

UFRRJ
INSTITUTO DE FLORESTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS E FLORESTAIS

DISSERTAÇÃO

Caracterização da lignina da raque de *Couroupita guianensis* Aubl. por técnicas de micro análise

Monique de Moura Gurgel

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E
FLORESTAIS

CARACTERIZAÇÃO DA LIGNINA DA RAQUE DE *Couroupita*
***guianensis* AUBL. POR TÉCNICAS DE MICRO ANÁLISE**

MONIQUE DE MOURA GURGEL

Sob a Orientação do Professor
Heber dos Santos Abreu

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Ambientais e Florestais**, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Tecnologia de Produtos Florestais

Seropédica, RJ
Abril de 2011

660.28
G979c
T

Gurgel, Monique de Moura, 1985-.
Caracterização da lignina da
raque de Couroupita guianensis AUBL.
por técnicas de micro análise /
Monique de Moura Gurgel. - 2011.
43 f.: il.

Orientador: Heber dos Santos
Abreu.

Dissertação (mestrado) -
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro, Programa de Pós-Graduação
em Ciências Ambientais e Florestais.
Bibliografia: f.27-33.

1. Química vegetal - Teses. 2.
Lignina - Teses. 3. Madeira -
Química - Teses. 4. Gravidade -
Anomalias - Teses. I. Abreu, Heber
dos Santos, 1953. II. Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Ambientais e Florestais.
III. Título.

*Dedico ao Deus Jeová pela
força e perseverança concedida*

*À minha dedicada e amorosa mãe Maria Lúcia por todo incentivo nas
horas em que tudo parecia insolúvel e ao meu querido pai Miguel por
todo o apoio*

*Os meus padrinhos Angela e
Wilson por acreditarem em mim*

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro por fazer parte da minha história;

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Florestais pela oportunidade;

A Capes pela concessão da bolsa;

Ao Prof. Dr. Heber pela excelente orientação, por toda paciência e essencial dedicação;

Aos meus grandes amigos Juliana Bernardo, Thiago Scoralick, Sílvia Helena, Michelle Reis, e Nayara Dorigon por todo companheirismo e ajuda de sempre;

As meninas Bruna Ugulino, Juliana Teixeira e Gilmara Palermo pela amizade;

Aos amigos, Gisely Oliveira, Daniela Paes, Thuanny Menezes, Carlos Henrique e Bruno Couto pela amizade e pela grande e divertida equipe do Laboratório de Química da Madeira, além de toda união e solidariedade;

As Dr^a. Maria Beatriz Monteiro e Regina Pereira pelos conselhos;

A amiga Dr^a. Tatiana Elias pela disponibilidade em me ajudar;

Ao auxiliar técnico José Carlos pelo apoio nas análises;

Ao Thiago Amorim; do Instituto de Biologia, pela colaboração na identificação da espécie;

Aos técnicos da serralheria que me ajudaram prontamente;

Ao Maurício do Departamento de Química (Instituto de Ciências Exatas) pelo auxílio;

A todos os membros da banca;

A todos os amigos da turma e alunos da pós-graduação, professores e funcionários, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos, muito obrigado.

RESUMO

GURGEL, Monique de Moura. **Caracterização da lignina da raque de *Couroupita guianensis* Aubl. por técnicas de micro análise.** 2011. 46p Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais). Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

O objetivo desta dissertação foi estudar por micro análise a lignificação da raque de *Couroupita guianensis*, (família Lecitidaceae, originária da Amazônia) considerando a influência da gravidade sobre a formação de tecidos especiais, tendo em vista que a raque possui um crescimento positivo com relação à força gravitacional. O experimento foi conduzido no Laboratório de Química da Madeira, onde a raque foi seca, preparada para cortes anatômicos e análise química. Os testes histoquímicos foram analisados através de imagens obtidas no microscópio óptico do tecido da raque, juntamente com microespectroscopia e espectroscopia de infravermelho-FTIR. O tecido da raque apresentou características de tecido de tensão, com fibras gelatinosas, evidenciadas pelo teste de Wiesner e pela reação de Lawrens-Takaashi (cloreto de zinco iodato). Os testes histoquímicos foram considerados eficientes e mostrou que em regiões de alta flexibilidade possui lignina siringilíca. Os espectros micro espectrométrico mostraram a existência de lignina, entretanto não o suficiente para afirmar o tipo de lignina predominante em uma determinada região do tecido. Os tecidos foram extraídos com NaOH 1% e com acetona, contudo, os espectros no infravermelho dos cortes transversais pré-extraídos com acetona, permitiu identificar sinais característicos de lignina guaiacilíca e siringilíca. Os espectros do material moído somente extraídos com solventes orgânicos (ciclohexano, acetato de etila e metanol) ou com NaOH 1% por 1 hora confirmaram que as ligninas são do tipo guaiacila e siringila.

Palavras-chave: Gravidade, tecido de tensão, lignina e infravermelho.

ABSTRACT

GURGEL, Monique de Moura. **Characterization of lignin from rachis of *Couroupita guianensis* Aubl. for micro analysis techniques.** 2011. 46p Dissertation (Master in Environment and Forest Science). Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

The purpose of this dissertation was to study by the micro analysis the rachis lignification of *Couroupita guianensis* (Lecitidaceae family, originally from the Amazon) considering the influence of gravity on the formation of special tissues in order that the rachis has a positive growth with respect to the gravitational force. The experiment was conducted at the Laboratory of Wood Chemistry, where the rachis was dried, prepared to cutting anatomical and chemical analysis. Histochemical tests were analyzed by optical microscope images of tissue of the rachis, with microspectroscopy and infrared spectroscopy-FTIR. The tissue of the rachis presented features of tissue tension, with gelatinous fibers, as evidenced by the Wiesner test and the reaction Lawrens-Takaashi (zinc chloride iodate). Histochemical tests were efficient and showed that in regions of high flexibility has syringyl lignin. The micro spectrometric spectra showed the existence of lignin, but not enough to affirm the predominant type of lignin in a given region of tissue. The tissues were extracted with NaOH 1% and acetone, however, the infrared spectra of the cross sections pre-extracted with acetone, allowed to identify characteristic signs of guaiacyl and syringyl. Spectra of the milled material only extracted with organic solvents (cyclohexane, ethyl acetate ethyl and methanol) or with 1% NaOH for 1 hour confirmed that lignins are guaiacyl and syringyl type.

Key words: Gravity, tension tissue, lignin and infrared.

LISTA DE TABELA

Tabela 1	25
-----------------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	4
Figura 2	5
Figura 3	7
Figura 4	11
Figura 5	11
Figura 6	12
Figura 7	12
Figura 8	13
Figura 9	14
Figura 10	15
Figura 11	16
Figura 12	17
Figura 13	18
Figura 14	18
Figura 15	20
Figura 16	22
Figura 17	23
Figura 18	24

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Lignina.....	2
2.2 Lignificação	3
2.3 Tecido de reação.....	7
2.4 Gravidade.....	9
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1 Microscopia de campo claro.....	11
3.2 Testes histoquímicos	12
3.3 Microespectroscopia no Infravermelho	13
3.4 Espectroscopia no Infravermelho	14
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4.1 Microscopia de campo claro.....	14
4.2 Testes histoquímicos	16
4.3 Microespectroscopia no Infravermelho	19
4.4 Espectroscopia no Infravermelho	21
4.4.4 Material moído	21
5 CONCLUSÕES	26
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
ANEXO	37
ANEXO 1	37
ANEXO 2	40
ANEXO 3	43
ANEXO 4	46

1 INTRODUÇÃO

O surgimento da lignina na face da terra ainda é alvo de especulações teóricas, às quais definem sua existência em decorrência do crescimento verticalizado dos vegetais superiores e é considerada a chave de inovação para a adaptação das plantas em meio terrestre. LEWIS & SARKANEN (1998) mencionam o processo evolutivo da lignina, a partir das algas verdes com a presença de substâncias semelhantes à lignina (lignanas); contudo, pouco se tem confirmado sobre a existência dela, propriamente dita, em organismos não vasculares, como as algas. Entretanto, em razão da descoberta da presença de lignina em algas vermelhas (*Calliarthron cheilosporioides*), somados a uma composição atípica, novas discussões deverão surgir dentro da comunidade científica (MARTONE et al., 2009).

A existência de plantas terrestre trouxe significativas mudanças e dentre elas, estruturais e químicas, para melhor transportar a água, as substâncias e os gases, desenvolvendo células com parede secundária lignificada, com propriedades hidráulicas e de sustentação mecânicas, muitas vezes apoiadas em concentrações maiores de lignina na parede primária ou secundária (FRIEDMAN & COOK, 2000).

A lignina é o segundo maior componente das plantas após a celulose, sendo considerada um dos componentes mais predominantes da biomassa das plantas, com grande relevância para uso energético, compreendendo cerca de 25% (WEGNER & FENGEL, 1984; HIGUCHI, 1990). É denominada atualmente como macromolécula tradicional cuja composição se reflete numa base comum de precursores fenilpropanoídicos levando a um complexo tridimensional associado a ligações cruzadas com os demais constituintes da parede celular, divergindo um pouco das ligninas anormais formadas em decorrência da desarrumação da rota fenilpropanoídica (RALPH et al., 2004). Essas ligninas possuem uma composição diferenciada além das três unidades básicas, como consequência da modificação pela engenharia genética que redesenha alterações nas rotas biossintéticas (ANTEROLA & LEWIS, 2002; HUMPHREYS & CHAPPLE, 2002; BAUCHER et al., 2003).

O arranjo das moléculas de lignina no tecido vegetal foi fundamental para o estabelecimento das plantas na terra; tanto para o seu crescimento quanto para seu desenvolvimento. Somando-se a isso, promoveu a regulação do ciclo de carbono e influenciou a resistência aos estresses abióticos e bióticos. Tudo isso contribuiu principalmente para o aprimoramento da agricultura e para a utilização de materiais à base de madeira (PETER & NEALE, 2004).

A vida na Terra, com toda sua diversidade e complexidade, sustenta-se sob constantes alterações das condições ambientais. A força gravitacional, apesar de ser uma das forças mais constantes, exerce pequena variação para os organismos que se reparam sobre a crosta terrestre (VOLKMANN & BALUSKA, 2006).

Embora as plantas cresçam sob a influência da gravidade, pouco é conhecido sobre o comportamento das plantas e sua consequência sobre o crescimento das mesmas (MUSGRAVE, 2002). A influência da gravidade no processo de lignificação tem sido divulgada a partir de experimentos sob condições de microgravidade (STUTTE et al., 2006). Há descrições experimentais de laboratório que simulam condições de efeito da gravidade refletindo em acúmulo de lignina na parede celular (ALLEN et al., 2009).

O processo de formação de uma planta é determinado pelas características genéticas e influenciado pelas pressões ambientais, tais como a gravidade. Em resposta a esses estímulos ambientais, as árvores são capazes de reorientarem seus eixos, ramos, galhos ou tronco a fim de restabelecerem o equilíbrio, desenvolvendo um tecido especial. (DU & YAMAMOTO, 2007; DÉRJARDIN et al., 2010).

As características e a localização dos tecidos especiais diferem entre os grupos de plantas. Nas gimnospermas é chamado tecido de compressão e nas angiospermas; tecido de tensão. As plantas que geralmente crescem com influência da gravidade desenvolvem tecidos cuja composição química e propriedades físicas se diferem do caule principal (DU & YAMAMOTO, 2007).

Partes de plantas que têm seu crescimento no sentido da força gravitacional podem apresentar alterações químicas, principalmente em relação ao teor de lignina, modificações a níveis composicionais e organizacionais dos elementos da parede celular e das células (HOSON, 2003). Um exemplo de espécie lenhosa que apresenta a raque (ramo de fluorescência) em crescimento no sentido da força gravitacional é a *Couroupita guianensis* Aubl., popularmente designada como Abricó de macaco, Castanha de macaco, amêndoa dos Andes e Macacarecuia; pertencente à família Lecitidaceae (cerca de 25 gêneros e 400 espécies) e distribuída nas regiões tropicais da América do Sul (LORENZI, 2000). Nativos da região amazônica e de outros estados da região norte do Brasil fazem uso de infusões e chás obtidos de folhas, flores e galhos da *Couroupita guianensis* para tratamento de hipertensão, tumores e processos inflamatórios (SANZ-BISET et al., 2009). Para o presente trabalho, a raque de *Couroupita guianensis* foi alvo de estudo dado o seu comportamento semelhante ao crescimento que simboliza o efeito oposto da gravidade.

A proposta da pesquisa baseia-se no fato de que a existência e composição da lignina são ativadas ou desativadas pela influência da gravidade, à qual estimula ou desestimula a formação de substâncias nos tecidos de sustentação. Neste sentido, a presente dissertação tem como princípio substanciar a possível influência da gravidade no teor da lignina e sua composição em raque de *Couroupita guianensis* Aubl., a qual sustenta um fruto que quando adulto pesa mais de 500 g.

O objetivo do trabalho foi estudar por micro análise a lignificação da raque de *Couroupita guianensis* Aubl., considerando a influência da gravidade sobre a formação de tecidos especiais. Como objetivos específicos, foram determinar o teor de lignina do caule e da raque; caracterizar *in loco* lignina da raque através de micro análise utilizando espectroscopia no infravermelho e microscopia de campo claro; identificar particularidades da lignificação por teste histoquímico e contextualizar o efeito da gravidade sobre a lignificação da raque de *Couroupita guianensis* Aubl.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Lignina

A primeira evidência da constituição da lignina foi obtida em 1874 por Tiemann e Haarman, os quais determinaram a estrutura química do álcool coniferílico e a unidade β -glicosídica. Em 1933, Erdtman, trouxe uma relevante contribuição para a bioquímica da lignina, designando-a como resultado da desidrogenação de seus monômeros precursores (LEWIS, 1999). No seu grupo de estudo, desenvolvido nas décadas de cinquenta e sessenta, Freudenberg propôs a primeira fórmula química da lignina (FREUDENBERG, 1968).

Pesquisadores consideram que a lignina na parede celular foi o agente principal para a evolução das plantas do meio aquático para o terrestre a mais de 475 milhões de anos atrás (KENDRICK et al., 1997; PETER & NEALE, 2004; BOYCE et al., 2004). Lewis &

SARKANEN (1998) consideram que a lignina é a etapa final da via fenilpropanoídica e que sem a qual não haveria vidas superiores na face da terra.

Em células condutoras de água; como os traqueídeos e os elementos de vaso do xilema das plantas, tiveram suas paredes reforçadas por um polímero fenólico de elevado efeito hidrofóbico e imóvel, conhecido como lignina. Essa essencial adaptação proporcionou o apoio biomecânico dos ramos laterais e estruturas aéreas (copa); permitiu que as plantas adotassem um hábito de crescimento ereto, além de fornecer resistência ao colapso das células sob a tensão da água (MARTONE, 2009).

A lignina confere resistência, rigidez e hidrofobicidade à parede celular, formando intensas ligações cruzadas com a matriz unindo as microfibrilas e outros componentes da parede (BAUCHER et al., 2003). Conforme descrito anteriormente, a lignina concede às células capacidade de suportar a força da gravidade, o estresse mecânico e a pressão negativa gerada pela transpiração. A lignificação ocorre durante o desenvolvimento normal do tecido, e diversos estresses bióticos e abióticos como ferimentos ou infecções causados por patógenos, podem desencadear a produção de lignina. Em face de sua característica estrutural e a abundância de átomos de carbono torna-se altamente resistente à degradação enzimática e, portanto, contribui para a defesa física e química contra herbívoros (VANCE et al., 1980; LANGE et al., 1995; ROGERS & CAMPBELL, 2004;).

A resistência da lignina à degradação tem impulsionado cientistas a estudar sua estrutura e biossíntese em relação à alimentação animal, pois esta reduz a qualidade nutricional (MOORE & JUNG, 2001). Outro campo que os cientistas têm se dedicado é a remoção da lignina durante a preparação da polpa celulósica. O alto custo energético e o grande impacto ambiental são preocupações mais imediatas (DEAN, 2005).

Mais recentemente, a formação da lignina e sua manipulação tem sido alvo de pesquisa no que tange à produção de bioenergia (WENG et al., 2008; SIMS et al., 2010). A lignina atua como um agente protetor da celulose, aumentando os custos na produção de açúcares fermentáveis para geração de etanol de segunda geração, entre outros biocombustíveis (CHEN & DIXON, 2007).

Para complementar o avanço desses estudos, as tecnologias genéticas têm facilitado a identificação dos fatores que regulam e controlam a lignificação e têm alterado genes para que se possa entender o processo de ativação enzimática dos monômeros que formam a lignina (ZHOU et al., 2009).

A lignina é um produto da via fenilpropanoídica e de sua formação derivam outras substâncias, como a suberina, e também flavonóides, ácidos hidroxicinâmicos, éster, lignanas, taninos e estilbenos (UMEZAWA, 2009).

A formação da lignina é um dos processos que mais demandam energia em plantas, requerendo grande quantidade de esqueletos de carbono e que para tal, consome em média entre 30-40% da energia utilizada pelos vegetais (GOTTLIEB, 1989; GOTTLIEB et al., 1995).

2.2 Lignificação

Ao processo de deposição da lignina nos tecidos vegetais dá-se o nome de lignificação. Este é um processo bioquímico que abrange a formação de monolignóis, seu transporte e a polimerização na parede celular.

A formação da lignina compreende duas fases. A primeira fase é determinada pela ação enzimática e ocorre no citoplasma (oxidação horizontal). A princípio a biossíntese da lignina inicia-se através da condensação envolvendo as substâncias 4- fosfato de eritrose e o ácido fosfoenolpirúvico que é derivado da glicose através da glicólise. Ambos são iniciadores

de uma via biossintética que através de reação de condensação e de várias transformações, forma o ácido chiquímico e em seguida os precursores iniciais (alcoóis *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico), representados na Figura 1 (ABREU, 1994).

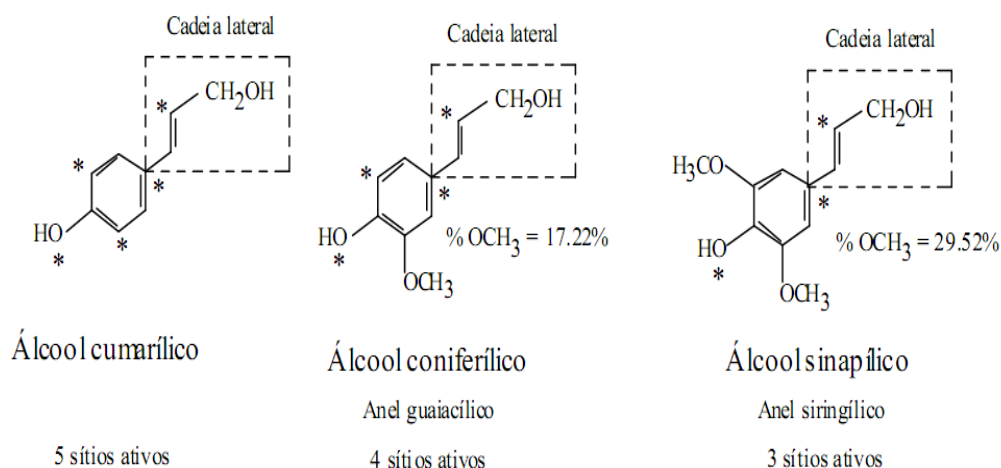


Figura 1. Precursores da Lignina (ABREU et al., 1999).

Após a formação dos precursores da lignina no citoplasma, estes são exportados para o meio extracelular (apoplasto) através da formação de glicosídeos e seu restabelecimento pela ação da beta-glicosidase (BAUCHER et al., 2003). Depois de alcançarem o apoplasto, os monolignóis sofrem uma abstração de hidrogênio fenólico por meio de enzimas ligadas a parede celular denominadas por peroxidases e/ou lacases formando um sistema coordenado com peróxido de hidrogênio altamente reativo, iniciando a segunda fase (oxidação vertical), (ABREU et al., 1999).

Ou seja, essas enzimas quebram uma ligação covalente entre o oxigênio da unidade fenólica e o seu hidrogênio. A ligação é rompida homoliticamente de tal modo que um elétron fica com o oxigênio e o outro vai com o hidrogênio (SJOSTRON, 1992), gerando radicais livres. O radical livre inicial é estabilizado pelo deslocamento do elétron ao longo da molécula, em um processo conhecido como estabilização por ressonância (ARGYROPOUPOS & MENACHEM, 1997). Deste modo, é formada uma série de radicais livres estabilizados por ressonância, (estruturas canônicas), em equilíbrio constante entre si (Figura 2).

