



III CBCTEM

Congresso Brasileiro de Ciência
e Tecnologia da Madeira
Florianópolis - 2017

ESTUDO DAS LIGNINAS DAS CAMADAS DO TEGUMENTO DA SEMENTE DE *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.

Danielle Affonso Sampaio¹
Maria Vanessa Schueler²
Fernanda Lago Morbeck²

¹ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

² Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais / Instituto de Floresta / Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro



III CBCTEM

Congresso Brasileiro de Ciência
e Tecnologia da Madeira
Florianópolis - 2017

ESTUDO DAS LIGNINAS DAS CAMADAS DO TEGUMENTO DA SEMENTE DE *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.

Resumo: Recentes pesquisas com lignina em sementes mostraram características composicional que diferem das ligninas tradicionais (HGS). Essas características podem estar associadas a natureza da semente assim como a capacidade de responder as condições de sobrevivência as quais estão sendo submetidas. Assim, o presente estudo teve como objetivo caracterizar quimicamente as ligninas das três camadas do tegumento da semente bem como descrever anatomicamente a deposição dessa lignina nas três camadas do tegumento. Nas análises químicas, determinou-se os teores de holocelulose e lignina de Klason de cada camada do tegumento. Os grupos funcionais de cada superfície das três camadas do tegumento foram observados por microespectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier através do espectrômetro VARIAN 640-IR FT-IR. Para o estudo anatômico e avaliação do processo de lignificação, foram realizados cortes anatômicos das três camadas do tegumento e observados em microscópio epifluorescente utilizando cubo de excitação azul em 450-480nm e filtro FITC. A exotesta foi a camada que apresentou o maior teor de holocelulose e lignina de Klason. Os espectros das camadas do tegumento apresentaram sinais indicativos de lignina do tipo guaiacilica (G). Através da microscopia epifluorescente foi possível verificar que a lignina tem maior concentração na lamela média. Os resultados deste estudo contribuem para uma melhor compreensão do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia* possibilitando melhores utilizações no contexto da fisiologia, conservação do solo e energia.

Palavras-chave: pinhão, caracterização química, microespectroscopia no infravermelho, microscopia de fluorescência.

STUDY OF LIGNINS OF THE SEED COAT LAYERS OF *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.

Abstract: Recent research with lignin in seeds has shown compositional characteristics that differ from traditional lignins (HGS). These characteristics may be associated with the nature of the seed as well the ability to respond to the survival conditions under which they are being submitted. The present study aimed to chemically characterize the lignin of the three layers of the seed coat and anatomically describe the deposition of this lignin in the three layers of the integument. In the chemical analyzes, holocelulose and Klason lignin contents of each layer of the integument were determined. The functional groups of each surface of the three layers of the integument were observed by infrared microspectroscopy by Fourier transform through the VARIAN 640-IR FT-IR spectrometer. For the anatomical study and evaluation of the lignification process, anatomical sections of the three layers of the integument were realized and observed in epifluorescent microscope using blue excitation cube at 450-480nm and FITC filter. The exotesta was the layer that presented the highest holocellulose and lignin content of Klason. The spectra of the integument layers presented indicative signals of guaiacyl lignin (G). Through epifluorescent microscopy it was possible to verify that lignin has a higher concentration in the middle lamella. The results of this study contribute to a better understanding of the seed coat of *Araucaria angustifolia*, allowing better uses in the context of physiology, soil conservation and energy.

REALIZAÇÃO



APOIO



ORGANIZAÇÃO





III CBCTEM

Congresso Brasileiro de Ciência
e Tecnologia da Madeira
Florianópolis - 2017

Keywords: pinhão, chemical characterization, infrared microscopy, fluorescence microscopy.

