



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS

JOSY TAINARA SILVA SILVA

**AVANÇOS METODOLÓGICOS NA ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DE LIGNINA NA
PAREDE CELULAR E CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DE MADEIRAS NATIVAS DA
AMAZÔNIA**

JERÔNIMO MONTEIRO - ES
2026

JOSY TAINARA SILVA SILVA

**AVANÇOS METODOLÓGICOS NA ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DE LIGNINA NA
PAREDE CELULAR E CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DE MADEIRAS NATIVAS DA
AMAZÔNIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Florestais na área de Concentração Ciências Florestais. Orientador: Prof. Dr. Jordão Cabral Moulin Coorientador: Prof. Dr. Silvano Intra Moreira.

JERÔNIMO MONTEIRO - ES
2026

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

S586a Silva, Josy Tainara Silva, 2001-
Avanços metodológicos na análise da distribuição de lignina na parede celular e caracterização anatômica de madeiras nativas da Amazônia / Josy Tainara Silva Silva. - 2026.
78 p. : il.

Orientador: Jordão Cabral Moulin.
Coorientador: Silvino Intra Moreira.
Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Microscopia de fluorescência. 2. Espécies amazônicas. 3. Anatomia funcional do xilema. 4. Lignina celular. I. Moulin, Jordão Cabral. II. Moreira, Silvino Intra. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.


CDU: 630

**AVANÇOS METODOLÓGICOS NA ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DE LIGNINA NA
PAREDE CELULAR E CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DE MADEIRAS NATIVAS
DA AMAZÔNIA**


Josy Tainara Silva Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Florestais na Área de Concentração Ciências Florestais.


Aprovada em 24 de fevereiro de 2026.

Documento assinado digitalmente
 **JOAO VICENTE DE FIGUEIREDO LATORRACA**
Data: 11/03/2026 20:54:15-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof. Dr. João Vicente de Figueiredo Latorraca (Examinador externo)
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Documento assinado digitalmente
 **MARIA NARUNA FELIX DE ALMEIDA**
Data: 26/02/2026 17:28:57-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Maria Naruna Félix de Almeida (Examinadora externa)
Universidade do Estado do Pará

Documento assinado digitalmente
 **GRAZIELA BAPTISTA VIDAURRE DAMBROZ**
Data: 26/02/2026 16:04:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Graziela Baptista Vidaurre Dambroz (Examinadora interna)
Universidade Federal do Espírito Santo

Documento assinado digitalmente
 **JORDAO CABRAL MOULIN**
Data: 26/02/2026 14:18:13-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Jordão Cabral Moulin (Orientador)
Universidade Federal do Espírito Santo

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, João Maria e Amária Alves, fontes de incentivo e motivação que tornaram este caminho possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pela vida, pela saúde, pela força diária e por me conduzir ao longo de toda esta caminhada, mostrando-me que sou capaz e corajosa.

À minha família, meu alicerce e minha base. Em especial, ao meu pai, João Maria, e à minha mãe, Amária Alves. Se estou aqui hoje, é graças a eles, que sempre me deram apoio constante, incentivo e nunca mediram esforços para que eu pudesse seguir meus sonhos. Eles não puderam voar, mas criaram uma filha com asas. Aos meus irmãos, João Gabriel, Cássia Fernanda, Willy Maik e Jerredy Maik, pelo carinho, companheirismo e apoio ao longo desta trajetória.

Ao professor da graduação, Prof. Dr. Evandro Ferreira da Silva, que me fez sair da caixinha e enxergar em mim o que eu ainda não conseguia ver. Nunca havia pensado em fazer mestrado, muito menos em sair da minha cidade para um lugar tão distante; foi ele quem me apresentou esse mundo. A ele, meus mais sinceros agradecimentos. Saber que existem professores como você é reconfortante.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jordão Cabral Moulin, pela orientação, confiança, ensinamentos e contribuições fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa. Tenho profundo respeito e admiração pelo grande profissional que é; você é inspiração. Ao meu coorientador, Prof. Dr. Silvino Intra Moreira, pelo apoio, sugestões e valiosas contribuições ao longo do trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, por todo o conhecimento transmitido e pela contribuição à minha formação acadêmica e profissional.

Aos membros da banca examinadora, pelas valiosas contribuições, sugestões e disponibilidade para a avaliação deste trabalho. Em especial, à Profa. Dra. Maria Naruna Félix de Almeida, que esteve comigo desde a graduação, orientou meu trabalho de conclusão de curso e me incentivou a seguir no mestrado, mesmo quando eu não acreditava que conseguiria; guardo você no coração.

Ao marceneiro Elecy Palácio e aos técnicos José Geraldo e Luciano Dias, pelo apoio, dedicação e auxílio no preparo das amostras e no desenvolvimento das atividades experimentais.

À Sâmara Nunes e à Érica Queiroz, que me receberam e me acolheram tão bem quando cheguei a Jerônimo Monteiro. À Aneicy Ramos, Rayana Souza, Ana Júlia e aos amigos que encontrei ao longo desta caminhada, pelo companheirismo, apoio, troca de experiências e pelos momentos de convivência que tornaram essa trajetória mais leve; vocês se tornaram uma verdadeira família.

À Vitória Gomes, minha dupla inseparável que se tornou uma irmã, com quem dividi apartamento, risos, choros e momentos inesquecíveis. Você trouxe felicidade aos meus dias, um verdadeiro presente de Deus para mim. Obrigada por ser você! “Que toda Fátima encontre sua Sueli”.

À Gean Caxias, pelo companheirismo, apoio, incentivo e carinho que tornaram os dias mais leves e marcaram de forma especial este período da minha vida.

Aos integrantes do Laboratório de Anatomia da Madeira (LAM) e do Núcleo de Qualidade da Madeira (NUQMAD), pela convivência e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal do Espírito Santo, ao Departamento de Ciências Florestais e da Madeira e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, pela formação acadêmica, pelas oportunidades concedidas e pela estrutura disponibilizada para a realização desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

A todos, minha profunda gratidão.

RESUMO GERAL

SILVA, Josy Tainara Silva. **Avanços metodológicos na análise da distribuição de lignina na parede celular e caracterização anatômica de madeiras nativas da Amazônia.** 2026. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES. Orientador: Jordão Cabral Moulin. Coorientador: Silvino Intra Moreira.

A madeira de espécies nativas da Floresta Amazônica apresenta elevada complexidade estrutural e química, cuja compreensão ainda é limitada pela escassez de informações. Esta dissertação teve como objetivo avaliar metodologias de análise da lignina por microscopia de fluorescência, bem como caracterizar a anatomia da madeira e analisar a distribuição e a intensidade de fluorescência da lignina em diferentes regiões celulares, em madeiras de espécies nativas da Amazônia, a partir da aplicação da técnica validada. No primeiro capítulo, foram testados diferentes tratamentos químicos e metodologias de processamento de imagens para análise da lignina celular por microscopia de fluorescência, visando à validação da técnica por meio da relação entre o teor de lignina total da madeira e a intensidade de fluorescência emitida em seções histológicas. Foram analisadas sete espécies: melancieira (*Alexa grandiflora* Ducke), angelim saia (*Parkia pendula* (Willd.) Benth. ex Walp.), guaruba (*Vochysia maxima* Ducke), angelim pedra (*Hymenolobium petraeum* Ducke), freijó (*Cordia sagotii* I.M. Johnst.), pequiá (*Caryocar villosum* (Aubl.) Pers.) e angelim vermelho (*Dinizia excelsa* Ducke). O teor total de lignina da madeira foi obtido pelo método de Klason, e para a análise da intensidade de fluorescência foram utilizados quatro tratamentos: autofluorescência *in natura*, autofluorescência sem extrativos, fucsina básica e Mäule. As imagens foram processadas no software *ImageJ*, no qual foram testadas três metodologias de processamento. Os resultados indicaram que a autofluorescência em lâminas sem extrativos, analisada por método automatizado de subtração de *background*, apresentou melhor desempenho e elevada correlação com o teor de lignina total, assegurando rapidez, reprodutibilidade e padronização dos resultados. No segundo capítulo, foram realizadas a caracterização anatômica da madeira e a análise da distribuição e da intensidade de fluorescência da lignina em diferentes regiões celulares. A análise anatômica evidenciou elevada variabilidade interespecífica nas dimensões, frequência e organização dos vasos, fibras, raios e pontoações intervasculares. A análise da lignina revelou predominância de unidades guaiacil nas paredes dos vasos e na lamela média, enquanto as fibras apresentaram variações interespecíficas na composição da lignina. A intensidade de fluorescência foi maior na lamela média, seguida pelas paredes dos vasos e das fibras. De modo geral, os

resultados demonstram que cada espécie amazônica combina vasos, pontoações, fibras, raios e lignina de forma funcionalmente integrada, expressando estratégias anatômicas próprias que sustentam o desempenho hidráulico e a resistência mecânica da madeira.

Palavras-chave: Anatomia funcional do xilema; Espécies amazônicas; *ImageJ*; Lignina celular; Microscopia de fluorescência.

GENERAL ABSTRACT

SILVA, Josy Tainara Silva. **Methodological Advances in the Analysis of Lignin Distribution in the Cell Wall and Anatomical Characterization of Native Amazonian Woods**. 2026. Dissertation (Master's degree in Forest Sciences) – Federal University of Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES, Brazil. Advisor: Jordão Cabral Moulin. Co-advisor: Silvino Intra Moreira.

Wood from native species of the Amazon Forest exhibits high structural and chemical complexity, whose understanding is still limited by the scarcity of available information. This dissertation aimed to evaluate methodologies for lignin analysis using fluorescence microscopy, as well as to characterize wood anatomy and analyze the distribution and fluorescence intensity of lignin in different cellular regions in wood from native Amazonian species, based on the application of the validated technique. In the first chapter, different chemical treatments and image processing methodologies were tested for the analysis of cellular lignin using fluorescence microscopy, aiming to validate the technique through the relationship between total lignin content in wood and the fluorescence intensity emitted in histological sections. Seven species were analyzed: melancieira (*Alexa grandiflora* Ducke), angelim saia (*Parkia pendula* (Willd.) Benth. ex Walp.), guaruba (*Vochysia maxima* Ducke), angelim pedra (*Hymenolobium petraeum* Ducke), freijó (*Cordia sagotii* I.M. Johnst.), pequiá (*Caryocar villosum* (Aubl.) Pers.), and angelim vermelho (*Dinizia excelsa* Ducke). Total lignin content in wood was obtained using the Klason method, and four treatments were used for fluorescence intensity analysis: *in natura* autofluorescence, autofluorescence without extractives, basic fuchsin, and Mäule. Images were processed using the ImageJ software, in which three image processing methodologies were tested. The results indicated that autofluorescence in sections without extractives, analyzed using an automated background subtraction method, showed the best performance and high correlation with total lignin content, ensuring speed, reproducibility, and standardization of the results. In the second chapter, wood anatomical characterization and the analysis of lignin distribution and fluorescence intensity in different cellular regions were performed. The anatomical analysis revealed high interspecific variability in the dimensions, frequency, and organization of vessels, fibers, rays, and intervessel pits. Lignin analysis showed a predominance of guaiacyl units in vessel walls and in the middle lamella, whereas fibers exhibited interspecific variations in lignin composition. Fluorescence intensity was higher in the middle lamella,

followed by vessel and fiber walls. Overall, the results demonstrate that each Amazonian species combines vessels, pits, fibers, rays, and lignin in a functionally integrated manner, expressing distinct anatomical strategies that support hydraulic performance and the mechanical resistance of wood.

Keywords: Functional xylem anatomy; Amazonian species; ImageJ; Cellular lignin; Fluorescence microscopy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	2
2.1 Lignina na madeira e na parede celular	2
2.2 Agentes cromóforos e metodologias para visualização da lignina por fluorescência	4
2.2.1 Autofluorescência.....	5
2.2.2 Fucsina básica	6
2.2.3 Mäule	8
2.2.4 Auramine-O.....	10
REFERÊNCIAS	11
CAPÍTULO 1.....	16
METODOLOGIAS PARA ANÁLISE DA LIGNINA EM MADEIRA POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	16
RESUMO	16
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
2.1 Coleta dos materiais	18
2.2 Amostras para as análises	19
2.3 Teor total de lignina da madeira	19
2.4 Análise da intensidade de fluorescência da lignina na madeira	20
2.4.1 Confeção das lâminas histológicas	20
2.4.2 Tratamentos para obtenção da intensidade de fluorescência da lignina.....	21
2.4.2.1 Autofluorescência em lâminas <i>in natura</i>	21
2.4.2.2 Autofluorescência em lâminas sem extrativos.....	21
2.4.2.3 Mäule.....	21
2.4.2.4 Fucsina básica.....	21
2.4.3 Microscópio de fluorescência	22
2.5 Processamento dos dados.....	22
2.5.1 Método 1	23
2.5.2 Método 2	23
2.5.3 Método 3	24
2.6 Análise estatística dos dados.....	24
3. RESULTADOS.....	25
4. DISCUSSÃO	31
5. CONCLUSÃO	34

6. REFERÊNCIAS	34
CAPÍTULO 2.....	37
CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E DA DISTRIBUIÇÃO DE LIGNINA EM MADEIRAS DE ESPÉCIES NATIVAS DA AMAZÔNIA	37
1. INTRODUÇÃO.....	38
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
2.1 Caracterização anatômica	39
2.1.1 Características dos raios e frequência dos vasos	39
2.1.2 Dimensões dos elementos de vasos e características das pontoações	40
2.1.3 Análise anatômica por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	41
2.1.5 Distribuição da lignina guaiacil e siringil	42
2.2 Análise da lignina por fluorescência	42
2.3 Análise estatística dos dados	43
3. RESULTADOS.....	43
4. DISCUSSÃO	53
5. CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	60
CONCLUSÃO GERAL	65

1. INTRODUÇÃO GERAL

A madeira é um material biológico complexo cuja estrutura e composição refletem uma interação dinâmica entre fatores evolutivos, funcionais e ambientais. Dentre os seus principais componentes, a lignina se destaca como o segundo polímero mais abundante, representando entre 25 e 35% da massa da madeira. Sua estrutura resulta da polimerização de unidades p-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), originadas de alcoóis hidroxicinâmicos, e sua proporção varia amplamente entre grupos taxonômicos e entre os próprios tecidos lenhosos (Vanholme *et al.*, 2019; Novaes *et al.*, 2010). Além de essencial para a rigidez e impermeabilidade do xilema, a lignina atua como barreira química contra patógenos e degradação, sustentando a longevidade e o desempenho mecânico de espécies arbóreas.

A distribuição da lignina na parede celular acompanha o processo de diferenciação do xilema, concentrando-se inicialmente na lamela média e no canto celular, e posteriormente nas camadas secundárias, onde sua proporção e composição determinam a resistência mecânica e a funcionalidade dos diferentes elementos anatômicos (Donaldson, 2001; Raven *et al.*, 2001). Essa heterogeneidade espacial tem implicações diretas sobre a condução hídrica, o suporte estrutural e a adaptação ao ambiente, tornando fundamental sua caracterização em nível celular. No entanto, métodos químicos tradicionais, embora precisos, não permitem visualizar a lignina na microescala, demandando técnicas complementares para compreender sua distribuição e composição ao longo da parede celular.

Nesse contexto, a microscopia de fluorescência tem se consolidado como ferramenta essencial para o estudo da lignina em tecidos vegetais, permitindo visualização direta, rápida e com mínima preparação de amostra. A autofluorescência natural da lignina, bem como métodos químicos como Mäule e fucsina básica, possibilitam a diferenciação de suas unidades estruturais e a quantificação relativa de seu sinal em cortes histológicos (Gierlinger & Schmidt, 2006; Donaldson, 2013). Apesar disso, limitações metodológicas persistem, especialmente relacionadas ao processamento de imagens, aos interferentes fluorescentes e às diferenças na eficiência dos tratamentos químicos, reforçando a necessidade de estudos que validem e aprimorem essas abordagens.

A importância desses avanços é ainda mais evidente quando se trata da madeira de espécies nativas da Amazônia, uma das maiores reservas de biodiversidade arbórea do planeta. Essas espécies apresentam elevada variabilidade anatômica e química, o que influencia diretamente suas propriedades tecnológicas, seu potencial de uso e sua resposta

a condições ambientais (Ferreira *et al.*, 2020; FAO, 2020). No entanto, grande parte desse patrimônio permanece subexplorado cientificamente. A integração entre a análise anatômica e o estudo da lignina emerge como estratégia fundamental. Elementos como vasos e fibras apresentam diferentes graus de lignificação, que determinam desde a eficiência do transporte hídrico até a rigidez e a resistência mecânica da madeira (Donaldson, 2001; Ralph *et al.*, 2019). Assim, compreender simultaneamente a estrutura dos elementos do xilema e a distribuição de lignina em suas paredes fornece uma visão aprofundada da organização funcional da madeira, com implicações diretas em suas propriedades tecnológicas.

Diante disso, este trabalho está estruturado em dois capítulos complementares, que tem como objetivo comparar metodologias de quantificação e distribuição de lignina em nível celular, por microscopia de fluorescência, com foco na caracterização anatômica da madeira de espécies amazônicas. Em conjunto, ambos os capítulos contribuem para o desenvolvimento de ferramentas analíticas mais precisas e aplicáveis ao estudo da lignificação da madeira.

2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Lignina na madeira e na parede celular

A lignina, um dos principais constituintes das paredes celulares lignocelulósicas, é um polímero complexo formado por subunidades fenilpropanóides que conferem suporte estrutural, hidrofobicidade e resistência mecânica às plantas vasculares, além de atuar na defesa contra patógenos (Vanholme *et al.*, 2019). Ocorre predominantemente no xilema da maioria das plantas terrestres, como um componente principal da parede celular de traqueídeos, vasos e fibras. Seu processo de deposição inicia-se na lamela média e cantos celulares, progredindo em direção ao lúmen, com variações quantitativas entre espécies, tecidos, estágios de desenvolvimento e localizações celulares (Donaldson, 2001).

Contribui para a resistência à compressão de caules lenhosos e para a impermeabilização de elementos condutores dentro do xilema (Donaldson, 2001). A lignina nos vasos é geralmente enriquecida em unidades G, enquanto nas fibras é tipicamente enriquecida em unidades S, proporcionando maior flexibilidade e resistência à tração (Saka & Goring, 1985). Uma grande proporção de unidades S também é encontrada nas paredes secundárias do parênquima do raio (Fergus & Goring, 1970).

A composição e teor de lignina diferem significativamente entre folhosas (angiospermas) e coníferas (gimnospermas). Enquanto as coníferas apresentam

predominantemente unidades de guaiacil (G) com pequenas quantidades de p-hidroxifenil (H) e maiores teores totais de lignina, as folhosas contêm proporções variáveis de unidades siringil (S) e guaiacil (G), cuja distribuição depende do tipo celular e da estrutura da parede (Edmunds *et al.*, 2017). Em folhosas, a parede celular do vaso, lamela média e canto celular, geralmente contêm mais unidades G. Devido à sua função estrutural e à necessidade de resistência, os vasos devem suportar as grandes forças compressivas resultantes do fluxo de transpiração em plantas e, portanto, uma maior lignificação da parede celular é esperada para aumentar a resistência à compressão e reduzir sua suscetibilidade ao colapso (Donaldson, 2001). Essa diferença estrutural tem implicações práticas, onde madeiras com maior razão S/G apresentam lignina mais reativa e, conseqüentemente, são mais facilmente deslignificadas (Nawawi *et al.*, 2017).

Em coníferas, a região da lamela média composta da parede celular contém tipicamente mais de 50% de concentração de lignina (p/p), enquanto a região S2 contém cerca de 20%. No entanto, como a parede secundária representa um volume muito maior do que a lamela média relativamente fina, a maior parte da lignina na madeira está localizada na parede secundária, sendo importante diferenciar entre concentração de lignina, que corresponde à quantidade presente dentro de uma região específica da parede celular, e conteúdo de lignina, que se refere à quantidade de lignina em amostras a granel e, portanto, depende de variações na anatomia, como espessura da parede celular e proporção de lenho inicial e lenho tardio (Donaldson, 2001).

A distribuição de lignina entre a parede secundária e a lamela média em fibras de folhosas segue um padrão semelhante ao observado em coníferas. No entanto, a parede secundária das fibras de folhosas geralmente apresenta menor lignificação comparada à dos traqueídeos de coníferas (Donaldson, 2001). A distribuição do conteúdo de lignina pode variar no lenho de reação (tração em folhosas; compressão em coníferas). Em *Eucalyptus grandis*, o lenho de tração exibe menor lignificação que o lenho normal, com a lamela média e cantos celulares sempre apresentando maior concentração de lignina (Souza *et al.*, 2019).

As variações na composição e teor de lignina entre e dentre espécies podem ser influenciadas pelo estágio de desenvolvimento, condições ambientais e função ecológica (Novaes *et al.*, 2010). Na Amazônia, por exemplo, os teores de lignina em espécies arbóreas podem variar de 26,8% a 33,9% (Bimestre *et al.*, 2023), como o angelim vermelho (*Dinizia excelsa* Ducke), que geralmente apresenta teores altos (34,6%), enquanto outras espécies como a guaruba (*Vochysia maxima* Ducke) apresentam teores médios a baixos

(28%) (Ferreira, 2017; Vale *et al.*, 2017). Essas diferenças são importantes tanto para a ecologia das plantas quanto para seu uso industrial.

Na indústria de celulose e papel, a lignina representa tanto um desafio quanto uma oportunidade. Sua remoção eficiente durante o processamento demanda quantidades significativas de produtos químicos e energia, especialmente em madeiras com baixa razão S/G (Li *et al.*, 2003; Cui *et al.*, 2016). Em contrapartida, esse mesmo polímero emerge como matéria-prima valiosa em biorrefinarias, onde técnicas inovadoras como pré-tratamentos com líquidos iônicos permitem seu fracionamento seletivo para produção de biocombustíveis e bioprodutos (Huang *et al.*, 2018). Na indústria energética, a lignina contribui positivamente para a qualidade do carvão vegetal, conferindo maior densidade aparente e poder calorífico. Durante a carbonização, sua degradação lenta, contrastando com a rápida decomposição de celulose e hemicelulose, resulta em maior rendimento energético (Gouvêa *et al.*, 2015).

2.2 Agentes cromóforos e metodologias para visualização da lignina por fluorescência

Um grupo atômico com um elétron, como uma ligação insaturada, é chamado de cromóforo (do grego antigo "portador de cor"). Um grupo atômico com pares de elétrons isolados, como –OH, COOH ou –OR, é chamado de auxocromo, que auxiliam a ação dos cromóforos intensificando a coloração ou permitindo a absorção de luz com comprimento de onda maior (Hon; Shiraishi, 1991). Grupos funcionais na lignina, como α -carbonila, bifenila e ligações duplas conjugadas em anel, são conhecidas por absorver a luz UV e formar cromóforos (Sandoval-Torres *et al.*, 2012). A quinona e a carbonila conjugada são os principais grupos cromóforos, e o fenol hidroxila é o principal grupo auxocromo na madeira (Sandoval-Torres *et al.*, 2010).

O teor de lignina pode ser determinado qualitativa ou quantitativamente através de uma reação cromogênica ou crômica (Liu *et al.*, 2004). Quando os elétrons nesses cromóforos são excitados, eles podem relaxar para seu estado fundamental, liberando energia na forma de luz visível. A intensidade e a cor da fluorescência são influenciadas pela estrutura específica dos cromóforos e suas interações com o ambiente ao redor. A lignina, dessa forma, é o principal emissor na fluorescência das paredes celulares da madeira (Donaldson *et al.*, 2010).

A degradação que a luz provoca na lignina tem início na absorção da radiação ultravioleta ($\lambda=300$ a 400 nm) pelos grupos cromóforos presentes na lignina, ao passo que

ligações éteres são quebradas e novos radicais são formados, resultando em grupos fenóis e cetonas (Johansson, 2000; Pastore, 2004).

Como uma abordagem complementar à quantificação bioquímica, a visualização da lignina em diferentes tipos de tecidos é muito útil para avaliar qualitativamente a distribuição espacial da lignina em uma amostra. A autofluorescência da lignina tem sido usada para determinar sua localização nos tecidos vegetais e quantificá-la (De Micco; Aronne, 2007), mas os sinais de autofluorescência da lignina podem às vezes ser confundidos pela presença de compostos autofluorescentes adicionais na planta. Para isso, foram criadas metodologias que utilizam corantes para visualizar especificamente a lignina.

Os reagentes têm sido utilizados como coloração padrão para avaliar qualitativamente a presença de lignina em material vegetal. No entanto, pouco é conhecido sobre os métodos para avaliar quantitativamente a lignina presente em diferentes locais anatômicos da madeira com base na pigmentação do tecido vegetal, apesar dos esforços para quantificar, a seleção de valores de pixel relevantes de forma imparcial permanece problemática (Kapp *et al.*, 2015). A seguir, são apresentadas algumas metodologias utilizadas para visualização da lignina por fluorescência.

2.2.1 Autofluorescência

As paredes celulares da madeira apresentam fluorescência natural devido à presença de lignina (Albinsson, 1999). A lignina tem uma ampla faixa de emissão de fluorescência e pode ser excitada tanto com luz UV quanto com luz visível, emitindo fluorescência azul, verde e vermelha (Donaldson; Knox, 2012). A autofluorescência tem sido usada para localizar lignina em madeira e polpa, a fim de investigar os efeitos do processamento industrial na fotodegradação de superfícies de madeira, ou para estudar a distribuição de lignina em vários tipos de madeira (Donaldson, 2013).

A microscopia de autofluorescência como um método para visualizar a distribuição de lignina tem uma série de vantagens sobre alguns outros métodos, pois não requer quase nenhuma preparação de amostra além do seccionamento em confecção da lâmina histológica (Donaldson, 2013). Para avaliar a autofluorescência da madeira de *Pinus radiata* D., Donaldson *et al.* (2010), lavaram as amostras em água e fizeram cortes no plano transversal usando um micrótomo de deslize com espessura de 60 µm. Os cortes foram montados em glicerol e examinados utilizando um microscópio confocal espectral usando excitação de luz azul (488 nm) (Figura 1).

