



MILENE TEIXEIRA DE SOUZA

**DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DA LIGNINA E DO ÂNGULO
MICROFIBRILAR NA PAREDE CELULAR DE *Eucalyptus*
*grandis***

LAVRAS – MG

2017

MILENE TEIXEIRA DE SOUZA

**DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DA LIGNINA E DO ÂNGULO MICROFIBRILAR NA
PAREDE CELULAR DE *Eucalyptus grandis***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia da Madeira, área de concentração em Madeira como Matéria Prima, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. José Tarcísio Lima

Coorientadores

Dr. José Reinaldo Moreira da Silva

Dr. Eduardo Alves

LAVRAS – MG

2017

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Souza, Milene Teixeira de.

Distribuição espacial da lignina e do ângulo microfibrilar na
parede celular de *Eucalyptus grandis* / Milene Teixeira de Souza. -
2017.

52 p. : il.

Orientador(a): José Tarcísio Lima.

Coorientador(a): José Reinaldo Moreira da Silva, Eduardo
Alves.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Parede celular. 2. Ângulo da microfibrila. 3. Fluorescência. I.
Lima, José Tarcísio . II. Silva, José Reinaldo Moreira da. III. Alves,
Eduardo . IV. Título.

MILENE TEIXEIRA DE SOUZA

**DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DA LIGNINA E DO ÂNGULO MICROFIBRILAR NA
PAREDE CELULAR DE *Eucalyptus grandis***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia da Madeira, área de concentração em Madeira como Matéria Prima, para a obtenção do título de Doutor.

Lavras, 12 de Setembro de 2017.

Dr. José Reinaldo Moreira da Silva	UFLA
Dr. José Tarcísio Lima	UFLA
Dra. Gilmara Pires de Moura Palermo	UFRRJ
Dr. Silvino Intra Moreira	UFLA
Dra. Claudinéia Olímpia de Assis	UFLA

Orientador

Dr. José Tarcísio Lima

**LAVRAS – MG
2017**

AGRADECIMENTOS

A Deus por me fortalecer diante das dificuldades e permitir a conclusão dessa importante etapa da minha vida.

À Universidade Federal de Lavras e ao programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia da madeira pela oportunidade e estrutura para realização do meu doutorado.

Ao professor e orientador José Tarcísio pela confiança depositada em mim, pelos ensinamentos e amizade construída durante esses anos que estive na UFLA.

Aos membros da banca José Reinaldo, Gilmara, Silvino e Claudinéia pela contribuição para a conclusão deste trabalho.

A todos os professores do programa em Ciência e Tecnologia da madeira que contribuíram para a minha formação.

Aos laboratórios de serraria, usinagem e anatomia e tecnologia da madeira que contribuíram para realização deste trabalho.

Ao laboratório de microscopia eletrônica de transmissão da UFLA.

Ao centro de microscopia da UFMG.

À Vallourec pelo material cedido para realização deste estudo.

À minha família e meu marido José Antonio, pelo apoio, carinho e por incentivarem a seguir em frente e concluir este projeto.

A todos os amigos da CTM que me acolheram e tornaram minha jornada mais fácil, tornando meus dias em Lavras mais felizes e em especial Bruno e Lidiane que além da amizade construída, contribuíram muito para realização deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para concretização desta etapa da minha vida.

O meu sincero agradecimento.

RESUMO

A parede celular é formada basicamente por lignina, celulose e hemiceluloses, organizadas sistematicamente nas paredes primária e secundária, constituindo o exoesqueleto das fibras. As microfibrilas de celulose e a lignina exercem grande influência sobre as propriedades físicas e mecânicas da madeira. Neste contexto o objetivo deste trabalho foi buscar informações sobre a variabilidade natural da orientação das microfibrilas através da parede celular secundária e analisar a distribuição do conteúdo de lignina na parede celular das fibras do lenho normal da árvore ereta e do lenho de tração e oposto da árvore inclinada de *Eucalyptus grandis*. A espécie utilizada foi *Eucalyptus grandis* com 28 anos de idade. Foram retirados discos de 10 cm em duas alturas, a 1,30m do solo e a 25% da altura total da árvore ereta e da árvore inclinada. A determinação do ângulo microfibrilar (AMF) médio foi feita através da microscopia de luz polarizada e o AMF das camadas da parede celular por microscopia eletrônica de transmissão. Para determinação qualitativa da lignina foi empregada à microscopia de fluorescência e a microscopia laser confocal e a quantificação relativa foi realizada com o auxílio do software Image J. O ângulo microfibrilar médio foi menor para o lenho de tração com valor de 5,4°. Foi observado redução do ângulo microfibrilar no sentido medula-casca. As camadas S1, S2 e S3 e a transição entre elas, foram identificadas pelo direcionamento das microfibrilas de celulose. A camada S2 apresentou menor AMF em relação às camadas S1 e S3. Foi observada na camada S2 diminuição do AMF da medula para a casca. Os AMF encontrados no lenho de tração para a camada S2 foram próximos ao ângulo médio da parede celular. O lenho de tração apresentou menor intensidade de fluorescência.

Palavras-Chave: Parede celular, ângulo da microfibrila, fluorescência.

ABSTRACT

The cell wall consists basically of lignin, cellulose and hemicelluloses, systematically organized in the primary and secondary walls, constituting the exoskeleton of the fibers. Cellulose microfibrils and lignin have a great influence on the physical and mechanical properties of the wood. In this context the aim of this work was to provide information on the natural variability of the microfibrils orientation through the secondary cell wall and to analyze the distribution of the lignin content in the fiber cell wall of normal, tension and opposite wood of *Eucalyptus grandis*. Two 28 year old *Eucalyptus grandis* trees were used, one with upright trunk and one with inclined trunk. Discs of 10 cm were removed at two heights, 1,30 m from the ground and 25% of the total height of the tree. Analyzes were performed for normal, tension and opposite wood. The determination of the mean microfibrillar angle (MFA) was made by polarized light microscopy and the angle of the cell wall layers by transmission electron microscopy. Lignin determination was performed by fluorescence and confocal microscopy, the quantification was realized using the software *Image J*. The mean MFA being the lowest in tension wood, with a value of 5,4°. A reduction of the microfibrillar angle in the pith to bark direction was observed. The layers S1, S2 and S3 and the transition between them were identified by the orientation of the cellulose microfibrils. The S2 layer presented lower AMF in relation to layers S1 and S3, with a decrease of the MFA from pith to bark. The MFA found in the tension wood for the S2 layer was close to the average angle of the cell wall. The tension wood showed lower fluorescence intensity.

Palavras-Chave: Cell wall, microfibril angle, fluorescence.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
2 OBJETIVO.....	7
3 REFERENCIAL TEÓRICO	7
3.1 Lignina	7
3.1.1 Distribuição do conteúdo de lignina na parede celular	8
3.1.2 Técnicas de avaliação da distribuição de lignina	11
3.2 Ângulo microfibrilar (AMF)	11
3.2.1 Variação do ângulo microfibrilar através da parede celular.....	13
3.2.2 Técnicas de medição do ângulo microfibrilar	14
3.3 Lenho de reação	15
4 MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 Área de estudo e coleta do material	17
4.2 Determinação do Ângulo microfibrilar	19
4.2.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	19
4.2.2 Microscopia de luz polarizada.....	21
4.3 Determinação da distribuição de lignina	21
4.3.2 Microscopia de fluorescência.....	21
4.3.3 Microscopia laser confocal.....	21
4.4 Análise dos dados.....	21
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1 Ângulo microfibrilar médio - microscopia de luz polarizada.....	23
5.2 Ângulo microfibrilar através da parede celular (MET).....	26
5.3 Distribuição qualitativa da lignina- microscopia de fluorescência.....	38
5.4 Distribuição qualitativa e quantificação relativa da lignina.....	39
6 CONCLUSÃO.....	43
7 REFERÊNCIAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

A parede celular, formada principalmente de lignina, hemicelulose e celulose, organizadas sistematicamente nas paredes primária e secundária, constituem o exoesqueleto das fibras, que por sua vez conferem à madeira notável comportamento mecânico.

Na parede primária a orientação das microfibrilas é geralmente dispersa. A parede secundária apresenta três camadas: as microfibrilas das camadas S1 e S3 são orientadas transversalmente, já na camada S2, as microfibrilas tendem a ser orientadas axialmente (WARDROP & PRESTON, 1947). A parede secundária pode apresentar camadas alternadas com diferentes orientações das microfibrilas, formando o que é conhecido como arranjo helicoidal (REIS & VIAN, 2004). O Ângulo formado entre o eixo longitudinal de uma fibra e as microfibrilas de celulose na parede secundária das fibras e dos traqueídes é chamado de ângulo microfibrilar (BARNETT & BONHAM 2004), sendo comumente representado pelas iniciais AMF. As microfibrilas de celulose constituem os principais elementos estruturais da parede celular das fibras (DONALDSON, 2008).

A camada S2 é a mais espessa da parede celular, sendo considerada a que exerce maior influência sobre as propriedades físicas e mecânicas da madeira. A estrutura cruzada das microfibrilas na parede secundária proporciona à madeira alta rigidez axial, além de alta resistência ao colapso e à ruptura, permitindo que a planta adote um hábito de crescimento ereto e faça uma condução eficiente da água da raiz até o topo (DONALDSON, 2008).

De modo diferente, as camadas S1 e S3, são relativamente mais finas, mas exercem papel importante no reforço da célula contra deformação por forças de tensão de água, além de contribuir para a dureza e a resistência ao esmagamento da madeira (BOOKER, 1993). Donaldson e Xu (2005) relataram que as camadas S1 e S3 mostram orientação altamente variável das microfibrilas, que variam de 50° a 113° na S3 e 79° a 117° na S1, em relação ao eixo da fibra.

Os AMF da parede celular podem variar no sentido longitudinal e radial no caule e com a idade da árvore (DONALDSON, 2008; EVANS et al., 2000). De acordo com From et al. (2003) o AMF está associado ao teor de lignina da parede celular e segundo Boyd (1980) está relacionado com o direcionamento das tensões de crescimento, particularmente em lenho de reação, onde no lenho de tração o baixo ângulo microfibrilar, confere resistência a uma elevada tensão de tração. Este tipo de lenho é formado pela árvore sob esforços mecânicos,

apresentando características anatômicas, químicas e físicas diferenciadas em relação ao lenho normal (MONTEIRO et al., 2010).

A distribuição da lignina dentro da parede celular é pouco conhecida, sabe-se que no lenho de tração, ocorre redução no teor de lignina na parede celular das fibras (CÔTÉ et al., 1966; DONALDSON, 2001). Neste lenho pode ocorrer à formação de uma camada gelatinosa na parte mais interna da parede celular secundária, excessiva contração e aumento da densidade básica (SIMPSON & TENWOLDE, 1999), o que resultará em alteração nas propriedades físicas, químicas e mecânicas deste lenho em relação ao lenho normal (GREEN et al., 1999).

Diversos estudos (HARRIS & MEYLAN, 1965; CAVE, 1968; CAVE & WALKER, 1994) mostram que o ângulo das microfibrilas é uma das características de grande importância para a definição de algumas propriedades como a retratibilidade, a resistência e a rigidez, que afetam diretamente a utilização comercial da madeira. Além disso, o AMF está relacionado com a resistência à tração e com o módulo de elasticidade de fibras de celulose, onde pequenos valores do AMF tornam as fibras mais fortes e mais rígidas (DOWNES et al., 2003), sendo esta informação de grande interesse para a indústria de papel e celulose. Da mesma forma, obter informações sobre a distribuição do conteúdo de lignina é importante para este setor já que a de lignina presente na madeira afeta o processo de polpação e branqueamento do papel. Na indústria de carvão vegetal, a lignina é um dos componentes da madeira de grande relevância, pois está relacionado com o poder calorífico do carvão vegetal.

Neste contexto, o presente estudo busca fornecer informações detalhadas sobre a distribuição espacial do AMF e da lignina na parede celular, bem como conhecer o comportamento dessas características e as relações existentes entre elas para diferentes tipos de formações de madeira, de modo a contribuir para a melhoria na interpretação do comportamento das propriedades da madeira, de seu processamento e utilização, pois pouco conhecimento é disponível até o momento, principalmente em *Eucalyptus*.

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi buscar informações sobre a distribuição espacial do ângulo microfibrilar e do conteúdo de lignina dentro da parede celular das fibras dos lenhos normal, de tração e oposto de *Eucalyptus grandis*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Lignina

A palavra lignina é originária do latim *lignum* que significa madeira. É um polímero tridimensional complexo que ocorre predominantemente no xilema das plantas terrestres (DONALDSON, 2001), constituída em sua maior parte pelos álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (LEWIS & SARKANEN, 1998). É um dos principais componentes da parede celular de traqueídes, vasos e fibras, contribuindo para impermeabilização de elementos condutores do xilema, confere resistência à compressão no lenho, enrijecimento da célula e conformação física do vegetal (DONALDSON, 2001), participa da formação de ligações químicas com as hemiceluloses, atuando como uma ponte ou um adesivo e garantindo a consistência entre a matriz e as microfibrilas de celulose (MESHITSUKA et al., 1982).

Os materiais lignocelulósicos possuem composição química muito complexa, formada por substâncias de alta massa molecular insolúveis e de substâncias de baixa massa molecular solúveis em solventes orgânicos neutros, formando assim uma rede de ligações multimoleculares na parede celular (LEWIS & SARKANEN, 1998).

A lignificação da parede celular é uma das etapas finais do processo de diferenciação celular do xilema, na qual a lignina é depositada dentro da matriz da parede celular em um processo de preenchimento de espaços vazios interlamelares (DONALDSON, 2001).

O processo de lignificação inicia-se nos cantos das células, nas regiões da lamela média e parede primária, e vai se espalhando através da parede secundária em direção ao lume. A lignificação da lamela média e da parede primária geralmente começa após o início da formação da parede secundária, enquanto que a lignificação da parede secundária começa

após sua completa formação, sendo evidenciado pela presença da camada S3 (WARDROP, 1957).

Quanto à utilização a lignina vem se destacando para a produção de novos produtos, como o biocombustível que surge com grande perspectiva e prosperidade para o futuro. Sua propriedade recalcitrante tem despertado interesse de pesquisadores no desenvolvimento de novos caminhos para desconectá-la da matriz celulósica (MOSIER et al., 2005; HENDRIKS & ZEEMAN, 2008). Algumas pesquisas científicas estão sendo empregadas para o desenvolvimento de técnicas capazes de diminuir a recalcitrância da lignina durante o processamento para utilização da biomassa na produção de álcool de segunda geração (CORTEZ et al., 2008).

Na indústria energética elevado teor de lignina resulta em carvão vegetal de melhor qualidade, com maior densidade aparente e maior poder calorífico, resultando em melhores propriedades físico-mecânicas (GOUVÊA et al., 2015). Devido à complexidade da molécula de lignina sua degradação ocorre muito lentamente durante a carbonização da madeira, enquanto a celulose e hemicelulose degradam rapidamente, com isso ocorre o aumento da massa do carvão e conseqüentemente aumento do poder calorífico (GOUVÊA et al., 2015).