1. INTRODUÇÃO

Pertencente à família Araucariaceae, a espécie *Araucaria angustifolia* é conhecida vulgarmente como pinheiro-brasileiro ou pinheiro-do-paraná, e, é a única espécie do seu gênero com ocorrência natural no Brasil (CARVALHO, 2003). É uma espécie dióica, com árvores masculinas e femininas em indivíduos distintos (KOCH e CORRÊA, 2002). Apresenta suas estruturas reprodutivas organizadas em estróbilos masculinos e femininos (SILVA et al., 2011). Estes últimos, também chamados de pinha, contêm um número variável de sementes (5-150).

A semente de *Araucaria angustifolia* é também conhecida como pinhão (COSTA et al., 2013). A amêndoa do pinhão é rica em substâncias de reserva (amido), e, consiste em um alimento tradicional de alto teor calórico, em que se destaca os teores de fibra dietética, vitamina C e substâncias antioxidantes (TACO 4a, 2011; COSTA et al., 2013). Experimentos mostram que o tegumento da semente apresenta potenciais na produção de carvão ativo e na remoção de metais de águas poluídas (SANTOS et al., 2011). Cordenunsi et al (2004) afirmam que a coloração avermelhada do tegumento da semente madura indica a presença de substâncias polifenólicas, que são transferidas para o gametófito quando do cozimento da semente para consumo.

Entretanto, existem polifenólicos insolúveis, como a lignina, que possuem propriedades que garantem a estrutura celular da semente, a proteção física e química bem como a condução de água. As ligninas diferem-se quanto a sua composição. As ligninas que ocorrem em madeira apresentam composições apenas formadas pelas unidades fenilpropanoídicas tendo as hidroxilas como um dos mais importantes grupos funcionais. Recentes estudos definiram outro tipo de lignina (C-lignina), rica em ácido caféico. Essa lignina é depositada em alta concentração durante os estágios iniciais de desenvolvimento da semente da orquídea baunilha (*Vanilla planifolia*), e encontrada também em algumas Cactaceae (CHEN et al., 2012). Ainda segundo os autores algumas espécies de cactos contêm apenas C-lignina em sua semente, enquanto outros contêm apenas a lignina clássica guaiacilica / siringilica.

Estudos com lignina de sementes são ainda escassos, porém, recentes pesquisas mostraram características composicional que diferem das ligninas tradicionais. Essas características podem estar associadas a natureza da semente assim como a capacidade de responder as condições de sobrevivência da espécie as quais estão sendo submetidas.

Deste modo, o presente estudo teve como objetivo caracterizar quimicamente as ligninas das três camadas do tegumento da semente bem como descrever anatomicamente a deposição da lignina nas três camadas do tegumento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Neste estudo foram utilizadas sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze com dimensões aproximadas de 56X20X17 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 1.

REALIZAÇÃO



APOIO



ORGANIZAÇÃO





III CBCTEM

Congresso Brasileiro de Ciência
e Tecnologia da Madeira
Florianópolis - 2017

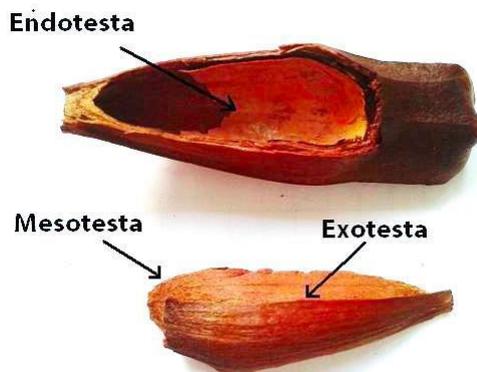


Figura 1. Tegumento da semente de *Araucaria angustifolia* composto por três camadas: interna (endotesta), intermediária (mesotesta) e externa (exotesta).

2.2 Caracterização química do material

Para as análises químicas (determinação dos teores de holocelulose e lignina), os tegumentos foram separados das amêndoas e em seguida foram moídos em moinho de facas do tipo Willey (Modelo SL 31). 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 (Abreu et al., 2006).

