



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

DANIELLE AFFONSO SAMPAIO

**Composição química estrutural do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia*
(Bert.) O. Ktze. com ênfase na lignificação**

Prof. Dr. Heber dos Santos Abreu
Orientador

SEROPÉDICA, RJ
Fevereiro – 2014



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

DANIELLE AFFONSO SAMPAIO

**Composição química estrutural do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia*
(Bert.) O. Ktze. com ênfase na lignificação**

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Florestal, como requisito parcial para obtenção do Título de Engenheiro Florestal, Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Prof. Dr. Heber dos Santos Abreu
Orientador

SEROPÉDICA, RJ
Fevereiro – 2014

**Composição química estrutural do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia*
(Bert.) O. Ktze. com ênfase na lignificação**

DANIELLE AFFONSO SAMPAIO

Comissão Examinadora:

Monografia aprovada em 7 de Fevereiro de 2014.

Prof. Dr. Heber dos Santos Abreu
UFRRJ / IF / Departamento de Produtos Florestais
Orientador

Prof. Dr. Tiago Böer Breier
UFRRJ / IF / Departamento de Silvicultura
Membro

Prof^a. M.Sc. Natalia Dias de Souza
UFRRJ / IF / Departamento de Produtos Florestais
Membro

DEDICATÓRIA

À Deus.
Aos Meus Irmãos
Aos Meus Pais
À Matheus Tiné Palheta de Oliveira

“As Árvores são Poemas que a Terra escreve para o Céu”.

Kahlil Gibran



AGRADECIMENTOS

À Deus, por me presentear com a VIDA, por guiar todos os meus caminhos, por me fazer vencer com sabedoria mais essa etapa da vida.

Aos meus Pais, por me ensinarem o valor da Educação.

Aos meus Irmãos, por todos os conselhos, por todos os cuidados.

A Matheus Tiné Palheta de Oliveira, companheiro de todas as horas, pelos conselhos, carinho e incentivo. Obrigada por estar na minha vida!

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pelo privilégio que me concedeu em poder nela VIVER!

Ao Prof. Dr. Heber dos Santos Abreu, por ter acreditado e confiado em mim para a esta pesquisa, pela sua ajuda e experiência, contribuindo em todos os aspectos para a realização deste trabalho.

Aos Professores deste Instituto, por todos os ensinamentos.

A Minha Família Ruralina, Taiana Menezes Scheiner, Letícia Maria Souto, Sharitta Alves, Raquel de Oliveira, Rafael Ammon, Micael Booth, Denise de Souza, Bruna Barboza, pela amizade, pelo companheirismo, por toda nossa vivência ao longo da graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de iniciação científica, CAPES e FAPERJ pela infraestrutura de equipamentos do laboratório.

Ao Prof. Roberto Carlos Costa Lelis, pela cessão do Laboratório de Tecnologia da Madeira do Instituto de Florestas / UFRRJ.

Ao Viveiro Florestal Luiz Fernando Oliveira Capellão da UFRRJ, em especial ao Sebastião Corrêa da Costa, pelo fornecimento das sementes de *Araucaria angustifolia* utilizadas neste estudo.

Aos amigos, Monique Gurgel, Leonardo Sanchez, Clessio Gomes, pela amizade e pela valiosa colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, Thuanny Menezes, Bruno Couto, Gisely Oliveira, Luizmar de Assis, Vinícius Cadete, Carlos Henrique, Michel Cardoso, pela nossa boa convivência

Aos companheiros, José Carlos Ferreira Batista e Leonardo Davi, pela ajuda imprescindível para a realização deste trabalho.

A empresa Rizoma engenharia & paisagismo, pela oportunidade do estágio e pelos ensinamentos técnicos e pessoais.

À todos aqueles que de alguma forma participaram desta importante etapa.

RESUMO

A presente monografia teve como objetivo caracterizar a composição química estrutural e descrever anatomicamente o tegumento da semente de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. enfatizando a lignificação. Para tanto, o tegumento da semente foi moído, homogeneizado e submetido a um ciclo de extração com os solventes ciclohexano, acetato de etila e metanol de forma a preparar o material para a análise química estrutural, visando a determinação dos teores de celulose, hemicelulose, da lignina de Klason e lignina dioxano. A lignina dioxano obtida foi reduzida quimicamente, devido a presença de terminais aldeídicos na lignina. Essa transformação ocorreu com a redução do grupo aldeído à álcool utilizando NaBH_4 . Foram registrados espectros no infravermelho das amostras lignocelulósicas, da lignina dioxano e da lignina dioxano reduzida. Os espectros no infravermelho foram registrados em pastilhas de KBr confeccionadas com 1 mg de amostra e 100mg de KBr. Foram realizadas análises microscópicas das camadas da exotesta e mesotesta do tegumento da semente ao natural, por teste histoquímico (teste de Wiesner) e análise com fluorescência. Neste contexto, a quantificação dos elementos estruturais da parede celular foi de 32.43% de lignina, 35.16% de celulose e 14,83% de hemicelulose. A análise no infravermelho mostrou que a reação de redução de terminais aldeídicos da lignina de dioxano por NaBH_4 ocorreu com sucesso, visto que o sinal no espectro no infravermelho correspondente ao estiramento de RHC=O em $1620\text{-}1653\text{cm}^{-1}$ diminuiu de intensidade após reação. Os espectros também mostraram que a lignina da casca da semente é extremamente rica em unidade guaiacila, revelando uma estrutura molecular rica em ligações condensadas. Nas análises microscópicas foram observados na exotesta a presença de esclereídeos altamente lignificados e na mesotesta a presença de canais resiníferos assim como a ocorrência dispersa de macroesclereídeos. Ficou evidente que a presença de terminais aldeídicos deve-se a baixa atividade da CAD na formação da lignina, acumulando uma significativa quantidade de coniferaldeído a qual se define como lignina hidrofóbica e de maior mobilidade na parede celular.

Palavras-chave: Araucária, lignina, semente.

ABSTRACT

This work aimed to characterize the chemical structural composition and to describe the anatomy of the seed tegument of *Araucaria angustifolia* with emphasis in the lignification. For this, the tegument of the seed was milled and then submitted to the extraction cycle with cyclohexane, ethyl acetate and methanol solvents to prepare the material for chemical analysis in order to determine cellulose, hemicellulose, Klason and dioxane lignins. The dioxane lignin was chemically reduced due aldehyde terminal presence. This transformation occurred with the reduction of the aldehyde group to the alcohol using NaBH₄. Infrared spectra from tegument samples, dioxane and reduced dioxane lignins were recorded. The infrared spectra were recorded in KBr pellets with 1 mg of sample and 100 mg of KBr. Microscopic analysis of the tegument tissue from exotesta and mesotesta by histochemical test (Wiesner) and fluorescence were carried out. In this context, the chemical quantification of cell wall was 32.43 %, 35.16 %, 14.83 %, to the lignin, cellulose and hemicellulose, respectively. Infrared analysis showed that the reaction of aldehydes terminals of dioxane lignin was successful. The signal in the infrared spectrum corresponding to the RHC=O stretching (1620-1653 cm⁻¹) decreased its intensity after reaction. The spectra also showed that the lignin from the seed tegument is extremely rich in guaiacyl unit, with a molecular structure rich in condensed bonds. Microscopy analysis revealed high lignified sclereids in exotesta and resiniferous channels as well as the macrosclereids in the mesotesta. It was also evident that the presence of aldehyde due low CAD activity during lignin formation, accumulating a significant amount of coniferaldehyde which is defined as hydrophobic lignin and of higher mobility in the cell wall.

Key-words: Araucaria, lignin, seed.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE SIGLAS.....	XII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 GÊNERO <i>ARAUCARIA</i>	5
2.2 SEMENTE DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i>	6
2.3 LIGNINA	7
3. OBJETIVO.....	10
3.1 OBJETIVO GERAL.....	10
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1 PREPARO DO MATERIAL PARA A CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA ESTRUTURAL	11
4.2 PREPARO DO MATERIAL PARA AS ANÁLISES QUÍMICAS	13
4.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO	14
4.4 PREPARO DO MATERIAL PARA ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	14
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA ESTRUTURAL DO TEGUMENTO DA SEMENTE DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i>	15
5.2 ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA NO INFRAVERMELHO DO TEGUMENTO DA SEMENTE DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i>	16
5.3 CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DO TEGUMENTO DA SEMENTE DE <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i>	20
6. CONCLUSÃO.....	23
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Cobertura original da Floresta Ombrófila Mista.	1
Figura 2.	<i>Araucaria angustifolia</i> (Bert.) O. Ktze.	3
Figura 3	Estróbilos Feminino (A) e Masculino de <i>Araucaria angustifolia</i> (Bert.) O. Ktze.	3
Figura 4.	Sementes de <i>Araucaria angustifolia</i> (Bert.) O. Ktze.	4
Figura 5.	Composição básica da lignina.	7
Figura 6.	Representação da lignina estabelecida por análise de Vanholve (2010).	8
Figura 7.	Rota biossintética da formação dos monolignóis da lignina (Boerjan <i>et al.</i> , 2003).	10
Figura 8.	Camadas exotesta, mesotesta e endotesta do tegumento da semente de <i>Araucaria angustifolia</i> .	11
Figura 9.	Extrator do tipo Soxhlet.	12
Figura 10.	Material reacional em atmosfera de nitrogênio.	13
Figura 11.	Espectrômetro no infravermelho VARIAN 640-IR	14
Figura 12.	Microscópio óptico Olympus ,acoplado a um sistema de análise de imagem digital (Imaging Software cellf) utilizado para a microscopia de campo claro e epifluorescente.	15
Figura 13.	Espectro no infravermelho do material lignocelulósico pré-extraído.	17
Figura 14.	Espectro no infravermelho da lignina de dioxano. (B).	17
Figura 15.	Modelos de estrutura de ligninas.	18
Figura 16.	Espectro no infravermelho da lignina de dioxano (A) e da lignina de dioxano reduzida	19
Figura 17.	Redução do coniferaldeído por NaBH ₄ a álcool coniferílico.	19
Figura 18.	Fotomicrografia do tegumento <i>in natura</i> da semente de <i>Araucaria angustifolia</i> (exotesta e mesotesta).	21
Figura 19.	Fotomicrografia da exotesta <i>in natura</i> sob o filtro excitação azul (450-480nm) da semente de <i>Araucaria angustifolia</i> .	21
Figura 20.	Fotomicrografia da exotesta da semente ao natural (A) e corado (B) de	22

Araucaria angustifolia.

- Figura 21.** Fotomicrografia exibindo autofluorescência sob o filtro de excitação verde (330-385nm) do tegumento da semente ao natural de *Araucaria angustifolia*. 22
- Figura 22.** Fotomicrografia exibindo esclereídeo colunar de extremidade ramificada (A) e esclereídeo bifurcado (B) corados com safranina alcoólica 1%. 23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Evolução enzimática desde o metabolismo primário ao metabolismo secundário (Weng and Chappelle, 2010).	9
Tabela 2.	Composição química da semente de <i>Araucaria angustifolia</i> e de outras sementes florestais (Costa <i>et al.</i> , 2011).	16
Tabela 3.	Atribuições dos sinais das ligninas no infravermelho.	20

LISTA DE SIGLAS

IUCN	International Union of Conservation of Nature and Natural Resources.	2
-------------	--	---

1. INTRODUÇÃO

A Floresta Ombrófila Mista integra o domínio do bioma Mata Atlântica, acolhendo uma grande variedade de espécies, algumas das quais endêmicas. Está circunscrita a uma região de clima pluvial subtropical em altitudes que vão de 500 a 1200 m de altitude (Guerra et al., 2002). Recobria originalmente cerca de 175.000 Km² na Região Sul do Brasil (Figura 1). É caracterizada por dois estratos, sendo o superior dominado pela *Araucaria angustifolia*, que chega a responder por mais de 40% dos indivíduos arbóreos existentes nesse ecossistema (Medeiros et al., 2004). E, o inferior é dominado por uma variedade de espécies como canela (*Ocotea* sp. *Nectandra* sp.) e imbuia (*Ocotea porosa*). No estrato arbustivo no sub-bosque predominam a erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e o xaxim (*Dicksonia sellowiana*).

