Distribuição espacial da lignina na parede celular da madeira de *Eucalyptus grandis*

Spatial distribution of lignin content in the cellular wall
of *Eucalyptus grandis* wood

Milene Teixeira de Souza¹, José Tarcísio Lima¹, Claudinéia Olímpia de Assis¹,
Bruno Charles Soares¹, Lidiane Costa Lima¹ e Silvino Intra Moreira

RESUMO

A lignina é um importante componente da parede celular que contribui para impermeabilização de elementos condutores do xilema, confere enrijecimento da célula, conformação física do vegetal, resistência à compressão no lenho e também apresenta grande importância na indústria energética. Sabe-se que há diferenças no conteúdo de lignina entre as madeiras normal e de reação, contudo, sua distribuição na parede celular é pouco conhecida. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi analisar a distribuição espacial do conteúdo de lignina na parede celular das fibras dos lenhos normal e de reação em *Eucalyptus grandis*. Para isso, foram utilizadas duas árvores com 28 anos de idade, sendo uma com tronco ereto e outra com tronco inclinado. Discos de 5 cm de espessura, foram retirados a 1,30 m de distância do solo (DAP) e a 25% da altura total da árvore, a partir deles foram analisados os lenhos normal, de tração e oposto. Amostras de madeira foram retiradas desde a medula até a casca, das quais foram confeccionados cortes histológicos, utilizados para análise no microscópio laser confocal. As amostras foram retiradas em três posições radiais: interna, intermediária e externa, para cada um dos lenhos. O lenho de tração apresentou intensidade do sinal de fluorescência 40% menor em relação ao lenho normal. Não foi observado um padrão de variação da intensidade de fluorescência da lignina no sentido medula-casca. Não houve diferença estatística na intensidade da lignina entre as duas alturas amostradas. Nos lenhos analisados, as regiões da lamela média e do canto celular apresentaram maior intensidade de fluorescência da lignina.

Palavras-chave: Fluorescência; microscopia laser confocal; lenho de reação.

ABSTRACT

Lignin is an important component of the cell wall that contributes to the waterproofing of xylem conducting elements, which contribute to the cell stiffness, physical conformation of the plant, resistance to compression in the wood, and it is also of great importance for the energy industry. It is known that there are differences in the lignin content between normal and reaction wood; however, its distribution in the cell wall is little known. In this context, the aim of this work was to analyze the spatial distribution of lignin content in the cell wall of normal and of reaction wood fibers of *Eucalyptus grandis*. Two 28-year-old trees were used in this study, one tree with erect trunk and another with inclined trunk. 5 cm thick discs were removed at 1.30 m from the soil (DBH) and at 25% of the trees total height; from which the normal wood was analyzed, the reaction wood and the wood opposed to it. Samples of the wood were collected from the pith to bark in three positions: internal, intermediate and external, from which histological sections were prepared and used for analysis in the confocal laser microscope. The tensile wood showed a 40% lower fluorescence signal intensity than the normal wood. A pattern of variation of lignin fluorescence intensity in the pith to bark direction was not observed. There was no statistical difference in the lignin intensity between the two heights sampled. In the woods analyzed, the middle lamella and cell corner regions showed higher lignin fluorescence intensity.

Keywords: Fluorescence; laser confocal microscopy; reaction wood.

INTRODUÇÃO

A parede celular, formada principalmente por lignina, hemiceluloses e celulose organizadas sistematicamente em parede primária e secundária, constituem a estrutura das fibras, que por sua vez conferem à madeira excelente comportamento mecânico.

1. Departamento de Engenharia Floresta, Universidade Federal de Lavras – UFLA. Lavras / MG, Brasil. * Autor correspondente: tsmilene@gmail.com

A lignina é um dos principais componentes da parede celular das fibras, que contribui para impermeabilização de elementos condutores do xilema, confere resistência à compressão no lenho, enrijecimento da célula e conformação física do vegetal (DONALDSON, 2001). Ela também tem papel relevante ao formar ligações químicas com as hemiceluloses, atuando como uma ponte ou adesivo e garantindo a consistência entre a matriz e as microfibrilas de celulose (MESHITSUKA et al., 1982).