A determinação dos teores de holocelulose e lignina foi realizada de acordo com os métodos descritos por Abreu et al. (2006). Foram realizadas três repetições para cada camada do tegumento.

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:

$$TH = P_2 / P_1 \times 100 \quad (1)$$

onde, TH = teor de holocelulose (%); P2 = peso seco do resíduo holocelulósico (g); e P1 = 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

REALIZAÇÃO



APOIO



ORGANIZAÇÃO





III CBCTEM

Congresso Brasileiro de Ciência
e Tecnologia da Madeira
Florianópolis - 2017

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:

$$TL = P_2 / P_1 \times 100 \quad (2)$$

onde, TL = teor de lignina de Klason (%); P2 = peso seco do resíduo; e P1 = peso seco da amostra livre de extrativos.

2.3 Microespectroscopia no Infravermelho (FTIR)

As superfícies externa e interna de cada camada do tegumento (exotesta, mesotesta e endotesta) ao natural foram utilizadas para registro de espectros no infravermelho *in loco* através de um microscópio acoplado a um espectrômetro de infravermelho de modo a caracterizar e localizar a presença de lignina nos tecidos. As superfícies (externa e interna) secas de cada camada foram colocadas sobre uma lâmina KBr, e, registrados os espectros com detector MCT, usando condições experimentais de reflectância difusa. Foram registrados espectros das regiões externa e interna de cada camada do tegumento com amplitude espectral entre 4000-700 cm⁻¹, 2 cm⁻¹ de resolução e 128 varreduras. As análises foram realizadas em triplicata.

2.4 Microscopia Epifluorescente

Para o teste com fluorescência, foram realizados cortes transversais e longitudinais de cada camada do tegumento (exotesta, mesotesta e endotesta) e, posteriormente, observados em microscópio epifluorescente utilizando cubo de excitação azul em 450-480nm e filtro FITC (U-MWB2), sendo observado a autofluorescência (BARROS e MIGUENS, 1998).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização química

A Tabela 1 apresenta os teores de holocelulose e lignina encontrado nas camadas exotesta, mesotesta e endotesta do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia*. A exotesta foi a camada que apresentou o maior teor de holocelulose, em torno de 56%, valor este que pode ser comparado ao encontrado em biomassa oriunda de madeiras (HANSTED et al., 2016).

O teor de lignina de Klason encontrado nas três camadas do tegumento da semente foi em torno de 31% na exotesta, 29% na mesotesta e 38% na endotesta. A lignina de Klason é um método usado para determinar o percentual de lignina em materiais lignocelulósicos (TOBIMATSU et al., 2013) porém esse método pode apresentar um valor superestimado do teor de lignina devido à presença de polissacarídeos e proteínas não extraídos (HATFIELD e FUKUSHIMA, 2005). Isso poderia explicar o elevado teor de lignina de Klason para a endotesta (Tabela 1).

Tabela 1. Teores de holocelulose e lignina de Klason para as camadas do tegumento de *Araucaria angustifolia*

