



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

GISELY DE LIMA OLIVEIRA

LIGNIFICAÇÃO EM *Struthanthus vulgaris* Mart.

Prof. Dr. Heber dos Santos Abreu
Orientador

SEROPÉDICA, RJ
Novembro – 2010



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

GISELY DE LIMA OLIVEIRA

LIGNIFICAÇÃO EM *Struthanthus vulgaris* Mart.

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Florestal, como requisito parcial para obtenção do Título de Engenheiro Florestal, Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Prof. Dr. Heber dos Santos Abreu
Orientador

SEROPÉDICA, RJ
Novembro – 2010

LIGNIFICAÇÃO EM *Struthanthus vulgaris* Mart.

Comissão Examinadora:

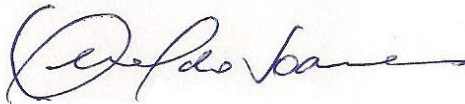
Monografia aprovada em 19 de novembro de 2010.



Prof. Dr. Heber dos Santos Abreu

UFRRJ / IF / DPF

Orientador



Prof. Dr. Geraldo Luiz Gonçalves Soares

UFRGS / Departamento de Botânica

Membro



Prof^a. Dr^a. Rosilei Aparecida Garcia

UFRRJ / IF / DPF

Membro

DEDICATÓRIA

A Deus.
A minha avó Maria José de Cavalcante de Lima.
A todos os meus tios.
Aos meus irmãos Vitor e Wagner de Lima Oliveira.
Ao meu noivo Michel Cardoso Vieira.

Aprenda com o ontem, viva o hoje, tenha esperança no amanhã. O importante é não parar de questionar.

Albert Einstein

Uma descoberta não consiste em ver o que todo mundo não viu, mas em pensar o que ninguém ainda pensou.

Albert Ezent-Gyorgy

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar forças para levantar todos os dias, pela luz divina que ilumina os meus caminhos e me ajuda a vencer com sabedoria mais essa etapa da vida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de iniciação científica, CAPES e FAPERJ pela infraestrutura de equipamentos do laboratório.

Ao Prof. Dr. Heber dos Santos Abreu, que como orientador, colaborou em todos os aspectos para a realização deste trabalho, demonstrando paciência, interesse e amizade na tarefa de orientação. Muito obrigada por tudo!

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

Ao Prof. João Vicente de Figueiredo Latorraca pela cessão do Laboratório de Anatomia e Qualidade da Madeira do Instituto de Florestas / UFRRJ.

As professoras Maria Mercedes Teixeira da Rosa, Helena Regina Pinto Lima, Doria Maria Saiter Gomes e ao professor Joecildo Francisco Rocha do Departamento de Botânica do instituto de Biologia / UFRRJ.

Aos amigos José Carlos Ferreira Batista, Tatiana de Felice Elias, Natália Dias de Souza pelo carinho e pela valiosa colaboração que foi de fundamental importância para o processo de desenvolvimento deste trabalho.

Ao amigo Fabrício Gomes Gonçalves pela ajuda e experiência nesta reta final do trabalho.

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

A minha segunda família, que permitiram que eu, de vez em quando, escapasse da solidão e quebrasse a rotina, Bruno Couto da Silva, Bruno Rebuá Nirello, Carlos Henrique da Rocha Gonçalves, Dallyene da Silva Poubel, Daniela Paes da Rocha, Guilherme de Assis Rodrigues, Iury Costa Oliveira, Rafael Fonseca de Medeiros, Raphaelli de Souza Silva e Wanessa Aparecida dos Santos, pelo carinho, amizade e apoio.

Ao meu noivo e companheiro das horas mais difíceis Michel Cardoso Vieira, que soube compreender minha ausência em algumas etapas de nossas vidas, pelo carinho e incentivo.

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a lignificação do caule jovem da erva de passarinho (*Struthanthus vulgaris* Mart.), visando identificar a presença de lignina, sua composição e deposição em tecidos. Esta espécie é uma hemiparasita escandente da família Loranthaceae. Seu estudo foi principalmente fundamentado na sua condição de crescimento e plasticidade anatômica. Para isso, diferentes amostras de caule com extrativos, sem extrativos e pré-tratadas com NaOH 1% foram analisadas através da microespectroscopia no infravermelho, permitindo estimar a composição da lignina considerada do tipo Guaiacólica:Siringólica. Para análises por microespectrometria, microscopia óptica em campo claro e fluorescência, foram utilizados cortes transversais de 20 a 30 μm de espessura ao natural e tratados com NaOH 1% durante 1 hora. Foi realizado teste histoquímico de Wiesner que permitiu evidenciar a existência de lignina na epiderme, nas calotas de fibras do floema e nos vasos condutores, assim como em células adjacentes.

Palavras-chave: erva de passarinho, lignina, fluorescência, infravermelho

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the lignification in young stem of *erva-de-passarinho* (*Struthanthus vulgaris* Mart.) to identify the lignin presence, its composition and localization in the tissues. This species is a hemi parasite of the Loranthaceae family. This study was mainly based on its condition of growth and anatomic plasticity. Different samples of woody tissues with extractives free of extractives and pre-treated with NaOH 1%, were analyzed by infrared microspectroscopy, allowing to estimate its composition considered of the Guaiacyl: Syringyl type. For analysis of infrared microspectroscopy, bright field microscopy and fluorescence, cross section of stem with 20 to 30 μm of thickness were elaborated from natural and samples treated with NaOH 1% for one hour. It carried out test with Wiesner reagent which showed the lignin existence at epidermis, in the phloem fiber caps and conductives vessels as well as adjacent cells.

Key-words: erva de passarinho, lignin, fluorescence, infrared

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| LISTA DE FIGURAS..... | IX |
| LISTA DE TABELAS..... | X |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 3 |
| 2.1 LIGNIFICAÇÃO | 3 |
| 2.2 MICROSCOPIA EPIFLUORESCENTE..... | 4 |
| 2.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO | 5 |
| 3. OBJETIVO | 6 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL | 6 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 6 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 6 |
| 4.1 PREPARO DO MATERIAL PARA ANÁLISE QUÍMICA | 7 |
| 4.2 PREPARAÇÃO DO MATERIAL CAULINAR PARA ANÁLISE NO INFRAVERMELHO | 8 |
| 4.3 PREPARO DO MATERIAL PARA ESTUDO ANATÔMICO | 8 |
| 4.4 MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO | 9 |
| 4.5 MICROSCOPIA EPIFLUORESCENTE..... | 9 |
| 4.6 MICROESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (FTIR) | 10 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 10 |
| 5.1 CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DO CAULE JOVEM DE STRUTHANTHUS VULGARIS | 10 |
| 5.2 ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA NO INFRAVERMELHO | 11 |
| 5.2.1 <i>Análise por Microespectroscopia no Infravermelho</i> | 12 |
| 5.2.2 <i>Avaliação da lignificação através de testes histoquímicos</i> | 14 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 16 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 17 |
| ANEXOS | 21 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 1. | <i>Struthanthus vulgaris</i> Mart. | 1 |
| Figura 2. | Precusores da Lignina. | 4 |
| Figura 3 | Organograma interativo constando as análises desenvolvidas para avaliar o processo de lignificação | 7 |
| Figura 4. | Liofilizador (<i>TERRONI</i> – Modelo ENTERPRISE) (A) e Espectrômetro de infravermelho <i>VARIAN 640-IR</i> acoplado ao microscópio FTIR (B). | 8 |
| Figura 5 | Microscópio óptico <i>Olympus</i> , acoplado a um sistema de análise de imagem digital (Imaging Software cell**) utilizado para a microscopia de campo claro e epifluorescente. | 9 |
| Figura 6 | Fotomicrografia da seção transversal do caule de <i>Struthanthus vulgaris</i> Mart., corado com safrablau usando objetiva de 10 vezes de aumento. | 10 |
| Figura 7 | Espectro no infravermelho do caule maduro (pó) de <i>Struthanthus vulgaris</i> Mart. ao natural (A), extraído com cicloexano, acetato de etila e metanol (B) e extraído e tratado com NaOH 1% (C). | 11 |
| Figura 8 | Espectros no infravermelho das regiões da seção transversal do caule de <i>Struthanthus vulgaris</i> ao natural: parênquima, calota de fibra do floema e medula (A), (B) e (C), respectivamente e fotos ilustrando essas regiões (1), (2) e (3), respectivamente. | 13 |
| Figura 9 | Fotomicrografias da seção transversal do caule de <i>Struthanthus vulgaris</i> submetido ao teste de Wiesner. Legenda: mtx – metaxilema; ptx – protoxilema; cff – calotas de fibras do floema; flo – floema. | 14 |
| Figura 10 | Fotomicrografias da seção transversal do caule de <i>Struthanthus vulgaris</i> tratado com NaOH 1% e posteriormente submetido ao teste de Wiesner. Legenda: cff – calota de fibra do floema; mtx – metaxilema; ptx – protoxilema. | 15 |
| Figura 11 | Fotomicrografias exibindo autofluorescência da seção transversal do caule de <i>Struthanthus vulgaris</i> ao natural (A e B) e tratado com NaOH 1% (C e D). Legenda: cff – calota de fibra do floema; epi – epiderme. | 16 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atribuições dos sinais no infravermelho de lignina de Björkman através do modo de DRIFT (reflectância Difusa).

12

1. INTRODUÇÃO

Erva de passarinho é o nome genérico para designar plantas trepadeiras da família Loranthaceae, conhecidas por estarem associadas ao hábito alimentar de algumas aves que consomem seus frutos, sendo consideradas os principais dispersores de suas sementes. Esta se desenvolve sobre os ramos e troncos principais de arbustos e árvores em vias públicas, praças, jardins, pomares e florestas naturais e artificiais, porém em menores proporções (ROTTA, 2004). A família Loranthaceae é composta de 40 gêneros e 1500 espécies, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios, revelando-se pouco freqüentes nas regiões temperadas (VENTURELLI, 1981).

A espécie *Struthanthus vulgaris* Mart. é uma hemiparasita no qual depende parcialmente da planta hospedeira, pois possui folha clorofilada (Figura 1), assim capaz de realizar o processo de fotossíntese, ainda que em menor grau, e produzir substâncias especiais necessárias para seu desenvolvimento. Esta hemiparasita emite raízes especiais (haustórios), que atravessam a casca do hospedeiro, retirando água e sais minerais, e isto contribui para sua grande capacidade de proliferação e resistência à erradicação (TATTAR, 1978; ROTTA, 2001; TAINTER, 2002).

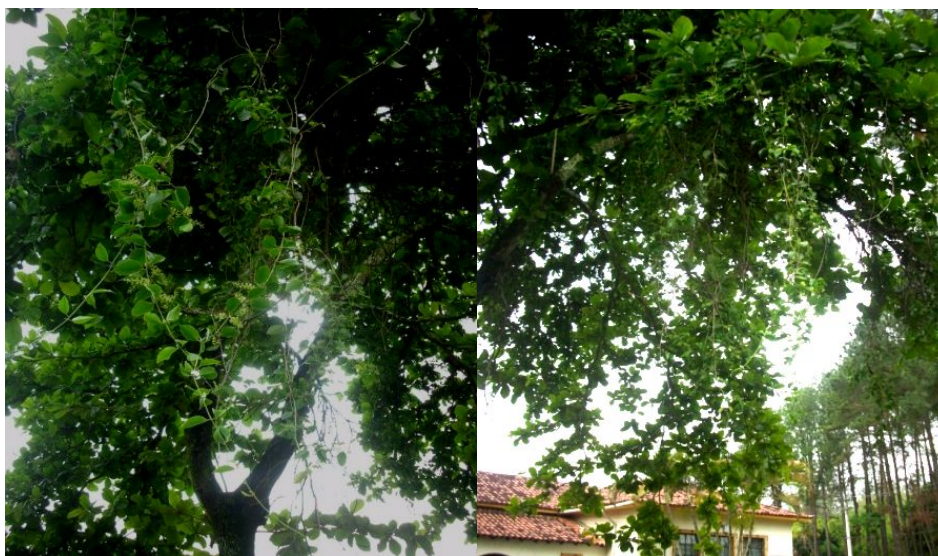


Figura 1. *Struthanthus vulgaris* Mart.

De acordo com AUKEMA (2003), a germinação e o estabelecimento das plantas parasitas dependem do sucesso da dispersão de sementes juntamente com a compatibilidade com o hospedeiro. A maioria das espécies de Santalales possui os pássaros como principais agentes dispersores dos diásporos, sendo que para muitos grupos existe uma relação bastante estreita entre determinadas famílias e gêneros de pássaros e espécies parasitas (REID, 1994; AUKEMA, 2003).