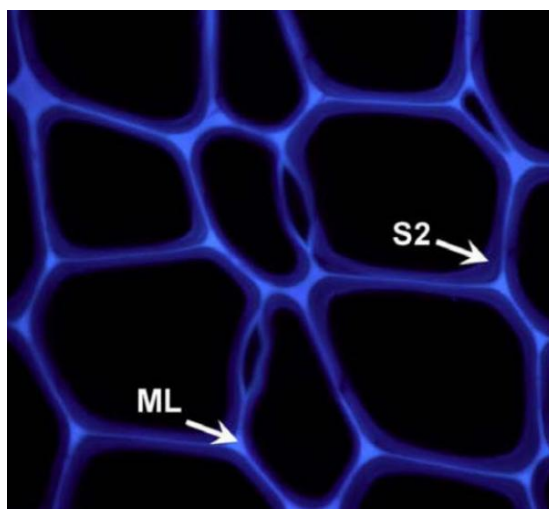


Figura 1 - Imagens de fluorescência confocal na madeira de *Pinus radiata* D. ML: lamela média, S2: camada S2 da parede secundária. As imagens foram construídas representando uma aproximação próxima da cor real usando sobreposições de cores violeta, azul e verde. O campo de visão é de 79 x 79 μm (fonte: Donaldson *et al.*, 2010).

Diferenças de intensidade entre as regiões da parede celular na Figura 1 refletem diferenças na concentração de lignina, quanto mais brilhosa for a região, maior é a concentração de lignina. Por exemplo, na madeira normal, a lamela média é conhecida por ser mais lignificada do que a parede celular secundária e, portanto, produz fluorescência mais brilhante, já na madeira de compressão, a lamela média é menos lignificada do que a parede secundária, produzindo fluorescência mais escura (Donaldson *et al.*, 2010).

A lignina tem um máximo de absorção em 280 nm, tendo fluorescência mais brilhante com excitação UV (Olmstead; Gray, 1997), embora a fluorescência também possa ser observada com excitação azul (440-490 nm) ou mesmo verde (490-565 nm) (Donaldson; Bond, 2005).

2.2.2 Fucsina básica

A fucsina básica é um corante triamino-trifenilmetano amplamente utilizado na indústria têxtil e na biologia celular para coloração do colágeno, músculo e mitocôndrias (Pathrose *et al.*, 2014). Também tem sido usada em uma variedade de espécies de plantas como um corante para paredes celulares lignificadas (Dharmawardhana *et al.*, 1992, 1995; Caño-Delgado *et al.*, 2000; Möller *et al.*, 2005; Wagner *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2013; Rocha *et al.*, 2014). A intensidade da coloração com fucsina básica correlaciona-se qualitativamente com a abundância de lignina nas paredes celulares (Wagner *et al.*, 2009).

O corante fucsina básica, foi usado por Kapp *et al.* (2015) para medir a lignificação em seções transversais, basais e entrenó do caule de *Brachypodium distachyon* e avaliar diferenças na lignificação para três ecótipos de *B. distachyon* que variam no tempo de floração. Para a coloração em fucsina básica, os cortes anatômicos foram incubados em

15 µl de fucsina básica a 0,001% ou 0,01% (Sigma 857343, teor de corante ≥88%), respectivamente, em água por 5min, lavados duas vezes com glicerol 50% (v/v) (10min por lavagem) e montados em glicerol 50%. Para a visualização e fotografias, utilizou-se um microscópio confocal de disco giratório, com objetivas de 20×0,50 NA e 63×1,4 NA sob excitação de 561 nm e emissão de 593/40 nm.

Para a quantificação do teor de lignina, após a obtenção de imagens, a área fluorescente de cada seção corada pela fucsina básica foi selecionada no *ImageJ* (NIH), usando o plugin de limite automático padrão com as caixas 'ignorar preto' e 'ignorar branco' marcadas para contabilizar quaisquer pixels sub ou superexpostos. Como esse algoritmo converte imagens em profundidade de 8 bits, a área limitada foi selecionada, e salva como um ROI e reaplicada à imagem original de 16 bits. A densidade integrada bruta (soma de todas as intensidades de pixel) da área limiarizada foi então medida. Este valor foi normalizado para toda a área do caule medida a partir de uma seção transversal do caule para cada planta, traçando o perímetro da seção no *ImageJ*. Os valores de intensidade de fluorescência da fucsina básica normalizados por área representam a quantidade de coloração de fucsina básica para cada seção e servem como uma medida quantitativa da coloração dentro dessa seção (Kapp *et al.*, 2015).

A quantificação da intensidade da fluorescência por meio da imagem do corante fluorogênico fucsina básica forneceu uma estimativa rápida das concentrações de ligninas e outros compostos hidrofóbicos em seções de tecido vegetal. No nível subcelular, a fluorescência da fucsina básica foi concentrada nas lamelas médias e nos cantos das células em todos os três ecótipos de *B. distachyon* (Figura 2), onde se acredita que a polimerização da lignina seja iniciada (Kapp *et al.*, 2015).

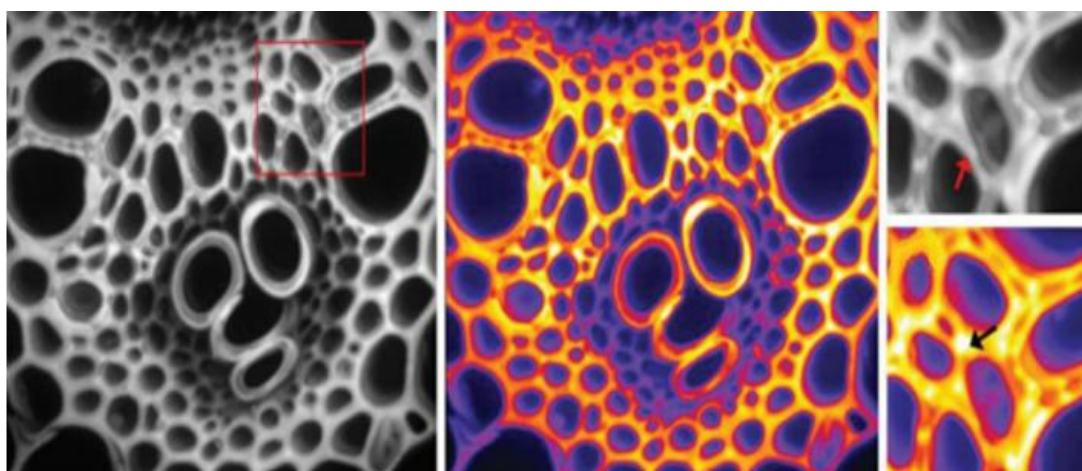


Figura 2 - Imagem de alta magnificação da coloração fucsina básica, revelando a intensidade de fluorescência nas lamelas médias e cantos celulares e padrões semelhantes a treliças nas paredes dos elementos de vasos. As inserções mostram ampliação da área delineada em vermelho mostrando coloração de alta intensidade nas lamelas médias (setas vermelhas) e nos cantos das células (setas pretas) (fonte: Kapp *et al.*, 2015).

No emprego de corantes como a fucsina básica, antecede a esse reagente a necessidade de limpeza da lâmina, o clearsee, composto por xilitol ($C_5H_{12}O_5$) 10% (m/v), sodium deoxycholate ($C_{76}H_{11}NaO_8$) 15% (m/v), ureia ($CO(NH_2)_2$) 25% (m/v) e água (Ursache *et al.* 2018), é um reagente de limpeza para tecidos vegetais que mantém sua integridade estrutural, permitindo imagens profundas (Kurihara *et al.*, 2015). A fucsina básica é solúvel em clearsee e mantém suas características espectrais com seu máximo de emissão no espectro laranja (590-630) e vermelho (630-780).

Ursache *et al.* (2018) desenvolveram um trabalho metodológico para folhas, flores, raízes e caule, e descobriram que, após a limpeza com clearsee e coloração das raízes de *Arabidopsis*, com fucsina básica 0,2%, ouve a coloração das paredes celulares secundárias e lignificadas do protoxilema e metaxilema (Figura 3). Apesar da eficácia da metodologia em raízes, ainda não há estudos com a aplicação dessa metodologia em tecidos lenhosos.

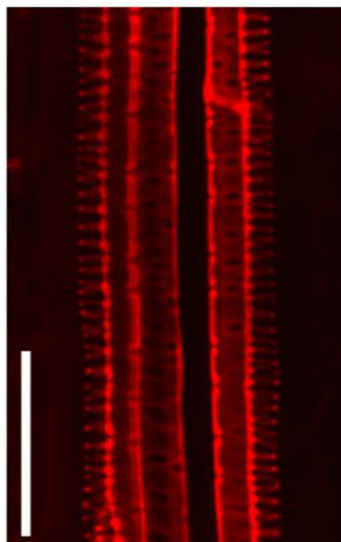


Figura 3 - Coloração da raiz de *Arabidopsis* com fucsina básica. Barras de escala = 50 μ m. (fonte: Ursache *et al.*, 2018).

2.2.3 Mäule

O teste de cor Mäule, que é realizado por tratamento sequencial com permanganato de potássio ($KMnO_4$), cloridrato e amônia aquosa, é um dos métodos mais eficientes para detecção de lignina (Yamashita *et al.*, 2016). Isso porque ele possibilita a distinção dos tipos de lignina, sendo possível visualizar a sua distribuição, na medida em que cora a lignina siringil em vermelho e a lignina guaiacil em amarelo (Nakagawa *et al.*, 2012). O $KMnO_4$ é frequentemente usado para investigar a lignificação da parede celular por microscopia eletrônica de transmissão (Bland *et al.*, 1971).

Para desenvolver cor por meio da metodologia de Mäule, Yamashita *et al.* (2016) examinaram a fluorescência de amostras de madeira de *Betula platyphylla*, excitadas com luz azul (440-490 nm). Os cortes anatômicos foram tratados com solução aquosa de $KMnO_4$

a 1% (m/m) por 5 min, lavados três vezes com água destilada, tratados com ácido clorídrico 1 N por 30 min e depois lavados com água destilada. Para gerar uma reação de cor, foi adicionada amônia aquosa a 28% (m/v) às seções montadas em lâminas de vidro e cobertas com lamínulas. Além disso, foi testado também o tampão Tris-HCl (pH 8, 1 M) em vez de amônia aquosa. Para a observação microscópica, a fluorescência da lignina foi visualizada sob um microscópio com fluorescência excitada pela luz azul (460-490 nm).

As paredes celulares das fibras da madeira, dos raios e do parênquima axial emitiram uma fluorescência vermelha, enquanto a parede celular dos vasos emitiu uma fluorescência amarela a vermelha (Figura 4). Usar o tampão Tris-HCl em vez de amônia na reação Mäule resultou no desenvolvimento de cor semelhante ao encontrado usando o método tradicional. No entanto, o novo método foi resistente ao desbotamento da cor com o tempo e extraiu lignina de cor menos visível da parede celular. Além disso, a avaliação após excitação com luz azul (em torno de 480 nm) melhorou a observação da lignificação e da distribuição da lignina (Yamashita *et al.*, 2016).

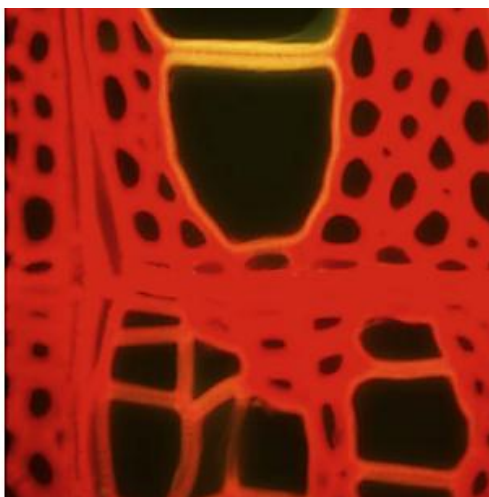


Figura 4 - Seção transversal (20 μm de espessura) de *Betula platyphylla*, tratada com reagente Mäule e fotografada com excitação da luz azul (480 nm) (fonte: Yamashita *et al.*, 2016).

Yang *et al.* (2020) realizaram a metodologia de Mäule para determinar o conteúdo de lignina em espécies de madeira, com o intuito de obter referências de dados e uma base teórica. Foram feitos cortes anatômicos de 10 μm a 20 μm de espessura em micrótomo, onde posteriormente foram tratados com uma solução aquosa de permanganato de KMnO_4 a 1% (m/v) por 5 min, lavados 3 vezes com água destilada, depois tratados com ácido clorídrico (HCl) 3 M por 1 min, lavados novamente 3 vezes com água destilada e depois montados em uma solução aquosa de amônia a 29%, os cortes foram então observados por meio de um microscópio de fluorescência (luz azul com fonte de excitação de 488 nm).

A reação de coloração de Mäule coloriu ligninas S na parede celular da madeira em um vermelho/roxo-avermelhado, e ligninas G em um amarelo/marrom-amarelado. O tipo de

lignina em *Cunninghamia lanceolata* foi o tipo G, a reação de fluorescência foi muito forte, o que indicou um maior teor de lignina nessa madeira. As reações de fluorescência às ligninas na madeira de *Betula alnoides* e *Fraxinus mandshurica* indicou que o conteúdo de lignina nas madeiras foi menor do que nas outras espécies testadas. *Tectona grandis* foi a que teve mais ligninas do tipo G, e a reação geral de fluorescência foi mais forte do que nas outras espécies testadas (Yang *et al.*, 2020).

2.2.4 Auramine-O

O corante auramine-O, tem sido usado para detectar lignina em paredes celulares secundárias de culturas de células de elementos traqueais de *Zinnia* em diferenciação (Pesquet *et al.*, 2005), bem como esporopolenina lignificada, o polímero quimicamente resistente que compreende a exina (Nishikawa *et al.*, 2005). Foi usado por Souza *et al.* (2019) para analisar a distribuição espacial do conteúdo de lignina na parede celular das fibras dos lenhos normal e de reação de *Eucalyptus grandis*. Para isso, foram utilizados cortes transversais de 7 µm de espessura retirados nas três posições de amostragem no sentido medula-casca, preparados em micrótomo de deslize. Após essa etapa, os cortes foram colocados em lâmina de vidro e corados com auramina (1%) por 20 minutos. Os cortes foram examinados em microscópio laser confocal, com o software Zen 2012. As imagens foram geradas a partir da sobreposição de 7 planos focais ao longo do eixo Z (Z-stack), para cada posição analisada.

Para determinação da intensidade de fluorescência da lignina marcada com auramina, foram realizadas 20 medições em três imagens geradas para cada posição medula-casca, através do software *ImageJ*, utilizando o parâmetro "INT DEN". A medição da intensidade da lignina foi feita através da fórmula adaptada de Fernando *et al.* (2015): Intensidade de lignina = Densidade integrada - (área selecionada x intensidade do *background*). O lenho de tração apresentou menor intensidade de fluorescência da lignina em relação ao lenho normal e o oposto a tração. Tanto no lenho normal quanto no lenho de reação, as regiões da lamela média e do canto celular apresentaram maior intensidade de fluorescência da lignina, mostrando que nesses locais a concentração de lignina é maior do que nos demais (Figura 5). Em algumas regiões do lenho de tração as células apresentaram achatamento e diminuição da lamela média. Não foi possível identificar um padrão de variação da intensidade de fluorescência da lignina no sentido medula-casca (Souza *et al.*, 2019).

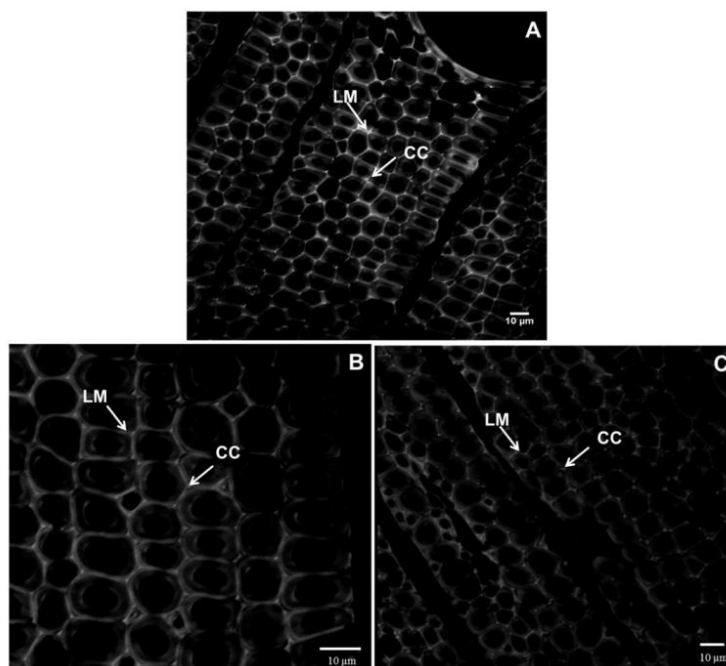


Figura 5 - Imagem de fluorescência da lignina nos lenhos normal (A), lenho de tração (B) e lenho oposto (C) de *Eucalyptus grandis*. A lamela média (LM) e canto celular (CC) indicados pela seta apresenta maior intensidade de fluorescência. (fonte: Souza *et al.*, 2019).

REFERÊNCIAS

- ALBINSSON, B.; LI, S.; LUNDQUIST, K.; STOMBERG, R. The origin of lignin fluorescence. **Journal of Molecular Structure**, v. 508, p. 19-27, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(98\)00913-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(98)00913-2)
- BIMESTRE, T.; SILVA, F.; TUNA, C.; SANTOS, J.; CARVALHO, J.; CANETTIERI, E. Physicochemical Characterization and Thermal Behavior of Different Wood Species from the Amazon Biome. **Energies**, v. 16, n. 5, 2257, 2023. <https://doi.org/10.3390/en16052257>
- BLAND, D. E.; FOSTER, R. C.; LOGAN, A. F. The mechanism of permanganate and osmium tetroxide fixation and distribution of lignin in cell wall of *Pinus radiata*. **Holzforschung**, v. 25, n. 5, p. 137-143, 1971. <https://doi.org/10.1515/hfsg.1971.25.5.137>
- CAÑO-DELGADO, A. I.; METZLAFF, K.; BEVAN, M. W. The eli1 mutation reveals a link between cell expansion and secondary cell wall formation in *Arabidopsis thaliana*. **Development**, v. 127, n. 15, p. 3395-3405, 2000. <https://doi.org/10.1242/dev.127.15.3395>
- CUI, H. S.; YANG, S. M.; LIU, X. E.; MA, J. F.; TIAN, G. L. Chemical composition and lignin distribution of *Salix integra*. **Chemistry and Industry of Forest Products**, v. 36, n. 5, p. 120-126, 2016. <https://doi.org/10.3969/j.issn.0253-2417.2016.05.018>
- DE MICCO, V.; ARONNE, G. Combined histochemistry and autofluorescence for identifying lignin distribution in cell walls. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 82, n. 4-5, p. 209-216, 2007. <https://doi.org/10.1080/10520290701713981>
- DHARMAWARDHANA, D. P.; ELLIS, B. E.; CARLSON, J. E. Characterization of Vascular Lignification in *Arabidopsis thaliana*. **Canadian Journal of Botany**, v. 70, n. 11, p. 2238-2244, 1992. <https://doi.org/10.1139/b92-277>
- DONALDSON, L. A.; BOND, J. **Fluorescence Microscopy of Wood**. Rotorua: Scion, 2005.

1 CD-ROM.

DONALDSON, L. A. Lignification and lignin topochemistry - an ultrastructural view. **Phytochemistry**, v. 57, n. 6, p. 859-873, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00049-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00049-8)

DONALDSON, L. A. Softwood and hardwood lignin fluorescence spectra of wood cell walls in different mounting media. **IAWA Journal**, v. 34, n. 1, p. 3-19, 2013. <https://doi.org/10.1163/22941932-00000002>

DONALDSON, L. A.; KNOX, J. P. Localisation of cell wall polysaccharides in normal and compression wood of radiata pine: Relationships with lignification and microfibril orientation. **Plant Physiology**, v. 158, n. 2, p. 642-653, 2012. <https://doi.org/10.1104/pp.111.184036>

DONALDSON, L. A.; RADOTIĆ, R.; KALAUZI, A.; DJIKANOVIĆ, D.; JEREMIĆ, M. Quantification of compression wood severity in tracheids of *Pinus radiata* D. Don using confocal fluorescence imaging and spectral deconvolution. **Journal of Structural Biology**, v. 169, n. 1, p. 106-115, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.09.006>

EDMUNDS, C. W.; PERALTA, P.; KELLEY, S. S.; CHIANG, V. L.; SHARMA-SHIVAPPA, R. R.; DAVIS, M. F.; HARMAN-WARE, A. E.; SYKES, R. W.; GJERSING, E.; CUNNINGHAM, M. W.; ROTTMANN, W.; MILLER, Z. D.; PESZLEN, I. Characterization and enzymatic hydrolysis of wood from transgenic *Pinus taeda* engineered with syringyl lignin or reduced lignin content. **Cellulose**, v. 24, n. 5, p. 1901-1914, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1231-z>

FERGUS, B. J.; GORING, D. A. I. The location of guaiacyl and syringyl lignins in birch xylem tissue. **Holzforschung**, v. 24, n. 4, p. 113-117, 1970. <https://doi.org/10.1515/hfsq.1970.24.4.113>

FERNANDO, C.; AUDIBERT, A.; SIMON, F.; TAZI, J.; JUGE, F. A role for the serine/arginine-rich (SR) protein B52/SRSF6 in cell growth and Myc expression in *Drosophila*. **Genetics**, v. 199, n. 4, p. 1201-1211, 2015. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.174391>

FERREIRA, G. **Viabilidade técnica da produção de pellets de resíduos de madeira das espécies *Dinizia excelsa* Ducke e *Manilkara elata* (Allemão ex Miq.) Monach. para fins energéticos**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, 2017.

GOUVÊA, A. F. G.; TRUGILHO, P. F.; ASSIS, C. O.; ASSIS, M. R.; COLODETTE, J. L.; GOMES, C. M. Avaliação do Efeito da Relação Siringila/Guaiacila da Lignina de Eucalipto na Produção de Carvão Vegetal. **Ciência da Madeira**, v. 6, n. 1, p. 71-78, 2015. <https://doi.org/10.12953/2177-6830/rcm.v6n1p71-78>

HON, D. N. S.; SHIRAIISHI, N. **Wood and Cellulosic Chemistry**. New York: Marcel Dekker, 1991.

HUANG, Y.; DUAN, Y.; QIU, S.; WANG, M.; JU, C.; HUI, C.; FANG, Y.; TAN, T. Lignin-first biorefinery: a reusable catalyst for lignin depolymerization and application of lignin oil to jet fuel aromatics and polyurethane feedstock. **Sustainable Energy and Fuels**, v. 2, n. 3, p. 637-647, 2018. <https://doi.org/10.1039/C7SE00535K>

JOHANSSON, M. **Formation of chromophores and leucochromophores during manufacturing of mechanical pulp**. 2000. Licentiate Thesis - Royal Institute of

Technology, Stockholm, 2000.

KAPP, N.; BARNES, W. J.; RICHARD, T. L.; ANDERSON, C. T. Imaging with the fluorogenic dye Basic Fuchsin reveals subcellular patterning and ecotype variation of lignification in *Brachypodium distachyon*. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 14, p. 4295-4304, 2015. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv158>

KURIHARA, D.; MIZUTA, Y.; SATO, Y.; HIGASHIYAMA, T. ClearSee: a rapid optical clearing reagent for whole-plant fluorescence imaging. **Development**, v. 142, n. 23, p. 4168-4179, 2015. <https://doi.org/10.1242/dev.127613>

LI, L.; ZHOU, Y.; CHENG, X.; SUN, J.; MARITA, J.; RALPH, J.; CHIANG, V. Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multigene cotransformation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 8, p. 4939-4944, 2003. <https://doi.org/10.1073/pnas.0831166100>

LIU, Y. X.; ZHAO, G. J. **Wood Resource Material Science**. Beijing: Chinese Forestry Press, 2004.

MÖLLER, R.; STEWARD, D.; PHILLIPS, L.; HEATHER, F.; WAGNER, A. Gene silencing of cinnamyl alcohol dehydrogenase in *Pinus radiata* callus cultures. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 12, p. 1061-1066, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.11.001>

NAKAGAWA, K.; YOSHINAGA, A.; TAKABE, K. Anatomy and lignin distribution in reaction phloem fibres of several Japanese hardwoods. **Annals of Botany**, v. 110, n. 4, p. 897-904, 2012. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs144>

NAWAWI, D.; SYAFII, W.; TOMODA, I.; UCHIDA, Y.; AKIYAMA, T.; YOKOYAMA, T.; MATSUMOTO, Y. Characteristics and Reactivity of Lignin in Acacia and Eucalyptus Woods. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 37, n. 4, p. 273-282, 2017. <https://doi.org/10.1080/02773813.2017.1291684>

NISHIKAWA, S.; ZINKL, G. M.; SWANSON, R. J.; MARUYAMA, D.; PREUSS, D. Callose (beta-1,3 glucan) is essential for *Arabidopsis* pollen wall patterning, but not tube growth. **BMC Plant Biology**, v. 5, n. 22, 2005. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-5-22>

NOVAES, E.; KIRST, M.; CHIANG, V.; WINTER-SEDEROFF, H.; SEDEROFF, R. Lignin and biomass: a negative correlation for wood formation and lignin content in trees. **Plant Physiology**, v. 154, n. 2, p. 555-561, 2010. <https://doi.org/10.1104/pp.110.161281>

OLMSTEAD, J. A.; GRAY, D. G. Fluorescence spectroscopy of cellulose, lignin and mechanical pulps: a review. **Journal of Pulp and Paper Science**, v. 23, n. 12, p. 571-581, 1997.

PASTORE, T. C. M. **Estudos do efeito da radiação ultravioleta em madeiras por espectroscopias raman (ft-raman), de refletância difusa no infravermelho (drift) e no visível (cie-l*a*b*)**. 2004. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília, Brasília, 2004.

PATHROSE, B.; SAHIRA, H.; NAMPOORI, V. P. N.; RADHAKRISHNAN, P.; MUJEEB, A. Variations in fluorescence quantum yield of Basic Fuchsin with silver nanoparticles prepared by femtosecond laser ablation. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 128, p. 522-526, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.02.078>

PESQUET, E.; RANOCHA, P.; LEGAY, S.; DIGONNET, C.; BARBIER, O.; PICHON, M.; GOFFNER, D. Novel markers of xylogenesis in zinnia are differentially regulated by auxin and cytokinin. **Plant Physiology**, v. 139, n. 4, p. 1821-1839, 2005. <https://doi.org/10.1104/pp.105.064337>

PLOMION, C.; LEPROVOST, G.; STOKES, A. Wood Formation in Trees. **Plant Physiology**, v. 127, n. 4, p. 1513-1523, 2001. <https://doi.org/10.1104/pp.010816>

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biology of Plants**. 6th ed. New York: W.H. Freeman and Worth Publishers, 1999.

