

Compositional Analysis by Infrared Spectroscopy of the Lignin of *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake Treated with Growth Regulators Análise composicional por Espectrometria de Infravermelho da Lignina de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake Tratados com Reguladores de Crescimento

Títulos abreviados:

Compositional Analysis of the Lignin of *Eucalyptus urophylla* Treated with JA e 2,4-D

Análise Composicional da Lignina de *Eucalyptus urophylla* Tratados com AJ e 2,4-D

Maria Beatriz de Oliveira Monteiro^{1*} ; Regina Paula Willemen Pereira^{2*};
Heber dos Santos Abreu^{3*}

ABSTRACT

This work comes to contribute with relevant aspect of the lignification, the possibility of change compositional of the lignin for the several uses of the wood in the forest section. The synthesis of the lignin can be affected by several factors abiotic and biotic, being one of those factors the growth regulators, that act as indicator molecules in the plant. Being the growth regulators an interference factor in the lignification, give relevance, in that work, to two important classes of plant hormones: auxins and jasmonates. To verify the performance of those in the relationship compositional of the units of lignin in *Eucalyptus urophylla*, the jasmonic acid (AJ) and the 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) were used , both with role in the physiology, growth and development of the plant. The applications of those isolated and combined regulators were initiate 90 days after sowing, being nine treatments with five repetitions each one. The obtained results were analyzed by infrared spectroscopy. The spectra showed that there were not changes relevant compositional. However, there was a small alteration, in all of the treatments (J2, A1, A2, J1A1, J1A2, J2A1 and J2A2) where it was shown that the relationship guaiacyl/siringyl (G/S) it was lightly above the control (H₂O), except for J1 that showed inferior relationship to the control. This takes us inside to propose that any one of these treatments didn't affect the phase of the first stage of formation of the lignin of the cytoplasmatic compartment. The jasmonic acid and the 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid can activate or to inhibit the phase of polymerization of the lignin depending on the used concentration.

Keywords: lignin, *Eucalyptus urophylla*, jasmonic acid, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid.

* Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ - Instituto de Florestas, Laboratório de Biotecnologia da Madeira

¹ betyka@ufrj.br - Autor para correspondência

² willemen@ufrj.br

³ abreu@ufrj.br

RESUMO

Este trabalho vem contribuir com aspecto relevante da lignificação, a possibilidade de mudança composicional da lignina para os diversos usos da madeira no setor florestal. A síntese da lignina pode ser afetada por diversos fatores abióticos e bióticos, sendo um desses fatores os reguladores de crescimento que atuam como moléculas sinalizadoras na planta. Sendo os reguladores de crescimento um fator de interferência na lignificação, deu-se relevância, nesse trabalho, a duas importantes classes de hormônios vegetais: auxinas e jasmonatos. Para verificar a atuação desses na relação composicional das unidades de lignina em *Eucalyptus urophylla*, foram usados o ácido jasmônico (AJ) e o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ambos com atuação na fisiologia, crescimento e desenvolvimento da planta. As aplicações desses reguladores isolados e combinados foram iniciadas 90 dias após semeadura, sendo nove tratamentos com cinco repetições cada um. Os resultados obtidos foram analisados por espectroscopia do infravermelho. Os espectros revelaram que não houve mudanças composicionais relevantes. Porém, houve uma pequena alteração, em todos os tratamentos (J2, A1, A2, J1A1, J1A2, J2A1 e J2A2) onde foi mostrado que a relação guaiacila/siringila (G/S) foi ligeiramente acima do controle (H₂O), com exceção do J1 que apresentou relação inferior ao controle. Isto leva-nos a propor que qualquer um destes tratamentos não afetou a fase do primeiro estágio de formação da lignina dentro do compartimento citoplasmático. O ácido jasmônico e o ácido 2,4-diclorofenoxiacético podem ativar ou inibir a fase de polimerização da lignina dependendo da concentração utilizada.

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

INTRODUÇÃO

A lignina representa a segunda mais abundante biomacromolécula da biosfera sendo superada apenas pela celulose. É uma classe de biomacromoléculas complexas, de estrutura tridimensional embebida na parede celular de células especializadas, representando um importante papel no crescimento e desenvolvimento da planta (ROGERS; CAMPBELL, 2004).

A evolução molecular da lignina parte da premissa que este material apresenta características peculiares, por ter composição enzimaticamente dependente e também por ser uma biomacromolécula oxi-dependente, estável, hidrofóbica, fundamentalmente aromática e de alto peso molecular, contribuindo para a estabilidade e o aumento da rigidez do sistema multi-molecular da parede celular, que evolutivamente se associa às características fenotípicas das plantas superiores (LEWIS; SARKANEN, 1998; MONTEIRO, 2009).

A classificação atual divide as ligninas em duas classes principais: lignina guaiacila (tipo G) e lignina guaiacila-siringila (tipo G-S) com as ligninas cumarila-guaiacila (tipo H-G) e cumarila-guaiacila-siringila (tipo H-G-S), sendo subclasses das ligninas tipo G e G-S, respectivamente (PEREIRA et al. 2012).

A lignificação é um processo que sempre esteve intrinsecamente ligado à evolução dos tecidos vasculares, ocorrendo predominantemente em células de quase todos os órgãos, mais abundantemente em caules e raízes (RAES et al., 2003; ROGERS; CAMPBELL, 2004). Pereira et al. (2012) descrevem o processo de lignificação e a diferenciação vascular nas plantas superiores.