A distribuição dessa hemiparasita pode ser determinada por especificidade e distância entre plantas hospedeiras, condições ambientais, arquitetura do forófito (MARTINEZ DEL RIO et al., 1995), comportamento alimentar e seleção de habitat do agente dispersor

(MONTEIRO et al., 1992). São plantas muito importantes em ecossistemas naturais como fonte de alimento para os pássaros e podem também ser consideradas espécies chave para os animais que consomem seus frutos e seu néctar (AUKEMA, 2003). Contudo, em desequilíbrio, este grupo de hemiparasitas é considerado uma praga (REID, 1994, MARTINEZ DEL RIO *et al.*, 1996). Ocorrem naturalmente, também, nas florestas nativas, porém em menor quantidade, possivelmente devido à presença de fontes alternativas de alimentação (ROTTA, 2004).

Algumas espécies de ervas-de-passarinho têm importância econômica, por conta dos prejuízos que causam às plantações (CAZETTA & GALLETI, 2003). Apesar do impacto que estas plantas podem causar, ainda têm recebido pouca atenção no Brasil (MARTINEZ DEL RIO *et al.*, 1996). A sua presença danifica as árvores e arbustos de florestas, pomares e jardins. A extensão do dano varia em função do hemiparasita, de sua longevidade e da intensidade da infestação. Alguns dos efeitos causados por hemiparasitas nas árvores hospedeiras são: redução do vigor e da produção de frutos e sementes, mau funcionamento dos tecidos lenhosos, produção de galhas, folhagem esparsa, morte do ápice, predisposição ao ataque de insetos e doenças e, até mesmo, morte prematura (HARRIS, 1992).

Ao se olhar atentamente às árvores que compõem a arborização urbana, em diversas cidades brasileiras, é possível notar a presença da erva-de-passarinho (ZILLOTTO *et al.*, 1999). A sua ocorrência no meio urbano pode ser um fator relevante a ser monitorado, pois, em desequilíbrio, compromete a arquitetura das árvores, e por se proliferar com facilidade, pode comprometer todo um programa de arborização (ROTTA, 2001). Elas comprometem o vigor das árvores devido à competição por espaço de crescimento e luz solar (TATTAR, 1978; CAZETTA & GALLETI, 2003), além de alterar suas características estéticas, tornando-se um problema para os setores de parques e jardins das cidades. Apesar do conhecimento da presença da erva-de-passarinho nas árvores, principalmente nas áreas urbanas, pouco se sabe sobre o grau de infestação, as árvores hospedeiras mais atacadas e a especificidade destas com os hemiparasitas, dentre outras.

Por ser uma espécie com características peculiares e por não apresentar dados relacionados a lignificação, tendo em vista, a sua importância ecológica, econômica e paisagística, este trabalho partiu das seguintes indagações: Qual o papel da lignina em plantas que, de uma forma geral, apresentam no início crescimento escandente e depois a favor da gravidade? Onde a lignina está localizada dentro do tecido de um caule de uma planta parasita? Como é a composição e se há evidências de interdependência de precursores da lignina entre o parasita e o hospedeiro?

Na procura dessas respostas resolveu-se estudar a espécie *Struthanthus vulgaris* Mart., que provavelmente poderia responder essas indagações, sobretudo, conceituais, principalmente em decorrência de sua forma de crescimento, propriedades morfológicas, anatômicas e fisiológicas.

De uma forma geral a lignina é encontrada em maior porcentagem na parede secundária de fibras, vasos e traqueídeos, conferindo suporte mecânico e rigidez; na periderme, onde ocorre em menor quantidade, está associada à suberina que age como uma barreira contra patógenos (BROWNING, 1967). A quantidade assim como sua composição apresenta uma conotação evolutiva entre pteridófitas, gimnospermas e angiospermas (ABREU *et al.*, 2009). Alguns vegetais apresentam além destas características diferenciadoras, tecidos especiais que são uma espécie de resposta a ação da gravidade, formando os tecidos conhecidos como de tração e de compressão comuns em plantas arbóreas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Lignificação

A lignificação é um processo que contempla a ação de enzimas, a formação de monolignóis, a polimerização e a deposição nos compartimentos extra e intracelulares do xilema. Formada por diferentes unidades fenilpropanoídicas (ABREU *et al.*, 2009) desperta grande interesse científico, tecnológico e econômico há mais de 150 anos (SALIBA *et al.*, 2001). A lignificação é uma das fases finais da diferenciação de células xilemáticas, iniciando-se nos cantos da célula, na lamela média e nas regiões S em direção ao lume. O produto da lignificação denomina-se lignina, sendo esta encontrada repousando sobre a matriz de carboidratos da parede celular, preenchendo os vazios interlamelares (DONALDSON *et al.*, 2001).

O termo lignina foi introduzido, pela primeira vez, por Anselmo Payen em 1838 para designar o resíduo insolúvel obtido no tratamento da madeira por ácido nítrico. Em 1917, Peter Klason propôs que a lignina seria uma substância macromolecular constituída de unidades do álcool coniferílico, e em 1968 Freudenberg propôs a primeira fórmula química para a lignina (SJOSTROM, 1981).

Dentre os constituintes da madeira (celulose, hemiceluloses, lignina, cinzas e extrativos), a lignina representa o segundo polímero natural mais abundante encontrado na biosfera, depois da celulose (JUNG, 1998), respondendo por 25 a 30% da biomassa terrestre (FENGEL & WEGENER, 1984). Em tecidos adultos da madeira, varia de 18 a 38% (SARKANEM, 1963).

Lignina é um termo para designar uma macromolécula de natureza fenólica tridimensional com ligações cruzadas, com propriedade cimentadora da parede celular, apresentando-se com alta massa molecular e constituída pelas unidades básicas majoritárias dos álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (LATORRACA & ABREU, 1997) (Figura 2). Durante o desenvolvimento celular, a lignina é incorporada como último componente da parede celular, interpenetrando as fibrilas e fortalecendo a parede celular (FENGEL & WEGENER, 1984), ocorrendo assim à lignificação. Sua heterogeneidade varia entre diferentes espécies, órgãos, tecidos, e até mesmo nas camadas da parede celular (RAVEN *et al.*, 2007; HIGUCHI, 1980). Funcionalmente, a rigidez e a hidrofobia da lignina são importantes para o suporte mecânico, características que provavelmente permitiram a melhor adaptação das plantas à vida terrestre (MONTIES, 1989), a condução de água (NORTHCOTE, 1989) e a defesa do vegetal ao ataque de patógenos (VANCE *et al.*, 1980).

Existe uma relação biossintética entre os precursores da lignina e derivados arilpropanóicos: estilbenos, ácido cinâmico, flavonóides, entre outras, uma consequência do processo similar de biossíntese que leva a muitas das substâncias aromáticas em vegetais superiores. A capacidade que têm os sistemas enzimáticos para formar lignina foi fator decisivo na evolução de plantas do meio aquático para o meio terrestre (ABREU, 1994).

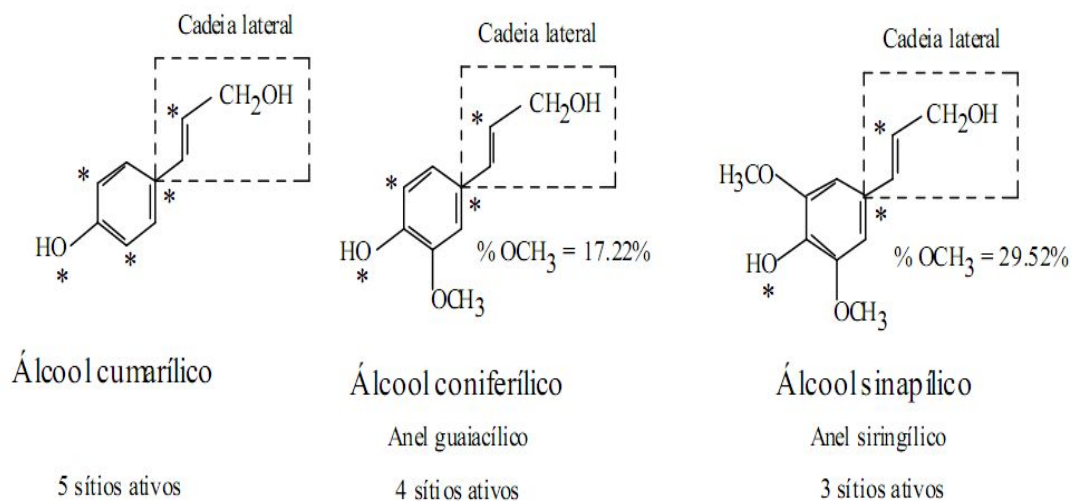


Figura 2. Precursores da Lignina (MONTEIRO *et al.*, 2004).

A biossíntese das ligninas envolve uma adequação coordenada de três fases: a fase pré-corísmica, a fase fenilpropanoídica e a fase de polimerização. A fase pré-corísmica é apoiada na via responsável pela formação dos ácidos chiquímico e corísmico, os quais são importantes em uma variedade de substâncias essenciais (HERRMANN, 1995). A via geral dos fenilpropanoídes começa com a formação a partir da presença de fenilalanina e envolve sucessivas reações de hidroxilação do anel aromático, seguida de O-metilação fenólica e conversão do grupo carboxílico em álcool (BOERJAN, *et al.*, 2003; BARBER & MITCHELL, 1997).

2.2 Microscopia Epifluorescente

O termo fluorescência refere-se à luz emitida (luminescência) pelas moléculas durante o período de excitação pelos fótons. A substância após ser irradiada com uma luz de excitação de comprimento de onda específico pode ser visualizada em um microscópio com fluorescência e quantificada por espectrofotometria (GUIBAULT, 1989).

A microscopia com fluorescência ou epifluorescente é utilizada principalmente para a identificação, localização e quantificação de substâncias específicas com estruturas que emitem fluorescência (FULCHER, *et al.*, 1989). Existem alguns componentes de origem vegetal e animal que emitem fluorescência natural ao serem irradiados, sendo denominados fluorescência primária ou autofluorescência (MUNCK, 1989; KALÁB, *et al.*, 1995; HEALTH, 2000) e alguns constituintes celulares que não apresentam fluorescência natural devem ser adicionados de fluorocromos específicos (HEALTH, 2000), que induzem a fluorescência, denominada fluorescência secundária. Alguns fatores podem afetar a fluorescência das amostras, como a decomposição fotoquímica e perda da intensidade com o tempo; a concentração da substância fluorescente; o pH das soluções; a estrutura química da amostra e a polaridade dos solventes utilizados (FULCHER, *et al.*, 1989).

Em plantas que possuem clorofila, uma pequena parte da radiação absorvida é

suficiente para a emissão de fluorescência natural na cor vermelha. Além desta, pode-se observar fluorescência primária na camada de aleurona na cor azul, devido à presença do ácido ferúlico e substâncias fenólicas (MUNCK, 1989; HAGEN *et al.*, 2006).

2.3 Espectroscopia no Infravermelho

A espectroscopia no infravermelho é certamente uma das técnicas analíticas mais importantes para o químico moderno. Sua área de aplicação envolve o estudo de polímeros, identificação de substâncias inorgânicas e orgânicas, análise de misturas complexas como gasolina e poluentes atmosféricos, controle de qualidade de produtos diversos, estudo de semicondutores, transporte de moléculas bioativas em tecidos vivos, mecanismos de catálise, entre outros (BARBOSA, 2008).

O olho humano é sensível apenas a uma pequena faixa de frequências, ou seja, a região da luz visível do espectro eletromagnético. A luz, com frequências levemente superiores (menor comprimento de onda), encontra-se na faixa do ultravioleta e a luz, com frequências levemente inferiores (maior comprimento de onda), encontra-se na faixa do infravermelho (NISGOSKI, 2005).

A espectroscopia no infravermelho (IV) baseia-se na observação de vibrações moleculares que apresentam frequências específicas, a níveis de energia bem definido. Estas frequências de vibração, ou frequências de ressonância, são determinadas pela forma da molécula, pelos seus níveis de energia e pela massa dos átomos que a constituem (PAIVA, 2006).

A região espectral do infravermelho compreende uma radiação com números de onda num intervalo de 12.800 a 10 cm^{-1} . Por ser uma faixa muito extensa é conveniente dividir a região em infravermelho próximo (12.800 a 4000 cm^{-1}), infravermelho médio (4000 a 200 cm^{-1}) e infravermelho distante (200 a 10 cm^{-1}) (CUNHA, 2006).

