

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

DISSERTAÇÃO

Topoquímica e abordagem sobre a estrutura e a conectividade
lignina-fenol-parede celular em *Euterpe oleracea* Mart.
(Arecaceae)

Gisely de Lima Oliveira

2013



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

**TOPOQUÍMICA E ABORDAGEM SOBRE A ESTRUTURA E A
CONECTIVIDADE LIGNINA-FENOL-PAREDE CELULAR EM *Euterpe
oleracea* Mart. (Arecaceae)**

Gisely de Lima Oliveira

Sob a orientação do Professor
Dr. Heber dos Santos Abreu

e Coorientação da Professora
Dra. Helena Regina Pinto Lima

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

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2013

674.13

O48t

T

Oliveira, Gisely de Lima, 1983-
Topoquímica e abordagem sobre a
estrutura e a conectividade lignina - fenol
- parede celular em Euterpe oleracea Mart.
(Arecaceae) / Gisely de Lima Oliveira. -
2013.

72 f.: il.

Orientador: Heber dos Santos Abreu.

Dissertação (mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de
Pós-Graduação em Ciências Ambientais e
Florestais.

Bibliografia: f. 47-58.

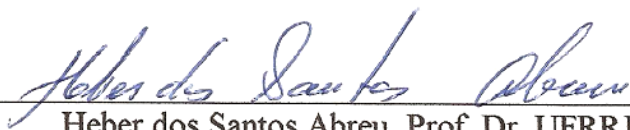
1. Madeira - Química - Teses. 2.
Palmeira - Teses. 3. Lignina - Teses. 4.
Açaizeiro - Análise - Teses. 5.
Espectroscopia de infravermelho - Teses.
I. Abreu, Heber dos Santos, 1953- II.
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em
Ciências Ambientais e Florestais. III.
Título.

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

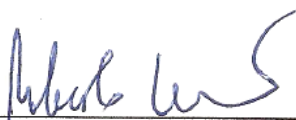
GISELY DE LIMA OLIVEIRA

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 28/02/2013



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



Roberto Carlos Costa Lelis. Prof. Dr. UFRRJ



Claudia Franca Barros. Prof^a. Dra. JBRJ

A Deus.

A minha avó Maria José de Cavalcante de Lima.

A minha mãe Maristela de Lima Oliveira.

Aos meus irmãos Vitor e Wagner de Lima Oliveira.

A todos os meus tios.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Nesta etapa tão importante da minha vida, não poderia de deixar de agradecer primeiramente a Deus por mais uma vez mostrar sua fidelidade em minha vida me ajudando a vencer com sabedoria todos os obstáculos. Sinto-me verdadeiramente abençoada por Deus ter-me concedido a oportunidade de concluir o Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais na UFRRJ.

Ao Prof. Dr. Heber dos Santos Abreu, que como orientador, colaborou em todos os aspectos para a realização deste trabalho, demonstrando paciência, interesse e amizade na tarefa de orientação. Tê-lo como orientador (mais uma vez) foi um privilégio, pois demonstrou notável atenção perante minhas dúvidas, mesmo diante de tantas obrigações e responsabilidade. Muito obrigada por tudo!

À professora Helena Regina Pinto Lima do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia/UFRRJ pela coorientação e, sobretudo pelo apoio, companheirismo e amizade durante a realização deste trabalho.

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

Aos técnicos Vitor dos Santos Almeida e Maurício Lemos Mattos do Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química/Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pelos registros dos espectros de RMN de ^{13}C .

Aos amigos José Carlos Ferreira Batista e Fabrício Gomes Gonçalves pelo carinho e pela valiosa colaboração que foi de fundamental importância para o processo de desenvolvimento deste trabalho.

À minha amada avó Maria José Cavalcante de Lima, por quem serei eternamente grata, pelo carinho, dedicação e ensinamentos; aos meus estimados tios pelo carinho, amizade e colaboração que me apoiaram ao longo da minha jornada universitária, mas também ao longo de toda minha vida.

À minha mãe Maristela de Lima Oliveira, aos meus queridos irmãos Vitor e Wagner de Lima Oliveira, a minha cunhada Cíntia Martins de Lima pelo carinho, amor e dedicação e também pela compreensão pelos momentos em que estive ausente. Aos meus amados sobrinhos Laís e Davi Martins de Lima pelas brincadeiras, pelas risadas e principalmente pelo apoio e por entender que muitas vezes foi necessário estar ausente. Vocês sempre poderão contar com a tia!

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Química da Madeira, Thamires Fernandes de Avila Netto Guterres, Maria Vanessa Egger Schueler, Luizmar de Barros Assis, Carlos Henrique Rocha Gonçalves, Leonardo de Souza Sanches, Isaac Ricardo Abello Ariza, Danielle Sampaio, Genix Pallarco Castro.

Em especial, gostaria de agradecer ao Michel Cardoso Vieira, Bruno Couto da Silva, Vinícius Cadete Bernardes, Thuanny de Santa Barbara Menezes e Cléssio Gomes da Silva a quem considero parte integrante da minha família, pelo carinho, amizade, companheirismo e principalmente pela paciência ao longo desta jornada que ao mesmo tempo foi extremamente difícil e gratificante.

À CAPES pela bolsa de mestrado e a FAPERJ pela infraestrutura de equipamentos do Laboratório de Química da Madeira do DPF do Instituto de Florestas/UFRRJ.

RESUMO

OLIVEIRA, Gisely de Lima. **Topoquímica e abordagem sobre a estrutura e a conectividade lignina-fenol-parede celular em *Euterpe oleracea* Mart. (Arecaceae)**. 2013. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais). Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Euterpe oleracea Mart. é uma palmeira denominada popularmente por açaí, possui caule cespitoso, ereto ou inclinado, que tem várias utilizações, tais como: alimentação humana (palmito e xarope de açaí), fabricação de casas, ração animal, arborização, medicina caseira e corante natural. Atualmente, vem atraindo o interesse dos pesquisadores por ser uma fonte valiosa de matéria-prima lignocelulósica florestal com fins energéticos. A determinação da natureza das interações entre lignina-fenol-parede celular é primordial para compreender a biogênese e a degradação desse material. O presente estudo teve como objetivos caracterizar a estrutura anatômica, a distribuição topoquímica da lignina e conectividade lignina-fenol-parede celular (ácido *p*-cumárico) das fibras nos caules de *E. oleracea*. Para o estudo anatômico e avaliação do processo de lignificação foram utilizados indivíduos jovens e adultos (parte interna e parte externa), processados de acordo com técnicas usuais em microscopia óptica, microscopia de fluorescência e microespectroscopia no infravermelho. Também foram realizadas análises espectroscópicas no infravermelho, CLAE e RMN de ^{13}C . As observações anatômicas no caule jovem indicaram que *E. oleracea* Mart. possui epiderme uniestratificada recoberta por cutícula espessa, dois estratos subepidérmicos formados por células parenquimáticas e fibras que formam uma pequena calota, apresentando paredes bem espessas com lume reduzido que separam os elementos de tubo crivado e as células companheiras em dois grupos. Através dos testes histoquímicos e da microespectroscopia no infravermelho foi possível verificar que a lignificação inicia-se na lamela média e nos ângulos comuns às células. Os espectros de IV apresentaram sinais indicativos de lignina do tipo guaiacila, siringila e cumarila, com os sinais $1352\text{-}1341\text{ cm}^{-1}$ e 1282 cm^{-1} . A espectroscopia de infravermelho, juntamente com as análises de RMN de ^{13}C e CLAE permitiram verificar as concentrações de ácido *p*-cumárico em todas as amostras na espécie estudada, indicando que este está ligado a parede celular por ligação éster.

Palavras chave: ácido hidroxicinâmico, teste histoquímico, infravermelho.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Gisely de Lima. **Topochemical and approach on the structure and connectivity lignin-phenol-cell wall in *Euterpe oleracea* Mart. (Arecaceae).** 2013. 72 f. Dissertation (Master Science in Environmental and Forestry Science). Instituto de Florestas. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 2013.

Euterpe oleracea Mart is a cespituous palm tree, commonly known as açai, with either a straight or an inclined stem used as food (palm heart), for humane feeding (palmetto and açai syrup), for house construction, animal feeding, afforestation, homemade medicine and natural colorant. This species has been recently investigated as an important source of lignocellulosic feedstock for energetic purposes. The determination how lignin and phenol, interact in the cell wall is primordial to understand both the biogenesis and degradation of this material. The objective of this study was to characterize the anatomical structure, topochemical distribution of lignin and the lignin-phenol-cell wall (*p*-coumaric acid) connectivity of fibers in *E. oleracea* stems. Young and adult specimens (internal and external regions) were used for the anatomical study and evaluation of the lignification process. Individuals were processed according to usual techniques in optical microscopy, fluorescence microscopy and infrared microscopy. Other analysis involved infrared spectroscopic analyses, HPLC, and ¹³C NMR. Anatomical observations in young stems indicated that *E. oleracea* has an uniseriate epidermis covered with thick cuticles, two subepidermal layers formed of fibers, and parenchyma cells which form a small hub, having very thick walls with reduced lumen separating sieve tube elements and companion cells into two groups. Histochemical tests and infrared microspectroscopy allowed verifying that lignification starts in the middle of the lamella, and in cell corners. The IR spectra presented indicative signals of guaiacyl, siringyl and coumaryl-type lignins, based on the 1352-1341 cm⁻¹ e 1282 cm⁻¹ signals). The infrared spectroscopy, together with ¹³C NMR and HPLC allowed to verify high concentration of *p*-coumaric acid in all samples in the studied specie, indicating that it is bonded to the cell wall through ester linkage.

Key words: hydroxycinnamic acid, histochemical test, infrared.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Enzimas que atuam sobre a formação dos precursores da lignina (adaptado de PEREIRA et al., 2012).	7
Tabela 2.	Formulações dos tratamentos dos materiais caulinares.	23
Tabela 3	Atribuições dos sinais dos espectros por microscopia no infravermelho das regiões A, B e C da planta jovem e adulta (PI) e (PE) pré-extraídas com metanol por 24 horas (adaptada de LIN & DENCE, 1992).	34
Tabela 4	Atribuições dos sinais dos espectros por microscopia no infravermelho das regiões A, B e C da planta jovem e adulta (PI) e (PE) pré-extraídas com metanol por 24 horas e tratadas com NaOH 1% (adaptada de LIN & DENCE, 1992).	35
Tabela 5.	Cálculo empírico da concentração de ésteres, aldeídos, cetonas e ácidos por técnica de linha base utilizando os espectros no infravermelho do material lignocelulósico da planta jovem, PI e PE.	37
Tabela 6.	Deslocamentos químicos dos constituintes do caule da planta jovem e adulta (PI) e (PE) de <i>E. oleracea</i> (adaptada de LIN & DENCE, 1992; WIKBERG, 2004; RESENDE et al 2011).	44

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Formação do ácido desidrodiferúlico via oxidação desidrogenativa. 2
- Figura 2.** Planta. (A) e frutos (B) de *Euterpe oleracea* Mart (LORENZI et al., 2004). 4
- Figura 3.** Via metabólica chiquimato-corismato: 1) 3-Desoxi-D-arabino-heptulonato-7-fosfato sintase; 2) 3-Desidroquinato sintase; 3) 3-Desidroquinato desidratase; 4) Chiquimato desidrogenase; 5) Chiquimato quinase; 6) 3-Fosfochiquimato-1-carboxiviniltransferase; 7) Corismato sintase (CHIQUIMATO, 2012). 6
- Figura 4.** Via biossintética do corismato aos precursores finais da lignina: 1) Corismato mutase; 2) Prefenato aminotransferase; 3) Arogenato desidratase; 4) Arogenato desidrogenase; 5) Fenilalanina amonialfise (FAL); 6) Cinamato 4-hidroxilase (C4H); 7) Cumarato 3-hidroxilase (C3H); 8) O-Metiltransferase (OMT); 9) Ferulato 5-hidroxilase (F5H); 10) 4-Cumarato-CoA ligase (4CL); 11) Cinamoil-CoA redutase (CCR); 12) Cinamil Álcool desidrogenase (CAD). (WHETTEN & SEDEROFF, 1995; LEWIS & SARKANEN, 1998). 8
- Figura 5.** Estrutura molecular de coniferina. 9
- Figura 6.** Inicialização da polimerização da lignina na parede celular envolvendo os precursores: álcool p-cumarílico, coniferílico e sinapílico, respectivamente (MONTEIRO et al., 2004). 10
- Figura 7.** Tipos de movimento vibracional em uma molécula (adaptado de BRUICE, 2005). 13
- Figura 8.** Estado energético de um núcleo de hidrogênio na ausência e presença de um campo magnético externo (PAVIA et al., 2010). 15
- Figura 9.** Esquema mostrando o travamento de spin (spin locking) no sistema coordenado rotatório e abaixo sequência geral de pulsos para RMN CP/MAS (LIN & DENCE, 1992). 16
- Figura 10.** Interação dipolo-dipolo de um par de spin (MACOMBER, 1998). 17
- Figura 11.** Diagrama do girador do ângulo mágico. 17
- Figura 12.** Esquema de um sistema de CLAE (PFARMA, 2013). 19
- Figura 13.** Exemplar da planta jovem (A) e planta adulta (B) de *Euterpe oleracea* Mart. 20
- Figura 14.** Proposta de mecanismo de reação com reagente de Wiesner (A) e com reagente de Maüle (B) (LIN & DENCE, 1992). 21
- Figura 15.** Caule da planta jovem de *Euterpe oleracea*. A – F - Seção transversal. A- Aspecto geral do caule da planta jovem. B- Detalhe das fibras. C- Detalhe da lignificação das fibras do floema, evidenciado pelo teste de Wiesner, mostrando regiões A e B. D- Detalhe da lignificação (→), evidenciada pela microscopia de fluorescência. E- Lignina guaiacólica (coloração marrom) nas paredes das fibras do floema (→), evidenciada pelo teste de Maüle. F- Detalhe das paredes celulares com o reagente de Maüle (→). Ep= Epiderme; Pa= Parênquima; Fb= Fibras; Fl= Floema; Mx= Metaxilema; Px= Protoxilema; Ac= Ângulo comum às células; Lm= Lamela média. Barras: A e E= 200 µm; B, C, D e F= 50 µm. 25
- Figura 16.** Caule da planta adulta (PE) de *Euterpe oleracea*. A, C, D, E, F e G - 27

Seção transversal. B – Material dissociado. A e C- Aspecto geral do feixe condutor. B- Detalhe das fibras. D- Detalhe da lignificação das fibras do floema, evidenciado pelo teste de Wiesner, mostrando regiões A, B e C. E, F e G- Topoquímica da lignina nas fibras, evidenciando a polilamelação e a distribuição da lignina; E- Lignina evidenciada pelo teste de Wiesner na lamela média e nos ângulos das células. F- Detalhe da lignificação (→), evidenciada pela microscopia de fluorescência. G- Detalhe das paredes celulares constituída de lignina guaiacólica (coloração marrom) nas paredes das fibras do floema (→), evidenciada pelo teste de Maüle. Pa= Parênquima; Fb= Fibras; Fl= Floema; Mx= Metaxilema; Px= Protoxilema; Ac= Ângulo comum às células; Lm= Lamela média; La= paredes polilameladas. Barras: A, C e D= 200 µm; E, F e G= 50 µm.

- Figura 17.** Caule da planta adulta (PI) de *Euterpe oleracea*. A, B, C, D, E e F - 28
Seção transversal. A e B- Aspecto geral do feixe condutor. C- Lignificação das fibras do floema, evidenciado pelo teste de Wiesner, mostrando regiões A, B e C. D- Detalhe da lignificação pelo teste de Wiesner na lamela média e nos ângulos das células. E- Detalhe da lignificação (→), evidenciada pela microscopia de fluorescência. F- Detalhe das paredes celulares constituída de lignina guaiacólica (coloração marrom) nas paredes das fibras do floema (→), evidenciada pelo teste de Maüle. Pa= Parênquima; Fb= Fibras; Fl= Floema; Mx= Metaxilema; Px= Protoxilema; Ac= Ângulo comum às células; Lm= Lamela média; La= paredes polilameladas. Barras: A e C= 200 µm; D e E= 100 µm, B e F= 50 µm.
- Figura 18.** Espectros no infravermelho das regiões das fibras do floema (A e B) da 29
planta jovem em duas condições de tratamento: linhas vermelhas – metanol por 24 horas e linhas azuis – metanol por 24 horas + NaOH 1%).
- Figura 19.** Espectros no infravermelho das regiões das fibras do floema (A, B e C) 31
da planta adulta (PE) em duas condições de tratamento: linhas vermelhas – metanol por 24 horas e linhas azuis – metanol por 24 horas + NaOH 1%).
- Figura 20.** Espectros no infravermelho das regiões dos feixes vasculares (A, B e 32
C) da planta adulta (PI) em duas condições de tratamento: linhas pretas – metanol por 24 horas e linhas azuis – metanol por 24 horas + NaOH 1%).
- Figura 21.** Tratamento alcalino com NaOH 1% dos tecidos levando a formação da 33
lignina-ácido *p*-cumárico.
- Figura 22.** Declínio da concentração do ácido *p*-cumárico da planta jovem e adulta 38
(PI e PE) de *E.oleracea*.
- Figura 23.** Curva de calibração do padrão de ácido *p*-cumárico (A) e perfis 39
cromatográficos do ácido *p*-cumárico(B), planta jovem, planta adulta (PI) e (PE).
- Figura 24.** Formação de lignina em sítios de nucleação (ácido *p*-cumárico). 40
- Figura 25.** Espectro CP/MAS da planta jovem e adulta (PI) e (PE) sem extratos 43

LISTA DE ABREVIACOES E SIMBOLOS

4CL	Hidroxicinamoil: CoA ligase
¹³ C	Carbono-13
C3H	4-Cinamato-4-hidroxilase
C4H	Cinamato-4-hidroxilase
CAD	Cinamil lcool desidrigenase
CCR	Hidroxicinamoil: CoA redutase
CLAE	Cromatografia Liquida de Alta Eficiência
Cm	Centímetro
CP/MAS	Polarização cruzada e ângulo mágico de spin
F5H	Ferulato-5-hidroxilase
FAL	Fenilalanina amnialiase
FT-IR	Infravermelho com Transformada de Fourier
G	Guaiacila
¹ H	Hidrognio
H	Cumarila
HCl	cido clorídrico
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IV	Infravermelho
KBr	Brometo de potássio
M	Metro
M	Molar (mol/L)
MCT	Detector
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
Min	Minutos
NaOH	Hidróxido de sódio
NH ₄ OH	Hidróxido de amnio
Nm	Nanmetro
OMT	5-Adenosil-metionina: cafeato/5-hidroxiferulato-O-metiltransferase
PE	Parte externa
PI	Parte interna
Ppm	Partes por milhão
RD	Reflectância difusa
RMN	Ressonância magnética nuclear
Rpm	Rotações por minuto
S	Siringila
UV	Ultravioleta
µg	Micrograma
µm	Micra
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 <i>Euterpe oleracea</i> Mart.....	3
2.2 Biossíntese da lignina.....	5
2.3 Conexão entre lignina e ácido <i>p</i> -cumárico	10
2.4 Espectroscopia no infravermelho.....	12
2.5 Espectroscopia de RMN de ¹³ C.....	14
2.6 RMN de ¹³ C CP/MAS.....	16
2.6.1 Polarização cruzada	16
2.6.2 MAS – Ângulo mágico de spin.....	16
2.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Preparação do material para estudo anatômico	20
3.1.1 Microscopia de campo claro.....	20
3.1.2 Microscopia de fluorescência	21
3.2 Microespectroscopia no Infravermelho (FTIR).....	21
3.3 Preparação do material para análises químicas.....	22
3.4 Espectroscopia no infravermelho.....	22
3.5 Determinação de ácido <i>p</i> -cumárico na parede celular por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	23
3.6 Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C no estado sólido.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 Estudo da lignificação no caule jovem e adulto de <i>E. oleracea</i> por testes histoquímicos e microscopia de fluorescência	24
4.2 Análises dos espectros de microespectroscopia no infravermelho (FTIR) das fibras do floema no caule jovem e adulto	29
4.3 Análises dos espectros no infravermelho do material caulinar da planta jovem e adulta	36
4.4 identificação e quantificação de ácido <i>p</i> -cumárico por CLAE	37
5. CONCLUSÃO	45
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1. INTRODUÇÃO

A composição química de materiais lignocelulósicos é extremamente complexa sendo formada por substâncias de baixa massa molecular, solúveis em solventes orgânicos neutros e de substâncias de alta massa molecular insolúveis, as quais compõem a parede celular formando uma rede de ligações multimoleculares. Essas substâncias de alta massa molecular formam ligações cruzadas de diversas naturezas (ligação covalente, ligação de hidrogênio e força de Van der Waals). Entre as substâncias que compõem a matriz polimérica da parede celular está a intrigante substância denominada lignina. Na realidade, o termo lignina é originário do latim *lignum* que significa madeira, que preferimos defini-la como macromolécula de origem fenilpropanoídica constituída majoritariamente pelos álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico que incrusta a parede celular da maioria dos vegetais, assim como os espaços entre elas (LEWIS & SARKANEN, 1998).

Recentemente, o reconhecimento da potencialidade da lignina para novos produtos e sua importância para a produção de biocombustível surge com grande perspectiva e prosperidade para o futuro. A propriedade recalcitrante que lhe é peculiar, tem levado os pesquisadores ao desenvolvimento de novos caminhos para desconectá-la da matriz celulósica (MOSIER et al., 2005; HENDRIKS & ZEEMAN, 2008, MARCOS et al., 2013). A degradabilidade da lignina é um tema que converge em metas científicas e tecnológicas para sua utilização, assim como, dos polímeros da parede celular na produção de energia de forma sustentável. Trabalhos científicos que simulam e norteiam situações sintéticas e biológicas têm sido estabelecidos no desenvolvimento como métodos capazes de diminuir a recalcitrância da lignina durante o procedimento para utilização da biomassa para produção de álcool de segunda geração (CORTEZ et al., 2008). Esse desafio faz parte de diversas pesquisas neste contexto que está em conexão com outros componentes da parede celular e muitas vezes de difícil degradação (GRABBER, 2005).

As ligninas de monocotiledôneas, por exemplo, surgem como o mais recente desafio, tendo em vista que para o álcool de segunda geração o bagaço de cana-de-açúcar revelou ser tecnicamente e economicamente viável principalmente na forma de resíduo (SANTOS et al., 2012). As propriedades da lignina como barreira são notáveis pelo fato de que, apesar de cerca de 100 milhões de toneladas de biomassa produzida anualmente, igualando aproximadamente cinco vezes o consumo de energia mundial anual, menos de 1% desta fonte de energia é utilizada comercialmente (BOUDET et al., 2003).

O estudo com a espécie *Euterpe oleraceae* Mart. (Arecaceae), uma monocotiledônea endêmica da flora da Amazônia brasileira (PAULA, 1975), abre novos horizontes para a utilização da matéria prima lignocelulósica florestal com fins energéticos como também servirá para dirimir dúvidas sobre as propriedades da lignina e da parede celular de monocotiledôneas, tendo em vista que seu produto maior é o xarope de açai com grande apelo no mercado alternativo internacional de produtos naturais energéticos saudáveis (MIRANDA et al., 2012). Além disso, a determinação da natureza no âmbito das interações entre lignina-fenol-parede celular é primordial para compreender a biogênese e a degradação dos materiais lignocelulósicos.

Em poáceas por exemplo, os ácidos hidroxicinâmicos são altamente envolvidos no processo de lignificação durante o desenvolvimento da parede celular. Ferulatos e ésteres ferulatos-polissacarídeos são intimamente incorporados à lignina via processos de acoplamento de radicais que tipificam a lignificação, produzindo fortes ligações cruzadas lignina-polissacarídeos da parede celular (RALPH et al., 1995, 1998). Ligninas de outras famílias de monocotiledôneas contém ácido *p*-cumárico conectados também aos núcleos moleculares da lignina por ligações etéricas e de ésteres (SMITH, 1955; NAKAMURA & HIGUCHI, 1976,

1978; RALPH & HELM, 1993). Elucidações dos sítios de ligações de ácido *p*-cumárico à lignina são importantes para entender os mecanismos pelos quais este ácido é incorporado, assim como desconectado da matriz polimérica.

Pressupõe-se que os ácidos hidroxicinâmicos são substâncias muito importantes, não só para a biologia da parede celular, mas também para a sua estrutura, porque podem ser oxidados por peroxidase, compartilhando do acoplamento oxidativo para formar uma variedade de dímeros desidrodiferulatos (Figura 1), formando ligações cruzadas com as cadeias de polissacarídeos (HATFIELD et al., 1999; RALPH et al., 1994; BRETT & WALDRON, 1996). As ligações entre os polímeros nas paredes lignificadas de algumas poáceas contribuem para a baixa digestibilidade em alimentação de animais na maioria das espécies (ERASO & HARTLEY, 1990; GRABBER et al., 1998; IYAMA & LAM, 2001; LAM et al., 2003) (Figura 1).

