UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CLAUDIA ALVES DA SILVA

ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DA MADEIRA DE *Caesalpinia echinata* Lam. (PAU-BRASIL): SUBSÍDIOS PARA O ENTENDIMENTO DE SUA ESTRUTURA E RESISTÊNCIA A ORGANISMOS XILÓFAGOS

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Biologia Celular e Estrutural, na área de Biologia Celular.

Orientador: Profa. Dra. Marcia Regina Braga

Campinas, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Si38a

Silva, Claudia Alves da
Análise da composição da madeira de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil): subsídios para o entendimento de sua estrutura e resistência a organismos xilófagos / Claudia Alves da Silva. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientadora: Márcia Regina Braga.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Biodegradação. 2. Lignina. 3. Pau Brasil. 4. Parede celular. I. Braga, Márcia Regina. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Wood composition analysis of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood): subsidies to understanding its structure and resistance to xilophagous organisms.
Palavras-chave em inglês: Biodegradation; Brazilwood; Cell wall; Lignin.
Área de concentração: Biologia Celular.
Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural.
Banca examinadora: Márcia Regina Braga, Ângelo Luiz Cortelazzo, André Ferraz, Dácio Roberto Matheus, Marilia de Moraes Castro.
Data da defesa: 26/01/2007.
Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 26 de janeiro de 2007.

BANCA EXAMINADORA

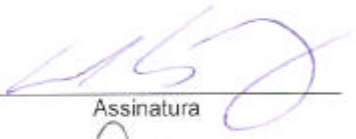
Profa. Dra. Márcia Regina Braga (Orientadora)

Assinatura

Profa. Dra. Adriane Maria Ferreira Milagres

Assinatura

Prof. Dr. André Luis Ferraz



Assinatura

Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo

Assinatura

Profa. Dra. Marília de Moraes Castro

Assinatura

Profa. Dra. Rita de Cássia Leone Figueiredo Ribeiro

Assinatura

Prof. Dr. Dácio Roberto Matheus

Assinatura

Profa. Dra. Edenise Segala Alves

Assinatura

"Não há pedra no caminho que não possa ser aproveitada para o próprio crescimento"

Anônimo

Aos meus grandes amores, Claudemir e Sarah,

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus. Certamente presente em todos os momentos.

Ao meu esposo Claudemir pelo incentivo e calma em todos os momentos, e acima de tudo, por sempre acreditar na minha capacidade.

À minha família, em especial a minha mãe, Marta, que sempre me apoiou apesar de nunca entender muito bem o que eu fazia.

À Dra. Marcia Regina Braga pela oportunidade, orientação criteriosa e paciência, principalmente nas etapas finais do trabalho.

À Dra. Rita de Cássia L. Figueiredo Ribeiro pela oportunidade de participar do Projeto Temático do Pau-brasil.

Ao Instituto de Botânica pela oportunidade de estagiar na Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

À Dra. Rita de Cássia L. Figueiredo-Ribeiro, Dra. Edenise Segala Alves e Dr. Dácio Roberto Matheus pelas sugestões da pré-banca.

À Dra. Solange Cristina Mazzoni-Viveiros pelo auxílio na preparação e análise do material por Microscopia de Luz, bem como na discussão dos resultados.

Ao Dr. Romualdo S. Fukushima, pelo estágio em seu departamento para aprender a técnica de extração de lignina.

Ao Dr. José Roberto Vieira de Melo, que gentilmente cedeu uma amostra de pau-brasil oriunda da Reserva Biológica do Pau-brasil (Ba).

Aos pesquisadores do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT, SP): Sérgio Brazolin, Beatriz B. Monteiro e Gonzalo A. C. Lopez pela condução dos ensaios

com organismos xilófagos e doação das ripas de pinus, eucalipto e angico-preto para as demais análises.

Ao Dr. Andreas A. Richter, pela condução das análises no GC/ MS.

À Dra. Maria Angela Machado de Carvalho pela revisão do Abstract.

À aluna Graziele de Souza Girardi, pelo auxílio no desdobro das madeiras.

Aos funcionários da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas: Mary, Ana Alice, Cida, Sirlei e Helena, pelo convívio e auxílio.

À secretária da pós-graduação Liliam Panagio, pela amizade e auxílio nos processos burocráticos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de doutoramento.

Aos amigos do Botânico: Kelly, Fernanda K., Fernanda M., Amanda Asega, Amanda Souza (Top), Amanda Souza, Tatiana, Vanessa, Marina, Ludmila, Simone, Juliana, Paola, Marcelino, Marília, Patrícia Pinho, Aline, Giovana, Clóvis, Fabio, Rosana, Fabiano, Rodrigo, Eduardo Longui, pelo companheirismo e momentos de descontração.

Aos amigos do Belém: Patrícia, Wilma, Débora, Miriam, Jesiel, Francisco, pela torcida, amizade sincera e apoio espiritual.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

Resumo..... **ix**

Abstract..... **xi**

Introdução..... **01**

1. Estrutura e composição química da madeira..... 02

1.1. Estrutura..... 02

1.2. Composição química..... 04

2. Biodeterioração da madeira..... 20

3. Pau-brasil..... 24

4. Outras madeiras estudadas..... 27

4.1. Angico-preto..... 27

4.2. Eucalipto..... 28

4.3. Pinus..... 29

Objetivos..... **30**

Material e Métodos..... **31**

1. Material Biológico..... 31

2. Metodologia..... 33

2.1. Preparação das amostras..... 33

2.2. Análises anatômicas e microquímicas..... 33

2.3. Obtenção dos extrativos..... 34

2.4. Extração, fracionamento e análise de polissacarídeos da parede celular.. 36

2.5. Extração e quantificação de ligninas..... 38

2.6. Ensaios de biodeterioração por organismos xilófagos..... 39

2.7. Análise estatística..... 43

Resultados..... 44

1. Teor de extrativos e presença de açúcares álcoois..... 44

2. Conteúdo de lignina..... 47

3. Rendimento e composição de polissacarídeos da parede celular..... 57

4. Biodeterioração da madeira..... 65

Discussão..... 72

1. Extrativos e resistência da madeira à degradação..... 72

2. Lignina e a durabilidade de madeiras..... 78

3. Parede celular e a resistência à biodeterioração..... 84

Conclusão..... 89

Referências bibliográficas..... 90

Anexo..... 103

RESUMO

Neste trabalho, a madeira de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) oriunda da Reserva Biológica da Estação Experimental de Moji-Guaçu (SP) foi analisada quanto ao teor e composição de extrativos, lignina, polissacarídeos de parede celular e resistência a organismos xilófagos e comparada com as madeiras de *Anadenathera macrocarpa* (Benth.) Brenae (angico-preto), *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden (eucalipto) e *Pinus elliottii* (Warm.) Engelm (pinus). Os extrativos obtidos em etanol foram encontrados em maior teor no cerne de *C. echinata* quando comparado às demais madeiras. A análise dos extrativos quanto ao teor e composição de ciclitóis revelou que o alburno de *C. echinata* e os cernes de *E. grandis* e *A. macrocarpa* apresentaram os maiores conteúdos desses açúcares, com predomínio de pinitol em *C. echinata* e *A. macrocarpa*. Nos ensaios de laboratório com cupins-de-madeira-seca foi observado que o cerne de *C. echinata* sofreu o menor desgaste, ocasionando maior mortalidade desses insetos, possivelmente devido às substâncias tóxicas presentes nos extrativos. Nos ensaios com os fungos causadores de podridões, o cerne de *C. echinata* sofreu perda de massa inferior a 3%, sendo similar àquele de *A. macrocarpa*, conhecido por sua alta resistência, o que confirma a elevada durabilidade natural de *C. echinata*. O perfil de degradação das madeiras pelos fungos evidenciou a redução preferencial de xilose nas angiospermas e manose em *P. elliottii*. Em relação ao teor de lignina, o alburno e o cerne de *C. echinata* não apresentaram diferenças quantitativas, sendo os valores semelhantes aos observados para *E. grandis*. Das

análises microquímicas por microscopia de luz, após reação Maüle, constatou-se padrão de coloração do lenho de *C. echinata* semelhante ao de *A. macrocarpa*, com predomínio de lignina do tipo siringil nas paredes secundárias da fibra e lignina do tipo guaiacil nas paredes do elemento de vaso. A análise da composição da parede celular mostrou que a madeira de *C. echinata* difere das demais madeiras na composição de pectinas e no teor de hemiceluloses, sendo, entretanto, a composição desta fração similar à apresentada por *E. grandis* e *A. macrocarpa*.

Em resumo, os resultados obtidos neste trabalho mostram que a madeira de pau-brasil, analisada sob diferentes aspectos e comparada com madeiras comerciais de alta e baixa resistência a organismos xilófagos, possui semelhanças com a madeira de alta resistência, podendo ser considerada de alta durabilidade natural e sugerindo desempenho comercial semelhante. Não foi possível, no entanto, atribuir essa característica a um fator isolado, uma vez que a resistência é conseqüência da interação dos vários componentes na madeira. Considerando-se que o pau-brasil encontra-se na lista do IBAMA de espécies ameaçadas de extinção, sua indicação para usos múltiplos deve ser cuidadosamente avaliada.

Palavras-chave: biodegradação, lignina, parede celular, pau-brasil.

ABSTRACT

In the present work, the wood of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood) from the Biological Preserve and Experimental Station of Moji-Guaçu (SP) was analyzed in respect to the content and composition of extractives, lignin, cell wall polysaccharides and resistance to xylophagous organisms, and compared with woods of *Anadenathera macrocarp*a (Benth.) Brenae (angico-preto), *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden (eucalipto) and *Pinus elliottii* (Warm.) Engelm (pinus). The extraction of wood extractives using ethanol showed that heartwood of *C. echinata* presents high content of extractives when compared to the other woods. Extractives from the sapwood of *C. echinata* and heartwoods of *E. grandis* and *A. macrocarpa* presented the highest contents of cyclitols, with the predominance of pinitol in *C. echinata* and *A. macrocarpa*. Decay assays revealed that the heartwood of *C. echinata* was less attacked by termites, leading to the highest insect mortality, possibly due the toxic activity of its extractives. In the fungal assays, the heartwood of *C. echinata* presented weight loss values lower than 3%, confirming its high natural durability; weight loss was similar that of *A. macrocarpa*, which is well known for presenting high resistance to fungal attack. The degradation profile indicated the preferential decrease of xylose in angiosperm woods and mannose in *P. elliottii*. No differences in the lignin content were observed in the sapwood and heartwood of *C. echinata*, and the heartwood of *E. grandis*. After Maüle reaction, similar lignin staining was observed in *C. echinata* and *A. macrocarpa*, with predominance of syringil-type lignin in the fiber walls and

guayacil-type lignin in the secondary wall of the vessel elements. Cell wall analysis showed that the wood of *C. echinata* differs from other woods in pectin composition and hemiceluloses content, although the composition of the latter fraction was similar to that of *E. gradis* and *A. macrocarpa*.

In conclusion, the results showed that the wood of *C. echinata*, analyzed under different aspects and compared with commercial woods, has similarities with the wood of high resistance, and may be considered of high natural durability. However, its resistance can not be attributed to one single feature, but certainly it is a consequence of the interaction of several wood components. Considering that brazilwood was included in the IBAMA list of plant species in risk of extinction, the use of its wood for multiple purposes has to be carefully evaluated.