A condição para que ocorra absorção da radiação infravermelha é que haja variação do momento de dipolo elétrico da molécula como consequência de seu movimento vibracional ou rotacional (o momento de dipolo é determinado pela magnitude da diferença de carga e a distância entre dois centros de carga). Somente nessas circunstâncias, o campo elétrico alternante da radiação incidente interage com a molécula, originando os espectros. De outra forma, pode-se dizer que o espectro de absorção no infravermelho tem origem quando a radiação eletromagnética incidente tem uma componente com frequência correspondente a uma transição entre dois níveis vibracionais (SKOOG & LEARY, 1992).

De acordo com PAIVA (2006), para obter o espectro no infravermelho de uma amostra translúcida, faz-se passar através desta um feixe de luz no infravermelho, e mede-se a energia absorvida a cada comprimento de onda no modo transmitância, e no modo reflectância, o feixe de luz incide sobre o material amorfo e reflete na forma difusa. A partir desta informação obtém-se o espectro de transmissão ou de absorção, que mostra os comprimentos de onda no IV a que a amostra absorve radiação, permitindo então a interpretação dos tipos de ligações químicas presentes.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a lignificação da espécie *Struthanthus vulgaris* Mart. através da aplicação da microespectroscopia no infravermelho e microscopia epifluorescente.

3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar anatomicamente o tecido lenhoso do caule jovem;
- Analisar a presença de lignina nos tecidos da planta através da microespectroscopia no infravermelho (IFTR);
- Verificar o modelo de deposição da lignina através da fluorescência e teste histoquímico;

4. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras do caule de *Struthanthus vulgaris* Mart. foram coletadas do hospedeiro *Terminalia catappa* L. (Amendoeira), com auxílio de podão, localizada no campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, localizada na cidade de Seropédica (Estado do Rio de Janeiro, Brasil), sendo, em seguida, retiradas as folhas e feita à separação em partes jovens, ou seja, segmentos mais flexíveis localizadas aproximadamente no 3° ao 5° entrenós e partes adultas no qual são os segmentos a partir do 6° entrenó.

Para as análises por microscopia de campo claro, fluorescência e microespectrometria foram utilizadas partes jovens do caule, enquanto que para as análises químicas (determinação do teor de lignina e espectroscopia no infravermelho) foram utilizadas partes maduras do caule (Figura 3).

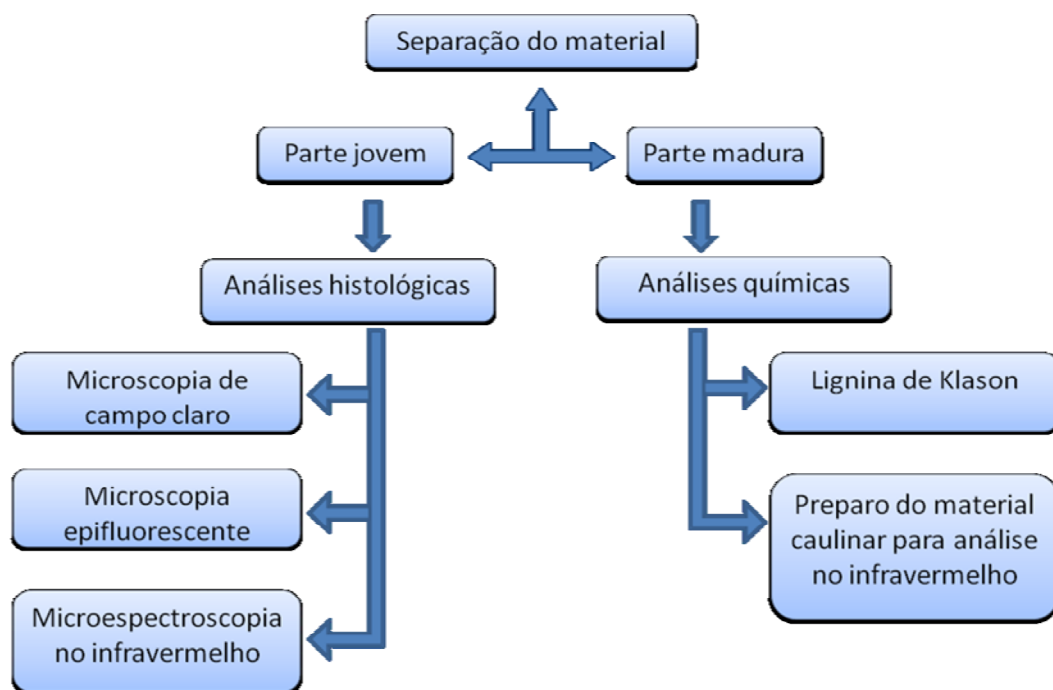


Figura 3. Organograma interativo constando as análises desenvolvidas.

4.1 Preparo do Material Para Análise Química

O caule maduro de *Struthanthus vulgaris* foi seco à temperatura ambiente e em seguida, moído em um moinho de facas do tipo Willey. As partículas obtidas foram homogeneizadas em um jogo de peneiras sendo utilizado o que ficou retido na malha nº 16 internacional (malha 40 ASTM). Após a preparação, as partículas do material caulinar foram extraídas com os solventes ciclohexano, acetato de etila e metanol em um extrator do tipo soxhlet, por um período de 24 horas ininterruptas para cada extração (ABREU et al., 2006).

Para a obtenção do teor de lignina foram utilizadas duas amostras de caule maduro livres de extrativos: uma amostra sem tratamento e outra amostra com tratamento com NaOH 1%. Para tal, transferiu-se aproximadamente 2,0 g do material extraído com solventes e devidamente seco para um Becker de 200 mL e adicionou-se 100 mL de solução de NaOH 1%. Este tratamento foi realizado em banho-maria por uma hora a 90°C. Em seguida, o material foi lavado com água desionizada, depois com ácido acético 10% e, em seguida, lavado com água quente sob vácuo utilizando um filtro de placa sinterizada (ABREU et al., 2006).

Para determinação do teor da lignina de Klason foi utilizado aproximadamente 300 mg de amostra seca e livre de extrativos e tratada com ácido sulfúrico 72%. A amostra foi homogeneizada por agitação contínua durante 1 minuto e conservada por 1 hora entre 25 e 30°C em banho-maria. Em seguida, o material foi diluído a 84 ml de água destilada, permanecendo em refluxo por 4 horas. Após este procedimento, o material foi lavado 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 em seguida foi feita uma nova pesagem (EFFLAND, 1977).

4.2 Preparação do Material Caulinar Para Análise no Infravermelho

Para espectroscopia no infravermelho, foram utilizados material caulinar adulto com 3 diferentes condições de tratamento: uma amostra ao natural, uma amostra livre de extrativos e uma amostra livre de extrativos e tratada com NaOH 1 %. As amostras foram moídas em um moinho de bolas de aço inoxidável (*Marconi*), utilizando a velocidade de 310 rpm durante 36 horas ininterruptas, até apresentar nível coloidal. O material foi seco em um liofilizador (*TERRONI – Modelo ENTERPRISE*) (Figura 4A). Os espectros foram registrados em um espectrômetro (*VARIAN 640-IR FT-IR spectrometer*) (Figura 4B) utilizando 1mg de amostra e 100mg de KBr. Os espectros foram registrados no modo experimental de transmitância utilizando 4 cm^{-1} de resolução, 32 varreduras, amplitude espectral entre 4000-400 cm^{-1} e atenuação 17.

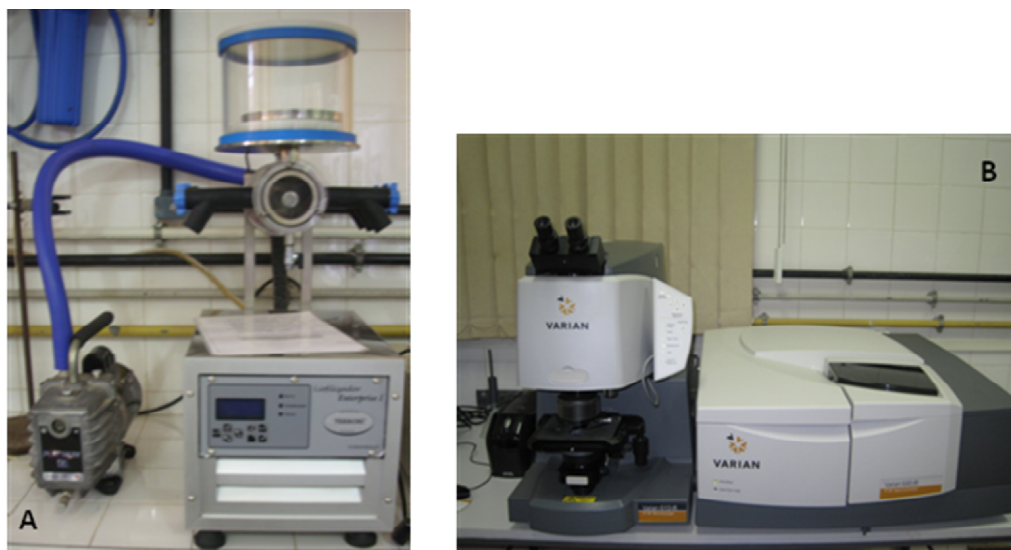


Figura 4. Liofilizador (TERRONI – Modelo ENTERPRISE) (A) e Espectrômetro no infravermelho VARIAN 640-IR acoplado ao microscópio FTIR (B).

4.3 Preparo do Material Para Estudo Anatômico

Após a coleta dos ramos, partes provenientes do caule jovem foram divididas em segmentos menores, sendo posteriormente fixado em FAA 70% (solução de Formaldeído, Ácido acético glacial e Álcool etílico, 1:1:18 (v/v)) e transferido após 24 horas para etanol 50% (KRAUS et al., 1997). Os cortes anatômicos do caule jovem de *Struthanthus vulgaris* foram realizados em micrótomo do tipo Ranvier, obtendo-se cortes de espessura entre 20 a 30 μm .

Após a obtenção dos cortes, estes foram clarificados através dos seguintes procedimentos: primeiramente estes permaneceram em solução de hipoclorito de sódio 50%, durante 5 minutos e em seguida foram lavados em água destilada para retirar o excesso do reagente. Após a lavagem, os cortes foram depositados em solução de ácido acético 1% para neutralizar a ação da água sanitária e, posteriormente, submetidos a uma nova lavagem. Ao

término do processo de clarificação foram realizados os testes histoquímicos (VAZQUEZ-COOZ & MEYER, 2002), utilizando para isso um microscópio óptico (*Olympus BX 51*) com um sistema digital de análise de imagens (*cell^f imaging software*) (Figura 5).

4.4 Microscopia de Campo Claro

As análises por microscopia de campo claro foram realizadas com cortes transversais do caule jovem, ao natural e corados com mistura de azul de astra a 1% e safranina a 1% (9:1 v/v) (BUKATSCH, 1972, citado por KRAUS et al., 1997).

Além das análises anatômicas do caule, testes histoquímicos foram realizados para detectar lignina por meio do teste de Wiesner para a localização do tecido lignificado, cuja coloração avermelhada foi evidenciada imediatamente (LIN & DENCE, 1992). Foi usado neste teste histoquímico cortes de 20 a 30 μm ao natural e cortes tratados com uma solução aquosa de NaOH 1% (solução aquosa) durante 1 hora, sendo este último utilizado para extração de material fenólico conforme a norma TAPPI – T 212 os – 76 (TAPPI, 1979).

4.5 Microscopia Epifluorescente

Para o teste com fluorescência, seções transversais do caule ao natural e tratados com NaOH 1% foram observados em microscópio epifluorescente (Figura 5) utilizando cubo de excitação azul em 450-480nm e filtro FITC (U-MWB₂), sendo observado a autofluorescência (BARROS & MIGUENS, 1998).



Figura 5. Microscópio óptico *Olympus*, acoplado a um sistema de análise de imagem digital (Imaging Software *cell^f*) utilizado para a microscopia de campo claro e epifluorescente.

4.6 Microespectroscopia no Infravermelho (FTIR)

Os cortes anatômicos das seções transversais, ao natural foram utilizados para registro de espectros no infravermelho *in loco* através de um microscópio acoplado a um espectrômetro de infravermelho (Figura 4B), de modo a caracterizar e localizar a presença de lignina nos tecidos. Estes cortes foram congelados em nitrogênio líquido e em seguida secos entre lâminas de vidro por 12 horas em um liofilizador.