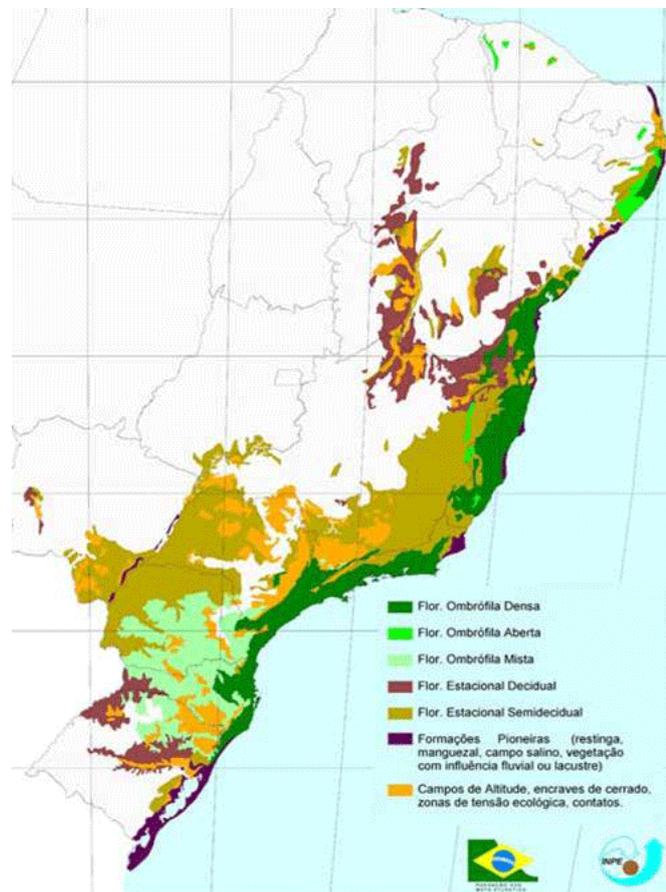


Figura 1. Mapa do Brasil contendo a área original do bioma Mata Atlântica com suas sub-formações (INPE, 2006).

Para Veloso et al (1991) a *Araucaria angustifolia* é espécie característica e exclusiva da Floresta Ombrófila Mista, nas formações Aluvial, Submontana, Montana e Alto-Montana. Mas Carvalho (2003) afirma que a espécie é também encontrada nas áreas de tensão ecológica, com a Floresta Estacional Semidecidual e com a Floresta Ombrófila Densa (Floresta Atlântica). Ocupam, também, pequenas regiões da Argentina e do Paraguai (Cozzo,

1980; Lopez *et al.*, 1987).

Carvalho (1994) relatou que a *Araucaria angustifolia* ocupava uma superfície de cerca de 200.000 Km², ocorrendo desde o Paraná (40% da superfície), Santa Catarina (31%) e Rio Grande do Sul (25%) até em manchas esparsas no sul de São Paulo (3%), sul de Minas Gerais e no estado do Rio de Janeiro (1%) em áreas de altitudes mais elevadas. Ruschi (1950) constatou a presença dessa espécie no Espírito Santo, crescendo em meio natural em uma área da Serra do Caparaó, em uma altitude acima de 1.700 metros. Atualmente, estima-se que os remanescentes ocupem apenas entre 1% a 4% da área original (Lima & Capobianco 1997, Guerra *et al.* 2002).

De acordo com Machado (1980) a *Araucaria angustifolia* é uma espécie que ocorre em diferentes tipos de solos, mas de maneira geral os solos dominantes da região de sua ocorrência natural são siltico-argilosos, podendo ainda ser encontrada em solos oriundos de granitos, dioritos e arenitos.

Pertencente a família Araucariaceae, a espécie é também conhecida como pinheiro-brasileiro e pinheiro-do-paraná (Lamprecht, 1986). Comercialmente é conhecida por parana pine (Carvalho, 2003). É a única espécie do seu gênero com ocorrência natural no Brasil e está na categoria de vulnerável na lista de espécies ameaçadas da IUCN (Hilton-Taylor 2000).

A exploração do pinheiro-brasileiro teve seu marco inicial na eclosão da Primeira Guerra Mundial que, ao bloquear a comercialização de uma espécie de pinheiro da Letônia, suscitou a proliferação de serrarias nos estados do Sul do Brasil, instaladas para abastecer alguns dos principais centros consumidores de madeira do mundo (Medeiros, 2004). O auge dessa exploração ocorreu entre as décadas de 1950 e 1970, quando o metro cúbico da *Araucaria angustifolia* era o produto madeireiro mais importante do Brasil (Shimizu & Oliveira, 1981; Seitz, 1986). Segundo Sousa (2000) essa exploração foi ostensiva e desordenada e quase resultou na extinção do pinheiro-brasileiro. Atualmente, é uma espécie protegida por lei no estado do Paraná, por meio da Portaria do Instituto Ambiental do Paraná (IAP) 191/2004, tendo seu corte permitido somente por autorização prévia do órgão ambiental (IAP, 2004).

O pinheiro-brasileiro (Figura 2) é uma conífera secundária longeva, mas de temperamento pioneiro (Imaguire, 1979). Árvore perenifólia, de aspecto original e contrastante com as demais árvores do Sul do Brasil (Carvalho, 2003).



Figura 2. *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.

Ainda segundo Carvalho (2003), o pinheiro-brasileiro é uma espécie dióica, raramente monóica por traumas ou doenças, apresentando suas estruturas reprodutoras organizadas em estróbilos masculinos e femininos, estes últimos são também chamados de pinhas (Figura 3).



Figura 3. Estróbilos feminino (A) e masculino (B) de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.

A polinização do pinheiro-brasileiro é principalmente anemocórica (Carvalho, 2003). O processo reprodutivo é longo (Shimoya, 1962), podendo ser de até quatro anos após a fecundação (Solórzano filho, 2001). As pinhas são encontradas nos galhos, entre 1 a 2 em cada ramo (Mattos, 1972) e amadurecem de fevereiro a dezembro, conforme as variedades (Carvalho, 2003). As sementes, que se desenvolvem a partir dos óvulos nus, são encontradas no Brasil de março a setembro. São consideradas por Ramos e Carneiro (1988), como a principal forma de propagação da espécie.

Embora as utilizações mais comuns da *Araucaria angustifolia* estivessem sempre

associadas à obtenção de madeira para tabulados (Mainieri & Chimelo, 1989; Guerra et al., 2002), para energia (Boiteux, 1947) e para o abastecimento da indústria de papel e celulose, suas sementes dão outra grande importância à espécie. Tema principal de alguns eventos gastronômicos no sul e sudeste do Brasil, os pinhões, como também são conhecidas as sementes do pinheiro-brasileiro (Conforti e Lupano, 2007), tornam-se também fonte de renda alternativa para muitas famílias que vivem nas regiões de ocorrência (Ecoplan, 2000; Siega, 1998).

Rica em reservas energéticas (Carvalho, 2003), as sementes de *Araucaria angustifolia* (Figura 4) são recalcitrantes, perdendo a viabilidade germinativa rapidamente após a colheita (Ferreira, 1977), o que dificulta sua conservação por longos períodos. Doni Filho *et al.* (1985), relataram que a presença do tegumento externo (brácteas) atrasa o processo de germinação dos pinhões, que pode estar associado à restrição à entrada de água (Borges et al., 1987).



Figura 4. Sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.

Os pinhões são carnosos, e, são uma fonte rica em amido (endoplasma), proteínas, lipídeos, açúcares, fibras, magnésio e cobre (Cordenunsi *et al.*, 2004).

Experimentos mostram que sua casca apresenta potenciais na produção de carvão ativo e na remoção de metais de águas poluídas (Santos *et al.*, 2011).

Cordenunsi *et al.* (2004) afirmam que a coloração avermelhada da casca da semente madura indica a presença de substâncias polifenólicas, que são transferidas para o gametófito quando do cozimento da semente para consumo.

Entretanto, existem polifenólicos insolúveis, como a lignina, que possuem propriedades que garantem a estrutura celular da semente, a proteção física e química assim como a condução de água.

As ligninas diferem-se quanto a sua composição. As tradicionais, que ocorrem em madeira, apresentam composições apenas formadas pelas unidades fenilpropanoídicas tendo as hidroxilas como um dos mais importantes grupos funcionais.

Descobertas recentes definiram outro tipo de lignina (C-lignina) que é rica em ácido caféico. Essa lignina é depositada em alta concentração durante os estágios iniciais de desenvolvimento da semente, e, foi encontrada em uma orquídea baunilha (*Baunilha planifolia*), e em algumas Cactaceae. Segundo Chena (2012) algumas espécies de cactos

contêm apenas C-lignina em sua semente, enquanto outros contêm apenas a lignina clássica Guaiacilica / Siringilica. Em semente de soja, de variedade CD 215, o teor de lignina na semente permitiu maior porcentagem de semente germinada, revelando a importância da lignina na fisiologia e na biologia da semente (Moreira *et al.*, 2012).

Estudos com lignina de sementes são ainda escassos, porém, recentes pesquisas mostraram características composicional que diferem das ligninas tradicionais. Essas características podem estar associadas à natureza da semente assim como a capacidade de responder as condições de sobrevivência da espécie as quais estão sendo submetidas. Novos conhecimentos sobre a formação da lignina em termos de composição, estruturas e vias metabólicas parecem reacender novos caminhos para o entendimento completo da formação da lignina.

Essa monografia dá início a esse estudo e utiliza a casca da semente de *Araucaria angustifolia* de forma a possibilitar melhores utilizações no contexto da fisiologia, conservação do solo e energia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Araucaria*

A família Araucariaceae, pertence à ordem Coniferae. É o grupo de coníferas mais primitivo ainda existente, tendo o início de seu desenvolvimento entre as eras paleozóica e mesozóica (Dutra e Stranz, 2003). Sua distribuição ocorre principalmente no Hemisfério Sul, sendo encontrada na Nova Caledônia, na Nova Guiné, na Austrália, na Nova Zelândia e na América do Sul (Setoguchi *et al.*, 1998).

Pertencente à família Araucariaceae, o gênero *Araucaria*, é composto por 19 espécies (Carvalho, 2003), que pela proposta de Wilde e Eames (1952) são divididas em quatro seções: *Araucaria (Columbea)* (2spp.), *Bunya* (1spp.), *Intermedia* (1spp.) e *Eutacta* (15 spp.). Esta última seção possui 13 espécies endêmicas da Nova Caledônia. Em 1998, Setoguchi *et al.* confirmaram a existência dessas quatro seções através de análises moleculares. As seções caracterizam-se pelos diferentes padrões morfológicos e anatômicos das folhas; orientação e distribuição dos estômatos; características embriológicas; número de cotilédones e germinação (Burrows, 1987).

As espécies desse gênero evoluíram na Era Mesozóica, durante o período Jurássico-cetráceo, há cerca de 200 milhões de anos (Golfari, 1971; Koch & Corrêa, 2002). Segundo Mattos (1994), este gênero basicamente, se caracteriza por árvores perenes, em sua maioria dióica, com distribuição regular dos ramos. Os indivíduos jovens possuem forma cônica, com ramos até o solo, enquanto os adultos possuem uma copa densa na parte superior da árvore. As folhas possuem grande longevidade, as juvenis são acículas finas e as folhas maduras podem ser acículas ou escamas. Os estróbilos masculinos tem disposição terminal, podendo ser solitários ou em grupos. Os estróbilos femininos são globosos deiscentes na maturidade. Nas sementes, com exceção da seção *Eutacta* que é lipídico, Tompsett (1984) afirma que o principal material de reserva dos pinhões é amiláceo.