Trata-se de macromoléculas de origem fenilpropanoídica com funções de vital importância à sustentação mecânica, característica que provavelmente permitiu a adaptação das plantas aquáticas à vida terrestre (MONTIES, 1989), a condução de água (NORTHCOTE, 1989) e a defesa do vegetal frente a herbívoros e patógenos (VANCE; KIRK; SHERWOOD, 1980). Grande parcela da lignina encontra-se formando ligações cruzadas, ancorando-se aos polissacarídeos da parede celular ou através de fenóis simples e dímeros (NAKASHIMA et al., 1997).

A acumulação, composição e arquitetura molecular da lignina em diferentes táxons provavelmente sofreram modificações ao longo do tempo. Neste contexto, plantas modernas apresentam-se com moderados níveis de acumulação, composição guaiacila/siringila (G/S) e estruturas mais simples. Isso se deve, ao processo oxidativo e a um desenvolvimento enzimático que levaram

a formação de ligninas adaptadas às diversidades ambientais durante milhões de anos, com conseqüente diminuição de gasto energético, menor toxidez e maior atividade antioxidante (GOTTLIEB et al. 1995; WENG; CHAPPLE, 2010).

A arquitetura molecular da lignina tem sido também objeto de estudo em inúmeros trabalhos científicos, aos quais estabelecem propostas estruturais e formação biossintética. Considera-se para os mesmos a existência de um provável controle biológico diferenciado segundo os aspectos inerentes à classe botânica a que o vegetal pertence, a influência genética, aos aspectos espaciais da subestrutura da parede celular, entre outros aspectos.

Dois estádios de formação da lignina são considerados: a formação enzimática e a formação semi-enzimática (ABREU et al., 2010). Sendo a primeira considerada como oxidação horizontal ocorrendo no citoplasma e a segunda oxidação vertical que acontece na parede celular. De modo geral, a complexidade estrutural das ligninas depende das ligações formadas entre as unidades constitucionais (C₆C₃) durante o processo de polimerização (MICIC et al., 2002). A composição é conseqüência da rota biossintética do fenilpropanóide, que leva a formação de precursores intermediários para a formação da lignina.

Na etapa da polimerização da lignina o oxigênio possivelmente atua aumentando os níveis de lignificação da célula. Consideramos o processo de formação da lignina na parede celular é semi-enzimático, à medida que a formação da lignina depende de atuação das oxidases.

Todo este processo de evolução pode ser analisado pelo aumento do grau de metoxilação: álcool cumarílico – álcool coniferílico e álcool sinapílico que em ordem diminui a freqüência de ligações intermonoméricas entre radicais, que é a base do modelo moderno da arquitetura molecular estabelecida após a polimerização (PEREIRA et al. 2012).

A síntese da lignina pode ser afetada por diversos fatores abióticos e bióticos, sendo um desses fatores os reguladores de crescimento que atuam como moléculas sinalizadoras na planta.

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

A regulação do crescimento em plantas é um fenômeno interativo em que

reguladores de crescimento podem atuar sinergisticamente ou antagonicamente em nível de sinalização, concentração e resposta fisiológica ao hormônio (GROSSMANN, 2003).

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

A aplicação exógena de reguladores de crescimento pode esclarecer questionamentos no que se refere à dinâmica dos papéis endógenos dos hormônios vegetais e dessa forma contribuir para o manejo de florestas e de suas finalidades para o produto final (PEREIRA et al. 2011). De acordo com Pereira et al. (2005) há atuação dos fitohormônios durante a formação do lenho.

Os hormônios são substâncias produzidas em uma parte específica do organismo, que atua em baixas concentrações, sobre células específicas em locais diferentes de onde foram produzidas. As mudanças nas respostas a uma determinada quantidade de hormônios também podem ser causadas por alterações nos níveis endógenos de outras substâncias como, por exemplo, substâncias fenólicas, capazes de interagir aumentando ou inibindo a resposta do hormônio. Sendo os hormônios vegetais um fator de interferência na lignificação, deu-se relevância, nesse trabalho, a duas importantes classes de hormônios vegetais: auxinas e jasmonatos. Para analisar a atuação desses foram usados os reguladores de crescimento o ácido jasmônico e o ácido 2,4-diclorofenoxiacético, ambos com atuação na fisiologia, crescimento e desenvolvimento da planta.

A aplicação de reguladores de crescimento em plantas no viveiro pode aumentar sua resistência fisiológica e sua relação com o ambiente. Para que isto cada vez mais se torne realidade tem-se a necessidade de pesquisas no sentido de se obter informações do mecanismo e modo de ação de todos os hormônios com bioatividade em cada componente no processo envolvendo a diferenciação e divisão celular associado com o câmbio e o meristema apical.

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

Assim, objetivou-se verificar as mudanças composicionais nas unidades da lignina em *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake com a utilização de dois reguladores de crescimento: ácido jasmônico e ácido 2,4-diclorofenoxiacético aplicados exogenamente.