Depois de liofilizados, os cortes transversais foram colocados sobre uma lâmina de KBr, e registrados os espectros com detector MCT, usando condições experimentais de reflectância difusa. Foram registrados espectros das seguintes regiões: parenquimatosa, calota de fibra do floema e medula, abrangendo uma área de 5 nm² em cada região, registrando espectros com 2 cm⁻¹ de resolução, 128 varreduras com amplitude espectral entre 4000-700 cm e atenuação 7.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização Anatômica do Caule Jovem de *Struthanthus vulgaris*

Na seção transversal do caule jovem de *Struthanthus vulgaris* observou-se a epiderme uniestratificada, cujas células apresentam formas e tamanhos variados, seguida por três a sete camadas de parênquima cortical homogêneo constituído por células isodiamétricas (Figura 6).

Os elementos condutores estão organizados em feixes colaterais, interrompidos por células parenquimáticas, caracterizando um cilindro descontínuo. Os feixes vasculares são providos de calotas de fibras adjacentes aos pólos do floema (Figura 6), as quais apresentaram características de fibras gelatinosas. O xilema apresenta de uma a duas camadas de células cambiais no cilindro central (Figura 6), podendo ser observado o protoxilema e o metaxilema conforme descrição de SALATINO et al. (1993). Foi observado também que a medula é formada por células parenquimáticas maiores em relação à porção cortical (Figura 6).

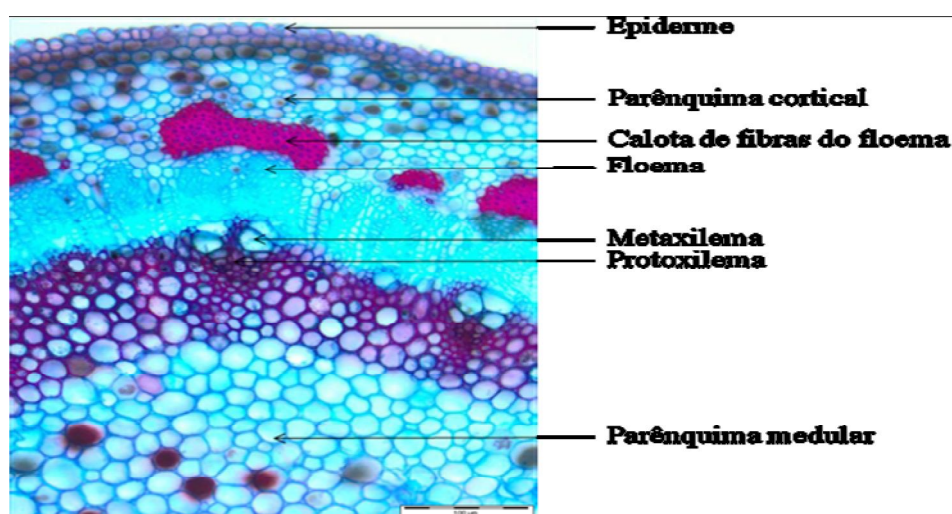


Figura 6. Fotomicrografia da seção transversal do caule jovem de *Struthanthus vulgaris* Mart., corado com safrablau usando objetiva de 10 vezes de aumento.

5.2 Análise Espectroscópica no Infravermelho

Os espectros no infravermelho do material lignocelulósico do caule (pó) principal da parte adulta de *Struthanthus vulgaris* ao natural, pré-extraído com cicloexano, acetato de etila e metanol e tratado com uma solução de NaOH 1%, revelaram sinais que evidenciaram a presença de tecidos lignificados, refletindo a presença de lignina do tipo Guaiacólica:Siringílica (Figuras 7A, 7B e 7C).

Foram observados os sinais em 1733, 1513, 1435, 1374, 1329 e 1257 cm^{-1} no espectro do material ao natural (Figura 7A), sinais em 1733, 1640, 1633, 1513, 1435, 1353, 1329 e 1256 cm^{-1} no espectro do material extraído (Figura 7B) e, 1641, 1507, 1424, 1366, 1330 e 1266 cm^{-1} no espectro do material extraído e tratado com NaOH 1% (Figura 7C).

Pode-se observar que o espectro do material extraído e tratado, quando comparados com o espectro do material ao natural e do material extraído sem o tratamento NaOH 1%, apresentou os sinais mais evidentes, confirmando a existência de lignina Guaiacólica:Siringílica (Figura 7C).

O tratamento com NaOH 1% serviu para remover substâncias taníferas e hemicelulósicas, o que acarretou em espectros mais limpos e com ausência de contaminação. A prova disso está na presença e ausência do sinal em 1733 cm^{-1} nos espectros das amostras não tratadas (Figuras 7A e 7B) e tratadas com NaOH 1% (Figura 7C), respectivamente. Este sinal corresponde ao estiramento simétrico e assimétrico de carbonilas de éster ou de ácido carboxílico existentes nas hemiceluloses (xiloglicanas) (ORTON et al., 2004). Esses espectros foram registrados no modo transmitância. Foi usado como referência nesta comparação as atribuições descritos na tabela 1 (ABREU, 1994).

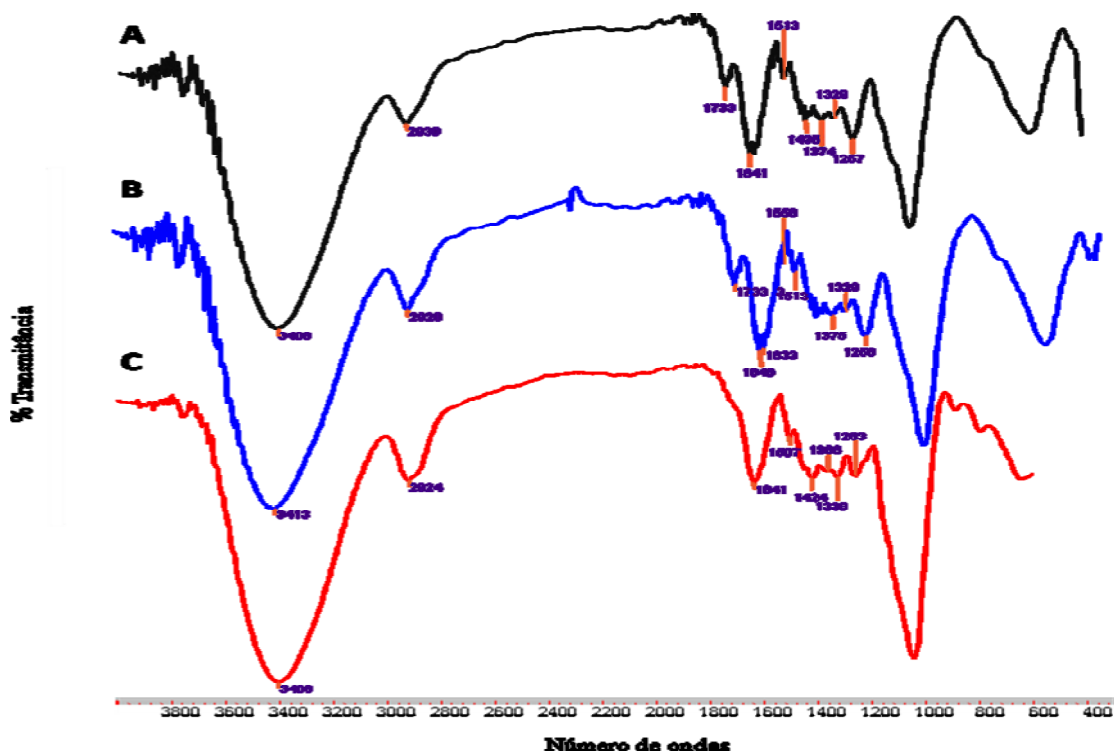


Figura 7. Espectro no infravermelho do caule maduro (pó) de *Struthanthus vulgaris* ao natural (A), extraído com cicloexano, acetato de etila e metanol (B) e extraído e tratado com NaOH 1% (C).

Tabela1. Atribuições dos sinais de referência no infravermelho de ligninas de Bjorkman.

| cm ⁻¹ | Atribuições dos Sinais | cm ⁻¹ | Atribuições dos Sinais |
|------------------|--|------------------|---|
| 3412-3460 | Estiramento de O-H | 1221-1230 | Estiramento de C=O, C-C com estiramento de C=O sensível à substituição do anel aromático G condensado > G eterificado |
| 3000-2842 | Estiramento de C-H dos grupos metílicos e metilênicos | 1116 | Típicos de ligninas HGS com influência de grupos carboxílicos e carbinílicos |
| 1738-1709 | Estiramento de C=O de cetonas não conjugadas e de grupo éster | 1140 | Deformação (no plano) de C-H de anel aromático guaiacílico. G condensado > G eterificado |
| 1655-1675 | Estiramento de C=O em cetonas conjugadas e em aldeídos conjugados | 1128-1125 | Deformação (no plano) de C-H (típico de anel siringílico) |
| 1593-1605 | Vibração do esqueleto aromático com estiramento de C=O | 1086-1125 | Deformação de C-O de álcool secundário e de éter alifático |
| 1505-1515 | Vibração do esqueleto aromático | 1030-1095 | Deformação (no plano) de C-H de anel guaiacílico mais deformação de C-O em álcool primário e em éter com contribuição de estiramento de C=O não conjugado |
| 1460-1470 | Deformação assimétrica em -CH ₃ e -CH ₂ -CH ₂ - | 915-925 | Deformação de C-H (monohidrogênio) fora do plano do anel aromático siringílico |
| 1422-1430 | Vibração do esqueleto aromático combinado com deformação no plano de C-H, influenciado pela substituição do anel | 853-858 | Deformação de C-H fora do plano dos H de C-2, C-5 e C-6 (anel guaiacílico) |
| 1365-1370 | Estiramento de C-H alifático de -CH ₃ -CH ₃ | 834-835 | Deformação de C-H fora do plano dos H do C-2 e C-6 (anel siringílico) |
| 1325-1330 | Respiração (breathing) do anel siringílico com contribuição do estiramento de C=O e de estruturas condensadas | 817-827 | Deformação de C-H fora do plano do C-H nas posições 2,5 e 6 de unidades guaiacílicas |
| 1266-1270 | Respiração (breathing) do anel guaiacílico com contribuição do estiramento de C=O | | |

5.2.1 Análise por Microespectroscopia no Infravermelho

Cortes transversais do caule jovem de *Struthanthus vulgaris* ao natural (sem aditivo de corantes) foram submetidos à técnica de microscopia no infravermelho FTIR, sendo varridos em três regiões distintas (parênquima cortical, calota de fibra do floema e medula) (Figuras 8A; 8B e 8C).

O espectro da região do parênquima cortical revelou um perfil complexo com pouca definição, principalmente com relação aos sinais correspondentes a presença de lignina (Figura 8A). Não houve registro de lignina nas células do feixe medular.

O espectro registrado da região da calota de fibra do floema (Figura 8B) indicou sinais de presença de lignina, sendo estes os sinais 1647, 1511, 1453, 1376 e 1244 cm⁻¹ (Figura 8B). Os sinais 1338 e 1244 cm⁻¹ por comparação entre eles sugere uma proporção (G≤S) na composição da lignina das fibras floemáticas das calotas do caule. Esta relação coaduna com a hipótese que ligninas de tecidos de alta flexibilidade podem possuir ligninas mais flexíveis, permitindo maior taxa de flexibilidade as plantas (ABREU *et al.*, 2009).

Esses espectros foram obtidos no modo experimental de reflectância difusa conforme descrição anterior, de acordo com os dados da literatura (LIN & DENCE, 1992).

O espectro registrado na região da medula também revelou um perfil complexo de sinais dificultando qualquer diagnóstico, não sendo possível a identificação da presença de lignina nesses espectros (Figura 8C).