Key words: biodegradation, brazilwood, cell wall, lignin.

INTRODUÇÃO

A madeira é um produto de grande importância para o comércio mundial. Ao longo do desenvolvimento da civilização, madeiras que possuem propriedades como elevada resistência à decomposição por agentes físicos, químicos ou biológicos, bom isolamento térmico e elétrico, além de serem encontradas na natureza com ampla faixa de texturas e colorações, foram sendo selecionadas para usos específicos. Atualmente, vastas quantidades de madeira são utilizadas como combustível, fibras (para polpa e produtos de papel), assoalhos, construções e mobiliário, entre outros. A versatilidade da madeira é demonstrada pela grande variedade de produtos dela derivados, e que são o resultado de seu amplo e variável espectro de características. Na maioria das vezes, mais do que uma característica da madeira é relevante para o seu uso na elaboração de um produto final (Simpson & TenWolde 1999). A durabilidade ou resistência da madeira, seja mecânica ou química, é imprescindível para determinados usos econômicos (Lepage 1986). Apesar da importância econômica da madeira, os processos que levam ao seu desenvolvimento e muitos de seus aspectos bioquímicos e moleculares são ainda pouco conhecidos (Plomion *et al.* 2001).

1. ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA MADEIRA

1.1. ESTRUTURA

A madeira, também chamada de lenho ou xilema secundário, é constituída de um conjunto heterogêneo de células, com propriedades específicas, que variam devido, principalmente, a fatores genéticos e ambientais (Silva & Trugilho 2003). A madeira é composta por três tipos celulares que são especializados para desempenhar funções como: condução de seiva, transformação, armazenamento e transporte de substâncias nutritivas, além da sustentação do vegetal. As características celulares e o modo como as células estão associadas afetam as propriedades da madeira (Miller 1999)

Dois grupos vegetais são conhecidos por produzirem madeiras: as gimnospermas e angiospermas (Miller 1999). As diferenças fundamentais desses grupos devem-se a tipos, tamanhos, proporções e arranjo das diferentes células que as compõem. Gimnospermas têm, microscopicamente, uma constituição anatômica mais simples e menos especializada que as angiospermas, com a presença de dois tipos celulares e pequena variação estrutural entre essas células. As angiospermas, por sua vez, possuem estrutura mais complexa com um grande número de tipos celulares e maior grau de variabilidade entre eles (Wiedenhoeft & Miller 2005).

As gimnospermas são compostas principalmente por traqueídes e parênquima radial, sendo o parênquima axial pouco presente (Burger & Richter 1991). As traqueídes, que representam os maiores componentes dessas madeiras (até 95% do volume), são células imperfuradas, alongadas e estreitas. Desempenham a função de condução e sustentação no lenho. As células do parênquima axial (quando presente) e radial são similares em tamanho e forma, mas este último possui as funções de síntese, estoque e transporte de compostos e, em menor escala, de água (Wiedenhoeft & Miller 2005).

As angiospermas, por sua vez, são comumente compostas de elementos de vaso, fibras e parênquimas axial e radial (Burger & Richter 1991). A condução ascendente de seiva em sua madeira é feita através de elementos traqueais sobrepostos, que possuem paredes espessadas. O armazenamento de substâncias é feito principalmente no parênquima axial. Quando comparadas aos elementos de vaso, as células do parênquima apresentam paredes mais finas e dimensões menores. As funções de armazenamento, transformação e condução transversal de substâncias nutritivas são realizadas pelo parênquima radial. Além disso, a madeira das angiospermas também é formada por fibras, que são células alongadas com extremidades afiladas e paredes que variam quanto à espessura e que constituem cerca de 20 a 80% de seu lenho. Distribuem-se longitudinalmente no tronco e desempenham primordialmente a função de sustentação (Burger & Richter 1991).

Em angiospermas, o tronco apresenta do centro para a periferia, respectivamente, a medula, o cerne, o alburno e a casca. O alburno é a região do xilema que conduz água e sais minerais, armazena substâncias de reserva e colabora na sustentação (Wiedenhoeft & Miller 2005). O cerne, por sua vez, é a região do xilema que não mais conduz água e íons minerais e não armazena substâncias de reserva, mas ainda mantém as funções de sustentação e de defesa química. A transformação do alburno em cerne, chamada por alguns autores de cernificação, é geralmente acompanhada pelo aumento no conteúdo de extrativos, substâncias comumente armazenadas pelo cerne e que são conhecidas por contribuir para a durabilidade natural das madeiras. Os extrativos escurecem o cerne dando a ele uma cor característica, que é variável nas diferentes madeiras e conferem maior resistência à biodeterioração (Miller 1999). Durante a cernificação também ocorre a morte das células do parênquima radial, consumo de amido, consumo de oxigênio e liberação de gás carbônico (Silva & Trugilho 2003). Nem sempre o cerne se distingue do alburno por uma coloração mais intensa, apesar de ser fisiologicamente diferente. Neste caso, é chamado de

"cerne fisiológico". A proporção entre cerne e alburno pode variar dentro da própria árvore, dependendo da espécie, idade, local, solo e clima (Burger & Richter 1991).

O alburno e o cerne possuem diferenças marcantes que podem ser interessantes ou não, e que são levadas em consideração de acordo com a utilização que se pretende dar a cada um deles. As diferenças mais importantes são: a) o cerne contém mais compostos fenólicos e ácidos que o alburno; b) a lignina presente no cerne é mais condensada e possui peso molecular mais elevado; c) o cerne apresenta menor teor de umidade porque é um tecido sem atividade fisiológica; e o cerne é menos permeável e com células mais compactadas que o alburno. Tais diferenças fazem com que o alburno e o cerne tenham comportamento diferenciado, tanto do ponto de vista físico, quanto químico e estrutural (Silva & Trugilho 2003).

1.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA

1.2.1. EXTRATIVOS

Como o próprio nome indica, extrativos são substâncias que podem ser removidas da madeira pela extração com solventes como água, álcool, acetona, benzeno, entre outros (Miller 1999). Nessa categoria estão incluídos os fenóis, terpenos, resinas, graxas, taninos, óleos essenciais, e ceras, etc. Esses compostos estão presentes como monômeros, dímeros ou polímeros (Wiedenhoeft & Miller 2005). Encontrados em gimnospermas e angiospermas, os extrativos geralmente estão localizados no cerne e conferem propriedades como cheiro, cor, gosto e algumas vezes apresentam atividades inibidoras ou tóxicas, servindo como preservantes naturais ao ataque de insetos ou à colonização e deterioração por fungos (Schultz & Nicholas 2000, Lelis *et al*. 2001). O grau de resistência da madeira a organismos xilófagos (alto, médio ou baixo), segundo Lelis *et al*. (2001), está intimamente relacionado à quantidade e à qualidade dos

extrativos. Dependendo da espécie, das condições de crescimento e da idade da árvore, os extrativos podem constituir de 5 a 30% da madeira (Miller 1999).

Madeiras tropicais têm sido analisadas quanto ao teor de seus extrativos, porém poucos são os relatos nos quais a eficácia dessas substâncias na proteção é testada através da extração e impregnação de outras madeiras. Onuorah (2000) cita que os extrativos presentes em *Cassia fistula* e *Afzelia* sp., ambas pertencentes à família Fabaceae, possuem atividade inibidora contra fungos e insetos e caracteriza suas madeiras como muito duráveis. Este mesmo autor, analisando o efeito da impregnação de extrativos de angiospermas em gimnospermas, verificou a eficácia dos extrativos na inibição do ataque fúngico. Schultz *et al.* (1995, citado por Schultz & Nicholas 2000) estudando o papel de alguns extrativos, principalmente da classe dos estilbenos, na durabilidade natural de algumas madeiras de angiospermas, constataram que essas substâncias têm ação fungicida menos potente quando comparadas aos biocidas comerciais. Em outro estudo, esses mesmos autores sugeriram que os extrativos possuem uma dupla função na madeira, atuando como fungicida e antioxidante. Esta função antioxidante estaria relacionada ao fato de que, no processo inicial de deterioração da madeira por fungos de podridão parda e branca, há a liberação de radicais livres que afetam a parede celular, facilitando a colonização por esses microrganismos (Schultz *et al*. 1998 citado por Schultz & Nicholas 2000).

Historicamente, o primeiro extrativo comercializado para fins de tingimento foi o extraído de *Caesalpinia sappan* (Fabaceae), espécie vinda do oriente, a partir do século XII. Mas foi de uma árvore nativa do Brasil conhecida como *C. echinata* Lam. (pau-brasil) que os índios extraíam uma tinta vermelha intensamente utilizada para tingimento de fibras de algodão e muito valorizada no início do período colonial brasileiro. A popularização do pau-brasil na Europa a partir do século XVI devido ao seu pigmento, e a sua intensa exploração econômica para atender as indústrias de tinta e obtenção dos cobiçados tons de vermelho levaram essa espécie a se tornar rara, condição que durou quase até meados do século XIX, quando ocorreu a síntese do primeiro corante artificial,

chamado malveína (Rezende *et al.* 2004). O corante do pau-brasil teve seu princípio ativo determinado em 1883 pelos químicos Liebermann e Burg (Rocha 2004). Chamada de brasilina ($C_{16}H_{14}O_5$), essa substância incolor torna-se vermelha em soluções alcalinas, ou após exposição ao ar, transformando-se em brasileína ($C_{16}H_{12}O_5H_2O$) **(Figura 1)**.

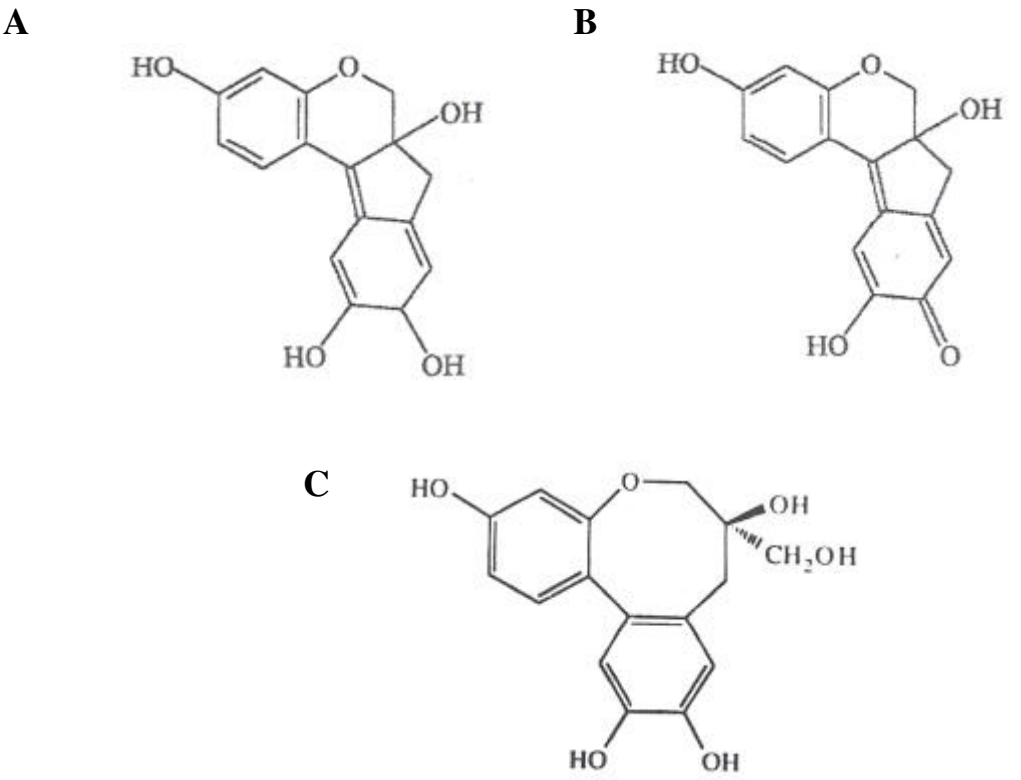


Figura 1. Estrutura química dos principais componentes presentes no extrativo de pau-brasil. A: brasilina, B: brasileína (Oliveira *et al*. 2002) e C: protossapanina B (Matsunaga *et al*. 2000a).