REALIZAÇÃO



APOIO



ORGANIZAÇÃO





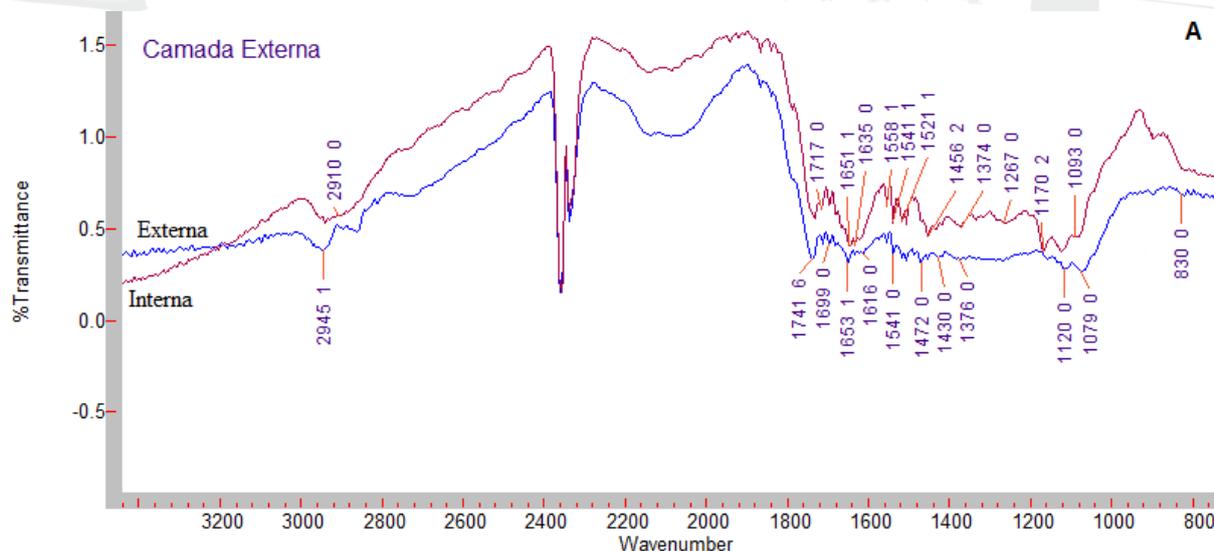
Camadas	Holocelulose (%)	Lignina de Klason (%)
Exotesta	56,20	31,89
Mesotesta	52,66	29,90
Endotesta	33,89	38,58

3.2 Microespectroscopia no Infravermelho (FTIR)

O espectro no infravermelho das superfícies externa e interna da camada externa (Figura 2A), intermediária (Figura 2B) e interna do tegumento (Figura 2C) mostra-se extremamente complexo, tendo em vista as absorções conjunta da celulose, hemicelulose e lignina.

Nos espectros no infravermelho de cada camada é possível observar os seguintes picos: em $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ referente a vibração do anel aromático, porém este sofre influência do estiramento de grupo carbonila ($\text{C}=\text{O}$). O pico em $\sim 1500\text{ cm}^{-1}$, também é atribuído à vibração do anel aromático, é considerado uma banda pura e é utilizado como padrão interno em espectros de lignina por não apresentar perturbações na sua intensidade (LIN e DANCE, 1992). O pico em $\sim 1260\text{ cm}^{-1}$ se refere à vibração do anel aromático guaiacílico (lignina tipo G). O pico em $\sim 1050\text{ cm}^{-1}$ é atribuída a deformação C-H aromático no plano em que as unidades guaiacílicas (G) ocorrem em maior proporção que as siringílicas (S). E, o pico em $\sim 830\text{ cm}^{-1}$ é referente a deformação de C-H fora do plano do C-H nas posições 2, 5 e 6 de unidades guaiacílicas.

Em todas as superfícies das três camadas do tegumento da semente foram observados sinais característicos da presença de celulose, hemicelulose e lignina (KUBO e KADLA, 2005; SILLS e GOSSETT, 2011; XU et al., 2013). Por meio de uma comparação semiquantitativa das intensidades das bandas é possível classificar as ligninas (LIN e DENCE, 1992). Assim, foi possível verificar a presença de unidades guaiacila caracterizando essa lignina como guaiacílica (G) tipicamente encontrada em espécies de coníferas (VANHOLME et al., 2010).