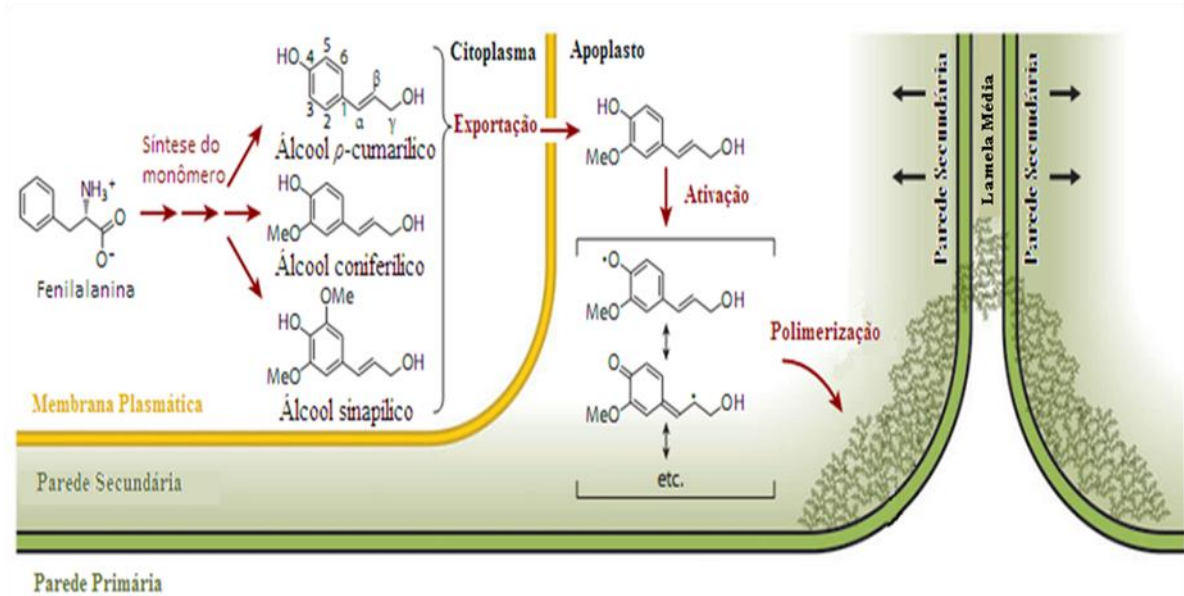


Figura 2. Biossíntese da lignina a nível celular (BONAWITZ & CHAPPLE, 2010).

A lignina deriva-se da fenilalanina; levando a formação do ácido cinâmico na fase inicial da via fenilpropanoídica (pós-corísmica), e envolve uma série de reações de hidroxilação e subseqüentes metilações, assim como, a redução da cadeia lateral que sustenta grupos carboxílicos terminais, reduzindo-os aldeídos e em alcoóis ρ -cumarílico, coniferílico e sinapílico. Quando estes são incorporados, as ligninas são denominadas cumarílica (H), guaiacílica (G) e siringílica (S) respectivamente e a proporção destas variam entre espécies, entre tecidos de uma mesma planta, dentro da parede celular, e em resposta a estímulos ambientais. Embora, exceções existam, a lignina das angiospermas consiste principalmente de unidades G e S, podendo conter traços de unidades H. As gimnospermas são compostas especialmente de unidades G, com baixos níveis de unidades H (RALPH, 2004; ROGERS & CAMPBELL, 2004).

As variações quantitativas e qualitativas da lignina nas plantas podem ter sido influenciadas por uma série de fatores. De uma forma geral, as plantas arbóreas possuem alto teor de lignina em relação aos arbustos e herbáceas, podendo alcançar valores superiores a 35% em relação a sua massa seca (FENGEL & WEGENER, 1984). Os fatores edáficos e atmosféricos, acompanhados de uma situação extrema de estresse ambiental, podem ter sido responsáveis pelas marcantes modificações fenotípicas e genotípicas das plantas superiores (GOTTLIEB, 1989; GOTTLIEB et al., 1995).

Há inúmeras propostas, ainda não concretas, sobre a formação de ligações intra e intermoleculares. Por exemplo: o acoplamento pode ocorrer com dois outros radicais (combinação de dois monolignóis, um monolignol e o polímero da lignina ou entre dois polímeros) e para prosseguir o alongamento da cadeia, segundo RALPH (2004) & BAUCHER (2003) devem ocorrer subseqüentes ativações de oxidação desidrogenativas.

Os três diferentes precursores da lignina podem fazer ligações entre si, dependendo do padrão de substituição do anel aromático referente aos precursores e sítios ativos para o acoplamento intramolecular (Figura 1) (RALPH, 2004).

A formação molecular das ligninas primitivas, por exemplo, baseia-se no mais alto valor de NTLI (Número Teórico de Ligações Intermonoméricas) (ABREU et al., 1999). Neste contexto, as ligninas cumarílicas são formadas segundo cinco centros reativos, apresentando-se com estruturas moleculares extremamente complexas, formando extensa rede de ligações

cruzadas na parede celular. Enquanto os demais alcoóis dão origem às moléculas de lignina mais simples em termos de rede de ligações inter e intramoleculares. Do mesmo modo o número máximo de combinações ou ligações intermonoméricas sob base teórica na proporção (1:1) entre os radicais precursores, diminui a partir dos precursores álcool cumarílico para o álcool sinapílico. Isto revela que a variação composicional tem papel importante na estrutura molecular da lignina e que a rede de ligações carbono-carbono e carbono-oxigênio conferem possivelmente maior ou menor flexibilidade estrutural aos vegetais (ABREU et al., 1999, ABREU et al., 2003; ABREU et al., 2009), relacionado-se aos grupos botânicos, cuja complexidade molecular diminui segundo a escala evolutiva de pteridófitas, gimnospermas e angiospermas.

A formação da lignina envolve um complexo sistema enzimático formando precursores intermediários e finais da lignina. O metabolismo dos fenilpropanóides inclui caminhos bioquímicos que permitem às plantas diversas combinações e muitas destas vias atuam como intermediadoras à síntese da lignina (BOATRIGT, et al., 2004).

A síntese da lignina requer desaminação, hidroxilação em uma, duas ou três posições do anel aromático, metilação em um ou dois dos grupos hidroxílicos, e duas sucessivas reduções da cadeia lateral do monolignol, de ácido carboxílico a aldeído primeiramente e a álcool. Estas reações são mediadas pela fenilalanina amônia-liase (PAL), três diferentes citocromos P450-dependentes monooxigenases (C4H, C3H e F5H), duas metiltransferases (CCoAOMT e COMT), e duas oxidoredutases (CCR e CAD). Adicionado a essas oito enzimas, duas enzimas são necessárias, 4CL e HCT, atuando como substrato para as reações (Figura 3).

A PAL (fenilalanina amônia-liase) está cometida ao primeiro passo para a biossíntese dos fenilpropanóides, catalisa a desaminação da fenilalanina em ácido cinâmico, e juntamente com C4H (Cinamato-4-hidroxilase) e 4CL (Hidroxicinamoil CoA ligase), é essencial para a síntese de todas os fenilpropanóides.

A C4H controla a conversão do cinamato em *p*-cumarato. É o primeiro citocromo monooxigenase P450-dependente da via fenilpropanóide. São catalisadas três reações de hidroxilação sucessivas no anel na formação do monolignol, começando pela enzima C4H, seguido da C3H (4-hidroxicinamato 3-hidroxilase) e da F5H (ferulato-5-hidroxilase) (DIXON et al., 2001).

A 4CL é uma ATP-dependente e catalisa a síntese do *p*-cumaroil CoA. Este é então usado como um doador de acila pela HCT (aciltransferase) para sintetizar o chiquimato *p*-cumaroil, sofrendo hidroxilação pela C3H (DAVIN, et al., 2008).

A enzima CCoAOMT (Cafeoil coenzima A O-metiltransferase) catalisa a metilação de cafeoil CoA a feruloil CoA (DO, et al., 2007). E a COMT (5-Adenosil-metionina:cafeato/5-hidroxi) catalisa a metilação do cafealdeído e do 5-hidroxiciniferaldeído a coniferaldeído e sinapaldeído, respectivamente (VAN DOORSSELAERE et al., 1995). A F5H (Ferulato-5-hidroxilase) participa da biossíntese de monômeros da lignina siringila, através da hidroxilação na posição 5 do coniferaldeído e/ou do álcool coniferílico. (LI et al., 2000; HUMPHREYS & CHAPPLE, 2002).

A redução do tio ésteres do hidroxicinamoil CoA a hidroxicinamalaldeídos e a alcoóis hidroxicinamal é catalisada pela CCR (Hidroxicinamoil CoA redutase) e a CAD (Cinamil álcool desidrogenase). A CCR é considerada uma enzima específica da via biossintética dos monolignóis. A CAD catalisa o último passo reduzindo os aldeídos aos alcoóis correspondentes (cumarílico, coniferílico e sinapílico) (CHABANNES, et al., 2001).

O caminho relativamente menor para a formação do álcool *p*-cumarílico (lignina H) requer somente as enzimas PAL, C4H, 4CL, CCR e CAD, enquanto que para síntese do álcool coniferílico (lignina G), requer estas cinco enzimas mais HCT, C3H e CCoAOMT, e para síntese do álcool sinapílico (lignina S) requer as dez enzimas, incluindo a F5H e COMT.

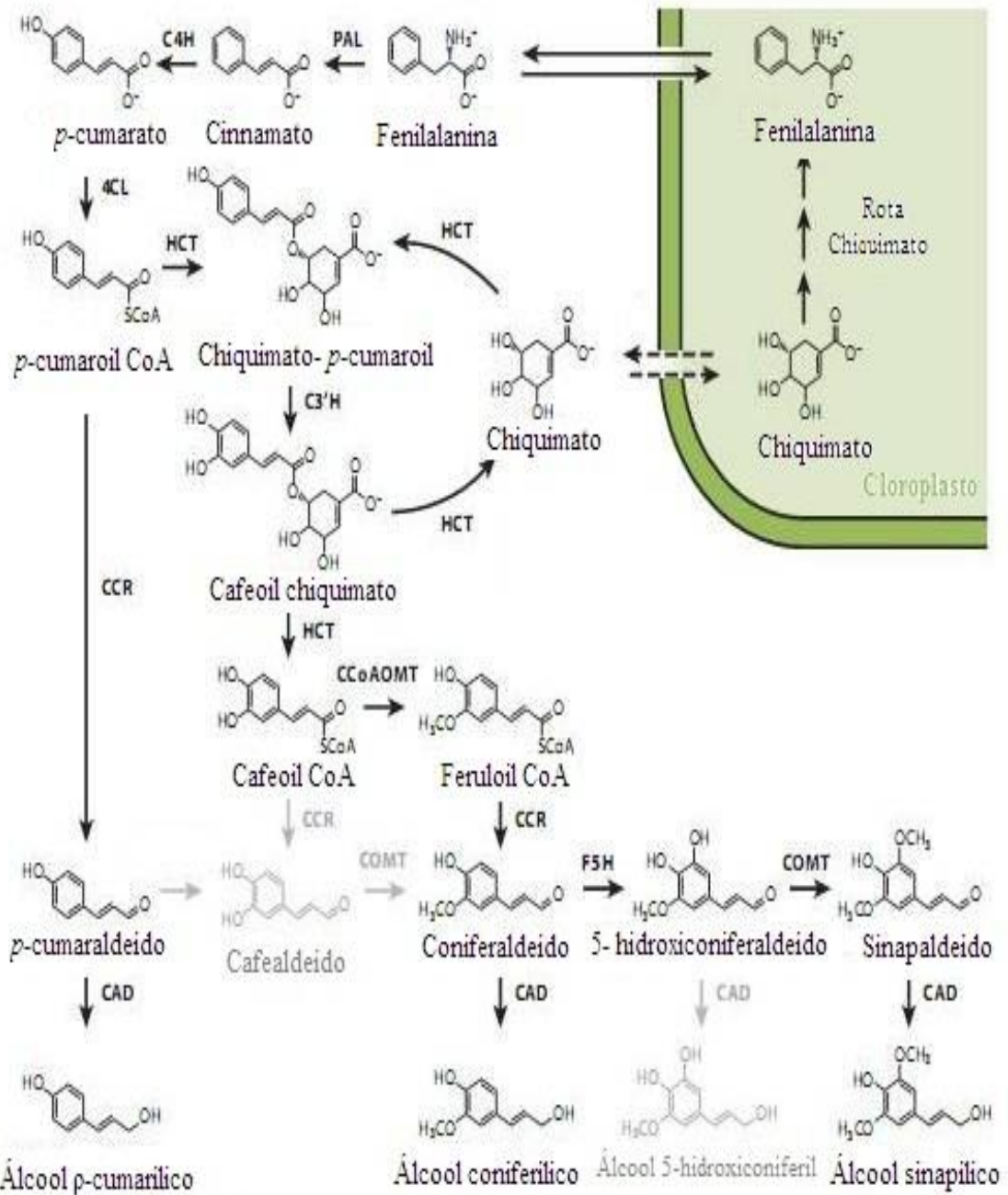


Figura 3. Biossíntese de monolignóis através da rota fenilpropanoídica (BONAWITZ & CHAPPLE, 2010).

2.3 Tecido de reação

A formação da madeira envolve vários mecanismos de diferenciação envolvendo padrões genéticos e ambientais, que se modificam de uma árvore para outra e ao longo dos anos. Água, nutrientes, temperatura, fotoperíodo, vento, gravidade e hormônios são fatores

que influenciam a formação da madeira (ZIMMERMANN & BROWN, 1971; ZOBEL & BUIJTENEN, 1989; LARSON, 1994; CHAFFEY, 2002).

As variações das propriedades da madeira podem ocorrer em uma mesma espécie e entre genótipos de espécies diferentes. Em cada árvore, as características anatômicas, químicas e físicas diferem entre regiões do mesmo indivíduo e, estas são importantes porque definem não só a importância, mas, sobretudo o uso de uma determinada madeira. As alterações predominantes em uma árvore incluem madeira juvenil e adulta, lenho inicial e tardio, cerne e alborno, e tecido de reação (DU & YAMAMOTO, 2007).

A formação e as propriedades do tecido de reação são alvo de investigação por muitos anatomistas, fisiologistas e recentemente geneticistas. O tipo de tecido de reação difere entre grupos lenhosos (WARDROP, 1964; WILSON & ARCHER, 1977; TIMELL, 1986; PLOMION et al., 2001; BONAWITZ & CHAPPLE, 2010). Em gimnospermas, é chamada de tecido de compressão, e se desenvolve na parte inferior do ramo inclinado, onde o tecido sofre um estresse de compressão.

De acordo com Du e Yamamoto (2007), uma característica importante do tecido de compressão é o formato arredondado dos traqueídeos, resultando em espaços intercelulares. A parede celular é mais espessa quando comparada ao de um tecido normal da madeira e apresenta maior teor de lignina e menor de celulose.

A reação da madeira em angiospermas é chamada de tecido de tensão e ocorre na região superior do tronco ou ramo lateral, onde o local do tecido é mantido sobre tensão. Anatomicamente, o tecido de tensão tem um padrão generalizado, variando dependendo da espécie. JOUREZ et al. (2001) inferiram, após análise de imagens em tecido normal e em tecido de tensão, os quais sofreram estímulos gravitacionais, que em ambos, fibras e vasos, foram significativamente mais longos em tecidos de tensão, em resultado de uma prolongada diferenciação celular. Estes mesmos autores observaram uma expressiva redução da área e da frequência dos vasos, e um aumento na proporção das fibras com uma estrutura diferenciada, uma parede celular espessa. Geralmente é descrito por conter elevada proporção de celulose e por ser menos lignificado que o tecido que um tecido normal em madeiras (WADA, et al., 1995; HABRANT, et al., 2003). Sendo que em ambos os tecidos, (tecido de tensão e de compressão) ocorre um aumento da lignificação na região inferior da haste ou ramo (WARDROP, 1965).

Uma característica marcante da fibra do tecido de tensão é a presença de uma camada espessa, interna, não muito coesa às outras camadas da parede celular, de origem celulósica, cristalina e gelatinosa, denominada de camada G, a qual não é encontrada em fibras de tecido que não sofrem tensão (PILATE et al. 2004).

As microfibrilas do tecido de tensão são orientadas quase paralelamente ou paralelamente ao eixo longitudinal das fibras, porém, a natureza do estímulo e o controle mecânico das alterações das microfibrilas da celulose de tecido de tensão não são ainda totalmente esclarecidos (KWON, 2008).

Embora a camada G tenha espessura variável, esta pode normalmente substituir o interior da camada S3 da parede secundária, a camada S2 e S3, ou ser incorporada à camada S3 (CÔTÉ, 1969).

Alguns casos especiais de tecidos foram observados por pesquisadores onde o padrão para o tecido de reação não corresponde aos grupos da gimnosperma ou angiosperma. Em Cycadales, uma angiosperma, não foi observado reação no tecido e em Gnetales, considerada gimnosperma, não há formação de tecido de compressão, porém ambas podem formar tecido de tensão. Uma primitiva angiosperma; da ordem Buxus, produziu tecido de compressão (TIMELL, 1986; YOSHIZAWA, et al., 1993; TOMLINSON, 2001).

Mais de um fator pode contribuir como estímulo inicial para indução da formação do tecido de reação. Estudos anteriores consideram o tecido de compressão como um reforço

causado pela pressão exercida pelo vento. Contudo, um experimento onde o ramo do vegetal foi inclinado com auxílio de uma corda revelou a formação de tecido de compressão na região mais inferior, mesmo não possuindo a pressão do peso do ramo, sugerindo a gravidade como o único estímulo (HARTIG, 1901). Desde então, vários experimentos tem mostrado a gravidade como responsável pela formação do tecido de reação.

Estudos também confirmam que estresses mecânicos implicam no desenvolvimento de madeira de reação. Recentes abordagens da NASA mostram novas evidências de estímulos mecânicos formando tecido de compressão (KWON, et al. 2001). Segundo BERTHIER & STOKES (2005), perturbações mecânicas frequentes como ventos em mudas de pinus provocam inclinação ou uma reorientação mais rápido, do que em mudas que não sofrem essa pressão. Porém, experimentos semelhantes para tecido de tensão não foi relatado (DU & YAMAMOTO, 2007).

A madeira de reação pode ser controlada por mecanismos internos do vegetal caso um ramo seja removido, por exemplo, ou em resposta a mudanças ambientais. Tais modificações resultando em um tecido de reação podem ser interpretadas como uma condição de equilíbrio que foi rompida. Consequentemente, o tecido de reação é sempre formado no lado em que restabelecerá a posição de equilíbrio do caule ou de um ramo.

2.4 Gravidade

A vida na Terra, com toda sua diversidade e complexidade, tem se desenvolvido sob constantes mudanças ambientais. A força gravitacional, porém, é uma das influências mais constantes e que sofre pequena variação, dependendo da posição do objeto ou organismo na Terra e a massa que sofre o impacto dessa força.

A homogeneidade do ambiente aquático em oposto à heterogeneidade do ambiente terrestre e do ar é decorrente da temperatura, distribuição dos nutrientes, radiação, força mecânica. Para esses quatro parâmetros, a variação é moderada no hábitat aquático, enquanto que na Terra e no ar é elevada. Portanto, para que as plantas ocupassem o ambiente terrestre, as mesmas necessitaram ter mecanismos para solucionar problemas graves quanto à regulação da temperatura, absorção de nutrientes, à radiação solar e resistência as forças mecânicas (VOLKMASNN & BALUSKA, 2006).

Apesar de a gravidade ser relativamente constante na Terra, a pressão mecânica sobre os organismos é mil vezes maior na Terra do que na água, devido principalmente a variação da densidade. Essa pressão acabou resultando em um crescimento antigravitacional dos organismos e das plantas (VOLKMASNN & BALUSKA, 2006).

As plantas, por sua vez, modificaram estruturalmente suas paredes celulares por meio da lignificação para suportar a pressão externa e mecânica, surgindo principalmente na periferia do corpo da planta, nos tecidos de condução, tanto no espessamento vascular quanto em torno dos vasos (VOLKMASNN & BALUSKA, 2006).

Embora se saiba que a gravidade possibilitou o surgimento de plantas na face da Terra, pouco é conhecido sobre como essa força influenciou o crescimento e a forma das plantas (MUSGRAVE, 2002, 2007).

O uso de plantas superiores como base para a manutenção da vida é de interesse da NASA a mais de 40 anos, principalmente em grandes missões espaciais. No entanto, a taxa fotossintética das plantas, considerada um processo biológico simples, baseia-se na troca de gases (captura de CO₂ e liberação de O₂) e é um componente crítico para a geração de alimentos. Em virtude disso, é essencial determinar os impactos num ambiente onde impera a microgravidade (no espaço) sobre o desenvolvimento das plantas (STUTTE et al., 2006).

A maioria dos experimentos usando mudas de plantas, relacionados com micro (menor que 10^{-3} g) e hipergravidade (maior que 1 g) não foram o suficiente para entender o papel da gravidade na formação da planta madura (ALLEN et al., 2009).