ROCHA, S.; MONJARDINO, P.; MENDONÇA, P.; CÂMARA MACHADO, A.; FERNANDES, R.; SAMPAIO, P.; SALEMA, R. Lignification of developing maize (*Zea mays* L.) endosperm transfer cells and starchy endosperm cells. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. 102, 2014. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00102>

SAKA, S.; GORING, D. A. I. Localization of Lignins in Wood Cell Walls. In: HIGUCHI, T. (Ed.). **Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components**. Orlando: Academic Press, 1985. p. 51-62.

SANDOVAL-TORRES, S.; JOMAA, W.; MARC, F.; PUIGGALI, J. R. Causes of color changes in wood during drying. **Forestry Studies in China**, v. 12, n. 3, p. 167-175, 2010. <https://doi.org/10.1007/s11632-010-0404-8>

SANDOVAL-TORRES, S.; JOMAA, W.; MARC, F.; PUIGGALI, J. R. Colour alteration and chemistry changes in oak wood (*Quercus pedunculata* Ehrh) during plain vacuum drying. **Wood Science and Technology**, v. 46, n. 5, p. 177-191, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00226-010-0381-z>

SMITH, R.; SCHUETZ, M.; ROACH, M.; MANSFIELD, S. D.; ELLIS, B.; SAMUELS, L. A. Neighboring parenchyma cells contribute to *Arabidopsis* xylem lignification, while lignification of interfascicular fibers is cell autonomous. **The Plant Cell**, v. 25, n. 10, p. 3988-3999, 2013. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.117176>

SOUZA, M. T.; LIMA, J. T.; ASSIS, C. O.; SOARES, B. C.; LIMA, L. C.; MOREIRA, S. I. Distribuição espacial da lignina na parede celular da madeira de *Eucalyptus grandis*. **Scientia Forestalis**, v. 47, n. 121, p. 125-130, 2019. <https://doi.org/10.18671/scifor.v47n121.12>

URSACHE, R.; ANDERSEN, T. G.; MARHAVÝ, P.; GELDNER, N. A protocol for combining fluorescent proteins with histological stains for diverse cell wall components. **The Plant Journal**, v. 93, n. 2, p. 399-412, 2018. <https://doi.org/10.1111/tpj.13784>

VALE, A. E. N.; NUNES, M. L.; BATISTA, A. C. G.; VALENTE, B.; SOUZA, M. J. L. Determinação dos teores extrativos e lignina de três espécies amazônicas: medida de comparação para que não sejam comercializadas como mogno Brasileiro (*Swietenia macrophylla* King.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA MADEIRA, 2017, Campinas. **Anais...** Campinas: CBCTEM, 2017.

VANHOLME, R.; MEESTER, B.; RALPH, J.; BOERJAN, W. Lignin biosynthesis and its integration into metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 56, p. 230-239, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.018>

WAGNER, A.; DONALDSON, L.; KIM, H.; PHILLIPS, L.; FLINT, H.; STEWARD, D.; TORR, K.; KOCH, G.; SCHMITT, U.; RALPH, J. Suppression of 4-coumarate-CoA ligase in the

coniferous gymnosperm *Pinus radiata*. **Plant Physiology**, v. 149, n. 1, p. 370-383, 2009. <https://doi.org/10.1104/pp.108.125765>

YAMASHITA, D.; KIMURA, S.; WADA, M.; TAKABE, K. Improved Maule color reaction provides more detailed information on syringyl lignin distribution in hardwood. **Journal of Wood Science**, v. 62, n. 2, p. 131-137, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10086-016-1536-9>

YANG, Y.; HE, Y.; HAN, L.; WANG, A.; WANG, W.; ZHAO, R.; LI, B. Application of histochemical stains for rapid qualitative analysis of the lignin content in multiple wood species. **BioResources**, v. 15, n. 2, p. 3524-3533, 2020. <https://doi.org/10.15376/biores.15.2.3524-3533>

CAPÍTULO 1

METODOLOGIAS PARA ANÁLISE DA LIGNINA EM MADEIRA POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

RESUMO

A heterogeneidade espacial da distribuição da lignina tem implicações diretas sobre a condução hídrica, o suporte estrutural e a adaptação ao ambiente, tornando fundamental sua caracterização em nível celular. O objetivo deste estudo foi testar diferentes tratamentos químicos e metodologias de análise da lignina celular por microscopia de fluorescência em tecidos lenhosos. A validação da técnica de fluorescência para análise de lignina foi realizada por meio da análise da relação do teor de lignina total da madeira com a intensidade de fluorescência emitida pela lignina em seções histológicas. Foram analisadas sete espécies nativas da Amazônia: melanciaira (*Alexa grandiflora* Ducke); angelim saia (*Parkia pendula* (Willd.) Benth. Ex Walp.); guaruba (*Vochysia maxima* Ducke); angelim pedra (*Hymenolobium petraeum* Ducke); freijó (*Cordia sagotii* I.M. Johnst.); pequiá (*Caryocar villosum* (Aubl.) Pers) e angelim vermelho (*Dinizia excelsa* Ducke). O teor de lignina da madeira foi obtido pelo método de Klason, e para a análise da intensidade de fluorescência foram utilizados quatro tratamentos nas seções histológicas: autofluorescência *in natura*, autofluorescência sem extrativos, fucsina básica e Mäule. Para o processamento das imagens obtidas no microscópio de fluorescência foi usado o software *ImageJ*, aplicando três diferentes metodologias, sendo duas com o uso de fórmula de densidade integrada para remoção de *background* de área não fluorescente da imagem, e uma determinando a intensidade de fluorescência de forma automática pela ferramenta 'subtract'. O tratamento mais eficaz para estudar a relação entre a intensidade de fluorescência e o teor de lignina foi o de autofluorescência em lâmina sem extrativo, devido a remoção dos extrativos fluorescentes que causam interferências nos resultados. Especialmente quando analisado pelo Método 3 (Determinação de intensidade de fluorescência de forma automática pela ferramenta 'subtract'), que demonstrou o segundo maior coeficiente de determinação ($R^2 = 76,22\%$) e correlação ($r = 0,87$), e melhor desempenho devido à sua automação no software *ImageJ*, garantindo rapidez, reprodutibilidade e padronização dos resultados. Os resultados confirmam a eficácia da microscopia de fluorescência como ferramenta para investigar a lignina na parede celular.

Palavras-chave: Autofluorescência; Fucsina básica; Mäule; software *ImageJ*.

1. INTRODUÇÃO

A lignina, um dos principais componentes estruturais da madeira, desempenha um papel essencial na sua rigidez, impermeabilidade e resistência ao ataque de microrganismos. Quimicamente, a lignina é um polímero aromático complexo que, associado à celulose e à hemicelulose, confere propriedades mecânicas e químicas às plantas vasculares (Tribot *et al.*, 2019). Além disso, a lignina é altamente relevante para processos industriais, como a produção de papel, energia, biocombustíveis e materiais compósitos, tornando-se um objeto de crescente interesse em pesquisas científicas.

Na Floresta Amazônica, a madeira de espécies nativas apresenta grande diversidade de características estruturais e químicas, incluindo variações significativas no teor de lignina (Ferreira *et al.*, 2020). A proporção e composição da lignina determinam a resistência mecânica e a funcionalidade dos diferentes elementos anatômicos (Donaldson, 2001; Raven *et al.*, 2001). Essa heterogeneidade espacial tem implicações diretas sobre a condução hídrica, o suporte estrutural e a adaptação ao ambiente, tornando fundamental sua caracterização em nível celular. As análises químicas tradicionais da madeira, com ênfase na determinação de lignina, não permitem avaliar sua distribuição nas diferentes estruturas anatômicas.

O estudo da lignina na escala celular pode ser realizado por meio de diferentes técnicas microscópicas e de microspectroscopia. Nesse contexto, a microscopia de fluorescência tem se destacado como uma ferramenta promissora que possibilita a análise qualitativa e quantitativa da lignina, além da avaliação da distribuição espacial da lignina em amostras histológicas de madeira (Gierlinger; Schmidt, 2006). A fluorescência na lignina surge da presença de grupos cromóforos e fluoróforos em sua estrutura química (Liu *et al.*, 2004). Cromóforos são responsáveis por absorver luz em comprimentos de onda específicos, enquanto fluoróforos reemitem luz após a excitação (Donaldson & Radotić, 2013).

A precisão das análises depende de diversos fatores, incluindo os tratamentos químicos aplicados às amostras e os métodos de processamento de imagens (Garcia *et al.*, 2019). Entre as técnicas disponíveis, destaca-se a microscopia de autofluorescência, um método eficiente para mapear a distribuição da lignina com maior praticidade de análise. Ela tem sido amplamente utilizada para localizar lignina em madeira e polpa, investigar os efeitos de processos industriais, estudar a fotodegradação de superfícies de madeira e analisar a distribuição de lignina em diferentes espécies lenhosas (Donaldson, 2013).

Entretanto, O sinal da lignina pode ser confundido pela presença de outros compostos autofluorescentes no material vegetal. Para contornar isso, corantes como Mäule (Meshitsuka & Nakano, 1979), clorossulfito (Akin & Burdick, 1981), fucsina básica (Dharmawardhana *et al.*, 1992), auramina O (Pesquet *et al.*, 2005), acriflavina (Kutscha & Gray, 1970) e floroglucinol (Vallet *et al.*, 1996; Liljegren, 2010; Liebsch *et al.*, 2014) foram desenvolvidos para evidenciar especificamente a lignina.

Apesar desses avanços, ainda existem lacunas na aplicação da fluorescência para o estudo da lignina em tecidos lenhosos. Alguns tratamentos fluorescentes, como a fucsina básica, têm sido utilizados em outros tecidos vegetais para evidenciar estruturas lignificadas (Ursache *et al.* 2018), porém sua aplicação em tecidos lenhosos ainda não é explorada. Além disso, quando utilizados, são voltados à visualização da lignina, não tendo como finalidade analisar a intensidade de fluorescência, nem comparar com o teor de lignina total. Outra problemática refere-se ao processamento dos dados obtidos por meio das imagens de fluorescência, uma vez que ainda não existe uma metodologia definida para a extração e análise quantitativa da intensidade de fluorescência da lignina a partir dessas imagens. Assim, existe a necessidade de estudos que investigam a relação entre a intensidade de fluorescência obtida por esses tratamentos e o teor total de lignina na madeira.

O objetivo deste estudo foi relacionar o teor total de lignina do tipo Klason com a intensidade de fluorescência da lignina emitida em tecido lenhoso, testando diferentes tratamentos químicos e métodos de análise. Dessa forma, busca-se aprimorar as técnicas de avaliação da lignina em nível celular.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta dos materiais

A madeira foi coletada em serrarias e marcenarias localizadas na área urbana do município de Altamira, Pará, Brasil. Foram selecionadas amostras de sete espécies comercializadas na região: melancieira (*Alexa grandiflora* Ducke, Fabaceae), angelim-saia (*Parkia pendula* (Willd.) Benth. ex Walp., Fabaceae), guaruba (*Vochysia maxima* Ducke, Vochysiaceae), angelim-pedra (*Hymenolobium petraeum* Ducke, Fabaceae), freijó (*Cordia sagotii* I.M. Johnst., Boraginaceae), pequiá (*Caryocar villosum* (Aubl.) Pers., Caryocaraceae) e angelim-vermelho (*Dinizia excelsa* Ducke, Fabaceae). A seleção das espécies considerou variações no teor de lignina, incluindo espécies que normalmente apresentam baixo, médio e alto teor de lignina.

2.2 Amostras para as análises

As amostras de madeira foram separadas, destinando parte do material coletado à análise química, e outra parte à confecção de lâminas histológicas para análise da intensidade de fluorescência (Figura 1). Todas as etapas foram realizadas utilizando o mesmo pedaço de madeira para garantir uniformidade entre as análises.

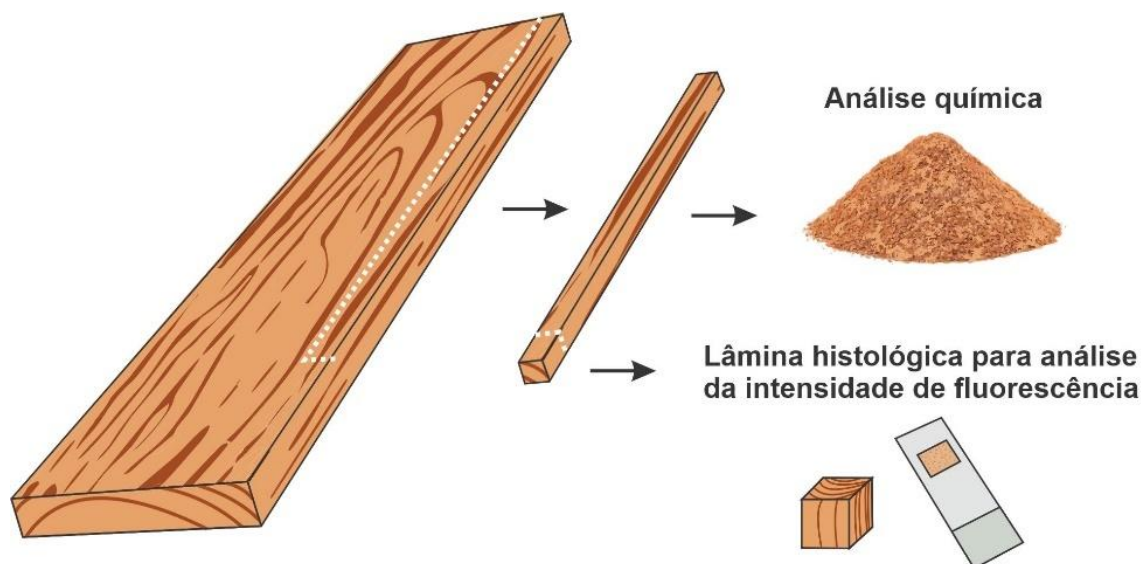


Figura 1 - Separação das amostras para análise química e confecção de lâmina histológica para análise da intensidade de fluorescência.

2.3 Teor total de lignina da madeira

Para a análise química, a madeira foi preparada seguindo a norma TAPPI T 257 cm-85 (1985). As amostras de madeira foram trituradas em um moinho tipo Willey e peneiradas para separação da fração retida entre a peneira de 40 mesh e 60 mesh. Inicialmente, o teor de umidade foi determinado de acordo com a norma TAPPI T 210 cm-93 (1993). Amostras de serragem em duplicata de cada espécie foram pesadas para obter a massa úmida e, posteriormente, transferidas para uma estufa à temperatura de 103 ± 2 °C para secagem até massa constante. Após a secagem completa, a amostra foi retirada da estufa e pesada novamente para obtenção da massa seca, usada no cálculo da umidade da madeira.

Os extrativos foram removidos seguindo a norma TAPPI T 204 cm-17 (2017). Amostras de serragem em triplicata foram pesadas em dois gramas, inseridas em filtros de vidro sinterizado com porosidade 2, e então levadas ao Soxhlet acoplado a um balão com 150 mL de acetona (CH_3COCH_3). Após 6 horas, contadas a partir do primeiro refluxo do solvente, o sistema foi desligado para resfriamento. A segunda extração foi realizada em água quente. Após a remoção da acetona das amostras, elas foram colocadas em banho-maria a 100 °C por 1 hora e depois transferidas para uma estufa a 103 ± 2 °C até massa constante.

A análise do teor de lignina foi do tipo Klason, conforme a norma TAPPI T 222 om-22 (2022) e modificada segundo Gomide & Demuner (1986). Um total de 0,3 gramas das amostras em triplicata (livres de extrativos) foram tratadas com 3 mL de ácido sulfúrico a 72% (H₂SO₄) em banho-maria a 30 °C por 1 hora, homogeneizando a mistura com frequência. Em seguida, as amostras solubilizadas em ácido sulfúrico foram transferidas para frascos de vidro de 100 mL contendo 84 mL de água destilada, selados com tampa de borracha e lacre de alumínio, para serem submetidos à pressão em autoclave por 60 minutos. A lignina insolúvel foi filtrada, lavada com água e, após secagem até massa constante, pesada. A lignina solúvel foi determinada por espectrometria, conforme Goldschimid (1971), usando a diluição do filtrado obtido no procedimento da lignina insolúvel. O teor total de lignina foi obtido pela soma dos valores de lignina solúvel e insolúvel.

2.4 Análise da intensidade de fluorescência da lignina na madeira

2.4.1 Confeção das lâminas histológicas

Amostras medindo 1,0 × 1,5 × 2,0 cm foram preparados nas direções radial, tangencial e longitudinal. Cada corpo de prova foi amolecido em água fervente e seccionado em um micrótomo de deslize (Leica SM 2000R) para obtenção de cortes transversais com aproximadamente 20 µm de espessura. Três cortes seriados foram preparados por espécime, e pelo menos 20 fotomicrografias não sobrepostas foram adquiridas para cada espécie e tratamento.

Os cortes foram montados em lâminas de vidro (26 × 76 mm, 1,0–1,2 mm de espessura), cobertos com lamínulas #1.5 (24 × 32 mm, 0,13–0,17 mm de espessura). Para a análise de fluorescência *in natura*, os cortes foram montados diretamente em glicerol. Para análises livres de extrativos e tratamentos com coloração química (Mäule e fucsina básica), o mesmo procedimento de seccionamento foi adotado antes da aplicação dos reagentes. Após a montagem, as lâminas foram deixadas em repouso por cerca de 10 minutos antes da captura das imagens, para garantir a estabilização do meio de montagem e do sinal de fluorescência.

2.4.2 Tratamentos para obtenção da intensidade de fluorescência da lignina

2.4.2.1 Autofluorescência em lâminas *in natura*

A autofluorescência foi realizada conforme descrito por Donaldson *et al.* (2010). Cortes histológicos de tecidos lenhosos não tratados foram montados com glicerol e analisados em microscópio de fluorescência com excitação de luz entre 440–490 nm e emissão entre 490–565 nm.

2.4.2.2 Autofluorescência em lâminas sem extrativos

Como o sinal da lignina pode, às vezes, ser confundido pela presença de outros compostos autofluorescentes na madeira, foi realizada uma adaptação no método de autofluorescência para remover os extrativos da madeira. As seções anatômicas foram submersas em 3,3% (v/v) de hipoclorito de sódio (NaClO) a uma temperatura entre 30°C e 40°C por 3 minutos, e depois lavadas três vezes com água destilada. Em seguida, as seções foram analisadas em microscópio de fluorescência com excitação de luz entre 440–490 nm e emissão entre 490–565 nm.

2.4.2.3 Mäule

A reação de coloração de Mäule foi realizada conforme descrito por Yamashita *et al.* (2016). As seções anatômicas foram tratadas com uma solução aquosa a 1% (m/v) de permanganato de potássio (KMnO₄) por 5 minutos e, em seguida, lavadas três vezes com água destilada, tratadas com ácido clorídrico (HCl) 1 N por 30 minutos e novamente lavadas com água destilada.

Para gerar a reação de coloração, foi adicionado às seções um tampão Tris-HCl 1 M (Tris-hidroximetilaminometano ácido clorídrico) com pH 8, após o que as seções foram montadas em lâminas de vidro e cobertas com lamínulas. A excitação de luz entre 440–490 nm e a emissão entre 600–650 nm foram utilizadas para observação microscópica da fluorescência da lignina.

2.4.2.4 Fucsina básica

A reação de coloração com fucsina básica foi realizada conforme descrito por Ursache *et al.* (2018). Inicialmente, a solução *ClearSee* foi preparada utilizando xilitol (C₅H₁₂O₅) 10% (m/v), desoxicolato de sódio (C₇₆H₁₁NaO₈) 15% (m/v), ureia (CO(NH₂)₂) 25% (m/v) e água até o volume final desejado. A solução foi misturada em agitador magnético por 1 hora, até completa dissolução dos reagentes.

Para o clareamento, as seções foram imersas em *ClearSee* por 30 minutos, seguidas de imersão em 0,2% de fucsina básica por 5 minutos. Em seguida, a solução de fucsina foi removida e as seções foram lavadas, permanecendo em *ClearSee* por 30 minutos, com troca da solução, onde permaneceram por mais 1 hora. As lâminas histológicas dos tecidos lenhosos foram montadas com *ClearSee* e submetidas à excitação de luz na faixa entre 490–565 nm e emissão entre 600–650 nm, para observação no microscópio de fluorescência.

2.4.3 Microscópio de fluorescência

A captura de fluorescência foi realizada em um microscópio de fluorescência Zeiss Axio Scope A1 (Zeiss), equipado com iluminação transmitida para campo claro, campo escuro, DIC e contraste de polarização, além de iluminação refletida fornecida por uma lâmpada de vapor de mercúrio HBO 50 W. A fluorescência foi detectada usando conjuntos de filtros Zeiss para os canais DAPI, FITC e Rodamina. As imagens foram adquiridas com objetiva de 10×/0,25 NA (aumento total de 100×).

As imagens foram capturadas com uma câmera digital AxioCam MRc5 de 5 MP (2584 × 1936 pixels, 24 bits, 300 dpi), controlada pelo software ZEN 3.4 (blue edition), no modo de plano único (2D; sem Z-stack). Um total de 20 micrografias de fluorescência foi obtido por espécie e por tratamento, sendo os arquivos salvos em formato TIFF.

O tempo de exposição variou entre 30–200 ms, dependendo do canal de fluorescência. Para cada canal e tratamento, os parâmetros de aquisição (tempo de exposição, intensidade de iluminação e ganho da câmera) foram mantidos constantes, garantindo a comparabilidade entre as amostras.

2.5 Processamento dos dados

As imagens capturadas foram processadas no *ImageJ-Fiji* (Schindelin *et al.*, 2012) para remover regiões não fluorescentes (lúmen celular), consideradas como *background*, e posteriormente quantificar a intensidade de fluorescência, sendo expressa em Unidades Arbitrárias (UA). O software foi calibrado para reconhecimento dimensional, a fim de transformar distâncias em pixels para micrômetros, utilizando as barras de escala como referência. As regiões capturadas para gerar as fotomicrografias usadas na medição da fluorescência possuem área de 278 × 208 μm e resolução de 2584 × 1936 pixels. Para maior confiabilidade, o processamento das imagens seguiu três procedimentos distintos descritos abaixo.

2.5.1 Método 1

Fórmula de densidade integrada para remoção de *background* de área não fluorescente da imagem (Fernando *et al.*, 2015). A seguir está descrito o fluxo de trabalho (*workflow*):

Converter a imagem para 8 bit → selecionar a área total utilizando um retângulo → acessar o menu '*analyze*' e selecionar a opção '*measure*' (para medir o sinal da área total e abrir uma caixa *pop-up* com os valores) → selecionar uma área de 2601,46 μm^2 no interior do vaso para servir de *background* (área indicada pela seta na Figura 2) → novamente acessar o menu '*analyze*' e selecionar '*measure*' (para medir o sinal da área no interior do vaso).

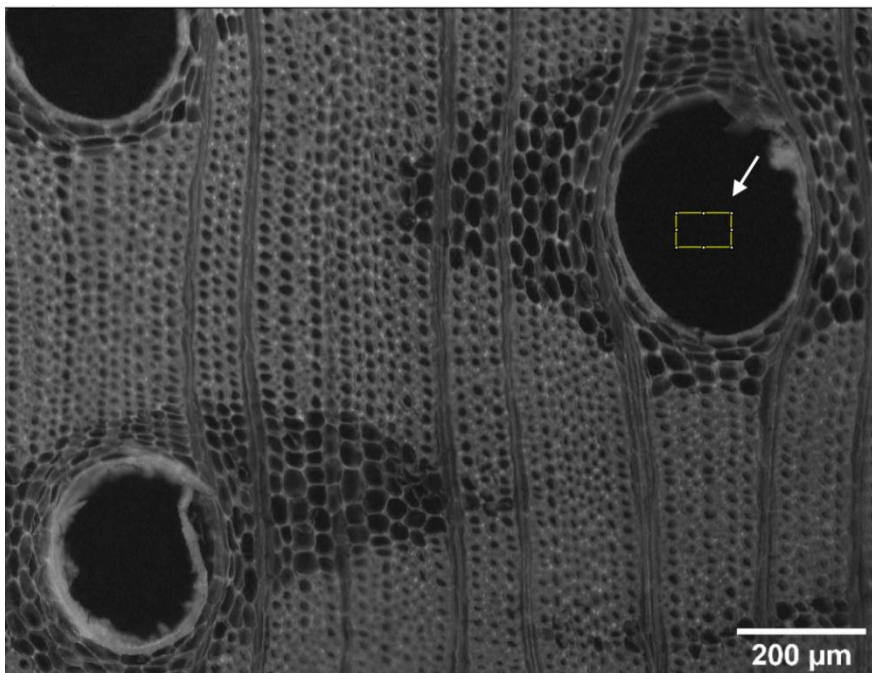


Figura 2 - Imagem da lâmina histológica de melancia (*Alexa grandiflora* Ducke) convertida para 8 bit. A seta em branco indica a região em que foi obtido o *background*.

Com os dados obtidos, a medição da intensidade da fluorescência (IF) na fotomicrografia foi feita por meio da Equação 1, descrita por Fernando *et al.* (2015). A intensidade do *background* usada foi a média de três medições e a área selecionada e a densidade integrada foi em relação ao tamanho total da imagem.

$$\text{IF} = \text{Densidade integrada} - (\text{Área selecionada} \times \text{Intensidade do } \textit{background}) \quad (1)$$

2.5.2 Método 2

Fórmula de densidade integrada para remoção de *background* de área não fluorescente da imagem com correção de acordo com a área analisada. Este método

consistiu em utilizar a Equação 1, com a pequena área do *background* sendo extrapolada para a área total da imagem e obter o *Background* ajustado (Equação 2), logo a Equação 3 foi aplicada para obtenção do IF.

$$IBAj = (IB \times AT) / AV \quad (2)$$

$$IF = \text{Densidade integrada} - IBAj \quad (3)$$

Onde: IBAj = Intensidade do *background* ajustado; IB = “Intensidade do *background*” da Equação 1; AT = Área total da imagem; AV = Área selecionada no interior do vaso.

2.5.3 Método 3

Determinação de intensidade de fluorescência de forma automática pela ferramenta ‘*subtract*’. Desta forma, o *background* é removido diretamente no programa, deixando apenas o sinal da fluorescência e posteriormente fornecida pelo programa após comando pré-determinado. Para encontrar o caminho para análise no *ImageJ* deve-se seguir fluxo de trabalho (*workflow*) abaixo:

Acessar o menu ‘*process*’ e selecionar a opção ‘*math*’ em seguida ‘*subtract*’ → em ‘*subtract*’ selecionar um valor que melhor se ajustar para remover o *background*, nesse caso, foi 20 para autofluorescência *in natura*, Mãule e fucsina básica, e 25 para autofluorescência sem extrativo → após a remoção do *background*, acessar o menu ‘*analyze*’ e selecionar a opção ‘*measure*’ (para medir o sinal da intensidade da fluorescência e abrir uma caixa *pop-up* com os valores).

