

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

DISSERTAÇÃO

**Modulação do processo de lignificação por aplicação de ácido
jasmônico e ácido 2,4-diclorofenoxiacético em *Eucalyptus*
urophylla S. T. Blake**

Maria Beatriz de Oliveira Monteiro

2005



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS AMBIENTAIS E FLORESTAIS**

**MODULAÇÃO DO PROCESSO DE LIGNIFICAÇÃO POR
APLICAÇÃO DE ÁCIDO JASMÔNICO E ÁCIDO
2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO EM
Eucalyptus urophylla S. T. BLAKE**

MARIA BEATRIZ DE OLIVEIRA MONTEIRO

Sob a Orientação do Professor

Heber dos Santos Abreu

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no curso de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Florestais, Área de concentração em Tecnologia e Utilização de Produtos Florestais

Seropédica, RJ

Março, 2005

634.97342

M775m

T

Monteiro, Maria Beatriz de Oliveira.

Modulação do processo de lignificação por aplicação de ácido jasmônico e ácido 2,4-Diclorofenoxiacético em *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake / Maria Beatriz de oliveira Monteiro. – 2005. 77 f. : il.

Orientador: Heber dos Santos Abreu.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Florestas.

Bibliografia: f. 38-41.

1. Eucalipto - Teses. 2. Madeira - Química - Teses. 3. Plantas - Reguladores – Teses. 4. Lignina – Teses. 5. Biossíntese – Teses. I. Abreu, Heber dos Santos. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Florestas. III. Título.

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

MARIA BEATRIZ DE OLIVEIRA MONTEIRO

Dissertação submetida, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais, área de concentração em Tecnologia e Utilização de Produtos Florestais.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 15/03/2005

Heber dos Santos Abreu. Prof. Dr. UFRRJ
(Orientador)

Maria Auxiliadora Coelho Kaplan. Prof^a Dr^a. UFRJ

Alexandre Miguel do Nascimento. Prof. Dr. UFRRJ

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Agronomia pela casa de vegetação.

Ao Laboratório de Anatomia Estrutural do Centro de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, onde foi realizada a análises citológicas.

Ao Laboratório de Produtos Naturais de Far-Manguinhos (FIOCRUZ), onde foi realizada parte da análise química.

A EMBRAPA Agrobiologia pela análise de proteínas realizada.

Ao Laboratório de Produtos Florestais – IBAMA de Brasília – DF, onde foi realizada as ressonâncias magnéticas.

A CAPES pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	1
2.REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. <i>Eucalyptus urophylla</i>	3
2.2.Lignina	3
2.3.Reguladores de Crescimento	3
2.4.Ácido Jasmônico	7
2.5.Auxina	7
3.MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1.Desenvolvimento experimental	12
3.2.Delineamento estatístico	12
3.3.Preparação do material para análise citológica	14
3.3.1.Análise citológica por aplicação de corantes nos tecidos seccionados para identificar presença de lignina	14
3.3.1.1. Teste de Wiesner	15
3.3.1.2. Teste de Maüle	15
3.4.Preparação do material para análise química	15
3.5. Preparação do material livre de proteínas	16
3.6.Lignina de Klason	16
3.7.Espectroscopia no Infravermelho	17
3.8.RMN ¹³ C no estado líquido ou sólido	17
3.9. Lignina Dioxano	18
3.10. Acetilação	18
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1. Teor de lignina	19
4.2. Altura do <i>Eucalyptus urophylla</i> na coleta para análises	19
4.3. Diâmetro do <i>Eucalyptus urophylla</i> na coleta para análise	21
4.4. Diâmetro da fibra	22
4.5. Lúmen da fibra	23
4.6. Comprimento da fibra	23
4.7. Espessura da parede da fibra	24
4.8. Diâmetro de vaso de <i>Eucalyptus urophylla</i>	26
4.9. Espessura da parede de vaso de <i>Eucalyptus urophylla</i>	27
4.10. Comprimento do vaso de <i>Eucalyptus urophylla</i>	28
4.11. Composição da lignina por espectroscopia no infravermelho	29
4.12. Quantificação de proteína total	29
4.13. Dados globais envolvendo teor de lignina, medidas anatômicas e medidas do <i>Eucalyptus urophylla</i>	32
4.14. Teste de Maüle no corte transversal do <i>Eucalyptus urophylla</i>	33
4.15. Teste de Wiesner no corte transversal do <i>Eucalyptus urophylla</i>	34
4.16. Teor de metoxila por ¹ H RMN	35
5.CONCLUSÃO	36
6.CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
8. ANEXOS	39
8.1. Extrativos	42
8.2. Análise de Variância	42
8.3. Médias das medidas anatômicas das fibras e vaso	42
8.4. Média da altura e diâmetro do <i>Eucalyptus urophylla</i> em cm	47

8.5. Mínima, Média, Máxima e Desvio Padrão das Análises Anatômicas	48
8.6. Gráficos dos tratamentos simples	48
8.7. Gráficos dos espectros no infravermelho	52
8.8. Espectros ¹ H RMN	62
	67

LISTA DE SÍMBOLOS

Mg	Micro grama
μM	Micro molar
J1	Solução com 1 μM de ácido jasmônico
J2	Solução com 2 μM de ácido jasmônico
A1	Solução com 18,12 μM de ácido 2,4-diclorofenóxiacético
A2	Solução com 36,24 μM de ácido 2,4-diclorofenóxiacético
J1A1	Solução com J1 e A1
J1A2	Solução com J1 e A2
J2A1	Solução com J2 e A1
J2A2	Solução com J2 e A2
H ₂ O	Testemunha
KOH	Hidróxido de potássio
M	Molar
HCl	Ácido Clorídrico
N	Normal
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
KBr	Brometo de Potássio
IV	Infravermelho
KI	Iodeto de Potássio

LISTA DE ABREVIACOES

AJ	cido jasmônico
2,4-D	cido 2,4-diclorofenoxiacético
G	Lignina Guaiaclica
S	Lignina Siringlica
H	Lignina Cumarlica
Cald5H	Coniferaldedo 5-hidroxilase
PAL	Fenilalanina Amnia-liase
C3H	4-hidrxicinamato 3-hidroxilase
F5H	Ferulato 5-hidroxilase
OMT	5-adenosil-metionina: cafeato/5-hidróxi
4CL	Hidroxicinamoil coenzima A ligase
CCR	Hidroxicinamoil coenzima A redutase
CAD	Cinamil lcool desidrogenase
C4H	Cinamato 4-hidroxilase
AIA	cido 3-indol-acético
IPEF	Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais
FAA	Formol, lcool etílico e ácido acético
THAM	Tri-hidróxi-amino-metano
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Soluções de aplicação dos reguladores de crescimento	13
Tabela 2. Teor de lignina Klason em % nos diversos tratamentos	19
Tabela 3. Comparações múltiplas entre as médias do teor de lignina em %	20
Tabela 4. Comparações múltiplas entre as médias da altura em cm	21
Tabela 5. Comparações múltiplas entre as médias do diâmetro em cm	22
Tabela 6. Comparações múltiplas entre as médias do diâmetro da fibra em μm	23
Tabela 7. Lúmen da fibra de <i>Eucalyptus urophylla</i> em μm	24
Tabela 8. Comprimento da fibra do <i>Eucalyptus urophylla</i> em μm	25
Tabela 9. Espessura da parede da fibra do <i>Eucalyptus urophylla</i> em μm	26
Tabela 10. Diâmetro de vaso do <i>Eucalyptus urophylla</i> em μm	27
Tabela 11. Espessura da parede do vaso de <i>Eucalyptus urophylla</i> em μm	28
Tabela 12. Comprimento do vaso de <i>Eucalyptus urophylla</i> em μm	29
Tabela 13. Visão geral dos dados do teor de lignina, medidas anatômicas e medidas do <i>Eucalyptus urophylla</i>	33
Tabela 14. Extrativos de todos os tratamentos	45
Tabela 15. Análise de variância do teor de lignina do <i>Eucalyptus urophylla</i>	45
Tabela 16. Análise de variância da altura final do <i>Eucalyptus urophylla</i>	45
Tabela 17. Análise de variância do diâmetro do <i>Eucalyptus urophylla</i>	45
Tabela 18. Análise de variância do diâmetro da fibra do <i>Eucalyptus urophylla</i>	46
Tabela 19. Análise de variância do lúmen da fibra do <i>Eucalyptus urophylla</i>	46
Tabela 20. Análise de variância do comprimento da fibra do <i>Eucalyptus urophylla</i>	46
Tabela 21. Análise de variância da espessura da parede da fibra do <i>Eucalyptus urophylla</i>	46
Tabela 22. Análise de variância diâmetro do vaso do <i>Eucalyptus urophylla</i>	46
Tabela 23. Análise de variância da espessura da parede do vaso do <i>Eucalyptus urophylla</i>	47
Tabela 24. Análise de variância do comprimento do vaso <i>Eucalyptus urophylla</i>	47
Tabela 25. Médias das medidas das fibras do <i>Eucalyptus urophylla</i> (μm)	47
Tabela 26. Médias das medidas do vaso (μm)	47
Tabela 27. Médias das alturas e dos diâmetros (cm)	48
Tabela 28. Elementos de vaso do tratamento J1	48
Tabela 29. Elementos de vaso do tratamento J2	48
Tabela 30. Elementos de vaso do tratamento A1	48

Tabela 31. Elementos de vaso do tratamento A2	48
Tabela 32. Elementos de vaso do tratamento J1A1	49
Tabela 33. Elementos de vaso do tratamento J1A2	49
Tabela 34. Elementos de vaso do tratamento J2A1	49
Tabela 35. Elementos de vaso do tratamento J2A2	49
Tabela 36. Elementos de vaso do tratamento H ₂ O	49
Tabela 37. Fibras do tratamento J1	50
Tabela 38. Fibras do tratamento J2	50
Tabela 39. Fibras do tratamento A1	50
Tabela 40. Fibras do tratamento A2	50
Tabela 41. Fibras do tratamento J1A1	50
Tabela 42. Fibras do tratamento J1A2	51
Tabela 43. Fibras do tratamento J2A1	51
Tabela 44. Fibras do tratamento J2A2	51
Tabela 45. Fibras do tratamento H ₂ O	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Precursores da lignina e respectivos sítios reativos	4
Figura 2. Proposta de oxidação horizontal e vertical durante a formação da lignina	5
Figura 3. Inicialização da polimerização da lignina na parede celular envolvendo os precursores: álcool <i>p</i> -cumarílico, coniferílico e sinapílico, respectivamente.	6
Figura 4. Estrutura do ácido jasmônico	7
Figura 5. Estrutura do ácido 2,4-diclorofenoxiacético	11
Figura 6. <i>Eucalyptus urophylla</i> na Casa de Vegetação com 4 meses de idade	12
Figura 7. Aplicação de AJ e 2,4-D em <i>Eucalyptus urophylla</i> na Casa de Vegetação	13
Figura 8. Reação de Wiesner	15
Figura 9. Reação de Maüle	16
Figura 10. Teor médio de lignina dos tratamentos do <i>Eucalyptus urophylla</i>	21
Figura 11. Altura média dos tratamentos na coleta do <i>Eucalyptus urophylla</i>	22
Figura 12. Médias do diâmetro de fibra em <i>Eucalyptus urophylla</i>	23
Figura 13. Médias do lúmen da fibra em <i>Eucalyptus urophylla</i> em μm	24
Figura 14. Médias do comprimento da fibra em <i>Eucalyptus urophylla</i>	25
Figura 15. Médias da espessura da parede da fibra em <i>Eucalyptus urophylla</i>	26
Figura 16. Médias do diâmetro de vaso em <i>Eucalyptus urophylla</i>	27
Figura 17. Médias da espessura da parede do vaso em <i>Eucalyptus urophylla</i>	28
Figura 18. Médias do comprimento do vaso em <i>Eucalyptus urophylla</i>	29
Figura 19. Espectro do <i>Eucalyptus urophylla</i> do tratamento J1 normalizado	30
Figura 20. Composição da lignina por infravermelho do <i>Eucalyptus urophylla</i>	31
Figura 21. Correlação de teor de lignina com unidade guaiacila e siringila de <i>Eucalyptus urophylla</i>	32
Figura 22. Correlação entre teor de proteína total e teor de lignina nos tratamentos	33
Figura 23. Tratamentos com teste de Maüle.	34
Figura 24. Teste de Wisner nos diversos tratamentos	35
Figura 25. Teores de OCH ₃ nos diversos tratamentos	36
Figura 26. Médias do AJ do lúmen da fibra de <i>Eucalyptus urophylla</i>	52
Figura 27. Médias do 2,4-D do lúmen da fibra de <i>Eucalyptus urophylla</i>	52
Figura 28. Médias do AJ do comprimento da fibra de <i>Eucalyptus urophylla</i>	53
Figura 29. Médias do 2,4-D do comprimento da fibra de <i>Eucalyptus urophylla</i>	53
Figura 30. Médias do AJ do diâmetro da fibra de <i>Eucalyptus urophylla</i>	54

Figura 31. Médias do 2,4-D do diâmetro da fibra de <i>Eucalyptus urophylla</i>	54
Figura 32. Médias do AJ da espessura da parede da fibra de <i>Eucalyptus urophylla</i>	55
Figura 33. Médias do 2,4-D da espessura da parede da fibra de <i>Eucalyptus urophylla</i>	55
Figura 34. Médias do AJ do comprimento do vaso de <i>Eucalyptus urophylla</i>	56
Figura 35. Médias do 2,4-D do comprimento do vaso de <i>Eucalyptus urophylla</i> .	56
Figura 36. Médias do AJ do diâmetro do vaso de <i>Eucalyptus urophylla</i>	57
Figura 37. Médias do 2,4-D do diâmetro do vaso de <i>Eucalyptus urophylla</i>	57
Figura 38. Médias do AJ da espessura da parede do vaso de <i>Eucalyptus urophylla</i>	58
Figura 39. Médias do 2,4-D da espessura da parede do vaso de <i>Eucalyptus urophylla</i>	58
Figura 40. Médias do AJ do teor de lignina de <i>Eucalyptus urophylla</i>	59
Figura 41. Médias do 2,4-D do teor de lignina de <i>Eucalyptus urophylla</i>	59
Figura 42. Médias da altura na aplicação de AJ do <i>Eucalyptus urophylla</i> .	60
Figura 43. Médias da altura na aplicação de 2,4-D do <i>Eucalyptus urophylla</i>	60
Figura 44. Médias do diâmetro na aplicação de AJ do <i>Eucalyptus urophylla</i>	61
Figura 45. Médias do diâmetro na aplicação de 2,4-D do <i>Eucalyptus urophylla</i>	61
Figura 46. Espectro no infravermelho do tratamento J1 normalizado	62
Figura 47. Espectro no infravermelho do tratamento J2 normalizado	62
Figura 48. Espectro no infravermelho do tratamento A1 normalizado	63
Figura 49. Espectro no infravermelho do tratamento A2 normalizado	63
Figura 50. Espectro no infravermelho do tratamento J1A1 normalizado	64
Figura 51. Espectro no infravermelho do tratamento J1A2 normalizado	64
Figura 52. Espectro no infravermelho do tratamento J2A1 normalizado	65
Figura 53. Espectro no infravermelho do tratamento J2A2 normalizado	65
Figura 54. Espectro no infravermelho do tratamento H ₂ O normalizado	66
Figura 55. Espectro de ¹ H RMN do tratamento J1	67
Figura 56. Espectro de ¹ H RMN do tratamento J2	68
Figura 57. Espectro de ¹ H RMN do tratamento A1	69
Figura 58. Espectro de ¹ H RMN do tratamento A2	70
Figura 59. Espectro de ¹ H RMN do tratamento J1A1	71
Figura 60. Espectro de ¹ H RMN do tratamento J1A2	72
Figura 61. Espectro de ¹ H RMN do tratamento J2A1	73
Figura 62. Espectro de ¹ H RMN do tratamento J2A2	74

RESUMO

MONTEIRO, Maria Beatriz de Oliveira. **Modulação do processo de lignificação por aplicação de ácido jasmônico e ácido 2,4-diclorofenoxiacético em *Eucalyptus urophylla*** S. T. Blake. 2005. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais). Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 2005.

Lignina é uma biomolécula indispensável a diversos processos biológicos das plantas, dos quais o mais importante é conferir rigidez necessária à manutenção da verticalidade do caule principal e assegurar a existência de vias rápidas de circulação da água e minerais. A busca de sistemas moduladores da biossíntese da lignina pode ser alcançada com a aplicação de reguladores de crescimento, cuja atividade tem efeito sobre a xilogênese. Esta pesquisa foi realizada com mudas de *Eucalyptus urophylla* e seus resultados podem viabilizar outros estudos na área da biotecnologia. Nesta pesquisa foram aplicadas diferentes concentrações de reguladores vegetais (ácido jasmônico (1µM e 2 µM e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (18,12 µM e 36,24 µM). A análise das plantas tratadas respondeu a alguns questionamentos de cunho bioquímico e anatômico ainda desconhecido. O experimento foi fatorial completo com delineamento inteiramente casualizado. Foram obtidas lignina ácido insolúvel (klason) e dioxano. As análises procederam com aplicação de espectrometria no infravermelho, determinação de proteína total, teor de metoxila e anatômicas. Os resultados mostraram que os tratamentos com o ácido jasmônico na sua primeira concentração ativou o processo de formação da lignina enquanto a segunda concentração desativou. No tratamento com 2,4-D (A1) o processo de lignificação contribuiu para reduzir a deposição de lignina, enquanto (A2) teve uma redução menor comparado com a testemunha. Os tratamentos conjugados J1A1 e J1A2 apresentaram efeito sinérgico com predomínio do ácido jasmônico, estes ativaram a formação da lignina Os resultados acenaram para modificação do processo de lignificação assim como na constituição protéica e anatômica do tecido estudados.

Palavras-chave: ácido 2,4-diclorofenoxiacético, ácido jasmônico, lignina, *Eucalyptus urophylla*

ABSTRACT

MONTEIRO, Maria Beatriz de Oliveira. Modulation of the lignification process for application of jasmonic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in *Eucalyptus urophylla* **S. T. Blake.** 2005. 77p. Dissertation (Master Science in Environmental and Forest Sciences), Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 2005.

Lignin is an important biomacromolecule for several biological processes in plants, the most important process is to give necessary rigidity to keep the stem verticality, and water and minerals circulation. This research was carried out with *Eucalyptus urophylla* seedling and the result can help other biotechnological studies. In this research were applied different growth regulators concentrations such as jasmonic acid (1 μ M e 2 μ M) and 2,4-dichlorofenoxiacético (18,12 μ M e 36,24 μ M). Analysis of the treated plants allowed to understand some unknown questions on biochemical and anatomical point of view. The experiment was factorial with whole randomized design. It was get insoluble (Klason) and dioxane lignins. Infrared spectroscopy, total protein, methoxyl determination and anatomical study were carried out. The results showed that the jasmonic acid on its first concentration activated the lignin formation process, while its second this process was disabled. 2,4-D (A1) and A2 treatments contributed for the lignification process, however with the second provided less reduction to be compared with standard treatment. The conjugated treatments J1A1 e J1A2 show to have effect on lignification with high synergistic behaviour for jasmonic acid, activating the lignin formation. The result varied for lignin modification process, as well as the alteration in the protein and anatomy.

Key words: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, jasmonic acid, lignin, *Eucalyptus urophylla*

1.INTRODUÇÃO

A lignificação é um processo bioquímico que em primeiro estágio é altamente mediado por enzimas intrínsecas à formação dos precursores no compartimento citoplasmático. O segundo estágio de formação da lignina ocorre na parede celular e caracteriza-se pela reação de oxidação desidrogenativa dos monolignóis disponíveis. Enzimas oxi-redutoras tais como peroxidases e isoenzimas correspondentes atuam na parede celular formando um complexo coordenado com peróxido de hidrogênio. Lacase entre outras oxidases também promove oxidação desidrogenativa dos lignóis na parede celular (LEWIS & SARKANEN, 1998; WHETTEN et al., 1998). A lignificação é um processo que abrange a biossíntese de monolignóis, seu transporte e polimerização na parede celular.

A lignina representa o segundo mais abundante biopolímero da biosfera sendo superada apenas pela celulose. É uma classe de macromoléculas complexas, de estrutura tridimensional embebida na parede celular de células especializadas, representando um importante papel no crescimento e desenvolvimento da planta (ROGERS & CAMPBELL, 2004). Trata-se de macromoléculas de origem fenilpropanoídica com funções de vital importância à sustentação mecânica, característica que provavelmente permitiu a adaptação das plantas aquáticas à vida terrestre (MONTIES, 1989), a condução de água (NORTHCOTE, 1989) e a defesa do vegetal frente a herbívoros e patógenos (VANCE et al., 1980). Grande parcela da lignina encontra-se formando ligações cruzadas, ancorando-se aos polissacarídeos da parede celular ou através de fenóis simples e dímeros (NAKASHIMA et al., 1997).

Sua arquitetura molecular difere segundo a origem botânica dos táxons, entre células e até mesmo dentro da parede celular, respondendo aos efeitos abióticos e bióticos do ambiente (LARROQUE & PLANCHON, 1990; KITAYAMA et al., 2004). As plantas detêm mecanismos coordenados de deposição da lignina, assim sua síntese obedece aos conceitos da topoquímica onde o tempo e local de posição pode ser endógena e exogenamente afetado.

Os vegetais produzem moléculas sinalizadoras, conhecidas como hormônios, e são responsáveis por efeitos marcantes no desenvolvimento em concentrações bastante pequenas. Até pouco tempo, acreditava-se que o desenvolvimento vegetal era regulado por apenas cinco hormônios: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico. Entretanto, evidências atuais indicam a existência de outros hormônios vegetais incluindo ácido jasmônico, brassinosteróides, ácido salicílico, glicoxilanas e polipeptídios sistêmicos. O número e os tipos de hormônios, além dos agentes sinalizadores homólogos, continuam aumentando (TAIZ & ZEIGER, 2004).

O crescimento e desenvolvimento vegetal dependem de sinais internos e exógenos que devem ser translados de uma zona à outra. Esta comunicação intercelular realiza-se por mensageiros químicos chamados de hormônios. Sua função é transportar informação e coordenar o crescimento e desenvolvimento (HINOJOSA, 2000).

As auxinas exercem papéis críticos nas respostas de crescimento, principalmente durante desenvolvimento de planta. Ao nível celular, a auxina age como um sinal para divisão, expansão, e diferenciação ao longo do ciclo de vida da planta. Tem um papel importante na formação da raiz, dominância apical e senescência (GODA et al., 2004).

O ácido jasmônico, por exemplo, estimula o crescimento celular e promove mudanças genéticas que alteram a formação do xilema. Os jasmonatos são ésteres derivados do ácido jasmônico como seus metil-ésteres. Eles inibem muitos processos vegetais como crescimento e germinação de sementes, e também promovem

senescência, abscisão, formação de tubérculo, amadurecimento de fruto, formação de pigmento e enrolamento de gavinha, assim como um importante papel na ativação de enzimas associadas ao sistema de lignificação das plantas (DAVIES, 1995).

Na realidade, a busca de sistemas ativadores da lignificação pode ser alcançada com a aplicação simples e conjugada de reguladores de crescimento que tem efeito sobre xilogênese.

As hipóteses levantadas neste trabalho são:

- ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e o ácido jasmônico (AJ) modulam o processo de formação da lignina em *Eucalyptus urophylla*.
- ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e o ácido jasmônico (AJ) modificam a composição e a estrutura da lignina em *Eucalyptus urophylla*.

Este trabalho teve como objetivo geral:

Estudar o efeito da aplicação de reguladores de crescimento (ácido 2,4-diclorofenoxiacético e o ácido jasmônico) como estratégia bioquímica do controle da biossíntese da lignina em *Eucalyptus urophylla*.

Os objetivos específicos foram:

- Verificar o mecanismo de ação isolada e conjugada do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e ácido jasmônico (AJ) na biossíntese da lignina em *Eucalyptus urophylla*;
- Analisar a composição da estrutura da lignina e
- Determinar os níveis de acumulação da lignina através de estudos anatômicos do xilema de *Eucalyptus urophylla*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Eucalyptus urophylla*

O *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake é uma das espécies de grande importância para a indústria de celulose e papel. O *Eucalyptus urophylla* cresce em solos arenosos, pobres e sujeito a déficit hídrico (período de 3 a 6 meses) (GALVÃO, 2000) desenvolvendo-se melhor em solos profundos, úmidos e bem drenados. Híbridos urograndis são usados na formação de florestas clonais em várias regiões do Brasil. *Eucalyptus urophylla* é uma espécie altamente indicada para celulose, aglomerados e chapas de fibras, serrarias, postes, moirões e carvão (JUNIOR & GARCIA, 2003).

A absorção de nutrientes pelas plantas, particularmente os transportados por difusão, é afetada por uma série de fatores, dentre esses: a umidade e a textura do solo. Baixa umidade e fertilidade promovem significativas alterações fisiológicas nas plantas, às quais podem ser diferente para cada espécie, dada a adaptabilidade diferenciada dessas ao ambiente. Se investigações de cunho bioquímico e genético fossem realizadas com mais intensidade, a qualidade da matéria prima assim como técnicas de procedimento para produção de celulose poderiam alcançar níveis extremamente interessantes quanto à produção de polpa celulósica (RALPH & HATFIELD, 1997). Por outro lado, poder-se-ia utilizar a madeira para outros fins nobres com modificações bioquímicas induzidas. Problemas na secagem, por exemplo, poderão ser solucionados com novas tecnologias, trabalhando com melhor material genético e utilizando práticas que permitam, na hora do corte e industrialização, a obtenção do melhor produto possível para o mercado.

2.2. Lignina

Um dos mais importantes metabólitos da via dos fenilpropanóides é a lignina, macromolécula essencial à vida das plantas, estabelecendo resistência estrutural à parede celular, dos tecidos do caule, raízes e nervuras das folhas. Esse grupo de substância apresenta-se como material amorfo e heterogêneo e sua composição difere conforme a origem botânica dos táxons (LARROQUE & PLANCHON, 1990). Os lignóis (C₆C₃), fenilpropanóides como: os álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico são conhecidos como precursores majoritários finais da lignina (Fig.1). Estes apresentam vários sítios reativos capazes de constituírem ligações cruzadas entre si, no anel aromático nas posições 3 ou 3 ou 5 e sobre a cadeia lateral. A lignina afeta diversos níveis das relações entre o vegetal e os fatores bióticos e abióticos do ambiente, como por exemplo, contra os efeitos dos raios ultravioletas (fotoionizantes) sobre os constituintes celulares.

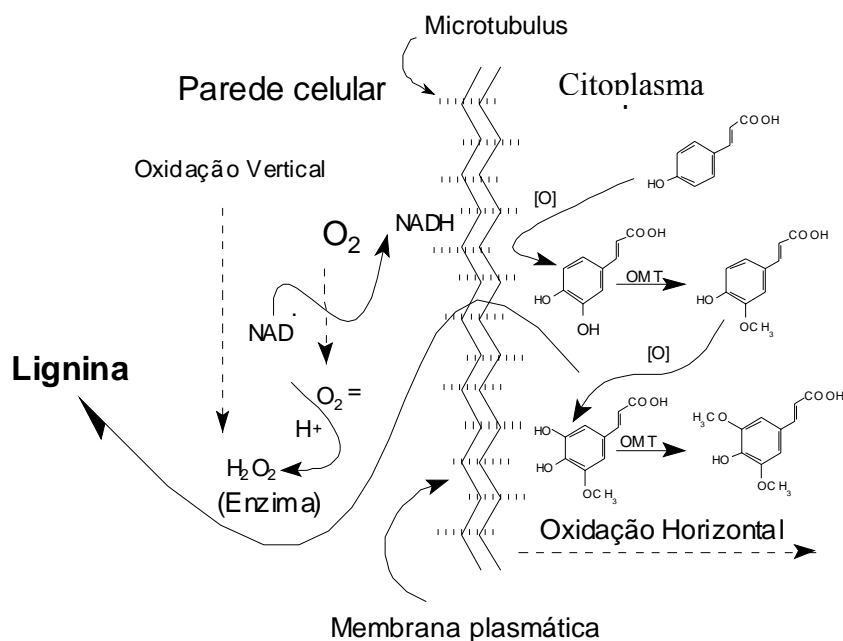


Figura 2. Proposta de oxidação horizontal e vertical durante a formação da lignina (ABREU, 1999)

A biossíntese da lignina nas plantas inicia-se pela oxidação dos três monolignóis na condição de precursor terminal. Para formar os precursores terminais (ésteres de ácidos fenilpropanóides) sucessivas oxidações e metilações são observadas (CHOINOWSKI et al., 1999). O ácido *p*-cumárico, por exemplo, é hidroxilado em posição meta à cadeia lateral, formando o éster cafeato. Este precursor intermediário é determinante na síntese dos demais precursores dos monolignóis. Três reações mediadas por cinamoil redutase levam aos aldeídos correspondentes (cumaraldeído, coniferaldeído e sinapaldeído), os quais são reduzidos a álcoois através da enzima cinamil álcool desidrogenase (CAD). Todo este processo enzimático intermediário ocorre no compartimento citoplasmático.

