

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

**DISSERTAÇÃO**

**Caracterização anatômica e físico-química do tegumento da semente de**  
***Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.**

**Danielle Affonso Sampaio**

**2016**



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

**CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E FÍSICO-QUÍMICA DO TEGUMENTO DA  
SEMENTE DE *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.**

**DANIELLE AFFONSO SAMPAIO**

*Sob a orientação da Professora*  
**Dr<sup>a</sup> Rosilei Aparecida Garcia**  
*e do professor*  
**Dr. Heber dos Santos Abreu (*in memorian*)**

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 Ciência e Tecnologia de Produtos Florestais

Seropédica, RJ  
Maio de 2016

634.9751  
S192c  
T

Sampaio, Danielle Affonso, 1988-  
Caracterização anatômica e físico-  
química do tegumento da semente de  
Araucaria angustifolia (Bert.) O. Ktze. /  
Danielle Affonso Sampaio. - 2016.  
42 f.: il.

Orientador: Rosilei Aparecida Garcia.

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

Bibliografia: f. 34-42.

1. Araucaria angustifolia - Teses. 2.  
Araucaria angustifolia - Semente - Teses.  
3. Sementes - Anatomia - Teses. 4.  
Sementes - Análise - Teses. 5.  
Colorimetria - Teses. I. Garcia, Rosilei  
Aparecida. 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**

**DANIELLE AFFONSO SAMPAIO**

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 19/05/2016

---

Rosilei Aparecida Garcia, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. UFRRJ  
(Orientadora)

---

Juliana Müller Freire. Dr<sup>a</sup>. EMBRAPA-Agrobiologia

---

Roberto Carlos Costa Lelis. Prof. Dr. UFRRJ

## DEDICATÓRIA

*À Deus.  
À Minha Família.  
Ao Prof. Dr. Heber dos Santos Abreu.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, minha força motriz, por guiar e iluminar todos os meus caminhos.

À UFRRJ e à Capes pela bolsa concedida.

Ao Prof. Dr. Heber dos Santos Abreu, por toda a sua dedicação e todos os seus ensinamentos.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosilei Aparecida Garcia, por toda a dedicação, preocupação e carinho para a realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Helena Regina Pinto Lima do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da UFRRJ pelo apoio, incentivo e amizade durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Roberto Carlos Costa Lelis, por permitir a utilização do Laboratório de Tecnologia da Madeira do Instituto de Florestas da UFRRJ.

Aos Professores deste Instituto, por todos os ensinamentos.

Aos meus Pais e irmãos, pelos valores transmitidos, por todos os conselhos, por todos os cuidados.

À Matheus Tiné Palheta de Oliveira, pelo companheirismo, amizade, incentivo e constante apoio.

Ao Zé, pelo fornecimento das sementes de *Araucaria angustifolia* utilizadas neste estudo.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Natália Dias, pelos conselhos e ensinamentos.

Às amigas, Raquel, Fernanda, Camila, Maria Vanessa e Damaris pelas risadas, pela convivência e aprendizado.

Aos amigos, Monique, Sabrina, Wagner, Natália, Marcello e Kathlyn, pela amizade, pelos momentos de descontração e pela valiosa colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, Gisely, Bruno, Cadete, Carlão, pela nossa boa convivência.

Aos companheiros, José Carlos Ferreira Batista, Tiago Costa e Thiago pela ajuda imprescindível para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Rafael Pimentel, por esclarecer minhas dúvidas.

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

## RESUMO

SAMPAIO, Danielle Affonso. **Caracterização anatômica e físico-química do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.** 42p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais). Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 2016.

O tegumento de semente desempenha um papel importante no ciclo de vida do vegetal, controlando o desenvolvimento do embrião e a germinação. O conhecimento da estrutura celular e das características físico-químicas do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia* é importante para a correta interpretação funcional do mesmo. Sendo assim, o objetivo deste estudo consistiu na caracterização anatômica e físico-química do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia*. As características anatômicas foram observadas através de diferentes técnicas de microscopia (microscopia de campo claro, microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de varredura) e testes histoquímicos (Lugol, Wiesner, Sudan IV e dicromato de potássio –  $K_2Cr_2O_7$ ). Nas análises químicas, determinou-se os teores de extrativos, holocelulose e lignina de Klason tratada e não-tratada com hidróxido de sódio – NaOH. Os grupos funcionais das camadas do tegumento e da lignina foram observados por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier através do espectrômetro VARIAN 640-IR FT-IR. As análises colorimétricas foram realizadas no espaço de cor  $L^*a^*b^*$  CIE 1976 segundo a norma ISO 11664-4: 2008 utilizando o espectrofotômetro CM 2600d. A molhabilidade das camadas foi avaliada através de análises de ângulo de contato com o sistema de formato da gota DSA 100. O tegumento da semente de *Araucaria angustifolia* é composto por três camadas distintas: exotesta, mesotesta e endotesta. As camadas apresentam características químicas e anatômicas distintas. A estrutura da lignina das camadas do tegumento foi classificada como guaiacólica (G). A endotesta foi a camada com maior cromaticidade devido ao maior teor de extrativos e substâncias fenólicas. A molhabilidade variou entre as camadas em função da sua estrutura. Os resultados deste estudo contribuem para uma melhor compreensão do funcionamento do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia*, podendo corroborar com estudos futuros sobre a fisiologia da semente.

**Palavras-chave:** colorimetria, espectroscopia FT-IR, ângulo de contato.

## ABSTRACT

**SAMPAIO, Danielle Affonso. Anatomical and physico-chemical characterization of the *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. seed integument.** 42p. Dissertation (Master Science in Environmental and Forest Sciences). Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 2016.

Seed integument plays an important role in the plant life cycle, monitoring the embryo development and germination. Informations about cell structure and physico-chemical characteristics of the *Araucaria angustifolia* seed coat are important to its correct functional interpretation. Thus, the aim of this study was the anatomical and physico-chemical characterization of the *Araucaria angustifolia* seed integument. Anatomical features were observed using different microscopy techniques (brightfield microscopy, fluorescence microscopy and scanning electron microscopy) and histochemical tests (Lugol, Wiesner, Sudan IV and potassium dichromate –  $K_2Cr_2O_7$ ). Chemical analysis included the extractive, holocelulose and Klason lignin contents (untreated and treated with sodium hydroxide – NaOH). Functional groups of the integument layers and lignin were observed by Fourier transformed infrared spectroscopy using a VARIAN 640-IR FT-IR spectrometer. Colour analyses were performed in CIE 1976 L\*a\*b\* space colour according to ISO 11664-4:2008 standard using CM 2600d spectrometer. Wettability of the layers was evaluated by contact angle analysis with the drop shape analyser DSA 100. The *Araucaria angustifolia* seed integument is composed by three distinct layers: exotesta, mesotesta and endotesta. The layers have different chemical and anatomical characteristics. Lignin structure of the integument layers was classified as guayacil (G) type. The endotesta was the layer with higher chromaticity due to higher extractive content and phenolic substances. The wettability varied between layers according to their structure. The results of this study contribute to a better understanding of the functioning of the *Araucaria angustifolia* seed integument and corroborate to future studies on seed physiology.

**Key words:** colorimetry, FT-IR spectroscopy, contact angle.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	<i>Araucaria angustifolia</i> (Bert.) O. Ktze. A: Aspecto geral da árvore. B-C: Detalhes das estruturas reprodutivas masculina e feminina, respectivamente (SILVA et al., 2011). D: Estrutura reprodutiva feminina contendo as sementes (pinhões) (DAUERNHEIMER, 2011).....	5
<b>Figura 2.</b>	(A) Pinhões (SILVA et al., 2011); (B) Corte longitudinal demonstrando o endosperma e o embrião (CORREIA, 2016).....	6
<b>Figura 3.</b>	Percursos finais da lignina com os possíveis sítios ativos (*) (PEREIRA, 2012).....	7
<b>Figura 4.</b>	Representação da lignina (VANHOLVE, 2010).....	8
<b>Figura 5.</b>	Rota biossintética da formação dos monolignóis da lignina (BOERJAN et al., 2003).....	9
<b>Figura 6.</b>	Representação do espectro eletromagnético (LEITE; PRADO, 2012).....	10
<b>Figura 7.</b>	Interferômetro de Michelson: interferograma gerado e espectro (FORATO et al., 2010).....	11
<b>Figura 8.</b>	Sistema de coordenadas de cores CIELAB 1976. A: Sólido em três dimensões (tonalidade, luminosidade e saturação). B: Sólido de cores (KONICA MINOLTA, 1998).....	13
<b>Figura 9.</b>	Ângulo de contato de Young ( $\theta_y$ ) formado entre um líquido e uma superfície sólida lisa e homogênea. (B) Ângulo de contato aparente ( $\theta_m$ ) formado entre um líquido e uma superfície rugosa.....	14
<b>Figura 10.</b>	Tegumento da semente de <i>Araucaria angustifolia</i> composto por três camadas: interna (exotesta), intermediária (mesotesta) e externa (endotesta).....	15
<b>Figura 11.</b>	(A) Sistema de formato da gota DSA 1: mesa de suporte para as amostras, sistema de vídeo com câmera e seringa dosadora. (B) Fixação e nivelamento da semente de <i>Araucaria angustifolia</i> na mesa de suporte com auxílio da massa de modelar. (C) Deposição da gota de água destilada na superfície da semente.....	18
<b>Figura 12.</b>	Características anatômicas da exotesta do tegumento da semente de <i>Araucaria angustifolia</i> nas seções transversal (A-D) e longitudinal (I). A: cutícula ornamentada. B: células isodiamétricas. C: Paredes lignificadas. D: substâncias no lúmen. E: Fibrotraqueídes. F: macroesclereídes. G: Detalhe das pontuações. H-I: Autofluorescência da lignina.....	20

<b>Figura 13.</b>	Imagens de MEV da exotesta do tegumento da semente de <i>Araucaria angustifolia</i> nas seções transversal (A-B) e longitudinal (C-D). S <sub>1</sub> e S <sub>2</sub> : superfície externa e interna da exotesta.....	21
<b>Figura 14.</b>	Características anatômicas da mesotesta nas seções transversal (A-B, E e G) e longitudinal (F, H) do tegumento da semente de <i>Araucaria angustifolia</i> . A: Três tecidos distintos. B: Paredes espessas e lignificadas. C: Macroesclerídes ramiformes. D: Macroesclerídes vermiformes curtas. E: Segundo tecido apresentando reação positiva para substâncias fenólicas. F: Tecido interno com paredes espessas e não lignificadas. G-H: Autofluorescência da lignina.....	22
<b>Figura 15.</b>	Imagens de MEV da mesotesta do tegumento da semente de <i>Araucaria angustifolia</i> . A e B: Seção transversal. C e D: Seção longitudinal. S <sub>3</sub> e S <sub>4</sub> : superfície externa e interna da mesotesta.....	23
<b>Figura 16.</b>	Características anatômicas da endotesta nas seções transversal (A-E) e longitudinal (F) do tegumento da semente de <i>Araucaria angustifolia</i> . A: Dois tecidos distintos. B: Substâncias fenólicas no tecido mais externo. C: Tecido interno apresentando grãos de amido. D: Tecido mais externo apresentando substâncias fenólicas. E-F: Baixa autofluorescência.....	24
<b>Figura 17.</b>	Imagens de MEV da endotesta do tegumento da semente de <i>Araucaria angustifolia</i> . A-B: Seção transversal. C-D: Seção longitudinal. S <sub>5</sub> e S <sub>6</sub> : superfície externa e interna da endotesta.....	25
<b>Figura 18.</b>	Espectro no infravermelho das três camadas do tegumento da semente de <i>Araucaria angustifolia</i> (sem NaOH 1%).....	27
<b>Figura 19.</b>	Espectro no infravermelho das três camadas do tegumento da semente de <i>Araucaria angustifolia</i> (com NaOH 1%).....	27
<b>Figura 20.</b>	Espectro no infravermelho da lignina de Klason tratada com NaOH 1% obtida a partir das três camadas do tegumento da semente de <i>Araucaria angustifolia</i> .....	28
<b>Figura 21.</b>	Correlação entre a luminosidade e as variáveis cromáticas das camadas do tegumento da semente de <i>Araucaria angustifolia</i> .....	30
<b>Figura 22.</b>	Comportamento da gota na mesotesta da semente de <i>Araucaria angustifolia</i> . A: superfície externa (S <sub>3</sub> ) com baixa molhabilidade. B: superfície interna (S <sub>4</sub> ) com alta molhabilidade.....	32
<b>Figura 23.</b>	Ângulo de contato aparente das camadas do tegumento da semente de <i>Araucaria angustifolia</i> .....	32

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Teor de extrativos para as camadas do tegumento de <i>Araucaria angustifolia</i> ..	26
<b>Tabela 2.</b>	Teores de holocelulose e lignina de Klason para as camadas do tegumento de <i>Araucaria angustifolia</i> .....	26
<b>Tabela 3.</b>	Médias das variáveis colorimétricas das camadas do tegumento da semente de <i>Araucaria angustifolia</i> .....	29
<b>Tabela 4.</b>	Médias de ângulo de contato aparente das camadas do tegumento da semente de <i>Araucaria angustifolia</i> para análise de molhabilidade.....	31

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 <i>Araucaria angustifolia</i> (Bert.) O. Ktze.....	3
2.2 Semente de <i>Araucaria angustifolia</i> .....	5
2.3 Lignina.....	7
2.4 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR).....	9
2.5 Calorimetria .....	12
2.6 Análises de ângulo de contato e molhabilidade.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Material.....	15
3.2 Caracterização anatômica .....	15
3.3 Caracterização química.....	16
3.4 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) .....	17
3.5 Espectroscopia de cor .....	17
3.6 Análises de ângulo de contato .....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	19
4.1 Caracterização anatômica.....	19
4.2 Caracterização química.....	25
4.3 Espectroscopia FT-IR.....	26
4.4 Espectroscopia da cor .....	28
4.5 Ângulo de contato.....	30
5. CONCLUSÕES .....	33
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	34

# 1 INTRODUÇÃO

O bioma Mata Atlântica apresenta uma complexidade de eventos geomorfológicos, climáticos, biológicos e ecológicos, onde cada trecho é único em sua documentação histórica e em seu conjunto de formas vivas (PEIXOTO et al., 2002), e, paradoxalmente, representa um dos ecossistemas mais ameaçados do planeta (MYERS et al., 2000). Abrange um conjunto de formações florestais e ecossistemas associados, sendo eles: a Floresta Ombrófila Densa, a Floresta Ombrófila Mista, a Floresta Ombrófila Aberta, a Floresta Estacional Semidecidual, a Floresta Estacional Decidual, os Manguezais, as Restingas e Campos de Altitude (IBGE, 1993).

A Floresta Ombrófila Mista é caracterizada pela presença de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze, que por sua abundância, porte e copas característicos imprimem o aspecto fitofisionômico próprio desta formação (SONEGO, 2007). Segundo Narvaes (2005), a Floresta Ombrófila Mista possui grande importância ecológico-econômica, por sua característica única de abrigar a conífera mais expressiva da vegetação brasileira, a *Araucaria angustifolia*. A espécie pertence à família Araucariaceae e é conhecida vulgarmente como pinheiro-brasileiro ou pinheiro-do-paraná (LAMPRECHT, 1986) e comercialmente como Parana pine (CARVALHO, 2003). É a única espécie do seu gênero com ocorrência natural no Brasil e está na categoria de vulnerável na lista de espécies ameaçadas da IUCN – *International Union of Conservation of Nature and Natural Resources* (HILTON-TAYLOR, 2000).

As utilizações mais comuns da *Araucaria angustifolia* sempre estiveram associadas à obtenção de madeira serrada (MAINIERI; CHIMELO, 1989; GUERRA et al., 2002) e para o abastecimento da indústria de papel e celulose; porém suas sementes conferem outra grande importância à espécie. Tema principal de alguns eventos gastronômicos no sul e sudeste do Brasil, os pinhões, como também são conhecidas as sementes da *Araucaria angustifolia* (CONFORTI; LUPANO, 2007), tornam-se também fonte de renda alternativa para muitas famílias que vivem nas regiões de ocorrência (SIEGA, 1998; ECOPLAN, 2000). Segundo o IBGE (2015), no ano de 2013, foram comercializadas 8.889 toneladas de pinhões no país, sendo 8.608 toneladas na região Sul e 281 toneladas na região Sudeste.

Os pinhões são ricos em substâncias de reserva (amido) (CARVALHO, 2003) e recalcitrantes, ou seja, perdem a viabilidade germinativa rapidamente após a colheita (FERREIRA, 1977), dificultando sua conservação por longos períodos. A presença do tegumento externo atrasa o processo de germinação dos pinhões (DONI FILHO et al., 1985), o que pode estar associado à restrição à entrada de água (BORGES et al., 1987). O tegumento da semente de *Araucaria angustifolia* apresenta potencial para produção de carvão ativado e na remoção de metais pesados em águas poluídas (SANTOS et al., 2011).

Segundo Moise et al. (2005), o tegumento de semente desempenha um papel importante no ciclo de vida do vegetal, controlando o desenvolvimento do embrião e a germinação. A estrutura do tegumento da semente é complexa e variável entre as espécies e, apesar da grande importância da semente de *Araucaria angustifolia*, não há informações na literatura sobre as características do seu tegumento. Deste modo, o conhecimento da estrutura celular assim como das características físicas e químicas do revestimento da semente de *Araucaria angustifolia* se faz importante de modo que se possa ter uma correta interpretação funcional do mesmo viabilizando melhores utilizações dos recursos florestais não madeireiros.

O objetivo geral deste estudo consistiu na caracterização anatômica e físico-química do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia*. Os objetivos específicos foram: (1) caracterizar a estrutura anatômica das três camadas do tegumento; (2) avaliar a composição química das camadas do tegumento, identificando os grupos funcionais de cada camada e

particularmente da lignina de cada camada; (3) caracterizar a cor das camadas do tegumento e avaliar sua correlação com a composição química; e (4) determinar a molhabilidade das camadas do tegumento.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.

A família Araucariaceae, pertence à ordem Coniferae. É o grupo de coníferas mais primitivo ainda existente, tendo o início de seu desenvolvimento entre as eras paleozóica e mesozóica (DUTRA; STRANZ, 2003) e sua evolução na era mesozóica, durante o período jurássico-cetráceo, há cerca de 200 milhões de anos (GOLFARI, 1971; KOCH; CORRÊA, 2002). Sua distribuição ocorre principalmente no Hemisfério Sul, sendo encontrada na Nova Caledônia, Nova Guiné, Austrália, Nova Zelândia e América do Sul (SETOGUCHI et al., 1998).

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

Na América do Sul ocorrem somente duas espécies desse gênero: a *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze e a *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch. A *Araucaria araucana* tem sua ocorrência localizada em zonas restritas do Chile e Argentina enquanto que a *Araucaria angustifolia* possui uma dispersão na Argentina e no Brasil, se constituindo no único representante nativo do gênero.

