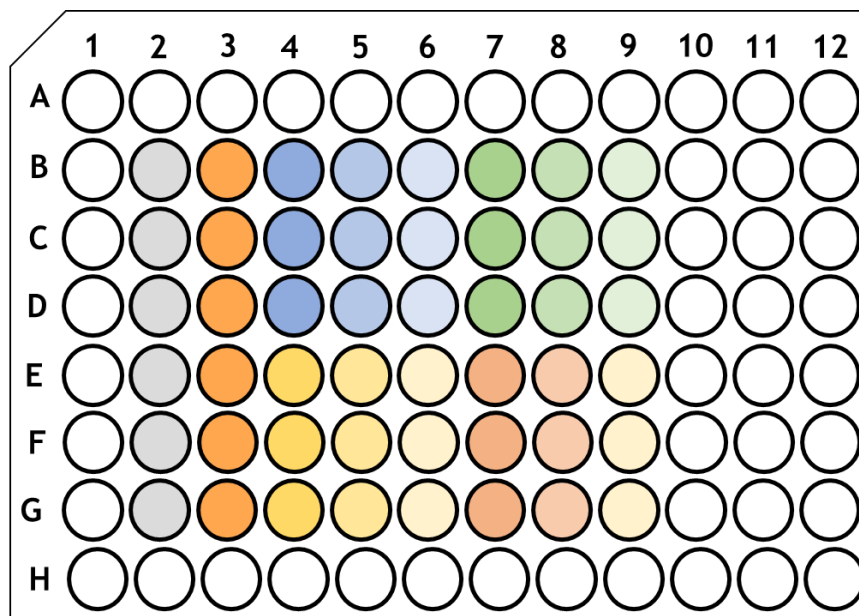
A quantidade de fenóis totais presentes nas amostras foi calculada a partir equação da curva de calibração e é expressa em miligramas de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de matéria seca.

3.8. Avaliação da citotoxicidade

3.8.1. Linha celular

As células não tumorais da derme, NHDF, foram semeadas em frascos de cultura celular pequenos onde lhes foi adicionado meio RPMI-1640, suplementado com 10 % de soro bovino fetal (FBS), HEPES (0,01 M), L-glutamina (0,02 M), piruvato de sódio (0,001 M) e 1 % de antibiótico/ antimicótico. As células foram mantidas a 37 °C em atmosfera húmida contendo 5 % de CO₂. Quando se verificou uma elevada proliferação celular, estando o frasco de cultura celular a apresentar cerca de 80% de confluência, procedeu-se à tripsinização das células, uma vez que a tripsina faz com que as células percam a adesão à parede do frasco. Após a adição da tripsina, colocou-se na estufa a 37 °C com 5 % de CO₂ durante 5 minutos. Findo este tempo, verificou-se que as células já se encontravam em suspensão e, desta forma, foi adicionada uma quantidade de meio igual à quantidade de tripsina de forma a inativar esta, transferiu-se para tubos falcon que foram colocados em centrifugação a 1400 G durante 4 min. O sobrenadante foi descartado, ressuspendeu-se o pellet com meio, pipetou-se metade do conteúdo para cada um dos frascos e adicionou-se a quantidade de meio prevista para o tamanho do frasco novo, visto que cada frasco de cultura celular dá origem a dois frascos. Colocaram-se em incubação na estufa, tendo em conta o procedimento referido anteriormente, havendo troca de meio a cada 2 dias, até que se obteve a quantidade de células necessária para o ensaio de MTT e quantificação da proteína na passagem 24.

Uma vez que as células apresentavam cerca de 80% de confluência, foram tripsinizadas e centrifugadas de forma a sedimentar as células. As células foram ressuspensas com meio, retirou-se uma alíquota de 100 µL à qual foi adicionado 100 µL de *trypan blue* e procedeu-se à contagem celular numa câmara de *Neubauer*. As células foram cultivadas em duas placas de 96 poços, com uma densidade de 2x10⁴ células/mL, com 200 µL de meio e colocaram-se a incubar na estufa a 37 °C com 5 % de CO₂. Após 48 h de cultura, ao verificar-se que as células estavam aderidas à placa, aspirou-se o meio de cultura e adicionaram-se as soluções de lenhina em dimetilsufóxido (DMSO) e meio, esterilizadas por filtração, com concentrações de 500, 250 e 0,5 µg/mL de acordo Barapatre *et al.* (2016) O esquema a seguir apresentado é representativo das placas com os compostos em estudo e respetivas concentrações (figura (3.1)).
















-  Células + 200 μ L de meio
-  Células + 200 μ L de meio + DMSO 1%
-  Células + 200 μ L de meio com extrato ácido acético - 500 μ g/mL
-  Células + 200 μ L de meio com extrato ácido acético - 250 μ g/mL
-  Células + 200 μ L de meio com extrato ácido acético - 0,5 μ g/mL
-  Células + 200 μ L de meio com extrato ácido fórmico - 500 μ g/mL
-  Células + 200 μ L de meio com extrato ácido fórmico - 250 μ g/mL
-  Células + 200 μ L de meio com extrato ácido fórmico - 0,5 μ g/mL
-  Células + 200 μ L de meio com extrato NaOH 0,4 M - 500 μ g/mL
-  Células + 200 μ L de meio com extrato NaOH 0,4 M - 250 μ g/mL
-  Células + 200 μ L de meio com extrato NaOH 0,4 M - 0,5 μ g/mL
-  Células + 200 μ L de meio com extrato NaOH 0,7 M - 500 μ g/mL
-  Células + 200 μ L de meio com extrato NaOH 0,7 M - 250 μ g/mL
-  Células + 200 μ L de meio com extrato NaOH 0,7 M - 0,5 μ g/mL

Figura 3.1: Esquema representativo das placas de 96 poços usadas nos ensaios de citotoxicidade.

3.8.2. Ensaio de viabilidade celular (MTT)

A viabilidade celular das lenhinas extraídas pelos diferentes métodos foi estudada através do método do MTT, de acordo com o procedimento descrito Freshney (2010), efetuando-se apenas algumas alterações. Após 48 h da adição das amostras em estudo, procedeu-se à aspiração destas, adicionou-se 200 µL de solução MTT a cada poço e colocou-se a placa a incubar, ao escuro, durante 4 h, numa estufa a 37 °C. Posteriormente retirou-se o MTT com cuidado para não se aspirarem os cristais de formazano obtidos, sendo estes dissolvidos em 200 µL de DMSO e efetuou-se a leitura da placa a 570 nm (Domingues *et al.* 2014).

O ensaio foi realizado em triplicado e a extensão de células não viáveis foi expressa em percentagem de atividade metabólica em comparação com as células controlo.

3.8.3. Doseamento de proteína

O ensaio do doseamento da proteína foi realizado usando o método do ácido bicinonínico (BCA), com recurso a um kit comercial, BCA Protein assay kit (Thermo Scientific 2011), seguindo o procedimento indicado para o teste em microescala.

A placa utilizada foi preparada da forma referida no item 3.8.1 e, após 96 h de incubação, aspirou-se o meio com os compostos e colocou-se numa arca congeladora, envolta em papel de alumínio durante alguns dias. A placa foi descongelada, adicionou-se 20 µL de tampão fosfato salino (PBS) 1 %, 200 µL BCA e colocou-se a incubar envolto em papel de alumínio, durante 30 min, a 37 °C. Foram lidas as absorvâncias a 562 nm e o cálculo da proteína presente foi realizado de acordo com a curva de calibração representada no gráfico 3.3, cujo padrão foi a proteína BSA.

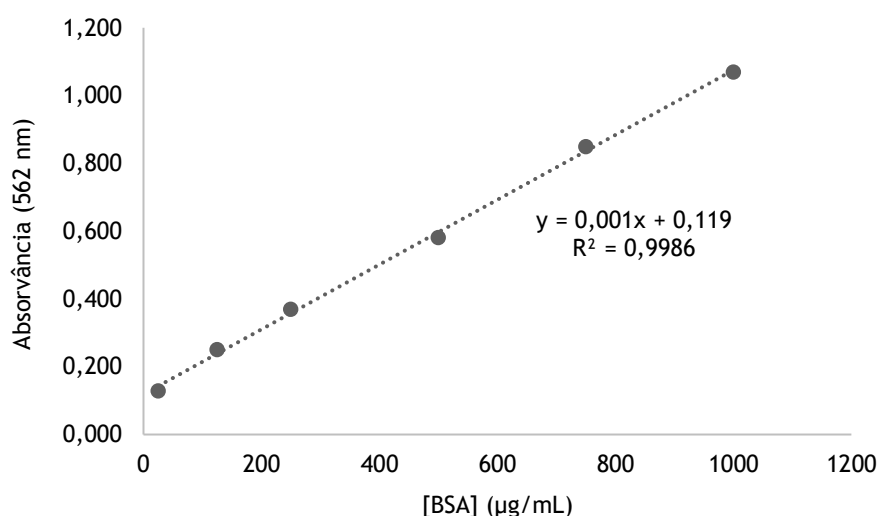


Gráfico 3.3: Curva de calibração para a determinação da proteína total.

3.8.4. Análise estatística

Os resultados obtidos das diferentes concentrações e extrações foram comparados com o controlo, isto é, células em DMSO 1%, e tratados estatisticamente pelo teste não paramétrico ANOVA através do GraphPad Prism 6.

Capítulo 4 - resultados e discussão

4.1. Composição química dos ramos da cerejeira

Na tabela 4.1 apresentam-se os resultados obtidos para a composição química dos ramos do *Prunus avium* var. *Burlat*. Os resultados obtidos nesta determinação para o teor de holocelulose são concordantes com o reportado por Rowell (2012) para árvores botanicamente classificadas como angiospérmicas, sendo este valor de $71,7 \pm 5,7$ %.

A lenhina obtida para os ramos de cerejeira em estudo é ligeiramente superior ao obtido por Bodîrlău Spiridon e Teacă (2007) para a cerejeira *Cerasus avium* L., apresentando esta cerca de 20 % de lenhina. No entanto, Rowell (2012) e Lin e Dence (1992) sugerem que as angiospérmicas apresentam cerca de 23 ± 3 % e 18 ± 3 % de lenhina, respetivamente.

Por outro lado, o teor de cinzas também se encontra superior ao esperado uma vez que, tal como referido por Rowell (2012) para as angiospérmicas, o teor esperado devia corresponder a $0,5 \pm 0,3$ % e, Bodîrlău, Spiridon e Teacă (2007) mostraram que o teor de cinzas da cerejeira *Cerasus avium* L. varia entre 0,3 e 0,4 %. Este facto pode dever-se à localização da árvore uma vez que os compostos inorgânicos são adquiridos do solo e este poderá ser mais rico neste tipo de compostos. Por outro lado, uma vez que estes componentes são essenciais para o crescimento da árvore e tendo em conta que as cerejeiras em estudo eram jovens, poderiam ter necessidade de absorver mais compostos inorgânicos para promover o crescimento quando foi recolhida a amostra.

Tabela 4.1 Composição química da cerejeira.

Componente	Teor (%) Média \pm desvio padrão
Holocelulose	$74,87 \pm 0,52$
Lenhina insolúvel	$28,11 \pm 0,88$
Cinzas	$1,53 \pm 0,05$
Extrativos	$7,67 \pm 0,47$

4.2. Rendimentos de extração da lenhina

4.2.1. Extração com água quente

Testaram-se 6 metodologias de extração em água quente, tendo como referência o estudo de Aadil *et al.* (2014) e García, Spigno e Labidi. (2017) e adaptação destes e de Zhou *et al.* (2012).

Na tabela 4.2 estão representados os rendimentos de extração de cada um dos métodos descritos no capítulo 3, nas secções 3.4.1 e 3.4.2..

Tabela 4.2: Rendimento das extrações da lenhina com água.

Tipo de aquecimento	Método	Rendimento (%)
Banho termostastizado de PEG	1	0,38
	2	0,23
	3	0,45
	4	0,49
	5	0,57
Micro-ondas	—	Não ocorreu precipitação

As extrações com água quente resultaram em rendimentos muito baixos, não sendo estas metodologias vantajosas.

Entre os métodos realizados com aquecimento num banho termostastizado de PEG foram testadas diferentes condições de temperatura, tempo e adição de soluções aquosas ácidas em diferentes etapas da extração. No entanto, nenhuma destas alterações se mostrou relevante, tendo em conta os rendimentos apresentados. Por exemplo, Aadil *et al.* (2014), através da metodologia testada em 1, referem ter conseguido obter lenhina de *Acacia nilotica*, mas, contudo não apresentam os rendimentos obtidos. Por outro lado, García, Spigno e Labidi 2017 referem ter obtido cerca de 7 % de lenhina da macieira através da metodologia 3, tendo em consideração que tanto a *Acacia nilotica* como a macieira são angiospérmicas, tal como a cerejeira.

No entanto, Schuerch (1952) refere que a lenhina é insolúvel em água e Rowell (2012) refere que a água, o tolueno e o etanol removem os extrativos da madeira. Desta forma, pode considerar-se a lenhina insolúvel em água pois os extrativos não englobam a lenhina e os rendimentos apresentados são demasiado baixo para se confirmar a sua solubilidade. O resíduo obtido nestas extrações poderá ser uma pequena parte de extrativos que não foi removido na pré-extração.

A extração em micro-ondas foi efetuada no sentido de se tentar promover uma maior degradação da parede celular, mesmo após a pré-extração, de forma a ser possível extrair a lenhina. Tendo em conta que não se obteve qualquer tipo de precipitado, podemos então dizer que a radiação micro-ondas, quando a amostra esta imersa em água, não resulta para a extração da lenhina.

4.2.2. Extração organosolv

A extração da lenhina pelo processo organosolv (etanol/água) apenas se procedeu de acordo com uma metodologia descrita por Abdul Khalil *et al.* (2011) e Santos *et al.* (2015), mas em triplicado. Os resultados obtidos nestas extrações estão demonstrados na tabela 4.3.

Tabela 4.3: Rendimentos das extrações da lenhina com processo organosolv.

Tipo de aquecimento	Extração	Rendimento (%)
Banho termostastizado de PEG	1	0,32
	2	0,51
	3	0,41

Os resultados obtidos diferem muito dos referidos por Santos *et al.* (2015), apresentando estes rendimentos que variam entre 75 e 90 % para as espécies *E. paniculata*, *E. botryoides*, *E. tererticornis* e *C. citriodora*.

Estes rendimentos não tornam este método reproduzível embora pudesse ser efetuada pelo menos uma otimização tal como a renovação do etanol uma vez que no sistema de refluxo este pode ter evaporado mesmo apesar de o condensador de bolas ser comprido e havendo constante circulação de água. Visto que a lenhina não é solúvel em água, caso o etanol evapore, não vai haver uma extração adequada.

4.2.3. Extrações em meio ácido

Realizaram-se extrações em banho termostastizado de PEG e usando os ácidos acético e fórmico e extração assistida por micro-ondas para duas potências (500 W e 600 W) com ácido fórmico. As amostras de cerejeira usadas nestas extrações foram previamente submetidas a um processo de pré extração, tal como referido por Gong *et al.* (2016) e Zhou *et al.* (2012)

Na tabela 4.4 estão referidos os rendimentos obtidos nas extrações bem como os desvios padrão associados.

Tabela 4.4: Rendimentos obtidos nas extrações ácidas.

Tipo de aquecimento		Solvente de extração	Rendimento (%) Média ± desvio padrão
Banho termostastizado de PEG		Ácido acético	5,33 ± 0,54
		Ácido fórmico	8,91 ± 0,42
Micro-ondas	Potência 500W	Ácido fórmico	12,79 ± 0,69
	Potência 600W		12,63 ± 0,57

De acordo com o referido por Gong *et al.* (2016), na extração com o ácido acético conseguiram obter um rendimento de extração de lenhina do bambu de $4,38 \pm 0,35$ % e o valor obtido para a amostra de cerejeira foi de $5,33 \pm 0,54$ %, indicando apenas gamas muito próximas atendendo a que ambas são angiospérmicas.

Nas extrações com ácido fórmico, Zhou *et al.* (2012) sugeriram a extração da lenhina de *Betula alnoides* em banho de óleo e assistida em micro-ondas, variando o tempo de extração em ambas e variando a potência nas extrações com recurso ao micro-ondas. Desta forma, procedeu-se à extração em banho de óleo onde se obteve um rendimento de $8,91 \pm 0,42$ %, sendo este muito inferior ao referido por Zhou *et al.* (2012) pois estes autores obtiveram, com estas condições, 65,27 %. Na extração em banho de óleo obteve-se um rendimento de $8,91 \pm 0,42$ % apresentando-se este também inferior ao referido por Zhou *et al.* (2012) (65,27 %).

Quando se procedeu à extração em micro-ondas, testaram-se as potências 500 e 600 W uma vez que não foi possível utilizar a potência de 700 W visto que o condensador acoplado ao micro-ondas não tinha a capacidade de refluxo do ácido fórmico. Comparando os rendimentos, na potência inferior obteve-se um rendimento médio semelhante ao rendimento obtido com 600 W. No entanto, Zhou *et al.* (2012) obtiveram rendimentos superiores médios compreendidos entre 72 e 78 %, respetivamente.

A discrepância, em ambos os casos, pode ser devida à espécie em estudo ser diferente, embora tanto a cerejeira como a bétula pertençam à mesma classe (angiospérmicas).

4.2.4. Extrações alcalinas com NaOH

As extrações com NaOH procederam-se com recurso a diferentes metodologias, otimizações e adaptações entre métodos referidos por Aadil *et al.* (2014) e Gong *et al.* (2016). Foram também testadas diferentes concentrações de NaOH, sendo estas refletidas nos rendimentos, tal como demonstrado na tabela 4.5. As amostras usadas nas extrações efetuadas pelo método 4 tinham sido submetidas a uma pré-extração com água.

Tabela 4.5: Rendimentos obtidos nas extrações alcalinas com NaOH nas diferentes metodologias e concentrações.

Tipo de aquecimento	Método	Concentração de NaOH (M)	Rendimento (%) Média ± desvio padrão	
Banho termostastizado de PEG	1	0,4	0,14	
	2	0,4	Não ocorreu precipitação	
	3	0,4	1,48	
	4		0,4	9,52 ± 0,32
			0,7	10,96 ± 0,33
			1,25	10,35
			2	17,49

Através da análise da tabela 4.5 temos a percepção de que os métodos 1, 2 e 3 não extraíram corretamente a lenhina. Estes rendimentos baixos podem ser consequência de não se ter realizada uma pré-extração da madeira de cerejeira mas, no entanto Aadil *et al.* (2014) para *Acacia nilotica* não apresentam valores de referência pelo que, não se consegue definir uma comparação.

Quando se procedeu à adaptação do método ácido referido por Gong *et al.* (2016) para a extração em meio alcalino, obteve-se surpreendentemente resultados favoráveis. Desta forma, foram então testadas várias concentrações de NaOH para se perceber a sua influência ao nível de rendimento obtido. Assim, podemos observar que a extração que obteve melhores resultados foi a de maior concentração de NaOH (2 M) e a que apresentou rendimento mais baixo foi a de menos concentração de NaOH (0,4 M). Estes resultados podem sugerir que quando se aumenta a concentração de NaOH vai ocorrer uma maior degradação da parede celular, promovendo uma maior fragmentação e extração da lenhina.

A tabela 4.6 apresenta uma compilação de todas as extrações, tipos de aquecimento, métodos de extração e respectivos rendimentos com média e desvio padrão, quando aplicável. Através da análise da tabela podemos verificar que as extrações aquosas, organosolv e alcalinas pelos métodos 1, 2 e 3 são aquelas que apresentam rendimentos mais baixos, não sendo métodos reproduzíveis, ao invés das extrações ácidas e das realizadas pelo método 4 nas extrações alcalinas.

Tabela 4.6: Tabela resumo com todos os tipos de extração e respectivos rendimentos.