A via do ácido chiquímico é responsável pela formação de várias substâncias aromáticas, principalmente, a lignina e para tal consome em média entre 30-40% da energia utilizada pelos vegetais (GOTTLIEB, 1989; GOTTLIEB et al. 1995).

A polimerização da lignina nas plantas inicia-se pela oxidação dos três monolignóis na condição de precursores terminais. Os precursores terminais da lignina (álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico) apresentam vários sítios reativos capazes de constituírem ligações cruzadas entre si, preferencialmente sobre a cadeia lateral (HIGUCHI, 1997). O aumento do grau de metoxilação a partir dos precursores: álcool cumarílico, álcool coniferílico, álcool sinapílico corresponde à diminuição do número de ligações intermoleculares, possibilitando a formação de uma rede de ligações intermonoméricas na maioria envolvendo ligações C-C. Isso, portanto, constitui base na composição química e conseqüentemente nas formas estruturais adquiridas após a polimerização na parede celular.

O processo de polimerização é conseqüentemente dependente das estruturas dos precursores formados (Fig. 3). As estruturas mostram-se menos complexas, menos bio e quimioresistentes e com mais atividade antioxidante na ordem seqüencial de composição (H, G e S).

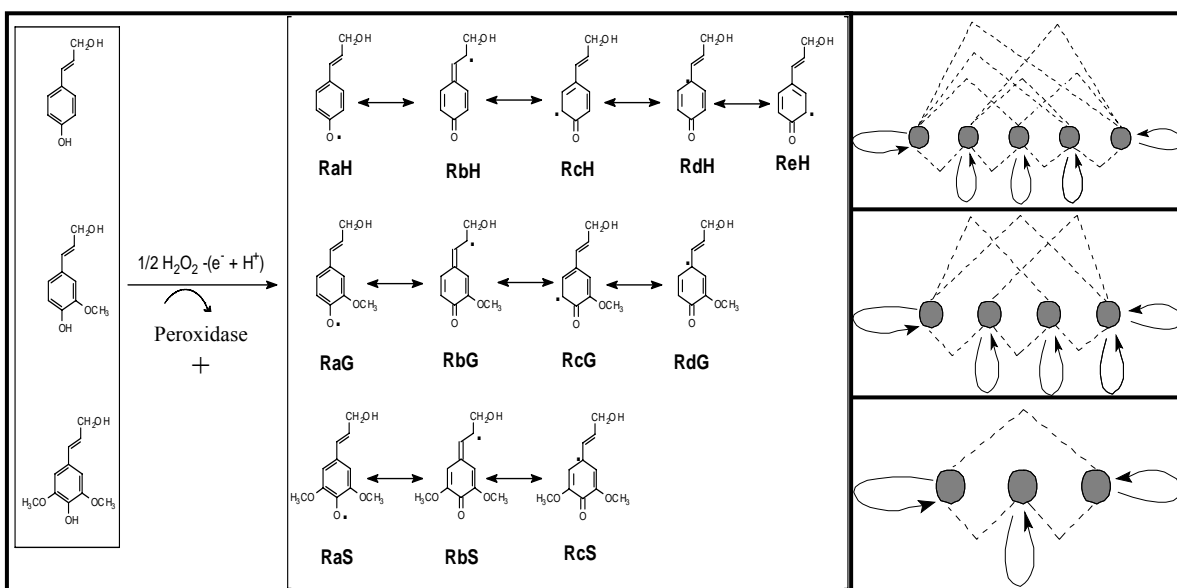


Figura 3. Inicialização da polimerização da lignina na parede celular envolvendo os precursores: álcool *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico, respectivamente.

Todo este processo de evolução pode ser analisado pelo aumento do grau de metoxilação: álcool cumarílico – álcool coniferílico e álcool sinapílico que em ordem diminui a frequência de ligações intermonoméricas entre radicais, que é à base do modelo moderno da arquitetura molecular estabelecida após a polimerização.

Contudo, a polimerização dos precursores não necessariamente necessita de H_2O_2 + peroxidase; outras enzimas como lacase ou fenol oxidase podem atuar sobre o sistema celular descartando a atuação global do peróxido de hidrogênio na formação da lignina (RANOCHA et al., 2002).

Existem evidências que no início da vida das plantas superiores predominavam as ligninas cumarílicas em pteridófitas, e só depois as ligninas cumarílicas-guaiacílicas dominaram o reino vegetal nas Gimnospermas. Depois, com o aparecimento das angiospermas surgiram às ligninas guaicílicas-siringílicas. Tornando assim a melhor forma posicional adaptativa, mesmo considerando a fragilidade molecular destas biomoléculas.

Pouco se tem estudado sobre a relação da composição da lignina e a sua respectiva estrutura química adquirida. A arquitetura molecular é consequência da rota biossintética do fenilpropanóide que leva a formação dos precursores intermediários (ácido chiquímico e ácido corísmico).

A biossíntese da lignina envolve uma série de enzimas como PAL, C4H, 4COL, CCR e CAD que participam da formação dos precursores intermediários e finais da lignina. A enzima CAD regula a composição da lignina G:S detectada em uma ampla variedade de plantas, cujo polimorfismo sugere que a CAD apresenta especificidade diferenciada na composição da lignina de Gimnospermas e Angiospermas. Em *Eucalyptus* a CAD2 mRNA tem sido detectada em tecidos de xilema e folhas e, em outros casos, a CAD afetou a composição (ABREU et al., 2003).

2.3. Reguladores de Crescimento

A regulação do crescimento em plantas é um fenômeno interativo em que fitohormônios podem atuar sinergisticamente ou antagonicamente em nível de sinalização, concentração e resposta fisiológica ao hormônio (GROSSMANN, 2003).

Os hormônios ou reguladores de crescimento quando presentes nos sítios celulares de ação estimulam o processo de desenvolvimento e crescimento, assim como o alongamento e divisão celular, diferenciação vascular, formação de raízes e dominância apical (LJUNG et al., 2002).

Os hormônios são substâncias produzidas em uma parte específica do organismo, que atua em baixas concentrações, sobre células específicas em locais diferentes de onde foram produzidas. As mudanças nas respostas a uma determinada quantidade de hormônios também podem ser causadas por alterações nos níveis endógenos de outras substâncias como, por exemplo, substâncias fenólicas, capazes de interagir aumentando ou inibindo a resposta do hormônio.

Dentre os reguladores de crescimento, foram usados, o ácido jasmônico e o 2,4-diclorofenoxiacético, ambos com atuação na fisiologia, crescimento e desenvolvimento da planta.

2.3.1.Ácido jasmônico

O ácido jasmônico e seu metil éster (MeJA) estão amplamente distribuídos no reino vegetal (Fig. 4). Primeiro o MeJA foi identificado como um componente do óleo essencial de várias espécies de plantas, enquanto o ácido jasmônico foi obtido de um líquido filtrado de uma cultura de fungo (CREELMAN & MULLET, 1997). São originários do ácido linolênico. Estes ácidos graxos (18 átomos de carbono), derivados de lipídeos de membrana, representam na atualidade um novo tipo de fitohormônio que desempenham papéis cruciais no crescimento, desenvolvimento e respostas à diferentes condições de estresse ambiental da planta (CORTÈS, 2000).

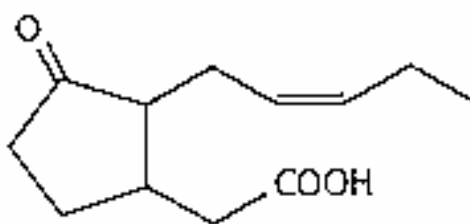


Figura 4. Estrutura do ácido jasmônico

As plantas produzem duas formas de ácido jasmônico. O solúvel que é usado como defesa direta para herbívoro, ativando genes para produção da PAL que catalisa substâncias especiais, inclusive inibidores de proteína que diminuem benefícios para o

herbívoro. E na forma de um sinal volátil pelo metil jasmonato recentemente descoberto em plantas (KAVALIER, 2000).

O ácido jasmônico é um regulador de crescimento vegetal relacionado com funções de desenvolvimento, crescimento, senescência da planta e indução de resistência sistêmica (ECKER & DAVIS, 1987). O ácido jasmônico induz a expressão de tioninas (EPPLE & BOHLMANN, 1995) e inibidores de proteínases (FARMER & RYAN, 1992). O ácido jasmônico tem ação sinérgica na expressão de genes protéicos por eliciação (XU et al., 1994). Ele está implicado na ativação de defensinas (PENNINCKX et al., 1996) e enzimas que medem a formação de fitoalexinas (ECKER & DAVIS, 1987; GUNDLACK et al., 1992). Recentemente, PIETERSE et al. (1998) demonstraram que o ácido jasmônico está envolvido em uma via independente de indução de resistência sistêmica, diferente da via de indução de RSA (resistência sistêmica adquirida) por AS (ácido salicílico). Assim estes reguladores de crescimento, potenciam a atividade do ácido salicílico na indução de RSA. Além disso, o ácido jasmônico induz genes envolvidos na biossíntese de fitoalexinas (Chs, PAL, HMGR) (CREELMAN et al., 1992) e fenóis (DOARES et al., 1995) isso é genes envolvidos diretamente em defesa da planta. Tem-se sugerido que os jasmonatos participam na via transdutora de sinais associados às respostas de ferida mecânica, processos de senescência, abscisão de folhas, inibição de germinação, indução de tubérculos, enrolamento de gavinhas. A aplicação de quantidades relativamente altas de ácido jasmônico em uma variedade ampla de plantas tem confirmado muito destes efeitos (GUNDLACK et al., 1992). Também parecem estar envolvidos em vários eventos morfogênicos das plantas, tais como na tuberização, formação das raízes tuberosas, formação de bulbos (HIGASHI, 2002).

O ácido jasmônico é reconhecido como molécula sinalizadora sintetizada por plantas em resposta a ferimentos, herbívoros e ataque de patógenos (CREELMAN et al., 1992; MUELLER, 1997). Dentre os vários efeitos fisiológicos descritos para o ácido jasmônico e seu metil éster em plantas, por exemplo, podem ser citados: a regulação da expressão de genes que codificam proteínas de reserva vegetativa (ANDERSON et al., 1989), a tradução de sinais relacionados a estresses, a indução gênica de inibidores de próteses (FRANCESCHI & GRIMES, 1991) e o aumento dos níveis dos transcritos e da atividade de lipoxigenase em plântulas e em folhas de soja (GRIMES et al., 1992; SARAVITZ & SIEDON, 1996).

Segundo BALDWIN (1998) o ácido jasmônico altera a expressão de gene e que o ferimento em plantas ativa elicitores que podem causar acumulação de ácido jasmônico e metil jasmonato em defesa da planta. De acordo com SEMBDNER & PARTHIER (1993) o jasmonato afeta o desenvolvimento vegetativo, desenvolvimento de frutas, e viabilidade de pólen.

A indução da resistência por herbívoros e patógenos é geralmente regulada por uma rede de caminho de tradução de sinais, os quais o ácido jasmônico e ácido salicílico têm função como chave sinalizadora de moléculas (GLAZEBROOK, 2001; THOMMA et al., 2001; KUNKEL & BROOKS, 2002). Injúrias causadas por herbívoros elevam rapidamente o nível do ácido jasmônico (BOSTOCK, 1999; REYMOND et al., 2000) causando defesas sistêmicas contra herbívoros e patógenos necrotróficos. Um tipo de evidência para o papel do ácido jasmônico na resistência a praga vem da análise de plantas que têm níveis modificados de ácido jasmônico, por exemplo, o tratamento de batata com o ácido jasmônico aumentou a resistência a *Phytophthora infestans* (COHEN et al., 1993).

O nível de ácido jasmônico em plantas varia em função do tecido e do tipo de célula e da fase de desenvolvimento (WEILER et al., 1993). A aplicação de ácido

jasmônico causa mudanças na maioria das células das plantas antes de atingir um equilíbrio no tecido entre o ácido jasmônico exógeno e o endógeno (FALKENSTEIN et al., 1991).

2.3.2. Auxina

O termo auxina é usado para descrever substâncias naturais e sintéticas que se caracterizam, essencialmente, por favorecer o alongamento celular. Também são definidas como substâncias que produzem modificações na plasticidade das paredes celulares, permitindo o alongamento celular (HINOJOSA, 2000). Na verdade, o efeito das auxinas sobre os vegetais é muito diversificado, dependendo do local de atuação e concentração, podendo apresentar efeitos completamente antagônicos.

Um papel essencial da auxina é a iniciação e crescimento do câmbio vascular, isto é evidente com experimentos envolvendo auxina exógena. A excisão de folha e aplicação de auxina em estudos tem demonstrado que o desenvolvimento do pró-câmbio e diferenciação do xilema primário e floema dependem do fornecimento do transporte basípeto de auxina (De GROOTE & LARSON, 1984).

A biossíntese de auxina está associada aos tecidos com rápida divisão celular e crescimento, especialmente nas partes aéreas. Embora quase todos os tecidos vegetais sejam capazes de produzir baixos níveis de AIA (ácido 3-indol-acético), os meristemas apicais, as folhas jovens, os frutos e as sementes em desenvolvimento são os principais locais de síntese deste hormônio (LJUNG et al., 2001). A auxina é sintetizada no ápice caulinar e transportada em direção basípeta aos tecidos localizados abaixo do ápice. O suprimento constante de auxina que chega à região subapical do caule ou do coleóptilo é necessário ao alongamento contínuo dessas células. Segundo TAIZ & ZEIGER (2004) quando o nível de auxina endógena na região de alongamento de uma planta sadia normal está próximo do ponto ótimo para o crescimento, a aspersão na planta com auxina exógena resulta em um breve estímulo no crescimento, podendo até ser inibitório. Entretanto, quando a fonte endógena de auxina é removida por excisão das regiões contendo as zonas de alongamento, a taxa de crescimento decresce rapidamente a uma faixa basal baixa. Frequentemente, tais regiões excisadas respondem de forma intensa à auxina exógena pelo rápido aumento de sua taxa de crescimento aos níveis observados na planta intacta.

Auxina é importante regulando e controlando muitas células diferentes, e processos de desenvolvimento em plantas. Este controle é mediado não somente através de alterações na concentração de auxina celular, mas também através de alterações no tecido sensibilizado em relação à auxina e mudança no transporte polar (DAVIES, 1995; MUDAY & De LONG, 2001; MOYLE et al., 2002). A distribuição da auxina fica em um gradiente radial através de tecido da região do câmbio, com alta concentração na zona cambial e baixa concentração relativa durante o amadurecimento do xilema e do floema (SUNDBERG et al., 2000).

De acordo com ALONI (1995) as quantidades relativas de xilema e floema formadas são reguladas pela concentração de auxina: altas concentrações de auxina induzem a diferenciação de xilema e floema, enquanto que somente floema diferencia-se em baixas concentrações. Da mesma forma, os experimentos com tecidos de caule indicaram baixas concentrações de auxina durante a diferenciação do floema, ao passo que altos níveis de auxina são encontrados no xilema.

A auxina funciona como um sinal de coordenação, que integra crescimento apical e a produção de tecidos vasculares (UGGLA et al., 1998). Ela é envolvida em

quase todos os aspectos da xilogênese, inclusive na regulação da atividade mitótica da célula cambial (LITTLE & PHARIS, 1995; LITTLE et al., 2002, KIJIDANI et al., 2001; SAVIDGE, 2001). O nível de auxina endógeno está mais associado à formação de lenho juvenil do que o lenho tardio (LITTLE & SAVIDGE, 1987).

A concentração da auxina na planta não é uniforme, diminuindo ao longo do caule. Em ordem decrescente de concentração temos ápice caulinar com mais concentração, gemas de crescimento, sementes em formação, folhas novas, folhas maduras, ápices radiculares, grãos de pólen e câmbio com menos concentração (CROSS, 1985).

A auxina é o único hormônio de crescimento vegetal conhecido que apresenta transporte polar (TAIZ & ZEIGER, 2004). O gradiente longitudinal da auxina da parte aérea até a raiz afeta vários processos de desenvolvimento, incluindo o alongamento celular, a dominância apical, a cicatrização de lesões e a senescência foliar. Este transporte da extremidade apical para basal é denominado basípeto (COSGROVE, 2000).

Recentemente foi descoberto que uma quantidade significativa de auxina ocorre no floema e que ele é a principal rota pela qual a auxina é transportada em direção acrópeta na raiz. Assim, mais de uma rota é responsável pela distribuição da auxina na planta (UGGLA et al., 1996).

O principal local de transporte polar basípeto da auxina nos caules e folhas é o parênquima vascular. E o transporte polar acrópeta na raiz está especificamente associado ao parênquima do estelo (PALM & GÁLWEILER, 1999).

Em plantas lenhosas, a auxina produzida pelas gemas em crescimento estimula a ativação do câmbio na direção basípeta. A nova camada de crescimento secundário inicia nos ramos menores e avança de modo descendente, em direção a extremidade da raiz (JACOBS, 1984).

Experimentos com auxina exógena demonstram claramente que o transporte polar da auxina induz a formação de tecido vascular primário (SACHS, 1981; JACOBS, 1984; ALONI, 1995) e mantém a estrutura e atividade da divisão celular do câmbio vascular (SAVIDGE, 1983). Nas plantas superiores, o transporte assume caráter polar com exigência de energia. A velocidade média do transporte é lenta, mesmo assim, este transporte é mais rápido do que por difusão. O sistema polar de transporte também funciona para as auxinas sintéticas, como ANA e 2,4-D, mas com velocidades diferenciadas, podendo ser mais lento o transporte deste último (BRENNER et al., 1987).

Dentre as auxinas sintéticas pode-se citar: o ácido indolpropiónico (AIP), ácido naftacenoacético (ANA), 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético (MCPA), 2,4,5-tricloropenoxipropiónico (2,4,5-TP) e o 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) que foi utilizado nesta pesquisa (Fig. 5).

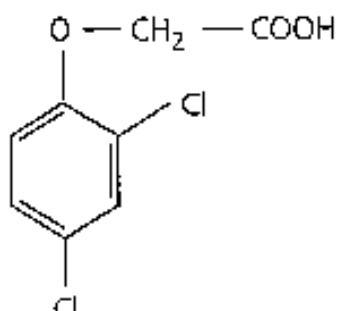


Figura 5. Estrutura do ácido 2,4-diclorofenoxiacético

3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Desenvolvimento Experimental

Neste experimento foram utilizadas sementes certificadas de *Eucalyptus urophylla* adquiridas do IPEF/SP. Foi utilizado substrato (60% de composto orgânico,

20% de argila, 10% de areia e 10% de vermiculita) preparado no Viveiro Florestal do Instituto de Florestas/UFRRJ. Inicialmente foram plantadas em tubetes com capacidade de 53cm³ no Viveiro Florestal, com adubações e tratos silviculturais para o crescimento de plantas saudáveis. Depois de três meses e meio foram transferidas para citrus 3800 (tubete) com capacidade de 3,8 L e transferidos para Casa de Vegetação do Instituto de Agronomia/UFRRJ (Fig. 6) onde permaneceram até os seis meses.



Figura 6. *Eucalyptus urophylla* na Casa de Vegetação com 4 meses de idade

As aplicações com os reguladores de crescimento, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e ácido jasmônico (AJ) foram iniciadas no dia 24 de junho de 2004 na Casa de Vegetação, com a 1ª aplicação, de acordo com o cronograma do experimento no campo. As aplicações continuaram sendo feitas de dez em dez dias, totalizando sete aplicações no horário de 05h00min às 07h00min, para uma melhor eficiência da absorção dos reguladores de crescimento aplicados sobre as folhas (Fig. 7).



Figura 7. Aplicação de AJ e 2,4-D em *Eucalyptus urophylla* na Casa de Vegetação

As soluções foram preparadas segundo avaliação preparatória dos dados da literatura. Essas soluções constituídas de AJ, 2,4-D, H₂O bideionizada e adesil estão na Tabela 1 com a descrição da quantidade aplicada da solução de reguladores de crescimento utilizado neste experimento. O adesil que é um tensoativo não iônico é um agente que não fornece íons em solução e cuja solubilidade em água se deve a presença, nas suas moléculas, de grupamentos funcionais possuindo forte afinidade pela água, ajudando assim na absorção pelas folhas da planta.

Tabela 1. Soluções de aplicação dos reguladores de crescimento

TRATAMENTOS	2,4-D	AJ	H ₂ O
J1 + Adesil		15 mL	
J2 + Adesil		15 mL	
A1 + Adesil	15 mL		
A2 + Adesil	15 mL		
J1A1 + Adesil	7,5 mL	7,5 mL	
J1A2 + Adesil	7,5 mL	7,5 mL	
J2A1 + Adesil	7,5 mL	7,5 mL	
J2A2 + Adesil	7,5 mL	7,5 mL	
H ₂ O bideionizada + Adesil			15mL

Nota : J1 – 1 μ M, J2 – 2 μ M, A1 – 18,12 μ M , A2 – 36,24 μ M e Adesil – 3 μ L

Cronograma do experimento no campo:

Semeadura – 27/03/04
Raleio – 26//06/04
Adubações – 1ª aplicação: 07/05/04
 2ª aplicação: 14/05/04
 3ª aplicação: 26/05/04
Repicagem: 15/06/04
Transferência para Casa de Vegetação: 16/06/04
Aplicações: 1ª - 24/06/04
 2ª - 04/07/04
 3ª - 14/07/04
 4ª - 24/07/04
 5ª - 03/08/04
 6ª - 13/08/04
 7ª - 23/08/04
Coleta do Material – 27/09/04

3.2.Delineamento estatístico

O experimento foi implantado sobre delineamento inteiramente casualizado, constando de três fatores e três níveis, totalizando nove tratamentos, com cinco repetições cada para altura e diâmetro final, três repetições para determinação do teor de lignina pelo método Klason e com vinte e cinco repetições para a análise anatômica. Com análise de variância, teste de comparação entre as médias pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade, e a homogeneidade pelo teste de Bartlett ao mesmo nível de significância.

3.3. Preparação do material para análise citológica

Parte das bases dos caules das plantas tratadas foram usadas para análise microscópica, realizada no Laboratório de Botânica Estrutural do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Foram avaliadas: espessura da parede do vaso, diâmetro do vaso (corte transversal) e espessura da parede de fibra, comprimento de fibra, diâmetro de fibras, lúmen de fibra, comprimento de vaso (macerado).

A montagem das lâminas seguiu os seguintes procedimentos:

- 1) O tecido cortado foi mergulhado em hipoclorito (1 min);
- 2) O tecido foi lavado quatro vezes com água destilada;
- 3) Foram usadas quatro gotas de ácido acético glacial para neutralizar o hipoclorito;
- 4) Foi lavado quatro vezes com água destilada;
- 5) Foi corado com safrablau (mistura dos corantes safranina e azul de astra);
- 6) O material foi montado sobre a lâmina e depois colado com glicerina 50% para fixação (JOHANSSON, 1994).

A maceração foi feita com objetivo de observar os elementos de vasos e de fibras. Cada amostra foi submersa em água oxigenada e ácido acético, e em seguida

cada amostra ficou 48hs na estufa, para que o material se dissociasse. Depois de dissociado o material foi lavado com água destilada e corado com safranina alcoólica 1%.

3.3.1 Análise citológica por aplicação de corantes nos tecidos seccionados para identificar presença de lignina

3.3.1.1 Teste de Wiesner

A análise da presença de lignina e sua localização no tecido obtido do corte transversal do caule foram realizadas através do teste de cor conhecido por floroglucina, utilizando uma solução de floroglucionol a 2% em ácido clorídrico aplicado em tecidos frescos (Fig. 8) (LIN & DENCE, 1992).

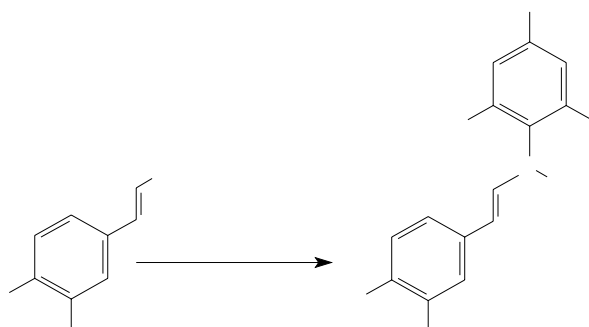


Figura 8. Reação de Wiesner

3.3.1.2 Teste de Maïle

Para a análise de verificação do tipo de lignina foi utilizado o teste de Maïle. O procedimento para este teste (LIN & DENCE, 1992) foi realizado em três etapas: com permanganato de potássio 1%; ácido clorídrico 3% e hidróxido de amônio concentrado. Foram feitos vários cortes citológicos transversais em micrótomo com espessura de 16µm, retirados do segmento do caule a uma mesma altura para todos os tratamentos (acima de 1 cm a partir da base do caule). Esses cortes foram colocados em uma placa de Petri (uma para cada tratamento) e imersos em solução de permanganato de potássio 1% por 5 min à temperatura ambiente. A solução foi descartada e a amostra lavada duas vezes com água bideionizada e então tratada com uma solução de ácido clorídrico a 3% até a cor passar de marrom escuro à marrom claro. Quando necessário, adicionou-se ácido clorídrico para facilitar a descarga da cor escura. A solução de ácido clorídrico foi descartada, e a amostra lavada duas vezes com água. O passo seguinte foi o tratamento com hidróxido de amônio concentrado. Como esse tratamento foi realizado em dicotiledôneas, no caso desse trabalho em *Eucalyptus urophylla*, houve variações da cor vermelho-violáceo nos diferentes tratamentos.

O teste de Mäule é um procedimento analítico de reação de cor sobre o tecido ou lignina para verificação da presença de unidades siringila. Na reação de Mäule (Fig. 9), o permanganato de potássio é reduzido pela madeira a dióxido de manganês, que é depositado sobre a fibra; o posterior reage com ácido clorídrico, formando cloro que reage com a lignina (NAKANO & MESHITSUKA, 1992).

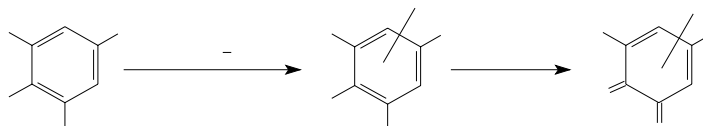


Figura 9. Reação de Mäule

3.4. Preparação do material para análise química

Preparação do material livre de extrativos

Os materiais do caule principal (lignocelulósicos) foram secos e logo em seguida moídos (todos os caules) de um mesmo tratamento. Todo material passou por duas peneiras, uma com 0,177mm e outra com 0,420 mm de diâmetro de partículas, das quais foram extraídas continuamente através do uso de ciclohexano (24hs), acetato de etila (24hs), metanol (24hs) em um extrator do tipo Soxhlet, durante 72h ininterruptas e em seguida, com água por três horas de extração em uma placa de aquecimento a 90°C. O material livre de extrativos foi previamente seco em um dessecador contendo anidrido fosfórico, sob vácuo (BROWNING, 1967).

Após a extração o material solúvel foi concentrado em um evaporador rotatório e em seguida seco e pesado. O material livre de extrativo foi seco previamente por sucção durante alguns minutos e finalmente seco em um dessecador contendo anidrido fosfórico.

3.5. Preparação do material livre de proteínas

Esse procedimento foi aplicado por tratar de tecido vegetal jovem, por haver indícios de proteínas.

Transferiu-se 1,5g de material (tecido livre de extrativo) para erlenmeyer de 250mL com solução de pepsina (10g de pepsina para 1000mL de solução de ácido clorídrico 1%, esta solução de pepsina não pode ser armazenada), e mantendo a temperatura de 40°C (durante 14 horas) no banho-maria. Depois lavou-se duas vezes com H₂O quente destilada; uma vez com 12,8mL de H₂SO₄ (5 %); transferiu-se o material para um balão com 240mL de H₂SO₄ (5 %) e refluxou-se por uma hora. Depois, filtrou-se essa mistura lavando com 48mL de H₂O bideionizada quente, e em seguida com 32mL de etanol por duas vezes e por último lavou-se com 24mL de éter

por duas vezes. A amostra então foi colocada no dessecador com sílica gel ativada (LIN & DANCE, 1992).

3.6. Lignina insolúvel (Klason)

A lignina insolúvel foi quantificada pelo método de Klason. 300mg de amostra seca foram transferidas para um tubo de ensaio, adicionando-se 3mL de ácido sulfúrico 72%. A amostra foi macerada (mecanicamente) por agitação contínua durante 3 minutos no macerador mecânico de tecidos (Potters – B. Braun Biotech International). Depois foi mantida entre 25 a 30⁰C, usando-se banho maria, agitando-se freqüentemente por uma hora. O material foi transferido para um balão de 250mL e diluído à solução de ácido sulfúrico 72%, adicionando 84mL de água destilada. O material ficou em refluxo por 4h, sendo em seguida lavado com H₂O quente (500mL). A solução de lignina ácida foi filtrada em um funil de placa sinterizada e colocado em estufa a 105⁰C até peso constante. Por último, os filtros contendo as amostras foram pesados calculando-se a porcentagem de lignina na madeira, pela equação % lignina = [peso seco(mg)/peso da amostra em mg (300mg)] x 100 (EFFLAND, 1977).