Apesar de apresentar vários sinônimos, atualmente sua denominação oficial é *Araucaria angustifolia* (SOARES; MOTA, 2004). O termo *Araucaria* deriva de Arauco, uma região do Chile onde ocorre a espécie, e, *angustifolia* é uma palavra do latim que significa “folha estreita” (CARVALHO, 2003). Esta espécie ocupava uma superfície de cerca de 200.000 Km<sup>2</sup> (CARVALHO, 1994), ocorrendo em todo o sul do país e em manchas esparsas no sul de São Paulo, sul de Minas Gerais e no estado do Rio de Janeiro em áreas de altitudes mais elevadas (CARVALHO, 2003). Atualmente, estima-se que os remanescentes ocupem apenas entre 1% a 4% da área original (LIMA; CAPOBIANCO 1997, GUERRA et al., 2002). A espécie é protegida por lei no estado do Paraná, por meio da Portaria do Instituto Ambiental do Paraná (IAP) 191/2004, tendo seu corte permitido somente por autorização prévia do órgão ambiental (IAP, 2004).

A *Araucaria angustifolia* apresenta um grande valor econômico (SCHNEIDER et al., 1992) devido a sua madeira apresentar qualidades físicas e mecânicas sendo indicada para construções em geral (MAIMERI; CHIMELO, 1989) e pelo ao alto valor nutricional do pinhão (SILVA et al., 2011); e também apresenta importância ecológica, desempenhando um papel importante na conservação do seu ecossistema, possibilitando a expansão das florestas sobre os campos do planalto (CARVALHO, 2003).

É uma conífera secundária longeva podendo viver em média 400 anos, porém de temperamento pioneiro podendo colonizar espaços abertos, tais como clareiras e campos abandonados, onde a luz é abundante (SOUZA et al., 2008; IMAGUIRE, 1979). Ocorre em diferentes tipos de solos, de modo geral os solos dominantes da região de sua ocorrência natural são siltico-argilosos (MACHADO, 1980). A árvore é perenifólia, de aspecto original e contrastante com as demais árvores do Sul do Brasil com 10-35 m de altura e 50-120 cm de DAP, podendo atingir 50 m de altura e 250 cm de DAP na idade adulta (CARVALHO, 2003). Possui tronco reto, uniforme e quase cilíndrico. As árvores jovens possuem copas em forma de cone enquanto as adultas possuem copa alta em formato de guarda-chuva. À medida que a

árvore vai se tornando senil ocorre um afastamento dos ramos até o ápice dando à copa uma forma de um candelabro (CARVALHO, 1994) (Figura 1A). Apresenta casca grossa com espessura de até 10 cm nas árvores adultas. A casca externa é áspera, rugosa, de cor marrom-arroxeadada enquanto que a casca interna é resinosa e esbranquiçada. Suas folhas são simples, alternas, espiraladas, lineares a lanceoladas tendo de 3-6 cm de comprimento e de 4-10 mm de largura (LORENZI, 1992; CARVALHO, 2003; SILVA et al., 2011). É uma espécie dióica, com árvores masculinas e femininas em indivíduos distintos, mas pode ocorrer representantes monóicos devido a traumas de cortes e doenças (KOCH; CORRÊA, 2002; CARVALHO, 2003; SILVA et al., 2011). Apresenta suas estruturas reprodutivas organizadas em estróbilos masculinos e femininos (CARVALHO, 2003), também chamados de androstróbilo para o estróbilo masculino e ginostrobilo para o feminino (SILVA et al., 2011). O estróbilo masculino apresenta de 10-22 cm de comprimento por 2-4 cm de diâmetro com escamas coriáceas (Figura 1B). O estróbilo feminino é composto por numerosas folhas muito próximas entre si (megaesporófilo) inseridas ao redor de um eixo subarredondado (REITZ et al., 1988; KOCH; CORRÊA, 2002; CARVALHO, 2003). Por ser uma espécie dióica o sistema reprodutivo da araucária é alógama. Sua polinização ocorre por anemofilia (LORENZI, 1992; CARVALHO, 2003; SILVA et al., 2011). Os pseudofrutos reunidos em estróbilo feminino são conhecidos como pinha, são esféricas e encontram-se em galhos entre 1 a 2 em cada ramo, com 10-25 cm de diâmetro, composto de 700-1200 escamas (Figura 1C), com número variável de sementes (5 a 150) e com até 4.700 g de peso (Figura 1D) (SILVA et al., 2011). Suas sementes têm origem nas brácteas do amentilho feminino, desenvolvendo-se a partir dos óvulos nus, com tegumento duro e endosperma abundante. São sementes carnosas que apresentam a amêndoa branca rica em reservas energéticas e no centro encontra-se o embrião com os cotilédones que são retos e constituem 5/6 do comprimento do embrião (CARVALHO, 2003).



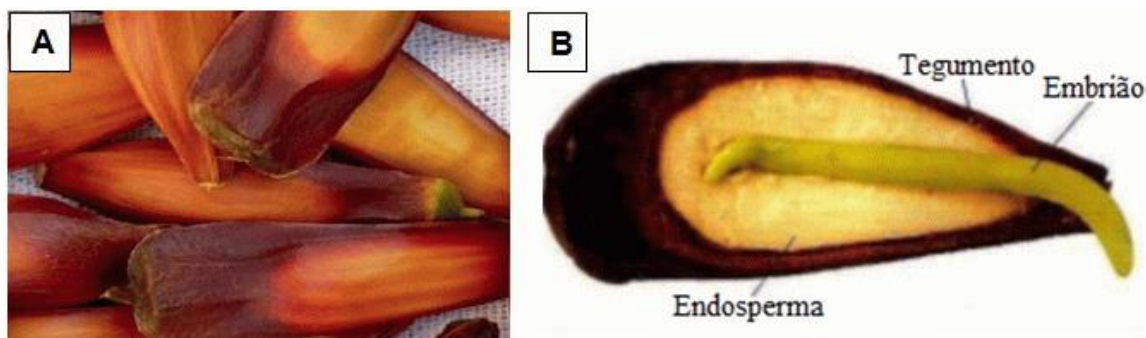


**Figura 1.** *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. A: Aspecto geral da árvore. B-C: Detalhes das estruturas reprodutivas masculina e feminina, respectivamente (SILVA et al., 2011). D: Estrutura reprodutiva feminina contendo as sementes (pinhões) (DAUERNHEIMER, 2011).

## 2.2 Semente de *Araucaria angustifolia*

A semente de *Araucaria angustifolia* é também conhecida como pinhão (CONFORTI; LUPANO, 2007; COSTA et al., 2013). É uma semente carnosa, medindo entre 3 a 8 cm de comprimento, por 1 a 2,5 cm de largura, o peso dessa semente tem grande variação conforme a idade da árvore e a região (KOSCINSKI, 1934), porém apresenta peso médio de 8,7 g por unidade. São sementes obovadas-oblongas, com ápice terminando com um espinho achatado e curvo para a base (CARVALHO, 2003) tal como ilustrado na Figura 2 (A-B).

As sementes de coníferas, tal como a semente de *Araucaria angustifolia*, apresentam dois tipos comuns de células, sendo elas: as parenquimáticas que geralmente não são especializadas e apresentam paredes finas, e, as esclerenquimáticas que são células de paredes espessas fornecendo suporte e proteção ao embrião (KOLOTELO, 1997).



**Figura 2.** Semente de *Araucaria angustifolia*. A: Aspecto geral dos pinhões (SILVA et al., 2011). B: Corte longitudinal demonstrando o endosperma e o embrião (CORREIA, 2016).

As sementes têm curta longevidade natural, com perda total de viabilidade em até um ano após a colheita por causa da desidratação (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000) o que faz com que seja necessário o armazenamento com alto grau de umidade (NEVES, 1994).

A recalcitrância é descrita por Roberts (1973) como sementes que possuem alto grau de umidade logo após a maturação e que perdem a viabilidade ao serem desidratadas. As sementes são muito sensíveis à redução do teor de água (EIRA et al., 1994), característica de sementes recalcitrantes, fator este que contribui para a vulnerabilidade dessa espécie. Tompsett (1984) afirma que as sementes de araucária não podem ser secas abaixo de 37% sem sofrer danos e abaixo de 25% conduz à perda total de sua viabilidade.

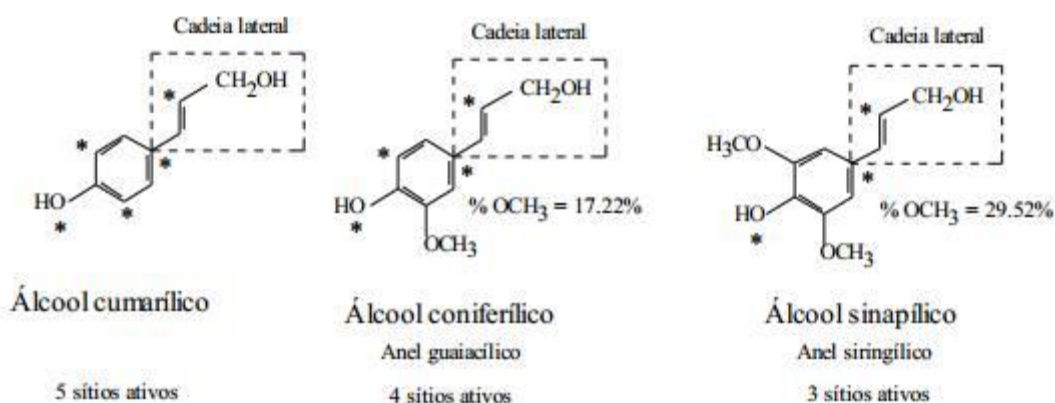
A dispersão do pinhão ocorre geralmente por autocoria, principalmente barocórica, entretanto, pode ocorrer de forma zoocórica, feita por aves e roedores. A cutia (*Dasyprocta azarae*) é grande apreciadora do pinhão e possui o hábito de enterrar as sementes para comê-las depois. Este comportamento faz com que a cutia seja uma das mais importantes disseminadoras das sementes de *Araucaria angustifolia* (CARVALHO, 1950). Entre os demais animais dispersores da semente estão o papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinaceae*) (SOLÓRZANO-FILHO; KRAUS, 1999), o tucano (*Ramphastos toco*), o aiuru (*Amazona farinosa*) e o macaco-prego (*Cebus apella*) encontrados na Serra da Mantiqueira, Minas Gerais (BUSTAMANTE, 1948). Lorenzi (1992) afirma que os pinhões são consumidos por animais domésticos, avifauna, roedores e primatas. Para Monteiro e Speltz (1980), o ser humano, que utiliza o pinhão na sua alimentação, pode atuar também como agente dispersor.

Os humanos consomem pinhões desde 6.000 anos atrás, e durante um longo período tem sido importante alimento para alguns grupos indígenas e para agricultores (RAGONESE; CROVETTO, 1947; HUECK, 1972). Na alimentação humana, o pinhão consiste em um alimento tradicional de alto teor calórico, podendo ser consumido cozido, em água ou leite, e assado (DAVID; SILOCHI, 2010; COSTA et al., 2013). Suas amêndoas apresentam alto valor nutricional destacam-se os teores de fibra dietética, vitamina C e substâncias antioxidantes (TACO 2, 2006).

## 2.3 Lignina

As ligninas apresentam funções fisiológicas e estruturais que contribuem para facilitar o fluxo de água e aumentar a estabilidade e rigidez da parede celular (PEREIRA, 2012). A lignina tem ação cimentante (MONTEIRO, 2002), o que confere a célula maior resistência ao ataque de fungos e compõe toda a rede de vasos condutores do vegetal, contribuindo para a estrutura da parede celular, além de agir como agente protetor a fatores bióticos e abióticos. Respondem a quase todo o funcionamento fisiológico das plantas superiores assim como a muitos estímulos causados nas plantas, como lesão biológica ou física.

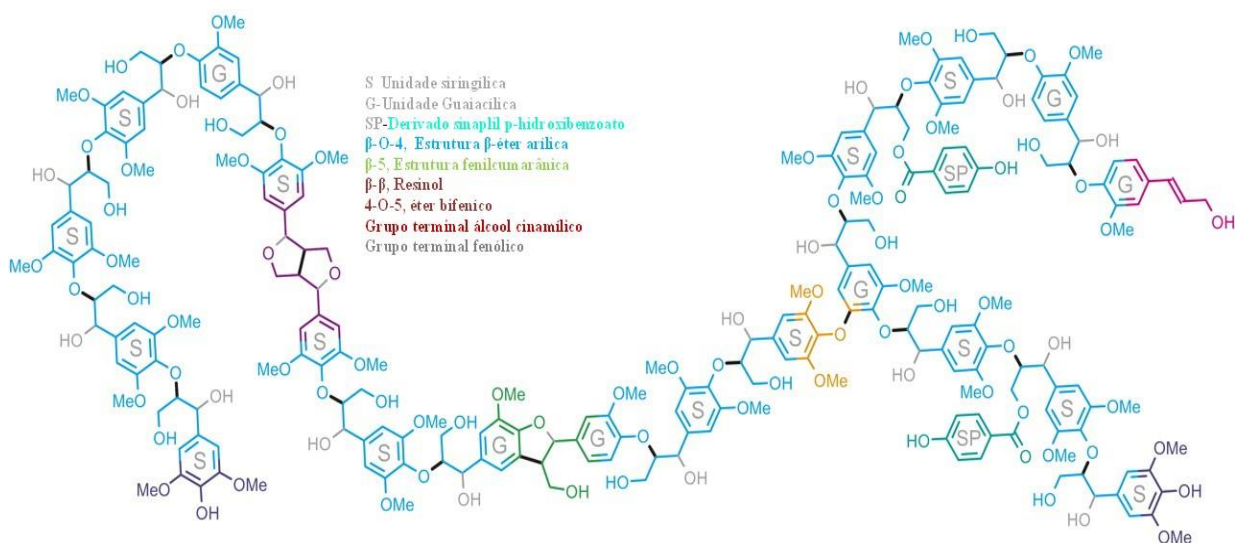
Lignina é o nome genérico dado à uma classe de substâncias que tem uma composição básica fenilpropanoídica (C6 C3) biossintetizadas na parede celular e na lamela média da maioria das fanerógamas (PEREIRA, 2012). A lignina possui três precursores finais, sendo eles o álcool cumarílico, o álcool coniferílico e o álcool sinapílico (Figura 3). Sasaki et al. (2008) definem a lignina como sendo um polímero de unidades fenilpropanoídicas com uma variedade de ligações e acoplamentos, que resulta em uma estrutura complexa.



**Figura 3.** Precursores finais da lignina com os possíveis sítios ativos (\*) (PEREIRA, 2012).

A lignina tem sua origem relacionada a mudança do habitat das plantas aquáticas para o ecossistema terrestre, há aproximadamente 400 milhões de anos (WENG; CHAPPLLE, 2010). Essa hipótese tem sido apoiada pelo desempenho vegetal com base na condição da vida adaptativa no ecossistema terrestre, visto que existem do mais simples ao mais complexo dos polímeros. A origem das plantas superiores iniciou-se a partir das algas verdes (WENG; CHAPPLLE, 2010), porém recentemente houve a descoberta de lignina em algas vermelhas (*Calliarthron intergeniculum*), o que retoma as discussões (MARTONE et al., 2009). Para Sakarnen e Ludwing (1971), a lignina não só contribuiu para a adaptação das plantas à vida terrestre durante o processo evolutivo, como tornou a parede celular impermeável e possibilitou o transporte de água e soluções pelo sistema vascular.

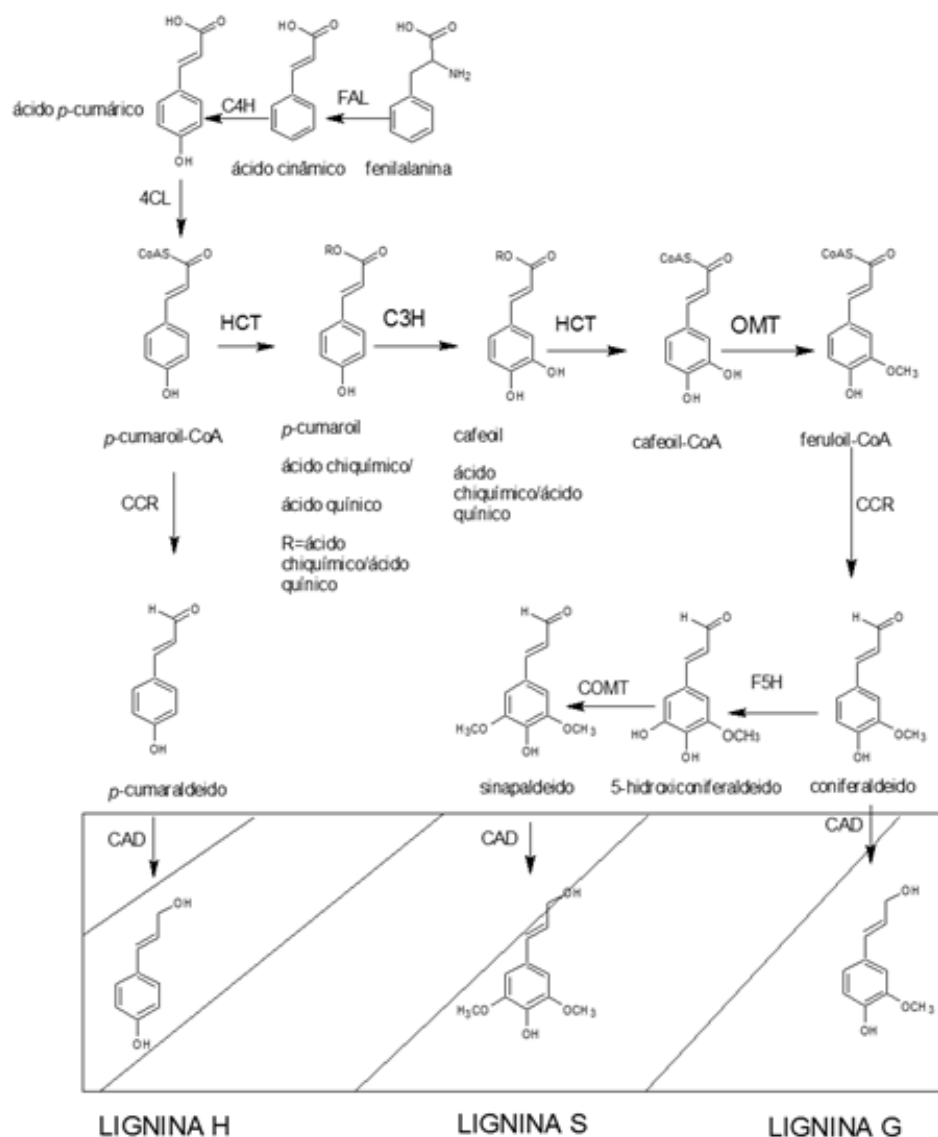
A estrutura da lignina ainda não foi definitivamente estabelecida, apesar do uso de ferramentas de alta tecnologia. Alguns estudos mostram que as estruturas possuem diferentes perfis (Figura 4). Segundo Barceló (2004), izoenzimas básicas, como a peroxidase, presentes em plantas mais primitivas são consideradas um portão da evolução, visto que em angiospermas, podem oxidar o álcool sinapílico à lignina. Em gimnospermas, com a falta do álcool sinapílico não há formação de lignina siringílica. Esta modulação de lignina foi realizada de maneira adaptativa e é baseada na flexibilidade enzimática.