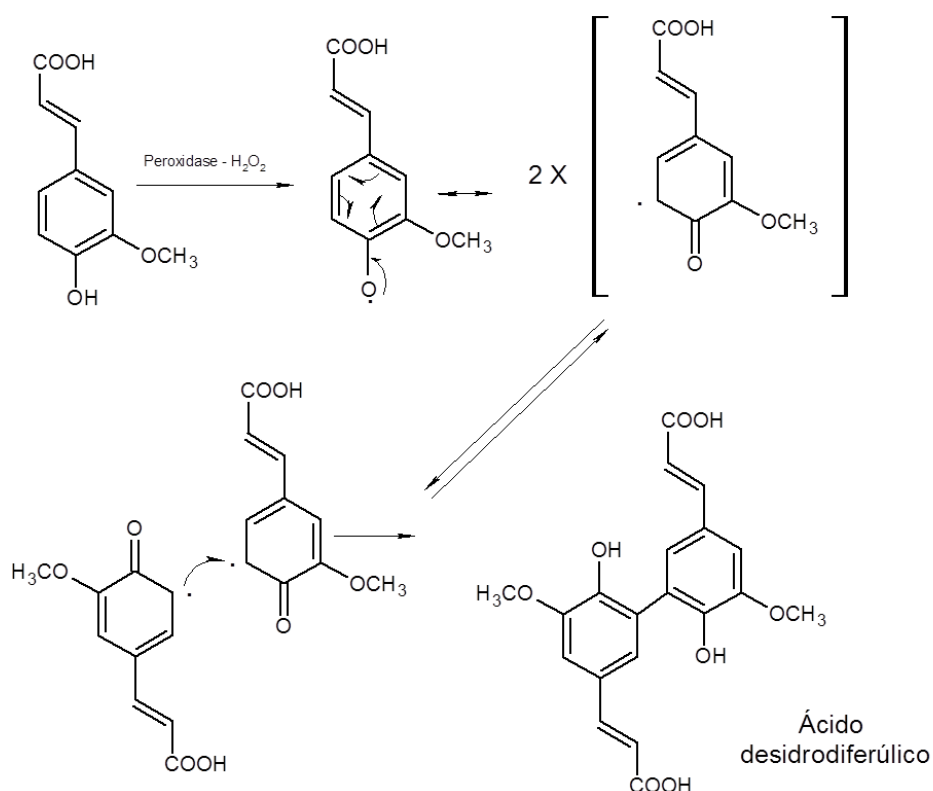


Figura 1. Formação do ácido desidrodiferúlico via oxidação desidrogenativa.

Segundo Hatfield et al. (2008), uma explicação para um alto teor de unidade siringila em ligninas de monocotiledôneas é que esta se liga ao ácido *p*-cumárico da parede celular o que quase não ocorre em gimnospermas e angiospermas dicotiledôneas. Nesse sentido, a atuação de certas enzimas principalmente a cinamil-álcool desidrogenase (CAD) pode refletir também na degradabilidade, diferenciando os tecidos xilemáticos de uma determinada planta.

Diante do exposto, o presente trabalho visa responder as seguintes questões, a saber: *i*) Como ocorre a distribuição topoquímica da lignina nas paredes celulares das fibras de *Euterpe oleracea* (Arecaceae)? *ii*) Qual tipo de ligação entre os monolignóis e os demais componentes da parede celular?

Assim, o objetivo geral do trabalho foi caracterizar anatomicamente o caule, bem como o processo de lignificação e a conectividade lignina-fenol-parede celular (ácido *p*-cumárico) das células que constituem os feixes condutores dos caules jovens e adultos de *Euterpe*

oleracea, compreendendo a caracterização anatômica do caule por microscopia de campo claro e fluorescência; caracterização a distribuição dos monolignóis na parede celular por meio de diferentes técnicas, nos indivíduos jovens e adultos; caracterizando o tipo de lignina das fibras do floema através da microscopia no infravermelho e Ressonância magnética nuclear de ^{13}C no estado sólido nos indivíduos jovens e adultos. A identificação e quantificação da presença do ácido *p*-cumárico nos indivíduos jovens e adultos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Euterpe oleracea* Mart.

A espécie *Euterpe oleracea* Mart. é abundante nas áreas de várzeas da região Amazônica, especialmente no estuário, ocorrendo nos seguintes Estados: Pará, Amazonas, Maranhão e Amapá, e rompendo as fronteiras brasileiras é encontrada na Colômbia, Equador, Guianas e Venezuela (LORENZI et al., 2004; MIRANDA et al., 2012). Conhecida também por açai, açai-do-pará, açai-do-baixo-amazonas, açai-de-touceira, açai-de-planta, açai-da-várzea, juçara, juçara-de-touceira e açai-verdadeiro, pode ser considerada como a espécie mais importante do gênero *Euterpe* pertencente à família Arecaceae (Palmae), dentre as dez registradas no Brasil e as sete que ocorrem na Amazônia (HENDERSON & GALEANO, 1996; SOUZA & LORENZI, 2012).

A espécie *E. oleracea* (Figura 2A) apresenta um caule cespitoso, ereto ou inclinado, de 3-20 m de altura e 7-18 cm de diâmetro, normalmente de cor acinzentada com líquens aderidos, provido de um cone de raízes avermelhadas na base e um palmito liso no topo. Folhas pinadas, planas em número de 8-14 contemporâneas, arqueadas, de 2-3 m de comprimento; bainha de 0,6-1,5 m de comprimento; pecíolo de 17-50 cm de comprimento, com poucas escamas achatadas em relevo, ou às vezes esbranquiçadas na face superior; pinas longo-acuminadas, pêndulas, em número de 40-80 pinas de cada lado, distribuídas regularmente e dispostas num mesmo plano, as da porção mediana de 0,6-1,1 m de comprimento e 2,0-4,5 cm de largura. Inflorescências infrafoliares (abaixo do palmito), com pedúnculo de 5-15 cm de comprimento; bráctea peduncular de 66-95 cm de comprimento; raque (parte ramificada) de 35-70 cm, com 80-160 raquillas de 25-75 cm de comprimento. Frutos globosos ou depressos-globosos de 1-2 cm de diâmetro, lisos, negro-púrpureos, negros ou verdes quando maduros (Figura 2B) (LORENZI et al., 2004).



Figura 2. Planta. (A) e frutos (B) de *Euterpe oleracea* Mart (LORENZI et al., 2004).

O açazeiro tem várias utilizações, tais como: alimentação, produção de celulose, fabricação de casas, ração animal, arborização, medicina caseira e corante natural; no entanto, a principal importância econômica desta espécie é como produtora de palmito utilizado principalmente para a exportação. Estima-se que 95% de todo palmito produzido no Brasil é extraído do açazeiro, sendo usado no preparo de picles, saladas, cremes e ração animal (GOUVÊA, 2007).

O açazeiro vem despertando grande interesse comercial devido às suas perspectivas de aplicação nas indústrias alimentícias, aliada à grande quantidade existente na região Amazônica e à relativa facilidade de extração. Existe um grande número de famílias que sobrevivem dessa palmeira, utilizada não só como alimento, mas como principal fonte de renda pela comercialização; há, portanto, um receio generalizado de que uma exploração desordenada acabe por dizimar os açazeiros (MIRANDA et al., 2012).

Campos et al. (1951) afirmam que a polpa do fruto de “açai” possui 13,4% de lipídeos e 1,25% de protídeos. Altman (1956) verificou no caroço do “açai” 4,34% de proteínas brutas, 12,26% de hemicelulose e 34,41% de celulose. Não consta na literatura, nenhuma informação sobre teor de lignina, bem como o processo de formação da lignina nesta espécie.

Tomlinson & Huggett (2012) vêm pesquisando o tempo de vida ou longevidade dos organismos vivos, determinadas pelo período de tempo em que suas células permanecem funcionalmente e metabolicamente ativas. As palmeiras tem sido alvo de estudos desses autores, porque possuem células vivas que podem ser sustentadas ao longo da vida de um indivíduo.

A título de comparação, na maioria a árvores que possuem vida longa, ou lignophytes, o tronco da árvore é quase inteiramente composto por tecido morto, lenhoso, tecidos do xilema, e em certo aspecto esse órgão permite o suporte das árvores, com apenas um anel interno de células ativamente em divisão. Ao contrário, os troncos de palmeiras são constituídos por células que individualmente vivem por muito tempo, na verdade durante toda a vida de um indivíduo. Então se levanta a questão por quanto tempo pode viver uma palmeira? Os autores apontam que a idade das palmeiras é difícil de determinar, principalmente porque não têm crescimento secundário e, portanto, não formam anéis de crescimento anual

ou sazonal que permita ser mensurado. No entanto, a idade pode ser estimada se avaliada com base na taxa de produção de folhas e/ou cicatrizes visíveis no tronco a partir das folhas caídas (TOMLINSON & HUGGETT, 2012).

Assim, os autores descobriram que várias espécies de palmeiras vivem um longo tempo de 100 até 740 anos. As palmeiras não possuem estrutura secundária provenientes de atividade cambial. Há evidências que diversos tecidos primários presentes nos caules destas plantas mantêm elevada atividade metabólica contínua.

2.2 Biossíntese da lignina

O estabelecimento das plantas para o ambiente terrestre, imediatamente levaram-nas a confrontarem vários desafios importantes, incluindo a exposição à radiação pelo UV-B, do qual a água protegia seus ancestrais. A falta de suporte estrutural, que uma vez era fornecida pela flutuabilidade, em meio terrestre, o estresse, a desidratação e eventualmente a presença de herbívoros e patógenos, conduziram-nas ao desenvolvimento de uma substância que representasse a capacidade de resistência aos fatores provenientes desse novo meio (RAVEN, 1984; WENG & CHAPPLE, 2010).

De acordo com Weng & Chapple (2010), a planta gerou uma série de vias metabólicas especializadas para lidar com as situações de estresse, dentre as quais o metabolismo fenilpropanoídico de onde foi adquirida a capacidade de desaminar a fenilalanina e hidroxilar o anel aromático de metabólitos subsequentes.

Embora a presença de metabolismo fenilpropanoide em plantas terrestres primitivas tenha facilitado seu movimento terrestre, estas ainda permaneceram pequenas devido à falta de reforço mecânico (BATEMAN et al., 1998). A ascensão das traqueófitas somente foi possível devido ao desenvolvimento da capacidade de sintetizar moléculas fenilpropanoídicas para a formação de lignina na parede celular e iniciar assim a dominância sobre o ecossistema terrestre.

A lignificação é um processo conjunto de mecanismos bioquímicos, químicos e biológicos e determinados durante o período de crescimento celular. Nas espécies arbóreas, o xilema secundário é formado pelo câmbio vascular (GROOVER, 2005). Segundo Donaldson (2001), o processo de lignificação começa na lamela média nos ângulos comuns às células e na S1, estendendo-se às camadas S2 e S3 em direção ao lume. Normalmente as plantas detêm mecanismos coordenados de deposição da lignina, assim sua síntese obedece aos conceitos da topoquímica (sítio de deposição de lignina na parede celular) onde o tempo e local de deposição podem ser afetados endógena e exogenamente (DONALDSON, 2001).

A lignina constitui uma classe de macromoléculas fenólicas de alta complexidade molecular formada através de acoplamentos dos radicais dos álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (TERASHIMA, 2000; ANTEROLA & LEWIS, 2002; BOERJAN et al., 2003). A lignina ocorre em pteridófitas, gimnospermas e angiospermas (mono e dicotiledôneas), conforme sua constituição composicional e estrutural (PEREIRA et al., 2012).

Estas macromoléculas são depositadas predominantemente nas paredes secundárias espessadas, tornando-as rígidas e impermeáveis. Além da deposição programada da lignina, a sua deposição também pode ser induzida em várias condições de estresses bióticos e abióticos, tais como infecção, ferimentos, patógenos, estresse metabólicos e perturbações na estrutura da parede celular (CAÑO-DELGADO et al., 2003; TRONCHET et al., 2010).

Alguns artigos de revisão sobre este tema podem ser encontrados na literatura sobre a biossíntese da lignina (HIGUCHI, 1990; BOUDET, 2000; DONALDSON, 2001; KARKONEN & KOUTANIEMI, 2010; VANHOLME et al., 2010). A formação da lignina e sua deposição envolvem uma série de enzimas organizadas geralmente em superfamílias, tais

como oxigenases, ligases, oxireduases e transferases (VOGT, 2010), em que milhões de anos foram necessários para melhorar sua especialização, as quais foram centralmente oriundas do metabolismo primário (KAPLAN et al., 2010).

Para facilitar o entendimento do mecanismo de formação, a biossíntese da lignina foi dividida em duas fases: a fase enzimática e a fase não enzimática ou semi-enzimática. Compreende a fase enzimática a via do chiquimato que envolve a condensação de dois intermediários do metabolismo dos carboidratos: fosfoenol piruvato produto da glicólise e 4-fosfato de eritrose da via da pentose-fosfato que é catalisada pela enzima 3-deoxi-D-arabino-heptulonato-7-fosfato sintase que forma a substância 3-deoxi-D-arabino-2-heptulonato-7-fosfato até a formação dos fenilpropanoides que se inicia a partir da fenilalanina e envolve sucessivas reações de hidroxilação do anel aromático, seguida de O-metilação fenólica e conversão do grupo carboxílico em álcool (HERRMANN, 1995; BOERJAN, et al., 2003; BARBER & MITCHELL, 1997).

A rota do chiquimato conduz à produção dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, constitui uma parte do metabolismo que é encontrado apenas em microrganismos e em plantas, nunca em animais (HERRMAN & WEAVER, 1999). A rota é, portanto, um alvo importante para herbicidas (KISHORE & SHAH, 1988), antibióticos, e vacinas vivas (O'CALLAGHAN et al., 1988).

Ao formar a molécula de chiquimato, esta é fosforilada através da enzima chiquimato quinase, formando a substância 3-fosfochiquimato. A penúltima enzima envolvida nesta etapa, a 3-fosfochiquimato-1-carboxiviniltransferase catalisa a formação de 5-O-(1-carboxivinil)-3-fosfochiquimato que, por sua vez, é sintetizado a corismato através da enzima corismato sintase, conforme mostra a Figura 3.

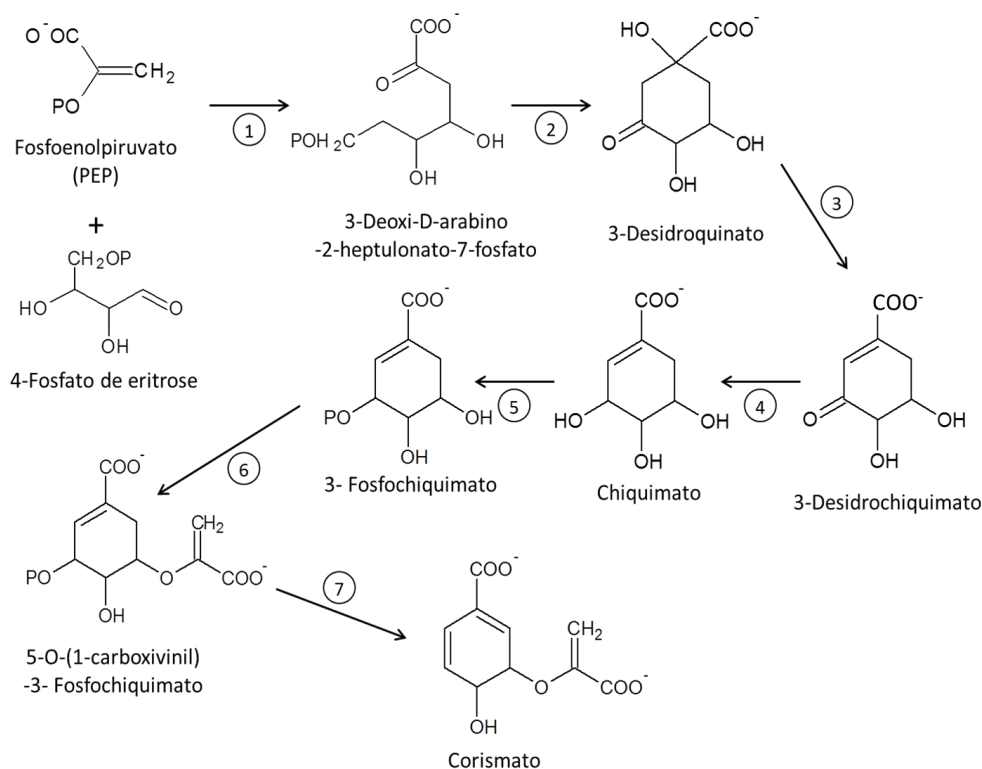


Figura 3. Via metabólica chiquimato-corismato: 1) 3-Desoxi-D-arabino-heptulonato-7-fosfato sintase; 2) 3-Desidroquinato sintase; 3) 3-Desidroquinato desidratase; 4) Chiquimato desidrogenase; 5) Chiquimato quinase; 6) 3-Fosfochiquimato-1-carboxiviniltransferase; 7) Corismato sintase (CHIQUIMATO, 2012).

Em plantas, o corismato é um precursor comum de pelo menos quatro ramos de vias metabólicas, levando à formação de triptofano, fenilalanina/tirosina, salicilato/filoquinona e folato. Esses aminoácidos também servem como precursores de uma grande variedade de produtos naturais de plantas que desempenham papéis cruciais como crescimento, desenvolvimento, reprodução, defesa, e respostas ambientais (MAEDA & DUDAREVA, 2012).

O aminoácido triptofano é sintetizado a partir de cinco reações enzimáticas iniciando-se com a ação da enzima antranilato sintase. No outro ramo da via, ocorre a conversão de corismato formando prefenato pela ação da enzima corismato mutase (VARISI, 2007). Em seguida, ocorre a transaminação do prefenato à arogenato através da enzima prefenato aminotransferase.

A via biossintética principal para tirosina só difere da fenilalanina no último passo onde, a enzima arogenato desidrogenase catalisa a descarboxilação do arogenato à tirosina (VELISEK & CEJPPEK, 2006; POULIN, 2011), enquanto que para a formação da fenilalanina ocorre uma descarboxilação e desidratação do arogenato pela enzima arogenato desidratase (CHO et al., 2007; MAEDA et al., 2010). Em monocotiledôneas, a enzima fenilalanina amonialíase (FAL) aceita tanto a fenilalanina quanto a tirosina como substratos, embora a eficiência catalítica seja mais baixa para tirosina; entretanto, a enzima tirosina amônialíase supre essa deficiência (ABREU, 1994; GLEASON & CHOLLET, 2012).

As enzimas que atuam na formação dos precursores da lignina e suas especificidades estão descritas na Tabela 1. Um esquema da via fenilpropanoide que representa a formação dos precursores finais da lignina está apresentado na Figura 4.

Tabela 1. Enzimas que atuam sobre a formação dos precursores da lignina (adaptado de PEREIRA et al., 2012).

Sigla	Enzima	Função
FAL	Fenilalanina amônialíase	Desaminação mediando à formação do cinamato
C4H	Cinamato-4-hidroxilase	Conversão do ácido cinâmico a ácido <i>p</i> -cumárico
C3H	4-Hidroxicinamato-3-hidroxilase	Hidroxilação do <i>p</i> -cumarato
F5H	Ferulato-5-hidroxilase	Responsável pela 5-hidroxilação do ferulato
OMT	5-Adenosil-metionina:cafeato/5-hidroxiferulato-O-metiltransferase	Enzima bifuncional. Metila o cafeato e o 5-hidroxiferulato ou os tios ésteres correspondentes.
4CL	Hidroxicinamoil: CoA ligase	Catalisa a formação de ésteres CoA do <i>p</i> -cumarato, cafeato, ferulato, 5-hidroxiferulato e sinapato.
CCR	Hidroxicinamoil: CoA redutase	Catalisa a conversão de ésteres de cinamoil-CoA para cinamaldeído, sendo a primeira da parte específica da biossíntese da lignina.
CAD	Cinamil álcool desidrogenase	Catalisa o último passo da biossíntese do monolignol, isto é, a redução de aldeído ao álcool correspondente.

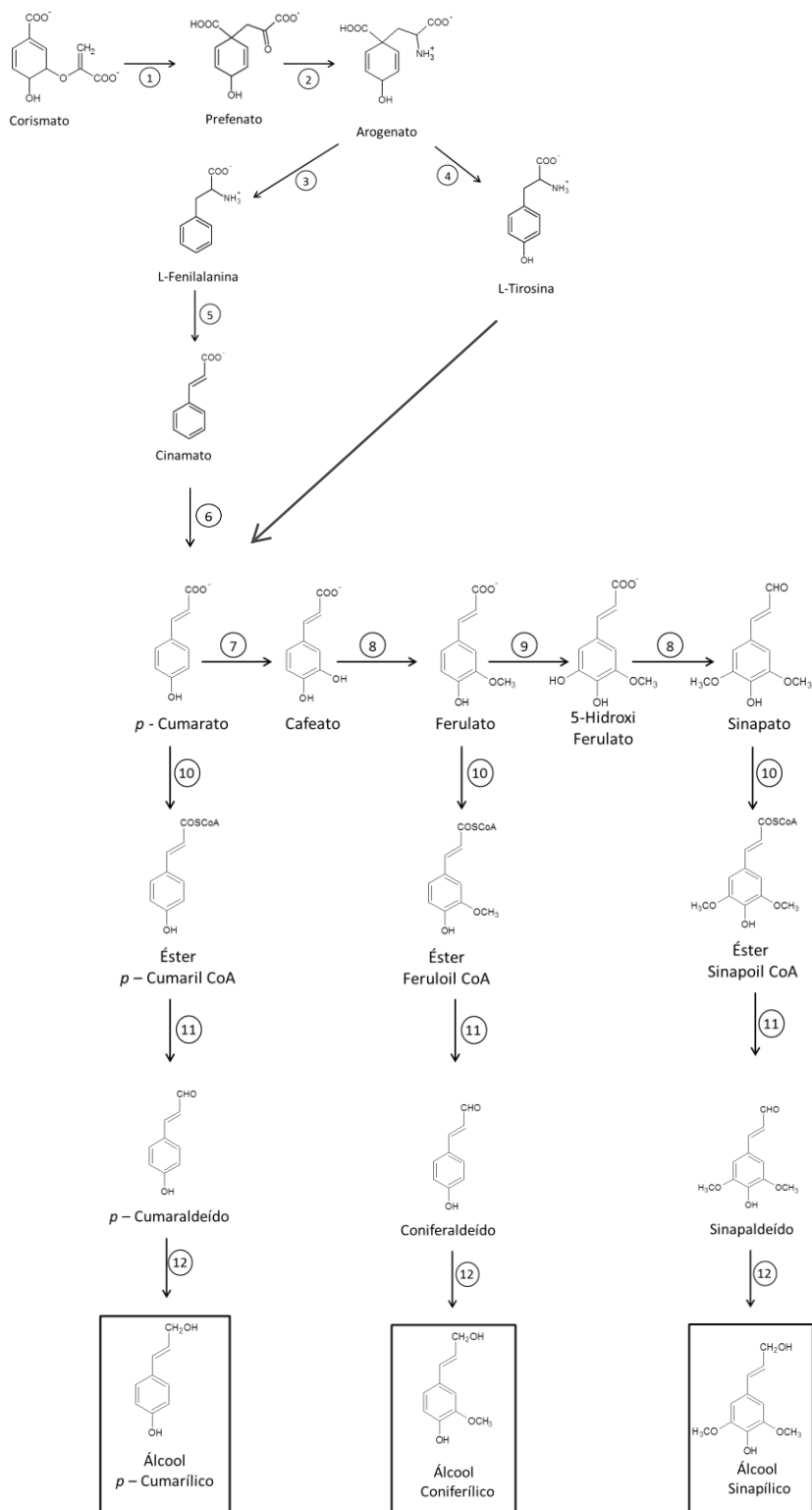


Figura 4. Via biossintética do corismato aos precursores finais da lignina: 1) Corismato mutase; 2) Prefenato aminotransferase; 3) Arogenato desidratase; 4) Arogenato desidrogenase; 5) Fenilalanina amonialfise (FAL); 6) Cinamato 4-hidroxilase (C4H); 7) Cumarato 3-hidroxilase (C3H); 8) *O*-Metiltransferase (OMT); 9) Ferulato 5-hidroxilase (F5H); 10) 4-Cumarato-CoA ligase (4CL); 11) Cinamoil-CoA redutase (CCR); 12) Cinamil Álcool desidrogenase (CAD). (WHETTEN & SEDEROFF, 1995; LEWIS & SARKANEN, 1998).

A abundância relativa dos precursores finais da lignina depende da espécie, tecido, estágio de desenvolvimento e localização subcelular. Por exemplo, ligninas isoladas a partir de angiospermas (dicotiledônea) são constituídas de unidades guaiacila e siringila e gimnospermas de unidades cumarila e guaiacila, enquanto que ligninas de monocotiledôneas são compostas de todas as três unidades (LEWIS & YAMAMOTO, 1990; CROCKER, 2010).

Ralph et al. (2007) afirmam que em gimnospermas e algumas angiospermas, glicosídeos de monolignóis (4-O- β -D-glicosídeos) acumulam em altos níveis em tecido cambial. A existência desses monolignóis glicosilados permite pressupor que estes são formas de armazenagem ou transporte. A enzima transferase permite a glicosilação e a enzima β -glicosidase a formação de álcool coniferílico, regulando a armazenagem e mobilização de monolignóis (Figura 5). A rota de transporte dos monolignóis para a parede celular permanece ainda sob investigação (RALPH et al., 2007).

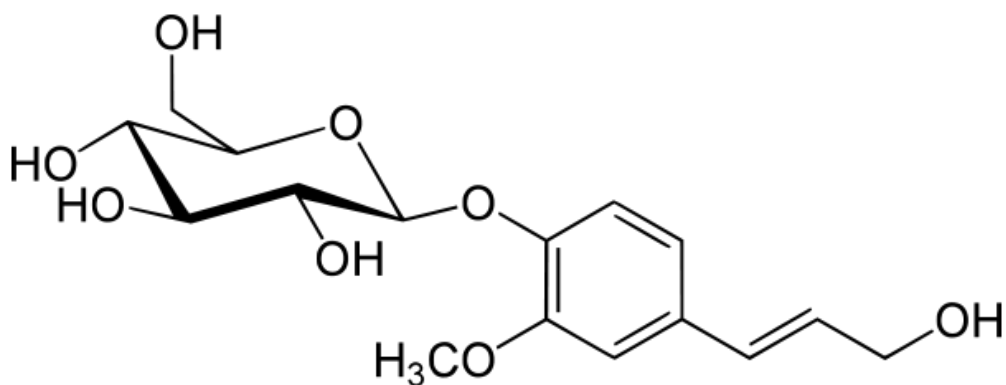


Figura 5. Estrutura molecular de coniferina.