2.6 Análise estatística dos dados

A análise estatística avaliou a relação linear entre o teor de lignina da madeira e a intensidade de fluorescência emitida nas seções histológicas. Para cada tratamento, foram ajustadas equações de regressão linear entre essas variáveis, sendo o ajuste do modelo avaliado pelo coeficiente de determinação (R^2). A associação entre as variáveis também foi analisada por meio do coeficiente de correlação de Pearson (r), considerando nível de significância de 95% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando as médias das repetições de cada tratamento.

3. RESULTADOS

A composição química das espécies apresentou variação, com os teores de extrativos variando de 5,46% para pequiá (*Caryocar villosum* (Aubl.) Pers) a 14,03% para o angelim vermelho (*D. excelsa* Ducke) e teores de lignina variando de 27,14% para melanciaira (*A. grandifora* Ducke) a 32,43% para guaruba (*V. maxima* Ducke) (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores médios dos teores de extrativos e lignina para as espécies analisadas.

Espécies	Teor total de extrativos (%)	Teor total de lignina (%)
Guaruba (<i>Vochysia maxima</i> Ducke)	5,91 (0,136)	32,43 (0,164)
Angelim vermelho (<i>Dinizia excelsa</i> Ducke)	14,03 (0,332)	32,10 (0,166)
Angelim pedra (<i>Hymenobium petraeum</i> Ducke)	8,60 (0,144)	30,84 (0,326)
Freijó (<i>Cordia sagotii</i> I.M. Johnst.)	6,68 (0,089)	30,40 (0,133)
Pequiá (<i>Caryocar villosum</i> (Aubl.) Pers)	5,46 (0,171)	30,28 (0,231)
Angelim saia (<i>Parkia pendula</i> (Willd.) Benth. Ex Walp.)	12,15 (0,262)	28,92 (0,693)
Melanciaira (<i>Alexa grandifora</i> Ducke)	9,61 (0,187)	27,14 (0,633)

(valores entre parênteses correspondem ao desvio padrão).

As Figuras 3 a 9 apresentam as fotomicrografias das espécies com os tratamentos utilizados. As imagens das lâminas *in natura* e das sem extrativos mostram as células com maior clareza, enquanto o tratamento com fucsina básica produziu um sinal de fluorescência mais intenso na região das fibras, exceto para guaruba (Figura 7c). Um aumento semelhante no brilho da fluorescência também foi observado em Mãule, exceto para guaruba (Figura 7d) e melanciaira (Figura 8d). O tratamento Mãule permitiu observar uma diferença quanto aos tipos de lignina presentes em angelim saia, guaruba, melanciaira e pequiá por meio da coloração, a lignina siringil apresentou coloração vermelha, enquanto a lignina guaiacil apresentou coloração amarela. As demais espécies exibiram maior coloração amarela nas células, indicando uma maior presença de lignina guaiacil.

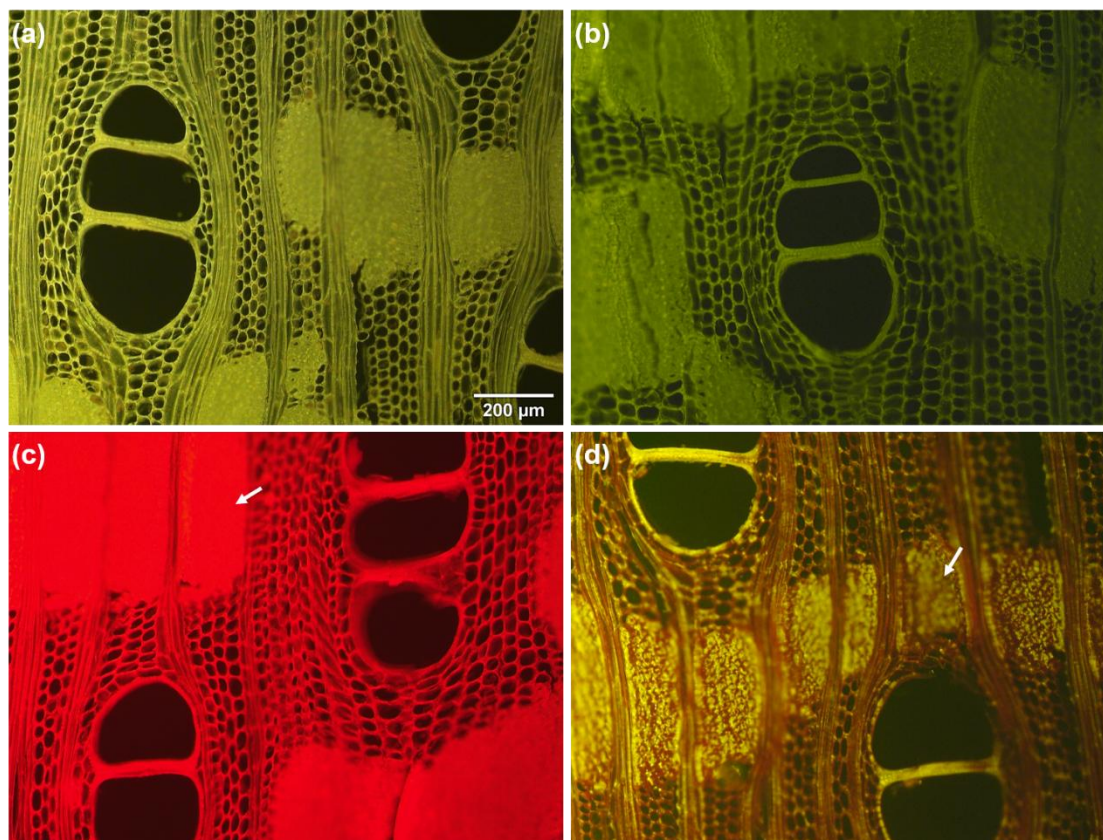


Figura 3 - Fotomicrografias do angelim pedra com magnificação de 100×. Tratamentos: a) Autofluorescência da lâmina *in natura*; b) autofluorescência da lâmina sem extrativos; c) fluorescência com fucsina básica; d) fluorescência com Mäule. Setas indicando regiões com sinal de fluorescência mais intenso.

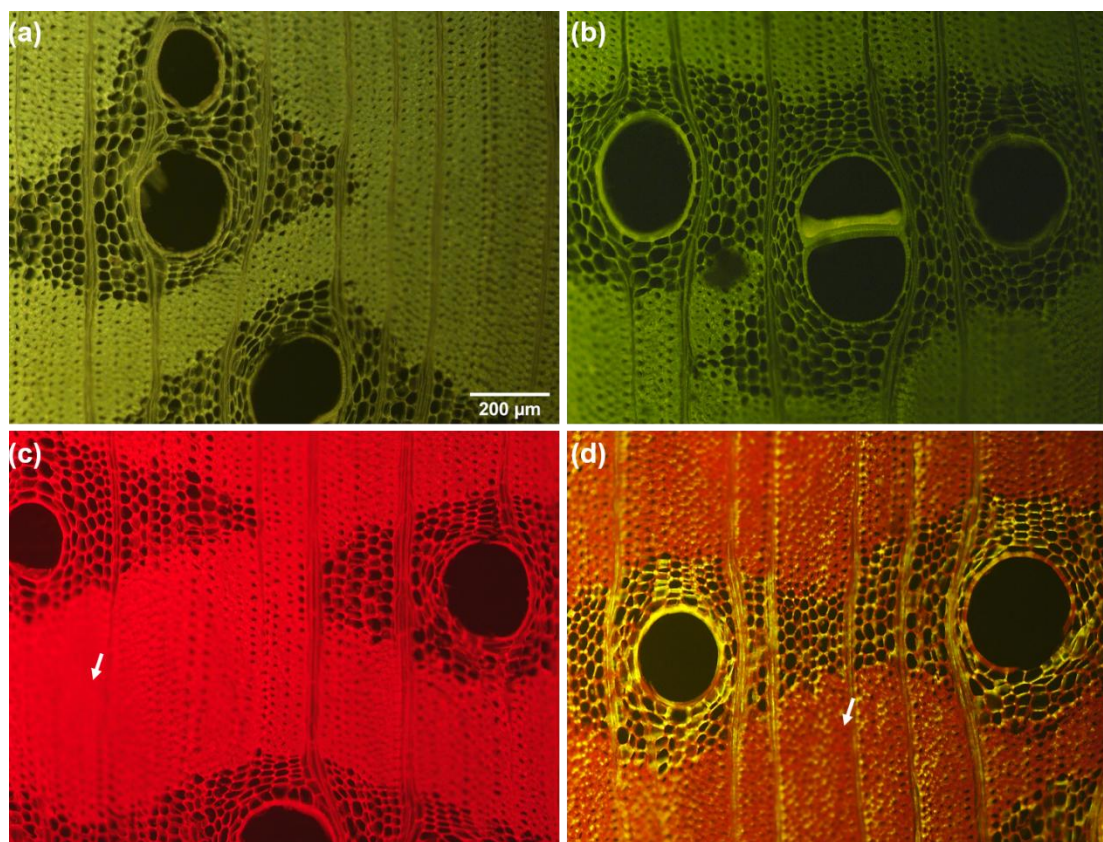


Figura 4 – Fotomicrografias do angelim saia com magnificação de 100×. Tratamentos: a) Autofluorescência da lâmina *in natura*; b) autofluorescência da lâmina sem extrativos; c) fluorescência com fucsina básica; d) fluorescência com Mäule. Setas indicando regiões com sinal de fluorescência mais intenso.

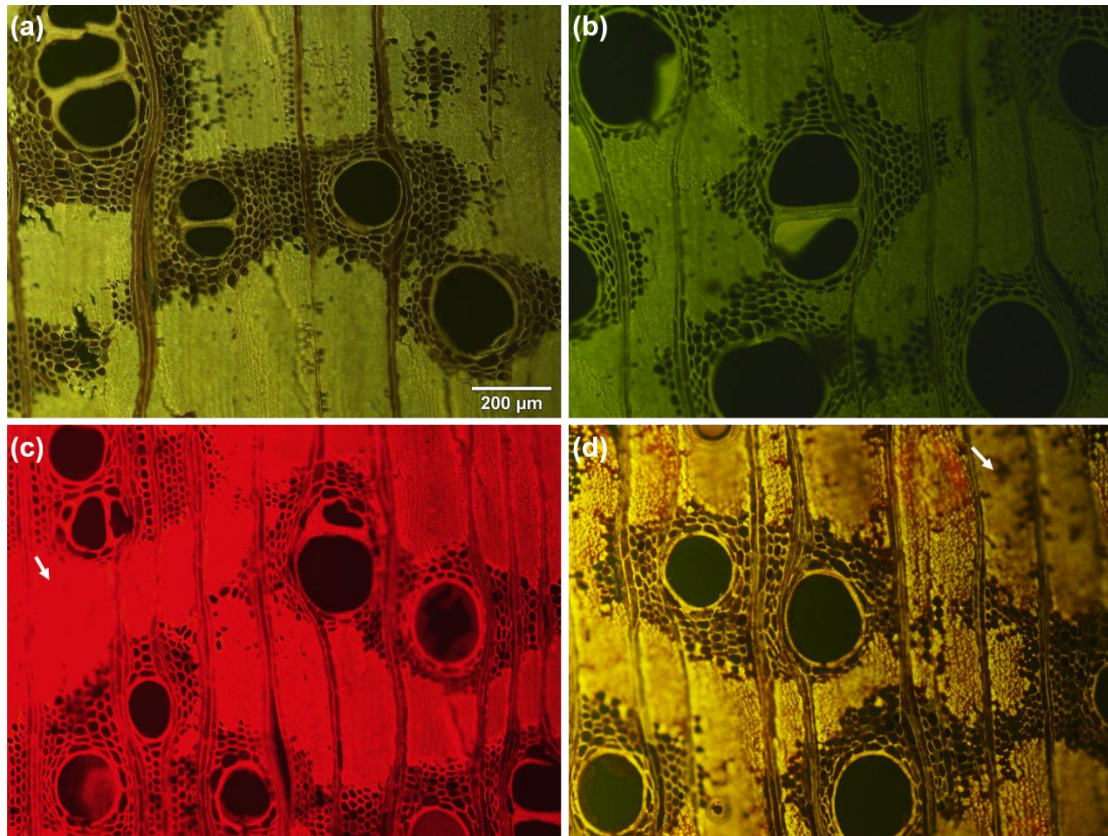


Figura 5 – Fotomicrografias do angelim vermelho com magnificação de 100×. Tratamentos: a) Autofluorescência da lâmina *in natura*; b) autofluorescência da lâmina sem extrativos; c) fluorescência com fucsina básica; d) fluorescência com Mäule. Setas indicando regiões com sinal de fluorescência mais intenso.

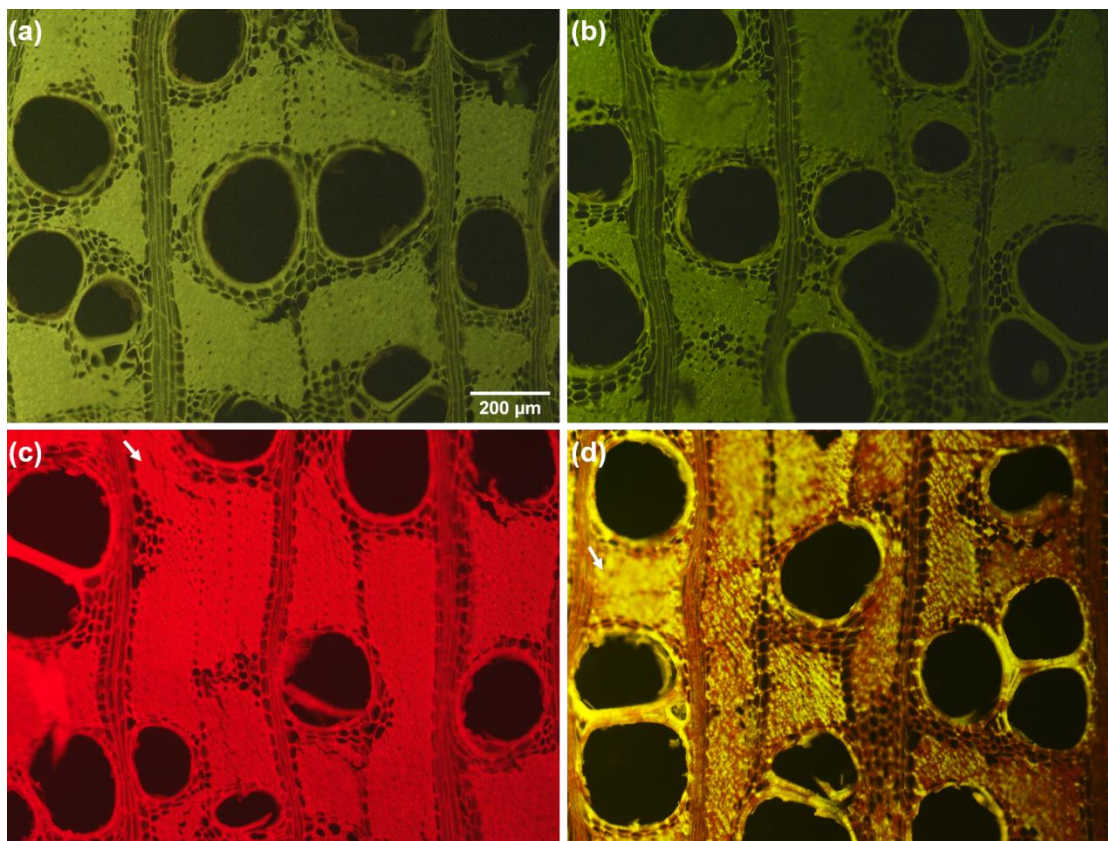


Figura 6 - Fotomicrografias do freijó com magnificação de 100×. Tratamentos: a) Autofluorescência da lâmina *in natura*; b) autofluorescência da lâmina sem extrativos; c) fluorescência com fucsina básica; d) fluorescência com Mäule. Setas indicando regiões com sinal de fluorescência mais intenso.

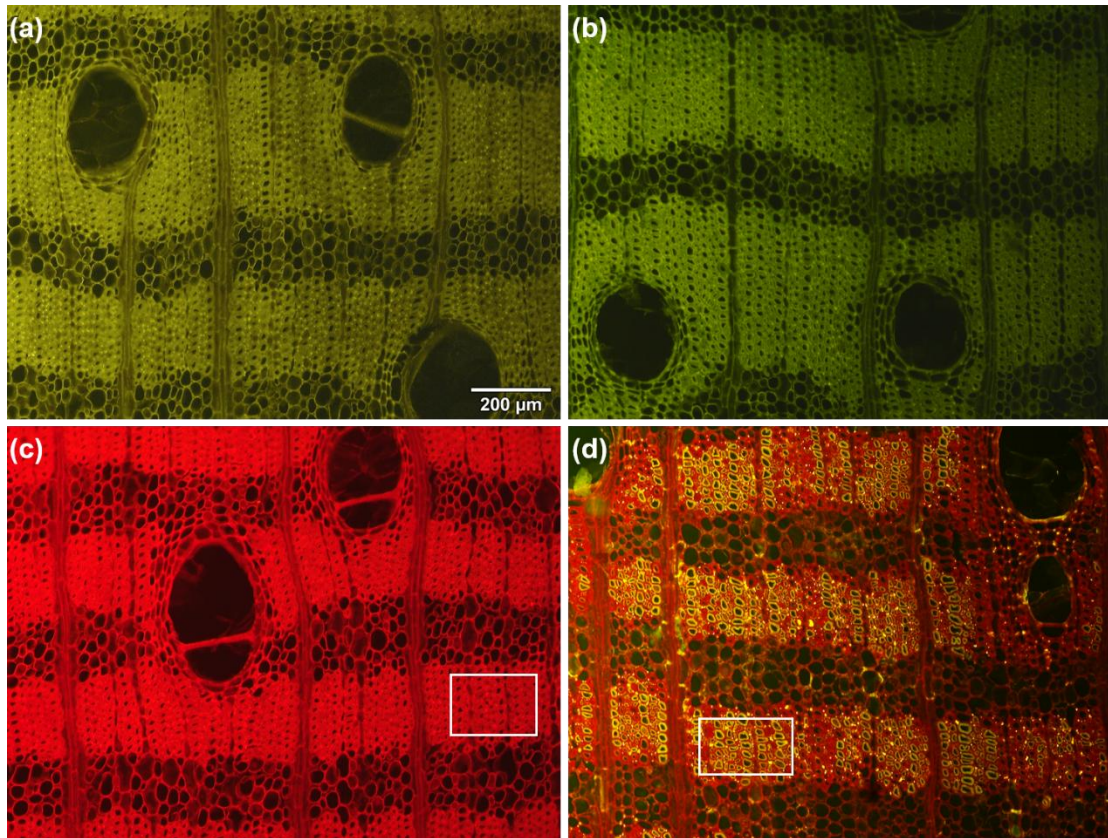


Figura 7 - Fotomicrografias da guaruba com magnificação de 100×. Tratamentos: a) Autofluorescência da lâmina *in natura*; b) autofluorescência da lâmina sem extrativos; c) fluorescência com fucsina básica; d) fluorescência com Mäule. Retângulos indicando regiões nítidas nas fibras.



Figura 8 - Fotomicrografias da melanciaira com magnificação de 100×. Tratamentos: a) Autofluorescência da lâmina *in natura*; b) autofluorescência da lâmina sem extrativos; c) fluorescência com fucsina básica; d) fluorescência com Mäule. Retângulo indicando regiões nítidas nas fibras.

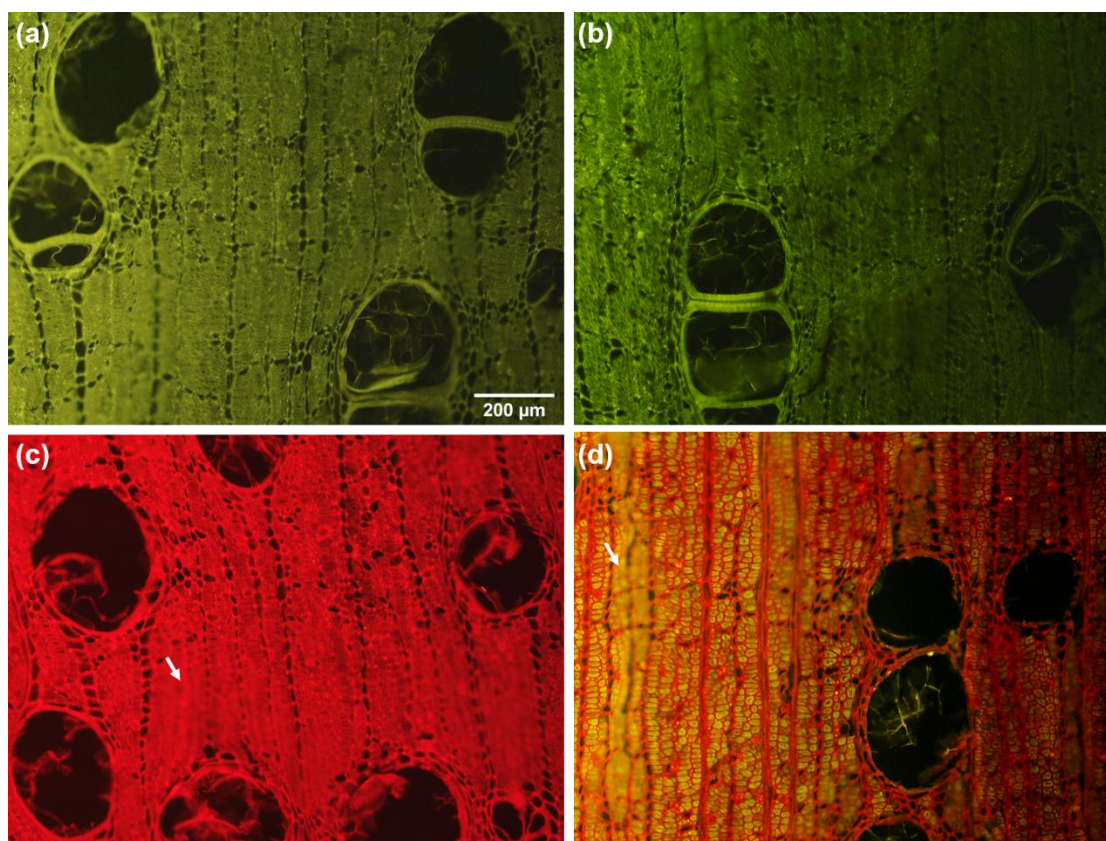


Figura 9 - Fotomicrografias do pequiá com magnificação de 100×. Tratamentos: a) Autofluorescência da lâmina *in natura*; b) autofluorescência da lâmina sem extrativos; c) fluorescência com fucsina básica; d) fluorescência com Mäule. Setas indicando regiões com sinal de fluorescência mais intenso.

O maior ajuste entre a intensidade de fluorescência e o teor de lignina foi obtido pelo Método 2 (fórmula de densidade integrada para remoção de *background* de área não fluorescente da imagem com correção), aplicado à autofluorescência em lâmina sem extrativo, com coeficiente de determinação (R^2) de 77,77% e coeficiente de correlação de Pearson (r) de 0,88. Esse resultado indica que o modelo explica de forma significativa a variação da intensidade de fluorescência em relação ao teor de lignina (Tabela 2). O tratamento de autofluorescência em lâmina sem extrativo obteve os maiores valores de R^2 para todos os métodos analisados (75,09% a 77,77%), sugerindo que essa análise é a mais adequada para relacionar intensidade de fluorescência da lignina e teor total de lignina. Por outro lado, os tratamentos Mäule e fucsina básica apresentaram coeficientes R^2 inferiores a 40%, indicando uma fraca capacidade de explicação dessa relação.

Tabela 2 - Correlação de Pearson e análise de regressão linear entre a intensidade de fluorescência e o teor de lignina (tipo klason), para cada combinação de tratamento e método.

Tratamento	Métodos	Equação de regressão	Coef. Determinação (R^2)	Coef. Correlação de Pearson (r)
Autofluorescência em lâmina <i>in natura</i>	1	IF = 2.28E+08 - 6233801 TL	49,82%	-0,70
	2	IF = 3.01E+08 - 7775011 TL	48,50%	-0,69

	3	IF = 2.34E+08 - 6530456 TL	52,42%	-0,72
Autofluorescência em lâmina sem extrativo	1	IF = - 12528229 + 741044 TL	75,09%	0,86*
	2	IF = - 4289370 + 1095170 TL	77,77%	0,88*
	3	IF = - 23943422 + 1067387 TL	76,22%	0,87*
Mäule	1	IF = 1.02E+08 - 2562944 TL	38,63%	-0,62
	2	IF = 1.65E+08 - 3491596 TL	35,46%	-0,59
	3	IF = 1.35E+08 - 3347305 TL	34,67%	-0,58
Fucsina básica	1	IF = - 33343615 + 2571289 TL	26,95%	0,52
	2	IF = - 91375719 + 5787301 TL	35,82%	0,60
	3	IF = - 1.11E+08 + 5609966 TL	35,16%	0,59

*correlação significativa ($p < 0,05$). Sendo: IF - Intensidade de fluorescência; TL - Teor de lignina. Métodos de determinação da intensidade de fluorescência utilizando *ImageJ*: Método 1 - Fórmula de Densidade integrada para remoção de *background* de área não fluorescente da imagem (Fernando *et al.*, 2015); Método 2 - Fórmula de Densidade integrada para remoção de *background* de área não fluorescente da imagem com correção de acordo com a área analisada; Método 3 - Determinação de intensidade de fluorescência de forma automática pela ferramenta 'subtract'.

Na Figura 10 é apresentada a relação entre intensidade de fluorescência e teor de lignina nos diferentes tratamentos. As linhas de regressão linear indicam as tendências identificadas nas análises estatísticas. A autofluorescência sem extrativo apresenta um padrão mais definido de correlação positiva, enquanto os tratamentos Mäule e fucsina básica apresentam maior dispersão dos pontos, reforçando os baixos coeficientes de determinação encontrados na análise numérica. A autofluorescência *in natura* também exibe variação significativa e relação inversa ao teor de lignina, e com menor ajuste quando comparada à versão sem extrativo.