MATERIAL E MÉTODOS

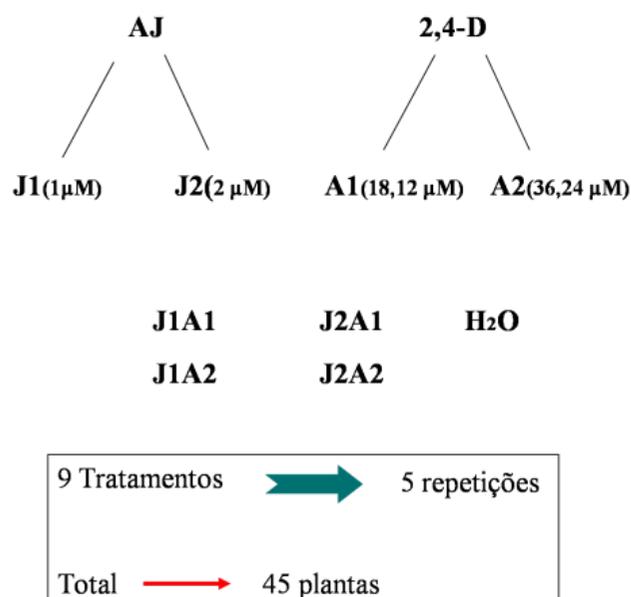
1. Desenvolvimento Experimental

Neste experimento foram utilizadas sementes certificadas de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake adquiridas do IPEF/SP. Foi utilizado substrato (60% de composto orgânico, 20% de argila, 10% de areia e 10% de vermiculita) preparado no Viveiro Florestal do Instituto de Florestas/UFRRJ. Inicialmente foram plantadas em tubetes com capacidade de 53cm³ no Viveiro Florestal, com adubações e tratos silviculturais para o crescimento de plantas sadias. Depois de 80 dias foram transferidas para tubetes com capacidade de 3,8 L e transferidos para Casa de Vegetação do Instituto de Agronomia/UFRRJ onde permaneceram até os seis meses.

Os reguladores de crescimento utilizados foram o ácido jasmônico (AJ) e o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) com duas concentrações para cada regulador de crescimento e a combinação desses reguladores, conforme esquematizado na Figura 1. As concentrações dos reguladores de crescimento e a forma de aplicação utilizados foram inovadores, isto é, não havia referência para o tipo de experimentação proposto nesse trabalho.

As aplicações com os reguladores de crescimento, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e ácido jasmônico (AJ) foram iniciadas 90 dias após semeadura na Casa de Vegetação. As aplicações foram feitas de dez em dez dias, totalizando sete aplicações sempre iniciando às 05h00min.

Figura 1. Esquema mostrando a montagem dos tratamentos com ácido jasmônico e 2,4-D utilizados nas plantas de *Eucalyptus urophylla* S T. Blake



2. Preparação do material livre de extrativos

O caule das plantas com seis meses de idade foram coletados, secos e logo em seguida moídos (cinco plantas por tratamento). Todo material passou por duas peneiras, com malha de 0,177 mm e outra com 0,420 mm. O material lignocelulósico passou por extração sequencial através do uso de ciclohexano (24 hs), acetato de etila (24 hs), metanol (24 hs) em um extrator do tipo Soxhlet, durante 72 h ininterruptas e em seguida, com água por três horas de extração em uma placa de aquecimento a 90 °C.

Após a extração o material solúvel foi concentrado em um evaporador rotatório e em seguida seco, pesado e armazenado em um dessecador contendo anidrido fosfórico. (BROWNING, 1967).

3. Preparação do material livre de proteínas

Transferiu-se 1,5 g de material (tecido livre de extrativo) para erlenmeyer de 250 mL com solução de pepsina (10 g de pepsina para 1000 mL de solução de ácido clorídrico 1 %, esta solução de pepsina não pode ser armazenada), e mantido à temperatura de 40 °C (durante 14 horas) em banho-maria. Depois lavado duas vezes com H₂O destilada quente; uma vez com 12,8 mL de H₂SO₄ (5

%); foi então transferido para um balão com 240 mL de H₂SO₄ (5 %) e refluxado por uma hora. Depois, filtrado em um cadinho de porcelana sob vácuo lavando com 48 mL de H₂O bideionizada quente, e em seguida com 32 mL de etanol por duas vezes e por último com 24 mL de éter por duas vezes. A amostra então foi colocada no dessecador com sílica gel ativada (LIN & DANCE, 1992).

4. Extração da lignina com dioxano

Adicionou-se lentamente, em um balão de 500 mL com duas saídas e contendo amostra de madeira livre de extrativos e proteína total, uma solução de dioxano e H₂O 9:1 + HCl (37% - puro). A mistura reacional foi aquecida em uma chapa de aquecimento a 90-95 °C, em atmosfera de nitrogênio, por um período de 4 horas. Em seguida, esfriada ainda em atmosfera de N₂; filtrada e lavada em um funil de Büchner com 12 mL da mesma solução. O extrato (solução ácida) foi concentrado, em um evaporador rotatório, até o momento em que um material de natureza viscosa apareceu no balão. Precipitou-se este material em 300 mL de H₂O bideionizada sob agitação permanente. O precipitado foi separado por centrifugação, decantação e, em seguida, lavando-o com H₂O, por três vezes. A amostra, em seguida, foi seca em um dessecador com hidróxido de sódio e sílica sob vácuo (LIN; DANCE, 1992).

5. Acetilação

Inicialmente, foi dissolvido 50 mg de lignina em 5 mL de piridina, em seguida, adicionado 5 mL de anidrido acético, na proporção (1:1) e deixado em repouso durante 48 horas. Depois, a lignina foi recuperada, por precipitação, da mistura reacional com éter etílico e centrifugada com este mesmo solvente. Posteriormente, seca a frio no dessecador, com KOH sob pressão reduzida durante três dias (ABREU et al., 2006). A lignina acetilada tem sido a melhor opção para uma diagnose mais precisa quando se trabalha com espectros de acordo com Abreu & Oertel, 1999.