3.1.1 Distribuição do conteúdo de lignina na parede celular

Fujino e Itoh (1998), em estudo sobre o processo de lignificação de *Eucalyptus tereticornis*, observaram a perda de porosidade da parede celular conforme ocorria o processo de deposição de lignina. Esse comportamento segundo o autor é a razão provável para as diferenças de concentração de lignina entre as regiões de parede celular, sendo que a matriz altamente porosa da lamela média e parede primária permitem maior deposição de lignina do que a parede secundária, mais densamente organizada.

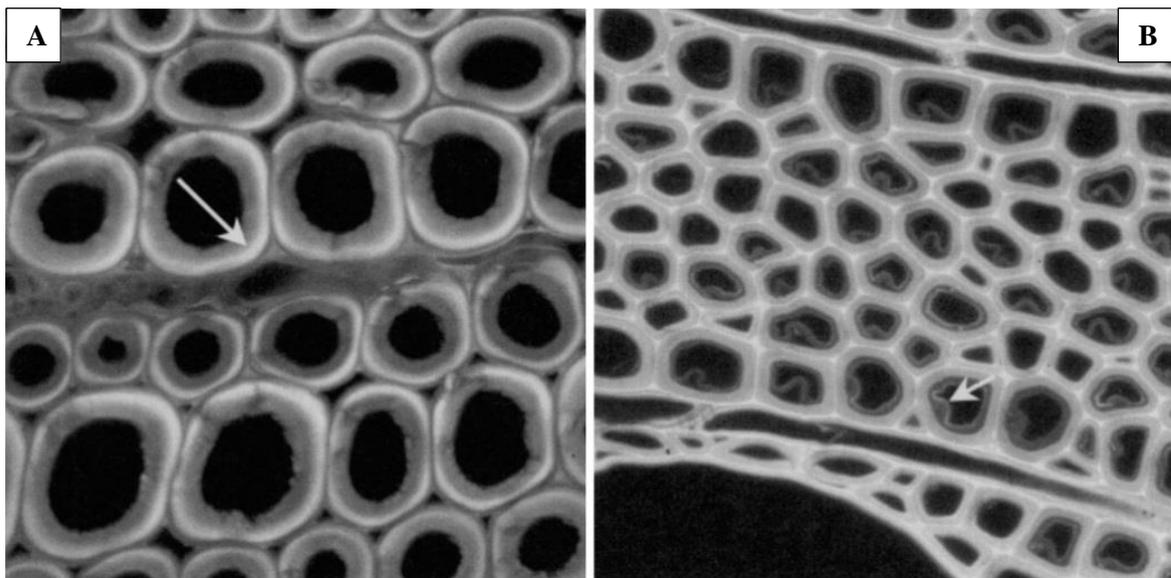
Segundo Donaldson (2001), a parede secundária das fibras é frequentemente menos lignificada do que a dos traqueídes, no entanto, a distribuição de lignina na parede celular das fibras de folhosas é semelhante à dos traqueídes de coníferas.

A distribuição do conteúdo de lignina pode ocorrer de forma diferente quando se trata do lenho de reação, chamado de lenho de tração para folhosas e lenho de compressão para coníferas. Estudos sobre a distribuição de lignina em lenho de compressão mostram que a lamela média desse é menos lignificada que no lenho normal (CÔTÉ et al., 1966) e que nos

casos de compressão severa há formação de espaços intercelulares não lignificados (DONALDSON, 2001).

Donalson (2001), estudando o lenho de compressão em *Pinus radiata* e lenho de tração em *Populus nigra*, através da microscopia de fluorescência, observou a presença de uma região altamente lignificada na camada S2 da parede secundária (Figura 1A) e presença da camada G não lignificada (Figura 1B).

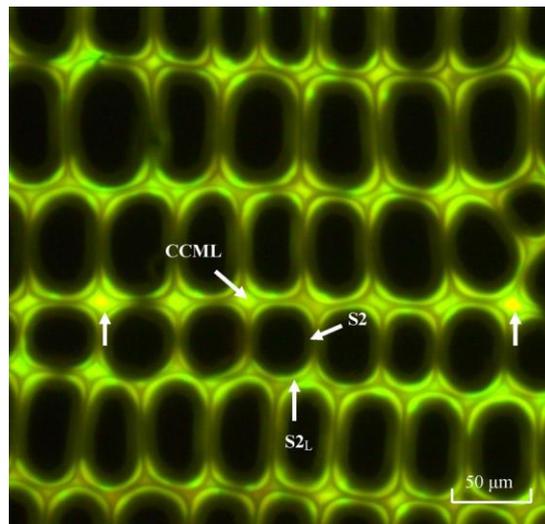
Figura 1 – Imagens de fluorescência de cortes transversais dos lenhos de: (A) *Pinus radiata* e (B) *Populus nigra*. A seta branca em A, indica a região lignificada e em B a presença da camada gelatinosa.



Fonte: Donaldson (2001).

Zhe Ji et al. (2013) em estudo com o lenho de compressão da madeira de *Pinus yunnanensis*, através da microscopia de fluorescência observaram que na região da lamela média e parede primária, sendo considerada pelo autor a junção dessas duas regiões de lamela média composta (indicadas pela seta branca), a presença de uma da região mais brilhante do que as outras e que esta maior intensidade de sinal de fluorescência corresponde a maior concentração da lignina (FIGURA 2).

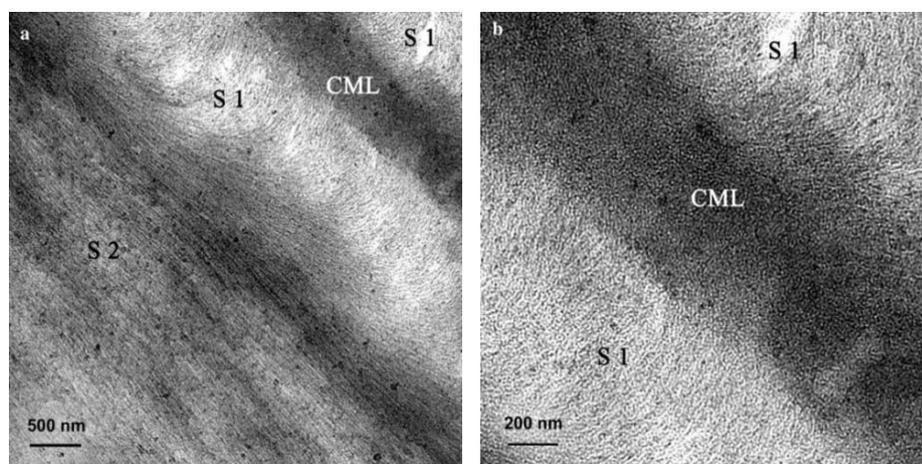
Figura 2 – Imagem de microscopia de fluorescência da seção transversal do Lenho de *Pinus yunnanensis*. As setas brancas indicam a camada S2 e região da lamela média composta (CCML).



Fonte: Zhe Ji et al. (2013).

Fromm et al. (2003) observaram que a lignina ocorre em concentrações elevadas na lamela média (CML), e que a transição entre a camada S1 e S2 ocorre aumento da concentração de lignina (FIGURA 3).

Figura 3 – Micrografias de seções radiais ultrafinas de traqueídes de Abeto vermelho por microscopia de transmissão. CML: lamela média composta, camadas S1 e S2.



Fonte: Fromm et al. (2003).

3.1.2 Técnicas de avaliação da distribuição de lignina

A distribuição do conteúdo de lignina na parede celular pode ser estudada por diversas técnicas, como histoquímica, absorção de UV, microscopia de fluorescência, microscopia confocal, microscopia eletrônica de transmissão, microscopia eletrônica de varredura (DONALDSON, 2001). Dentre as técnicas empregadas para a determinação da distribuição da lignina, a microscopia de fluorescência e a microscopia confocal proporcionam visualização direta dessa distribuição na parede celular, sendo observadas diferenças entre as camadas, isso devido à autofluorescência da lignina. De acordo com Kutscha e Mcormond (1972), algumas substâncias possuem a capacidade de absorver luz ultravioleta o que, por sua vez, estimula a emissão de luz visível, sendo este fenômeno conhecido como fluorescência. A fluorescência deste tipo é conhecida como primária ou autofluorescência. A fluorescência também pode ser induzida através dos fluorocromos, e esta fluorescência é referida como fluorescência secundária. Hernandez-Hernandez (2014), em estudo com a espécie *Agave atrovirens*, diz que quando a autofluorescência da lignina foi intensa, as fibras apresentaram maior teor de lignina.

3.2 Ângulo microfibrilar (AMF)

A parede celular funciona como um esqueleto para a mecânica do corpo da planta. É formada por celulose, hemiceluloses, pectina, lignina, vários compostos aromáticos e proteínas. Está organizada em parede primária e parede secundária. Na parede primária a orientação das microfibrilas é geralmente dispersa. A parede secundária está subdividida nas camadas S1, S2 e S3 que apresenta orientações alternadas das microfibrilas. A camada S2 é mais espessa do que as outras camadas, sendo considerada a mais influente sobre as propriedades físicas e químicas da parede celular (DONALDSON, 2008). De acordo com o mesmo autor, a estrutura cruzada das microfibrilas (orientação alternadas das microfibrilas na parede secundária) proporciona à madeira uma alta rigidez axial, além de uma alta resistência ao colapso e a ruptura, permitindo que a planta adote um hábito de crescimento ereto e faça uma condução eficiente da água da raiz até o topo.

Em contraste as camadas S1 e S3, possuem orientação transversal das microfibrilas, são relativamente finas, mas exercem papel importante no reforço da célula contra

deformação por forças de tensão de água, além de contribuir para a dureza e a resistência ao esmagamento da madeira (BOOKER, 1993). A camada S1 pode desempenhar papel importante na determinação das propriedades de fibras de celulose, contribuindo para a formação de finos e a determinação das propriedades de superfície das fibras (BERGANDER et al., 2002; BRANDSTROM et al., 2003). Booker e Sell (1998) sugeriram que a camada S3 é comparativamente mais eficaz no endurecimento da parede no plano transversal do que a camada S2 e, portanto, contribui para a resistência ao colapso no xilema funcional.

Em relação às propriedades físicas da madeira, para Evans et al. (2000), o AMF apresenta relação variável com a densidade, podendo apresentar correlação entre alguns anéis consecutivos, mas não apresenta o mesmo comportamento entre árvores de uma mesma espécie. DONALDSON (2008) diz que como o AMF varia entre lenho inicial e tardio e a quantidade destes na madeira tem influência sobre a densidade, a relação entre AMF e densidade pode ser hipotética (DONALDSON, 2008).

O AMF é um dos parâmetros que afetam a contração e a anisotropia. Em madeiras de compressão, o aumento do AMF mostra um aumento correspondente na contração longitudinal (HARRIS & MEYLAN, 1965). Madeiras com AMF baixo geralmente apresentam alta contração tangencial, enquanto que aquelas com AMF alto apresentam alta contração longitudinal (DONALDSON, 2008).

O AMF na camada S2 é considerado um indicativo da qualidade da madeira e das fibras (BENDTSEN & SENFT, 1968). O AMF mostra uma boa correlação com as propriedades mecânicas das fibras individuais, sendo que as fibras com maiores AMFs também mostram aumento da extensibilidade, que é a resistência que um material apresenta ao ser estirado sem se romper (PAGE et al., 1972) ou seja, o AMF está relacionado com a resistência à tração e ao módulo de elasticidade de fibras de celulose, sendo que pequenos valores AMF levam a fibras mais fortes e mais rígidas (DOWNES et al., 2003).

Segundo Lima et al. (2014), o ângulo microfibrilar da madeira é uma característica importante, pois ajuda a explicar o comportamento mecânico da madeira. O ângulo microfibrilar influencia na estabilidade dimensional, rigidez e mecânica das madeiras (Barnett e Bonham 2004, Chauhan et al., 2006) e de acordo com Donaldson (2008), menores ângulos microfibrilares são associados a maiores valores de resistência e rigidez da madeira.

Em coníferas, os valores médios dos ângulos das microfibrilas podem variar de 35° a 40° e para folhosas esses valores variam de 5° a 20°, podendo ocorrer variações entre espécies, entre árvores da mesma espécie e dentro de uma mesma árvore (BOYD, 1980).

3.2.1 Variação do ângulo microfibrilar através da parede celular

A variação do AMF tem sido amplamente observada dentro da árvore, no sentido medula-casca e da base até topo. Segundo Sarén et al. (2004) os maiores ângulos são encontrados nos primeiros cinco anéis próximo a medula e o mesmo comportamento foi observado por Donaldson (2008). Axialmente, o AMF diminui conforme se avança em direção ao topo da árvore. Evans et al. (2000) diz que o menor valor do AMF para *Eucalyptus nitens* foi entre 30 e 50% da altura total da árvore, voltando a aumentar em direção ao topo.

A variação do AMF também pode ser observada no lenho juvenil e adulto, onde os maiores ângulos são encontrados no lenho juvenil, o que proporciona a árvores jovens maior elasticidade, que é necessária para tolerar flexão mediada pelo vento (BARNETT & BONHAM, 2004). Entre árvores, mesmo vizinhas, observa-se significativa variação no AMF, sendo as diferenças mais aparentes em madeira juvenil (DONALDSON, 2008).

As determinações do AMF são geralmente realizadas na parede radial da fibra, no entanto, estudos comparativos mostraram que as diferenças entre determinações nas paredes radial e tangencial são variáveis entre árvores e dependentes da espécie (DONALDSON, 2008).

Usando microscopia eletrônica de transmissão em amostras de *Pinus radiata*, Donaldson e Xu (2005) foram capazes de medir a variação contínua da orientação das microfibrilas do lume à parede primária, mostrando uma zona de transição relativamente abrupta entre S2 e S3, mas uma transição mais gradual entre S1 e S2.

O AMF está relacionado com o direcionamento das tensões de crescimento, particularmente em lenho de reação. O lenho de compressão geralmente tem um alto AMF e, portanto, pode resistir a alta tensão de compressão, enquanto o lenho de tração tem um baixo AMF, podendo resistir à uma elevada tensão de tração (BOYD, 1980).

No lenho de compressão o AMF é geralmente maior em relação ao lenho oposto, enquanto na camada G o AMF é geralmente pequeno. No lenho de tração da espécie tropical

Laetia procera (Poepp.) Eichl., a parede secundária é composta por várias lamelas distintas, com camadas alternando AMFs altos e baixos em associação com variação no grau de lignificação, sendo que ângulos baixos são associados à baixos níveis de lignificação (RUELLE et al., 2007).

Estudos com diversas espécies mostram que sítio, tratos silviculturais como fertilização e desbaste, latitude, temperatura anual, pluviosidade, geadas e irrigação apresentam influência variável sobre o AMF, o que pode ser associado à taxa de crescimento do vegetal (DONALDSON, 2008).

3.2.2 Técnicas de medição do ângulo microfibrilar

As principais técnicas de medição do ângulo microfibrilar podem ser feitas em fibra individual através de microscopia, ou medição em amostras de madeira utilizando difração de raios-X. Dentre as técnicas de microscopias tem-se a microscopia de luz polarizada que depende das propriedades ópticas da celulose cristalina, e as que permitem visualização direta da orientação das microfibrilas como a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (DONALDSON, 2008).