Comercialmente, a lignina tem grande importância para a indústria energética, pois maiores teores resultam em carvão vegetal de melhor qualidade, com maior densidade aparente e maior poder calorífico, resultando em melhores propriedades físico-mecânicas (GOUVÊA et al., 2015). Devido à complexidade estrutural da molécula de lignina, sua degradação ocorre muito lentamente durante a carbonização da madeira enquanto a celulose e hemicelulose se degradam rapidamente. O conteúdo de lignina é um fator importante para a produção de carvão vegetal considerando a taxa de degradação dos componentes da madeira e o rendimento da carbonização (GOUVÊA et al., 2015).

A distribuição da lignina dentro da parede celular, em suas paredes primária e secundária, é pouco conhecida, porém sabe-se que, no lenho de tração, ocorre redução no teor de lignina da parede celular das fibras (CÔTÉ et al., 1966; DONALDSON, 2001).

O lenho de reação é formado a partir da reorientação do tronco ou ramos ao tentarem retornar a posição original após sofrerem esforços mecânicos. O lenho de reação formado na parte inferior do caule inclinado de ginmosperma é chamado de lenho de compressão e em angiospermas o lenho de reação é formado na parte superior do tronco inclinado, sendo denominado lenho de tração. Este tecido permite que a árvore ajuste continuamente sua posição às múltiplas perturbações que ocorrem durante toda a sua vida (GHISLAIN; CLAIR, 2017). Sua formação pode ser influenciada por fatores como clima, topografia, copa assimétrica e a massa dos galhos (MATTHECK; KÜBLER, 1998; MONTEIRO et al., 2010). O lenho de reação apresenta características físicas, anatômicas e químicas diferenciadas em relação ao lenho normal (YOSHIZAWA et al., 2012).

A parede celular do lenho de tração é frequentemente caracterizada pela presença da camada gelatinosa, embora não obrigatoriamente todo lenho de tração apresente a camada G (QIU et al., 2008; RUELLE et al., 2010; WASHUSEN et al., 2003). Análises anatômicas realizadas por Clair et al. (2006) com 21 espécies tropicais, demonstraram ausência da camada G em 14 dessas espécies.

Quando ocorre a formação da camada gelatinosa nas fibras do lenho de tração, estas apresentam a parede secundária com maior teor de celulose e menor teor de lignina na parte interna da parede celular (YOSHIZAWA et al., 2012; 2000).

O lenho de tração também pode apresentar características anatômicas diferenciadas, como diminuição da frequência de vasos (JOUREZ et al., 2001), fibras mais longas e mais finas, que apresentam parede celular mais espessa e menor lume (JOUREZ et al., 2001; YOSHIZAWA et al., 2000). No lenho de tração as fibras são geralmente mais achatadas, fazendo com que a lamela média possua menor área (BOWLING; VAUGHN, 2008).

Neste contexto, o presente estudo busca fornecer informações detalhadas sobre a distribuição da lignina na parede celular, bem como conhecer o comportamento dessas características os para diferentes tipos de formações de madeira, de modo a contribuir para a melhoria na interpretação do comportamento de suas propriedades, pois pouco conhecimento é disponível até o momento, principalmente em *Eucalyptus*.

Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a distribuição espacial do conteúdo de lignina na parede celular das fibras dos lenhos normal e de reação de *Eucalyptus grandis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Procedência e coleta do material

Para realização deste estudo foram utilizadas árvores de *Eucalyptus grandis* com 28 anos de idade, provenientes da empresa Vallourec Florestal Ltda, localizada no município de Paraopeba, Minas Gerais.

Duas árvores foram selecionadas, sendo uma com tronco ereto e uma com tronco inclinado. A altura e o diâmetro à altura do peito (DAP) foram mensurados, estando essas medidas dispostas na Tabela 1. As árvores foram abatidas e, posteriormente, de cada tronco, foi retirado um disco de aproximadamente 5 cm de espessura a 1,30 m de distância do solo (DAP) e outro a 25% da altura total da árvore. No sentido medula-casca de cada disco foram marcadas as posições de onde foram retiradas as amostras para determinação da distribuição de lignina na parede celular.

Tabela 1. Diâmetro e altura das árvores de *Eucalyptus grandis*.

Table 1. Diameter and height of *Eucalyptus grandis* trees.