Após a biossíntese dos monolignóis finais da lignina, estes são translocados para a parede celular. Em uma proposta, os monolignóis são translocados através da membrana plasmática por meio de suas formas 4-O-glicosiladas, nas quais são desglicosiladas por β -glicosidases quando chegam à parede celular. Em outra proposta, os monolignóis são transportados à membrana plasmática através de vesículas derivadas do complexo de Golgi (VANHOLME et al., 2010). Segundo Boija & Johansson (2006), os álcoois coniferílico e sinapílico podem ter a capacidade de difusão através da membrana plasmática.

Uma vez no apoplasto, os monolignóis sofrem polimerização desidrogenativa via mediação por oxidases, para desencadear o processo de acoplamento dos radicais fenólicos formados (Figura 6) (GRABBER et al., 2004).

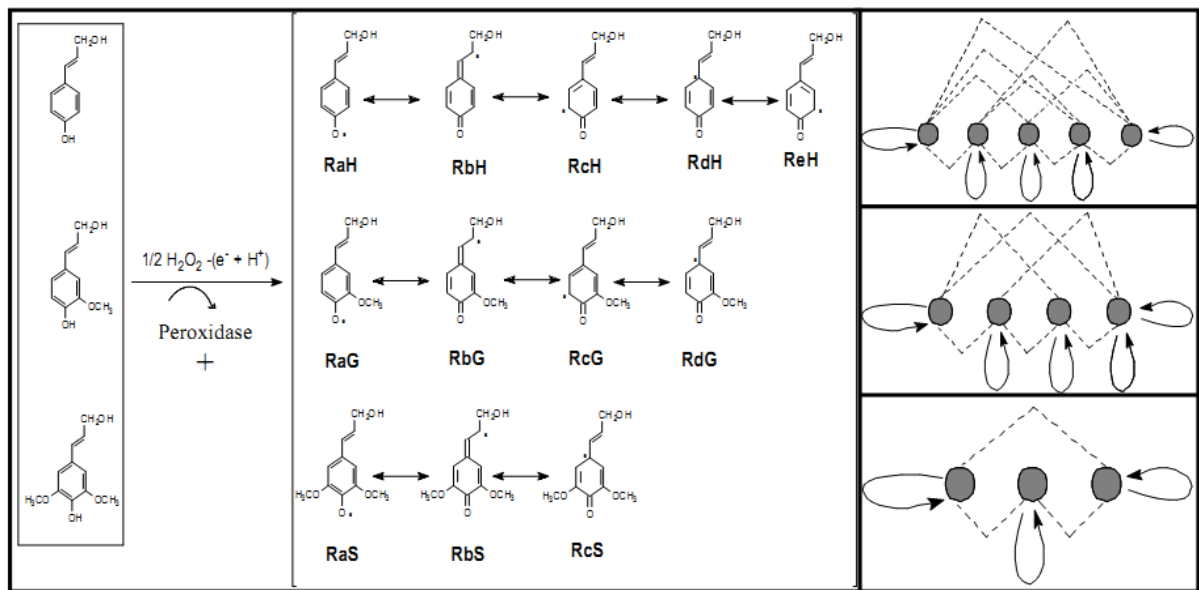


Figura 6. Inicialização da polimerização da lignina na parede celular envolvendo os precursores: álcool *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico, respectivamente (MONTEIRO et al., 2004).

Ralph et al. (2007) afirmam que a desidrogenação dos monolignóis à radicais tem sido verificada com diferentes classes de proteínas, sendo as peroxidases e lacases as mais comuns no processo. Peroxidases utilizam peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e lacases utilizam oxigênio para oxidar seus substratos.

Os radicais fenólicos resultantes são relativamente estáveis devido ao sistema conjugado do anel aromático com a cadeia lateral, permitindo o deslocamento do elétron não emparelhado nas estruturas fenólicas. Subsequentemente, duas estruturas radicalares simples podem acoplar entre si para formar um desidrodímero, estabelecendo assim uma ligação covalente entre as duas subunidades. Radicais monolignóis favorecem o acoplamento nas suas posições β , resultando essencialmente em apenas dímeros β - β , β -O-4, e β -5 entre outros. (VANHOLME et al., 2010).

Até o presente momento, todos os genes da via de monolignóis foram regulados ou reprimidos proporcionando uma nova percepção da lignificação normal e perturbada e, por vezes fornecendo materiais de plantas com eficiências de conversão melhoradas em processos tais como a produção de pasta química de celulose, a sacarificação e fermentação da biomassa e a digestibilidade dos ruminantes. Embora muitos estudos tenham demonstrado os efeitos benéficos da engenharia genética sobre a biossíntese da lignina nas aplicações de uso final, tais como a produção de pasta celulósica e etanol, poucos estudos têm sido avaliados com plantas modificadas cultivadas no campo (BOERJAN, 2005; KAWAOKA et al., 2006; HOPKINS et al., 2007; LEPLÉ et al., 2007; WADENBÄCK et al., 2008; WEI et al., 2008; WALTER et al., 2010).

2.3 Conexão entre lignina e ácido *p*-cumárico

Hartley (1990) constatou a presença de dímeros constituídos unicamente por ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico ou pelos dois ácidos na parede celular. Estes dímeros estão, sobretudo, presentes nas poáceas, existindo também em outros táxons, representando cerca de um décimo dos monômeros encontrados em todas as forrageiras estudadas (ERASO & HARTLEY, 1990). A conexão lignina-ácido *p*-cumárico-parede celular tem sido muito

estudada principalmente com relação à alimentação de animais ruminantes e com a utilização dos resíduos lignocelulósicos para a produção do álcool de segunda geração.

Em poáceas, o teor de ácidos *p*-hidroxicinâmicos tem uma influência importante na recalitrância (propriedade de resistência à degradação da parede celular) (LAM et al., 2003), nos quais incluem o ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido cafeico e ácido sinápico. O ácido *p*-cumárico é integrado à planta através da parede celular durante o desenvolvimento da parede secundária. À medida que a lignificação se inicia, grandes quantidades de ácido *p*-cumárico são depositadas e esterificam a lignina na parede celular secundária (JUNG & VOGEL 1992; RALPH et al 1994). Por esse motivo, este é considerado como um indicador da deposição de lignina nas paredes celulares (DU, 2008).

Em estado livre, ou seja, sem conectividade com qualquer substância da parede celular, o ácido *p*-cumárico, pode proteger as plantas do UV da luz solar que causa danos pela radiação (BLOKKER et al. 2006), é um agente extremamente tóxico que protege as paredes celulares de plantas contra o ataque de microrganismos patogênicos e degradação microbiológica (KROON & WILLIAMSON, 1999) e um grande agente antioxidante reconhecido como sendo um produto importante para a indústria farmacêutica, bem como para a saúde humana como medicamento contra o câncer de estômago (ABDEL-WAHAB et al., 2003).

Ésteres *p*-cumarato ligados à lignina não participam extensivamente nas reações de acoplamento oxidativo, e permanecem mais como unidades terminais com um grupo fenólico livre e uma cadeia lateral insaturada (RALPH et al., 1994). Altos níveis de *p*-cumarato esterificados com lignina têm sido descritos para poáceas, mas isto pode resultar, em parte, devido à dificuldade de hidrolisar totalmente os ésteres *p*-cumarato nas paredes lignificadas (HARTLEY & MORRISON, 1991).

A proposta de que o ácido *p*-cumárico funciona como um centro de nucleação é bem aceita entre os pesquisadores que estudam monocotiledôneas, tendo em vista que o ácido *p*-cumárico e/ou ferúlico funcionam como âncoras que se ligam a ligninas junto à parede celular, (JUNG, et al. 1993; LEWIS & SARKANEN, 1998; RALPH, 2010). O último autor citou a ocorrência de diferentes ligações em ligninas de espécies de monocotiledôneas, que se diferem estruturalmente da lignina convencional. Há também menções sobre ligninas anormais produzidas por plantas mutantes ou transgênicas (HIGUCHI et al. 1994; RALPH et al. 1997; OSAKABE et al. 1999; LAPIERRE et al. 2000).

Experiência com cultura de células elicidadas com diferentes monolignóis podem gerar lignina H, H-G, G-S *in vitro*, porém isso não influencia na degradabilidade; portanto, não são modificações composicionais as responsáveis pela menor degradabilidade. Plantas deficientes em cinamil álcool desidrogenase (CAD) são consideradas importantes devido ao aumento de até 50% no nível de degradabilidade do que em uma composição cuja CAD é altamente ativa (BAUCHER et al., 1999; PROVAN et al., 1997; THORSTENSSON et al., 1992; VAILHE et al., 1998). Plantas com CAD deficiente tendem a ter elevado nível de *p*-hidroxicinamaldeído, pois a enzima catalisa a reação do *p*-hidroxicinamaldeído para formar os seus correspondentes álcoois (GRABBER, 2005). Outras modificações que acompanham a deficiência de CAD imprimem reduzida quantidade de éster *p*-cumarato e éster ferulato e reduzida composição de lignina S e G e o aumento na deposição de cinamaldeído (KIM et al, 2003;. PROVAN et al, 1997;. VAILHE et al, 1998), cuja lignina é mais insolúvel e hidrofóbica.

Para Grabber (2005) a degradabilidade não é só devido à presença de aldeído e sim de outras características estruturais. Aumento da deposição de unidades fenólicas (benzaldeído, cinamaldeído e respectivas unidades S e G) com seus efeitos inibidores sobre a degradabilidade da célula principalmente na proteção contra doenças de plantas (GRABBER, 2005).

Os mecanismos que controlam esse processo ainda não estão totalmente resolvidos,

mas estão provavelmente regulados pela interação entre a expressão espaço-temporal dos genes que expressam a biossíntese dos monolignóis, a cinética de transferência dos monolignóis para a parede celular e a química de acoplamento dos monolignóis para o polímero em crescimento, seja no núcleo molecular como na região de fronteira (RALPH et al., 2007).

2.4 Espectroscopia no infravermelho

Segundo Lima et al. (2009), a radiação na região do infravermelho foi descoberta por William Herschel, um astrônomo inglês que, em 1800, estava investigando qual a cor da radiação solar produzia calor. Ele empregou um prisma de vidro, transparente à radiação, para decompor a luz branca do sol em seus comprimentos de onda visíveis e, com o auxílio de um termômetro com um bulbo enegrecido, pôde verificar a temperatura produzida por cada cor. Surpreendentemente, a mais intensa variação de temperatura foi observada quando o termômetro foi colocado logo acima da região vermelha do espectro. Herschel chamou esta radiação de “raios caloríficos”, que mais tarde foi denominada Infravermelho.

A espectroscopia no infravermelho (IV) é certamente uma das técnicas analíticas mais importantes para o químico moderno. Sua aplicação envolve o estudo de polímeros, identificação de substâncias inorgânicas e orgânicas, análise de misturas complexas como gasolina e poluentes atmosféricos, controle de qualidade de produtos diversos, estudo de semicondutores, transporte de moléculas bioativas em tecidos vivos, mecanismo de catálise, etc (BARBOSA, 2008). É estabelecida para identificar, de forma não destrutiva e dentro de poucos segundos, os grupos funcionais das moléculas. Pertence à classe das espectroscopias vibracionais porque explora vibrações moleculares. Convenientemente, a frequência é dada em número de onda definido como o recíproco do comprimento de onda. Cada sinal ou faixa vibracional, no espectro corresponde à vibração de uma parte de uma molécula da amostra. Moléculas experimentam uma variedade de movimentos vibracionais, característica de seus átomos componentes e ligações químicas (HUMBERT & QUILÉS, 2011).

A energia denominada infravermelho corresponde à região do espectro eletromagnético situada na faixa de número de ondas entre 14290 e 200 cm^{-1} . A região que apresenta número de ondas entre 4000 – 400 cm^{-1} é a mais utilizada pelos químicos orgânicos, sendo denominada *infravermelho médio*. A região chamada de *infravermelho próximo*, 14290 a 4000 cm^{-1} , tem recebido recentemente muita atenção, em particular com as análises quantitativas de amostras com matrizes complexas (BARBOSA, 2008).

O avanço da espectroscopia no IV médio, como técnica para análise qualitativa e quantitativa, deve-se à combinação da transformada de Fourier e da nova geometria dos espectrofotômetros com a utilização do interferômetro de Michelson, tornando-os mais rápidos e robustos (DURING & SULLIVAN, 1990; EIKREM, 1990; KALASINSKY, 1990; COATES, 1998).

Os tipos mais simples, ou modos, de movimento vibracional em uma molécula, ativa no infravermelho, que dão origem a absorções, são as formas de estiramento e dobramento (Figura 7). Contudo, outros tipos mais complexos de estiramento e dobramento são mais ativos. Em geral, vibrações de estiramento assimétrico ocorrem em frequências mais altas do que vibrações de estiramento simétrico e as vibrações de estiramento ocorrem em frequência mais altas do que vibrações de dobramento (PAVIA et al., 2010). Os termos *scissoring*, *wagging* e *twisting* (Figura 7) são comumente usados na literatura científica para descrever tipos de deformações vibracionais (PAVIA et al., 2010).

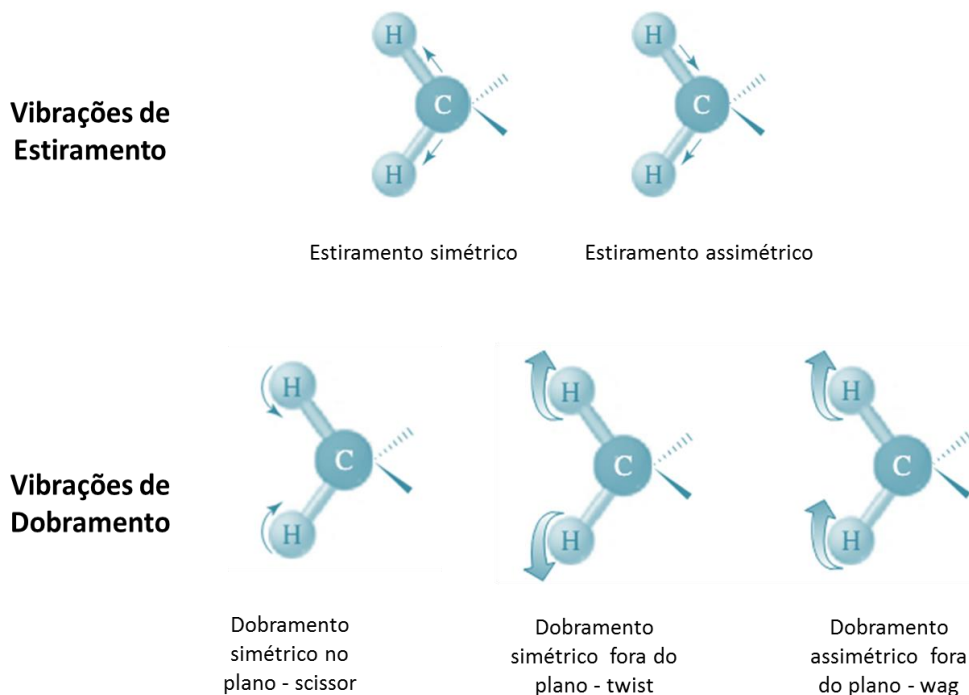


Figura 7. Tipos de movimento vibracional em uma molécula (adaptado de BRUCE, 2005).

Segundo RIBEIRO (2009), a técnica envolve a aquisição de um espectro de absorvância/reflectância depois que a radiação no infravermelho próximo penetra em uma amostra. A reflectância da luz para cada comprimento de onda é medida com um espectrofotômetro, sendo utilizada para o cálculo da absorção. O espectro de absorção obtido dá informações sobre as moléculas ou grupos moleculares envolvidos (SO et al., 2004) sendo comparado com medidas obtidas usando técnicas analíticas convencionais como a análise multivariada. MOUSSAOUI et al. (2006), afirma que a desvantagem é a complexidade dos espectros IV.

Dentre as principais técnicas experimentais se destacam a transmitância e reflectância (BÖRJESSON et al., 2007). Segundo Naumann (2000), Lin & Dence (1992), o espectro por transmitância pode ser obtido a partir de soluções líquidas, suspensões, filmes viscosos ou sólidos colocados nas placas transparentes adequadas para o infravermelho. Os espectros no infravermelho são normalmente registrados pelo modo de transmitância, no qual, o feixe de infravermelho passa através da amostra e a intensidade de IV é mensurada. No entanto, para alguns estudos o modo mais apropriado é o modo de Reflectância Difusa (HUMBERT & QUILÈS, 2011).

O modo de reflectância pode ser usado para as mesmas amostras que a transmitância. As amostras são colocadas em aparatos que refletem a luz ao invés de transmiti-la (prata, ouro ou aço inoxidável polido), o que leva a uma passagem dupla, ou para dispositivos especiais de reflectância, uma multipassagem do infravermelho através da amostra. O fenômeno no qual a luz é refletida em diferentes direções é denominado Reflectância Difusa (RD) (LIN & DENCE, 1992). Esta técnica é bem adequada para a caracterização da superfície de madeira e da determinação de lignina em madeiras e materiais lignocelulósicos em geral (LIN & DENCE, 1992). Essa técnica é regida pela equação de Kubelka-Munk (K-M), que garante que a técnica de Reflectância Difusa mantém uma relação direta entre a absorção e a concentração da amostra (ABREU, 1995).

Por conseguinte, o estudo do desenvolvimento e diferenciação dos tipos de células individuais, e da sua resposta a estímulos externos, é extremamente difícil. No entanto, o uso no microespectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) permite o estudo de alterações localizadas na composição da parede celular e da estrutura das células individuais e da comparação destes com tecidos diferentes (STEWART, 1996).

O microscópio FT-IR foi inventado em 1949, mas continuou a ser uma curiosidade até a adição de técnicas de transformada de Fourier, em 1982 (REFFNER & MARTOGLIO, 1995). Seu uso tornou-se então muito difundida em toda ciência forense e de materiais (BEAUCHAINE et al, 1988; ALLEN, 1992). Em contrapartida, a aplicação desta técnica para ciências da planta tem sido relativamente limitada e só agora está se tornando mais comum (STEWART, 1996).

O primeiro espectro no infravermelho de ligninas foi publicado em 1948 (MICHELL & HIGGINS, 2002). Os dados específicos sobre análise no infravermelho da lignina podem ser encontrados no livro de Lin & Dence (1992) páginas 92 e 93.

2.5 Espectroscopia de RMN de ^{13}C

O estudo dos núcleos de carbono por meio da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica importante para determinar as estruturas e na dinâmica de moléculas orgânicas em solução e em estado sólido (KAISER, 2000). Combinando dados de espectros no infravermelho, RMN de ^1H e o RMN de ^{13}C , conseguem-se determinar a estrutura completa de substâncias desconhecidas. Os espectros de ^{13}C servem para determinar o número de carbonos não equivalentes e para identificar os tipos de átomos de carbono (metila, metileno, aromático, carbonila e outros) presentes em uma substância. Assim a RMN de carbono oferece informações diretas sobre o esqueleto do carbono de uma determinada molécula (CAREY, 2008).

Os primeiros estudos com aplicação da técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) aplicada a polímeros ocorreram por volta dos anos 60 com o RMN de ^1H . Com o avanço da técnica que primeiramente utilizava espectrômetros de onda contínua para equipamentos que operam no modo pulsado com transformada de Fourier, foi possível avaliar com melhor precisão e sensibilidades outros núcleos magnéticos, como por exemplo, o carbono-13 (^{13}C). Isto proporcionou um avanço da utilização desta técnica para a caracterização de polímeros (PAVIA et al., 2010).

Atualmente, a espectroscopia de RMN de alta resolução sendo a técnica que proporciona um maior número de informações, tanto qualitativas quanto quantitativas, sobre a microestrutura dos polímeros tanto em solução, como em gel ou no estado sólido.

Embora o ^{13}C corresponda a apenas 1,1% do carbono natural, o fato do núcleo desse isótopo de carbono provocar um sinal de RMN tem grande importância para a análise de substâncias orgânicas. Tal situação, apesar de parecer muito restrita, é possível uma vez que o principal isótopo do carbono, o ^{12}C , com abundância natural de cerca de 98,9%, não tem spin magnético, e por isso não tem capacidade de gerar sinais de RMN. De certa maneira, os espectros de RMN de ^{13}C são, usualmente, menos complicados que os espectros de RMN de ^1H e mais fáceis de interpretar. Devido ao fato de o ^{13}C existir naturalmente em percentagem tão baixa, os sinais de RMN gerados pelos seus núcleos, em analogia com os sinais gerados pelos núcleos dos prótons, não poderiam ser visualizados no espectro. Porém, a técnica utilizada nos aparelhos de RMN de ^{13}C consiste em irradiar um pulso curto e potente de radiofrequência, que excita todos os núcleos de ^{13}C existentes na amostra. Os dados são então digitalizados automaticamente e guardados num computador numa série de pulsos repetidos, construindo desta forma os sinais (PAVIA et al., 2010).

Ao contrário do espectro de RMN de ^1H , que necessita apenas de algumas miligramas de amostra, na RMN de ^{13}C é preciso de 10 a 200 mg de lignina em 0,4 ml de solvente deuterado. Essa grande diferença é necessária para compensar a baixa percentagem de ^{13}C , e permitir a acumulação de sinais. Além disso, enquanto no espectro de RMN de ^1H a faixa de absorção magnética dos prótons varia de 0 a 10 ppm, eventualmente 14 ppm, no espectro de RMN ^{13}C a faixa varia de 0 a 240 ppm.

A comparação com o hidrogênio seu campo magnético deve ser 4 vezes maior para registrar sua ocorrência, por saber que a constante magnetogírica do carbono é 4 vezes menor do que a do hidrogênio. Os estados energéticos dos spins do ^{13}C é $+1/2$ e $-1/2$, em um campo Magnético sendo o primeiro alinhado e o segundo oposto ao campo magnético externo. No esquema abaixo se pode de forma simplificada entender o mecanismo de absorção de energia dos spins do átomo de ^{13}C em um campo Magnético B_0 (Figura 8). Atualmente, os espectrômetros são conhecidos como RMN-FT pulsados, que facilita a absorção, tendo em vista que a transformada de Fourier tem sido utilizada graças à sofisticação dos softwares computacionais. Sob um campo magnético os núcleos de ^{13}C precessam nas suas respectivas fases de spin $+1/2$ e $-1/2$ (Figura 8).

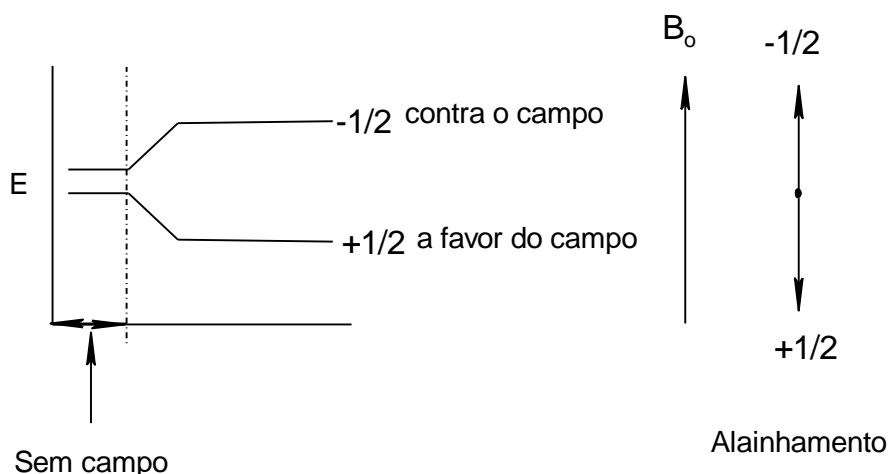


Figura 8. Estado energético de um núcleo de hidrogênio na ausência e presença de um campo magnético externo (PAVIA et al., 2010).

A ressonância de ^{13}C atualmente se apresenta com várias tecnologias de obtenção de espectros. Espectros unidimensionais desacoplados e DEPT, assim como dos espectros bidimensionais, como os espectros monoacoplados e heteroacoplados, como HETCOR - Correlação de Deslocamento Químico Heteronuclear, HMQC e HSQC - Correlação Heteronuclear de Múltiplos Quanta e Correlação Heteronuclear de Único Quantum, respectivamente, entre outras técnicas. Entretanto, tais ferramentas se aplicam em espectros registrados de amostras no estado líquido, comuns para substâncias de baixa massa molecular com solubilidade ótima em solventes principalmente orgânicos neutros e na maioria deuterados. Neste caso, a maioria de substâncias denominada de extrativos são aptas para registro espectral utilizando solvente, o que para materiais insolúveis como a madeira torna-se difícil o registro dos espectros. O advento da técnica CP/MAS (polarização cruzada e ângulo mágico de spin) trouxe condições satisfatórias para análise de madeiras, lignina, celulose, e outros materiais de interesse (LIN & DENCE, 1992).

2.6 RMN de ^{13}C CP/MAS

2.6.1 Polarização cruzada

A polarização cruzada pode ser alcançada por seqüência de pulsos interrompidos para hidrogênio que permite a transferência de magnetização de um núcleo mais abundante como o de hidrogênio para um núcleo mais escasso como no caso do ^{13}C , sem o qual a relação sinal ruído não permitiria a observação dos sinais, influenciando no tempo de decaimento (T1), ou seja, transferência. Uma sequencia como a descrita na Figura 9 pode ser interpretada com seqüências de pulso de modo a manter o travamento do spin do hidrogênio durante a transferência de magnetização; isso acontece enquanto a magnetização do próton permanece com o spin travado e um segundo transmissor de radio frequência é ligado na frequência do ^{13}C por um tempo de contato (t_c).