Em Caesalpinoideae, subfamília a qual pertence o pau-brasil, há relatos de extrativos isolados da madeira de algumas espécies, como *Caesalpinia volkensii* e *C. sappan* (Kuria *et al.* 2001, Xie *et al.* 2000), das quais foram isoladas a brasilina e a hematoxilina. A madeira de *C. sappan*, além de ser objeto de estudo de pesquisadores chineses na área medicinal, já tem sua madeira em pó utilizada pela medicina tradicional como agente anti-inflamatório e analgésico (Oliveira *et al*. 2002). Recentemente, foi descrito que os extrativos isolados de *C. echinata* possuem atividade inseticida, matando larvas do mosquito *Aedes aegypti*, e moluscicida, impedindo o desenvolvimento de ovos de *Biomphalaria glabrata* (Luna *et al*. 2005).

Há trabalhos que relacionam o teor de extrativos com a qualidade da madeira utilizada na fabricação de arcos para instrumentos de corda. A madeira de pau-brasil tem sido considerada como uma das melhores para este fim. Matsunaga *et al.* (1996) e Matsunaga & Minato (1998) estudaram o efeito dos extrativos isolados de *C. echinata* nas propriedades físicas e mecânicas das madeiras utilizadas na fabricação de arcos de violino. Esses autores verificaram que os extrativos da madeira de pau-brasil alteram o tan delta (tan δ), que é um dos parâmetros relacionados às propriedades vibracionais e que indica a qualidade da madeira para esta finalidade. Minato *et al*. (1997), Sakai *et al*. (1999) e Matsunaga *et al*. (2000b) impregnaram a protossapanina B e a brasilina **(Figura 1)** em outras madeiras e observaram que as mesmas tiveram o tan δ alterado, constatando uma melhora nas características vibracionais. Acredita-se que a quantidade de extrativos, sua estrutura química e a localização dos mesmos na madeira também sejam responsáveis pelas propriedades vibracionais, além da sua durabilidade. Os extrativos presentes nas madeiras, além de conterem substâncias tóxicas a insetos e microrganismos, possuem outros componentes que podem servir como fonte nutricional para organismos xilófagos, como os açúcares solúveis e os açúcares álcoois.

1.2.2. AÇÚCARES ÁLCOOIS

Os açúcares solúveis e os açúcares álcoois, estes últimos também chamados de polióis, são metabólitos de baixo peso molecular encontrados em vários tecidos e órgãos vegetais, estando também presentes em madeiras. Acredita-se que podem atuar como estabilizadores de membranas e protegendo macromoléculas de efeitos adversos, como, por exemplo, da excessiva perda de água (Vernon *et al*. 1993).

Poucos são os relatos a respeito do teor de polióis em madeiras. Hoch *et al*. (2003), analisando alburno de várias espécies oriundas de florestas temperadas, observaram maiores teores de sacarose, glucose e frutose, e em menores quantidades polióis. Atualmente, há indícios de que a presença de polióis na madeira confere à mesma maior resistência a microrganismos xilófagos, uma vez que eles, em sua maioria, não são degradados na planta. Entretanto essa função ainda não está bem esclarecida (A. A. Richter, comunicação pessoal).

Como uma sub-classe de açúcares álcoois, os ciclitóis são altamente solúveis, não reativos e metabolicamente inertes. Essas qualidades permitem que eles sejam acumulados em altas concentrações sem interferir nas estruturas celulares e no metabolismo (Vernon *et al.* 1993). Estão divididos em quatro grandes grupos baseados em: a) *mio*-Inositol (galactinol); b) D-ononitol; c) D-pinitol (galactopinitol A e B); e d) D-*chiro*-Inositol (fagopiritol) (Peterbauer & Richter 2001) **(Figuras 2 e 3)**. A maioria dos ciclitóis é sintetizada a partir do *mio*-inositol, sendo um dos mais comuns o pinitol (1-D-3-*O*-methyl *chiro*-inositol). Altas concentrações de pinitol e de ononitol são encontradas em várias espécies de plantas osmotolerantes, como por exemplo a jojoba (Vernon *et al*. 1993). Em angiospermas, os polióis mais comuns são o galactitol, o sorbitol e o manitol, sendo que o galactitol está presente especialmente na família Celastraceae. Em *Pinus pinaster* foram observados os ciclitóis D- ononitol e D- pinitol (Noiraud *et al*. 2001). Atualmente, os ciclitóis têm sido estudados principalmente em sementes, por estarem relacionados à tolerância à dessecação e à longevidade das mesmas,

promovendo, quando em solução, a formação de um estado vítreo que protege as estruturas macromoleculares durante a dessecação (Peterbauer & Richter 2001, Horbowicz *et al*. 1998, Noiraud *et al*. 2001).

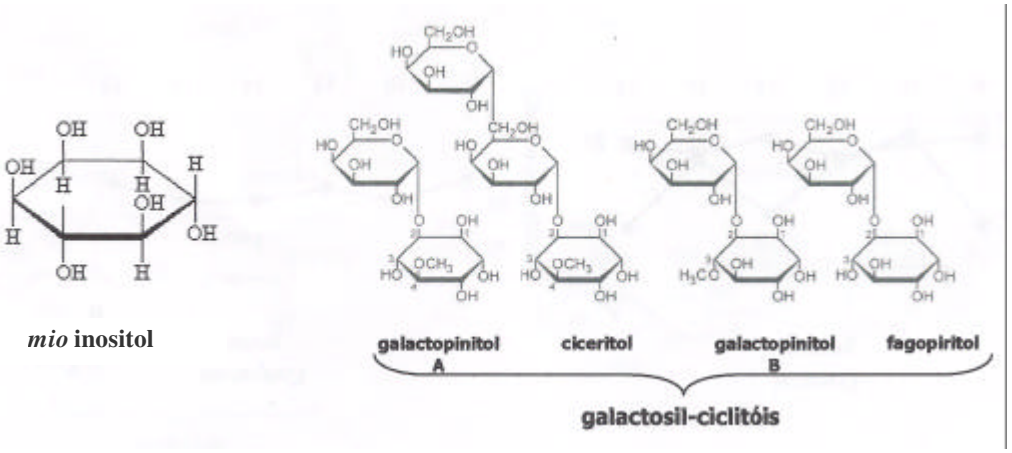


Figura 2. Estrutura química de alguns dos açúcares álcoois encontrados em plantas superiores (reproduzido de Souza *et al*. 2005).

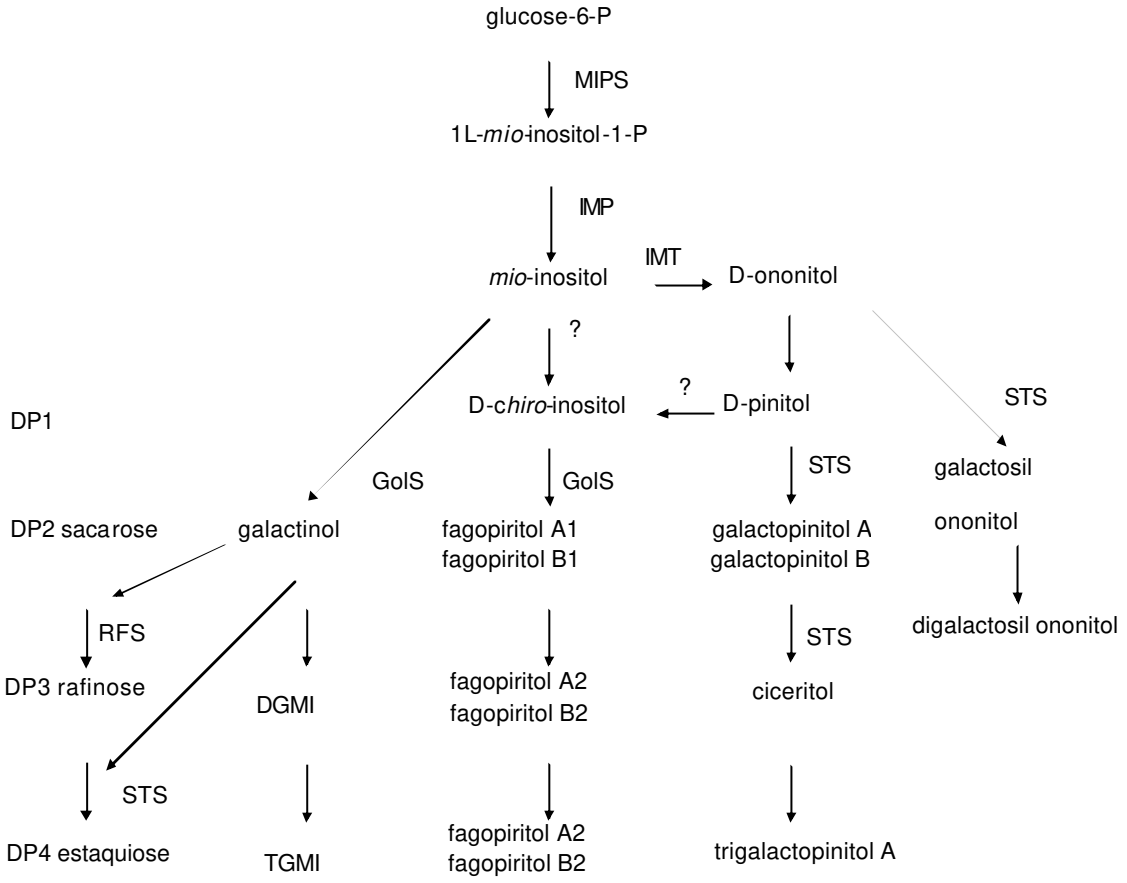


Figura 3. Rota proposta para a síntese de ciclitóis, galactosil ciclitóis e oligossacarídeos da série rafinósica. As setas sem identificação indicam que a enzima que cataliza a reação ainda não foi identificada. DP: grau de polimerização; DGMI: digalactosil *mio*-inositol; GolS: galactinol sintase; IMP: *mio*-inositol fosfato monofosfatase; IMT: *mio*-inositol 4-metiltransferase; MIPS; *mio*-inositol fosfato sintase; RFS: rafinose sintase: STS: estaquiose sintase; TGMI: trigalactosil *mio*-inositol; ?: rota ainda não identificada em plantas superiores (adaptado de Ma *et al.* 2005).