Tipo de extração	Tipo de aquecimento	Método	Rendimento (%)	
Aquosa	Banho termostastizado de PEG	1	0,38	
		2	0,23	
		3	0,45	
		4	0,49	
		5	0,57	
		Micro-ondas	—	Não ocorreu precipitação
Organosolv	Banho termostastizado de PEG	1	0,32	
		2	0,51	
		3	0,41	
Tipo de extração	Tipo de aquecimento	Solvente de extração	Rendimento (%) Média ± desvio padrão	
Ácida	Banho termostastizado de PEG	Ácido acético	5,33 ± 0,54	
		Ácido fórmico	8,91 ± 0,42	
	Micro-ondas	Potência 500W	Ácido fórmico	12,79 ± 0,69
		Potência 600W	Ácido fórmico	12,63 ± 0,57
Tipo de extração	Tipo de aquecimento	Método	Concentração de NaOH	Rendimento (%) Média ± desvio padrão
Alcalina	Banho termostastizado de PEG	1	0,4	0,14
		2	0,4	Não ocorreu precipitação
		3	0,4	1,48
		4	0,4	9,52 ± 0,32
			0,7	10,96 ± 0,33
			1,25	10,35
			2	17,49

4.3. Análise espectrofotométrica de Infravermelho

De entre os vários métodos descritos no capítulo 3 e tendo em conta os rendimentos de extração referidos anteriormente, recorreu-se à espectrofotometria de infravermelho para caracterizar as amostras e selecionar as mais adequadas de acordo com integridade da molécula da lenhina para os estudos a efetuar posteriormente. Desta forma, realizou-se FTIR das seguintes amostras prensadas:

- Madeira da cerejeira moída;
- Madeira da cerejeira livre de extrativos;
- Lenhina de Klason;
- Lenhina extraída pela água no método 5;
- Lenhina extraída com ácido fórmico em banho de PEG, em micro-ondas com potência de 500 W e em micro-ondas com potência de 600 W;
- Lenhina extraída com ácido acético;
- Lenhina extraída com NaOH 0,4 M através do método 4
- Lenhina extraída com NaOH 0,7 M através do método 4
- Lenhina extraída com NaOH 1,25 M através do método 4
- Lenhina extraída com NaOH 2 M através do método 4

As bandas obtidas foram identificadas através da análise de algumas referências que apresentam valores padrão para a lenhina presente em angiospérmicas e género *Eucalyptus*, tais como Casas *et al.* (2012), Pandey (1999) e Popescu *et al.* (2007), onde se obteve a seguinte tabela com valores padrão para as bandas da lenhina (tabela 4.7).

Tabela 4.7: Referência das bandas típicas da lenhina em FTIR (Casas *et al.* 2012; Pandey 1999; Popescu *et al.* 2007).

Frequência de vibração (cm ⁻¹)	Atribuição
3460 - 3405	Vibração de O-H
2938 - 2920	Vibração simétrica de C-H no anel aromático do grupo metoxilo e grupos metilo e metileno da cadeia lateral
2840 - 2835	Vibração assimétrica de C-H no anel aromático do grupo metoxilo e grupos metilo e metileno da cadeia lateral
1740 - 1705	Vibração C=O em cetonas, carbonilos e grupos éster não conjugados
1610 - 1590	Vibração C=C do anel aromático das unidades S (Siringilo)
1515 - 1505	Vibração C=C do anel aromático das unidades G (Guaiacilo)
1470 - 1455	Deformação assimétrica de C-H em OCH ₃ e CH ₂
1430 - 1422	Vibração do esqueleto aromático combinada com vibração de deformação no plano C-H
1375 - 1365	Vibração de C-H alifático em grupos CH ₃ (exceto OCH ₃), associada à vibração de deformação de OH fenólicos
1330 - 1325	Anéis S e G condensados
1270 - 1266	Vibração C=O em unidades G
1230 - 1221	Vibração de C-C, C-O e C=O
1218	Vibração C-O do anel guaiacilo
1162 - 1125	Vibração assimétrica C-O-C
1140	Vibração de deformação no plano de C-H aromático (típico em unidades G)
1128 - 1110	Vibração de deformação no plano de C-H aromático (típico em unidades S); álcoois secundários e vibração C=O
1086 - 1075	Vibração de deformação C-O em álcoois secundários e éteres alifáticos
1035 - 1030	Vibração de deformação no plano de C-H aromático (unidades G); vibração de deformação de C-O em álcoois primários; vibração de C=O não conjugado
990 - 966	Vibração de deformação fora do plano de -HC=CH- (trans)
925 - 915	C-H fora do plano (aromático)
858 - 853	C-H fora do plano nas posições 2,5 e 6 nas unidades G
835 - 834	C-H fora do plano nas posições 2 e 6 nas unidades S
832 - 817	C-H fora do plano nas posições 2,5 e 6 nas unidades G

4.3.1. Comparação entre a madeira da cerejeira moída e a madeira da cerejeira moída e sem extrativos

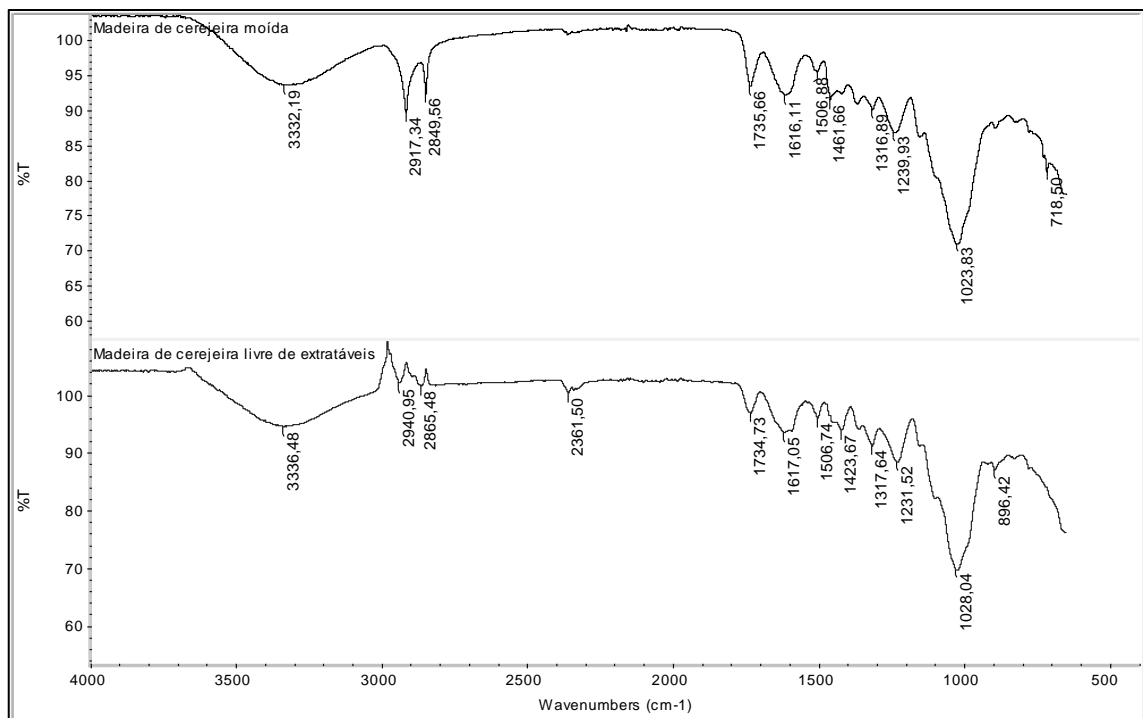


Figura 4.1: Espectros das amostras de cerejeira moída e cerejeira livre de extrativos.

Através do referido por Popescu *et al.* (2007) para a madeira de *Eucalyptus*, na tabela 4.8 encontra-se a análise dos espectros presentes na figura 4.1.

Tabela 4.8: Bandas características da cerejeira moída e da cerejeira livre de extrativos.

Frequência de vibração (cm ⁻¹)		Atribuição
Cerejeira moída	Cerejeira livre de extrativos	
3332,19	3336,48	Vibração de O-H
2917,34	2940,95	Vibração simétrica de C-H no anel aromático do grupo metoxilo e grupos metilo e metileno da cadeia lateral
2849,56	2865,48	Vibração assimétrica de C-H no anel aromático do grupo metoxilo e grupos metilo e metileno da cadeia lateral
1735,66	1734,73	Vibração C=O em cetonas, carbonilos e grupos éster não conjugados
1616,11	1617,05	Vibração C=C do anel aromático das unidades S
1506,88	1506,74	Vibração C=C do anel aromático das unidades G
1461,66	1423,67	Deformação assimétrica de C-H em OCH ₃ e CH ₂
1316,89	1317,64	Vibração CH ₂ da celulose
1239,93	1231,52	Vibração do C-O do anel S da lenhina e dos grupos acetilo e carboxilo do xilano
1023,83	1028,04	Vibração de valência C-O em C(3)- O(3)H
—	896,42	Grupo C1 da celulose e hemicelulose

As bandas obtidas em ambos os espectros são semelhantes, não sendo evidente degradação da cerejeira no processo de pré-extração. Verifica-se a presença de lenhina nas amostras, tanto na cerejeira inicial como na pré-extraída, o que indica que as extrações com rendimentos baixos ou nulos de lenhina deveu-se apenas aos processos de extração e às condições submetidas das amostras e não á não existência de lenhina.

4.3.2. Lenhina de Klason

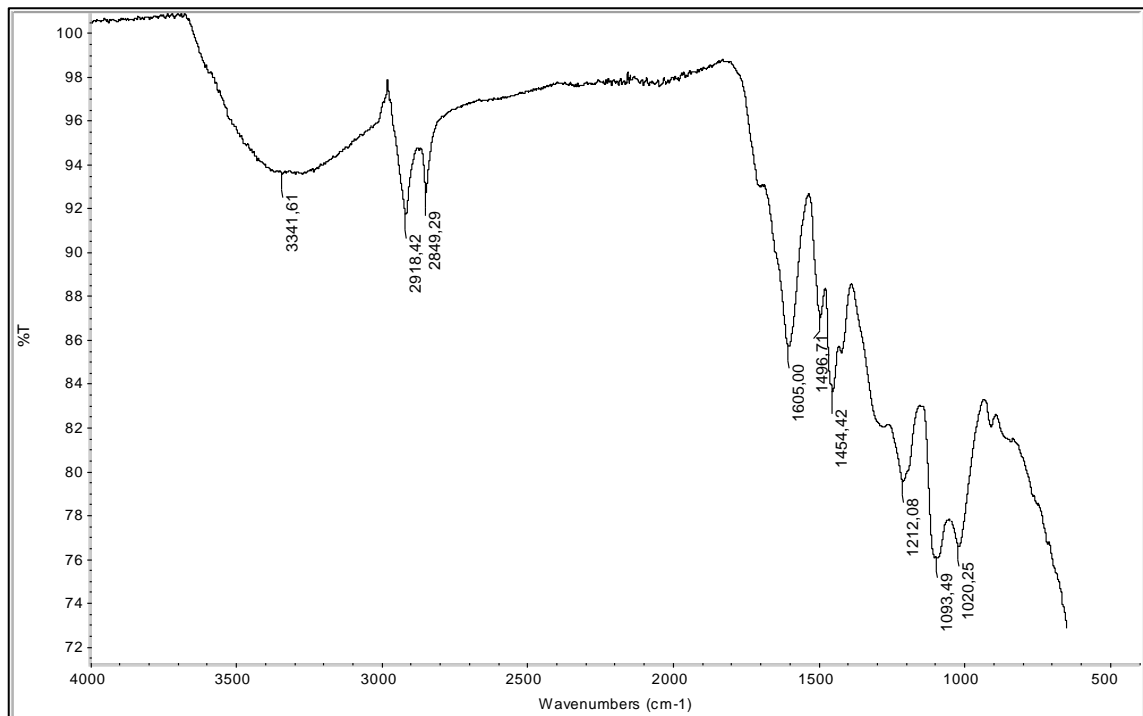


Figura 4.2: Espectro obtido da determinação da lenhina de Klason.

A figura 4.2 representa o espectro da lenhina extraída pelo método da lenhina de Klason. Através da análise deste espectro verificamos a existência de alguns picos característicos da lenhina, facto corroborado por Liu *et al.* (2008) que referem picos da lenhina de Klason do bamboo nas mesmas frequências de vibração apresentadas pela lenhina de Klason obtida neste estudo.

4.3.3. Lenhina extraída pela água no método 5

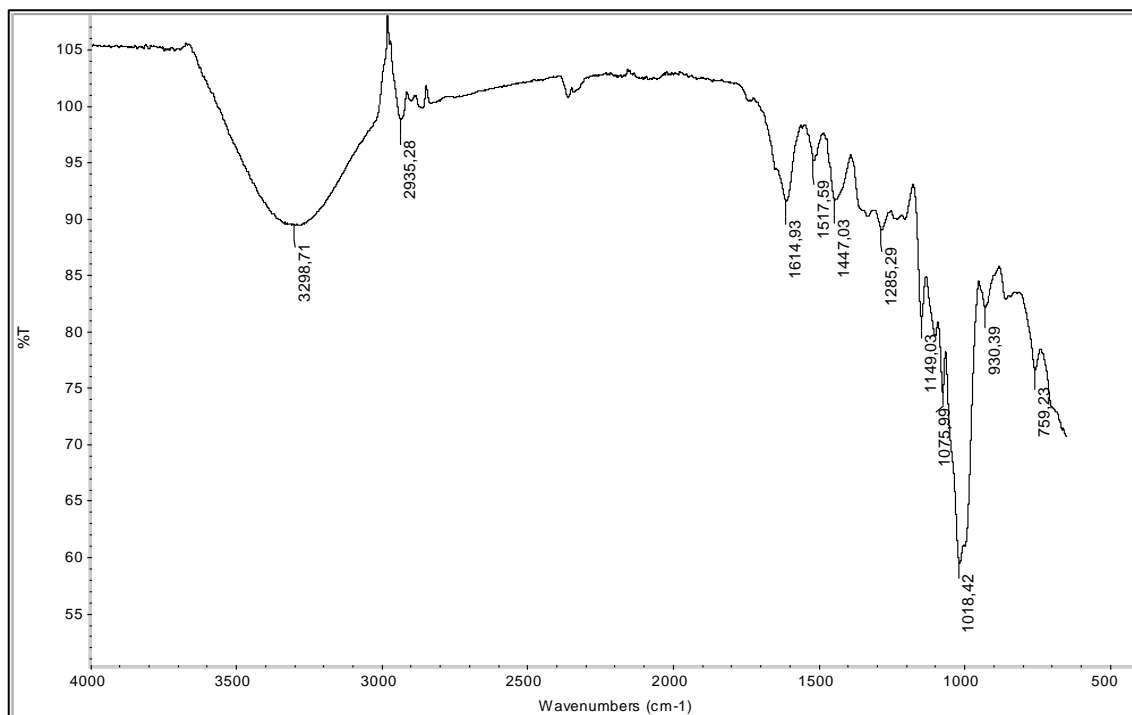


Figura 4.3: Espectro da lenhina extraída com água.

A lenhina obtida pela extração com água do método 5 foi caracterizada e, através da análise do espectro (figura 4.3), pode dizer-se que apresenta algumas bandas características da lenhina, tais como 1614,93 cm^{-1} que corresponde à vibração C=C do anel aromático das unidades Siringilo e a 1517,59 cm^{-1} corresponde a uma vibração de C=C do anel aromático das unidades Guaiacilo. As restantes bandas também apresentam frequências de vibração semelhantes às tabeladas. No entanto, neste espectro também estão presentes duas bandas características da celulose, sendo estas a 1285,29 cm^{-1} que corresponde a uma deformação C-H da celulose e a banda a 1018,42 cm^{-1} é característica da vibração C-O da celulose, tal como descrito por Popescu *et al.* (2007).

Contudo, apesar de esta amostra apresentar bandas de lenhina, também pode dizer-se que está contaminada com celulose e, tendo em conta o tamanho das bandas, podemos dizer que a banda que apresenta maior relevância é a da celulose, podendo ser este o componente maioritário.

4.3.4. Lenhina extraída com ácido fórmico

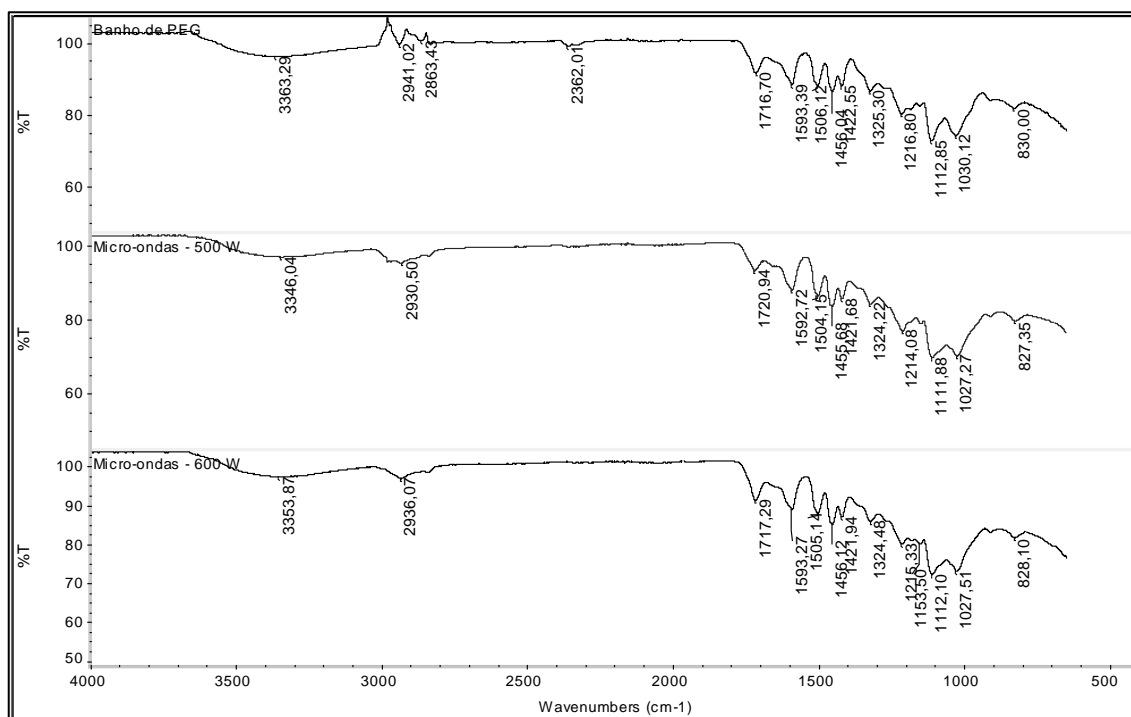


Figura 4.4: Espectros obtidos da lenhina extraída com ácido fórmico em banho de PEG, em micro-ondas com potências de 500 W e 600 W.

A figura 4.4 apresenta os resultados obtidos com as extrações ácidas com ácido fórmico em banho termostastizado de PEG, em micro-ondas com uma potência incidida de 500 W e 600 W.

Através das bandas representadas nos três espectros podemos dizer que ambas as condições testadas extraíram lenhina pois apresentam as suas bandas características em frequências de vibração semelhantes.

No espectro da extração da lenhina em banho de PEG temos a 1593,39 cm⁻¹ a vibração C=C do anel aromático das unidades S; a 1506,12 cm⁻¹ a vibração C=C do anel aromático das unidades G; a 1325,30 cm⁻¹ anéis S e G condensados; a 1216,80 cm⁻¹ a vibração C-O do anel G; a 1112,85 cm⁻¹ vibração de deformação no plano de C-H aromático em unidades S e a 830,00 cm⁻¹ a deformação fora do plano C-H nas posições 2, 5 e 6 dos anéis G.

No espectro da extração com micro-ondas com uma potência de 500 W, a 1592,72 cm⁻¹ a vibração C=C do anel aromático das unidades S; a 1504,15 cm⁻¹ a vibração C=C do anel aromático das unidades G; a 1324,22 cm⁻¹ anéis S e G condensados; a 1214,08 cm⁻¹ a vibração C-O do anel G; a 1111,88 cm⁻¹ a vibração de deformação no plano de C-H aromático em unidades S e a 827,35 cm⁻¹ a deformação fora do plano C-H nas posições 2, 5 e 6 dos anéis G.