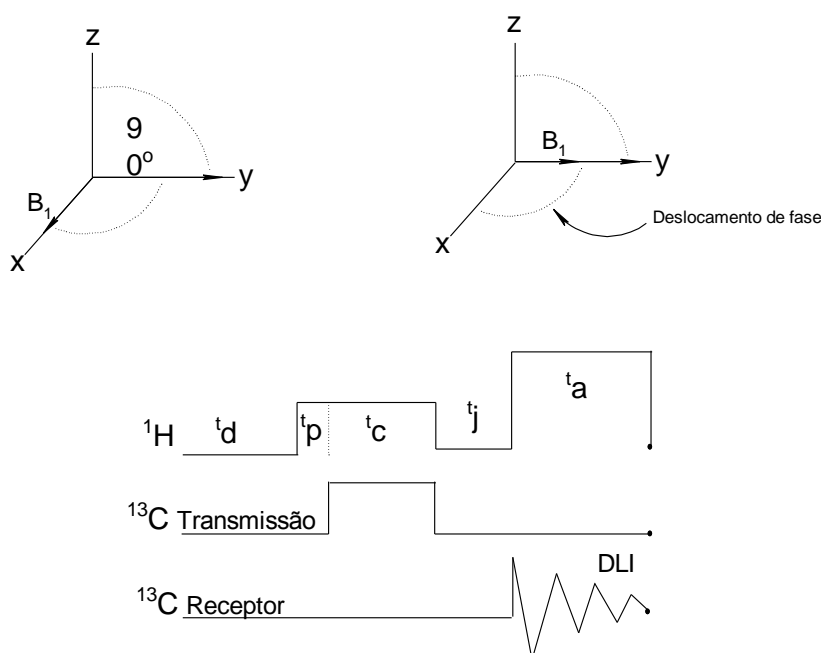


Figura 9. Esquema mostrando o travamento de spin (spin locking) no sistema coordenado rotatório e abaixo seqüência geral de pulsos para RMN CP/MAS (LIN & DENCE, 1992).

Nota: t_d - tempo de atraso de pulso; t_p - tempo para rearranjo da magnetização; t_j - tempo com transmissor desligado; t_a - tempo de magnetização do próton. Traço vertical significa intensidade da Radio Frequência (RF) e a linha horizontal tempo do pulso, DLI-Decaimento livre de indução.

2.6.2 MAS – Ângulo mágico de spin

A diferença entre uma amostra sólida e uma líquida depende da extensão e do tipo de movimento molecular, o que vai interferir em diversas interações entre spins. Supondo dois spins de prótons em fase onde cada um experimenta o campo magnético do outro, isso gera um acoplamento direto conhecido como Acoplamento dipolo-dipolo.

Uma equação simplifica esse experimento:

$$3 \cos 2\phi - 1 = 0$$

$$\cos \phi = (1/2)^{1/2}$$

$$\phi = 54.74^\circ = 54^\circ 44'$$

Este ângulo é então chamado ângulo mágico que permite amostras anisotrópicas como os materiais lignocelulósicos a terem seus espectros registrados numa relação ótima entre sinal e ruído. A Figura 10 define melhor a equação supracitada onde ocorre a interação dipolar internuclear (Figura 10).

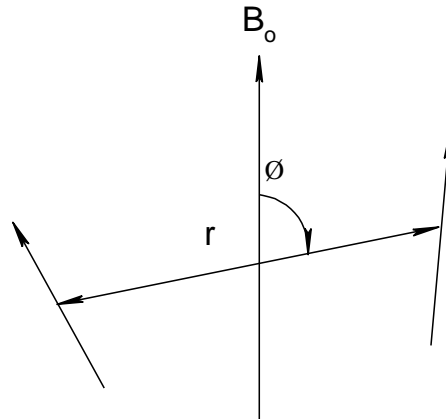


Figura 10. Interação dipolo-dipolo de um par de spin (MACOMBER, 1998).

A rotação do tubo é uma técnica que melhora os sinais restringindo o aparecimento de sinais laterais de spin. Isso permite aproximar uma amostra anisotrópica das amostras isotrópicas. A Figura 11 detalha um rotor de ângulo mágico.

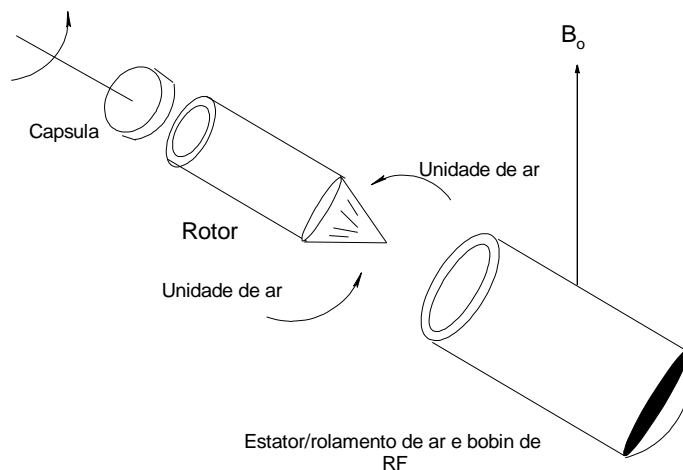


Figura 11. Diagrama do girador do ângulo mágico.

2.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida conhecida em português como CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) é uma tradução do inglês High Performance Liquid Chromatography

(HPLC). Essa técnica de análise tem sido muito utilizada na avaliação da constituição básica de algumas substâncias no estado líquido. A CLAE é uma ferramenta analítica para a separação de misturas, que permite a realização de análises qualitativas e quantitativas das substâncias separadas (CROMATOLOGRAFIA, 2009).

Até o final da década de 1970 essa técnica era pouco utilizada no Brasil, tornando-se mais popular a partir do desenvolvimento de novas fases estacionárias, como a fase reversa quimicamente ligada, que associadas ao uso de um gradiente de eluição e ao desenvolvimento de detectores mais seletivos e sensíveis, tornaram possível a separação de uma gama de substâncias a partir de matrizes complexas como alimentos, fluidos biológicos, madeira e solo. Nas últimas três décadas ocorreram o desenvolvimento de vários detectores espectrofotométricos que operam em comprimento de onda variável e houve um aumento na utilização de detectores eletroquímicos, por fluorescência e por fluorescência induzida por laser, bem como o acoplamento com espectrômetro de massas (COLLINS et al., 2006).

A cromatografia está baseada na repartição dos analitos entre duas fases: uma estacionária e outra móvel. A distribuição, exclusão, partição ou adsorção seletiva dos componentes é um processo de equilíbrio dinâmico e as moléculas ora estão retidas na fase estacionária ora deslocando-se com a fase móvel (NETO & NUNES, 2003). Os componentes de um cromatógrafo líquido são: bomba, coluna cromatográfica, detector e o sistema de processamento de dados (Figura 12) (DEGANI et al., 1998; PERES, 2002).

Na CLAE, a fase móvel deve ser um solvente que dissolva a amostra sem que qualquer interação química ocorra entre ambas. A fase estacionária deve ser compatível com o detector, possuindo polaridade adequada para permitir a separação adequada dos componentes da amostra. Já a coluna cromatográfica deve ser confeccionada de material inerte e que resista a altas pressões (PERES, 2002). Além disso, a composição da fase móvel pode-se manter constante durante uma análise (isocrática) ou variar, linearmente ou não linear (gradiente) (BIDLINGERMEYER, 1992; LOUGH et al, 1995).

A coluna cromatográfica é feita de um material inerte que resiste a todas as pressões em que ela vai ser usada. A capacidade da coluna é determinada pelo comprimento, diâmetro e pelo material de recheio. As colunas geralmente utilizadas são: octadecil (C18, RP18, ODS), octil (C8, RP8), CN (cianopropil) e NH₂ (amina) (GILL, 1986).

Quanto aos detectores, não existe um que apresente todas as propriedades para que ele seja ideal para CLAE; porém, existem detectores que apresentam ampla faixa de aplicações. Os detectores mais usados na CLAE são os fotométricos, baseados na absorvância no ultravioleta e no visível (GILL, 1986). Os detectores de fluorescência, utilizados como métodos de detecção específica são sensíveis para substâncias que fluorescem. Também são utilizados detectores por índice de refração, os quais acompanham continuamente a diferença no índice de refração entre a fase móvel pura e o efluente que sai da coluna contendo os componentes da amostra (SKOOG et al., 2002; PERES, 2002).

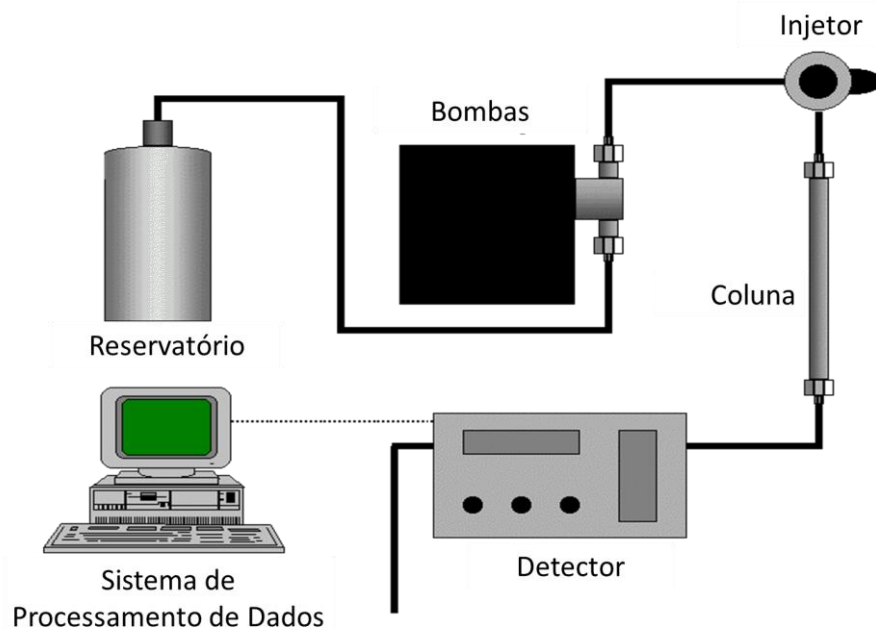


Figura 12. Esquema de um sistema de CLAE (PFARMA, 2013).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Para as análises químicas e anatômicas foram utilizadas plantas de *E. oleracea* com 6 meses de idade (Figura 13A) que foram germinadas em sacos plásticos preenchidos com substrato (30% de composto orgânico, 30% de argila, 40% de terra), preparadas no viveiro florestal “Fernando Capelão” do Instituto de Florestas/UFRRJ. Também foram analisados indivíduos adultos, com aproximadamente 12 anos de idade (Figura 13B), coletados no campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no Bosque Florestal ao lado do viveiro. A planta jovem foi registrada sob o n° RBR 35623 no Herbário do Departamento de Botânica da UFRRJ, e a planta adulta sob o n° 7538, na xiloteca do Departamento de Produtos Florestais do Instituto de Florestas.

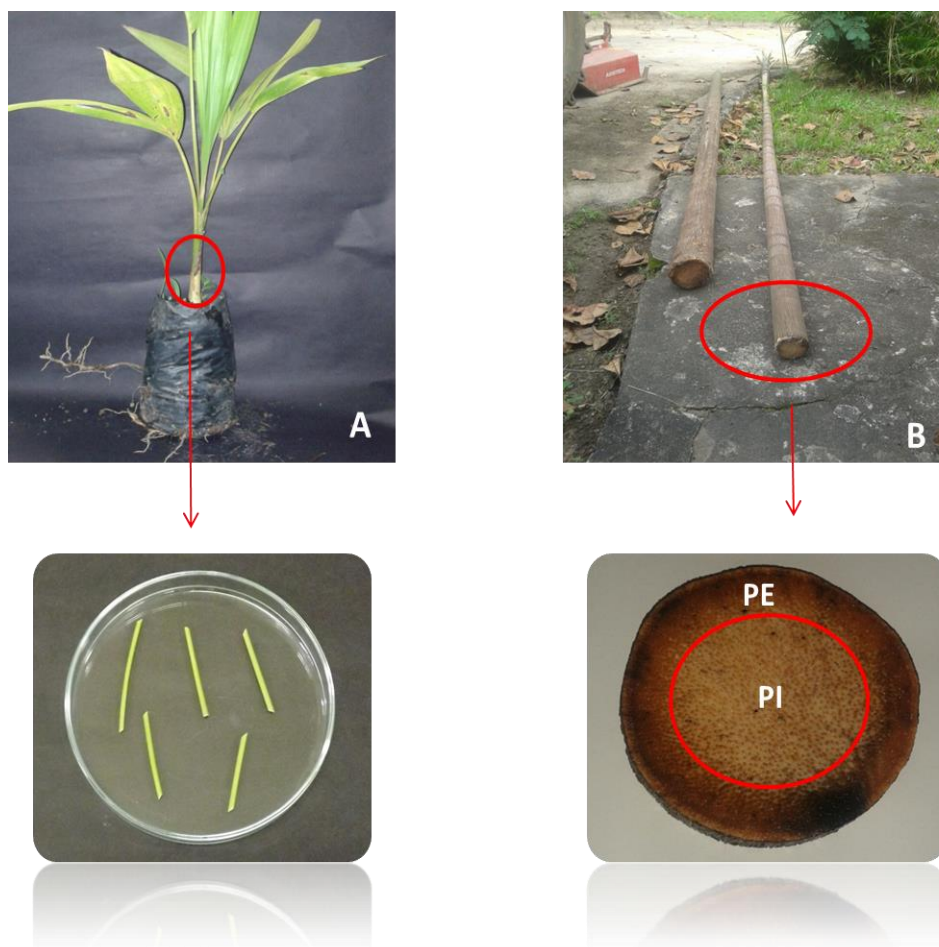


Figura 13. Exemplar da planta jovem (A) e planta adulta (B) de *Euterpe oleracea* Mart.
Nota: PE – parte externa; PI – parte interna.

3.1 Preparação do material para estudo anatômico

3.1.1 Microscopia de campo claro

Foram preparados corpos-de-prova dos indivíduos jovens e adultos com 0,5 e 30 cm de diâmetro, respectivamente, a partir da área basal. Os fragmentos de ambos os indivíduos foram conservados em álcool etílico 50%. Para a análise anatômica do caule adulto, o mesmo foi dividido em duas regiões: uma parte interna (PI - mais próxima da região central do disco) e uma parte externa (PE - mais próxima da casca). Os corpos-de-prova da parte interna foram aquecidos em água por 3 horas e a parte externa por 6 horas.

Os materiais botânicos foram seccionados no micrótomo de Ranvier no plano transversal e longitudinal, com espessura entre 20 a 30 μm . Os cortes foram clarificados em solução de hipoclorito de sódio 50%, durante 10 minutos e em seguida foram lavados em água destilada. Em seguida, os cortes foram neutralizados em solução de ácido acético 1% e lavados em água destilada. Posteriormente, foram corados com a mistura de azul de astra 1% e safranina a 1% (9:1 v/v) (KRAUS & ARDUIN, 1997) e lâminas semipermanentes foram montadas em glicerina.

Testes histoquímicos foram realizados nos indivíduos jovens e adultos (PI e PE) a fim de detectar: lignina pelo teste de Wiesner (Floroglucina ácida) (Figura 14A) e teste de Maüle para identificação de lignina do tipo guaiacólica (G) (marrom) e siringílica(S) (vermelho)

(Figura 14B) (LIN & DENCE, 1992; ABREU et al., 2006). Este último teste foi modificado para evitar ruptura das células, utilizando-se a concentração de NH_4OH com diluição de 50%, durante 15 segundos.

Para a dissociação dos elementos traqueais desses órgãos foi utilizado o método modificado de Franklin (1945), esse consiste na mistura de peróxido de hidrogênio 30% e ácido acético glacial, na proporção 1:1. Os fragmentos obtidos foram corados com safranina aquosa 1% e depois montados em lâminas semipermanentes.

Fotomicrografias foram obtidas com um microscópio óptico (Olympus BX 51) com um sistema digital de processamento de imagens (cell^f imaging software).

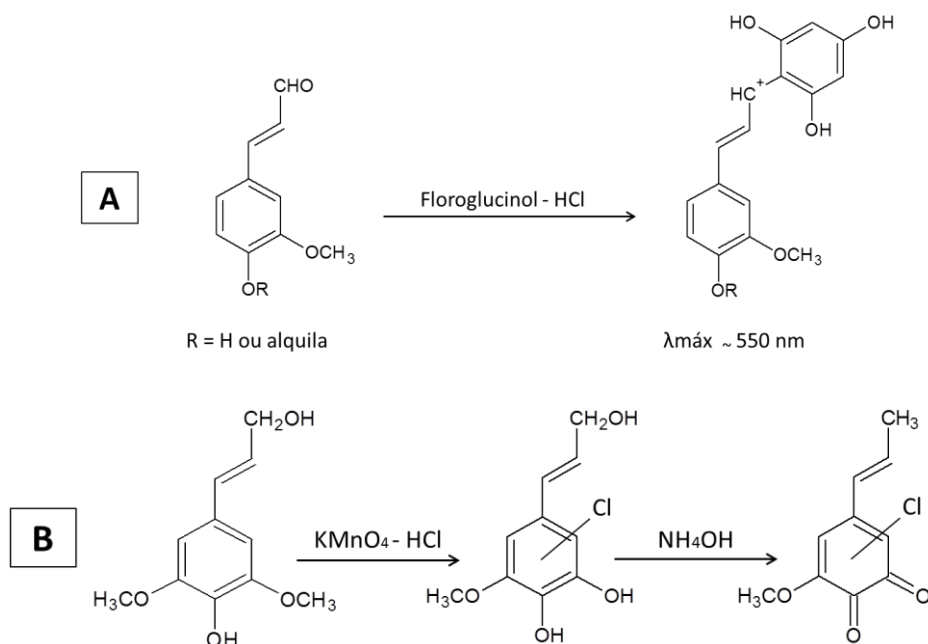


Figura 14. Proposta de mecanismo de reação com reagente de Wiesner (A) e com reagente de Maüle (B) (LIN & DENCE, 1992).

3.1.2 Microscopia de fluorescência

Seções transversais dos caules jovens e adultos (PI e PE) foram tratadas com solução de auramina 0,01% por 15 segundos, em seguida lavados com água bidesionizada. Essas seções foram observadas em microscópio de fluorescência utilizando cubo de excitação azul em 450-480 nm e filtro FITC (U-MWB₂) (BARROS & MIGUENS, 1998). As lâminas foram observadas e descritas ao microscópio óptico *Olympus*, acoplado a um sistema de análise de imagem digital (cell^f imaging software).

3.2 Microespectroscopia no Infravermelho (FTIR)

Foram realizadas seções transversais com 20-30 μm de espessura dos caules jovens e adultos (PI e PE), como já descritos anteriormente, para obtenção dos espectros de infravermelho.

Para a análise de microespectroscopia no infravermelho, as seções transversais do órgão foram preparadas em duas condições diferentes: A - extraídas somente com metanol por 24 horas e B - extraídas com metanol e tratados com NaOH 1% conforme descrito na norma da TAPPI – T 212 os – 76 (TAPPI, 1979).

Em ambas as metodologias, as seções foram congeladas em nitrogênio líquido e em seguida secas entre lâminas de vidro por 12 horas em um liofilizador. Depois de liofilizados, os cortes das seções transversais foram colocados sobre uma lâmina de KBr, e os espectros registrados utilizando o detector Mercúrio Cádmio Telureto (Mercury Cadmium Telluride - MCT), usando condições experimentais de Reflectância Difusa.

Nos indivíduos jovens foram registrados espectros em duas regiões da calota de fibras do floema: região distante do floema (A) e mais próxima do floema (B) e nos indivíduos adultos (PI) e (PE) em três regiões: região distante do floema (A), região central (B) e mais próxima do floema (C).

A análise foi feita através de um microscópio acoplado a um espectrômetro de infravermelho VARIAN 640-IR FT-IR spectrometer, de modo a caracterizar a presença e o tipo de lignina nos tecidos, com condições experimentais de 4 cm^{-1} de resolução, 128 varreduras com amplitude espectral entre $4000\text{-}700\text{ cm}^{-1}$.

As intensidades de absorção em 1500 cm^{-1} (vibração do anel aromático) foram determinadas através do método de linha base. Esse sinal foi usado como referência interna por depender menos dos substituintes aromáticos (ABREU, 1995).

3.3 Preparação do material para análises químicas

Para as análises químicas, os materiais dos caules jovens e adultos (PI e PE) foram secos em estufa 60° C e preparados (moídos) em um moinho de facas do tipo Wiley (Modelo SL 31). Os materiais foram peneirados para a homogeneização das partículas, sendo utilizadas para obtenção dos extratos, partículas com a fração que ficou retida na peneira de malha 18 ABNT.

As amostras foram extraídas com os solventes acetona (PA) e metanol (PA) e água bidesionizada no soxhlet, por um período de 24 horas ininterruptas, para cada solvente (ABREU et al., 2006). Os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotatório e colocados em uma capela onde permaneceram até a completa evaporação dos solventes.

3.4 Espectroscopia no infravermelho

Para espectroscopia no infravermelho, foram utilizadas amostras do caule jovem e adulto (PI e PE) em três condições de tratamentos: uma amostra *in natura*, uma amostra livre de extratos e uma amostra livre de extratos e tratada com NaOH 1% (TAPPI – T 212 os – 76, 1979) conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Formulações dos tratamentos dos materiais caulinares.

<i>Amostras</i>	<i>Tratamentos</i>
<i>Planta jovem</i>	Livre de extratos (acetona, metanol e água) Livre de extratos (acetona, metanol e água) e tratada com NaOH 1%
<i>Planta adulta (PI)</i>	Livre de extratos (acetona, metanol e água) Livre de extratos (acetona, metanol e água) e tratada com NaOH 1%
<i>Planta adulta (PE)</i>	Livre de extratos (acetona, metanol e água) Livre de extratos (acetona, metanol e água) e tratada com NaOH 1%

As amostras no estado sólido foram preparadas em um moinho de bolas de aço inoxidável para redução da granulometria até certo tamanho das partículas, para evitar os efeitos de espelhamento de radiação. Foram feitas pastilhas utilizando 1 mg de amostra e 100 mg de KBr.

Os espectros foram registrados em um aparelho VARIAN 640-IR FT-IR spectrometer utilizando o modo experimental de transmissão com 4 cm⁻¹ de resolução, 32 varreduras, amplitude espectral entre 4000-400cm⁻¹ e atenuação 7, onde a luz transmitida atravessa a amostra e a quantidade desta luz que for absorvida pela substância informa sobre a quantidade e a qualidade dos componentes desta amostra.

3.5 Determinação de ácido *p*-cumárico na parede celular por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para identificação do ácido *p*-cumárico na parede celular foi utilizada a metodologia descrita por Deschamps & Ramos (2012). Para o preparo das amostras, 50 mg de material livre de extratos e tratadas com NaOH 1% (TAPPI, 1979) foram extraídos com 5 mL de NaOH 1M em um tubo de ensaio por 24 horas em uma incubadora a 20°C. Em seguida, o material foi filtrado com auxílio de um funil de placa sinterizada e lavado com água bidesionizada, sendo o filtrado acidificado para um pH 2,5 com adição de uma solução de HCl (1:1). O volume final foi ajustado para 10 mL com água.

Após uma noite em geladeira, o material foi centrifugado (13.000 rpm) por 5 minutos, sendo deixado em congelador até o momento da análise. Para as injeções no cromatógrafo, as amostras foram descongeladas e novamente centrifugadas sob as mesmas condições descritas anteriormente.

Foi utilizado como padrão o ácido *p*-cumárico (marca Fluka) no qual foi dissolvido em metanol para preparar a solução estoque na concentração de 100 µg/mL. A partir da solução estoque, esta foi diluída em cinco diferentes concentrações para a montagem da curva de calibração.

As análises foram realizadas no Shimadzu HPLC com duas bombas LC-20A, Detector de arranjo de diodos SPD-M20A (Shimadzu), forno da coluna CTO-20A (Shimadzu) e sistema da controladora DGU-20A₃ e foi utilizada a coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm). A fase móvel foi composta por metanol-ácido fórmico 0,8% e água na proporção de 6:4, eluição isocrática. A razão de fluxo foi mantida em 1 mL/min e o volume de injeção 20 µL. O comprimento de

onda para detecção foi fixado em 326 nm e a temperatura da coluna foi mantida em 35°C (GEETHA et al., 2011).

3.6 Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C no estado sólido

O material lignocelulósico livre de extratos e tratados com NaOH 1% (ver item 3.3 e 3.4) foi processado em um moinho de bolas para redução da granulometria. Após moagem, o material foi seco em um dessecador contendo anidrido fosfórico por três dias. Foram utilizados 500 mg para análise de RMN de ^{13}C no estado sólido (ABREU et al., 2006).

Os espectros foram obtidos em um aparelho Bruker 400 MHz (BRUKE AVANCE 2), com rotor de 4 mm, com a técnica CP/MAS com giro de 8000 Hz com polarização cruzada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo da lignificação no caule jovem e adulto de *E. oleracea* por testes histoquímicos e microscopia de fluorescência

O caule jovem, em seção transversal, apresenta uma epiderme uniestratificada, recoberta por cutícula espessa. Logo abaixo, ocorrem dois estratos subepidérmicos formados por células parenquimáticas e fibras. Adjacentes aos feixes externos, de menor calibre, ocorrem pequenas faixas de fibras (Figura 15 A). Junto aos elementos condutores do floema essas fibras formam uma pequena calota, apresentando paredes bem espessas com lume reduzido que separam os elementos de tubo crivado e as células companheiras em dois grupos. O xilema é formado, em geral, por dois a seis elementos de protoxilema, um a dois elementos de metaxilema e fibras que possuem lume bem amplo. O sistema vascular é constituído por feixes colaterais fechados dispersos, com poucas unidades independentes que formam um atactostelo.

Foram realizados testes histoquímicos para identificação dos componentes da parede celular no caule jovem. Foi observado na região periférica do órgão faixas de células esclerenquimáticas, que apresentaram variação de intensidade de cor, distinguindo duas regiões (A e B) (Figuras 15 C).