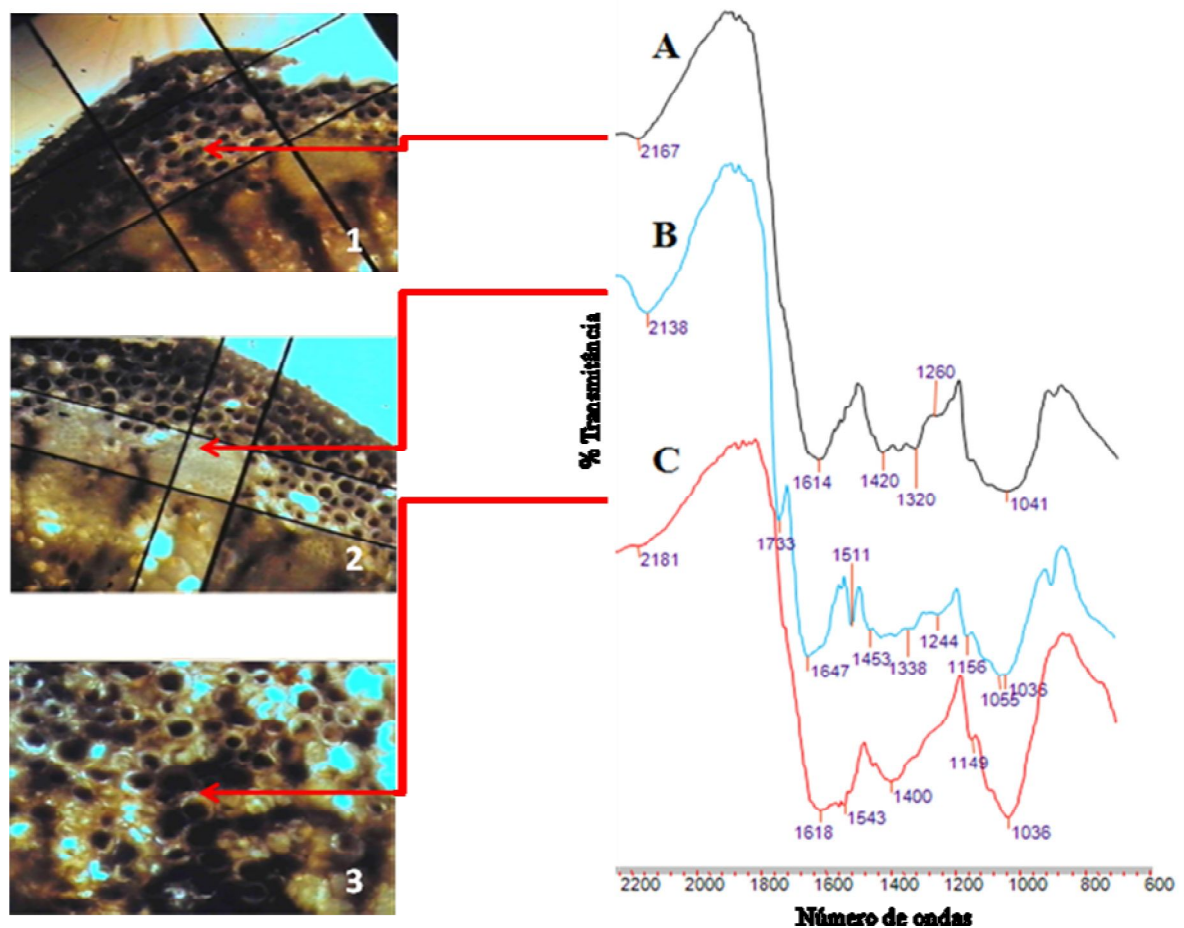


Figura 8. Espectros no infravermelho das regiões da seção transversal do caule de *Struthanthus vulgaris* ao natural: parênquima, calota de fibra do floema e medula (A), (B) e (C), respectivamente e fotos ilustrando essas regiões (1), (2) e (3), respectivamente.

As atribuições foram baseadas em análise comparativa entre espectros apoiado em dados da literatura (LIN & DENCE, 1992). As calotas de fibras do floema e as células do parênquima medular localizadas próximas aos feixes vasculares mostrou forte indicação de presença de lignina, sendo esta evidência reduzida após tratamento com NaOH 1%. Em caules adultos, foi verificada presença do alto teor de lignina aproximadamente 30,6% em material adulto sem tratamento e 24,2% no material tratado com NaOH 1%, respectivamente. A diferença observada de 6,4% permitiu propor que parte do material incrustante foi solubilizada, o que foi confirmado por teste histoquímico.

Esta diferença pode ser observada a partir da comparação das seções transversais do caule ao natural e tratadas com NaOH 1% submetidos ao teste de Wiesner e à fluorescência.

5.2.2 Avaliação da lignificação através de testes histoquímicos

O teste de Wiesner permitiu observar células lignificadas do caule jovem (Figura 9A), identificando as células diferenciadas do protoxilema, evidenciando as paredes secundárias lignificadas e o metaxilema sem deposição de parede secundária (Figura 9B). O teste de Wiesner também demonstrou claramente a presença de lignina nas calotas de fibras do floema (Figura 9C).

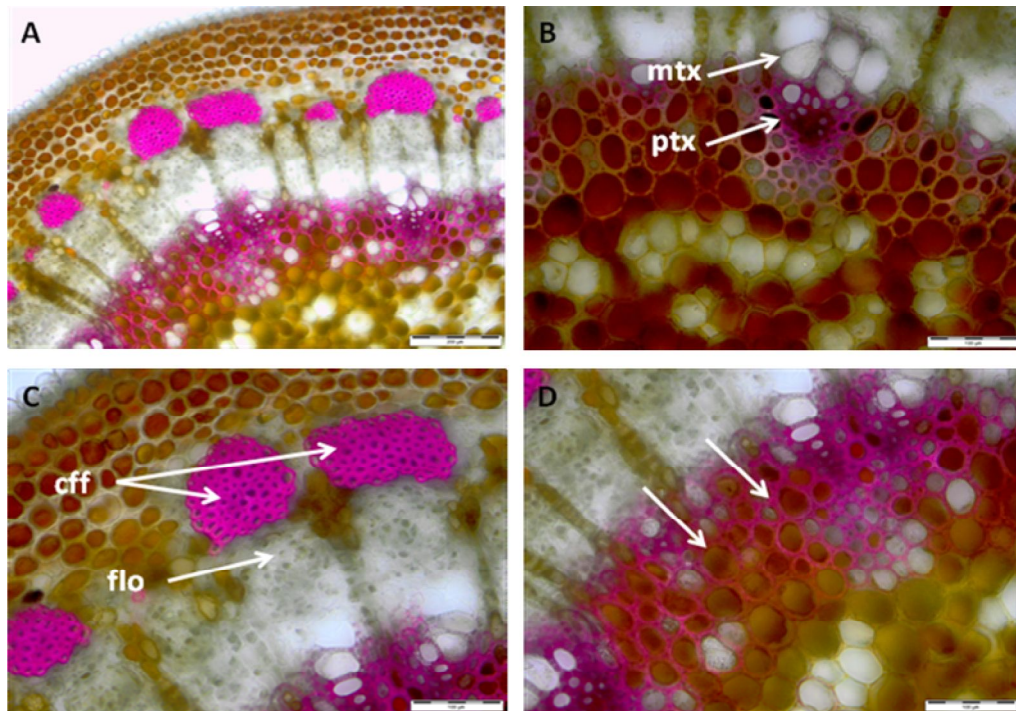


Figura 9. Fotomicrografias da seção transversal do caule de *Struthanthus vulgaris* submetido ao teste de Wiesner. Legenda: mtx – metaxilema; ptx – protoxilema; cff – calotas de fibras do floema; flo – floema.

Após tratamento dos cortes com NaOH 1%, o teste de Wiesner revelou uma redução da intensidade de cor, tanto nas calotas de fibras do floema (Figura 10B) bem como nas células adjacentes aos feixes vasculares e também as do protoxilema (Figura 10C), sugerindo provavelmente dissolução de substâncias de baixa massa molecular de natureza lignoídica nestas células. Esta diferença pode ser observada a partir da comparação das seções transversais ao natural e tratadas com NaOH 1%, tanto no teste de Wiesner (Figuras 9 e 10, respectivamente) como no teste de fluorescência (Figuras 11). Esses resultados coadunam com os dados encontrados por WATANABE *et al.* (2004), os quais observaram a remoção de polifenóis por NaOH 1% na madeira de eucalipto através de análises histoquímicas, permitindo acessar a precisa distribuição de lignina na parede celular.

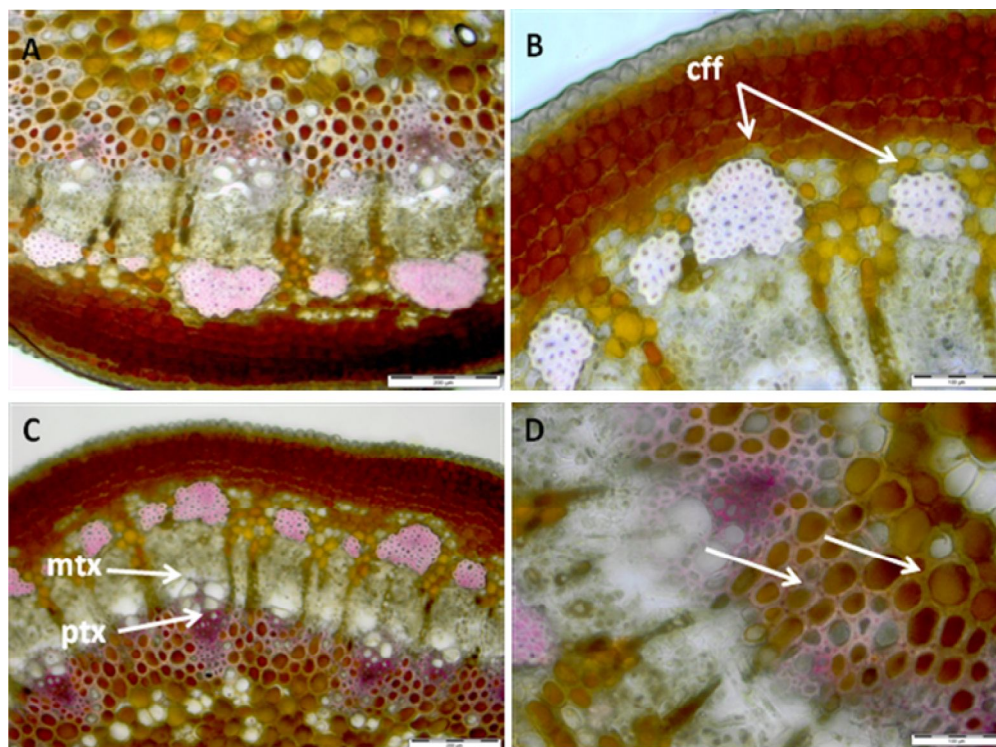


Figura 10. Fotomicrografias da seção transversal do caule de *Struthanthus vulgaris* tratado com NaOH 1% e posteriormente submetido ao teste de Wiesner. Legenda: cff – calota de fibra do floema; mtx – metaxilema; ptx – protoxilema.

O teste de fluorescência indicou a presença de lignina (Figura 11), confirmando com os resultados encontrados anteriormente. Os resultados mostram as calotas de fibras do floema são lignificadas (Figura 11A). A região dos feixes vasculares com as células diferenciadas do protoxilema, evidenciando as células lignificadas com espessamento de parede e também algumas células adjacentes, localizadas em torno dos feixes vasculares, com espessamento secundário (Figura 11B). Em destaque, a lignina, em células da epiderme (Figura 11C). Após tratamento com NaOH 1% pode ser observado também uma redução na intensidade da fluorescência, da mesma forma como revelado no teste de Wiesner (Figuras 11C e 11D).

Essas substâncias que provavelmente foram dissolvidas pela solução aquosa de NaOH 1% podem também compreender o grupo de substâncias da classe dos taninos, visto que, de acordo com SALATINO et al. (1993), *Struthanthus vulgaris* apresenta grande quantidade desse polifenol em suas células.