III CBCTEM

Congresso Brasileiro de Ciência
e Tecnologia da Madeira
Florianópolis - 2017

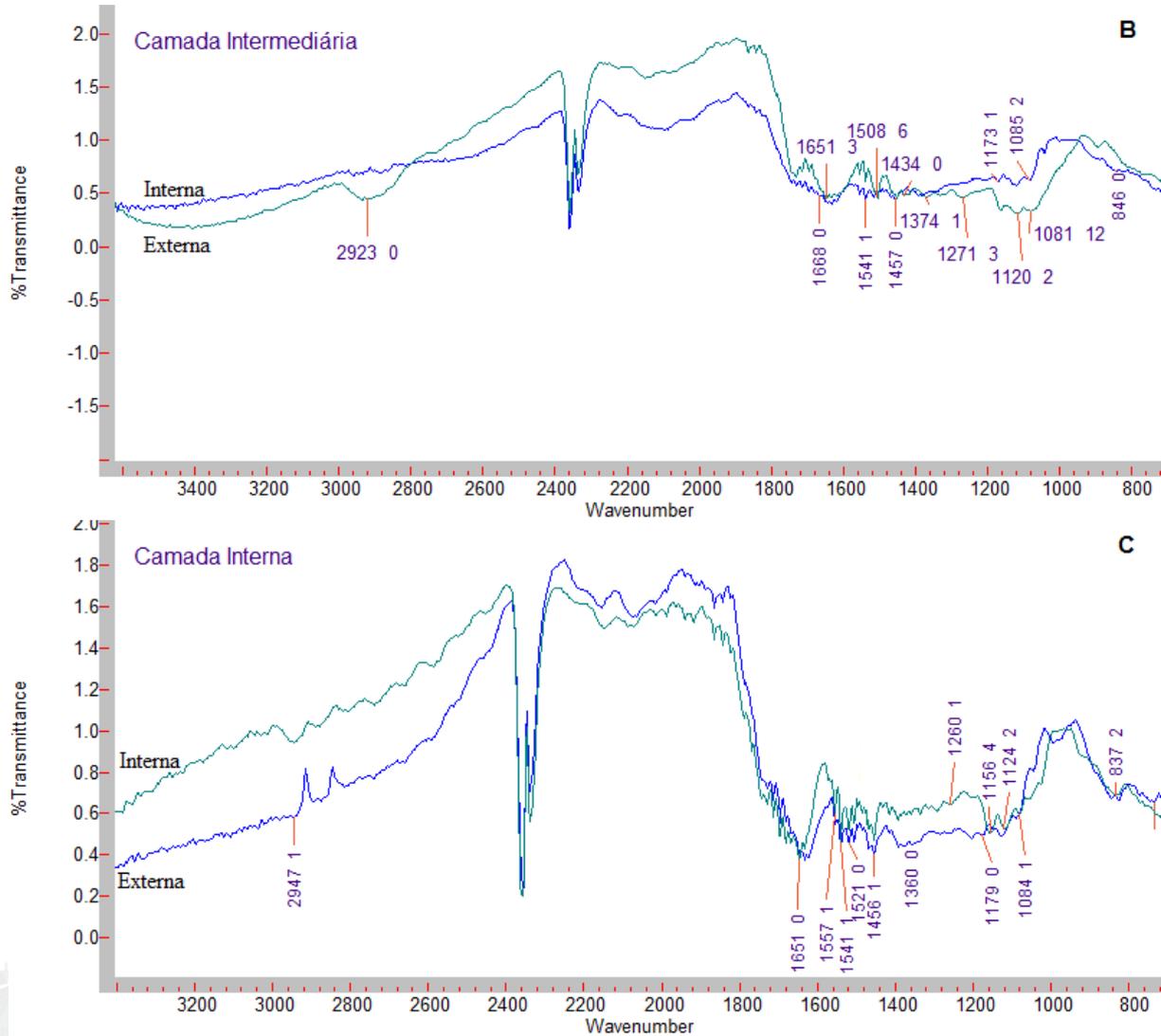


Figura 2. Espectros FT-IR das superfícies externa e interna de cada camada do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia*. A. Camada Externa (exotesta). B. Camada intermediária (mesotesta). C. Camada interna (endotesta).

3.3 Microscopia Epifluorescente

O teste de fluorescência indicou a presença de lignina em todas as camadas do tegumento corroborando com os resultados encontrados anteriormente.