O teste de Wiesner revelou unidades de cinamaldeídos por meio da coloração vermelha observadas nas paredes das fibras. Houve uma variação do processo de lignificação no esclerênquima, sendo mais intensa nas partes externa e interna (região A) em relação à porção intermediária (região B) (Figura 15 C). O espectro de IV (item 4.2), que abrange as duas regiões, revelou sinais em 1651–1648 cm^{-1} de estiramento $\nu\text{C-O}$ (cetona ou aldeído conjugados), confirmando essas unidades. Pomar et al. (2002) afirmam que este reagente é muito abrangente pois revela os três aldeídos precursores dos diferentes tipos de lignina, enquanto Sarkanen & Ludwig (1971) consideram que essa reação com floroglucinol é mais específica para as unidades de aldeído coniferílico que constituem a lignina guaiacólica (G). O resultado obtido pelo teste de Maüle, por meio da coloração marrom nas paredes (Figura 15 E e F), e pelos sinais dos espectros de IV em 1244-1255 cm^{-1} , confirmaram o predomínio dessa lignina.

Segundo Fukushima & Terashima (1991) a lignina é formada na lamela média e nos ângulos comuns as demais células, nos estágios iniciais da lignificação. A lignina G é primeiramente depositada na região da lamela média e depois na parede secundária, enquanto lignina S é depositada em quantidades menores durante o estágio final da lignificação da parede secundária. A formação e a distribuição da lignina, na espécie estudada, ocorreram de forma semelhante ao descrito pelos autores, como observado nas Figuras 15 (C e D) reveladas respectivamente, pelo teste de Wiesner e microscopia de fluorescência.

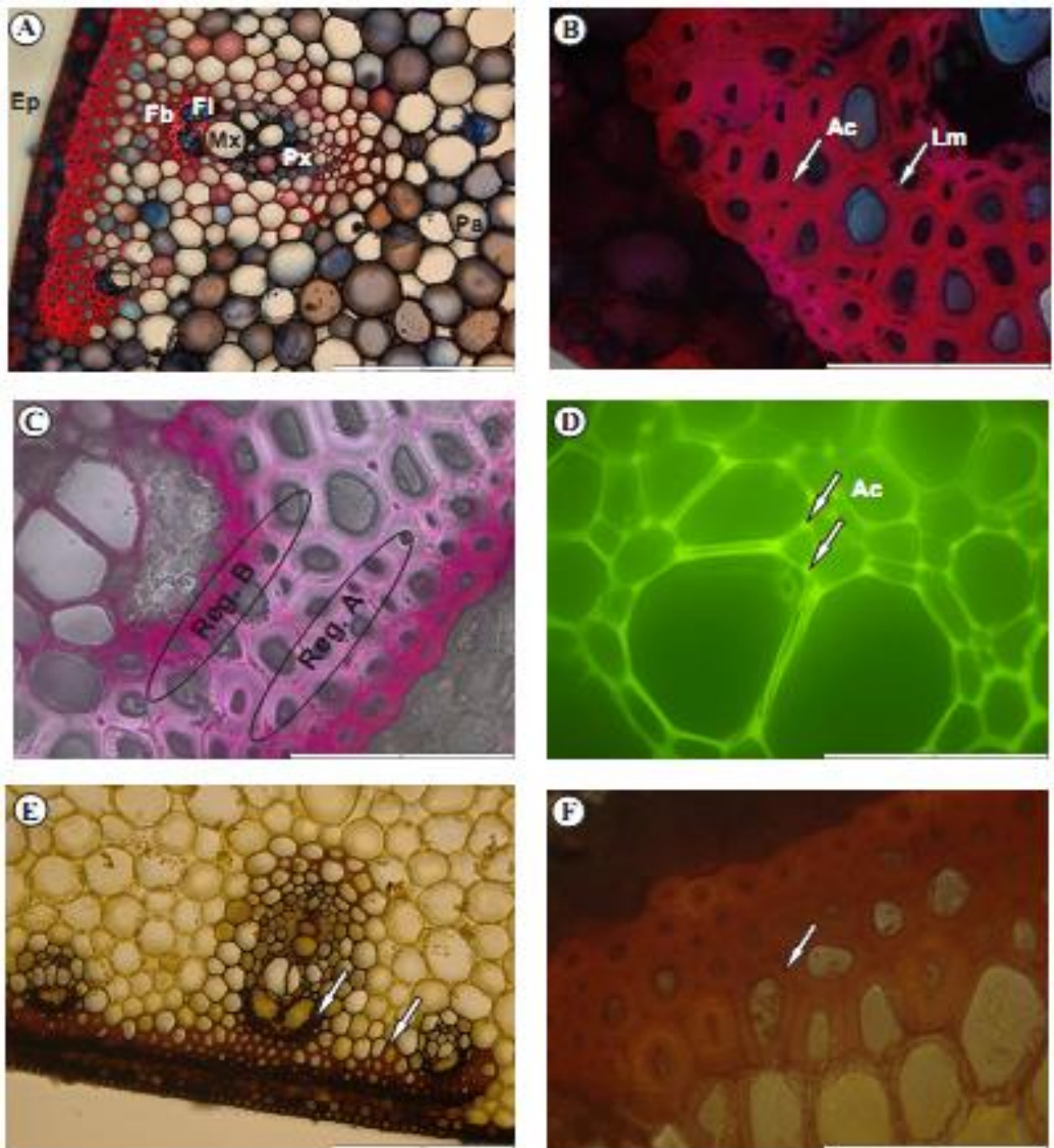


Figura 15. Caule da planta jovem de *Euterpe oleracea*. A – F - Seção transversal. A- Aspecto geral do caule da planta jovem. B- Detalhe das fibras. C- Detalhe da lignificação das fibras do floema, evidenciado pelo teste de Wiesner, mostrando regiões A e B. D- Detalhe da lignificação (→), evidenciada pela microscopia de fluorescência. E- Lignina guaiacólica (coloração marrom) nas paredes das fibras do floema (→), evidenciada pelo teste de Maüle. F- Detalhe das paredes celulares com o reagente de Maüle (→).
 Ep= Epiderme; Pa= Parênquima; Fb= Fibras; Fl= Floema; Mx= Metaxilema; Px= Protoxilema; Ac= Ângulo comum às células; Lm= Lamela média.
 Barras: A e E= 200 µm; B, C, D e F= 50 µm.

O espessamento secundário das palmeiras ocorre por extensa divisão e alargamento das células do parênquima fundamental, por meio de crescimento secundário difuso (RUDALL, 1992), ou ainda, segundo Eames & MacDaniels (1947) é resultante do aumento gradual do tamanho das células e dos espaços intercelulares. Este último citou que raramente há proliferação de faixas de tecidos, com formação de novas fibras.

No caule adulto de *E. oleracea*, em seção transversal, foi verificado uma maior quantidade de feixes vasculares na parte externa (PE), circundados por calotas de fibras conspícuas. São observados dois tipos de fibras associados aos elementos condutores do floema, sendo: o primeiro mais interno com células com paredes espessas e lume reduzido e o segundo tipo formado por células com lume mais amplo e paredes menos espessas, que apresentam uma lignificação gradual (Figura 16 A e B). Tomlinson & Huggett (2012) descreveram para espécies da família Arecaceae esse processo de espessamento e lignificação das fibras, em que ocorre a maturação gradual dessas células, a partir dos elementos condutores do floema, com uma progressão radial, que finaliza na porção mais externa da calota.

O parênquima fundamental apresentou células longas, retangulares dispostas radialmente aos feixes. Em certos trechos, algumas dessas células sofreram lignificação (Figuras 16 C e 17 A).

Em PE e PI foram realizados testes histoquímicos para identificação dos componentes da parede celular. Foi observada nas calotas de fibras floemáticas uma variação de intensidade de cor, que possibilitou a distinção em três regiões (A, B e C) (Figuras 16 D e 17 C).

O teste de Wiesner revelou unidades de cinamaldeídos por meio de uma cor avermelhada observada nas paredes das fibras, indicando uma maior intensidade de cor na lamela média das células e ângulos comuns as células (16 E e 17 D). Foram encontradas, tanto nas amostras PE quanto em PI, diferenças no tipo de lignina. Pelo teste de Maüle, foi detectada lignina guaiacólica (G), nas calotas de fibras, confirmados pelos sinais 1266-1270 cm^{-1} (Respiração do anel guaiacólico com contribuição do estiramento de C=O) (item 4.2). Estes resultados foram similares aos obtidos na planta jovem.

Os testes histoquímicos e microscopia de fluorescência, na porção do caule do indivíduo adulto (PE), permitiu observar fibras com paredes polilameladas (Figuras 16 E, F e G). De acordo com Itoh (1990), Weiner et al. (1996) as paredes das fibras de palmeiras e bambus podem mostrar uma polilamelação resultante de variações no depósito da lignina em cada camada da parede celular. Segundo estes autores tais fibras permanecem vivas por um longo período e por isso continua a desenvolver novas lamelas.

Segundo Donaldson & Lausberg (1998) as diferenças na intensidade da fluorescência também podem fornecer indícios quanto à distribuição de lignina na fibra, ou seja, a concentração de lignina reflete no aumento ou a diminuição na intensidade da fluorescência. Em *Euterpe oleracea* foram observadas também pequenas variações de intensidade nas fibras (Figuras 16 E e F; 17 E).

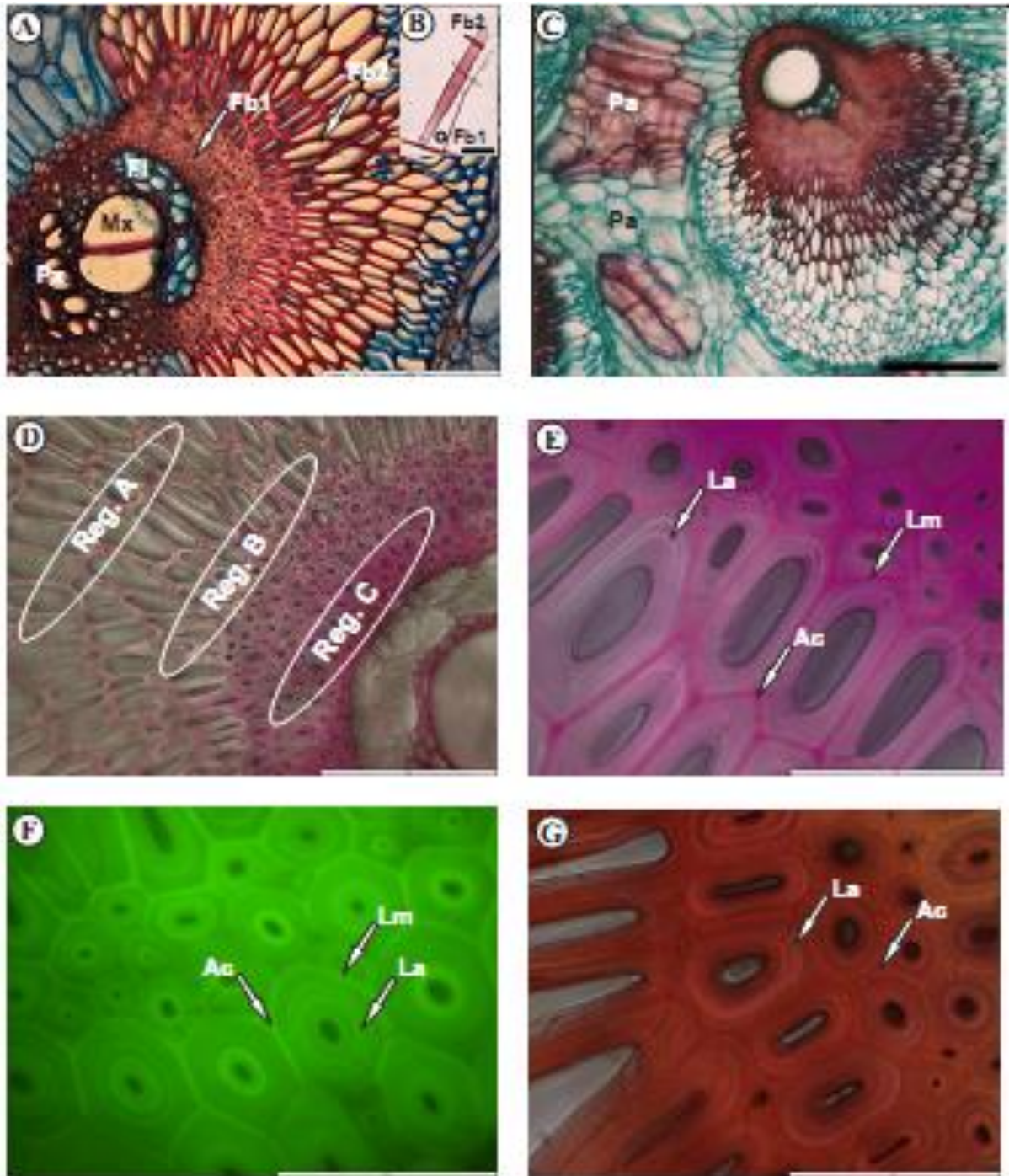


Figura 16. Caule da planta adulta (PE) de *Euterpe oleracea*. A, C, D, E, F e G - Seção transversal. B – Material dissociado. A e C- Aspecto geral do feixe condutor. B- Detalhe das fibras. D- Detalhe da lignificação das fibras do floema, evidenciado pelo teste de Wiesner, mostrando regiões A, B e C.

E, F e G- Topoquímica da lignina nas fibras, evidenciando a polilamelacção e a distribuição da lignina;

E- Lignina evidenciada pelo teste de Wiesner na lamela média e nos ângulos das células.

F- Detalhe da lignificação (→), evidenciada pela microscopia de fluorescência. G- Detalhe das paredes celulares constituída de lignina guaiacólica (coloração marrom) nas paredes das fibras do floema (→), evidenciada pelo teste de Maüle.

Pa= Parênquima; Fb= Fibras; Fl= Floema; Mx= Metaxilema; Px= Protoxilema; Ac= Ângulo comum às células; Lm= Lamela média; La= paredes polilameladas.

Barras: A, C e D= 200 µm; E, F e G= 50 µm.

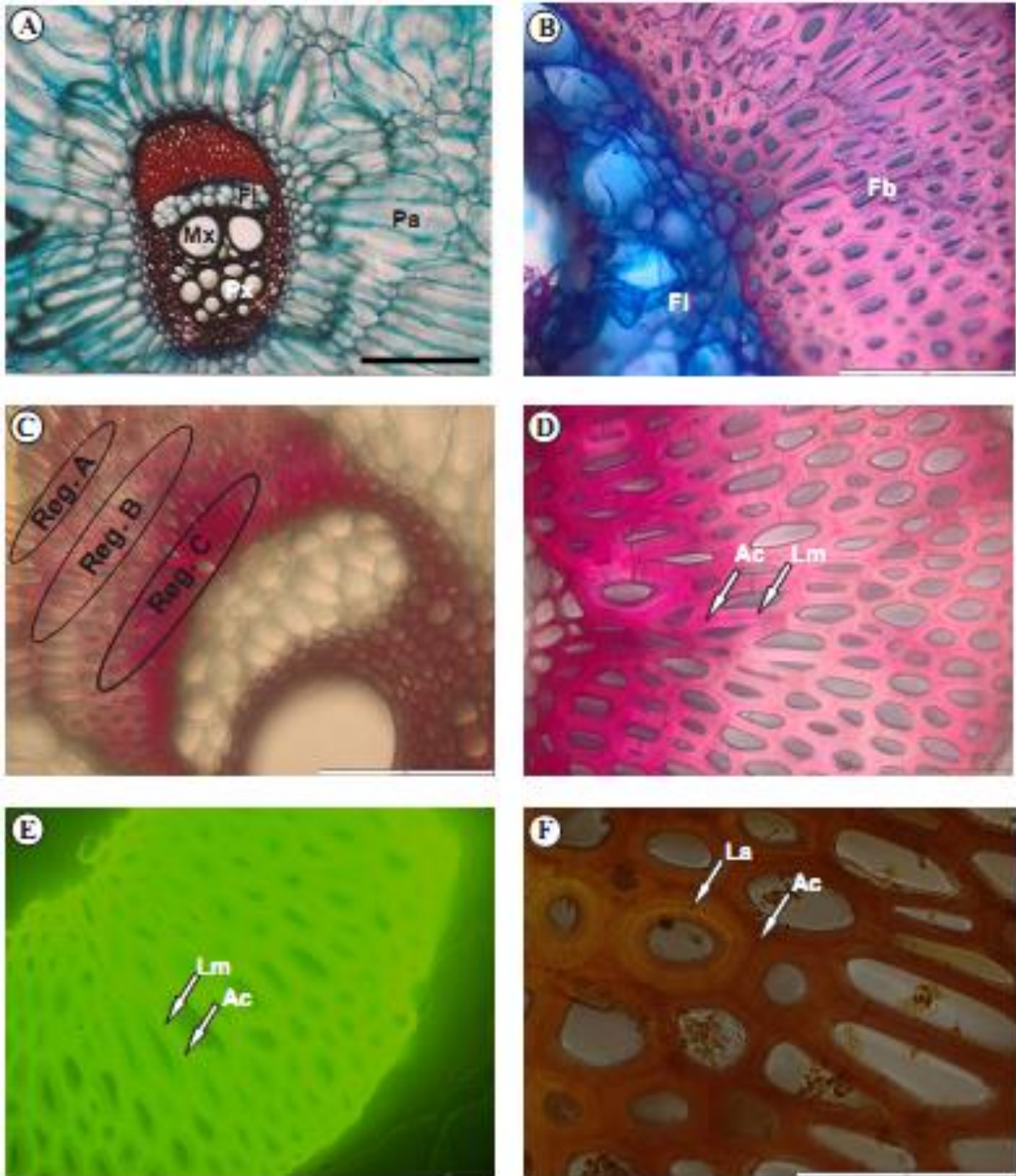


Figura 17. Caule da planta adulta (PI) de *Euterpe oleracea*. A, B, C, D, E e F - Seção transversal. A e B- Aspecto geral do feixe condutor. C- Lignificação das fibras do floema, evidenciado pelo teste de Wiesner, mostrando regiões A, B e C. D- Detalhe da lignificação pelo teste de Wiesner na lamela média e nos ângulos das células. E- Detalhe da lignificação (→), evidenciada pela microscopia de fluorescência. F- Detalhe das paredes celulares constituída de lignina guaiacólica (coloração marrom) nas paredes das fibras do floema (→), evidenciada pelo teste de Maïle.

Pa= Parênquima; Fb= Fibras; Fl= Floema; Mx= Metaxilema; Px= Protoxilema; Ac= Ângulo comum às células; Lm= Lamela média; La= paredes polilameladas.

Barras: A e C= 200 µm; D e E= 100 µm, B e F= 50 µm.

4.2 Análises dos espectros de microespectroscopia no infravermelho (FTIR) das fibras do floema no caule jovem e adulto

Através da análise por microespectroscopia no infravermelho, os espectros revelaram sinais característicos de lignina, em todas das seções da planta jovem e adulta (PI) e (PE) (Tabelas 3 e 4).

Para avaliar a composição e distribuição da lignina foram obtidos espectros em duas regiões distintas (região A e B) do caule da planta jovem, que apresentaram sinais com estiramento de $1752\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ corresponde ao estiramento de $\nu\text{C}=\text{O}$ de éster de carboidratos (Figura 18).

O espectro da região A revelou sinais mais definidos, com absorção em $3595\text{-}3436\text{ cm}^{-1}$ relativamente fino em comparação com os demais espectros. A intensidade relativa dos sinais em espectros normalizados baseou-se na razão entre a intensidade de qualquer sinal pela intensidade do sinal em 1500 cm^{-1} (método de linha base). Esse sinal é usado como padrão em espectros de lignina por não apresentar perturbações na sua intensidade de absorção independentemente dos seus substituintes.

As razões entre as intensidades dos sinais das absorções de aldeído com a intensidade da absorção do anel aromático foram ($A=2,5$; $B=5,0$), apresentando uma concentração maior na região B. Após o tratamento com NaOH 1% do caule da planta jovem, os sinais em $1178\text{-}1175\text{ cm}^{-1}$ foram mais intensos que os sinais em $1137\text{-}1135\text{ cm}^{-1}$, correspondentes ao estiramento de $\nu\text{C}-\text{O}$ do ácido *p*-hidroxicinâmico (ácido *p*-cumárico) e dos outros estiramentos $\nu\text{C}-\text{O}$ de outras substâncias, revelando uma alta concentração de ácido *p*-hidroxicinâmico (ácido *p*-cumárico) nas regiões A e B nesse estágio de desenvolvimento (Figura 18).

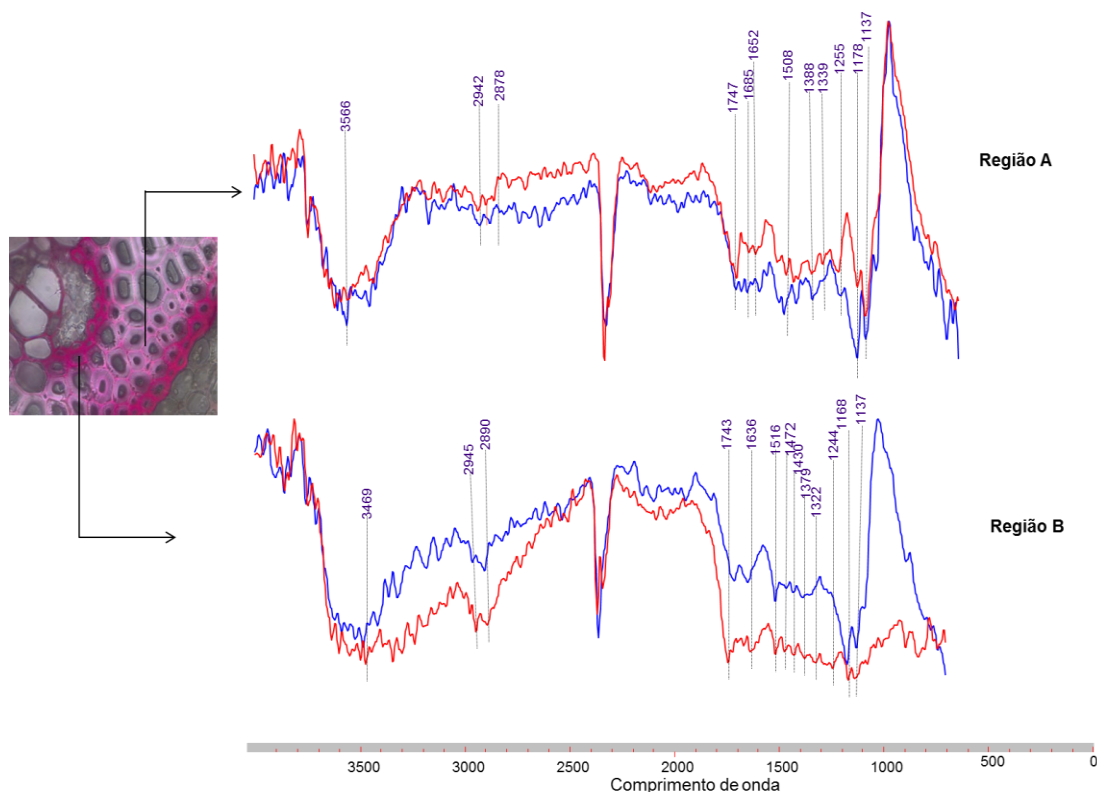


Figura 18. Espectros no infravermelho das regiões das fibras do floema (A e B) da planta jovem em duas condições de tratamento: linhas vermelhas – metanol por 24 horas e linhas azuis – metanol por 24 horas + NaOH 1%).

O sinal correspondente ao estiramento de $\nu\text{C}=\text{O}$ de cetonas não conjugadas, de grupo éster, que pode ser característicos da celulose ou hemicelulose, foi evidenciado em todas as seções. Abreu & Oertel (1999) em estudo sobre a maleabilidade de *Paullinia rubiginosa* Cambess afirmam que o grupamento éster confere plasticidade em diversos materiais. Os sinais em 1325-1330 e 1260-1270 cm^{-1} apresentaram-se claramente em todos os indivíduos, revelando se tratar de uma lignina guaiacólica/siringólica (G/S) com alta proporção de unidades guaiacólicas (G), porém com intensidades diferentes, confirmado pelos testes histoquímicos, muito embora para ligninas que possuem unidade cumarila essa estimativa torne-se mais difícil, principalmente em decorrência da sobreposição do sinal em torno de 1161 cm^{-1} , correspondente ao $\nu\text{C}-\text{O}$ de ácidos *p*-hidroxicinâmicos e $\nu\text{C}-\text{O}$ de poliacarbohidratos onde $\text{G}+\text{S}+\text{H}=100\%$.

Os espectros das regiões A, B e C da planta adulta (PE) mostraram a presença de ésteres hemicelulósicos e/ou ácidos *p*-hidroxicinâmicos evidenciados pelos sinais em 1746-1750 cm^{-1} ($\nu\text{C}=\text{O}$ de éster), 1698 cm^{-1} $\nu\text{C}=\text{O}$ (ácido conjugado) e 1179 cm^{-1} ($\nu\text{C}-\text{O}$) e 1138 cm^{-1} ($\nu\text{C}-\text{O}$ de éster e/ou poliacarbohidratos).

As intensidades dos sinais de aldeído e cetonas conjugadas não foram tão altas, porém na região C os sinais correspondentes aos estiramentos de carbonila (podendo aqui incluir os aldeídos conjugados) foram intensos. Na região C da planta adulta (PE) há fortes indícios de presença de grande quantidade de ácidos, de aldeídos e também apresenta sinal mais largo de estiramento de $\nu\text{O}-\text{H}$. Esta mesma região também apresentou fortes indícios de alta concentração de carboidratos, em decorrência da largura dos sinais em todo o espectro.

A presença de ácidos e de seus respectivos ânions com estiramento de $\nu\text{C}=\text{O}$ em 1680 cm^{-1} pode aumentar ou diminuir as absorções em 1600 e em 1260 cm^{-1} (STEWART et al., 1995). Essa variação foi também observada nos espectros das regiões A, B e C da planta adulta (PE) após tratamento com NaOH 1% (Figura 19), o que revela a presença desse tipo de substância na parede celular interferindo na análise do material antes do tratamento alcalino. Neste caso, os espectros das amostras tratadas com NaOH 1% das regiões A, B e C, revelaram que as absorções em 1280 cm^{-1} que antes do tratamento eram mais intensas e a de 1340 cm^{-1} (respiração do anel aromático siringílico) que eram menos intensas se inverteram; isso permitiu supor que nesses tecidos pode haver um teor de unidade siringila mais alto (LIN & DENCE, 1992). Foi também observado que no espectro da planta adulta (PE) da região B tratado com NaOH 1% o sinal próximo a 1181 cm^{-1} (Estiramento de $\text{C}-\text{O}$ de ácido *p*-cumárico ou ferúlico) quase desapareceu totalmente, enquanto os demais espectros se mantiveram com a forma de dubletos. O espectro da região C das fibras do floema da planta adulta (PE) apresentou uma absorção em torno de 1500 cm^{-1} bastante larga, caracterizando a existência de uma grande quantidade de celulose nessa região, além da lignina.