Mudas de *Arabidopsis thaliana* em estufas reguladas para condições de hipergravidade mostraram aumento na raque. Outras alterações, incluindo o incremento em altura e em diâmetro reduziu (ALLEN et al., 2009). Outros estudos apontam a inibição do alongamento das raízes e aumento da espessura da parede celular em *Vigna* e *Arabidopsis* (SOGA et al., 2005 ; NAKABAYASHI et al., 2006).

Alguns estudos no passado relataram que plantas expostas a microgravidade obtiveram redução em componentes da parede celular, como a celulose e lignina (COWLES et al., 1984; NEDUKHA, 1996) e aumento no teor de metabólitos secundários (glucosinolatos e isoflavonóides) (MUSGRAVE et al., 2005) ou nenhuma variação em condições ambientais adequadas fornecidas ao sistema (LEVINE et al., 2001a; LEVINE et al., 2001b). Em contraste, a hipergravidade induziu a atividade da fenilalanina amônia-liase e da lignina (WAKABAYASHI et al., 2005 ; TAMAOKI et al., 2006), enquanto que o teor de glucosinolatos diminuiu (DARNELL et al., 2007).

A expansão dos ramos, sob a ação da variação da gravidade com valores elevados, não foi acompanhada com o aumento do teor da lignina, porém os tamanhos das pontuações, do córtex e do tecido vascular aumentaram (ALLEN et al., 2009).

A hipergravidade representa as condições em que prevalece na Terra ($9,8 \text{ m/s}^2$), onde as plantas têm um crescimento oposto ao sentido da força gravitacional, enquanto a microgravidade representa as condições onde a gravidade tem valores muito baixos ou nulos, como na Lua ou em Marte, podendo alterar a orientação dos ramos ou troncos para o sentido a favor da gravidade, como verificado com o crescimento da raque de *Couroupita guianensis* Aubl.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As raques de *Couroupita guianensis* Aubl. foram coletadas de árvores situadas no campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em Seropédica, e o experimento foi conduzido no Laboratório de Química da Madeira, Departamento de Produtos Florestais, do Instituto de Florestas. A espécie foi identificada e registrada no Herbário do departamento de Botânica (RBR) do Instituto de Biologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

As raques foram retiradas aleatoriamente das árvores a 2 metros de altura a partir do solo e utilizadas para confecção de cortes anatômicos. A Figura 4 ilustra a disposição da raque no tronco e as regiões de estudo (região superior e região inferior), de onde foram registrados espectros no infravermelho.

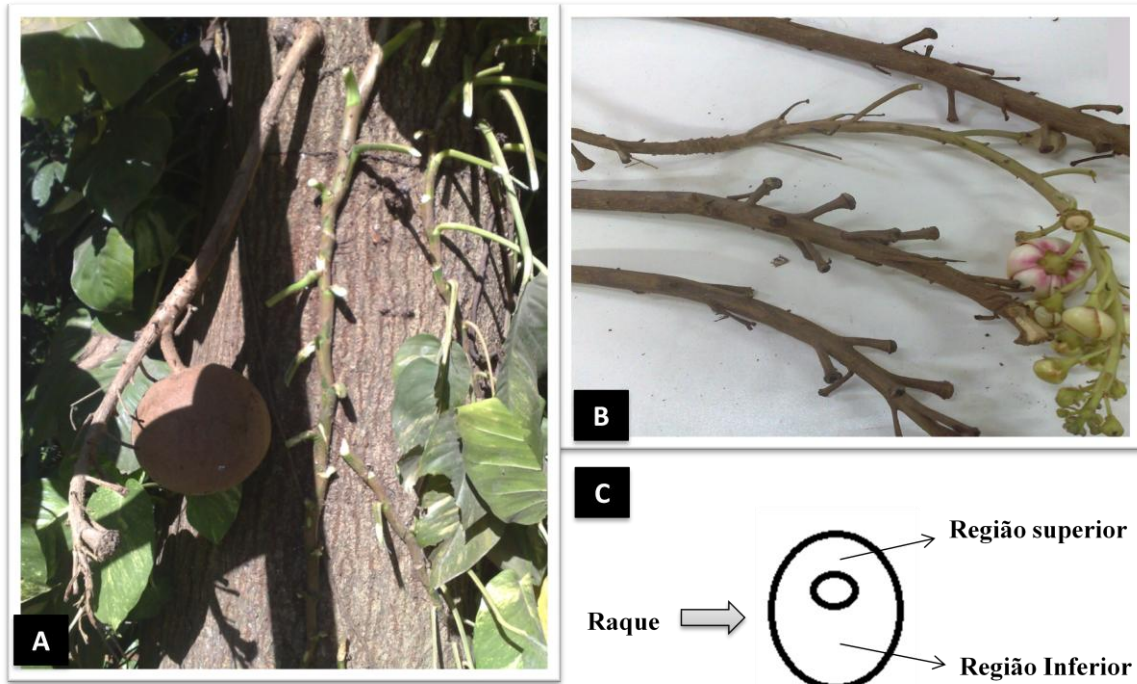


Figura 4. A- Disposição da raque de *Couroupita guianensis* no tronco da árvore; B- Raques utilizadas para confecções dos cortes anatômicos e, C- Regiões de estudo da raque.

Foi utilizada a raque inteira e a raque dividida em 4 regiões distintas, sendo: regiões superior e inferior, próximas ao tronco e ao fruto (Figura 5), totalizando 5 amostras.

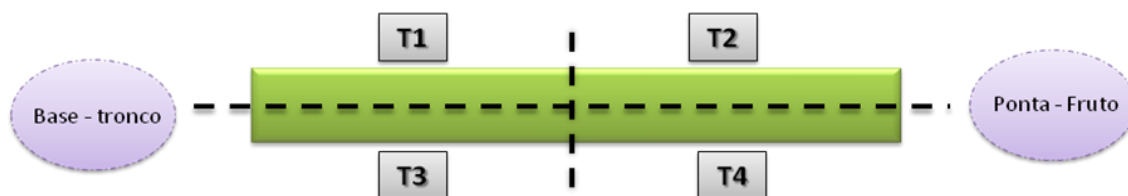


Figura 5. Representação da divisão da raque em 4 regiões. T1- região superior próxima ao tronco; T2- região superior próxima ao fruto; T3- região inferior próxima ao tronco; T4- região inferior próxima ao fruto.

3.1 Microscopia de campo claro

Cortes transversais com espessura de 10 μ m foram confeccionados através de um micrótomo (MICROM HM450), e em seguida, fixados em FAA (50mL de formaldeído 40%, 50mL de ácido acético glacial, 90mL de etanol 50%) por 2 dias e submetidos a dois métodos de coloração (KRAUS & ARDWIN, 1997).

O primeiro consistiu na coloração com uma solução alcoólica de safranina O (1g de safranina em 65mL de etanol 100% e 30mL de água destilada) por 2h, lavados três vezes em etanol 85% por 5 minutos, corados novamente com uma solução alcoólica de azul de astra (1g de azul de astra em 100mL de etanol 100% e 5mL água destilada por 3 min.; e lavados rapidamente em etanol absoluto 95%) (VASQUEZ COOZ & MEYER, 2002).

No segundo método, os cortes foram corados com safranina O 2% durante 24h e rapidamente lavados em água destilada e etanol 70% como recomendado por JENSEN (1962). Foram montados em lâmina e lamínulas com água e lutadas com esmalte incolor.

3.2 Testes histoquímicos

Os cortes, com 20 μm , foram submetidos a uma pré-extração com acetona por 1 hora para remoção dos extrativos, e posterior realização dos seguintes testes histoquímicos: Mäule, Wiesner, Cloreto de Zinco Iodato (Lawrens-Takaashi).

Os cortes foram submetidos ao teste de Mäule para identificação do tipo de lignina (guaiacólica e/ ou siringílica) (LIN & DENCE, 1992). A Figura 6 mostra uma proposta do mecanismo reacional do teste de Mäule.

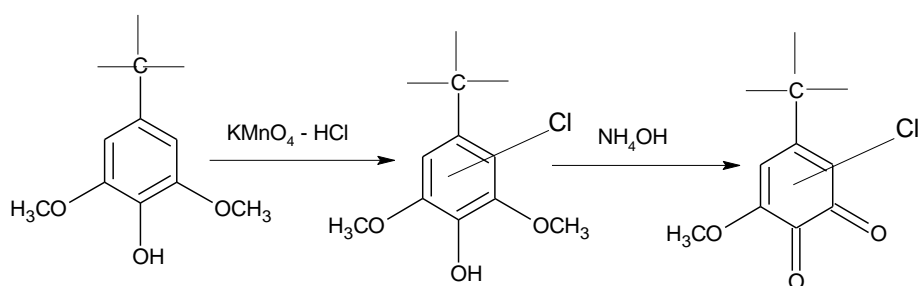


Figura 6. Mecanismo de reação do teste de Mäule.

No teste de Wiesner, cortes transversais foram transferidos para uma solução do reagente preparado por uma combinação de 50 mL de uma solução de floroglucinol 2% em etanol 95% e 25 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado (LIN & DENCE, 1992). Como esse reagente não é muito estável, a solução foi armazenada em vidro âmbar com rolha de vidro. A Figura 7 representa a reação do reagente com um modelo representativo do segmento da lignina.

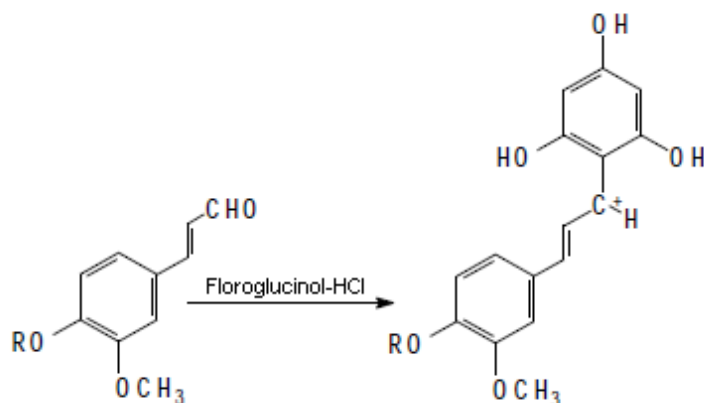


Figura 7. Mecanismo de reação do teste de Wiesner.

Para a visualização de fibras gelatinosas e amido, foi utilizado o teste de Cloreto de zinco iodato (KRAUS & ARDWIN, 1997).

Os cortes foram observados em um microscópio óptico (Olympus BX51) acoplado a um sistema digital de análise de imagens (Cell*Family).

3.3 Microespectroscopia no Infravermelho

Cortes anatômicos transversais com espessura de $14\mu\text{m}$, obtidos com auxílio de micrótomo (MICROM HM450), foram utilizados para a geração de espectros no infravermelho, *in loco*, através de um microscópio acoplado a um espectrômetro de infravermelho (VARIAN 640-IR FTIR Spectrometer), de modo a caracterizar e localizar a presença de lignina nos tecidos.

Para isso, cortes ao natural e tratados com NaOH 1% foram congelados em nitrogênio líquido em placas de Petri por 30 segundos e em seguida, secos entre lâminas de vidro por 12 horas em liofilizador (Terroni – Modelo Enterprise). Foi utilizado um detector de esfriamento com nitrogênio líquido Mercury Cadmium Telluride (MCT). Após secos, estes foram colocados sobre lâminas de KBr e analisados sob condição de Reflectância Difusa, com 2cm^{-1} de resolução, 128 varreduras e amplitude espectral entre $4000\text{-}700\text{cm}^{-1}$ (Figura 8).

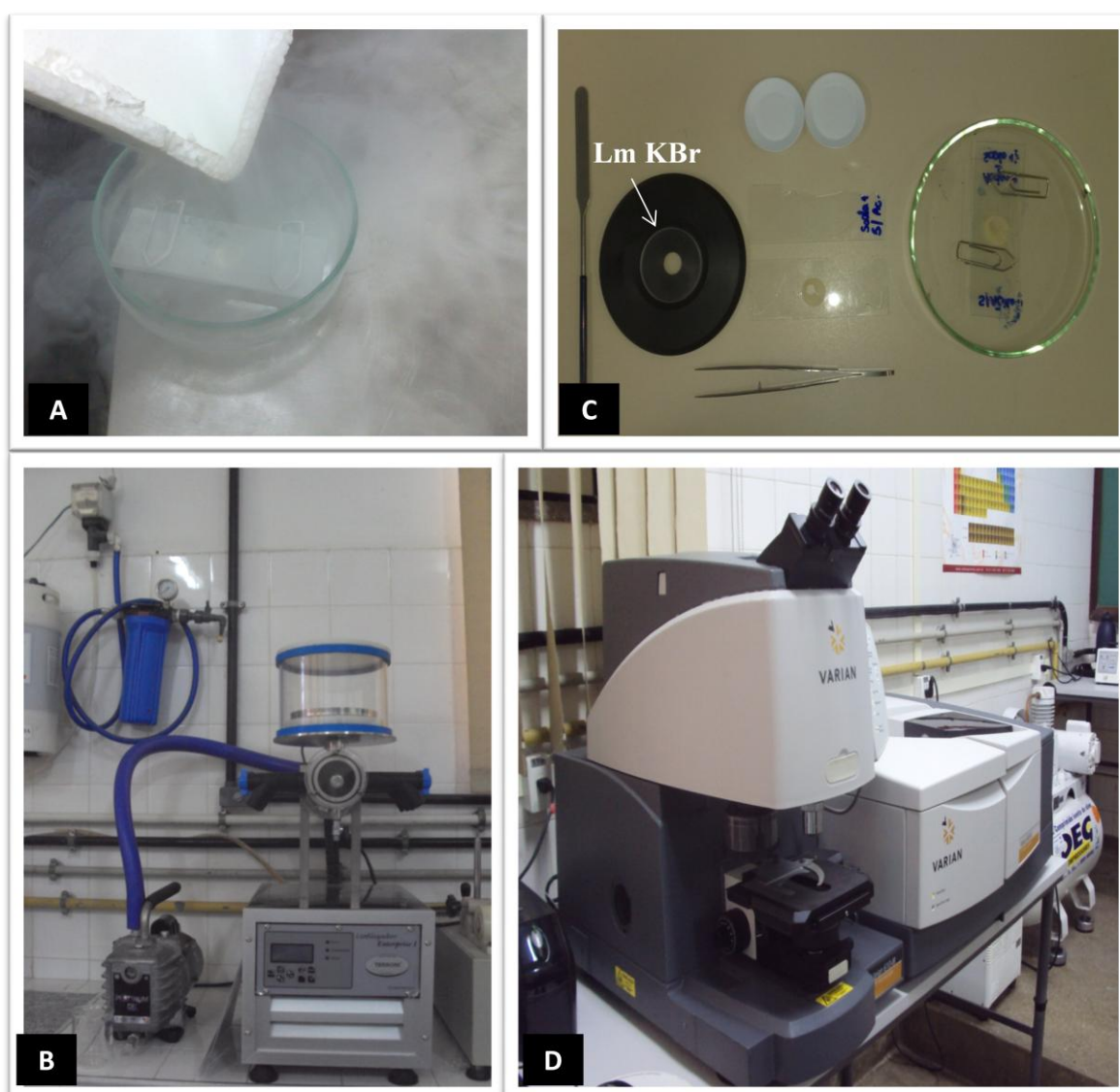


Figura 8. Sequência de preparação do material (corte) para registro no espectro de infravermelho A- Cortes anatômicos congelados em nitrogênio; B- Liofilizador; C- Lm KBr: Lâmina de KBr e cortes anatômicos em lâminas de vidro congelados; D- Microscópio acoplado ao espectrômetro de infravermelho FTIR.

3.4 Espectroscopia no Infravermelho

O material livre de extrativo foi moído em moinho de bolas de aço inoxidável (MARCONI) e 2mg dessa amostra foram liofilizados por 12 horas. Sendo a amostra posteriormente homogeneizada sobre 100mg de KBr, prensada em uma prensa manual obtendo-se uma pastilha a qual foi utilizada para proceder o registro dos espectros em espectrômetro (VARIAN 640-IR FT-IR Spectrometer), no modo experimental de Transmitância, utilizando 4cm^{-1} de resolução, 128 varreduras e amplitude espectral entre $4000\text{-}400\text{cm}^{-1}$ (Figura 9). Para os registros dos espectros foram misturados os materiais de 8 raques diferentes.

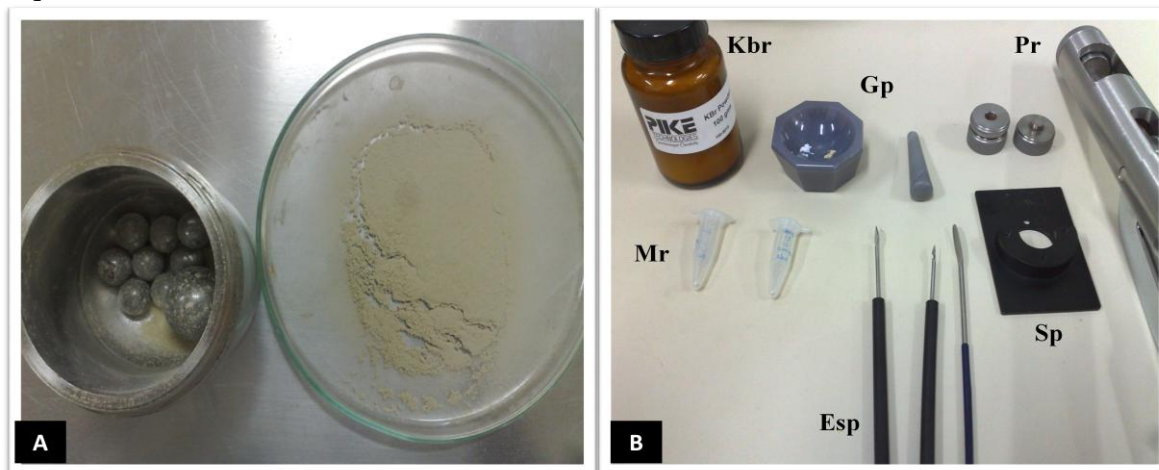


Figura 9. Sequência de preparação do material (pó) para registro no espectro de infravermelho. A- Material moído; B- Acessórios de preparo de amostras do infravermelho: KBr- Brometo de potássio, Pr-Prensa manual, Mr- microtubos tipo eppendorf, Esp- espátulas, Gp- gral e pistilo, Sp- suporte de leitura.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Microscopia de campo claro

Na seção transversal observou-se que as fibras apresentaram formas e composição diferenciadas entre o tecido de tensão e o tecido da região inferior da raque (Figuras 10a e 10b). É possível observar na Figura 10b uma zona fibrosa de coloração vermelha acentuada (retângulo), e na Figura 10d, em maior aumento, evidência de fibras menos organizadas que as do tecido de tensão (Figura 10c), apresentando visualmente menor espessura da parede.

Os tecidos de tensão geralmente possuem elevada quantidade de celulose, são menos lignificados do que os tecidos normais e apresentam um aumento na proporção de fibras exibindo as paredes espessas, conforme representam as Figuras 10c e 11c (PILATE et al., 2004).

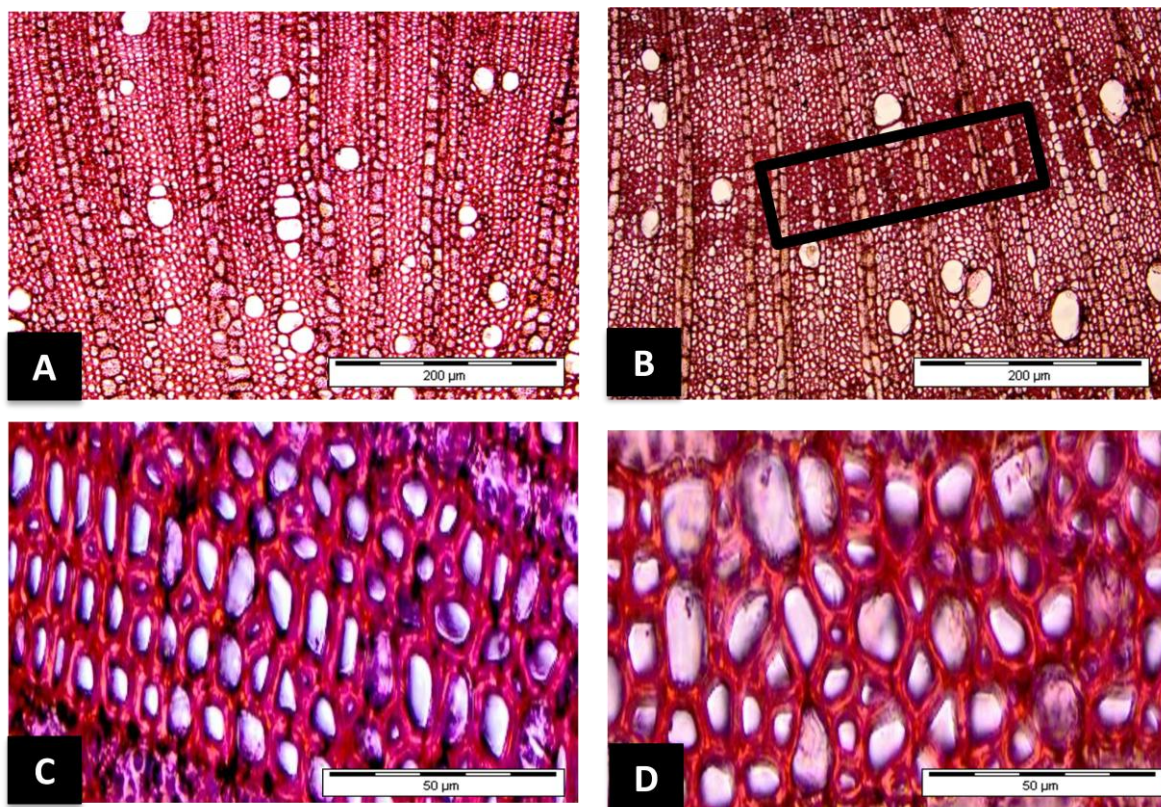


Figura 10. Seções transversais da raque de *Couroupita guianensis* Aubl. coradas com safranina O: A, C – Região superior ou tecido de tensão; B, D – Região inferior ou oposta ao tecido de tensão. Retângulo – Zona fibrosa.