**Figura 4.** Representação da lignina (VANHOLVE et al., 2010).

As ligninas têm em comum a flexibilidade enzimática, que ocorre em fibras de madeira, em sementes e outros órgãos das plantas tanto de gimnospermas como de angiospermas. Suas enzimas são capazes de metilar monolignóis pelas formas do ácido 5-hidroxiferulico e de seus correspondentes aldeídicos, álcoois e ésteres (WENG; CHAPPLLE, 2010). Durante a formação dos monolignóis são envolvidas enzimas que alteram o núcleo aromático e a cadeia lateral propanoídica. Plantas deficientes na enzima CAD (hidroxicinamoil álcool desidrogenase) possuem ligninas restritas a hidratação (são mais hidrofóbicas) e menor degradabilidade, em decorrência da acumulação em sua estrutura de cinamaldeído e/ou coniferaldeído. Portanto, a deficiência de CAD pode trazer profunda alteração na parede celular (GRABBER, 2005). A Figura 5 mostra a seqüência biossintética da lignina com distinção dos passos enzimáticos, observando que a sua formação ocorre em compartimentos celulares distintos. Essa etapa (enzimática) ocorre apenas no citoplasma. A fase enzimática deficiente da CAD está demarcada pelo retângulo.

As ligninas tradicionais, que ocorrem em madeira, apresentam composições apenas formadas pelas unidades fenilpropanoídicas (H, G e S) tendo as hidroxilas como um dos mais importantes grupos funcionais. As ligninas do tipo H, tipo G, tipo S, tipo HG, tipo GS, tipo HGS, tipo HO-5, tipo C, CALD e tipo CAC, são ligninas que ocorrem naturalmente em grupos botânicos distintos (raízes, caules, sementes) como também em transgênicos. A lignina do tipo CALD tem sido considerada a de mais baixa massa molecular, mais hidrofóbica e de maior mobilidade na parede celular (RALPH et al., 2001). Segundo Chen (2012) algumas espécies de cactos contêm apenas lignina do tipo C em sua semente, enquanto outros contêm apenas a lignina clássica guaiacilica/siringilica. A lignina tipo C é rica em ácido caféico e é depositada em alta concentração durante os estágios iniciais de desenvolvimento da semente. Estudando semente de soja, de variedade CD 215, Moreira et al. (2012) afirmam que o teor de lignina na semente permitiu maior porcentagem de semente germinada, revelando então a importância da lignina na fisiologia e na biologia da semente.

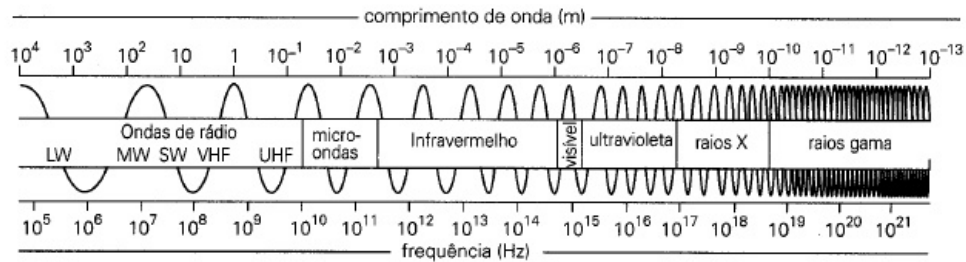


**Figura 5.** Rota biossintética da formação dos monolignóis da lignina (BOERJAN et al., 2003).

## 2.4 Espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier

A espectroscopia no infravermelho tem por base os movimentos relativos dos átomos numa molécula, isto é, as suas vibrações (GONSALVES, 2005). Deste modo, a espectroscopia no infravermelho detecta a radiação que é absorvida pelas ligações vibracionais moleculares. É uma técnica de grande importância na análise orgânica qualitativa. O infravermelho e demais métodos espectroscópicos modernos (ex.: ressonância magnética nuclear – RMN; espectroscopia na região do ultravioleta – visível e espectrometria de massas) constituem os principais recursos para a identificação e elucidação estrutural de substâncias orgânicas (LOPES; FASCIO, 2004).

A faixa de radiação no infravermelho, no espectro eletromagnético, corresponde a faixa entre o visível e microondas (Figura 6). Subdivide-se em infravermelhos próximos ( $4000 - 12500 \text{ cm}^{-1}$ ), médios ( $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ ) e longínquos ( $10 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ) (XU et al., 2013). A faixa de maior interesse para a análise de grupos funcionais se encontra na região entre  $4000$  e  $400 \text{ cm}^{-1}$  (BRUCE, 2006).



**Figura 6.** Representação do espectro eletromagnético (LEITE; PRADO, 2012).

### Vibrações Moleculares

Para que uma determinada molécula apresente absorção no infravermelho, suas vibrações moleculares devem resultar numa alteração do momento dipolar. O campo elétrico alternado, produzido pela mudança de distribuição de carga que acompanha a vibração, acopla a vibração molecular com o campo elétrico oscilante da radiação eletromagnética, resultando na absorção da energia radiante. Com a absorção da radiação infravermelha, as moléculas são excitadas a estados maiores de energia. Essa absorção corresponde a variações de energia na ordem de 8 a 40 KJ/mol (FORATO et al., 2010; PAVIA, 2010).

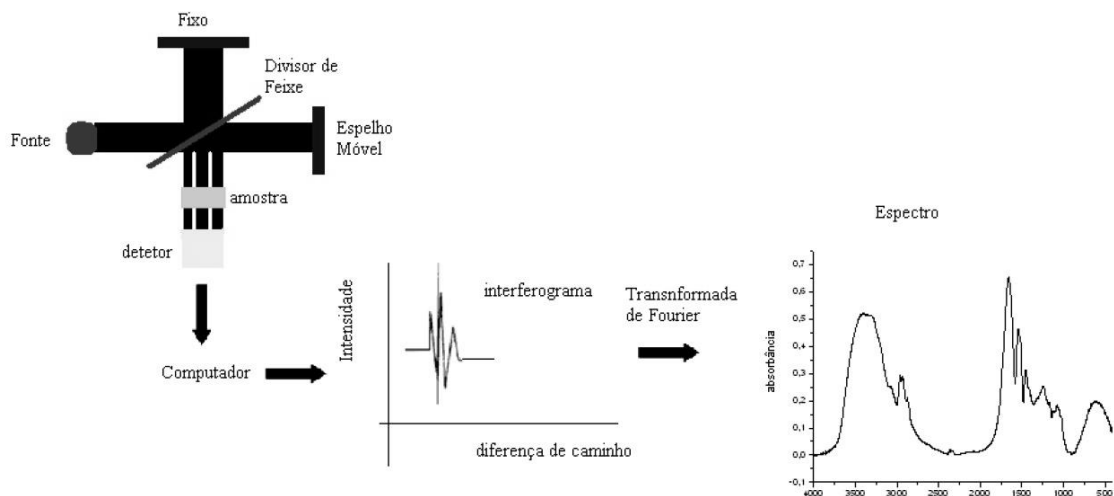
As vibrações moleculares no infravermelho costumam ser apresentadas como bandas e as posições das bandas são representadas em comprimento de onda ( $\lambda$ ) ou número de onda ( $\nu$ ). Em termos de número de onda, o infravermelho vibracional vai de  $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a comprimentos de onda de  $2,5$  a  $25\mu\text{m}$  (PAVIA, 2010). A intensidade das bandas pode ser expressa em modo de transmitância (T) ou em modo de absorbância (A). A transmitância é a razão entre a energia radiante transmitida por uma amostra e a energia radiante que nela incide. A absorbância é o logaritmo, na base dez, do inverso da transmitância, ou seja,  $A = \log(1/T)$  (ILHARCO, 1998).

Os tipos mais simples de movimento vibracional em uma molécula, ativos no infravermelho, que dão origem às absorções são: as deformações axiais (estiramento) e as deformações angulares (dobramentos) (BARBOSA, 2008). As vibrações de deformação axial ocorrem na direção do eixo de ligação dos átomos, onde a distância interatômica aumenta e diminui alternadamente. As vibrações de deformação angular correspondem às variações de ângulos de ligação, seja internamente em um grupo de átomos, seja deste grupo de átomos com relação à molécula como um todo. As vibrações de estiramento ocorrem em frequências mais altas do que as vibrações de dobramentos (SOLOMONS, 2005; FORATO et al., 2010). De modo geral, as vibrações moleculares podem ocorrer de seis maneiras: estiramento simétrico, estiramento assimétrico, dobramento angular simétrico no plano (*scissor*), dobramento angular assimétrico (*rocking*) no plano, dobramento simétrico fora do plano (*wagging*) e dobramento assimétrico fora do plano (*twisting*). As vibrações de estiramento e dobramento são chamadas vibrações fundamentais. A análise do espectro, normalmente, é complicada por causa da presença de fracas bandas conhecidas como bandas harmônicas, de combinação e de diferença. As bandas harmônicas resultam da excitação do estado fundamental para estados de energia mais alta. As bandas de combinação são resultantes da soma de duas bandas interativas. E, as bandas de diferença são resultadas da diferença entre duas bandas interativas. Quando uma vibração fundamental se acopla com uma frequência harmônica ou de combinação, a vibração acoplada é chamada de Ressonância de Fermi (PAVIA, 2010).

## Instrumentação

O equipamento usado nas medidas das vibrações moleculares é o espectrofotômetro no infravermelho. Os espectrofotômetros dispersivos foram os primeiros espectrofotômetros produzidos e utilizavam um prisma para fazer a separação dos comprimentos de onda da radiação eletromagnética que seria incidida na amostra. Fazia-se a varredura do espectro com luz monocromática. Mais tarde, os prismas foram substituídos por grades de difração, porém o processo de medição era o mesmo. Esses espectrômetros eram, em sua maioria, do tipo analógico, de baixa sensibilidade e longo tempo de varredura (FORATO et al., 2010). A partir de 1980, com o advento dos computadores, os espectrofotômetros dispersivos começaram a ser substituídos pelos espectrofotômetros com transformada de Fourier. Esses equipamentos têm seu funcionamento baseado na interferometria para produzir o espectro, e esta técnica é chamada de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier ou do inglês *Fourier transform infrared* (FT-IR) (ILHARCO, 1998).

O componente óptico básico para instrumentos de FT-IR é o interferômetro de Michelson, que tem por finalidade dividir em dois feixes iguais o feixe da radiação de infravermelho através de um divisor de feixe (*beamsplitter*). Um dos feixes segue em direção a um espelho de posição fixa no qual reflete de volta para o divisor de feixe, e aqui volta a dividir-se e parte desta vai para o detector. O outro feixe parte do divisor de feixe em direção ao espelho de posição móvel, este espelho também reflete, e, parte da radiação segue também para o detector, conseguindo assim, com rapidez percorrer todos os comprimentos de onda no infravermelho. À medida que o espelho móvel percorre certa distância um interferograma é formado com a recombinação dos dois feixes. Assim, um interferograma é formado pela soma de todas as ondas de diferentes amplitudes e frequências que chegam ao interferômetro. O interferograma resultante é digitalizado e transferido para um microcomputador. Com a transformada de Fourier desse sinal obtém-se o espectro de infravermelho, em absorvância/transmitância por número de ondas, similar aos obtidos em aparelhos dispersivos (SOLOMONS, 2005; BARBOSA, 2008; FORATO et al., 2010) (Figura 7). Os equipamentos de FT-IR trabalham com um único feixe. Deste modo, para se realizar um espectro de uma amostra é necessário coletar dois espectros, o primeiro para levantar um perfil do instrumento levando em consideração todas as condições ambientais, chamado *background*. E, o segundo espectro realiza com a amostra mais o ambiente do sistema. A razão entre estes dois espectros fornecerá informações somente sobre a absorvância/transmitância da amostra estudada.



**Figura 7.** Interferômetro de Michelson: interferograma gerado e espectro (FORATO et al., 2010).

A espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier tem ampla aplicação, abrangendo desde a análise de pequenas moléculas até sistemas complexos (BERTHOMIEU; HIENERWADEL, 2009), podendo ser analisadas amostras em estado sólido (amorfo ou cristalino), soluções, solventes orgânicos, gases, filmes, pastilhas de KBr e membranas (ILHARCO, 1998; FORATO et al., 2010). Esta técnica vem sendo amplamente utilizada para caracterizar celulose e lignina tanto de forma qualitativa quanto de forma quantitativa (XU et al., 2013; BUI et al., 2015).

A espectroscopia no infravermelho tem por finalidade fornecer informação estrutural de uma molécula, e, por consequência, é amplamente usada para a identificação de grupos funcionais (HUANG; SINGH; RAGAUSKAS, 2011; HUMBERT; QUILÉS, 2011). A seguir segue os comportamentos de alguns grupos funcionais importantes no infravermelho (BARBOSA, 2008; PAVIA et al., 2010):

**Anéis aromáticos:** na região de  $900-690\text{ cm}^{-1}$  aparecem as bandas de absorção de  $=\text{C}-\text{H}$  angular fora do plano, que diz respeito da posição dos substituintes no anel, enquanto que na faixa de  $1600-1475\text{ cm}^{-1}$  estão localizadas as bandas de  $\text{C}=\text{C}$  do anel, que ocorre aos pares.

**Alcoóis e fenóis:** a absorção  $\text{O}-\text{H}$  ocorre como um pico bem pronunciado na região entre  $3650-3600\text{ cm}^{-1}$ . Na faixa entre  $1440-1220\text{ cm}^{-1}$  ocorre um pico largo e fraco referente à ligação  $\text{C}-\text{O}-\text{H}$ . As vibrações de estiramento da ligação  $-\text{C}-\text{O}$  em álcoois e fenóis se encontram na região de  $1260-1000\text{ cm}^{-1}$ .

**Éteres:** a banda mais importante surge por causa do estiramento  $\text{C}-\text{O}$  na região entre  $1300-1000\text{ cm}^{-1}$ . A ausência de  $\text{C}=\text{O}$  e  $\text{O}-\text{H}$  é necessária para garantir que o estiramento  $\text{C}-\text{O}$  não se deve a um éster ou a um álcool.

**Aldeídos:** a ligação  $\text{C}=\text{O}$  de aldeído mostra banda de absorção na região entre  $1690-1740\text{ cm}^{-1}$ . A substituição de hidrogênio por um átomo eletronegativo aumenta a frequência de absorção. O estiramento  $\text{C}-\text{H}$  consiste em um par de bandas fracas, uma em  $2860-2800\text{ cm}^{-1}$  e a outra em  $2760-2700\text{ cm}^{-1}$ .

**Ésteres:** A ligação  $\text{C}=\text{O}$  apresenta banda de absorção na região entre  $1765-1735\text{ cm}^{-1}$ . A substituição de hidrogênio por um átomo eletronegativo aumenta a frequência de absorção. O estiramento  $\text{C}-\text{O}$  aparece como duas ou mais bandas, uma forte e mais larga que outra, ocorre na faixa entre  $1300-1000\text{ cm}^{-1}$ .

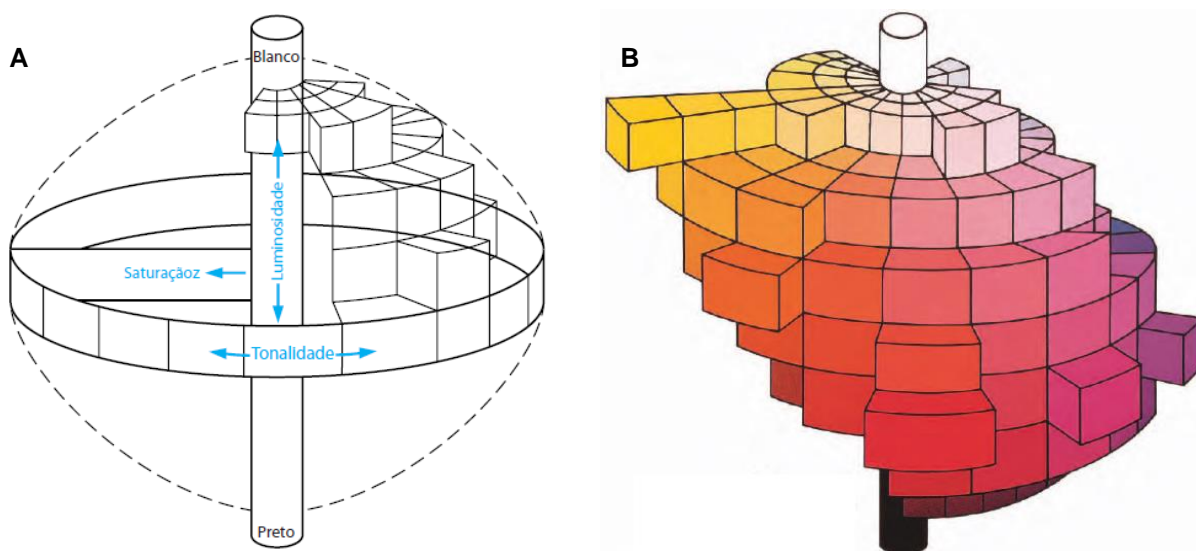
## 2.5 Colorimetria

A cor em materiais lignocelulósicos (ex.: madeiras) é oriunda da presença de extrativos, como: taninos, resinas e óleos, e pode ser alterada por diferentes fatores ambientais tais como raios solares, temperatura, teor de umidade, reações químicas de fotoxidação e por degradação causada por organismos (AUTRAN; GONÇALEZ, 2006).

Para a medição e quantificação da cor de materiais utiliza-se a colorimetria, técnica que descreve uma cor segundo diferentes elementos, com o auxílio de equipamentos específicos, tais como colorímetros e espectrofotômetros. A colorimetria quantitativa determina de maneira exata a cor do material e leva em consideração seu aspecto superficial (CAMARGOS; GONÇALEZ, 2001). O sistema mais utilizado é o CIE (Commission Internationale de L'Éclairage) (1976) que define a sensação da cor por meio de três elementos ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ): a luminosidade (claridade), a tonalidade (matiz) e a saturação (cromaticidade) (AUTRAN; GONÇALEZ, 2006; PINCELLI et al., 2012). Neste sistema,  $L^*$  indica a



luminosidade que define a escala de cinza entre o branco e o preto, em que assume o valor zero para o preto absoluto e 100 para o branco total. Pode ser representada graficamente por uma reta perpendicular a um círculo, passando pelo seu centro (CAMARGOS; GONÇALES, 2001) (Figura 8). A tonalidade é expressa pelas cores primárias vermelho, verde, amarelo e azul e é representada graficamente em forma de um círculo cortado por duas retas perpendiculares (horizontal e vertical) passando pelo centro. As variáveis  $a^*$  e  $b^*$  representam as coordenadas cromáticas em que ambas variam entre -60 e +60. O  $a^*$  indica a matiz vermelho, em que o número positivo indica o vermelho e o negativo indica o verde. O  $b^*$  indica a matiz amarelo, sendo que o número positivo indica o amarelo e o negativo, o azul (CAMARGOS; GONÇALES, 2001; ZANUNCIO et al., 2014). A saturação ( $C^*_{ab}$ ) indica a pureza da cor, é o desvio partindo do ponto correspondente ao cinza no eixo  $L^*$  (luminosidade). Graficamente, essa corresponde ao raio do círculo de tonalidade, partindo do cinza do eixo de luminosidade até a cor pura espectral localizada na extremidade do círculo. Assim, é expressa pela variável  $C^*_{ab}$ , variando de 0 a 60 (AUTRAN; GONÇALEZ, 2006). O ângulo de tinta ( $h_{ab}$ ) indica a dominância de alguma tonalidade na cor e deriva dos valores de  $a^*$  e  $b^*$  (CAMARGOS; GONÇALES, 2001; ZANUNCIO; et al., 2014).