Há também a hipótese de que as regiões A e B possuem maior (OH) livre sugerindo maior quantidade de (OH) primário e secundário no estado livre, ou seja, não formando ligações de hidrogênio. O espectro da região C foi o que mais se aproximou de uma parede rica em lignina com pouca quantidade de poliacarbohidratos, tendo em vista as intensidades baixas dos sinais em 1473 cm^{-1} e 1393 cm^{-1} , sendo este último com menor intensidade em B. Os sinais dos espectros da região A da planta adulta (PE) apresentaram-se mais definidos, principalmente na região de estiramento de carbonilas. Um ombro foi observado em torno do sinal de 1600 cm^{-1} em ordem crescente da região A para a região C.

A razão das intensidades dos sinais em 1600:1500 cm^{-1} revelou os seguintes valores: B=1,0; A=1,33; C= 3,00 dos tecidos adultos (PE), significando que as ligninas das respectivas amostras possuem estruturas mais eterificadas do que condensadas (LIN & DENCE, 1992). Considerando-se a razão entre os sinais 1648 cm^{-1} a 1651 cm^{-1} em ordem crescente de estiramento de carbonila aldeídica conjugada com o sinal do anel aromático, obtêm-se os

seguintes valores: B=1,5; A=2,0; C=6,5 da planta adulta (PE), coadunando com o resultado positivo do teste de Wiesner região C, enquanto B e A foram insignificantes (Figura 19), provavelmente devido ao baixo teor de coniferaldeído nas ligninas das respectivas regiões. As diferentes concentrações de aldeído, ácido *p*-cumárico e/ou ácido ferúlico, mostrados nos espectros evidenciam que em um mesmo grupo de fibras do floema das plantas adultas (PE) existem ligninas com perfis estruturais diferentes, provavelmente devido ao efeito da CAD.

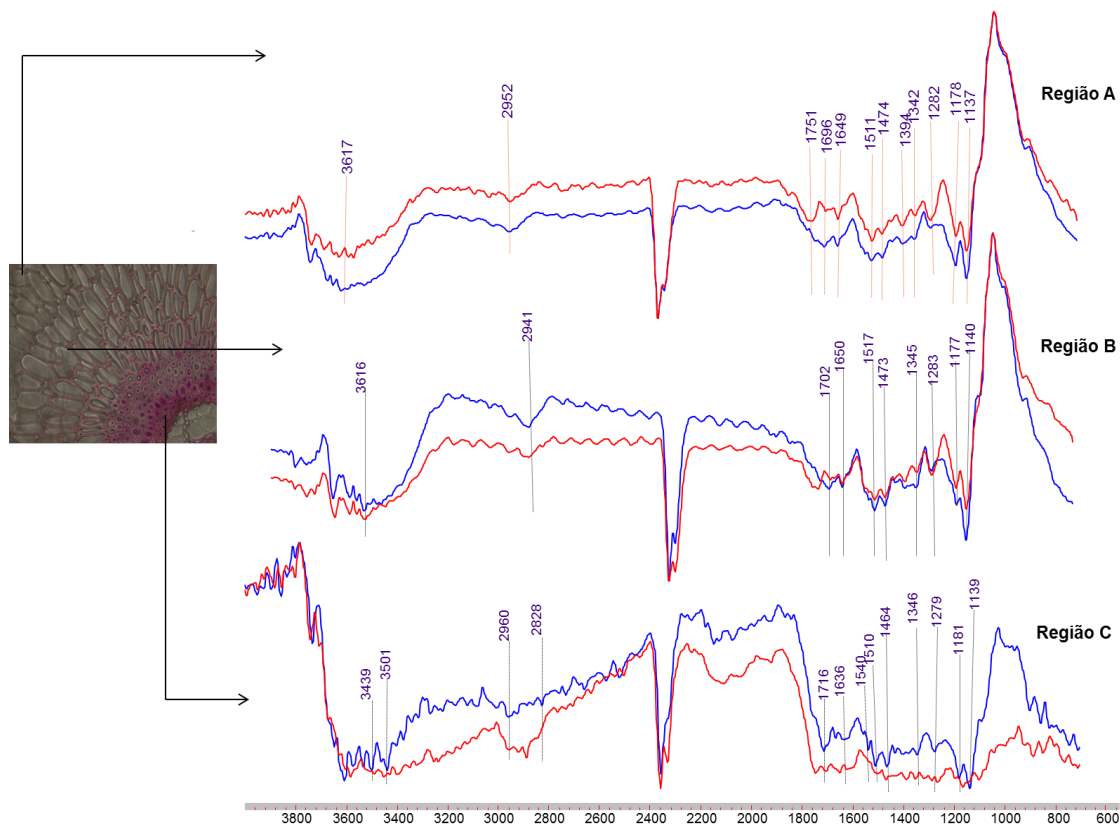


Figura 19. Espectros no infravermelho das regiões das fibras do floema (A, B e C) da planta adulta (PE) em duas condições de tratamento: linhas vermelhas – metanol por 24 horas e linhas azuis – metanol por 24 horas + NaOH 1%).

Stewart (1996) trabalhando com *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* em condições aeróbica e anaeróbica verificou uma série de absorções, que são comuns em plantas. Ele se referiu às absorções em 1650 cm^{-1} que pode ser proveniente do estiramento de $\nu\text{C}=\text{O}$ de amida, assim como estiramento de $\nu\text{C}-\text{O}$ de quinona formada pela oxidação da parede celular. Também relatou uma possível existência de suberina, a qual absorve em $1480\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ com estiramento de $\nu\text{C}-\text{O}$ em $1300\text{ - }1050\text{ cm}^{-1}$; todavia, os cortes analisados passaram por uma extração prévia com metanol, que possivelmente retirou essas substâncias.

Neste sentido, os sinais em $1680\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$, 1260 cm^{-1} e 955 cm^{-1} observados nos espectros da região (C) do feixe vascular da planta adulta (PE) extraída com metanol podem ser atribuídos à pectina (Figura 19). Existem também evidências da presença de hemicelulose devido ao sinal em 1660 cm^{-1} , que é provavelmente oriundo do estiramento de $\text{C}=\text{O}$ do ácido glicurônico. Sinais em 1427 e 895 cm^{-1} podem representar também deformação de CH_2 e do CH anomérico de celulose cristalina, respectivamente (KATAOKA & KONDO, 1998).

A concentração de ácido *p*-hidroxicinâmico nas regiões A, B e C da planta adulta (PI) comparada com as regiões da planta adulta (PE) (Figura 20) é abordada pela pouca diferença entre os sinais 1179 cm^{-1} e 1137 cm^{-1} (Figura 20). Após tratamento com NaOH 1%, o espectro

da região B da planta adulta (PI) mostrou sinais de estiramento de (vOH) mais estreito e o sinal da região C mais largo, provavelmente com grande concentração de polissacarídeos hemicelulósicos. O espectro da região A da planta adulta (PI) mostrou maior intensidade do sinal correspondente ao ácido *p*-hidroxicinâmico e o sinal em 3550 cm⁻¹ relativamente largo, com poliacarbohidrato residual. A intensidade do sinal em 1182 cm⁻¹ e 1137 cm⁻¹ (dubleto) apresentou sinal com alta intensidade, revelando maior concentração de *p*-hidroxicinâmico (ácido *p*-cumárico).

A razão da intensidade entre os sinais de A=1649 cm⁻¹, B=1649 cm⁻¹ e C=1647 cm⁻¹ respectivamente sendo A= 1510 cm⁻¹, B=1515 cm⁻¹ e C=1518 cm⁻¹ das amostras de plantas adultas (PI) foram respectivamente 1,66; 2,33 e 8, mostrando que a concentração de aldeído conjugado é maior na região C.

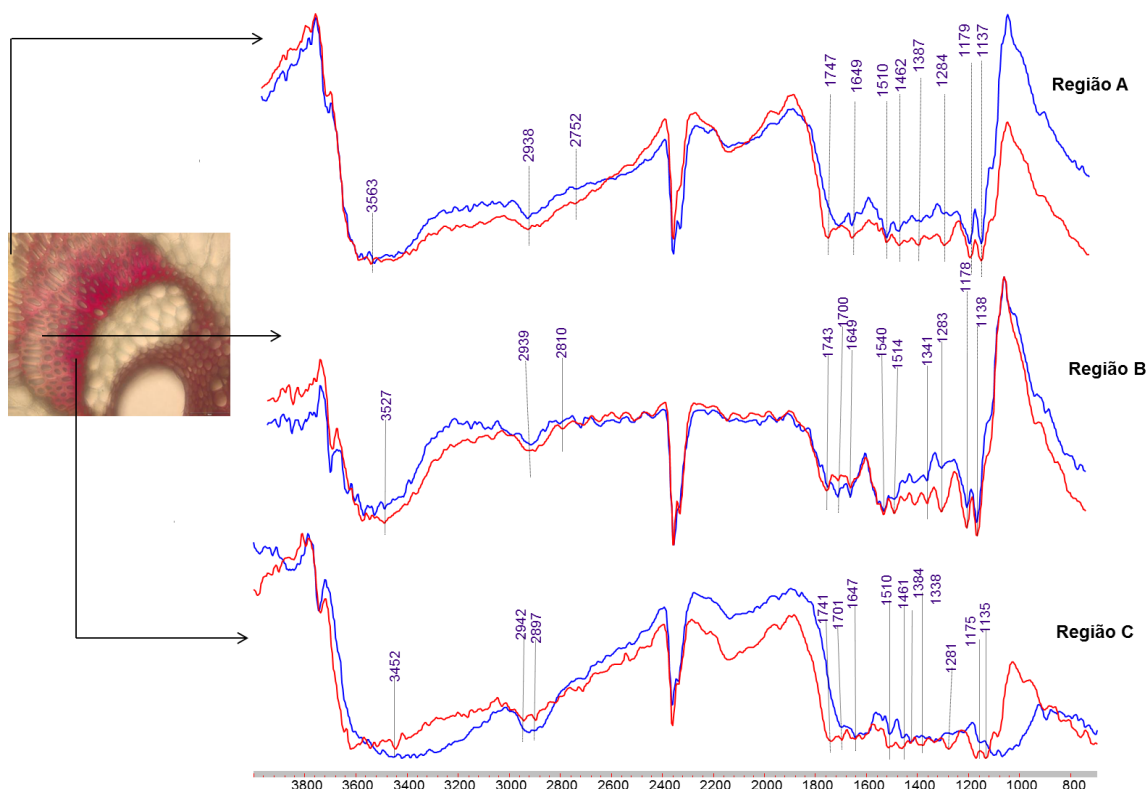


Figura 20. Espectros no infravermelho das regiões dos feixes vasculares (A, B e C) da planta adulta (PI) em duas condições de tratamento: linhas pretas – metanol por 24 horas e linhas azuis – metanol por 24 horas + NaOH 1%).

Segundo Willats et al. (2000) e Tranquet et al. (2009), a ocorrência de ácidos *p*-hidroxicinâmicos é mais alta em tecido adulto do que em tecido jovem, o que coaduna com a existência de ligações intramoleculares de natureza menos condensada de A para C. Allison et al. (2009) afirmam que os sinais em 1688 cm⁻¹ e 1630 cm⁻¹ podem ser associados às ligações entre lignina e ferulato e/ou cumarato, e que a presença deles favorecem o aparecimento do sinal forte em 1171 cm⁻¹. Essas atribuições foram comparadas com dados da literatura (Anexos 1 e 2) (LIN & DENCE, 1992). Na região C da planta adulta (PE) o espectro do tecido tratado com NaOH 1% mostrou que a absorções de estiramento de carbonila de éster hemicelulósico desapareceu revelando a sua presença; entretanto, o caráter ácido permaneceu revelado pelo sinal largo em 1701 cm⁻¹. Lozovaya et al. (1999), afirmam que tratamento alcalino brando com NaOH 1% apenas hidrolisa as ligações ésteres dos ácidos cinâmicos com a parede celular não

sendo possível nessa concentração romper as ligações etéricas com a lignina, e que apenas sob o tratamento com NaOH 4% a quente seria possível. A observação do sinal em $1700-1716\text{ cm}^{-1}$ pode ser atribuído aos ácidos *p*-hidroxicinâmicos (ácido *p*-cumárico). A Figura 21 mostra as possíveis ligações entre lignina-ácido *p*-cumárico-hemicelulose (ligação éter e/ou éster) e após a hidrólise alcalina com conectividade lignina-ácido *p*-cumárico e hemicelulose-ácido *p*-cumárico.

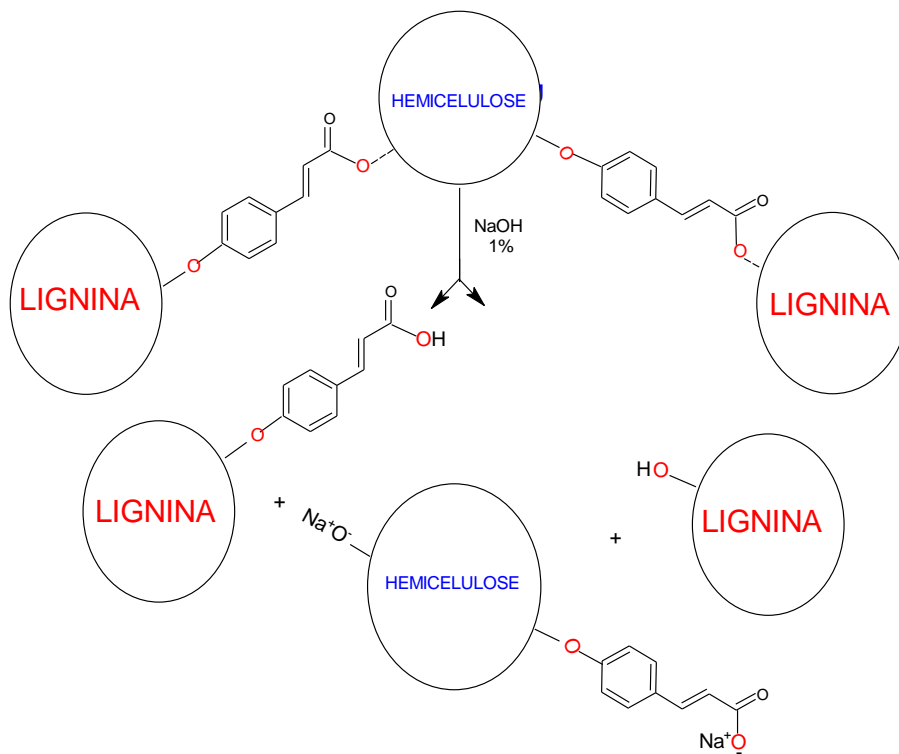


Figura 21. Tratamento alcalino com NaOH 1% dos tecidos levando a formação da lignina-ácido *p*-cumárico.

As absorções de aldeído em $1636-1650\text{ cm}^{-1}$ mantiveram-se com ligeira modificação em suas intensidades. Os sinais em forma de duplete em $1181-1137\text{ cm}^{-1}$ foi alterado ligeiramente na amostra B após tratamento com NaOH 1%. Embora os sinais do espectro C da amostra da planta adulta (PE) não tenham ficado bem definidos por apresentarem hemicelulose em grande concentração, esse mesmo espectro também apresentou sinal em 3541 cm^{-1} bastante largo.

Tabela 3. Atribuições dos sinais dos espectros por microscopia no infravermelho das regiões A, B e C da planta jovem e adulta (PI) e (PE) pré-extraídas com metanol por 24 horas (adaptada de LIN & DENCE, 1992).

cm⁻¹	Atribuições
3568	Estiramento de O-H
2938	Estiramento de C-H de grupos metílicos e metilênicos
1750-1746	Estiramento de C=O de grupos éster de carboidratos
1700-1696	Estiramento de C=O de ácido ou éster conjugado ou cetona conjugada
1651-1648	Estiramento de C=O em cetonas ou aldeídos conjugados
1600	Vibração do esqueleto aromático com estiramento de C=O, S > G, G condensado > eterificado.
1511-1506	Vibração do anel aromático
1473-1469	Deformação assimétrica de -CH ₃ e CH ₂
1393	Estiramento de CH e CH ₃ alifático exceto OCH ₃
1352-1341	Vibração do anel siringílico com contribuição do estiramento de C=O de estrutura condensada
1282	Vibração do anel guaiacílico com contribuição do estiramento de C=O

Tabela 4. Atribuições dos sinais dos espectros por microscopia no infravermelho das regiões A, B e C da planta jovem e adulta (PI) e (PE) pré-extraídas com metanol por 24 horas e tratadas com NaOH 1% (adaptada de LIN & DENCE, 1992).

cm⁻¹	Atribuição
3611-3609	Estiramento de O-H
2948-2938	Estiramento de C-H de grupos metílicos e metilênicos
1700-1699	Estiramento de C=O de ácido ou éster conjugado ou cetona conjugada
1660-1648	Estiramento de C=O em cetonas ou aldeídos conjugados
1600	Vibração do esqueleto aromático com estiramento de C=O, S > G, G condensado > eterificado.
1513-1512	Vibração do anel aromático
1473-1471	Deformação assimétrica de -CH ₃ e CH ₂
1393-1291	Estiramento de CH e CH ₃ alifático exceto OCH ₃
1348-1345	Vibração do anel siringílico com contribuição do estiramento de C=O de estruturas condensadas
1280-1279	Vibração do anel gaudiacílico com contribuição do estiramento de C=O
1181-1180	Estiramento de C-O de ácido ou ésteres insaturados e aromáticos: 2 sinais ou aromáticos e vinílicos e ou de carboidratos

4.3 Análises dos espectros no infravermelho do material caulinar da planta jovem e adulta

Os espectros foram registrados no modo de transmissão e as atribuições foram direcionadas para estimar a variação da estrutura da lignina nas amostras de plantas jovens e adultas (PI) e (PE), em amostras pré-extraídas e tratadas com NaOH 1%. Apesar de ser um método útil para o estudo das alterações químicas de madeira, os espectros de IV fornecem resultados gerais, visto que ocorre uma sobreposição dos sinais de lignina, hemicelulose e celulose.

Uma análise comparativa entre importantes sinais dos espectros foi realizada dividindo a intensidade desses sinais pelo sinal 1500 cm^{-1} de todos os espectros utilizando a técnica de linha base. Apesar de ser uma análise empírica é possível estimar essa comparação. Verificou-se ao analisar a Tabela 3 que na sequência da planta jovem, planta adulta (PI) e (PE), os sinais entre 1736 a 1738 cm^{-1} (estiramento $\nu\text{C}=\text{O}$ de éster alifático e/ou fenólico), diminuem sua razão da intensidade na ordem de 3,0; 2,5 e 2,0 o que revelou uma redução da hemicelulose esterificada entre outros ésteres ou éster fenólico. Usando o mesmo princípio de análise, verificou-se que entre 1640 - 1600 cm^{-1} (estiramento de carbonila de aldeídos e/ou cetona e/ou ácidos *p*-hidroxicinâmicos e estiramento de $\nu\text{C}=\text{C}$ houve diminuição das concentrações das substâncias carboniladas na sequência planta jovem, PI e PE, o que evidencia que as plantas jovens acumulam mais ácidos e aldeídos do que PI e PE respectivamente conforme Tabela 5.

Segundo Hergert (1971) apenas alguns poucos sinais são inequivocamente atribuídos, e muitos sinais podem ser interpretados de várias maneiras. Os sinais de estiramento de $\nu\text{O}-\text{H}$, $\nu\text{C}-\text{H}$, e $\nu\text{C}=\text{O}$, acima de 1600 cm^{-1} e a vibração do esqueleto do anel aromático em torno 1510 cm^{-1} são sinais "puros". McCann et al. (1992) afirmam que para as espécies químicas de interesse, a região mais importante do espectro se encontra na região entre 2000 a 900 cm^{-1} . O grupo éster carboxílico absorve em aproximadamente 1740 cm^{-1} , grupamento de ácidos carboxílicos em pectinas absorvem em 1610 cm^{-1} , grupos fenólicos em 1600 cm^{-1} e 1500 cm^{-1} e carboidratos apresentam sinais entre 1200 e 900 cm^{-1} .

Após hidrólise alcalina com NaOH 1%, os sinais do estiramento de $\nu\text{C}=\text{O}$ de éster desapareceram totalmente, sendo substituídos pelo sinal em torno de 1700 cm^{-1} que correspondente a presença de ácidos fenólicos. Estes resultados corroboraram com MacCann et al. (1992) que verificaram a variação de éster carboxílico em amostra de *Allium cepa*, utilizando diferentes soluções alcalinas.

Tabela 5. Cálculo empírico da concentração de ésteres, aldeídos, cetonas e ácidos por técnica de linha base utilizando os espectros no infravermelho do material lignocelulósico da planta jovem, PI e PE.

Amostras	Sinais mensurados	Intensidade em mm	Razão Sinal I de interesse/I de 1500 cm ⁻¹
Planta jovem	1738	6	3
	1640-1600	11	5,5
	1520	2	
Planta adulta (PI)	1737	15	2,5
	1640-1600	18	3
	1511	6	
Planta adulta (PE)	1736	20	2
	1640-1600	17	1,7
	1508	10	

Nota: I – Intensidade dos sinais; PI – parte interna; PE – parte externa

4.4 identificação e quantificação de ácido *p*-cumárico por CLAE

A determinação de ácidos fenólicos na parede celular pode oferecer informações importantes para a compreensão de como estes estão envolvidos na parede celular e na conexão entre a lignina e os carboidratos, bem como a influência destes na recalcitrância da lignina.

O método discutido neste trabalho revelou a presença de ácido *p*-cumárico nas amostras da planta jovem e planta adulta (PI e PE). Para a análise quantitativa da concentração do ácido *p*-cumárico foi elaborada uma curva de calibração. A equação obtida foi $f(x) = 7,25242e-006.(X) + 0,659972$, apresentando R² igual a 0,9990582.

O tempo de retenção do padrão foi de (RT – 4,59 min), correspondendo também aos perfis cromatográficos das amostras RT - 4,60; 4,69 e 4,68 e as concentrações do ácido *p*-cumárico foram 0,019; 0,0019 e 0,001 mg/mL da planta jovem, planta adulta (PI) e (PE), respectivamente (Figura 22). O perfil cromatográfico do padrão de ácido *p*-cumárico para planta jovem, planta adulta (PI) e (PE) está apresentado na Figura 23.

Os tecidos da planta jovem de *E. oleracea* apresentaram maior concentração de ácido *p*-cumárico do que os de plantas adultas (PI e PE). Substâncias foram observadas em planta jovem, PI e PE além do ácido *p*-cumárico, entretanto não foram identificadas. Esses resultados são diferentes dos encontrados em parede celular de poáceas, onde a concentração do ácido *p*-cumárico aumenta de plantas jovens para plantas adultas (MORRISON et al., 1998; JUNG et al., 1998).

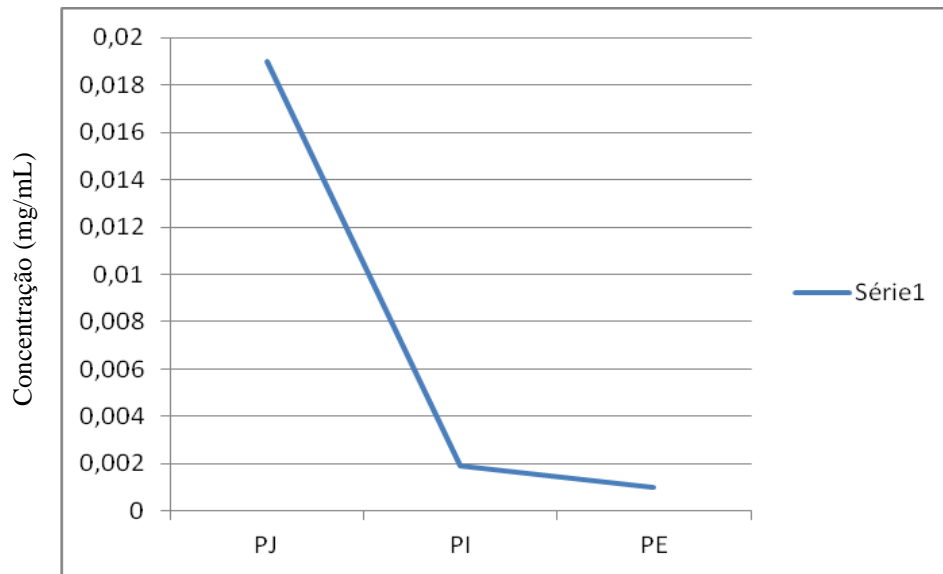


Figura 22. Declínio da concentração do ácido *p*-cumárico da planta jovem e adulta (PI e PE) de *E.oleracea*.
Nota: PJ – planta jovem; PI – parte interna; PE – parte externa.