Com a dupla coloração safranina O/astrablau foi possível observar uma camada aparentemente espessa, mais interna à parede secundária, sugerindo a existência de fibras gelatinosas, desenvolvida principalmente em tecido de tensão, como indicadas pelas setas na Figura 11d. De acordo com PILATE et al., 2004 essa camada apresenta-se menos lignificada e/ou com maior teor de unidade siringila, o que coaduna com o observado (cor violeta). Em contraste, as camadas S1 e S2 da parede secundária são geralmente mais finas e com elevada concentração de lignina, observadas na Figura 11d com coloração rosada (TIMELL, 1969; JOSELEAU et al., 2004).

Estudos indicam que há um aumento na relação Siringila/Guaiacila em tecidos de tensão e, portanto; visualmente, a cor azul-violeta da camada com fibra gelatinosa indica maior quantidade de unidades siringila (Figura 11d) (YOSHIDA et al., 2002; AOYAMA et al., 2001).

Geralmente, a parede secundária das fibras contém ligninas do tipo guaiacila e siringila. A coloração com astrablau (afinidade com unidade siringila) promoveu a tonalidade violeta como visualizado na Figura 11c. Na Figura 11b há forte indício de ligninas siringila na faixa mais escura.

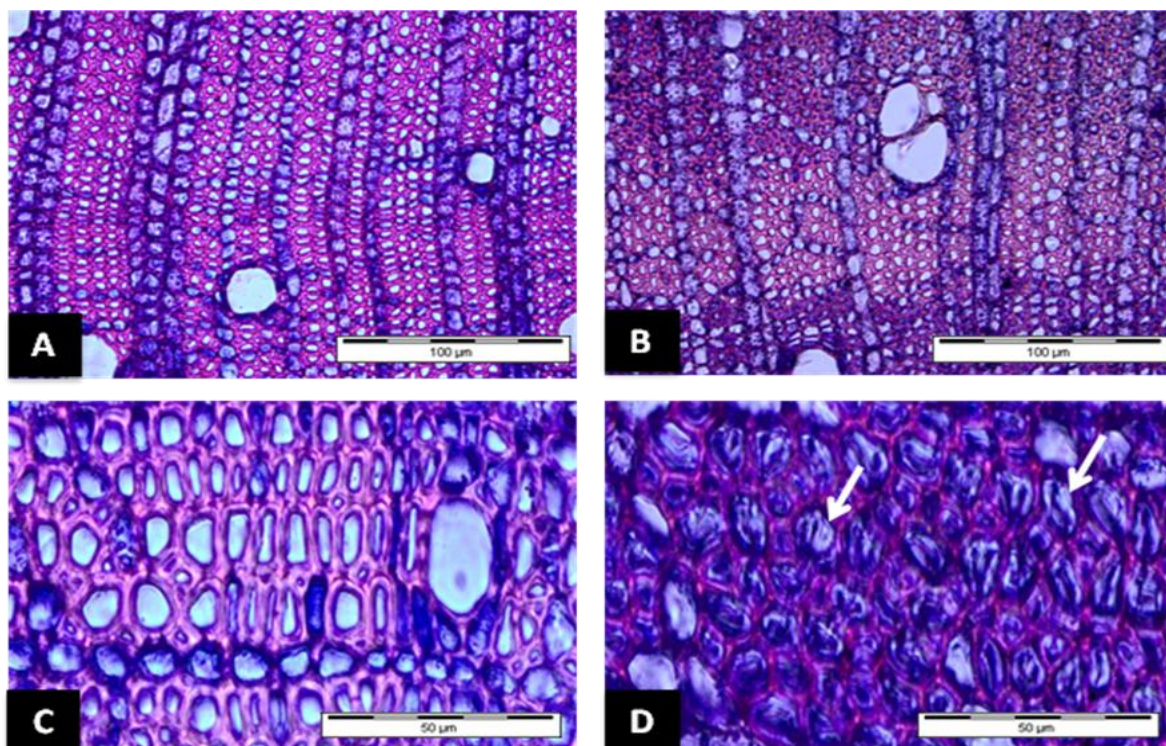


Figura 11. Seções transversais da raque de *Couroupita guianensis* Aubl. coradas com safranina O/astablau: A, C – Região superior ou tecido de tensão; B, D – Região inferior ou oposta ao tecido de tensão.

Espécies de gimnospermas contêm ligninas frequentemente ricas em unidades guaiacila, enquanto que angiospermas possuem unidades guaiacila/siringilas.

4.2 Testes histoquímicos

Os testes histoquímicos permitem a visualização da distribuição da lignina no tecido sem promover sua destruição. A reação de Mäule detecta as unidades siringilas como resultado da diferença de coloração formada durante a reação. Quando as seções são tratadas por esse reagente, as paredes das células que contêm unidades siringilas tornam-se predominantemente vermelhas, enquanto que as paredes das células que contêm unidades guaiacilas permanecem com o tom de cor amarelo. (WATANABE et al., 1997).

Embora a reação de Mäule permita a detecção do tipo de lignina nas células, esta, não é indicada para a visualização de unidades guaiacilas visto que as unidades siringilas são coradas com a tonalidade muito forte de vermelho, podendo obscurecer o amarelo das unidades guaiacilas (WATANABE et al., 2004).

Na Figura 12 é possível observar o efeito da reação de Mäule sobre cortes transversais da raque de *Couroupita guianensis* Aubl. indicando lignificação no tecido e cor vermelha nas paredes das fibras, e tons diferentes ao longo da seção (unidades siringilas). Com o maior aumento, nota-se uma coloração amarela na parede das células responsáveis por condução (unidades guaiacilas) (Figura 12c e 12d).

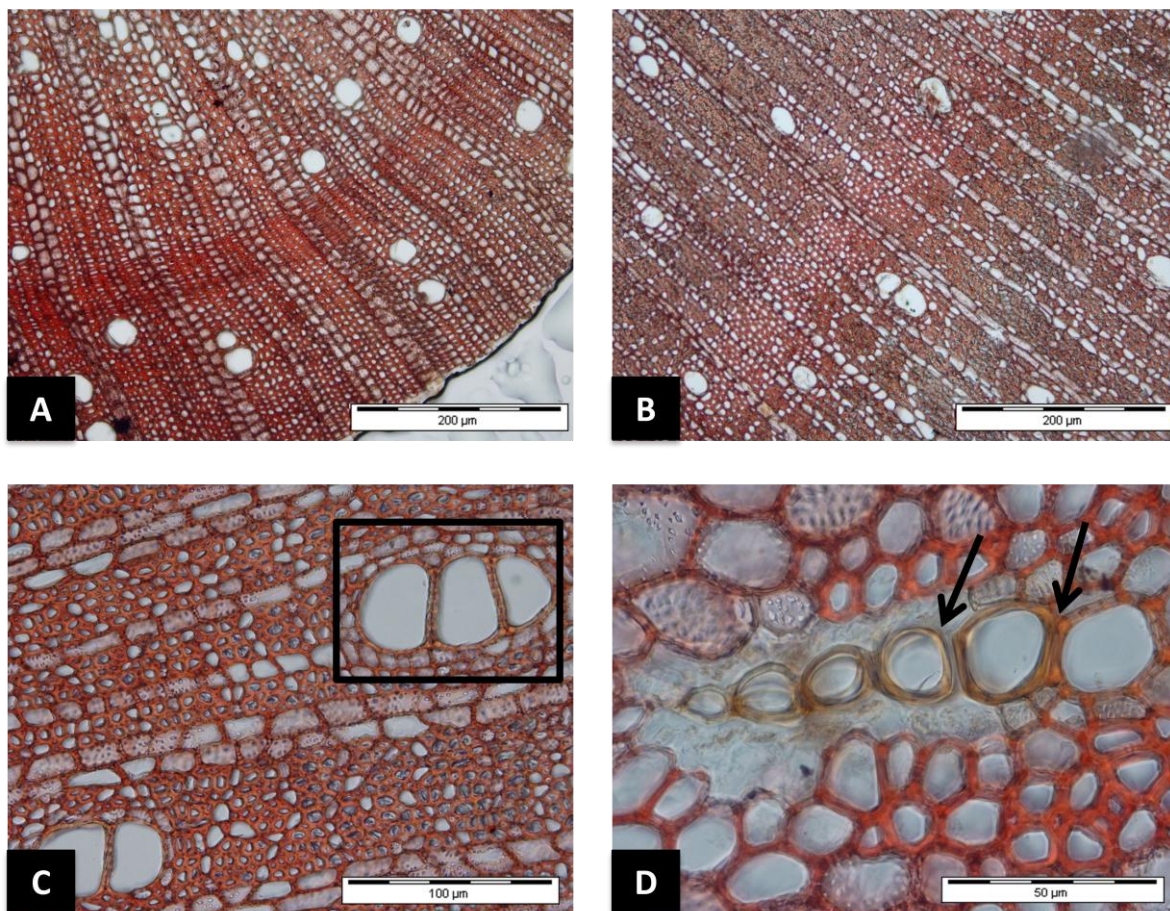


Figura 12. Seções transversais da raque de *Couroupita guianensis* Aubl. submetidas a reação de Mäule. A, B- Tecido evidenciando faixas com diferentes tonalidades de vermelho; C, D- Unidades guaiacilas na parede dos vasos sob a tonalidade amarela.

Em angiospermas, a lignina siringila é frequentemente associada às fibras, cuja importância é revelada no suporte mecânico. Essa correlação leva a hipótese que a lignina siringila pode ser superior que a guaiacila quando incorporada às células, conferindo resistência (LI, et al., 2001). Segundo MENDEN et al., 2007; WENG *et al* (2008), a lignina siringila acumula-se primeiramente em células corticais esclerificadas, oferecendo suporte ao corpo da planta e resistência ao ataque de patógenos.

Na espectroscopia de infravermelho do material lenhoso da raque, o sinal correspondente a lignina guaiacila foi o que prevaleceu, embora não tenha sido observado pela reação de Mäule.

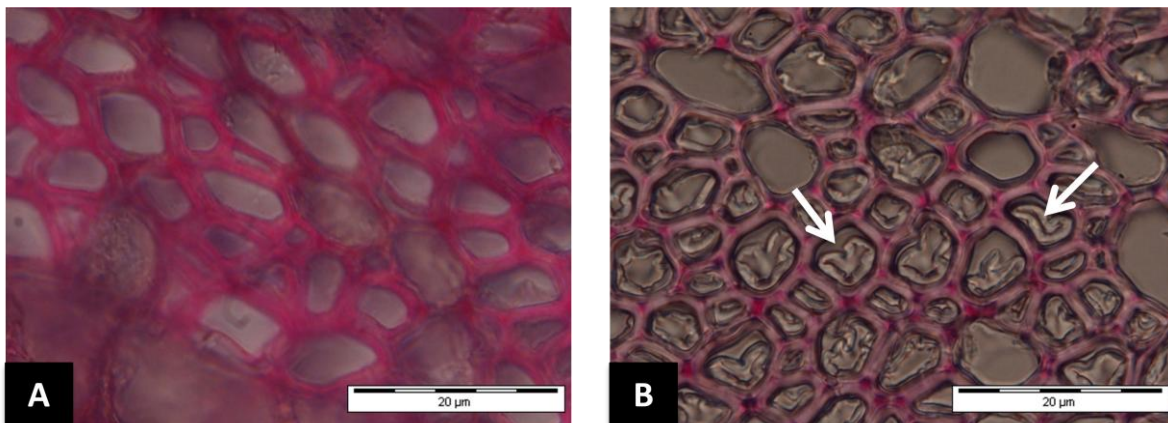


Figura 13. Seções transversais da raque de *Couroupita guianensis* Aubl. submetidas ao teste de Wiesner.

O teste de Wiesner, indicado para expor a presença de lignina ou substâncias fenólicas nas estruturas celulares, constatou lignina nas células pela coloração rosa-violeta (Figura 13). A reação com floroglucina e ácido clorídrico realçou os cantos celulares das fibras e não reagiu com a camada G (Figura 13b). Segundo PILATE (2004), a reação de coloração histológica, como com a floroglucina, indica que a camada G é normalmente deslignificada ou lignificada a um teor muito limitado, enquanto que a parede externa a essa camada é fortemente lignificada.

Os resultados dos testes histoquímicos corroboram com os resultados obtidos com a espectrometria de infravermelho, com sinais em $1252 - 1254 \text{ cm}^{-1}$ e $1328 - 1330 \text{ cm}^{-1}$, indicando a formação de ligninas do tipo guaiacólica e siringílica respectivamente para o material lenhoso da raque de *Couroupita guianensis* Aubl.

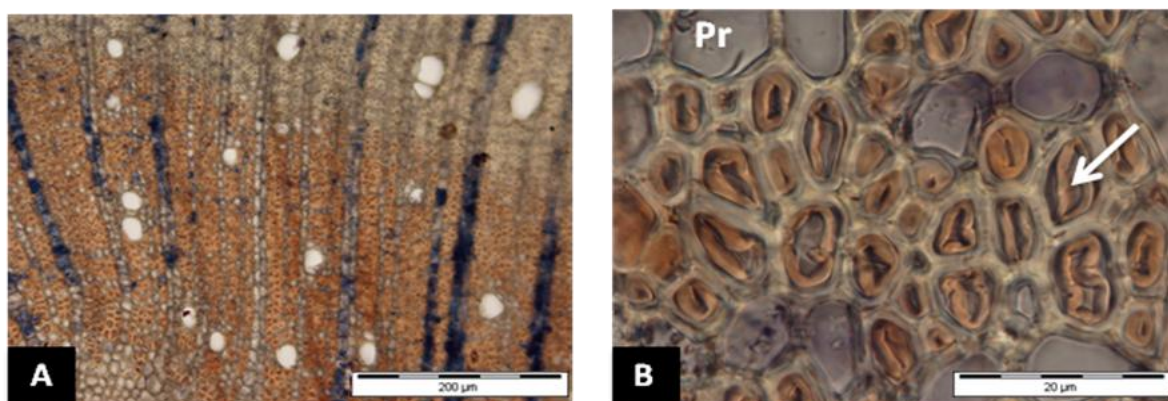


Figura 14. Seções transversais da raque de *Couroupita guianensis* Aubl. submetidas a reação de Lawrens-Takaashi. Pr- Parênquima.

O reativo de Lawrens-Takaashi (cloreto de zinco iodato) produz uma coloração azul acinzentada para as paredes celulósicas e hemicelulósicas, amarelo e amarelo-alaranjado para as lignificadas, cutinizadas e suberificadas, e negro-azulada para o amido (KRAUS & ARDWIN, 1997).

A reação de cloreto de zinco e o iodo promoveram uma coloração azul para os raios (Figura 14a) e amarela para a parede celular das fibras lignificadas (Figura 14b). Na Figura 14b, o parênquima foi corado com uma cor acinzentada, podendo ser amido em seu conteúdo.

Embora pesquisadores tenham determinado qualitativamente na camada G, que sua composição seja predominantemente celulósica e hemicelulósica, estes não realizaram análises fenólicas (NOBERG & MEIER, 1966). No entanto, SCURFIELD & WADROP (1963), utilizando microscopia ultra-violeta e testes de cor, observaram em diversas espécies que a camada G poderia ser parcialmente lignificada, especialmente em regiões de transição entre o lenho que não sofre reação e o tecido de tensão. Isso pode estar relacionado com a cor laranja observada na camada G, desprendida da parede celular, como indicada pela seta (Figura 14b). E a reação com cloreto de zinco não foi suficiente para promover uma coloração azul desta camada.

4.3 Microespectroscopia no Infravermelho

Os espectros dos cortes transversal da região superior do tecido da raque ao natural mostram-se complexos, porém permitiram a identificação da presença de lignina (Figura 15a e 15b). Nos espectros da Figuras 15, os sinais correspondentes a presença de lignina expressaram fracamente suas intensidades, quando comparados com os espectros do material na forma de pó (Figura 18).

A presença dos grupos acetatos decorre da existência do grupamento da parede celular, que apresenta o tipo de grupo hemicelulósico, além do que, o complexo Lignina-Carboidrato (L-C) ocorre presentes até mesmo nas ligninas de Bjorkman, e só são removidos por tratamento alcalino com NaOH. Foi observado que os espectros das amostras abaixo apresentaram as absorções dos três componentes da parede celular (celulose, hemicelulose e lignina), e por isso os espectros se mostraram tão complexos. As amostras foram saponificadas para a liberação de componente hemicelulósico principalmente sobre as ligações éster-lignina, visando facilitar as atribuições dos sinais.

Os sinais em 1736 cm^{-1} a 1739 cm^{-1} (Figura 15a e 15b) não apareceram nos espectros das amostras tratadas com NaOH 1%, apenas um ombro foi ligeiramente visível. Estes sinais correspondem ao estiramento de carbonila de éster ou de ácido carboxílico existentes nas polioses (ORTON et al., 2004), os quais não ocorrem também nos espectros do material em pó tratados com NaOH 1% por 1 hora (Figura 18). E nos espectros tratados com NaOH 1% (Figura 15c e 15d) e tratados com acetona (Figura 15e e 15f), permitiram melhor visualização de grupos acetato e outros sinais.

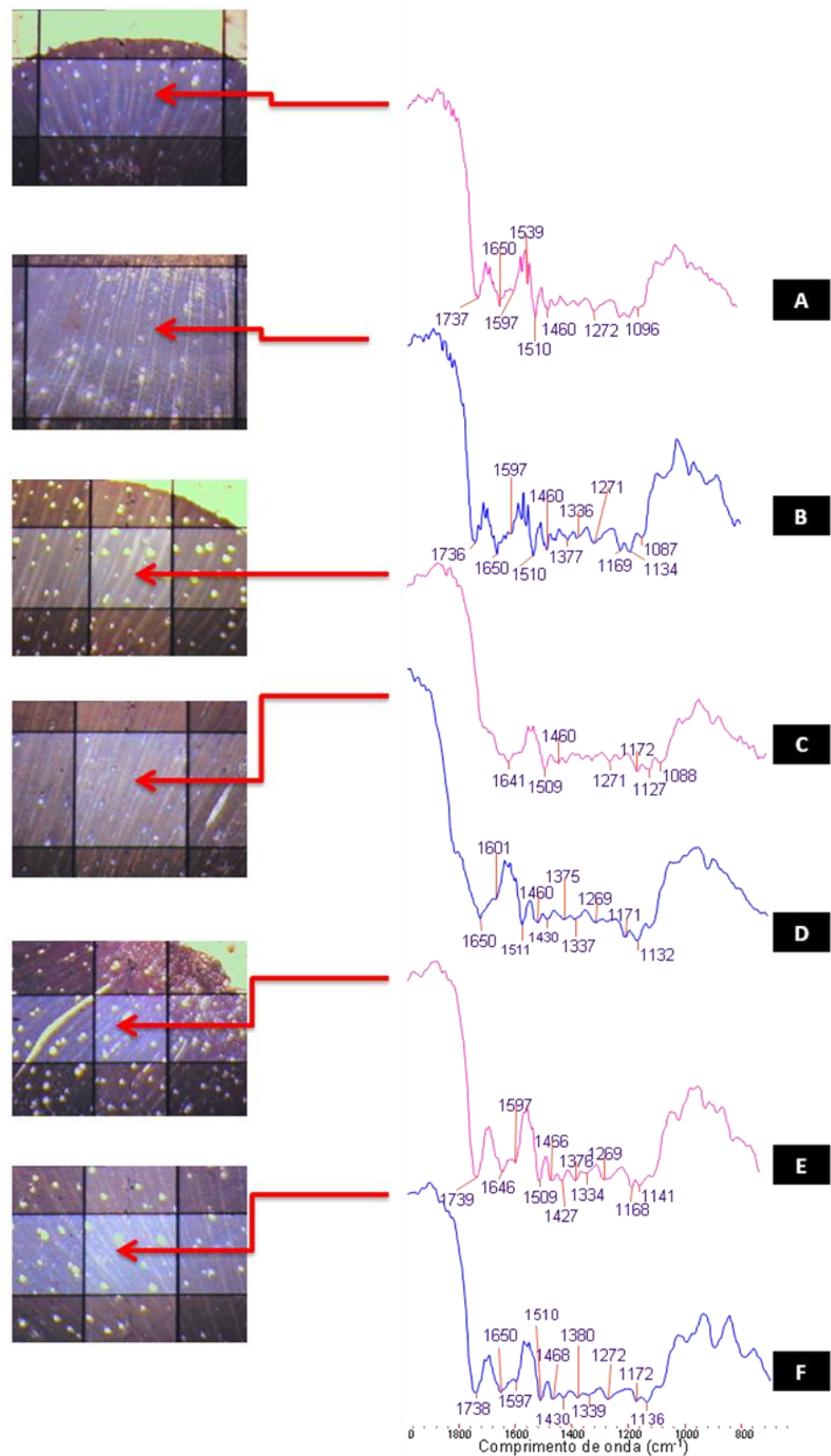


Figura 15. Fotos e espectros obtidos por infravermelho através de um microscópio nas regiões da seção transversal da raque de *Couroupita guianensis*, ao natural, A - Região superior, B - Região inferior; tratado com NaOH 1%, C - Região superior, D - Região inferior; e tratados com acetona, E - Região superior, F - Região inferior.