Árvore	DAP (cm)	Altura total (m)	Inclinação (°)
Ereta	29,97	24,10	-
Inclinada	32,52	23,40	12,4

A determinação da lignina pela microscopia laser confocal foi realizada para o lenho normal (árvore ereta) e lenho de reação (árvore inclinada), identificado pela excentricidade da medula. As amostras foram retiradas em três posições radiais: interna (próximo a medula), intermediária e externa (próximo a casca), para cada um dos lenhos, normal e de reação (lenho de tração e oposto a tração). Totalizando 18 amostras para a análise de fluorescência.

Microscopia laser Confocal

Para análise da distribuição da lignina no microscópio laser confocal, foram utilizados cortes transversais de 7 µm de espessura retirados nas três posições de amostragem no sentido medula-casca, preparados em micrótomo de deslize. Após essa etapa, os cortes foram colocados em lâmina de vidro e corados com auramina (1%) por 20 minutos. Os cortes foram examinados em microscópio laser confocal modelo LSM 780 Zeiss Observer Z.1, com o software Zen 2012.

As imagens foram geradas a partir da sobreposição de 7 planos focais ao longo do eixo Z (Z-stack), para cada posição analisada. Para determinação da intensidade de fluorescência da lignina marcada com auramina, foram realizadas 20 medições em três imagens geradas para cada posição medula-casca, através do software Image J, utilizando o parâmetro "INT DEN".

A medição da intensidade da lignina foi feita através da fórmula adaptada de Fernando et al. (2015): Intensidade de lignina = Densidade integrada - (área selecionada x intensidade do background).

Para comparação dos lenhos quanto à intensidade de fluorescência da lignina foi aplicado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis a 1% de probabilidade de erro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 pode ser observada a intensidade de fluorescência da lignina marcada com auramina em diferentes regiões da parede das fibras dos lenhos normal, e de reação (lenho tração e lenho oposto) de *E. grandis*.

Figura 1. Imagem de fluorescência da lignina nos lenhos normal (A), lenho de tração (B) e lenho oposto (C) de *Eucalyptus grandis*. A lamela média (LM) e canto celular (CC) indicados pela seta apresenta maior intensidade de fluorescência.

Figure 1. Fluorescence image of lignin in normal (A), tension (B) and opposite wood (C) of *Eucalyptus grandis*. The mean lamella (LM) and cell corner (CC) indicated by the arrow show a higher fluorescence intensity.

Observou-se visualmente na Figura 1 que a espessura da parede celular da fibra do lenho de tração da madeira de *E. grandis* em algumas regiões é maior e que o diâmetro do lume é menor quando comparado com o lenho normal. Pode ser observado também que o lenho de tração apresenta fibras mais achatadas e nessa região ocorre menor concentração da lignina, representada pela menor intensidade de sinal, estando estes resultados em acordo com Bowling e Vaughn (2008), onde relatam que no lenho de tração as fibras são geralmente mais achatadas, fazendo com que a lamela média possua menor área.

A maior intensidade de sinal, ou seja, a maior concentração de lignina pode ser observada no canto celular e na lamela média, o que corrobora com afirmativa de Fromm et al. (2003), que, trabalhando com microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, observaram que a lignina ocorre em concentrações elevadas na lamela média, e que na transição entre a camada S1 e S2 ocorre aumento da concentração de lignina.

Mizrachi et al. (2015) estudando clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus Urophylla* com quatro anos de idade, relataram que o lenho de tração possui anatomia diferenciada em relação ao lenho oposto. Essas alterações relatadas no lenho de tração tratam-se das características das fibras que se apresentam mais longas e mais finas (JOUREZ et al., 2001; YOSHIZAWA et al., 2000), possuindo parede celular mais espessa e menor lume quando comparado com lenho normal ou oposto (JOUREZ et al., 2001; RUELLE et al., 2006). Segundo Bowling e Vaughn (2008), os vasos e as fibras são geralmente mais compactos no lenho de tração, fazendo com que a lamela média possua menor superfície, com isso tendo menor concentração de lignina.

Analisando as imagens contidas na Figura 1, pode-se verificar que no lenho de tração a intensidade do sinal é reduzida mesmo nas regiões da lamela média e canto celular, quando comparado com os lenhos normal e o oposto ao de tração. Essa redução pode estar associada, além da diminuição da área da lamela média, a presença da camada G, no entanto através da técnica de microscopia laser confocal não foi possível a visualização da camada gelatinosa e de acordo com os autores Qiu et al. (2008) e Ruelle et al. (2010), o lenho de tração é frequentemente relatado pela presença de fibras gelatinosas, denominada camada G, que apresenta baixo conteúdo de lignina e alto conteúdo de celulose, mas nem sempre a camada G está presente no lenho de tração, e pode variar entre e dentro das árvores de espécies angiospermas.