Apesar do gênero *Araucaria* possuir 19 espécies, somente duas espécies desse gênero ocorrem na América do Sul, *Araucaria angustifolia* e *Araucaria araucana*. A *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch têm sua ocorrência localizada em zonas restritas de Chile e Argentina. A *Araucaria angustifolia* possui uma dispersão restrita na Argentina, enquanto que

no Brasil sua área de dispersão é maior (NTIMA, 1968), se constituindo no único representante nativo do gênero.

2.2 Semente de *Araucaria angustifolia*

A semente tem origem no desenvolvimento do óvulo fecundado. Cada óvulo está ligado à placenta através de um curto cordão chamado funículo. Dos tegumentos do óvulo, o mais externo (primina) origina a testa, que é a camada mais externa do tegumento da semente. E, o tegumento mais interno, chamado secundina, origina o tégmen (Oliveira, 2011).

As sementes são, geralmente, constituídas por duas partes, o tegumento e a amêndoa. O tegumento compreende, frequentemente, de duas camadas histologicamente distintas, a testa e o tégmen, que garantem uma melhor hermeticidade a semente. A amêndoa, localizada no interior do tegumento, contém o embrião e, muitas vezes, tecido de reserva (Esau, 1953).

Nas sementes gminospérmicas, o tecido de reserva (endosperma) tem geralmente origem anterior à fecundação, como consequência as sementes tem o mesmo tamanho que os óvulos que as originaram. A estrutura dos tegumentos é complexa e variável. A semente de *Araucaria angustifolia*, como semente de conífera, apresenta dois tipos comum de células, as células do parênquima que geralmente não são especializadas e apresentam paredes finas, e, as células de esclerênquima que são células de paredes espessas fornecendo suporte e proteção ao embrião (Kolotelo, 1997).

A semente de *Araucaria angustifolia* é também conhecida como pinhão (Conforti e Lupano, 2007). É uma semente carnosa, medindo entre 3 cm a 8 cm de comprimento, por 1 cm a 2,5 cm de largura, o peso dessa semente tem grande variação conforme a idade da árvore e a região (Koscinski, 1934), porém apresenta peso médio de 8,7 g por unidade. São sementes obovadas-oblongas, com ápice terminando com um espinho achatado e curvo para a base (Carvalho, 2003).

As sementes do pinheiro-do-paraná têm curta longevidade natural, com perda total de viabilidade em até um ano após a colheita por causa da desidratação (Carvalho e Nakagawa, 2000) o que faz com que seja necessário o armazenamento com alto grau de umidade (Neves, 1994). As sementes são muito sensíveis à redução do teor de água (Eira *et al.*, 1994), característica de sementes recalcitrantes, fator este que contribui para a vulnerabilidade dessa espécie. A recalcitrância é descrita por Roberts (1973) como sementes que possuem alto grau de umidade logo após a maturação e que perdem a viabilidade ao serem desidratadas. Tompsett (1984) afirma que as sementes de araucária não podem ser secas abaixo de 37% sem sofrer danos e abaixo de 25% conduz à perda total de sua viabilidade.

A dispersão do pinhão ocorre geralmente por autocoria, principalmente barocórica, entretanto, pode ocorrer de forma zoocórica, feita por aves e roedores. A cutia (*Dasyprocta azarae*), grande apreciadora do pinhão, pelo hábito que possui de enterrar as sementes para comê-las depois, Carvalho (1950) sugere que por este comportamento, a cutia seja uma das mais importantes disseminadoras das sementes do pinheiro-do-paraná. Para Solórzano-Filho & Kraus (1999), o papagaio-de-peito-rosa (*Amazona vinaceae*) é uma ave que atua como dispersora das sementes de araucária. Em Minas Gerais, na Serra da Mantiqueira, dos diversos dispersores do pinhão, Bustamante (1948) cita o tucano (*Ramphastos toco*), o aiuru (*Amazona farinosa*) e o macaco-prego (*Cebus apella*).

Lorenzi (1992) afirma que os pinhões são consumidos por animais domésticos, avifauna, roedores e primatas. Para Monteiro & Speltz (1980), o ser humano, que utiliza o pinhão na sua alimentação, pode atuar como agente dispersor.

Os humanos consomem pinhões desde 6.000 anos atrás. Foi durante um longo período um importante alimento para alguns grupos indígenas e para os primeiros agricultores (Ragonese e Crovetto, 1947; Hueck, 1972), e, atualmente, é ainda muito utilizado por populações locais. Os pinhões podem ser consumidos crus, cozidos em água ou leite e até mesmo assados (David & Silochi, 2010). Com relação ao seu valor nutricional destacam-se os teores de fibra dietética e vitamina C, Taco 2 (2006) presume que substâncias antioxidantes também estejam presentes no pinhão.

As sementes do pinheiro-do-paraná contribuem ativamente para a economia brasileira, dados do IBGE (2011) registram que em 2009 5.066 toneladas foram comercializadas no Brasil, sendo destas 4.761 no Sul e apenas 304 toneladas no Sudeste. Informações importantes visto que o pinhão é uma fonte de renda para agricultura familiar e para os povos indígenas que habitam as regiões produtoras. Tornou-se, portanto, mais uma opção para os agricultores obterem renda extra todos os anos, mesmo restrito somente à época de sua maturação, visto que o corte da Araucária é limitada pela legislação (Bittencourt *et al.*, 2004; Siega, 1998).

2.3 Lignina

Lignina é o nome genérico para uma classe de substância que tem uma composição básica fenilpropanoídica (C₆ C₃) biossintetizadas na parede celular e na lamela média da maioria das fanerógamas (Pereira, 2012).

A lignina possui três precursores finais: álcool cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (Figura 5). Sasaki *et al* (2008) definem a lignina como sendo um polímero de unidades fenilpropanoídicas com uma variedade de ligações e acoplamentos, que resulta em uma estrutura complexa.

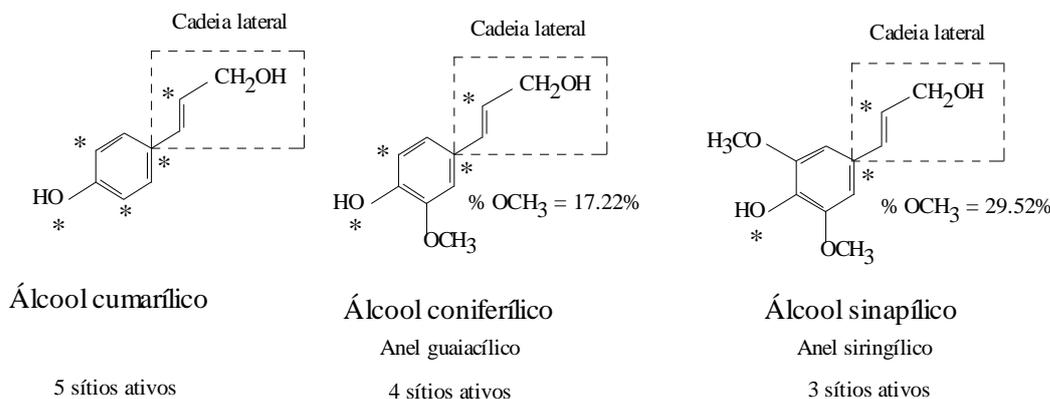


Figura 5. Os três precursores finais da lignina com os possíveis sítios ativos (*) (Pereira, 2012).

Essas macromoléculas apresentam funções fisiológicas e estruturais que contribuem para facilitar o fluxo de água e aumentar a estabilidade e rigidez da parede celular (Pereira, 2012).

Por ter ação cimentadora (Monteiro, 2002), confere a célula maior resistência ao

ataque de fungos e compõe toda a rede de vasos condutores do vegetal, contribuindo para a estrutura da parede celular, além de agir como agente protetor a fatores bióticos e abióticos. Respondem a quase todo o funcionamento fisiológico das plantas superiores assim como a muitos estímulos causados nas plantas, como lesão biológica ou física.

A origem das plantas superiores iniciou-se a partir das algas verdes (Weng & Chappelle, 2010), porém recentemente houve a descoberta de lignina em algas vermelhas (*Calliarthron intergeniculum*), o que retoma as discussões (Martone *et al.*, 2009).

A lignina tem sua origem relacionada a mudança do habitat das plantas aquáticas para o ecossistema terrestre, há a aproximadamente 400 Milhões de anos (Weng & Chappelle, 2010). Essa hipótese tem sido apoiada pelo desempenho vegetal com base na condição da vida adaptativa no ecossistema terrestre, visto que existam do mais simples ao mais complexos dos polímeros.

Para Sakarnen & Ludwing (1971) a lignina não só contribuiu para a adaptação das plantas à vida terrestre durante o processo evolutivo, como tornou a parede celular impermeável e possibilitou o transporte de água e de soluções pelo sistema vascular.

A estrutura da lignina ainda não foi definitivamente estabelecida, apesar do uso de ferramentas de alta tecnologia. Alguns estudos mostram que as estruturas possuem diferentes perfis. A figura 6 contempla uma representação mais recente da estrutura da lignina.

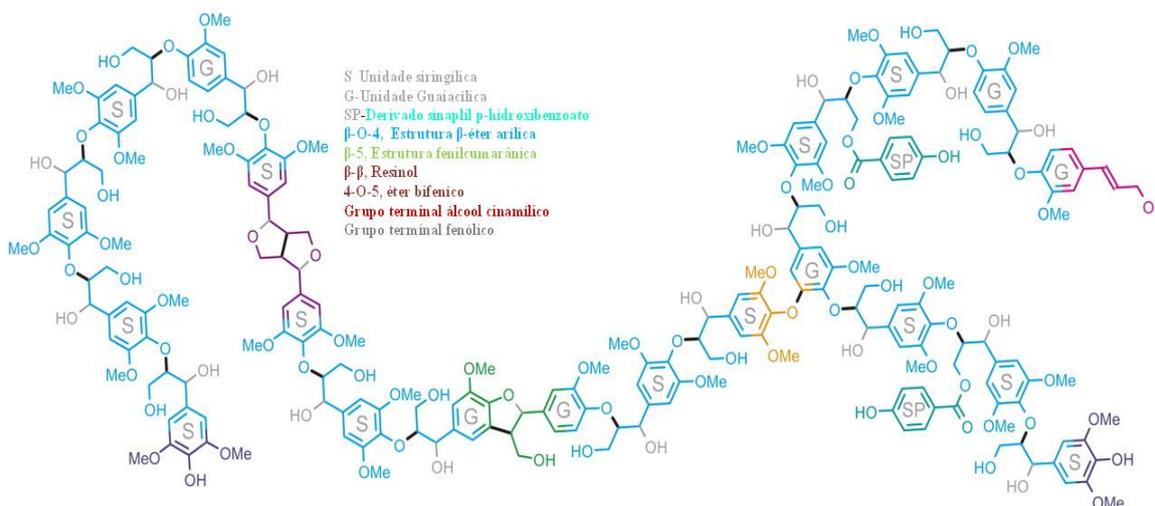


Figura 6. Representação da lignina estabelecida por análise de Vanholve (2010).

Segundo Barceló (2004), izoenzimas básicas, como a peroxidase, presentes em plantas mais primitivas são consideradas um portão da evolução, visto que em angiospermas, podem oxidar o álcool sinapílico à lignina. Em gimnospermas, com a falta do álcool sinapílico não há formação de lignina siringílica. Esta modulação de lignina foi de maneira adaptativa e é baseada na flexibilidade enzimática.

As ligninas tem em comum a flexibilidade enzimática (Tabela 1), que ocorre em fibras de madeira, em sementes e outros órgãos das plantas tanto de gimnospermas como de angiospermas. Suas enzimas são capazes de metilar monolignóis pelas formas do ácido 5-hidroxiferulico e de seus correspondentes aldeídicos, álcoois e ésteres (Weng & Chappelle, 2010).

Tabela 1: Evolução enzimática desde o metabolismo primário ao metabolismo secundário.