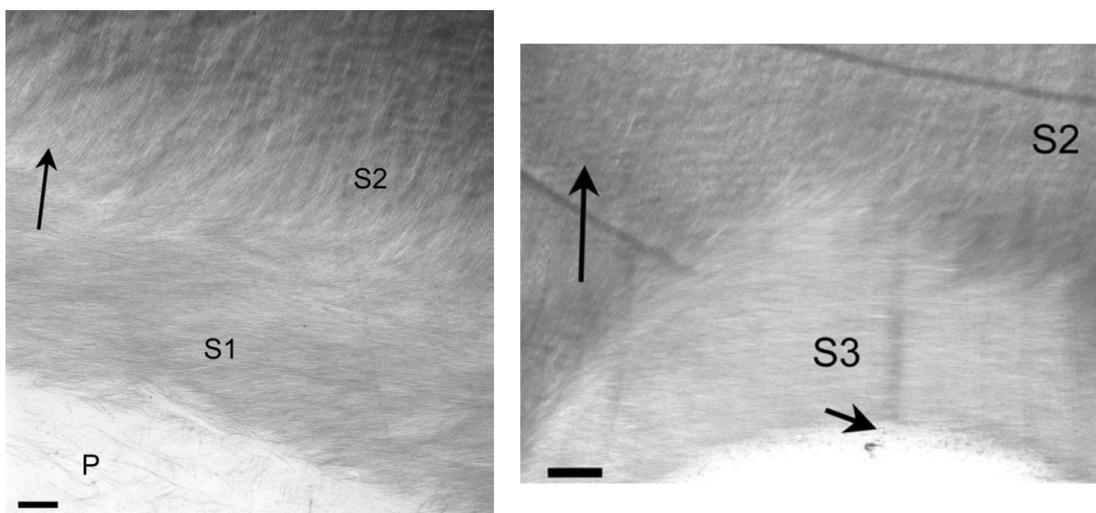
A microscopia de luz polarizada foi um dos primeiros métodos utilizados para inferir a estrutura de celulose em resolução microscópica. A microscopia de luz polarizada parte do princípio de que, como a celulose possui regiões cristalinas e as microfibrilas dentro da parede secundária são altamente alinhadas (MÜLLER et al., 1998), e seções finas de madeira são birrefringentes quando observadas entre dois filtros polarizadores cruzados. A observação de uma única parede em fibras individuais é possível com o auxílio de um micrótomo, para obter cortes mais finos, e maceração, para deslignificação do material.

Esta técnica envolve a rotação da fibra do seu eixo axial até que a parede celular, antes brilhante, se torne escura, atingindo a chamada posição de máxima extinção. A diferença entre o eixo axial da fibra e a angulação da posição de máxima extinção determina o AMF, que se aproxima ao AMF da camada S2, devido a sua maior espessura em relação às demais camadas (DONALSON, 2008). O efeito das camadas S1 e S3 na birrefringência da parede da fibra é geralmente pequeno, mas varia de acordo com a espessura da parede (PAGE & EL-HOSSEINY, 1974).

Na microscopia de luz polarizada obtemos os valores médios para AMF enquanto que na microscopia eletrônica de transmissão (MET) é possível a obtenção da angulação em cada

camada. Donaldson e Xu (2005), em estudo com a espécie *Pinus radiata*, observaram a variação contínua da orientação da microfibrila do lume à parede primária (FIGURA 4), mostrando a transição gradual entre S1 e S2 e zona de transição abrupta entre S2 e S3.

Figura 4 - Micrografia mostrando as camadas S1, S2 e S3 da parede celular de *Pinus radiata* por microscopia eletrônica de transmissão. As setas indicam a direção das microfibrilas.



Fonte: Donaldson e Xu (2005). Barra de escala = 500 nm

3.3 Lenho de reação

O lenho de reação é formado quando os troncos ou ramos das árvores crescem sob esforço mecânico e apresenta características anatômicas, químicas e físicas diferenciadas em relação ao lenho normal. Sua formação pode ser influenciada por fatores como clima, topografia, copa assimétrica e a massa dos galhos (MONTEIRO et al., 2010), sendo comumente associada à inclinação ou tortuosidade do fuste, o que ocorre como uma resposta natural da árvore para retornar a posição normal durante ou após a ação de forças (SIMPSON & TENWOLDE, 1999).

Em coníferas o lenho de reação é chamado de lenho de compressão e em folhosas de lenho de tração, que é formado no lado superior do tronco inclinado e associado com o desenvolvimento de grandes tensões de tração no interior do tronco (WARDROP 1964; FISHER E STEVENSON, 1981).

O lenho de reação pode ser evidenciado pelo o deslocamento da medula do seu centro geométrico. Ferreira et al. (2008), em estudo com clones de *Eucalyptus* aos dois anos de idade, que cresceram em regiões de baixada e de encosta, identificaram a presença do lenho de tração através do deslocamento da medula das árvores estudadas.

Outras características da madeira indicam a ocorrência do lenho de tração são: redução no teor de lignina na parede celular das fibras (PANSWIN & DE ZEEUW, 1980), formação de camada gelatinosa na parte mais interna da parede celular secundária, conhecida como camada G, excessiva contração e aumento da densidade básica (SIMPSON & TENWOLDE, 1999), o que resultará em alteração nas propriedades físicas, químicas e mecânicas deste lenho em relação ao lenho normal (GREEN et al., 1999).

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

A parede celular do lenho de tração é frequentemente relatada pela presença da camada gelatinosa, embora não obrigatoriamente todo lenho de tração apresente a camada G (WASHUSEN et al., 2003; QIU et al., 2008; RUELLE et al., 2010). Estudos anatômicos realizados por Clair et al. (2006b), com 21 espécies tropicais, observaram ausência da camada G em 14 espécies das estudadas. Os autores ressaltaram que é necessária a realização de técnicas mais específicas para a detecção da camada G e afirmaram que a ausência dessa camada não indica a ausência de tecido de reação.

Quando ocorre a formação da camada gelatinosa no lenho de tração, este apresenta a parede secundária com maior teor de celulose e diminuição do teor de lignina na parte interna da parede celular (YOSHIZAWA et al., 2000) e possui diminuição acentuada do ângulo microfibrilar (WASHUSEN et al., 2005; RUELLE et al., 2006; CLAIR et al., 2011).

Outras características que podem ser citadas quanto as alterações no lenho de reação é a excessiva contração quando a umidade fica abaixo do ponto de saturação das fibras e o aumento da densidade básica (SIMPSON e TENWOLDE, 1999).

Monteiro et al. (2010) observaram em espécies de *Eucalyptus*, que o lenho de tração foi evidenciado por elevada retratibilidade e maior densidade básica quando comparada a madeira normal. As características anatômicas, químicas e físicas do lenho de reação são

diferentes do lenho oposto e do lenho normal (PLOMION et al., 2003) e algumas espécies são mais propensas a ocorrência do lenho de reação do que outras (GREEN et al., 1999).

No lenho de compressão de coníferas as características da madeira são semelhantes em todas as espécies. Já em madeira de tração essas características são menos uniformes, podendo variar entre espécies e gêneros (PANSHIN e DE ZEEUW, 1980).

Mizrachi et al. (2015), verificou AMF baixo para o lenho de tração de clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* aos 4 anos de idade, sendo essa redução de 20% em relação ao lenho oposto.

Clair et al. (2011) investigaram as mudanças estruturais nas microfibrilas de celulose ao longo de sequências de diferenciação celular do xilema do lenho de tração e lenho normal de álamo (*Populus deltoides* x *Populus trichocarpa*) e encontraram redução do ângulo microfibrilar no lenho de tração (AMF próximo de 0°).

Ruelle et al. (2007), estudando o lenho de tração de *Laetia procera* (Poepp.) Eichl., observaram que a parede secundária dessa espécie é composta por várias lamelas distintas, com camadas alternando AMF altos e baixos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo e coleta do material

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

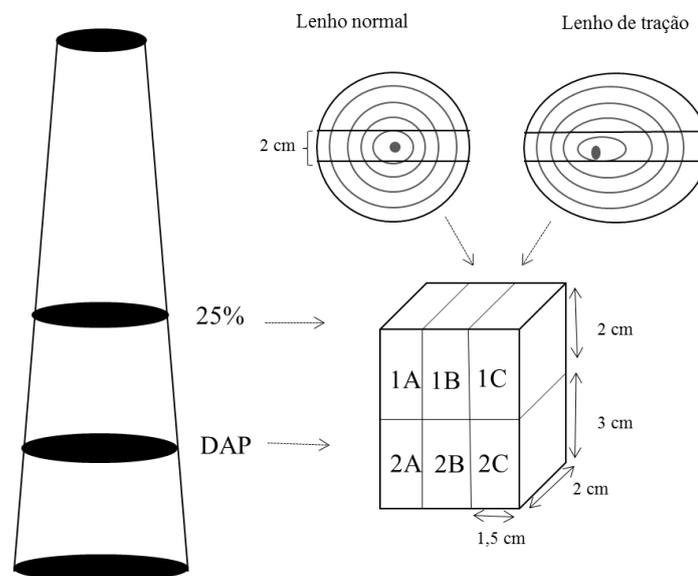
Foram selecionadas duas árvores, sendo uma com tronco ereto e uma com tronco inclinado, foram mensurados altura e diâmetro a altura do peito (DAP), dispostos na Tabela 1. As árvores foram abatidas e, posteriormente, de cada árvore, foram retirados dois discos de aproximadamente 5 cm de altura, um a de 1,30 m do solo (DAP) e outro a 25% da altura total da árvore. O material coletado foi encaminhado ao Laboratório de Usinagem da Madeira do Departamento de Ciências Florestais da Universidade Federal de Lavras (DCF/UFLA), e então a faixa central do tronco foi retirada com o auxílio de serra fita simples.

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

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

Em cada disco foram traçadas linhas passando pela medula e a partir dela delimitada a largura final da seção transversal de 2 cm de espessura e 5 cm de altura (FIGURA 5). Foram realizadas análises para o lenho normal (árvore ereta) e lenho de tração e lenho oposto (árvore inclinada), identificados pela excentricidade da medula.

Para as análises de microscopia eletrônica de transmissão, microscopia de fluorescência e microscopia confocal a retirada das amostras foram realizadas em três posições radiais, interna (próximo a medula), intermediária e externa (próximo a casca), para cada um dos lenhos, normal, oposto e de tração, gerando 9 amostras para cada análise. Para determinação do ângulo microfibrilar através da microscopia de luz polarizada, os corpos de prova foram retirados a cada 1,5 cm a partir da medula até a casca, totalizando 57 corpos de prova.

Figura 5 - Esquema de retirada das amostras das árvores de *E. grandis*.

As amostras 1 foram utilizadas para as análises de determinação do AMF e 2 para distribuição da lignina. As letras A, B e C representam as posições de retirada das amostras internas, intermediárias e externas, respectivamente.

4.2 Determinação do ângulo microfibrilar

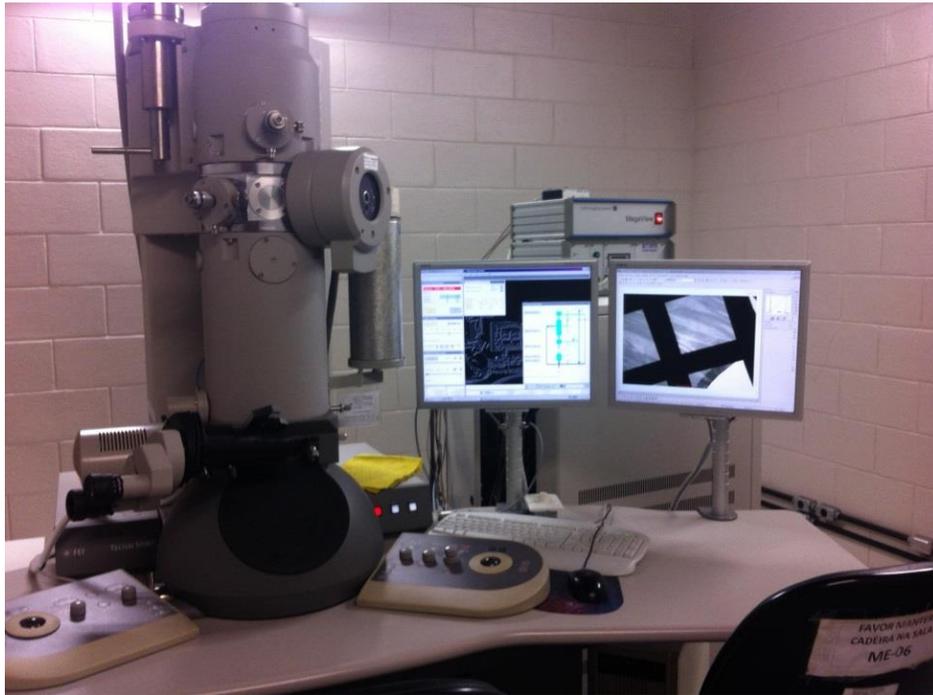
4.2.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para determinação dos ângulos microfibrilares nas camadas da parede celular foram confeccionados os corpos de prova de 1x1x1 mm, estes foram parcialmente deslignificados em solução de ácido acético glacial e peróxido de hidrogênio (proporção de 1:1) por 3 horas, esse procedimento foi realizado para facilitar a penetração da resina na madeira. Posteriormente os corpos de prova foram colocados em solução karnovisk por 24h, para fixação (estabilização das estruturas celulares). Após as 24h o material foi lavado com cacodilato, por três vezes a cada 10 minutos, na terceira lavagem foi deixado uma pequena quantidade do cacodilato e foi adicionado 6 gotas de tetróxido de ósmio. Após 2 horas o material foi lavado em água destilada para retirada do ósmio. Posteriormente os corpos de prova foram colocados em uranila e deixados por 24h. Após as 24h foram desidratados em solução crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) por dez minutos em cada solução. Por fim as amostras foram emblocadas em resina Spurr. Após o emblocamento do corpo de prova na resina foi realizado o desbaste da amostra e então confeccionados os cortes semifinos. Feita as seções semifinas, foi escolhida a região de interesse para as seções longitudinais oblíquas de 80 nm (ultrafinos) que foram preparadas com o auxílio de um ultramicrótomo com navalha de diamante.

As seções ultrafinas foram colocadas em telas de cobre e contrastadas com acetato de uranila (0,1%), citrato de chumbo (0,1%), permanganato de potássio (0,1%) em citrato de sódio (0,1%) e novamente citrato de chumbo (0,1%), por 3 minutos cada (adaptado de DONALDSON & XU, 2005). Os cortes ultrafinos foram analisados no microscópio eletrônico de transmissão, FEI- Tecnai 120, série 9432 (FIGURA 6), no centro de microscopia (CM) da UFMG. As camadas da parede celular foram identificadas visualmente pela diferença no direcionamento das microfibrilas. O AMF de cada camada da parede celular da fibra foi determinado com o auxílio do software de análise de imagens Image-J. O preparo

das amostras foi realizado no centro de microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Figura 6 - Microscópio eletrônico de transmissão Tecnai 120 do centro de microscopia da UFMG.