Gierlinger e Schwanninger (2006), em estudo com as espécies *Populus nigra* e *Populus deltoids*, através da microscopia confocal, identificaram pela intensidade de lignina, através das camadas da parede celular, que o teor de lignina na camada G é mínimo chegando a quase zero. Donaldson (2001) encontrou alto teor de celulose e baixo conteúdo de lignina e formação de camada gelatinosa no lenho de tração de *Populus nigra*.

A quantificação relativa da distribuição de lignina nas posições interna, intermediária e externa para os lenhos normal, de tração e oposto a tração foi realizada nas imagens geradas por microscopia laser confocal. Na Figura 2, são apresentados os valores médios de intensidade da lignina nas diferentes posições para cada lenho. Observando o comportamento das barras, não foi possível identificar um padrão de variação da intensidade de fluorescência no sentido medula-casca. Entretanto, de acordo com a Tabela 2, houve diferença significativa ao nível de 1%, para a intensidade de fluorescência da lignina entre os lenhos.

Figura 2. Variação radial da intensidade de fluorescência de lignina marcada por auramina para os lenhos normal, de tração e oposto da madeira de *E. grandis*.

Figure 2. Radial variation of the fluorescence intensity of auramine labeled lignin for normal, traction and opposite wood of *E. grandis* wood.

Tabela 2. Médias da intensidade de lignina para os lenhos normal, de tração e oposto de *E. grandis*.

Table 2. Mean of lignin intensity for normal, traction and opposite woods of *E. grandis*.

Árvore	Lenho	Média
Ereta	Normal	117,31 A
Inclinada	Tração	47,71 B
	Oposto	106.46 A

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Kruskal-Wallis ao nível de 1%.

O lenho de tração apresentou menor média de intensidade de fluorescência em comparação com os lenhos normal e oposto ao lenho de tração, de acordo com o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ao nível de 1% de significância (Tabela 2).

A menor intensidade de lignina observada no lenho de tração pode estar associada ao menor conteúdo de lignina nas regiões onde as células encontram-se achatadas e muito juntas, comprimindo e diminuindo a região da lamela média e o canto celular. A intensidade no lenho de tração foi 40% menor em relação ao lenho normal. Estes resultados corroboram com o estudo realizado por Mizrachi et al. (2015), com clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* com 4 anos de idade, que demonstrou redução de 30% no teor de lignina no lenho de tração em relação ao lenho normal.

CONCLUSÕES

O lenho de tração apresentou menor intensidade de fluorescência da lignina em relação aos lenhos normal e o oposto a tração.

Tanto no lenho normal quanto no lenho de tração, as regiões da lamela média e do canto celular apresentaram maior intensidade de fluorescência da lignina, mostrando que nesses locais a concentração de lignina é maior do que nos demais.

Em algumas regiões do lenho de tração as células apresentaram achatamento e diminuição da lamela média.

Não foi possível identificar um padrão de variação da intensidade de fluorescência da lignina no sentido medula-casca.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOWLING, A. J.; VAUGHN, K. C. Immunocytochemical characterization of tension wood: gelatinous fibers contain more than just cellulose. **American Journal of Botany**, v. 95, n. 6, p. 655-663, 2008.

CLAIR, B.; RUELE, J.; BEAUCHÊNE, J.; PRÉVOST, M.F.; FOURNIER, M. Tension wood and opposite wood in 21 tropical rain forest species: occurrence and efficiency of the G-layer. **International Association of Wood Anatomists Journal**, v. 27, n. 3, p. 329-338, 2006.

CÔTÉ, W. A.; TIMELL, T. E.; ZABEL, R. A. Studies on compression wood I. Distribution of lignin in compression wood of red spruce (*Picea rubens* Sarg.). **Holz Roh-Werkstoff**, v. 24, p. 432-438, 1966.

DONALDSON, L. A. Lignification and lignin topochemistry – an ultrastructural view. **Phytochemistry**, v. 57, n. 6, p. 859-873, 2001.