6. Espectroscopia no infravermelho

Os espectros no infravermelho da madeira livre de extrativos e proteína foram efetuados objetivando-se identificar o tipo de lignina presente no material de estudo. Esta análise foi realizada na FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz) no Instituto de Tecnologia em Fármacos de Manguinhos na Central Analítica.

Os espectros foram registrados em aparelho de espectrometria no IV por transformada de Fourier, Perkin-Elmer, utilizando 2 mg de amostra de material lignocelulósico e 200 mg de KBr. Foram observados os principais sinais: 3500 cm^{-1} , $3000\text{-}2980\text{ cm}^{-1}$, 1740 cm^{-1} , 1690 cm^{-1} , 1670 cm^{-1} , 1600 cm^{-1} , 1500 cm^{-1} , 1460 cm^{-1} , 1328 cm^{-1} e 1268 cm^{-1} (BROWNING, 1967). As intensidades foram determinadas através do método de linha base (MARTON; SPARKS, 1967). O sinal foi usado de absorção em 1500 cm^{-1} (vibração do anel aromático), como referência interna por depender menos dos substituintes aromáticos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A espectroscopia na região do infravermelho (IV) é uma técnica de inestimável importância na análise orgânica qualitativa, sendo amplamente utilizada nas áreas de química de produtos naturais, síntese e transformações orgânicas (LOPES; FASCIO, 2004).

Entre as técnicas de análise descritas na literatura, a espectroscopia mostra características interessantes como alta sensibilidade, seletividade, simplicidade mecânica, tempo curto e pequena quantidade de amostra requerida para a análise (HORTLING et al., 1997). O espectro de uma amostra de lignina dá uma visão global de sua estrutura química (GILARRANZ et al., 2001).

No infravermelho a análise das bandas características de determinados grupos funcionais de uma molécula fornece, através de um simples exame do espectro e consulta a tabelas de dados, um conjunto valioso de informações sobre a estrutura da molécula. Esta técnica baseia-se no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula (chamados nesse caso de níveis vibracionais) (BARBETTA; MAGINI, 2007).

Os espectros no infravermelho de madeira de *Eucalyptus urophylla* livre de extrativos e proteínas apresentaram-se com sinais mais largos devido à presença de celulose, hemicelulose e lignina.

Para atribuir os sinais foram utilizadas amostras de lignina de Björkman da planta *Galeziana gorzeana* como referência. As intensidades dos sinais foram determinadas com base no sinal 1500 cm^{-1} , e a razão G/S pelos sinais 1200 cm^{-1} e 1300 cm^{-1} de acordo com o método da linha base, como pode-se verificar através dos tratamentos J1 e o H_2O como controle (Figuras 2 e 3).

Figura 2. Espectro do infravermelho do tratamento J1 do *Eucalyptus urophylla*

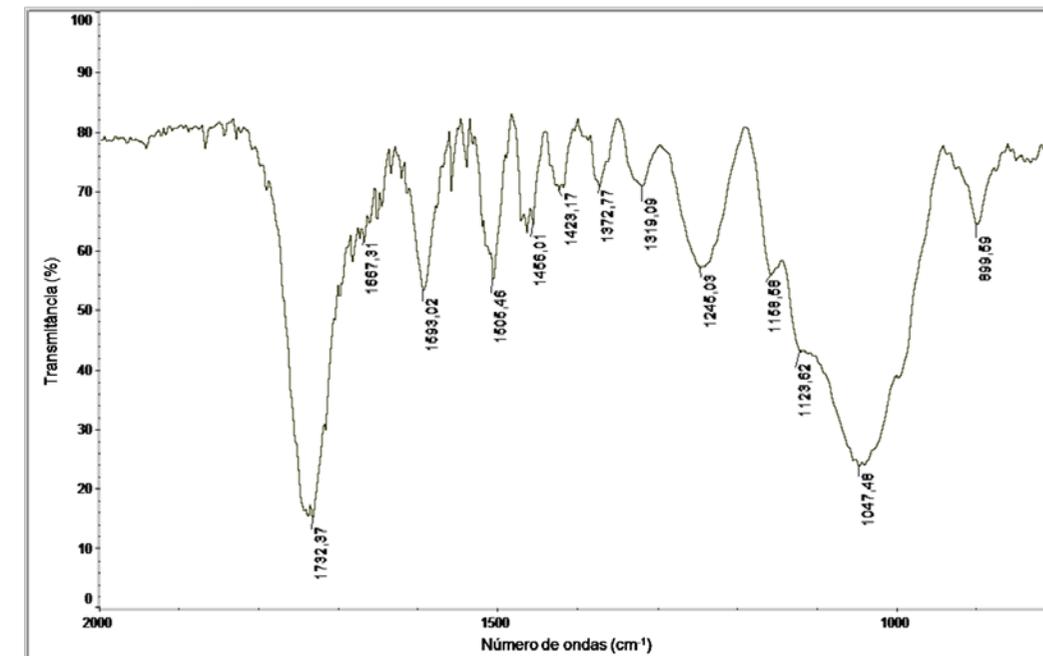
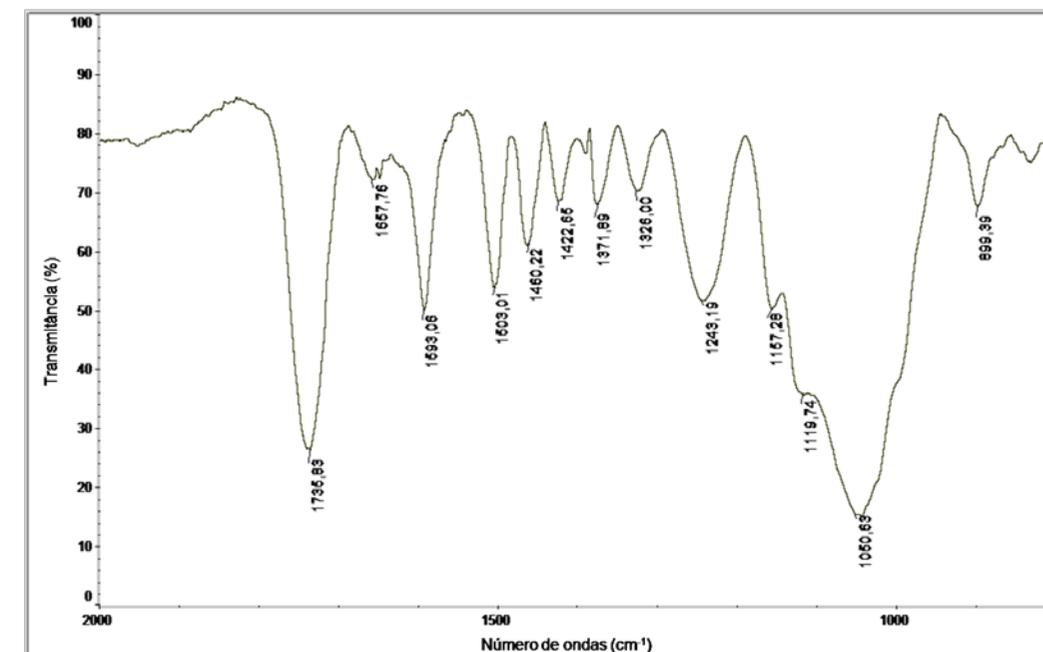