**Figura 8.** Sistema de coordenadas de cores CIELAB 1976. A: Sólido em três dimensões (tonalidade, luminosidade e saturação). B: Sólido de cores (KONICA MINOLTA, 1998).

O sistema CIE  $L^*a^*b^*$  tem sido utilizado para determinar a cor da semente de *Araucaria angustifolia* (pinhão) por alguns autores (RICHETTI et al., 2014; SPADA et al., 2012). Entretanto, não há estudos tratando da cor do tegumento da semente e a relação com suas características físico-químicas.

## 2.6 Análises de ângulo de contato e molhabilidade

A análise de ângulo de contato é uma técnica para determinar a molhabilidade da superfície de materiais sólidos e tem sido recentemente utilizada na área de tecnologia de sementes (BORMASHENKO et al., 2013; LING et al., 2015). A molhabilidade da semente está associada diretamente a sua germinação, ou seja, sementes com alta molhabilidade absorvem mais água para estimular sua germinação. Ling et al. (2015) mediram o ângulo de contato em sementes de colza (*Brassica napus* L.), utilizada para extração de azeite e para produção de biodiesel, visando avaliar o efeito do tratamento de plasma na sua germinação. Bormashenko et al. (2013) também utilizaram a molhabilidade para avaliar o efeito do

tratamento de plasma na taxa de germinação de sementes de lentilha (*Lens culinares* Medikus), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e trigo (*Triticum* sp.).

O ângulo de contato é calculado pela equação de Young, a qual descreve a relação entre o contato das fases sólido, líquido e vapor tal como apresentado abaixo:

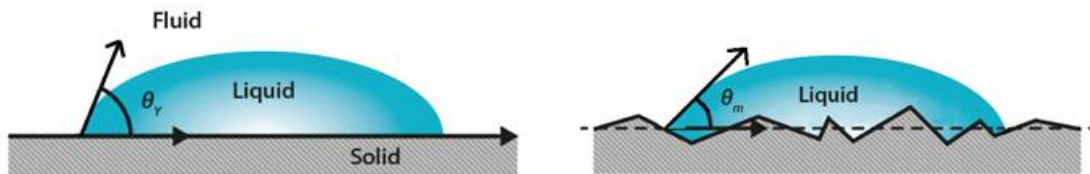
$$\gamma_{SV} = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cdot \cos\theta_Y \quad (1)$$

onde,  $\gamma_{SV}$  = energia livre da superfície na interface sólido-vapor;  $\gamma_{SL}$  = energia livre da superfície na interface sólido-líquido;  $\gamma_{LV}$  = tensão superficial do líquido com seu vapor;  $\theta$  = ângulo de contato de Young (SCHULTZ; NARDIN, 2003).

A equação de Young assume que a superfície avaliada é homogênea e topograficamente lisa (superfície ideal). Entretanto, uma superfície real apresenta irregularidades, ou seja, um conjunto de saliências e reentrâncias que define a rugosidade superficial. A Figura 9 apresenta o ângulo de contato em uma superfície ideal e em uma superfície real (rugosa). Na superfície ideal, o ângulo de contato é igual ao ângulo de contato de Young, entretanto, na superfície real, o ângulo formado entre a tangente da interface líquido-vapor e a superfície aparente do sólido, é chamado de ângulo de contato aparente. Wenzel (1936) propôs a seguinte equação para considerar o efeito da rugosidade superficial:

$$\cos\theta_m = r \cdot \cos\theta_Y \quad (2)$$

onde,  $\theta_m$  = ângulo de contato aparente;  $\theta_Y$  = ângulo de contato de Young; e  $r$  = razão de rugosidade. A razão de rugosidade é definida pela razão entre as áreas da superfície sólida real e a área aparente (nominal), onde  $r = 1$  para uma superfície lisa e  $r > 1$  para uma superfície rugosa (SCHULTZ; NARDIN, 2003). A razão de rugosidade pode ser calculada através do parâmetro  $Sdr$  ( $r = 1 + S_{dr}/100$ ), o qual é obtido através de programas específicos capazes de calcular a área em 3D (BIOLIN SCIENTIFIC, 2014).

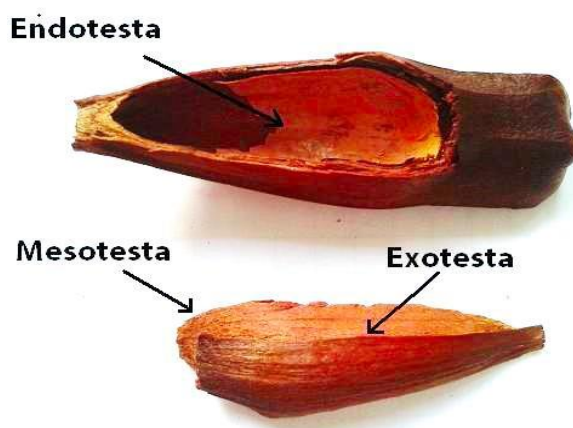


**Figura 9.** (A) Ângulo de contato de Young ( $\theta_Y$ ) formado entre um líquido e uma superfície sólida lisa e homogênea. (B) Ângulo de contato aparente ( $\theta_m$ ) formado entre um líquido e uma superfície rugosa.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material

Neste estudo foram utilizadas sementes de 15 indivíduos de *Araucaria angustifolia* com comprimento de  $56,03 \pm 3,20$  mm, largura de  $20,35 \pm 1,66$  mm e espessura de  $17,05 \pm 1,74$  mm provenientes da região do Vale dos Eucaliptos, Alagoa (Minas Gerais). O tegumento da semente é composto por três camadas de tecido: camada interna (endotesta), camada intermediária (mesotesta) e camada externa (exotesta) tal como representado na Figura 10.



**Figura 10.** Tegumento da semente de *Araucaria angustifolia* composto por três camadas: interna (endotesta), intermediária (mesotesta) e externa (exotesta).

#### 3.2 Caracterização anatômica

Para as análises anatômicas, as três camadas do tegumento foram separadas, sendo cada uma delas incluídas em Historresina<sup>®</sup> para confecção de lâminas histológicas (O' BRIEN et al., 1964). Foram obtidas seções transversais e longitudinais, de 5  $\mu$ m de espessura para cada uma delas, utilizando o micrótomo rotatório Leica RM 2235. As lâminas foram coradas com azul de toluidina à 0,05% de acordo com a metodologia proposta por O' Brien et al. (1964).

O estudo anatômico foi realizado por meio da microscopia de campo claro em diversas combinações ópticas e de microscopia de fluorescência, com cubo de excitação azul em 450-480 nm e filtro FITC (U-MWB2), utilizando o microscópio óptico OLYMPUS<sup>®</sup> BX 51 (BARROS; MIGUENS, 1998). As fotomicrografias foram obtidas com o auxílio de uma câmera digital XC30 3.0 MP acoplada ao sistema digital de processamento de imagens CELL<sup>F</sup>. Testes histoquímicos foram realizados em material fresco a fim de detectar a presença de amido pelo uso de Lugol (BERLYN; MIKSCHE, 1976); lignina pelo teste de Wiesner (LIN; DENCE, 1992); substâncias lipídicas pelo teste de Sudan IV (JENSEN, 1962); e substâncias fenólicas, com uso de dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) à 10% (GABE, 1968). As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram obtidas pelo HITACHI TM3000.

Para a dissociação dos elementos estruturais da exotesta foi utilizado o método de Franklin (1945) enquanto que para a mesotesta e a endotesta foi utilizado o método adaptado de Occhioni (1948). Os fragmentos obtidos foram corados com safranina aquosa 1% e depois montados em lâminas semipermanentes. As mensurações foram realizadas segundo a IAWA Committee (INTERNATIONAL ASSOCIATION OF WOOD ANATOMISTS, 2004).

### 3.3 Caracterização química

Para as análises químicas, os tegumentos foram separados das amêndoas e em seguida foram moídos em moinho de facas do tipo Willey (Modelo SL 31) para determinação dos teores de extrativos, holocelulose e lignina. As análises químicas foram realizadas de acordo com os métodos descritos por Abreu et al. (2006), os quais foram adaptados das normas ASTM D 1105 e D1106. Foram realizadas três repetições para cada camada do tegumento para cada análise química.

#### *Teor de extrativos*

A partir da amostra moída das três camadas do tegumento foi realizado um ciclo de extração utilizando três solventes orgânicos de ordem crescente de polaridade: ciclohexano, acetato de etila e metanol em um extrator do tipo soxhlet, por um período de 24 horas ininterruptas para cada solvente. Após cada extração, os extratos foram concentrados em um evaporador rotatório sob vácuo e em seguida levados para a capela para a completa evaporação do solvente. Após esse procedimento os extratos obtidos foram determinados através da seguinte equação:

$$TE = (P_2 \times 100) / P_1 \quad (3)$$

onde,  $TE$  = teor de extrativos (%);  $P_2$  = peso do extrativo concentrado (g); e  $P_1$  = peso da amostra seca (g).

#### *Teor de holocelulose*

Para a determinação da holocelulose foram utilizados 1,25 g da amostra livre de extrativos de cada camada do tegumento, as quais foram homogeneizadas e colocadas em um erlenmeyer onde foram adicionados os reagentes ácido acético e clorito de sódio (80%). Em seguida, a amostra foi mantida em banho-maria a 70°C por um período de 4 horas. A cada 60 minutos foram adicionados mais reagentes dentro do erlenmeyer contendo a amostra, até que as fibras se mostraram completamente dissociadas. A amostra reacional foi então levada para a capela onde permaneceu por 24 horas em repouso. Após esse período a amostra foi lavada em um funil de placa sinterizada sob vácuo com água destilada até que o desaparecimento da cor e do odor do cloro. As amostras foram então secas em estufa a  $\pm 60^\circ\text{C}$  durante 24 horas, e novamente pesada. O teor de holocelulose foi então determinado pela seguinte equação:

$$TH = P_2 / P_1 \times 100 \quad (4)$$

onde,  $TH$  = teor de holocelulose (%);  $P_2$  = peso seco do resíduo holocelulósico (g); e  $P_1$  = peso seco da amostra livre de extrativos (g).

#### *Teor de lignina de Klason*

Para a quantificação da lignina foram utilizados 300 mg da amostra seca e livre de extrativos tratada com ácido sulfúrico a 72%. Cada amostra foi homogeneizada por agitação dentro de um tubo de ensaio durante 1 minuto e conservada por 1 hora entre 25-30°C em banho-maria. Em seguida, o material foi diluído em balões com adição de 84 ml de água destilada e, mantidos sob refluxo por um período de 4 horas, com temperatura em torno de 70°C. Terminado este procedimento, o material foi lavado sob vácuo com 500 ml de água

destilada quente em um funil de placa sinterizada previamente tarado e em seguida seco em estufa a 105°C durante 24 horas e foi feita uma nova pesagem (EFFLAND, 1977). O teor de lignina foi então determinado pela equação abaixo:

$$TL = P_2 / P_1 \times 100 \quad (5)$$

onde,  $TL$  = teor de lignina de Klason (%);  $P_2$  = peso seco do resíduo; e  $P_1$  = peso seco da amostra livre de extrativos.

Os teores de lignina de Klason foram obtidos a partir do material tratado e não tratado com hidróxido de sódio (NaOH) à 1% (TAPPI, 1979).

### 3.4 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)

Para a análise de espectroscopia FT-IR foram utilizadas amostras secas de cada camada do tegumento livre de extrativos com e sem NaOH à 1% e da lignina de Klason de cada camada com NaOH à 1%. As amostras foram moídas em moinho de bolas até apresentar aparência de talco, posteriormente congeladas em nitrogênio líquido e secas utilizando o liofilizador TERRONI<sup>®</sup> de modo a obter a completa desidratação do material. Os espectros foram registrados utilizando 2 mg de cada material em condição de pastilha de brometo de potássio (KBr) (100 mg) em um espectrômetro VARIAN 640-IR FT-IR no modo experimental de transmitância utilizando 4 cm<sup>-1</sup> de resolução, 128 varreduras, amplitude espectral entre 4000-400 cm<sup>-1</sup>.

### 3.5 Espectroscopia da cor

As análises colorimétricas foram realizadas com o espectrofotômetro CM 2600d da Konica Minolta no espaço de cor L\*a\*b\* CIE 1976 segundo a norma ISO 11664-4:2008 em que foram obtidas as seguintes variáveis: luminosidade (L\*), coordenadas cromáticas a\* (variação entre verde e vermelho) e b\* (variação entre azul e amarelo), croma (C\*<sub>ab</sub>) e ângulo de tinta (h<sub>ab</sub>). Os parâmetros C\*<sub>ab</sub> e h<sub>ab</sub> foram calculados através das seguintes equações:

$$C^*_{ab} = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2} \quad (6)$$

e

$$h_{ab} = \arctan(b^*/a^*) \quad (7)$$

As medições foram feitas com o iluminante D65, ângulo de observação de 10°, luz especular incluída e abertura de 3 mm (SAV «Small Area View»). Foram realizadas medições de cor em ambas as faces, externa e interna, de cada uma das três camadas do tegumento da semente, em que: S<sub>1</sub> = superfície externa da exotesta; S<sub>2</sub> = superfície interna da exotesta; S<sub>3</sub> = superfície externa da mesotesta; S<sub>4</sub> = superfície interna da mesotesta; S<sub>5</sub> = superfície externa da endotesta; e S<sub>6</sub> = superfície interna da endotesta. Foram realizadas duas medições de cor por superfície por semente para um total de 50 sementes totalizando 100 observações por superfície.

### 3.6 Análises de ângulo de contato

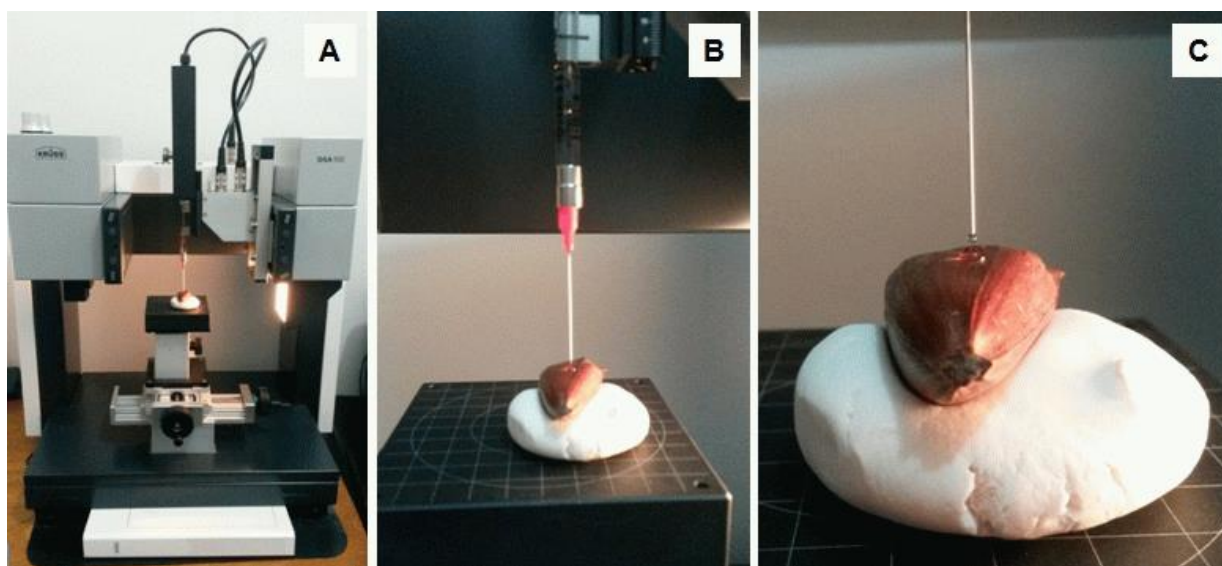
As análises de ângulo de contato foram realizadas com o sistema de formato da gota «Drop Shape Analyser» DSA 100, versão 1.92 da Krüss GmbH (Hamburg, Alemanha), o qual

é composto por uma mesa de suporte para as amostras, um sistema de vídeo com câmera e uma seringa dosadora (Figura 11A). As medições de ângulo de contato foram feitas através do programa DSA1, o qual grava imagens da gota depositada na superfície do material e analisa o comportamento da gota de forma dinâmica ao longo do tempo.

Foram realizadas medições de ângulo de contato em ambas as faces, externa e interna, de cada uma das três camadas do tegumento da semente ( $S_1 - S_6$ ). Para a  $S_1$ , as medições foram realizadas em uma superfície plana da semente, sendo que para sua fixação e nivelamento na mesa de suporte foi utilizada massa de modelar (Figuras 11B-11C). Em seguida, as sementes foram descascadas e as camadas do tegumento separadas. Para as medições das demais superfícies ( $S_2-S_6$ ), o material foi fixado em lâminas com fita adesiva para as medições de ângulo de contato.

As análises foram realizadas em ambiente climatizado em que se utilizou água destilada como líquido teste, uma seringa dosadora de 100  $\mu$ l, agulha com 0,5 mm de diâmetro e a altura da agulha em relação à superfície do material de 3 mm. Foram efetuadas medições a cada 15 segundos durante 3 minutos totalizando 12 leituras de ângulo de contato para cada superfície. Foram avaliadas três variáveis: ângulo de contato médio = média das 12 leituras efetuadas ao longo de 180 segundos; ângulo inicial = primeira leitura obtida após 10 segundos; e ângulo final = última leitura obtida após 180 segundos. Foram mensuradas 50 sementes.

O tegumento da semente de *Araucaria angustifolia* apresenta estrias longitudinais que aumentam a sua rugosidade superficial, principalmente nas camadas externa e intermediária. Em superfícies rugosas, o ângulo de contato formado entre a tangente da interface líquido-ar e a superfície sólida aparente é chamado de ângulo de contato aparente ( $\theta_m$ ).