Fonte: Souza (2017).

4.2.2 Microscopia de luz polarizada

Foram feitos cortes tangenciais de 7 μm de espessura obtidos com o auxílio de um micrótomo de deslize. Os cortes foram colocados em frascos de vidro e cobertos com uma solução de ácido acético glacial e peróxido de hidrogênio, na proporção de 1:1 (FRANKLIN, 1945, modificado por BERLYN; MIKSCHE, 1976). Os frascos foram lacrados e deixados em estufa a 60°C durante 12 horas, para que ocorresse a dissolução da lamela média e a desagregação dos elementos anatômicos, formando um macerado que foi então lavado e armazenado em água destilada. O AMF médio da parede celular foi determinado através da técnica de microscopia de luz polarizada, empregada por Lima et al. (2004), realizando-se 20 medições por amostra no microscópio de luz polarizada Olympus BX 51.

4.3 Determinação da distribuição de lignina

4.3.1 Microscopia de fluorescência

Para análise qualitativa da distribuição de lignina, foram realizados cortes transversais de 5 µm de espessura preparados com um micrótomo de deslize. Os cortes foram tratados com solução de auramina 1% por 10 minutos (adaptado de OLIVEIRA, 2013) e examinados em microscópio de fluorescência Obsever Z1 Zeis AX10. Com filtro HQ 470/40 Q495 500 LP (GFP), no laboratório de microscopia eletrônica (LME) da UFLA.

4.3.2 Microscopia laser confocal

Para análise da distribuição da lignina, foram realizados cortes transversais de 7µm de espessura preparados em micrótomo de deslize em três posições de amostragem na direção medula-casca. 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 LSM 780 Zeiss Observer Z.1 do laboratório de microscopia eletrônica da UFLA, com o software Zen 2012. As imagens foram geradas a partir da sobreposição de 7 planos focais ao longo do eixo Z (Z-strack), para cada posição analisada. Para determinação da intensidade de fluorescência da lignina marcada com auramina foram realizadas 20 medições em três imagens geradas para cada posição medula-casca através do software Image J utilizando o parâmetro “INT DEN”. A medição da intensidade da lignina foi feita através da fórmula (adaptada de FERNANDO et al., 2015) : Intensidade de lignina = Densidade integrada - (área selecionada x intensidade do background).

4.4 Análise dos dados

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) a 5% e 1% de significância para comparação das médias encontradas nos lenhos normal, de tração e oposto para o ângulo microfibrilar. Para análise da lignina foi aplicado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis a 1% de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ângulo microfibrilar médio determinado por microscopia de luz polarizada

As médias encontradas para o ângulo microfibrilar, determinado por microscopia de luz polarizada, das madeiras das duas árvores de *E. grandis* estão descritas na Tabela 2. A madeira da árvore ereta (lenho normal) apresentou o maior ângulo microfibrilar médio (AMF) em comparação com a árvore inclinada (lenho de reação) com ângulo de 8,9° e 5,7°, respectivamente. A análise estatística possibilitou identificar diferença do ângulo microfibrilar entre as madeiras das árvores analisadas, a 1% de significância pelo teste F, sendo o menor na árvore com lenho de reação. O AMF apresentou mínimo de 4,7° para o lenho de reação e máximo de 11,6° para o lenho normal.

Esses resultados estão em acordo com o relatado por Evans et al. (2000) em que dizem que existe diferença na variação de AMF entre árvores de angiospermas e esta variação é maior e observada próximo da medula.

Tabela 2 - Valores médios do ângulo microfibrilar (AMF) da madeira da árvore ereta e da árvore inclinada de *Eucalyptus grandis*.

Árvore	AMF(°) Médio	AMF(°) Máximo	AMF(°) Mínimo
Ereta	8,9	11,6	7,2
Inclinada	5,7	7,2	4,7
F calculado	133,71*		

* = significativo a 5%

O lenho normal (árvore ereta) apresentou o maior ângulo microfibrilar médio, com 8,9°, enquanto que no lenho de tração o ângulo médio sofreu redução apresentando o valor de 5,4° (TABELA 3). Houve diferença do AMF entre os tipos de lenho amostrados, a 1% de probabilidade de acordo com o teste F, sendo maior no lenho normal do que no lenho de reação.

Tabela 3 - Valores médios do ângulo microfibrilar para os lenhos das árvores ereta e inclinada de *Eucalyptus grandis*.

Árvore	AMF(°) Médio	AMF(°) Máximo	AMF(°) Mínimo
Ereta	8,9	11,6	7,45
Inclinada	5,4	6,25	4,7
Inclinada	6,2	7,2	5,55
F calculado	79,57*		

* = significativo a 1%.

O valor máximo do AMF, obtido neste estudo para a árvore ereta está próximo ao encontrado por Hein e Lima (2012) para *Eucalyptus grandis*. A diminuição do AMF do lenho normal para o lenho de tração, também foi observado por Mizrachi et al. (2015) com híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* e em estudos realizados por Clair et al. (2011). Em pesquisa realizada por Donaldson (2008), o autor relata que em folhosas o AMF do lenho de tração é menor em relação ao lenho oposto.

Com base nos resultados deste trabalho, nota-se que a madeira de tração por ter apresentado menor ângulo microfibrilar que a madeira normal tende a ser mais resistente a compressão e a tração, e também mais rígida. Porém, em relação à estabilidade dimensional, a madeira de tração apresenta menor ângulo microfibrilar e maior contração tangencial, tornando a madeira menos estável.

Na Tabela 4 é apresentando o resultado para as duas alturas amostradas na árvore, no DAP (altura a 1,3 m do solo) e a 25% da altura total. Existe diferença do AMF entre as alturas amostradas na árvore com lenho de tração, a 5% de significância pelo teste F, sendo menor na altura de 1,3 metros.

Tabela 4 - Valores médios do ângulo microfibrilar (AMF) para as duas alturas de amostragem das árvores de *Eucalyptus grandis*.

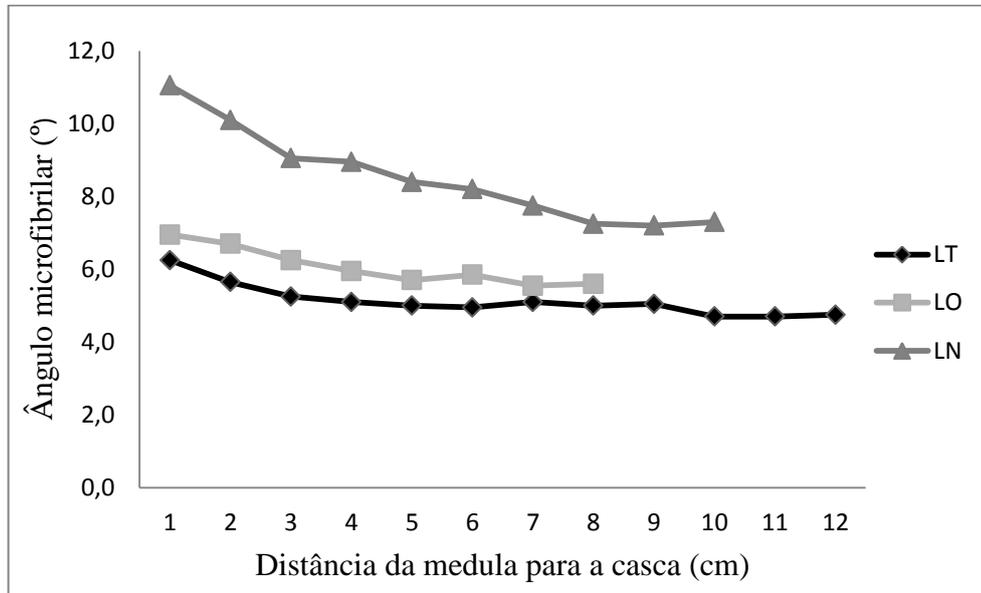
Árvore	AMF(°) Médio	AMF(°) Máximo	AMF(°) Mínimo
Ereta (DAP)	8,53	11,05	7,2
Ereta (25%)	9,37	11,6	7,45
F calculado	1,81 ^{ns}		
Inclinada (DAP)	5,4	7,0	4,7
Inclinada (25%)	6,0	7,2	4,95
F calculado	5,63*		

ns= não significativo a 5%; *= significativa a 5%.

Pode-se observar no lenho de reação (TABELA 4) que houve aumento do AMF a 25% da altura quando comparado ao DAP, porém neste estudo não podemos afirmar que esse comportamento ocorra no sentido base-topo das árvores, pois foram amostrados apenas dois pontos. De acordo com Evans *et al.* (2000) axialmente, o AMF diminui conforme se avança em direção ao topo da árvore, os autores relatam que em *Eucalyptus nitens* o AMF atinge seu mínimo entre 30 e 50% da altura total do vegetal, voltando a aumentar em direção ao topo da árvore.

A Figura 7 mostra a variação do ângulo microfibrilar no sentido medula-casca nos três tipos de lenho, nota-se que o AMF diminui da medula em direção à casca tanto para o lenho normal quanto para o lenho de tração e oposto. Sendo que o lenho normal apresenta 11,6° próximo da medula atingindo seu mínimo perto da casca com 7,45°. O mesmo comportamento foi observado para os lenhos de tração e oposto.

Figura 7 - Variação na direção medula-casca do ângulo microfibrilar (AMF) médio dos lenhos normal (LN), de tração (LT) e oposto (LO) de *E. grandis*.



Na figura 7 pode ser observado que tanto para o lenho normal quanto para o lenho de reação o AMF sofre redução da medula para a casca, no entanto os valores encontrados para o AMF no lenho normal de 11,6° próximo à medula e de 7,5° próximo à casca, são maiores em relação ao lenho de reação. Os resultados deste trabalho apresentam comportamento semelhante, em relação à variação do AMF na direção medula-casca, com o que foi relatado em pesquisas realizadas por Lima et al. (2004) em estudo com clones *E. grandis* × *E. urophylla* aos 8 anos de idade em que verificaram a diminuição do ângulo microfibrilar da medula para a casca, sendo o AMF encontrado na região interna (próxima a medula) igual a 9,68° e região externa próxima à casca igual a 8,58°. Medhurst et al. (2012), em trabalho realizado com *Eucalyptus nitens* com 22 anos, encontraram redução do AMF de 25% da medula para casca nos seis primeiros anéis de crescimento, variando de 20° perto da medula a 15° perto da casca. Stuart e Evans (1995), também trabalhando com *Eucalyptus nitens*, observaram que o ângulo microfibrilar diminuiu da medula para casca, a partir de 11 anos.

Lima et al. (2014) observaram em madeira de *E. grandis* que o AMF diminui da medula para a casca, com os maiores ângulos nos primeiros três anéis de crescimento com uma média de 28,0°, 27,7° e 27,9°, respectivamente, enquanto o menor ângulo foi 20,2° na região perto da casca, no anel 25.

5.2 Ângulo microfibrilar através da parede celular (MET)

Através da técnica de microscopia de luz polarizada apresentados no item 5.1 foram obtidos os valores médio do ângulo microfibrilar para a parede celular da fibra. As variações que ocorrem nas camadas S1, S2 e S3 foram analisadas com mais detalhes pela microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para medição do ângulo microfibrilar no Image J, foi tomada como referência uma linha vertical que representasse o eixo da fibra e a partir dela foi obtido o AMF de cada camada da parede celular.

Na Tabela 5 são apresentados os valores médios do ângulo microfibrilar para as camadas S1, S2 e S3 da parede celular dos lenhos normal, de tração e oposto. Nos lenhos de tração e oposto não foi possível obter o AMF da posição intermediária devido à amostra não ter resistido à intensidade do laser.

Tabela 5 - Valores médios do ângulo microfibrilar (AMF) através das camadas da parede celular para os lenhos normal, de tração e oposto de *E. grandis*. Posições: interna, intermediária e externa.

Árvore	Lenho	Posição radial	S1 (°)	S2 (°)	S3 (°)
Ereta	Normal	Interno	66,82	20,65	48,21
		Intermediário	67,73	16,49	64,78
		Externo	74,91	8,92	57,31
Inclinada	Tração	Interno	70,76	12,53	75,03
		Externo	17,68	4,43	-
	Oposto	Interno	71,45	18,49	72,11
		Externo	68,27	8,80	60,90

Observou-se a diminuição do ângulo microfibrilar da camada S2 em direção à casca tanto para o lenho normal, quanto para o lenho de reação. Esses resultados estão em acordo com os encontrados por Lima et al. (2014) em estudo com *Eucalyptus grandis* em função da idade cambial que mostrou essa tendência da redução do ângulo em direção à casca, embora o ângulo encontrado não fosse exclusivamente da camada S2. Donaldson e Xu (2005), em estudo com a madeira de *Pinus radiata*, observaram o mesmo comportamento do AMF. A

camada S2 do lenho de tração apresentou menor ângulo médio em comparação com os lenhos normal e oposto.

Na Figura 8, é possível visualizar a lamela média, parede primária, camadas S1, S2 e S3 da parede secundária, canto celular e o lume da célula. A identificação das camadas foi possível devido aos diferentes tons acinzentados da imagem. Pode ser observado que a região da lamela média (LM) entre as fibras é estreita, enquanto que o canto celular (CC) apresenta uma maior área. A camada S2 é a mais espessa, a S1 é identificada como uma fina linha em tom de cinza claro entre a camada S2 e parede primária. A camada S3 entre o lume da célula e a S2 também apresenta pequena espessura. Também pode ser observado em “A” parte de uma fibra que foi seccionada superficialmente devido à pequena espessura do corte utilizado no MET, que atinge as fibras em profundidades diferentes.

Figura 8 - Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de fibras do lenho normal de *E. grandis*. A lamela média (LM), as camadas S1, S2 e S3 da parede celular, a parede primária (PP) e o canto celular (CC) são indicadas pelas setas brancas. A - fibra seccionada. As camadas foram diferenciadas através dos diferentes tons de cinza.