Figura 3. Espectro do infravermelho do tratamento H_2O (controle) do *Eucalyptus urophylla*



De acordo com a Tabela 1 pode-se observar a intensidade dos sinais nos tratamentos do *Eucalyptus urophylla*.

Tabela 1. Atribuição dos sinais no infravermelho das ligninas dos nove tratamentos de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake

Sinal cm^{-1}	Atribuições	J1	J2	A1	A2	J1A1	J1A2	J2A1	J2A2	H2O
1500-1515	Vibração do esqueleto aromático	1505,05	1505,56	1505,25	1503,41	1506,50	1505,73	1502,91	1506,51	1503,01
1315-1330	Respiração do anel siringílico	1319,09	1325,27	1328,06	1326,74	1326,64	1326,02	1327,15	1327,37	1326,00
1240-1270	Respiração do anel guaiacílico	1245,03	1242,03	1243,63	1242,27	1244,20	1241,81	1241,36	1242,27	1243,19

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

Estudos realizados por Ibarra et al. (2005) investigaram as modificações da lignina durante a produção de polpa para papel, as ligninas residuais foram analisadas usando espectroscopia de infravermelho, e comparadas com lignina da madeira de *Eucalyptus globulus* (lignina de madeira moída) e com a lignina kraft isolada de madeira de eucalipto durante cozimento industrial. Os espectros das ligninas residuais apresentaram uma intensidade maior de sinais atribuídos para unidades tipo S (sinal de 1329 cm^{-1}) que para unidades tipo G (sinal de 1270 cm^{-1}). Quando comparado com a lignina de madeira moída de eucalipto, as ligninas residuais não mostraram diferença nas intensidades relativas das bandas trigêmeas de lignina para as faixas de 1515-1421 cm^{-1} e 1594-1609 cm^{-1} . Por comparação, a lignina Kraft mostrou intensidade mais alta à 1505-1515 e 1216-1225 cm^{-1} , e mais baixa intensidade à 1030-1033 cm^{-1} .

Já em nosso estudo com *Eucalyptus urophylla* tratados com a aplicação exógena dos reguladores de crescimento: ácido jasmônico e ácido 2,4-diclorofenoxiacético, os espectros apresentaram os sinais característicos de lignina e não houve mudanças composicionais significativas. Porém, houve uma pequena sinalização, em todos os tratamentos (J2, A1, A2, J1A1, J1A2, J2A1 e