**Figura 11.** (A) Sistema de formato da gota DSA 1: mesa de suporte para as amostras, sistema de vídeo com câmera e seringa dosadora. (B) Fixação e nivelamento da semente de *Araucaria angustifolia* na mesa de suporte com auxílio da massa de modelar. (C) Deposição da gota de água destilada na superfície da semente.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização anatômica

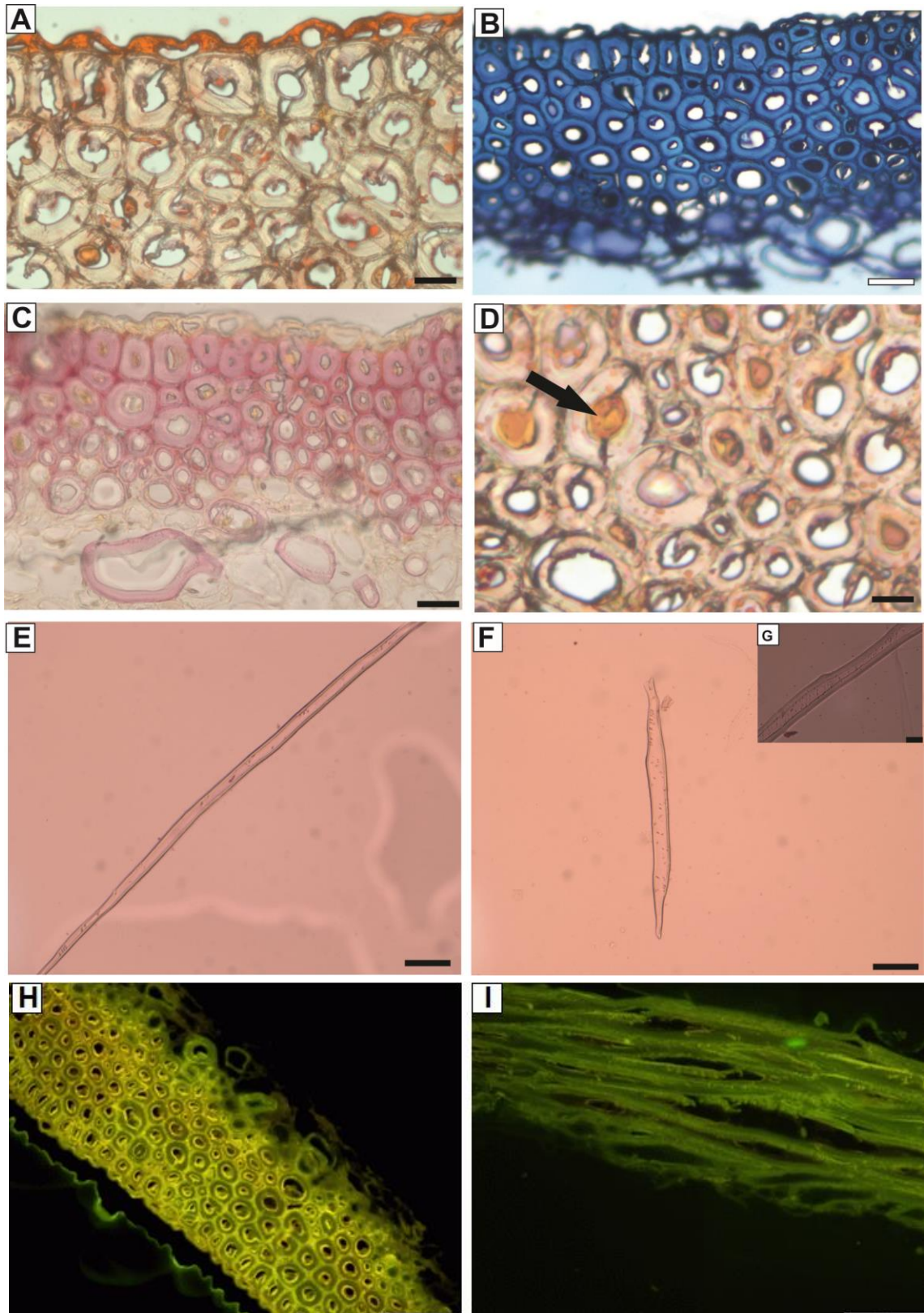
O tegumento da semente de *Araucaria angustifolia* é caracterizado pela exotesta (camada externa), mesotesta (camada intermediária) e endotesta (camada interna). A exotesta é a camada mais espessa com aproximadamente 268,5  $\mu\text{m}$ , enquanto que a endotesta é a mais fina com aproximadamente 86  $\mu\text{m}$  de espessura. A espessura da mesotesta foi de aproximadamente 246  $\mu\text{m}$ .

A exotesta, em seção transversal, é formada por uma epiderme de células tabulares e circulares, revestida por uma cutícula lipídica delgada e ornamentada (Figura 12A). Segundo Stewart (1996), a presença de substâncias lipídicas na camada externa atua como uma barreira contra a entrada de água e ataque de patógenos. O estrato subepidérmico, em seção transversal, apresenta de 6-7 camadas de células isodiamétricas (Figuras 12B e 13A-B), com paredes espessas de  $7,45 \pm 1,95 \mu\text{m}$  e lignificadas (Figura 12C e 12H), com substâncias no lúmen de algumas células (Figura 12D). Em seção longitudinal e no material dissociado foi observado que as células são longas, apresentando comprimento médio de  $1339,76 \pm 234,44 \mu\text{m}$  e com pontuações entre 5-6  $\mu\text{m}$ , sendo identificadas, portanto, como fibrotraqueídes (Figura 12E e 13C-D). Em seguida, ocorre um tecido de células de paredes delgadas e lúmen amplo, com presença de idioblastos de macroesclereídes (Figura 12F). Observa-se a autofluorescência da lignina, tanto na seção transversal quanto na seção longitudinal, sendo sua presença, na parede celular, mais acentuada na região da lamela média e próxima ao lúmen das células (Figura 12H-I).

A mesotesta, em seção transversal, apresenta três tecidos distintos (Figura 14A, 15A-B). O primeiro tecido adjacente a exotesta (S3) é constituído por 8-9 camadas de células isodiamétricas, de paredes espessas e lignificadas (Figura 14B). Essas células, em seção longitudinal e no material dissociado, foram identificadas como macroesclerídes, de diferentes formas, classificadas como vermiformes curtas e ramiformes (RAO; BHUPAL, 1973) (Figuras 14C-D e 15C-D). O segundo tecido forma uma rede de células poligonais, de paredes espessas, não lignificadas (teste Wiesner), porém com reação positiva para substâncias fenólicas em geral (Figura 14E). O terceiro tecido (S4), em seção transversal, é formado por células alongadas, que em seção longitudinal apresentam paredes espessas e não lignificadas (teste Wiesner) ou pouco lignificadas (autofluorescência), com lúmen reduzido (Figura 14F). A autofluorescência da lignina na parede celular é mais marcante no primeiro tecido quando comparado aos demais tecidos da mesotesta (Figura 14G).

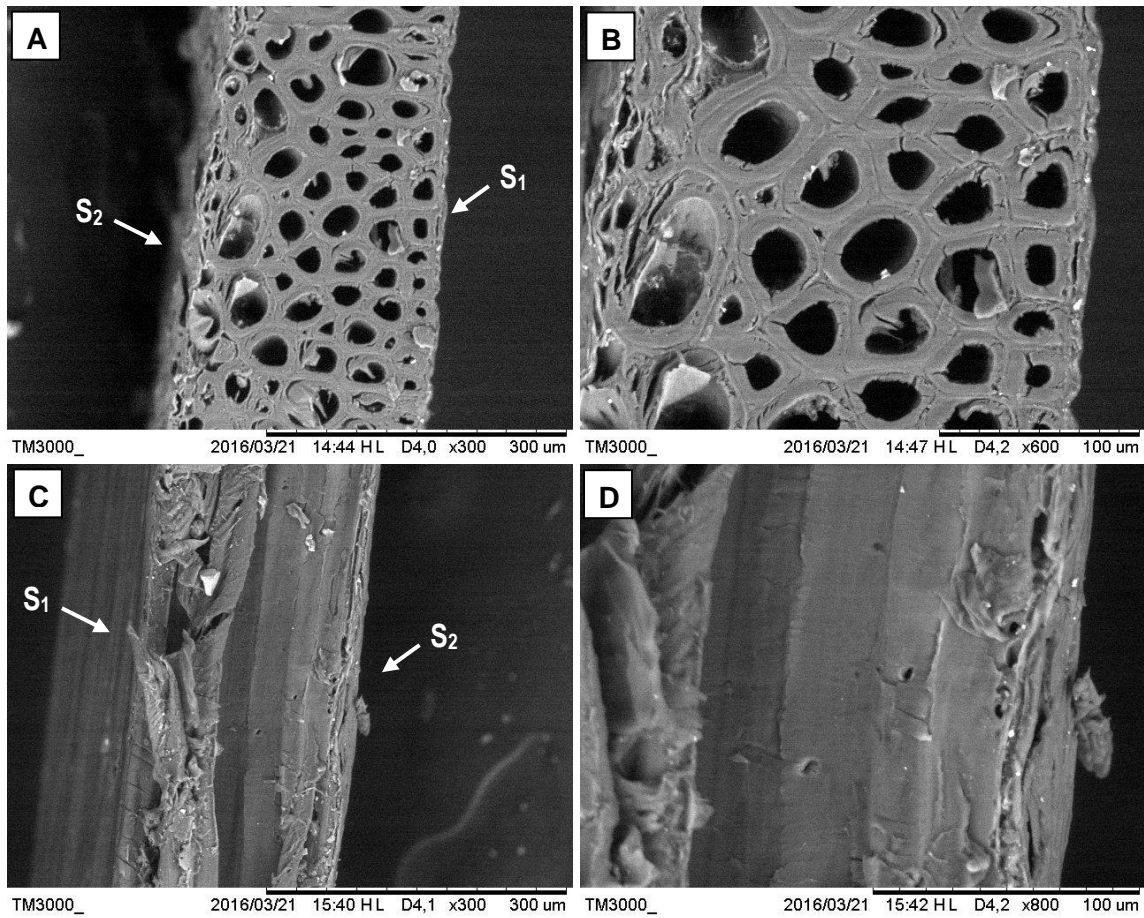
A endotesta, em seção transversal, é formada por dois tecidos (Figura 16A e 17A-B) em que o mais externo adjacente à mesotesta (S5) apresenta células parênquimáticas com substâncias fenólicas (Figura 16B); e a mais interna (S6) apresenta células parênquimáticas contendo grande quantidade de amido (Figura 16C e 17A-D).

A estrutura anatômica do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia* apresenta algumas similaridades com o tegumento de *Araucaria mirabilis* (STOCKEY, 1975). A *Araucaria mirabilis*, espécie de conífera extinta da Patagônia (Argentina), é composta por três camadas, denominadas por Stockey (1975) de sarcotesta, esclerotesta e endotesta. A sarcotesta, camada externa, é composta por um tecido composto por 3-4 células alongadas; a esclerotesta, camada intermediária, é composta por esclereídes com orientação em zig-zag; e a endotesta (camada interna) é composta por células parenquimáticas.

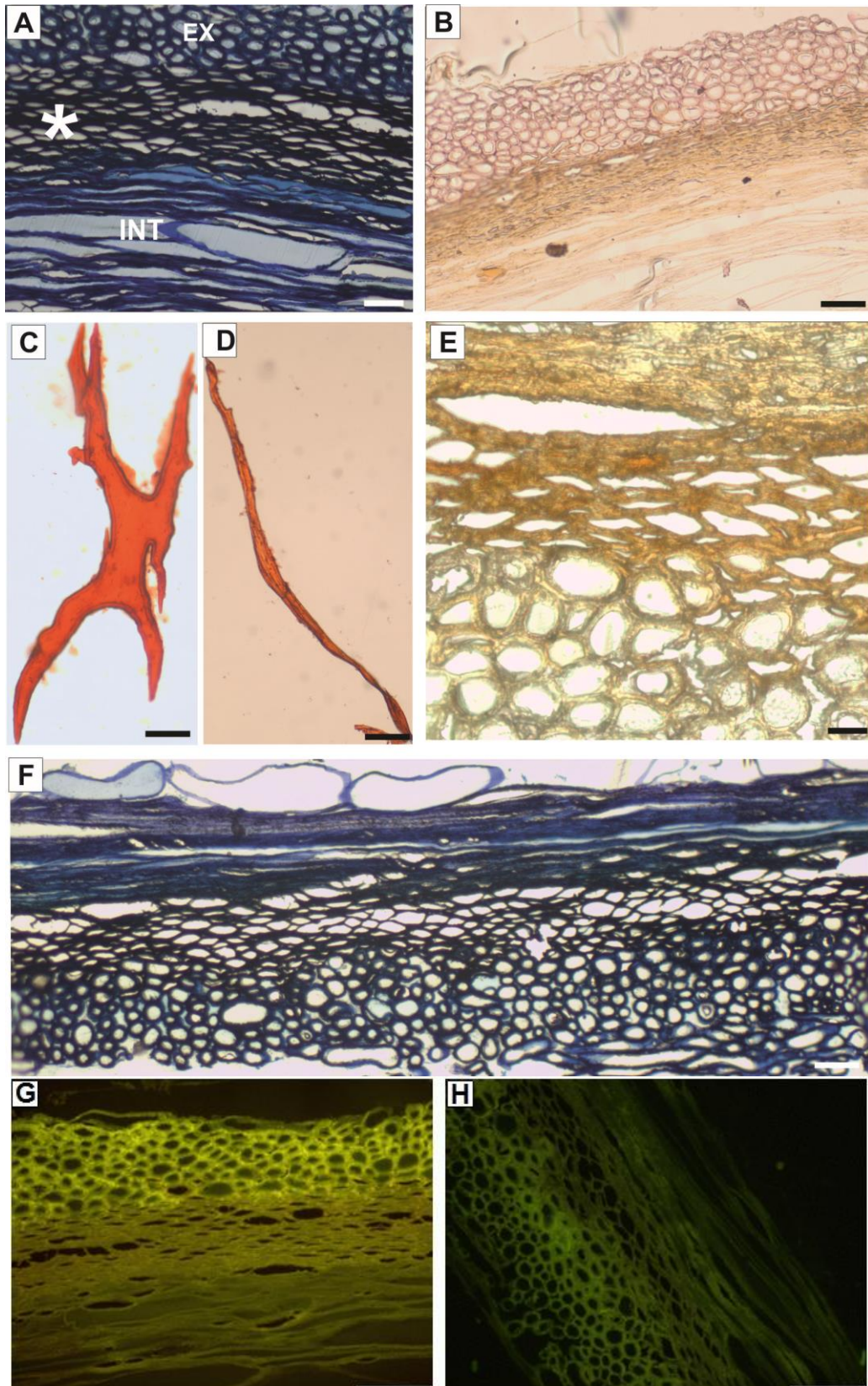


**Figura 12.** Características anatómicas da exotesta do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia* nas seções transversal (A-D) e longitudinal (I). A: cutícula ornamentada. B: células isodiamétricas. C: Paredes lignificadas. D: substâncias no lúmen. E: Fibrotraqueídes. F: macroesclereídes. G: Detalhe das pontuações. H-I: Autofluorescência da lignina. Barra = 50  $\mu\text{m}$  (A-D); 100  $\mu\text{m}$  (E-F).

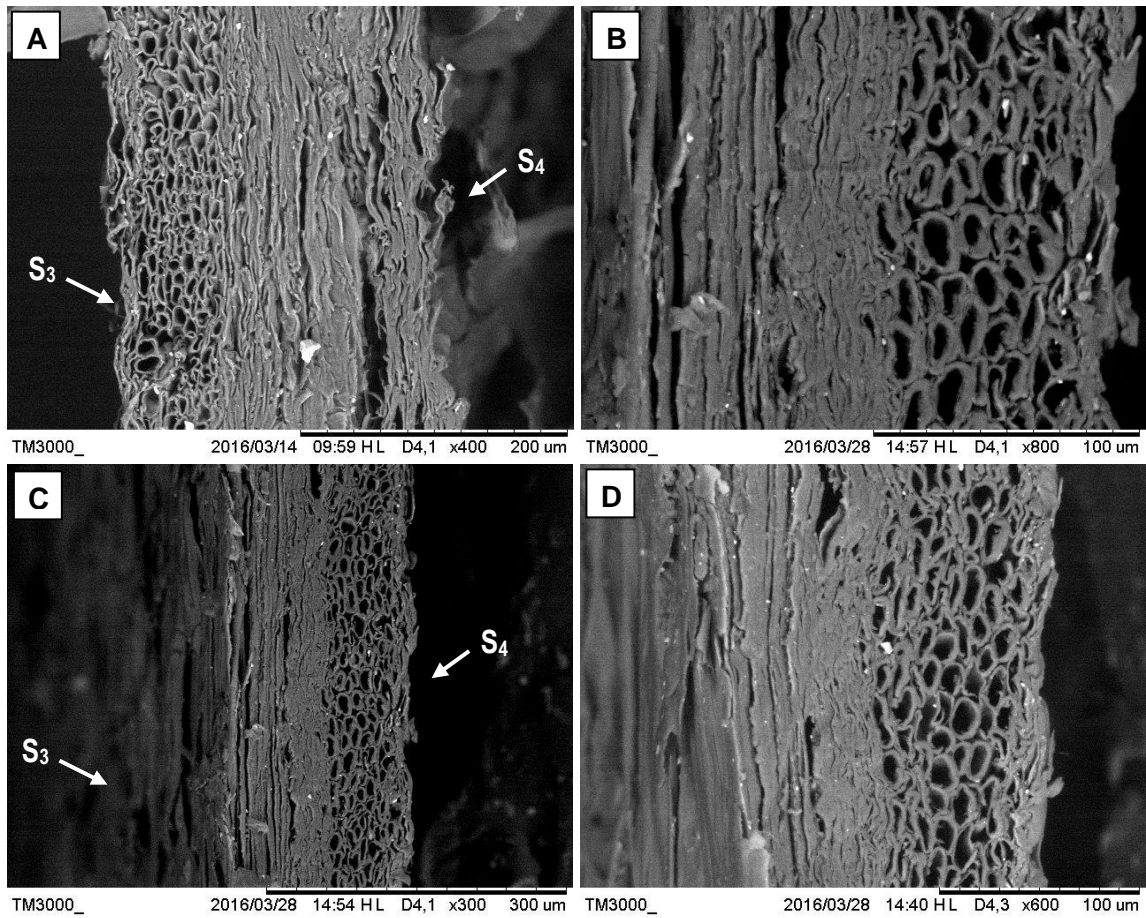




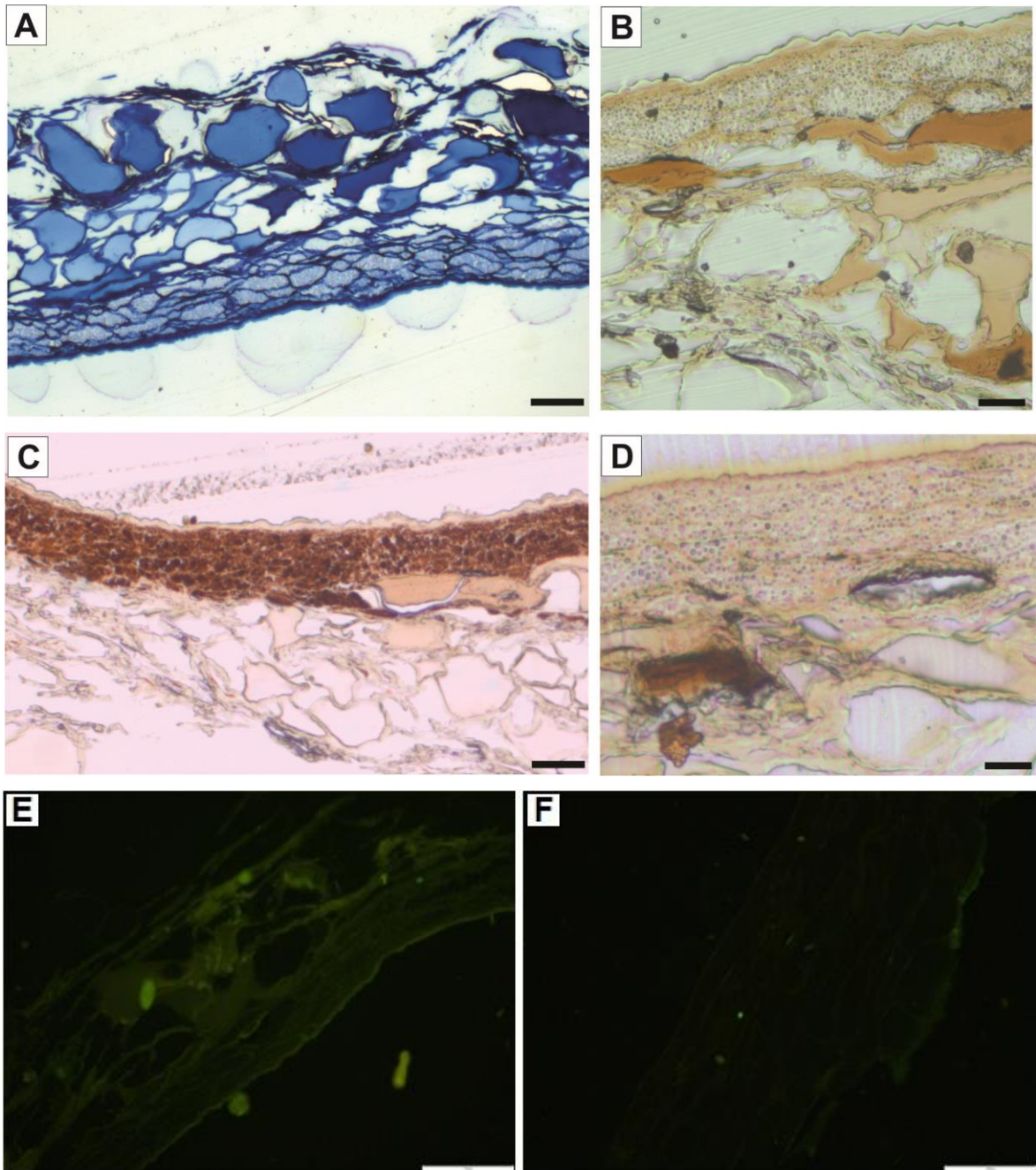
**Figura 13.** Imagens de MEV da exotesta do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia* nas seções transversal (A-B) e longitudinal (C-D). S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub>: superfície externa e interna da exotesta.