3.7. Obtenção da percentagem de proteína total

Para obtenção da proteína total de cada tratamento, foi usado o material livre de extrativos. Foi quantificado o teor de Nitrogênio total através do método kjedahl (BODDEY, et al., 1983; BREMMER, 1965; LOUREIRO, 1986).

Os materiais necessários foram: tubos de digestão de 80 mL; erlenmeyer de 125 mL; Kjeltex auto analyzer; balança com precisão de 1 mg; ácido sulfúrico P.A.; solução de hidróxido de sódio 44,4%; solução indicadora de ácido bórico 1% e solução de THAM (Tri hidroxí amino metano) 0,03N.

Reagentes:

- Solução de hidróxido de sódio 44,4% - foram pesados 44,4 g de hidróxido de sódio sendo dissolvidos de 0,8 L de água, a seguir transferida a solução para um balão de 1 L e aferiu-se o balão. Solução indicadora de ácido bórico 2%.

- Solução de THAM (Tri hidroxí amino metano) 0,03N - foram pesados 3,5 g de Tri hidroxí amino metano e dissolvidos em um balão volumétrico de 1 L. Foi aferido o balão.

Procedimento

A solução de ácido sulfúrico usada no aparelho Kjeltex auto analyzer foi padronizada, com um erlenmeyer de 125 mL, adicionou-se 10mL de solução indicadora de ácido bórico 2% e 5 mL de solução de THAM 0,03N, titulou-se com ácido sulfúrico, e efetuou-se o seguinte cálculo:

$$\text{Normalidade do ácido} = \frac{\text{N do THAM} \times \text{Volume THAM}}{\text{Tit. Versus THAM}}$$

Com a normalidade do ácido, colocou-se o tubo de digestão com amostra no Kjeltex auto analyzer.

3.8. Espectroscopia no infravermelho

Os espectros no infravermelho da madeira livre de extrativos foram efetuados objetivando-se identificar o tipo de lignina presente no material de estudo. Esta análise foi realizada na Central Analítica na FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz) no Instituto de Tecnologia em Fármacos de Manguinhos. Os espectros foram registrados em aparelho de espectrometria no IV por transformada de Fourier, Perkin-Elmer, utilizando-se 2 mg de amostra de material lignocelulósico e 200 mg de KBr. Foram observados os principais sinais: 3500 cm^{-1} , $3000\text{-}2980\text{ cm}^{-1}$, 1740 cm^{-1} , 1690 cm^{-1} , 1670 cm^{-1} , 1600 cm^{-1} , 1500 cm^{-1} , 1460 cm^{-1} , 1328 cm^{-1} e 1268 cm^{-1} (BROWNING, 1967). As intensidades foram determinadas através do método de linha base. O sinal foi usado de absorção em 1500 cm^{-1} (vibração do anel aromático), como referência interna por depender menos dos substituintes aromáticos.

3.9. Lignina Dioxano

Adicionou-se lentamente, em um balão de 500ml com duas saídas e contendo amostra de madeira, uma solução de dioxano e H_2O 9:1 + HCl. A mistura reacional foi aquecida em uma chapa de aquecimento a $90\text{-}95^\circ\text{C}$, em atmosfera de nitrogênio, por um período de 4 horas. Em seguida, deixou esfriar a mistura reacional ainda em atmosfera de N_2 , em seguida foi filtrada e lavada em um funil de Büchner com 12mL da mesma solução. O extrato (solução ácida) foi concentrado, em um evaporador rotatório, até o momento em que um material de natureza viscosa apareceu no balão. Precipitou-se este material em um grande volume de H_2O bideionizada sob agitação permanente. O precipitado foi separado por centrifugação, decantação e, em seguida, lavado totalmente com H_2O , por três vezes, usando centrifugação. A amostra, em seguida, foi seca em um dessecador com hidróxido de sódio e sílica sob vácuo (LIN & DANCE, 1992).

3.10. Acetilação

Inicialmente, foram dissolvidos 50mg de lignina em 5mL de piridina. Em seguida, adicionou-se 5mL de anidrido acético, na proporção (1:1) e o material foi deixado em repouso durante 48 horas. Depois, a lignina foi recuperada, por precipitação, da mistura reacional com éter etílico e centrifugada cuidadosamente com este mesmo solvente. Posteriormente, secada a frio no dessecador, com KOH sob pressão reduzida durante três dias (ABREU, 2002).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os dados analisados tiveram distribuição normal, quando submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov, ao nível de significância de 5% para teor de lignina, altura final, diâmetro final, diâmetro da fibra, lúmen da fibra, comprimento da fibra, espessura da parede da fibra, comprimento do vaso, diâmetro do vaso e espessura da parede do vaso. Foi também verificada a homogeneidade das variâncias, pelo teste de Bartlett ao mesmo nível de significância.

4.1. Lignina insolúvel (Klason)

Os teores de lignina foram determinados pelo método Klason (EFFLAND, 1977) e apresentaram resultados satisfatórios para o objetivo proposto como mostrado a seguir na Tabela 2. Não foram determinados teores de sílica, devido a não verificação deste material nos cortes anatômicos.

Tabela 2. Teor de lignina Klason em % nos diversos tratamentos

Tratamentos	Teor de lignina (Klason) %
J1	41,56
J2	20,49
A1	17,42
A2	23,55
J1A1	41,08
J1A2	42,45
J2A1	21,25
J2A2	27,51
H ₂ O	26,43

Nota: A1 (1ª concentração de 2,4-D: 18,12µM), A2 (2ª concentração de 2,4-D: 36,24µM), AJ (ácido jasmônico), J1 (1ª concentração de AJ: 1µM), J2 (2ª concentração de AJ: 2µM); J1A1 (combinação da 1ª concentração de AJ com a 1ª concentração de 2,4-D), J1A2 (combinação da 1ª concentração de AJ com a 2ª concentração de 2,4-D), J2A1 (combinação da 2ª concentração de AJ com a 1ª concentração de 2,4-D), J2A2 (combinação da 2ª concentração de AJ com a 2ª concentração de 2,4-D) e H₂O (testemunha).

As aplicações de ácido jasmônico (AJ) e o ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D) contribuíram para a mudança do teor de lignina no *Eucalyptus urophylla*. O AJ quando aplicado na sua menor concentração de 1 µM (J1) teve um resultado relevante aumentando consideravelmente o teor de lignina para 41,56 %, em relação à testemunha (H₂O) com 26,43%. Na concentração de 2 µM (J2) ele teve um efeito inibitório reduzindo a lignina para 20,49%, abaixo da H₂O (testemunha) conforme Tabela 3.

Segundo KAVALIER (2000) o ácido jasmônico é uma das moléculas sinalizadoras que inicia a ativação da PAL (fenilalanina amônia-liase). A PAL é uma das enzimas da via fenilpropanóides, que é a rota biossintética da formação da lignina e outros metabólitos secundários. Este efeito do sinal do ácido jasmônico no aumento de ativação e na concentração da PAL poderia aumentar a produção de metabólitos secundários, como foi estudado por KAVALIER (2000) com *Brassica rapa* tendo sido borrifado 2 µM de solução de cis e trans metil jasmonato em etanol, no qual teve um aumento de antocianina.

A fenilalanina, pela ação da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL), perde uma molécula de amônia, originando o ácido cinâmico, que é um dos precursores da lignina

na via biossintética. A regulação dessa enzima é um fator crítico na produção dos metabólitos da via dos fenilpropanóides. Nas plantas, a atividade da PAL está sob controle de vários fatores internos e externos, tais como hormônios, níveis de nutrientes, luz, infecção por fungos e lesões (RHODES, 1994).

Tabela 3. Comparações múltiplas entre as médias do teor de lignina em %

		2,4-D		
		0	A1	A2
AJ	0	26,43aA	17,42bA	23,55cA
	J1	41,56aB	41,08aB	42,45bB
	J2	20,49aC	21,25aC	27,51bC

Nota: letras minúsculas distintas mostram as diferenças significativas para o teste de Tukey entre linhas e letras maiúsculas entre colunas, a 5% de probabilidade; 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético), A1 (1ª concentração de 2,4-D : 18,12µM), A2 (2ª concentração de 2,4-D : 36,24µM), AJ (ácido jasmônico), J1 (1ª concentração de AJ : 1µM), J2 (2ª concentração de AJ : 2µM).

Os tratamentos envolvendo o 2,4-D tiveram efeitos diferentes entre si e em relação à H₂O (testemunha). De acordo com a tabela 3 os tratamentos A1 (17,42 %) e A2 (23,55 %) tiveram diferença estatística ao nível de 5 % de significância.

Os tratamentos conjugados tiveram sinergismo. Pode-se observar que o J1 (41,56 %) tem a maior concentração de lignina nos tratamentos simples (J1, J2, A1 e A2) e quando combinado com A1 e A2, mantiveram com o teor de lignina alto para J1A1 (41,08 %) e J1A2 (42,45 %). Isso demonstra que o ácido jasmônico na sua 1ª concentração (1µM) ativou a via fenilpropanóides.

Quando o J2 foi combinado com o A1 e A2 prevaleceu o efeito do 2,4-D diminuindo para 21,25% (J2A1) e aumentando para 27,51 % (J2A2), este último ultrapassando a testemunha (H₂O). Sendo que o J2 (20,49 %) teve um teor de lignina maior do que o A1 (17,43 %). Como foi observado a 2ª concentração do AJ inibiu a formação da lignina, porém quando foi aplicado conjuntamente com o 2,4-D (J2A2) teve um aumento na produção deste metabólito secundário, sendo provavelmente com uma atuação maior do 2,4-D na sua 2ª concentração (A2), quando combinado com o J2. A Figura 10 mostra os valores médios dos teores de lignina envolvendo todos os tratamentos. A análise de variância foi significativa a 5 % de probabilidade para as três variações (em anexo).

No nosso experimento percebemos que o 2,4-D, inibe a rota do fenilpropanóide diminuindo a presença de metabólitos secundários. Sendo constatado que a menor concentração utilizada do 2,4-D teve um maior efeito nesta rota diminuindo para 17,43% (A1). Quando aplicada a segunda concentração o efeito de diminuição foi menor (23,55 % - A2).

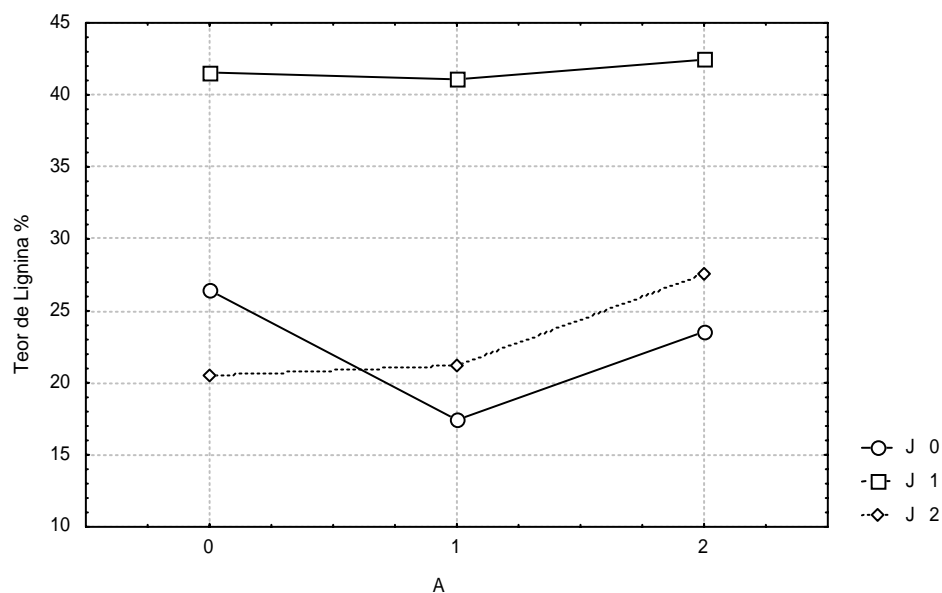


Figura 10. Teor médio de lignina dos tratamentos do *Eucalyptus urophylla*

4.2. Altura do *Eucalyptus urophylla* na coleta para análises

De acordo com a Tabela 4 existe diferença significativa entre as médias de alguns tratamentos como: H₂O (testemunha-68,40cm) em relação a A1 (80,20cm) e A2 (78,40cm). Existe também esta diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey relacionando a H₂O (testemunha-68,40cm) com J1 (77,80cm) e J2 (78,40cm).

Tabela 4. Comparações múltiplas entre as médias da altura em cm

		2,4-D		
		0	A1	A2
AJ	0	68,40 aA	80,20bA	78,40bA
	J1	77,80 bB	94,60bB	86,60bA
	J2	78,40 bB	100,00bB	87,00aA

Nota: letras minúsculas distintas mostram as diferenças significativas para o teste de Tukey entre linhas e letras maiúsculas entre colunas, a 5% de probabilidade; 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético), A1 (1ª concentração de 2,4-D : 18,12µM), A2 (2ª concentração de 2,4-D : 36,24µM), AJ (ácido jasmônico), J1 (1ª concentração de AJ : 1µM), J2 (2ª concentração de AJ : 2µM).

Pode-se dizer que todos os tratamentos envolvendo os reguladores de crescimento contribuíram para aumentar a altura da planta, sendo o tratamento J2A1 (100cm) o mais significativo como podemos observar na Figura 11.

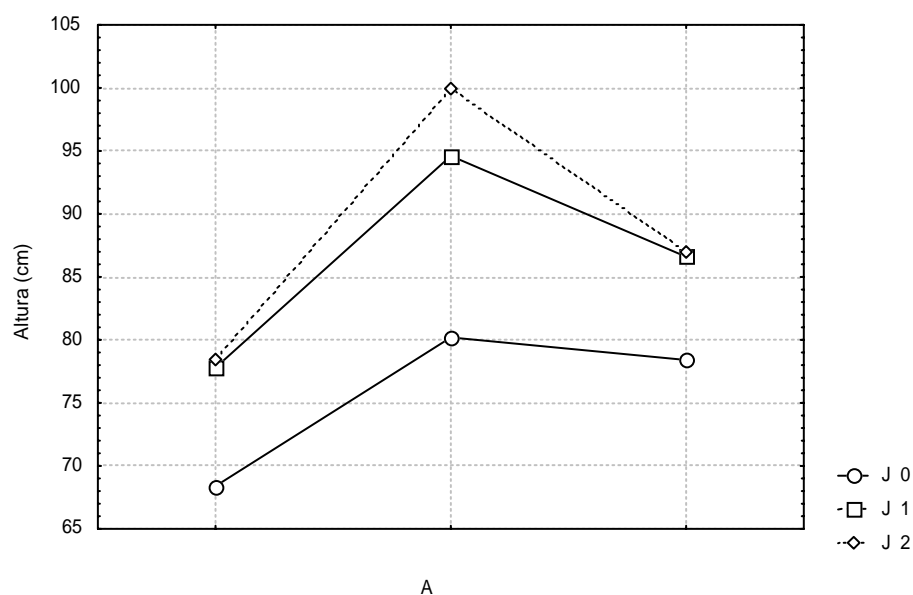


Figura 11. Altura média dos tratamentos na coleta do *Eucalyptus urophylla*

Correlacionando com o teor de lignina, não necessariamente o aumento no teor de lignina equivale a uma maior altura, pois, J2A1 (100 cm) com teor de lignina 21,25 % e J1A1 (94,60 cm) com teor de lignina de 42,45 % apresentam teores de ligninas totalmente opostas. A altura quando em tratamentos conjugados com A1, J1A1 e o J2A1 tiveram um crescimento maior em relação aos outros tratamentos tendo havido sinergismo com uma atuação maior do A1, pois quando J1 e o J2 estão combinados com o A2 a altura atinge o máximo em 87 cm (J2A1). A análise de variância consta em anexo.

4.3. Diâmetro do colo de mudas de *Eucalyptus urophylla*

Não houve diferença significativa entre as médias de todos os tratamentos ao nível de 5 % de significância pelo teste de Tukey.

Os tratamentos conjugados tiveram um aumento no diâmetro, não se demonstrando uma tendência significativa em relação aos tratamentos simples (J1, J2, A1 e A2) conforme Tabela 5. Na análise de variância, em anexo, dos tratamentos simples com AJ e o 2,4-D foram significativos a 5 % de probabilidade.

Tabela 5. Comparações múltiplas entre as médias do diâmetro em cm

		2,4-D		
		0	A1	A2
AJ	0	0,83	0,85	0,84
	J1	0,86	0,94	0,94
	J2	0,84	0,96	0,91

Nota: 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético), A1 (1ª concentração de 2,4-D: 18,12µM), A2 (2ª concentração de 2,4-D: 36,24µM), AJ (ácido jasmônico), J1 (1ª concentração de AJ: 1µM), J2 (2ª concentração de AJ: 2µM).

4.4. Diâmetro da fibra

Na Tabela 6 pode-se observar que o 2,4-D aplicado de forma simples nas suas duas concentrações (A1 e A2) apresentou comportamento similar estatisticamente. O J1 diminuiu o diâmetro da fibra, enquanto o J2 aumentou em relação ao J1, e também em relação à testemunha (H₂O).

Os tratamentos conjugados J1A1 e J1A2 tiveram diferença ao nível de 5 % de significância, o mesmo não acontecendo comparando J2A1 e J2A2. Observando a Figura 12 pode notar que o J1A1 foi o que apresentou maior diâmetro de fibra e logo depois o J1A2, os outros tratamentos foram menores que a testemunha (H₂O).

Tabela 6. Comparações múltiplas entre as médias do diâmetro da fibra em μm

		2,4-D		
		0	A1	A2
AJ	0	16,98aA	15,47aA	15,46aA
	J1	13,44aB	18,68bB	18,19bB
	J2	16,48aA	15,55aA	16,47aBC

Nota: letras minúsculas distintas mostram as diferenças significativas para o teste de Tukey entre linhas e letras maiúsculas entre colunas, a 5% de probabilidade; 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético), A1 (1ª concentração de 2,4-D: 18,12 μM), A2 (2ª concentração de 2,4-D: 36,24 μM), AJ (ácido jasmônico), J1 (1ª concentração de AJ : 1 μM), J2 (2ª concentração de AJ : 2 μM).

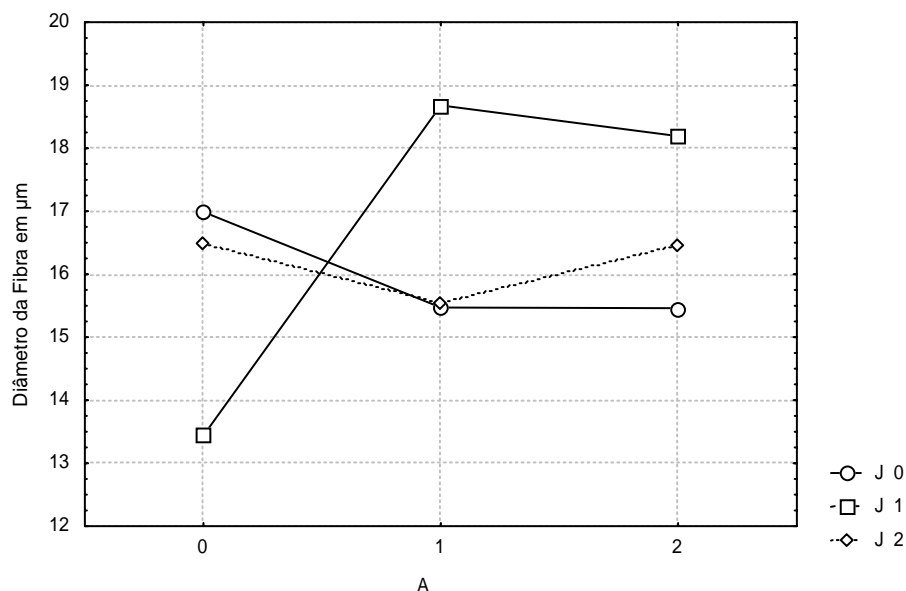


Figura 12. Médias do diâmetro de fibra em *Eucalyptus urophylla*

4.5. Lúmen de fibra

Na Tabela 7 observa-se que os tratamentos H₂O, A1 e o A2 não diferem estatisticamente em nível de 5 % de significância. O J1 que tem a menor concentração de ácido jasmônico apresentaram diferença significativa em relação aos tratamentos que envolvem AJ com o 2,4-D que são J1A1 e J1A2. Aumentando a concentração de AJ para todos os tratamentos que utilizam esta concentração (J2, J2A1 e J2A2) não há diferença significativa.

O tratamento com maior lúmen é o J1A1 e o de menor é o J1, constando que houve sinergismo da primeira concentração de AJ com a primeira concentração do 2,4-D, com maior influência deste último. Na Figura 13 pode-se observar o efeito sinérgico do 2,4-D e o AJ.

Tabela 7. Lúmen da fibra de *Eucalyptus urophylla* em μm

		2,4-D		
		0	A1	A2
AJ	0	10,78 aA	10,19 aA	8,97 aA
	J1	8,49 aB	13,24 bB	12,44 bB
	J2	9,90 aBA	9,66 aA	10,38 aB

Nota: letras minúsculas distintas mostram as diferenças significativas para o teste de Tukey entre linhas e letras maiúsculas entre colunas, a 5% de probabilidade; 2,4-D (2,4-diclorofenoxyacético), A1 (1ª concentração de 2,4-D: 18,12 μM), A2 (2ª concentração de 2,4-D: 36,24 μM), AJ (ácido jasmônico), J1 (1ª concentração de AJ: 1 μM), J2 (2ª concentração de AJ: 2 μM).

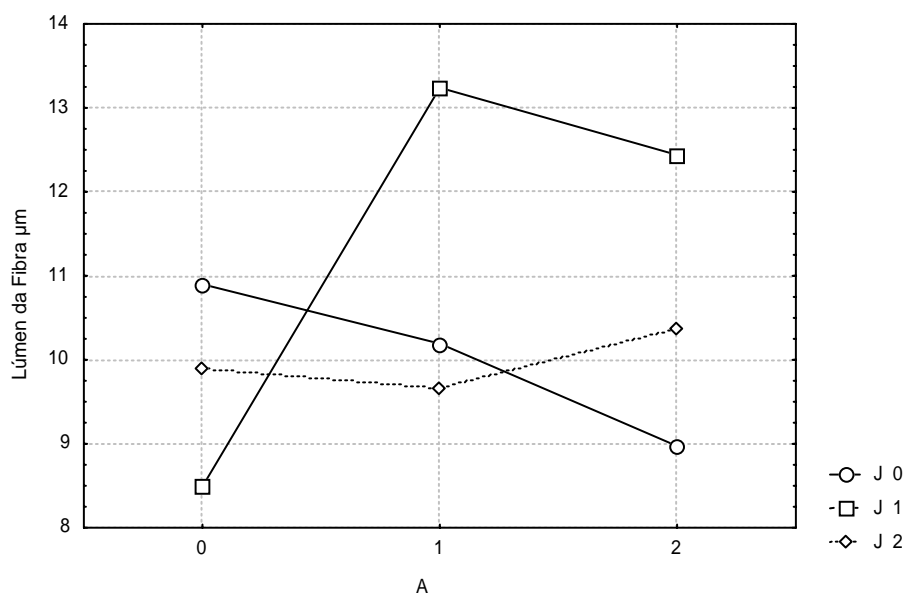


Figura 13. Médias do lúmen da fibra em *Eucalyptus urophylla* em μm

4.6. Comprimento da fibra

A Tabela 8 relacionada com o comprimento da fibra demonstra que a testemunha (H₂O) apresentou o maior comprimento de fibra com 668,37 μm. Todos os tratamentos tiveram uma resposta em relação a aplicação dos reguladores de crescimento (2,4-D e AJ) diminuindo o comprimento das fibras.

Tabela 8. Comprimento da fibra do *Eucalyptus urophylla* em μm

		2,4-D		
		0	A1	A2
AJ	0	668,37 aA	595,36 aA	604,71 aAB
	J1	537,82 aB	539,82aAB	550,05 aA
	J2	536,55 aB	497,69 aB	642,35 bB

Nota: letras minúsculas distintas mostram as diferenças significativas para o teste de Tukey entre linhas e letras maiúsculas entre colunas, a 5% de probabilidade; 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético), A1 (1ª concentração de 2,4-D: 18,12μM), A2 (2ª concentração de 2,4-D: 36,24μM), AJ (ácido jasmônico), J1 (1ª concentração de AJ: 1μM), J2 (2ª concentração de AJ: 2μM).

O tratamento A1 e A2 não diferiram significativamente ao nível de 5% de significância em relação a H₂O, apesar de terem diminuído o comprimento de fibra. J1 e J2 diferiram significativamente da H₂O, e tiveram uma diminuição maior do que os tratamentos simples de 2,4-D. Nos tratamentos conjugados o que obteve a maior diminuição foi J2A1 e o que registrou menor diferença em relação a H₂O foi J2A2.

O ácido jasmônico na sua primeira concentração (J1) foi estatisticamente igual ao J1A1 e o J1A2. Na segunda concentração (J2) foi estatisticamente igual ao J2A1 e diferiu do J2A2.

De acordo com a Figura 14 pode-se observar melhor as interações entre os reguladores de crescimento.

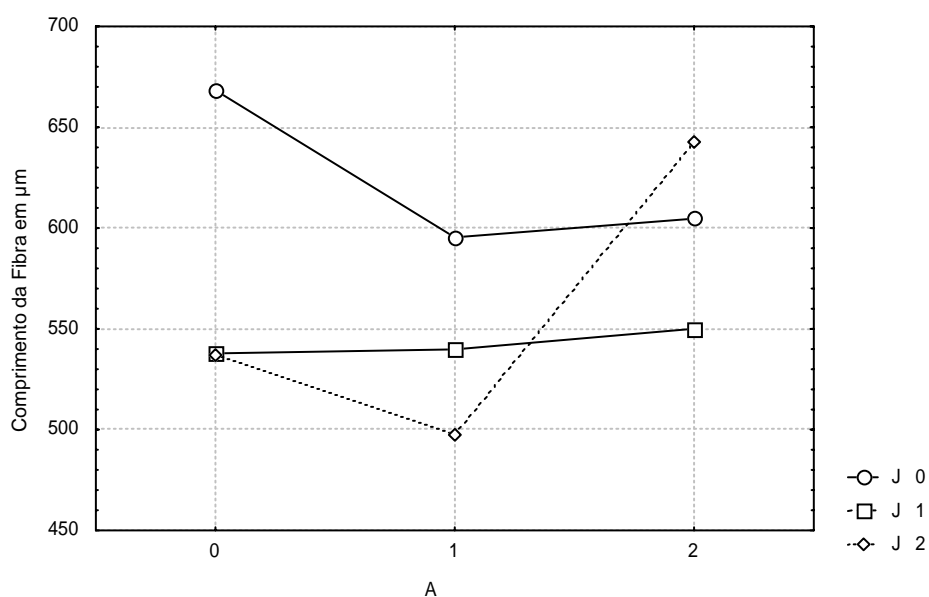


Figura 14. Médias do comprimento da fibra em *Eucalyptus urophylla*

4.7. Espessura da parede da fibra

De acordo com a Tabela 9 à espessura da parede da fibra não houve diferença significativa ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste Tukey.

O J1 apresentou menor valor (2,47 μm) e o J2 (3,29 μm) acima da H_2O (testemunha com 3,10 μm). Os reguladores de crescimento AJ e o 2,4-D contribuíram para que a maioria diminuísse a espessura da parede da fibra (Fig. 15). Exceto com os tratamentos com a segunda concentração do AJ e o 2,4-D (J2 e A2) que aumentaram a espessura da parede da fibra.

Tabela 9. Espessura da parede da fibra do *Eucalyptus urophylla* em μm

		2,4-D		
		0	A1	A2
AJ	0	3,10aA	2,64aA	3,24aA
	J1	2,47aB	2,72aA	2,87aA
	J2	3,29aA	2,94aA	3,04aA

Nota: letras minúsculas distintas mostram as diferenças significativas para o teste de Tukey entre linhas e letras maiúsculas entre colunas, a 5% de probabilidade; 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético), A1 (1ª concentração de 2,4-D : 18,12 μM), A2 (2ª concentração de 2,4-D : 36,24 μM), AJ (ácido jasmônico), J1 (1ª concentração de AJ : 1 μM), J2 (2ª concentração de AJ : 2 μM).

SHERIFF (1983) no seu trabalho com segmentos de caule isolado de *Pinus radiata* analisou o efeito do AIA no crescimento radial, diâmetro do lúmen de traqueídeo e espessamento da parede, havendo aumento no caule e diâmetro do lúmen com a concentração de AIA de 30 μm , enquanto que o espessamento da parede aumentou com níveis de AIA até 90 μm . Neste experimento, não houve aumento significativo na primeira concentração aplicada para o 2,4-D (auxina).