1.2.3. COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR DAS CÉLULAS DO XILEMA

A parede celular é um envoltório firme, mas extensível, que sustenta e protege o corpo vegetal, podendo ser definida como uma rede altamente organizada de polissacarídeos, proteínas e fenilpropanóides. Apesar de extremamente firme, a parede celular é plástica o suficiente para permitir o crescimento celular. As características físicas e as funções biológicas da parede celular dependem de seus componentes e do modo como eles interagem entre si. As propriedades da parede celular variam com a espécie, o ambiente, o tipo de tecido e o estádio de desenvolvimento da planta. Em plantas jovens ou em crescimento ela é representada por uma fina matriz extracelular, rígida e extensível, denominada de parede celular primária, importante no processo de expansão celular. Quando a célula atinge a maturidade e os tecidos cessam seu crescimento, é formada uma estrutura reforçada e espessa, que usualmente é impregnada de lignina em tecidos secundários, chamada de parede celular secundária (Roberts 2001). Esta é composta de três camadas, denominadas S1, S2 e S3 **(Figura 4)**, que são formadas nos diferentes períodos durante a diferenciação celular e que divergem entre si pela disposição de seus componentes e por sua composição (Plomion *et al*. 2001).

Diversas funções são atribuídas à parede celular, como definir a forma e o tamanho celular, conferir resistência mecânica aos tecidos, controlar a expansão celular, atuar no transporte intercelular, participar da sinalização e do reconhecimento entre células, armazenar compostos de reserva e moléculas sinalizadoras que controlam diversos processos fisiológicos e participar de mecanismos de proteção das plantas contra microorganismos (Darvill *et al.* 1992, Aldington & Fry 1993).

As paredes primária e secundária são compostas por carboidratos, glicoproteínas, água e compostos fenólicos, diferindo apenas na proporção destes componentes (Carpita & Gibeaut 1993). Toda madeira é naturalmente composta de polímeros como celulose, hemiceluloses e lignina que, juntamente com os

extrativos, são responsáveis pela maior parte das propriedades físicas e químicas exibidas pela mesma e por seus produtos (Pandey 1999). Variações nas características e quantidade desses componentes, além de diferenças na arquitetura celular, estão diretamente ligadas ao fato das madeiras serem pesadas ou leves, rígidas ou flexíveis e duras ou moles (Miller 1999).

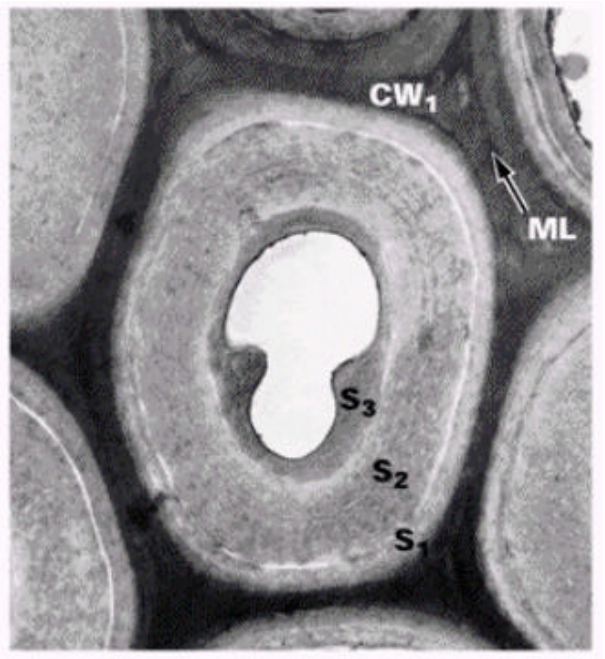


Figura 4. Eletromicrografia de uma fibra presente em caule vegetal jovem na qual são visualizadas a lamela média (ML), a parede celular primária (CW_1) e as camadas (S1, S2, S3) da parede celular secundária (reproduzido de Carpita & McCann 2000).

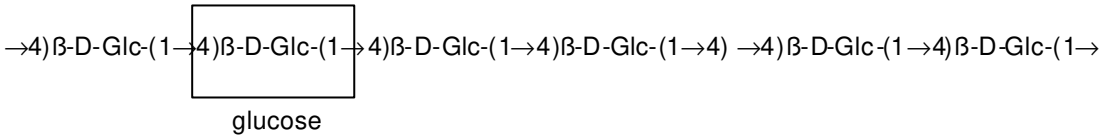
1.2.3.1. POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos perfazem cerca de 75% da parede celular. A distribuição e o tipo dos componentes na parede celular das células do xilema variam de acordo com a espécie e com o tipo celular. A celulose **(Figura 5 A)**, considerada o maior componente, constitui cerca de 40 a 50% da biomassa da madeira, sendo encontrada em altas quantidades na parede secundária. É um polímero linear composto de glucose ligada β-(1, 4), cujas cadeias se agrupam na forma de microfibrilas, com zonas cristalinas intercaladas com zonas amorfas (não cristalinas). Devido ao alto grau de polimerização e cristalinidade, a celulose é considerada a responsável pela resistência da fibra da madeira (Pandey 1999).

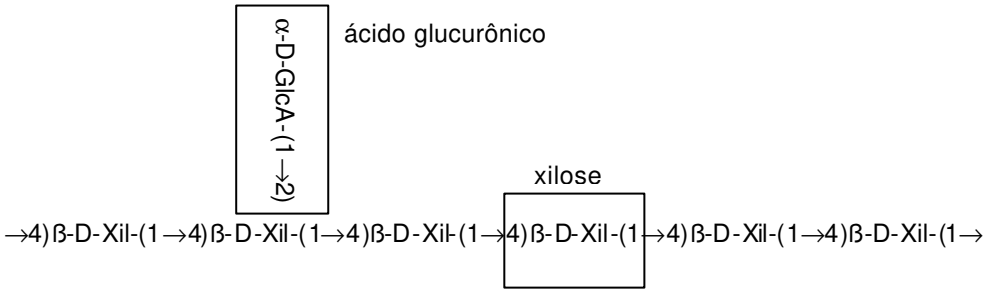
As microfibrilas de celulose estão associadas a uma mistura de polissacarídeos não celulósicos, chamados de hemiceluloses, que são responsáveis por cerca de 25% do peso seco da madeira. Estes são depositados ao redor e entre as microfibrilas de celulose formando uma estrutura que dá suporte mecânico à parede celular. As hemiceluloses compreendem um grupo de polímeros ricos em glucose, xilose ou arabinose, com diversas ramificações. Tais polímeros ocorrem sob a forma de heteropolímeros como os glucomananos, galactoglucomananos e glucuronoxilanos, ou como homopolímeros como xilanos e β-(1,3) glucanos (Plomion *et al.* 2001).

Dentre as hemiceluloses, os xilanos e os glucuronoxilanos **(Figura 5 B)** são encontrados em maiores proporções nas paredes celulares secundárias vegetais. São considerados os maiores componentes de madeiras de angiospermas, chegando a compor 30% da parede celular das mesmas. Em menores proporções são encontrados os glucomananos (2-5%). Nas madeiras de gimnospermas, por sua vez, são encontradas diversas hemiceluloses, sendo o galactoglucomanano **(Figura 5 C)** considerado o principal componente, perfazendo aproximadamente 20% da parede celular, seguido de glucuronoarabinoxilano (5-10%) (Rowell *et al.* 2005).

A- Celulose



B- Glucuronoxilano



C- Galactoglucomanano

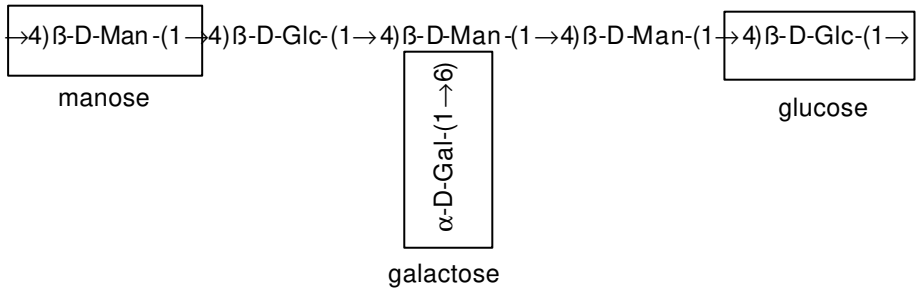


Figura 5. Representação estrutural. A: Celulose; B: Principal hemicelulose encontrada em madeiras de angiospermas (glucuronoxilano); C: Principal hemicelulose encontrada em madeiras de gimnospermas (galactoglucomanano) (adaptado de Carpita & McCann 2000).

Vian *et al*. (1986), estudando a madeira de *Tilia platyphyllos*, verificaram que os glucuronoxilanos estão relacionados à disposição e orientação das microfibrilas de celulose na parede celular presente nas camadas S1 e S2 e que o xilano envolve as microfibrilas de celulose. Awano *et al*. (2002), analisando microfibrilas de celulose presentes nas paredes celulares das células do xilema de *Fagus crenata* (Fagaceae) em microscopia eletrônica, verificaram que as mesmas estavam envolvidas por xilano e lignina, formando um complexo lignina-polissacarídeo, que estaria contribuindo para o seu espessamento. Esse complexo seria o responsável pelo suporte mecânico da fibra da madeira (Reis *et al*. 1994).

As hemiceluloses são mais abundantes em madeiras de angiospermas do que em gimnospermas e podem diferir em sua composição entre as espécies. Entre as camadas da parede celular secundária (S1, S2 e S3) há diferenças na proporção de celulose e hemiceluloses, sendo que estas últimas estão presentes em maiores quantidades na camada S1. Por terem arranjo e composição diferentes, e sendo distinguíveis apenas por essas características, as camadas possuem funções diferentes. A camada S2 é considerada a mais importante, pois está relacionada ao suporte mecânico. A orientação perpendicular das microfibrilas de celulose nesta camada pode influenciar as propriedades físicas e mecânicas na madeira (Plomion *et al*. 2001, Singh & Daniel 2001). Alguns autores acreditam que a camada S3 minimiza os efeitos da tensão da camada S2 e do restante da parede celular durante o transporte de água. Também pode formar uma barreira a certos tratamentos químicos e contra a invasão de microrganismos durante a biodeterioração da madeira (Singh *et al*. 2002).

Proteínas e pectinas estão entre os menores componentes da parede celular de madeiras (Rowell *et al.* 2005). Embora diferentes proteínas estejam presentes na parede celular em diferentes momentos durante o desenvolvimento da célula, as quantidades restantes na madeira são pequenas. Entretanto, acredita-se que algumas proteínas desempenham importante papel na determinação da composição e morfologia das paredes celulares das células do xilema (Cassab 1998). As pectinas são caracterizadas por possuírem alto

conteúdo de ácido α-D-galacturônico. Os três maiores componentes da pectina são o homogalacturonano (HGA), que é constituído de unidades de ácido galacturônico α-(1,4) ligadas e os ramnogalacturonanos I (RGI) e II (RGII), que possuem unidades de ácido galacturônico α-(1,4) intercaladas por unidades de ramnose ligadas α-(1,2) (Dumville & Fry 2000). Várias funções são atribuídas às pectinas, como contribuir na regulação da extensibilidade da parede celular, determinar a porosidade, além de conter moléculas sinalizadoras da indução de respostas de defesa em plantas (Van Cutsem & Messiaem 1994).