Apesar de apresentar resultados interessantes e bem evidentes, os tecidos da raque de *Couropita guianensis* mostraram baixas respostas à microscopia no infravermelho, somados à forma como os espectros foram registrados, ponto a ponto em uma determinada área, muitas vezes, onde ocorre baixo teor de lignina.

4.4 Espectroscopia no Infravermelho

4.4.4 Material moído

Do pó do material lenhoso (moído) da raque de *Couropita guianensis* pré-extraído com solventes orgânicos neutros (ciclohexano, acetato de etila e metanol, respectivamente), sem o isolamento da lignina, foram registrados espectros. Sendo estes da raque inteira, raque dividida (região superior e inferior, próximo ao tronco e próximo ao fruto) (Figura 5).

Na Figura 16, os espectros apresentam sinais correspondentes ao anel guaiacílico (respiração), sendo estes: 1252 cm^{-1} , 1254 cm^{-1} para os tratamentos A e B respectivamente e, 1253 cm^{-1} para os tratamentos C, D. Os sinais correspondentes à presença de unidade siringila e de estruturas condensadas, foram: 1329 cm^{-1} para os tratamentos A, C e D; 1328 cm^{-1} e 1330 cm^{-1} para os tratamentos B e E respectivamente, de acordo com as atribuições da Tabela 1 (ABREU, 1994). A análise permitiu estimar a presença de lignina guaiacílica e siringílica, sendo mais ricas em unidades guaiacílica. Os espectros não foram muito distintos entre as regiões analisadas.

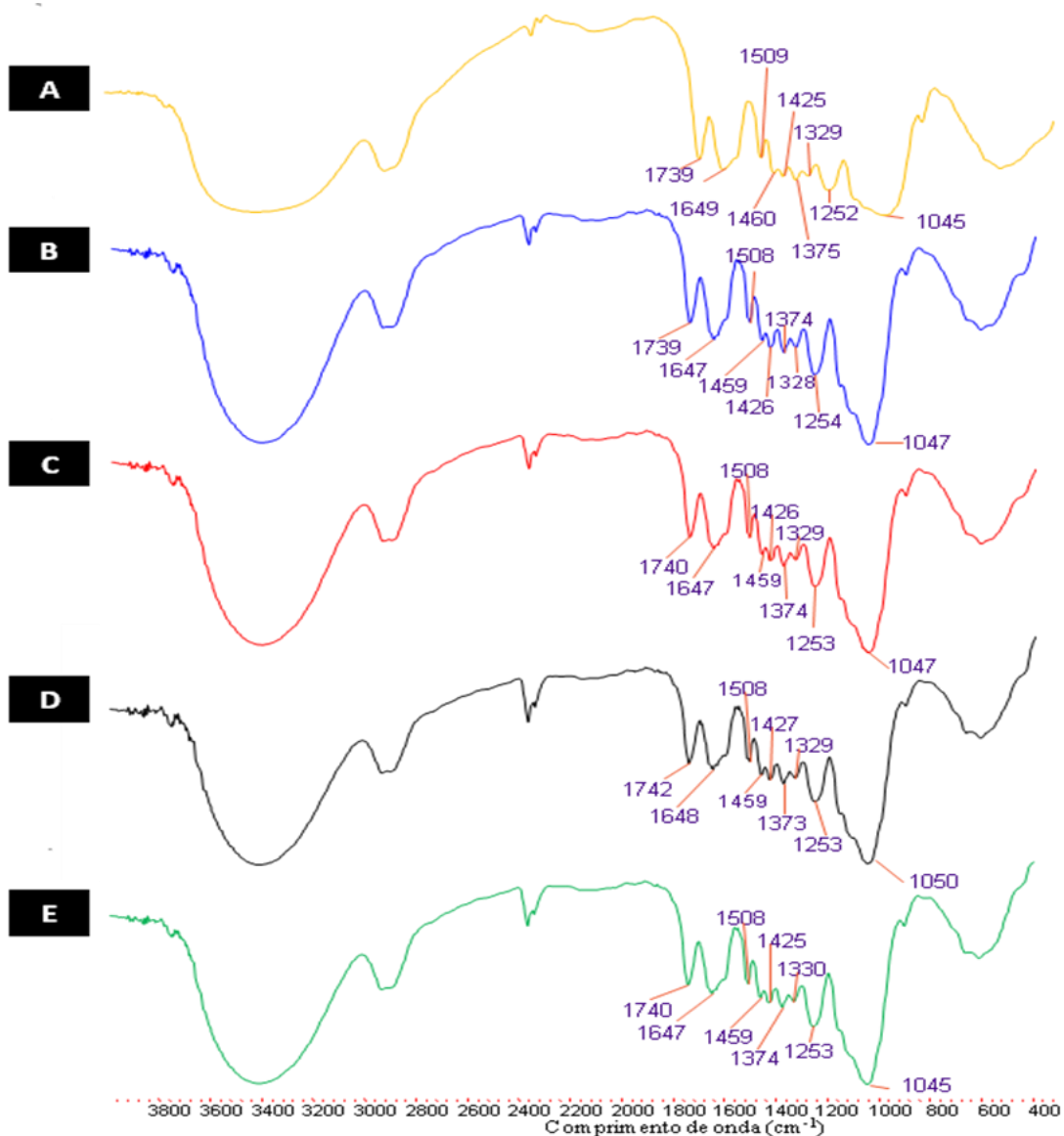


Figura 16. Espectros no infravermelho do material lenhoso (moído) da raque de *Couroupita guianensis* Aubl. em pó, extraído com ciclohexano, acetato de etila e metanol. A – Raque inteira; B, C, D, E – Raque dividida, sendo: B – Região superior próxima ao tronco, C – Região superior próxima ao fruto, D – Região inferior próxima ao tronco, E - Região inferior próxima ao fruto.

Os espectros do mesmo material lenhoso pré-extraídos da parte superior e inferior, tratados com NaOH 1% durante 10 minutos, revelaram que houve uma saponificação parcial do grupamento éster. O espectro da região inferior da raque mostrou presença de lignina siringílica/ guaiacólica em decorrência dos sinais 1330 cm^{-1} , 1366 cm^{-1} e 1256 cm^{-1} , 1254 cm^{-1} respectivamente.

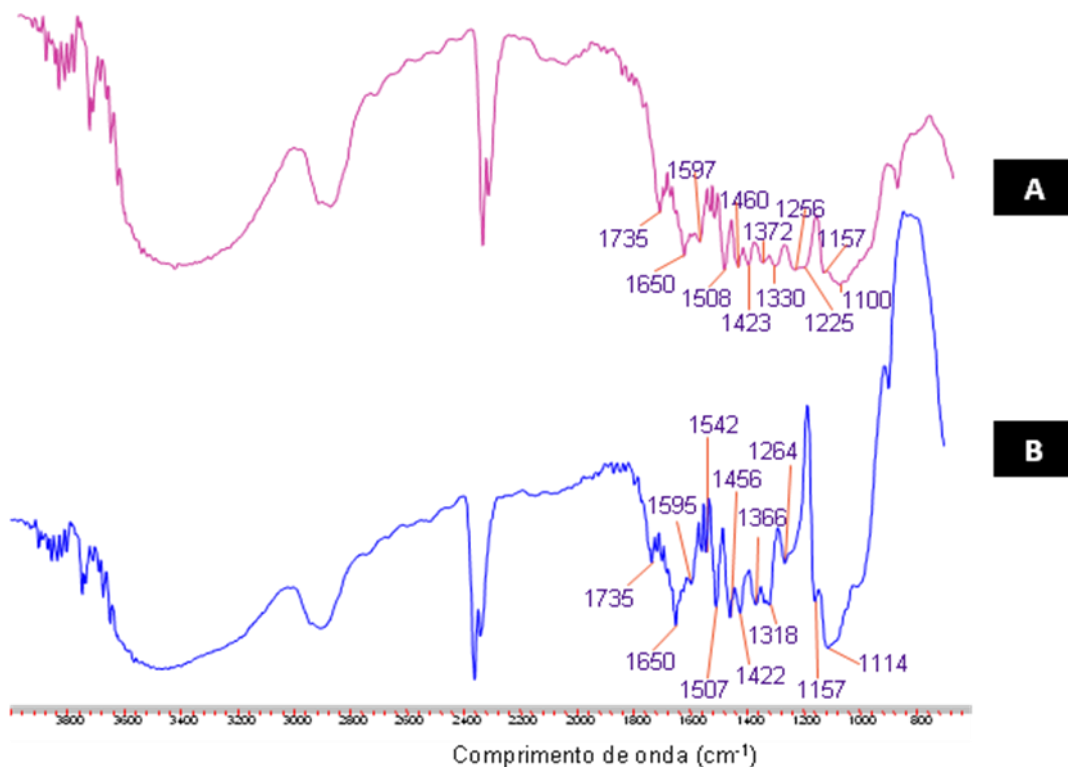


Figura 17. Espectros no infravermelho do material lenhoso (moído) da raque de *Couroupita guianensis* Aubl. em pó, extraído com ciclohexano, acetato de etila e metanol tratados com NaOH 1% por 10 minutos. A - Região superior, B - Região inferior.

Os espectros dos materiais lenhosos (moído) pré-extraídos e tratados com NaOH 1% por uma hora foram suficiente para sofrerem saponificação total e confirmam que as ligninas são do tipo guaiacila e siringila estimadamente com proporções iguais, com sinais em torno de 1330/ 1331 a 1265/ 1266 cm^{-1} , (Figura 18).

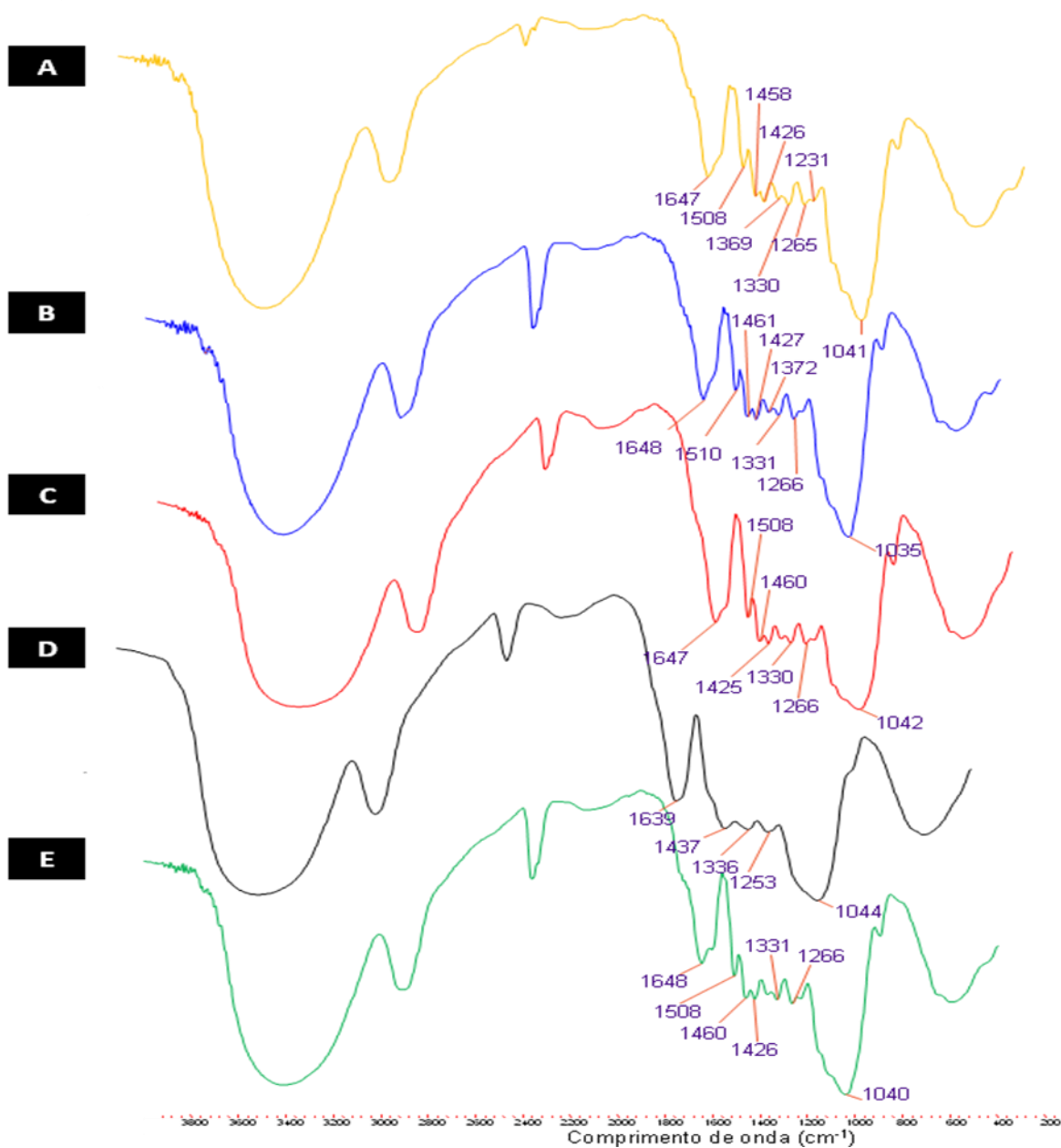


Figura18. Espectros no infravermelho do material lenhoso (moído) da raque de *Couroupita guianensis* Aubl. em pó, extraído com ciclohexano, acetato de etila e metanol tratados com NaOH 1% por 1 hora. A – Raque inteira; B, C, D, E – Raque dividida, sendo: B – Região superior próxima ao tronco, C – Região superior próxima ao fruto, D – Região inferior próxima ao tronco, E - Região inferior próxima ao fruto.

Tabela 1. Atribuições dos sinais de referência no infravermelho de ligninas de Bjorkman, (ABREU, 1994).

cm⁻¹	Atribuições dos Sinais	cm⁻¹	Atribuições dos Sinais
3412-3460	Estiramento de O-H	1221-1230	Estiramento de C=O, C-C com estiramento de C=O sensível à substituição do anel aromático G condensado > G eterificado
3000-2842	Estiramento de C-H dos grupos metílicos e metilênicos	1116	Típicos de ligninas HGS com influência de grupos carboxílicos e carbonílicos
1738-1709	Estiramento de C=O de cetonas não conjugadas e de grupo éster	1140	Deformação (no plano) de C-H de anel aromático guaiacílico. G condensado > G eterificado
1655-1675	Estiramento de C=O em cetonas conjugadas e em aldeídos conjugados	1128-1125	Deformação (no plano) de C-H (típico de anel siringílico)
1593-1605	Vibração do esqueleto aromático com estiramento de C=O	1086-1125	Deformação de C-O de álcool secundário e de éter alifático
1505-1515	Vibração do esqueleto aromático	1030-1095	Deformação (no plano) de C-H de anel guaiacílico mais deformação de C-O em álcool primário e em éter com contribuição de estiramento de C=O não conjugado
1460-1470	Deformação assimétrica em –CH ₃ e –CH ₂ –CH ₂ –	915-925	Deformação de C-H (monohidrogênio) fora do plano do anel aromático siringílico
1422-1430	Vibração do esqueleto aromático combinado com deformação no plano de C-H, influenciado pela substituição do anel	853-858	Deformação de C-H fora do plano dos H de C-2, C-5 e C-6 (anel guaiacílico)
1365-1370	Estiramento de C-H alifático de –CH ₃ –CH ₃	834-835	Deformação de C-H fora do plano dos H do C-2 e C-6 (anel siringílico)
1325-1330	Respiração (breathing) do anel siringílico com contribuição do estiramento de C=O e de estruturas condensadas	817-827	Deformação de C-H fora do plano do C-H nas posições 2,5 e 6 de unidades guaiacílicas
1266-1270	Respiração (breathing) do anel guaiacílico com contribuição do estiramento de C=O		

5 CONCLUSÕES

- ✓ Os resultados permitiram observar que a raque de *Couroupita guianensis* Aubl. possui características de tecido especial, e que seu baixo conteúdo de lignina possivelmente teve influência da gravidade através da qual desativou as enzimas mediadoras da biossíntese da lignina a um nível de teor de lignina equivalente às plantas herbáceas.
- ✓ Os testes histoquímicos foram considerados eficientes e mostraram que em regiões de alta flexibilidade há lignina siringílica, supostamente necessária a esse tipo de tecido pela sua propriedade estrutural adquirida.
- ✓ As análises micro espectrométricas expuseram a existência de lignina, entretanto não o suficiente para afirmar o tipo de lignina predominante em uma determinada região do tecido.
- ✓ O estudo coaduna com dados da literatura de que, tecido sob influência da gravidade acarreta modificações na lignificação.
- ✓ Esse tecido que cresce geotropicamente a favor da gravidade, pode ser extremamente útil para estudos do genoma em tecidos especiais em busca de genes que não expressam ou não aumentam as atividades de enzimas durante a biossíntese de lignina.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, H. S. **Biossíntese de Lignificação**, UFRRJ, Itaguaí, 63p., 1994.

ABREU, H. S., NASCIMENTO, A. M.; MARIA, M. A. Lignin structure and wood properties, **Wood and Fiber Science**, v. 31, n. 4, 426-433, 1999.

ABREU, H. S.; MAÊDA, J.; LATORRACA, J. F.; PEREIRA, R. P. W.; MONTEIRO, M. B. O.; ABREU, F.; CARMO, J. Proposta de modificação da biossíntese da lignina como estratégia para correção de defeitos em madeiras. **Silva Lusitana**, v.11, n.2, p.217-225, 2003.

ABREU, S.H.; LATORRACA, J. V. F.; PEREIRA, W. P. R.; MONTEIRO, M.B.O.; ABREU, F.A.; AMPARADO, K.F. A supamolecular proposal of lignin structure and its relation with the wood properties. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n.1, 1-6, 2009.

ALLEN, J.; BISBEE, P. A.; DARNELL, R. L.; KUANG, A.; LEVINE, L. H.; MUSGRAVE, M. E.; LOON, J. J. W. A.Gravity of growth in *Brassica rapa* e *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae): Consequences for secondary metabolism. **American Journal of Botany**, v. 96, n. 3, p. 652-660, 2009.

ALLEN, J.; BISBEE, P. A.; DARNELL, R. L.; KUANG, A.; LEVINE, L. H.; MUSGRAVE, M. E.; VAN LOON, J. J. W. A. Gravity control of growth form in *Brassica rapa* and *Arabidopsis thaliana* (brassicaceae): consequences for secondary metabolism. **American Journal of Botany**, v. 96, n.3, p. 652–660, 2009.

ANTEROLA, A. M.; LEWIS, N. G. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. **Phytochemistry**, v. 61, p. 221-294, 2002.

ARGYROPOUPOS, D.S.; MENACHEM, S.B. Lignin. **Adv. Bloch Enc Biotech**, v. 57, p. 127-158, 1997.