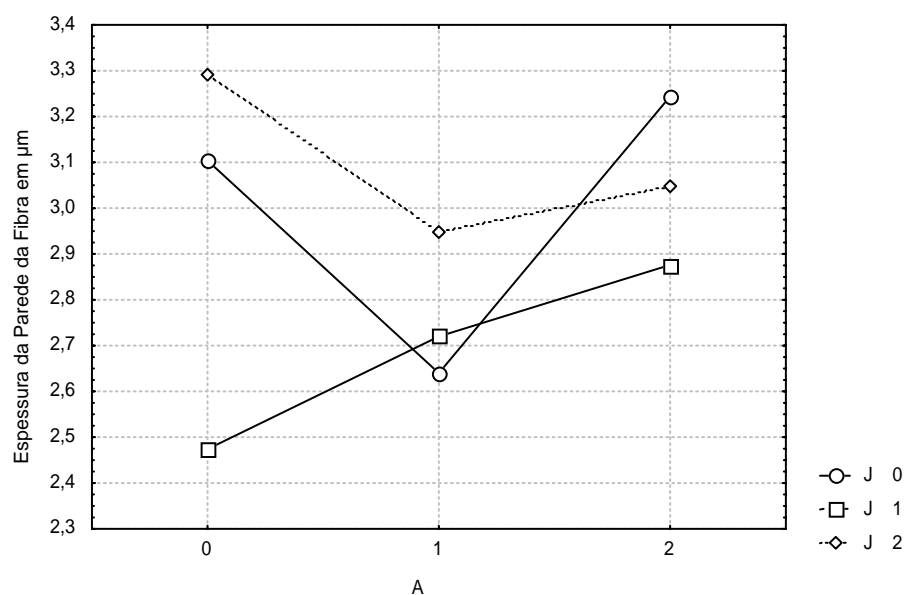


Figura 15. Médias da espessura da parede da fibra em *Eucalyptus urophylla*

4.8. Diâmetro de vaso de *Eucalyptus urophylla*

A Tabela 10 apresenta o teste de comparação entre as médias. Não houve diferença significativa entre os tratamentos H₂O, J1 e J2. O mesmo acontecendo com os tratamentos A2, J1A2 e J2A2.

Observa-se que o J2A1 foi o que apresentou menor diâmetro de vaso com valor de 48,37 µm, e o J1A1 o maior diâmetro com 59,19 µm. No tratamento conjugado J2A1 o 2,4-D prevaleceu, pois diminuiu o diâmetro, ocorrendo o oposto quando foi aplicado J1A1 com o predomínio do AJ no sinergismo.

Tabela 10. Diâmetro de vaso do *Eucalyptus urophylla* em µm

	2,4-D		
	0	A1	A2
AJ	0	55,11abA	49,68aA
	J1	50,79aA	59,19bB
	J2	54,83aA	48,37bA

Nota: letras minúsculas distintas mostram as diferenças significativas para o teste de Tukey entre linhas e letras maiúsculas entre colunas, a 5% de probabilidade; 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético), A1 (1ª concentração de 2,4-D: 18,12µM), A2 (2ª concentração de 2,4-D: 36,24µM), AJ (ácido jasmônico), J1 (1ª concentração de AJ: 1µM), J2 (2ª concentração de AJ: 2µM).

Na Figura 16 pode-se observar melhor as relações de diâmetro de vaso. A análise de variância está em anexo.

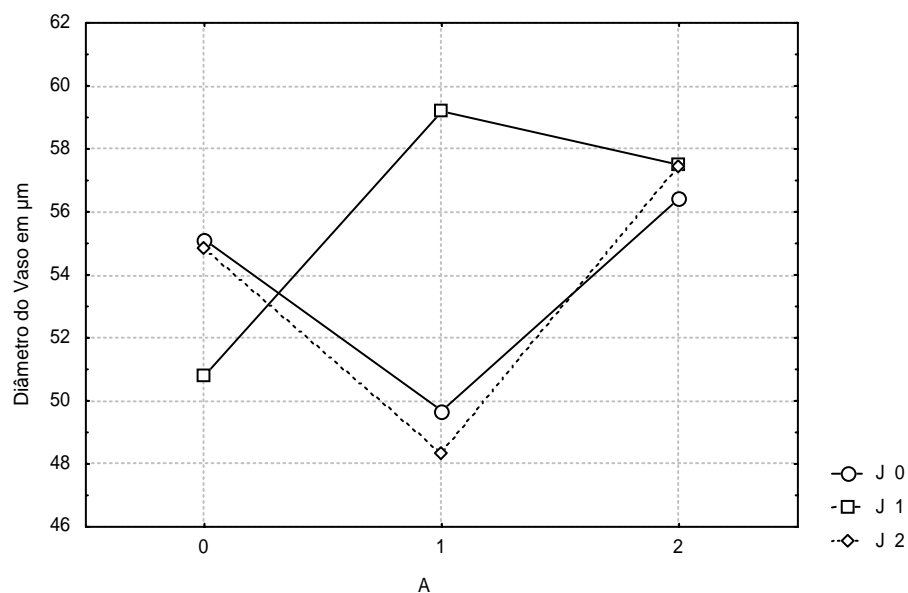


Figura 16. Médias do diâmetro de vaso em *Eucalyptus urophylla*

4.9. Espessura da parede de vaso de *Eucalyptus urophylla*

A Tabela 11 mostra que os dados que não tiveram diferença estatística ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste Tukey foram H₂O (testemunha), A1 e A2. Também o J1, J1A1 e J1A2 não tiveram diferença estatística.

A menor espessura foi no tratamento J2A2 e as maiores foram A2 (1,51 µm), J1A1 (1,50 µm) acima de 1,50 µm como mostrado na figura 17. Todos os tratamentos que receberam aplicação dos reguladores de crescimento AJ e do 2,4-D na sua forma simples tiveram sua espessura da parede do vaso aumentada. Na forma conjugada o único tratamento J2A2 teve a espessura da parede do vaso diminuída com valor de 1,16 µm.

Tabela 11. Espessura da parede do vaso de *Eucalyptus urophylla* em µm

		2,4-D		
		0	A1	A2
AJ	0	1,32 aA	1,49 Ba	1,51bA
	J1	1,38aA	1,50 Aa	1,47aA
	J2	1,41aA	1,32 Aa	1,16bB

Nota: letras minúsculas distintas mostram as diferenças significativas para o teste de Tukey entre linhas e letras maiúsculas entre colunas, a 5% de probabilidade; 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético), A1 (1ª concentração de 2,4-D: 18,12µM), A2 (2ª concentração de 2,4-D: 36,24µM), AJ (ácido jasmônico), J1 (1ª concentração de AJ: 1µM), J2 (2ª concentração de AJ: 2µM).

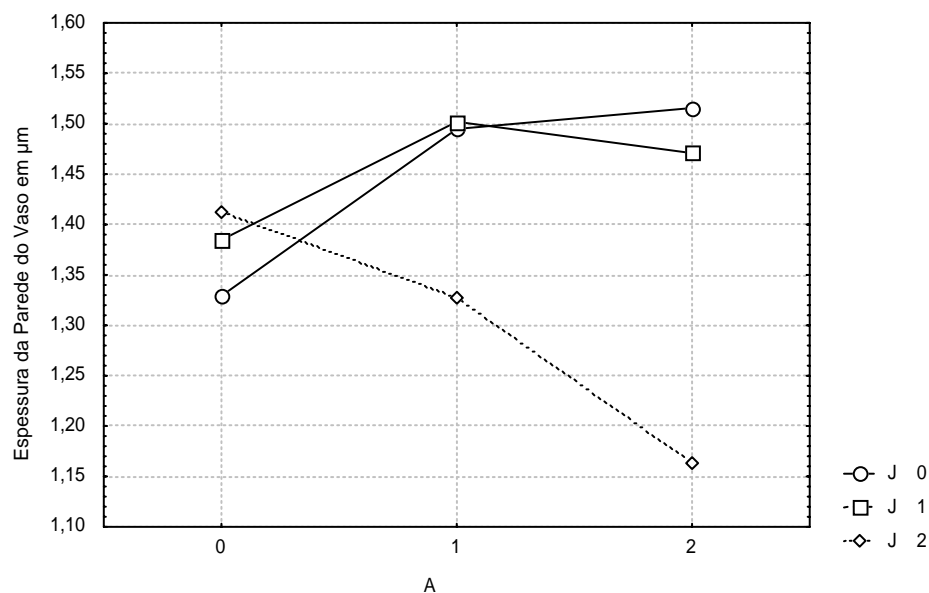


Figura 17. Médias da espessura da parede do vaso em *Eucalyptus urophylla*

4.10. Comprimento do vaso de *Eucalyptus urophylla* em µm

De acordo com a Tabela 12 a testemunha (H₂O) apresentou maior comprimento de vaso que foi de 438,16µm. Todos os outros tratamentos tiveram comprimento de vaso menor (Fig. 18).

Observa-se que o J2, J2A1 e J2A2 não diferiu-se estatisticamente. O mesmo não ocorrendo com J1, J1A1 e J1A2.

Quando compara-se A1, A2 e H₂O e J1, J2 com H₂O existe diferença estatística a nível de 5 % de significância pelo teste de Tukey.

Tabela 12. Comprimento do vaso de *Eucalyptus urophylla* em µm

		2,4-D		
		0	A1	A2
AJ	0	438,16 aA	349,28 Ba	338,72 bA
	J1	321,20 aB	361,00 aA	376,60 aA
	J2	301,20 aB	306,56 aA	341,88 aA

Nota: letras minúsculas distintas mostram as diferenças significativas para o teste de Tukey entre linhas e letras maiúsculas entre colunas, a 5% de probabilidade; 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético), A1 (1ª concentração de 2,4-D: 18,12µM), A2 (2ª concentração de 2,4-D: 36,24µM), AJ (ácido jasmônico), J1 (1ª concentração de AJ: 1µM), J2 (2ª concentração de AJ: 2µM).

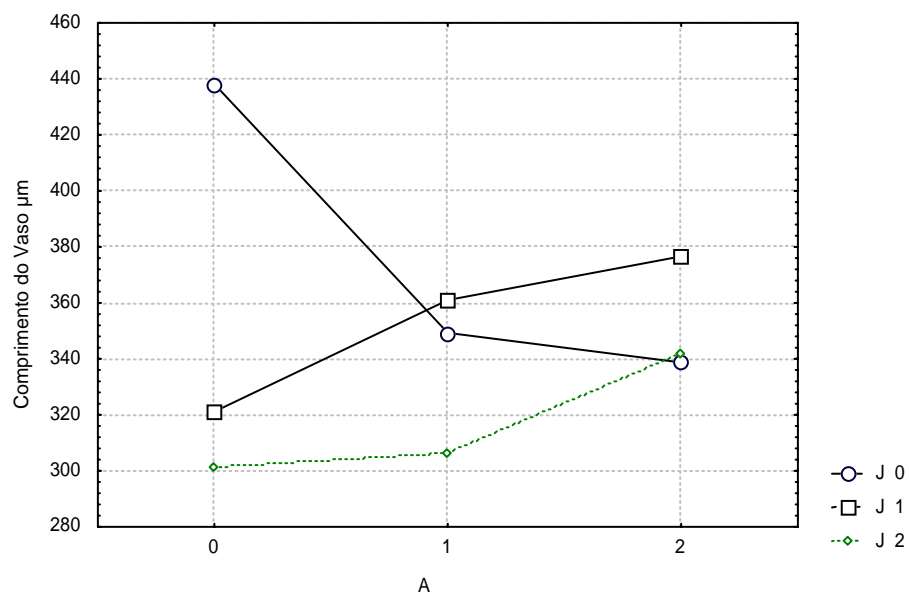


Figura 18. Médias do comprimento do vaso em *Eucalyptus urophylla*

4.11. Espectroscopia no Infravermelho

Os espectros no infravermelho de madeira livre de extrativos apresenta-se com sinais, mas largos devido a presença de celulose, hemicelulose e lignina. Para atribuir os sinais utilizou-se lignina de Björkman de *Galeziana gorzeana* como de modelo de comparação. As intensidades dos sinais foram determinadas com base no sinal 1500cm^{-1} , e a razão G/S pelos sinais 1300cm^{-1} e 1200cm^{-1} (Figura 19).

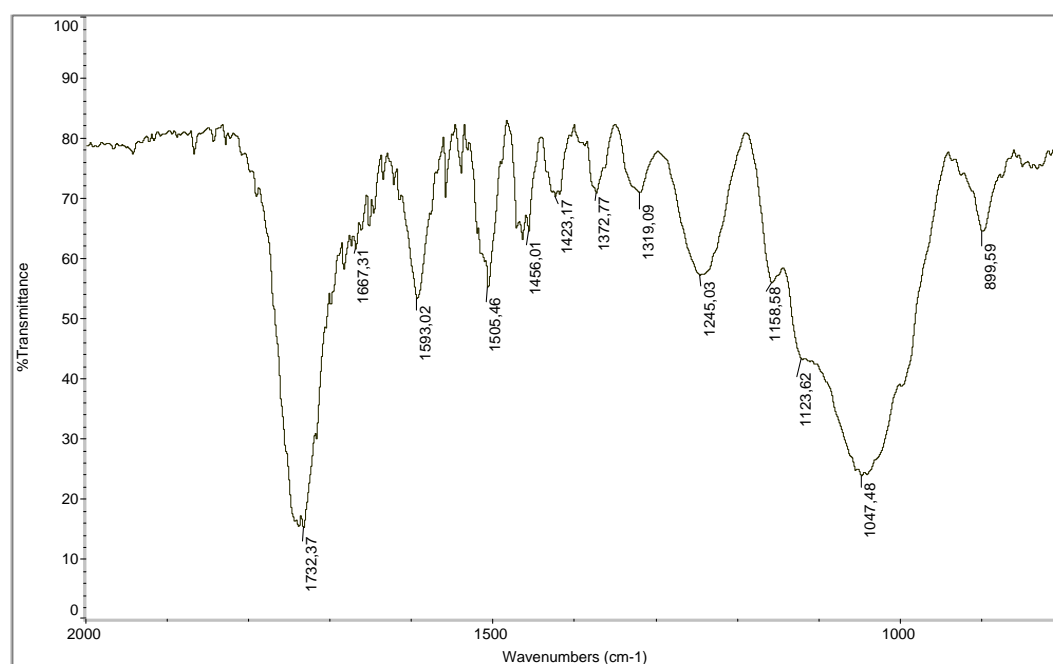


Figura 19. Espectro do *Eucalyptus urophylla* do tratamento J1 normalizado

Através da espectrometria no infravermelho pode-se empiricamente propor modificações composicionais ocorridas nas unidades guaiacilas e siringilas da lignina.

De acordo com os sinais $1505-1515\text{ cm}^{-1}$ (vibração do esqueleto aromático), $1266-1270\text{ cm}^{-1}$ (respiração do anel aromático guaiacílico) e $1325-1330\text{ cm}^{-1}$ (respiração do anel aromático siringílico) determinou-se a razão G/S, a porcentagem de unidade guaiacílica e unidades siringílicas de lignina de cada tratamento, conforme Figura 20.

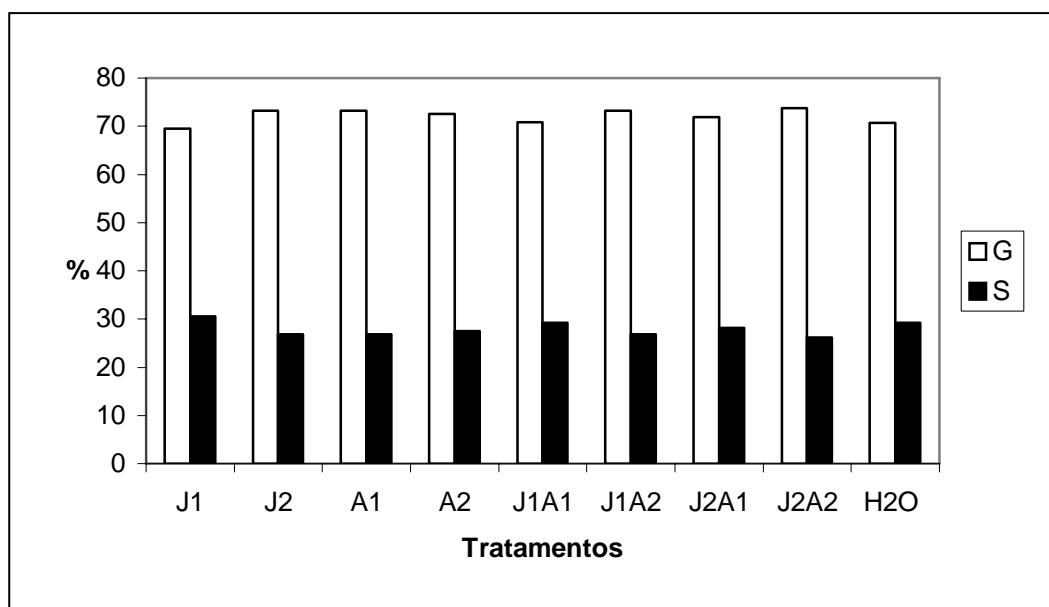


Figura 20. Composição da lignina por infravermelho do *Eucalyptus urophylla*

A composição da lignina não se alterou em nenhum tratamento por essa observação. Apenas foi constatado um leve aumento das unidades guaiacila em relação a siringila nos tratamentos: J2, A1, A2, J1A1, J1A2, J2A1 e J2A2. Sendo observado

→ → → →

pela Figura 20 que a relação G/S foi maior no J2A2 A2 J2 A1 J2A1 em ordem decrescente.

O tratamento com a primeira concentração de AJ (J1) ficou com relação menor em relação à testemunha (H₂O), ficando com a maior porcentagem de unidades siringílicas (30,56) comparando com os outros tratamentos. Dos tratamentos conjugados o J1A1 apresentou-se a menor relação G/S, apesar de um pouco acima da testemunha (H₂O), sugerindo que o efeito sinérgico dos dois reguladores de crescimento, o AJ e o 2,4-D, o AJ prevaleceu, não ocorrendo o mesmo com o J1A2. A estrutura da lignina dependendo de sua composição é mais ou menos rígida. Na Figura 21 está a composição da lignina correlacionando com o teor.

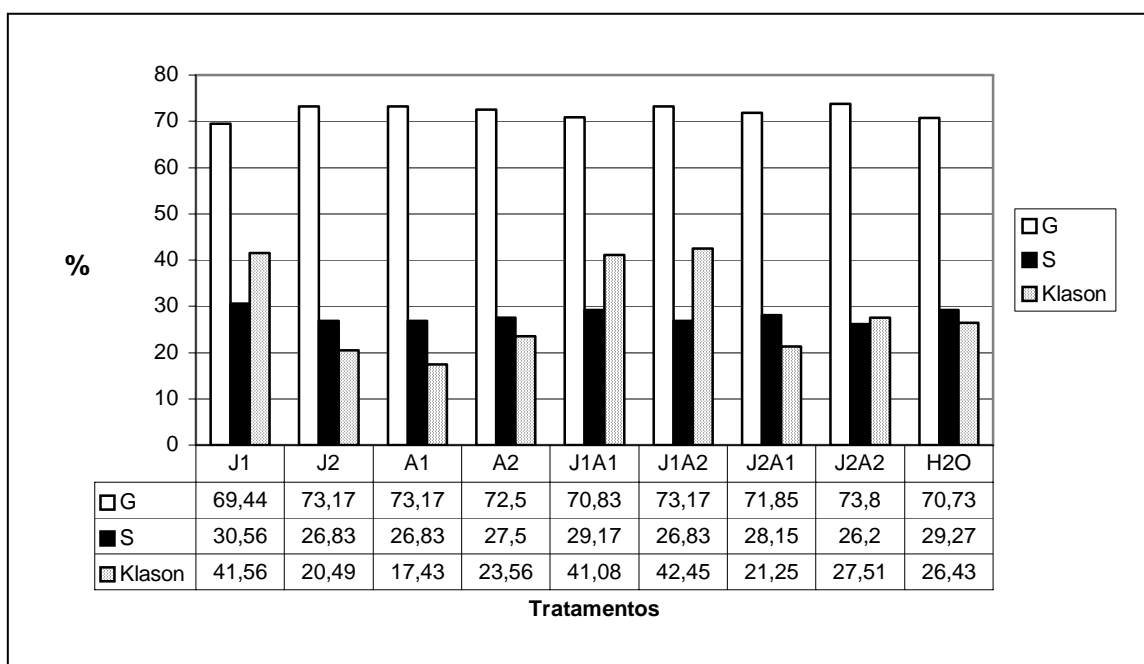


Figura 21. Correlação de teor de lignina com unidade guaiacila e siringila de *Eucalyptus urophylla*

4.12. Quantificação de proteína total

Por se tratar de um tecido jovem, sabendo-se que os tratamentos hormonais atuam na via protéica, conduziu-se esta análise. A maioria destas proteínas são ligadas na parede e provavelmente tem funções estruturais, embora elas participem da morfogênese (DAVIS, 2000). A natureza das proteínas na parede celular é variada como muitas das suas funções na planta.

A análise do teor protéico mostrou que os tratamentos J1 e J2 não diferenciou significativamente da H₂O (testemunha), mostrando que neste caso o ácido jasmônico não promoveu nenhuma ação que elevasse o teor de proteína (Fig. 22). Entretanto a presença de 2,4-D como pode ser visto nos tratamentos que o contem diminui a quantidade de proteína. O que mostra a retração à atividade protéica e provavelmente desativação da via metabólica fenilpropanoídica. Além disso, às proteínas detectadas (nitrogênio total) deve-se a unidade protéica na parede, e proteínas estruturais como as glicoproteínas.

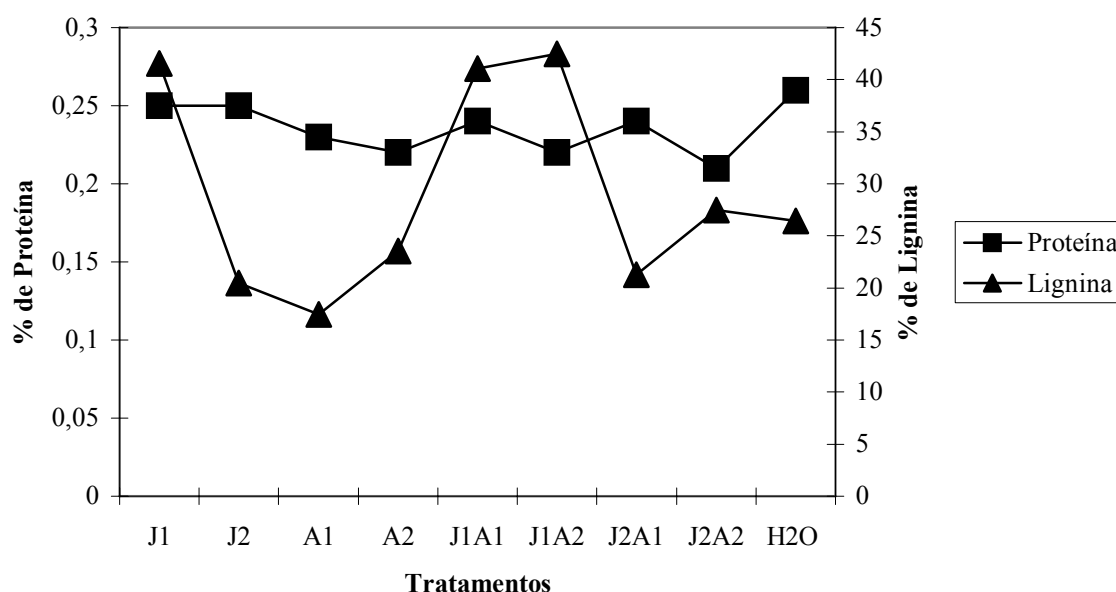


Figura 22. Correlação entre teor de proteína total e teor de lignina nos tratamentos

4.13. Dados globais envolvendo teor de lignina, medidas anatômicas e medidas do *Eucalyptus urophylla*

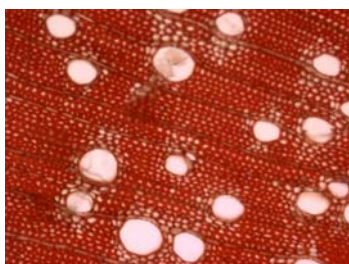
Tabela 13. Visão geral dos dados do teor de lignina, medidas anatômicas e medidas do *Eucalyptus urophylla*

Tratamentos	K	DF	EPF	LF	CF	DV	EPV	CV	A	D
J1	41,56	13,44	2,47	8,49	537,82	50,79	1,38	321,20	77,80	0,86
J2	20,49	16,48	3,29	9,90	536,55	54,83	1,41	301,20	78,40	0,84
A1	17,42	15,47	2,64	10,19	595,36	49,68	1,49	349,28	80,20	0,85
A2	23,55	15,46	3,24	8,97	604,71	56,42	1,51	338,72	78,40	0,84
J1A1	41,08	16,48	2,72	13,24	539,82	59,19	1,50	361,00	94,60	0,94
J1A2	42,45	18,19	2,87	12,44	550,05	57,49	1,47	376,60	86,60	0,94
J2A1	21,25	15,55	2,94	9,66	497,69	48,37	1,32	306,56	100,00	0,96
J2A2	27,51	16,47	3,04	10,38	642,35	57,45	1,16	341,88	87,00	0,91
H₂O	26,43	16,98	3,10	10,78	668,37	55,41	1,32	438,16	68,40	0,83

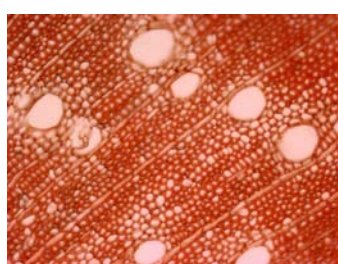
Nota: K (teor de lignina em %), DF (diâmetro da fibra em μm), EPF (espessura da parede da fibra em μm), LF (lúmen da fibra em μm), CF (comprimento da fibra em μm), DV (diâmetro do vaso em μm), EPV (espessura da parede do vaso em μm), CV (comprimento do vaso em μm), A (altura do *Eucalyptus urophylla* na coleta em cm) e D (diâmetro do *Eucalyptus urophylla* na coleta em cm).

4.14. Teste de Maüle no corte transversal do *Eucalyptus urophylla*

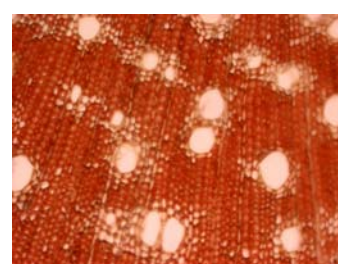
De acordo com o teste anatômico de Maüle os tratamentos não apresentaram diferenças no tipo de lignina. Como pode-se observar na Figura 24.



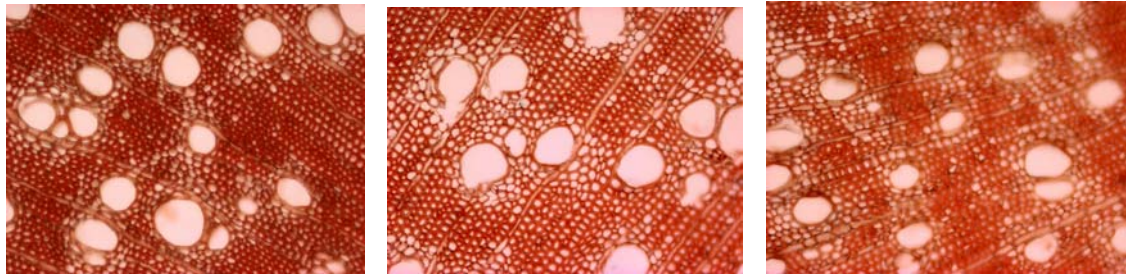
J1



J2



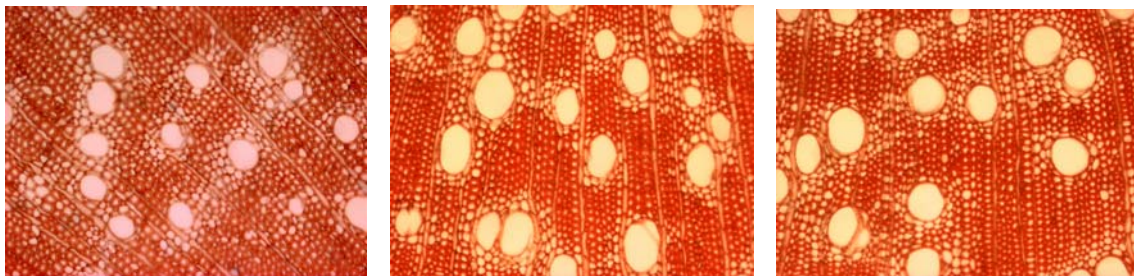
A1



A2

J1A1

J1A2



J2A1

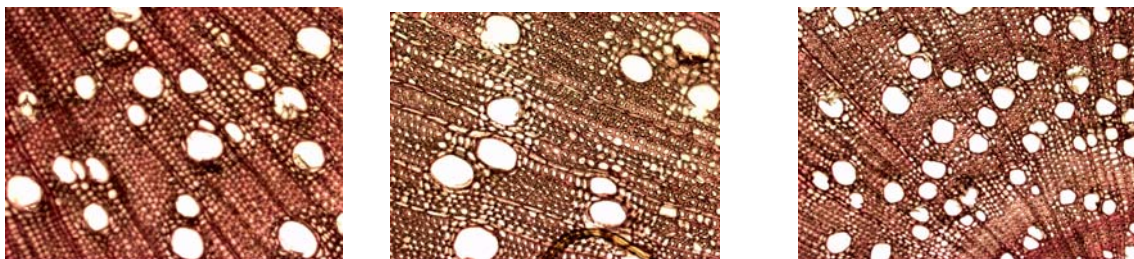
J2A2

H₂O

Figura 23. Tratamentos com teste de Maüle.