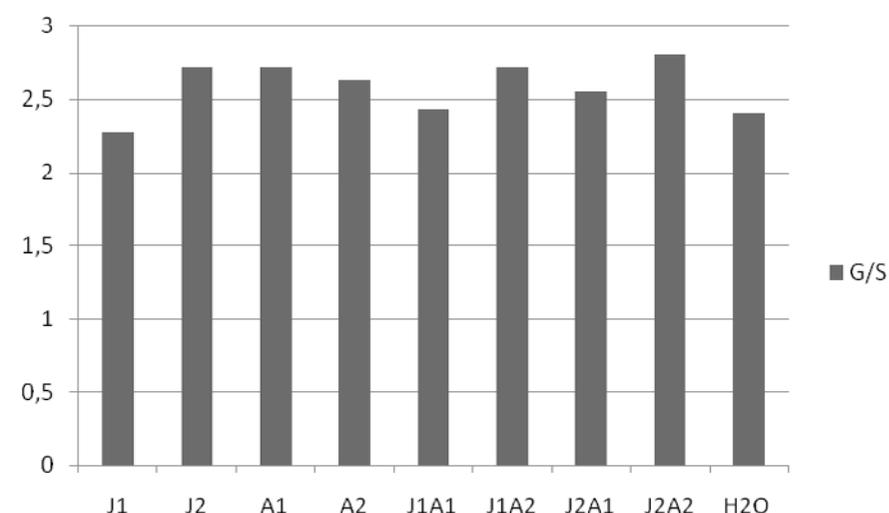
J2A2) onde se apresentaram relação guaiacila/siringila (G/S) ligeiramente acima do controle (H₂O), com exceção do J1 que apresentou relação inferior ao controle.

Entre as biomacromoléculas, a estrutura da lignina tem sido a mais difícil de se caracterizar e até hoje sua estrutura não está completamente definida (CHAKAR; RAGAUSKAS, 2004).

As unidades composicionais (monolignóis) da lignina de angiospermas são siringilas, guaiacilas, e traços da cumarila. Os monolignóis diferem no grau de substituição do anel fenólico pelos grupos metoxílicos nas posições C3 e C5. No caso do álcool cumarílico (estrutura H) estas duas posições são livres, enquanto álcool guaiacílico (estrutura G) e álcool siringílico (estrutura S) é mono- e bissubstituído, respectivamente (LIN, 1992; GOUVEIA et al, 2012).

Através dos espectros do infravermelho foi calculada a relação G/S (guaiacila/siringila) como demonstrado na Figura 4. A composição da lignina não foi alterada relevantemente em nenhum dos tratamentos por essa observação. Apenas foi constatado um leve aumento das unidades guaiacila em relação à siringila nos tratamentos: J2, A1, A2, J1A1, J1A2, J2A1 e J2A2. Sendo que a relação G/S foi decrescente do J2A2 > J1A2 > A1 > J2 > A2 > J2A1 > J1A1. O único tratamento que ficou com a relação menor que o controle (H₂O) foi o J1.

Figura 4. Relação guaiacila/siringila (G/S) nos diversos tratamentos do *Eucalyptus urophylla*



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

De acordo com o método da linha base calculamos através da relação dos picos da vibração do esqueleto aromático (1500-1515 cm^{-1}), respiração do anel siringílico (1315-1330 cm^{-1}) e respiração do anel guaiacílico (1240-1270 cm^{-1}) as concentrações das unidades guaiacilas e siringilas.

O tratamento com a primeira concentração de AJ (J1) ficou com relação menor em relação ao controle (H_2O), mostrando maior porcentagem de unidades siringilas (30,56%) como pode ser observado na Figura 5 em comparação com os outros tratamentos, neste caso, a atuação do ácido jasmônico possivelmente interferiu na proporção dos monômeros da rota biossintética que leva a formação da lignina guaiacila e siringila.

Dos tratamentos conjugados o J1A1 apresentou-se a menor relação G/S, apesar de um pouco acima do controle (H_2O), sugerindo que o efeito sinérgico dos dois reguladores de crescimento, o AJ e o 2,4-D, ocorrendo o mesmo com os outros conjugados.

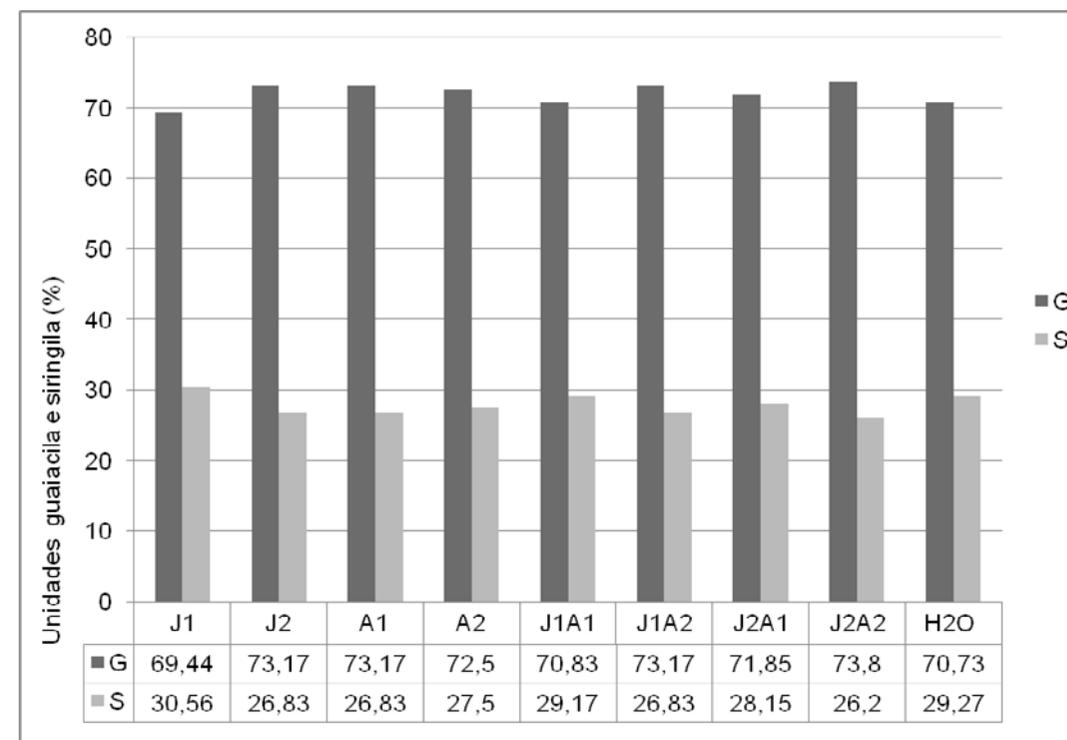
O tratamento J2A2 foi o que teve a maior relação G/S apresentando 73,80 % de unidades guaiacilas e 26,20 % de unidades siringilas. Sinalizando uma resposta positiva na mudança proporcional das unidades de lignina do *Eucalyptus urophylla*. A estrutura da lignina dependendo de sua composição é mais ou menos rígida, de acordo com Pereira et al. (2012) a organização estrutural da lignina contribui extensivamente para as propriedades físicas e mecânicas da madeira, entre outras características. Em angiospermas, a lignina é formada de unidades guaiacila e siringila, com traços de unidades cumarila destacando as ligações β -O-4 que possibilitam maior flexibilidade a biomacromolécula, conferindo diferentes estruturas supramoleculares da lignina na parede celular, Este tipo de ligação predomina nas ligninas de angiospermas, chegando a alcançar até 75 % das ligações existentes. Quanto mais unidades guaiacilas na lignina de *Eucalyptus* mais ligações cruzadas ocorreram na parede celular.