O amido é o principal polissacarídeo de reserva em plantas, e embora não faça parte da parede celular pode ser encontrado em pequenas quantidades associado à parede celular da madeira. Ocorre geralmente em grânulos e é composto de unidades de glucose α-(1,4) ligadas (amilose), com ramificações α-(1,6) (amilopectina) (Rowell *et al.* 2005).

Dentre os componentes químicos de parede celular das células do xilema, a celulose e a lignina têm sido as mais estudadas, devido à sua influência na resistência e durabilidade da madeira (Singh & Daniel 2001). Lichtenegger *et al*. (1999) descrevem que a celulose contribui consideravelmente para a resistência mecânica da parede celular. Para Rowell *et al.* (2005), o fato da associação entre a celulose, as hemiceluloses e a lignina ser tão íntima dificulta o isolamento da celulose da madeira. Outra característica importante, relacionada à elasticidade da parede celular, é a disposição das microfibrilas de celulose nas diferentes camadas da parede celular secundária, principalmente na camada S2. A resistência e a rigidez são outras características diretamente influenciadas pelo arranjo dos polímeros na parede celular da madeira (Bergander & Salmén 2002).

1.2.4. LIGNINA

Considerada o segundo maior componente da madeira, a lignina é responsável por cerca de 25 a 35% da parede celular das células do xilema,

sendo abundante na parede celular secundária e formando um sistema altamente resistente entre e ao redor do domínio celulose-hemicelulose (Zabel & Morrell 1992, Plomion *et al*. 2001).

A lignina é encontrada em menores quantidades na parede celular primária e na lamela média e difere daquela presente na parede celular secundária. Além disso, sua natureza química é dependente da idade da célula (Joseleau & Ruel 1997). As ligninas exibem intrinsecamente várias características que as tornam polímeros únicos na natureza, sendo o polímero natural mais difícil de ser hidrolisado (Boudet 2000).

De acordo com Hatfield & Vermerris (2001), existem duas formas para definir as ligninas: a primeira do ponto de vista químico, através da análise da composição química e estrutural; a segunda do ponto de vista funcional. Encontradas em células especializadas, como traqueídes, vasos e fibras, as ligninas são derivadas da polimerização oxidativa de três álcoois cinâmicos, chamados de monolignóis: *p*-coumarílico, coniferílico e o sinapílico **(Figura 6)**, que dão origem aos resíduos hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), respectivamente. O álcool *p*-coumarílico é o precursor menos abundante de ligninas de angiospermas e gimnospermas; o álcool coniferílico é o precursor dominante de ligninas de gimnospermas e os álcoois coniferílico e sinapílico são precursores de ligninas de angiospermas (Rowell *et al.* 2005). O predomínio de um desses resíduos define os três tipos de lignina que diferem entre si apenas pelo grau de metiliação. A unidade G é caracterizada por uma substituição por grupo metil no anel aromático, enquanto a unidade S é di-metilada e a unidade H não possui metilação (Dixon *et al.* 2001). O conteúdo e o tipo de lignina pode variar nos diferentes taxa, indivíduos, tecidos, tipos de células e camadas da parede celular (Piquemal *et al.* 1998, Plomion *et al.* 2001).

As ligninas de gimnospermas contém somente unidades G e uma menor proporção de unidades H, perfazendo cerca de 25 a 35% da parede

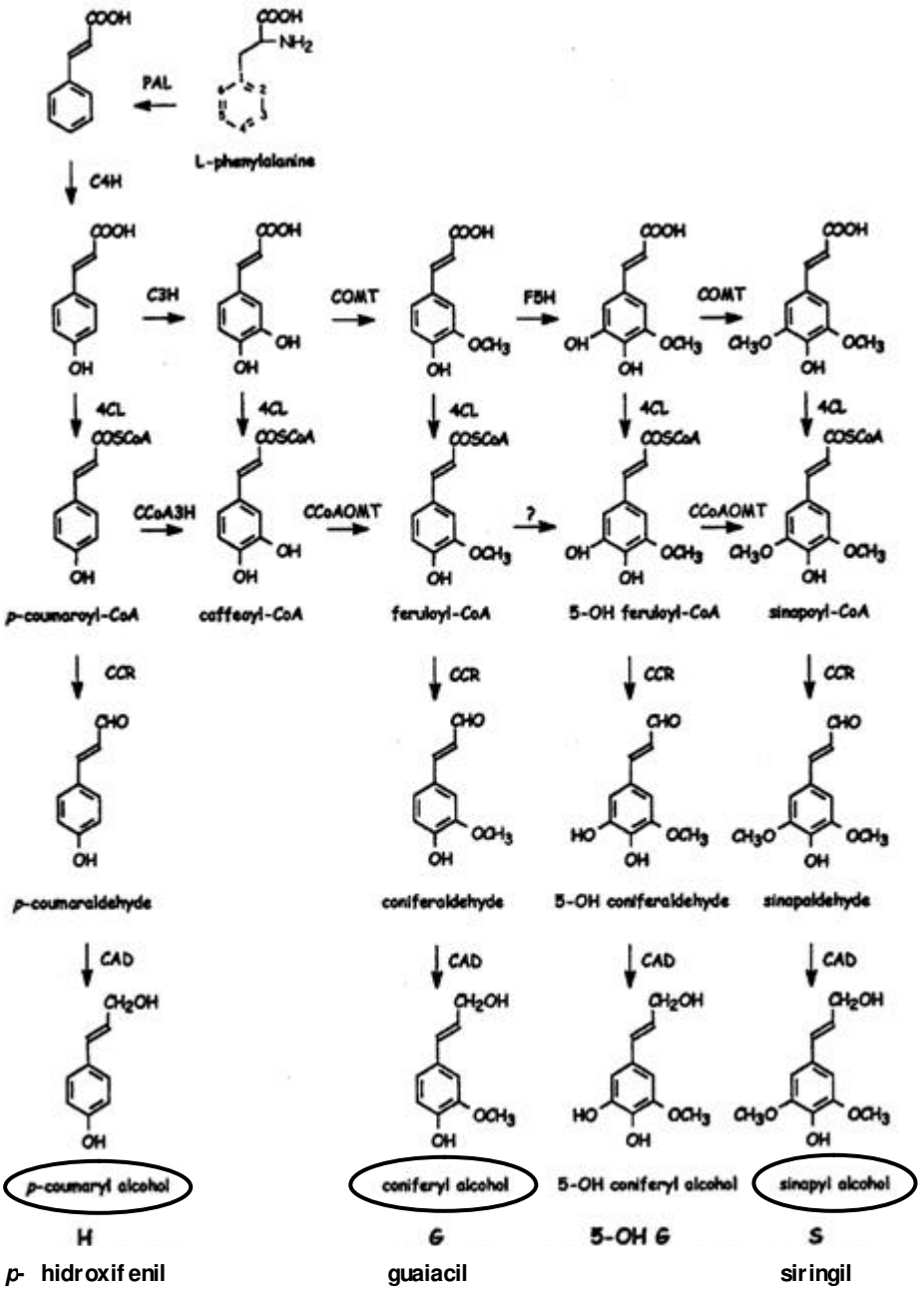


Figura 6. Via de biossíntese dos três monolignóis que compõem a lignina e os respectivos resíduos derivados (adaptado de Dixon *et al*. 2001).

(Rowell *et al.* 2005). Já as ligninas de angiospermas contêm tipicamente uma mistura de unidades G e S e uma quantidade mínima de unidades H (Whetten *et al*. 1998), e seu conteúdo varia entre 18 a 25%. A razão entre as unidades G:S varia de cerca de 4:1 a 1:2 (Rowell *et al.* 2005). Em gramíneas são sempre encontrados os três tipos de unidades, na seguinte ordem: H<G<S. (Yoshizawa *et al*. 1999). Em gimnospermas, as ligninas apresentam-se altamente condensadas. Os mecanismos que determinam as proporções entre as unidades ainda não estão esclarecidos, porém, acredita-se que a lignina não é simplesmente um polímero que possui unidades escolhidas ao acaso, mas a sua composição é programada (Dixon *et al.* 2001). A existência de mais de um tipo de lignina e a precisa regulação da composição durante o desenvolvimento indicam a existência de diferenças adaptativas e em suas propriedades funcionais (Whetten *et al.* 1998).

A relação G:S em ligninas de diversos tipos de madeiras tem sido extensamente estudada, pois, além de estar relacionada à capacidade de deslignificação da mesma, na qual a maior quantidade de unidades S facilita sua fragmentação, também está sendo utilizada como critério de seleção de árvores para uso exploratório, principalmente na indústria do papel (Pereira *et al*. 1994). Diferentemente, ligninas que contêm uma maior quantidade de unidades H são dificilmente degradadas (Campbell & Sederoff 1996). Esta relação G:S aumenta conforme avança a maturidade da célula. Alguns autores têm observado que durante a diferenciação celular, a parede celular do vaso sofre o processo de lignificação anteriormente à da fibra, e que a deposição das unidades G antecede a deposição das unidades S (Yoshizawa *et al*. 1999). Recentemente, alguns estudos têm relacionado inversamente a quantidade de lignina e a relação G:S na digestibilidade de forrageiras por animais ruminantes. Nas forrageiras mais jovens, que apresentam baixo teor de lignina, um pequeno aumento na relação G:S acarreta diminuição da digestibilidade por ruminantes (Fukushima & Savioli 2001). Assim, à medida que as plantas forrageiras tornam-se maduras, maior é o teor de lignina, bem como maior é o seu efeito restritivo sobre a utilização da parede

celular. Por outro lado, Grabber *et al*. (1997), analisando plantas de milho quanto à sua proporção de monolignóis, verificaram que a degradabilidade da parede celular por hidrolases fúngicas está mais associada à química e ultraestrutura da parede celular do que à composição de ligninas.

A deposição de fenilpropanóides na parede celular é, dentre outros, um aspecto relacionado a respostas de resistência a doenças. O processo de reforço da parede, que tem início após a infecção ou por estímulos ambientais, leva a mudança na rigidez e digestibilidade das células e tecidos (Whetten *et al.* 1998, Boudet 2000). A lignificação é um processo que confere proteção contra a invasão fúngica, pois a lignina é o último componente a ser degradado pelos fungos (Blanchete 1991). A lignina forma uma barreira ao redor das microfibrilas de celulose e das hemiceluloses na parede celular, que deve ser alterada ou removida antes que as microfibrilas possam ser enzimaticamente digeridas. Por esse motivo, a presença de lignina representa uma barreira que os fungos devem remover ou modificar para ter acesso aos demais polímeros. A lignina pode ser degradada somente por um pequeno grupo de fungos especializados ou bactérias, em um processo que, algumas vezes, leva longos períodos (Zabel & Morrell 1992).