4.15. Teste de Wiesner no corte transversal do *Eucalyptus urophylla*

O teste Wiesner constatou a presença de lignina em todos os tratamentos. Na Figura 25 pode observar os testes.



J1

J2

A1

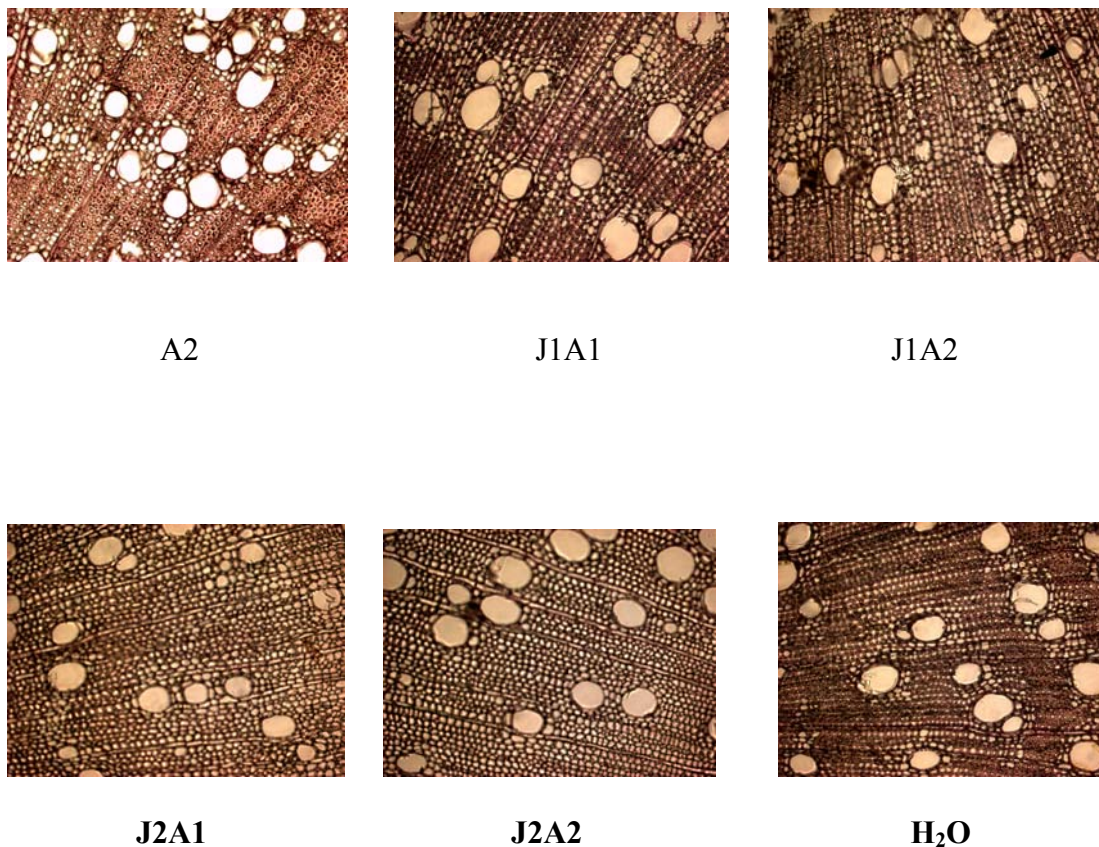


Figura 24. Teste de Wiesner nos diversos tratamentos

4.16. Teor de metoxila por RMN

Segundo Silva (2005) A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma das espectroscopias que mais cresce em números de usuários no Brasil. A espectroscopia de ressonância magnética nuclear no estado sólido, por meio das diferentes técnicas, é capaz de fornecer informações detalhadas a cerca dos componentes majoritários presentes em diferentes regiões de uma madeira específica, assim como sua dinâmica molecular.

Pelos espectros da RMN foram encontrados sinais referentes a composição da lignina (Fig. 63), indicando que estes não diferiram entre os tratamentos.

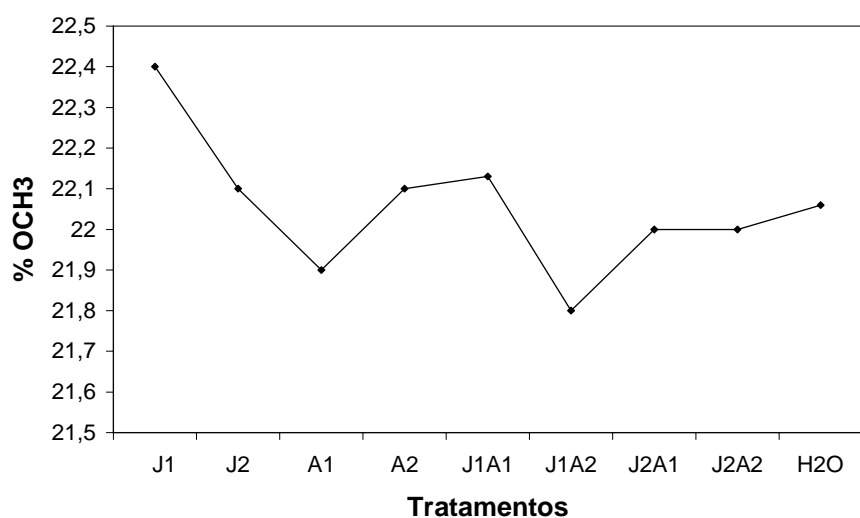


Figura 25. Teores de OCH3 nos diversos tratamentos

5. CONCLUSÕES

- O ácido jasmônico na concentração de 1 μm (J1) aumentou de forma significativa o teor de lignina, ativando o processo de formação da mesma; isso provavelmente deve-se a ativação principalmente da PAL durante a formação da lignina;
- Quando aplicado na sua segunda concentração 2 μm (J2) ele teve um efeito inibitório no processo de formação da lignina, resposta definida pela concentração para inibição da lignificação;

- Os tratamentos com 2,4-D (A1 e A2) tiveram uma resposta com teor de lignina reduzida, isto mostra que apesar da sua importância na eficiência na modulação da célula, nesta concentração apenas diminui a taxa de lignificação;
- Os tratamentos conjugados tiveram respostas diferentes, nos que tiveram a presença da primeira concentração de AJ o J1, a formação da lignina foi ativada, que foram o J1A1 e o J1A2. Quando conjugado o 2,4-D com a segunda concentração do AJ, o J2A1 ficou com teor de lignina abaixo da testemunha (H₂O) e o J2A2 com o teor acima da testemunha;
- A composição da lignina não foi significativamente alterada nas suas unidades guaiacilas. O único tratamento que atenuou foi o J1 que ficou com a relação G/S menor do que a testemunha (H₂O). Isto leva-nos a propor que qualquer um destes tratamentos não afetou a fase do primeiro estágio de formação da lignina dentro do compartimento citoplasmático; e
- Sobre este aspecto poderia o ácido jasmônico e o 2,4-diclorofenoxiacético ativar e restringir a fase de polimerização da lignina.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação de reguladores de crescimento em plantas no viveiro pode aumentar sua resistência fisiológica e sua relação com o ambiente. O entendimento do papel desempenhado pelos hormônios naturais ou hormônios sintéticos, os chamados reguladores de crescimento, abre uma nova perspectiva na melhora da qualidade da madeira, visto que estes podem controlar a taxa e periodicidade no crescimento radial e longitudinal em espécies madeireiras.

Para que isto cada vez mais se torne realidade tem-se a necessidade de pesquisas no sentido de se obter informações do mecanismo e modo de ação de todos os hormônios com bioatividade em cada componente no processo envolvendo a diferenciação e divisão celular associado com o câmbio e o meristema apical.

A interação da fisiologia e bioquímica de hormônios em plantas lenhosas com a biologia molecular oferece oportunidade para o esclarecimento dos mecanismos no controle do crescimento radial e longitudinal da planta.

O conhecimento do processo de formação da lignina ainda requer muitas pesquisas de natureza teórica e experimental, principalmente relacionando a lignificação com a qualidade do produto final nos diversos segmentos do setor florestal. O controle e a modulação da biossíntese da lignificação pode-nos oferecer um avanço tecnológico.

7.REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABREU, H. S., NASCIMENTO, A. M. & MARIA, M. A. Lignin and structure, **Wood and Fiber**, V.31, pp. 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.

ALONI, R. The induction of vascular tissue by auxin and cytokinin. In **Plant Hormones and Their role in Plant growth development**, 2nd ed., P. J. Davies, ed., kluwer, dordrecht, Netherlands, pp. 531-546, 1995.

BALDWIN, I. Jasmonate-induced responses are costly but benefit plants under attack in native populations. **Proceedings National Academy Science of USA**, V.95, pp.8113-8118, 1998.

BODDEY, R. M. ; CHALK, P. M.; VICTORIA, R. L.; MATSUI, E. & DBBEREINER, J. The use of the ^{15}N isotope dilution technique to estimate the contribution of associated biological nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of *Paspalum notatum* cv Batatais. **Can. J. Microbiol**, V.29, p.1036, 1983.

BOSTOCK RM Signal conflicts and synergies in induced resistance to multiple attackers. **Physiol Mol Plant Pathol**, V.55, pp.99–109,1999.

BRENNER, M. L.; WOLLEY, D. J.; SJUT, V.; SALERNO, D. Analysis of apical dominance in relation to IAA transport. Symposium Mechanism of rest and dormancy. **HortScience**, V.22, pp. 833-835, 1987.

BROWNING, B. L. **Methods of wood chemistry**. Interscience Publishers. New York, London, v.1, p. 75-89, 1967.

CHOINOWSKI, T., BLODIG, W., WINTERHALTER, K. H., PIONTEK, K. The crystal structure of lignin peroxidase at 170 Å resolution reveals a hydroxy group on the C $^{\beta}$ of tryptophan 171: A nonel radical site formed during the redox cycle. **J Mol Biol**, V.286, pp. 809-827, 1999.

COHEN Y, GYSI U, NIDERMAN T. Local and systemic protection against *Phytophthora infestans* induced in potato and tomato plants by jasmonic acid and jasmonic methyl ester. **Phytopathology**, V.83, 1993.

COSGROVE, D. J. Expansive growth of plant cell walls. **Plant Physiol Biochem**, V.38, pp.109-124, 2000.

CREELMAN, R.A., AND MULLET, J.E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol**. V.48, pp.355-381, 1997.

CREELMAN, R.A., TIERNEY, M. L., MULLET, J.E. Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulated in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. **Proceedings National Academy Science of USA**, V.89, pp.4938-4941, 1992.

CROSS, J. W. Auxin action: the search for the receptor. **Plant Cell Environment**, V.8, pp. 351-359, 1985

DAVIES, P. J. The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions. In: DAVIES, P. J. (Ed.) **Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**. 2.ed. Estados Unidos, Kluwer Academic Publishers, Cap.1, p.1-12, 1995.

DAVIN, L., B. & LEWIS, N. G. Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis, **Plant Physiol**. V.123, pp.453-462, 2000.

DeGROOTE D. K. & LARSON, P. R.. Correlations between net auxin and secondary xylem development in young *Populus deltoids*. **Physiologia Plantarum**. V.60, n.4, 459-465, 1984.

DOARES SH, NARVAEZ-VASQUEZ J, COCONI A, RYAN CA Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. **Plant Physiol**, V.108, pp.1741-1746,1995.

ECKER, J.R., AND DAVIS, R.W. Plant defense genes are regulated by ethylene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, V.84, pp.5202-5206, 1987.

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

EPPLE, P., APEL, K., AND BOHLMANN, H. An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. **Plant Physiol**. V.109, pp.813-820, 1995.

FALKENSTEIN, E., GROTH, B., MITHÖFER, A., WEILER, E, E. W. Methyl-jasmonate and linolenic acid are potent inducers of tendril coiling. **Planta**, V.185, pp.316-322, 1991.

FARMER EE, RYAN CA. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. **The Plant Cell**, V.4, pp.129–134, 1992.

FRANCESCHI, V.R., AND GRIMES, H.D. Induction of soybean vegetative storage proteins and anthocyanins by low-level atmospheric methyl jasmonate. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** , V.88, pp.6745–6749, 1991.

GALVÃO, A. P. **Reflorestamento de Propriedades Rurais para fins Produtivos e Ambientais**. 1ª ed. Colombo, EMBRAPA Floresta, 351p. , 2000.

GLAZEBROOK J Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*: 2001 status. **Curr Opin Plant Biol**, V.4, pp.301–308, 2001.

GODA, H.; SAWA, S.; ASAMI T.; FUJIOKA S.; SHIMADA, Y & YOSHIDA, S. Comprehensive Comparison of Auxin-Regulated and Brassinosteroid-Regulated Genes in *Arabidopsis*. **Plant Physiology Preview**, V.10, pp.1104-1110, 2004.

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

GOTTLIEB, R.; BORIN, M.R.D.M.B. & KAPLAN, M.A .C. Biosynthetic interdependence of lignins and secondary metabolites in Angiosperms. **Phytochemistry**, V.40, pp. 99-113, 1995.

GROSSMANN, K. Mediation of herbicide effects by hormone interactions. **J. Plant Growth Regul**, V.22, pp.109-122, 2003.

GUNDLACH, H., MÜLLER, M.J., KUTCHAN, T.M., AND ZENK, M.H. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, V.89, pp.2389-2393, 1992.

HIGUCHI, T. **Biochemistry and molecular biology of wood**. Springer, 506p., 1997.

HINOJOSA, G. F. Conceito de Hormônio. In: CID L. P. B. (editor). **Introdução aos Hormônios Vegetais**. 1^a ed. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Cap. 1, p. 15-53, 2000.

JACOBS WP Functions of hormones at tissue level of organization. In TK Scott, eds, **Hormonal Regulation of Development**. II. The Function of Hormones from the Level of the Cell to the Whole Plant, Encyclopedia of Plant Physiology (New Series), Vol 2. Springer-Verlag, Berlin, pp 149-171, 1984.

JOHANSSON, M.B. Decomposition rates of Scots pine needle litter related to site properties, litter quality, and climate. **Canadian Journal of Forest Research**, V.24, n.9, pp.1771-1781, 1994.

KAVALIER, A. **The effects of methyl jasmonate on the anthocyanin content and growth rates of the Wisconsin fast plants *Brassica rapa***. Research performed at the College of Charleston, 2000.

KIJIDANI, Y.; WU, Z. and SAVIDGE, R. A. New insight into phytohormone regulation of wood formation in conifers. **Phytomorphology Golden Jubilee Issue**, pp. 185-200, 2001.

KUNKEL BN, BROOKS DM Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. **Curr Opin Plant Biol**, V.5, pp.325–331, 2002.

KYTAYAMA, K., SUZUKI, S., HORI, M., TAKYU, M., AIBA, S.I., MALAJALAP-LEE, N., KIKUZAWA, K. On the relationships between leaf-litter lignin and net primary productivity in tropical rain forests. **O ecologia**, V.140, pp.335-339, 2004.

LARROQUE, C. M. & PLANCHON C. L. Lignification and physiological factors of yield in maize. **Published in Crop Sci**, V.30, pp.1105-1109, 1990.

LEWIS, N. G. & SARKANEN, S.. **Lignin and lignan biosynthesis**, American Chemical Society. Washington, DC, 436 p., 1998.

LIN, S. Y. & DANCE, C. W. **Methods in lignin chemistry**, Springer, Berlin Heidelberg New York, 1992.

LITTLE, C. H. A.; MACDONALD, J. E.; AND OLSSON, O. Involvement of Indole-3-Acetic Acid in Fascicular and Interfascicular Cambial Growth and Interfascicular Extraxylary Fiber Differentiation in *Arabidopsis thaliana* Inflorescence Stems. **International Journal of Plant Sciences**, V.163, pp. 519–529, 2002.

LITTLE, C. H. A, PHARIS R. P. Hormonal control of radial and longitudinal growth in the tree stem. In B Gartner, ed, **Plant Stems: Physiology and Functional Morphology**. Academic Press, San Diego, pp. 281-319, 1995.

LITTLE, C. H. A.; SAVIDGE, R. A. The role of plant growth regulators in forest tree cambial growth. **Plant Growth Regul**, V.6, pp. 137-169, 1987.

LJUNG, K.; BHALERAO, R & SANDBERG, G. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. **Plant J.**, n 29, p. 465-474, 2001.

LJUNG, K., HULL, A. K., KOWALCZYK, M., MARCHANT A., CELENZA, J. , COHEN, G., SANDBERG, G., Biosynthesis, conjugation catabolism and homeostasi of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Mol Biol**, V.49, pp. 249-272, 2002.

MICIC, M., ORBULESCU, J., RADOTIC, K., JEREMIC, .M., SUI, G., ZHENG, Y., LEBLANC, R. M. ZL-DHP lignin model compound at the air – water interface. **Biophysical Chemistry**, V.99, pp.55-62, 2002.

MONTIES, B. Molecular structure and biochemical properties of lignins in relation with possible self-organization of lignin networks. **Annales des Sciences Forestières**, V.46, pp.846-855, 1989.

MOYLE, R.; SCHRADER, J.; STENBERG A.; OLSSON, O.; SAXENA, S.; SANDBERG, G.; BHALERAO, R. Environmental and auxin regulation of wood formation involves members of the *Aux/IAA* gene family in hybrid aspen. **The Plant Journal**, V.31, pp.675-690, 2002.

MUDAY, G. K.; DELONG, A. Polar auxin transport: Controlling where and how much. **Trends Plant Sci**, V.6, pp.535–542, 2001.

MUELLER MJ. Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. **Physiologia Plantarum**, V.100, pp.653–663, 1997.

NAKASHIMA, J.; TATSUYA, A.; TAKABE, K.; FUJITA, M.; SAIKI, H. Immunocytochemical localization of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamyl alcohol dehydrogenase in differentiating tracheary elements derived from *Zinnia* mesophyll cells. **Plant Cell Physiology**, V.38, pp. 113-123, 1997.

NORTHCOTE, D. H. Control of plant cell wall biogenesis: an overview. **ACS Symp. Ser.** V.399, pp.1-15, 1989.

PENNINCKX, I.A.M.A., EGGERMONT, K., TERRAS, F.R.G., THOMMA, B.P.H.J., DE SAMBLANX, G.W., BUCHALA, A., MÉTRAUX, J.-P., MANNERS, J.M., AND BROEKAERT, W.F. Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. **Plant Cell**, V.8, pp.2309-2323, 1996

PIETERSE, C.M.J., VAN WEES, S.C.M., VAN PELT, J.A., KNOESTER, M., LAAN, R., GERRITS, H., WEISBEEK, P.J., AND VAN LOON, L.C. A novel signaling

pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. **Plant Cell**, V.10, pp.1571-1580,1998.

RALPH, J.; HATFIELD, R. D. A new frontier for plant modificacion. **Plant Chemistry**, pp.28 – 30, 1997.

RANOCHA, P.; CHABANES, M., CHAMAYOU, S., JAUNEAU, A.; BOUDET, A. M., GOFFNER, D. Laccasse Down-Regulation Causes Alterations in Phenolic Metabolism and cell wall structure in poplar. **Plant Physiology**, V.129, n.1, pp.145-155, 2002.

REYMOND P, WEBER H, DAMOND M, FARMER EE Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, V.12, pp.707–719, 2000.

ROGERS, L.A.; CAMPBELL, M. M. The genetic control of lignin deposition during plant growth and development. **New Phytologist**, V.164, n.1, pp.17-29, 2004.

SACHS, T. The controls of the patterned differentiation of vascular tissues. **Adv Bot Res**, V.9, pp.151-262, 1981.

SAVIDGE, R. A. The role of plant hormones in higher plant cellular differentiation. II. Experiments with the vascular cambium, and sclereid and tracheid differentiation in the pine, *Pinus contorta*. **Histochem J**, V.15, pp. 447-466, 1983.

SAVIDGE, R. Intrinsic regulation of cambial growth. **J. Plant Growth Regulation**, V.20, pp.52-77, 2001

SEMBDNER, G., AND PARTHIER, B. The biochemistry and the physiological molecular actions of jasmonates. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 44, 569–589, 1993.

SHERIFF, D. W. Control by indole-3-acetic acid of wood production in *Pinus radiata* Don segments in culture. **Aust J. Plant. Physiol.**, V.10, pp. 131-135, 1983.

SHOWALTER, A. M. Structure and function of plant cell wall proteins, **The Plant Cell**, n.5, pp.9-23. 1993.

SILVA, A. L. B. B. **Princípios Básicos de Ressonância Magnética Nuclear do Estado Sólido**. São Carlos, USP, 50p. 2005.

SUNDBERG, B., UGGLA, C. AND TUOMINEN, H. Cambial growth and auxin gradients. In: **Cell and Molecular Biology of Wood Formation** (Savidge, R.A. Barnett, J.R. and Napier, R. eds). Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers Ltd., 2000.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed., Porto alegre, Artmed, 719 p., 2004.

THOMMA BPHJ, PENNINCKX IAMA, BROEKAERT WF, CAMMUE BPA The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. **Curr Opin Immunol**, V.13, pp. 63–68, 2001.

UGGLA C, MORITZ T, SANDBERG G, SUNDBERG B Auxin as a positional signal in pattern formation in plants. **Proc Natl Acad Sci USA**, V.93, pp.9282-9286, 1996.

UGGLA, C.; MELLEROWICZ, E. J AND SUNDBERG, B. Indole-3-Acetic Acid Controls Cambial Growth in Scots Pine by Positional Signaling. **Plant Physiol**. V.117, pp.113-121, 1998.

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

VIEIRA, E. L., MONTEIRO, C. A. Hormônios Vegetais. In: CASTRO, P. R., SENA, J. O. A., KLUGE, R. A. (editores). **Introdução á Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal**. 1^a ed. Maringá, Eduem, Cap. VI, p. 79-104, 2002.

WEILER, E.W., ALBRECHT, T., GROTH, B., XIA, Z.-Q., LUXEM, M., LI, H., ANDERT, L., AND SPENGLER, P. Evidence for the involvement of jasmonates and their octadecanoid precursors in the tendril coiling response of *Bryonia doica*. **Phytochemistry**, V.32, pp.591–600, 1993.

WHETTEN, R.W., MACKAY, J.J. & SEDEROFF, R.R. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. **Annual Review of plant physiology and plant molecular biology**, V.49, pp. 585-609, 1998.

XU, Y., CHANG, P.F.L., LIU, D., NARASIMHAN, M.L., RAGHOTHAMA, K.G., HASEGAWA, P.M., AND BRESSAN, R.A. Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. **Plant Cell**, V.6, pp.1077-1085, 1994.

8.ANEXOS

8.1- Extrativos

Tabela 14. Extrativos de todos os tratamentos

	Ciclo Hexano	Acetato de etila	Metanol	H ₂ O	Σ
J1	0,38	0,77	1,82	4,12	7,09
J2	0,28	0,38	2,20	3,71	6,57
A1	0,34	0,378	3,21	3,09	7,02
A2	0,19	0,34	1,67	2,60	4,80
J1A1	0,48	0,48	1,67	4,14	6,77
J1A2	0,49	0,48	1,29	4,34	6,66
J2A1	0,31	0,28	1,68	3,47	5,74
J2A2	0,11	0,48	1,43	3,95	5,97
H ₂ O	0,25	0,40	2,83	4,20	7,68

8.2. Análise de Variância

Tabela 15. Análise de variância do teor de lignina do *Eucalyptus urophylla*

FV	GL	QM	NS
AJ	2	1074,932	0,000000*
2,4-D	2	48,521	0,000000*
AJ x 2,4-D	4	30,497	0,000000*
Resíduo	18	0,085252	-

*Existe diferença estatística significativa entre as médias em nível de 5% de probabilidade.

Tabela 16. Análise de variância da altura final do *Eucalyptus urophylla*

FV	GL	QM	NS
AJ	2	705,422	0,008389
2,4-D	2	1052,956	0,001184
AJ x 2,4-D	4	46,722	0,833505
Resíduo	216	128,8222	

*Existe diferença estatística significativa entre as médias em nível de 5% de probabilidade.

Tabela 17. Análise de variância do diâmetro do *Eucalyptus urophylla*

FV	GL	QM	NS
AJ	2	0,026587	0,019478*
2,4-D	2	0,021447	0,039114*
AJ x 2,4-D	4	0,004413	0,576884
Resíduo	216	0,006039	

*Existe diferença estatística significativa entre as médias em nível de 5% de probabilidade.

Tabela 18. Análise de variância do diâmetro da fibra do *Eucalyptus urophylla*

FV	GL	QM	NS
AJ	2	12,9470	0,199779
2,4-D	2	25,4940	0,042906*
AJ x 2,4-D	4	105,1766	0,000000*
Resíduo	216	7,979107	

*Existe diferença estatística significativa entre as médias em nível de 5% de probabilidade.

Tabela 19. Análise de variância do lúmen da fibra do *Eucalyptus urophylla*

FV	GL	QM	NS
AJ	2	49,70253	0,000349*
2,4-D	2	33,22333	0,004581*
AJ x 2,4-D	4	76,47086	0,000000*
Resíduo	216	6,016052	

*Existe diferença estatística significativa entre as médias em nível de 5% de probabilidade.

Tabela 20. Análise de variância do comprimento da fibra do *Eucalyptus urophylla*

FV	GL	QM	NS
AJ	2	134934,2	,000000*
2,4-D	2	58335,5	,000984*
AJ x 2,4-D	4	61164,9	,000011*
Resíduo	216	8157,676	

*Existe diferença estatística significativa entre as médias em nível de 5% de probabilidade.

Tabela 21. Análise de variância da espessura da parede da fibra do *Eucalyptus urophylla*

FV	GL	QM	NS
AJ	2	3,339078	,000395*
2,4-D	2	1,581344	,022760*
AJ x 2,4-D	4	1,359894	,011716*
Resíduo	216	,410761	

*Existe diferença estatística significativa entre as médias em nível de 5% de probabilidade.

Tabela 22. Análise de variância diâmetro do vaso do *Eucalyptus urophylla*

FV	GL	QM	NS
AJ	2	119,4647	0,104432
2,4-D	2	451,8637	0,000247*
AJ x 2,4-D	4	453,6435	0,000002*
Resíduo	216	52,32761	

*Existe diferença estatística significativa entre as médias em nível de 5% de probabilidade.

Tabela 23. Análise de variância da espessura da parede do vaso *Eucalyptus urophylla*

FV	GL	QM	NS
-----------	-----------	-----------	-----------

AJ	2	,553715	,000003*
2,4-D	2	,097315	,093506
AJ x 2,4-D	4	,330286	,000004*
Resíduo	216	,040617	

*Existe diferença estatística significativa entre as médias em nível de 5% de probabilidade.

Tabela 24. Análise de variância do comprimento do vaso *Eucalyptus urophylla*

FV	GL	QM	NS
AJ	2	66128,59	0,000006*
2,4-D	2	4932,86	0,388306
AJ x 2,4-D	4	51131,77	0,000000*
Resíduo	216	5191,844	

*Existe diferença estatística significativa entre as médias em nível de 5% de probabilidade.