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

De acordo com os sinais 1500-1515 cm^{-1} (vibração do esqueleto aromático), 1240-1270 cm^{-1} (respiração do anel aromático guaiacílico) e 1315-1330 cm^{-1} (respiração do anel aromático siringílico) determinou-se a razão guaiacila/siringila (G/S), conforme Figura 5, a porcentagem de unidade guaiacilas e

siringilas da lignina de cada tratamento, que são os monolignóis constituintes da biomacromolécula da lignina.

Figura 5. Porcentagem de unidades guaiacila(G) e siringilas (S) *Eucalyptus urophylla*



Nota: J1 (1ª concentração de AJ : 1 μM), J2 (2ª concentração de AJ : 2 μM). A1 (1ª concentração de 2,4-D : 18,12 μM), A2 (2ª concentração de 2,4-D : 36,24 μM); J1A1 (combinação da 1ª concentração de AJ com a 1ª concentração de 2,4-D), J1A2 (combinação da 1ª concentração de AJ com a 2ª concentração de 2,4-D), J2A1 (combinação da 2ª concentração de AJ com a 1ª concentração de 2,4-D), J2A2 (combinação da 2ª concentração de AJ com a 2ª concentração de 2,4-D) e H_2O (testemunha).

Em trabalho realizado por She et al. (2010) não foi encontrada nenhuma diferença significativa nas características estruturais principais entre as preparações de lignina de caule de sorgo isoladas com 50% dioxano e isolada com álcali, e estes tratamentos não resultaram em mudanças relevantes na composição da lignina e sua estrutura. Os resultados revelaram que o conteúdo de carboidrato associado nas preparações de lignina obtidas por tratamento com 50 % dioxano e tratamentos alcalinos foram menores que nas frações de lignina isoladas por água quente e DMSO (dimetilsulfóxido), isso indicou que os tratamentos com 50 % dioxano e os álcalis sob tais condições, proporcionaram significativa ruptura dos acoplamentos entre hemiceluloses e ligninas da parede

celular de sorgo, o que tornou possível obter frações de lignina com alta pureza. Os sinais 1327, 1250, e 1227 cm^{-1} são indicativos do anel de respiração tipo siringila e guaiacila, respectivamente.

Em particular, a relação de unidades guaiacila e siringila (relação G/S) em lignina de angiosperma, afeta não somente a eficiência de polpação, mas também a resistência da polpa e papel. Então a espectroscopia do infravermelho é um método simples e seguro para determinar a relação de G/S de materiais lignocelulósicos.

A mudança composicional da estrutura molecular da lignina é um campo de pesquisa em expansão, pois, dependendo da finalidade do produto final desejado pela indústria - papel e celulose, móveis, biocombustíveis, e outros - a arquitetura desta biomacromolécula é desejada de forma a balancear as suas três unidades principais que são siringila, guaiacila e cumarila, para um melhor aproveitamento dos produtos não só beneficiando a própria indústria, como também corroborando com a sustentabilidade. Nesse aspecto, a engenharia genética já tem resultados, e esse trabalho apenas com aplicação exógena de reguladores de crescimento mostrou a possibilidade de se alterar a composição da lignina em *Eucalyptus urophylla* nas condições estabelecidas.

Isto leva-nos a propor que qualquer um destes tratamentos não afetou a fase do primeiro estágio de formação da lignina dentro do compartimento citoplasmático. O ácido jasmônico e o ácido 2,4-diclorofenoxiacético podem ativar ou inibir a fase de polimerização da lignina dependendo da concentração utilizada.

O entendimento do papel desempenhado pelos hormônios naturais ou sintéticos, os chamados reguladores de crescimento, abre uma nova perspectiva na melhoria da qualidade da madeira.

Lembrando que são necessários mais estudos relacionando outras concentrações e/ou outros reguladores de crescimento.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - **CAPES** e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro **FAPERJ** pelo apoio concedido.