Quanto ao espectro da extração com micro-ondas com uma potência de 600 W podemos referir a $1593,27\text{ cm}^{-1}$ a vibração C=C do anel aromático das unidades S; a $1505,14\text{ cm}^{-1}$ a vibração C=C do anel aromático das unidades G; a $1324,48\text{ cm}^{-1}$ a anéis S e G condensados; a $1215,33\text{ cm}^{-1}$ a vibração C-O do anel G; a $1112,10\text{ cm}^{-1}$ a vibração de deformação no plano de C-H aromático em unidades S e a $828,10\text{ cm}^{-1}$ a deformação fora do plano C-H nas posições 2, 5 e 6 dos anéis G.

No entanto, comparando as três extrações diferentes, a integridade da lenhina aparenta ser semelhante, sendo mais vantajoso extraí-la em micro-ondas com potência de 500 W uma vez que apresenta o rendimento mais elevado, apresenta o tempo de extração mais pequeno e ao ser incidida menos potência não está a lenhina tão suscetível à degradação, bem como é mais viável em termos ambientais e económicos pelo menor consumo de energia.

4.3.5. Lenhina extraída com ácido acético

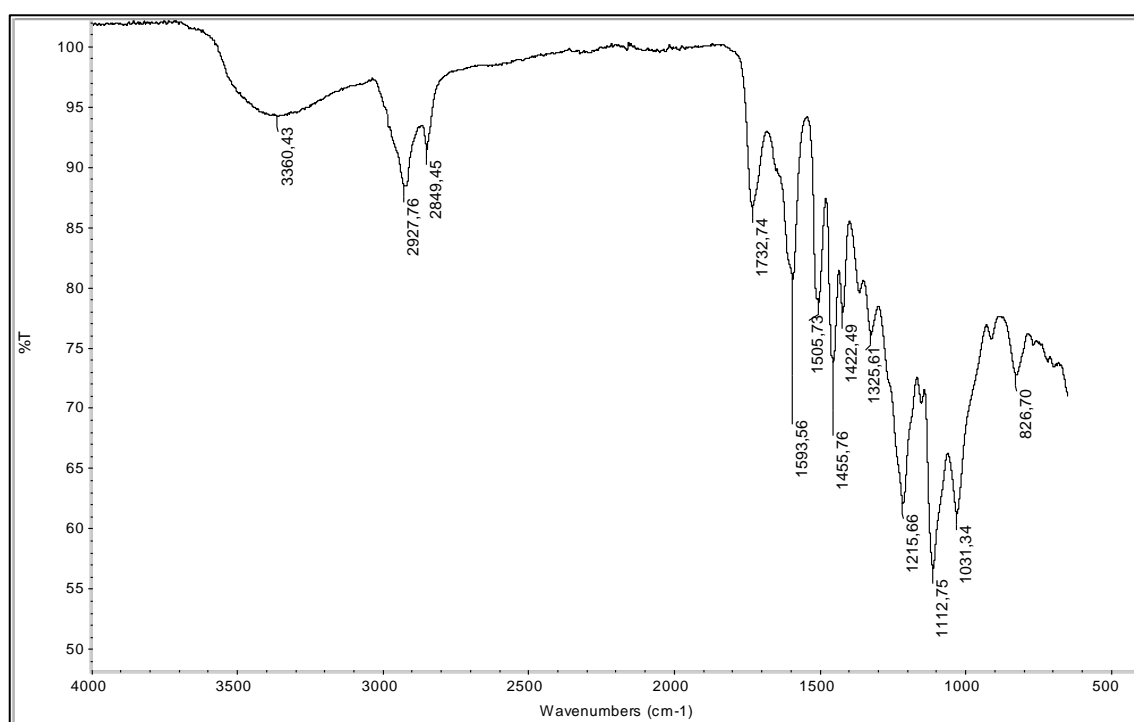


Figura 4.5: Espectro da lenhina extraída com ácido acético.

No caso da extração da lenhina com ácido acético (Figura 4.5) temos a $1593,56\text{ cm}^{-1}$ a vibração C=C do anel aromático das unidades S; a $1505,73\text{ cm}^{-1}$ a vibração C=C do anel aromático das unidades G; a $1325,61\text{ cm}^{-1}$ anéis S e G condensados; a $1215,66\text{ cm}^{-1}$ a vibração C-O do anel G; a $1112,75\text{ cm}^{-1}$ vibração de deformação no plano de C-H aromático em unidades S e a $826,70\text{ cm}^{-1}$ a deformação fora do plano C-H nas posições 2, 5 e 6 dos anéis G.

4.3.6. Lenhina extraída com NaOH 0,4; 0,7; 1,25 e 2 M através do método 4 das extrações em meio básico

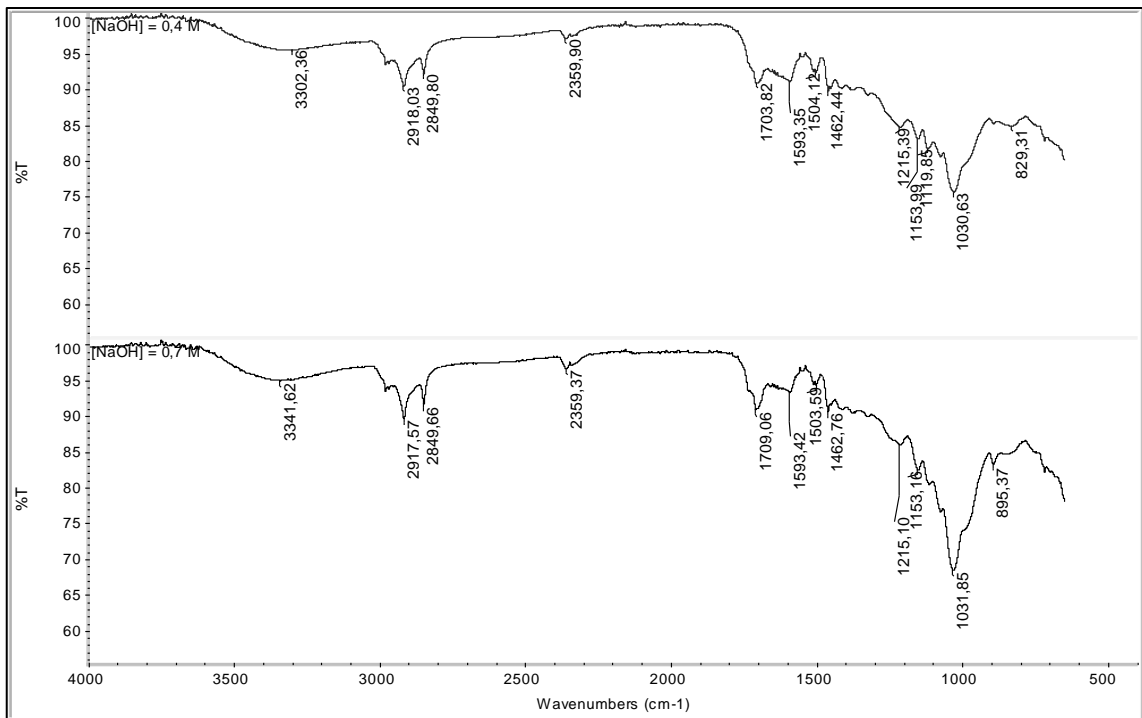


Figura 4.6: Espectros da lenhina extraída com NaOH de concentração 0,4 e 0,7 M.

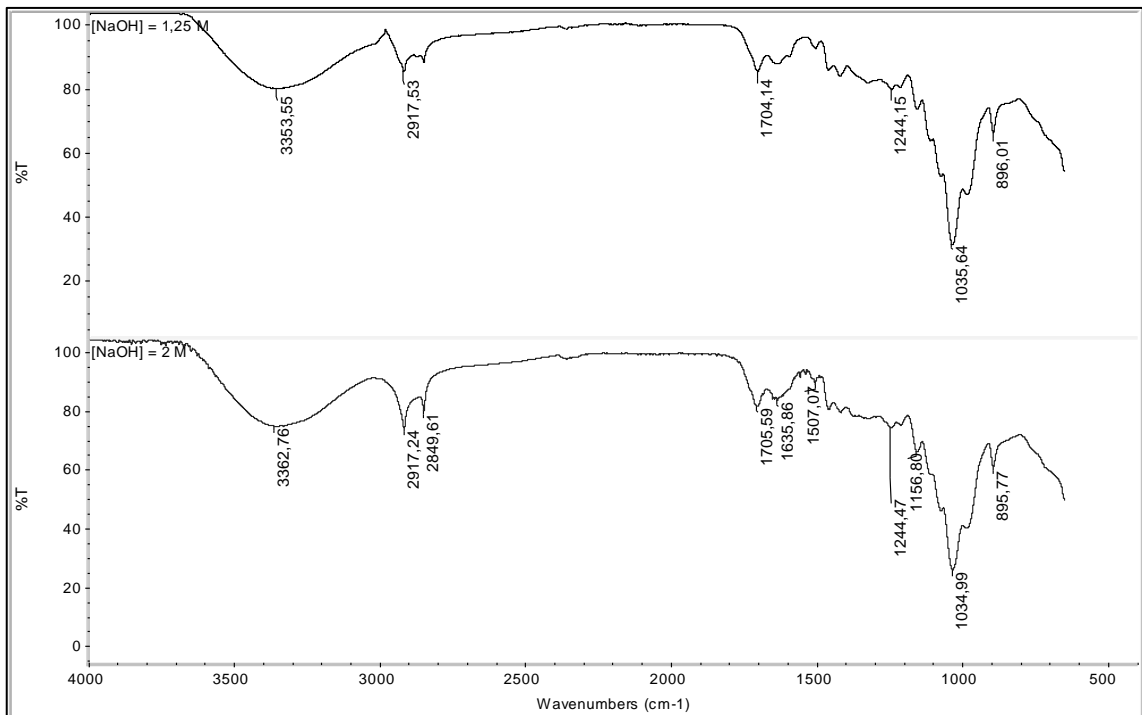


Figura 4.7: Espectros da lenhina extraída com NaOH de concentração 1,25 e 2 M.

Na figura 4.6 estão representados os espectros de FTIR das lenhinas extraídas com NaOH 0,4 M e 0,7 M. Nestes espectros encontram-se alguns dos picos mais característicos da lenhina, mas, no entanto, esta encontra-se mais degradada em ambos os casos do que nos outros tipos de extração.

No espectro da lenhina extraída com NaOH 0,4 M temos presentes nas bandas a $1593,35\text{ cm}^{-1}$ a vibração C=C do anel aromático das unidades S; a $1504,12\text{ cm}^{-1}$ a vibração C=C do anel aromático das unidades G; a $1215,39\text{ cm}^{-1}$ a vibração C-O do anel G; a $1119,85\text{ cm}^{-1}$ vibração de deformação no plano de C-H aromático em unidades S e a $829,31\text{ cm}^{-1}$ a deformação fora do plano C-H nas posições 2, 5 e 6 dos anéis G.

No caso do espectro da lenhina extraída com NaOH 0,7 M temos na banda a $1593,42\text{ cm}^{-1}$ a vibração C=C do anel aromático das unidades S; a $1503,59\text{ cm}^{-1}$ a vibração C=C do anel aromático das unidades G; a $1215,10\text{ cm}^{-1}$ a vibração C-O do anel G. Neste espectro não estão presentes tantas bandas características tal como nos anteriores, mas, tendo em conta que existem bandas referentes aos anéis S e G da lenhina pode dizer-se que esta se encontra presente na amostra, poderá é estar ligeiramente mais degradada e as ligações não serem apresentadas no espectro.

Na figura 4.7 estão os espectros da lenhina relativos às extrações com NaOH com concentrações de 1,25 M e 2 M. Nestes espectros é notável a menor quantidade de bandas, nomeadamente nas que são características da lenhina. Na região característica dos anéis S e G observa-se uma elevada degradação da amostra, pelo que apenas é possível identificar, no caso da lenhina extraída com NaOH 1,25 M, uma banda a $1035,64\text{ cm}^{-1}$ correspondente à vibração de deformação no plano de C-H aromático em unidades G e no caso lenhina extraída com NaOH 2 M a $1507,07\text{ cm}^{-1}$ temos a vibração C=C do anel aromático das unidades G e a $1034,99\text{ cm}^{-1}$ a vibração de deformação no plano de C-H aromático em unidades G.

Desta forma, pode referir-se que a lenhina é extraída na sua forma mais integrada quando em concentrações de NaOH mais baixas uma vez que ocorre uma degradação notável com o aumento da concentração.

4.4. Seleção das amostras de lenhina

Observando os resultados apresentados anteriormente e através da análise da tabela 4.9, procedeu-se à seleção dos melhores métodos de extração para os seguintes a caracterização da amostra. Desta forma, escolheram-se as extrações ácidas em micro-ondas com o solvente ácido fórmico e a extração ácida em banho termostático de PEG com ácido acético uma vez que apresentavam rendimentos de extração moderados e pela análise dos espectros de FTIR a estrutura da lenhina não se encontra degradada. Por outro lado, a extração com ácido

fórmico em micro-ondas com potência 600 W revelou-se semelhante à de 500 W, contudo, uma vez que a potência induzida é superior, poderá estar mais suscetível à degradação. Relativamente às extrações alcalinas, optou-se pelas extrações realizadas com o método 4 com concentrações de NaOH de 0,4 M e 0,7 M que embora apresentem rendimentos mais baixos, através dos espectros de FTIR, verifica-se que apenas nestes métodos se mantem a integridade estrutural da lenhina.

Tabela 4.9: Compilação das amostras caracterizadas por FTIR com respetivos rendimentos de extração.

Tipo de extração	Tipo de aquecimento	Método	Rendimento (%)	Análise de FTIR	
Aquosa	Banho termostastizado de PEG	5	0, 57	Contaminação com celulose	
Tipo de extração	Tipo de aquecimento	Solvente de extração	Rendimento (%) Média ± desvio padrão	Análise de FTIR	
Ácida	Banho termostastizado de PEG	Ácido acético	5,33 ± 0,54	Não degradada	
		Ácido fórmico	8,91 ± 0,42	Não degradada	
	Micro-ondas	Potência 500W	Ácido fórmico	12,79 ± 0,69	Não degradada
		Potência 600W	Ácido fórmico	12,63 ± 0,57	Não degradada
Tipo de extração	Tipo de aquecimento	Método	Concentração de NaOH	Rendimento (%) Média ± desvio padrão	Análise de FTIR
Alcalina	Banho termostastizado de PEG	4	0,4	9,52 ± 0,32	Não degradada
			0,7	10,96 ± 0,33	Não degradada
			1,25	10,35	Degradada
			2	17,49	Degradada

4.5. Análise espectroscópica por RMN ^1H e ^{13}C

De forma a obter-se uma caracterização mais precisa das amostras de lenhina extraídas, recorreu-se à espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C . Desta forma, nas tabelas 4.10 e 4.11 estão representados os desvios químicos relativos aos espectros de ^1H e de ^{13}C da lenhina não acetilada extraída com ácido acético. Os espectros obtidos foram analisados com base em referências, tais como Wen *et al.* (2013), Zeng *et al.* (2013) e Zhou *et al.* (2012) que apresentam estes desvios químicos da lenhina característica de angiospérmicas, extraída de *Triticum sativum* e extraída de *Betula alnoides*, respetivamente.

Tabela 4.10: Desvios químicos de RMN ^1H da lenhina não acetilada extraída com ácido acético.

δ (ppm)	Atribuição
1,24	Contaminação por hidrocarbonetos
2,01	Acetato alifático
2,75	Espirodionas (β -O-4 total)
3,76	Fenil-cumarano (β -O-4 total, $\text{C}_\beta\text{-H}_\beta$)
4,88	α -OH / β -O-4 - ligação interunidades G
5,33	α -ceto / β -O-4 - ligação interunidades G
6,71	$\text{C}_{2,6}$ - $\text{H}_{2,6}$ na unidade S esterificada
7,37	$\text{C}_{2,6}$ - $\text{H}_{2,6}$ na unidade S oxidada ($\text{C}_\alpha=\text{O}$)
7,57	Protões aromáticos nas unidades benzaldeído

Tabela 4.11: Desvios químicos de RMN ¹³C da lenhina não acetilada extraída com ácido acético.

δ (ppm)	Atribuição
196,66	C=O em Ar-CH=CH-CHO
182,37	C-4 da quinona (grupo carbonilo)
174,98	Grupo carboxílico (COOR alifático)
170,55	Ar-OH
169,82	Éster C=O em R-C(=O)OCH ₃
160,49 - 157,95	C-4 no p-cumarato
153,05	Grupo carbonilo da unidade S
152,73 / 152,58	C-3/ C-5 na unidade S eterificada
148,38	C-3 na unidade G eterificada
147,89	C-4 na unidade G eterificada
139,26	C-4 e C-1 na unidade S esterificada
135,31	C-1 na unidade G esterificada
131,18	C-1 não esterificado 5-5 (bifenil)
130,21	C-2 e C-6 no p-cumarato
129,65	C _B em Ar-CH=CH-CHO
128,80/ 128,23	C _α e C _B em Ar-CH=CH-CH ₂ OH
126,90	C-1 no p-cumarato
115,56	C-3 e C-5 no p-cumarato; C-5 da unidade G
105,65	C-2/ C-6 unidade S com α-CO
104,46	C-2/ C-6 unidade S eterificada
102,20/ 99,52/ 96,41	Complexo lenhina-hidrato de carbono
79,10	α, β diaril-eter em B-O-4
60,95	C-γ na unidade G do tipo B-O-4
56,63	Grupo metoxilo
55,66	-OCH ₃ em unidades S e G
29,32	CH ₂ na cadeia lateral alifática
25,62	CH ₂ na cadeia lateral insaturada
14,43/ 14,41	γ- CH ₃ na cadeia lateral n-propil

Ao analisar os resultados obtidos verifica-se que a amostra em estudo corresponde à lenhina uma vez que apresenta desvios químicos relativos aos anéis S e G da lenhina.

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C encontram-se no anexo 2.

A caracterização estrutural por RMN não teve continuidade, pois o equipamento de RMN avariou. Constituirá um dos tópicos para trabalho futuro.

4.6. Determinação da atividade antioxidante - DPPH

4.6.1. Método 1

Através deste método não foi possível determinar a atividade antioxidante uma vez que as absorvâncias dos extratos metanólicos não eram concordantes com o padrão de absorvâncias neste tipo de determinações.

4.6.2. Método 2

A atividade sequestradora de radicais livres foi determinada através do referido por *Aadil et al.* (2014), recorrendo à equação apresentada no capítulo 3, na subsecção 3.6.2. sendo esta a capacidade de eliminar radicais livres de DPPH. Na tabela 4.12 estão apresentados os resultados obtidos por método de extração e por respetiva concentração de lenhina.

Tabela 4.12: Atividade sequestradora do radical DPPH dos extratos metanólicos das lenhinas em estudo.

Espécie	Solvente de extração	Concentração da solução (mg de lenhina/ml de metanol)	Atividade sequestradora (%)
<i>Prunus avium</i> var. <i>Burlat</i>	Ácido acético	0,2	25,92
		0,4	47,36
		0,6	64,36
		0,8	75,25
		1	82,92
	Ácido fórmico	0,2	23,35
		0,4	42,61
		0,6	57,47
		0,8	67,84
		1	76,43
	NaOH 0,4 M	0,2	3,46
		0,4	9,41
		0,6	13,98
		0,8	18,49
		1	21,39
	NaOH 0,7 M	0,2	1,17
		0,4	4,37
		0,6	6,34
		0,8	8,74
		1	11,49

Através da análise dos resultados obtidos, a atividade sequestradora varia entre 1,17 % e 82,92 % sendo que as lenhinas extraídas com ácido apresentam os resultados mais elevados. Dentro de cada uma das lenhinas diferentes, podemos observar um aumento da atividade sequestradora proporcional ao aumento da concentração de lenhina no extrato metanólico.