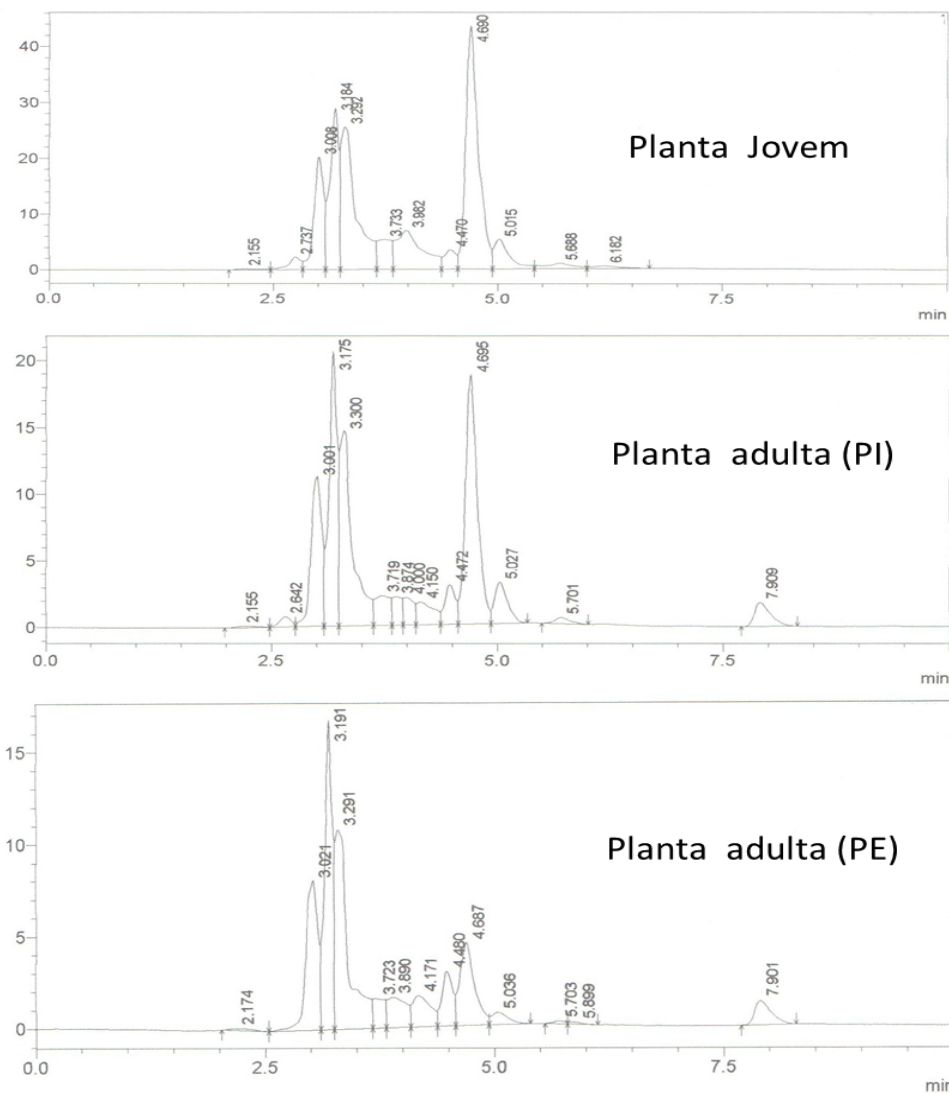
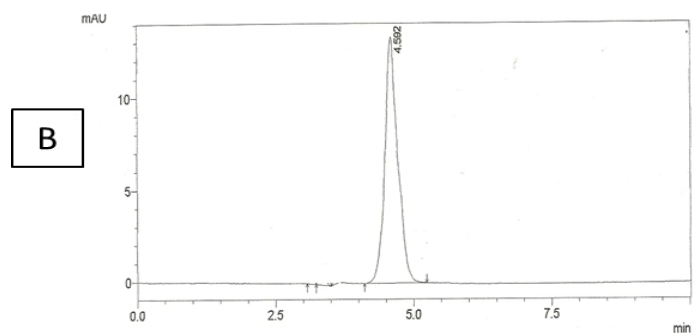
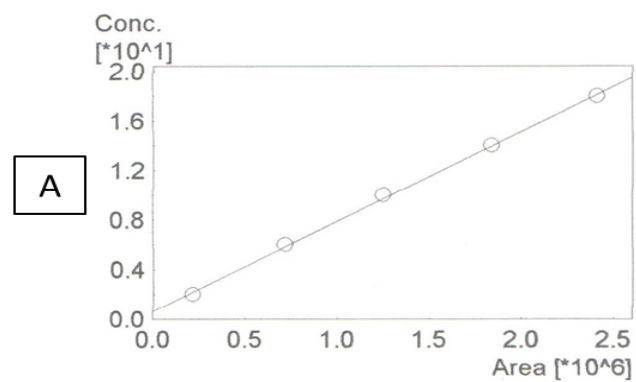


Figura 23. Curva de calibração do padrão de ácido *p*-cumárico (A) e perfis cromatográficos do ácido *p*-cumárico(B), planta jovem, planta adulta (PI) e (PE).

As análises conjuntas dos dados por CLAE e infravermelho permitiram observar que o ácido *p*-cumárico está principalmente ligado à parede celular por ligações éster, principalmente nas células do cilindro central (PI), constituído na maioria por células de parênquima fundamental. Isso não descarta a possibilidade desse fenol estar ligado a proteínas ou a outras substâncias da parede celular e significa também que a região da PE contém células dos feixes vasculares com baixa concentração de éster *p*-cumarato em suas paredes celulares.

Isso leva-nos a propor que esses ácidos em PE são incorporados às ligninas na condição de ligações ácido-sensível (ligação éter) o que configura uma estrutura de lignina eterificada, diferenciando de poáceas onde a concentração aumenta com a maturidade da planta. Outra proposta é que o ácido *p*-cumárico presente em altas concentrações em tecido jovem, possivelmente foi incorporado às estruturas da lignina que se tornaram altamente eterificadas, como foi verificada por diferentes técnicas de análise em tecidos adultos.

MORRISON et al. (1998); JUNG et al. (1998) descreveram que nas plantas jovens, os complexos éster/ácido ferúlico se constituem em sítios de nucleação. Isto porque, com o envelhecimento dos tecidos, a quantidade de ferulatos éster-ligados tende a se manter, enquanto aqueles éter-ligados é incrementado conforme a Figura 24.

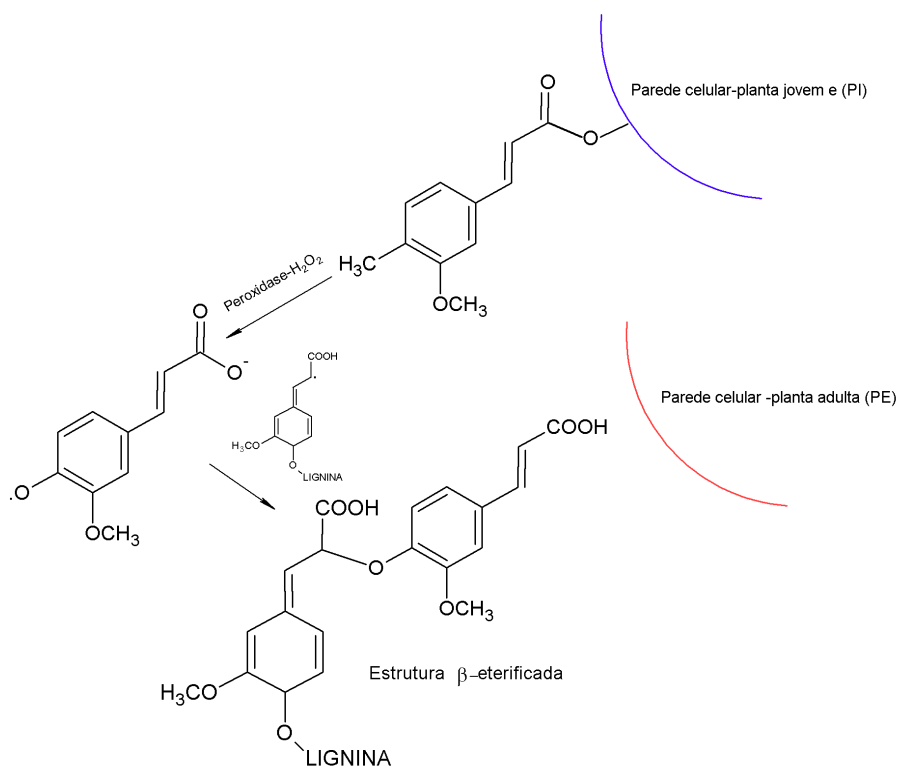


Figura 24. Formação de lignina em sítios de nucleação (ácido *p*-cumárico).

A concentração dos *p*-hidroxicinâmicos varia de acordo com o tipo de tecido e com o desenvolvimento da planta. Em poáceas, são mais comuns a presença dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico. A ligação do ácido ferúlico é mais ácido-sensível (ligação éter com a lignina) na posição β da cadeia lateral; ele também pode aparecer ligado aos polissacarídeos através de uma ligação álcali-sensível na forma de éster sobre o C-5 de um segmento de arabinosil de arabinosilana. O ácido *p*-cumárico é mais extensivamente esterificado através da lignina quando o mesmo é ligado em menor extensão aos

polissacarídeos. A deposição de ácido *p*-cumárico é contínua durante a lignificação e se torna mais predominante em tecidos mais adultos (TRANQUET et al., 2009; WILLATS et al., 2000).

4.5 Análises dos espectros de RMN DE ¹³C NO ESTADO SÓLIDO

Análise dos espectros de RMN de ¹³C do tecido oriundo da planta jovem e adulta (PI) e (PE) foram registrados e seus espectros analisados de acordo com a literatura (LIN & DENCE, 1992).

O espectro de uma amostra lignocelulósica pré-extraída assume características peculiares e de fácil reconhecimento em decorrência da sua composição múltipla formado pela celulose, hemicelulose e lignina. Embora os espectros sejam aparentemente simples, sua complexidade impõe uma análise acompanhada de outros métodos de análise. A anisotropia do material lignocelulósico conduz a espectros com sinais muito largos, visto que os sinais estão concentrados na região entre 50 e 120 ppm, no qual a grande parte é atribuído pelos carbonos da molécula de celulose, com contribuição de sinais de hemicelulose e lignina (REZENDE et al., 2011).

Os picos característicos de suberina aparecem em CP/MAS de RMN de ¹³C entre 29 e 33 ppm (característico de carbono metilênico em grande quantidade), em 110 - 160 ppm (aromáticos e alcenos), e 172 ppm (carbonilas de ácidos e ésteres). O sinal em torno de 50 - 56 ppm e entre 105 e 160 ppm, é característico da presença de ácidos *p*-hidroxicinâmicos e derivados O-metilados (GARBOW et al., 1989).

Tais atribuições mostraram que nos espectros de RMN de ¹³C CP/MAS das amostras sem extratos e tratadas com NaOH 1% apresentam sinais equivalentes principalmente em 29 - 33 ppm de baixa intensidade revelando a presença de carbonos (-CH₂-)_n, característica da cadeia alifática das suberinas nos espectros de RMN CP/MAS da planta jovem evidenciado pelos sinais em 25 ppm e 140 ppm.

Os deslocamentos químicos dos carbonos das unidades estruturais da lignina são relativamente complexos; entretanto, pode-se atribuir alguns sinais de espectros de modelos utilizados para determinação estrutural da lignina. Muito embora, estes sofram alterações em decorrência das ligações formadas entre as unidades, constituindo estruturas do tipo condensadas e eterificadas. Isso é refletido em diferentes grupos botânicos, assim como em distintas células, camadas celulares e a lamela média.

Os espectros de RMN de ¹³C apresentaram-se com pouca diferença, nas amostras livre de extratos dos indivíduos jovens e adultos (PI) e (PE), podendo observar o sinal em aproximadamente 169 ppm em todos os espectros (Figura 25). Segundo Lin & Dence (1992), os sinais em 163 a 180 ppm correspondem a carbonilas conjugadas de ácidos *p*-hidroxicinâmicos e de segmentos moleculares da lignina. Grupo acetoxílico de hemicelulose pode ocorrer em 173 ppm. Bardet et al. (2004) em trabalho com amostras de madeiras arqueológicas afirmam que se pode observar vários sinais de lignina em espectro de RMN de ¹³C. O pico em 56 ppm é característico de substituintes metoxila, na região entre 60 e 100 ppm para as cadeias de carbonos laterais com diferentes tipos de substituição. As estruturas aromáticas da lignina apresentam sinais entre 120 e 160 ppm. Nesta gama de sinais, o sinal intenso próximo a 153 ppm é atribuído ao oxigênio substituído (-OCH₃ e -OH) do carbono aromático.

O tratamento alcalino permitiu uma pequena melhoria da resolução dos espectros de RMN de ¹³C na região entre 50 a 120 ppm pela remoção de hemicelulose; porém, não houve modificação significativa. Em relação aos sinais de lignina, não houve alterações.

Experimento com precursor fenilalanina marcada nos carbonos [C1-13C], [C2-

^{13}C] e $[\text{C}3\text{-}^{13}\text{C}]$ *in situ* de *L. leucocephal* em microhidroponia, permitiu observar que os deslocamentos químicos dos carbonos α , β e γ da cadeia lateral ligados a carboidratos e outras unidades moleculares da lignina, mostram deslocamentos na faixa de 75 a 90 ppm. Sinais desses carbonos de qualquer material lignocelulósico em condições naturais tornam-se de difícil atribuições, pois são sobrepostos pelos sinais dos carbonos de celulose e outros carboidratos (LEWIS & YAMAMOTO, 1990).

Os espectros CP/MAS do caule da planta jovem e adulto (PE) e (PI) sem extratos foram divididos por regiões para facilitar as análises comparativas. As amostras pré-extraídas não mostraram modificações fortes, mas apenas os espectros das amostras dos tecidos da planta jovem. As atribuições estão na Tabela 6.

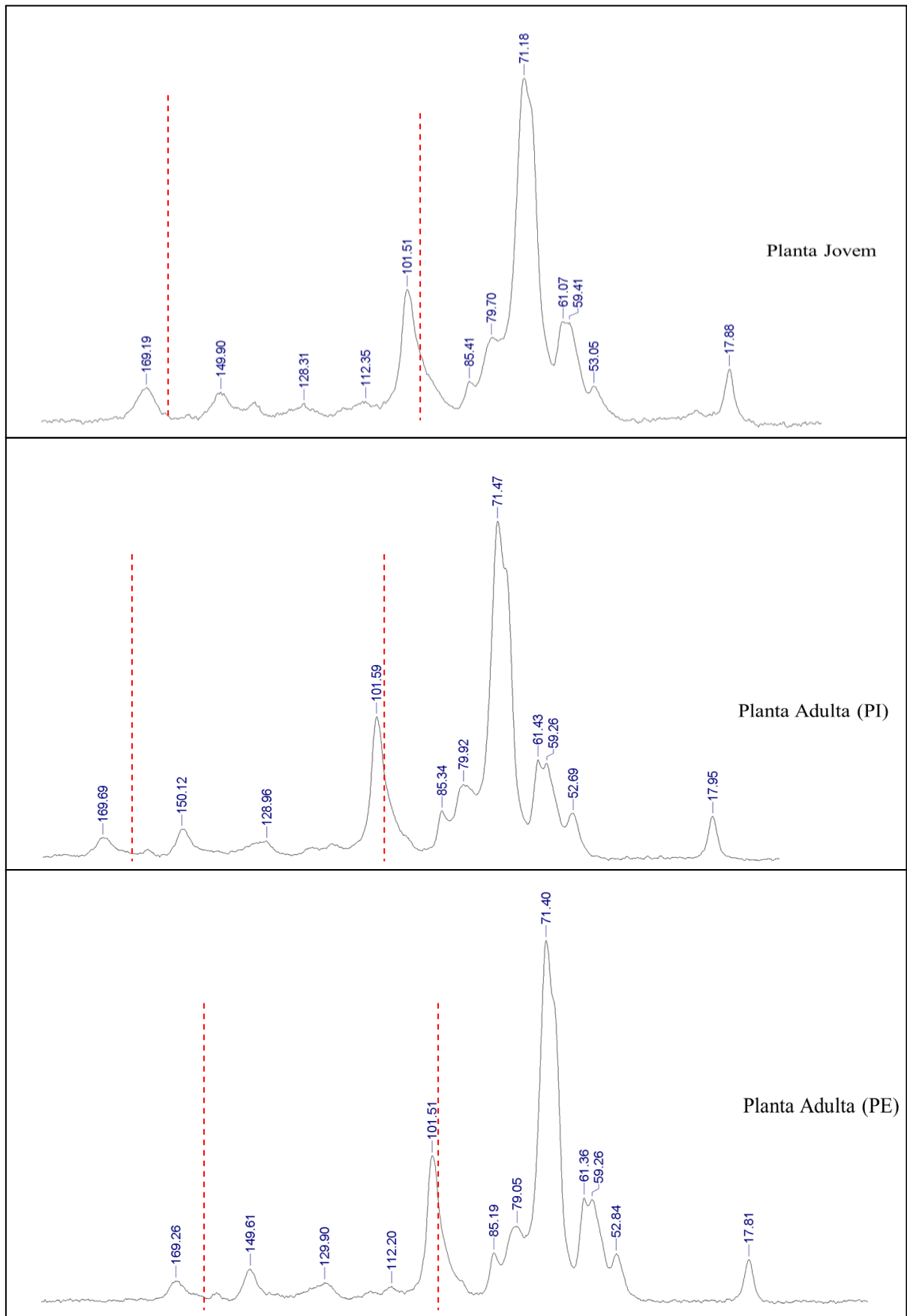


Figura 25. Espectro CP/MAS da planta jovem e adulta (PI) e (PE) sem extratos.

Tabela 6. Deslocamentos químicos dos constituintes do caule da planta jovem e adulta (PI) e (PE) de *E. oleracea* (adaptada de LIN & DENCE, 1992; WIKBERG, 2004; RESENDE et al 2011).

Deslocamento químico em ppm	Atribuição	Planta jovem	Planta adulta (PE)	Planta adulta (PI)
164 - 174	COO- de grupo acetílico de hemiceluloses e/ou C=O alfa em Ar- COOH e/ou Grupo carboxílico de lignina	Presente	Presente	Presente
153	C3 e C5 de S (e)	Presente	Presente	Presente
148	C3 e C5 (ne) de S e C1 e C4 de G	Presente	Presente	Presente
142	-C=C-	Presente	Ausente	Ausente
128	C α e C β em ARCH=CH-CH ₂ OH ou C2 de G	Presente	Presente	Presente
112	C2 e C6 de S e C5 e C6 de G	Presente	Presente	Presente
101	C-1 de celulose	Presente	Presente	Presente
98	C-1 de hemicelulose OMBRO	Presente	Presente	Presente
85	C-4 de celulose cristalina	Presente	Presente	Presente
84	C-4 de celulose amorfa	Presente	Presente	Presente
71 - 75	C-2/C-3/C-5 de celulose	Presente	Presente	Presente
61	C-6 de cellulose cristalina	Presente	Presente	Presente
59	C-6 de cellulose amorfa	Presente	Presente	Presente
53	OCH ₃ de lignina	Presente	Presente	Presente
26 - 33	-(CH ₂) _n - suberina	Presente	Ausente	Ausente
17	-CH ₃ de grupo acetílico de hemicelulose	Presente	Presente	Presente
		Presente	Presente	Presente

Nota: e- eterificado; ne – não eterificado; PI – parte interna; PE – parte externa.

5. CONCLUSÃO

A partir da avaliação da química lignoídica por meio da topoquímica, da histoquímica e dos métodos espectrométricos do caule jovem e adulto de *E.oleracea*, foi possível identificar que o depósito das unidades guaicílicas iniciou-se na lamela média e nos ângulos comuns às células. A existência do ácido *p*-cumárico, comum em monocotiledôneas, encontra-se nesta espécie altamente concentrado e está ligado à parede celular por ligação éster, principalmente nas células do cilindro central (PI – parte interna do caule). A região PE (parte externa do caule) se caracteriza por ser altamente lignificada onde as células do parênquima associadas ao feixe vascular disposta radialmente, mostram-se em processo de lignificação; entretanto com baixo acúmulo de éster *p*-cumarato ligado à lignina. A alta taxa de lignificação na parte externa (PE) coaduna com a existência de maior massa específica em caules de palmeiras, conferindo propriedades de resistência física, química e biológica.

O teste de Wiesner revelou uma variação na intensidade de cor nas calotas de fibras floemáticas, distinguindo-se três regiões (A, B e C). A condição de lignina livre na região PE até mesmo nas células parenquimatosas e fibrosas das regiões A, B e C do feixe vascular é prejudicada pela conectividade entre o ácido *p*-cumárico e a parede celular. Evidência de ligações etéricas ácido-sensíveis entre o ácido *p*-cumárico e lignina, principalmente em PE, permite supor que sob-hidrólise ácida a liberação da lignina torna-se mais facilitada do que se a mesma tivesse associada via ligação éster, configurando uma estrutura de lignina eterificada em PE, enquanto mais condensadas, ricas em unidade guaicílica e com mais baixo teor de unidades β -O-4 na região PI e na planta jovem. Isso é justificado pelos testes histoquímicos que acenam para existência de ligninas guaicílicas ricas em coniferaldeído, ligado ao núcleo molecular da lignina em células do feixe vascular na ordem crescente de A a C, coadunando com a hipótese que baixa atividade da cinamil álcool desidrogenase (CAD) promove o acúmulo de coniferaldeído, tanto na planta jovem como em PI e em PE. As ligninas da região A dos feixes vasculares, portanto, são mais ricas em ligninas com terminais cumarílicos e provavelmente de natureza siringílica, revelando que a expressão gênica em cada região do feixe vascular é diferente.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo topoquímico e químico do caule de *Euterpe oleracea* abrem novas perspectivas no entendimento da bioquímica da parede celular de palmeiras, contribuindo para o uso sustentável do caule que vise o uso para a produção de polpa e celulose, biocombustível, energia etc. Estudos dessa natureza ainda não foram realizados com essa palmeira, o que torna a dissertação inédita. A etapa seguinte será a realização de uma tese de Doutorado mais profunda focado nas espécies *Euterpe oleracea* e *Euterpe.edulis*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-WAHAB, M. H.; EL-MAHDY, M. A. ABD-ELLAH, M. F.; HELAL, G. K.; KHALIFA, F.; HAMADA, F. M. A. Influence of *p*-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart. **Pharmacological Research**, v. 48, p. 461-465, 2003.

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

ABREU, H. S.; OERTEL, A. C. Estudo químico da lignina de *Paullinia rubiginosa*. **Revista Cerne**, v. 5, n. 1, p. 52-60, 1999.

ABREU, H. S. Determinação do teor de lignina por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier para as madeiras de *Lophanthera Lactescens*, *Gallesia Gorazema*, *Peltogyne Paniculata*, *Aspidosperma Macrocarpum* e *A. Polyneuron*. **Revista Universidade Rural**, Série Ciências da Vida. v. 17, n 1, p. 45-49, 1995.

ABREU, H. S. **Biossíntese da lignificação**, Editora Universidade Rural, 1994, 60 p.

ALLISON, G. G.; THAIN, S. C.; MORRIS, P.; MORRIS, C.; HAWKINS, S.; HAUCK, B.; BARRACLOUGH, T.; YATES, N.; SHIELD, I.; BRIDGWATER, A. V.; DONNISON, I. S. Quantification of hydroxycinnamic acids and in perennial forage and energy grasses by Fourier-transform infrared spectroscopy and partial squares regression, **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1252–1261, 2009.

ALTMAN, R. F. A O caroço do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). **Boletim Técnico do Instituto Agrônomo do Norte**, Belém, 31, p. 109-111.

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

BARBER, M. S.; MITCHELL, H. J. Regulation of phenylpropanoid metabolism in relation to lignin biosynthesis in plants. **International Review of Cytology**, v. 172, p. 243-293, 1997.

BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Editora UFV, Universidade Federal de Viçosa. 2008. 189 p.

BARDET, M.; FORAY, M. F.; MARON, S.; GONÇALVES, P.; TRÂN, Q. K.; Characterization of wood components of Portuguese medieval dugout canoes with high-resolution solid-state NMR. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, p. 419–424, 2004.

BARROS, C. F.; MIGUENS, F. C. 1998. Ultrastructure of the epidermal cells of *Beilshmedia rigida* (Mez) Kosterm. (Lauraceae). **Acta Microscopica**, v. 6, n. 3, p. 451-461, 1998.

BATEMAN, R. M.; CRANE, P. R.; DIMICHELE, W. A.; KENRICK, P. R.; ROWE, N. P.; SPECK T, STEIN, W. E. Early evolution of land plants: phylogeny, physiology, and ecology of the primary terrestrial radiation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, p. 263–292, 1998.

BAUCHER, M.; M. A. Bernard Vailhe, B. Chabbert, J. M. Besle, C. Opsomer, M. Van Montagu, and J. Botterman. Down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) and the effect on lignin composition and digestibility. **Plant Molecular Biology**, v. 39, p. 437–447, 1999.

BIDLEMGMEYER, B. A. **Practical HPLC Metodology and Aplications**. 1 ed Nova York, NY: Wiley Intersciense Publication, 1992, 449 p.

BLOKKER, P.; BOELEN, P.; BROEKMAN, R.; ROZEMA, J. The occurrence of *p*-coumaric acid and ferulic acid in fossil plant materials and their use as UV-proxy. **Plant Ecology**, v. 182, p. 197-207, 2006.

BOERJAN, W. Biotechnology and the domestication of forest trees. **Current Opinion Biotechnology**, v. 16, p. 159 - 166, 2005.

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

BOIJA, E.; JOHANSSON, G. Interactions between model membranes and lignin -related compounds studied by immobilized liposome chromatography. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1758, p. 620–626, 2006.

BÖRJESSON; T.; STENBERG; B.; SCHNÜRER; J. Near-Infrared Spectroscopy for Estimation of Ergosterol Content in Barley: A Comparison between Reflectance and Transmittance Techniques. **Cereal Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 231-236, 2007.

BOUDET, A. M.; KAJITA, S.; GRIMA-PETTENATI, J.; GOFFNER, D. Lignins and lignocellulosics: A better control of synthesis for new and improved uses. **Trends in Plant Science**, v.8, p. 576-581, 2003.

BOUDET, A.-M. Lignins and lignification: selected issues. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.38, p. 81–96, 2000.

BRETT, C. T.; WENDE, G.; SMITH, A. C.; WALDRON, K. W. Biosynthesis of cell-wall ferulate and diferulates. **European Food Research and Technology**, v. 214, p. 482–488, 1999.