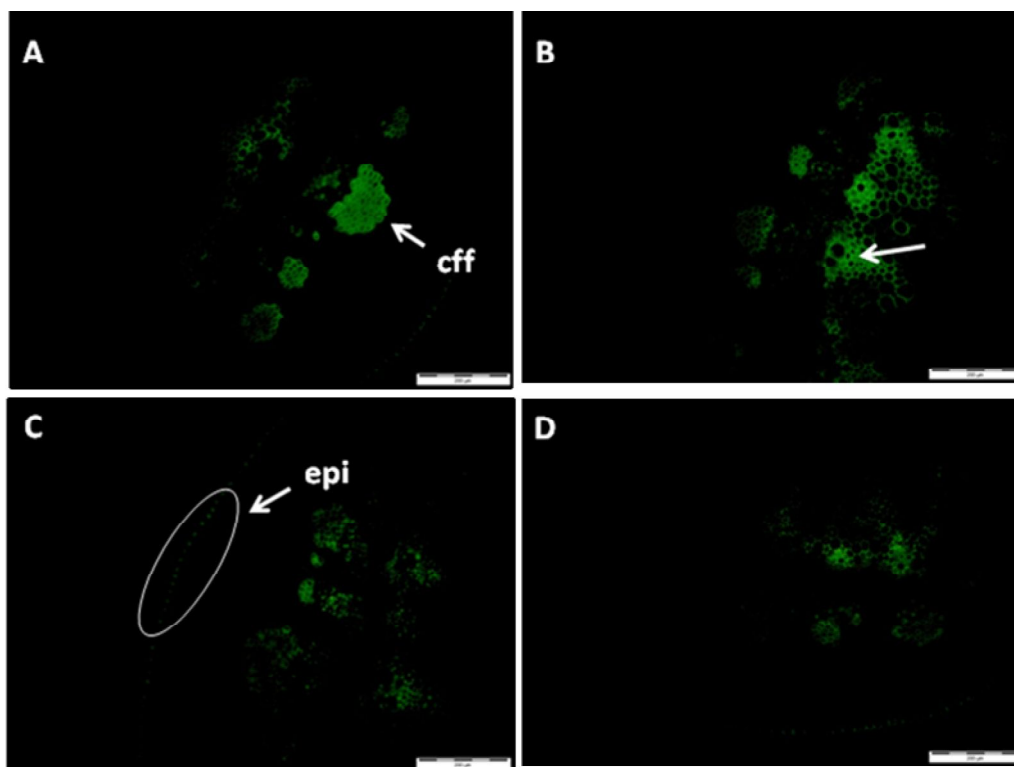


Figura 11. Fotomicrografias exibindo autofluorescência da seção transversal do caule de *Struthanthus vulgaris* ao natural (A e B) e tratado com NaOH 1% (C e D). Legenda: cff – calota de fibra do floema; epi – epiderme.

6. CONCLUSÃO

Os resultados revelaram que as calotas de fibras do floema apresentam lignina e também substâncias solúveis em solução aquosa de NaOH 1%, de baixa massa molecular e/ou tanino/polioses, já comprovada em estudos anteriores.

A espectroscopia no infravermelho foi a ferramenta que permitiu verificar *in loco* o tipo de lignina, facilitando a atribuição e o reconhecimento nestes tecidos, revelando uma composição rica em unidades siringíla (G:S), diferentemente do encontrado para o tecido total, onde percebe-se maior concentração de unidades guaiacíla. A estimativa de maior teor de unidade siringíla nas calotas fibrosas coaduna com a hipótese que ligninas siringílas correspondem a sistemas moleculares mais flexíveis.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, H. S.; LATORRACA, J. V. F.; PEREIRA, R. P. W.; MONTEIRO, M. B. O.; ABREU, F. A.; AMPARADO, K. F. A supramolecular proposal of lignin structure and its relation with the wood properties. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 81(1): 137-142, 2009.
- 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**, 2006, 20p.
- ABREU, H. S. **Biossíntese da lignificação**, Editora Universidade Rural, 1994, p.60.
- AUKEMA, J. E. Vectors, viscin, and Viscaceae: mistletoes as parasites, mutualists and resources. **Frontiers in Ecology and the Environment**, Washington, DC, v.1, n.3, p.212 - 219, 2003.
- BARBER, M. S.; MITCHELL, H. J. Regulation of phenylpropanoid metabolism in relation to lignin biosynthesis in plants. **International Review of Cytology**, V. 172, p. 243-293, 1997.
- BARBOSA, L. C. A., **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**, Editora UFV, 2008, 175p.
- BARROS, C. F.; MIGUENS, F. C. 1998. Ultrastructure of the epidermal cells of *Beilshmiedia rigida* (Mez) Kosterm. (Lauraceae). **Acta Microscopica** 6 (3): 451-461, 1998.
- BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin Biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, V. 54, p. 519-546, 2003.
- BROWNING, B. L. **Methods of wood chemistry** – Interscience Publishers – New York, v.2. 800 p, 1967.
- BUKATSCH, F. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. **Mikroskopos** vol.61, n. 8, p. 255, 1972.
- CAZETTA, E.; GALETTI, M. Ecologia das ervas-de-passarinho. **Ciência Hoje**, São Paulo, v.3, n. 94, p.72 - 74, 2003.
- CUNHA, F. C. **Modelos de calibração multivariada associados à espectroscopia vibracional para a análise de misturas diesel-óleos vegetais**. Brasília – UNB. 107 p. 2006. (Tese de Mestrado).
- DONALDSON, L. A. **Lignification and lignin topochemistry – an ultrastructural view**. **Phytochemistry**, v. 57, p.859-873, 2001.

EFFLAND, M. J. Modified procedure to determine acid-insoluble lignin in wood and pulp. **Teppi.**, n. 10, v.60, p.143-144, 1977.

FENGEL, D., WEGENER, G. **Wood, chemistry, ultra structure, reactions.** New York : Waster & Grugter, 1984. 613p.

FULCHER, R. G.; IRVING, D.W.; DE FRANCISCO, A. Fluorescence microscopy: applications in food analysis. In: MUCK, L. **Fluorescence analysis in foods.** New York: Longman Scientific and Technical, cap.9, p.59-106, 1989.

GUIBAULT, G. G. Principles of fluorescence spectroscopy in the assay of food products. In: MUNCK, L; DE FRANCISCO, A. **Fluorescence analysis in food.** 1^a ed. New York: Longman Scientific & Technical, p. 33-57, 1989.

HAGEN, S.F.; SOLHAUG, K. A.; BENGTSSON, G. B.; BORGE, G. I. A.; BILGER, W. Chlorophyll fluorescence as a tool for non-destructive estimation of anthocyanins and total flavonoids in apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 41, p.156-163, 2006.

HARRIS, R. W. Arboriculture: integrated management of landscape trees, shrubs and vines. New Jersey: Prentice-Hall, 1992. 674p.

HEALTH, M. C. Advances in imaging the cell biology of plant-microbe interaction. **Annual Review Phytopathology**, v.38, p.443-459, 2000.

HERRMANN, K. M. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. **Plant Cell**, V. 7, p. 907-919, 1995.

HIGUCHI, T. Lignin structure and morphological distribution in plant cell walls. In: KIRK, T.K; HIGUCHI, T.; CHANG, H. (Ed). **Lignin biodegradation: microbiology, chemistry and potential applications.** Boca Raton, v. I, p. 02, 1980.

JUNG, H. J. G.; NI, Comentary – Lignification of plant cell walls: Impact of genetic manipulation – **Proc. Natl. Acad. Sci . USA**, Oct ober, 1998. v.95, p. 12742-12743.

KALÁB, M.; ALLAN-WOJTAS, P.; MILLER, S. S. Microscopy, and other imaging techniques in food structure analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v.6, 1995.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**, Editora Universidade Rural,1997. 198p.

LATORRACA, J. V. F.; ABREU, H. S. Extrativos da madeira. Departamento de Produtos Florestais, **Imprensa Universitária**, Rio de Janeiro, 1997. 5p.

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

- MARTÍNEZ DEL RIO, C.; SILVA, A.; MEDEL R.; HOURDEQUIN, M. Seed dispersers as disease vectors: bird transmission of mistletoe seeds to plant hosts. **Ecology** 77: 912-921. 1996.
- MARTÍNEZ DEL RIO, C., HOURDEQUIN, M., SILVA, A. & MEDEL, R. 1995. The influence of cactus size and previous infection on bird deposition of mistletoe seeds. **Australian Journal of Ecology** 20:571-576.
- MONTEIRO, M. B. O.; PEREIRA, R. P. W.; ABREU, H. S. Bioquímica da lignificação de células xilemáticas. **Floresta e Ambiente**, V. 11, n. 2, p. 48-57, 2004.
- MONTEIRO, R. F., MARTINS, R. P. & YAMAMOTO, K. 1992. Host specificity and seed dispersal of *Psittacanthus robustus* (Loranthaceae) in south-east Brazil. **Journal of Tropical Ecology** 8: 307-314.
- 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.
- MUNCK, L. Practical experiences in development of fluorescence analyses in an applied food research laboratory. In: MUNCK, L; DE FRANCISCO, A. **Fluorescence analysis in food**. 1ª ed. New York: Longman Scientific & Technical, p.1-29, 1989.
- NISGOSKI, S. **Espectroscopia no infravermelho próximo no estudo de características da madeira e papel de *Pinus taeda* L.** Curitiba – PR. UFPR 160p. 2005. (Tese de Doutorado).
- NORTHCOTE, D. H. Control of plant cell wall biogenesis: an overview. **ACS Symp. Ser.** V.399, p.1-15, 1989.
- ORTON, C. R.; PARKINSON, D. Y.; EVANS, P. D.; OWEN, N. L. Fourier Transform Infrared Studies of Heterogeneity, Photodegradation, and Lignin / Hemicellulose Ratios Within Hardwoods and Softwoods. **Applied Spectroscopy**, v. 58, nº 11, 2004.
- PAIVA, M. C.; Espectroscopia de infravermelhos. Universidade do Minho, 2006, p. 18.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. p. 35, 2007.
- ROTTA, E, Autotrofia em *Tripodanthus acutifolius* (Ruiz & Pav.) Thiegh. (erva de passarinho) – um registro. Comunicado técnico, **Embrapa florestas**, 2004, 3 p.
- ROTTA, E. **Erva-de-passarinho (Loranthaceae) na arborização urbana: Passeio Público de Curitiba, um estudo de caso**. 135f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.
- REID,N. Dispersal of mistletoe by honeyeaters and flowerpeckers: components of seed dispersal quality. **Ecology** 70: 137-145. 1994.

SALATINO, A.; KRAUS, J.E.; SALATINO, M.L.F. Contents of Tannins and their histological localization in Young and adult parts of *Struthanthus vulgaris* Mart. (Loranthaceae). **Annals of Botany** 72: 409-414, 1993.

SALIBA, E.O.S.; RODRIGUES, M.N.; MORAIS, S.A.L.; PILÓ-VELOSO, D. Ligninas - Métodos de Obtenção e caracterização Química. **Ciência Rural**, v. 31, n.5, p.917-928, Santa Maria, 2001.

SARKANEM, K.V. Wood lignins. In: BROWNING, B.L. The chemistry of wood. New York, London: **Interscience Publishers**, 1963. p.249-311.

SJOSTROM, E; **Wood Chemistry: Fundamentals and Applications**, Academic Press, Inc.; NY, USA, 1981; p.71.

SKOOG, D. A.; LEARY, J. J. **Principles of instrumental analysis** 4. Ed. New York: Saunders College Publishing, 1992.

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.

TAINTER, F. H. What does mistletoes have to do with Christmas? Feature Story. St. Paul: **The American Phytopathological Society**, 2002. Disponível em:<<http://www.apsnet.org/online/feature/mistletoes>> Acesso em: 20 jul. 2005.

TATTAR, T. A. Diseases of Shade Trees. New York: Academic, 1978. 361 p.

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

VAZQUEZ-COOZ, I.; MEYER, R.W. A differential staining method to identify lignified and unlignified tissues, **Biotechnic and Histochemistry**, n. 5 , 277 – 282. 2002.

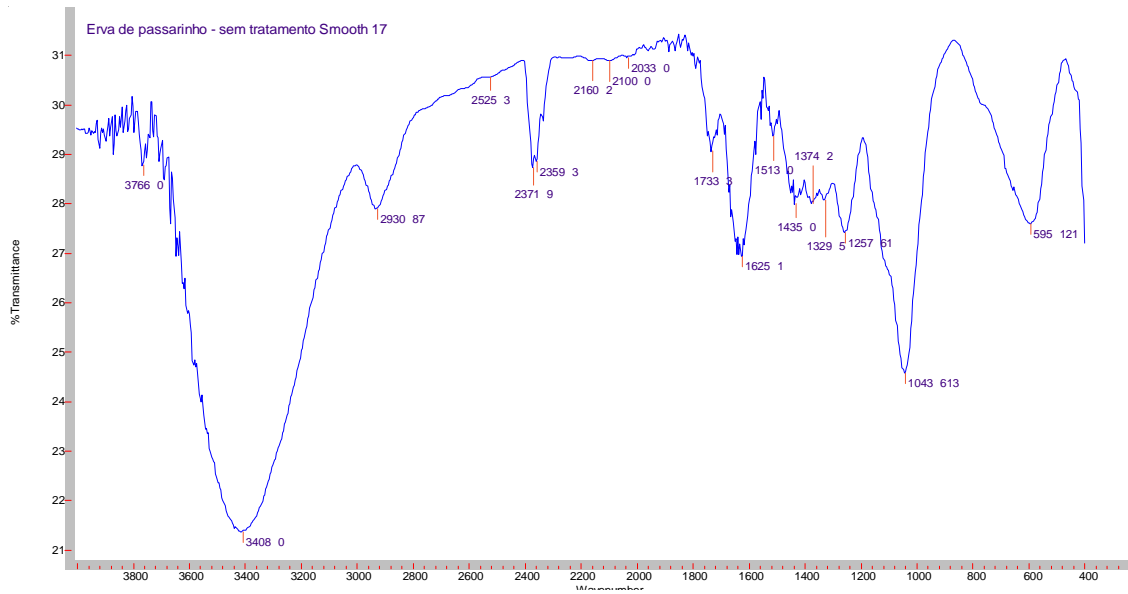
VENTURELLI, M. Estudos sobre *Struthanthus vulgaris* Mart: Anatomia do fruto e semente e aspectos de germinação, crescimento e desenvolvimento. **Revista Brasil. Bot.**, São Paulo, v.4, n.2, p.131-147, 1981.