Aadil *et al.* (2014) referiram como padrão o ácido ascórbico (28,25 %) e o ácido tânico (83,42 %). Desta forma, atendendo aos padrões referidos obtidos com metodologia semelhante, pode considerar-se que as lenhinas extraídas com ácido acético e ácido fórmico se encontram dentro dos valores daqueles dois padrões, apresentando estas valores mais próximos do ácido ascórbico quando em concentrações de 0,2 e 0,4 mg/mL e valores mais próximos do ácido tânico quando nas concentrações de 0,6; 0,8 e 1 mg/mL. Quanto às lenhinas extraídas por processos alcalinos, notamos valores significativamente mais baixos, não chegando estas a atingir a capacidade sequestradora do padrão ácido ascórbico. Apenas lenhina extraída com

NaOH 0,4 M apresenta uma capacidade sequestradora mais próxima do padrão quando em concentrações mais elevadas (1 mg/mL).

4.6.3. Método 3

Os resultados para os ensaios de DPPH através deste método estão referidos como valores de CI_{50} e AAI na tabela 4.13. Os gráficos relativos a cada concentração de DPPH para cada uma das amostras da lenhina extraídas encontram-se no anexo 1.

Tabela 4.13: Propriedades antioxidantes das lenhinas em estudo.

Espécie / padrão	Solvente de extração	CI_{50} (mg/L) Média \pm desvio padrão	AAI Média \pm desvio padrão	Atividade antioxidante
<i>Prunus avium</i> var. <i>Burlat</i>	Ácido acético	19,44 \pm 5,32	2,48 \pm 0,25	Muito forte
	Ácido fórmico	21,23 \pm 6,11	2,29 \pm 0,17	Muito forte
	NaOH 0,4 M	67,74 \pm 21,44	0,72 \pm 0,03	Moderada
	NaOH 0,7 M	92,50 \pm 26,19	0,54 \pm 0,01	Moderada
Trolox	—	8,1 \pm 1,8	6,8 \pm 0,4	Muito forte

Os resultados demonstrados na tabela 4.13 foram obtidos através de cálculos efetuados de acordo com o referido por Scherer e Godoy (2009), estando as equações demonstradas no capítulo 3, subsecção 3.6.3..

De acordo com a escala de atividade antioxidante referida por Scherer e Godoy (2009), a lenhina em estudo apresentou valores de AAI elevados, nomeadamente no extrato de lenhina extraída com ácido acético e com ácido fórmico, apresentando uma atividade antioxidante muito forte. No entanto, os extratos com NaOH, nas duas concentrações diferentes, também apresentaram atividade antioxidante, embora seja apenas moderada.

4.7. Quantificação dos compostos fenólicos

A quantificação dos fenóis totais é importante uma vez que estes estão diretamente relacionados com a capacidade antioxidante (Silva *et al.* 2006). Na tabela 4.14 encontram-se os valores da determinação do conteúdo em fenóis totais relativos a cada tipo de lenhina extraída. O conteúdo de fenóis totais foi determinado a partir da equação da curva de calibração e o resultado é expresso em miligramas por equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de matéria seca (mg EAG/g).

Tabela 4.14: Conteúdo de fenóis totais presentes nas lenhinas de cerejeira.

Espécie	Solvente de extração	Fenóis totais (mg EAG/ g) Média ± desvio padrão
<i>Prunus avium</i> var. <i>burlat</i>	Ácido acético	244,32 ± 3,27
	Ácido fórmico	182,55 ± 4,65
	NaOH 0,4 M	130 ± 3,21
	NaOH 0,7 M	68,18 ± 3,21

Relativamente aos resultados obtidos pode referir-se que a lenhina extraída com ácido acético é aquela que apresenta um maior teor em fenóis totais enquanto que a lenhina extraída com NaOH 0,7 M é a que tem um teor de fenóis totais mais baixo. Este facto corrobora os resultados referidos anteriormente nos dois métodos de determinação da atividade antioxidante das lenhinas. Nos métodos 2 e 3 da determinação da atividade antioxidante, a maior atividade sequestradora e a maior capacidade antioxidante, respetivamente, dizem respeito à lenhina que apresenta o maior teor de fenóis totais, enquanto que a que apresenta essas atividades mais reduzidas é a que tem um conteúdo de fenóis totais mais diminuto. Esta diminuição do conteúdo em fenóis totais e atividade antioxidante e sequestradora pode ser explicada pelo facto de a lenhina estar mais degradada quando é extraída por processos alcalinos, diminuindo assim a integridade dos compostos fenólicos que estão diretamente relacionados com a capacidade antioxidante da amostra.

Tendo em conta os resultados descritos neste capítulo, a tabela 1.15 apresenta um resumo dos principais resultados face às extrações ácidas e básicas selecionadas para obtenção da lenhina. Desta forma, e após a identificação das lenhinas mais promissoras com base na análise dos espectros de FTIR e do rendimento de extração, procedeu-se à realização de estudos de atividade antioxidante e de fenóis totais para essas amostras. Neste contexto, pela tabela 4.15, observa-se que as extrações ácidas prevalecem sobre as extrações básicas, principalmente em termos de AAI e fenóis totais.

Tabela 4.15: Compilação dos resultados obtidos resultantes das extrações selecionadas anteriormente com os respetivos rendimentos, AAI e fenóis totais.

Tipo de extração	Ácida		Básica	
	Ácido acético	Ácido fórmico	NaOH 0,4 M	NaOH 0,7 M
Método	Em banho termostastizado	Em micro-ondas a 500 W	4	4
Rendimento (%) media ± desvio padrão	5,33 ± 0,54	12,79 ± 0,69	9,52 ± 0,32	10,96 ± 0,33
AAI media ± desvio padrão	2,48 ± 0,25	2,29 ± 0,17	0,72 ± 0,03	0,54 ± 0,01
Fenóis totais (mg EAG/ g) media ± desvio padrão	244,32 ± 3,27	182,55 ± 4,65	130 ± 3,21	68,18 ± 3,21

4.8. Avaliação biológica

Para avaliar o efeito na proliferação celular, das lenhinas obtidas nas diferentes extrações, utilizaram-se o método do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e de quantificação da proteína total pelo método do ácido bicinconínico (BCA) após 48 h e 96 h de exposição às mesmas, respetivamente (Domingues *et al.* 2014; Thermo Scientific 2011). Estes são métodos colorimétricos onde, no MTT, este é reduzido pela enzima succinato desidrogenase, em células viáveis, ao seu derivado formazano e, no caso do BCA, ocorre a formação do complexo que compreende duas moléculas de BCA com um ião cuproso (Domingues *et al.* 2014; Smith *et al.* 1985). Estes ensaios quantificam espectralmente a viabilidade celular quando se relaciona o metabolismo celular com a expressão proteica.

A linha celular usada neste estudo foi a NHDF de forma a compreender o efeito da lenhina ao nível celular.

Seguidamente, encontram-se os gráficos de atividade metabólica (MTT), percentagem de proteína presente (BCA) e viabilidade celular (MTT/BCA), com média, desvio padrão e significância.

A lenhina extraída com ácido acético obteve os resultados apresentados nos gráficos da figura 4.8. Através do ensaio MTT observa-se que a lenhina aumenta a atividade metabólica principalmente em concentrações mais baixas, sendo esta diminuída consoante o aumento da concentração da lenhina. Na quantificação total da proteína verifica-se que a expressão proteica permanece semelhante ao controlo em todas as concentrações. Desta forma, ao efetuar-se a relação entre os resultados da atividade metabólica e da quantificação da proteína ocorre um ligeiro decréscimo da viabilidade celular, havendo diferença estatisticamente significativa entre o controlo e a concentração de 0,5 µg/mL e entre as concentrações 0,5 µg/mL e 500 µg/mL com $p < 0,05$.

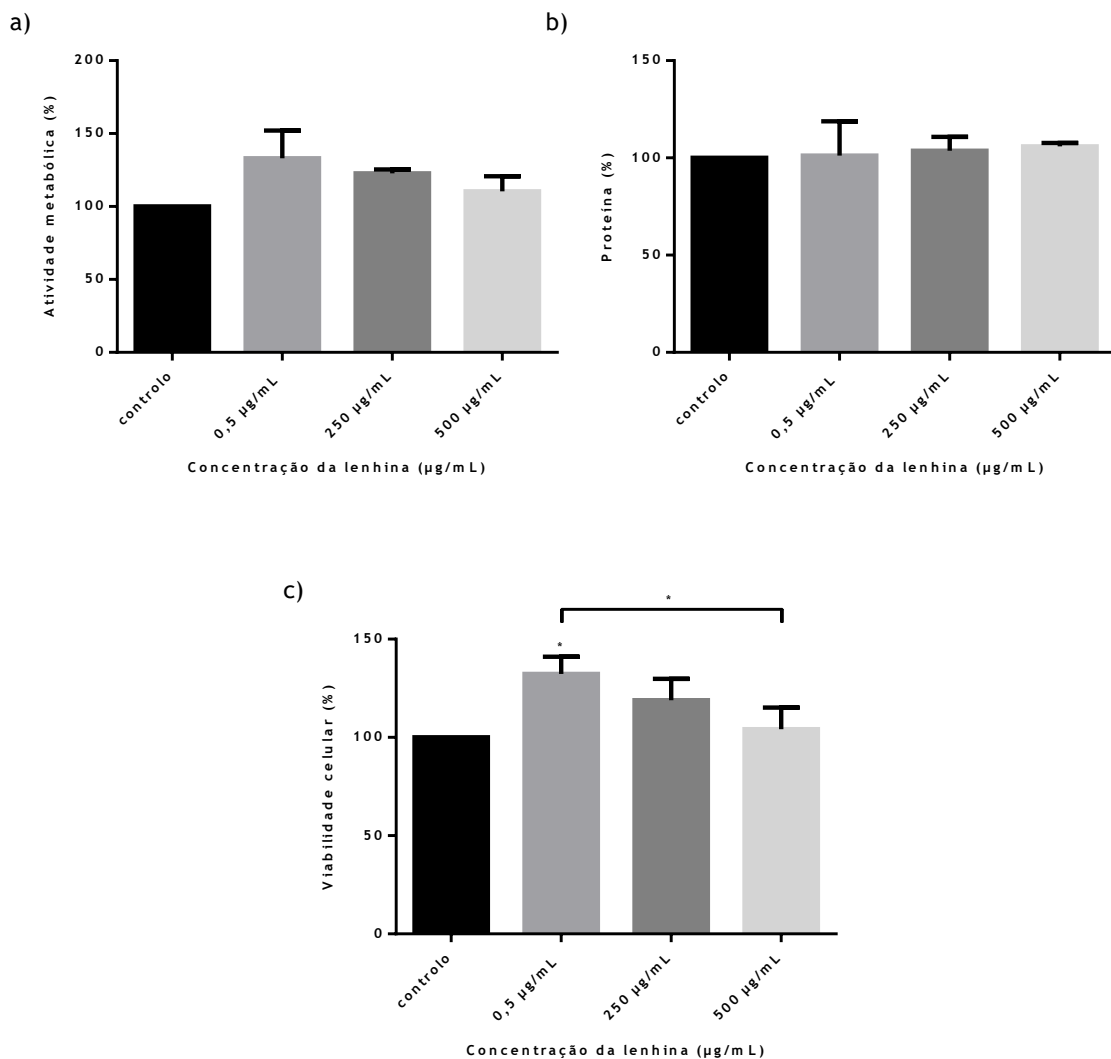


Figura 4.8: Gráficos relativos ao ensaio de MTT (a), quantificação da proteína (b) e à relação entre o ensaio MTT e quantificação da proteína (c) em células NHDF quando expostas à lenhina extraída com ácido acético.

Analisando os resultados obtidos para a lenhina extraída com ácido fórmico (figura 4.9), verifica-se que a atividade metabólica aumenta consideravelmente quando as células estão expostas à concentração de 0,5 µg/mL. No entanto, a quantidade de proteína total mantém-se praticamente inalterada tornando assim a viabilidade celular ligeiramente menor, tal como demonstrado em c). As concentrações de lenhina de 250 e 500 µg/mL não parecem alterar a atividade metabólica das células em estudo, reduzindo apenas ligeiramente a expressão proteica. Desta forma, ao efetuar-se a relação entre os dois estudos verifica-se que a viabilidade celular aumenta ligeiramente em relação com controlo (gráfico c) figura 4.9).

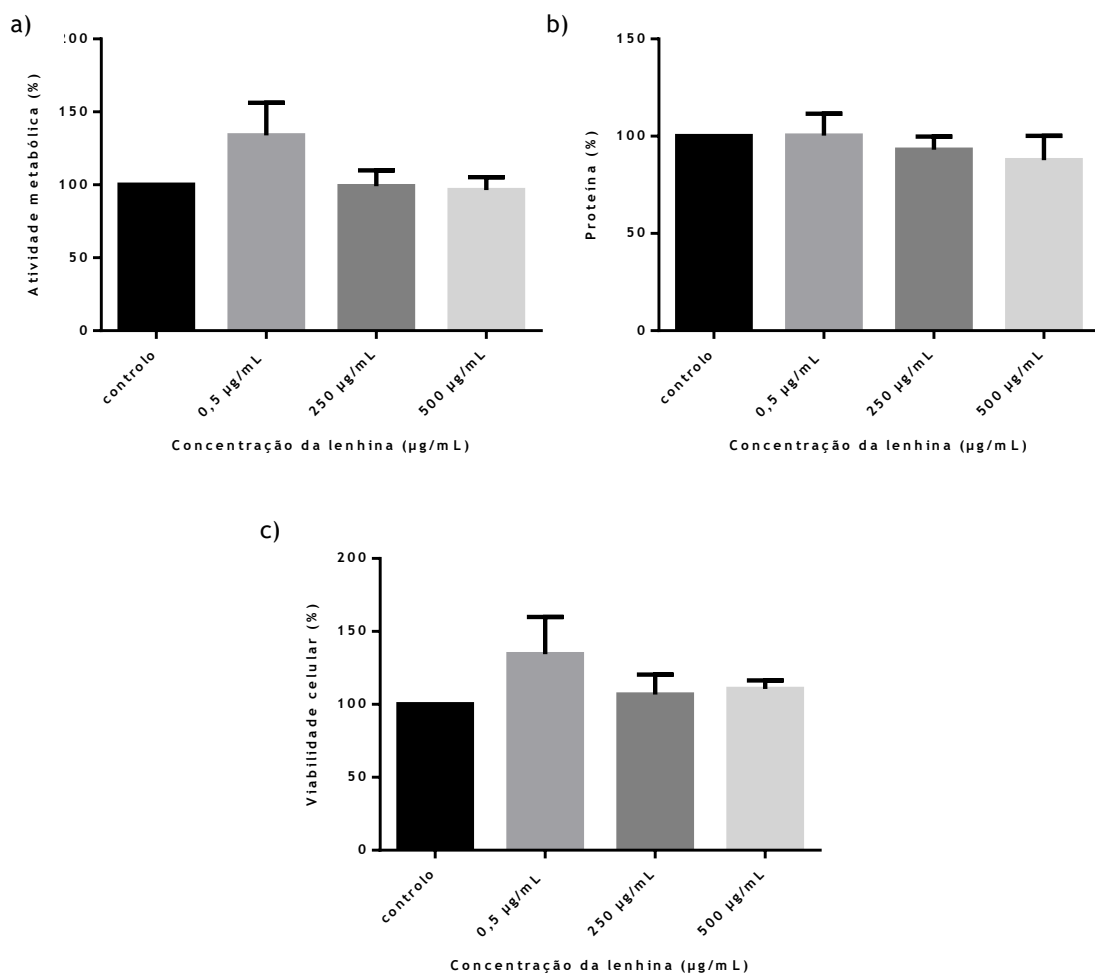


Figura 4.9: Gráficos relativos ao ensaio de MTT (a)), quantificação da proteína (b)) e à relação entre o ensaio MTT e quantificação da proteína (c)) em células NHDF quando expostas à lenhina extraída com ácido fórmico.

Relativamente à lenhina extraída com NaOH 0,4 M a atividade metabólica das células aumenta consideravelmente quando expostas à concentração mais baixa (0,5 µg/mL) mas por outro lado, a quantidade de proteína para esta concentração é menor, tal como demonstrado no gráfico b) da figura 4.10, sendo este valor estatisticamente significativo em relação ao controlo com $p < 0,05$. Para a concentração de 250 µg/mL verifica-se que a atividade metabólica celular aumenta ligeiramente em relação ao controlo e a expressão proteica apresenta um aumento estatisticamente significativo. Ao relacionarem-se estes dois parâmetros nota-se que a viabilidade celular diminui ligeiramente. Relativamente à concentração de 500 µg/mL existe um ligeiro aumento no metabolismo celular e na quantidade de proteína, refletindo-se num aumento da viabilidade celular.

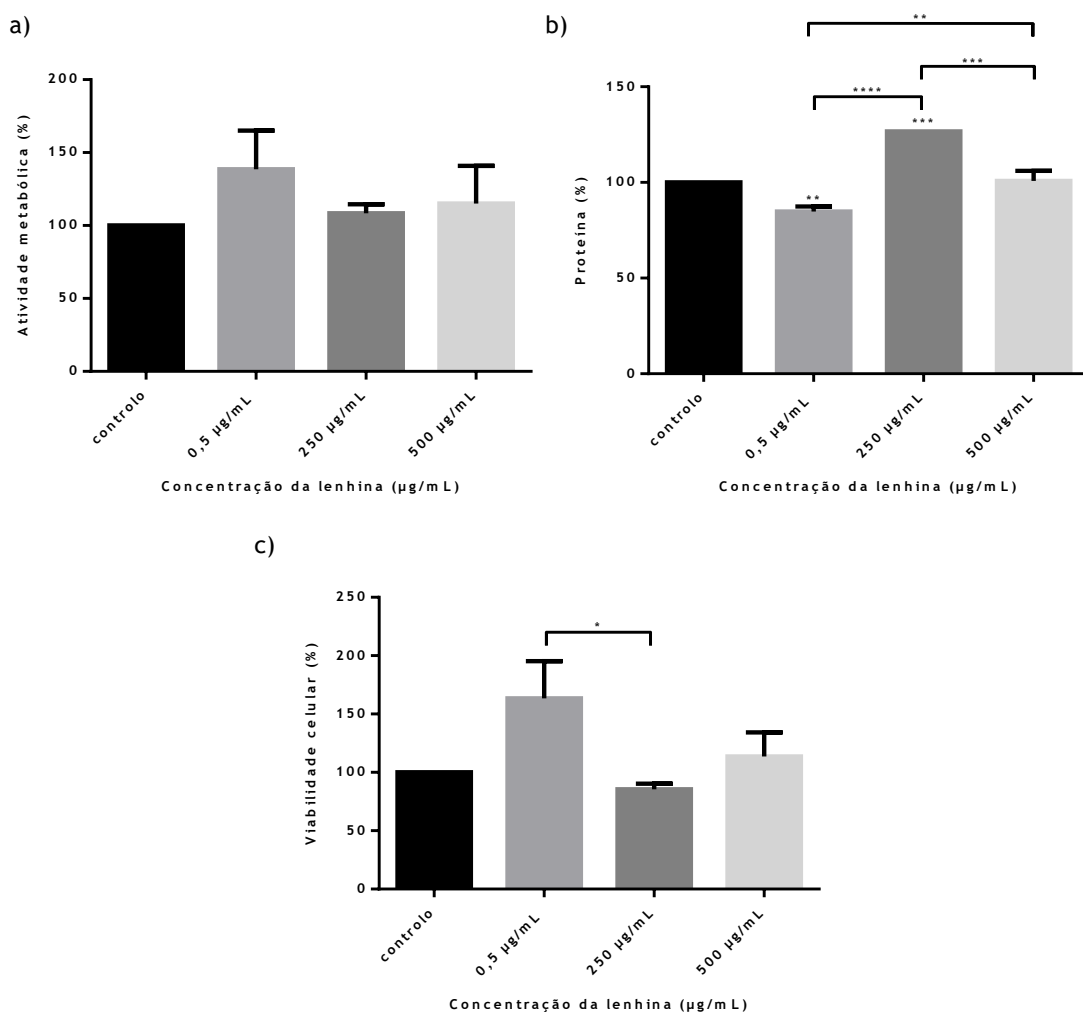


Figura 4.10: Gráficos relativos ao ensaio de MTT (a)), quantificação da proteína (b) e à relação entre o ensaio MTT e quantificação da proteína (c) em células NHDF quando expostas à lenhina extraída com NaOH 0,4 M.