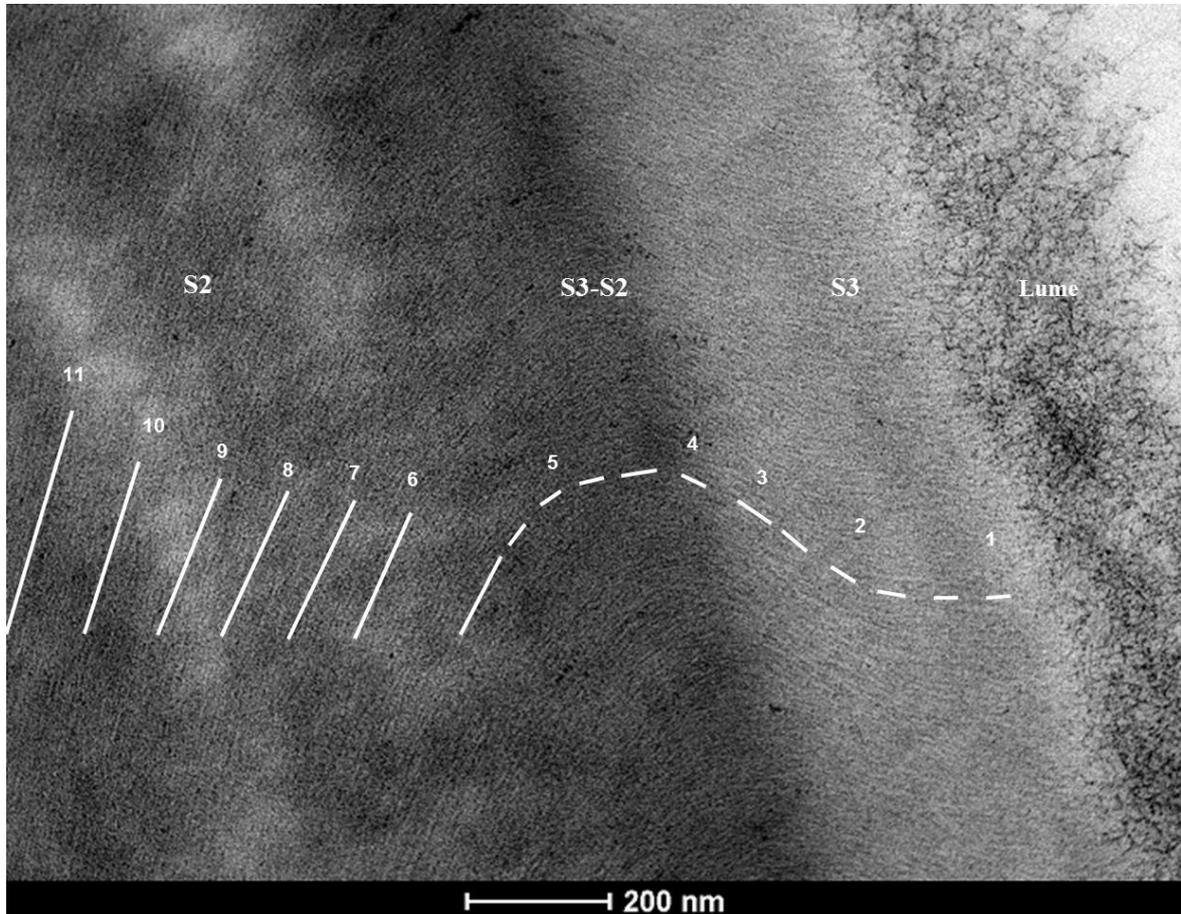
Para o lenho normal de *E. grandis*, foi realizada amostragem em três posições no sentido medula-casca. Foi possível através da orientação das microfibrilas identificar as camadas S1, S2 e S3 para essa posição. Também foi identificada através da orientação da microfibrila a região de transição gradual entre as camadas S2-S3. No lume da célula pode ser observada parte da camada S3 desfibrilada, que talvez tenha sido causada pela microtomia. Na Tabela 6 são apresentadas as espessuras das camadas da parede celular. A camada S2 apresenta espessura cerca de 60% a 80% maior que as outras camadas.

Tabela 6 - Valores da espessura (μm) das camadas S1, S2, S3 e parede primária (PP) para os lenhos normal, de tração e oposto *de E. grandis*.

Árvore	Lenho	Posição	S1	S2	S3	PP
Ereta	Normal	Interna	0,88	3,22	0,22	0,46
		Intermediária	0,44	2,60	0,24	0,64
		Externa	0,36	4,19	0,08	0,58
Inclinada	Tração	Interna	0,24	2,49	0,23	0,46
		Externa	0,13	4,20	-	0,39
	Oposto	Interna	0,57	2,93	0,25	0,56
		Externa	0,32	3,41	0,19	0,48

Na Figura 9 é apresentada a imagem da posição interna retirada entre os três primeiros anéis de crescimento do lenho normal. É possível identificar a camada S3 (1) com elevados AMF, decrescentes em direção em direção à zona de transição (2) quando as microfibrilas sofrem uma inflexão (3) em sua direção, voltando a aumentar até atingirem cerca de 90° (4). A partir desse máximo, o AMF vai diminuindo progressivamente a partir da zona de transição (5) até as posições mais externas da camada S2 (11).

Figura 9 - Imagem de microscopia eletrônica de transmissão da posição interna do lenho normal de *E. grandis*. S2-S3 – Faixa de transição entre camadas.



O ângulo microfibrilar apresentou grandes variações entre e dentro das camadas S1, S2 e S3. A amostra retirada próximo à medula (interno) apresentou na camada S2, ângulo variando entre 10° e 34°; na S3 entre 37° a 71° e na camada S1 os valores foram entre 52° e 79° na direção destrógira em relação ao eixo da fibra.

A camada de transição S2-S3 e a S3 para a posição intermediária do lenho normal, retirada entre os anéis 16-19, pode ser visualizada na Figura 10. No lume da célula pode ser observada parte da camada S3 desfibrilada. A camada S3 (1) apresenta maior AMF, as microfibrilas sofrem uma inflexão em sua direção (2), voltando a aumentar até atingirem 90° (3). Após atingir o máximo, o AMF vai diminuindo progressivamente a partir da zona de transição (4).

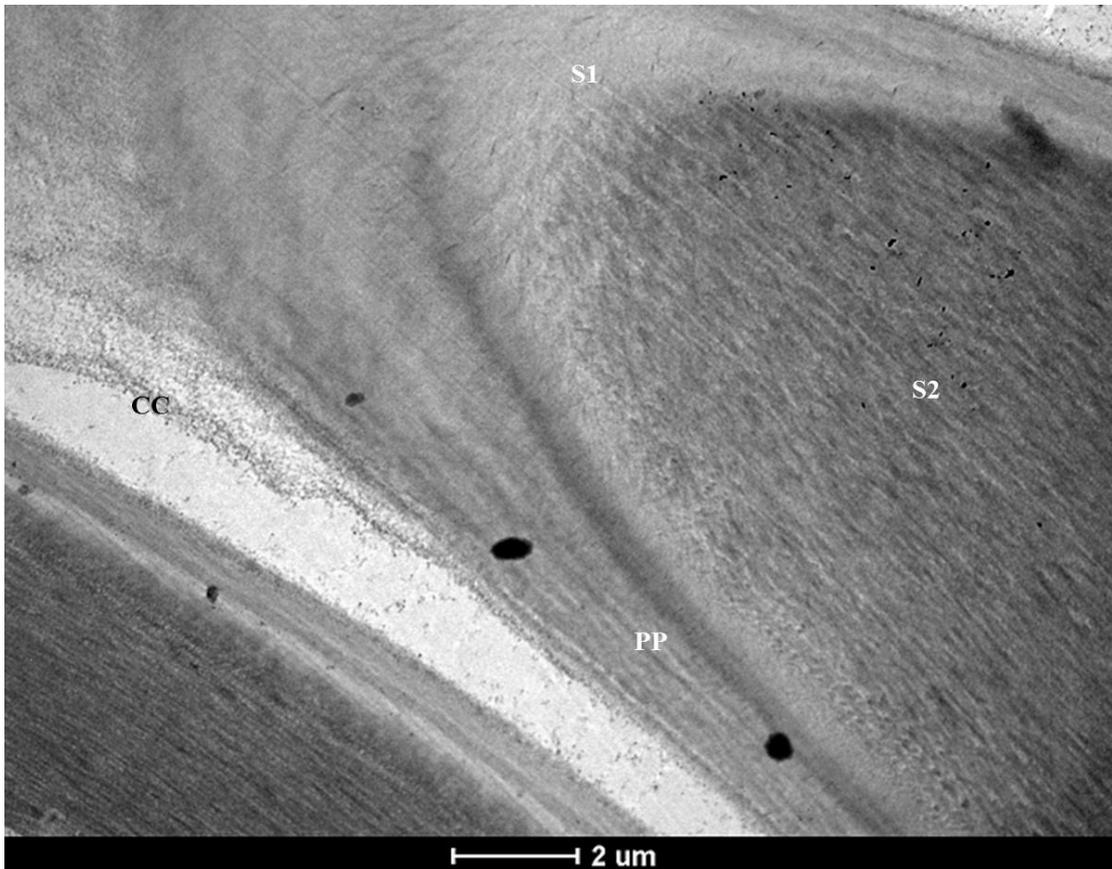
Figura 10 - Imagem de microscopia eletrônica de transmissão da posição intermediária do lenho normal de *E. grandis*. S2-S3 – Faixa de transição entre camadas.



A Figura 11 mostra a identificação da camada S2 com maior espessura, a S1 mais estreita, apresentando tom de cinza mais claro, com orientação inclinada da microfibrila e externamente a S1 encontra-se a parede primária. No canto celular pode ser observada a presença de uma substancia que provavelmente seja a lignina.

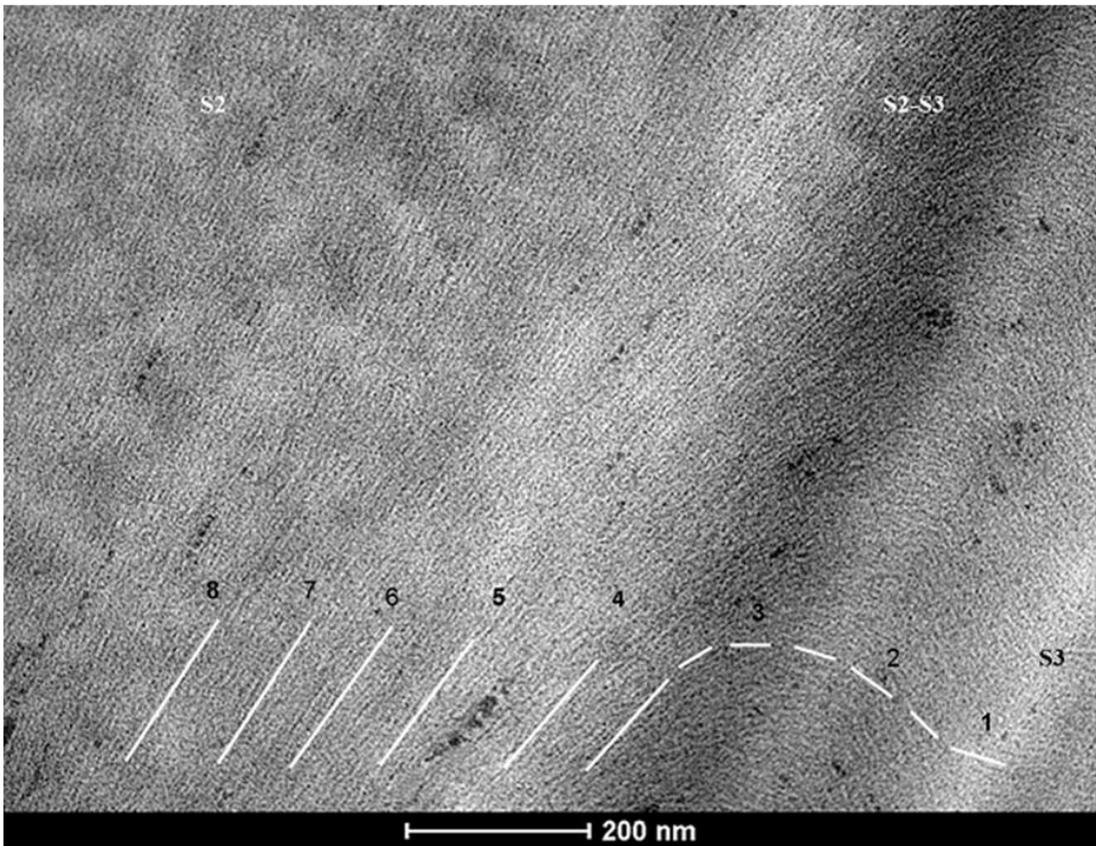
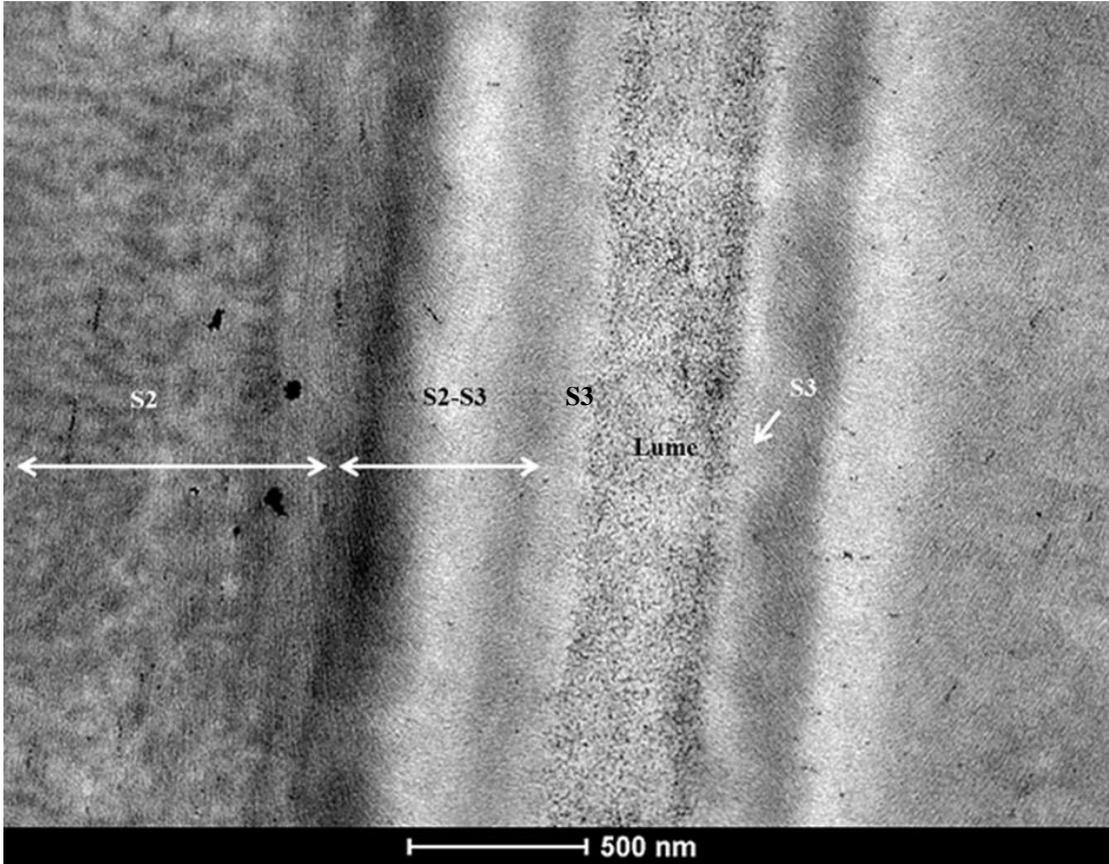
Na região intermediária de amostragem no sentido medula-casca, o ângulo microfibrilar variou na camada S2 de 7° a 21°, de 44° a 65° para a S3 e na S1 a variação foi entre 67° e 84°.