8.3. Médias das medidas anatômicas das fibras e vaso

Tabela 25. Médias das medidas das fibras do *Eucalyptus urophylla* (μm)

Tratamentos	Comprimento	Diâmetro	Espessura da parede	Lúmen
J1	537,83	13,44	2,47	8,49
J2	536,55	16,48	3,29	9,90
A1	595,36	15,47	2,64	10,19
A2	604,71	15,46	3,24	8,97
J1A1	539,83	18,68	2,72	13,24
J1A2	550,06	18,19	2,88	12,44
J2A1	497,70	15,55	2,95	9,66
J2A2	642,35	16,47	3,05	10,38
H ₂ O	668,38	16,98	3,10	10,78

Tabela 26. Médias das medidas do vaso (μm)

Tratamentos	Comprimento	Diâmetro	Espessura da parede
J1	321,20	50,79	1,4
J2	301,20	54,83	1,4
A1	349,28	49,68	1,5
A2	338,72	56,42	1,5
J1A1	361,00	59,19	1,5
J1A2	376,60	57,49	1,5
J2A1	306,56	48,37	1,3
J2A2	341,88	57,45	1,2
H ₂ O	438,16	55,11	1,3

8.4. Média da altura e diâmetro do *Eucalyptus urophylla* em cm

Tabela 27. Médias das alturas e dos diâmetros (cm)

Tratamentos	Altura	Diâmetro
J1	77,80	0,86
J2	78,40	0,84
A1	80,20	0,85
A2	78,40	0,84
J1A1	94,60	0,94
J1A2	86,60	0,94
J2A1	100,00	0,96
J2A2	87,00	0,91
H ₂ O	68,40	0,83

8.5. Mínima, Média, Máxima e Desvio Padrão das Análises Anatômicas**Tabela 28.** Elementos de vaso do tratamento J1

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Comprimento	144,00	321,20	565,00	100,61
Diâmetro	35,40	50,80	64,60	7,52
Espessura de Parede	1,2	1,4	1,7	0,13

Tabela 29. Elementos de vaso do tratamento J2

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Comprimento	193,00	301,20	504,00	66,01
Diâmetro	43,40	54,80	71,70	7,32
Espessura de Parede	0,9	1,4	1,7	0,19

Tabela 30. Elementos de vaso do tratamento A1

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Comprimento	250,00	349,28	536,00	70,58
Diâmetro	40,40	49,70	62,60	6,51
Espessura de Parede	1,1	1,5	2,0	0,27

Tabela 31. Elementos de vaso do tratamento A2

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Comprimento	245,00	338,72	459,00	67,97
Diâmetro	41,40	56,40	69,70	7,58
Espessura de Parede	1,1	1,5	1,9	0,19

Tabela 32. Elementos de vaso do tratamento J1A1

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Comprimento	240,00	361,00	437,00	49,21

Diâmetro	43,40	59,20	73,70	7,53
Espessura de Parede	1,3	1,5	1,8	0,18

Tabela 33. Elementos de vaso do tratamento J1A2

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Comprimento	239,00	376,60	501,00	68,67
Diâmetro	43,40	57,50	72,70	7,69
Espessura de Parede	1,3	1,5	1,8	0,16

Tabela 34. Elementos de vaso do tratamento J2A1

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Comprimento	180,00	306,56	418,00	63,09
Diâmetro	38,40	48,40	60,60	6,27
Espessura de Parede	1,0	1,3	1,7	0,21

Tabela 35. Elementos de vaso do tratamento J2A2

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Comprimento	172,00	341,88	465,00	78,55
Diâmetro	46,50	57,50	68,70	5,73
Espessura de Parede	0,8	1,3	1,8	0,24

Tabela 36. Elementos de vaso do tratamento H₂O

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Comprimento	289,00	438,16	544,00	73,20
Diâmetro	42,40	55,10	80,80	8,55
Espessura de Parede	0,80	1,30	1,80	0,24

Tabela 37. Fibras do tratamento J1

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
--	--------	-------	--------	---------------

Diâmetro	8,50	13,44	20,00	2,94
Lúmen	4,50	8,49	13,00	2,38
Comprimento	392,35	537,83	708,83	79,55
Espessura de Parede	1,50	2,47	3,50	0,53

Tabela 38. Fibras do tratamento J2

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Diâmetro	11,00	16,48	21,00	2,95
Lúmen	6,00	9,90	15,00	2,15
Comprimento	419,43	536,55	704,30	82,36
Espessura de Parede	2,00	3,29	5,00	0,81

Tabela 39. Fibras do tratamento A1

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Diâmetro	10,00	15,47	21,00	2,54
Lúmen	6,00	10,19	14,00	2,51
Comprimento	426,49	595,36	722,63	77,82
Espessura de Parede	1,50	2,64	3,50	0,56

Tabela 40. Fibras do tratamento A2

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Diâmetro	10,00	15,46	21,00	2,91
Lúmen	5,00	8,97	16,00	2,42
Comprimento	471,49	604,71	819,37	85,21
Espessura de Parede	2,0	3,24	4,75	0,76

Tabela 41. Fibras do tratamento J1A1

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Diâmetro	13,00	18,68	24,30	2,52
Lúmen	9,00	13,24	19,00	2,39
Comprimento	360,49	539,83	672,61	77,61
Espessura de Parede	2,0	2,72	4,00	0,55

Tabela 42. Fibras do tratamento J1A2

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
--	--------	-------	--------	---------------

Diâmetro	13,00	18,19	27,00	3,37
Lúmen	8,0	12,44	21,00	3,16
Comprimento	100,06	550,06	771,69	149,82
Espessura de Parede	2,0	2,88	4,00	0,54

Tabela 43. Fibras do tratamento J2A1

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Diâmetro	11,00	15,56	21,00	2,44
Lúmen	5,0	9,66	15,00	2,30
Comprimento	354,06	497,70	646,36	71,78
Espessura de Parede	1,50	2,95	4,00	0,63

Tabela 44. Fibras do tratamento J2A2

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Diâmetro	11,00	16,47	22,00	2,81
Lúmen	6,00	10,38	14,00	2,26
Comprimento	499,88	642,35	780,16	68,33
Espessura de Parede	2,00	3,05	4,50	0,60

Tabela 45. Fibras do tratamento H₂O

	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Diâmetro	12,50	16,99	25,00	2,83
Lúmen	6,00	10,78	17,00	2,36
Comprimento	481,48	668,38	807,06	93,27
Espessura de Parede	2,00	3,10	4,50	0,71

8.6. Gráficos dos tratamentos simples

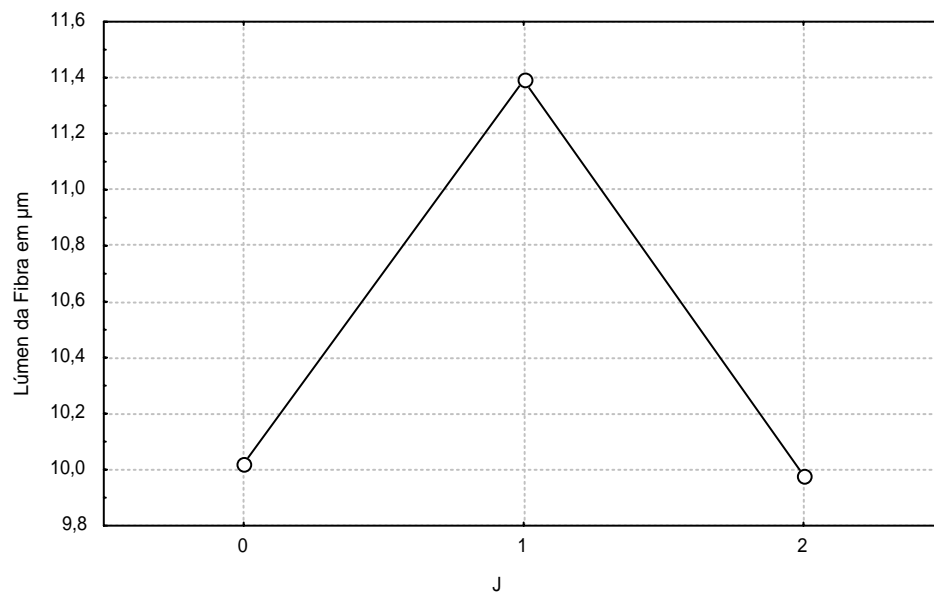


Figura 26. Médias do AJ do lúmen da fibra de *Eucalyptus urophylla*

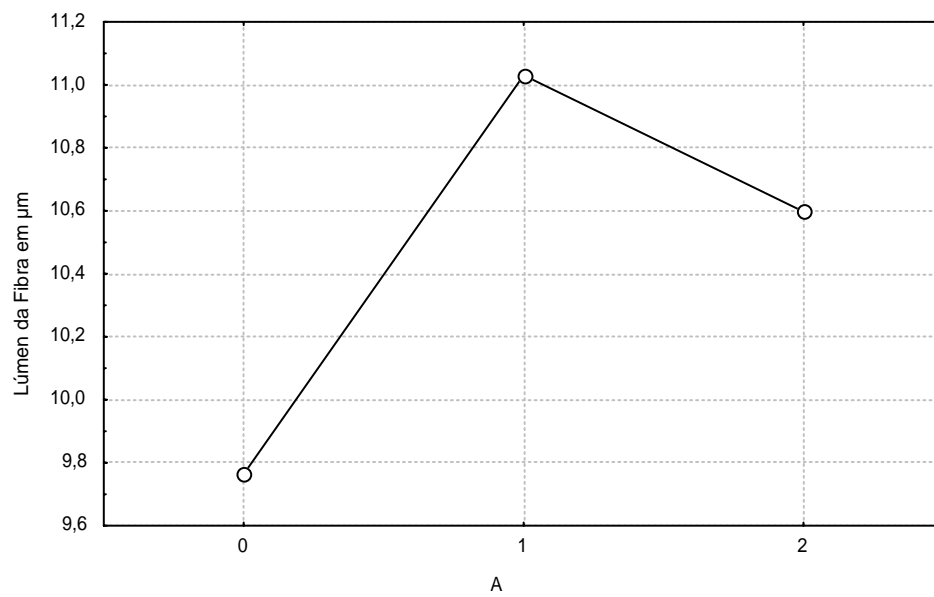


Figura 27. Médias do 2,4-D do lúmen da fibra de *Eucalyptus urophylla*

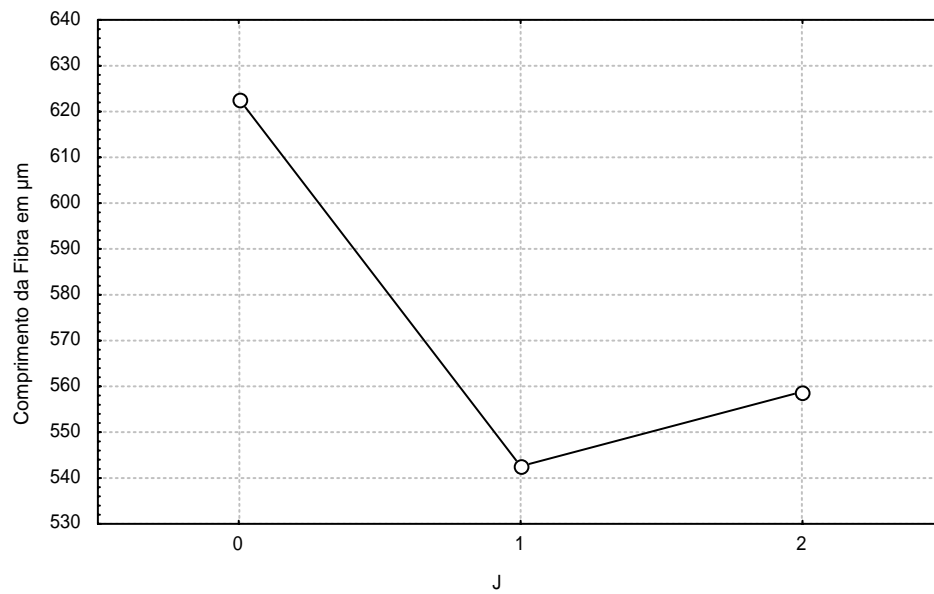


Figura 28. Médias do AJ do comprimento da fibra de *Eucalyptus urophylla*

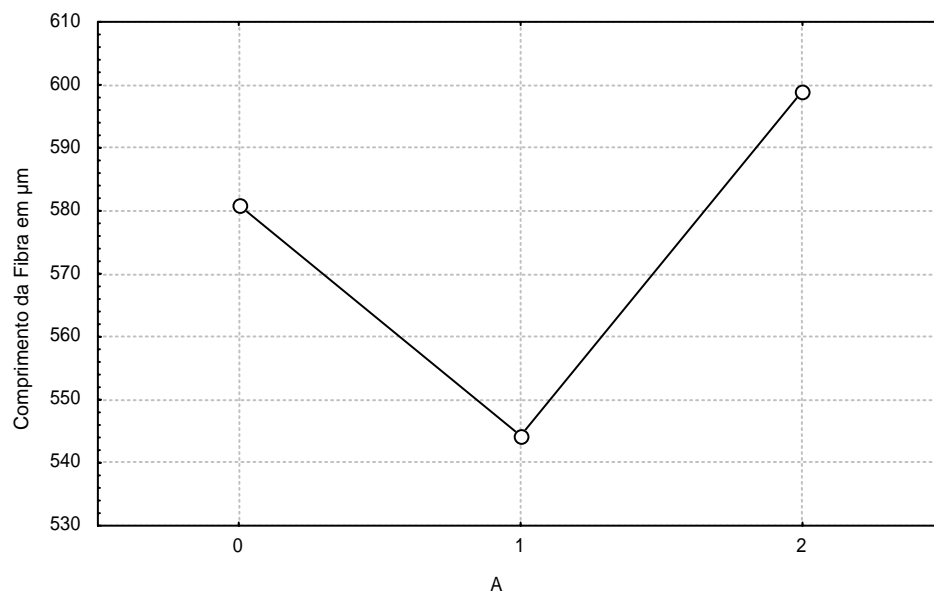


Figura 29. Médias do 2,4-D do comprimento da fibra de *Eucalyptus urophylla*

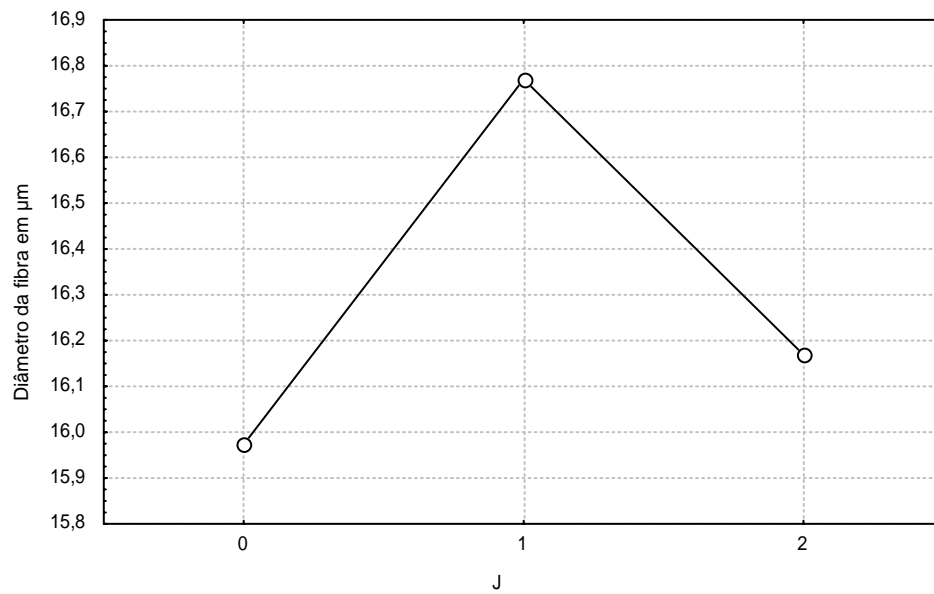


Figura 30. Médias do AJ do diâmetro da fibra de *Eucalyptus urophylla*

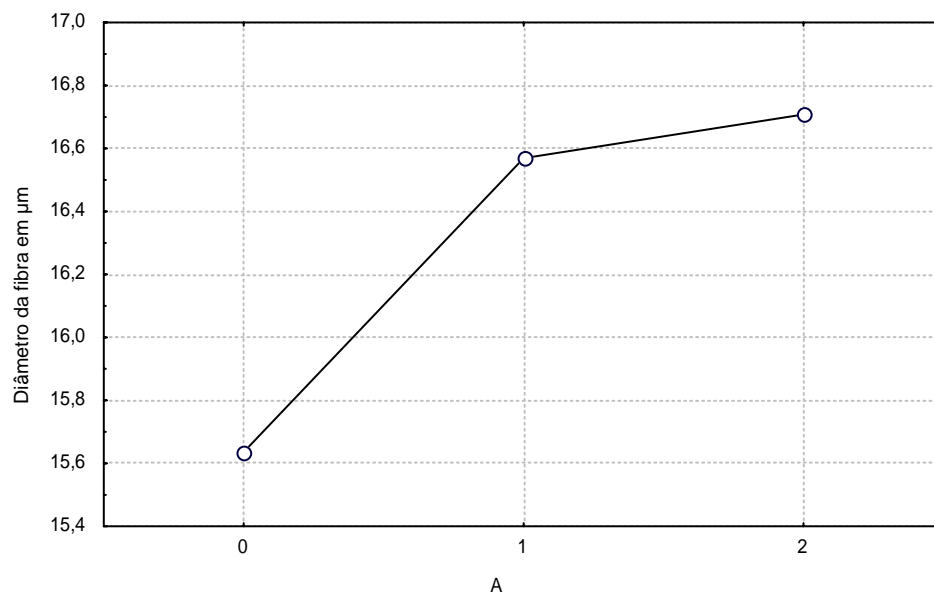


Figura 31. Médias do 2,4-D do diâmetro da fibra de *Eucalyptus urophylla*

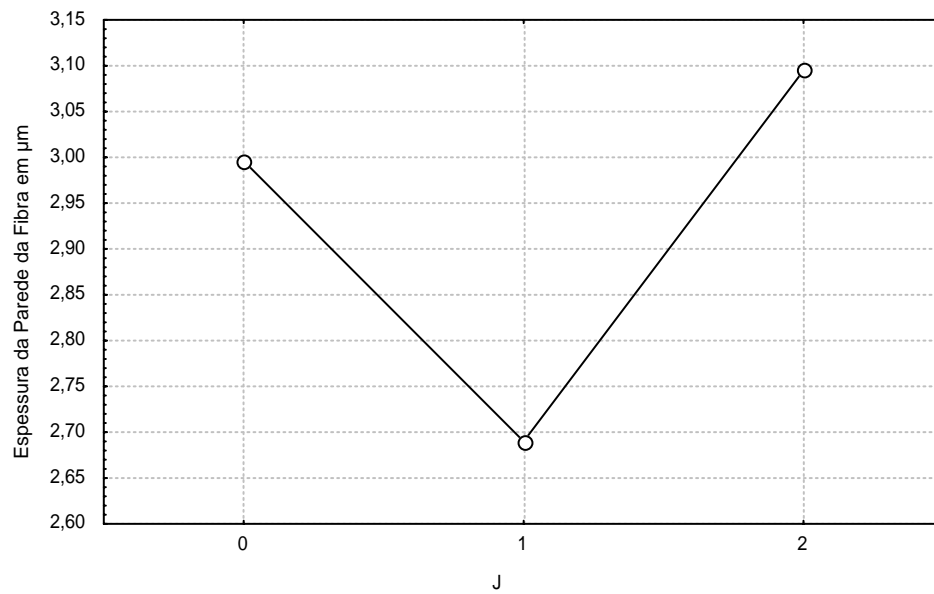


Figura 32. Médias do AJ da espessura da parede da fibra de *Eucalyptus urophylla*

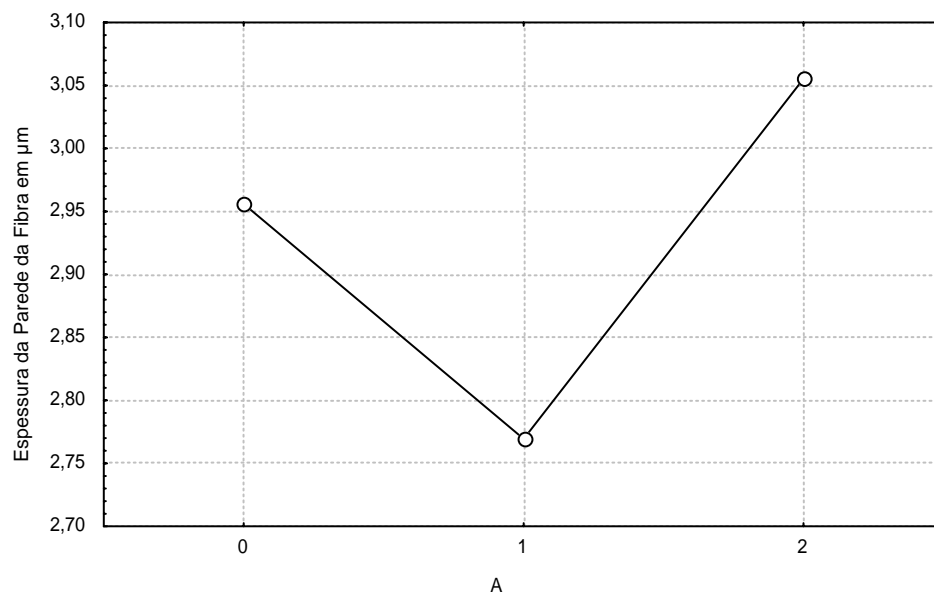


Figura 33. Médias do 2,4-D da espessura da parede da fibra de *Eucalyptus urophylla*

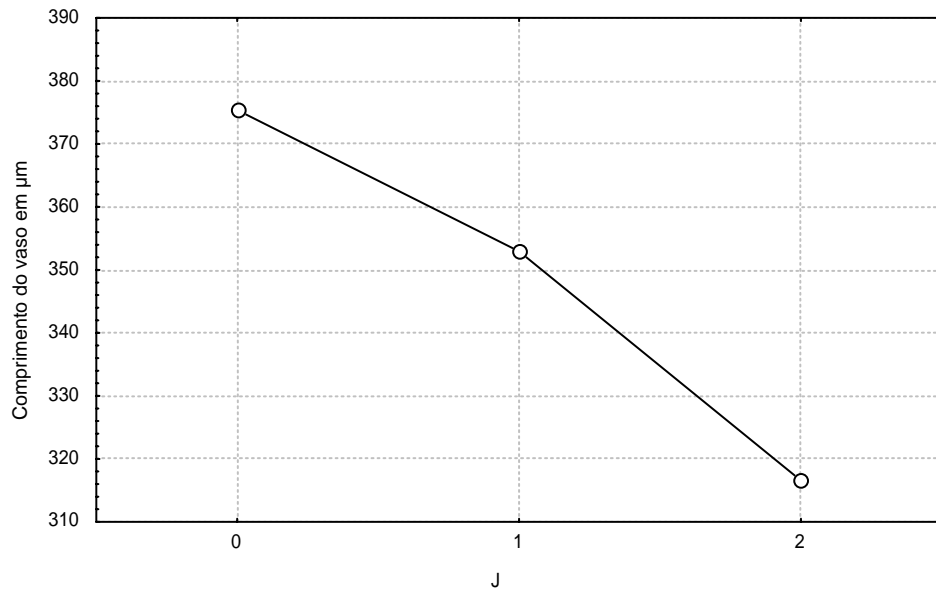


Figura 34. Médias do AJ do comprimento do vaso de *Eucalyptus urophylla*

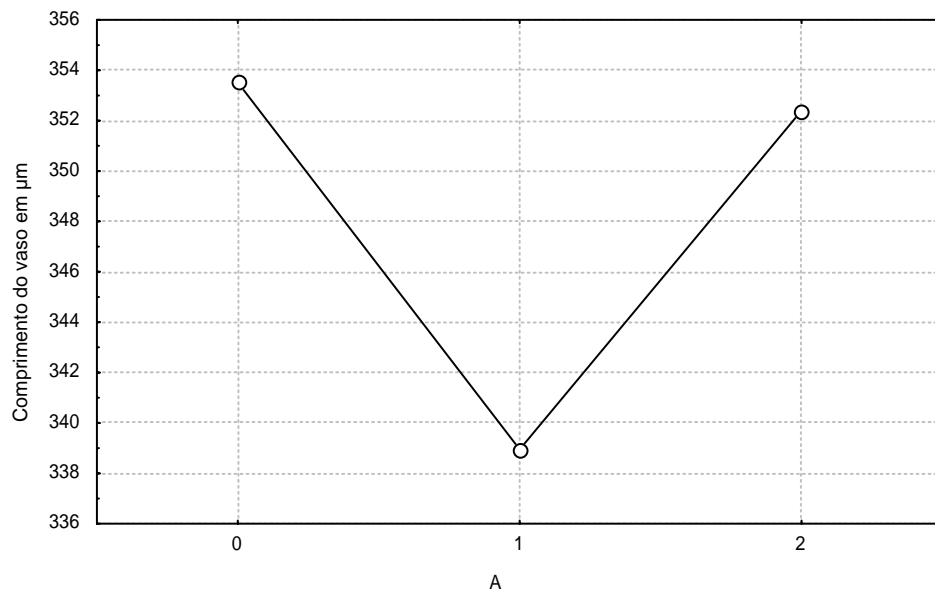


Figura 35. Médias do 2,4-D do comprimento do vaso de *Eucalyptus urophylla*

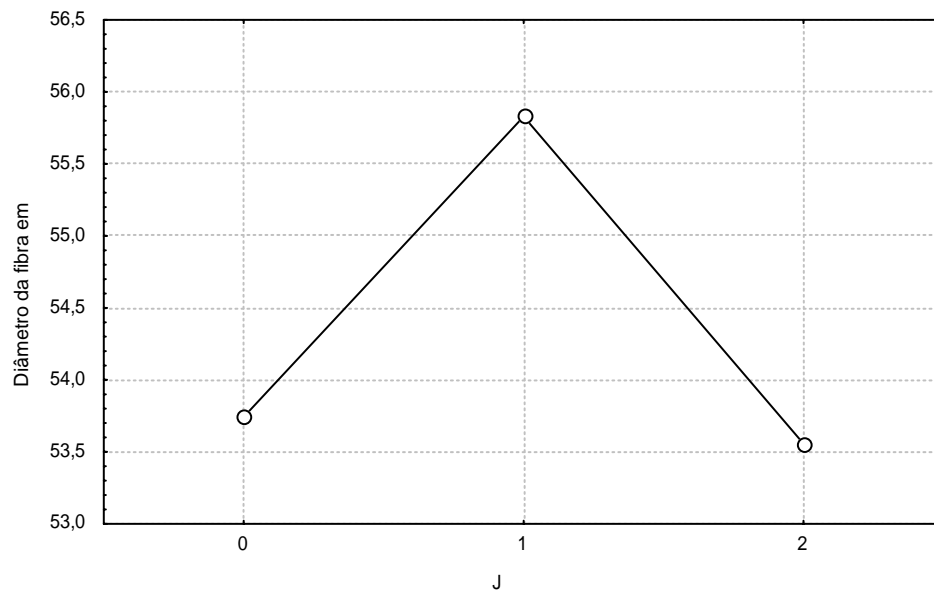


Figura 36. Médias do AJ do diâmetro do vaso de *Eucalyptus urophylla*

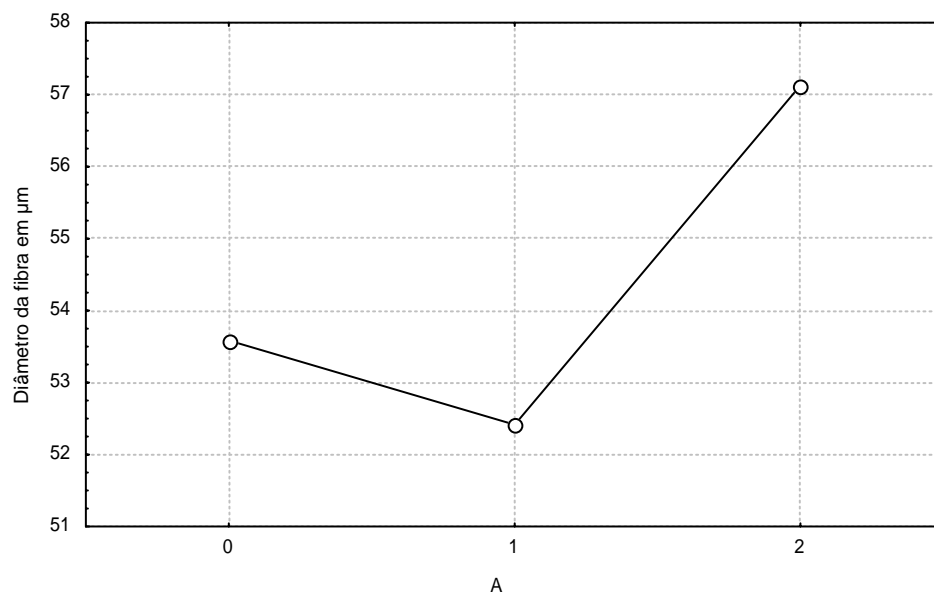


Figura 37. Médias do 2,4-D do diâmetro do vaso de *Eucalyptus urophylla*

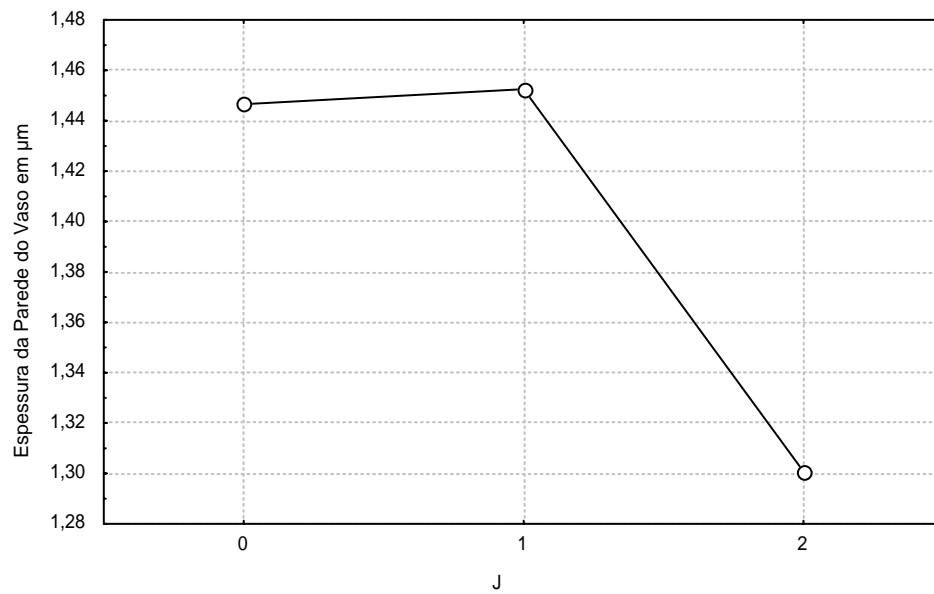


Figura 38. Médias do AJ da espessura da parede do vaso de *Eucalyptus urophylla*

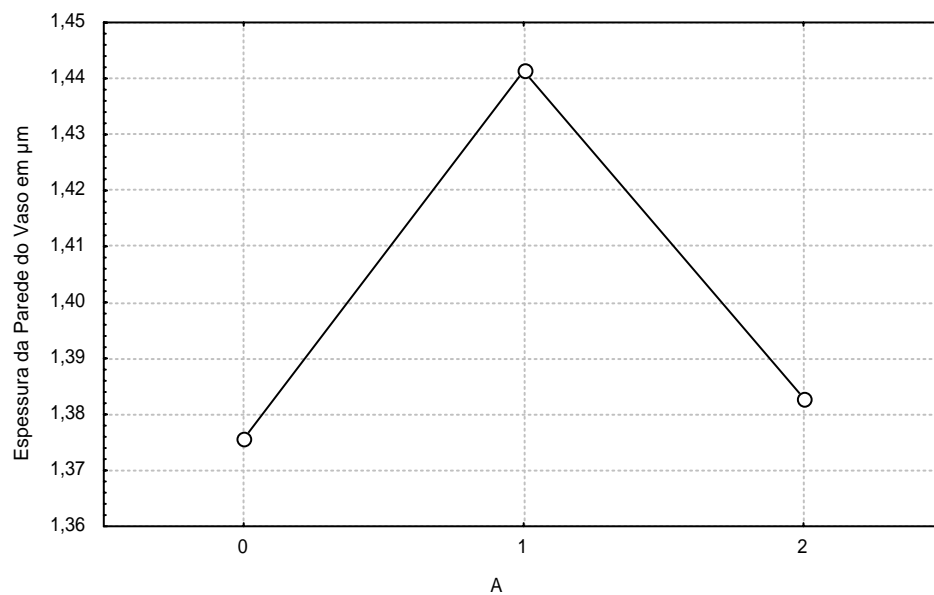


Figura 39. Médias do 2,4-D da espessura da parede do vaso de *Eucalyptus urophylla*