FAMÍLIA DE ENZIMAS DO METABOLISMO PRIMÁRIO	ENZIMAS ANCESTRAIS	NÚCLEO ENZIMÁTICO DA ROTA BIOSÍNTESE DE MONOLIGNÓIS	ATIVIDADE ENZIMÁTICO NA FORMAÇÃO DA LIGNINA
Liase-classe I-como	Histidina amonia-liase	FAL(Fenilalanina mônialias)	Enzima que converte fenilalanina em ácido trans-cinâmico
CitocromoP450 monooxigenase	Esterol 14-demetilase	C4H(Cinamato-4-idroxilase)	Catalisa as duas hidroxilações fenólicas do ácido cinâmico
Acil-CoAsintetase	Acil-CoAsintetase (longas cadeias alifáticas)	4CL (Hidroxicinamoil: CoAligase)	Catalisa a formação de ésteres de CoA dos ácidos: <i>p</i> -cúmarico, cafeico, ferúlico, 5-hidroxiferúlico e sinápico.
BAHD aciltransferase	Carnitina acetil transferase	HCT	Catalisa a formação de éster <i>p</i> -cumarato usando chiquimato ou quinato como um aceptor acílico
CitocromoP450 monooxigenase	Esterol 14-demetilase	C3H (4-Hidroxicinamato-3-hidroxilase)	Hidroxilação do ácido <i>p</i> -cumárico.
SAM-metiltransferasedependent	Catecol- <i>o</i> -metiltransferase	CCoAOMT (Cafeoil-CoA O-metiltransferase)	Enzima bifuncional metilando o ácido cafeico e o ácido 5-hidroxiferúlico, ou os tios ésteres correspondentes.
Desidrogenase	3-B-hidroxiesteroid desidrogenase	CCR (Hidroxicinamoil: CoAredutase)	Catalisa a conversão de ésteres de cinnamoil-CoA para cinamaldeído, sendo a primeira da parte específica da biossíntese da lignina.
Álcool desidrogenase	Desidrogenase	CAD (Cinamildesidrogenase)	Catalisa o último passo da biossíntese do monolignol, isto é, a redução de aldeído ao álcool correspondente.

Fonte: Weng and Chapplle (2010).

Durante a formação dos monolignóis são envolvidas enzimas que alteram o núcleo aromático e a cadeia lateral propanoídica. Plantas deficientes na enzima CAD (Hidroxicinamoil alcohol desidrogenase) possuem ligninas restritas a hidratação (são mais hidrofóbicas) e menor degradabilidade, em decorrência da acumulação em sua estrutura de cinamaldeído e/ou coniferaldeído. Portanto, a deficiência de CAD pode trazer profunda alteração na parede celular (Grabber, 2005). A figura 7 mostra a seqüência biossintética da lignina com distinção dos passos enzimáticos, observando que a sua formação ocorre em compartimentos celulares distintos. Essa etapa (enzimática) ocorre apenas no citoplasma. A fase enzimática deficiente da CAD está demarcada pelo retângulo.

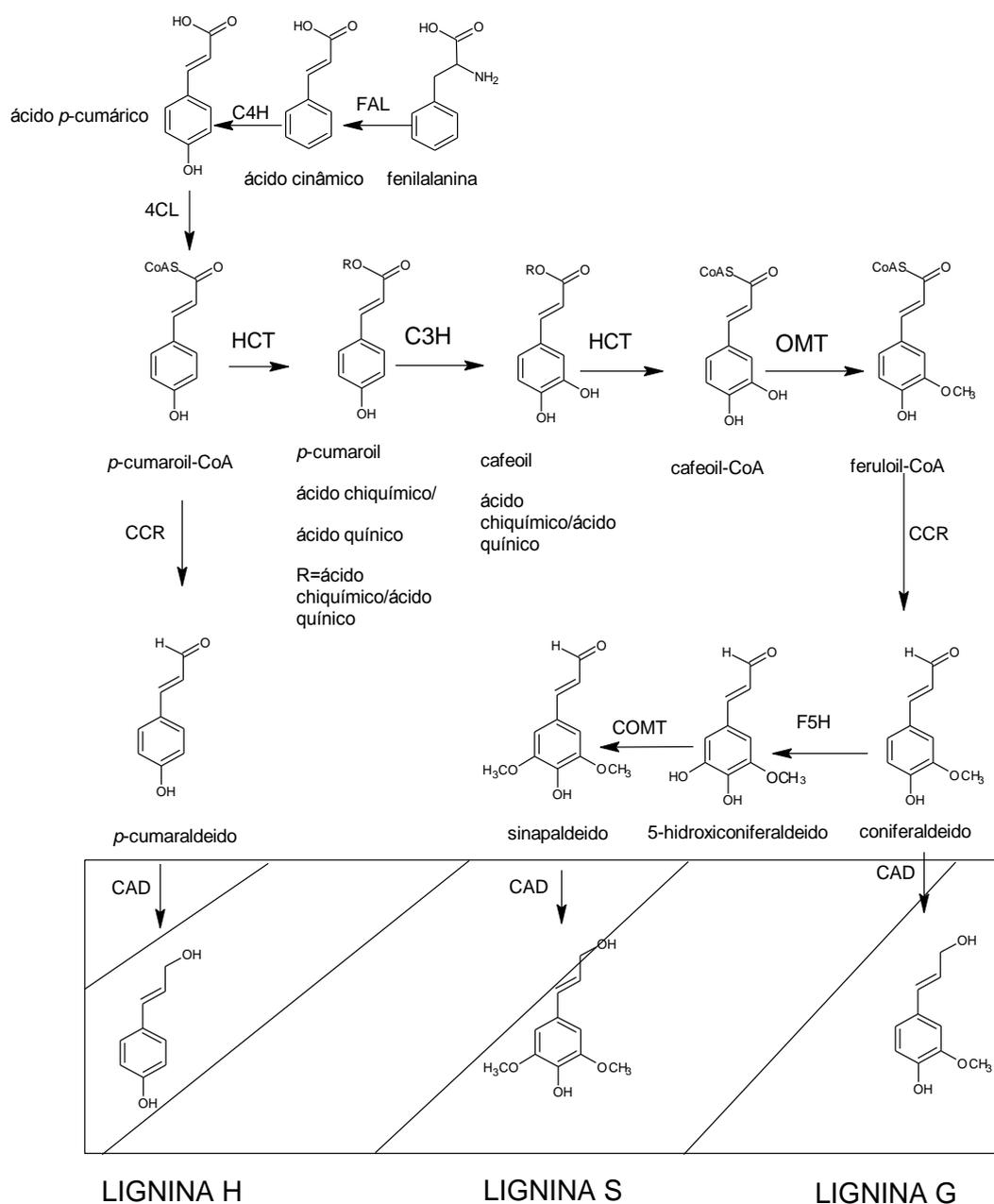


Figura 7. Rota biossintética da formação dos monolignóis da lignina (Boerjan *et al.*, 2003).

As ligninas do tipo H, G, S, HG, GS, HGS, HO-5, C, C_{ALD} e C_{AC}, são ligninas que ocorrem naturalmente em grupos botânicos distintos (raízes, caules, sementes) e em transgênicos. A lignina do tipo C_{ALD} tem sido considerada a de mais baixa massa molecular, mais hidrofóbica e de maior mobilidade na parede celular (Ralph, 2001).

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Neste contexto a presente pesquisa teve como objetivo caracterizar a composição química estrutural e descrever anatomicamente o tegumento da semente de

Araucaria angustifolia com ênfase na lignificação. Visando a sua importância na utilizações tecnológicas e silviculturais, podendo subsidiar pesquisas mais avançadas na área de utilização dos recursos florestais não madeireiros.

3.2 Objetivos Específicos

- Quantificar a composição química dos elementos estruturais tegumento da semente;
- Identificar por métodos físicos e químicos as características funcionais da lignina dioxano;
- Registrar por infravermelho espectros do material lignocelulósico;
- Descrever anatomicamente a estrutura da exotesta e da mesotesta do tegumento da semente através da fluorescência e teste histoquímico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de *Araucaria angustifolia* estudadas foram gentilmente doadas pelo Departamento de Silvicultura da UFRRJ através do Viveiro Florestal Luiz Fernando Oliveira Capellão.

4.1 Preparo do material para a caracterização da composição química estrutural

Dessas sementes, uma certa quantidade foi descascada, e apenas a camada externa do pinhão (tegumento) sem o endosperma (Figura 8) foi utilizada para análise química estrutural. Esse material foi moído em um moinho de facas do tipo Willey. Posteriormente, as amostras moídas foram homogeneizadas para que fossem submetidas à extração.

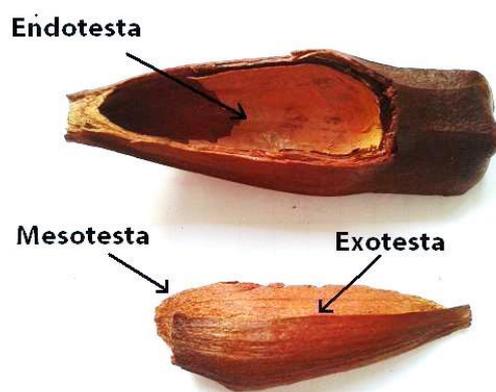


Figura 8. Camadas exotesta, mesotesta e endotesta do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia*.

O ciclo de extração ocorreu com os solventes ciclohexano, acetato de etila e metanol em um extrator do tipo soxhlet (Figura 9), por um período de 24 horas sem interrupção para cada extração (Abreu *et al.*, 2006). Após a extração o material foi lavado em bomba de vácuo e seco em estufa de $\pm 60^{\circ}\text{C}$. A partir das amostras das cascas das sementes de *Araucaria angustifolia* livre de extrativos, foram então realizadas a composição química estrutural e análises químicas (determinação da lignina dioxano; redução de terminais aldeídicos com

BNaH₄ e espectroscopia no infravermelho).



Figura 9. Extrator do tipo Soxhlet

Para a determinação do teor da lignina de Klason, foram realizadas três repetições, onde para cada repetição foram utilizados aproximadamente 300 mg da amostra seca e livre de extrativos e tratada com ácido sulfúrico a 72%. Cada amostra foi homogeneizada por agitação dentro de um tubo de ensaio durante 1 minuto e conservada por 1 hora entre 25°C e 30°C em banho-maria. Em seguida, o material foi diluído em balões volumétricos com adição de 84 ml de água destilada e, submetidos em refluxo por um período de 4 horas, com temperatura em torno de 70⁰ C. Terminado este procedimento, o material foi lavado sob vácuo com 500 ml de água destilada quente em um funil de placa sinterizada previamente tarado e em seguida seco em estufa a 105°C durante 24 horas e em seguida foi feita uma nova pesagem (Effland, 1977).

A determinação da celulose se faz a partir da holocelulose, portanto primeiramente determinou-se a holocelulose. Para tanto, foram utilizados 1,25g da amostra livre de extrativos da casca da semente de *Araucaria angustifolia* homogeneizados e colocados dentro de um Erlenmeyer onde foram adicionados os reagentes, ácido acético e clorito de sódio (80%). Em seguida, a amostra foi levada ao banho-maria a 70⁰C, por um período de 6 horas. A cada 60 minutos foram sendo adicionados os reagentes dentro do Erlenmeyer contendo a amostra, até que as fibras mostraram-se completamente dissociada da lignina (Abreu *et al.*, 2006). A amostra reacional foi então levada para a capela onde permaneceu por 24 horas em repouso. Após esse período a amostra foi lavada em um funil de porcelana sob vácuo com água destilada até que a cor e o odor do cloro desapareceram. A amostra foi então seca em estufa de \pm 60°C durante 24 horas, e novamente pesada.

A amostra para a obtenção da Celulose, preparada a partir da holocelulose, foi pesada

e levada para dentro de um Becker. O Becker contendo a amostra foi levado ao banho-maria a 20°C. A amostra foi tratada com uma solução de hidróxido de sódio a 17,5% e água destilada. Após um período de 45 minutos, o becker foi retirado do banho-maria e a amostra lavada sob vácuo com hidróxido de sódio a 8,3%, assim como ácido acético a 10% (Abreu et al., 2006). Posteriormente, a amostra foi lavada e filtrada sob vácuo com água destilada até retirar todo o resíduo. A amostra foi levada para secar em estufa a $\pm 105^{\circ}\text{C}$, onde ficou por 24 horas. Em seguida, a amostra foi novamente pesada.