Figura 11- Imagem de microscopia eletrônica de transmissão da posição intermediária do lenho normal de *E. grandis*. CC – canto celular, PP- parede primária.



Na Figura 12 é apresentada a imagem da posição externa (entre os anéis 27 e 28), região do alburno, próxima a casca. Foi possível identificar a camada S3 (1) com maior AMF que vai diminuindo em direção em direção à zona de transição, até o momento que as microfibrilas sofrem inflexão em sua direção (2), voltando a aumentar até atingirem aproximadamente 90° (3). A partir da zona de transição (4), o AMF vai diminuindo progressivamente até as posições mais externas da camada S2 (8).

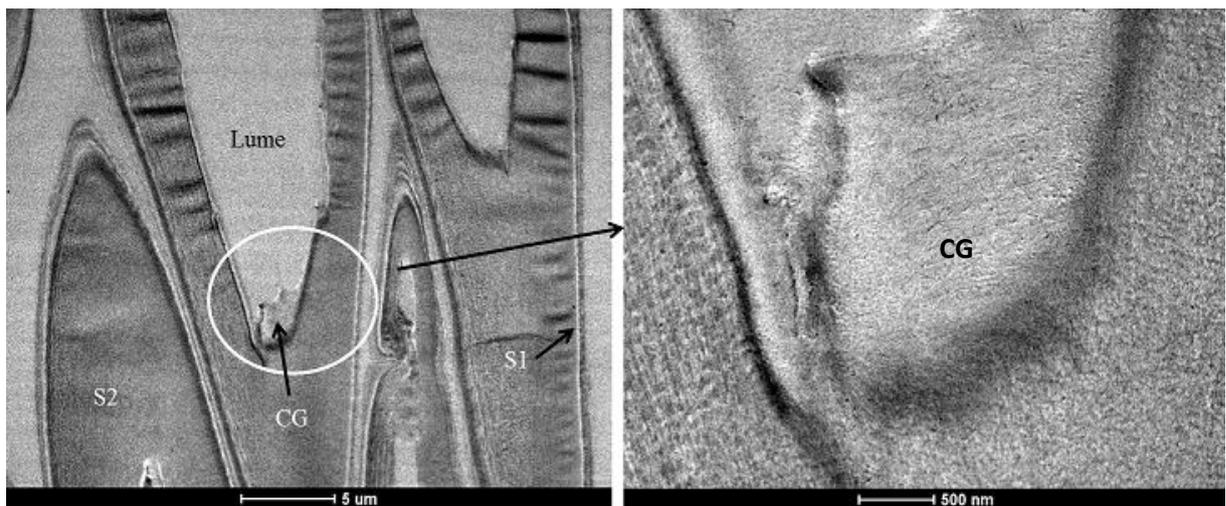
Figura 12- Imagem de microscopia eletrônica de transmissão da posição externa do lenho normal de *E. grandis*. S2-S3 – Faixa de transição entre camadas.



Na posição externa, com amostras retiradas próximo à casca os valores do ângulo variaram de 5° a 15° para a camada S2, entre 35° a 76° na S3 e 54° e 89° para a S1.

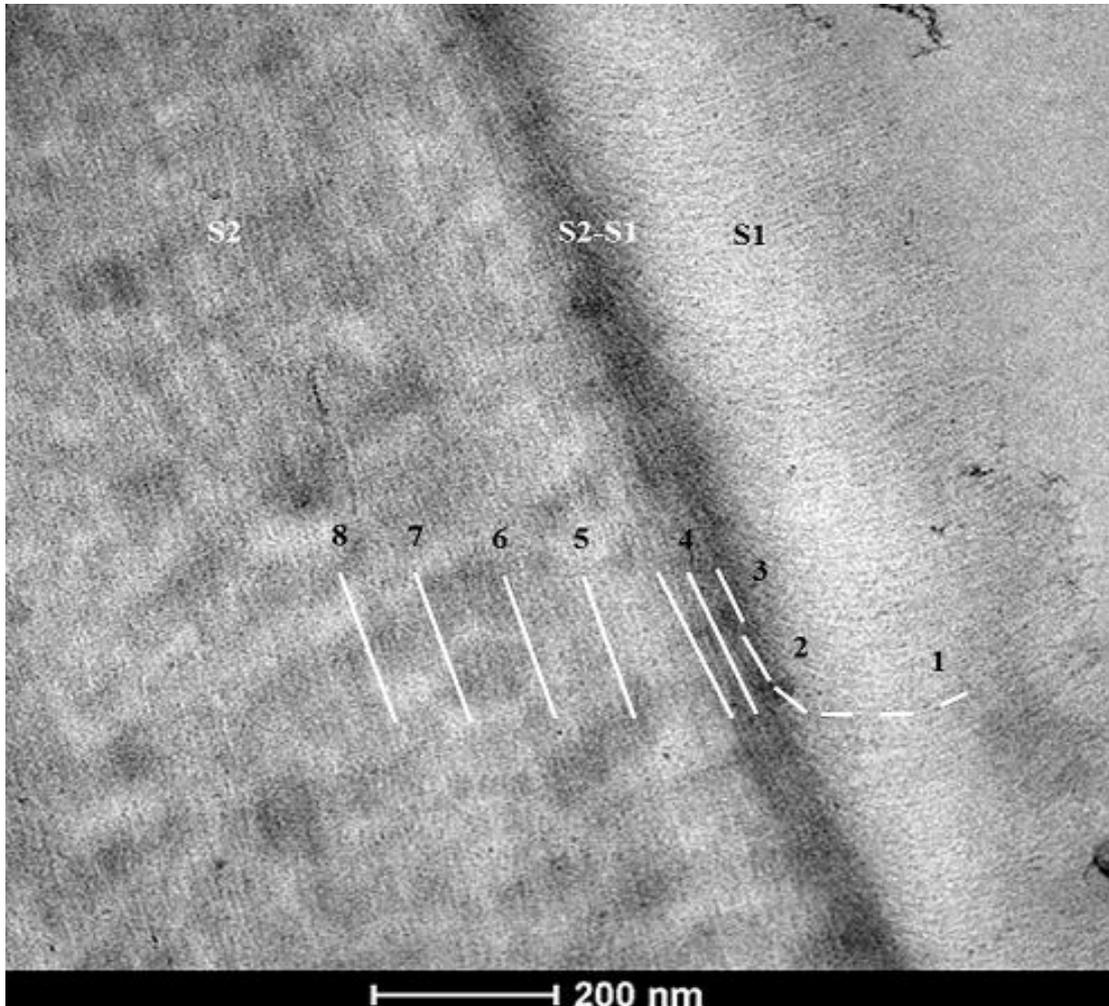
Para o lenho de tração, não foi possível obter as imagens da região intermediária, pois o corte ultrafino dessa amostra, não resistiu à intensidade do laser. Na Figura 13, as imagens geradas para região interna, com amostra retirada nos primeiros dois anéis, permitiram observar em algumas fibras a descontinuidade da camada S3 e a aparente presença da camada gelatinosa. Também é possível a visualização das camadas S1 e S2 pela diferença de tonalidade do cinza.

Figura 13 - Imagem de microscopia eletrônica de transmissão da região interna do lenho de tração de *E. grandis*. CG- camada gelatinosa.



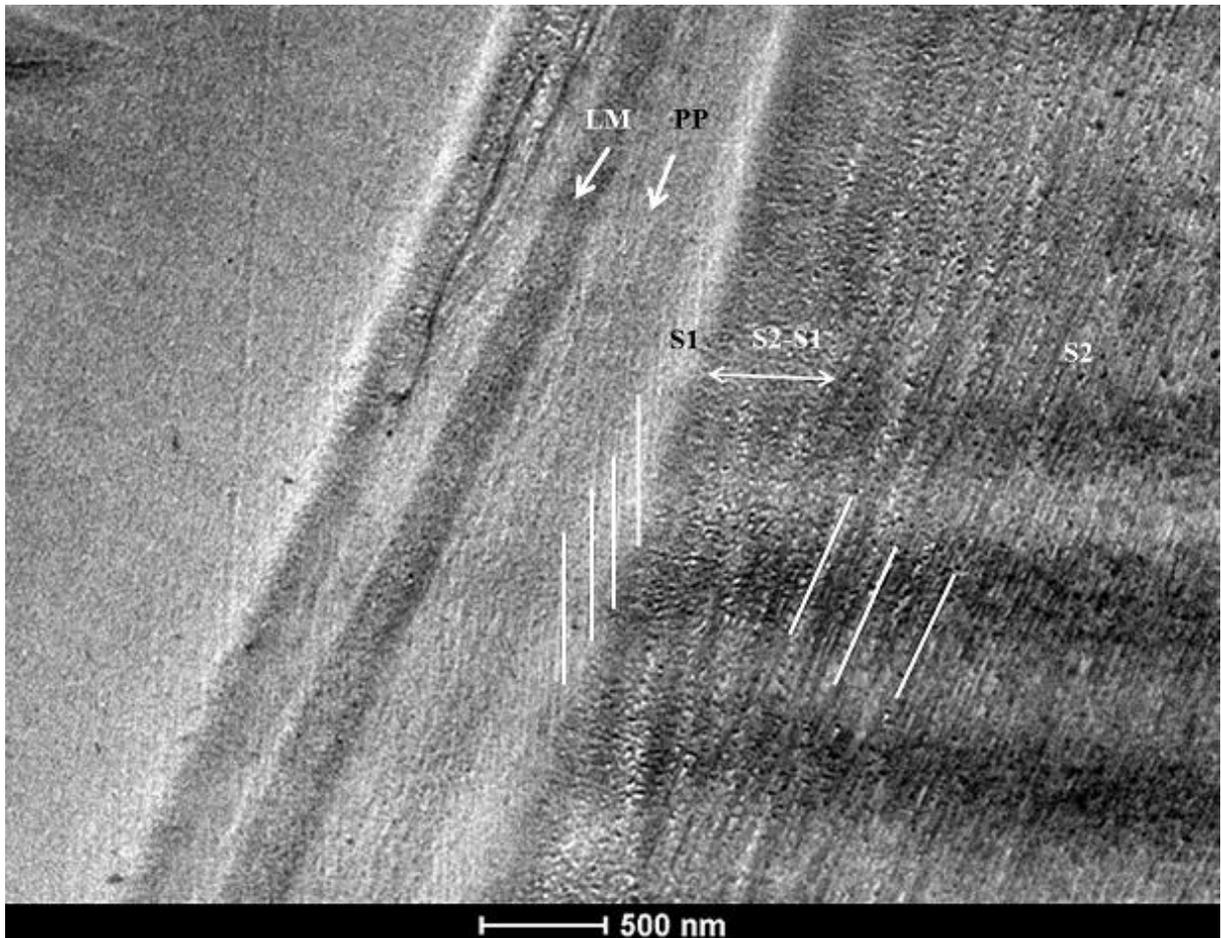
Ainda em relação à posição interna do lenho de tração foram identificadas na Figura 14, as camadas S2 e S1 da parede secundária e a zona de transição entre elas. O ângulo microfibrilar variou na S1 de 53° a 90°, na S2 de 7° e 23° e na S3 entre 64° e 87°. A camada S1 apresenta alto AMF (1), decrescentes em direção à zona de transição, até o momento que as microfibrilas sofrem inflexão em sua direção (2), voltando a diminuir até as posições mais externas da camada S2 (8).

Figura 14 - Imagem de microscopia eletrônica de transmissão da região interna do lenho de tração de *E. grandis*. S2-S1- camada de transição.



Na região externa do lenho de tração (FIGURA 15), não foi possível a visualização e identificação da camada S3. Foram identificadas as camadas S1, S2, a transição S1-S2, a lamela média e a parede primaria. A camada S2 apresenta pequena inclinação do ângulo em relação ao eixo da célula, com valor do AMF variando de 0° a 11°, enquanto que na S1 as microfibrilas encontram-se com grande inclinação e AMF entre 20° a 34°.

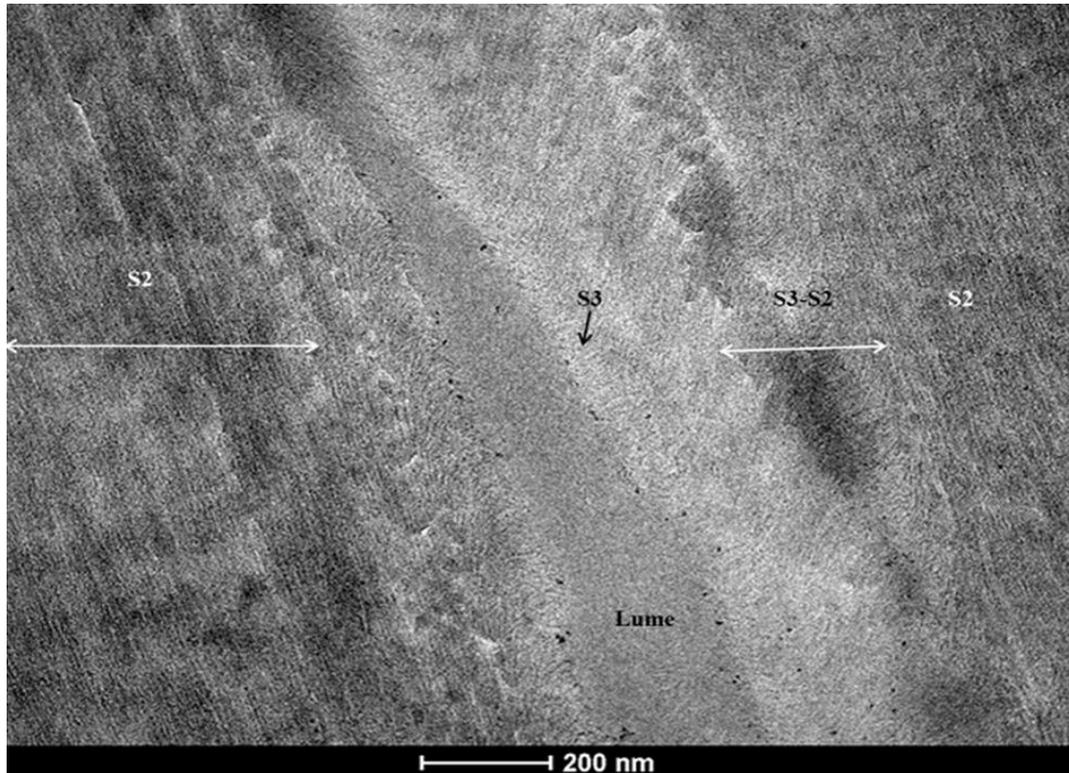
Figura 15- Imagem de microscopia eletrônica de transmissão da região externa do lenho de tração de *E. grandis*. As camadas foram diferenciadas pela tonalidade de cinza. LM- lamela média, PP- parede primaria.



No lenho oposto foram identificadas as camadas S1, S2 e S3 pelo direcionamento das microfibrilas e o lume da célula (FIGURA 16). A lamela média não está evidente na imagem. Pode ser observado que nas camadas S1 e S3 que o ângulo microfibrilar é alto. Para os valores do AMF acima de 90° foi feita inversão da inclinação, sendo o AMF destrógiro ou levógiro.