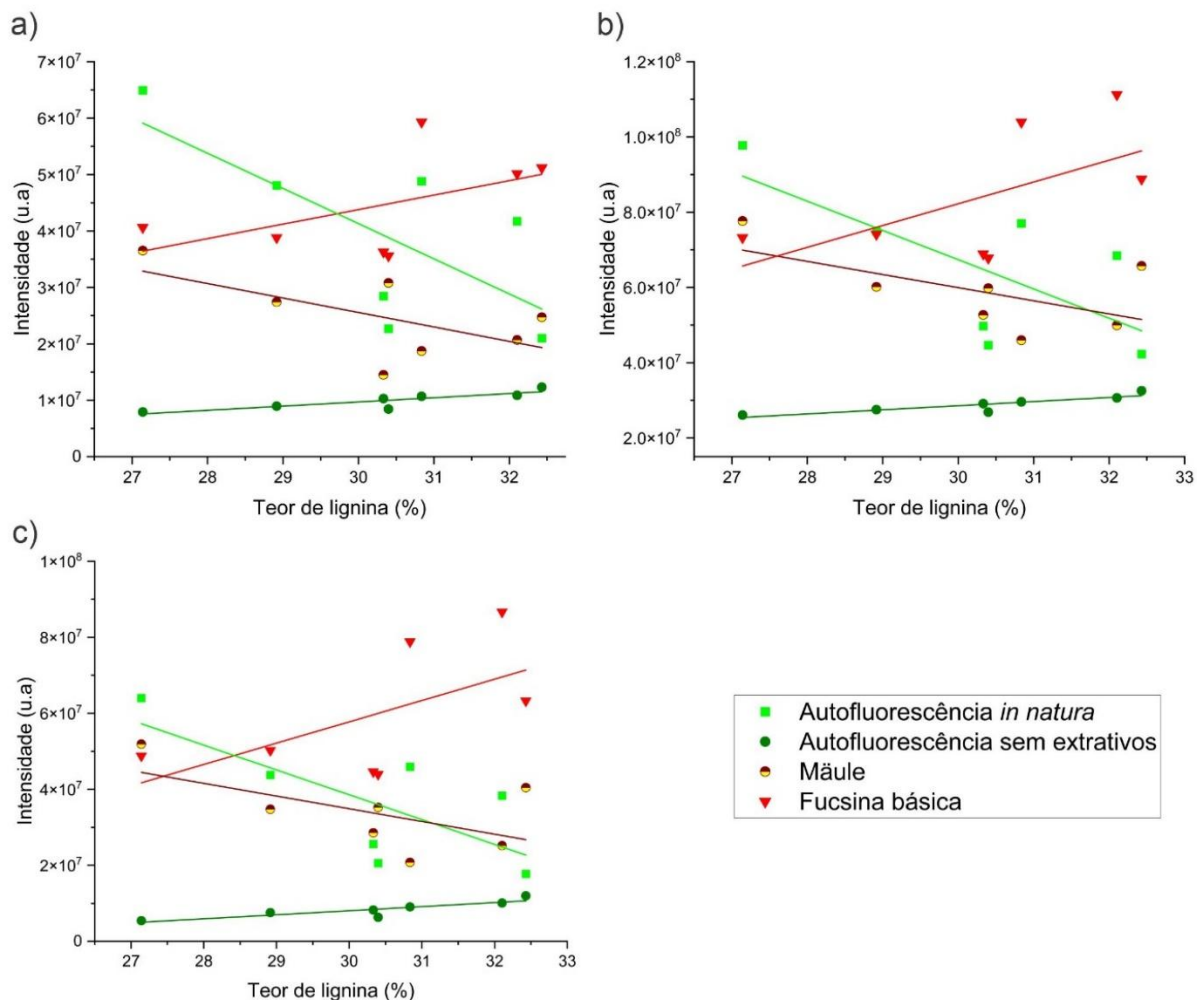


Figura 10 - Relação entre a intensidade de fluorescência e o teor de lignina nos diferentes tratamentos. A) Método 1: Fórmula de Densidade integrada para remoção de *background* de área não fluorescente da imagem (Fernando *et al.*, 2015); b) Método 2: Fórmula de Densidade integrada para remoção de *background* de área não fluorescente da imagem com correção de acordo com a área analisada; C) Método 3: Determinação de intensidade de fluorescência de forma automática pela ferramenta '*subtract*'.

4. DISCUSSÃO

O maior brilho observado na região das fibras pode ser explicado pela combinação do reduzido tamanho do lúmen e pela concentração de lignina nas paredes das fibras. Em espécies com lúmens maiores, como guaruba e melanciaira, o microscópio conseguiu focalizar as estruturas com maior precisão, resultando em imagens mais nítidas, porém com menor brilho aparente. Já em espécies com lúmens menores, o aumento visual da fluorescência pode ser atribuído ao acúmulo de lignina em regiões como a parede celular, o canto celular e a lamela média (Donaldson, 2001), que formam uma estrutura mais densa e refletem mais luz (Ban *et al.*, 2018), aumentando a percepção visual de brilho.

Além disso, cada tratamento de autofluorescência ou uso de corante responde de maneira diferente ao comprimento de onda de excitação utilizado no microscópio de fluorescência. As cores empregadas, vermelho na fucsina básica e vermelho/amarelo na reação de Mäule, aparecem visualmente mais brilhantes. Isso pode resultar não apenas da intensidade de fluorescência da lignina, mas também da maior eficácia do reagente em absorver a luz de excitação e emití-la em comprimentos de onda específicos.

A remoção dos extrativos melhorou a relação entre a intensidade de fluorescência e o teor de lignina. O alto coeficiente de correlação obtido com a autofluorescência em lâminas sem extrativos sugere que a presença de extrativos mascara a fluorescência da lignina, reduzindo a precisão da análise. Além disso, a baixa capacidade explicativa dos modelos para a lâmina *in natura*, Mäule e fucsina básica indica que esses métodos são os menos adequados para correlacionar a intensidade de fluorescência com o teor de lignina em tecidos lenhosos.

Os extrativos possuem cromóforos e fluoróforos em sua composição, podendo emitir fluorescência própria e interferir na emissão da lignina (Lakowicz, 2006). Isso ocorre principalmente no tratamento de autofluorescência em lâminas *in natura*, onde os extrativos permaneceram na estrutura, competindo pela emissão de fluorescência com a lignina, invertendo sua relação com a intensidade de fluorescência. No tratamento de fucsina básica e Mäule, mesmo com o processo de limpeza do tecido durante o preparo das seções histológicas, não houve correlação significativa. Esses reagentes, especialmente a fucsina básica, ainda não haviam sido amplamente aplicados em estudos com madeira, sendo necessária a realização de adaptações metodológicas, como a remoção prévia de extrativos, para reduzir interferências e possibilitar uma relação mais consistente entre a intensidade de fluorescência e o teor total de lignina. A dispersão dos pontos nos tratamentos Mäule e fucsina básica indica uma menor relação linear entre intensidade de fluorescência e o teor de lignina, enquanto a autofluorescência sem extrativo demonstra um comportamento mais previsível e alinhado ao modelo linear ajustado.

Na autofluorescência da lâmina sem extrativos, a remoção dos extrativos eliminou possíveis fontes de interferência e permitiu que a emissão de fluorescência fosse atribuída principalmente à lignina presente nas paredes celulares. Esse procedimento resultou em uma maior correlação com o teor de lignina, uma vez que as medições de fluorescência se tornaram mais representativas da real composição química da madeira. Ao comparar a quantificação de lignina de um clone de *Eucalyptus urophylla* por fluorescência com o método convencional de bancada, Moulin *et al.* (2024) observaram que a fluorescência

apresentou tendência semelhante ao método convencional ao indicar o comportamento da lignina presente no tecido lenhoso em nível celular.

Embora tenha sido encontrado uma correlação significativa entre o tratamento de autofluorescência sem extrativos e o teor de lignina, foram observados resultados distintos de intensidade de fluorescência em relação ao teor de lignina principalmente para a espécie freijó (*C. sagotii* I.M. Johnst.). Isso pode ter ocorrido devido a fatores intrínsecos às espécies, entre eles, as diferenças na estrutura anatômica da madeira, como arranjo dos vasos, tamanho das fibras e composição celular, que podem influenciar na intensidade de fluorescência detectada (Donaldson & Radotić, 2013).

A lignina não é uniformemente distribuída dentro da matriz da parede celular, podendo estar mais concentrada em regiões específicas como lamelas médias ou paredes secundárias (Souza *et al.*, 2019). Assim como, a composição química e as unidades monoméricas da lignina (guaiacil, siringil e p-hidroxifenil) podem variar entre espécies (Vanholme, 2010), essas diferenças podem ter afetado diretamente a emissão de fluorescência, uma vez que cada tipo de lignina possui diferentes propriedades ópticas e fluorescentes.

A avaliação individual do desempenho dos métodos utilizados para obter a intensidade de fluorescência, indica que o método 1 (fórmula de densidade integrada para remoção de *background* de área não fluorescente da imagem), apesar de apresentar resultados consistentes, requer maior intervenção manual e, conseqüentemente, maior tempo de processamento; além disso, a dependência da seleção manual pode introduzir variações devido à subjetividade de quem realiza a análise. O método 2 (fórmula de densidade integrada para remoção de *background* de área não fluorescente da imagem com correção de acordo com a área analisada) apresenta uma melhoria em relação ao método 1 no que diz respeito à normalização dos dados, e apresentou os maiores coeficientes de determinação e coeficientes de correlação. Contudo, ele ainda depende de cálculos adicionais e maior processamento dos dados, o que reduz sua praticidade para análises em larga escala.

O método 3 (determinação de intensidade de fluorescência de forma automática pela ferramenta '*subtract*'), apresentou o segundo maior coeficiente de determinação (R^2), e mostrou-se o mais eficiente e prático, permitindo a remoção automática do *background* diretamente no software *ImageJ*, esse processo reduz significativamente o tempo de análise e elimina possíveis vieses decorrentes da subjetividade do analista, a automatização garante maior reprodutibilidade, o que é essencial para estudos

comparativos. Os resultados obtidos pelos três métodos mostraram-se consistentes, validando a aplicabilidade das metodologias para análises desse tipo. Entretanto, o método de determinação da intensidade de fluorescência de forma automática é o mais recomendado, não apenas pela praticidade e eficiência, mas também pela padronização dos resultados, o que é fundamental para estudos de maior escala ou que envolvam múltiplos analistas.

5. CONCLUSÃO

A autofluorescência em lâmina sem extrativos foi o tratamento mais eficaz para relacionar a intensidade de fluorescência da lignina e o teor total de lignina, devido a remoção dos extrativos fluorescentes que causam interferências nos resultados. Especialmente quando analisada pelo Método 3 (determinação automática da intensidade de fluorescência pela ferramenta ‘*subtract*’), que apresentou alto coeficiente de determinação e correlação significativa, além de melhor desempenho devido à sua automatização no *ImageJ*, garantindo rapidez, reprodutibilidade e padronização dos resultados.

Nossos resultados confirmam a eficácia da microscopia de fluorescência como ferramenta para investigar a lignina na parede celular, quando há a remoção dos extrativos combinados a métodos automatizados. Essa metodologia pode ser aplicada a outras espécies lenhosas e a estudos com outros objetivos, como investigar a lignina na parede celular.

6. REFERÊNCIAS

AKIN, D. E.; BURDICK, D. Relationships of different histochemical types of lignified cell walls to forage digestibility. **Crop Science**, v. 21, p. 577-581, 1981.

BAN, M.; INAGAKI, T.; TSUCHIKAWA, S. Effect of cellular structure on the optical properties of wood. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 26, p. 53-60, 2018. <https://doi.org/10.1177/0967033518757233>

DHARMAWARDHANA, D. P.; ELLIS, B. E.; CARLSON, J. E. Characterization of vascular lignification in *Arabidopsis thaliana*. **Canadian Journal of Botany**, v. 70, p. 2238-2244, 1992.

DONALDSON, L. A. Lignification and lignin topochemistry - an ultrastructural view. **Phytochemistry**, v. 57, p. 859-873, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00049-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00049-8)

DONALDSON, L. A.; RADOTIĆ, R.; KALAUZI, A.; DJIKANOVIĆ, D.; JEREMIĆ, M. Quantification of compression wood severity in tracheids of *Pinus radiata* D. Don using confocal fluorescence imaging and spectral deconvolution”. **The Journal of Structural**

Biology. 169: 106–115. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.09.006>

DONALDSON, L. A. Softwood and hardwood lignin fluorescence spectra of wood cell walls in different mounting media. **IAWA Journal**, v. 34, n. 1, p. 3-19, 2013. <https://doi.org/10.1163/22941932-00000002>

DONALDSON, L. A.; RADOTIĆ, K. Fluorescence lifetime imaging of lignin autofluorescence in normal and compression wood. **Journal of Microscopy**, v. 251, n. 2, p. 178-187, 2013. <https://doi.org/10.1111/jmi.12059>

FERNANDO, C.; AUDIBERT, A.; SIMON, F.; TAZI, J.; JUGE, F. A role for the serine/arginine-rich (SR) protein B52/SRSF6 in cell growth and Myc expression in *Drosophila*. **Genetics**, v. 199, p. 1201-1211, 2015. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.174391>

FERREIRA, R. M.; SILVA, M. R.; OLIVEIRA, T. S. Quantification of lignin in native Amazonian species: a comparative approach. **Revista Floresta**, v. 50, p. 123-135, 2020.

GARCIA, M. L.; SILVA, J. A.; COSTA, F. Natural fluorescence analysis of wood: a new approach for lignin quantification. **Wood Science and Technology**, v. 53, p. 789-804, 2019.

GIERLINGER, N.; SCHMIDT, M. Imaging of plant cell walls by confocal Raman microscopy. **Nature Protocols**, v. 1, p. 2632-2638, 2006.

GOLDSCHIMID, O. Ultraviolet spectra. In: SARKANEN, K. V.; LUDWIG, C. H. (Eds.). **Lignins: occurrence, formation, structure and reactions**. New York: Wiley, 1971. p. 241-266.

GOMIDE, J. L.; DEMUNER, B. J. Determination of lignin content in woody material: modified Klason method. **O Papel**, v. 47, p. 36-38, 1986.

KUTSCHA, N. P.; GRAY, J. R. **The suitability of certain stains for studying lignification in balsam fir (*Abies balsamea* (L.) Mill.)**. Orono: University of Maine Life Sciences and Agriculture Experiment Station, 1972. (Technical Bulletin, 53).

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3. ed. New York: Springer, 2006. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>

LIEBSCH, D.; SUNARYO, W.; HOLMLUND, M.; NORBERG, M.; ZHANG, J.; HALL, H. C.; HELIZON, H.; JIN, X.; HELARIUTTA, Y.; NILSSON, O.; POLLE, A.; FISCHER, U. Class I KNOX transcription factors promote differentiation of cambial derivatives into xylem fibers in the *Arabidopsis* hypocotyl. **Development**, v. 141, p. 4311-4319, 2014. <https://doi.org/10.1242/dev.111369>

LILJEGREN, S. Phloroglucinol stain for lignin. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2010, pdb.prot4954, 2010. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4954>

LIU, Y. X.; ZHAO, G. J. **Wood resource material science**. Beijing: Chinese Forestry Press, 2004.

MESHITSUKA, G.; NAKANO, J. Mechanism of Maule color-reaction. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 178, p. 36-36, 1979.

MOULIN, J. C.; SILVA, J. T. S.; SANTOS, V. B.; CIRILO, N. R. M.; ALMEIDA, M. N. F.; VIDAUERRE, G. B. Lignin fluorescence of *eucalyptus* wood subjected to water stress. In: CONGRESSO BRASILEIRO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA MADEIRA, 6., 2024.

CBCTEM, 2024.

PESQUET, E.; RANOCHA, P.; LEGAY, S.; DIGONNET, C.; BARBIER, O.; PICHON, M.; GOFFNER, D. Novel markers of xylogenesis in zinnia are differentially regulated by auxin and cytokinin. **Plant Physiology**, v. 139, p. 1821-1839, 2005. <https://doi.org/10.1104/pp.105.064337>

SCHINDELIN, J.; ARGANDA-CARRERAS, I.; FRISE, E. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, v. 9, p. 676–682, 2012. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>

SOUZA, M. T.; LIMA, J. T.; ASSIS, C. O.; SOARES, B. C.; LIMA, L. C.; MOREIRA, S. I. Distribuição espacial da lignina na parede celular da madeira de *Eucalyptus grandis*. **Scientia Forestalis**, v. 47, n. 121, p. 125-130, 2019. <https://doi.org/10.18671/scifor.v47n121.12>

TAPPI - TECHNICAL ASSOCIATION OF PULP AND PAPER INDUSTRY. **T 204 cm-17: Solvent extractives of wood and pulp**. Atlanta, 2017.

TAPPI - TECHNICAL ASSOCIATION OF PULP AND PAPER INDUSTRY. **T 210 cm-93: Sampling and testing wood pulp shipments for moisture**. Atlanta, 1993.

TAPPI - TECHNICAL ASSOCIATION OF PULP AND PAPER INDUSTRY. **T 222 om-22: Acid-insoluble lignin in wood and pulp**. Atlanta, 2022.

TAPPI - TECHNICAL ASSOCIATION OF PULP AND PAPER INDUSTRY. **T 257 cm-85: Sampling and preparing wood for analysis**. Atlanta, 1985.

TRIBOT, A.; AMER, G.; ALIO, M. A.; BAYNAST, H.; DELATTRE, C.; PONS, A.; MATHIAS, J. D.; CALLOIS, J. M.; VIAL, C.; MICHAUD, P.; DUSSAP, C. G. Wood-lignin: Supply, extraction processes and use as bio-based material. **European Polymer Journal**, v. 112, p. 228-240, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.01.007>

URSCHE, R.; ANDERSEN, T. G.; MARHAVÝ, P.; GELDNER, N. A protocol for combining fluorescent proteins with histological stains for diverse cell wall components. **The Plant Journal**, v. 93, n. 2, p. 399-412, 2018.

VALLET, C.; CHABBERT, B.; CZANINSKI, Y.; MONTIES, B. Histochemistry of lignin deposition during sclerenchyma differentiation in alfalfa stems. **Annals of Botany**. 78: 625-632. 1996. <https://doi.org/10.1006/anbo.1996.0170>

VANHOLME, R.; DEMEDTS, B.; MORREEL, K.; RALPH, J.; BOERJAN, W. Lignin biosynthesis and structure. **Plant Physiology**, v. 153, n. 3, p. 895-905, 2010. <https://doi.org/10.1104/pp.110.155119>

YAMASHITA, D.; KIMURA, S.; WADA, M.; TAKABE, K. Improved Maule color reaction provides more detailed information on syringyl lignin distribution in hardwood. **Journal of Wood Science**, v. 62, p. 131-137, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10086-016-1536-9>

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E DA DISTRIBUIÇÃO DE LIGNINA EM MADEIRAS DE ESPÉCIES NATIVAS DA AMAZÔNIA

RESUMO

Na Floresta Amazônica, a alta diversidade de espécies arbóreas resulta em grande variabilidade anatômica da madeira. Entretanto, o potencial econômico e tecnológico dessas madeiras ainda é pouco explorado. O objetivo deste estudo foi caracterizar a anatomia da madeira e analisar a distribuição e a intensidade de fluorescência da lignina em diferentes regiões celulares de sete espécies nativas da Amazônia: melancieira (*Alexa grandiflora* Ducke), angelim saia (*Parkia pendula* (Willd.) Benth. ex Walp.), guaruba (*Vochysia maxima* Ducke), angelim pedra (*Hymenolobium petraeum* Ducke), freijó (*Cordia sagotii* I.M. Johnst.), pequiá (*Caryocar villosum* (Aubl.) Pers.) e angelim vermelho (*Dinizia excelsa* Ducke). A caracterização anatômica da madeira foi realizada a partir da avaliação dos vasos, fibras, raios e pontoações intervasculares, incluindo suas dimensões, frequência e organização estrutural. Também foi analisada a distribuição qualitativa da lignina guaiacil e siringil nas paredes celulares e na lamela média, bem como a intensidade de fluorescência da lignina nas paredes dos vasos, das fibras e na lamela média. As espécies analisadas apresentam diferentes estratégias anatômicas e químicas no xilema. O pequiá destacou-se por vasos longos e de grande diâmetro, associados à maior eficiência hidráulica, enquanto o freijó apresentou vasos mais curtos e elevada frequência, indicando maior segurança do sistema de condução. As pontoações ajustaram-se às dimensões dos vasos, com destaque para a presença de pontoações guarnecidas em angelim pedra, angelim vermelho e guaruba, reforçando mecanismos de contenção de embolias. Os raios parenquimáticos refletiram distintas capacidades de armazenamento e redistribuição radial. As fibras apresentaram predominantemente grande comprimento, com destaque para o pequiá, e paredes espessas, especialmente no angelim pedra. A lignina apresentou predominância de unidades guaiacil nos vasos e na lamela média e variações nas fibras, enquanto a análise por fluorescência confirmou maior concentração de lignina na lamela média. De modo geral, as espécies combinaram de forma integrada características anatômicas e químicas, expressando estratégias funcionais distintas no desempenho hidráulico e mecânico da madeira.

Palavras-chave: Anatomia funcional do xilema; Microscopia de fluorescência; Lignina guaiacil e siringil; Pontoações intervasculares; Parede celular.

1. INTRODUÇÃO

A Floresta Amazônica abriga a maior diversidade de espécies arbóreas do planeta, constituindo um patrimônio biológico de valor inestimável e uma importante fonte de recursos madeireiros, de acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura - FAO (2020). Apesar disso, o potencial econômico e tecnológico dessa biodiversidade permanece subexplorado, em grande parte devido à escassez de informações científicas consolidadas sobre as propriedades das madeiras nativas. A caracterização anatômica detalhada da madeira é importante por influenciar diretamente as propriedades físicas e mecânicas, determinando os usos potenciais e as aplicações tecnológicas das espécies (Lima *et al.*, 2024). Compreender esses atributos é fundamental para promover a utilização sustentável e agregar valor às madeiras amazônicas.

A anatomia da madeira estuda a organização dos tecidos vegetais secundários, que são formados por uma complexa associação de elementos celulares, como fibras, vasos e parênquimas (IAWA Committee, 1989). Estudos recentes comprovam que variáveis anatômicas, como a fração da parede celular, o diâmetro e a frequência dos vasos e dos raios, correlacionam-se significativamente com propriedades físicas fundamentais, como a densidade básica e o teor de umidade da madeira (Eloy *et al.*, 2024), determinando sua adequação para diferentes fins tecnológicos.

Além disso, as espécies vegetais apresentam estratégias anatômicas que permitem ajustar o desempenho hidráulico às condições ambientais onde ocorrem. Entre essas estratégias, destacam-se variações nas dimensões dos vasos, que podem favorecer maior eficiência na condução de água ou maior segurança contra embolias, além de modificações na frequência dos elementos vasculares (Pan *et al.*, 2025). Estruturas especializadas, como as pontoações guarnecidas, atuam como mecanismos de controle do fluxo entre vasos, reduzindo o risco de propagação de embolias e aumentando a tolerância a ambientes sujeitos à restrição hídrica (Simioni *et al.*, 2020).

Dentre os componentes da parede celular, a lignina desempenha um papel importante como polímero estrutural, conferindo rigidez, redução da higroscopicidade e resistência mecânica ao tecido lenhoso, além de atuar na defesa contra patógenos (Ralph *et al.*, 2019). Sua distribuição heterogênea nas diferentes camadas da parede e entre os tipos celulares está intrinsecamente ligada à função de cada elemento. A lamela média, altamente lignificada, atua como cimento intercelular (Zhang *et al.*, 2022), enquanto a lignina nas paredes das fibras e vasos confere suporte mecânico e proteção (Chen *et al.*,

2025). Além da variação espacial, a composição química da lignina também varia entre espécies e tipos celulares. A lignina do tipo guaiacil tende a se concentrar em vasos e lamela média, conferindo resistência à compressão, enquanto a lignina siringil predomina nas fibras, favorecendo flexibilidade e resistência à tração (Zhou *et al.*, 2011).

A análise conjunta desses parâmetros aprofunda o entendimento sobre a organização estrutural da madeira, contribuindo para a valorização de espécies nativas pouco estudadas e para a ampliação do uso de abordagens integradas na caracterização de madeiras tropicais. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a anatomia da madeira e analisar a distribuição e a intensidade de fluorescência da lignina nas paredes dos vasos, das fibras e na lamela média de espécies nativas da Amazônia.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A madeira foi coletada em serrarias e marcenarias localizadas na área urbana do município de Altamira, Pará, Brasil. Foram selecionadas amostras de sete espécies comercializadas na região: melancieira (*Alexa grandiflora* Ducke, Fabaceae), angelim saia (*Parkia pendula* (Willd.) Benth. ex Walp., Fabaceae), guaruba (*Vochysia maxima* Ducke, Vochysiaceae), angelim pedra (*Hymenolobium petraeum* Ducke, Fabaceae), freijó (*Cordia sagotii* I.M. Johnst., Boraginaceae), pequiá (*Caryocar villosum* (Aubl.) Pers., Caryocaraceae) e angelim vermelho (*Dinizia excelsa* Ducke, Fabaceae). As análises foram conduzidas para caracterização anatômica da madeira, distribuição da lignina guaiacil e siringil, e intensidade de fluorescência da lignina em diferentes regiões celular.

2.1 Caracterização anatômica

2.1.1 Características dos raios e frequência dos vasos

As amostras de madeira, com dimensões de 1,0 × 1,5 × 2,0 cm, orientadas nas direções radial, tangencial e longitudinal, respectivamente, foram inicialmente amolecidas em água em ebulição e, em seguida, fixadas em micrótomo de deslize modelo Leica SM 2000R, para obtenção de cortes nos planos transversal e tangencial, com espessura média de 20 µm. Após o corte, foi realizado o clareamento do material em 3,3% (v/v) de hipoclorito de sódio (NaClO) a uma temperatura entre 30°C e 40°C por 3 minutos, seguida de lavagem com água destilada. Logo, os cortes foram corados com safranina aquosa a 1% (m/v) e montados em lâminas histológicas temporárias, utilizando glicerol como meio de montagem.

As imagens para mensuração foram obtidas com o auxílio de uma câmera digital acoplada ao microscópio óptico de luz transmitida da marca Zeiss, modelo Axio Scope A.1, utilizando objetiva de 5×. Para a quantificação da frequência dos vasos, as análises foram realizadas em cortes transversais, sendo determinada utilizando um quadrante padronizado de 1000 μm^2 , delimitado no campo visual do microscópio, no qual foi realizada a contagem do número de vasos presentes na área definida, conforme a Associação Internacional de Anatomistas da Madeira (IAWA Committee, 1989). Foram realizadas 50 repetições por espécie.