BAUCHER, M.; HALPIN, C.; PETIT-CONIL, M.; BOERJAN, W. Lignin: genetic engineering and impact on pulp. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.38, p. 305-350, 2003.

BERTHIER, S.; STOKES, A. Righting response of artificially inclined maritime pine (*Pinus pinaster*) saplings to wind loading. **Tree Physiology**, v. 26, p. 73-79, 2005.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review Plant Biology**, v. 54, p. 519-546, 2003.

BOATRIGHT, J; NEGRE, F; CHEN, X; KISH, C. M; WOOD, B; PEEL, G; ORLOVA, I; GANG, D; RHODES, D; DUDAREVA, N. Understanding in Vivo Benzenoid Metabolism in Petunia Petal Tissue. **Plant Physiology**, v.135, p.1993-2011, 2004.

BOYCE, C. K.; ZWIENIECKI, M. A.; CODY, G. D.; JACOBSEN, C.; WIRICK, S.; KNOLL, A.H.; HOLBROOK, N. M. Evolution of xylem lignifications and hydrogel transport regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 17555-17558, 2004.

BONAWITZ, N. D.; CHAPPLE, C. The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype, **Annual Review of Genetics**, v. 44, p. 337-363, 2010.

CHABANNES, M.; BARAKATE, A.; LAPIERRE, C.; MARITA, J. M.; RALPH, J. Strong decrease in lignin content without significant alteration of plant development is induced by simultaneous down-regulation of cinnamoyl CoA reductase (CCR) and cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) in tobacco plants. **Plant Journal**, v. 28, p. 257-270, 2001.

CHAFFEY, N. Wood formation in trees: Cell and molecular biology techniques. **Taylor & Francis Books**, London, 2002.

CHEN, F.; DIXON, R. A. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. **National Biotechnology**, v. 25, p. 759-761, 2007.

CÔTÉ, W. A.; DAY, A. C.; TIMELL, T. E. A contribution to the ultrastructure of tension wood fibers. **Wood Science Technology**, v. 3, p. 257-271, 1969.

COWLES, J. R.; SCHELD, H. W.; MAY, R.; PETERSON, C. Experiments on plants grown in space: Growth and lignifications in seedlings exposed to eight days of microgravity. **Annals of Botany**, v. 54, n. 3, p. 33-48, 1984.

DARNELL, R. D.; LEVINE, L. H.; BISBEE, P. A.; ALLEN, J.; MUSGRAVE, M. E. Glucosinolate production in hypergravity in *Brassica rapa*. **Gravitational and Space Biology**, v. 21, n. 33, 2007.

DAVIN, L. B.; JOURDES, M.; PATTEN, A. M.; KIM, K. W.; VASSAO, D. G.; LEWIS, N. G. Dissection of lignin macro-molecular configuration and assembly: comparison to related biochemical processes in allyl/propenyl phenol and lignan biosynthesis. **Natural Product Reports**, v. 25, p. 1015-1090, 2008.

DEAN, J. F. D. **Synthesis of lignin in mutant and transgenic plants**. In *Biotechnology of Biopolymers: From Synthesis to Patents*, p. 3-26, 2005.

DÉRJARDIN, A. D.; LAURANS, F.; ARNAUD, D.; BRETON, C.; PILATE, G.; LEPLÉ, J. Wood formation in Angiosperms. **Plant biology and pathology**. p. 325-334, 2010.

DIXON, R. A.; CHEN, F.; GUO, D.; PARVATHI, K. The biosynthesis of monolignols: a “metabolic grid,” or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? **Phytochemistry**, v. 57, p. 1069-84, 2001.

DO, C.T.; POLLET, B.; THEVENIN, J.; SIBOUT, R.; DENOUE, D. et al. Both caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase and caffeic acid O-methyltransferase are involved in redundant functions for lignin, flavonoids and sinapoyl malate biosynthesis in *Arabidopsis*. **Planta**, v. 226, p. 1117-1129, 2007.

DU, S.; YAMAMOTO, F. An overview of the biology of reaction wood formation. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 49, n. 2, p. 131-143, 2007.

FENGEL, D. E.; WEGENER, G. **Wood, chemistry, ultrastructure, reaction**, Berlin 1 ed. Walter de Gruyter, p. 66, 1984.

FREUDENBERG, K.; NEISH, A. C. **The constitution and biosynthesis of lignin**. Springer-Verlag, Berlin, 1968.

FRIEDMAN, W. E; COOK, M. E. The origin and early evolution of tracheids in vascular plants: integration of palaeobotanical and neobotanical data. **The Royal Society**, v. 355, p. 857-868, 2000.

GOTTLIEB, O. R. The role of oxygen in phytochemical evolution towards diversity, **Phytochemistry**, v. 28, n. 10, p.2545-2558, 1989.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, R. M. B. E.; BOSÍCIO, B. M. Lignification: an evolutionary perspective, **An. Acad. bras. Ci.**, v. 67 (Supl 3) p.355-361, 1995.

HABRANT, A.; LAURANS, F.; DÉJARDIN, A.; LEPLÉ, J.C.; PILATE, G.; CATHALA, B.; CHABBERT, B. **Physical and chemical changes of poplar cell walls during tension wood formation**, In: **12th. INT. SYMP. ON WOOD AND PULPING CHEMISTRY (ISWPC)**, Madison, Wisconsin (USA), p. 8-12, 2003.

HARTIG, R. Holzuntersuchungen. Altes und Neues. **Julius Springer**, Berlin, 1901.

HIGUCHI, T. Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation. **Wood Science Technology**, v. 24, p. 23-63, 1990.

HOSON, T.; SOGA, K.; WAKABAYASHI, K.; KAMISAKA, S.; TANIMOTO, E. Growth and cell wall changes in rice roots during spaceflight. **Plant and Soil**, v. 255, p. 19 -26, 2003.

HUMPHREYS, J. M.; CHAPPLE, C. Rewriting the lignin roadmap. **Plant Biology**, v. 5, p. 224-229, 2002.

KENDRICK, P.; CRANE, P. R. The origin and early evolution of plants on land. **Nature**, v. 389, p. 33-39, 1997.

KRAUS, J.E.; ARDWIN, M. Manual básico de métodos em morfologia. **EDUR**, Seropédica, 198p, 1997.

KWON, M.; BEDGAR, D.L.; PIASTUCH, W.; DAVIN, L.B.; LEWIS, N.G. Induced compression wood formation in Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) in microgravity. **Phytochemistry**, v. 57, p. 847-857, 2001.

KWON, M. Tension Wood as a model system to explore the carbon partitioning between lignin and cellulose biosynthesis in woody plants. **Journal of Applied Biological Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 83-87, 2008.

JOUREZ, B.; RIBOUX, A.; LECLERCQ, A. Anatomical characteristics of tension wood and opposite wood in young inclined stems of poplar (*Populus euramericana* cv 'Ghoy'). **IAWA Journal**, v. 22, p. 133-157, 2001.

LANGE, B. M.; LAPIERRE, C. SANDERMANN, H. Elicitor-induced spruce stress lignin. Structural similarity to early developmental lignins. **Plant Physiol**, v. 108, p. 1277-1287, 1995.

LARSON, P. R. The vascular cambium: Development and structure. **Springer-Verlag, Berlin**, 1994.

LEVINE , L. H.; HEYENGA, A. G.; LEVINE, H. G.; CHOI, J.; DAVIN, L. B.; KRIKORIAN, A. D.; LEWIS, N. G. Cell-wall architecture and lignin composition of wheat developed in a microgravity environment. **Phytochemistry**, v. 57, p. 835-846, 2001a.

LEVINE , L. H.; LEVINE, H. G.; STRYJEWSKI, E. C.; PRIMA, V.; PIASTUCH, W. C. Effect of spaceflight on isoflavonoid accumulation in etiolated soybean seedlings. **Journal of Gravitational Physiology**, v. 8, p. 21-27, 2001b.

LEWIS, N. G. A 20th century roller coaster rider: a short account of lignifications. **Plant Biology**, v. 2, p. 153-162, 1999.

LEWIS, N. G; SARKANEN, S. **Lignin and Lignan Biosynthesis**. Washington, DC, ACS Symposium Series; American Chemical Society, 1998.

LI, L.; POPKO, J.L.; UMEZAWA, T.; CHIANG, V.L. 5-Hydroxyconiferyl aldehyde modulates enzymatic methylation for syringyl monolignol formation, a new view of monolignol biosynthesis in Angiosperms. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 6537-6545, 2000.

LI, L.; CHENG, X. F.; LESHKEVICH, J.; UMEZAWA, T.; HARDING, S. A.; CHIANG, V. L. The last step of syringyl monolignol biosynthesis in angiosperms is regulated by a novel gene encoding sinapyl alcohol dehydrogenase. **The Plant Cell**, v. 13, p. 1567–1586, 2001.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, 3 ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo, 2000.

MARTONE, P. T.; LU, F.; SOMERVILLE, C.; ESTEVEZ, J.; RUEL, K.; DENNY, M. W.; RALPH, J. Discovery of lignin in seaweed reveals convergent evolution of cell-wall architecture. **Current Biology**, v. 19, n. 2, p. 169-175, 2009.

MENDEN, B.; KOHLHOFF, M.; MOERSCHBACHER, B.M. Wheat cells accumulate a syringyl-rich lignin during the hypersensitive resistance response. **Phytochemistry**, n. 68, p. 513-520, 2007.

MONTEIRO, M. B. O.; PEREIRA, R. P. W.; ABREU, H. S. Bioquímica da lignificação de células xilemáticas. **Floresta e Ambiente**, v. 11, n. 2, p. 48-57, 2004.

MOORE, K. J.; JUNG, H. J. G. Lignin and fiber digestion. **Journal Range Manage**, v. 54, p. 420-430, 2001.

MUSGRAVE, M. E. Seeds in space. **Seed Science Research**, v. 12, p. 1-16, 2002.

MUSGRAVE , M. E.; KUANG, A.; TUOMINEN, L. K.; LEVINE, L. H.; MORROW, R. C. Seed storage reserves and glucosinolates in *Brassica rapa* L. grown on the International Space Station. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 130, p. 848-856, 2005.

NAKABAYASHI , I.; KARAHARA, I.; TAMAOKI, D.; MASUDA, K.; WAKASUGI, T.; YAMADA, K.; SOGA, K. Hypergravity stimulus enhances primary xylem development and decreases mechanical properties of secondary cell walls in inflorescence stems of *Arabidopsis thaliana*. **Annals of Botany**, v. 97, p. 1083-1090, 2006 .

NEDUKHA, E. M. Possible mechanisms of plant cell wall changes at microgravity. **Advances Space Research**, v. 1, p. 109-111, 1996.

NORBERG, P.H.; MEIER, H. Physical, chemical properties of the gelatinous layer in tension wood fibres of aspen (*Populus tremula* L.), **Holzforschung**, v. 20, p. 174-178, 1966.

PETER, G.; NEALE, D. Molecular basis for the evolution of xylem lignification. **Plant Biology**, v. 7, p. 737-742, 2004.

PILATE, G.; CHABBERT, B.; YOSHINAGA, A.; LEPLÉ, J.C.; LAURANS, F.; LAPIERRE, C.; RUEL, K. Lignification and tension wood. **Plant biology and pathology**. v.327, p. 889-901, 2004.

PLOMION, C.; LEPROVOST, G.; STOKES, A. Wood formation in trees. **Plant Physiology**, v. 127, p. 1513-1523, 2001.

RALPH, J. Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. **Phytochemistry Review**, v. 3, p. 29-60, 2004.

ROGERS, L. A.; CAMPBELL, M. M. The genetic control of lignin deposition during plant growth and development. **New Phytologist**, v. 164, p. 17-30, 2004.

SANZ BISET, J.; CAMPOS, J. L. C; EPIQUIÉN, M. A. R, CAÑIGUERAL, S.. A first survey on the medicinal plants of the Chazuta valley (Peruvian Amazon). **Journal of Ethnopharmacology**, n. 122, p. 333-362, 2009.

SCURFIELD, G.; WARDROP, A.B. The nature of reaction wood. VII. Lignification in reaction wood. **Australian Journal Botany**, v. 11, p. 107-116, 1963.

SIMS, R. E. H.; MABEE, W.; SADDLER, J. N.; TAYLOR, M. An overview of second generation biofuel technologies. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1570-1580, 2010.

SJOSTROM, E. **Wood Chemistry: Fundamentals and Applications**. 2ª edição, Academic Press, Inc: San Diego, CA, 1992.

SOGA, K.; WAKABAYASHI, K.; KAMISAKA, S.; HOSON, T. Mechanoreceptors rather than sedimentable amyloplasts perceive the gravity signal in hypergravity-induced inhibition of root growth in azuki bean. **Functional Plant Biology**, v. 32 , n. 2, p. 175-179, 2005.

STUTTE, G. W.; MONJE, O.; HATFIELD, R. D.; PAUL, A. L.; FERL, R. J.; SIMONE, C. G. Microgravity effects on leaf morphology, cell structure, carbon metabolism and mRNA expression of dwarf wheat. **Planta**, v. 224, p. 1038-1049, 2006.

STUTTE, G. W.; MONJE, O.; HATFIELD, R. D.; PAUL, A. L.; Ferl, R. J.; SIMONE, C. G. Microgravity effects on leaf morphology, cell structure, carbon metabolism and mRNA expression of dwarf wheat. **Planta**, p. 1038-1049, 2006.

TAMAOKI, D.; KARAHARA, I.; SCHREIBER, L.; WAKASUGI, T.; KAMISAKA, S. Effects of hypergravity conditions on elongation growth and lignin formation in the inflorescence stem of *Arabidopsis thaliana*. **Journal of plant research**, v. 119, n. 2, p. 79-84, 2006.

TIMELL, T. E. The chemical composition of tension wood. Svensk. **Papperstidn**, v. 72, n. 6, p. 173–181, 1969.

TIMELL, T. E. **Compression Wood in Gymnosperms**. Springer-Verlag, New York, v. 1-3, 1986.

TOMLINSON, P.B. Reaction tissues in *Gnetum gnemon*. A preliminary report. **IAWA Journal**, v. 22, p. 401-413, 2001.

UMEZAWA, T . The cinnamate/ monolignol pathway. **Phytochemistry Review**, v. 9, p. 1-17, 2009.

VANCE, C. P.; KIRK, T. K.; SHERWOOD, R. T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review of Phytopathologist**, v. 18, p. 259-288, 1980.

VAN DOORSSELAERE, J.; BAUCHER, M .; CHOIGNOT, E.; CHABBERT, B.; TOLLIER, M. T., et al. A novel lignin in poplar trees with reduced caffeic acid/5-hydroxyferulic acid *O*-methyltransferase activity. **Plant Journal**, v, 8, p. 855-864, 1995.

VOLKMANN, D.; BALUSKA, F. Gravity: one of the driving forces for evolution. **Protoplasma**, v. 226, p. 143-148, 2006.

VOLKMASNN, D.; BALUSKA, F. Gravity: one oh the driving forces for evolution. **Protoplasma**, v. 229, p. 143-148, 2006.

WADA, M.; OKANO, T.; SUGIYAMA, J.; HORII, F. Characterization of tension and normally lignified wood cellulose in *Populus maximowiczii*, **Cellulose**, v. 2, p. 223-233, 1995.

WAKABAYASHI , K. , SOGA, K.; KAMISAKA, S.; HOSON, T. Changes in levels of cell wall constituents in wheat seedlings grown under continuous hypergravity conditions. Space life sciences: Gravity-relate effects on plants and spaceflight and man-made environments on biological systems. **Advances in Space Research**, v. 36, p. 1292-1297, 2005.

WARDROP, A. B. The reaction wood anatomy of arborescent angiosperms. In: Zimmermann M. H, ed. *The Formation of Wood in Forest Trees*. **Academic Press**, New York, p. 405-456, 1964.

WARDROP, A. B. The formation and function of reaction wood, in: W.A. Coté (Ed.), **Cellular ultrastructure of woody plants**, Syracuse University Press, p. 371–390, 1965.

WATANABE, Y., FUKAZAWA, K.; KOJIMA, Y.; FUNADA, R.; ONA, T.; ASADA, T. Histochemical study on heterogeneity of lignin in Eucalyptus species I. Effects of polyphenols. **Mokuzai Gakkaishi** , v. 43, p. 102–107, 1997.

WATANABE, Y.; KOJIMA, Y.; ONA, T.; ASADA, T.; SANO, Y.; FUKAZAWA, K.; FUNADA, R. Histochemical study on heterogeneity of lignin in eucalyptus species II. The distribution of lignins and polyphenols in the walls of various cell types. **IAWA Journal**, v. 25, n. 3, p. 283-295, 2004.

WENG, J. K.; LI, X.; BONAWITZ, N. D.; CHAPPLE, C. Emerging strategies of lignin engineering and degradation for cellulosic biofuel production. **Biotechnology**, v. 19, p. 166-172, 2008.

WENG, J.K.; LI, X.; STOUT, J.; CHAPPLE, C. Independent origins of syringyl lignin in vascular plants, **The National Academy of Sciences of USA**, v. 105, n. 22, p. 7887-7892, 2008.

WILSON BF, ARCHER RR (1977). Reaction wood: Induction and mechanical action. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28, 23–43.

YOSHIZAWA, N.; SATOH, M.; YOKOTA, S.; IDEI, T. Formation and structure of reaction wood in *Buxus microphylla* var. *insularis* Nakai. **Wood Science and Technology**, v. 27, p. 1-10, 1993.

ZHOU, J.; LEE, C. Z.; HONG, R.; YE, Z. H. MYB58 and MYB63 are transcriptional activators of the lignin biosynthetic pathway during secondary cell wall formation in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 21, p. 248-266, 2009.

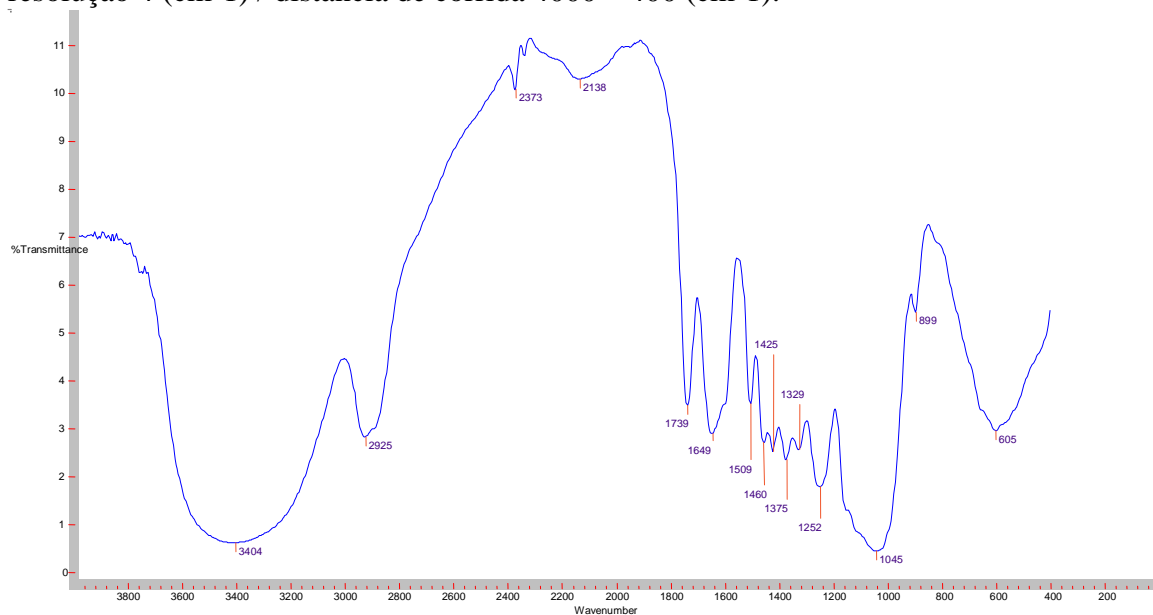
ZIMMERMANN, M. H.; BROWN, C. L. Trees: Structure and Function. **Springer-Verlag, Berlin, 1971.**

ZOBEL, B. J.; VAN BUIJTENEN, J. P. Wood Variations: Its Causes and Control. (Springer series in wood science). **Springer-Verlag, Berlin, 1989.**