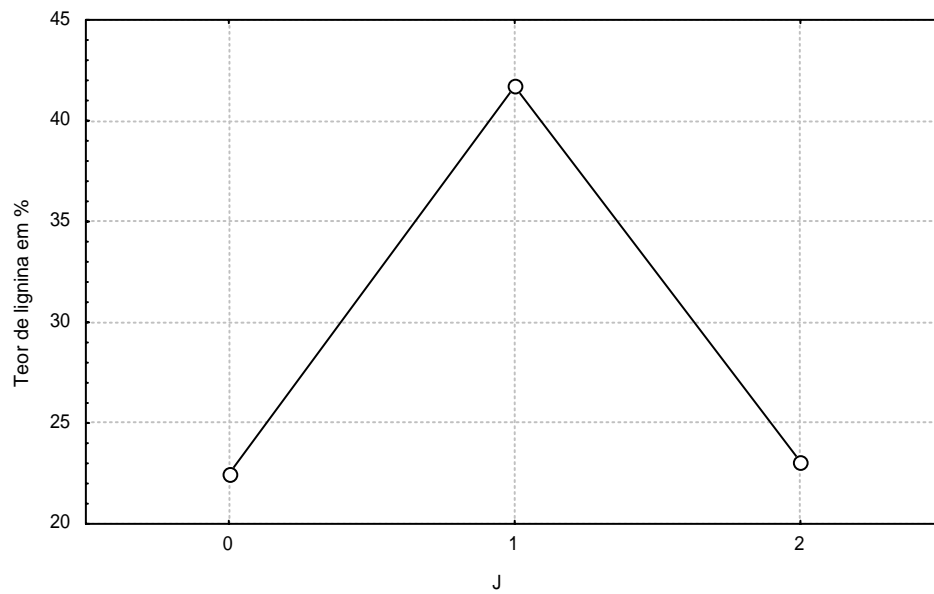


Figura 40. Médias do AJ do teor de lignina de *Eucalyptus urophylla*

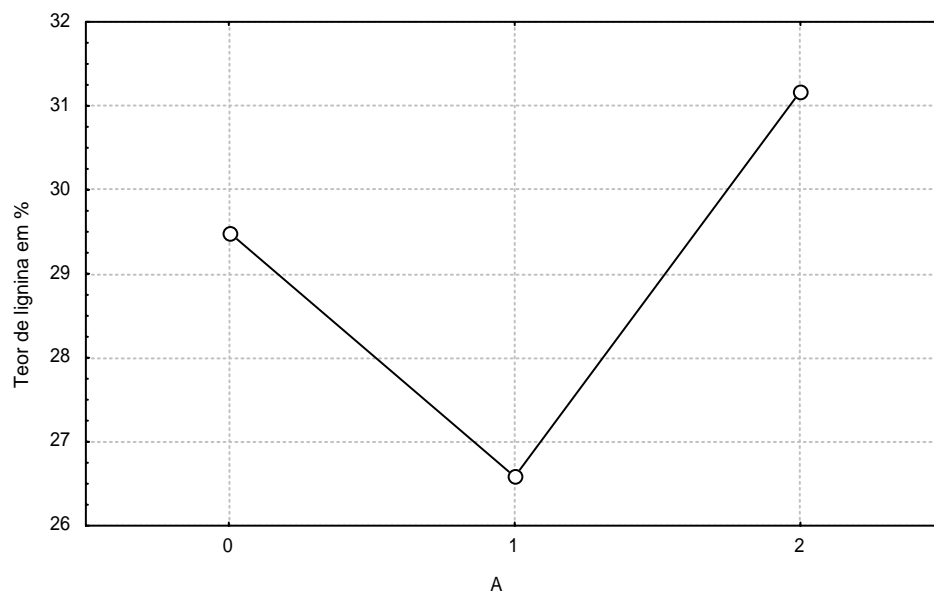


Figura 41. Médias do 2,4-D do teor de lignina de *Eucalyptus urophylla*

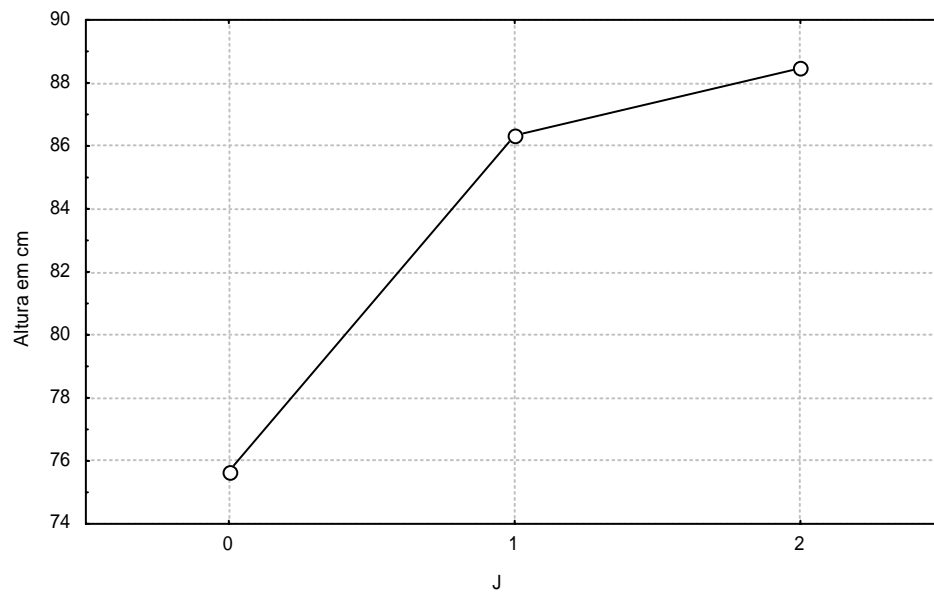


Figura 42. Médias da altura na aplicação de AJ do *Eucalyptus urophylla*

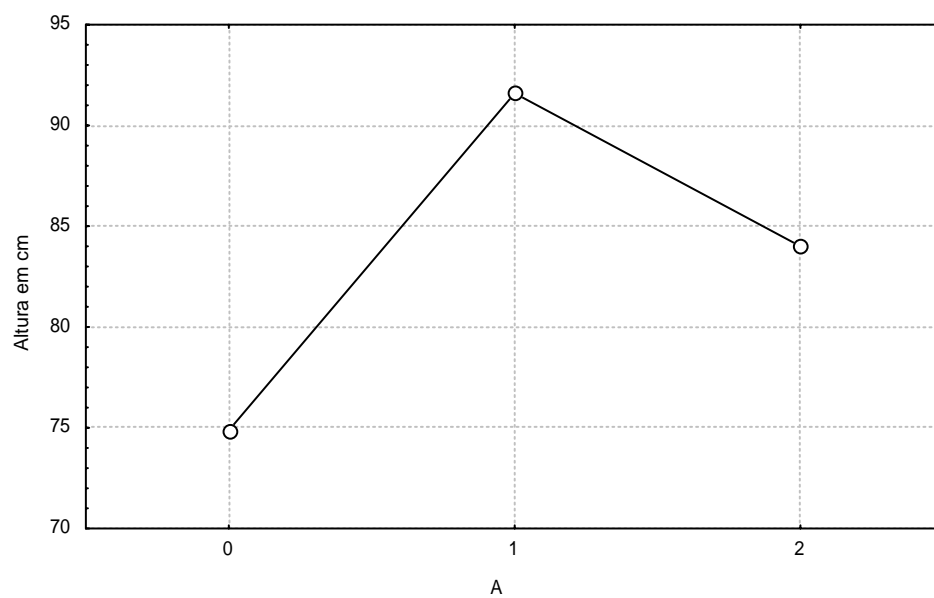


Figura 43. Médias da altura na aplicação de 2,4-D do *Eucalyptus urophylla*

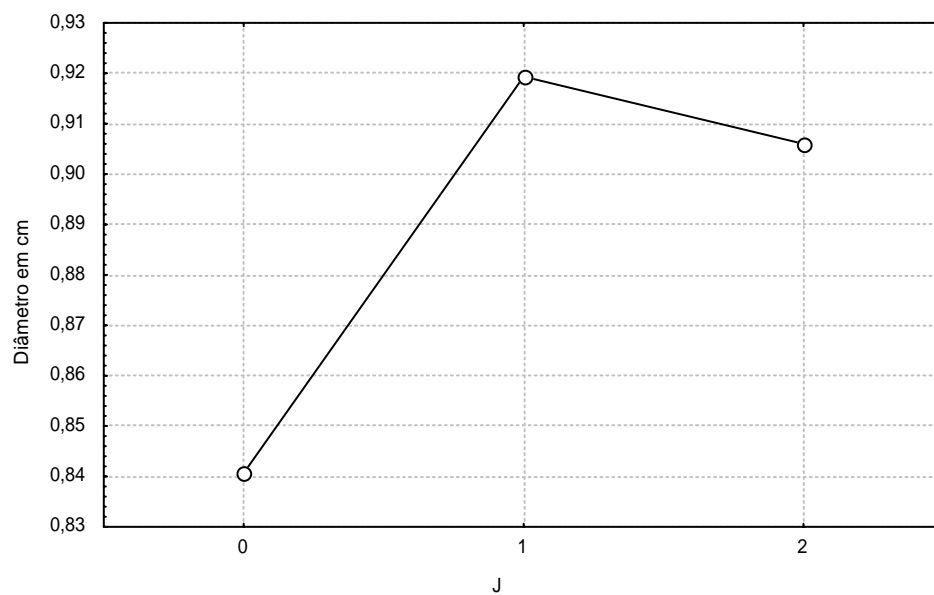


Figura 44. Médias do diâmetro na aplicação de AJ do *Eucalyptus urophylla*

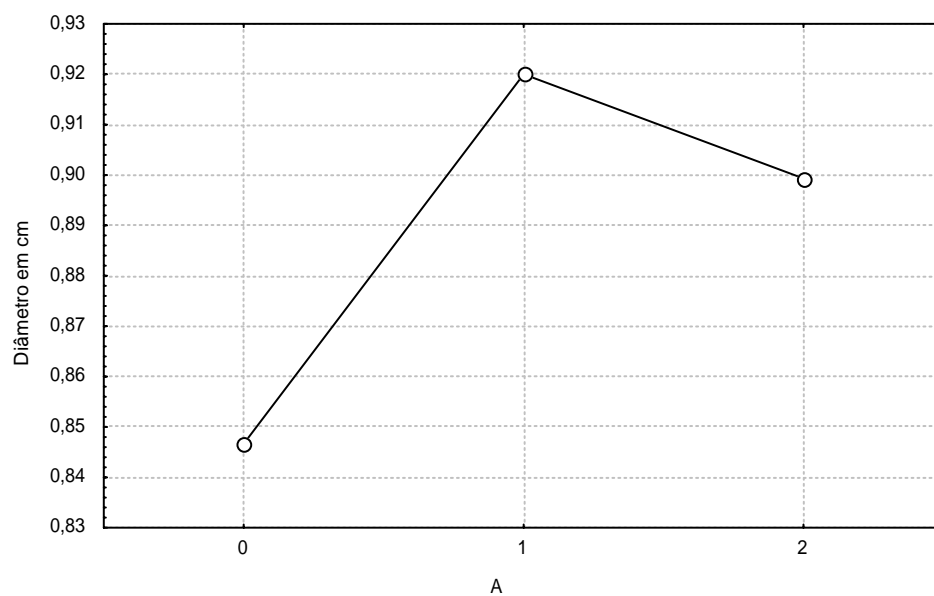


Figura 45. Médias do diâmetro na aplicação de 2,4-D do *Eucalyptus urophylla*

8.7. Gráficos dos espectros no infravermelho

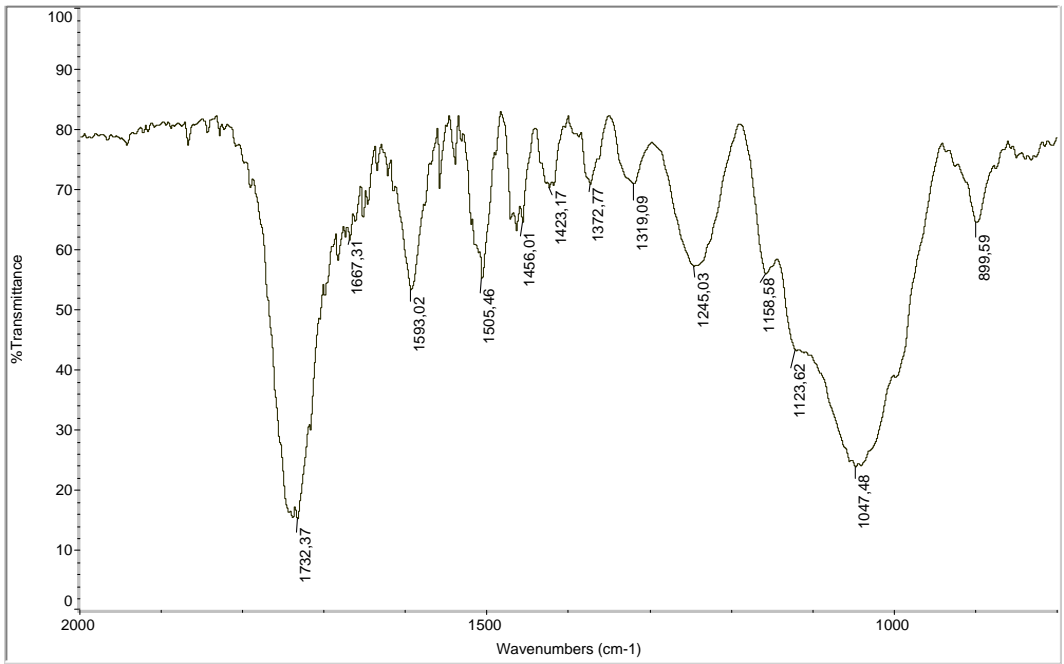


Figura 46. Espectro no infravermelho do tratamento J1 normalizado

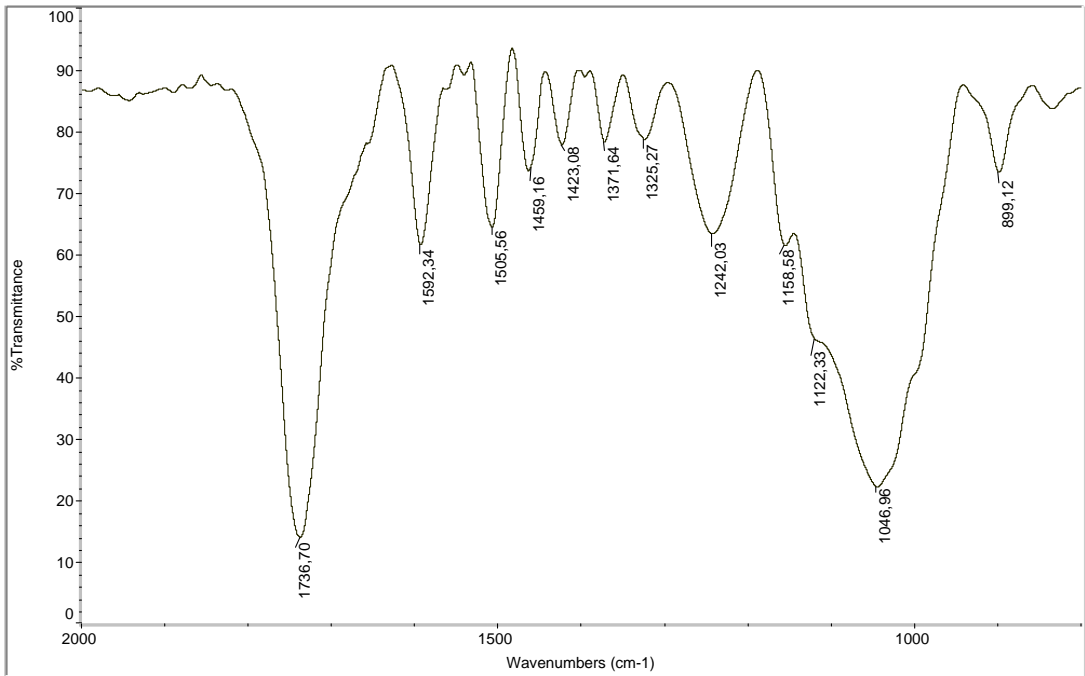


Figura 47. Espectro no infravermelho do tratamento J2 normalizado

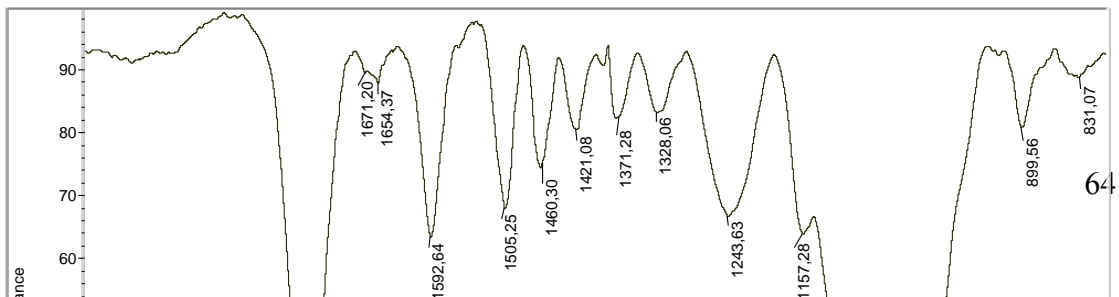


Figura 48. Espectro no infravermelho do tratamento A1 normalizado

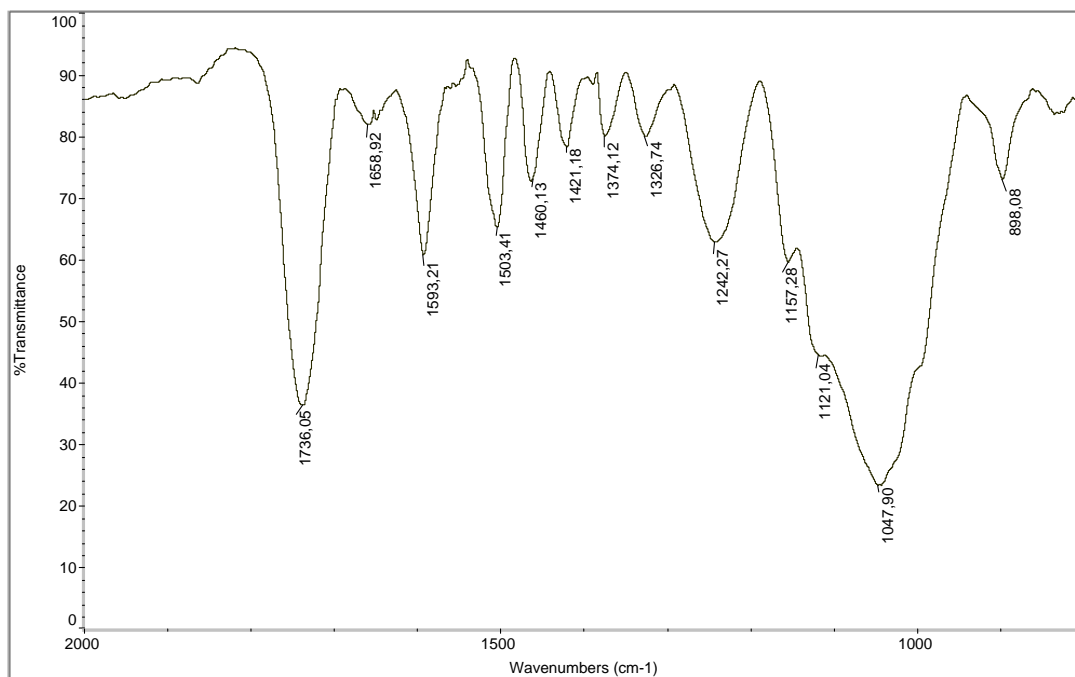


Figura 49. Espectro no infravermelho do tratamento A2 normalizado

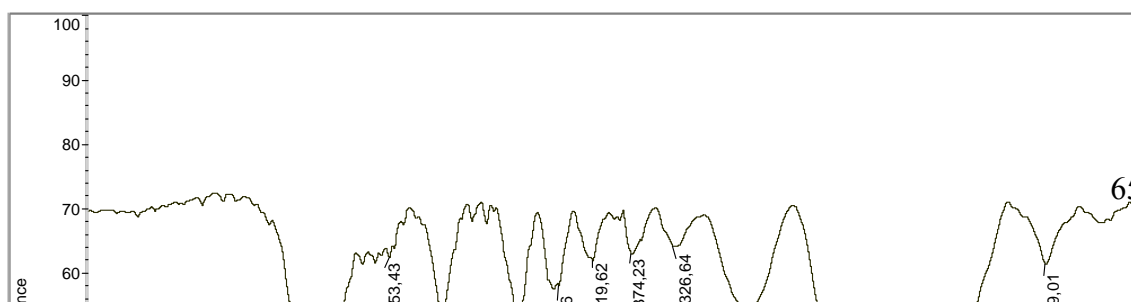


Figura 50. Espectro no infravermelho do tratamento J1A1 normalizado