Os valores do AMF na região interna do lenho oposto foram de 50° a 79° na S1, entre 14° e 27° na S2 e 39° a 88° para a S3. Na posição externa esses valores foram de 46° a 86° na S1, 15° a 30° na S2 e para a S3 variou entre 46° e 71° .

Figura 16 - Imagem de microscopia eletrônica de transmissão do lenho oposto de *E. grandis*. S2-S3 – região de transição entre as camadas. Camadas diferenciadas pelo direcionamento da microfibrila.

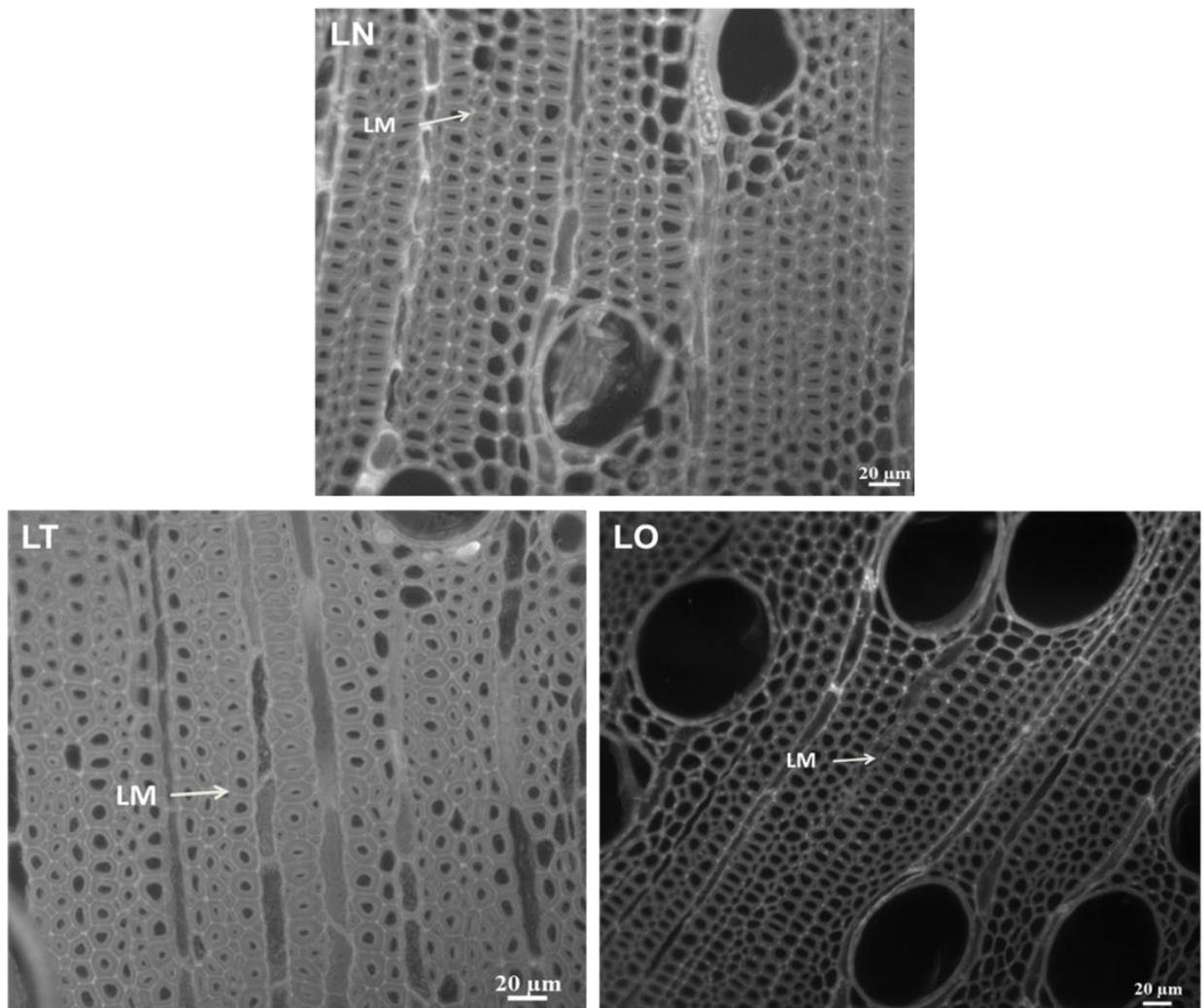


Nos três lenhos estudados foram identificadas as camadas S1, S2 e S3. Foi possível visualizar o lume da célula e lamela média. Com os valores dos AMF obtidos nota-se que houve variações dentro das camadas da parede celular, comportamento observado por Donaldson e Xu (2005), para traqueídes da madeira de *Pinus radiata* com 17 anos de idade.

5.3 Distribuição qualitativa da lignina - microscopia de epi-fluorescência

A microscopia de epi-fluorescência é uma técnica empregada para obtenção da distribuição qualitativa do conteúdo de lignina, através de imagens que proporcionam visualização direta dessa distribuição nas camadas da parede celular. A lignina possui autofluorescência natural e a intensidade de fluorescência é proporcional à sua concentração. A Figura 17 mostra a intensidade de fluorescência da lignina em diferentes regiões da parede das fibras dos lenhos normal, de tração e oposto de *E. grandis*.

Figura 17- Imagem de microscopia de fluorescência das fibras do lenho normal, lenhos de tração e oposto de *Eucalyptus grandis*. A maior fluorescência na lamela média (LM) é indicada pelas setas brancas.



Legenda: Lenho normal (LN), lenho oposto (LO) e lenho de tração (LT) da madeira de *E. grandis*.

Na figura 17 pode ser observado que a espessura da parede celular da fibra do lenho de tração em algumas regiões é mais espessa e apresenta menor lume quando comparada com os lenhos oposto e normal. Pode ser observado também que o lenho de tração apresenta fibras mais achatadas comprimindo a região da lamela média ocorrendo menor concentração da lignina que é identificada pela menor intensidade de sinal. A maior intensidade de sinal, ou seja, a maior concentração de lignina pode ser observada no canto celular e na lamela média.

Esse achatamento das fibras no lenho de tração e a menor intensidade de fluorescência foram verificados em outros estudos realizados por Mizrachi et al. (2015) com clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus Urophylla* com quatro anos de idade, onde relataram que a madeira de tração possui anatomia diferenciada em relação ao lenho oposto. E essas

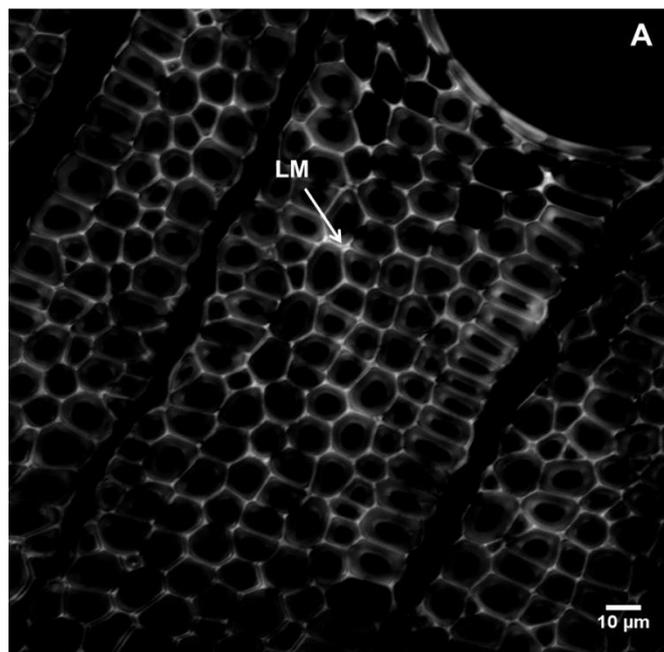
alterações relatadas no lenho de tração estão relacionadas a características das fibras que se apresentam mais longas e mais finas (Yoshizawa et al., 2000; Jourez et al., 2001), possuindo parede celular mais espessa e menor lume, quando comparado com o lenho normal ou oposto (Jourez et al., 2001; Ruelle et al., 2006).

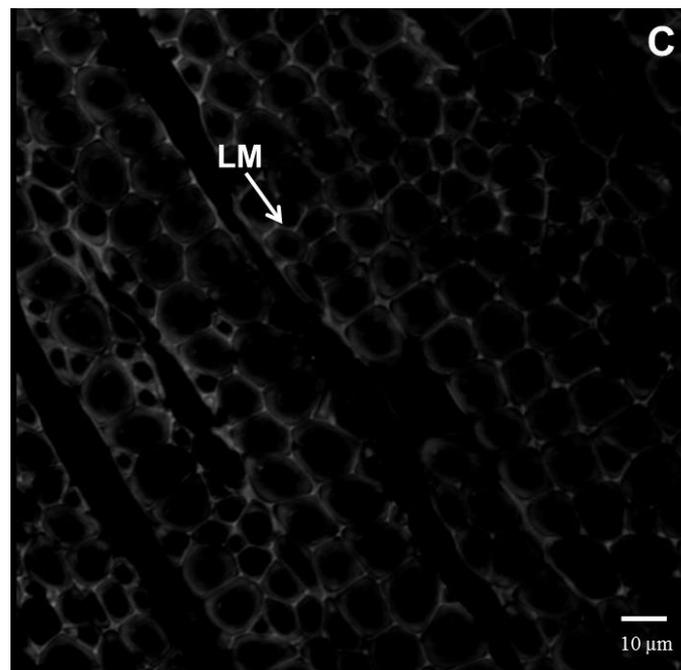
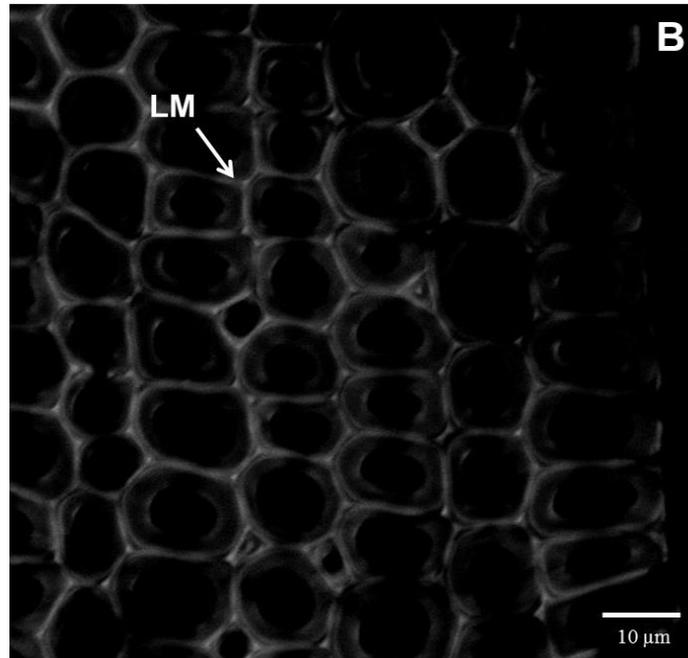
O lenho normal apresenta maior intensidade de fluorescência da lignina quando comparado com o lenho de reação, esse comportamento foi observado por Donaldson (2001) com *Populus nigra*, onde foi encontrado alto conteúdo de celulose e baixo conteúdo de lignina e formação de camada gelatinosa no lenho de tração.

5.4 Distribuição qualitativa e quantificação relativa da lignina - microscopia laser confocal

Nas imagens geradas pela microscopia laser confocal (FIGURA 18), é possível a visualização direta do conteúdo de lignina marcada com auramina, assim como ocorre na microscopia de fluorescência.

Figura 18- Imagem de fluorescência da lignina nos lenhos normal (A), lenho de tração (B) e lenho oposto (C) de *Eucalyptus grandis*. A lamela média (LM) indicada pela seta apresenta maior intensidade de fluorescência.





Legenda: LM = lamela média.

Analisando as imagens pode-se verificar que a maior intensidade do sinal, é encontrada na região da lamela média e canto celular dos lenhos, no entanto no lenho de tração “B”, essa intensidade do sinal é reduzida.

Através da fluorescência não foi possível à visualização da camada G. Qiu et al. (2008) e Ruelle et al. (2010) dizem que nem sempre é encontrada a camada G no lenho de tração, e que pode variar entre e dentro das árvores das espécies de angiosperma.

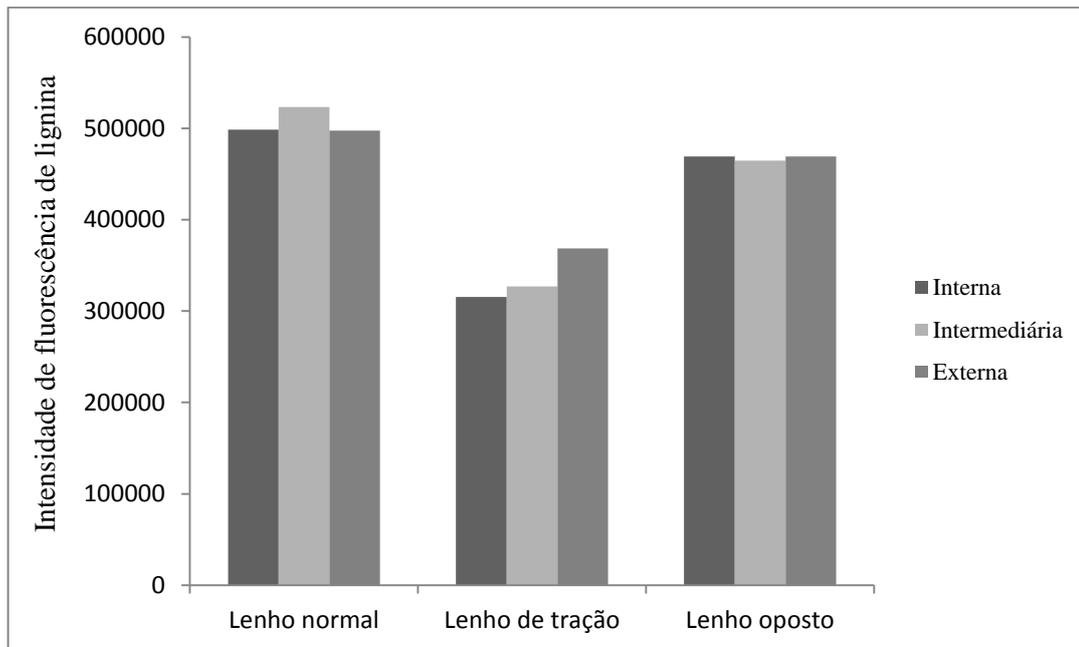
Pode ser observado também no lenho de tração o achatamento das células em algumas regiões. Segundo Bowling & Vaughn (2008), os vasos e as fibras são geralmente mais compactos no lenho de tração, fazendo com que a lamela média possua menor superfície, com isso tendo menor concentração de lignina.

Gierlinger e Schwanninger (2006), em estudo com as espécies *Populus nigra* e *Populus deltoids*, através da microscopia confocal identificaram, pela intensidade de lignina, através das camadas da parede celular, que o teor de lignina diminui quase para zero dentro da camada G.