WATANABE, Y.; KOJIMA, Y.; ONA, T.; ASADA, T.; SANO, Y.; FUKAZAWA, K.; FUNADA, R. Histochemical study on heterogeneity of lignin in *Eucalyptus* species II. The distribution of lignins and polyphenols in the walls of various cell types. **IAWA Journal**, vol. 25 (3), 283 – 295, 2004.

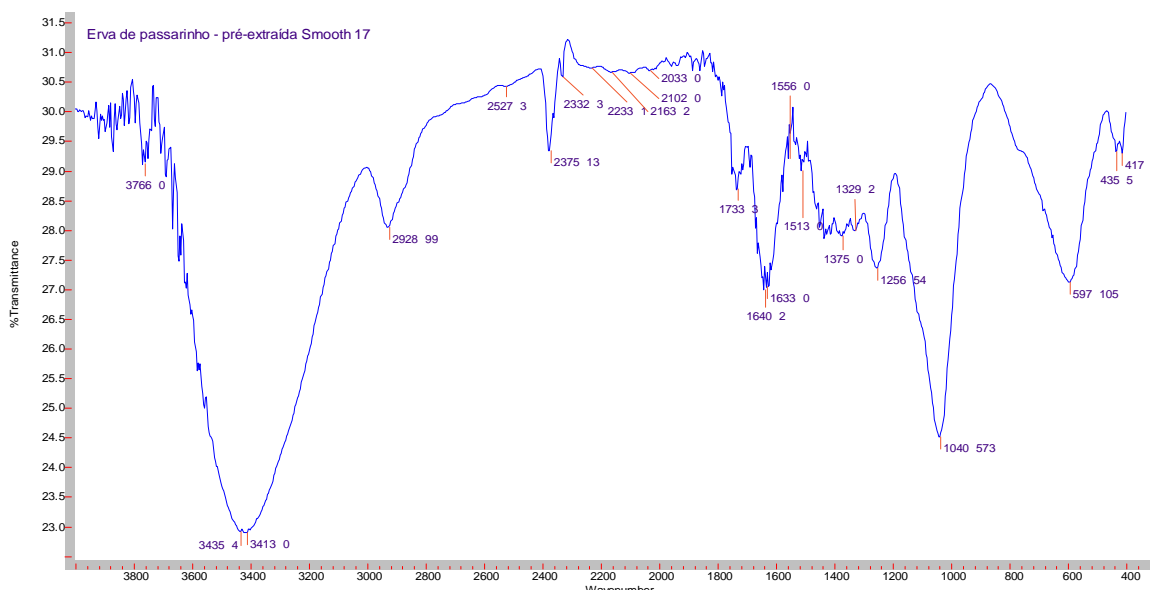
ZILIOOTTO, M. A.; SEITZ, R. A.; MIELKE, E.; SALGUEIRO, R. L. Experiências práticas na condução do controle de ervas-de-passarinho de diferentes espécies na arborização de Curitiba (PR). In: ENCONTRO NACIONAL DE ARBORIZAÇÃO URBANA, 8., 1999, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: SBAU, 1999. p.76 – 78.

ANEXOS

Espectro de infravermelho do material caulinar (parte madura) de *Struthanthus vulgaris* Mart. ao natural. 32 scans / resolução 4 (cm^{-1}) / distância de corrida 4000 – 400 (cm^{-1}) / Smooth 17



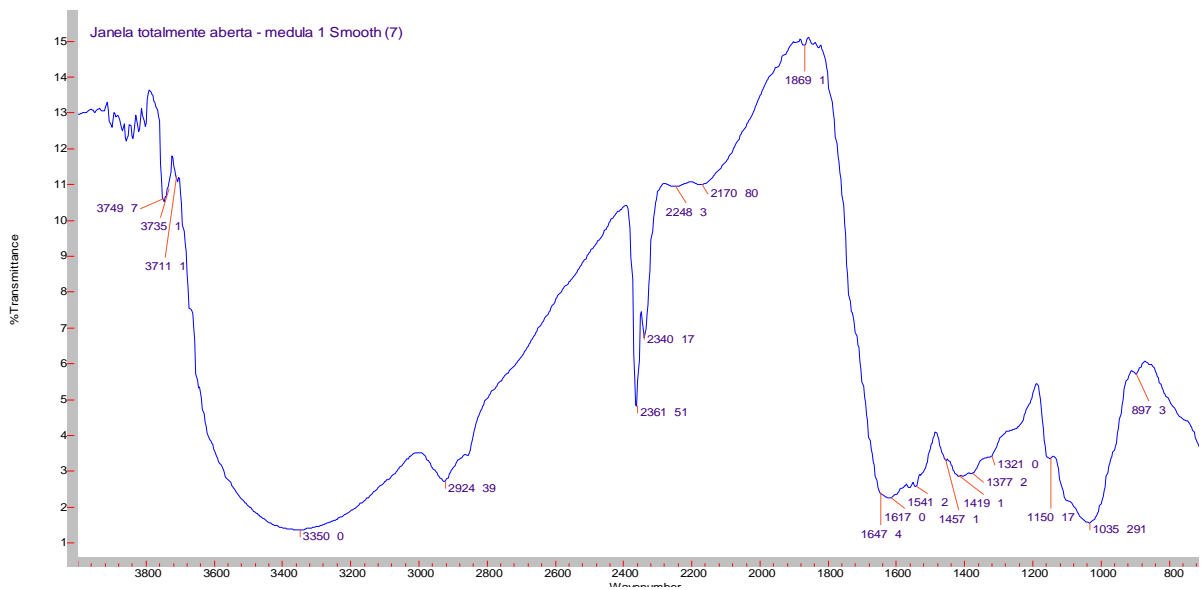
Espectro no infravermelho do material caulinar (parte madura) de *Struthanthus vulgaris* Mart. extraída com ciclohexano, acetato de etila e metanol. 32 scans / resolução 4 (cm^{-1}) / distância de corrida 4000 – 400 (cm^{-1}) / Smooth 17

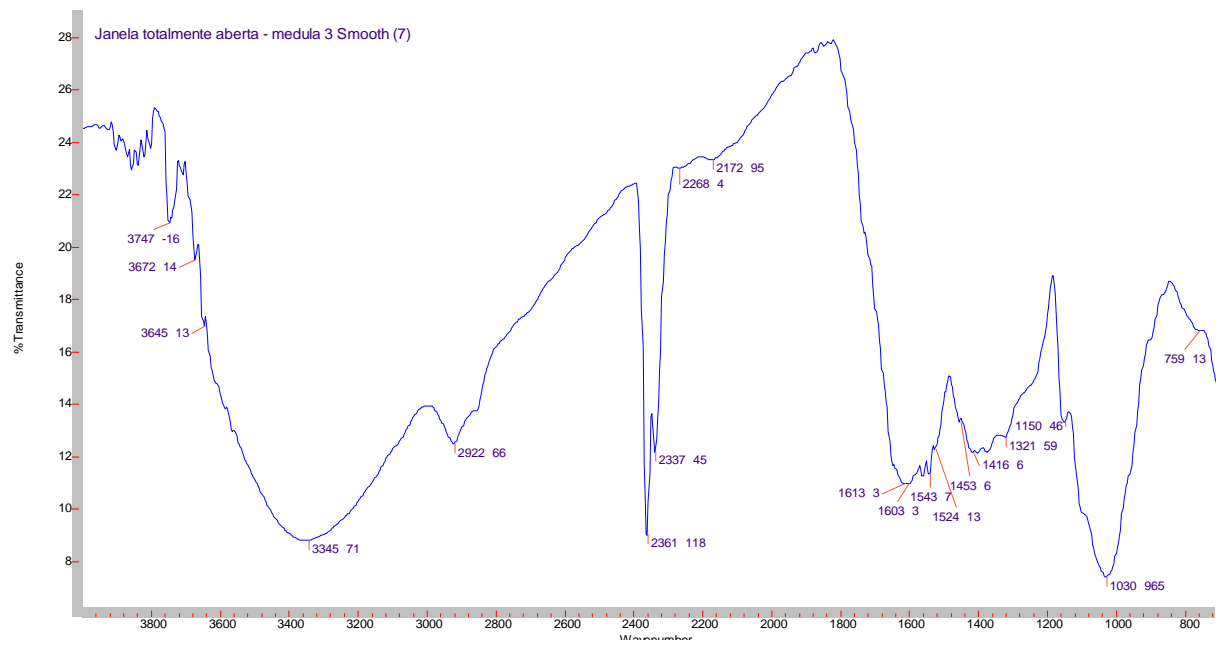
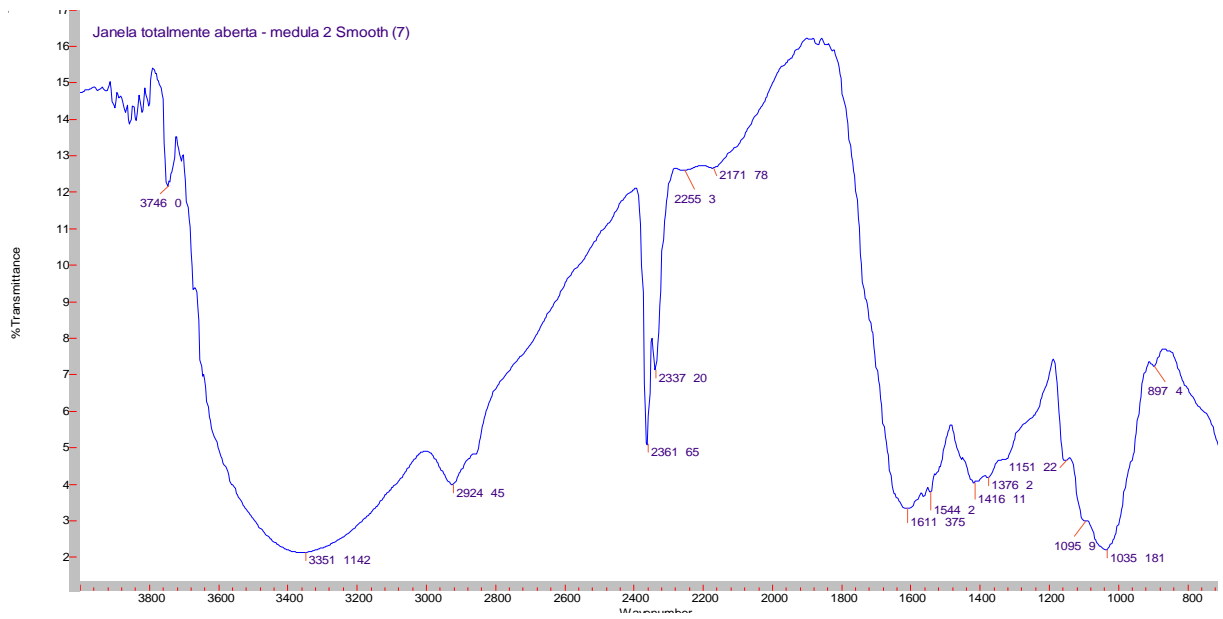