Quanto à lenhina obtida através da extração com NaOH 0,7 M (figura 4.11) observa-se um aumento na atividade metabólica na concentração de 0,5 µg/mL, enquanto que para as concentrações mais elevadas diminuiu gradualmente com o aumento da concentração. Na quantificação da proteína total verifica-se uma diminuição não significativa para as concentrações de 0,5 e 250 µg/mL mas, por outro lado, observa-se um pequeno aumento quando as células são expostas à concentração de 500 µg/mL. Ao efetuar-se a relação entre o ensaio MTT e a quantificação da proteína nota-se que a viabilidade celular na concentração mais baixa aumenta consideravelmente, sendo mantida na concentração intermédia (250 µg/mL) e diminuindo ligeiramente na concentração mais elevada (500 µg/mL).

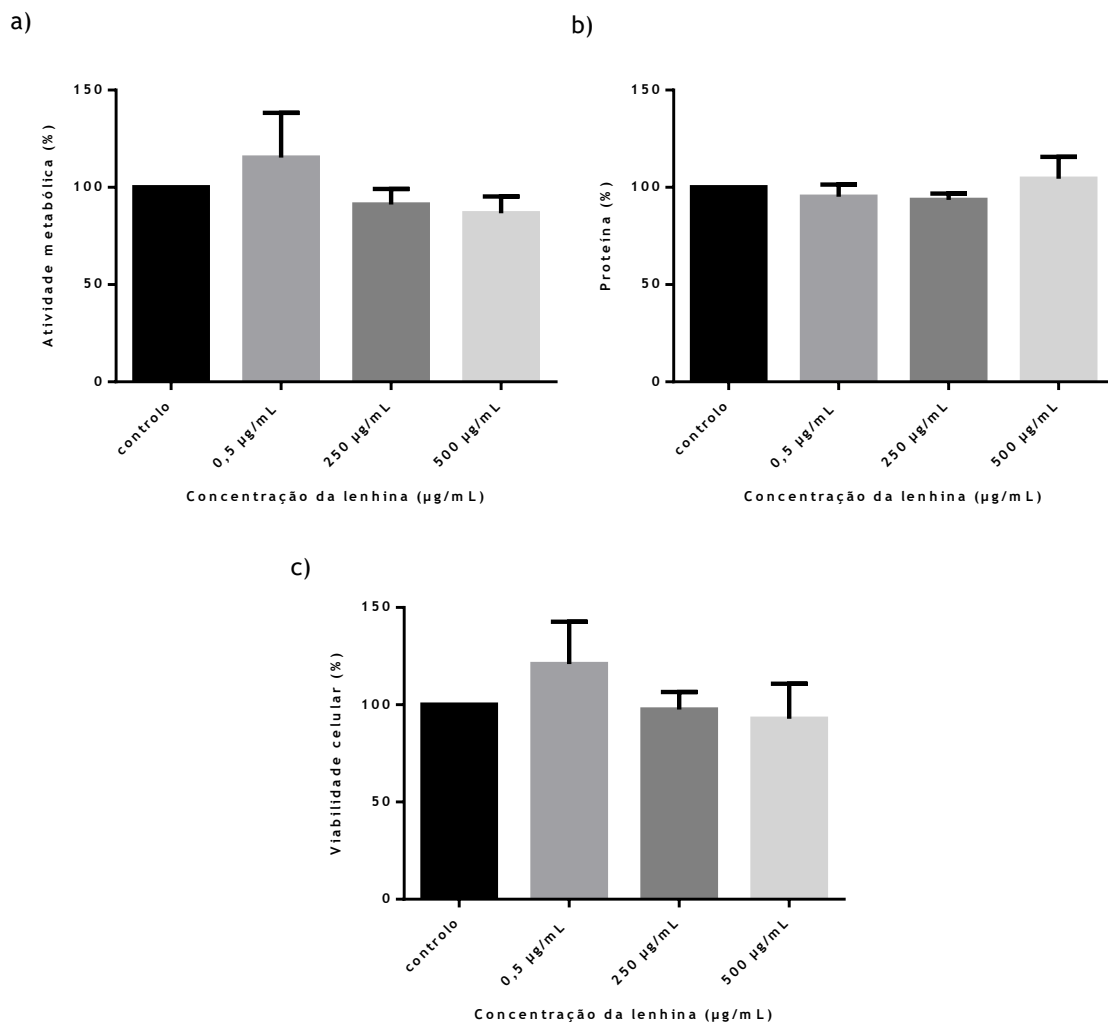


Figura 4.11: Gráficos relativos ao ensaio de MTT (a)), quantificação da proteína (b)) e à relação entre o ensaio MTT e quantificação da proteína (c)) em células NHDF quando expostas à lenhina extraída com NaOH 0,7 M.

Capítulo 4 - Conclusão e Perspetivas futuras

Durante o desenvolvimento deste trabalho de investigação procurou-se extrair e caracterizar os resíduos obtidos das podas destas árvores.

Neste sentido, foi efetuada a determinação da composição química da amostra dos ramos de cerejeira, cujos componentes maioritários apresentam valores dentro dos descritos na literatura, contrariamente aos minoritários que apresentaram valores ligeiramente superiores. Estes resultados podem estar relacionados com a localização geográfica, o tipo de solo, bem como o tipo de material lenhoso em análise, com algumas diferenças em relação ao lenho adulto da árvore.

Posteriormente procedeu-se à extração da lenhina com diferentes metodologias e solventes. Tendo em conta os resultados apresentados, as várias extrações apresentaram rendimentos díspares e a integridade da lenhina também é influenciada pelas condições de extração.

Ensaio de caracterização espectrofotométrica por FTIR das amostras de cerejeira com e sem extrativos, e das lenhinas obtidas ao longo dos processos de extração demonstraram a sua presença. Através da análise dos espectros obtidos verificou-se que nas extrações ácidas e alcalinas estavam presentes as bandas características da lenhina, determinando-se assim os métodos de extração mais promissores e que mantêm a integridade da lenhina. As amostras mais promissoras foram as extrações ácidas com ácido acético e em micro-ondas com ácido fórmico e as extrações alcalinas com NaOH a 0,4 e 0,7 M do método 4.

A análise espectroscópica por RMN de ^1H e ^{13}C foi executada apenas para a lenhina obtida pela extração com ácido acético apresentando esta os sinais característicos do polímero da lenhina, o que corrobora com os resultados obtidos nos espectros de FTIR.

A capacidade sequestradora do radical DPPH das amostras de lenhina e a atividade antioxidante das mesmas foram avaliadas. Em ambos os casos, verificou-se que a lenhina apresenta muito boa capacidade sequestradora e atividade antioxidante muito forte no caso das lenhinas extraídas com processos ácidos, enquanto que as lenhinas extraídas com métodos alcalinos apresentam valores moderados. Em relação à quantificação de compostos fenólicos presentes nas amostras, estes estão de acordo com as atividades antioxidantes demonstradas, isto é, as extrações ácidas apresentaram um teor superior às extrações alcalinas.

Desta forma, as condições de extração influenciam significativamente a lenhina obtida, tanto a nível de rendimento como da sua estrutura química e atividade antioxidante. As condições que mostraram melhores resultados foram as extrações realizadas com solventes ácidos, nomeadamente ácido acético e ácido fórmico em micro-ondas a 500 W e com o solvente NaOH nas concentrações de 0,4 e 0,7 M pelo método 4.

Em estudos de viabilidade celular verifica-se que, de um modo geral, a lenhina promove a proliferação celular quando as células NHDF estão expostas a concentrações mais baixas, mas,

quando expostas a concentrações mais elevadas a viabilidade celular não se altera significativamente em relação ao controlo, não se observando efeito citotóxico.

Em conclusão, o presente trabalho contribui para mostrar o potencial aproveitamento dos resíduos da poda de cerejeiras para obter um produto de valor acrescentado com impacto na bioeconomia.

Como trabalho futuro propõe-se a análise espectroscópica por RMN de ^1H e ^{13}C de todas as lenhinas extraídas e das que já foram sujeitas ao tratamento de acetilação, bem como estudar a viabilidade celular em outras linhas celulares, nomeadamente de alguns tipos de cancro.

Capítulo 5 - Comunicações

➤ **Comunicações em painel no âmbito desta dissertação**

Tenreiro, M., Amaral, M.E., Duarte, A.P., Optimization of Lignin extraction methods from *Prunus avium* cultivar *burlat*: preliminary chemical characterization, abstracts book do IV Encontro Nacional dos Estudante de Química, Universidade da Beira Interior, 2018 (Anexo 3)

Tenreiro, M., Boto, R. E. F., Amaral, M.E., Duarte, A.P., Lignin from branches of *Prunus avium burlat* cultivar: relationship between extraction methods and antioxidant activity, abstracts book do XIII Annual CICS-UBI Symposium, Universidade da Beira Interior, 2018 (Anexo 4)

➤ **Comunicações orais no âmbito desta dissertação**

Tenreiro, M., Boto, R. E., Breitenfeld, L., Amaral, M.E., Duarte, A.P., Extraction conditions and characterization of lignin isolated from cherry tree residues, abstracts book do 3rd Symposium of FibEnTech-UBI: Fiber Materials and Environmental Technologies, Universidade da Beira Interior, 2018 (Anexo 5)

Capítulo 6 - Referências bibliográficas

- Aadil, K. R., Barapatre, A., Sahu, S., Jha H., Tiwary, B. N.. 2014. "Free Radical Scavenging Activity and Reducing Power of Acacia Nilotica Wood Lignin." *International Journal of Biological Macromolecules* 67:220-27.
- Khalil, H. P. S. A., Marliana, M. M., Issam, A. M., Bakare, I. O.. 2011. "Exploring Isolated Lignin Material from Oil Palm Biomass Waste in Green Composites." *Materials and Design* 32(5):2604-10.
- Adler, E. 1977. *Wood Science Anci Technology*. Vol. 8. Springer-Verlag.
- Agrawal, A., Kaushik, N., Biswas, S.. 2014. "Derivatives and Applications of Lignin - An Insight." *The Scitech Journal* 01(07):30-36.
- Ainsworth, E. A., Gillespie, K. M.. 2007. "Estimation of Total Phenolic Content and Other Oxidation Substrates in Plant Tissues Using Folin-Ciocalteu Reagent." *Nature Protocols* 2(4):875-77.
- Wiedenhoef, A. C., Miller, R. B.. 2005. "Structure and Function of Wood." in *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites*, edited by R. Rowell. CRC Press.
- Allen, D. D., Caviedes, R., Cárdenas, A. M., Shimahara, T., Segura-Aguilar, J., Caviedes, P. A., 2005. "Cell Lines as in Vitro Models for Drug Screening and Toxicity Studies." *Drug Development and Industrial Pharmacy* 31(8):757-68.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M. J.. 2010. "Pretreatment Technologies for an Efficient Bioethanol Production Process Based on Enzymatic Hydrolysis: A Review." *Bioresource Technology* 101(13):4851-61.
- Amirkia, V., Heinrich M.. 2015. "Natural Products and Drug Discovery: A Survey of Stakeholders in Industry and Academia." *Frontiers in Pharmacology* 6(OCT):1-8.
- An, L., Wang, G., Jia, H., Liu, C., Sui, W., Si, C.. 2017. "Fractionation of Enzymatic Hydrolysis Lignin by Sequential Extraction for Enhancing Antioxidant Performance." *International Journal of Biological Macromolecules* 99:674-81.
- Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E. H., Rollinger, J. M., Schuster, D., Breuss, J. M., Bochkov, V., Mihovilovic, M. D., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch, V. M., Stuppner, H.. 2015. "Discovery and Resupply of Pharmacologically Active Plant-Derived Natural Products: A Review." *Biotechnology Advances* 33(8):1582-1614.
- Bainor, A., Chang, L., McQuade, T. J., Webb, B., Gestwicki, J. E.. 2011. "Bicinchoninic Acid (BCA) Assay in Low Volume." *Analytical Biochemistry* 410(2):310-12.

- Balakshin, M., Capanema, E.. 2015. "On the Quantification of Lignin Hydroxyl Groups With ³¹P and ¹³C NMR Spectroscopy." *Journal of Wood Chemistry and Technology* 35(3):220-37.
- Barapatre, A., Meena, A. S., Mekala, S., Das, A., Jha, H.. 2016. "In Vitro Evaluation of Antioxidant and Cytotoxic Activities of Lignin Fractions Extracted from *Acacia Nilotica*." *International Journal of Biological Macromolecules* 86:443-53.
- Belgacem, M. N., Gandini, A.. 2008. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. 1st. ed.. Elsevier
- Betteridge, D. J.. 2000. "What Is Oxidative Stress?" Pp. 3-8 in *Metabolism: Clinical and Experimental*. Vol. 49.
- Blainski, A., Lopes, G. C., Mello, J. C. P.. 2013. "Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L." *Molecules* 18(6):6852-65.
- Bodîrlău, R., Spiridon, I., Teacă, C. A.. 2007. "Chemical Investigation of Wood Tree Species in Temperate Forest in East-Northern Romania." *BioResources* 2(1):41-57.
- Boeriu, C. G., Bravo, D., Gosselink, R. J. A., Dam, J. E. G. V.. 2004. "Characterisation of Structure-Dependent Functional Properties of Lignin with Infrared Spectroscopy." *Industrial Crops and Products* 20(2):205-18.
- Brescia, P., Banks, P.. 2009. "Quantifying Cytotoxicity of Thiostrepton on Mesothelioma Cells Using MTT Assay and the Epoch™ Microplate Spectrophotometer." *BioTek* 3.
- Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K. B., Ramakrishnan, S.. 2011. "Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review." *Enzyme Research* 2011(1).
- Adler, E., Brunow, G., Lundquist, K.. 1987. "Investigation of the Acid-Catalysed Alkylation of Lignins by Means of NMR Spectroscopic Methods." *Holzforschung* 41(4):199-207.
- Wermuth, C. G., Aldous, D., Raboisson, P., Rognan, D.. 2015. *The Practice of Medicinal Chemistry*. 4th ed. Academic Press.
- Casas, A., Alonso, M. V., Oliet, M., Rojo, E., Rodríguez, F.. 2012. "FTIR Analysis of Lignin Regenerated from *Pinus Radiata* and *Eucalyptus Globulus* Woods Dissolved in Imidazolium-Based Ionic Liquids." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 87(4):472-80.
- Company, Chemical and Lancaster Synthe-. 1998. "Characterization of Lignin Functionality by NMR." (19):1-9.

- Dasgupta, A., Klein, K.. 2014. *Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements*. 1st editio. British Library Cataloguing.
- Derkacheva, O., Sukhov, D.. 2008. "Investigation of Lignins by FTIR Spectroscopy." *Macromolecular Symposia* 265(1):61-68.
- Dias, D. A., Urban, S., Roessner, U.. 2012. "A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery." *Metabolites* 2(2):303-36.
- Dizhbite, T., Telysheva, G., Jurkjane, V., Uldis, V.. 2004. "Characterization of the Radical Scavenging Activity of Lignins - Natural Antioxidants." *Bioresource Technology* 95(3):309-17.
- Domingues, Fernanda, Luís, Â., Breitenfeld, L., Ferreira, S., e Duarte, A. P.. 2014. "Antimicrobial, Antibiofilm and Cytotoxic Activities of Hakea Sericea Schrader Extracts." *Pharmacognosy Magazine* 10(37):6.
- Ebada, S. S., Edrada, R. A., Lin, W., Proksch, P.. 2008. "Methods for Isolation, Purification and Structural Elucidation of Bioactive Secondary Metabolites from Marine Invertebrates." *Nature Protocols* 3(12):1820-31.
- Sjostrom, E., Alen, R.. 2003. *Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping, and Papermaking*. 1st ed. edited by T. E. Timell. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., Walker, R. B.. 2010. "Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin-Ciocalteu Reagent." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(14):8139-44.
- Faustino, H., Gil, N., Baptista, C., Duarte, A. P.. 2010. "Antioxidant Activity of Lignin Phenolic Compounds Extracted from Kraft and Sulphite Black Liquors." *Molecules* 15(12):9308-22.
- Ferreira, I. C. F. R., Abreu, R. M. V.. 2007. "Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos." *Bioanálise* 2:32-39.
- Finkel, T., Holbrook, N. J.. 2000. "Oxidants, Oxidative Stress and the Biology of Ageing." *Nature* 408(6809):239-47.
- François, G.. 2014. *Biochemical Ecotoxicology - Principles and Methods*. Academic Press.
- Frangville, C., Rutkevicius, M., Richter, A., Velez, O. D., Stoyanov, S. D., Paunov, V. N.. 2012. "Fabrication of Environmentally Biodegradable Lignin Nanoparticles." *ChemPhysChem* 13(18):4235-43.
- Fresh Fruit Portal. 2014. "Global Fresh Cherry Production." *Cherries of the Worlds 2014* 12-

14.

Freshney, R. I.. 2010. *Culture of Animal Cells*. Vol. 82. 6th ed. John Wiley & Sons.

García, A., Spigno, G., Labidi, J.. 2017. "Antioxidant and Biocide Behaviour of Lignin Fractions from Apple Tree Pruning Residues." *Industrial Crops and Products* 104(May):242-52.

Gilbert D. F, Friedrich O., 2017. *Cell Viability Assays*. Vol. 1601. Springer Nature.

Gonçalves, A. C., Bento, C., Silva, B. M., Silva, L. R.. 2017. "Sweet Cherries from Fundão Possess Antidiabetic Potential and Protect Human Erythrocytes against Oxidative Damage." *Food Research International* 95:91-100.

Gong, W., Xiang, Z., Ye, F., Zhao, G. 2016. "Composition and Structure of an Antioxidant Acetic Acid Lignin Isolated from Shoot Shell of Bamboo (*Dendrocalamus Latiforus*)." *Industrial Crops and Products* 91:340-49.

Grant, A.. 2018. "Cherry Tree Pruning: How And When To Trim A Cherry Tree." Retrieved August 20, 2018 (<https://www.gardeningknowhow.com/edible/fruits/cherry/cherry-tree-pruning.htm>).

Jaszczyszyn, A., Gasiorowski, K.. 2008. "Limitations of the MTT Assay in Cell Viability Testing." *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 17(5):525-29.

Kirker, G. T., Blodgett, A. B., Arango, R. A., Lebow, P. K., Clausen, C. A.. 2013. "The Role of Extractives in Naturally Durable Wood Species." *International Biodeterioration and Biodegradation* 82:53-58.

Koshijima, T., Watanabe, T.. 2003. *Association between Lignin and Carbohydrates in Wood and Other Plant Tissues*. Vol. 77. 1st ed. edited by T. E. Timell. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.

Lievonen, M., Valle-Delgado, J. J., Mattinen, M. L., Hult, E. L., Lintinen, K., Kostianen, M. A., Paananen, A., Szilvay, G. R., Setälä, H., Osterberg, M.. 2016. "A Simple Process for Lignin Nanoparticle Preparation." *Green Chemistry* 18(5):1416-22.

Lignimatch. 2010. "Future Use of Lignin In." *LigniMatch* 16.

Lin, S. Y., Dence, C. W.. 1992. *Method in Lignin Chemistry*. 1st ed. edited by T. E. Timell. Springer-Verlag.

Liu, Q., Wang, S., Zheng, Y., Luo, Z., Cen, K.. 2008. "Mechanism Study of Wood Lignin Pyrolysis by Using TG-FTIR Analysis." *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 82(1):170-77.