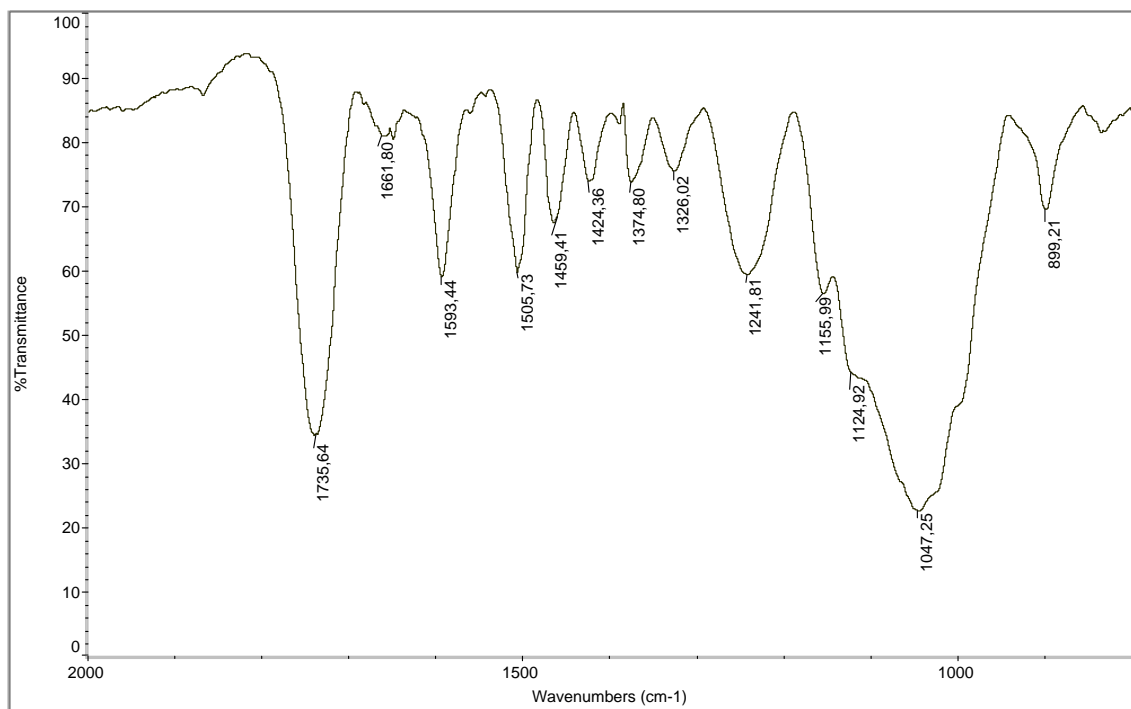


Figura 51. Espectro no infravermelho do tratamento J1A2 normalizado

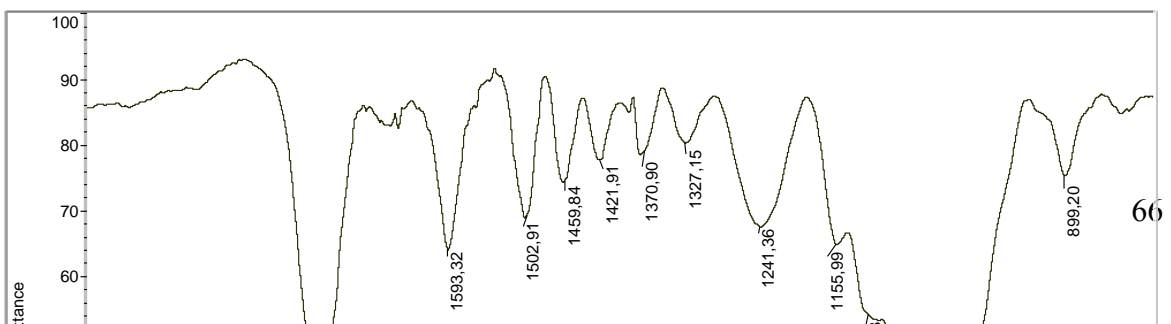


Figura 52. Espectro no infravermelho do tratamento J2A1 normalizado

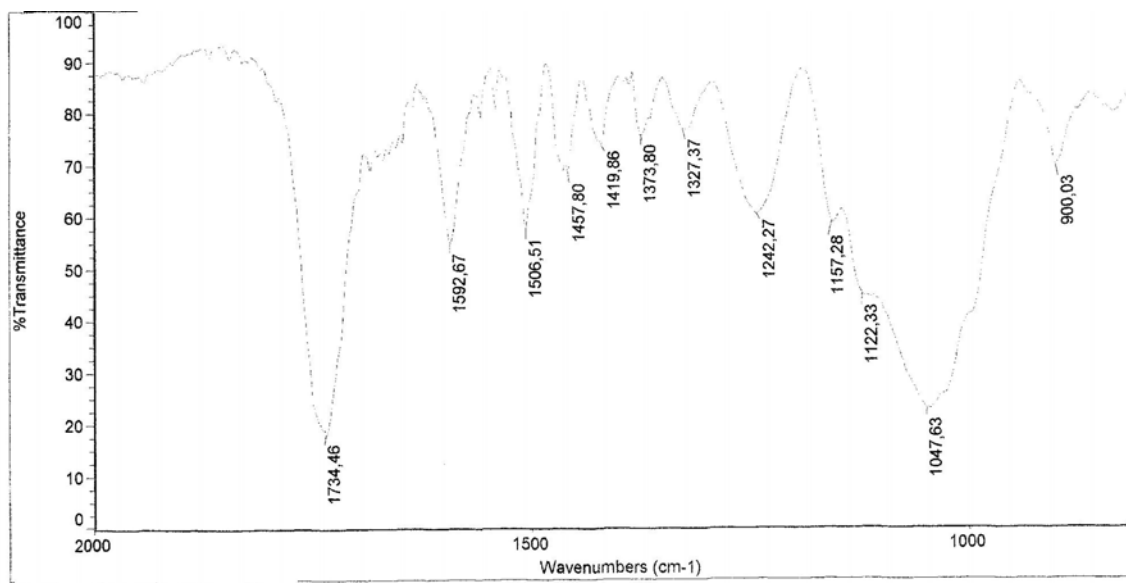


Figura 53. Espectro no infravermelho do tratamento J2A2 normalizado

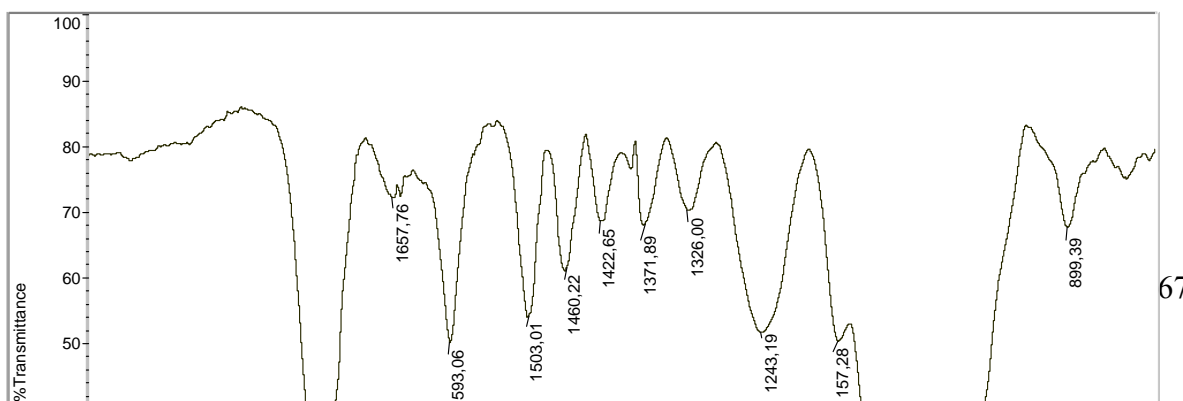


Figura 54. Espectro no infravermelho do tratamento H₂O normalizado

8.8 – Espectros ¹H RMN

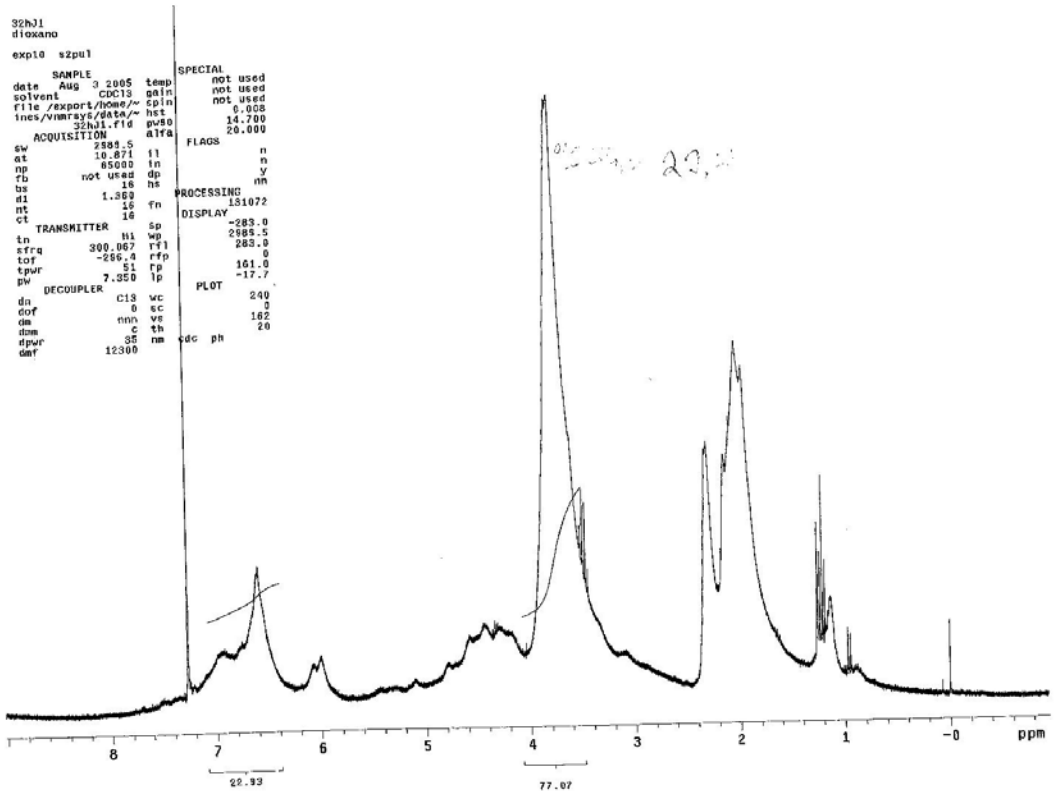


Figura 55. Espectro de ^1H RMN do tratamento J1

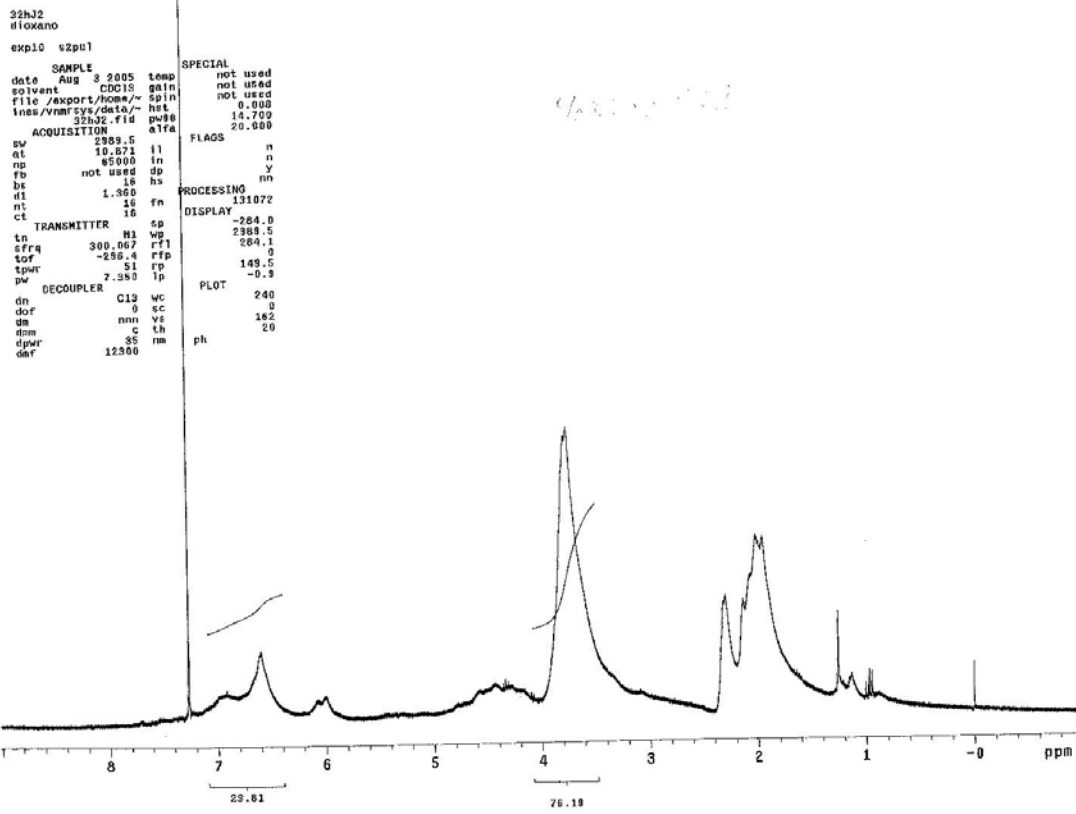


Figura 56. Espectro de ^1H RMN do tratamento J2

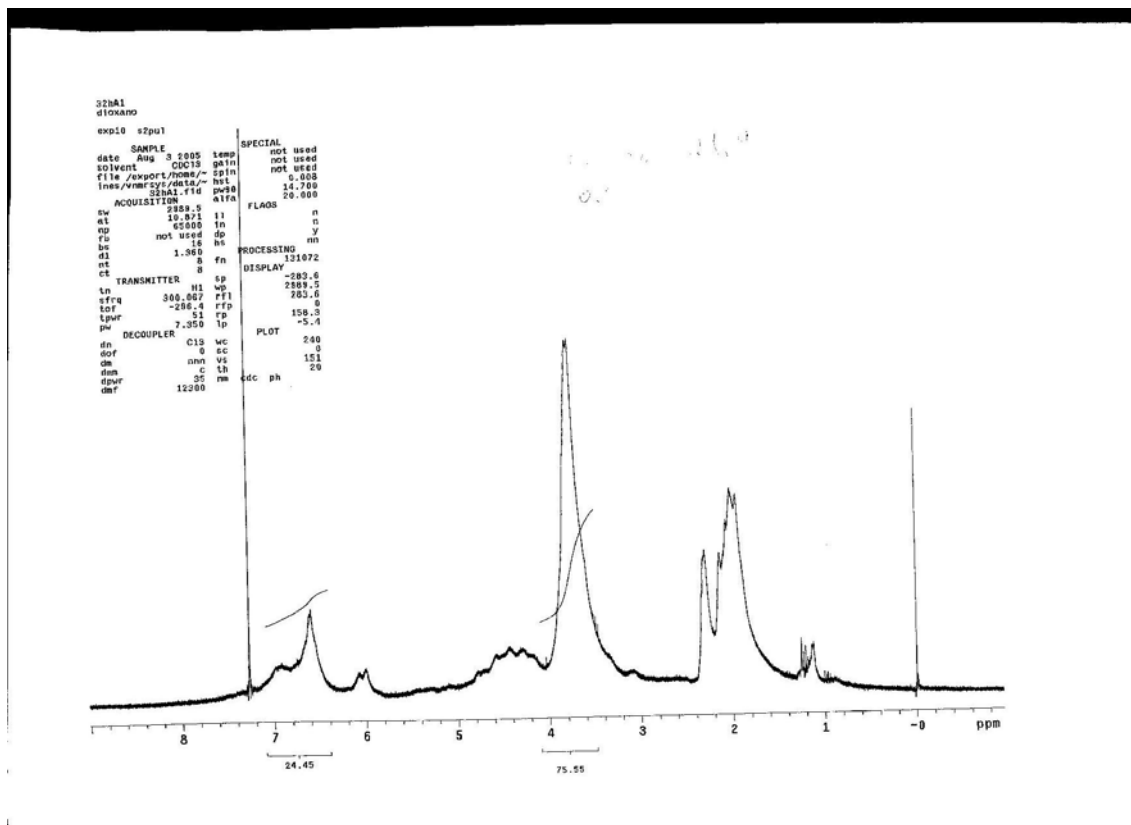


Figura 57. Espectro de ^1H RMN do tratamento A1

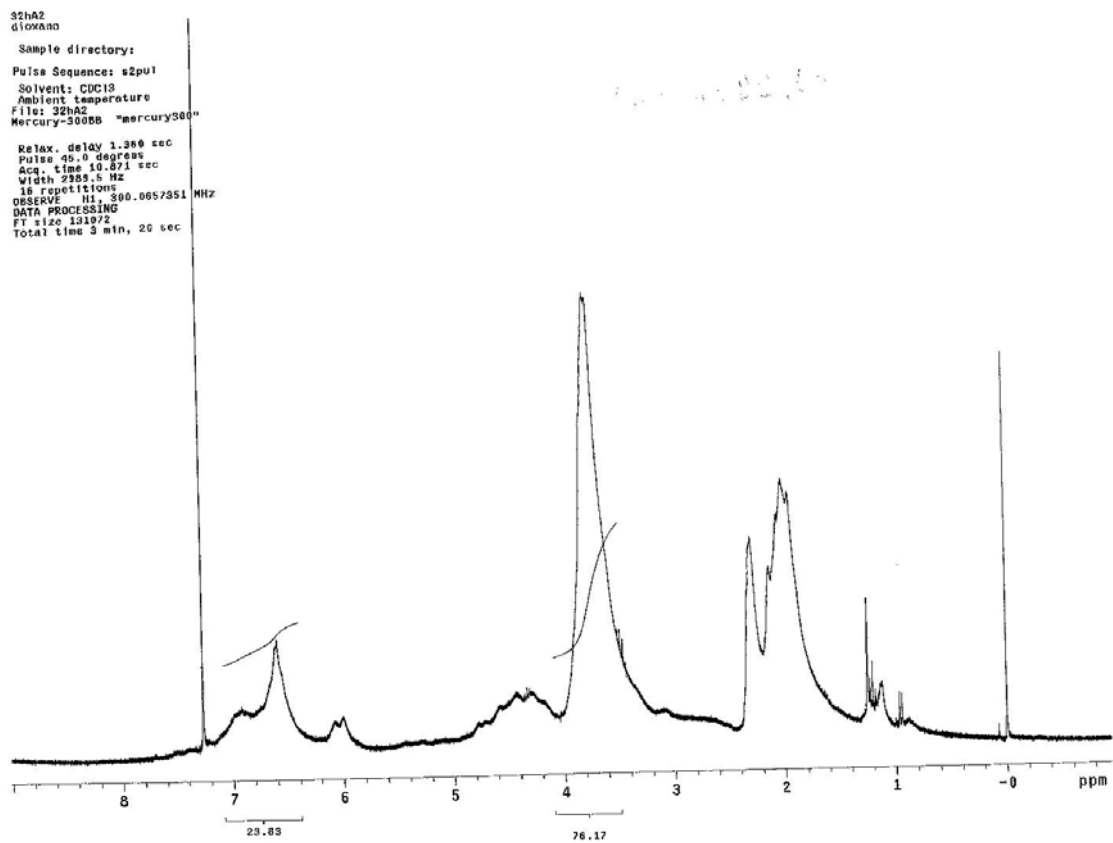


Figura 58. Espectro de ^1H RMN do tratamento A2

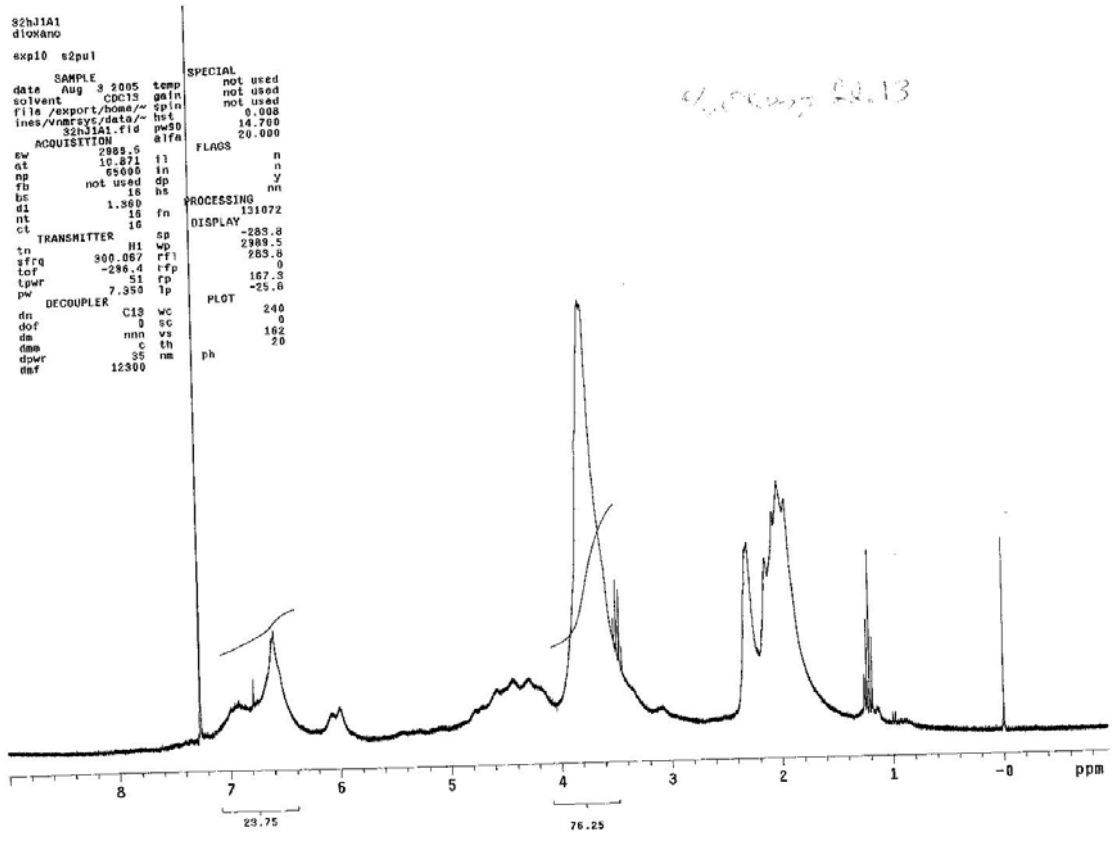


Figura 59. Espectro de ^1H RMN do tratamento J1A1

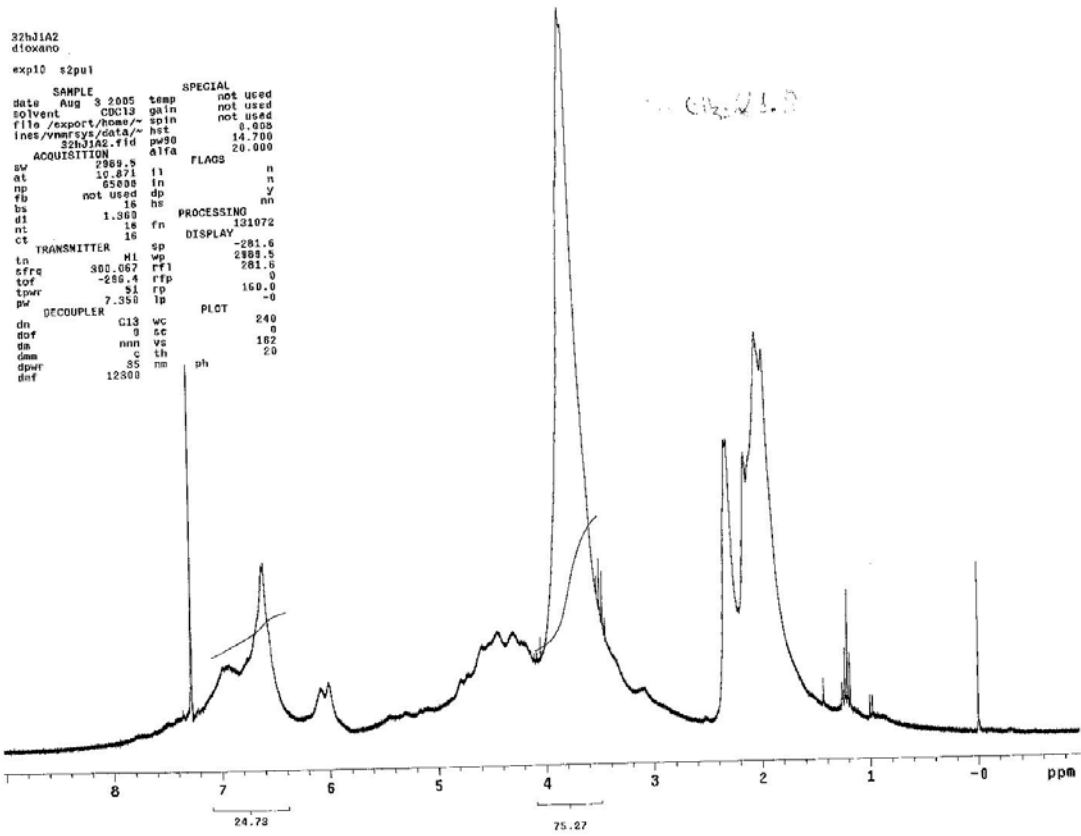


Figura 60. Espectro de ^1H RMN do tratamento J1A2

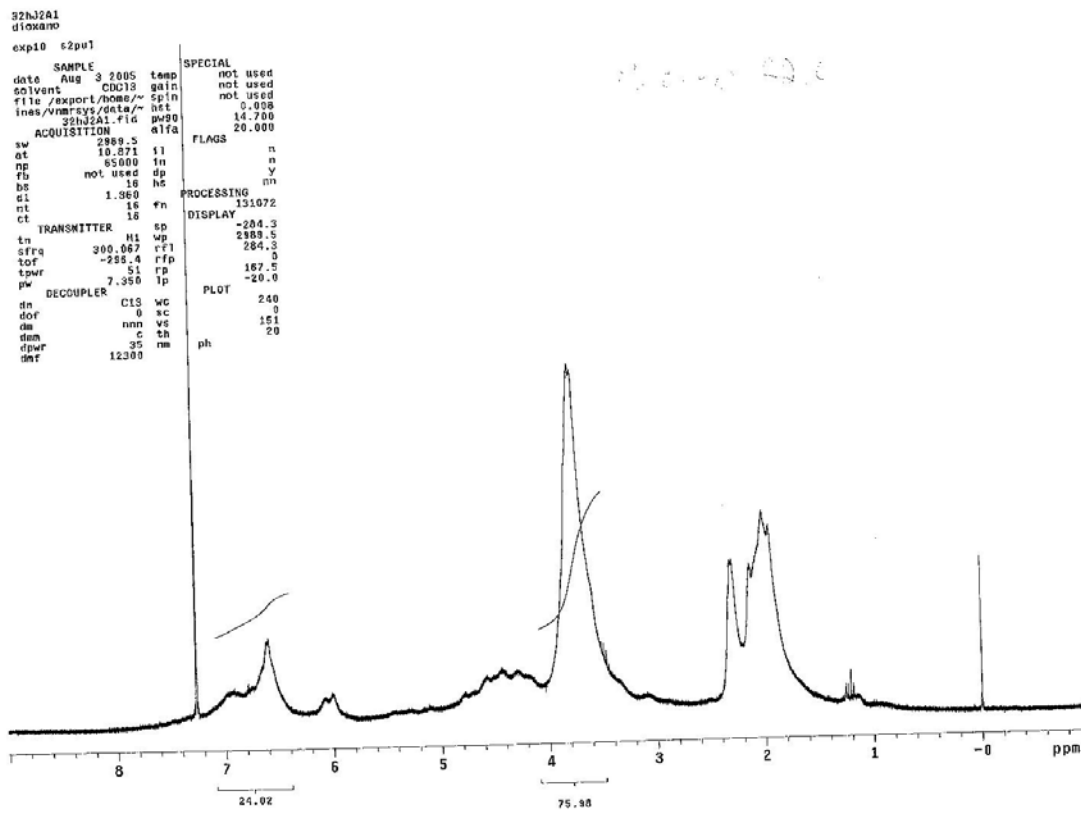


Figura 61. Espectro de ¹H RMN do tratamento J2A1

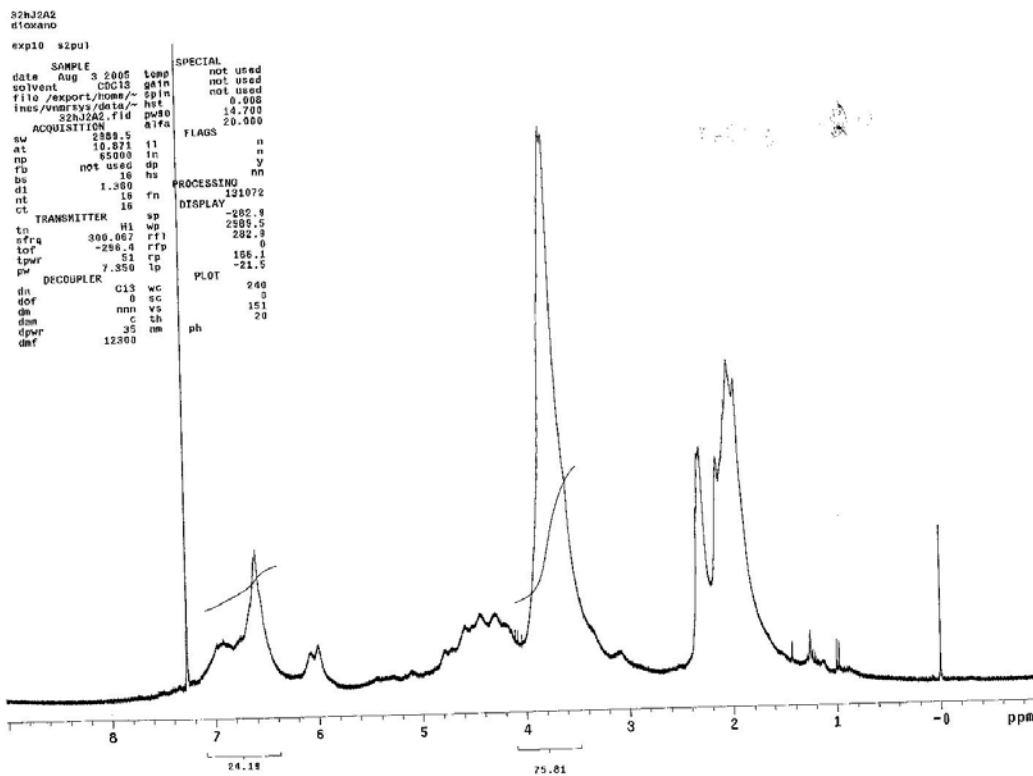


Figura 62. Espectro de ^1H RMN do tratamento J2A2

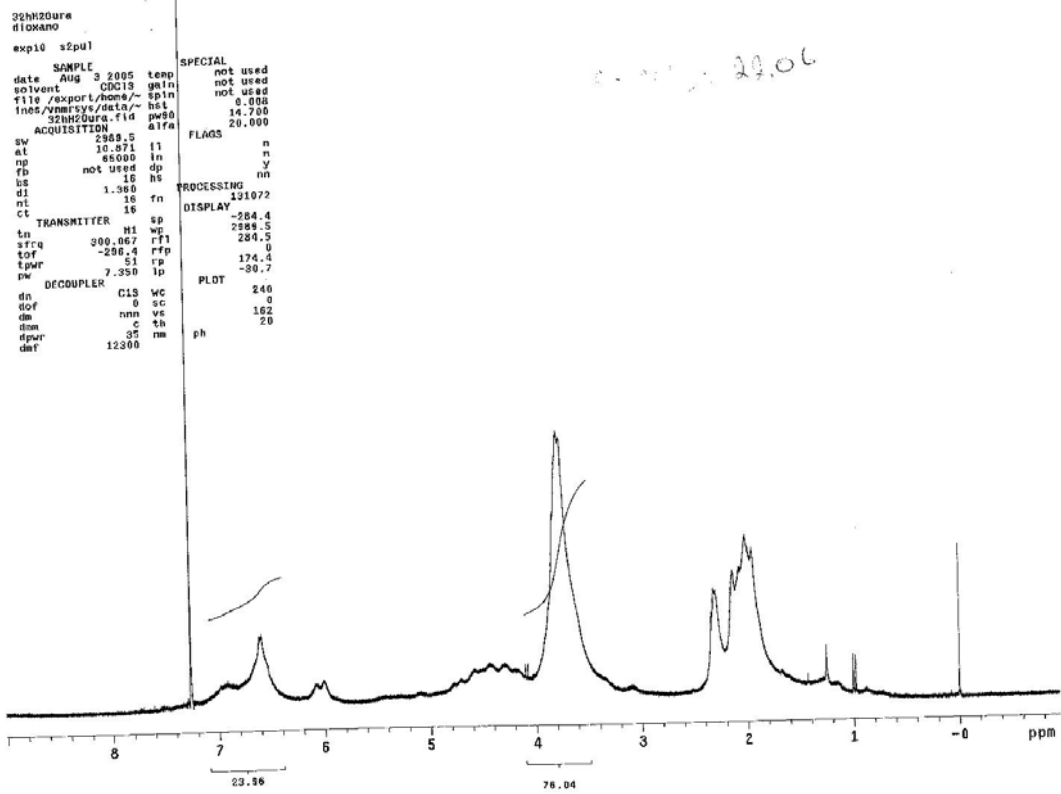


Figura 63. Espectro de ^1H RMN do tratamento H_2O