A exotesta é formada por células isodiamétricas de paredes espessas, revestida por uma cutícula. Observa-se a autofluorescência da lignina na exotesta, 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 3A-3B). A mesotesta, em seção transversal, apresenta três tecidos distintos. A autofluorescência da lignina na parede celular é mais marcante no primeiro tecido quando comparado aos demais tecidos da mesotesta (Figura 3C-3D). E, a endotesta, em seção transversal, é formada por dois tecidos. A autofluorescência da lignina não apresentou diferença entre os dois tecidos (Figura 3E-3F).

REALIZAÇÃO



APOIO



ORGANIZAÇÃO





III CBCTEM

Congresso Brasileiro de Ciência
e Tecnologia da Madeira
Florianópolis - 2017

A estrutura anatômica do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia* apresenta algumas similaridades com o tegumento de *Araucaria mirabilis*, espécie de conífera extinta da Patagônia (STOCKEY, 1975).

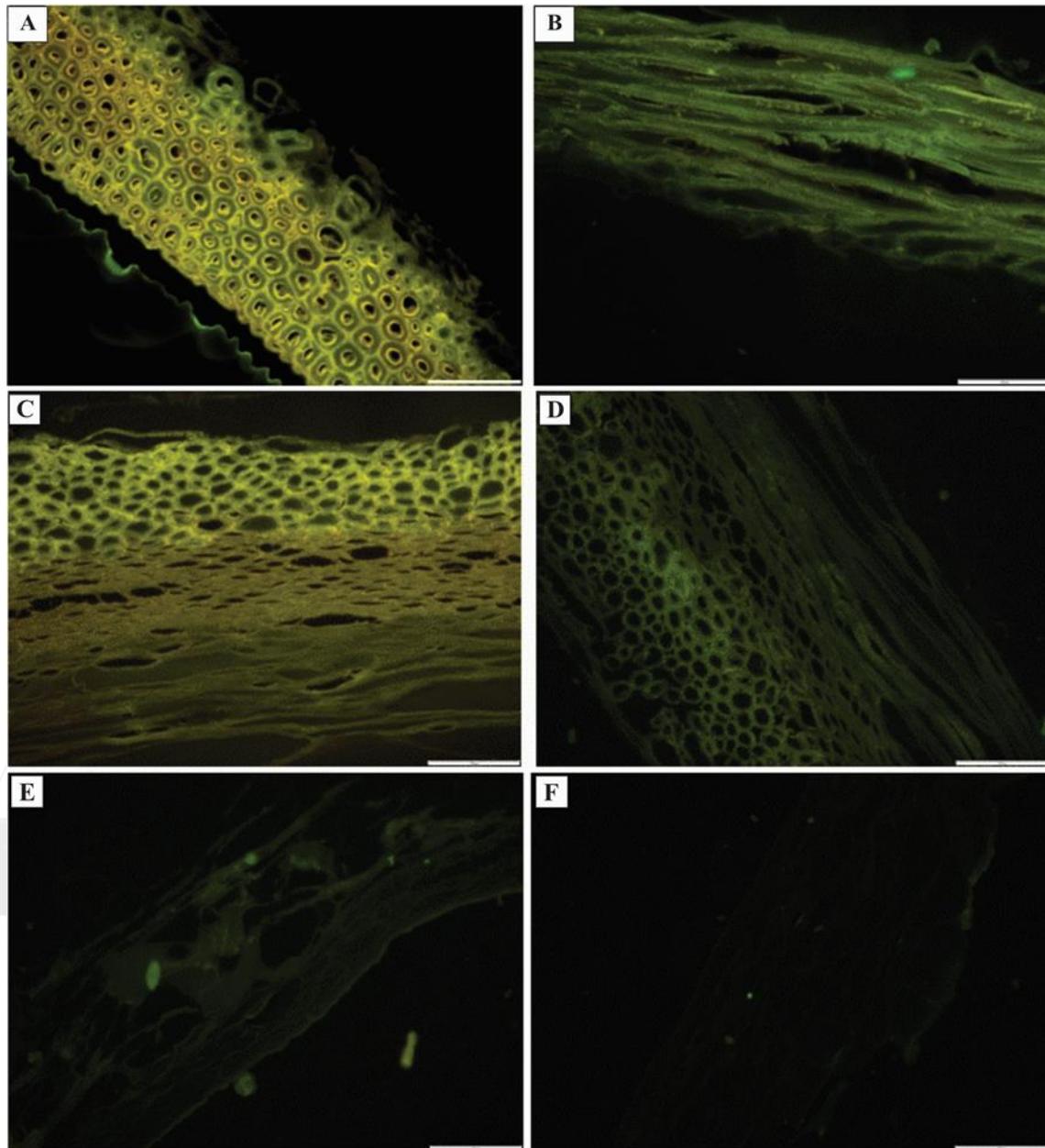


Figura 3. Fotomiografias das três camadas do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia* evidenciando a autofluorescência da lignina. A. Camada externa transversal. B. Camada externa longitudinal. C. Camada intermediária transversal. D. Camada intermediária longitudinal. E. Camada interna transversal. F. Camada interna longitudinal.

4. CONCLUSÃO

A exotesta foi a camada que apresentou o maior teor de holocelulose e de lignina de Klason. A concentração da lignina, na exotesta e mesotesta, é maior na lamela média. A lignina encontrada nas três camadas foi identificada como sendo do tipo G.

REALIZAÇÃO



APOIO



ORGANIZAÇÃO





III CBCTEM

Congresso Brasileiro de Ciência
e Tecnologia da Madeira
Florianópolis - 2017

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, H. S.; CARVALHO, A. M.; MONTEIRO, M. B. O.; PEREIRA, R. P. W.; SILVA, H. R.; SOUZA, K. C. A.; AMPARADO, K. F.; CHALITA, D. B. Métodos de análise em química da madeira, FLORESTA E AMBIENTE, p. 01-20, 2006.