- Lorencini, M., Brohem, C. A., Dieamant, G. C., Zanchin, N. I. T., Maibach, H. I.. 2014. "Active Ingredients against Human Epidermal Aging." *Ageing Research Reviews* 15(1):100-115.
- Luís, A., Domingues, F., Duarte, A. P.. 2011. "Bioactive Compounds, RP-HPLC Analysis of Phenolics, and Antioxidant Activity of Some Portuguese Shrub Species Extracts." *Natural Product Communications* 6(12):1863–1872.
- Machado, H.; Tanus, J. N., Peters, V. M., Fonseca, C. S., Oliveira, T. T.. 2008. "Flavonóides e Seu Potencial Terapêutico." *Boletim Do Centro de Biologia Da Reprodução* 27(1/2):33-39.
- Mansouri, N. E., Salvadó, J.. 2006. "Structural Characterization of Technical Lignins for the Production of Adhesives: Application to Lignosulfonate, Kraft, Soda-Anthraquinone, Organosolv and Ethanol Process Lignins." *Industrial Crops and Products* 24(1):8-16.
- Molla, M., Momekov, G., Manolov, I.. 2018. "Studies on Cytotoxic Effects of 4-hydroxycoumarin Derivatives in Human Tumor Cell Lines % of Untreated Control SKW-3 Cells % of Untreated Control." 8(1):18-32.
- Molyneux, P.. 2004. "The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl- Hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity." *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 26(November 2003):211-19.
- Mounguengui, S., Tchinda, J. B. S., Ndikontar, M. K., Dumarçay, S., Attéké, C., Perrin, D., Gelhaye, E., Gérardin, P.. 2016. "Total Phenolic and Lignin Contents, Phytochemical Screening, Antioxidant and Fungal Inhibition Properties of the Heartwood Extractives of Ten Congo Basin Tree Species." *Annals of Forest Science* 73(2):287-96.
- Neves, L. C., Alencar, S. M., Carpes, S. T.. 2009. "Determinação Da Atividade Antioxidante e Do Teor de Compostos Fenólicos e Flavonoides Totais Em Amostras de Pólen Apícola de Apis Mellifera." *Brazilian Journal of Food Technology* VII BMCFB:107-10.
- Nicholson, D. J., Leavitt, A. T., Francis, R. C.. 2014. "A Three-Stage Klason Method for More Accurate Determinations of Hardwood Lignin Content." *Cellulose Chemistry and Technology* 48:53-59.
- Niki, E.. 2010. "Assessment of Antioxidant Capacity in Vitro and in Vivo." *Free Radical Biology and Medicine* 49(4):503-15.
- Niu, N., Wang, L.. 2015. "In Vitro Human Cell Line Models to Predict Clinical Response to Anticancer Drugs." *Pharmacogenomics* 16(3):273-85.
- Lewis, N. G., Davin, L. B., Sarkanen, S.. 1998. "Lignin and Lignan Biosynthesis: Distinctions and Reconciliations." *Lignin and Lignan Biosynthesis* 697:96-108.

- Oliveira, E. S. S., Rodriguez, N. M., Morais, S. A. L., Veloso, P. V.. 2001. "Ligninas - Métodos De Obtenção E Caracterização Química Lignins - Isolation Methods and Chemical Characterization." 917-28.
- Pandey, K. K.. 1999. "A Study of Chemical Structure of Soft and Hardwood and Wood Polymers by FTIR Spectroscopy." *Journal of Applied Polymer Science* 71(12):1969-75.
- Patil, N. D., Tanguy, N. R., Yan N.. 2015. *Lignin Interunit Linkages and Model Compounds*. Elsevier Inc.
- Patlolla, A., Patlolla, B., Tchounwou, P.. 2010. "Evaluation of Cell Viability, DNA Damage, and Cell Death in Normal Human Dermal Fibroblast Cells Induced by Functionalized Multiwalled Carbon Nanotube." *Molecular and Cellular Biochemistry* 338(1-2):225-32.
- Popescu, C. M., Popescu, M. C., Singurel, G., Vasile, C., Argyropoulos, D. S., Willfor, S.. 2007. "Spectral Characterization of Eucalyptus Wood." *Applied Spectroscopy* 61(11):1168-77.
- Ramos-e-Silva, M., Celem, L. R., Ramos-e-Silva, S., Fucci-da-Costa, A. P.. 2013. "Anti-Aging Cosmetics: Facts and Controversies." *Clinics in Dermatology* 31(6):750-58.
- Remón, S., Ferrer, A., López-Buesa, P., Oria, R.. 2004. "Atmosphere Composition Effects on Burlat Cherry Colour during Cold Storage." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84(2):140-46.
- Rowell, Roger. 2012. *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites*. CRC Press
- Samuel, R., Pu, Y., Raman, B., Ragauskas, A. J.. 2010. "Structural Characterization and Comparison of Switchgrass Ball-Milled Lignin before and after Dilute Acid Pretreatment." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162(1):62-74.
- Sannigrahi, P., Pu, Y., Ragauskas, A.. 2010. "Cellulosic Biorefineries-Unleashing Lignin Opportunities." *Current Opinion in Environmental Sustainability* 2(5-6):383-93.
- Santos, F. A., Queiróz, J. H., Colodette, J. L., Fernandes, S. A., Guimarães, V. M., Rezende, S. T.. 2012. "Potencial Da Palha de Cana-de-Aucar Para Produção de Etanol." *Quimica Nova* 35(5):1004-10.
- Santos, P. S. B., Soares, A. K., Fuentes, S., Labidi, J., Gatto, D. A.. 2015. "Caracterização Da Lignina Obtida Da Madeira de Diferentes Espécies Por Meio Do Processo Organosolv." *Revista Ciência Da Madeira - RCM* 6(3):237-43.
- Scherer, R., Godoy, H. T.. 2009. "Antioxidant Activity Index (AAI) by the 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl Method." *Food Chemistry* 112(3):654-58.

- Schuerch, C.. 1952. "The Solvent Properties of Liquids and Their Relation to the Solubility, Swelling, Isolation and Fractionation of Lignin." *Journal of the American Chemical Society* 74(20):5061-67.
- Ritter, G. J., Seborg, R. M., Mitchell, R. L.. 1928. "Factors Affecting Quantitative Determination of Lignin by 7 2 Per Cent Sulfuric Acid Method." 4(2):202-4.
- Serra, A. T., Duarte, R. O., Bronze, M. R., Duarte, C. M. M.. 2011. "Identification of Bioactive Response in Traditional Cherries from Portugal." *Food Chemistry* 125(2):318-25.
- Sette, M., Lange, H., Crestini, C.. 2013. "Quantitative Hsqc Analyses of Lignin: A Practical Comparison." *Computational and Structural Biotechnology Journal* 6(7):e201303016.
- Shoemaker, M., Cohen, I., Campbell, M.. 2004. "Reduction of MTT by Aqueous Herbal Extracts in the Absence of Cells." *Journal of Ethnopharmacology* 93(2-3):381-84.
- Silva, E. M., Souza, J. N. S., Rogez, H., Rees, J. F., Larondelle, Y.. 2006. "Antioxidant Activities and Polyphenolic Contents of Fifteen Selected Plant Species from the Amazonian Region." *Food Chemistry* 101(3):1012-18.
- Silva, M. L. C. M. M. A., Alarcão, A.. 1999. "Características Físico-Químicas e Utilizações Agro-Alimentares Da Cereja e Da Ginja." *Revista de Ciências Agrárias - Vol. XXII - Nº3*.
- Smith, B. C. 2011. *Fundamentals of TRANSFORM INFRARED FOURIER SPECTROSCOPY*. 2nd editio. CRC Press.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goetze, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C.. "Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid." *Analytical Biochemistry* 150(1):76-85.
- Smolarski, N.. 2012. "High-Value Opportunities for Lignin: Unlocking Its Potential Lignin Potential." *Frost & Sullivan* 1-15.
- Tejado, A., Peña, C., Labidi, J., Echeverria, J. M., Mondragon, I.. 2007. "Physico-Chemical Characterization of Lignins from Different Sources for Use in Phenol-Formaldehyde Resin Synthesis." *Bioresource Technology* 98(8):1655-63.
- Thermo Scientific. 2011. "User Guide: Pierce BCA Protein Assay Kit." *Pierce Biotechnology* 0747(23225):1-7.
- Ugartondo, V., Mitjans, M., Vinardell, M. P.. 2008. "Comparative Antioxidant and Cytotoxic Effects of Lignins from Different Sources." *Bioresource Technology* 99(14):6683-87.
- United States Department of Agriculture. 2017. "GAIN Report: Stone Fruit Annual EU-28."

Global Agricultural Information Network (SP1727):1-24.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D, Mazur, M., Telser, J.. 2007. "Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 39(1):44-84.

Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., Boerjan, W.. 2010. "Lignin Biosynthesis and Structure." *Plant Physiology* 153(3):895-905.

Vinardell, M. P., Mitjans, M.. 2017. "Lignins and Their Derivatives with Beneficial Effects on Human Health." *International Journal of Molecular Sciences* 18(6).

Watkins, D., Nuruddin, M., Hosur, M., Tcherbi-Narteh, A., Jeelani, A.. 2015. "Extraction and Characterization of Lignin from Different Biomass Resources." *Journal of Materials Research and Technology* 4(1):26-32.

Wen, J. L., Sun, S. L., Xue, B. L., Sun, R. C.. 2013. "Recent Advances in Characterization of Lignin Polymer by Solution-State Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Methodology." *Materials* 6(1):359-91.

Yuan, T. Q., Sun, S. N., Xu, F., Sun, R. C.. 2011. "Characterization of Lignin Structures and Lignin-Carbohydrate Complex (LCC) Linkages by Quantitative¹³C and 2D HSQC NMR Spectroscopy." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(19):10604-14.

Zeng, J., Helms, G. L., Gao, X., Chen, S.. 2013. "Quantification of Wheat Straw Lignin Structure by Comprehensive NMR Analysis." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(46):10848-57.

Zhou, S., Liu, L., Wang, B., Xu, F., Sun, R.. 2012. "Microwave-Enhanced Extraction of Lignin from Birch in Formic Acid: Structural Characterization and Antioxidant Activity Study." *Process Biochemistry* 47(12):1799-1806.

Capítulo 7 - Anexos

Anexo 1 - Determinação da atividade antioxidante - método 2

No capítulo 3 estão apresentados os resultados médios relativos à CI_{50} e à AAI das lenhinas em estudo e do padrão usado. Seguidamente, encontram-se os gráficos e os cálculos do padrão trolox e de cada lenhina em análise, estando nas tabelas os valores de CI_{50} e AAI para cada concentração de DPPH. Na última tabela de cada conjunto de gráficos relativos a cada extrato encontra-se a indicação média dos valores de IC_{50} e AAI.

1.1. Trolox

➤ Concentração de DPPH de 0,200 mM

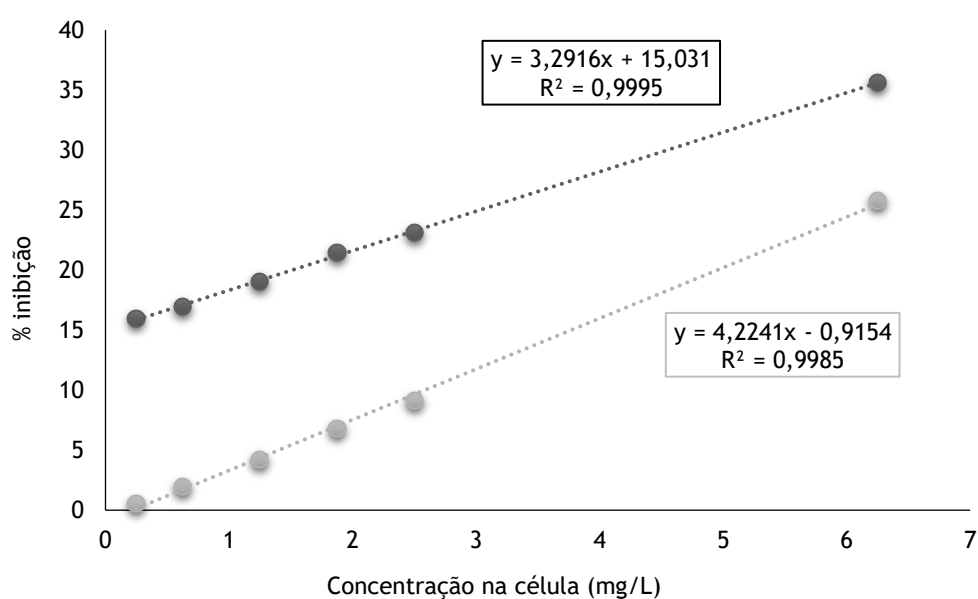


Gráfico 6.1: Padrão Trolox para [DPPH]=0,200 mM.

Tabela 6.1: Parâmetros da atividade antioxidante (CI_{50} e AAI) do padrão Trolox para [DPPH] = 0,2000 mM.

CI_{50}			AAI		
A	B	Média ± Desvio padrão	A	B	Média ± Desvio padrão
10,624	12,054	11,339 ± 0,715	8,729	6,479	7,604 ± 1,125

➤ **Concentração de DPPH de 0,1242 mM**

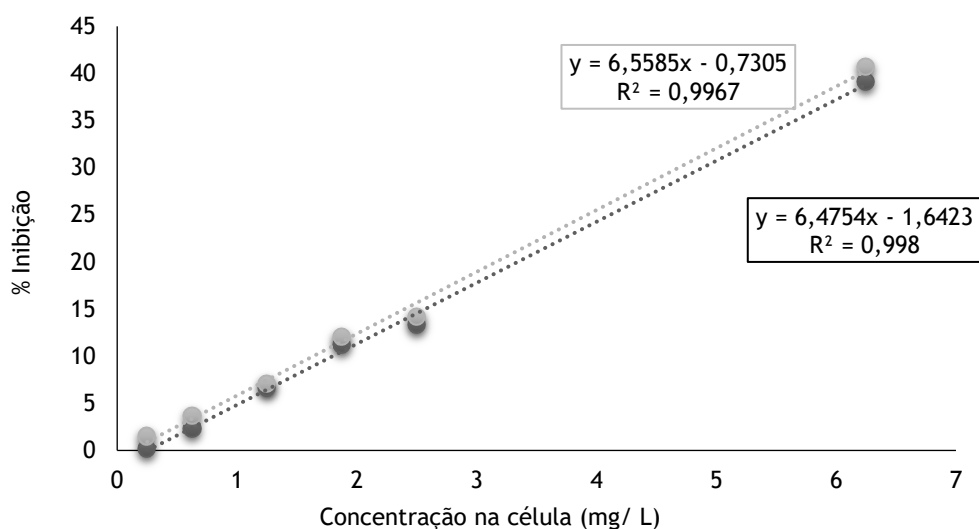


Gráfico 6.2: Padrão Trolox para [DPPH]=0,1242 mM.

Tabela 6.2: Parâmetros da atividade antioxidante (IC₅₀ e AAI) do padrão Trolox para [DPPH] = 0,1242 mM.

IC ₅₀			AAI		
A	B	Média ± Desvio padrão	A	B	Média ± Desvio padrão
7,975	7,735	7,855 ± 0,120	6,247	6,473	6,360 ± 0,113

➤ **Concentração de DPPH de 0,080 mM**

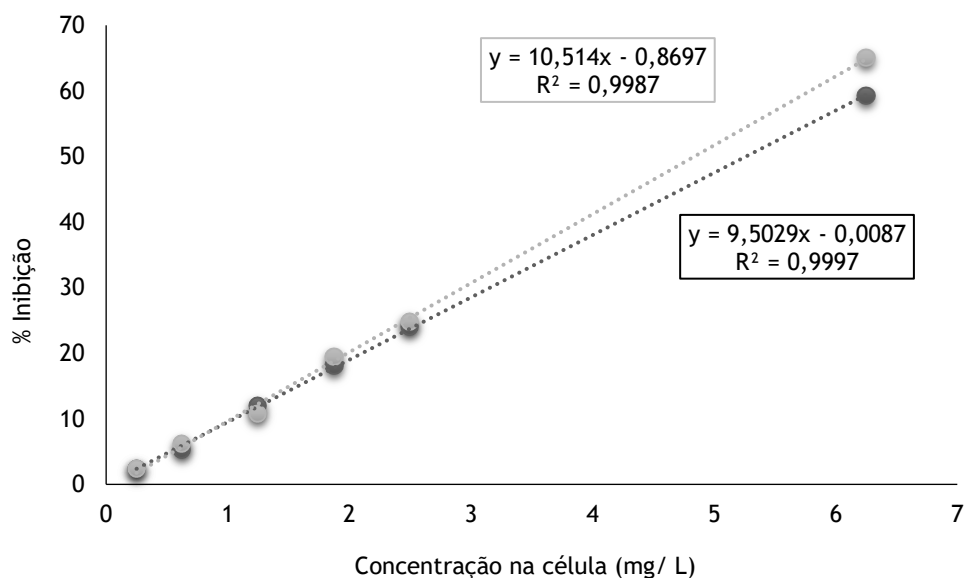


Gráfico 6.3: Padrão Trolox para [DPPH]=0,0800 mM.

Tabela 6.3: Parâmetros da atividade antioxidante (IC_{50} e AAI) do padrão Trolox para [DPPH] = 0,0800 mM.

IC_{50}			AAI		
A	B	Média ± Desvio padrão	A	B	Média ± Desvio padrão
5,262	4,838	5,050 ± 0,212	6,281	6,780	6,531 ± 0,249

- **Valores médios dos parâmetros IC_{50} e AAI para a três concentrações de DPPH**

Tabela 6.4: Resumo dos parâmetros da atividade antioxidante (IC_{50} e AAI) do padrão Trolox.

	Média ± Desvio padrão	Atividade antioxidante
IC_{50}	8,083 ± 1,819	Muito forte
AAI	6,83 ± 0,388	

1.2. Lenhina extraída com ácido acético

- **Concentração de DPPH de 0,200 mM**

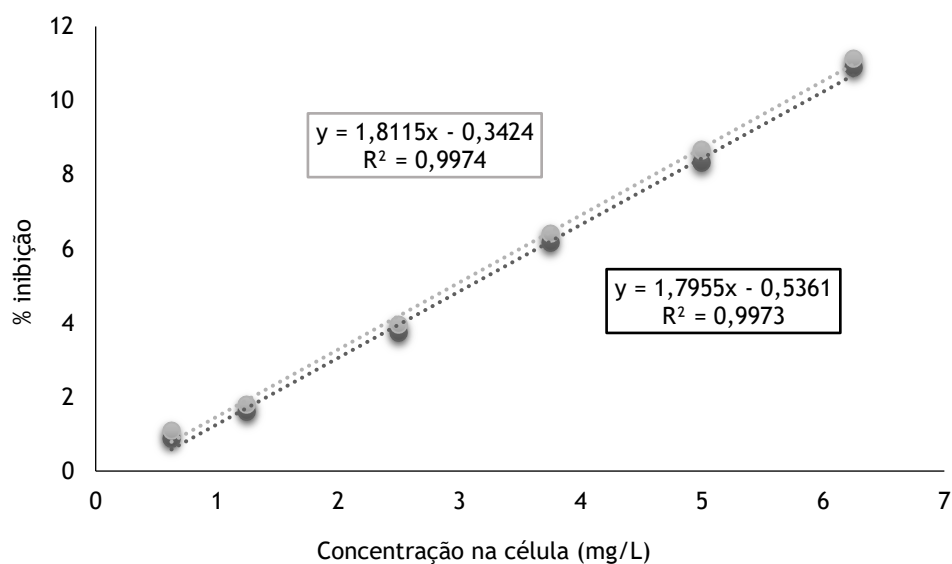


Gráfico 6.4: Lenhina extraída com ácido acético para [DPPH]=0,200 mM.

Tabela 6.5: Parâmetros da atividade antioxidante (IC₅₀ e AAI) da lenhina extraída com ácido acético para [DPPH] = 0,200 mM.