Nos cortes tangenciais, utilizando objetiva de 5×, foi avaliada a frequência dos raios por meio de uma linha de interseção de 1000 μm de comprimento, traçada no campo visual da lâmina, onde foram contabilizados os raios que interceptavam a linha de referência. A mensuração da largura e da altura dos raios seguiu os mesmos cortes e foi realizada com base nas imagens obtidas, conforme os critérios do IAWA Committee (1989). Também foram realizadas 50 medições por espécie.

2.1.2 Dimensões dos elementos de vasos e características das pontoações

A análise dos elementos de vasos e das pontoações intervasculares foi realizada por meio de microscopia confocal de varredura a laser Olympus LEXT. Foram utilizados fragmentos previamente macerados conforme descrito na Seção 2.1.4, corados com safranina a 1% (m/v). As observações foram conduzidas em um microscópio confocal, utilizando objetivas de 20× para os elementos de vasos e de 50× para as pontoações intervasculares, o equipamento permitiu a varredura ótica em profundidade (Z-stack), possibilitando a visualização tridimensional das estruturas celulares com alta resolução.

As medições do comprimento e do diâmetro dos elementos de vasos, bem como a altura da abertura (HA), altura total (HT), diâmetro da abertura (DA) e o diâmetro total das pontoações intervasculares (DT) (Figura 1a), foram realizadas diretamente no software do equipamento, por meio das ferramentas de análise dimensional integradas, sendo realizadas 25 medições por espécie, seguindo a recomendação do IAWA Committee (1989). A frequência das pontoações (número de pontoações por unidade de área) foi determinada utilizando um quadrante padronizado de 10.000 μm^2 (Figura 1b), conforme Fernández *et al.* (2019).

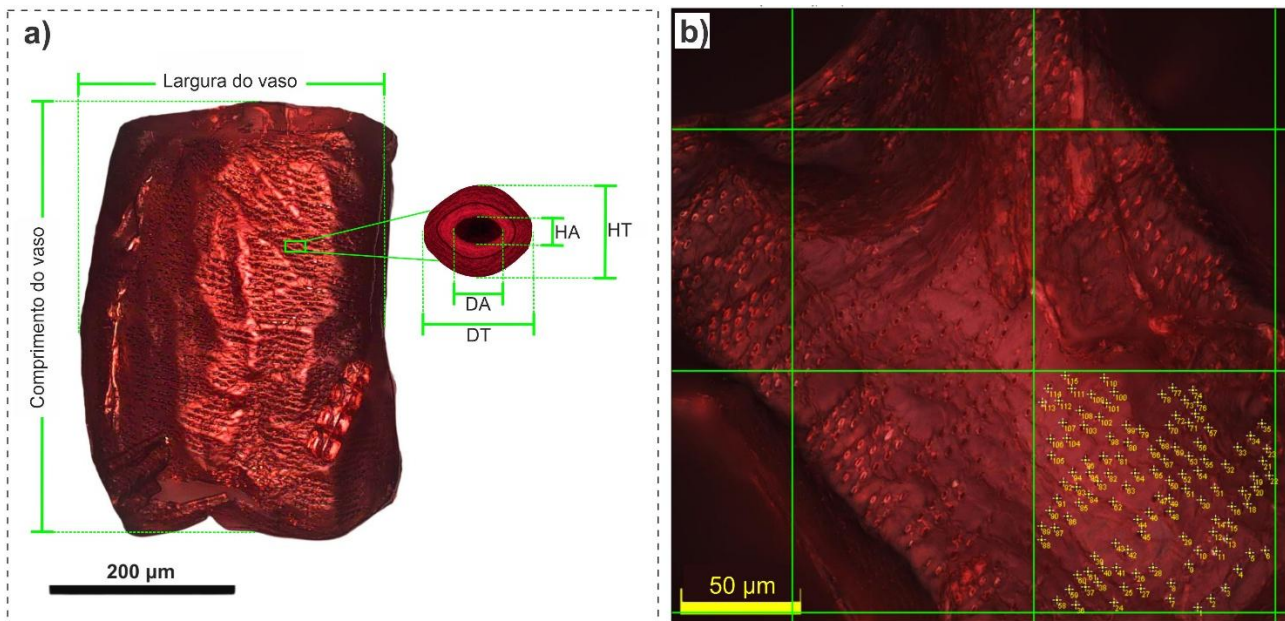


Figura 1 – a) Imagem do elemento de vaso da espécie angelim pedra (*Hymenolobium petraeum* Ducke), representação indicando as medições realizadas, incluindo o comprimento e a largura do elemento de vaso, a altura da abertura da pontoação (HA), altura total da pontoação (HT), diâmetro da abertura da pontoação (DA) e o diâmetro total da pontoação (DT). Imagem adquirida utilizando objetivas de 20× para os elementos de vasos e de 50× para as pontoações intervasculares. **b)** Imagem do elemento de vaso da espécie angelim saia (*Parkia pendula* (Willd.) Benth. Ex Walp.), com um quadrante padronizado de 10.000 µm² para medição da frequência das pontoações (número de pontoações por unidade de área).

2.1.3 Análise anatômica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para visualizar com maior detalhamento as pontoações intervasculares, incluindo as pontoações guarnecidas, e a parede interna dos elementos vasculares, foi utilizado a microscopia eletrônica de varredura (MEV). As imagens foram obtidas no plano longitudinal tangencial, para todas as sete espécies estudadas.

Os corpos de prova foram fixados em suportes de alumínio (*stubs*) com fita condutora de carbono e posteriormente metalizados com ouro. A observação foi realizada em microscópio eletrônico de varredura (MEV) da marca Shimadzu, modelo SSX-550. As imagens foram capturadas em diferentes ampliações, de acordo com a estrutura anatômica de interesse.

2.1.4 Análise das fibras

A partir das amostras de madeira, foi realizado o processo de maceração para análise das fibras, com retirada de pequenos fragmentos no plano radial. Os fragmentos foram acondicionados em frascos de 25 mL contendo uma solução de ácido acético glacial e peróxido de hidrogênio (1:1, v/v), e mantidos em estufa a 60 °C por 48 horas, conforme protocolo adaptado de Nicholls & Dadswell, descrito por Ramalho (1987). Após esse

período, o material foi lavado com água destilada e corado com safranina a 1%(m/v) para facilitar a visualização das estruturas celulares.

Durante o preparo das lâminas, pequenas porções do material macerado foram transferidas para lâminas previamente preparadas com uma gota de glicerol, a fim de evitar sobreposição entre as fibras. As observações foram realizadas em microscópio óptico de luz transmitida da marca Zeiss, modelo Axio Scope A.1. Para cada espécie, foram realizadas 50 medições de comprimento da fibra, com o uso de objetiva de 5×, e 50 medições da largura da fibra e do diâmetro do lúmen, realizadas com objetiva de 50×. A espessura da parede celular (EP) foi calculada com base na diferença entre a largura da fibra (LF) e o diâmetro do lume (DL), dividida por dois.

2.1.5 Distribuição da lignina guaiacil e siringil

Para analisar a distribuição da lignina guaiacil e siringil na parede celular dos vasos, fibras e lamela média, foi empregada a reação de coloração de Mäule, conforme descrito por Yamashita *et al.* (2016). Esse teste permite a diferenciação qualitativa dos tipos de lignina, sendo a lignina siringil corada em vermelho e a lignina guaiacil em amarelo, conforme indicado por Nakagawa *et al.* (2012).

Os cortes anatômicos do plano transversal foram tratados utilizando solução aquosa de permanganato de potássio (KMnO₄) a 1% (m/v) por 5 minutos. Em seguida, foram lavados três vezes com água destilada e tratados com ácido clorídrico (HCl) 1 N por 30 minutos e, novamente, lavados com água destilada. Para gerar a reação de coloração, foi adicionado tampão Tris-HCl (Tris-hidroximetilaminometano clorídrico) 1 M (pH 8) às seções, que foram então montadas em lâminas de vidro e cobertas com lamínulas (Yamashita *et al.*, 2016). Para a observação foi usado o microscópio de fluorescência da marca Zeiss Axio Scope A.1, com fonte de luz HBO 50, utilizando objetiva de 20× 0,4 e NA 50× 0,75 NA, excitação de luz em 440-490 nm e emissão em 600-650 nm.

2.2 Análise da lignina por fluorescência

Os cortes transversais foram submersos em 3,3% (v/v) de hipoclorito de sódio (NaClO) a uma temperatura entre 30°C e 40°C por 3 minutos, seguidos de três lavagens com água destilada. Após esse procedimento, foram montados em lâminas com glicerol e observados sob microscópio de fluorescência com excitação de luz em 440–490 nm e emissão entre 490–565 nm (Silva *et al.*, 2025).

As imagens foram capturadas com aumento de $50\times 0,75$ NA, totalizando 20 fotomicrografias por espécie. A intensidade de fluorescência foi quantificada com auxílio do software *ImageJ-Fiji* (Schindelin *et al.*, 2012), correspondente à determinação automática da intensidade de fluorescência com remoção direta do *background* pela ferramenta ‘*subtract*’, sendo expressa em Unidades Arbitrárias (UA). A intensidade foi mensurada nas regiões anatômicas da parede celular do vaso (PV), parede celular da fibra (PF) e lamela média (LM), com delimitação manual das áreas específicas contendo $1,11 \mu\text{m}^2$ (Figura 2).

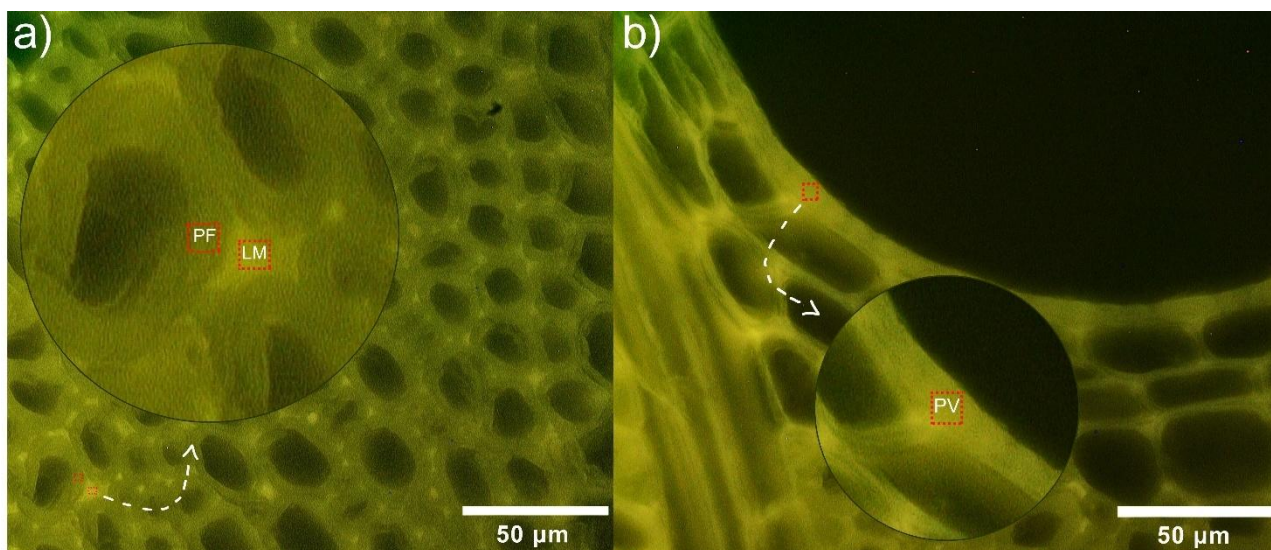


Figura 2 – a) Regiões anatômicas da parede celular da fibra (PF); Lamela média (LM) e b) parede celular do vaso (PV), da espécie melanciaira (*Alexa grandifora* Ducke), com delimitação manual das áreas específicas contendo $1,11 \mu\text{m}^2$.

2.3 Análise estatística dos dados

Os dados das características anatômicas foram submetidos à análise estatística descritiva. Os dados obtidos da intensidade de fluorescência foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Como não foi observada distribuição normal dos dados, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para verificação de diferença significativa entre os tipos celulares analisados. Quando identificado efeito significativo, foi aplicado o teste de comparação múltipla de Mann-Whitney, com nível de significância de 5%, para identificar diferenças entre pares (vaso \times fibra, vaso \times lamela média, fibra \times lamela média).

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização anatômica

A análise anatômica mostrou a variabilidade refletida nas dimensões dos elementos de vasos, pontoações, fibras e raios entre as espécies estudadas (Tabela 1). As

características anatômicas gerais podem ser observadas na Figura 3, que apresenta os cortes transversais e tangenciais das madeiras analisadas. Os elementos de vaso, conforme os critérios estabelecidos pelo IAWA Committee (1989), apresentaram diâmetros médios elevados, variando de 241,13 μm em *Alexa grandiflora* Ducke (melanciaira) a 310,70 μm em *Caryocar villosum* (Aubl.) Pers. (pequiá). Na Figura 3 é possível observar a variação no tamanho e na distribuição dos elementos de vasos entre as espécies. O comprimento variou de 299,59 μm em *Cordia sagotii* I.M. Johnst. (freijó) até 724,23 μm em pequiá, enquanto a frequência oscilou de 1,52 vasos/ mm^2 em *Parkia pendula* (Willd.) Benth. ex Walp. (angelim saia) a 7,76 vasos/ mm^2 em freijó.

Tabela 1 - Caracterização anatômica quantitativa da madeira de sete espécies nativas da Amazônia.

Tipo Celular	Medida	Espécies (nome comum)						
		Angelim pedra*	Angelim saia	Angelim vermelho*	Freijó	Guaruba*	Melanciaira	Pequiá
Vasos	Diâmetro (μm)	255,66	273,58	246,92	251,96	242,00	241,13	310,70
	Comprimento (μm)	387,94	384,66	368,45	299,59	440,03	374,28	724,23
	Frequência ($\text{n}^\circ/\text{mm}^2$)	2,56	1,52	3,82	7,76	1,94	1,98	4,10
Pontoações	DT (μm)	13,04	6,74	7,70	6,45	11,25	9,69	13,30
	HA (μm)	3,32	2,58	3,33	2,66	4,01	2,79	4,32
	Frequência ($\text{n}^\circ/10.000 \mu\text{m}^2$)	99,00	97,60	161,20	144,20	82,80	141,20	55,40
Raios	Largura (μm)	83,13	32,45	36,45	108,62	44,49	36,61	20,28
	Altura (μm)	389,02	328,73	251,20	1282,72	511,95	307,35	667,64
	Frequência (n°/mm)	5,76	7,40	6,56	3,56	4,46	7,61	13,76
Fibras	CF (μm)	2089,29	1608,39	1231,79	1709,03	1447,11	1135,69	2623,69
	LF (μm)	22,51	27,28	14,80	23,29	25,47	25,25	21,80
	DL (μm)	3,64	14,94	2,28	10,33	13,00	14,36	7,75
	EP (μm)	9,44	6,17	6,26	6,48	6,23	5,45	7,03

Diâmetro total das pontoações intervasculares (DT); Altura da abertura das pontoações intervasculares (HA); Comprimento da fibra (CF); Largura da fibra (LF); Diâmetro do lúmen (DL) e Espessura da parede da fibra (EP). *indica a espécie que possui pontuação guarnecida.

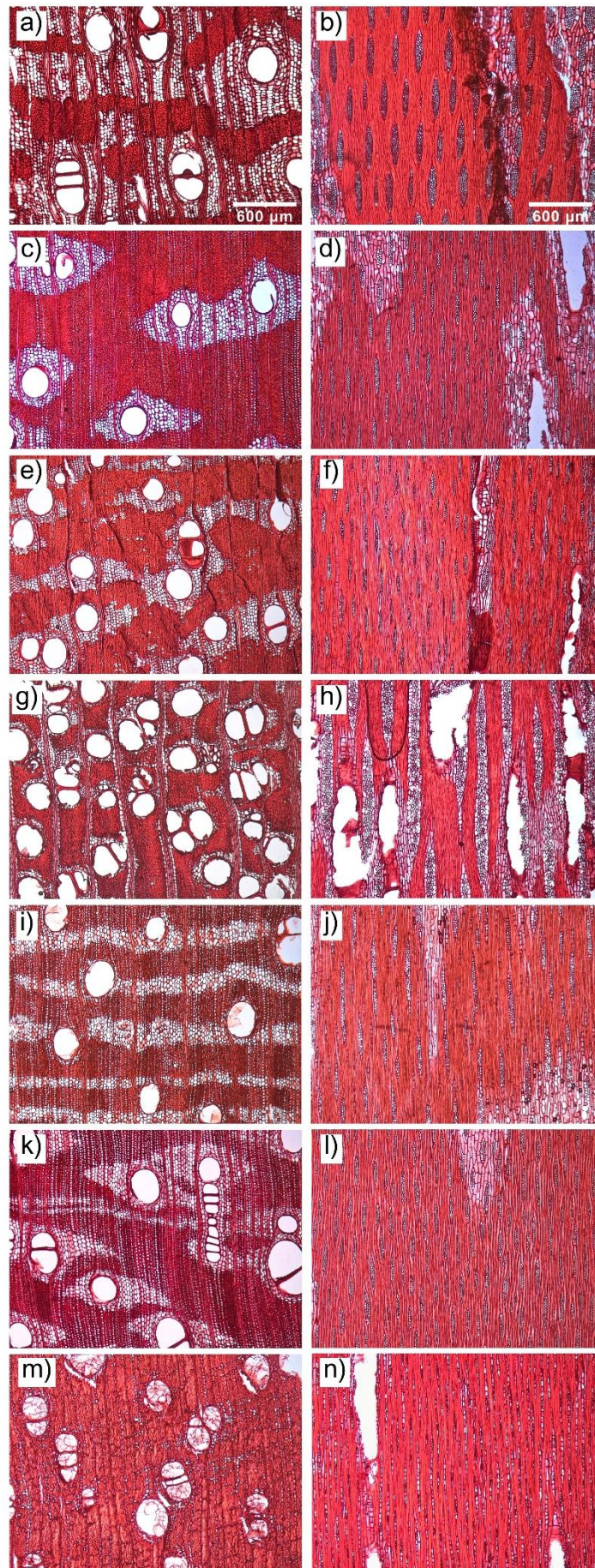


Figura 3 – Imagens anatômicas da madeira de sete espécies nativas em dois planos de seção: transversal (primeira coluna), e tangencial (segunda coluna). As imagens foram coradas com safranina. Escala: 600 μm .

(a–b) Angelim pedra (*Hymenolobium petraeum* Ducke); (c–d) Angelim saia (*Parkia pendula* (Willd.) Benth. Ex Walp.); (e–f) Angelim vermelho (*Dinizia excelsa* Ducke); (g–h) Freijó (*Cordia sagotii* I.M. Johnst.); (i–j) Guaruba (*Vochysia maxima* Ducke); (k–l) Melanciaira (*Alexa grandiflora* Ducke); (m–n) Pequiá (*Caryocar villosum* (Aubl.) Pers).

Os raios mostraram grande variação em suas dimensões (Figura 3). O freijó apresentou os raios mais altos (1282,72 μm), enquanto o pequiá os menores valores (307,35 μm). A largura variou de 20,28 μm no pequiá a 108,62 μm no freijó. A frequência foi maior no pequiá (13,76 raios/mm) e menor no freijó (3,56 raios/mm) (Tabela 1).

As fibras também apresentaram diferenças relevantes. Os maiores comprimentos foram observados no pequiá (2623,69 μm), enquanto o menor foi registrado na melanciaira (1135,69 μm). A largura variou de 14,80 μm no angelim vermelho até 27,28 μm no angelim saia. O diâmetro do lúmen variou de 2,28 μm no angelim vermelho até 14,94 μm no angelim saia, enquanto a espessura da parede das fibras variou de 5,45 μm na melanciaira a 9,44 μm no angelim pedra (Tabela 1).

As pontoações intervasculares apresentaram diâmetro total de 6,45 μm em freijó até 13,30 μm em pequiá, e altura da abertura variando entre 2,58 μm em angelim saia e 4,32 μm em pequiá (Tabela 1). A frequência de pontoações variou amplamente entre as espécies, sendo mais elevada no angelim vermelho (*Dinizia excelsa* Ducke) com 161,20/10.000 μm^2 , e mais baixa no pequiá, com 55,40/10.000 μm^2 (Tabela 1). As espécies angelim vermelho, angelim pedra e guaruba, apresentaram pontoações intervasculares, observadas no MEV, do tipo guarnecida, caracterizadas por protuberâncias que se projetam a frente do orifício da pontoação (Figura 4b, c, d).

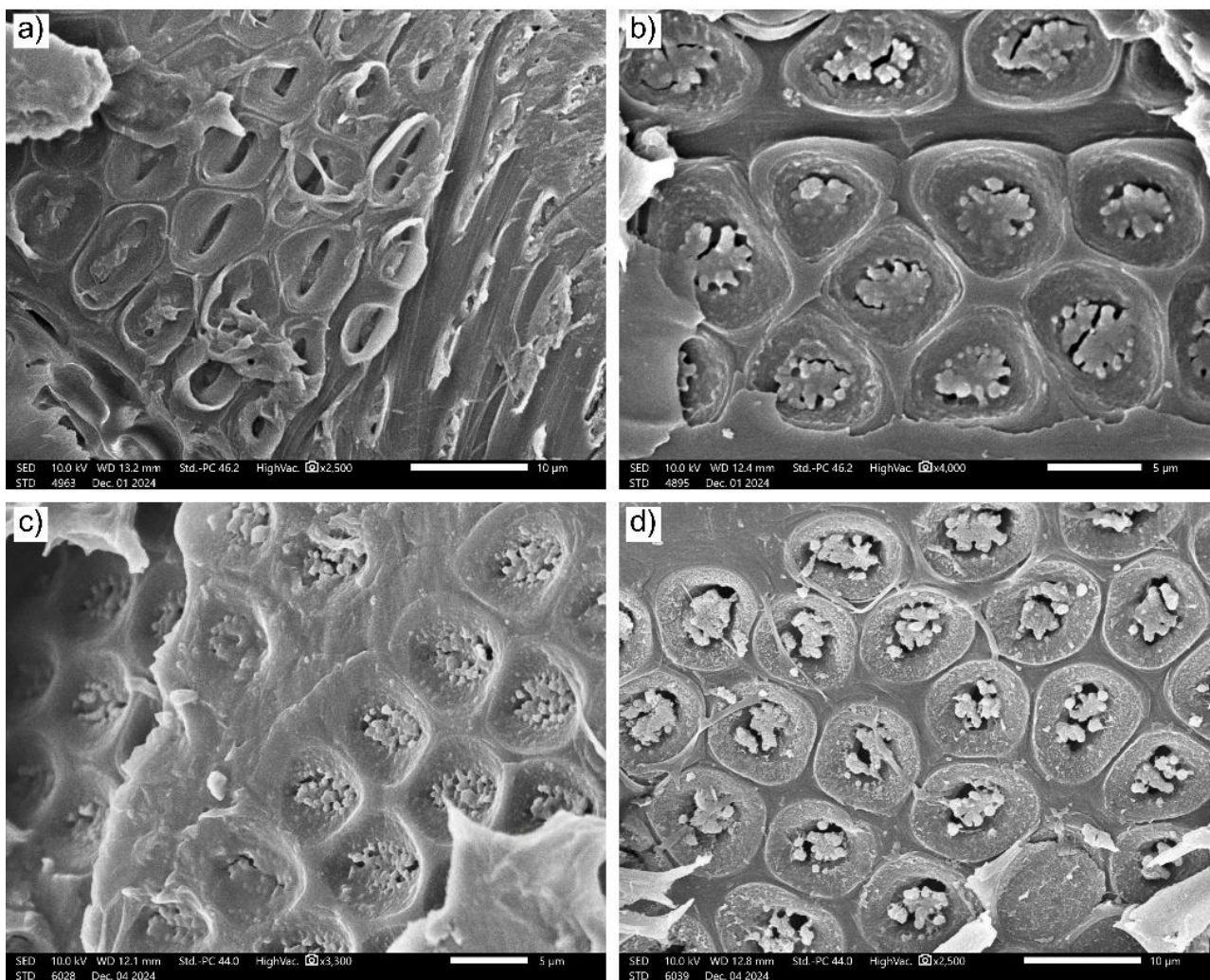


Figura 4 - Pontoações intervasculares observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). a) Pontoações areoladas dos vasos da espécie angelim vermelho (*Dinizia excelsa* Ducke). Pontoações do tipo guarnecida na espécie de: b) angelim vermelho (*Dinizia excelsa* Ducke); c) angelim pedra (*Hymenolobium petraeum* Ducke); d) guaruba (*Vochysia maxima* Ducke).

No MEV foi observada a presença de espessamentos helicoidais bem definidos na parede interna dos vasos da maioria das espécies, com exceção do angelim saia (Figura 5). Esses espessamentos apresentaram-se dispostos de forma contínua ao longo do eixo longitudinal do vaso, se estendendo até regiões próximas às pontoações, formando estrias paralelas, regularmente distribuídas ao longo de toda a extensão analisada (Figura 5a). Entretanto, foi verificada uma variação no ângulo de inclinação das faixas helicoidais, nas micrografias correspondentes às espécies angelim vermelho e pequiá (Figura 5c, g), os espessamentos helicoidais apresentaram maior inclinação, com helicoides mais diagonais em relação ao eixo do vaso, formando espirais mais abertas em determinadas regiões.