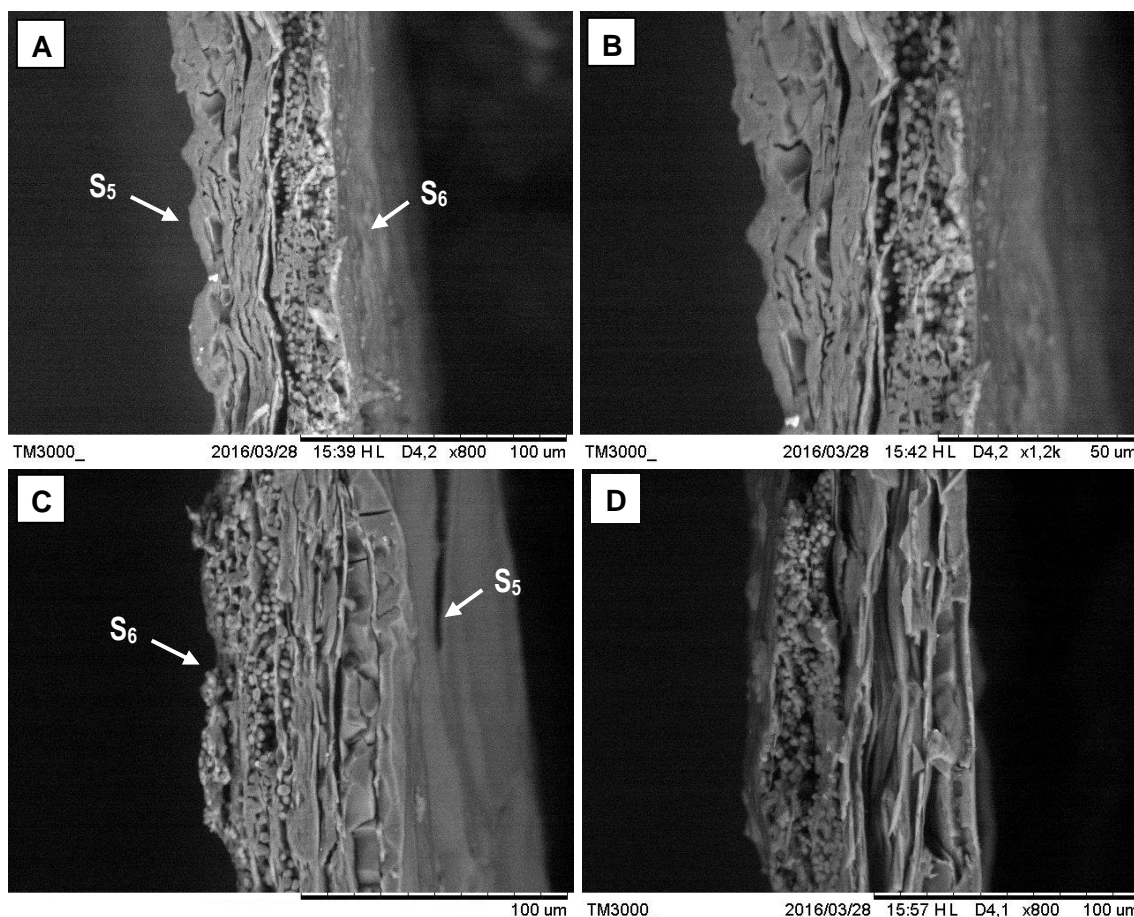
**Figura 14.** Características anatômicas da mesotesta nas seções transversal (A-B, E e G) e longitudinal (F, H) do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia*. A: Três tecidos distintos. B: Paredes espessas e lignificadas. C: Macroesclerídes ramiformes. D: Macroesclerídes vermiformes curtas. E: Segundo tecido apresentando reação positiva para substâncias fenólicas. F: Tecido interno com paredes espessas e não lignificadas. G-H: Autofluorescência da lignina. Barra = 50  $\mu\text{m}$  (A); 100  $\mu\text{m}$  (B-D; F); 25  $\mu\text{m}$  (E).



**Figura 15.** Imagens de MEV da mesotesta do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia*. A e B: Seção transversal. C e D: Seção longitudinal.  $S_3$  e  $S_4$ : superfície externa e interna da mesotesta.



**Figura 16.** Características anatômicas da endotesta nas seções transversal (A-E) e longitudinal (F) do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia*. A: Dois tecidos distintos. B: Substâncias fenólicas no tecido mais externo. C: Tecido interno apresentando grãos de amido. D: Tecido mais externo apresentando substâncias fenólicas. E-F: Baixa autofluorescência. Barra = 100 µm (A; C); 50 µm (B; D).



**Figura 17.** Imagens de MEV da endotesta do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia*. A-B: Seção transversal. C-D: Seção longitudinal. S<sub>5</sub> e S<sub>6</sub>: superfície externa e interna da endotesta.

## 4.2 Caracterização química

A Tabela 1 apresenta o teor de extrativos para as três camadas do tegumento da semente. O ciclo de extração é baseado na série elutropica, em que o ciclohexano retira compostos apolares e o metanol retira compostos polares (ex.: polifenóis). Observa-se que o teor de extrativos foi menor na exotesta e maior na endotesta.

O teor de lignina de Klason encontrado nas diferentes camadas do tegumento da semente foi na ordem de 31,89% na exotesta, 29,90% na mesotesta e 38,58% na endotesta. Embora a lignina de Klason seja um método amplamente usado para determinar o percentual de lignina em materiais lignocelulósicos (CHEN et al., 2012), a mesma pode apresentar um valor superestimado do teor de lignina devido à presença de polissacarídeos e proteínas não extraídos que podem ser mensurados em conjunto (HATFIELD; FUKUSHIMA, 2005). Isso poderia explicar o elevado teor de lignina de Klason para a endotesta (Tabela 2). Os teores de lignina de Klason na mesotesta e endotesta sofreram uma redução de 44,5% e 61,3%, respectivamente, após o tratamento com NaOH 1% (Tabela 2). Esta perda de lignina da mesotesta e endotesta pode ser devido a uma maior quantidade de ligninas com OH livre, ou a presença de complexo lignina-carboidrato (LC) (JEFFRIES, 1990), ou ainda fenóis na conectividade lignina-parede celular referindo-se às áreas chamadas *core* e *no core lignin* (BIDLACK et al., 1992; WANG et al., 2010; JAYABAL et al., 2011).

**Tabela 1.** Teor de extrativos para as camadas do tegumento de *Araucaria angustifolia*.

Camadas	Teor de extrativos (%)			
	Cicloexano	Acetato de etila	Metanol	Total
Exotesta	1,260	1,679	8,971	11,910
Mesotesta	1,104	1,660	14,676	17,440
Endotesta	0,665	0,840	26,025	27,530

**Tabela 2.** Teores de holocelulose e lignina de Klason para as camadas do tegumento de *Araucaria angustifolia*.

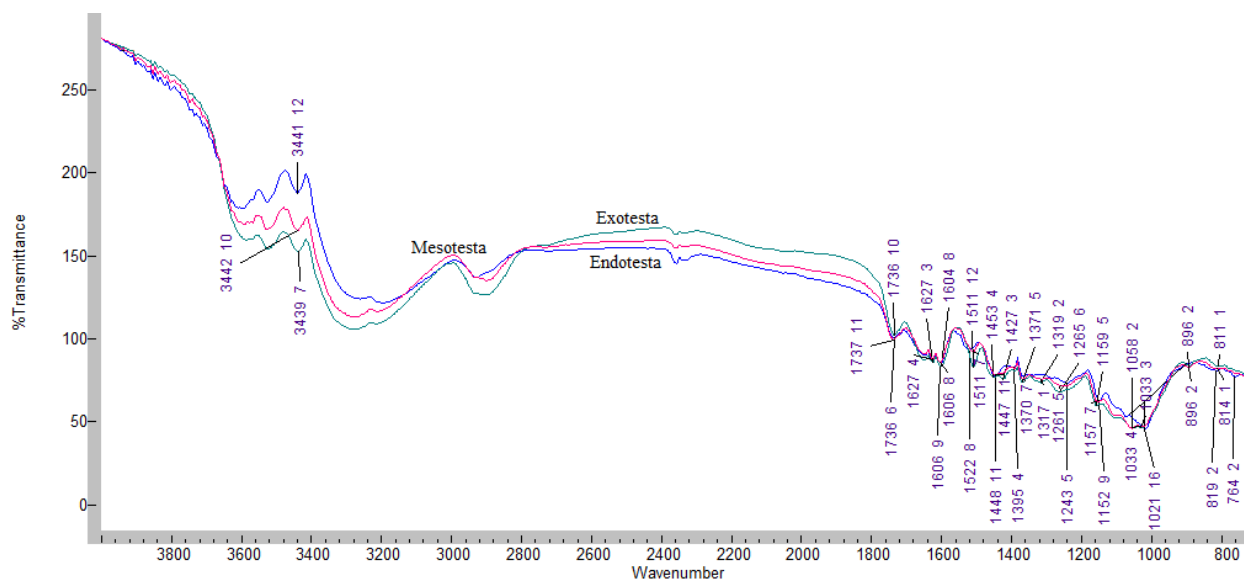
Camadas	Holocelulose (%)	Lignina de Klason (%)	Lignina de Klason com NaOH (%)
Exotesta	56,200 (0,625)	31,89 (3,29)	31,52 (0,46)
Mesotesta	52,660 (0,82)	29,90 (0,14)	16,88 (0,49)
Endotesta	33,890 (2,00)	38,58 (1,28)	15,32 (2,65)

Valores entre parêntesis = desvio padrão.

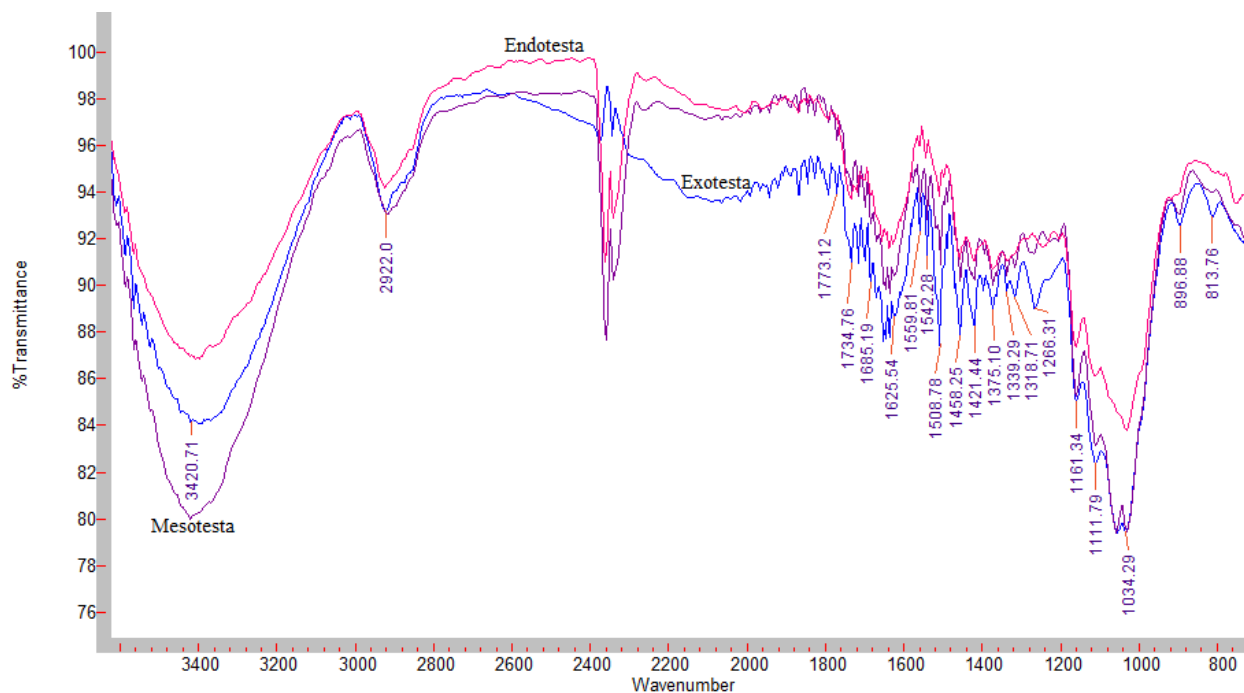
### 4.3 Espectroscopia FT-IR

O espectro no infravermelho das camadas do tegumento com e sem NaOH 1% mostram sinais característicos da presença de celulose, hemicelulose e lignina (KUBO; KADLA, 2005; SILLS; GOSSETT, 2011; XU et al., 2013) (Figuras 18 e 19). É possível observar o pico em torno de  $3400\text{ cm}^{-1}$  que diz respeito ao estiramento de grupos hidroxilas (O-H) em estruturas alifáticas e fenólicas. O pico de absorção em  $\sim 1730\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento de grupos carbonilas (C=O) de aldeídos ou cetonas não conjugados de hemicelulose. O pico em  $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$  é referente a vibração do anel aromático, mas sofre influência do estiramento de grupo carbonila (C=O). O pico em  $1500\text{ cm}^{-1}$  também é atribuída à vibração do anel aromático, essa é considerada uma banda pura e é utilizada como padrão interno em espectros de lignina por não apresentar perturbações na sua intensidade (LIN E DANCE, 1992). O pico em  $\sim 1315\text{ cm}^{-1}$  é atribuída vibração de  $\text{CH}_2$  de celulose e hemicelulose. A banda de absorção em  $\sim 1370\text{ cm}^{-1}$  é atribuída a deformação C-H de celulose e hemicelulose (STEWART, 1996). O pico de absorção em  $\sim 1450\text{ cm}^{-1}$  é atribuída a deformação O-H no plano de celulose, hemicelulose e lignina. O pico de absorção em  $\sim 1160\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento assimétrico C-O-C de celulose e hemicelulose.

As vibrações específicas para as diferentes unidades estruturais da lignina ocorrem na região abaixo de  $1500\text{ cm}^{-1}$ . Observa-se no espectro com NaOH 1% (Figuras 18 e 19) picos característicos de unidades guaiacílicas em que a banda em  $\sim 1265\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento C-O do anel aromático e a banda em  $\sim 1033\text{ cm}^{-1}$  é atribuída a deformação C-H aromático no plano em que as unidades guaiacílicas ocorrem em maior proporção que as siringílicas (KUBO; KADLA, 2005; SILLS; GOSSETT, 2011). Observa-se também o pico em  $\sim 1111\text{ cm}^{-1}$  que é atribuído ao estiramento assimétrico C-O de grupamento éster referente ao ácido  $p$ -cumárico (SUN et al., 2011; WEN et al., 2013). Por meio de uma comparação semiquantitativa das intensidades das bandas é possível classificar as ligninas (LIN; DENCE, 1992). Deste modo, foi possível verificar a presença de unidades guaiacila caracterizando essa lignina como guaiacílica (G) tipicamente encontrada em espécies de coníferas (VANHOLME et al., 2010).