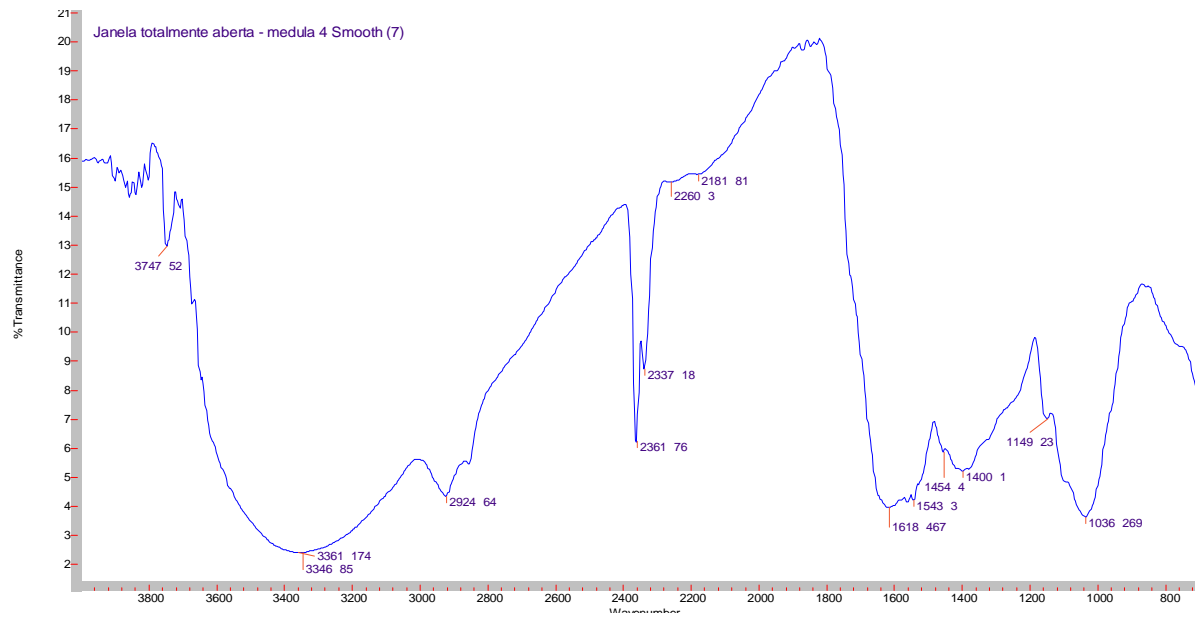
Espectro de infravermelho do material caulinar (parte madura) de *Struthanthus vulgaris* Mart. extraída com cicloexano, acetato de etila e metanol e tratado com NaOH 1%. 32 scans / resolução 4 (cm⁻¹) / distância de corrida 4000 – 400 (cm⁻¹) / Smooth 17



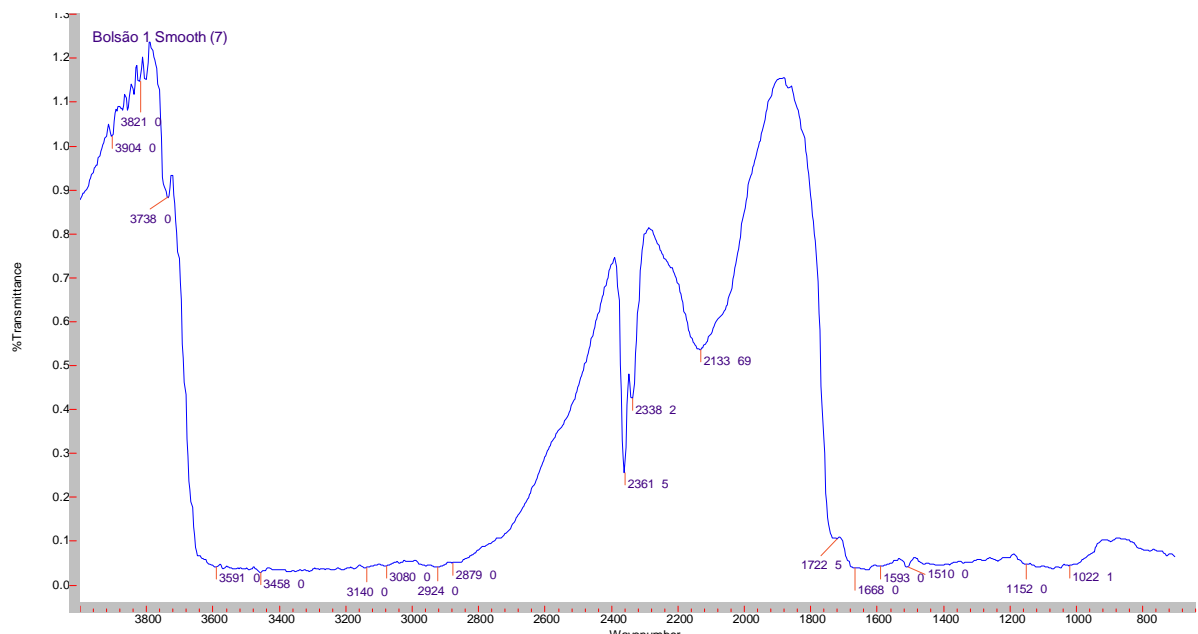
Espectros de infravermelho da seção transversal ao natural (sem aditivos de corantes) liofilizados da parte jovem de *Struthanthus vulgaris* Mart. abrangendo a região medular. Smooth (7) / 128 scans / resolução 4 (cm⁻¹) / distância de corrida 4000 – 700 (cm⁻¹).

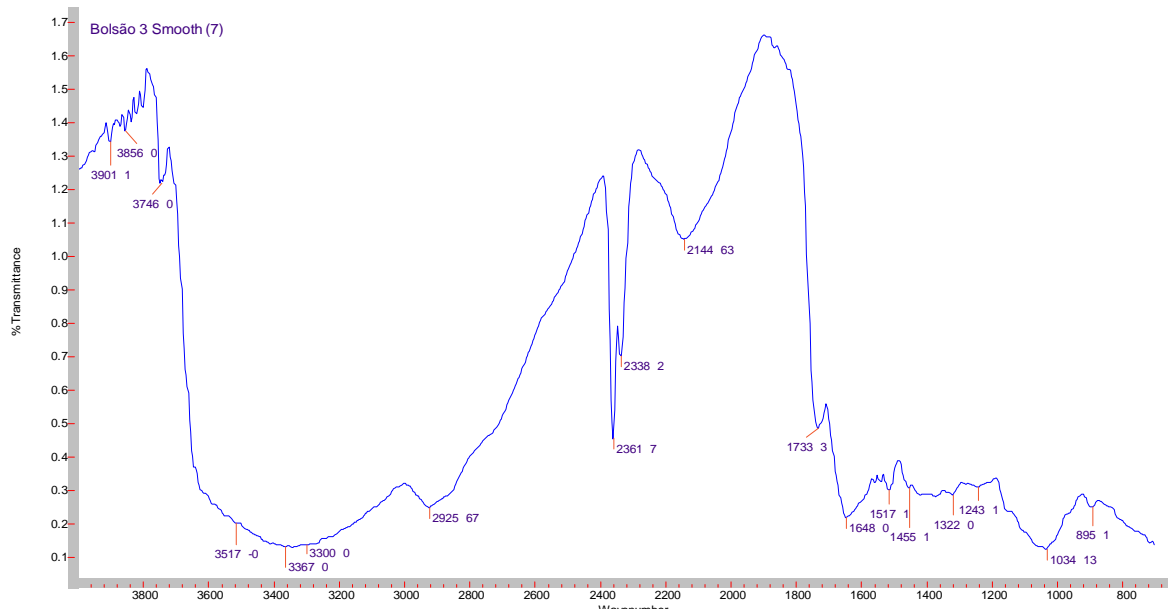
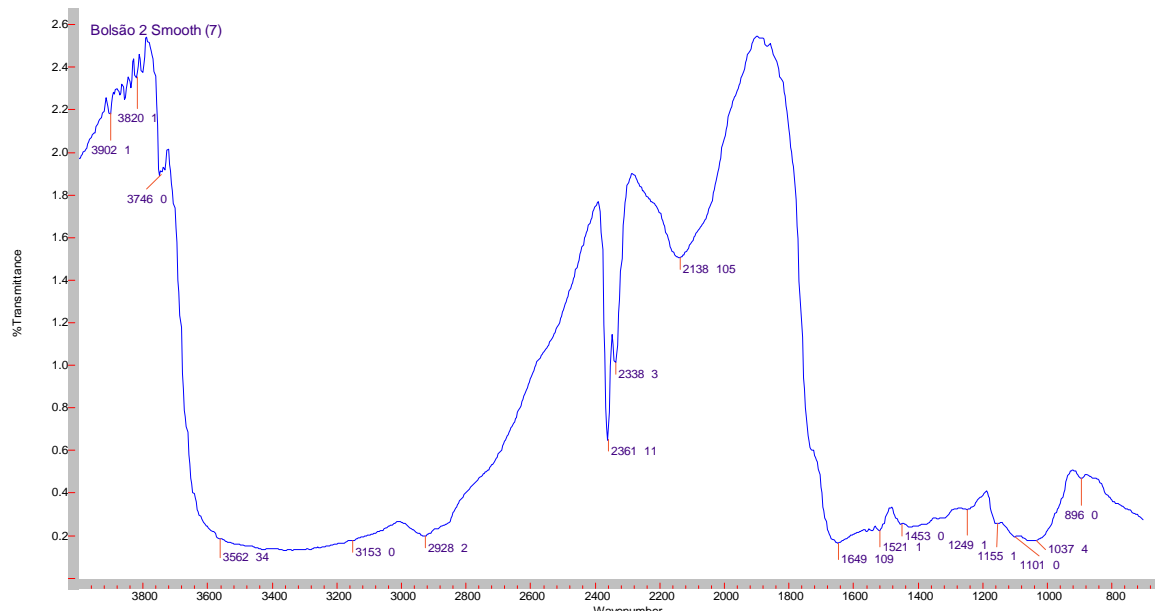


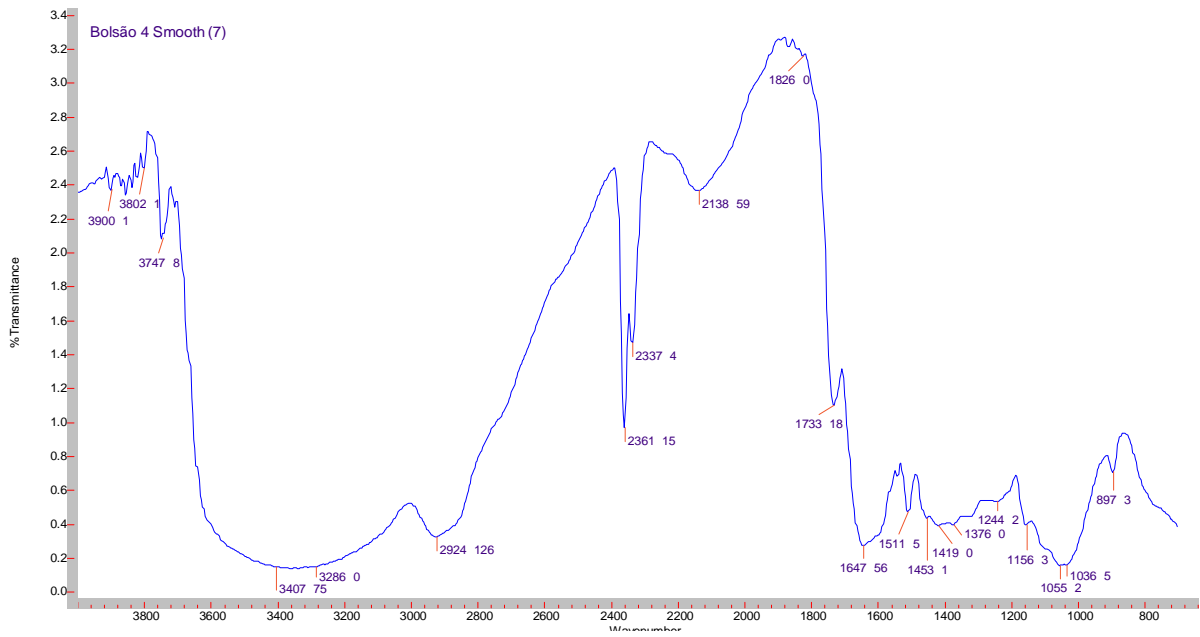




Espectros de infravermelho da seção transversal ao natural (sem aditivos de corantes) liofilizados da parte jovem de *Struthanthus vulgaris* Mart. abrangendo a região das calotas de fibras do floema. Smooth (7) / 128 scans / resolução 4 (cm^{-1}) / distância de corrida 4000 – 700 (cm^{-1}).







Espectros de infravermelho da seção transversal ao natural (sem aditivos de corantes) liofilizados da parte jovem de *Struthanthus vulgaris* Mart. abrangendo a região parenquimatosa. Smooth (7) / 128 scans / resolução 4 (cm⁻¹) / distância de corrida 4000 – 700 (cm⁻¹).