REFERÊNCIAS

- 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. **Série Técnica Floresta e Ambiente**, p. 1-20, 2006.
- ABREU, H. S.; MARIA, M. A.; MONTEIRO, M.B.O.; PEREIRA, R.P.W.; SOUZA, K.C.A.; SILVA, H.R.; ABREU, F. A. Evolução da lignina de gimnospermas. KAPPLAN, M.A.C. (Ed.) **Abordagem Quimiosistemática e evolução química de fanerógamas**. 1ª edição, Seropédica, EDUR, 2010.
- BARBETTA, C.M. & MAGINI, M.R. Espectros eletromagnéticos na região do infravermelho: utilização na caracterização de novos materiais. **Anais do X Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba**. 2007.
- BROWNING, B. L. **Methods of wood chemistry**. Interscience Publishers. New York, London, v.1, p. 75-89, 1967.
- CHAKAR, F.S., RAGAUSKAS, A.J., Review of current and future softwood kraft lignin process chemistry. **Industrial Crops and Products**, v.20, p.131–141, 2004.
- GILARRANZ, M.A., RODRIGUEZ, F., OLIET, M., GARCIA, J., ALONSO, V., Phenolic OH group estimation by FT-IR and UV spectroscopy. Application to organosolv lignins. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v.21, p.387–395. 2001.
- GOTTLIEB, R.; BORIN, M.R.D.M.B. & KAPLAN, M.A. .C. Biosynthetic interdependence of lignins and secondary metabolites in Angiosperms. **Phytochemistry**, v.40, p. 99-113, 1995.
- GROSSMANN, K. Mediation of herbicide effects by hormone interactions. **Journal Plant Growth Regulation**, v. 22, p. 109-122, 2003.
- HINOJOSA, G. F. Conceito de Hormônio. In: CID L. P. B. (Ed). **Introdução aos Hormônios Vegetais**. 1ª ed. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Cap. 1, p. 15-53, 2000.
- HORTLING, B., TAMMINEN, T., KENTTA, E. Determination of carboxyl and nonconjugated carbonyl groups in dissolved and residual lignins by IR spectroscopy. **Holzforschung**, v.51, p.405–410. 1997.
- IBARRA, D.; RIO, J. C. D.; GUTIERREZ, A.; RODRIGUEZ, I. M.; ROMERO, J.; MARTINEZ, M. J.; MARTINEZ, A. T. Chemical characterization of residual lignins from eucalypt paper pulps. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v.74, p.116–122, 2005.
- LEWIS, N.G., SARKANEN, S., 1998. **Lignin and lignan biosynthesis**, American Chemical Society. Washington, DC, 436 pp.
- LIN, S. Y. & DANCE, C. W. **Methods in lignin chemistry**, 1ª edição. Springer, Berlim, 1992.
- LJUNG, K., HULL, A. K., KOWALCZYK, M., MARCHANT A., CELENZA, J. , COHEN, G., SANDBERG, G., Biosynthesis, conjugation catabolism and homeostasi of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 249-272, 2002.

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.

MARTON, J. & SPARKS, H. E. Determination of lignin in pulp and paper by infrared multiple internal reflectance. **Tappi**, v. 50, n. 7, p. 363-367, 1967.

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

MONTEIRO, M. B. O. **Lignificação comparativa de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake por ferramentas biotecnológicas e polimerização *in vitro***. Tese de Doutorado, UFRRJ, Seropédica, p.151, 2009.

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

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

NORTHCOTE, D. H. Control of plant cell wall biogenesis: an overview. **ACS Symposium Series**, v. 399, p. 1-15, 1989.

PEREIRA, R. P. W.; MONTEIRO, M. B. O. & ABREU, H. S. **Bioinformação do Processo de Lignificação**, 1ª edição. Seropédica, EDUR, 2012.

PEREIRA, R. P. W.; ABREU, H. S.; MONTEIRO, M. B. O. & SOUZA, N. D. Variação ligno-anatômica em mudas de *Eucalyptus grandis* (Hill Ex Maiden) tratadas com reguladores de crescimento. **Cerne**, v. 17, n. 3, p. 369-375, 2011.

PEREIRA, R. P. W.; MONTEIRO, M. B. O. & ABREU, H. S. Os fitohormônios na formação da madeira. **Floresta e Ambiente**, v.11, n.2, p. 40 - 47, 2005.

RAES, J; ROHDE, A; CHRISTENSEN, J. H; VAN DE PEER, Y; BOERJAN, W. Genome-Wide Characterization of the Lignification Toolbox in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.133, n.3, p.1051-1071, 2003.

ROGERS, L.A.; CAMPBELL, M. M. The genetic control of lignin deposition during plant growth and development. **New Phytologist**, v.164, n.1 p.17-30, 2004.

S. GOUVEIA, C. FERNÁNDEZ-COSTAS, M.A. SANROMÁN, D. MOLDES. Enzymatic polymerisation and effect of fractionation of dissolved lignin from *Eucalyptus globules* Kraft liquor. **Bioresource Technology**, v.121, p.131–138, 2012.

SHE, D.; XU F.; GENG Z. C.; SUN, R. C.; JONES G. L.; BAIRD. M. S. Physicochemical characterization of extracted lignin from sweet sorghum stem. **Industrial Crops and Products**, v.32, p.21–28, 2010.

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

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

Received 25 October 2012
Accepted 25 March 2013