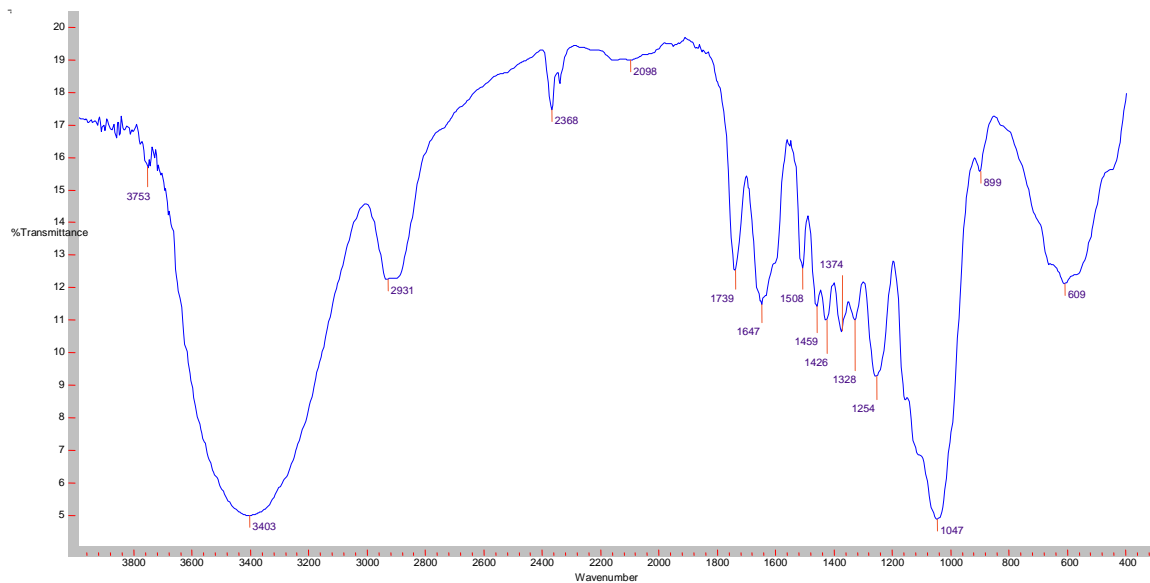
ANEXO

ANEXO 1

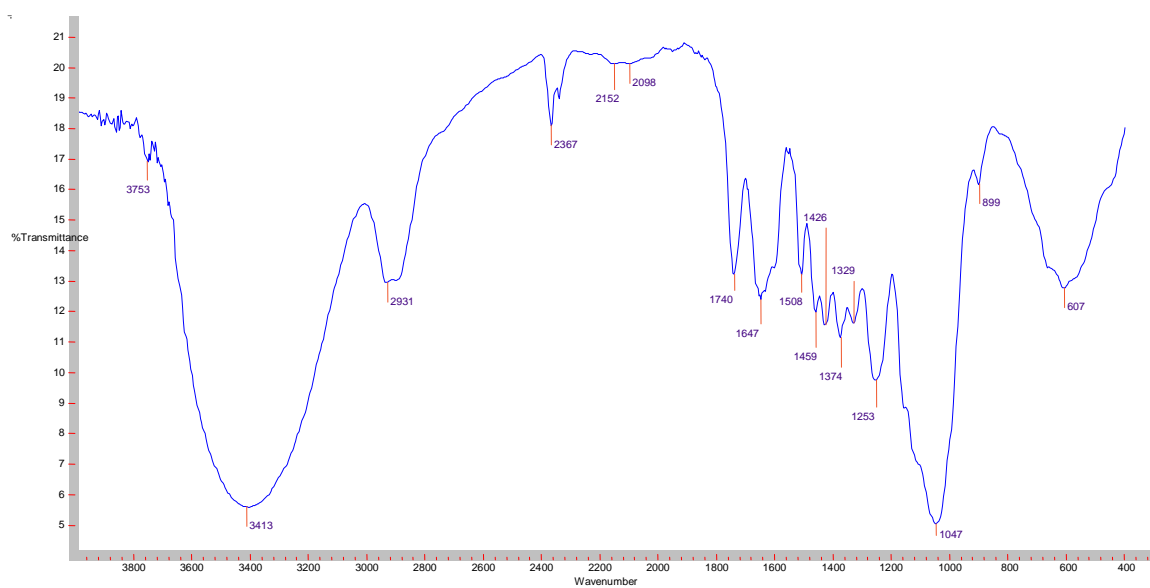
Espectros no infravermelho do material lenhoso (moído) da raque de *Couroupita guianensis* Aubl. em pó, extraído com ciclohexano, acetato de etila e metanol. Smooth (5) / 32 scans / resolução 4 (cm-1) / distância de corrida 4000 – 400 (cm-1).



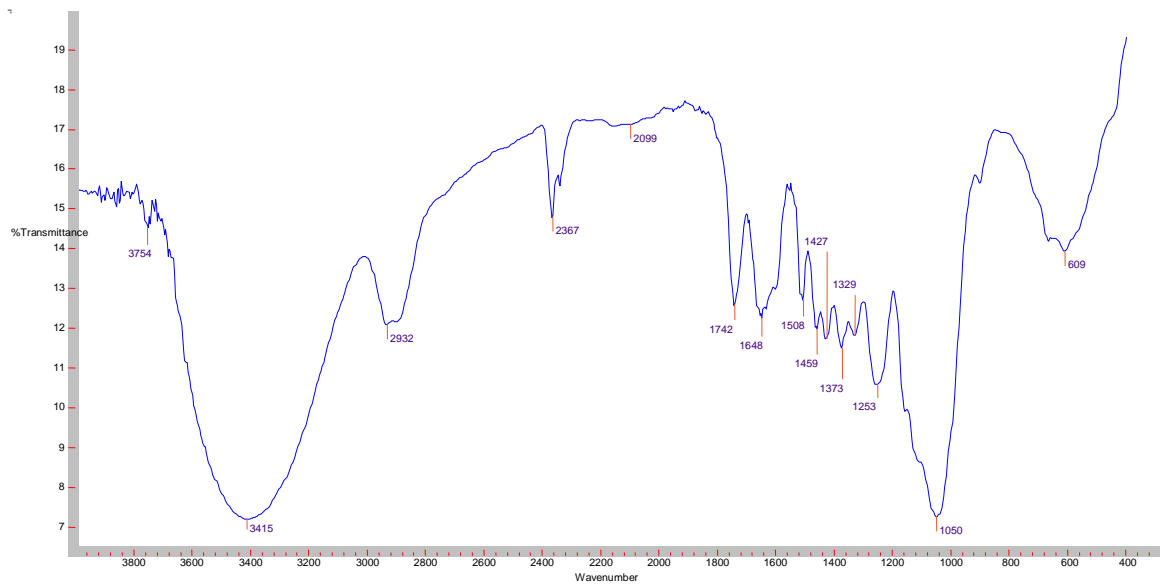
Espectro 1. Espectro no infravermelho do material lenhoso (moído) da raque inteira de *Couroupita guianensis* Aubl. em pó, extraído com ciclohexano, acetato de etila e metanol.



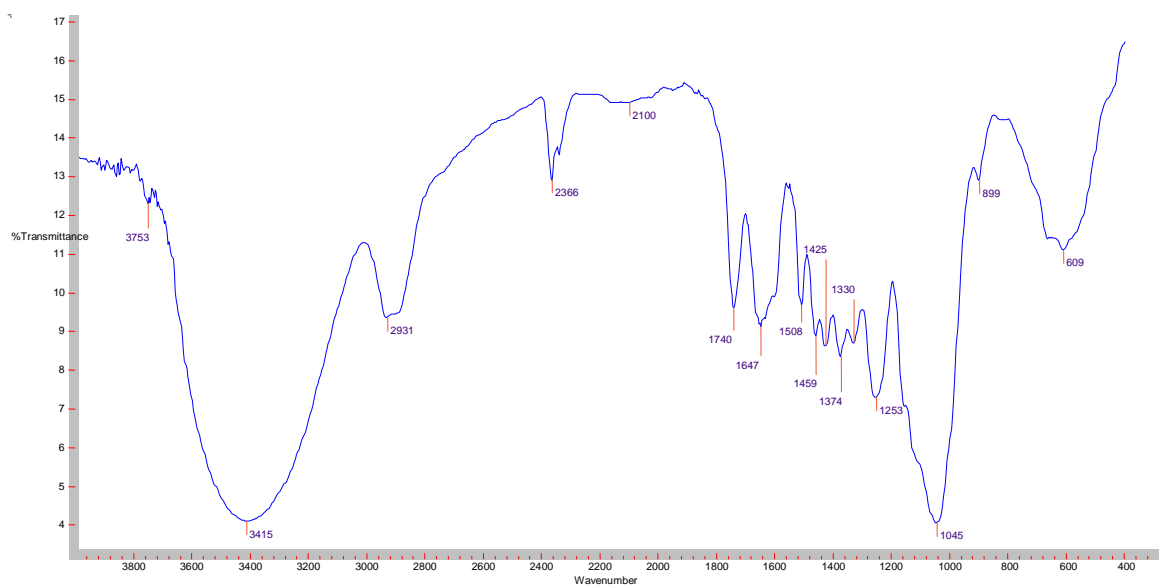
Espectro 2. Espectro no infravermelho do material lenhoso (moído) da região superior próxima ao tronco de *Couroupita guianensis* Aubl. em pó, extraído com ciclohexano, acetato de etila e metanol.



Espectro 3. Espectro no infravermelho do material lenhoso (moído) da região superior próxima ao fruto de *Couroupita guianensis* Aubl. em pó, extraído com ciclohexano, acetato de etila e metanol.



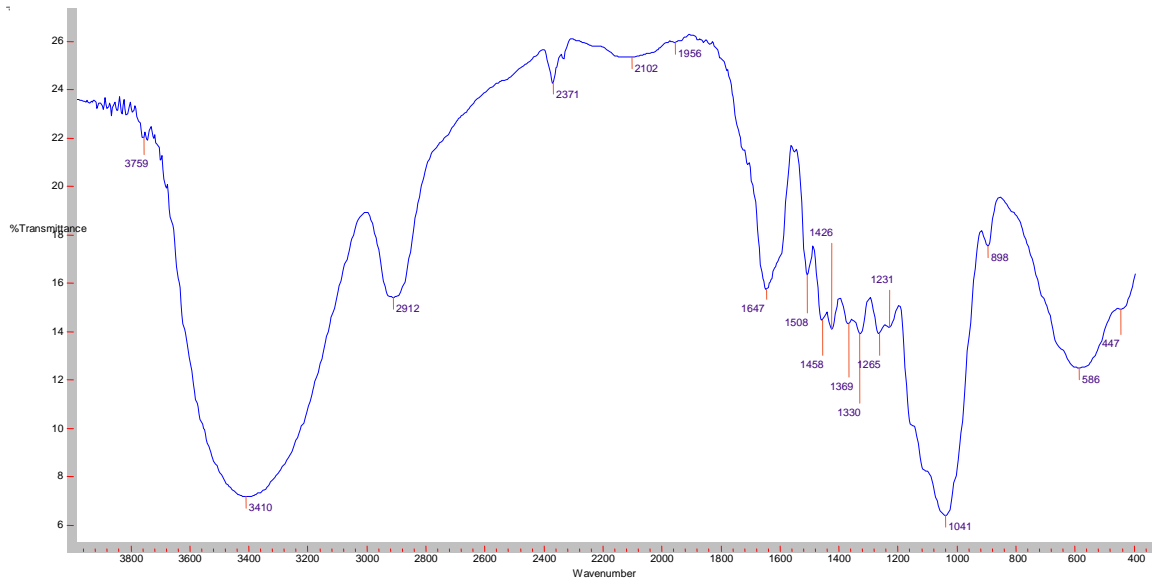
Espectro 4. Espectro no infravermelho do material lenhoso (moído) da região inferior próxima ao tronco de *Couroupita guianensis* Aubl. em pó, extraído com ciclohexano, acetato de etila e metanol.



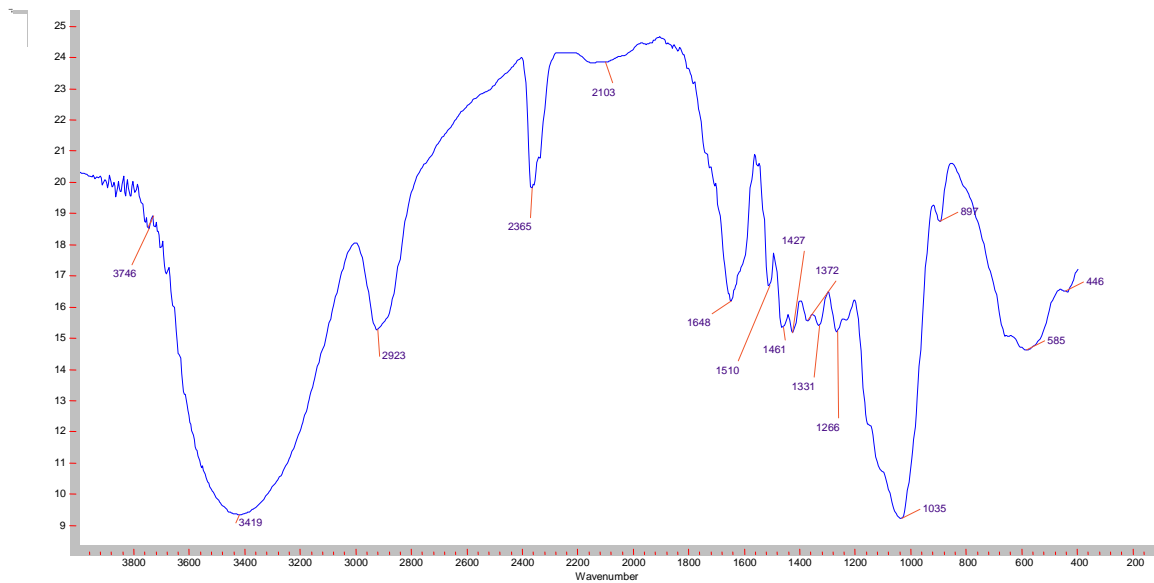
Espectro 5. Espectro no infravermelho do material lenhoso (moído) da região inferior próxima ao fruto de *Couroupita guianensis* Aubl. em pó, extraído com ciclohexano, acetato de etila e metanol.

ANEXO 2

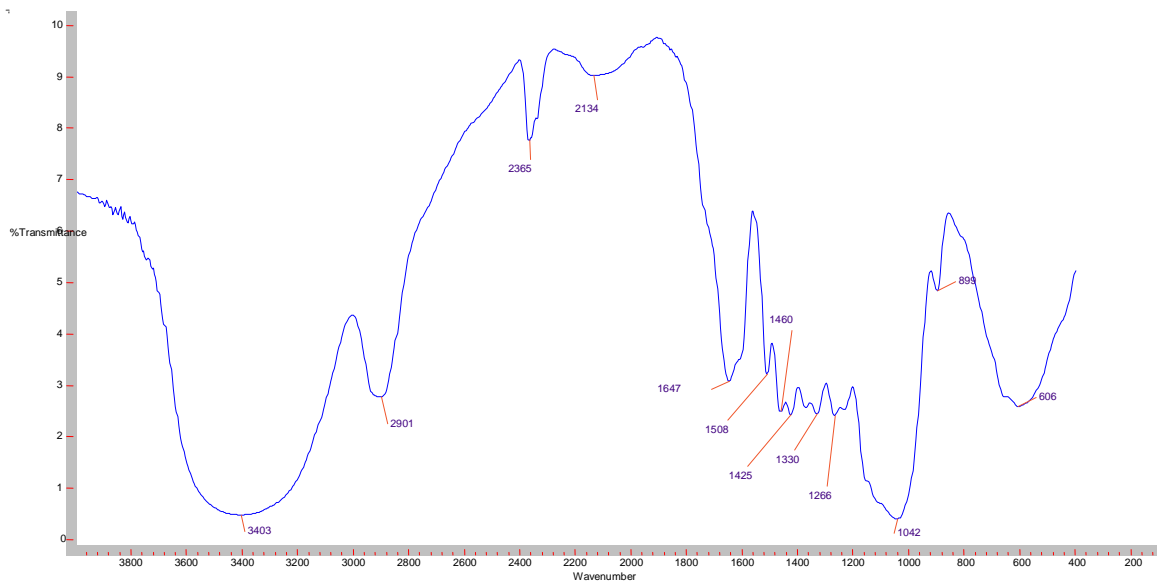
Espectros no infravermelho do material lenhoso (moído) da raque de *Couroupita guianensis* Aubl. em pó, extraído com ciclohexano, acetato de etila e metanol tratados com NaOH 1%. Smooth (7) , 32 scans , resolução 4 (cm-1) e distância de corrida 4000 – 400 (cm-1).



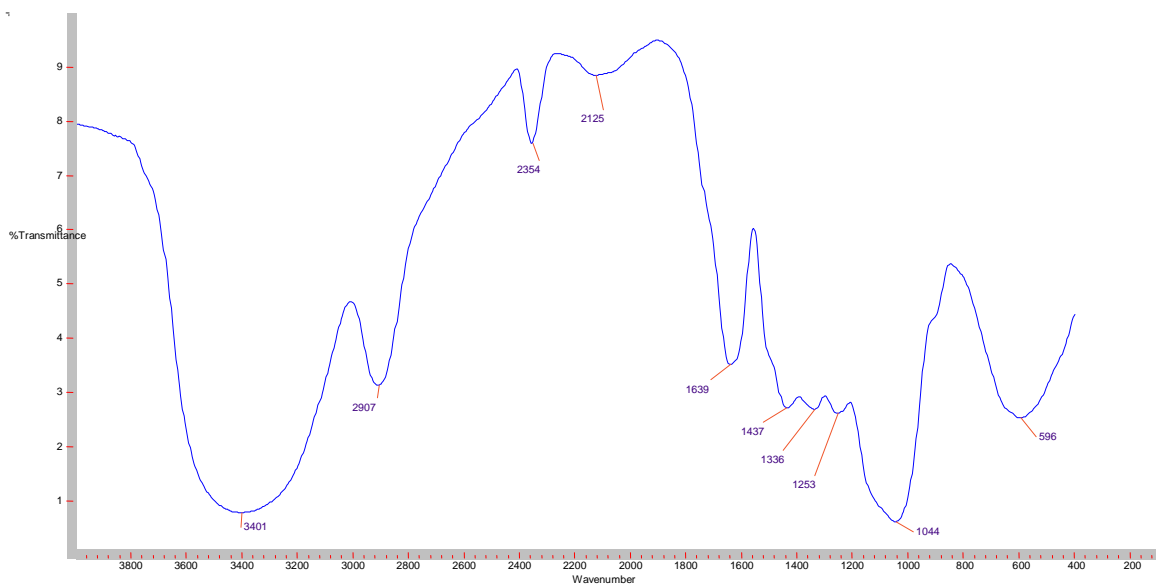
Espectro 1. Espectro no infravermelho do material lenhoso (moído) da raque inteira de *Couroupita guianensis* Aubl. em pó, extraído com ciclohexano, acetato de etila e metanol tratados com NaOH 1% por 1 hora.



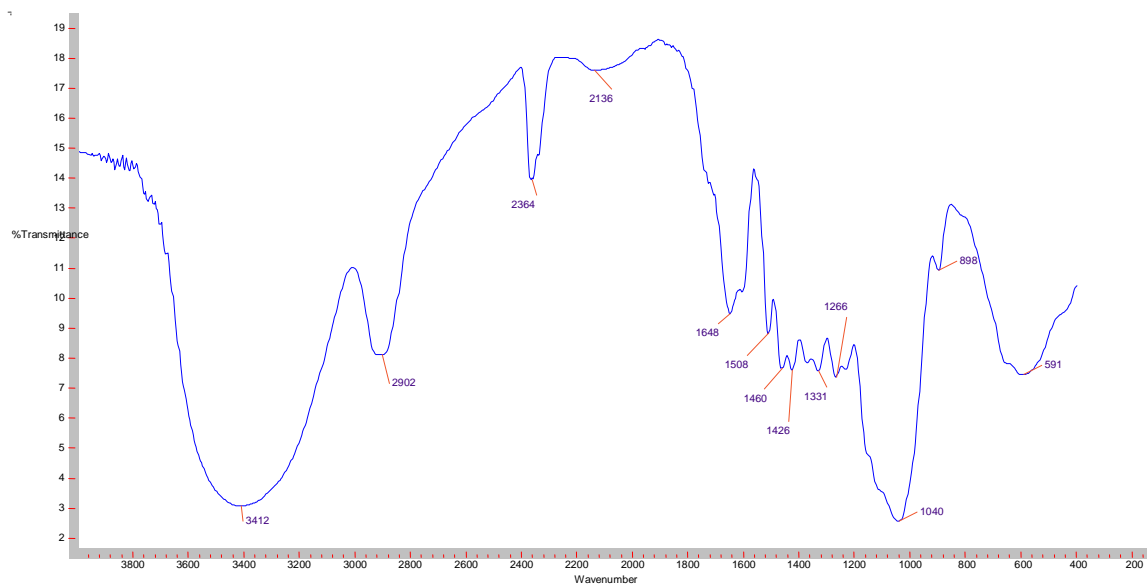
Espectro 2. Espectro no infravermelho do material lenhoso (moído) da região superior próxima ao tronco de *Couroupita guianensis* Aubl. em pó, extraído com ciclohexano, acetato de etila e metanol tratados com NaOH 1% por 1 hora.