A quantificação da distribuição de lignina nas posições interna, intermediária e externa para os lenhos normal, de tração e oposto foi realizada nas imagens de fluorescência obtidas por microscopia confocal.

Na Figura 19, são apresentados os valores médios de intensidade da lignina nas diferentes posições para cada lenho. Houve diferença significativa ao nível de 1%, para a intensidade do sinal (concentração de lignina) entre os lenhos. Entre posições não foi encontrada diferença estatística.

Figura 19 – Variação medula-casca da intensidade de fluorescência de lignina marcada por auramina para os lenhos normal, de tração e oposto da madeira de *E. grandis*.



O lenho de tração apresentou menor média de intensidade em comparação com os lenhos normal e oposto. A menor intensidade de brilho encontrada no lenho de tração pode estar associada ao menor conteúdo de lignina nas regiões onde as células encontram-se achatadas e muito juntas, comprimindo e diminuindo a região da lamela média e o canto celular. A intensidade do sinal no lenho de tração foi 40% menor em relação ao lenho normal. Estudo realizado por Mizrahi et al. (2015), com clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* com 4 anos de idade, identificou redução de 30% no teor de lignina no lenho de tração.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos para madeira de *Eucalyptus grandis* pode-se concluir que:

Houve decréscimo do AMF no sentido medula - casca de 11,6° para 7,2° no lenho normal e de 7,2° para 4,7° no lenho de reação, verificando-se diferença estatística do ângulo microfibrilar entre os lenhos normal e de reação e entre as árvores estudadas.

O lenho de tração apresentou menor ângulo microfibrilar médio (5,4°), em relação ao lenho normal.

As regiões da parede celular: lamela média, parede primária, camadas S1, S2 e S3 e o lume da célula foram identificadas pela diferenciação de tons de cinza presentes na imagem de microscopia eletrônica de transmissão.

As camadas S1, S2 e S3 e a transição entre elas também foram identificadas pela orientação das microfibrilas de celulose.

Houve grande variação do ângulo microfibrilar de 4° a 70°, dentro e entre as camadas. A camada S2 apresentou menor ângulo em relação às camadas S1 e S3 e foi observada a diminuição do AMF da região da medula para a casca na camada S2 de 9° a 20° para o lenho normal e de 4° a 18° para o lenho de reação.

A camada S2 apresentou espessura da parede celular variando de 2,5 a 4,5µm e as demais camadas de 0 a 1µm.

Os AMF encontrados no lenho de tração para a camada S2 entre 4° e 12° foram próximos ao ângulo médio, entre 5° a 7°, da parede celular pela técnica de microscopia de luz polarizada. Já para o lenho normal e oposto estes valores foram maiores nas camadas S2 do que o valor encontrado para o ângulo médio.

O lenho de tração apresentou menor intensidade de fluorescência da lignina em relação aos lenho normal e oposto. Foram notadas que em algumas regiões do lenho de tração as células apresentaram achatamento e diminuição da lamela média.

Não houve diferença estatística para a intensidade de fluorescência da lignina na região da medula para a casca.

Nos três lenhos analisados, as regiões da lamela média e do canto celular apresentaram maior intensidade de fluorescência da lignina.

7 REFERÊNCIAS

- BARNETT, J.R. & BONHAM, V.A. Cellulose microfibril angle in the cell wall of wood fibres. **Biological Reviews** 79: 461–472, 2004.
- BENDTSEN, B. A.; J. SENFT, J. Mechanical and anatomical properties in individual growth rings of plantation-grown eastern cottonwood and loblolly pine. **Wood Fibre Science**. 18: 23–38, 1968.
- BERGANDER, A.; BRANDSTROM, J.; DANIEL, G.; SALMEN, L. Fibril angle variability in earlywood of Norway spruce using soft rot cavities and polarisation confocal microscopy. **Journal Wood Science**.48:255–263, 2002.
- BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. Botanical microtechnique and cytochemistry. **Arnes**: Iowa, State University, 326p., 1976.
- BOOKER, R. E. The importance of the S3 cell wall layer in collapse prevention and wood hardness. In: **24th Forest Products Research Conference**. CSIRO Division of Forest Products, Clayton, Victoria, Australia 3/17. Pp. 1–13, 1993.
- BOOKER, R. E.; SELL, J. The nanostructure of the cell wall of softwoods and its functions in a living tree. **Holz als Roh Werkstoff** 56:1–8, 1998.
- BOYD, J. D. Relationships between fibre morphology, growth strains and physical properties of wood. **Australian Forest Research**. 10: 337-360, 1980.
- BOWLING, A. J.; VAUGHN, K. C. Immunocytochemical characterization of tension wood: gelatinous fibers contain more than just cellulose. **American Journal of Botany**, 95(6): 655-663, 2008.
- BRANDSTROM, J. BARDAGE, S.L.; DANIEL, G.; NILSSON, T. The structural organisation of the S1 cell wall layer of Norway spruce tracheids. **IAWA J** 24:27–40, 2003.
- CAVE, I. D. The anisotropic elasticity of the plant cell wall. **Wood Science Technology**. 2: 268–278, 1968.
- CAVE, I. D.; WALKER, J. C. F. Stiffness of wood in fast-grown plantation softwoods: The influence of microfibril angle. **Forest Products Journal**. 44: 43–48, 1994.
- CLAIR, B.; RUELLE, J. BEAUCHÊNE, J. PRÉVOST MF, FOURNIER M. Tension wood and opposite wood in 21 tropical rain forest species: occurrence and efficiency of the G-layer. **International Association of Wood Anatomists Journal**. 27(3): 329-338, 2006b.
- CLAIR, B.; ALMÉRAS, T.; PILATE, G.; JULLIEN, D.; SUGIYAMA, J.; RIEKEL, C. Maturation stress generation in poplar tension wood studied by synchrotron radiation microdiffraction. **Plant Physiology**, 155: 562–570, 2011.

CORTEZ, L. A. B.; LORA, E. E. S.; GÓMEZ, E. O. Biomassa para energia. Campinas, SP: **Editora Unicamp**, p.734, 2008.

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

DONALDSON, L. Microfibril angle: measurement, variation and Relationships – a review. **IWA Journal**, Vol. 29 (4), 345–386, 2008.

DONALDSON, L. A.; XU, P. Microfibril orientation across the secondary cell wall of radiate pine tracheids. **Trees**, 19: 644–653, 2005.

DONALDSON, L. A. Lignification and lignin topochemistry – an ultrastructural view. **Phytochemistry**, 57(6): 859–873, 2001.

DOWNES, G.; EVANS, R.; WIMMER, R.; FRENCH, J.; FARRINGTON, A.; LOCK, P. Wood, pulp and handsheet relationships in plantation grown *Eucalyptus globulus*. **Appita Journal**. 56: 221–228, 2003.

EVANS, R.; STRINGER, S.; KIBBLEWHITE, R. P. Variation of microfibril angle, density and fibre orientation in twenty-nine *Eucalyptus nitens* trees. **Appita Journal**. 53: 450–457, 2000.

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**, Vol. 199, 1201–1211, 2015.

FERREIRA, S.; LIMA, J. T.; TRUGILHO, P. F.; MONTEIRO, T. C. Excentricidade da medula em caules de clones de *Eucalyptus* cultivados em diferentes topografias. **Cerne**, v14, 335-340, 2008.

FISHER, J.B.; STEVENSON, J.W. Occurrence of reaction wood in branches of dicotyledons and its role in tree architecture. **Botanical Gazette**, 142:82–95, 1981.

FRANKLIN, G. L. Preparation of thin sections of synthetic resins and wood-resin composites, and a new macerating method for wood. **Nature**, 155 (3924): 51, 1945.

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

FUJINO, T.; ITOH, T. Changes in the three dimensional architecture of the cell wall during lignification of xylem cells in *Eucalyptus tereticornis*. **Holzforschung**, 52, 111–116, 1998.

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

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

GREEN, D. W.; WINANDY, J. E.; KRETSCHMANN, D. E. Mechanical Properties of Wood. In: **Wood handbook - Wood as an engineering material**. Gen.Tech. Rep. FPL–GTR–113. Madison, W. I.: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory, Cap 4, 1-45, 1999.

GROOVER, A. T. What genes make a tree a tree? **Trends in Plant Science**, v. 10, p. 211-214, 2005.

HEIN, P. R. G.; LIMA, J. T. Relationships between microfibril angle, modulus of elasticity and compressive strength in *eucalyptus* wood. **Maderas**. 14(3): 267-274, 2012.

HARRIS, J. M.; MEYLAN, B. A. The influence of microfibril angle on longitudinal and tangential shrinkage in *Pinus radiata*. **Holzforschung**. 19: 144–153, 1965.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 10–18, 2008.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, H. M.; CHANONA-PÉREZ, J. J.; CALDERÓN-DOMÍNGUEZ, G.; PEREA-FLORES, M. J.; MENDOZA-PÉREZ, J. A.; VEGA, A.; LIGERO, P.; PALACIOS-GONZÁLEZ, E.; FARRERA-REBOLLO, R. Evaluation of Agave Fiber Delignification by Means of Microscopy Techniques and Image Analysis. **Microscopy. Microanalysis**. 20: 1436–1446, 2014.

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

KUTSCHA, N.P.; MCORMOND, R. R. The Suitability of Using Fluorescence Microscopy for Studying Lignification in Balsam Fir, Life Sciences Agriculture Experiment Station, University of Maine, Orono, **Technical Bulletin**, vol. 62. 1972.

LEWIS, N. G.; SARKANEN, S. Lignin and lignin Biosynthesis. In: Lignin and Lignan Biosynthesis; Lewis, N., et al.; ACS Symposium Series; **American Chemical Society**: Washington, DC, p. 1-27, 1998.

LIMA, J. T.; RIBEIRO, A. O.; NARCISO, C. R. P. Microfibril angle of *eucalyptus grandis* wood in relation to the cambial age. **Maderas**. Ciencia y tecnología 16(4): 487 - 494, 2014.

LIMA, J. T.; BREESE, M. C.; CAHALAN, C. M. Variation in microfibril angle in *Eucalyptus* clones. **Holzforschung**, 58: 160-166, 2004.

MEDHURST, J.; DOWNES, G.; OTTENSCHLAEGER, M.; HARWOOD, C.; EVANS, R.; BEADLE, C. Intra-specific competition and the radial development of wood density, microfibril angle and modulus of elasticity in plantation-grown *Eucalyptus nitens*. **Trees**, Vol 26, 1771–1780, 2012.

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

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

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

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673–686, 2005.

MÜLLER, M.; CZIHAK, C.; VOGL, G.; FRATZL, P.;SCHOBER, H.; RIEKEL, C. Direct observation of microfibril arrangement in a single native cellulose fibre by microbeam small-angle X-ray scattering. **Macromolecules** 31: 3953–3957, 1998.

OLIVEIRA, G. L. **Topoquímica e abordagem sobre a estrutura e a conectividade lignina-fenol-parede celular em *Euterpe oleracea* Mart. (Arecaceae)**. 2013. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais). Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

PAGE, D. H.; EL-HOSSEINY, F. The birefringence of wood pulp fibres and the thickness of S1 and S3 layers. **Wood Fibre**, 6: 186–192, 1974.

PAGE, D. H.; EL-HOSSEINY, F.; WINKLER, K.; BAIN, R. The mechanical properties of singlewood pulp fibres. Part 1: A new approach. **Pulp Pap. Mag.** Canada 73: 72–77, 1972.

PANSHIN, A. J.; DE ZEEUW, C. Structure, identification, properties and uses of the commercial woods of the U.S. and Canadá. **Text Book of Wood Technology**, 722 p, 1980.

PLOMION, C.; PIONNEU, C.; BAILLERES, H. Analysis of protein expression along the normal to tension wood gradient in *Eucalyptus dunnii*. **Holzforschung**. Berlin, v. 57, n.4, p. 353-358, 2003.

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

- REIS, D.; VIAN, B. Helicoidal pattern in secondary cell walls and possible role of xylansin their construction. **CR Biol.** 327: 785–790, 2004.
- RUELLE, J.; BEAUCHÊNE, J.; YAMAMOTO, H.; THIBAUT, B. Variations in physical and mechanical properties between tension and opposite wood from three tropical rainforest species. **Wood Science and Technology**, 45: 339-537, 2010.
- RUELLE, J.; YOSHIDA, M.; CLAIR, B.; THIBAUT, B. Peculiar tension wood structure in *Laetia procera* (Poepp.) Eichl. (Flacourtiaceae). **Trees**, 21: 345–355, 2007.
- RUELLE, J.; CLAIR, B.; BEAUCHÊNE, N.E. J.; PRÉVOST, M.F.; FOURNIER, M. Tension wood and opposite wood in 21 tropical rain forest species 2. Comparison of some anatomical and ultrastructural criteria. **IAWA Journal**, 27: 341–376, 2006.
- SARÉN, M.P.; SERIMA, A. R.; ANDERSSON, SARANPA P. S.; KECKES A. J.; FRATZL, P. Effect of growth rate on mean microfibril angle and cross-sectional shape of tracheids of Norway spruce. **Trees** 18: 354–362. 2004.
- SIMPSON, W.; TENWOLDE, A. Physical Properties and Moisture Relations of Wood. In: **Wood handbook - Wood as an engineering material**. Gen. Tech. Rep. FPL–GTR–113. Madison, WI: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory, Cap 3, 1-24, 1999.
- WARDROP, A. B. The reaction anatomy of arborescent angiosperms. In the formation of wood in forest trees. Academic Press, New York. Pp 404-456, 1964.
- WARDROP, A. B. The organisation and properties of the outer layer of the secondary wall in conifer tracheids. **Holzforschung**. 11:102–110,1957.
- WARDROP, A. B.; PRESTON, R. D. Organisation of the cell walls of tracheids and wood fibres. **Nature**, 160: 911–913, 1947.
- WASHUSEN, R.; EVANS, R.; SOUTHERTON, S. A study of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus globulus* branch wood microstructure. **Iawa Journal** 26: 203–210, 2005.
- WASHUSEN, R.; ILIC, J.; WAUGH, G. The relationship between longitudinal growth strain, tree form and tension wood at the stem periphery of ten- to eleven-year-old *Eucalyptus globulus* labill. **Holzforschung** 57: 308–316, 2003.
- YOSHINAGA, A.; KUSUMOTO, H.; LAURANS, F.; PILATE, G.; TAKABE, K. Lignifications in poplar tension wood lignified cell wall layers. **Tree Physiology**, 32:1129–1136, 2012.
- YOSHIZAWA, N.; INAMI, A.; MIYAKE, S.; ISHIGURI, F.; YOKOTA S. Anatomy and lignin distribution of reaction wood in two *Magnolia species*. **Wood Science and Technology** 34: 183–196, 2000.
- ZHE, JI.; JIAN-FENG, MA.; ZHI-HENG, Z.; FENG XU; RUN-CANG SUN. Distribution of lignin and cellulose in compression wood tracheids of *Pinus yunnanensis* determined by fluorescence microscopy and confocal Raman microscopy. **Industrial Crops and Products**. 47: 212-217, 2013.