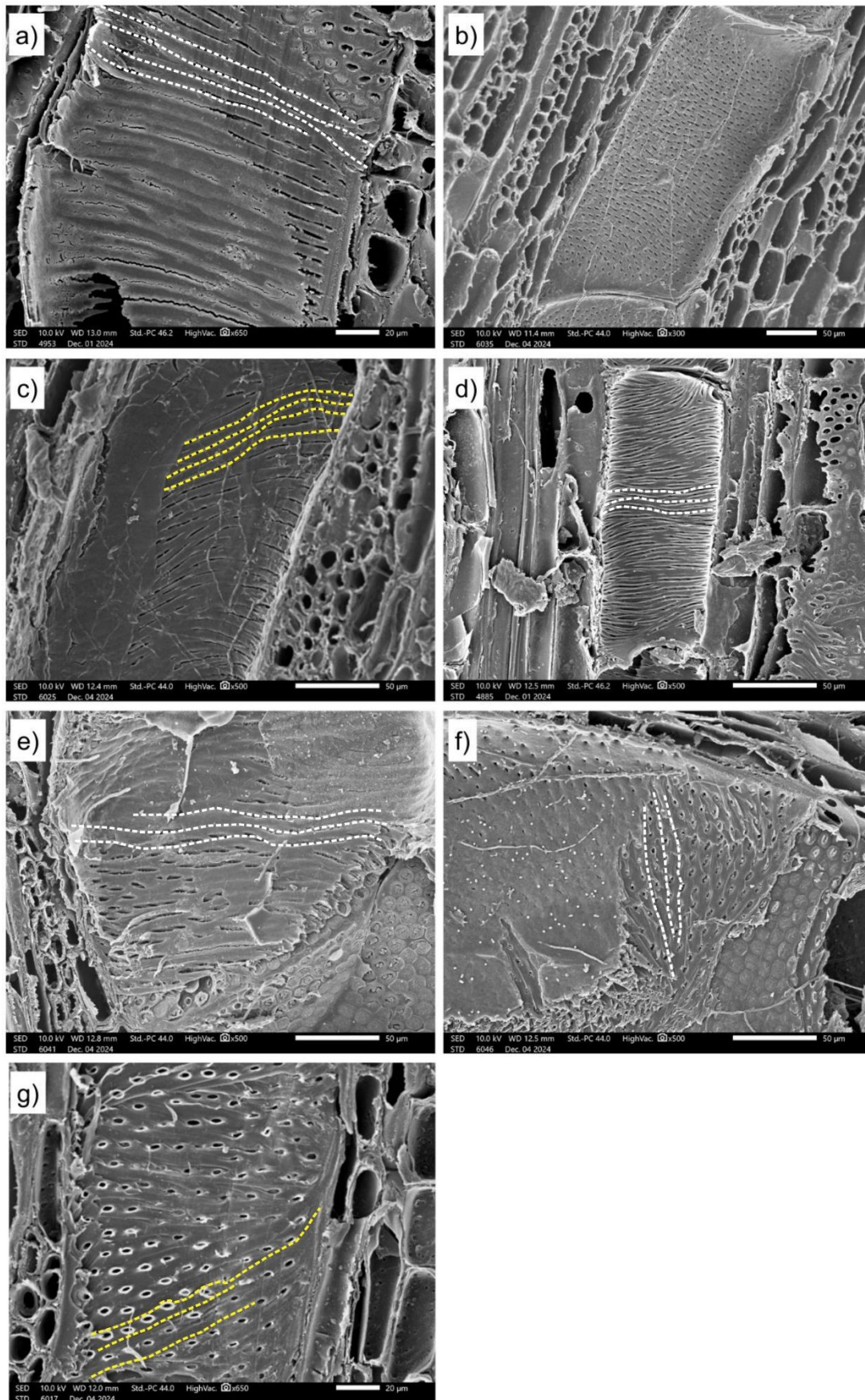


Figura 5 - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da parede interna de elementos de vaso em madeiras nativas da Amazônia, evidenciando a presença de espessamentos helicoidais com diferentes graus de inclinação e espessura. As linhas pontilhadas ilustram a inclinação dos espessamentos helicoidais ao longo do eixo longitudinal dos vasos; em branco, representando os espessamentos regularmente distribuídos ao longo da parede interna; e, em amarelo, espessamentos com maior inclinação.

Barras = 20–50 μm . a) Angelim pedra (*Hymenolobium petraeum* Ducke); b) Angelim saia (*Parkia pendula* (Willd.) Benth. Ex Walp.); c) Angelim vermelho (*Dinizia excelsa* Ducke); d) Freijó (*Cordia sagotii* I.M. Johnst.); e) Guaruba (*Vochysia maxima* Ducke); f) Melanciaira (*Alexa grandiflora* Ducke); g) Pequiá (*Caryocar villosum* (Aubl.) Pers).

A microscopia confocal a laser mostrou a estrutura dos vasos (Figura 6). A classificação do formato dos elementos de vaso foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos pelo IAWA Committee (1989). A forma em barril (vasos mais curtos e largos), foi a mais comum, observada no angelim pedra, angelim saia, angelim vermelho, guaruba e melanciaira. O freijó apresentou elementos de vasos predominantemente em forma de tambor (dimensão do comprimento semelhante a largura) (Figura 6d), enquanto o pequiá destacou-se por apresentar elementos de vaso longos e em forma de tubo (maior comprimento em relação a largura) (Figura 6g).

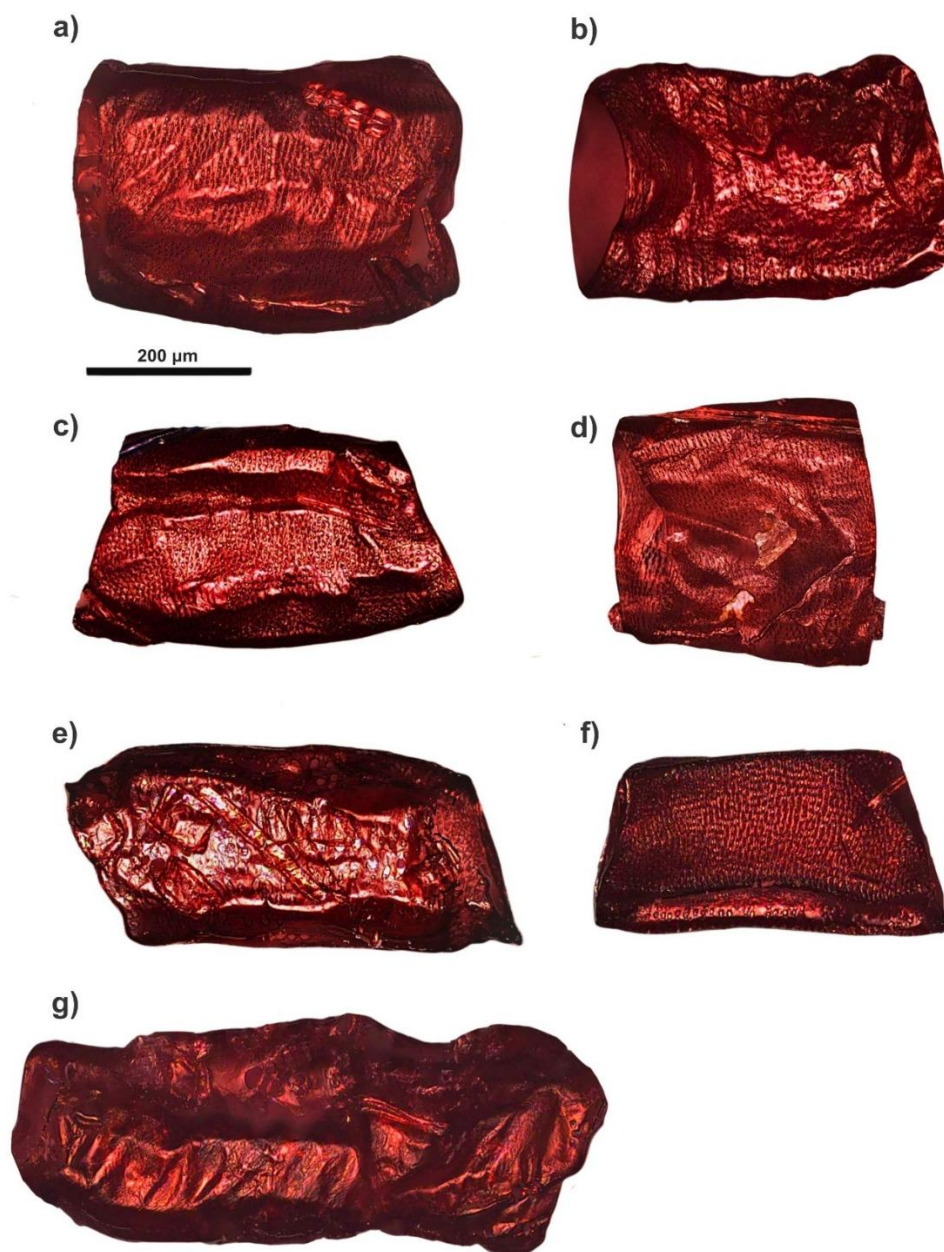


Figura 6 - Elementos de vaso isolados de sete espécies nativas da Amazônia, visualizados por microscopia confocal de varredura a laser após coloração com safranina a 1%. As imagens tridimensionais foram obtidas por meio de varredura ótica em profundidade (Z-stack), permitindo alta resolução das paredes celulares e estruturas associadas. Escala: 200 µm. (a) Angelim pedra (*Hymenolobium petraeum* Ducke); (b) Angelim saia (*Parkia pendula* (Willd.) Benth. Ex Walp.); (c) Angelim vermelho (*Dinizia excelsa* Ducke); (d) Freijó (*Cordia sagotii* I.M. Johnst.); (e) Guaruba (*Vochysia maxima* Ducke); (f) Melanciaira (*Alexa grandiflora* Ducke); (g) Pequiá (*Caryocar villosum* (Aubl.) Pers).

A presença de caldas (extensões nas extremidades) nos elementos de vasos foi uma característica variável em função da espécie. Elas foram observadas, geralmente curtas e com transição abrupta (de maneira repentina, sem afinamento progressivo), no angelim saia, angelim vermelho e freijó. O padrão das pontoações intervasculares foi majoritariamente oposto na maioria das espécies, organizando-se em fileiras horizontais curtas a longas orientadas transversalmente ao longo do vaso. Entretanto, nas espécies guaruba e pequiá, foi observado um padrão distintivo do tipo escalariforme, às vezes intercalado com disposições opostas. As aberturas das pontoações apresentaram formato de fenda em todos os casos. A descrição detalhada de cada espécie é sumarizada no Quadro 1.

Quadro 1 – Descrição detalhada das características anatômicas dos vasos das sete espécies estudadas, abrangendo formato, arranjo, dimensões e tipos de pontoações, conforme critérios estabelecidos pelo IAWA Committee (1989).

Espécie	Descrição dos vasos
Angelim pedra (<i>Hymenolobium petraeum</i> Ducke)	Elementos do vaso de diâmetro grande (255,66 µm), e comprimento médio (387,94 µm); predominantemente em forma de barril; caldas ausentes; pontoações intervasculares opostas dispostas em fileiras horizontais curtas a longas, orientadas transversalmente ao longo do vaso, com aberturas em forma de fenda, áreas sem pontoações se presente, muito pequena.
Angelim saia (<i>Parkia pendula</i> (Willd.) Benth. Ex Walp.)	Elementos do vaso de diâmetro grande (273,58 µm), e comprimento médio (384,66 µm); predominantemente em forma de barril, às vezes em forma de tambor; caldas curtas, com transição abrupta, às vezes gradual; pontoações intervasculares opostas dispostas em fileiras horizontais curtas a longas, orientadas transversalmente ao longo do vaso, com aberturas em forma de fenda, áreas sem pontoações às vezes presente, pequena.
Angelim vermelho (<i>Dinizia excelsa</i> Ducke)	Elementos do vaso de diâmetro grande (246,92 µm), e comprimento médio (368,45 µm); predominantemente em forma de barril, às vezes em forma de tambor; caldas curtas, com transição abrupta, às vezes ausente; pontoações intervasculares opostas dispostas em fileiras horizontais curtas a longas, orientadas transversalmente ao longo do vaso, com aberturas em forma de fenda, áreas sem pontoações às vezes presente, pequena.
Freijó (<i>Cordia sagotii</i> I.M. Johnst.)	Elementos do vaso de diâmetro grande (251,96 µm), e comprimento pequeno (299,59 µm); predominantemente em forma de tambor; caldas curtas, com transição abrupta, às vezes ausente; pontoações intervasculares opostas dispostas em fileiras horizontais curtas a longas, orientadas transversalmente ao longo do vaso, com aberturas em forma de fenda, áreas sem pontoações às vezes presente, pequena.
Guaruba (<i>Vochysia maxima</i> Ducke)	Elementos do vaso de diâmetro grande (242,00 µm), e comprimento médio (440,03 µm); predominantemente em forma de barril; caldas ausentes; pontoações intervasculares escalariformes, às vezes opostas dispostas em fileiras horizontais curtas a longas, com aberturas em forma de fenda, áreas sem pontoações presentes regularmente; pequenas a grandes.

Melanciaira (<i>Alexa grandiflora</i> Ducke)	Elementos do vaso de diâmetro grande (241,13 µm), e comprimento médio (374,28 µm); predominantemente em forma de barril; caldas ausentes; pontoações intervasculares opostas dispostas em fileiras horizontais curtas a longas, orientadas transversalmente ao longo do vaso, com aberturas em forma de fenda, áreas sem pontoações se presente, muito pequena.
Pequiá (<i>Caryocar villosum</i> (Aubl.) Pers)	Elementos do vaso de diâmetro grande (310,70 µm), e comprimento grande (724,23 µm); predominantemente em forma de tubo; caldas ausentes; pontoações intervasculares escalariformes, às vezes opostas dispostas em fileiras horizontais curtas a longas, com aberturas em forma de fenda, áreas sem pontoações presentes regularmente; pequenas a grandes.

A análise de correlação entre as variáveis de pontoações e as dimensões dos elementos de vasos revelou que, quanto ao comprimento do elemento de vaso, apenas a altura da abertura da pontoação e a frequência de pontoações apresentaram correlações significativas. A altura da abertura correlacionou-se positivamente ($r = 0,80$), enquanto a frequência mostrou uma correlação negativa ($r = -0,78$) com o comprimento do elemento de vaso (Tabela 2).

Tabela 2 - Coeficientes de correlação de Pearson (r) entre as dimensões das pontoações e as medidas dos elementos de vasos.

Pontoação	Comprimento do vaso	Largura do vaso
Altura total	0,75	0,36
Diâmetro total	0,68	0,45
Altura da abertura	0,80	0,39
Diâmetro da abertura	0,34	0,20
Frequência	-0.78	-0.33

Valores em negrito indicam correlação significativa ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

3.2 Distribuição da lignina guaiacil e siringil

A coloração da reação de Mäule permitiu a distinção qualitativa e a visualização da distribuição diferencial dos dois tipos de lignina na parede celular das sete espécies estudadas (Figura 7). A lignina do tipo siringil, identificada pela coloração vermelha, ocorreu predominantemente nas paredes das fibras de angelim saia e melanciaira (Figura 7f, r). Em contraste, a lignina do tipo guaiacil, identificada pela coloração amarela, predominou nas paredes das fibras de angelim pedra, angelim vermelho, freijó, guaruba e pequiá (Figura 7c, i, l, o, u). Em todas as espécies analisadas, a parede dos vasos apresentou maior concentração de lignina guaiacil. Além disso, em sua maioria, na lamela média foi registrada coloração amarela, também indicativa da presença de lignina guaiacil.

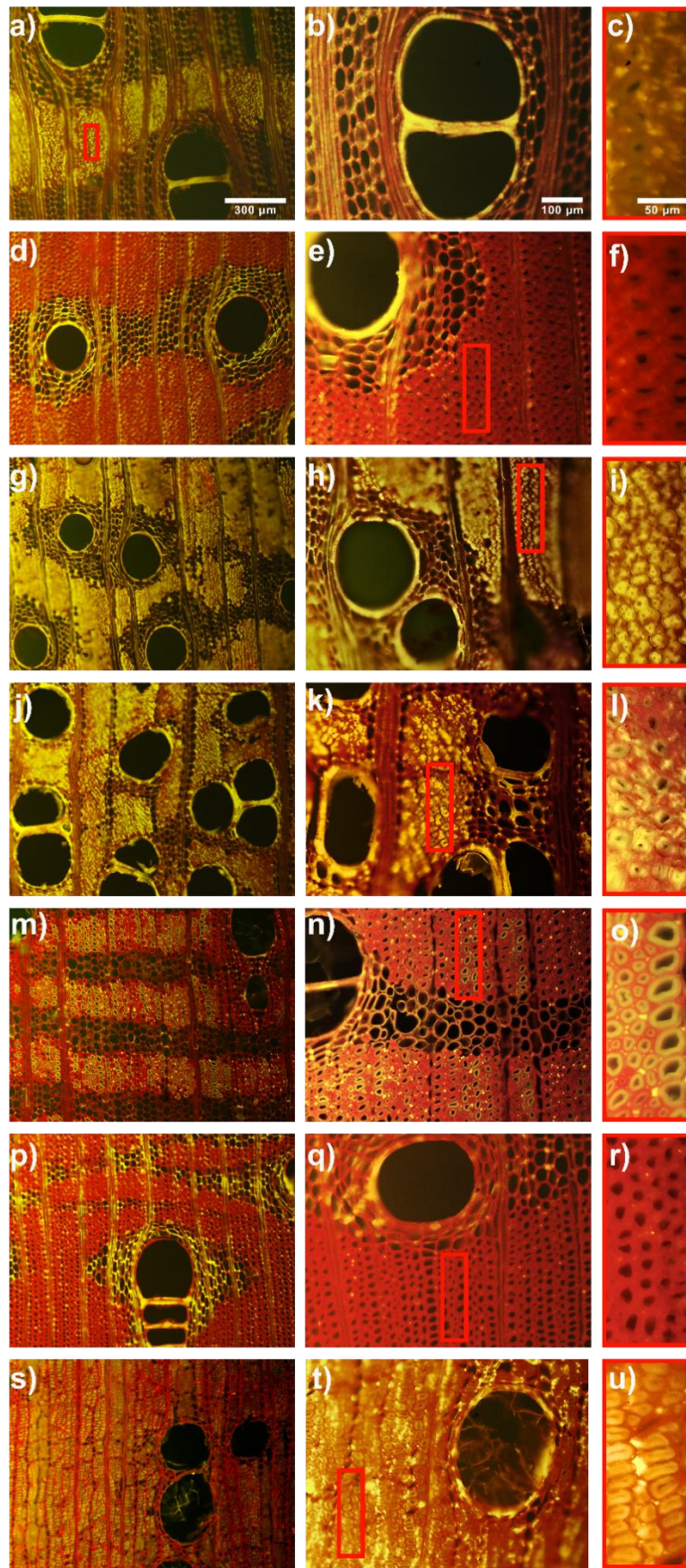


Figura 7 - Distribuição da lignina S (siringil) e G (guaiacil) em cortes transversais da madeira de sete espécies nativas da Amazônia, evidenciada pela reação de Mäule. Magnificação de 100× (primeira coluna), magnificação de 200× (segunda coluna) e magnificação de 500× (terceira coluna) detalhando a área selecionada em vermelho. (a–c) Angelim pedra (*Hymenolobium petraeum* Ducke); (d–f) Angelim saia (*Parkia*

pendula (Willd.) Benth. Ex Walp.); (g–i) Angelim vermelho (*Dinizia excelsa* Ducke); (j–l) Freijó (*Cordia sagotii* I.M. Johnst.); (m–o) Guaruba (*Vochysia maxima* Ducke); (p–r) Melancieira (*Alexa grandifora* Ducke); (s–u) Pequiá (*Caryocar villosum* (Aubl.) Pers).

3.3 Análise da lignina na parede celular

A intensidade de fluorescência emitida pela lignina variou de acordo com a localização medida (Figura 8). A região da lamela média apresentou os maiores valores médios de fluorescência em todas as espécies, seguido da parede dos vasos e fibras, com exceção de guaruba, angelim vermelho e melancieira, onde não houve diferença significativa entre vasos e fibras.

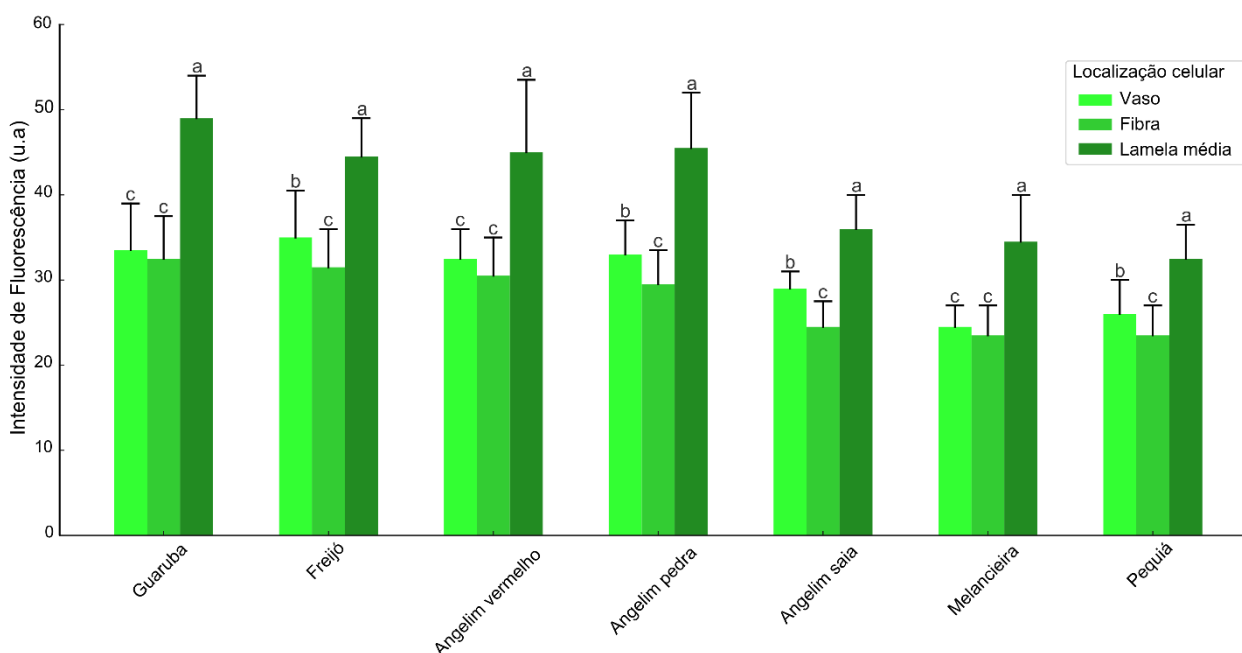


Figura 8 - Intensidade de fluorescência observada na parede do vaso, parede da fibra e lamela média das sete espécies estudadas. Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada espécie não diferem significativamente entre si pelo teste de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

4. DISCUSSÃO

4.1 Caracterização anatômica

As características dos vasos do xilema, como diâmetro, espessura da parede e densidade, determinam em grande parte a segurança e a eficiência hidráulica (Carlquist, 1975; Hacke *et al.*, 2001). A variabilidade anatômica observada entre as sete espécies reflete adaptações funcionais relacionadas à eficiência e segurança no transporte de água. Espécies como o pequiá, com vasos de grande diâmetro (310,70 μm) e comprimento (724,23 μm), associados a uma frequência intermediária de vasos (4,10/ mm^2), apresentam características típicas de madeiras com alta eficiência hidráulica. Vasos largos e longos oferecem menor resistência ao fluxo de seiva, favorecendo uma condução mais rápida de

água (Zhao, 2015). No entanto, essa maior eficiência pode implicar em maior vulnerabilidade ao embolismo gasoso, especialmente sob condições de estresse hídrico ou variações de pressão (Jacobsen *et al.*, 2019; Zhao, 2015).

Em contrapartida, espécies como o freijó, com vasos de menor comprimento (299,59 μm) e alta frequência (7,76/ mm^2), possuem um sistema de condução mais segmentado e seguro. A maior quantidade de elementos de vasos de menor dimensão permite a compartimentalização do transporte hídrico, limitando a propagação de falhas hidráulicas como a cavitação e a implosão das paredes sob tensões negativas do xilema (Zambonini, 2023). Esse padrão anatômico reforça a ideia de que elementos de vasos mais curtos e frequentes contribuem para uma arquitetura hidráulica mais segura, característica consistente com estratégias de resistência à falha do sistema de condução em espécies que enfrentam maior variabilidade hídrica (Jacobsen *et al.*, 2019; Zhao, 2015).

A variação no formato dos elementos de vaso entre espécies reflete distintas estratégias evolutivas de adaptação hidráulica. Enquanto o formato de barril, predominante nas espécies estudadas, oferece alta eficiência com segurança moderada, o formato de tambor, como observado no freijó, prioriza a resistência estrutural e a segurança hidráulica. Esse padrão é alcançado principalmente por placas de perfuração mais complexas, que limitam a propagação axial de embolias (Carlquist, 1975; Hacke *et al.*, 2001). Em contraste, o pequiá, com elementos de vaso em formato de tubo, apresenta características mais alinhadas a uma maior eficiência hidráulica primária. Isso ocorre porque o aumento do comprimento individual dos elementos reduz o número de placas de perfuração por unidade de comprimento do vaso, diminuindo a resistência total ao fluxo de água (Zimmermann, 1983).

As pontoações intervasculares atuam como válvulas de segurança no sistema de condução. Espécies como angelim vermelho e freijó, com alta frequência de pontoações (161,20 e 144,20 /10.000 μm^2 , respectivamente), possibilitam um maior número de conexões entre os vasos, o que pode facilitar o redirecionamento do fluxo de água em caso de embolismo, um fenômeno conhecido como segmentação por pontoações (Tyree & Zimmermann, 2002). Por outro lado, a presença de pontoações guarnecidas em angelim pedra, angelim vermelho e guaruba, está frequentemente associada a uma maior resistência ao embolismo. Essa estrutura complexa atua restringindo o caminho das bolhas de ar que podem se propagar entre os vasos, funcionando como um mecanismo de segurança contra a cavitação (Li *et al.*, 2016).

A estrutura dos raios parenquimáticos também desempenha um papel importante na segurança do sistema. O freijó, com raios altos (1282,72 μm) e largos (108,62 μm), possui um extenso sistema de parênquima radial. Esse parênquima atua como um reservatório de água e carboidratos, permitindo o armazenamento e realocação rápida de recursos, além de contribuir para o reparo de vasos embolizados através da realimentação sob pressão positiva (Morris *et al.*, 2016). A alta frequência de raios no pequiá (13,76 raios/mm) sugere uma grande capacidade de interação radial entre o sistema de condução e as células de armazenamento, otimizando a integração entre transporte e estoque (Morris *et al.*, 2016).

A correlação entre as medidas das pontuações e as medidas dos vasos evidenciam uma associação funcional entre essas estruturas, que equilibram eficiência e segurança hidráulica no xilema. A correlação significativa entre o comprimento da abertura das pontuações e o comprimento dos vasos ($r = 0,80$) indica que a morfologia das pontuações acompanha proporcionalmente o crescimento dos elementos de vasos, assim como Silva *et al* (2021), identificaram que elementos de vaso mais longos estão associados a dimensões maiores das pontuações.