4.2 Preparo do Material para as Análises Químicas

Para a obtenção da lignina dioxano foram utilizados, aproximadamente, 5g da amostra seca e livre de extrativos. A amostra foi colocada em um balão volumétrico de duas saídas, onde adicionou-se uma solução de dioxano e água (9:1) juntamente com HCl. A mistura reacional obtida foi mantida em uma chapa de aquecimento em atmosfera de nitrogênio durante um período de 24 horas (Figura 10). A mistura reacional foi então filtrada e lavada sob vácuo com a mesma solução, onde se obteve o extrato. O extrato foi concentrado em um evaporador rotatório até o aparecimento de um material viscoso. Este material foi precipitado em um grande volume de água destilada sob agitação constante. O precipitado foi separado por meio da centrifugação, em seguida lavado sob vácuo com água destilada e seco em um dessecador com anidrido fosfórico sob vácuo (Abreu *et al.*, 2006).



Figura 10. Aparelho para preparação da lignina dioxano.

Foi realizada a reação de redução de grupos aldeídicos da lignina dioxano por NaBH₄. Para essa reação foram dissolvidas 70 mg de lignina de dioxano em uma solução de etanol e NaOH 0,1N em atmosfera de nitrogênio. Em seguida, adicionou-se 20mg de NaBH₄ e 2mL de água destilada. Após 2 dias, a solução foi acidificada e, o produto da reação foi precipitado em água destilada, centrifugado, recentrifugado e seco a frio (Abreu *et al.*, 2006).

4.3 Espectroscopia no infravermelho

Para espectroscopia no infravermelho, foram utilizadas amostras secas do material lignocelulósico pré-extraído, da lignina de dioxano e da lignina de dioxano reduzida. Os espectros registrados foram das amostras secas em condição de pastilha de KBr (100 mg) e a amostra (1-2mg do material) em um espectrômetro (VARIAN 640-IR FT-IR spectrometer) (Figura 11). Os espectros foram registrados no modo experimental de transmitância utilizando 4 cm⁻¹ de resolução, 128 varreduras, amplitude espectral entre 4000-400cm⁻¹ (Abreu *et al.*, 2006).



Figura 11. Espectrômetro no infravermelho VARIAN 640-IR

4.4 Preparo do Material para as Análises Anatômicas

- **Preparo do material para as análises histológicas**

Outra certa quantidade de sementes de *Araucaria angustifolia* foi separada e colocada em um Becker contendo água destilada a $\pm 100^{\circ}$ C. As sementes foram cozidas por 5 minutos, de modo a facilitar o corte da casca da semente para as análises histológicas. Foram realizados cortes anatômicos transversais do tegumento (Exotesta e Mesotesta) da semente da *Araucaria angustifolia*, com o auxílio de um bisturi. E, posteriormente, feita as análises por microscopia de campo claro e microscopia epifluorescente.

As análises por microscopia de campo claro foram realizadas com cortes transversais da exotesta e mesotesta da semente de *Araucaria angustifolia* ao natural. Além das análises

anatômicas, foi realizado o teste histoquímico de Wiesner (Lin & Dence, 1992), para a localização do tecido lignificado.

Para o teste com fluorescência, os cortes transversais do tegumento da semente ao natural e corados pelo teste de Wiesner, da exotesta e mesotesta, foram observados em microscópio epifluorescente utilizando cubo de excitação azul em 450-480nm e filtro FITC (U-MWB2) (Figura 12), sendo observado a autofluorescência (Barros & Miguens, 1998).

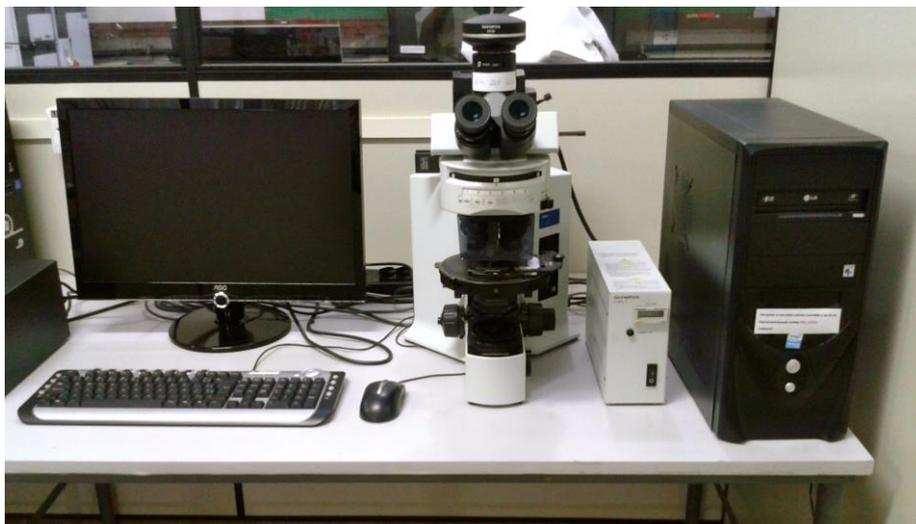


Figura 12. Microscópio óptico Olympus, acoplado a um sistema de análise de imagem digital (Imaging Software cellf) utilizado para a microscopia de campo claro e epifluorescente.

- **Preparo do material para a dissociação de fibras**

Outra certa quantidade de sementes foi descascada para que, novamente, pudesse se trabalhar apenas com a camada externa da semente (exotesta e mesotesta). Os tegumentos foram colocados em um pequeno frasco de vidro, onde posteriormente, foi adicionada uma solução de ácido acético glacial e peróxido de hidrogênio (130 vol.) na proporção (1:1) (Franklin, 1945). O frasco foi novamente tampado e vedado com lacre de alumínio, para evitar a evaporação da solução. Após a vedação, foi levado para a estufa a 60°C onde permaneceu por 24 horas, para completa dissociação dos elementos celulares. Concluído esse tempo, o frasco foi retirado da estufa e a solução existente eliminada. O material deslignificado foi lavado em água corrente até retirar completamente a solução. Em seguida, o material foi corado com safranina alcoólica a 1% e observado em microscópio óptico.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização química estrutural do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia*

O teor de lignina encontrado no tegumento da semente de *Araucaria angustifolia* (tabela 1), se comparado com os teores descritos para sementes de outras espécies florestais de ocorrência também do bioma Mata Atlântica (Costa *et al.*, 2011) é superior, corroborando a indicação do tegumento dessa semente para a produção de carvão ativo (Santos *et al.*, 2011).

Tabela 2: Composição química do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia* e de outras sementes florestais.

ESPÉCIES	LIGNINA	CELULOSE	HEMICELULOSE
	%	%	%
<i>Araucaria angustifolia</i>	32,4	35,16	14,83
<i>Anadenanthera macrocarpa</i>	18,9	-	-
<i>Cassia grandis</i>	10	-	-
<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	8,1	-	-

Adaptada por fonte: Costa *et al* (2011).

Esse alto teor de lignina obtido pode ser comparável aos encontrados em bagaço de cana, madeiras, etc. Visto que a própria madeira de *Araucaria angustifolia*, possui teor de lignina próximo de 28% (Mattos, 2006).

5.2 Análise Espectroscópica no Infravermelho do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia*

O espectro no infravermelho do material lignocelululósico pré-extraído (Figura 13) mostra-se extremamente complexo, tendo em vista as absorções conjunta da celulose, hemicelulose e lignina. O espectro revelou a existência de uma lignina típica de conífera, visto que aparece apenas o sinal em 1269 cm^{-1} (Vibração do anel guaiacílico com contribuição do estiramento de C=O) (Lin & Dance, 1992), com ausência de sinal referente a lignina do tipo Siringila. Os sinais 1600 , 1514 , e 1263 cm^{-1} foram também atribuídos a lignina. Foi observado sinais de grupo éster em 1739 cm^{-1} , que pode ser da hemicelulose e/ou da lignina.

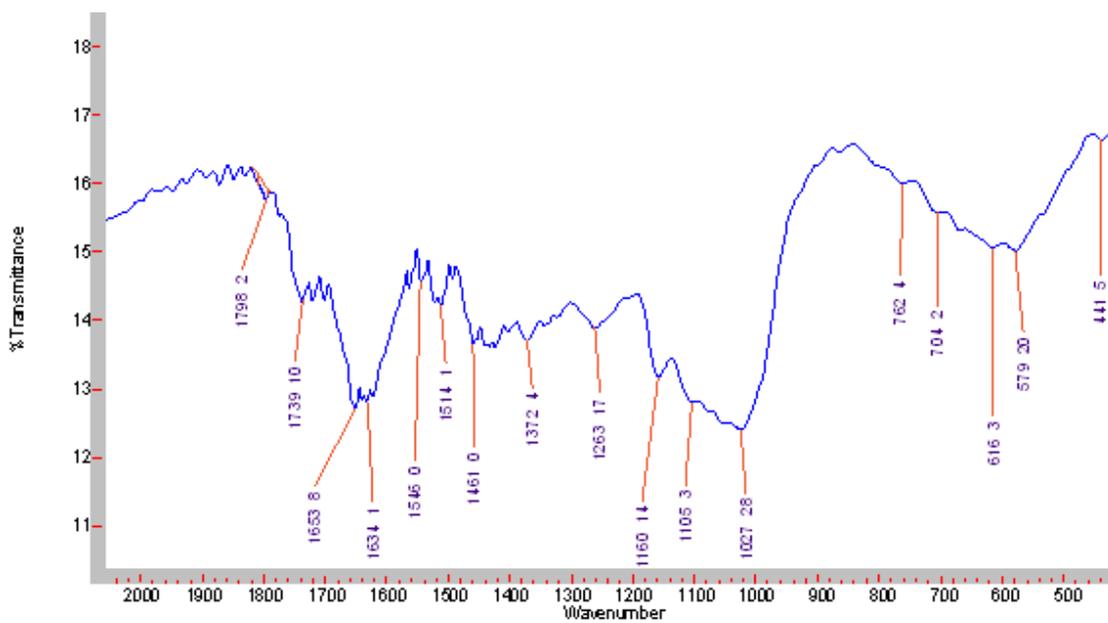


Figura 13. Espectro no infravermelho do material lignocelulósico pré-extraído.

Pelo espectro no infravermelho da lignina dioxano (Figura 14) foi possível confirmar as absorções da lignina, visto que se manteve a absorção em $1700\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$ ($\nu\text{C=O}$), que corresponde a éster conjugado, mostrando que esse grupo funcional pertence não somente a hemicelulose como a lignina também. A presença de grupo éster pode contribuir para aumentar a hidrofobicidade da lignina.

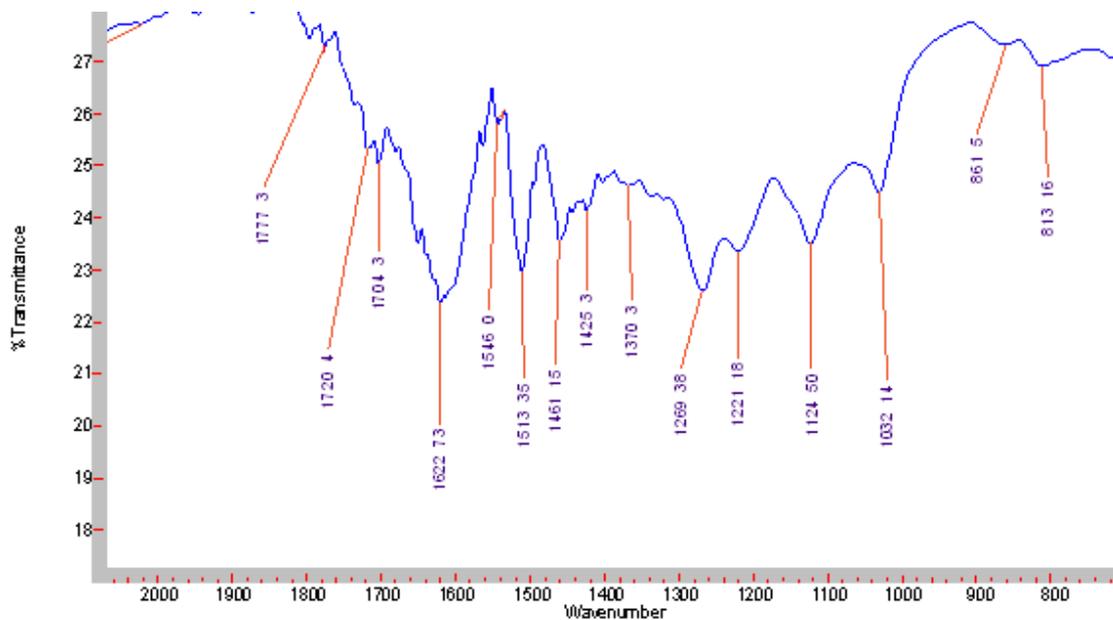


Figura 14. Espectro no infravermelho da lignina dioxano.