IC ₅₀			AAI		
A	B	Média ± Desvio padrão	A	B	Média ± Desvio padrão
27,790	28,146	27,968 ± 0,251	2,817	2,789	2,803 ± 0,020

➤ **Concentração de DPPH de 0,1242 mM**

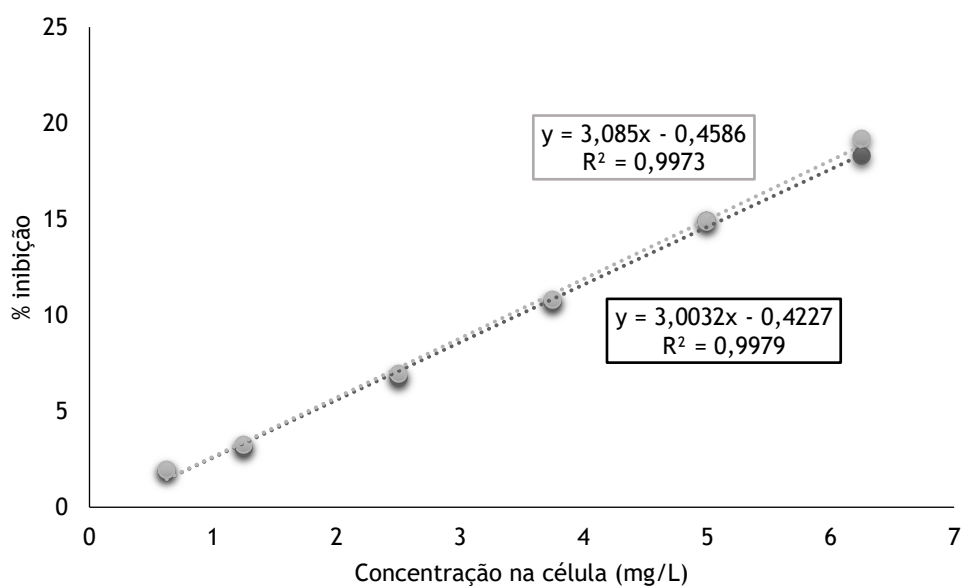


Gráfico 6.5: Lenhina extraída com ácido acético para [DPPH]=0,1242 mM.

Tabela 6.6: Parâmetros da atividade antioxidante (IC₅₀ e AAI) da lenhina extraída com ácido acético para [DPPH] = 0,1242 mM.

IC ₅₀			AAI		
A	B	Média ± Desvio padrão	A	B	Média ± Desvio padrão
16,356	16,790	16,573 ± 0,307	2,569	2,502	2,536 ± 0,047

➤ **Concentração de DPPH de 0,0800 mM**

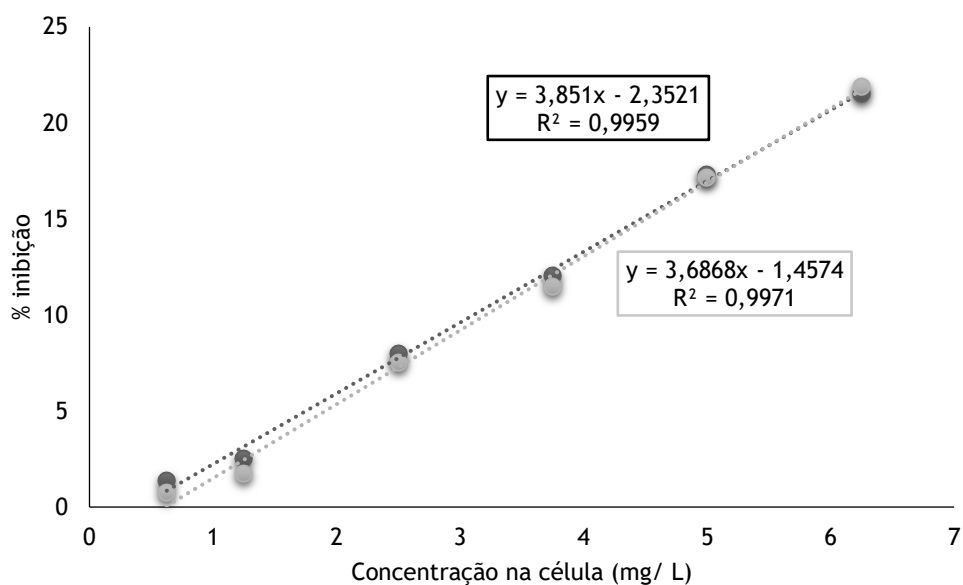


Gráfico 6.6: Lenhina extraída com ácido acético para [DPPH]=0,0800 mM.

Tabela 6.7: Parâmetros da atividade antioxidante (IC₅₀ e AAI) da lenhina extraída com ácido acético para [DPPH] = 0,0800 mM.

IC ₅₀			AAI		
A	B	Média ± Desvio padrão	A	B	Média ± Desvio padrão
13,594	13,957	13,776 ± 0,256	2,127	2,062	2,095 ± 0,046

➤ **Valores médios dos parâmetros CI₅₀ e AAI para a três concentrações de DPPH**

Tabela 6.8: Resumo dos parâmetros da atividade antioxidante (CI₅₀ e AAI) da lenhina extraída com ácido acético.

	Média ± Desvio padrão	Atividade antioxidante
CI ₅₀	19,44 ± 5,318	Muito forte
AAI	2,48 ± 0,253	

1.3. Lenhina extraída com ácido fórmico

➤ Concentração de DPPH de 0,200 mM

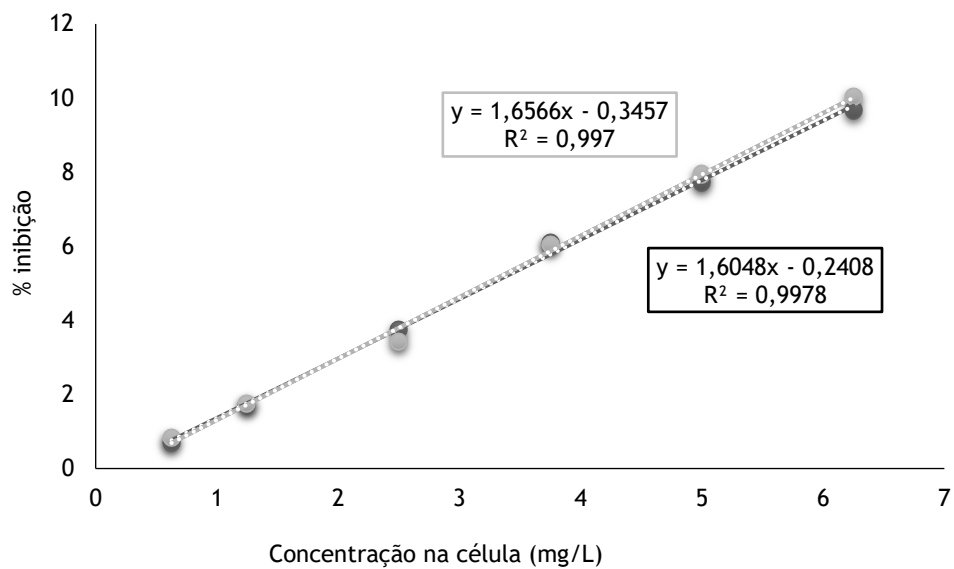


Gráfico 6.7: Lenhina extraída com ácido fórmico para [DPPH]=0,200mM.

Tabela 6.9: Parâmetros da atividade antioxidante (IC₅₀ e AAI) da lenhina extraída com ácido fórmico para [DPPH] = 0,200 mM.

IC ₅₀			AAI		
A	B	Média ± Desvio padrão	A	B	Média ± Desvio padrão
30,391	31,301	30,89 ± 0,647	2,559	2,488	2,523 ± 0,050

➤ **Concentração de DPPH de 0,1242 mM**

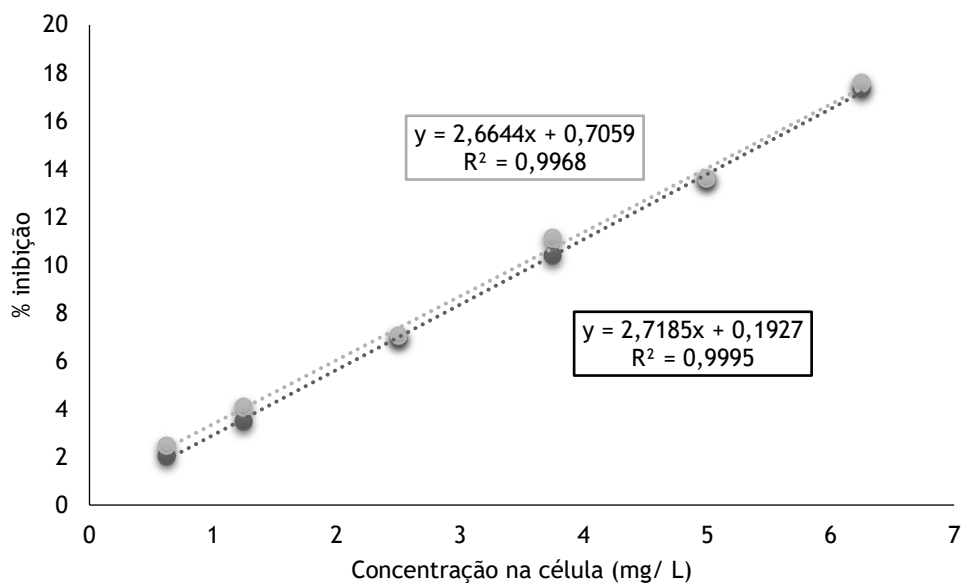


Gráfico 6.8: Linhina extraída com ácido fórmico para [DPPH]=0,1242mM.

Tabela 6.10: Parâmetros da atividade antioxidante (IC₅₀ e AAI) da lenhina extraída com ácido fórmico para [DPPH] = 0,1242 mM.

IC ₅₀			AAI		
A	B	Média ± Desvio padrão	A	B	Média ± Desvio padrão
19,031	18,322	18,676 ± 0,502	2,223	2,313	2,268 ± 0,064

➤ **Concentração de DPPH de 0,0800 mM**

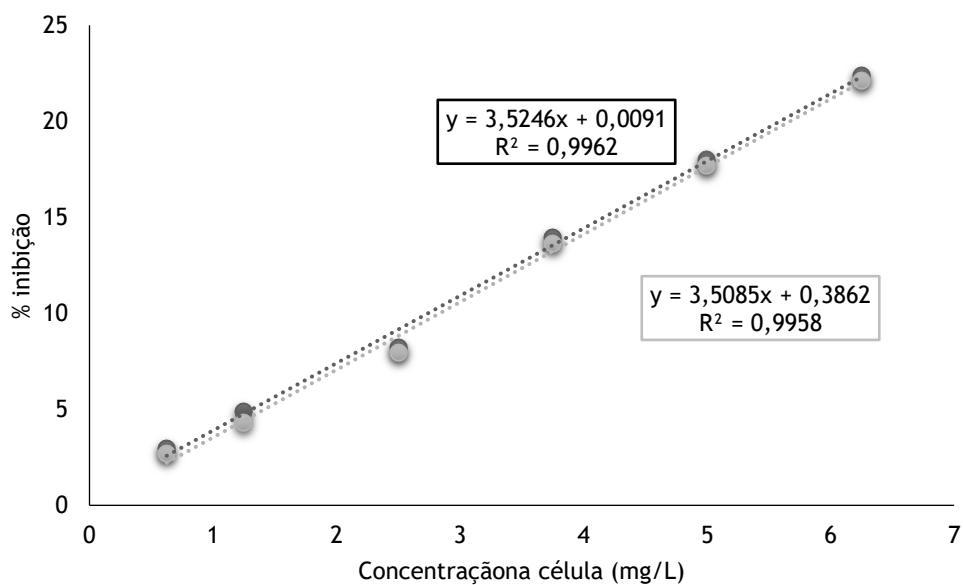


Gráfico 6.9: Linhina extraída com ácido fórmico para [DPPH]=0,0800 mM.

Tabela 6.11: Parâmetros da atividade antioxidante (IC_{50} e AAI) da lenhina extraída com ácido fórmico para [DPPH] = 0,0800 mM.

IC_{50}			AAI		
A	B	Média ± Desvio padrão	A	B	Média ± Desvio padrão
14,18	14,14	14,16 ± 0,02	2,08	2,07	2,07 ± 0,01

- **Valores médios dos parâmetros IC_{50} e AAI para a três concentrações de DPPH**

Tabela 6.12: Resumo dos parâmetros da atividade antioxidante (IC_{50} e AAI) da lenhina extraída com ácido fórmico.

	Média ± Desvio padrão	Atividade antioxidante
IC_{50}	21,23 ± 6,11	Muito forte
AAI	2,29 ± 0,17	

1.4. Lenhina extraída com NaOH 0,4 M

- **Concentração de DPPH de 0,200 mM**

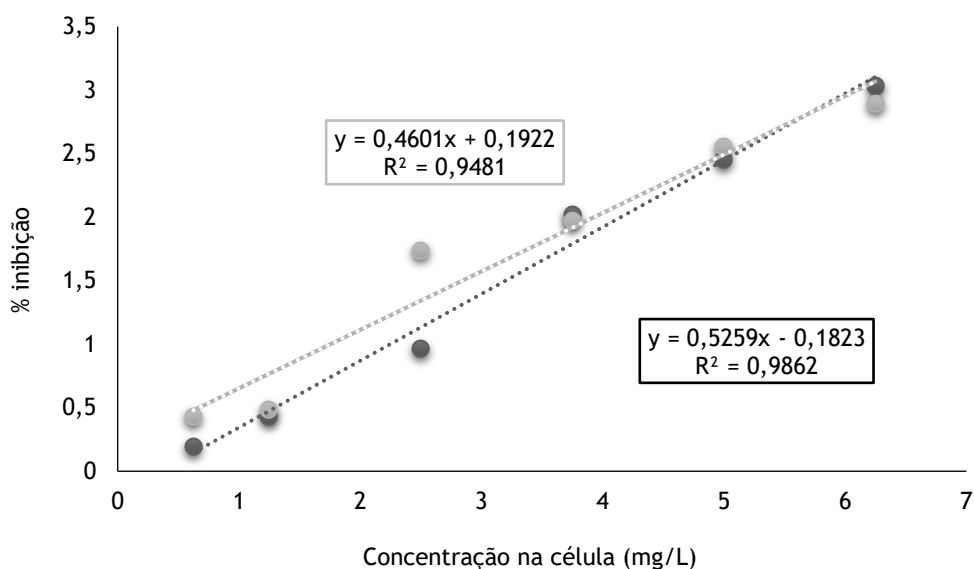


Gráfico 6.10: Lenhina extraída com NaOH 0,4 M para [DPPH]=0,200 mM.

Tabela 6.13: Parâmetros da atividade antioxidante (IC_{50} e AAI) da lenhina extraída com NaOH 0,4 M para [DPPH] = 0,200 mM.

IC_{50}			AAI		
A	B	Média ± Desvio padrão	A	B	Média ± Desvio padrão
108,25	95,42	101,84 ± 9,07	0,69	0,78	0,74 ± 0,07

➤ **Concentração de DPPH de 0,1242 mM**

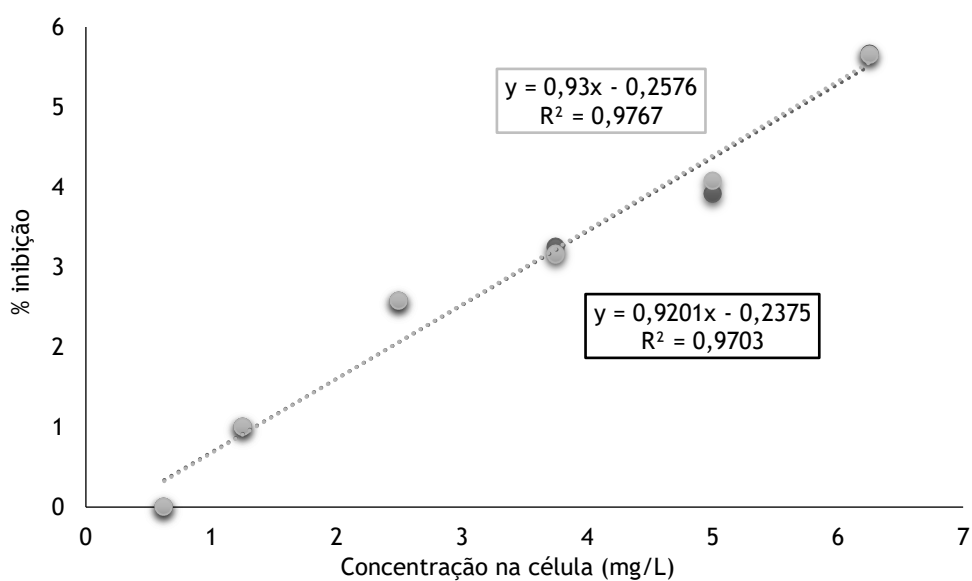


Gráfico 6.11: Lenhina extraída com NaOH 0,4 M para [DPPH]=0,1242 mM.

Tabela 6.14: Parâmetros da atividade antioxidante (IC_{50} e AAI) da lenhina extraída com NaOH 0,4 M para [DPPH] = 0,1242 mM.

IC_{50}			AAI		
A	B	Média ± Desvio padrão	A	B	Média ± Desvio padrão
60,55	54,60	57,58 ± 4,21	0,71	0,79	0,75 ± 0,06

➤ **Concentração de DPPH de 0,0800 mM**

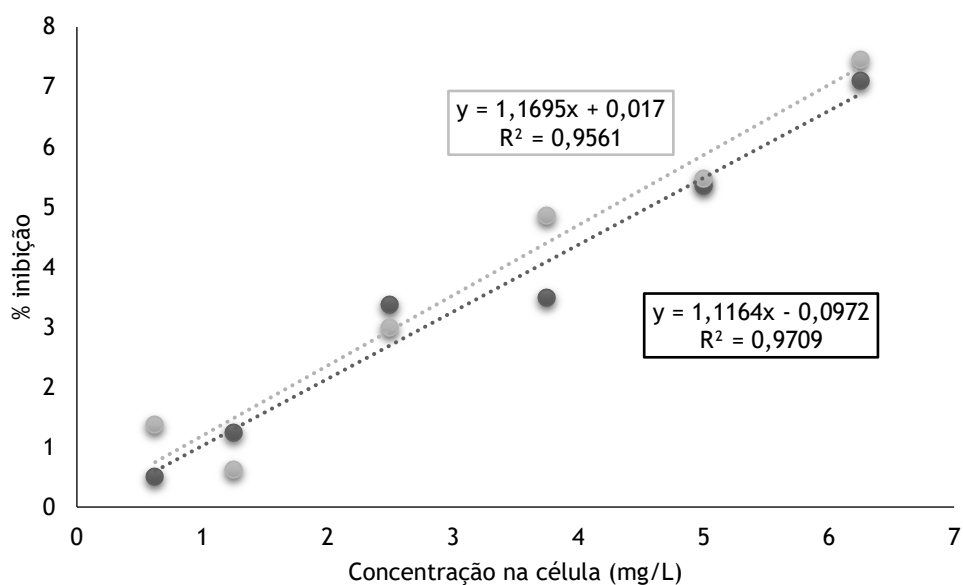


Gráfico 6.12: Lenhina extraída com NaOH 0,4 M para [DPPH]=0,0800 mM.

Tabela 6.15: Parâmetros da atividade antioxidante (IC_{50} e AAI) da lenhina extraída com NaOH 0,4 M para [DPPH] = 0,0800 mM.

IC_{50}			AAI		
A	B	Média ± Desvio padrão	A	B	Média ± Desvio padrão
42,74	44,87	43,81 ± 1,51	0,68	0,64	0,66 ± 0,03

➤ **Valores médios dos parâmetros IC_{50} e AAI para a três concentrações de DPPH**

Tabela 6.16: Resumo dos parâmetros da atividade antioxidante (IC_{50} e AAI) da lenhina extraída com NaOH 0,4 M.