De um modo geral, como principais funções da lignina destacam-se o suporte mecânico que confere aos vasos condutores, a rigidez adicional que dá à parede celular, tornando-a hidrofóbica, impermeável e resistente, além de estar envolvida em resposta a sinais ambientais e em mecanismos de defesa contra microorganismos (Boudet 2000, Minorsky 2002).

2. BIODETERIORAÇÃO DA MADEIRA

A deterioração da madeira é um processo em que ocorrem mudanças significativas nas propriedades físico-químicas da mesma, que podem ser causadas por agentes físicos, químicos ou biológicos (Zabel & Morrell 1992). A resistência natural da madeira é medida pela sua capacidade de resistir à

deterioração (Paes 2002). Umidade e temperatura, que podem variar de acordo com as condições locais, são os principais fatores que afetam a velocidade da deterioração. A madeira é mais rapidamente degradada em áreas quentes e úmidas que favorecem a deterioração biológica (Simpson & TenWolde 1999), resultante da atividade de microrganismos como fungos e bactérias (Schmitt *et al.* 2005).

Madeiras de gimnospermas são naturalmente suscetíveis ao processo de biodeterioração. As de angiospermas, ao contrário, apresentam geralmente vários graus de resistência natural ao ataque biológico, graus esses influenciados pelas diferenças na qualidade dos extrativos presentes na madeira. De fato, a constituição química, variável entre as espécies e até mesmo entre as células da mesma madeira, é um fator determinante da sua resistência natural ao ataque dos microrganismos (Paes *et al.* 2002, 2005). O alburno é mais suscetível que o cerne por ser a parte da madeira que apresenta material nutritivo armazenado. O cerne, além da ausência desse tipo de material, possui os extrativos, que usualmente contêm substâncias inibidoras ou tóxicas (Silva *et al.* 2004).

O processo de biodeterioração ocorre em etapas ou estágios graduais e contínuos e que dependem do tipo de microrganismo que está se desenvolvendo na madeira. O primeiro estágio, chamado de incipiente, tem início quando o microorganismo penetra superficialmente na madeira e começa a sua colonização liberando enzimas. Geralmente, neste estágio não ocorrem evidências macroscópicas da infecção. A deterioração vai se desenvolvendo e quando alguns sinais da infecção já podem ser notados, esta etapa é caracterizada como recente. Na seguinte, chamada de intermediária, mudanças na coloração e na textura da madeira já são bastante evidentes, mas a sua estrutura ainda permanece intacta. No último estágio, conhecido como avançado, a madeira torna-se completamente desestruturada. As etapas gerais de deterioração são semelhantes para diversos microorganismos, porém o padrão de deterioração é variável (Zabel & Morrell 1992).

Muitos organismos diferentes podem atacar e deteriorar a madeira, como fungos, brocas e cupins. Os ataques mais comuns e destrutivos são ocasionados por fungos (Istek *et al.* 2005), que são os responsáveis por profundas alterações nas propriedades físicas e mecânicas da madeira, uma vez que degradam progressivamente o material que compõe a parede celular. Os polissacarídeos presentes na parede celular da madeira servem de fonte de energia (alimento) para esses microrganismos (Lelis *et al*. 2001). No processo de deterioração por fungos, a lignificação é conhecida por ser um fator de resistência à degradação da parede celular. Usualmente, a habilidade de fungos em deteriorar a madeira não é a mesma para todas as espécies, sendo observada especificidade de alguns fungos a algumas madeiras (Ferraz *et al*. 2001).

Os fungos xilófagos, isto é, os que deterioraram a madeira, são comumente classificados em três grupos principais, conhecidos como causadores das podridões parda, branca e mole. Fungos de podridão parda degradam preferencialmente as hemiceluloses e a celulose presentes na parede, e a madeira atacada apresenta uma coloração residual pardacenta. Os fungos de podridão branca degradam tanto os polissacarídeos quanto a lignina. Neste caso, a madeira adquire uma coloração mais clara (Oliveira *et al.* 2005a). Muitas vezes, nos estágios iniciais de deterioração, degradam preferencialmente certos constituintes da parede celular em determinadas regiões da madeira (Schwarze *et al.* 2000). A maioria degrada a celulose e hemiceluloses aproximadamente nas mesmas quantidades, mas um pequeno grupo remove preferencialmente a lignina e as hemiceluloses (Istek *et al.* 2005). Os fungos de podridão mole degradam primariamente a celulose e as hemiceluloses. A degradação da lignina é mais lenta e é dependente do fungo e da madeira (Brazolin & Tomazello Filho 1999).

Schwarze *et al*. (2000), analisando a madeira de *Acer pseudoplatanus* por microscopia eletrônica de transmissão, depois de submetida à deterioração por *Laetiporus sulphureus* (podridão parda), *Ganoderma pfeifferi* e *Armillaria mellea* (podridão branca), observaram degradação preferencial dos componentes da parede celular. O fungo *L. sulphureus* degradou preferencialmente a celulose,

G. pfeifferi mostrou preferência por degradar as paredes celulares altamente lignificadas e *A. mellea* em degradar paredes celulares pouco lignificadas. Singh *et al* (2006), avaliando a resistência da madeira de *Pinus radiata* ao fungo de podridão mole, notaram que os traqueídes radiais, que possuem maior teor de lignina, eram mais resistentes à degradação comparados aos traqueídes axiais.

Com a crescente demanda do uso de madeiras das florestas e matas nativas, torna-se necessário obter maiores informações sobre a durabilidade natural das mesmas, para evitar seu uso inadequado e direcionar seu emprego comercial e industrial, de forma racional (Alves *et al.* 2006). Desse modo, madeiras do semi-árido brasileiro têm sido objeto de estudos de resistência natural a fungos causadores de podridões, em condições de laboratório (Paes *et al.* 2002, 2004, 2005), para este fim.

Os cupins, também chamados de térmitas, são os principais insetos xilófagos, sendo o cupim-de-madeira-seca considerado o mais importante, uma vez que é ativo destruidor de madeiras, mesmo quando em colônias com poucos indivíduos (Silva *et al.* 2004). Diferenciam-se em castas, nas quais muitos operários alimentam-se da madeira por possuírem protozoários no intestino, o que lhes possibilita digerir a celulose. O tempo de sobrevivência dos cupins é variável e depende das condições ambientais (Stumpp *et al.* 2006). A espécie *Cryptotermes brevis* é considerada um cupim-praga. É considerado cosmopolita, pois existe em todo o globo terrestre, principalmente nas regiões neotropicais (Gonçalves & Oliveira 2006). Vive em madeiras com baixo teor de umidade, inferiores a 30% (Brazolin *et al.* 2001). Tem seus ninhos dentro da madeira, da qual normalmente não sai a não ser no período de revoada. Essa espécie ataca fortemente madeiras de coníferas e algumas angiospermas de baixa resistência natural. A celulose presente na parede celular da madeira é digerida e a lignina depositada nas pelotas fecais (Stumpp *et al.* 2006). Alguns trabalhos relacionam a resistência natural de madeiras de angiospermas ao ataque de cupins (Gonçalves & Oliveira 2006, Silva *et al.* 2004, Paes 2002, Paes *et al.* 2002). Esses estudos também visam o uso racional da madeira.

3. PAU-BRASIL

A árvore de *Caesalpinia echinata* Lam., conhecida como pau-brasil, é um dos símbolos do país e objeto de várias referências históricas (Pickel 1951, Vasconcelos 1994). O extrativismo do pau-brasil foi a primeira atividade econômica desenvolvida pelos portugueses em terras brasileiras, ocupando o centro da história brasileira durante todo o primeiro século da colonização. Muito utilizada por nossos índios para o tingimento de tecidos, os portugueses logo descobriram nessa espécie uma riqueza inesgotável. Além do pigmento vermelho extraído do cerne e utilizado como corante e tinta de escrever, a madeira do pau-brasil também foi muito utilizada na construção naval e civil e em trabalhos de torno e marcenaria de luxo. Embora abundante na época da chegada dos portugueses, hoje essa árvore é uma espécie ameaçada de extinção, devido à exploração ilegal e irresponsável. Atualmente, seu uso restringe-se à confecção de arcos para instrumentos de corda, principalmente de violino (Carvalho, 1994; Lorenzi, 1992; Mainieri, 1960). Ainda há corte ilegal de madeira de pau-brasil para atender a esse mercado (Rocha 2004).

Pertencente à família Fabaceae, subfamília Caesalpinioideae, o pau-brasil é uma leguminosa originária das matas costeiras (Mata Atlântica), estendendo-se do Rio Grande do Norte ao Rio de Janeiro. A madeira recebe outros nomes populares, como: Ibirapitanga, Ibiripitinga, Arabutã, Brasilete, pau-rosado, pau-vermelho e pau-de-Pernambuco, dentre outros. Possui porte elegante, copa arredondada **(Figura 7 A)**, folhas verde-escuras brilhantes, flores em cacho amarelo-ouro suavemente perfumadas. Apresenta porte médio, entre 10 a 30 m de altura e seu caule pode atingir de 40 a 60 cm, podendo chegar a 1 m de diâmetro em condições naturais (Rizzini 1971, Aguiar *et al.* 2005). Seu cerne, muito duro e pesado, varia de coloração castanho-alaranjado ao vermelho escuro e foi alvo da primeira grande exploração econômica de recurso natural em