FERNANDO, C.; AUDIBERT, A.; SIMON, F.; TAZI, J.; JUGE, F. A Role for the Serine/Arginine-Rich (SR) Protein B52/SRSF6 in Cell Growth and Myc Expression in *Drosophila*. **Genetics**, v. 199, p. 1201-1211, 2015.

FROMM, J.; ROCKEL, B.; B.S.; LAUTNER, S.; WINDEISEN, E.; G. WANNER, Lignin distribution in wood cell walls determined by TEM and backscattered SEM techniques. **Journal of Structural Biology**, v. 143, p. 77-84, 2003.

GHISLAIN, B.; CLAIR, B. Diversity in the organisation and lignification of tension wood fibre walls – A review. **IAWA Journal**, v. 38, n. 2, p. 245-265, 2017.

GIERLINGER, N.; SCHWANNINGER, M. Chemical Imaging of Poplar Wood Cell Walls by Confocal Raman Microscopy. **Plant Physiology**, v. 140, p. 1246-1254, 2006.

GOUVÊA, A.F.G.; TRUGILHO, P. F.; ASSIS, C. O. ; ASSIS, M.R.; COLODETTE, J. L.; GOMES, C. M. Avaliação do Efeito da Relação Siringila/Guaiacila da Lignina de Eucalipto na Produção de Carvão Vegetal. **Ciência da Madeira**, v. 6, p. 71-78, 2015.

JOUREZ B, RIBOUX A, LECLERCQ A. Anatomical characteristics of tension wood and opposite wood in young inclined stems of poplar (*Populus euramericana* cv „Ghoy”). **IAWA Journal**, v. 22, p. 133–157, 2001.

MATTHECK C, KÜBLER H. Wood - the internal optimization of trees. Berlin: **Springer Verlag**, v. 1, 129 p. 1998.

MESHITSUKA, G.; LEE, Z. Z.; NAKANO, J.; EDA, S. Studies on the nature of lignin-carbohydrate bonding. **Journal Wood Chemistry Technology**, v. 2, p. 251–267, 1982.

MIZRACHI, E.; MALONEY, V. J.; SILBERBAUER, J.; HEFER, C. A.; BERGER, D. K.; MANSFIELD, S.; MYBURG, A. A. Investigating the molecular underpinnings underlying morphology and changes in carbon partitioning during tension wood formation in *Eucalyptus*. **New Phytologist**, v. 206, p. 1351–1363, 2015.

MONTEIRO, T. C.; SILVA, R. V.; LIMA, J. T.; BARAÚNA E. E. P.; CARVALHO, D. M.; LIMA, M. T. Influência do lenho de tração nas propriedades físicas da madeira de *Eucalyptus* sp. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 1, n. 1, p. 6-11, 2010.

QIU, D.; WILSON, I.W. GAN, S.; WASHUSEN, R.; MORAN, G.F.; SOUTHERTON, S.G. Gene expression in *Eucalyptus* branch wood with marked variation in cellulose microfibril orientation and lacking G-layers. **New Phytologist**, v. 179, p. 94–103, 2008.

RUELLE, J.; BEAUCHÊNE, J.; YAMAMOTO, H.; THIBAUT, B. Variations in physical and mechanical properties between tension and opposite wood from three tropical rainforest species. **Wood Science and Technology**, v. 45, p. 339-537, 2010.

RUELLE, J.; YOSHIDA, M.; CLAIR, B.; THIBAUT, B. Tension wood and opposite wood in 21 tropical rain forest species 2. Comparison of some anatomical and ultrastructural criteria. **IAWA Journal**, v. 27, p. 341–376, 2006.

WASHUSEN, R.; ILIC, J.; WAUGH, G. The relationship between longitudinal growth strain, tree form and tension wood at the stem periphery of ten- to eleven-year-old *Eucalyptus globulus* labill. **Holzforschung**, v. 57, p. 308–316, 2003.

YOSHINAGA, A.; KUSUMOTO, H.; LAURANS, F.; PILATE, G.; TAKABE, K. Lignification in poplar tension wood lignified cell wall layers. **Tree Physiology**, v. 32, p. 1129–1136, 2012.

YOSHIZAWA, N.; INAMI, A.; MIYAKE, S.; ISHIGURI, E.; YOKOTA, S. Anatomy and lignin distribution of reaction wood in two *Magnolia* species. **Wood Science and Technology**, v. 34, p. 183–196, 2000.

Recebido em: 17/11/2017

Aceito em: 06/08/2018