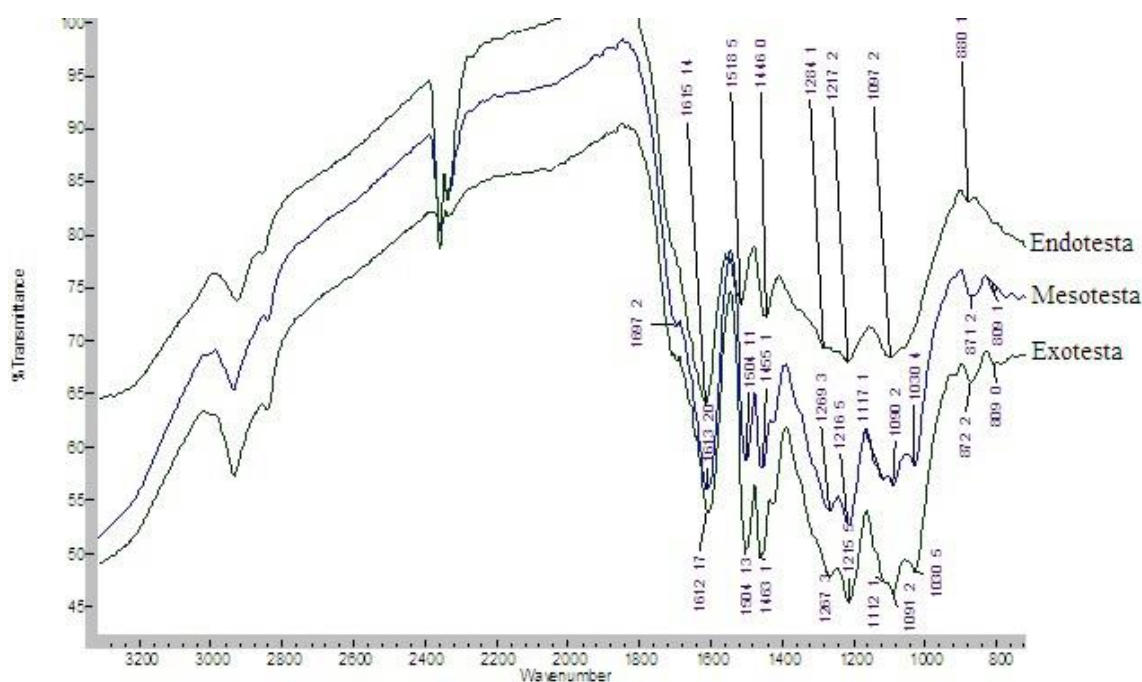


**Figura 18.** Espectro FT-IR das três camadas do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia* (sem NaOH 1%).



**Figura 19.** Espectro FT-IR das três camadas do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia* (com NaOH 1%).

Os espectros no infravermelho registrados para lignina de Klason das respectivas camadas tratadas com NaOH a 1% (Figura 20) mostraram sinais característicos de lignina ( $1600\text{ cm}^{-1}$  e  $1500\text{ cm}^{-1}$ ). Dado que os sinais no infravermelho representam a proporcionalidade dos grupos funcionais nas amostras, esse fato é usado para inferir a presença e a frequência das subestruturas que compõem a lignina. Os espectros no infravermelho registrados em madeiras mostram que o sinal em  $1600\text{ cm}^{-1}$  tem três componentes. A maior intensidade de sinal corresponde à vibração dos anéis aromáticos de subestruturas  $\beta$ -O-4 e as intensidades de sinal de vibração mais baixas correspondem aos anéis aromáticos de subestruturas  $\beta$ - $\beta$  e  $\beta$ -5 (LIN; DANCE, 1992). Com base nesta constatação, a relação dos sinais a  $1600\text{ cm}^{-1}$  e  $1500\text{ cm}^{-1}$  foram utilizados para a comparação semi-quantitativa. Esta proporção foi de 1,30 para a exotesta, 1,81 para mesotesta e 2,80 para endotesta. Elas assumem que a lignina da exotesta tem um perfil estrutural expressa pela natureza condensada, enquanto que a lignina presente no perfil das outras camadas apresenta menores graus de condensação. Isto pode fazer com que a mesotesta e endotesta sofram níveis mais elevados de degradação que a exotesta, essa que atua como uma barreira de proteção física e química nas sementes contra fatores bióticos e abióticos do ambiente (WADA et al., 2011).



**Figura 20.** Espectro FT-IR da lignina de Klason tratada com NaOH 1% obtida a partir das três camadas do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia*.

#### 4.4 Espectroscopia da cor

A Tabela 3 apresenta as médias das variáveis colorimétricas do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia*. As análises estatísticas indicaram diferenças significativas de cor entre as camadas. A luminosidade ( $L^*$ ) é maior na superfície externa da mesotesta ( $S_3$ ) e na superfície interna da endotesta ( $S_6$ ) cujos valores foram de 53,02 e 53,75, respectivamente. A superfície externa da endotesta ( $S_5$ ) é a mais escura, ou seja, apresenta a menor luminosidade com valor médio de 37,15. Comparando as superfícies externa e interna de cada camada,



observa-se que na exotesta, a superfície interna (S<sub>2</sub>) é mais clara (maior valor de L\*) que a superfície externa (S<sub>1</sub>); na mesotesta, a superfície interna (S<sub>4</sub>) é mais escura que a superfície externa (S<sub>3</sub>); e na endotesta, a superfície externa (S<sub>5</sub>) é mais escura que a superfície interna (S<sub>6</sub>).

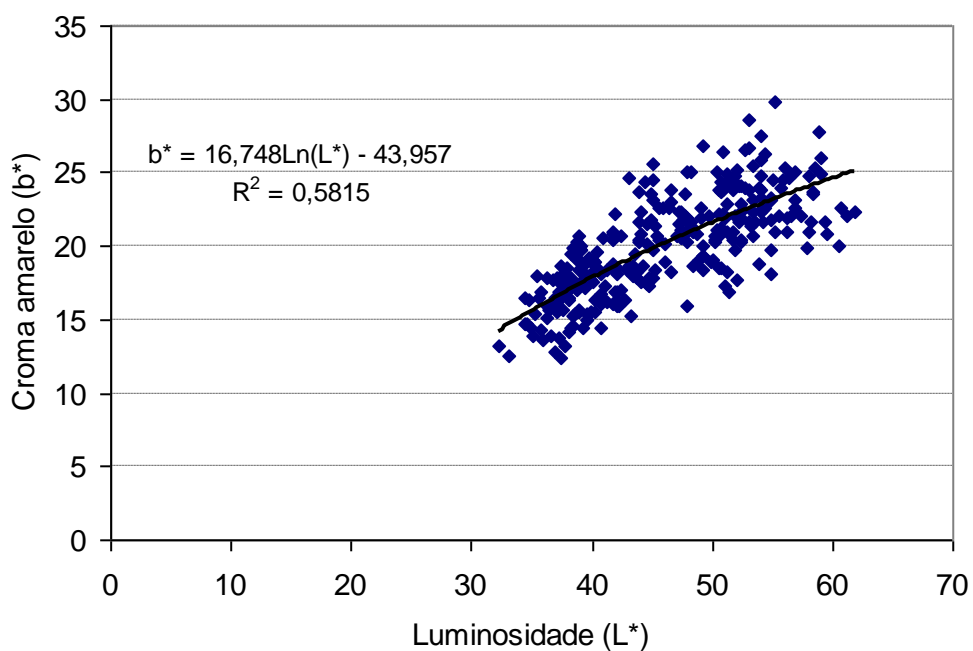
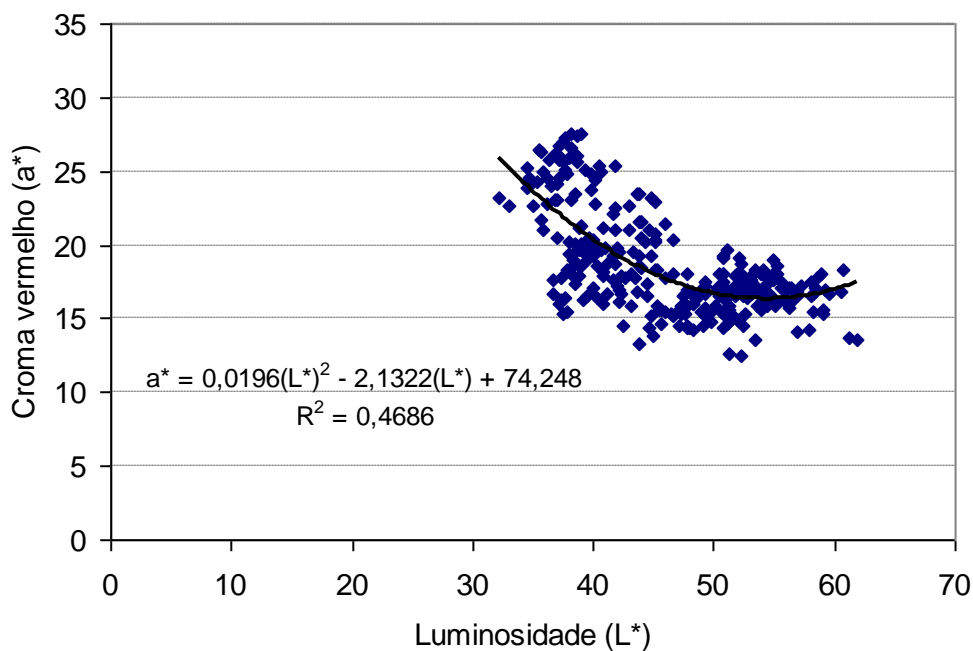
O valor de croma (C\*<sub>ab</sub>) indica a saturação da cor, i.e., quanto maior o valor de C\*<sub>ab</sub> mais saturada é a cor. Sendo assim, as superfícies externa (S<sub>5</sub>) e interna (S<sub>6</sub>) da endotesta apresentam a maior saturação de cor ou maior cromaticidade. A S<sub>5</sub> apresentou mais pigmento vermelho (a\*) enquanto que a S<sub>6</sub> apresentou mais pigmento amarelo, o que explica os maiores valores de C\*<sub>ab</sub> (Tabela 3). A cor é uma propriedade física que é afetada pela composição química, principalmente pelo teor e natureza dos extrativos (AMUSANT et al., 2004; PÂQUES; GARCÍA-CASAS; CHARPENTIER, 2012). Os resultados obtidos para a cromaticidade do tegumento da semente corroboram com análises dos extrativos em que a endotesta apresentou o maior teor em relação à exotesta e mesotesta (Tabela 1); e com as análises histoquímicas que indicaram a presença de substâncias fenólicas na S<sub>5</sub> da endotesta. Na Figura 21, observa-se que as superfícies mais escuras apresentam mais croma vermelho enquanto que as superfícies mais claras apresentam mais croma amarelo.

O ângulo (h<sub>ab</sub>), assim como os pigmentos vermelho (a\*) e amarelo (b\*) expressa a tonalidade. Os maiores ângulos foram encontrados para as superfícies S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> e S<sub>6</sub> com os respectivos valores médios de 53,05, 54,57 e 53,02 enquanto que a superfície S<sub>5</sub> apresentou o menor ângulo (34,28) (Tabela 3). As superfícies S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> e S<sub>6</sub> também apresentaram os maiores valores de pigmento amarelo (b\*).

**Tabela 3.** Médias das variáveis colorimétricas das camadas do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia*.

Camada		L*	a*	b*	C* <sub>ab</sub>	h <sub>ab</sub>
Exotesta	S <sub>1</sub>	40,79 [85,41] c	19,95 [199,70] b	18,80 [116,54] b	27,47 [142,34] bc	43,07 [98,88] b
	S <sub>2</sub>	49,03 [180,97] b	15,72 [58,57] e	20,99 [174,48] a	26,28 [102,27] cd	53,05 [211,82] a
Mesotesta	S <sub>3</sub>	53,02 [227,97] ab	16,41 [87,63] de	23,20 [223,43] a	28,47 [170,64] b	54,57 [230,76] a
	S <sub>4</sub>	41,90 [100,70] c	18,21 [155,59] bc	16,92 [66,61] b	24,88 [65,83] d	42,85 [93,26] b
Endotesta	S <sub>5</sub>	37,15 [34,63] d	24,84 [267,61] a	16,99 [70,21] b	30,12 [221,51] a	34,28 [25,53] c
	S <sub>6</sub>	53,75 [239,64] a	17,04 [116,14] cd	22,65 [217,32] a	28,37 [173,58] ab	53,02 [208,54] a

Valores entre colchetes = média dos postos de Kruskal-Wallis. Médias com a mesma letra não são estatisticamente diferentes entre si pelo teste de Kruskal-Wallis. S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub>: superfície externa e interna da exotesta. S<sub>3</sub> e S<sub>4</sub>: superfície externa e interna da mesotesta. S<sub>5</sub> e S<sub>6</sub>: superfície externa e interna da endotesta. L\*: luminosidade (claridade); a\*: matiz vermelho; b\*: matiz amarelo; C\*<sub>ab</sub>: saturação ; e, h<sub>ab</sub>: tonalidade.



**Figura 21.** Correlação entre a luminosidade e as variáveis cromáticas das camadas do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia*.

#### 4.5 Ângulo de contato

As análises estatísticas indicaram diferenças significativas de molhabilidade entre as camadas do tegumento (Tabela 4). A superfície externa da mesotesta ( $S_3$ ) apresentou os maiores valores de ângulo de contato aparente tanto para o ângulo médio quanto para os ângulos após 15 segundos e 180 segundos, mostrando que a  $S_3$  apresenta a menor molhabilidade (Figura 22A). Por outro lado, a superfície interna da mesotesta ( $S_4$ ) apresentou a maior molhabilidade, ou seja, os menores valores de ângulo (Figura 22B). Esses resultados podem ser explicados pelo contraste entre a estrutura anatômica e a composição químicas das

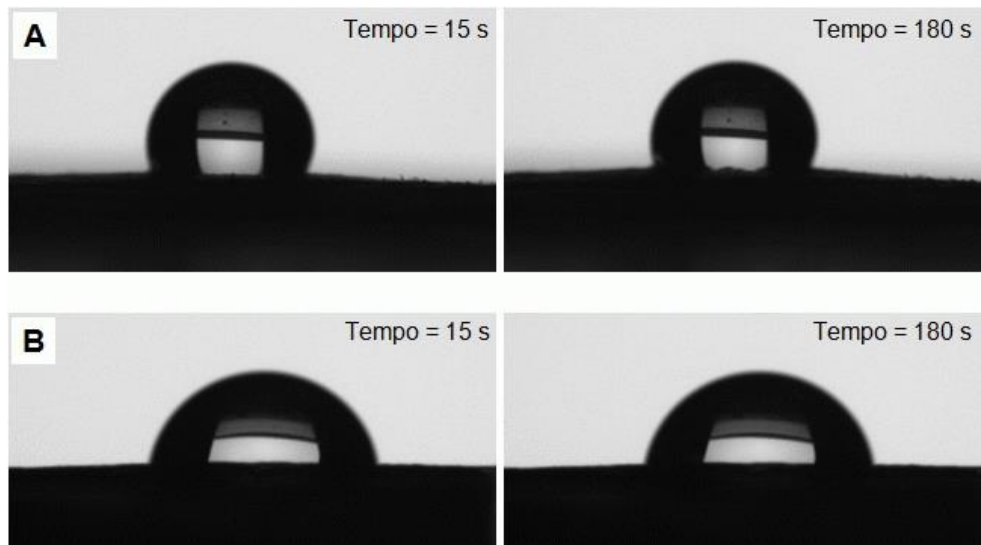
camadas S<sub>3</sub> e S<sub>4</sub> (Figuras 14 e 15). Na S<sub>3</sub>, as células são lignificadas (Figura 14B e 14G) e orientadas axialmente em relação ao comprimento da semente enquanto que na S<sub>4</sub>, as células são não-lignificadas e dispostas transversalmente, ou seja, perpendicular ao comprimento da semente. A lignina devido à sua característica hidrofóbica pode contribuir para a menor molhabilidade da S<sub>3</sub>. O ângulo de contato aparente da superfície externa (S<sub>1</sub>) e interna (S<sub>2</sub>) da exotesta e a superfície externa da endotesta (S<sub>5</sub>) não apresentaram diferenças significativas entre si. As camadas S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub> são bastante similares em relação à estrutura anatômica, o que explica o fato das duas superfícies apresentarem o mesmo comportamento para o ângulo de contato. As análises histoquímicas indicaram um alto teor de lignina na exotesta, assim como para a mesotesta, portanto esperava-se que a exotesta tivesse uma molhabilidade tão baixa quanto a S<sub>3</sub> da mesotesta, o que não ocorreu. A exotesta e a mesotesta do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia* apresentam estrias longitudinais que aumentam a sua rugosidade superficial, o que pode ter afetado os valores de ângulo de contato. Bormashenko et al. (2013) afirmam que o ângulo de contato (aparente), nesses casos, resulta de uma complexa combinação da composição química e da rugosidade superficial.

O comportamento do ângulo de contato das três camadas do tegumento apresentou a mesma tendência ao longo do tempo de 180 segundos, ou seja, as diferenças significativas encontradas entre as camadas após 15 segundos e 180 segundos foram similares entre si (Figura 23). Os resultados deste estudo contribuem para um melhor entendimento sobre a permeabilidade do tegumento da semente à penetração de água e conseqüentemente ao processo de germinação da semente de *Araucaria angustifolia*. Geralmente, recomenda-se que seja feita uma escarificação na semente de *Araucaria angustifolia* para acelerar e aumentar o seu potencial de germinação (SOUZA; CARDOSO, 2003). As análises de ângulo de contato mostraram que a camada externa da mesotesta é a principal responsável pela baixa permeabilidade da semente.

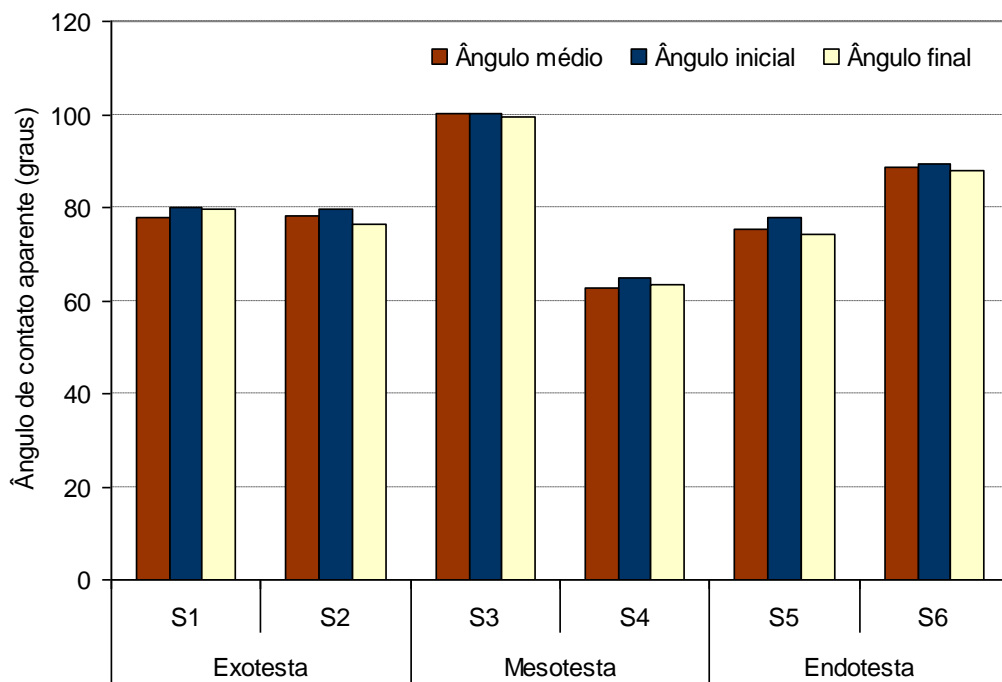
**Tabela 4.** Médias de ângulo de contato aparente das camadas do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia* para a análise de molhabilidade.

Camada		Ângulo de contato médio (graus)		Ângulo de contato inicial (graus) – após 10 s		Ângulo de contato final (graus) – após 180 s	
		Média	Postos de Kruskal-Wallis	Média	Postos de Kruskal-Wallis	Média	Postos de Kruskal-Wallis
Exotesta	S <sub>1</sub>	77,80	129,10 c	79,93	122,71 c	79,79	113,73 b
	S <sub>2</sub>	78,11	131,45 c	79,56	131,82 c	76,46	113,71 b
Mesotesta	S <sub>3</sub>	100,13	261,36 a	100,20	259,26 a	99,38	232,12 a
	S <sub>4</sub>	62,74	58,87 d	64,90	59,27 d	63,50	55,03 c
Endotesta	S <sub>5</sub>	75,48	117,15 c	77,92	120,97 c	74,20	103,17 bc
	S <sub>6</sub>	88,80	205,07 b	89,26	205,42 b	87,80	185,07 a

Médias com a mesma letra não são estatisticamente diferentes entre si. S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub>: superfície externa e interna da exotesta. S<sub>3</sub> e S<sub>4</sub>: superfície externa e interna da mesotesta. S<sub>5</sub> e S<sub>6</sub>: superfície externa e interna da endotesta.