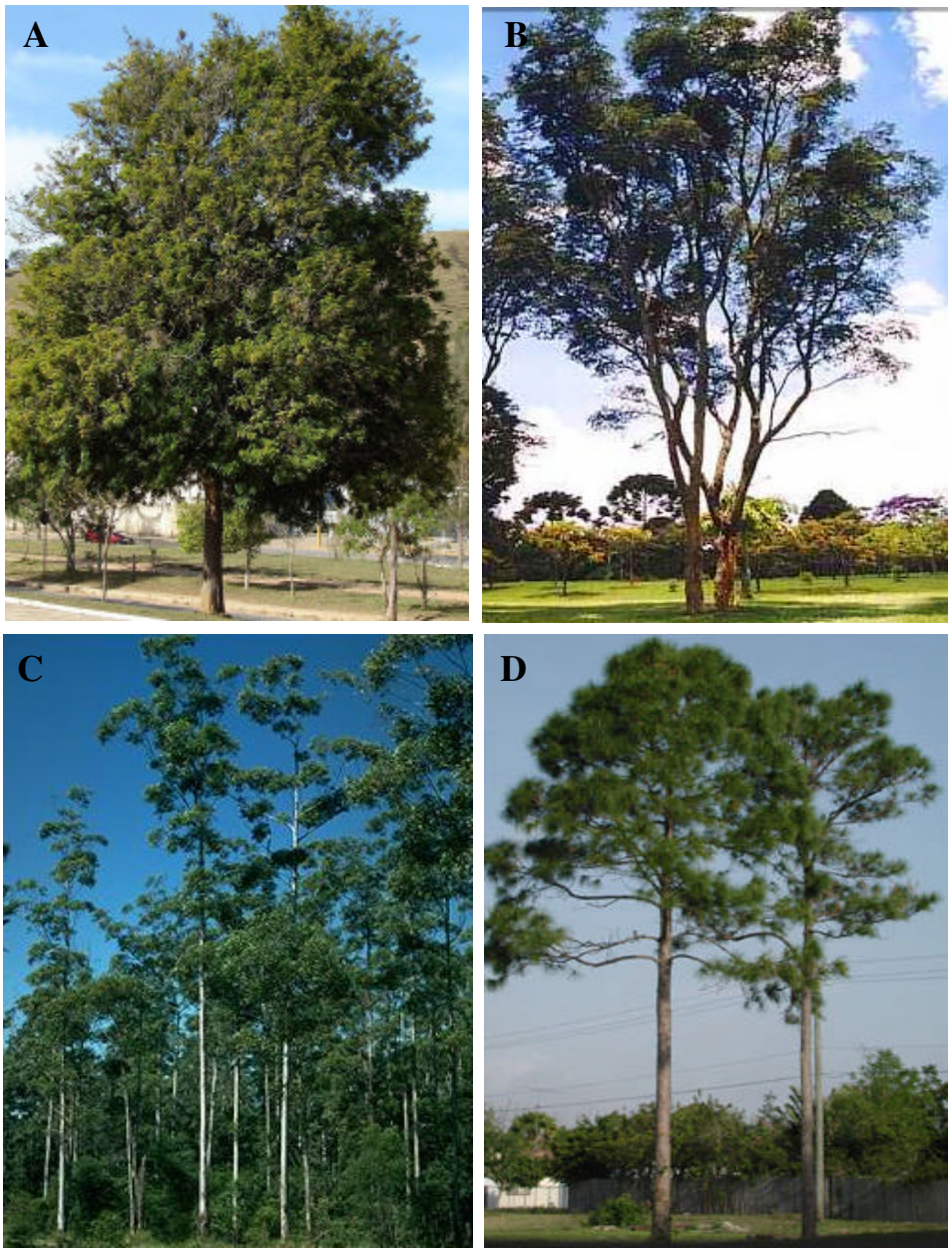


Figura 7. Fotos ilustrativas nas quais se observa o aspecto geral das árvores. A: Pau-brasil (A. G. Freitas Neto); B: Angico-preto (www.cbmm.com.br); C: Eucalipto (www.anbg.gov.au/images/photo_cd/myrtaceae); D: pinus (www.floridagardener.com /FLNatives/Slashpine.htm).

território brasileiro desde a colonização portuguesa. O alburno é fino e de cor amarela clara (Rezende *et al.* 2004).

A denominação vulgar pau-brasil é usada para designar seis gêneros distintos de plantas que produzem madeira (Mainieri 1960). Um dos fatores que contribui para confundir muitas espécies de outras famílias com o verdadeiro pau-brasil é o desconhecimento quase completo da sua madeira (Mainieri 1960). Apesar da sua importância como árvore símbolo do Brasil, até o ano de 2001 era uma espécie que carecia de estudos científicos que permitissem conhecê-la melhor e, conseqüentemente, promover sua conservação e orientar a sua utilização. As informações a respeito das propriedades físicas e mecânicas da madeira de pau-brasil eram escassas ou quase inexistentes. Com relação às suas propriedades químicas, os trabalhos restringiam-se à ocorrência de brasilina e brasileína. Além disso, não existiam relatos sobre sua resistência ao ataque de organismos xilófagos, que possivelmente seja decorrente de sua composição micromolecular e da composição e estrutura da parede celular.

Para preencher essas lacunas, entre os anos de 2001 e 2005 foi desenvolvido o Projeto Temático: "*Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil): da semente à madeira, um modelo para estudos de plantas arbóreas tropicais brasileiras", com quatro enfoques principais: 1) relações do pau-brasil com o homem; 2) uso sustentável e conservação; 3) uso racional e sustentável da madeira (propriedades físicas, químicas e biológicas) e 4) perspectivas futuras do uso do pau-brasil. Esse projeto ampliou o conhecimento existente sobre o pau-brasil em diversos aspectos (www.paubrasilvirtual.bio.br). Como parte desse projeto foram realizados estudos relativos à madeira de pau-brasil no que concerne à composição de suas paredes celulares e sua resistência a organismos xilófagos, apresentados nesta tese.

4. OUTRAS MADEIRAS ESTUDADAS

Para caracterizar a madeira do pau-brasil em relação à composição de suas paredes celulares e à sua resistência a organismos xilófagos e compará-la com outras espécies comerciais que já tivessem sua resistência a biodeterioração conhecida, foram selecionadas as madeiras de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenae (angico-preto), *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden (eucalipto) e *Pinus elliottii* (Warm.) Engelm (pinus), que são objeto de estudos no Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo (IPT).

4.1. ANGICO-PRETO

Angico-preto é o nome popular dado a *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenae, leguminosa da família Fabaceae **(Figura 7 B)**, encontrada no Brasil, Argentina e Paraguai (Chudnoff 1984). No Brasil, tem ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde o Maranhão até São Paulo e no Brasil Central. É comum na zona da mata em Minas Gerais, na região Oeste do Estado de São Paulo e no Sul de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Além do nome angico-preto, é também conhecida por angico-preto-rajado, angico-rajado, angico-vermelho, angico-do-campo, Arapiraca, Guarapiraca e Angici, dentre outros (Mainieri & Chimelo 1989).

Como características gerais do angico-preto destacam-se o cerne castanho-amarelado quando recém-cortado, a abundância de veios ou manchas arroxeadas que são mais facilmente visualizadas quando a madeira é recém-cortada, a presença de fibras irregulares, de superfície pouco lustrosa e irregularmente áspera, o cheiro imperceptível e o gosto ligeiramente adstringente (Chudnoff 1984).

Por ser muito pesada, de elevada resistência mecânica e de alta durabilidade em condições naturais, é uma madeira altamente valorizada, sendo

indicada para construção de estruturas externas, como estacas, esteios, postes, dormentes, cruzetas, madeiramento de currais, móveis, vigas, caibros, ripas, marcos de portas e janelas, tacos e tábuas para assoalhos, etc. É considerada de alta resistência natural ao apodrecimento (Mainieri & Chimelo 1989) e ao ataque de cupins (Paes *et. al.* 2003).

4.2. EUCALIPTO

O eucalipto (*Eucalyptus* sp.) é uma planta da família Myrtaceae que conta com mais de 600 espécies e variedades descritas **(Figura 7 C)**. No Brasil, sua introdução deu-se em 1868, no Rio Grande do Sul, com as espécies *Eucalyptus globulus*, *E. amygdalina* e *E. polyanthemo*. Geralmente as plantas alcançam uma altura de 43 a 55 m, com diâmetro entre 122 a 183 cm (Meskimen & Francis 1990). Apesar de ser uma espécie exótica, adaptou-se rapidamente ao clima brasileiro, e é largamente utilizada em áreas de reflorestamento. Para o caso específico do Brasil, o eucalipto possui um caráter estratégico, uma vez que a sua madeira é responsável pelo abastecimento da maior parte do setor industrial de base florestal. É também cultivado para a produção de lenha e carvão, além da madeira ser usada para escoras, esteios, postes, dormentes e toras para desdobra (serraria), fabricação de móveis, casas e estruturas na construção civil e fibras para a indústria de polpa e papel. Muitas espécies produzem néctar para a apicultura, assim como óleos e taninos (Silva 2001).

Eucalyptus grandis Hill ex Maiden destaca-se como uma das espécies mais plantadas no Brasil e no mundo, por ser considerada muito versátil e indicada para múltiplos usos (Haselein *et al.* 2004). Possui cerne castanho rosado e alburno bege rosado, pouco brilho e cheiro e gosto imperceptíveis. Sua madeira possui resistência natural de moderada a baixa à deterioração por fungos apodrecedores e cupins, sendo particularmente suscetível ao ataque de fungos da podridão mole e cupins-de-solo. Silva *et al*. (2004), verificaram que a madeira de

E. grandis, dentre as demais do gênero *Eucalyptus*, foi a que apresentou menor resistência natural ao ataque do cupim-de-madeira-seca *Cryptotermes brevis*.

4.3. PINUS

Nativo do Hemisfério Norte, o gênero *Pinus* sp. (Pinaceae) é economicamente importante pela sua madeira, polpa, alcatrão e aguarrás. Sua resina é conhecida por formar uma camada protetora na superfície da madeira contra microrganismos patogênicos. Como principal produto da resina, a aguarrás é utilizada para dissolver vernizes e tintas. Tem sido a principal fonte de madeira para vários propósitos, incluindo lenha, construção e carpintaria. No Reino Unido são encontrados exemplares introduzidos de *Pinus contorta* e *P. nigra*, na Nova Zelândia *P. radiata* e no Brasil *P. elliottii* e *P. taeda* (www.botanik.uni-bonn.de/conifers/pi/pin/index.htm).

Pinus elliottii (Warm.) Engelm, **(Figura 7 D)**, é uma espécie exótica originária dos Estados Unidos, e que foi introduzida no Brasil em 1959, inicialmente nos estados das regiões Sul e Sudeste. O pinus encontrado no Brasil é uma madeira oriunda de reflorestamento e desponta como uma das melhores alternativas para o abastecimento do mercado nacional, uma vez que cresce rapidamente e pode atingir até 30 m de altura (www.tokstok.com.br). Além do nome pinus, é conhecido também como pinheiro-americano. Sua madeira tem coloração branco-amarelado com brilho moderado, textura fina, cheiro e gosto distinto e característicos devido à resina. Observações e ensaios laboratoriais permitem considerar a madeira de pinus como de baixa resistência à deterioração por fungos apodrecedores, cupins e brocas-de-madeira (Gonçalves & Oliveira 2006). Geralmente, em ensaios de resistência a biodeterioração, sua madeira é utilizada como controle, por ser considerada altamente suscetível ao ataque de organismos xilófagos (Paes 2002, Gonçalves & Oliveira 2006).

OBJETIVOS

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de caracterizar a madeira do pau-brasil em relação à sua estrutura e à composição de suas paredes celulares e tentar correlacionar esses dados com à resistência a biodeterioração ocasionada por organismos xilófagos. Para fins de comparação, madeiras de pinheiro, eucalipto e angico-preto, espécies cuja resistência a organismos xilófagos já é conhecida, foram submetidas às mesmas análises. Os objetivos específicos foram:

- Quantificar e analisar os extrativos presentes nas madeiras e o teor de açúcares álcoois, para verificar sua possível relação com a resistência da mesma;

- Determinar o teor de lignina, por meio de análises bioquímicas específicas, e a presença de lignina do tipo guaiacil e siringil nas madeiras, empregando-se microscopia de luz e testes microquímicos;

- Determinar o teor e a composição dos polissacarídeos presentes nas paredes celulares de alburno e cerne;

- Avaliar o grau de resistência da madeira de pau-brasil à degradação por cupins e por fungos de podridões branca, parda e mole, através da comparação com madeiras comerciais cujo grau de resistência já é conhecido.