	Média ± Desvio padrão	Atividade antioxidante
IC_{50}	67,74 ± 21,44	Moderada
AAI	0,72 ± 0,03	

1.5. Lenhina extraída com NaOH 0,7 M

➤ Concentração de DPPH de 0,200 mM

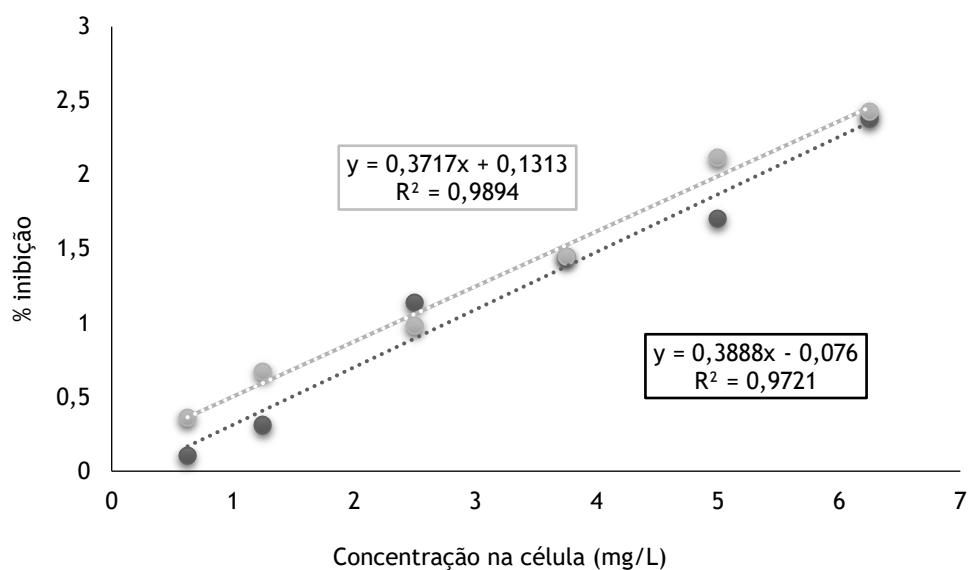


Gráfico 6.13: Lenhina extraída com NaOH 0,7 M para [DPPH]=0,200 mM.

Tabela 6.17: Parâmetros da atividade antioxidante (IC₅₀ e AAI) da lenhina extraída com NaOH 0,7 M para [DPPH] = 0,200 mM.

IC ₅₀			AAI		
A	B	Média ± Desvio padrão	A	B	Média ± Desvio padrão
134,16	128,80	131,48 ± 3,80	0,52	0,54	0,53 ± 0,02

➤ Concentração de DPPH de 0,1242 mM

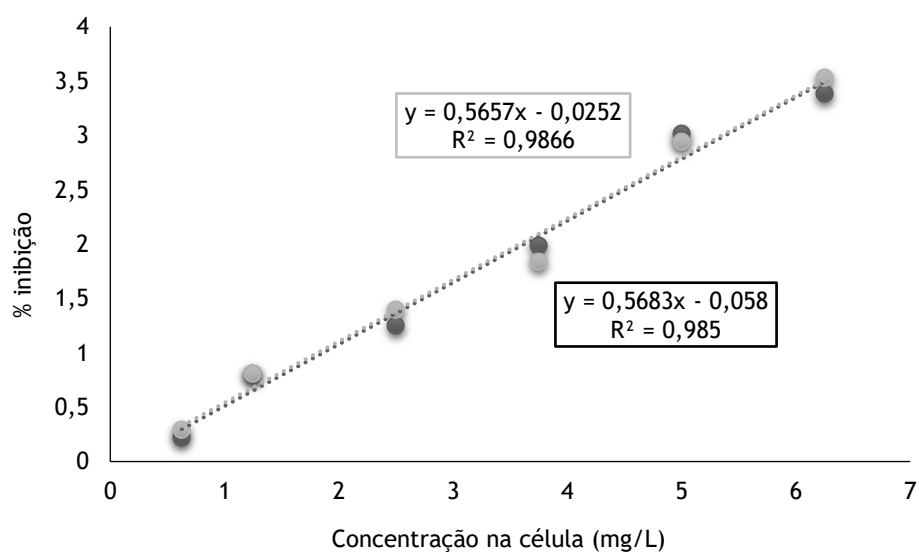


Gráfico 6.14: Lenhina extraída com NaOH 0,7 M para [DPPH]=0,1242 mM.

Tabela 6.18: Parâmetros da atividade antioxidante (IC_{50} e AAI) da lenhina extraída com NaOH 0,7 M para [DPPH] = 0,1242 mM.

IC_{50}			AAI		
A	B	Média ± Desvio padrão	A	B	Média ± Desvio padrão
88,43	88,08	88,26 ± 0,25	0,55	0,56	0,55 ± 0,01

➤ **Concentração de DPPH de 0,0800 mM**

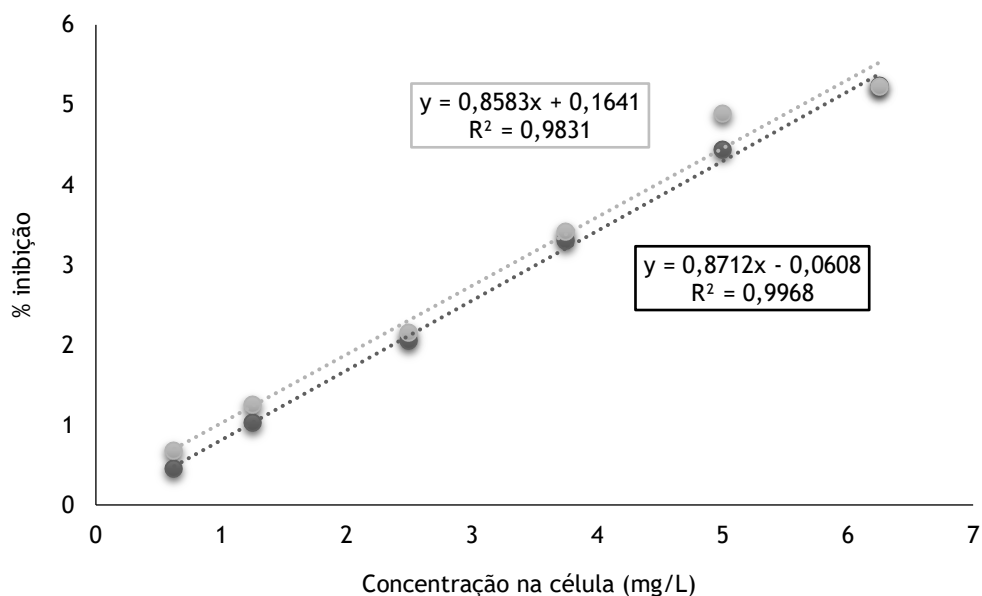


Gráfico 6.15 Lenhina extraída com NaOH 0,7 M para [DPPH]=0,0800 mM.

Tabela 6.19: Parâmetros da atividade antioxidante (IC_{50} e AAI) da lenhina extraída com NaOH 0,7 M para [DPPH] = 0,0800 mM.

IC_{50}			AAI		
A	B	Média ± Desvio padrão	A	B	Média ± Desvio padrão
58,06	27,46	57,76 ± 0,43	0,54	0,55	0,55 ± 0,01

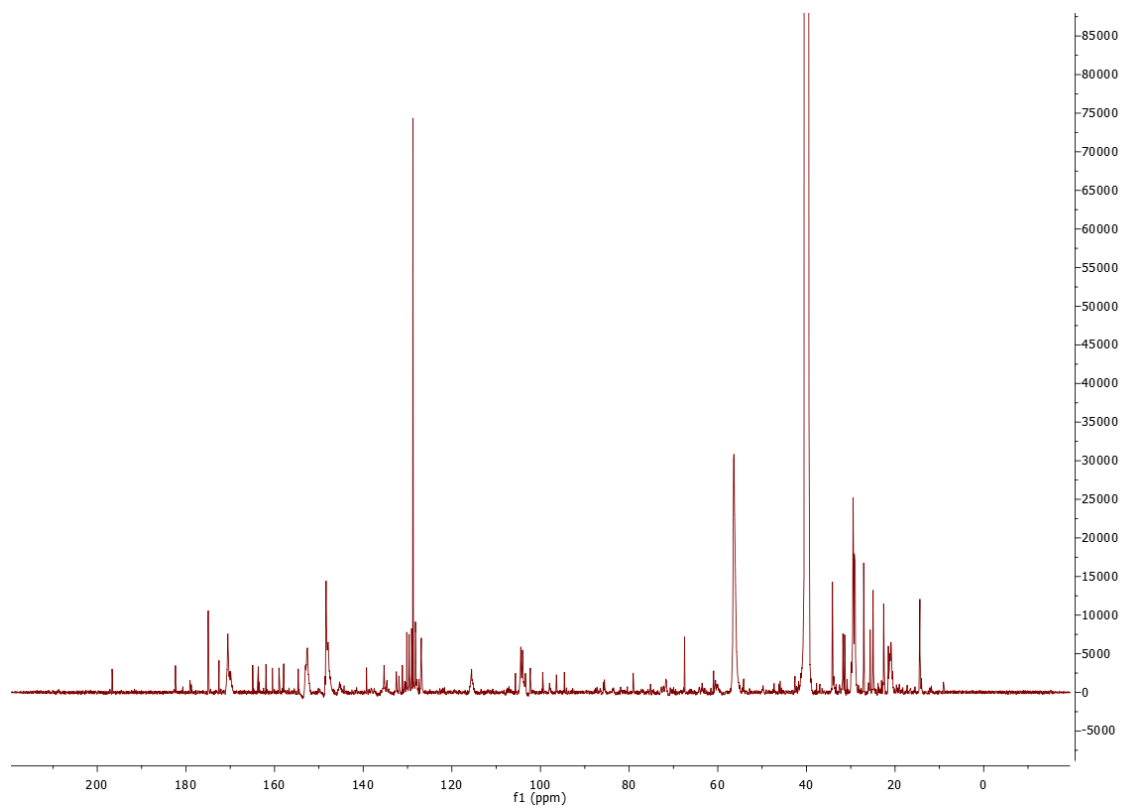
➤ **Valores médios dos parâmetros IC_{50} e AAI para a três concentrações de DPPH**

Tabela 6.20: Resumo dos parâmetros da atividade antioxidante (IC_{50} e AAI) da lenhina extraída com NaOH 0,7 M.

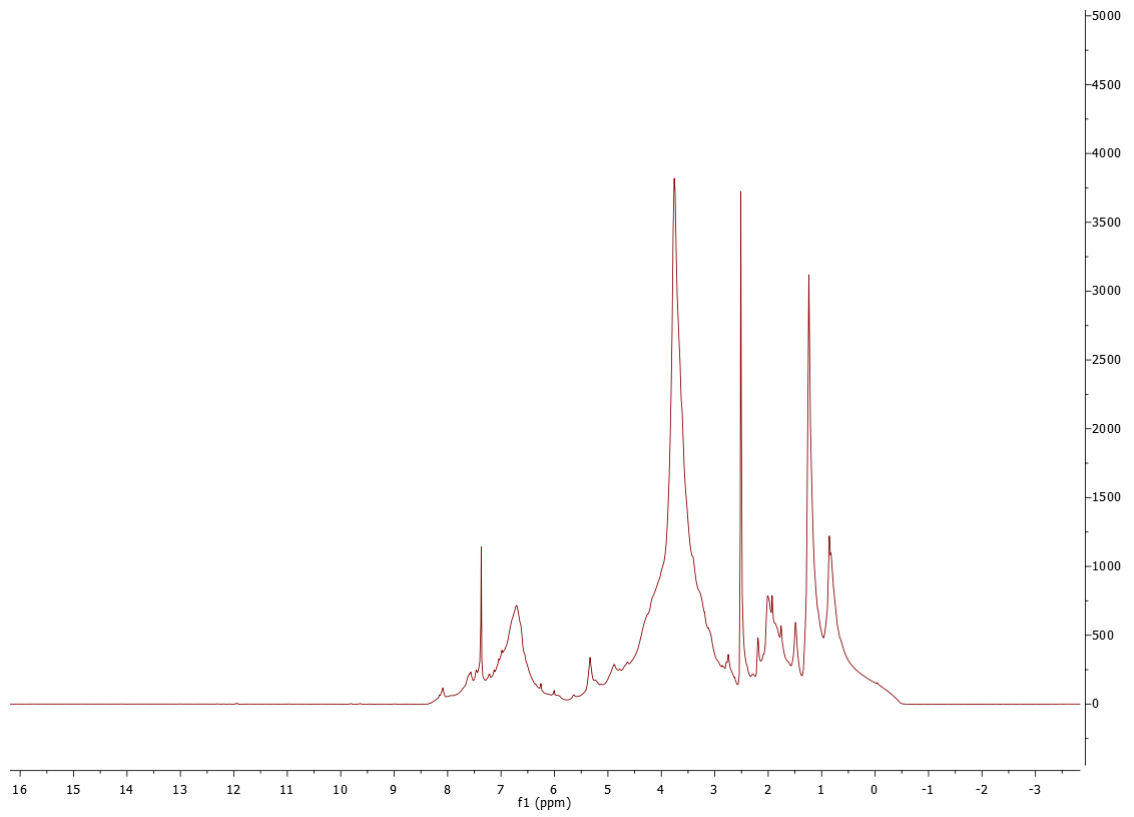
	Média ± Desvio padrão	Atividade antioxidante
IC_{50}	92,50 ± 26,19	Moderada
AAI	0,54 ± 0,01	

Anexo 2 - Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C da lenhina obtida na extração com ácido acético

➤ Espectro de RMN de ^{13}C



➤ Espectro de RMN de ^1H



Anexo 3 - Comunicação em poster no âmbito desta dissertação

Optimization of Lignin extraction methods from *Prunus avium* cultivar *burlat*: preliminary chemical characterization

Tenreiro, M. ^{a,b}, Amaral, M.E. ^{b,c}, Duarte, A.P. ^a

^a CICS-UBI - Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Av. Infante D. Henrique, 6200-506 Covilhã, Portugal;

^b Department of Chemistry, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal

^c FibEnTech, Department of Chemistry, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal

Abstract

The cherry tree, widely distributed throughout Europe, is a designation given to several species of trees, being fruitful and producing noble wood. In Portugal, the biggest representation is in the regions of Beira Interior and Trás-os-Montes.

This work presents a preliminary study on the optimization of lignin extraction methods from pruning residues of cherry orchards of the species *Prunus avium*, *Burlat* cultivar.

The cherry branches were milled and screened to obtain a suitable particle size and the obtained sample was extracted using three different extraction methods: an alkaline process, an acidic process (with hot water followed by acetic acid), and a process using formic acid.

The characterization of the chemical composition of the cherry wood was carried out using TAPPI standards for a Klason lignin, ash content, extract content and acid chlorite method as described by Browning (1967) for the determination of holocellulose. Thus, the original sample contains 74,87% holocellulose, 26,64% Klason lignin, 7,67% extractable content and 1,53% ash content.

For the different extraction procedures, the methods were adapted from Gong *et al.* (2016) and Zhou *et al.* (2012), obtaining the following yields relative to the initial wood: acetic acid (5,33%), formic acid (18,22%) and sodium hydroxide (10,35%).

An infrared spectrophotometry with Fourier transforms (FTIR) was used for the preliminary characterization of the macromolecules of the different lignins.

References:

Browning, B. L. (1967) *Methods of Wood Chemistry*, vol. II, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Gong, W., Xiang, Z., Ye, F., Zhao, G. (2016) *Composition and structure of an antioxidant acetic acid lignin isolated from shoot shell of bamboo (Dendrocalamus Latiforus)*. *Industrial Crops and Products*. 91, 340-349.

Zhou, S., Liu, L., Wang, B., Xu, F., Sun, R. (2012) *Microwave-enhanced extraction of lignin from birch in Formic acid: Structural characterization and antioxidant activity study*. *Process Biochemistry*, 47,1799-1806.

Anexo 4 - Comunicação em poster no âmbito desta dissertação

Lignin from branches of *Prunus avium burlat* cultivar: relationship between extraction methods and antioxidant activity

Tenreiro, M.^{1,2}, Boto, R. E. F.^{1,2}, Amaral, M.E.^{2,3}, Duarte, A.P.¹

¹ CICS- Health Sciences Research Centre, Faculty of Health Science, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

² Department of Chemistry, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

³ FibEnTech-Research Unit of Fiber Materials and Environmental Technologies, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

ABSTRACT

Lignin is an integral component of plant cell walls, and it is the second most common organic substances on earth.

In the present study, branches of *Prunus avium, burlat* cultivar, were subject to different extraction processes in acid and alkaline conditions, to obtain lignin compounds. Acid extractions were done either using hot water followed by acetic acid, or formic acid in a microwave-assisted process. Alkaline processes were done using two concentrations of sodium hydroxide (0.4 and 0.7M). The resulting samples were analysed in terms of extraction yield and characterized by Fourier Transform Infrared (FTIR), as well as by total phenolic content, which was determined through Folin-Ciocalteu colorimetric method in gallic acid equivalents. The antioxidant activity of lignin was obtained by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method using trolox as a positive control, and reported as IC₅₀ and antioxidant activity index (IAA).

The lignin was obtained with yields between 5 and 18%, being the best method the one using formic acid in the microwave. The highest concentrations of phenolic compounds were found with acetic acid and formic acid extractions (182.55 and 244.32 mg of gallic acid equivalents/g dry matter, (mg GAE/g)), while alkaline extractions, 0.4M and 0.7M, presented the lowest (130 and 68.19 mg GAE/g). The value of IAA showed that the lignin extracted in acid conditions displayed very high values, i.e., 2.48 for acetic acid and 2.29 for formic acid, while the samples extracted with 0.4M and 0.7M sodium hydroxide exhibited moderate activity, i.e., 0.72 and 0.74, respectively.

Keywords: cherry tree branches; lignin; extraction optimization; antioxidant activity.

Anexo 5 - Comunicação oral no âmbito desta dissertação

Extraction conditions and characterization of lignin isolated from cherry tree residues

M. Tenreiro ^{1,2}, R. E. Boto ^{1,2}, L. Breitenfeld ¹, M.E. Amaral ^{2,3}, A.P. Duarte ¹

¹ CICS- Health Sciences Research Centre, Faculty of Health Science, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

² Department of Chemistry, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

³ FibEnTech-Research Unit of Fiber Materials and Environmental Technologies, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

Abstract

In this study, cherry residues from the branches of *Prunus avium burlat* cultivars were milled and screened to obtain a suitable particle size. The obtained sample was evaluated in terms of its initial chemical composition and was subjected to different extraction conditions in order to isolate the lignin. The chemical composition was analyzed using TAPPI standards methods for Klason lignin, ash content and extractable content. Acid chlorite method was used for the determination of holocellulose, as described by Browning (1967). Thus, the original sample contains 74.87% holocellulose, 26.64% Klason lignin, 7.67% extractable content and 1.53% ash content. Acid extractions using hot water followed by acetic acid and formic acid in a microwave-assisted process. Alkaline extractions using two concentrations of sodium hydroxide (0.4 M and 0.7 M).

The resulting samples were analyzed in terms of extraction yield and characterized by Fourier Transform Infrared (FTIR), as well as by total phenolic content (determined through Folin-Ciocalteu colorimetric method in gallic acid equivalents). The antioxidant activity was obtained by DPPH method using trolox as a positive control and reported as IC₅₀ and antioxidant activity index (IAA). The most promising samples were submitted to cytotoxicity assays. The extractions yields are between 5 and 18%, being the best method the one using formic acid in the microwave. The highest concentrations of phenolic compounds were found with acetic acid and formic acid extractions (182.55 and 244.32 mg of gallic acid equivalents/g dry matter (mg GAE/g)), while alkaline extractions, 0.4 M and 0.7 M, presented the lowest (130 and 68.19 mg GAE/g). The value of IAA showed that the lignin extracted in acid conditions displayed very high values, i.e., 2.48 for acetic acid and 2.29 for formic acid, while the samples extracted with 0.4 M and 0.7 M sodium hydroxide exhibited moderate activity, i.e., 0.72 and 0.74, respectively.

Cytotoxicity was evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test and protein determination by the bicinchoninic acid method (BCA). The effect of lignin extracts in NHDF (Normal Human Derma Fibroblast) cells line have no toxic effect on these cells. The results were particularly positive for lignin extract (0.4 M NaOH) at the lowest concentration (0.5 µg/ml) as it increased cell proliferation. However, the results for the other lignin extracts were also positive, since no cell proliferation occurred, reducing the probability of occurrence of mutations, which is explained by the absence of cell death.