O espectro no infravermelho da lignina dioxano caracteriza por uma absorção muito forte na região de estiramento de carbonila aldeídica conjugada (1622 cm^{-1}). Esses grupos funcionais aldeídicos contribuem para rápida desidratação da semente e para sua baixa degradabilidade, tendo em vista a hidrofobicidade da lignina aldeídica, que possui grande influência na germinação da mesma. Foi possível a identificação da lignina Guaiacólica pelo sinal 1269 cm^{-1} de estrutura condensada (Figura 15) visto o sinal absorvido em 1221 cm^{-1} .

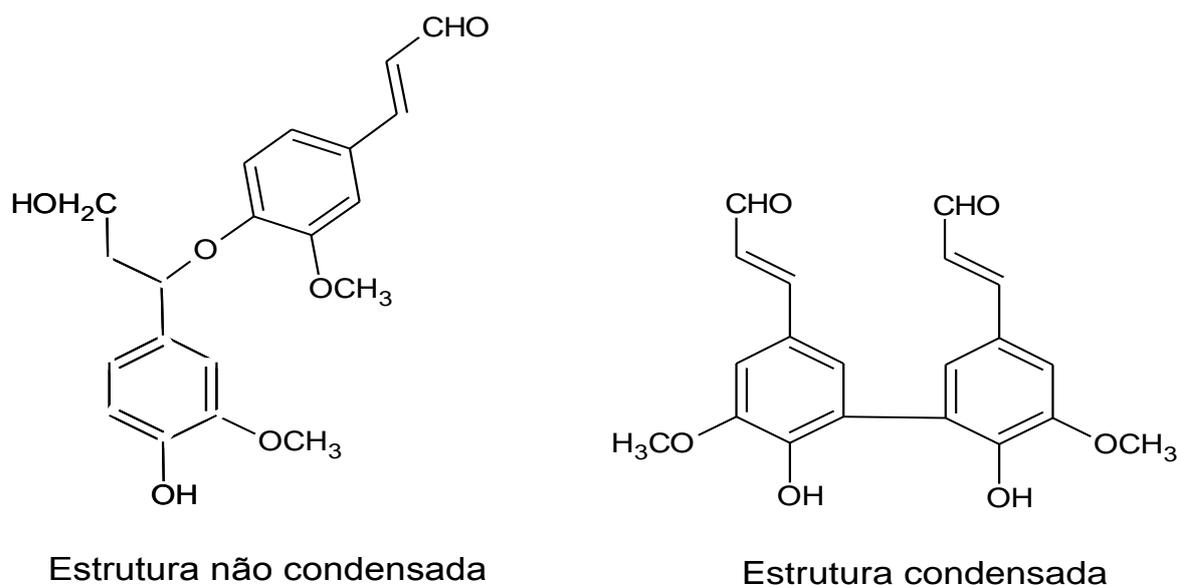


Figura 15. Modelos de estrutura de ligninas.

Em uma comparação da lignina de dioxano e da lignina de dioxano reduzida através do espectro no infravermelho (Figura 16) foi possível confirmar a presença de aldeído conjugado pela diminuição do sinal 1622 cm^{-1} . A porção da área eliminada no sinal em 1662 cm^{-1} está destacada pelas linhas diagonais em vermelho.

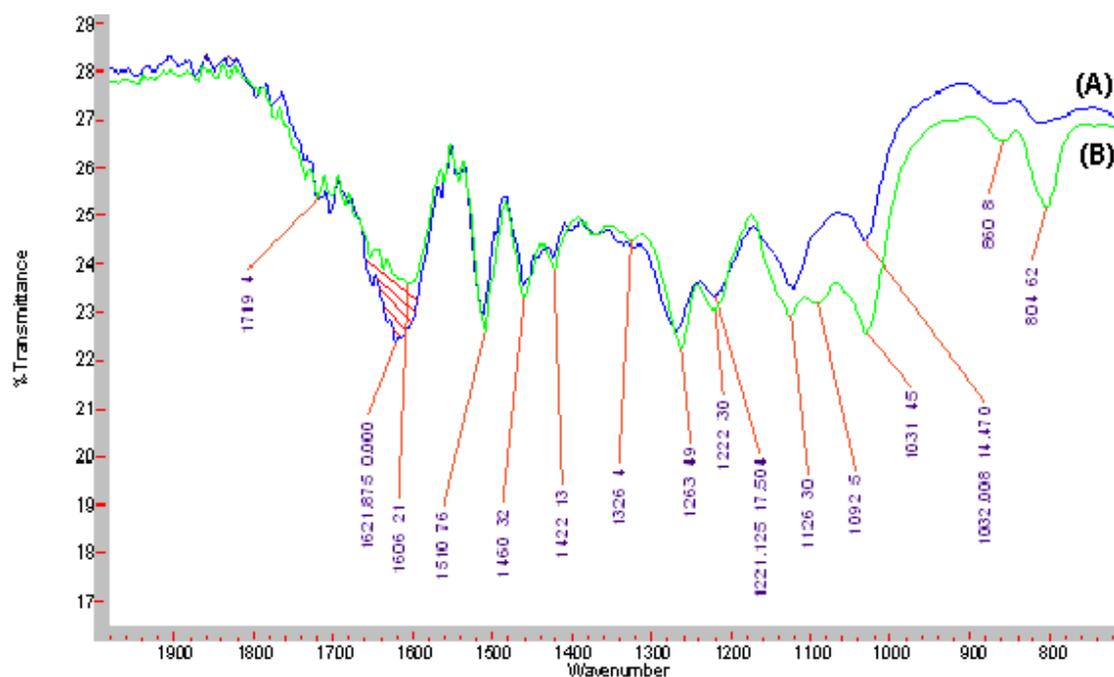


Figura 16. Espectro no infravermelho da lignina de dioxano (A) e da lignina de dioxano reduzida (B).

A absorção diminuída em intensidade, mostra que a reação de redução de terminais aldeídicos por NaBH_4 (Figura 17) foi realizada com sucesso, caracterizando a existência de grupamento aldeídico conjugado. A absorção em 1263 cm^{-1} e 1222 cm^{-1} no espectro da lignina reduzida confirma a existência de lignina do tipo guaiacólica de estrutura condensada, comumente encontrada em Gimnospermas.

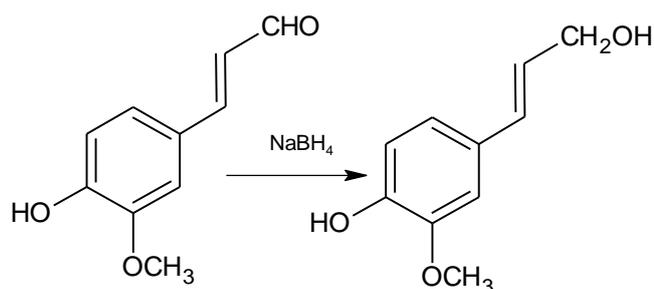


Figura 17. Redução do coniferaldeído por NaBH_4 a álcool coniferílico.

As atribuições para os espectros no infravermelho dos sinais obtidos de todas as amostras realizadas estão conforme a tabela 3.

Tabela 3. Atribuições dos sinais das ligninas no infravermelho.

cm^{-1}	Atribuições	Material Lignocelulósico (casca) (cm^{-1})	Lignina dioxano (cm^{-1})	Lignina dioxano reduzida (cm^{-1})
3568	Estiramento de O-H	-	-	-
2938	Estiramento de C-H de grupos metílicos e metilênicos	-	-	-
1700-1696	Estiramento de C=O de ácido ou éster conjugado ou cetona conjugada	1700-1939	1704	1719
1651-1648	Estiramento de C=O em cetonas ou aldeídos conjugados	1631-1553	1522-1660 Alta intensidade	1606-1660 Baixa intensidade
1600	Vibração do esqueleto aromático com estiramento de C=O, S > G, G condensado > Eterificado.	-	1622	1606
1511-1506	Vibração do anel aromático	1515	1513	1510
1473-1469	Deformação assimétrica de $-\text{CH}_3$ e CH_2		1463	1460
1393	Estiramento de CH e CH_3 alifático exceto OCH_3	-	-	1422
1282	Vibração do anel guaiacílico com contribuição do estiramento de C=O	1263	1269	1263
1221-1230	Estiramento de C-C + C-O + C=O, G>S; G condensado > G eterificado	-	1221	1222
817-832	Deformação fora do plano de C-H nas posições 2, 5 e 6 de unidade G	-	813	804

Fonte: Boerjan *et al* (2003)

5.3 Caracterização Anatômica do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia*

- **Caracterização Histológica**

A semente de *Araucaria angustifolia* é descrita anatomicamente por três camadas: a mais externa denominada de exotesta; a porção mediana que está aderida a exotesta, denominada de mesotesta, e, a porção mais interna denominada de endotesta.

Na seção transversal do tegumento *in natura* da semente de *Araucaria angustifolia* observou-se as duas camadas mais externas: a exotesta e a mesotesta (Figura 18). Na exotesta, uma camada coriácea (cutinosa), lignificada, esclerenquimática. Na mesotesta, uma camada também lignificada com presença de grandes espaços intercelulares.

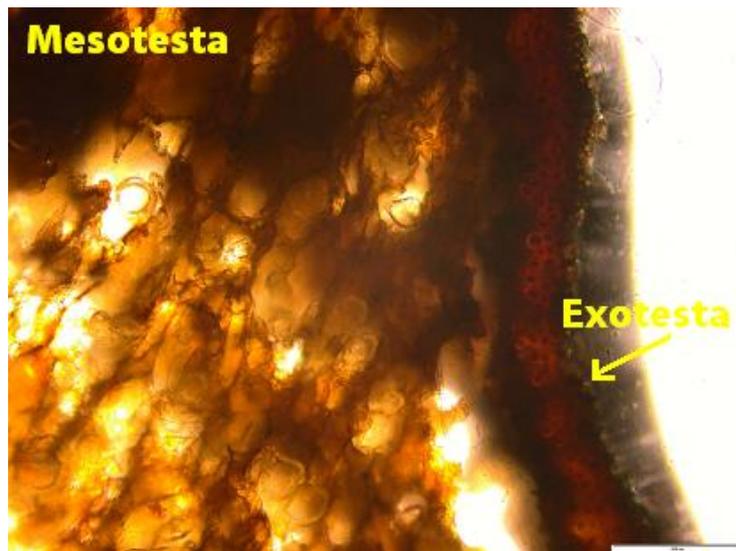


Figura 18. Fotomicrografia do tegumento *in natura* da semente de *Araucaria angustifolia* (exotesta e mesotesta).

Na região de transição do tegumento *in natura* da semente de *Araucaria angustifolia*, entre exotesta e mesotesta, no corte longitudinal é possível observar a ocorrência canais resiníferos (Figura 19).