Por outro lado, a correlação negativa entre a frequência de pontuações e o comprimento dos vasos ($r = -0,78$) indica que vasos mais longos tendem a apresentar menos pontuações. Esse padrão sugere que, à medida que o vaso se alonga, sua estrutura se organiza de forma a reduzir o número de aberturas laterais, possivelmente para manter a estabilidade da parede celular e evitar perdas no sistema de condução. Elementos de vasos mais longos e de maior calibre apresentam menor densidade de pontuações, o que reduz o número de vias potenciais de entrada de ar, minimizando a propagação de embolias e conferindo maior segurança hidráulica (Hacke *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2023). Esse padrão de correlação negativa entre frequência e tamanho dos vasos é amplamente relatado em espécies lenhosas e representa um ajuste adaptativo que equilibra transporte eficiente com resistência à cavitação (Pfautsch *et al.*, 2016). De forma geral, as correlações observadas indicam que o aumento das dimensões dos vasos está associado à ampliação das pontuações individuais e à redução de sua frequência, refletindo uma estratégia anatômica otimizada para maximizar o fluxo hídrico e reduzir o risco de falhas hidráulicas (Silva *et al.*, 2021).

As dimensões das fibras e a espessura da parede celular, juntamente com a proporção de fibras no xilema, influenciam significativamente a densidade da madeira e suas propriedades mecânicas (Plavcová *et al.*, 2025). Fibras compridas, como observadas no pequiá (2623,69 μm), estão associadas a melhor desempenho mecânico da madeira,

uma vez que favorecem a continuidade estrutural e a transmissão de esforços ao longo do eixo longitudinal do xilema (Oladi *et al.*, 2025). O menor comprimento observado no angelim vermelho (1231,79 μm), vem associado a um diâmetro do lúmen reduzido (2,28 μm), e a uma parede espessa (6,26 μm), características que contribuem diretamente para o incremento de densidade básica na madeira (Ziemińska *et al.*, 2013).

Espécies como o angelim saia, com maior diâmetro de lúmen (14,94 μm), e maior largura da fibra (27,28 μm), tendem a apresentar madeiras com menor densidade básica (Arenas-Navarro *et al.*, 2023; Eloy *et al.*, 2024). A elevada espessura da parede das fibras encontrada nas espécies estudadas, que variou de 6,17 μm no angelim saia a 9,44 μm no angelim pedra, constitui um dos principais fatores associados à alta densidade da madeira (Oladi *et al.*, 2025). Esse padrão é amplamente descrito para espécies tropicais de crescimento lento ou submetidas a elevadas exigências estruturais, como a necessidade de suportar grandes alturas, copas extensas e esforços mecânicos recorrentes, resultantes de vento e carga gravitacional (Nguyen *et al.*, 2014).

A organização helicoidal observada na parede interna do vaso confirma a presença de espessamentos típicos. Segundo Costa & Wiedenhoef (2023), os espessamentos helicoidais consistem em depósitos contínuos da parede secundária, que contribuem para o relevo interno do vaso. Do ponto de vista funcional, os espessamentos helicoidais têm sido relacionados a maior eficiência hidráulica. Embora se discuta o papel mecânico desses espessamentos, evidências recentes indicam que sua presença não está diretamente relacionada à prevenção de colapso vascular, mas sim a mecanismos de recarga e eficiência hídrica em condições ambientais variáveis (Costa & Wiedenhoef, 2023). Dessa forma, a conformação helicoidal observada sugere uma função adaptativa mais ligada ao suporte hidráulico.

4.2 Distribuição da lignina guaiacil e siringil

A reação de Mäule distingue unidades de lignina com base no número de grupos metoxila presentes no anel aromático. Unidades siringil possuem dois grupos metoxila e, durante o processo da reação de Mäule, que envolve oxidação com permanganato de potássio, tratamento ácido com HCl e posterior reação em meio alcalino, formam cromóforos que emitem coloração vermelha (Yamashita *et al.*, 2016). Já as unidades guaiacil, por possuírem apenas um grupo metoxila, não conseguem emitir essa coloração, resultando na tonalidade amarela a amarelado-esverdeada (Meshitsuka & Nakano, 1977; Fengel; Wegener, 1984; Yamashita *et al.*, 2016). Essa diferenciação mostra que a

distribuição da lignina não é homogênea entre os tipos celulares, a lignina do tipo guaiacil tende a se concentrar em vasos e lamela média, conferindo resistência à compressão, enquanto a lignina siringil predomina nas fibras, favorecendo flexibilidade e resistência à tração (Zhou *et al.*, 2011).

A reação de mäule mostrou diferenças na composição da lignina entre e dentro das espécies analisadas, refletindo estratégias adaptativas e funcionais distintas. A predominância de unidades siringil nas fibras das espécies angelim saia e melanciaira sugere paredes celulares mais homogêneas e com maior flexibilidade, uma vez que esse tipo de lignina está associado a uma maior proporção de ligações β -O-4, que são menos condensadas. Essa característica estrutural não apenas favorece propriedades mecânicas, como maior elasticidade das fibras, mas também torna a lignina menos recalcitrante e, portanto, mais suscetível a processos de degradação química e biológica (Sivan *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2020). Essa característica tem sido observada em lenhos de tensão, formados por angiospermas em resposta a estresses mecânicos, como a inclinação do tronco, nos quais há aumento do S/G para favorecer a plasticidade celular e a adaptação mecânica (Nakagawa *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2021).

Por outro lado, a coloração amarela presente nas paredes das fibras das espécies angelim pedra, angelim vermelho, freijó, guaruba e pequiá indicou maior proporção de unidades guaiacil, geralmente associadas à maior resistência mecânica e menor suscetibilidade à degradação química e biológica (Yang *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2022). Esse resultado é particularmente relevante, uma vez que o esperado seria que as fibras apresentassem coloração predominantemente vermelha na reação de Mäule, refletindo maior proporção de lignina siringil. Esse padrão tem sido amplamente descrito na literatura para diversas espécies lenhosas, como *Fraxinus excelsior* L., *Hibiscus cannabinus* L., *Cunninghamia* spp., *Tectona grandis* L. f., *Fagus longipetiolata* Seemen, *Betula alnoides* Buch.-Ham. ex D. Don e *Fraxinus mandshurica* Rupr. (Kim *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2020; Sivan *et al.*, 2021).

A presença acentuada de lignina guaiacil em fibras sugere uma estratégia adaptativa dessas espécies, nas quais as fibras atuam não apenas como elementos de suporte e resistência à tração, mas também contribuem para a rigidez e resistência à compressão do tecido lenhoso. Por ser mais condensada e menos suscetível à clivagem de ligações, a lignina guaiacil confere maior durabilidade estrutural e reduz a ação de agentes degradativos (Donaldson, 2001; Boerjan; Ralph; Baucher, 2003), ainda que isso implique menor elasticidade e plasticidade da parede celular.

Assim, a ocorrência de maior proporção de lignina guaiacil nas fibras pode estar associada a condições ambientais específicas ou a pressões seletivas que favorecem uma madeira mais rígida e resistente. Já a coloração amarela observada nas paredes dos vasos em todas as espécies, também reflete a predominância de unidades guaiacil, esse resultado reforça que a lignina guaiacil, por apresentar uma estrutura mais condensada e resistente, é particularmente adequada a regiões submetidas a maiores tensões mecânicas, como vasos condutores que enfrentam variações de pressão causadas pelo fluxo de seiva (Donaldson, 2001).

A predominância de unidades guaiacil na lamela média das espécies, região correspondente à junção entre paredes celulares adjacentes, corrobora com estudos que apontam essa área como altamente lignificada. Esse predomínio está diretamente relacionado à função estrutural da lamela média, que atua como um cimento intercelular, promovendo a coesão dos tecidos e conferindo elevada resistência mecânica à madeira (Raven *et al.*, 2001; Donaldson, 2001; Kim *et al.*, 2014).

4.3 Análise da lignina por fluorescência

A variação da intensidade de fluorescência entre as diferentes regiões celulares reflete a concentração diferencial da lignina na madeira. Com valores mais elevados na região da lamela média. Essa tendência está de acordo com estudos que apontam maior acúmulo de lignina, na lamela média, região que confere maior rigidez e estabilidade a células (Saka & Goring, 1985; Donaldson, 2001; Zhou *et al.*, 2011).

A diferença de intensidade de fluorescência entre os tipos celulares (lamela média > vaso > fibra) reforça o padrão funcional da lignina nas paredes celulares, atuando de forma diferenciada conforme a função estrutural de cada célula. A maior intensidade da lamela média indica forte lignificação, o que é compatível com seu papel de união entre as células adjacentes (Raven *et al.*, 2001; Baldacci-Cresp *et al.*, 2020). Nas paredes dos vasos, a lignina fornece suporte mecânico para que as plantas se mantenham eretas e permite que os xilemas suportem a pressão negativa gerada durante o transporte de água (Li & Chapple, 2010; Emonet & Hay, 2022), além de atuar como agente hidrofóbico, contribuindo positivamente no transporte da água e sais minerais (Ma, 2024), o que justifica os níveis intermediários de intensidade de fluorescência observados. Já nas fibras, a lignina atua como agente cimentante, integrando a matriz de celulose e hemiceluloses e contribuindo para a rigidez da parede secundária (Plomion *et al.*, 2001).

5. CONCLUSÃO

O tamanho, comprimento frequência e formato dos elementos de vaso definem as diferentes estratégias de ajuste entre eficiência hidráulica e segurança no transporte de água das espécies estudadas. Como foi o caso do pequiá com vasos longos e de grande diâmetro, associados à maior eficiência hidráulica, e o freijó, com vasos mais curtos e elevada frequência, associados a uma estratégia voltada à maior segurança do sistema de condução.

As pontoações acompanharam essas variações, ajustando-se às dimensões dos vasos e reforçando mecanismos de contenção da propagação de embolias, especialmente nas espécies angelim pedra, angelim vermelho e guaruba, que apresentaram pontoações guarnecidas. A presença de espessamentos helicoidais nos vasos da maioria das espécies sugere adaptação à estabilidade do fluxo hídrico sob condições ambientais variáveis.

As diferenças nos raios parenquimáticos complementam esse arranjo, com destaque para o freijó, que apresentou raios mais altos e largos, e para o pequiá, com alta frequência de raios, refletindo distintas capacidades de armazenamento e redistribuição radial. As fibras apresentaram predominantemente grande comprimento, com destaque para o pequiá, e paredes espessas, especialmente no angelim pedra, características associadas à elevada densidade e à resistência mecânica da madeira.

A composição e a distribuição da lignina variaram entre as espécies e os tipos celulares, com predominância de lignina guaiacil nos vasos e na lamela média e variações nas fibras, uma vez que as espécies angelim saia e melancieira apresentaram unidades de lignina siringil na parede das fibras e as espécies angelim pedra, angelim vermelho, freijó, guaruba e pequiá apresentaram unidades de lignina guaiacil.

A análise da lignina por fluorescência nas espécies confirmou a maior concentração de lignina na lamela média, seguida pelas paredes dos vasos e das fibras, com exceção das espécies guaruba, angelim vermelho e melancieira, onde não houve diferença significativa entre vasos e fibras. Mostrando que a lignina atua de forma diferenciada conforme a função estrutural de cada célula.

De modo geral, os resultados demonstram que cada espécie amazônica combina vasos, pontoações, fibras, raios e lignina de forma funcionalmente integrada, expressando estratégias anatômicas próprias que sustentam o desempenho hidráulico e a resistência mecânica da madeira.

REFERÊNCIAS

- ARENAS-NAVARRO, M.; OYAMA, K.; GARCÍA-OLIVA, F.; TORRES-MIRANDA, A.; TERRAZAS, T. Seasonal temperature and precipitation regimes drive variation in the wood of oak species (*Quercus*) along a climatic gradient in western Mexico. **IAWA Journal**, v. 44, n. 2, p. 140–155, 2023. <https://doi.org/10.1163/22941932-bja10110>
- BALDACCI-CRESP, F.; SPRIET, C.; TWYFFELS, L.; BLERVACQ, A.-S.; NEUTELINGS, G.; BAUCHER, M.; HAWKINS, S. A rapid and quantitative safranin-based fluorescent microscopy method to evaluate cell wall lignification. **The Plant Journal**, v. 102, n. 5, p. 1074–1089, 2020. <https://doi.org/10.1111/tpj.14675>
- BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 519–546, 2003. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938>
- CARLQUIST, S. Ecological strategies of xylem evolution. Berkeley: University of California Press, 1975.
- CHEN, H.; WANG, H.; ZHAO, Z.; PAN, J.; YAO, Y.; WANG, Y.; LUO, K.; SONG, Q. The fiber cell-specific overexpression of COMT2 modulates secondary cell wall biosynthesis in poplar. **Plants**, v. 14, n. 12, art. 1739, 2025. <https://doi.org/10.3390/plants14121739>
- COSTA, A.; WIEDENHOEFT, A. C. On the possible functions of helical thickenings in conductive cells in wood. **IAWA Journal**, v. 44, n. 3-4, p. 381-398, 2023. <https://doi.org/10.1163/22941932-bjai019>
- DONALDSON, L. A. Lignification and lignin topochemistry - an ultrastructural view. **Phytochemistry**, v. 57, p. 859-873, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00049-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00049-8)
- DONALDSON, L. A. Softwood and hardwood lignin fluorescence spectra of wood cell walls in different mounting media. **IAWA Journal**, v. 34, n. 1, p. 3-19, 2013. <https://doi.org/10.1163/22941932-00000002>
- DONALDSON, L. A.; RADOTIĆ, K. Fluorescence lifetime imaging of lignin autofluorescence in normal and compression wood. **Journal of Microscopy**, v. 251, n. 2, p. 178-187, 2013. <https://doi.org/10.1111/jmi.12059>
- DONALDSON, L. A.; RADOTIĆ, R.; KALAUZI, A.; DJIKANOVIĆ, D.; JEREMIĆ, M. Quantification of compression wood severity in tracheids of *Pinus radiata* D. Don using confocal fluorescence imaging and spectral deconvolution. **The Journal of Structural Biology**, v. 169, p. 106–115, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.09.006>
- ELOY, E.; MANGINI, T. S.; NARDINI, C.; CARON, B. O.; TREVISAN, R.; SANTOS, A. D. Correlação da anatomia com as propriedades físicas da madeira de espécies de um sistema agroflorestal. **Revista Árvore**, v. 48, 2024. <https://doi.org/10.53661/1806-9088202448263657>

EMONET, A.; HAY, A. Development and diversity of lignin patterns. **Plant Physiology**, v. 190, n. 1, p. 31–43, 2022. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac261>

FAO. **Global Forest Resources Assessment 2020: Main report**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1984. 613 p. <https://doi.org/10.1515/9783110839654>

FERNANDO, C.; AUDIBERT, A.; SIMON, F.; TAZI, J.; JUGE, F. A role for the serine/arginine-rich (SR) protein B52/SRSF6 in cell growth and Myc expression in *Drosophila*. **Genetics**, v. 199, p. 1201-1211, 2015. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.174391>

FERNÁNDEZ, M. E.; BAROTTO, A. J.; MARTÍNEZ MEIER, A.; GYENGE, J. E.; TESÓN, N.; QUIÑONES MARTORELLO, A. S.; MERLO, E.; DALLA SALDA, G.; ROZENBERG, P.; MONTEOLIVA, S. New insights into wood anatomy and function relationships: How *Eucalyptus* challenges what we already know. **Forest Ecology and Management**, v. 454, 117638, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2019.117638>

GAO, J.; JEBRANE, M.; TERZIEV, N.; DANIEL, G. Enzymatic hydrolysis of the gelatinous layer in tension wood of *Salix* varieties as a measure of accessible cellulose for biofuels. **Biotechnology for Biofuels**, v. 14, 141, 2021. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01983-1>

HACKE, U. G.; SPERRY, J. S.; POCKMAN, W. T.; DAVIS, S. D.; MCCULLOH, K. A. Trends in wood density and structure are linked to prevention of xylem implosion by negative pressure. **Oecologia**, v. 126, p. 457–461, 2001. <https://doi.org/10.1007/s004420100628>

IAWA COMMITTEE. IAWA list of microscopic features for hardwood identification. **IAWA Bulletin**, v. 10, n. 3, p. 219–332, 1989. <https://doi.org/10.1163/22941932-90000490>

JACOBSEN, A. L.; PRATT, R. B.; VENTURAS, M. D.; HACKE, U. G. Large volume vessels are vulnerable to water-stress-induced embolism in stems of poplar. **IAWA Journal**, v. 40, n. 1, p. 4-S4, 2019. <https://doi.org/10.1163/22941932-40190233>

KIM, J. S.; GAO, J.; TERZIEV, N.; CUCCUI, I.; DANIEL, G. Chemical and ultrastructural changes of ash wood thermally modified using the thermo-vacuum process: I. Histo/cytochemical studies on changes in the structure and lignin chemistry. **Holzforschung**, p. 1-10, 2014. <https://doi.org/10.1515/hf-2014-0148>

LI, S.; LENS, F.; ESPINO, S.; KARIMI, Z.; KLEPSCH, M.; SCHENK, H. J.; SCHMITT, M.; SCHULDT, B.; JANSEN, S. Intervessel pit membrane thickness as a key determinant of embolism resistance in angiosperm xylem. **IAWA Journal**, v. 37, n. 2, p. 152-171, 2016. <https://doi.org/10.1163/22941932-20160128>

LI, S.; WANG, J.; LU, S.; SALMON, Y.; LIU, P.; GUO, J. Trade-Off between Hydraulic Safety and Efficiency in Plant Xylem and Its Influencing Factors. **Forests**, v. 14, 1817, 2023. <https://doi.org/10.3390/f14091817>

LI, X.; CHAPPLE, C. Understanding Lignification: Challenges Beyond Monolignol Biosynthesis. **Plant Physiology**, v. 154, n. 2, p. 449-452, 2010. <https://doi.org/10.1104/pp.110.162842>

LIMA, F. B.; SOUZA, A. N.; MATRICARDI, E. A. T.; GASPAR, R. O.; LIMA, I. B.; SOUZA, H. J.; SANTOS, M. L.; MIGUEL, E. P.; BORGES, L. A. C.; SANTOS, C. R. C.; GOUVEIA, F. N.; LIMA, M. F. B. Alternative Tree Species for Sustainable Forest Management in the Brazilian Amazon. **Forests**, v. 15, 1763, 2024. <https://doi.org/10.3390/f15101763>

LIU, B.; TANG, L.; CHEN, Q.; ZHU, L.; ZOU, X.; LI, B.; ZHOU, Q.; FU, Y.; LU, Y. Lignin Distribution on Cell Wall Micro-Morphological Regions of Fibre in Developmental *Phyllostachys pubescens* Culms. **Polymers**, v. 14, 312, 2022. <https://doi.org/10.3390/polym14020312>

MA, Q-H. Lignin Biosynthesis and Its Diversified Roles in Disease Resistance. **Genes**, v. 15, n. 3, 295, 2024. <https://doi.org/10.3390/genes15030295>

MESHITSUKA, G.; NAKANO, J. Studies on the mechanism of lignin colour reaction (XI). Mäule colour reaction. **Mokuzai Gakkaishi**, v. 23, n. 11, p. 526–533, 1977.

MORRIS, H.; PLAVCOVÁ, L.; CVECKO, P.; FICHTLER, E.; GILLINGHAM, M. A. F.; MARTÍNEZ-CABRERA, H. I.; MCGLINN, D. J.; WHEELER, E.; ZHENG, J.; ZIEMIŃSKA, K.; JANSEN, S. A global analysis of parenchyma tissue fractions in secondary xylem of seed plants. **New Phytologist**, v. 209, n. 4, p. 1553–1565, 2016. <https://doi.org/10.1111/nph.13737>

NAKAGAWA, K.; YOSHINAGA, A.; TAKABE, K. Anatomy and lignina distribution in reaction phloem fibres of several Japanese hardwoods. **Annals of Botany**, v. 110, p. 897-904, 2012. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs144>

NGUYEN, H.; FIRN, J.; LAMB, D.; HERBOHN, J. Wood density: A tool to find complementary species for the design of mixed species plantations. **Forest Ecology and Management**, v. 334, p. 106–113, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2014.08.022>

OLADI, R.; ALIVERDIKHANI, R.; ABDI, E. Linking root xylem anatomy to tensile strength: insights from four broadleaved tree species in the Hyrcanian forests. **Plant and Soil**, v. 512, p. 1311–1326, 2025. <https://doi.org/10.1007/s11104-024-07148-x>

PAN, T.; BRITTON, T. G.; SCHRADER, J.; SUMNER, E.; NICOLLE, D.; CHOAT, B.; WRIGHT, I. J. Adaptation in wood anatomical traits to temperature and precipitation—A common garden study. **Plant, Cell & Environment**, v. 48, n. 8, p. 6016–6031, 2025. <https://doi.org/10.1111/pce.15576>

PFAUTSCH, S.; HARBUSCH, M.; WESOLOWSKI, A.; SMITH, R.; MACFARLANE, C.; TJOELKER, M. G.; REICH, P. B.; ADAMS, M. A. Climate determines vascular traits in the ecologically diverse genus *Eucalyptus*. **Ecology Letters**, v. 19, p. 240–248, 2016. <https://doi.org/10.1111/ele.12559>

PLAVCOVÁ, L.; GALLENMÜLLER, F.; MORRIS, H.; KHATAMIRAD, M.; JANSEN, S.; SPECK, T. Mechanical properties and structure–function trade-offs in secondary xylem of

young roots and stems. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n. 14, p. 3679–3691, 2019. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz286>

PLOMION, C.; LEPROVOST, G.; STOKES, A. Wood Formation in Trees. **Plant Physiology**, v. 127, p. 1513-1523, 2001. <https://doi.org/10.1104/pp.010816>

RALPH, J. et al. Lignin structure and its engineering. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 56, p. 240-249, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.019>

RAMALHO, R. S. **O uso de macerado no estudo anatômico de madeiras**. Viçosa: UFV, 1987. 4 p.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biology of Plants**. 6th ed. New York: W.H. Freeman and Worth Publishers, 1999.

SAKA, S.; GORING, D. A. I. Localization of Lignins in Wood Cell Walls. In: HIGUCHI, T. (Ed.). **Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components**. New York: Academic Press, 1985. p. 51-62. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-347880-1.50007-6>

SCHINDELIN, J.; ARGANDA-CARRERAS, I.; FRISE, E. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, v. 9, p. 676–682, 2012. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>

SILVA, J. T. S.; MOREIRA, S. I.; MOULIN, J. C. Method for lignin analysis in wood by fluorescence microscopy. **Microscopy Research and Technique**, 2025. <https://doi.org/10.1002/jemt.70095>

SIMIONI, P.; CAMPBELL, G.; PINTO, V. D.; CASTELAR, J. V. S.; PESSOA, M. J. G.; SILVA, I. V. Do anatomical wood traits suggest adjustments in the hydraulic architecture of dominant species in Amazonian savannah? **Plant Biosystems**, v. 155, n. 3, p. 498–509, 2020. <https://doi.org/10.1080/11263504.2020.1762782>

SILVA, M. S.; APGAUA, D. M. G.; SILVA, C. C. S.; SILVA, L. B.; TNG, D. Y. P. Expanding the wood anatomy economics spectrum: the correlates of vessel element lengths and pit apertures sizes in tropical forest trees. **Plant Ecology & Diversity**, v. 14, n. 5–6, p. 279–291, 2021. <https://doi.org/10.1080/17550874.2022.2053600>

SIVAN, P.; RAO, K. S.; RAJPUT, K. S. Anatomy and cell wall chemistry of tension wood in *Hibiscus cannabinus*. **Bosque**, v. 42, n. 1, p. 99-110, 2021. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002021000100099>

TYREE, M. T.; ZIMMERMANN, M. H. **Xylem Structure and the Ascent of Sap**. 2. ed. Berlin: Springer, 2002. 284 p. (Springer Series in Wood Science). <https://doi.org/10.1007/978-3-662-04931-0>

YAMASHITA, D.; KIMURA, S.; WADA, M.; TAKABE, K. Improved Mäule color reaction provides more detailed information on syringyl lignin distribution in hardwood. **Journal of Wood Science**, v. 62, p. 131–137, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10086-016-1536-9>

YANG, Y.; HE, Y.; HAN, L.; WANG, A.; WANG, W.; ZHAO, R.; LI, B. Application of histochemical stains for rapid qualitative analysis of the lignin content in multiple wood species. **BioResources**, v. 15, n. 2, p. 3524-3533, 2020. <https://doi.org/10.15376/biores.15.2.3524-3533>

ZAMBONINI, D. **Structure–function relationships of the hydraulic architecture of trees under climate change**. Tese (Doutorado em Land, Environment, Resources and Health) – University of Padova, Department of Land, Environment, Agriculture and Forestry (TESAF), Padova, Itália, 2023.

ZHANG, X.; LI, L.; XU, F. Chemical characteristics of wood cell wall with an emphasis on ultrastructure: A mini-review. **Forests**, v. 13, n. 3, art. 439, 2022. <https://doi.org/10.3390/f13030439>

ZHAO, X. Effects of cambial age and flow path-length on vessel characteristics in birch. **Journal of Forest Research**, v. 20, p. 175–185, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10310-014-0458-x>

ZHOU, C. Z.; LI, Q.; CHIANG, V. L.; LUCIAS, L. A.; GRIFFIS, D. P. Chemical and spatial differentiation of syringyl and guaiacyl lignins in poplar wood by time-of-flight secondary ion mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 18, p. 7020–7026, 2011. <https://doi.org/10.1021/ac200903y>

ZIEMIŃSKA, K.; BUTLER, D. W.; GLEASON, S. M.; WRIGHT, I. J.; WESTOBY, M. Fibre wall and lumen fractions drive wood density variation across 24 Australian angiosperms. **AoB PLANTS**, v. 5, p. pl046, 2013. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plt046>

ZIMMERMANN, M. H. Xylem structure and the ascent of sap. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1983. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-22627-8>

CONCLUSÃO GERAL

O tratamento de autofluorescência em lâmina sem extrativos é eficaz para investigar a intensidade de fluorescência da lignina no tecido lenhoso, combinado ao método de processamento de imagem automatizado no software *ImageJ-Fiji*. Essa metodologia demonstrou potencial para aplicação em estudos voltados à investigação da lignina na parede celular, como observado nas espécies amazônicas analisadas, nas quais a intensidade de fluorescência foi maior na lamela média, seguida pelas paredes dos vasos e das fibras. A composição e a distribuição da lignina variaram entre espécies e tipos celulares, com predominância de unidades guaiacil nos vasos e na lamela média, enquanto as fibras apresentaram variações interespecíficas, uma vez que algumas espécies apresentaram unidades de lignina siringil na parede das fibras, enquanto outras apresentaram unidades de lignina guaiacil. A caracterização anatômica evidenciou variabilidade na organização dos vasos, pontoações, raios e fibras, refletindo diferentes estratégias relacionadas à condução, à segurança e à eficiência hidráulica, além da densidade e resistência mecânica da madeira nas espécies amazônicas analisadas.