Espectro 3. Espectro no infravermelho do material lenhoso (moído) da região superior próxima ao fruto de *Couroupita guianensis* Aubl. em pó, extraído com ciclohexano, acetato de etila e metanol tratados com NaOH 1% por 1 hora.



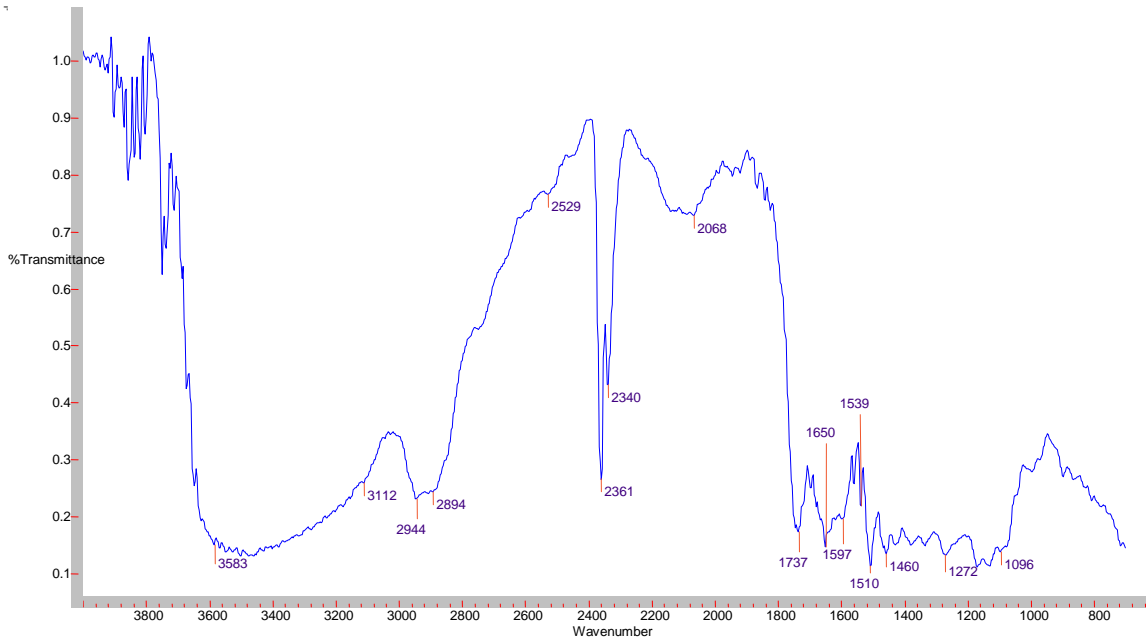
Espectro 4. Espectro no infravermelho do material lenhoso (moído) da região inferior próxima ao tronco de *Couroupita guianensis* Aubl. em pó, extraído com ciclohexano, acetato de etila e metanol tratados com NaOH 1% por 1 hora.



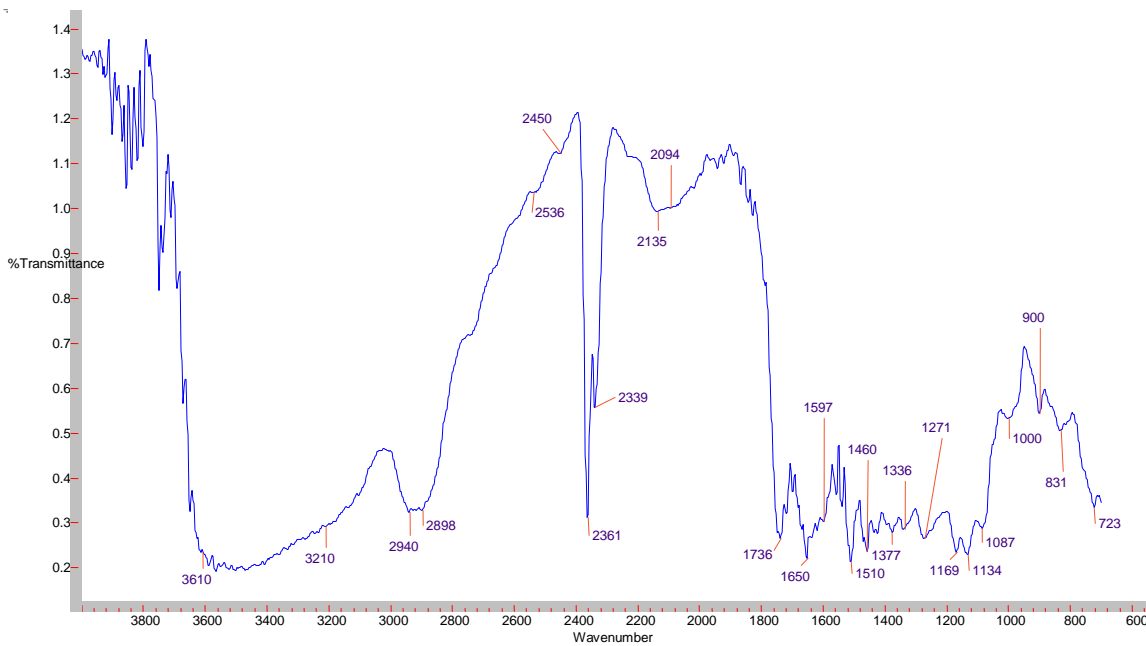
Espectro 5. Espectro no infravermelho do material lenhoso (moído) da região inferior próxima ao fruto de *Couroupita guianensis* Aubl. em pó, extraído com ciclohexano, acetato de etila e metanol tratados com NaOH 1% por 1 hora.

ANEXO 3

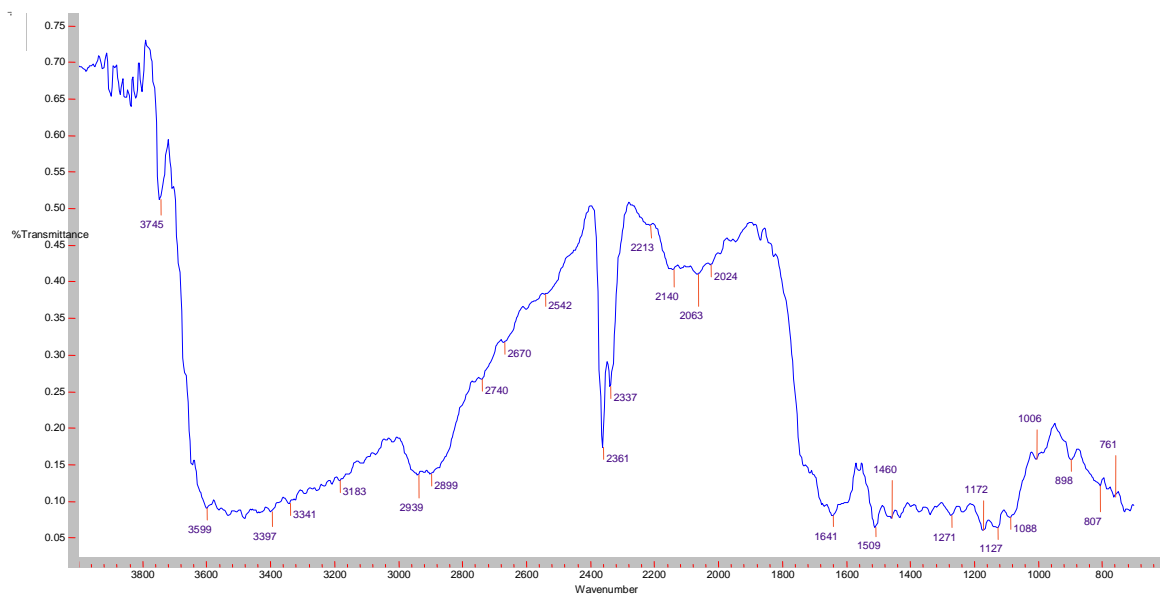
Espectros obtidos por infravermelho através de um microscópio nas regiões da seção transversal da raque de *Couroupita guianensis* Aubl. Smooth (11), 128 scans, resolução 2 (cm^{-1}) e distância de corrida 4000 – 700 (cm^{-1}).



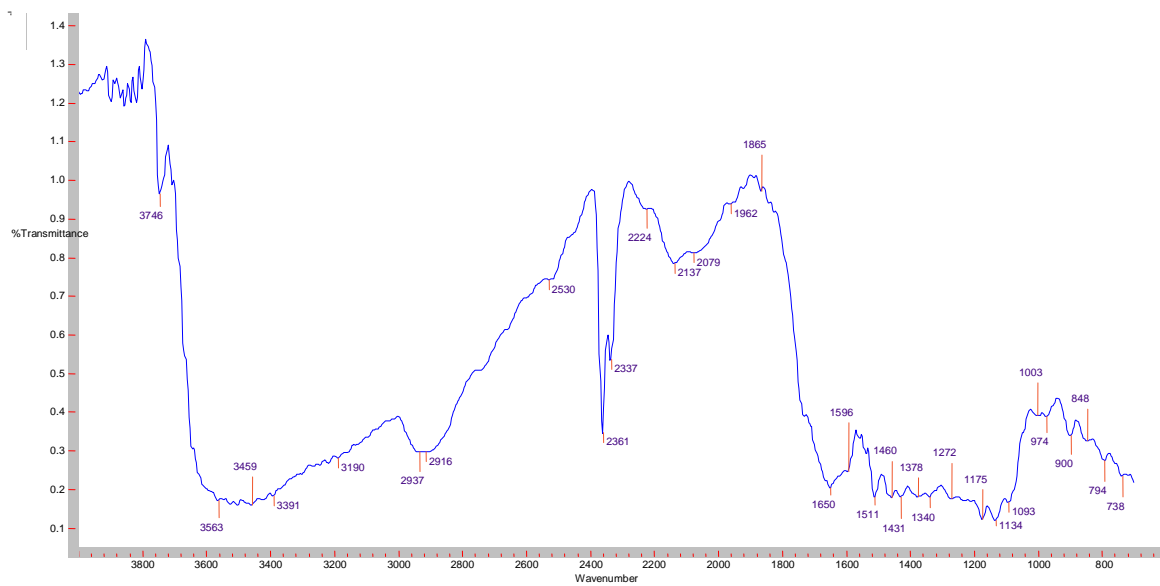
Espectro 1. Espectro obtido por infravermelho através de um microscópio da região superior da seção transversal ao natural da raque de *Couroupita guianensis* Aubl.



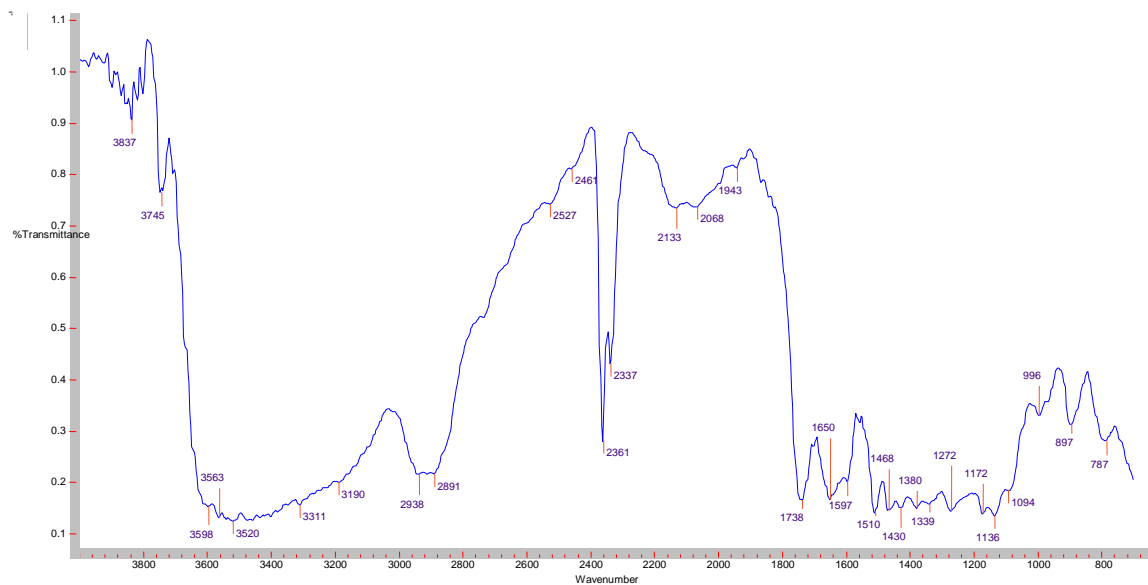
Espectro 2. Espectro obtido por infravermelho através de um microscópio da região inferior da seção transversal ao natural da raque de *Couroupita guianensis* Aubl.



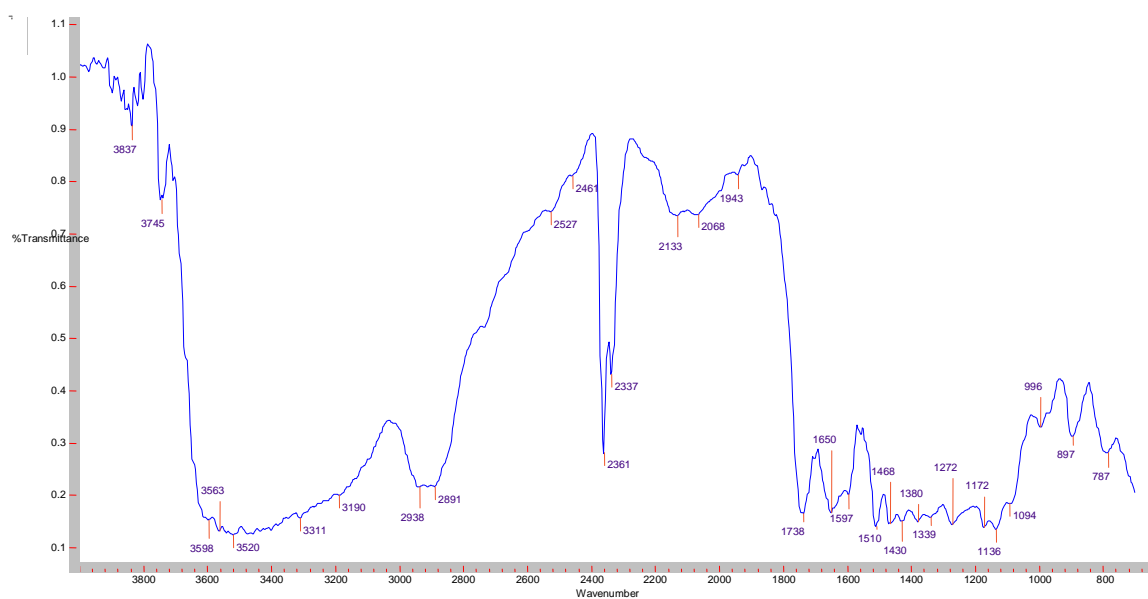
Espectro 3. Espectro obtido por infravermelho através de um microscópio da região superior da seção transversal tratado com NaOH 1% por 1 hora da raque de *Couroupita guianensis* Aubl.



Espectro 4. Espectro obtido por infravermelho através de um microscópio da região inferior da seção transversal tratado com NaOH 1% por 1 hora da raque de *Couroupita guianensis* Aubl.



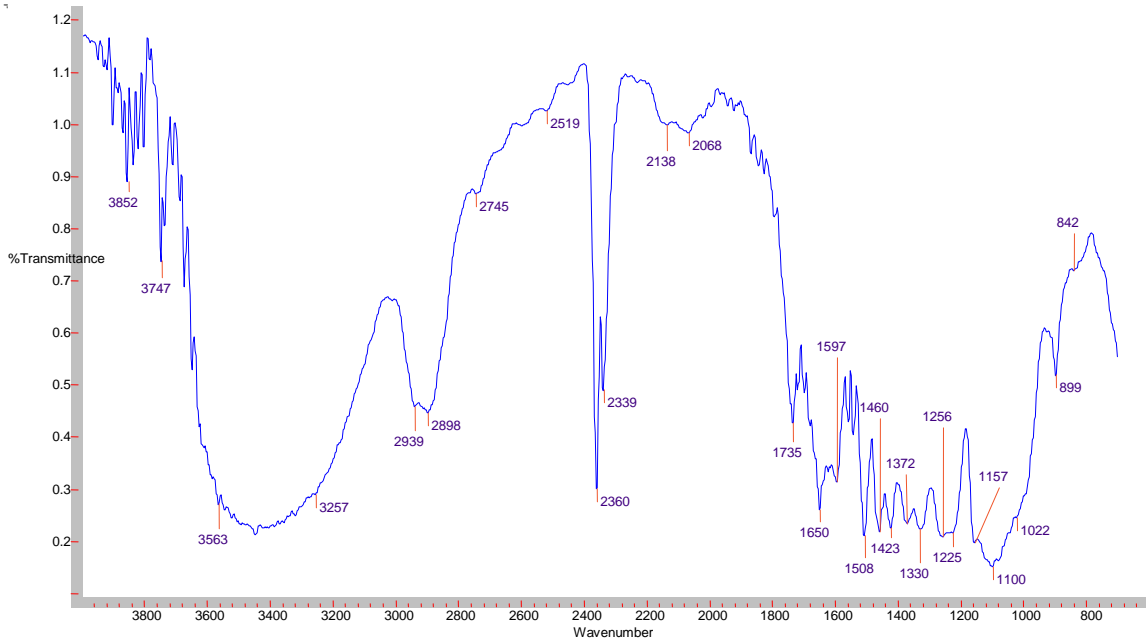
Espectro 5. Espectro obtido por infravermelho através de um microscópio da região superior da seção transversal tratado com acetona por 1 hora da raque de *Couroupita guianensis* Aubl.



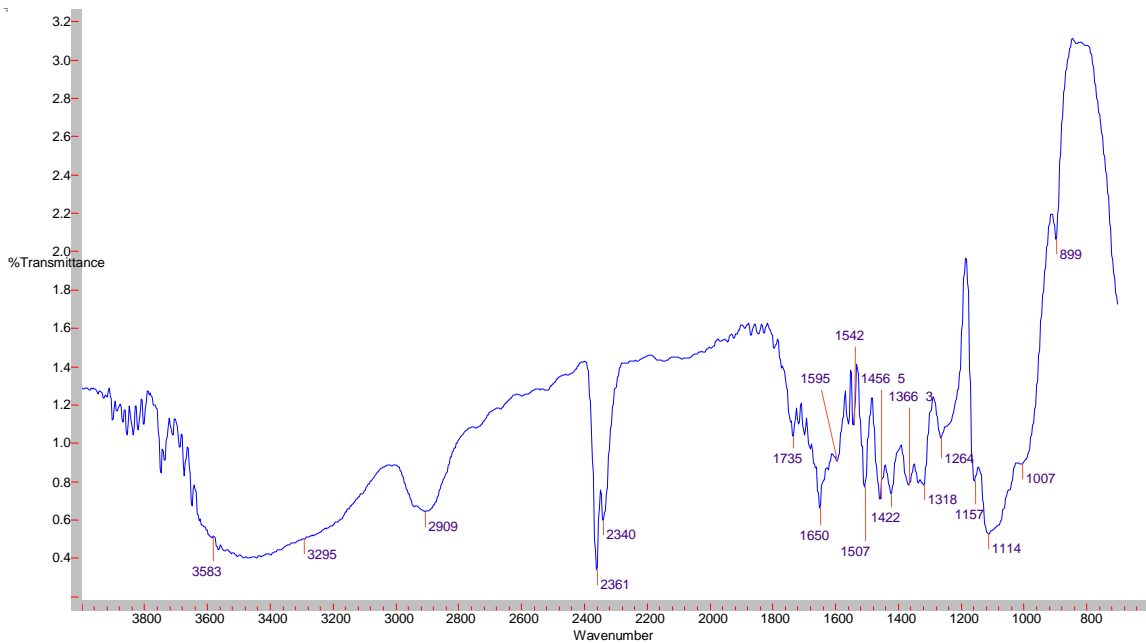
Espectro 6. Espectro obtido por infravermelho através de um microscópio da região inferior da seção transversal tratado com acetona por 1 hora da raque de *Couroupita guianensis* Aubl.

ANEXO 4

Espectros obtidos por infravermelho através de um microscópio nas regiões da seção transversal tratado com NaOH 1% por 10 minutos da raque de *Couroupita guianensis* Aubl. Smooth (11), 128 scans , resolução 2 (cm^{-1}) e distância de corrida 4000 – 700 (cm^{-1}).



Espectro 1. Espectro obtido por infravermelho através de um microscópio da região superior da seção transversal tratado com NaOH 1% por 10 minutos da raque de *Couroupita guianensis* Aubl.



Espectro 2. Espectro obtido por infravermelho através de um microscópio da região inferior da seção transversal tratado com NaOH 1% por 10 minutos da raque de *Couroupita guianensis* Aubl.