BRETT, C. T.; WALDRON, K. Cell wall formation. In: **Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls**, Brett C. T. and Waldron K., eds (London: Chapman & Hall), 1996, 75-111 p.

BRUICE, P. Y. Organic Chemistry. Editora Prentice Hall, 4th edição, 864 p. 2005.

CAMPOS, F. A. M.; PECHNIK, M.; SIGUEIRA, R. de. Valor nutritivo de frutas brasileiras. **Arq. Bras. Nutr.**, v. 8, n. 2, p. 99-161, 1951.

CAÑO-DELGADO, A.; PENFIELD, S.; SMITH, C.; CATLEY, M.; BEVAN, M. Reduced cellulose synthesis invokes lignification and defense responses in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 34, p. 351–362, 2003.

CAREY, F. A. **Química Orgânica**. Vol. 1, 7ª edição. The McGraw-Hill Companies, Inc., New York. 2008, 764 p.

CHIQUIMATO. Disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/reaction/misc/shikim.html> Acesso em 04 abr 2012.

CHO, M.; COREA, O. R. A.; YANG, H.; BEDGAR, D. L.; LASKAR, D. D.; ANTEROLA, A. M.; ANTEROLA, F. A. M.; HOOD, R. L.; KOHALMI, S. E.; BERNARDS, M. A.; KANG, C.; DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G. Phenylalanine biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* identification and characterization of arogenate dehydratases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 42, p. 30827-30835, 2007.

COATES, J. P. Vibrational Spectroscopy: Instrumentation for Infrared and Raman Spectroscopy. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 33, n. 4, p. 267-425, 1998.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas, SP: Editora Unicamp, 2006, 452 p.

CORTEZ, L. A. B.; LORA, E. E. S.; GÓMEZ, E. O. **Biomassa para energia**. Campinas, SP: Editora Unicamp, 2008, 734 p.

CROCKER, M. **Thermochemical Conversion of Biomass to Liquid Fuels and Chemicals**. Royal Society of Chemistry. 2010, 532 p.

CROMATOGRAFIA. Disponível em: http://www.setor1.com.br/analises/cromatografia/in_tro.htm Acesso em: 21 set 2009.

DEGANI, A. L.; CASE, Q. L.; VIERA, P. C. **Cromatografia um breve ensaio**. Química nova na escola, São Paulo, n. 7, 1998, 25 p.

DESCHAMPS, F. C.; RAMOS, L. P. Método para a determinação de ácidos fenólicos na parede celular de forragens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 4, p. 1634-1639, 2002.

DONALDSON, L. A. Lignification and lignin topochemistry – an ultrastructural view. **Phytochemistry**, v. 57, p.859-873, 2001.

DONALDSON, L. A.; LAUSBERG, M. J. F. Comparison of conventional transmitted light and confocal microscopy for measuring wood cell dimensions by image analysis. **IAWA Journal**, v. 19, n 3, p. 321-336, 1998.

DU, L. **Hull, ferulic acid, para-coumaric acid content and particle size characteristics of various barley varieties in relation to nutrient availability in ruminants**. 2008. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Departamento de Ciência Animal e Aves, Universidade de Saskatchewan, Saskatoon, Canadá.

DURIG, J. R.; SULLIVAN, J. F. Vibrational spectroscopy, Fourier transforms and analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 9, n. 4, p. 104-106, 1990.

EAMES, A. J.; MacDANIELS, L. H. **An Introduction to Plant Anatomy**. 2^a edição, McGraw-Hill Book Company, Inc. New York e London, 1947, 427 p.

EIKREM, L. O. Process Fourier transform infrared spectroscopy. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 9, n. 4, p. 107-109, 1990.

ERASO, F.; HARTLEY, R. D. Monomeric and dimeric phenolic constituents of plant-cell walls possible factors influencing wall biodegradability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 163–170, 1990.

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

FUKUSHIMA, K.; TERASHIMA, N. Heterogeneity in formation of lignin XIV. Formation and structure of lignin in differentiating xylem of *Ginkgo biloba*. **Holzforschung**, v. 45, p. 87-94, 1991.

GARBOW, J. R.; FERRANTELO, L. M.; STARK, R. E. ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Study of Suberized Potato Cell Wall. **Plant Physiology**, v. 90, p. 783-787, 1989.

GEETHA, N. P.; MAHESH, M.; BETTADIAH, B. K.; KINI, R. K.; PRAKASH, H. S. HPLC Method for Determination of *p*-coumaric acid from the Medicinal Herb *Leptadina reticulata*. **International Journal of Phytomedicine**, v. 3, p. 319-324, 2011.

GILL, R.; High pressure liquid chromatography. In Clarkes Isolation and identification of Drugs. Ed. The pharmaceutical Press. London, 1986, p. 201-220.

GLEASON, F. K.; CHOLLET, R. **Plant biochemistry**. Jones & Bartlett Learning books. 2012, 240 p.

GOUVÊA, D. D. S. **Caracterização anatômica e ultraestrutural de sementes de *Euterpe oleracea* Mart.** 2007, 64p. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, Belém – AM, 2007.

GRABBER, J. H. How Do Lignin Composition, Structure, and Cross-Linking Affect Degradability? A Review of Cell Wall Model Studies, **Crop Science Society of America**, v. 45, p. 820-831, 2005.

GRABBER, J. H.; RALPH, J.; LAPIERRE, C.; BARRIÈRE, Y. Genetic and molecular basis of grass cell-wall degradability. I. Lignin–cell wall matrix interactions. **Comptes Rendus Biologies**, v. 327, p. 455–465, 2004.

GRABBER, J. H.; HATFIELD, R. D.; RALPH, J. Diferulate cross-links impede the enzymatic degradation of non-lignified maize walls. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 77, p. 193–200, 1998.

GROOVER, A. T. What genes make a tree a tree? **Trends in Plant Science**, v. 10, p. 211-214, 2005.

HARTLEY, R. D.; MORRISON, W. H III. Monomeric and dimeric phenolic acids released from cell walls of grasses by sequential treatment with sodium hydroxide. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 55 p. 365–375, 1991.

HARTLEY, R. D. Phenolic monomers and dimers of the plant cell wall and their effects on fiber utilisation. In D. E. Akin, L. G. Ljungdahl, J. R. Wilson e P. J. Harris (eds.) **Microbial and Plant Opportunities to Improve Lignocellulose Utilisation by Ruminants**. Elsevier Science Publishing Co., Inc., USA, 1990, 183-194 p.

HATFIELD, R. D.; RALPH, J.; GRABBER, J. H. Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 79, p. 403–407, 1999.

HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNAL, R. **Euterpe, prestoca, and neonicholsonia (Palmae: Euterpeinae)**. New York: New York Botanical Garden, 1996. 90 p.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 10–18, 2008.

HERGERT, H. L. Infrared spectra. In: SARKANEN K. V., LUDWIG, C. H (eds) **Lignins. Occurrence, formation, structure and reactions**. Wiley-Interscience, New York, 1971, 267 – 293 p.

HERRMANN, K. The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. **Plant Physiology**, v. 107, p. 7–12, 1995.

HERRMANN, K. M.; WEAVER, L. M. The shikimate pathway. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 473-503, 1999.

HIGUCHI, T.; ITO, T.; UMEZAWA, T.; HIBINO, T.; SHIBATA, D. Red-brown color of lignified tissues of transgenic plants with antisense CAD gene: Wine-red lignin from coniferyl aldehyde. **Journal of Biotechnology**, v. 37, p. 151-158, 1994.

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

HOPKINS, D. W.; WEBSTER, E. A.; BOERJAN, W.; PILATE, G.; HALPIN, C. Genetically modified lignin below ground. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 168–169, 2007.

HUMBERT, F.; QUILÈS, F. *In-situ* study of early stages of biofilm formation under different environmental stresses by ATR-FTIR spectroscopy. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**. v. 2, 2011, 889-895 p.

IYAMA, K.; LAM, T. B. T. Structural characteristics of cell walls of forage grasses – Their nutritional evaluation for ruminants. Review. **Asian–Australasian Journal of Animal Science**, v. 14, p. 862–879, 2001.

ITOH, T. Lignification of bamboo (*Phyllostachys heterocycla* Mitf.) during its growth. **Holzforschung**, v. 44, p. 191–200, 1990.

JUNG, H. G.; MORRISON, T. A.; BUXTON, D. R. Degradability of cell wall polysaccharides in maize internodes during stalk development. **Crop Science**, v.38, p.1047-1051, 1998.

JUNG, H. G.; BUXTON, D. R.; HATFIELD, R. D.; RALPH, J. **Forage Cell Wall Structure and Digestibility**, American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, 1993.

JUNG, H. G.; VOGEL, K. P. Lignification of switchgrass (*Panicum virgatum*) and big bluestem (*Andropogon gerardii*) plant parts during maturation and its effect on fiber degradability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 169-176, 1992.

KAISER, C. R. RMN 2D: detecção inversa e gradient de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 231-236, 2000.

KALASINSKY, K. S. Industrial applications of vibrational spectroscopy. **Trends in Analytical Chemistry**, v.9, n.3, p.83-89, 1990.

KAPLAN, M. A. C.; ABREU, H. S.; LIMA, H. R. P.; SOARES, G. L. G. Abordagem quimiosistemática e Evolução química de fanerógamas. Editora Edur, Rio de Janeiro, Brasil, 2010, 277p.

KÄRKÖNEN, A.; KOUTANIEMI, S. Lignin biosynthesis studies in plant tissue cultures. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, n. 2, p. 176–185, 2010.

KATAOKA, Y.; KONDO, T. FT-IR Microscopic Analysis of Changing Cellulose Crystalline Structure during Wood Cell Wall Formation, **Macromolecules**, v. 31, n. 3, p. 760–764, 1998.

KAWAOKA, A.; NANTO, K.; ISHII, K.; EBINUMA, H. Reduction of lignin content by suppression of expression of the LIM domain transcription factor in *Eucalyptus camaldulensis*. **Silvae Genetica**, v. 55, p. 269–277, 2006.

KIM, H., RALPH, J.; LU, F.; RALPH, S. A.; BOUDET, A. M.; SEDEROFF, R. R.; ITO, T.; KAWAI, S.; OHASHI, H.; HIGUCHI, T. NMR analysis of lignins in CAD-deficient Plants. 1. Incorporation of hydroxycinnamyl and hydroxybenzyl aldehydes into lignins. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 1, p. 1–15, 2003.

KISHORE, G.M.; SHAH, D. M. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. **Annual Review of Biochemistry**, v. 57, p. 627–63, 1988.

KRAUS, J. E. ARDUIN, M. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. EDUR. Seropédica, BR. 1997, 198 p.

KROON, P. A.; WILLIAMSON, G. Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 355-336, 1999.

LAM, T. B. T.; IYAMA, K.; STONE, B. A. Hot alkali-labile linkages in the walls of the forage grass *Phalaris aquatica* and *Lolium perenne* and their relation to in vitro wall digestibility. **Phytochemistry**, v. 64, p. 603–607, 2003.

LEPLÉ, J. C.; DAUWE, R.; MORREEL, K.; STORME, V.; LAPIERRE, C.; POLLET, B.; NAUMANN, A.; KANG, K.Y.; KIM, H.; RUEL, K. et al. Downregulation of cinnamoylcoenzyme A reductase in poplar: multiple-level phenotyping reveals effects on cell wall polymer metabolism and structure. **Plant Cell**, v. 19, p. 3669–3691, 2007.

LAPIERRE, C.; POLLET, B.; MACKAY, J. J.; SEDEROFF, R. R. Lignin structure in a mutant pine deficient in cinnamyl alcohol dehydrogenase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 2326-2331, 2000.

LEWIS, N. G.; SARKANEN, S. Lignin and lignin Biosynthesis. In: **Lignin and Lignan Biosynthesis**; Lewis, N., et al.; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 1998, 1-27 p.

LEWIS, N. G.; YAMAMOTO, E. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 41, p. 455-496, 1990.

LIMA, K. M. G.; RAIMUNDO Jr., I. M.; SILVA, A. M. S.; PIMENTEL, M. F. Sensores ópticos com detecção no infravermelho próximo e médio. **Química Nova**, v. 32, n. 6, 1635-1643, 2009.

LIN, S. Y.; DENCE, C. W. **Methods in lignin chemistry**. Berlin: Springer-Verlag, 1992, 568 p.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M.; COSTA, J. T. M.; CERQUEIRA, L. S. C.; FERREIRA, E. **Palmeiras Brasileiras e Exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarium, 2004, 416 p.

LOUGH, W. J.; WAINER, I. W. **High Performance liquid chromatography: fundamental principles and practice**. Blackie Academic and Professional, 1995, 288 p.

LOZOVAYA, V. V.; GORSHKOVA, T.; YABLOKOVA, E. V.; RUMYANTSEVA, N.; VALIEVA, A.; ULANOV, A.; WIDHOLM, J. Cold alkali can extract phenolic acids that are ether linked to cell wall components in Dicotyledonous plants (buckwheat, flax and soybean). **Phytochemistry**, v. 50, p. 395-400, 1999.

MACOMBER, R. S. **A complete introduction to modern NMR spectroscopy**. New York Wiley, 1998, 379 p.

McCANN, M. C.; HAMMOURI, M.; WILSON, R.; BELTON, P.; ROBERTS, K. Fourier transform infrared microspectroscopy is a new way to look at plant cell walls. **Plant Physiology**, v. 100, p. 1940-1947, 1992.

MAEDA, H.; DUDAREVA, N. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, p.73–105, 2012.

MAEDA, H.; SHASANY, A. K.; SCHNEPP, J.; ORLOVA, I.; TAGUCHI, G.; COOPER, B. R.; RHODES, D.; PICHERSKY, E.; DUDAREVA, N. RNAi suppression of Arogenate Dehydratase1 reveals that phenylalanine is synthesized predominantly via the arogenate pathway in petunia petals. **Plant Cell**, v. 22, p. 832-849, 2010.

MARCOS M, GARCÍA-CUBERO MT, GONZÁLES-BENITO G, COCA M, BOLADO S, LUCAS S. Optimization of the enzymatic hydrolysis conditions of steam-exploded wheat straw for maximum glucose and xylose recovery. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 88, p. 237 – 246, 2013.

MICHELL, A. J.; HIGGINS, G. H. **Infrared spectroscopy in Australian Forest Products Research**. CSIRO Forestry and Forest Products, Melbourne, Austrália, 2002.

MIRANDA, D. L.C., SANQUETTA, C. R., COSTA, L. G. S., CORTE A. P. D. Biomassa e carbono em *Euterpe oleracea* Mart., na Ilha do Marajó – PA. **Floresta e Ambiente**, v. 19, n. 3, p. 336-343, 2012.

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

MORRISON, T. A.; JUNG, H. G.; BUXTON, D. R.; HATFIELD, R. D. Cell-wall composition of maize internodes of varying maturity. **Crop Science**, v. 38, p. 455–460, 1998.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673–686, 2005.

MOUSSAOUI, S.; CARTERET, C.; BRIE, D.; MOHMMAD-DJAFARI, A. Bayesian analysis of spectral mixture data using Markov chain Monte Carlo methods. **Chemometrics and intelligent laboratory systems**, v. 81, p. 137-148. 2006.

NAKAMURA, Y.; HIGUCHI, T. Ester linkage of *p*-coumaric acid in bamboo lignin. **Holzforschung**, v. 30, p. 187-191, 1976.

NAKAMURA, Y.; HIGUCHI, T. Ester linkage of *p*-coumaric acid in bamboo lignin. II. Syntheses of coniferyl *p*-hydroxybenzoate and coniferyl *p*-coumarate as possible precursors of aromatic acid esters in lignin. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 12, p. 199-208, 1978.

NAUMANN, D. **Infrared spectroscopy in Microbiology**. Encyclopedia of Analytical Chemistry, ed. R. A Meyers, Chichester, 2000, 102-131 p.

NETO, F. R. A.; NUNES, D. S. S. **Cromatografia princípios básicos e técnicas afins**. Editora Interciência, Rio de Janeiro, 2003, 187 p.

O'CALLAGHAN, D.; MASKELL, D.; LIEW, F.Y.; EAS-MON, C.S.; DOUGAN, G. Characterization of aromatic- and purine-dependent *Salmonella typhimurium*: attenuation, persistence, and ability to induce protective immunity in BALB/c mice. **Infection and Immunity**, v. 56, p. 419–23, 1988.

OSAKABE, K.; TSAO, C. C.; LI, L.; POPKO, J. L.; UMEZAWA, T.; CARRAWAY, D. T.; SMELTZER, R. H.; JOSHI, C. P.; CHIANG, V. L. Coniferyl aldehyde 5-hydroxylation and methylation direct syringyl lignin biosynthesis in angiosperms. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 96, p. 8955–8960, 1999.

PFARMA. Disponível em: <<http://www.pfarma.com.br/farmaceutico-industrial/130-cromatografia-liquida-de-alta-eficiencia.html>> Acesso em 20 jan 2013.

PAULA, J. E. Anatomia de *Euterpe oleracea* Mart. (Palmae da Amazônia). **Acta Amazonica**, v. 5, n. 3, p. 265-278, 1975.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introdução à espectroscopia**. Editora CENGAGE, 2010, 716 p.

PEREIRA, R. P. W.; MONTEIRO, M. B. O.; ABREU, H. S. **Bioinformação do Processo de Lignificação**. Edur, UFRRJ, 2012, 124 p.

PERES, T. B. **Noções básicas de cromatografia**. São Paulo, v 64, n. 2, p. 227-229, 2002.

POMAR, F., F. MERINO, AND A. ROS BARCELO'. O-4-Linked coniferyl and sinapyl aldehydes in lignifying cell walls are the main targets of the Wiesner (phloroglucinol-HCl) reaction. **Protoplasma**, v. 220, p. 17–28, 2002.

POULIN, J. **The role of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase 1 in *Arabidopsis Thaliana* metabolism**. Thesis (Master of Science) – Department of Cell and System Biology, University of Toronto, Canadá, 2011.

PROVAN, G. J.; SCOBIE, L.; CHESSON, A. Characterisation of lignin from CAD and OMT deficient BM mutants of maize. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 73, p. 133–142, 1997.

RALPH, J. Hydroxycinnamates in lignification. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, p. 65–83, 2010.

RALPH, J.; BRUNOW, G.; BOERJAN, W. **Lignins**. Encyclopedia of Life Science, 2007, 10 p.

RALPH, J.; HATFIELD, R. D.; GRABBER, J. H.; JUNG, H. G.; QUIDEAU, S.; HELM, R. F. Cell wall cross-linking in grasses by ferulates and diferulates. In: **Lignin and Lignan Biosynthesis**; Lewis, N. G., Sarkanen, S., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, p.209-236, 1998.

RALPH, J.; MACKAY, J. J.; HATFIELD, R. D.; O'MALLEY, D. M.; WHETTEN, R. W.; SEDEROFF, R. R. Abnormal lignin in a loblolly pine mutant. **Science**, v. 277, p. 235–239, 1997.

RALPH, J.; GRABBER, J. H.; HATFIELD, R. D. Lignin-ferulate cross-links in grasses: active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins. **Carbohydrate Research**, v. 275, p. 167-178, 1995.

RALPH, J.; HATFIELD, R. D.; QUIDEAU, S.; HELM, R. F.; GRABBER, J. H.; JUNG, H.-J. G. Pathway of *p*-coumaric acid incorporation into maize lignin as revealed by NMR. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, p. 9448–9456, 1994.

RALPH, J.; HELM, R. F. Lignin/hydroxycinnamic acid/polysaccharide complexes: Synthetic models for regiochemical characterization. In: **Forage Cell Wall Structure and Digestibility**, International Symposium; Jung, H. G., Buxton, D. R., Hatfield, R. D., Ralph, J., Eds.; ASA-CSSA-SSSA: Madison, WI, 1993, 201-246 p.

RAVEN, J. A. Physiological correlates of the morphology of early vascular plants. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 88, p. 105-126, 1984.

REFFNER, J. A.; MARTOGLIO, P. A. Uniting microscopy and spectroscopy. In: Humecki HJ, editor. **Practical guide to infrared microspectroscopy by Fourier transform infrared microscopy: the results of case copy**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1995, 41–86 p.

REZENDE, C. A.; LIMA, M. A.; MAZIERO, P.; AZEVEDO, E. R.; GARCIA, W.; POLIKARPOV, I. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 54, 2011.

RUDALL, P. J. Leaf anatomy and systematics of Mariceae (Iridaceae). **Kew Bulletin**, v. 48, n. 1, p. 151-160, 1992.

SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. **Sugarcane Bioenergy, Sugar and Ethanol – Technology and Prospects** - . MAPA/ACS: UFV/DEA, Brasília, 2012, 568p.

SARKANEN, K. V.; LUDWIG, C. H. Definition and nomenclature. In K. V. Sarkanen and C. H. Ludwig [eds.], **Lignins: occurrence, formation, structure and reactions**, 1–18. Wiley, New York, New York, USA 1971.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5ª edição, Porto Alegre: Bookman, 2002, 836 p.

SMITH, D. C. C. Ester groups in lignin. **Nature**, v. 176, p. 267-268. 1955.

STEWART, D. Fourier Transform Infrared Microspectroscopy of Plant Tissues, **Society for applied spectroscopy**, v. 50, n. 3, p. 357-365, 1996.

STEWART, D.; McDOUGALL, G. J.; BATY, A. Fourier-Transform Infrared Microspectroscopy of Anatomically Different Cells of Flax (*Linum usitatissimum*) Stems during Development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 7, p. 1853-1858, 1995.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**, 3 edição, Nova Odessa, SP: Instituto Platarum, 2012, 768p.

TAPPI - Technical Association of the Pulp and Paper Industry. TAPPI test methods T 212 os-76: one per cent sodium hydroxide solubility of wood and pulp. Atlanta: Tappi Technology Park, 1979.

TERASHIMA, N. Formation and ultrastructure of lignified plant cell walls. In: **New Horizons in Wood Anatomy**. Ed. Y.S. Kim. Chonnam National University Press, Kwangju, Korea, p. 169–180, 2000.

THORSTENSSON, E. M. G.; BUXTON, D. R.; CHERNEY, J. H. Apparent inhibition to digestion by lignin in normal and brown midrib stems. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 59, p.183–188, 1992.

TOMLINSON, P. B.; HUGGETT, B. Cell longevity and sustained primary growth in palm stems. **American Journal of Botany**, v. 99, n. 12, p. 1891-1902, 2012.

TRANQUET, O.; SAULNIER, L.; UTILLE, J-P.; RALPH, J.; GUILLON, F. Monoclonal antibodies to *p*-coumarato, **Phytochemistry**, v. 70, p. 1366-1373, 2009.

TRONCHET, M.; BALAGUE', C.; KROJ, T.; JOUANIN, L.; ROBY, D. Cinnamyl alcohol dehydrogenases C and D, key enzyme sin lignin biosynthesis, play an essential role in disease resistance in Arabidopsis. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, p. 83–92, 2010.

VAILHE, M. A. B.; BESLE, J. M.;MAILLOT, M. P.;CORNU, A.;HALPIN, C.;KNIGHT, M. Effect of down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase on cell wall composition and on degradability of tobacco stems. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, p. 505–514, 1998.

VANHOLME, R.; DEMEDTS, B.; MORREEL, K.; RALPH, J.; BOERJAN, W. Lignin biosynthesis and structure. **Plant Physiology**, v. 153, p. 895 – 905, 2010.

VARISI, V. A. **Caracterização de enzimas envolvidas na síntese de lisina de milho e quinoa**. Tese (Doutorado em Agronomia) – Setor de Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2007.

VELISEK, J.; CEJPEK, K. Biosynthesis of food constituents: Amino acids: 2. The alanine-valine-leucine, serine-cysteine-glycine, and aromatic and heterocyclic amino acids groups – a review. **Czech Journal of Food Sciences**, Prague, v. 24, p.45-58, 2006.

VOGT, T. Phenylpropanoids biosynthesis. **Molecular Plant**, v. 3, n 1, p. 2–20, 2010.

WADENBÄCK, J.; VON ARNOLD, S.; EGERTSDOTTER, U.; WALTER, M. H.; GRIMAPETTENATI, J.; GOFFNER, D.; GELLERSTEDT, G.; GULLION, T.; CLAPHAM, D. Lignin biosynthesis in transgenic Norway spruce plants harboring an antisense construct for cinnamoyl CoA reductase (CCR). **Transgenic Research**, v. 17, p. 379–392, 2008.

WALTER, C.; FLADUNG, M.; BOERJAN, W. Twenty years of GM tree field testing implies high environmental safety. **Nature Biotechnology**, 2010.

WEI, J.; WANG, Y.; WANG, H.; LI, R.; LIN, N.; MA, R.; QU, L.; SONG, Y. Pulping performance of transgenic poplar with depressed caffeoyl-CoA O-me thyltransferase. **Chinese Science Bulletin**, v. 53, p. 3553–3558, 2008.

WEINER, G.; LIESE, W.; SCHMITT, U. Cell wall thickening in fibers of the palms *Rhapis excelsa* (Thunb.) Henry and *Calamus axillaris* Becc. In: Donaldson, L. A., Singh, A. P., Butterfield, B. G., White-house, L. (Eds.), **Recent Advances in Wood Anatomy**. NZFRI Ltd, Rotorua, New Zealand, p. 191–197, 1996.

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

WHETTEN, R.; SEDEROFF, R. Lignin Biosynthesis. **The Plant Cell**, v. 7, p. 1001-1013, 1995.

WIKBERG, P-E. **Occurrence, Morphology and Growth of Understory Saplings in Swedish Forests**. Thesis (Doctoral Thesis) – Department of Silviculture Umeå, Swedish University of Agricultural Sciences, Suécia, 2004.

WILLATS, W. G. T.; STEELE-KING, C. G.; McCARTNWHY, L.; ORFILA, C.; MARCUS, S. E.; KNOX, J. P. Making and using antibody probes to study plant cell walls. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 1/2, p. 27-36, 2000.