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.

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.

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.

HANSTED, A. L.S.; NAKASHIMA, G. T.; MARTINS, M. P.; YAMAJI, F. M. Caracterização Físico-Química da Biomassa de *Leucaena leucocephala* para Produção de Combustível Sólido. REVISTA VIRTUAL DE QUÍMICA, v.8, n.5, 2016.

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

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

KUBO, S.; KADLA, J. F. Hydrogen Bonding in Lignin: A Fourier Transform Infrared Model Compound Study. BIOMACROMOLECULES, v. 6, n. 5, p. 2815-2821, 2005.

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

SILLS, D. L.; GOSSETT, J. M. Assessment of commercial hemicellulases for saccharification of alkaline pretreated perennial biomass. BIORESOURCE TECHNOLOGY, v. 102, n. 2, p. 1389-1398, 2011.

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.

STOCKEY, R. A. Seeds and embryos of *Araucaria mirabilis*. AMERICAN JOURNAL OF BOTANY, v. 62, n. 8, p.856-868, 1975.

REALIZAÇÃO



APOIO



ORGANIZAÇÃO





III CBCTEM

Congresso Brasileiro de Ciência
e Tecnologia da Madeira
Florianópolis - 2017

TACO 4a. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. Versão IV. Campinas-SP: NEPA-UNICAMP, 2011. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco/tabela.php?ativo=tabela>. Acesso em Setembro 2016.

TOBIMATSU, Y.; CHEN, F.; NAKASHIMA, J.; ESCAMILLA-TREVIÑO, L. L.; JACKSON, L.; DIXON, R. A.; RALPH, J. Coexistência mas independência biossintética dos polímeros Catechyl e Guaiacyl/Syringyl em tegumento de sementes. THE PLANT CELL, v.25, p. 2587-2600, 2013.

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

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.



REALIZAÇÃO



APOIO



ORGANIZAÇÃO