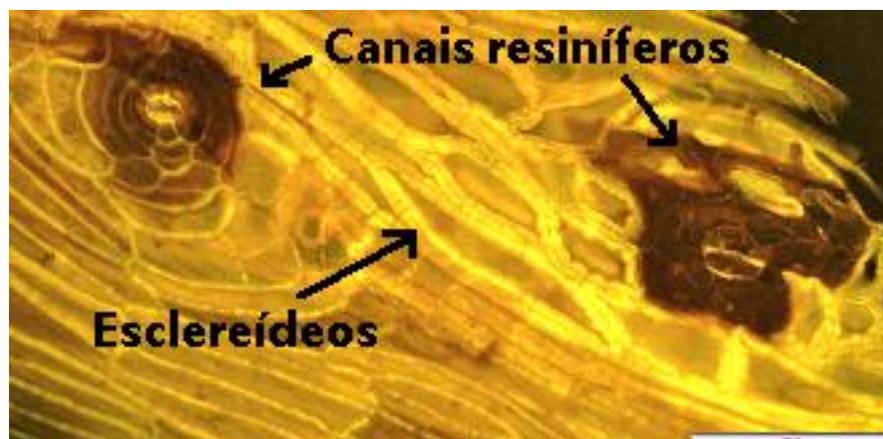


Figura 19. Fotomicrografia da exotesta *in natura* sob o filtro excitação azul (450-480nm) da exotesta de *Araucaria angustifolia*.

Na observação microscópica, o material natural sem qualquer preparação histoquímica mostrou que a camada de células esclereídicas constitui um tecido de cor avermelhada (Figura 20A), indicando claramente a presença de lignina. Tal fato, foi confirmado pelo teste de Wiesner (Figura 20B) que mostrou uma coloração avermelhada forte, evidenciando a presença de alta concentração de grupos terminais aldeídicos na lignina caracterizando a região lignificada como do tipo guaiacólica, confirmando os resultados obtidos pela análises químicas.

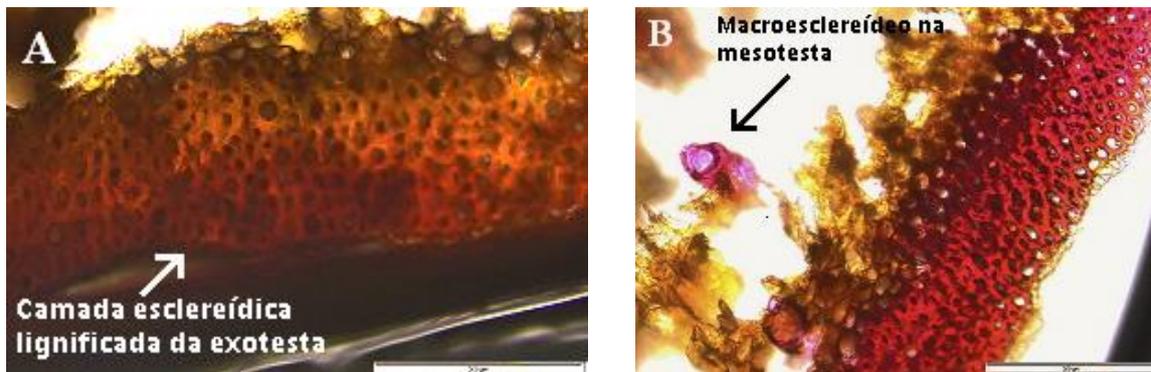


Figura 20 . Fotomicrografia do tegumento da semente ao natural (A) e corado (B) de *Araucaria angustifolia*.

A observação com microscopia de fluorescência indicou a presença de lignina na camada esclerênquimática (Figura 21), confirmando os resultados encontrados anteriormente. E, também a ocorrência dispersa de macroesclereídeos na mesotesta e na região de transição entre exotesta e mesotesta.

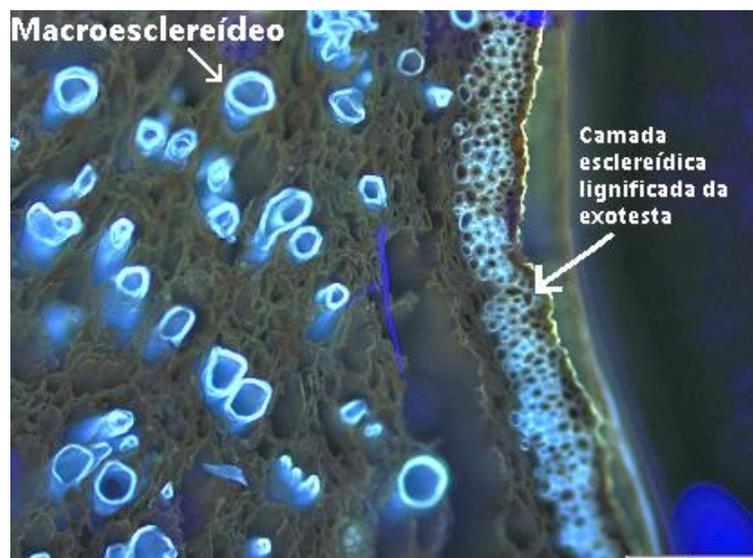


Figura 21 . Fotomicrografia exibindo autofluorescência sob o filtro de excitação verde (330 - 385 nm) do tegumento da semente ao natural de *Araucaria angustifolia*.

- **Caracterização por Dissociação de Fibras**

Na análise por dissociação de fibras foi possível observar esclereídeos colunares de extremidades ramificadas (Figura 22 A), variando de 4 a 7 células de espessura, esclereídeo bifurcado em decorrência do crescimento intrusivo (Figura 22 B), esclereídeos filiformes, e diversas formas de astroesclereídeos e braquiesclereídeos.

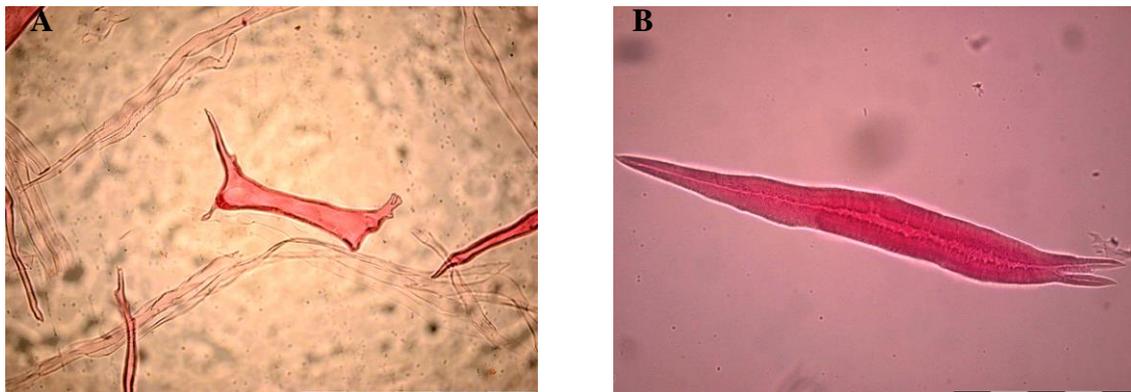


Figura 22. Fotomicrografia exibindo esclereídeo colunar de extremidade ramificada (A) e esclereídeo bifurcado (B) corados com safranina alcoólica 1%.

6. CONCLUSÃO

Os resultados das análises permitiram propor que o tegumento da semente de *Araucaria angustifolia* contém alto teor lignina do tipo Guaicólica de estrutura condensada, revelando alta complexidade estrutural. As análises também permitiram observar a presença de grande quantidade de grupos terminais aldeídicos, o que significa baixa atividade da enzima CAD na semente. Em termos de estrutura anatômica o tegumento da semente se constitui um material peculiar pela evidência de uma estrutura com grande diversidade estrutural.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, H. S.; CARVALHO, A. M.; MONTEIRO, M. B. O.; PEREIRA, R. P. W.; SILVA, H. R.; SOUZA, K. C. A.; AMPARADO, K. F.; CHALITA, D. B. Métodos de análise em química da madeira, **Floresta e Ambiente**, 2006. 20p. (Serie Técnica)

BARROS, C. F.; MIGUENS, F. C. Ultrastructure of the epidermal cells of *Beilschmiedia rigida* (Mez) Kosterm. (Lauraceae). **Acta Microscopica** v. 06, n. 03, p. 451-461, 1998.

BITTENCOURT, J.V.M.; HIGA, A.R.; MAZZA, M.C.; RUAS, P.M.; RUAS, C.F.; CACCAVARI, M.; FASSOLA, H. Conservation, management and sustainable use of *Araucaria angustifolia* genetic resources in Brazil. In: VINCENT, B; AMARAL, W.; MEILLEUR, B. (Eds). **Challenges in managing forest genetic resources for livelihoods: exemples from Argentina and Brazil**. Roma: IPGRI – International Plant Genetic Resources Institute, 2004. cap. 07, p.133-148. Disponível em: <<http://www.ipgri.cgiar.org/publications/1046/chapter%207.pdf>>. Acesso em: Outubro 2013.

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

BOITEAUX, H. **Madeiras de construção de Santa Catarina**. Florianópolis: IBGE, 1947.

108 p. (IBGE. Publicação, 27).

BORGES, E. E. L.; SILVA, R. F.; BORGES, R. C. G. Estudo da germinação de sementes de pinheiro brasileiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 5. 1987, Gramado. **Resumos...** Brasília, DF: ABRATES, 1987. p. 134.

BURROWZ, G. E. Leaf axil anatomy in the Araucariaceae. **Australian Journal of Botany**, v. 35, p. 631-640, 1987.

BUSTAMANTE, I. L. F. Notas sobre algumas madeiras úteis do sul de Minas Gerais. **Revista Florestal**, v.7, n. único, p. 7-16, 1948.

CARVALHO, A. L. Contribuição ao estudo da biologia na Estação Florestal dos Pardos. **Anuário Brasileiro de Economia Florestal**, v. 3, n. 3, p. 208-222, 1950.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588 p.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies Florestais Brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: Embrapa-CNPQ; Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 639 p.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras**. Colombo: Embrapa-CNPQ; Brasília: EMBRAPA-SPI, 2003, 1038 p.

CHENA, F.; TOBIMATSUC, Y.; HAVKIN-FRENKELD, D.; DIXONA, R. A.; RALPHC, J. A polymer of caffeyl alcohol in plant seeds. **PNAS**, v. 109, n. 05, p. 1772-1777, 2012.

CONFORTI, P.A.; LUPANO, C.E. Starch characterization of *Araucaria angustifolia* and *Araucaria araucana* seeds. **Starch-Starke**, v. 59, p. 284-289, 2007.

CORDENUNSI, B.R.; DE MENEZES, E.W.; GENOVESE, M.I.; COLLI, C.; DE SOUZA, A.G.A.; LAJOLO, F.M. Chemical composition and glycemic index of Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) seeds. **Journal of agriculture land Food Chemistry**, v. 52, p. 3412-3416, 2004.

COSTA, T. G. DIAS, A. H. S.; ELIAS, T. F.; BREIER, T. B.; ABREU, H. S. Lignina e a Dormência em Sementes de Três Espécies de Leguminosas Florestais da Mata Atlântica. **Floresta e Ambiente**, v. 02, n. 18, p. 204-209, 2011.

COZZO, D. Distribución fitogeográfica en la Argentina de *Araucaria araucana* y *A. angustifolia*. In: IUFRO MEETING ON FORESTRY PROBLEMS OF THE GENUS ARAUCARIA, 1., 1979, Curitiba. **Anais...** Curitiba: FUPEF, 1980. p. 01-03.

DAVID, A. A. R.; SILOCHI, R. M. H. Q. Avaliação de métodos para a conservação de pinhão. **Revista faz ciência**, v. 12, n. 15. p. 01-10, 2010.

DONI FILHO, L.; AMARAL, L.; CERVI, P. H. Métodos para testar o poder germinativo das

sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 7, n. 2, p. 113-123, 1985.