**Figura 22.** Comportamento da gota na mesotesta da semente de *Araucaria angustifolia*. A: superfície externa (S<sub>3</sub>) com baixa molhabilidade. B: superfície interna (S<sub>4</sub>) com alta molhabilidade.



**Figura 23.** Ângulo de contato aparente das camadas do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia*.

## 5 CONCLUSÕES

A estrutura celular do tegumento da semente de *Aracuaria angustifolia* apresentou características distintas entre as três camadas: exotesta, mesotesta e endotesta. A mesotesta apresentou maior diversidade e complexidade anatômica.

A endotesta foi a camada mais afetada pelo tratamento com NaOH, o que sugere a presença de uma lignina com perfil estrutural de natureza menos condensada. A lignina encontrada nas três camadas foi identificada como sendo do tipo G.

A superfície externa da mesotesta e a superfície interna da endotesta apresentaram a maior luminosidade enquanto que a superfície externa da endotesta apresentou a menor luminosidade. As superfícies mais escuras apresentaram mais croma vermelho enquanto que as superfícies mais claras apresentaram mais croma amarelo.

As superfícies externa e interna da endotesta apresentaram a maior saturação de cor (cromaticidade). As superfícies externa ( $S_5$ ) e interna ( $S_6$ ) da endotesta apresentam a maior saturação de cor (cromaticidade) em que a  $S_5$  apresentou mais croma vermelho ( $a^*$ ) devido à presença de substâncias fenólicas enquanto que a  $S_6$  mais pigmento amarelo.

As camadas do tegumento apresentaram comportamentos diferentes de molhabilidade. O fenômeno de molhabilidade é complexo e a análise da composição química não foi suficiente para explicá-lo. A superfície externa ( $S_3$ ) da mesotesta é a principal responsável pela baixa molhabilidade da semente.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, H. S. **Biossíntese da lignificação**. Editora Universidade Rural, 1994, p.60.
- 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**, p. 01-20, 2006.
- AMUSANT, N.; BEAUCHENE, J.; FOURNIER, M.; JANIN, G.; THEVENON, M. Decay resistance in *Dicorynia guianensis* Amsh: analysis of inter-tree and intra-tree variability and relations with wood colour. **Annals of Forest Science**, v. 61, n.4, p. 373-380, 2004.
- AUTRAN, C. S.; GONÇALEZ, J. C. Caracterização colorimétrica das madeiras de muirapiranga (*Brosimum rubescens* taub.) e de seringueira (*Hevea brasiliensis*, clone tjir 16 müll arg.) visando à utilização em interiores. **Ciência Florestal**, v. 16, n. 4, p. 445-451, 2006.
- BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Editora UFV, Universidade Federal de Viçosa. 2008. 189 p.
- BARROS, C. F.; MIGUENS, F. C. Ultrastructure of the epidermal cells of *Beilshmedia rigida* (Mez) Kosterm. (Lauraceae). **Acta Microscopica** v. 06, n. 03, p. 451-461, 1998.
- BERLYN G. P., MIKSCH, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: Iowa State University, p. 121-276, 1976.
- BERTHOMIEU, C.; HIENERWADEL, R. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. **Photosynth. Res.**, v. 101, n. 2-3, p. 157-170, 2009.
- BIOLIN SCIENTIFIC. 2014. Roughness corrected contact angle. Disponível em: <http://www.biolinscientific.com/application/surface-roughness-measurement/#ISO> Acesso em 30 out 2015.
- BITTENCOURT, J.V.M.; HIGA, A.R.; MAZZA, M.C.; RUAS, P.M.; RUAS, C.F.; CACCAVARI, M.; FASSOLA, H. Conservation, management and sustainable use of *Araucaria angustifolia* genetic resources in Brazil. In: VINCENT, B; AMARAL, W.; MEILLEUR, B. (Eds). **Challenges in managing forest genetic resources for livelihoods: examples from Argentina and Brazil**. Roma: IPGRI – International Plant Genetic Resources Institute, 2004. cap. 07, p.133-148. Disponível em: <http://www.ipgri.cgiar.org/publications/1046/chapter%207.pdf> Acesso em 30 out 2013.
- BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin Biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 519-546, 2003.
- BOITEAUX, H. **Madeiras de construção de Santa Catarina**. Florianópolis: IBGE, 1947. 108 p. (IBGE. Publicação, 27).
- BORGES, E. E. L.; SILVA, R. F.; BORGES, R. C. G. Estudo da germinação de sementes de pinheiro brasileiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 5. 1987, Gramado. **Resumos**. Brasília, DF: ABRATES, 1987. p. 134.

BORMASHENKO, E.; GRYNIOV, R.; BORMASHENKO, Y.; DROVI, E. **Cold radiofrequency plasma treatment modifies wettability and germination rate of plant seeds**. In: MITTAL, K. L. *Advances in contact angle, wettability and adhesion*. John Wiley & Sons, 2013. 440 p.

BRUICE, P. Y. **Química Orgânica**. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006. 690p.

BUI, N. Q.; FONGARLAND, P.; RATABOUL, F.; DARTIGUELONGUE, C. CHARON, N.; VALLEE, C.; ESSAYEM, N. FTIR as a simple tool to quantify unconverted lignin from chars in biomass liquefaction process: Application to SC ethanol liquefaction of pine wood. **Fuel Processing Technology**, v. 134, p. 378–386, 2015.

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

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

CAMARGOS, J. A.; GONÇALES, J. C. A colorimetria aplicada como instrumento na elaboração de uma tabela de cores de madeira. **Brasil Florestal**, n. 71, 2001.

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

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Florestais Brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Florestas. Colombo: Embrapa-CNPQ, 1994.

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

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

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

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

CORREIA, S. **Gimnospermas Plantas com sementes**. Disponível em: <http://pt.slideshare.net/LaraTavares/gimnospermas-e-angiosperma> Acesso em 30 abr 2016.

COSTA, F. J. O. G.; LEIVAS, C. L.; WASZCZYNSKYJ, N.; GODOI, R. C. B.; HELM, C. V.; COLMAN, T. A. D.; SCHNITZLER, E. Characterisation of native starches of seeds of *Araucaria angustifolia* from four germplasm collections. **Thermochimica Acta**, v. 565, p. 172– 177, 2013.

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

DONI FILHO, L.; AMARAL, L.; CERVI, P. H. Métodos para testar o poder germinativo das sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 7, n. 2, p. 113-123, 1985.

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

ECOPLAN. **Projeto Pinhão**: Culinária. General Carneiro, 2000. Disponível em: <http://www.ecoplan.org.br> Acesso em 30 out 2013.

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

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

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

FORATO, L. A.; FILHO, R. B.; OSIRO, D. BICUDO, T. C.; COLNAGO, L. A. **A Espectroscopia na região do Infravermelho e algumas aplicações**. Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP, 2010.

GABE, M. **Techniques Histologiques**. Masson Cle, Paris, p. 230. Grinwich, 1968.

GEETHA, N. P.; MAHESH, M.; BETTADAIAH, B. K.; KINI, K.; RAMACHANDRA, H. S. HPLC Method for Determination of p-coumaric acid from the Medicinal Herb *Leptadina reticulata*. **International Journal of Research in Phytochemistry and Pharmacology**, n. 1, v. 03, p. 192-195, 2011.

GRABBER, J. H. How do lignina composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. **Crop Science**, v. 45, n. 03, p.820-831, 2005

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

GONSALVES, A. M. R.; SERRA, E. S. S.; PIÑEIRO. **Espectroscopias Vibracional e Eletrônica**. Imprensa da Universidade de Coimbra. 2005. 30p.

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

HATFIELD, R.; FUKUSHIMA, R. S. Can lignin be accurately measured? **Crop Science**, v. 45, p. 832–839, 2005.



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

HUANG, F.; SINGH, P. M.; RAGAUSKAS, A. Characterization of milled wood lignin (MWL) in Loblolly pine stem wood, residue, and bark. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 12910–12916, 2011.

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

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, p. 889-895, 2011.

INTERNATIONAL ASSOCIATION OF WOOD ANATOMISTS – IAWA Committee. **IAWA List of microscopic features for softwood identification**. Eds: RICHTER, H. G.; GROSSER, D.; HEINZ, I.; GASSON, P. E. **IAWA Journal**, v. 25, n. 1, p. 1-70, 2004.

IBGE. **Mapa da vegetação do Brasil**. Brasília: IBGE, 1993. 1 p.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**: Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp> Acesso em 30 abr 2015.

ILHARCO, L. M. **Química**. Espectroscopia de Infravermelho uma Técnica Antiga, Sempre Actual. 1998. 12p. Disponível em: <http://www.spq.pt/magazines/BSPQ/593/article/3000839/pdf> Acesso em 30 mar 2016.

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

**Instituto Ambiental do Paraná (IAP)**. Disponível em: <http://www.iap.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=201#estportconj> Acesso em 30 abr 2016.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 11664-4:2008 Colorimetry – Part 4: CIE 1976 L\*a\*b\* Colour space.

JENSEN, D. H. **Botanical Histochemistry (Principles and Practice)**. São Francisco: W, H. Freeman and Company, 408p., 1962.

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

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

KONICA MINOLTA SENSING Inc. Comunicação precisa da cor. 1998. 57 p.

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

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

LING, L.; JIANGANG, L.; MINCHONG, S.; CHUNLEI, Z.; YUANHUA, D. Cold plasma treatment enhances oilseed rapeseed germination under drought stress. **Scientific Reports**, p. 1-10, 2015. In: MOSTRA NACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA INTERDISCIPLINAR – MICTI. Araquari: Instituto Federal Catarinense, 2014.

LIMA, A. R.; CAPOBIANCO, J. P. R. (coords.). 1997. Mata Atlântica: avanços legais e institucionais para sua conservação. **Documentos do ISA** n. 004. Instituto Sócio Ambiental, Brasília.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química nova**, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.

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

MACHADO, S. A.; SIQUEIRA, J. D. P. Distribuição natural da *Araucaria angustifolia*. In: Iufro meeting on forestry problems of the genus araucaria, 1979, Curitiba. **Forestry problems of the genus Araucaria**. Curitiba: FUPEF, 1980. p. 4-9.

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

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

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

MEIER, D.; FAIX, O. **Methods in lignin chemistry. Chap. 4, Section 7**. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1992.

MOISE, J. A.; HAN, S. GUDYNAITE-SAVITCH, L.; JOHNSON, D. A.; MIKI, B. L. A. Seed coats: structure, development, composition, and biotechnology. **In Vitro Cell Dev. Biol. Plant**, v. 41, p. 20–644, 2005.

MONTEIRO, M. B. O. **Lignina e Tanino como estratégia de defesa em árvores**. 2002. 49 f. Monografia, UFRRJ, Seropédica.

MONTEIRO, R. F. F.; SPELTZ, R. M. Ensaio de 24 procedências de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. In: IUFRO MEETING ON FORESTRY PROBLEMS OF THE GENUS ARAUCARIA, 1, 1979, Curitiba. **Anais...** Curitiba: FUPEF, 1980. p. 181-200.

MOREIRA, G. C.; SPERGER, T.; SPERGER, A. S.; PALAGI, C. A. Influência da lignina na germinação de sementes de soja. **Cultivando o Saber**, v. 05, n. 02. p.175-182, 2012.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. B. A.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

NARVAES, I. S.; BRENA, D. A.; LONGHI, S. J. Estrutura da regeneração natural em Floresta Ombrófila Mista na Floresta Nacional de São Francisco de Paula, RS. **Ciência Florestal**, v. 15, n. 04, p. 331-342, 2005.

NEVES, C. S. V. J. Sementes recalcitrantes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 29, n. 09, p.1, 459-1.467, 1994.

NTIMA, O. O. **The araucarias**. Oxford: Commonwealth Forestry Institute, 1968. 139 p.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma**, v.59, n.2, p.368-373, 1964.

OLIVEIRA, J. N. B. **Anatomia das plantas superiores**. Ponta Delgada. Departamento De Biologia Da Universidade De Açores, 2011. 176 p.

PÂQUES, L. E.; GARCÍA-CASAS, M. D. C.; CHARPENTIER, J. P. Distribution of heartwood extractives in hybrid larches and in their related European and Japanese larch parentes: relationship with wood colour parameters. **European Journal of Forest Research**, v. 131, n. 5, p. 1269-1278, 2012.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 700 p.

PEDROSA, I. **Da cor à cor inexistente**. Rio de Janeiro: Léo Christiano - Universidade de Brasília. 1989. 224 p.

PEIXOTO, A. L.; ROSA, M. M. T. Da; SILVA, I. M. Caracterização da Mata Atlântica. In: Sylvestre, L. da S. & Rosa, M. M. T. da. **Manual metodológico para estudos botânicos na mata Atlântica**. Seropédica: EDUR, 2002, p. 09-23.

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

PINCELLI, A. L. P. S. M.; DE MOURA, L. M.; BRITO, J. O. Effect of thermal rectification on colors of *Eucalyptus Saligna* and *Pinus Caribaea* woods. **Ciencia y tecnología**, v. 14, n. 2, p. 239-248, 2012.

RAGONESE, A. E.; MARTINEZ-CROVETTO, R. Plantas indígenas de la Argentina con frutos o semillas comestibles. **Revista de Investigaciones Agrícolas**, v. 01, n. 03, p. 147-216, 1947.

RALPH, J.; LAPIERRE, C.; MARITA, J. M.; KIM, H.; LU, F.; HATFIELD, R. D.; RALPH, S.; CHAPPLE, C.; FRANKE, R.; HEMM, M. R.; VAN DOORSSELAERE, J.; SEDEROFF, R. R.; O'MALLEY, D. M.; SCOTT, J. T.; MACKAY, J. J.; YAHIAOUI, N.; BOUDET, A.; PEAN, M.; PILATE, G.; JOUANIN, L.; BOERJAN, W. Elucidation of new structures in lignins of CAD- and COMT-deficient plants by NMR. **Phytochemistry**, v. 57, n. 6, p. 993-1003, 2001.

RAO, T. A.; BHUPAL, O. P. Typology of sclereids. **Proceedings of the Indian Academy of Sciences – Section B**, v. 77, n. 2, p. 41-55, 1973.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Secretaria de Estado da Agricultura e Abastecimento, 1988. 525p.

RICHETTI, A. E.; PEDROTTI, V.; HUBER, E.; BIASI, V. Elaboração e caracterização físico-química de farinha da semente de pinhão (*Araucaria angustifolia*). In: MOSTRA NACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA INTERDISCIPLINAR – MICTI. Araquari: Instituto Federal Catarinense, 2014.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v. 01, n. 01, p. 499-1.514, 1973.

ROS-BARCELÓ, A.; ROS GOMEZ, L. V.; GABALDON, C.; LOPEZ, M. S.; POMAR, F.; CARRION, J. S.; PEDRENO, M. A. Fitoquímica: A porta de entrada para a evolução da lignina. **Kluwer Academic Publishers**. v. 47, n. 03, p.61-78, 2004.

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

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

SASAKI, S.; NONAKA, D.; WARIISHI, H.; TSUTSUMI, Y.; KONDO, R. Role of Tyr residues on the protein surface of cationic cell-wall-peroxidase (CWPO-C) from poplar: Potential oxidation sites for oxidative polymerization of lignin. **Phytochemistry**, v. 69, p.48–355, 2008.

SCHNEIDER, P. R.; FINGER, C. A. G.; HOPPE, J. M. Produção da *Araucaria angustifolia* (Bert). O. Ktze. na região do planalto médio do Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, v. 2, n. 1, p. 99-118, 1992.

SCHULTZ, J.; NARDIN, M. **Theories and mechanisms of adhesion**. In: PIZZI, A.; MITTAL, K. L. (Eds.) Handbook of adhesive technology. New York-Basel: Marcel Dekker, Inc. 2003.

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

SIEGA, L. Pinhão é alternativa para agricultores. **A Notícia**, Joinville, 27 abr. 1998. Disponível em: <http://an.uol.com.br/1998/abr/27/0ger.htm> Acesso 15 set 2013.

SILVA, C. V.; MARTINS, G.; STEINER, N.; SANTOS, K. L.; CAMARGO, R. S.; MANTOVANI, A.; KUBO, R. R.; GUERRA, M. P.; REIS, M. S. *Araucaria angustifolia* Pinheiro-Brasileiro. In: CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. (Eds.). **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial Plantas para o Futuro - Região Sul**. Brasília: MMA, 2011. p. 134-150.

SOARES, T. S.; MOTA, J. H. Araucária – O Pinheiro Brasileiro. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, n. 3, 2004.

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

SONEGO, R. C.; BACKES, A.; SOUZA, A. F. D. Descrição da estrutura de uma Floresta Ombrófila Mista, RS, Brasil, utilizando estimadores não-paramétricos de riqueza e rarefação de amostras. **Acta Bot. Bras.**, v. 21, n. 04, p. 943-955, 2007.

SOUZA, A. F.; FORGIARINI, C.; LONGHI, S. J.; BRENA, D. A. Regeneration patterns of a long-lived dominant conifer and the effects of logging in southern South America. **Acta Oecologica**, v. 34, p. 221-232, 2008.

SOUZA, M. S. R.; CARDOSO, E. J. B. N. Practical method for germination of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze seeds. **Scientia Agrícola**, v. 60, n. 2, p. 389-391, 2003.

SPADA, J. C.; NOREÑA, C. P. Z.; MARCZAK, L. D. F. Study on the stability of  $\beta$ -carotene microencapsulated with pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds) starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 4, p. 1166-1173, 2012.

STEWART, D. Fourier Transform Infrared Microspectroscopy of Plant Tissues. **Applied Spectroscopy**, v. 50, n. 3, 1996.

STOCKEY, R. A. Seeds and embryos of *Araucaria mirabilis*. **Amer. J. Bot.**, v. 62, n. 8, p. 856-868, 1975.

SUN, X. F.; JING, Z.; FOWLER, P.; WU, Y.; RAJARATNAM, M. Structural characterization and isolation of lignin and hemicelluloses from barley straw. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 588-598, 2011.

TACO 2. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. Versão II. 2 ed. Campinas-SP: NEPA-UNICAMP, 2006. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco> Acesso set 2013.

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.

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

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

WADA, S.; KENNEDY, J. A.; REED, B. M. Seed-coat anatomy and proanthocyanidins contribute to the dormancy of *Rubus* seed. **Scientia Horticulturae**, v. 130, p. 762-768, 2011.

WEN, J. L.; XUE, B. L.; XU, F.; SUN, R. C.; PINKERT, A. Unmasking the structural features and property of lignin from bamboo. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 332-343, 2013.

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

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

XU, F.; YU, J.; TESSO, T.; DOWELL, F.; WANG, D. Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: A mini-review. **Applied energy**, v. 104, p. 801-809, 2013.

ZANUNCIO, A. J. V.; FARIAS, E. S.; SILVEIRA, T. A. Termorretificação e colorimetria da madeira de *Eucalyptus grandis*. **Floresta e Ambiente**, v. 21, n. 1, p. 85-90, 2014.