DUTRA, T.L., STRANZ, A. História das Araucariaceae: a contribuição dos fósseis para o entendimento das adaptações modernas da família, com vistas a seu manejo e conservação. In: RONCHI, L.H., WÖHL, O.G. (org.) **Tecnologia, Diagnóstico e Planejamento Ambiental**. São Leopoldo: Unissinos, 2003. p. 293-351.

ECOPLAN. **ProjetoPinhão**: Culinária. General Carneiro, 2000. Disponível em: <<http://www.ecoplan.org.br>>. Acesso em: Outubro 2013.

ESAU, K. **Plant anatomy**. New York, John Wiley and Sons. 1953. 767 p.

EFFLAND, M. J. Modified procedure to determine acid-insoluble lignin in wood and pulp. **Teppi** 60, n. 10, v.60, p.143-144, 1977.

EIRA, M.T.S.; SALOMÃO, A.N.; CUNHA, R.; CARRARA, D.K.; MELLO, C.M.C. Efeito do teor de água sobre a germinação de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.- Araucariaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 16, n. 01, p. 71-75, 1994.

FERREIRA, A. G. *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.: **germinação da semente e desenvolvimento da plântula**. 1977. 123 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FRANKLIN, G. L. Preparation of thin sections of synthetic resins and wood-resin composites, and a new macerating method for wood. **Nature**, v. 155, n. 3924, p.51, 1945.

GRABBER, J. H. How Do Lignina Composition, Structure, And Cross-Linking Affect Degradability? A Review Of Cell Wall Model Studies. **Crop Science**, v. 45, n. 03, p.820-831, 2005.

GOLFARI, L. Coníferas aptas para reflorestamento nos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Brasil Florestal: **Boletim Técnico**, Brasília, DF, n. 1, p. 1-71, 1971.

GUERRA, M. P.; SILVEIRA V.; M. S. DOS REIS; L. SCHNEIDER. Exploração, manejo e conservação da araucária (*Araucaria angustifolia*). In: SIMÕES, L. L.; LINO, C. F. (orgs). **Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais**. São Paulo: Editora Senac, 2002. p. 85-102.

HILTON-TAYLOR, C. **IUCN red list of threatened species**. IUCN: Switzerland, 2000. 61 p.

HUECK, K. **As florestas da América do Sul**. Brasília, DF: Editora da Universidade de Brasília; São Paulo: Polígono, 1972. 466 p.

IBGE. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisas/pevs/default.asp>>>. Acesso em: Novembro 2013.

IMAGUIRE, N. Condições ambientais para a *Araucaria angustifolia* Bert. O. Ktze. **Dusenía**, v. 11, n. 3, p. 121-127, 1979.

IAP. Disponível em:
<<http://www.iap.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=201#estportconj>>.
Acesso em: Outubro 2013.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw Hill Book, 1940. 523 p.

KOCH, Z.; CORRÊA, M. S. **Araucária: A floresta do Brasil meridional**. Curitiba: Olhar Brasileiro, 2002. 148 p.

KOLOTELO, D. **Anatomy & Morphology of Conifer Tree Seed**. British Columbia: Ministry of Forests, Nursery and Seed Operations Branch, 1997. 60 p.

KOSCINSKI, M. **O pinheiro brasileiro na silvicultura paulista**. São Paulo: Secretaria da Agricultura Indústria e Comércio do Estado, 1934. 56 p.

LAMPRECHT, H. **Waldbau in den Tropen**. Hamburg un Berlin: Paul Parey Verlag, 1986. 318 p.

LIMA, A. R.; CAPOBIANCO, J.P.R. **Mata Atlântica: avanços legais e institucionais para sua conservação**. São Paulo, Instituto Sócio Ambiental, 1997. (Documentos do ISA, n. 04).

LIN, S. Y.; DENCE, C. W. **Methods in lignin Chemistry**. Berlim: Spring-Verlag, 1992. p. 568.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Plantarum, 1992. 352 p.

LOPEZ, J. A.; LITTLE, E. L., Jr; RITZ, G. F.; ROMBOLD, J. S.; HAHN, W. J. **Arboles comunes Del Paraguay**. Washington, DC: Cuerpo de Paz, 1987. 425 p.

MACHADO, S. A.; SIQUEIRA, J. D. P. Distribuição natural da *Araucaria angustifolia*. In: IUFRO MEETING ON FORESTRY PROBLEMS OF THE GENUS ARAUCARIA, 1979, Curitiba. **Anais...** Curitiba: FUPEF, 1980. p. 04-09.

MAINIERI, C.; CHIMELO, J. P. **Fichas de características das madeiras brasileiras**. São Paulo: IPT, 1989. 418 p.

MARTONE, P. T.; ESTEVEZ, J.; LU, M. F.; RUEL, K.; DENNY, M. W.; SOMERVILLE, C.; RALPH, J. Discovery of Lignin in Seaweed Reveals Convergent Evolution of Cell-Wall Architecture, **Current Biology**, v 19, p. 169–175, 2009.

MATTOS, J. R. **O pinheiro brasileiro**. São Paulo: Grêmio Politécnico, 1972. 620 p.

MATTOS, J. R. **O pinheiro brasileiro**. 2. ed. Lages: Artes Gráficas Princesa, 1994. v. 1, 225 p.

- MATTOS, P. P.; BORTOLI, C. D.; MARCHESAN R. **Caracterização Física, Química e Anatômica da Madeira de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze**. Colombo: Embrapa Florestas, 2006. 04 p. (Embrapa Florestas. Comunicado Técnico, 160).
- MEDEIROS, J. D. DE.; GOLÇALVES, M. A.; PROCHNOW, M.; SCHAFFER, W. B. **Floresta com Araucárias: um símbolo a ser salvo da extinção**. Rio do Sul: APREMAVI, 2004. 82 p.
- MONTEIRO, M. B. O. **Lignina e Tanino como estratégia de defesa em árvores**. 2002. 49f. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- MONTEIRO, R. F. F.; SPELTZ, R. M. Ensaio de 24 procedências de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. In: IUFRO MEETING ON FORESTRY PROBLEMS OF THE GENUS ARAUCARIA, 1., 1979, Curitiba. **Anais...** Curitiba: FUPEF, 1980. p. 181-200.
- MOREIRA, G. C.; SPERGER, T.; SPERGER, A. S.; PALAGI, C. A. Influência da lignina na germinação de sementes de soja. **Cultivando o Saber**. v. 05, n. 02. p. 175-182, 2012.
- NEVES, C. S. V. J. Sementes recalcitrantes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 29, n. 09, p.1. 459-1.467, 1994.
- NTIMA, O. O. **The araucarias**. Oxford: Commonwealth Forestry Institute, 1968. 139 p.
- OLIVEIRA, J. N. B. **Anatomia das plantas superiores**. Ponta Delgada. Departamento De Biologia Da Universidade De Açores, 2011. 176 p.
- PEREIRA, R. P. W.; MONTEIRO, M. B. O.; ABREU H. S. **Bioinformação do processo de lignificação**. UFRRJ: Edur, 2012, 124 p.
- RAGONESE, A. E.; MARTINEZ-CROVETTO, R. Plantas indígenas de la Argentina con frutos o semillas comestibles. **Revista de Investigaciones Agrícolas**, v. 01, n. 03, p. 147-216, 1947.
- RAMOS, A.; CARNEIRO. J.G.A. Alterações fisiológicas em sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze armazenadas após secagem em estufa. In: CONGRESSO FLORESTAL DO PARANÁ, 2, 1988. Curitiba. **Anais ...**, Curitiba: v. único, 1988. p. 628-643.
- ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v. 01, n. 01, p. 499-1.514, 1973.
- ROS-BARCELÓ, A.; ROS GOMEZ, L. V.; GABALDON, C.; LOPEZ, M. S.; POMAR, F.; CARRION, J. S.; PEDRENO, M. A. Fitoquímica: A porta de entrada para a evolução da lignina. **Kluwer Academic Publishers** . v. 47, n. 03, p.61-78, 2004.
- RUSCHI, A. Fitogeografia do Estado do Espírito Santo. I. Considerações gerais sobre a

distribuição da flora no Estado do Espírito Santo. Boletim do Museu de Biologia Prof. Mello Leitão: **Série Botânica**, n. 01, p. 1-353, 1950.

SANTOS, F. A.; PIRES, M. J. R.; CANTELLI, M. Tratamento de efluente de galvanoplastia por meio da biossorção de cromo e ferro com escamas da pinha da *Araucaria angustifolia*. **REM**: R. Esc. Minas, Ouro Preto, v. 4, n. 64. p. 499-504, 2011.

SARKANEN, K. V.; LUDWING, C. H. **Lignins Occurrence, Formation, Structure and Reactions**. New York: USA, 1971. 867 p.

SASAKI, S.; NONAKA, D.; WARIISHI, H.; TSUTSUMI, Y.; KONDO, R. Role of Tyr residues on the protein surface of cationic cell-wall-peroxidase (CWPO-C) from poplar: Potential oxidation sites for oxidative polymerization of lignin. **Phytochemistry**, v. 69, p.348–355, 2008.

SEITZ, R. Crow development of *Araucaria angustifolia* in its natural environment during sixty years. In : FUJIMORI, T.; D. WHITEHEAD (Ed.). **Crow and Canopy structure in Relation to Productivity**. Ibakari: Forestry and Forest Products Research Institute, 1986. p. 129-145.

SETOGUCHI, H.; OSAWA, T.A.; PINTAUD, J-C.; JEFFRÉ, T.; VEILLON, J-M. Phylogenetic relationships within Araucariaceae based on rbcL gene sequences. **American Journal of Botany**, v. 85, p. 1507-1516, 1998.

SHIMIZU, J. Y.; OLIVEIRA, Y. M. M. **Distribuição, variação e usos dos recursos genéticos da araucária no sul do Brasil**. Curitiba: Embrapa-URPFCS, 1981. 9 p. (Documento, 04).

SHIMOYA, S. Contribuição ao estudo do ciclo biológico de *Araucaria angustifolia* (Bertilini) O. Ktze. **Experientiae**, v. 2, n. 2, p. 519-540, 1962.

SIEGA, L. Pinhão é alternativa para agricultores. **A Notícia**, Joinville, 27 abr. 1998. Disponível em: <<http://an.uol.com.br/1998/abr/27/0ger.htm>>. Acesso em: Setembro 2013.

SÓLORZANO-FILHO, J. A. **Demografia, fenologia e ecologia da dispersão de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kuntze (Araucariaceae) numa população relictual em Campos do Jordão, SP**. 2001. 155 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

SOLÓRZANO-FILHO, J. A.; KRAUS, J. E. Breve história das matas de araucária. In: INTERNATIONAL CONGRESS AND EXHIBITION ON FORESTS, 5. 1999. Forest 99, Curitiba-PR. **Anais...** Rio de Janeiro: Biosfera, 1999. p. 37-40.

SOUSA, V. A. **Population genetic studies in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze**. 2000. 161 f. Tese de Pós-Doutorado (PhD em Ecologia e Ciências Florestais) – Universidade de Göttingen, Alemanha.

TACO 2. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. Versão II. 2 ed. Campinas-SP:

NEPA-UNICAMP, 2006. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco>. Acesso em Setembro 2013.

TOMPSETT, P. B. Desiccation studies in relation to the storage of araucaria seed. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 105, n. 3, p. 581-586, 1984.

VANHOLME, R.; DEMEDTS, B.; MORREEL, K.; RALPH, J.; BOERJAN, W. Lignin Biosynthesis and Structure. **Plant Physiol.** 153, p.895-905, 2010.

VELOSO, H. P.; RANGEL FILHO, A. L. R.; LIMA, J. C. A. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro: IBGE, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, 1991. 123 p.

WENG, J. K. CHAPPLE, C. The origin and evolution of lignin biosynthesis. **New Phytol**, v. 187, p. 273–285, 2010.

WILDE, M. H.; EAMES, A.J. The ovule and seed of *Araucaria bidwillii* with discussion of the taxonomy of the genus II. Taxonomy. **Annals of Botany**, v. 16, p. 27-47, 1952.