MATERIAL E MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

Por meio de coleta destrutiva, foram obtidos discos do tronco (DAP-diâmetro da altura do peito) de três indivíduos adultos de *Caesalpinia echinata* Lam. (Fabaceae) com cerca de 25 anos **(Figura 8)**, procedentes de um bosque implantado na Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu (Fazenda Campininha/ SP) (22º 15-16' S, 47º 8-12' W). Uma amostra de tronco de pau-brasil oriundo da Estação Ecológica do Pau-Brasil, localizada em Porto Seguro (BA) foi utilizada em alguns ensaios para fins de comparação.

Ripas (triplicatas) de madeiras comerciais de *Pinus elliottii* (Warm.) Engelm (pinus) (Pinaceae), cerne de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden (eucalipto) (Myrtaceae) e cerne de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenae (angico-preto) (Fabaceae) foram obtidas na Fazenda Monte Alegre, SP, Estação Experimental de Ciências Florestais de Anhembi, SP e Aquidauana, MT, respectivamente **(Figura 9)**. Neste trabalho, as amostras de pinus foram consideradas como madeira (alburno) uma vez que não houve distinção do cerne ("cerne fisiológico"). A idade das árvores das quais foram obtidas as ripas utilizadas neste trabalho não foi estimada.

Para os ensaios de degradação por organismos xilófagos foram utilizados o cupim *Cryptotermes brevis* (Walker) e os fungos apodrecedores *Pycnoporus sanguineus* (Pers. Ex Fr.) Murr. (podridão branca), da Belgian Coordinated Culture Collection BCCC nº 30513, *Gloeophyllum trabeum* (Pers.) Murrill (podridão parda), da American Type Culture Collection ATCC nº 11539 e *Chaetomium globosum* Kunze ex Fries (podridão mole), da ATCC nº 6205.

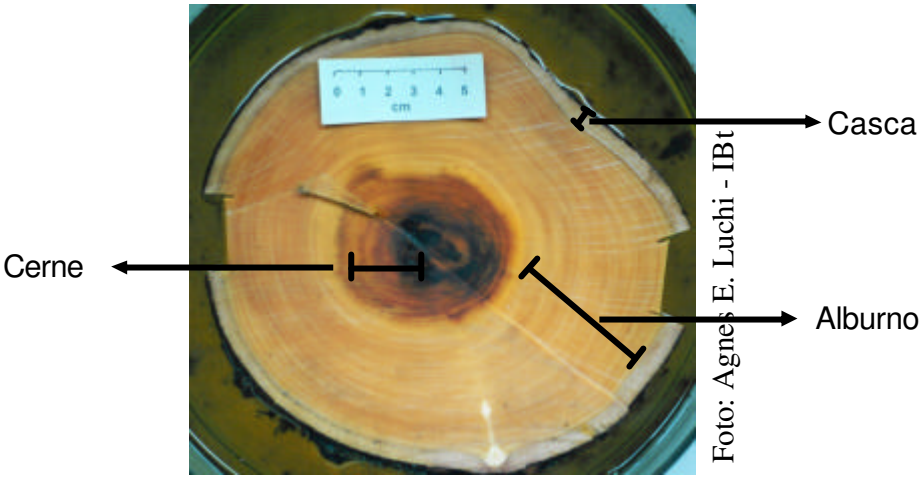


Figura 8 Disco de tronco de pau-brasil (*Caesalpinia echinata*), procedente da Reserva Biológica da Estação Experimental de Moji-Guaçu-SP, com indicação das diferentes partes que o compõem.

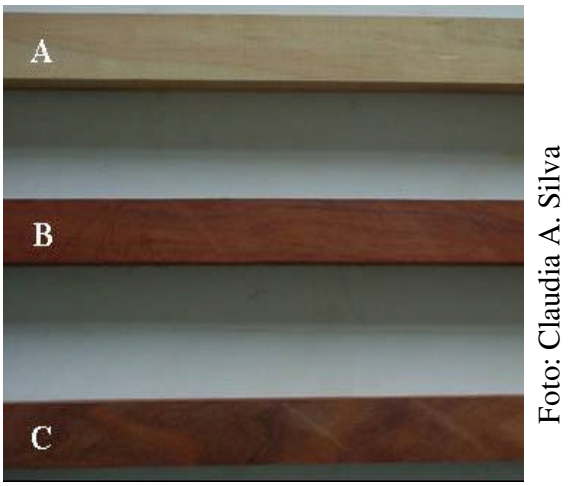


Figura 9. Ripas de madeira. A: *Pinus elliotti* (pinus); B: Cerne de *Eucalyptus grandis* (eucalipto); C: Cerne de *Anadenathera macrocarpa* (angico-preto) (C) utilizadas no trabalho.

2. METODOLOGIA

2.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Porções do tronco de plantas de pau-brasil e de ripas de pinus, eucalipto e angico-preto foram secas em estufa a 60 ºC até peso constante. Da madeira de pau-brasil foram separados manualmente, com o auxílio de uma talhadeira, o alburno, o cerne e a casca. Parte dos materiais do alburno e do cerne foi utilizada para a confecção de corpos-de-prova destinados às análises anatômicas (item 2.2) e aos ensaios de degradação por organismos xilófagos (item 2.6) e o restante foi moído em micromoinho de facas, separadamente, obtendo-se pós que foram utilizados para as análises bioquímicas. A casca também foi utilizada para análises relativas ao teor de extrativos (item 2.3) e Lignina de Klason (item 2.5.1).

2.2. ANÁLISES ANATÔMICAS E MICROQUÍMICAS

Corpos-de-prova de três indivíduos de pau-brasil e de três indivíduos de pinus, eucalipto e angico-preto (item 2.1) com dimensões de aproximadamente 3,0 X 2,0 X 2,0 cm foram submetidos a autoclavagem em água destilada por 1 h, a 1 atm e 121 ºC, para amolecimento. A partir desse material foram obtidas secções transversais de 18-20 µm de espessura em micrótomo de deslize Leica SM 2000R e estas submetidas à reação de Maüle (Yoshizawa *et al.* 1993), que indica a presença de ligninas do tipo guaiacil (G) e siringil (S) nas amostras. Gotas de uma solução aquosa de permanganato de potássio a 1% foram aplicadas sobre as secções e estas incubadas por 5 minutos. Após lavagem em água destilada, foram adicionadas gotas de ácido clorídrico 3% por 1 minuto, seguidas de lavagem e de gotas de amoníaco 29% por 1 minuto. As lâminas foram montadas em glicerina

70% e cobertas com lamínula. As secções foram observadas sob microscópio fotônico Carl Zeiss Jenamed 2 e fotografadas.

2.3. OBTENÇÃO DOS EXTRATIVOS

Os pós das madeiras (item 2.1) foram pesados e submetidos à extração exaustiva com etanol comercial (92%) de forma automática em extrator ASE 300 (Dionex), a temperatura ambiente, para a obtenção dos extrativos. Os resíduos das extrações foram lavados com água destilada para completa eliminação do etanol e posterior secagem em estufa a 60 ºC, até peso constante, e utilizados para a obtenção das paredes celulares (item 2.4) e para extração e quantificação de lignina (item 2.5). Os extrativos foram evaporados em evaporador rotatório a pequeno volume, secos em banho-maria a 50 ºC até evaporação completa do etanol, sendo posteriormente pesados para cálculo do rendimento e armazenados em congelador. Alíquotas dos extrativos foram analisadas quanto à presença de açúcares álcoois (item 2.3.1).

2.3.1. ANÁLISE DE AÇÚCARES ÁLCOOIS NOS EXTRATIVOS POR CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (GC/ MS)

A análise a seguir foi efetuada pelo Dr. Andreas A. Richter, do Department of Chemical Ecology & Ecosystem Research, University of Vienna, Áustria.

Vinte miligramas de cada extrativo foram colocados em tubos com tampa de rosca com 500 µL de uma solução contendo metanol:clorofórmio:água (12:5:1) e o padrão interno fenil-β-D–glucopiranosídeo; estes foram mantidos em

banho-maria por 30 minutos a 60 ºC, sendo agitados a cada 10 minutos. Após centrifigação em centrífuga de mesa a 5500 *g*, 350 µL dos sobrenadantes foram transferidos para um tubo eppendorff com 350 µL de água deionizada. Após agitação, os tubos permaneceram em repouso por 5 minutos e foram novamente centrifugados. Após centrifugação, 200 µL da fase superior foram transferidos para frascos especiais para cromatografia a gás. As amostras foram secas em evaporador do tipo Speedvac por 2 h e mantidas em dessecador com pentóxido de fósforo por 14 h, até completa secagem, estando então prontas para sililação. Em cada frasco foram adicionados 150 µL de piridina anidra Merck e estes imediatamente fechados. Com uma seringa com êmbolo de teflon foram adicionados 50 µL de N, O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) e trimetil-chlorosilano (TMCS) na proporção 10:1 em cada frasco, sendo estes lacrados imediatamente. Os frascos foram agitados e mantidos em bloco aquecedor a 75 ºC por 1 h. Cerca de 2 µL deste material foram aplicados em cromatógrafo a gás acoplado a um detector de massas Agilent equipado com uma coluna HP 5 MS (30,0 m X 250 µm X 0,23 µm nominal). Hélio foi utilizado como gás de arraste, com velocidade média de 46 cm/s. A temperatura inicial da coluna foi de 130 ºC por 2 minutos, aumentando 8 ºC por minuto até 320 ºC, mantendo esta temperatura por 2 minutos (total: 28 minutos). O injetor foi utilizado no modo "splitless" a 275 ºC. Os açúcares foram identificados por comparação de seus espectros de massas com os de padrões comerciais sililados existentes na biblioteca Wiley (Hoch *et al*. 2003).

2.4. EXTRAÇÃO, FRACIONAMENTO E ANÁLISE DE POLISSACARÍDEOS DA PAREDE CELULAR

2.4.1. OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DAS PAREDES CELULARES

Os resíduos obtidos após extração hidroalcoólica (item 2.3) foram homogeneizados em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5 por 2 minutos, filtrados em náilon "pele de ovo", e lavados seqüencialmente com clorofórmio:metanol (1:1 v/v), acetona e éter (1 mL de solventes/ mg de pó de madeira), sendo os filtrados descartados. Na seqüência, os resíduos foram secos em estufa a 60 ºC até peso constante e pesados. A ausência de amido foi confirmada através da coloração de alíquotas das paredes celulares com a solução de iodo/ iodeto de potássio. Esse material foi considerado como o rendimento bruto da parede celular.

Para o fracionamento da parede celular foi utilizado o método descrito por Gorshkova *et al*. (1996), com algumas modificações. Cerca de 500 mg de parede celular foram extraídos (2X) em triplicatas com solução (4 mg/ mL) de oxalato de amônio 0,5 %, pH 7,0, a 100 ºC por 1 h, sendo os resíduos coletados por centrifugação a 2700 *g* por 15 minutos a 25 ºC. Os sobrenadantes resultantes foram combinados, dialisados contra água destilada, submetidos a dosagens de carboidratos (item 4.2) e liofilizados, constituindo a **fração oxalato de amônio**, que contém pectinas. Os resíduos dessa extração foram submetidos ao processo de deslignificação, em banho maria a 70 ºC por 2 h, usando clorito de sódio e ácido acético, conforme descrito por Moraes *et al.* (2001). A **fração clorito de sódio**, que pode conter pectinas, foi dialisada, avaliada quanto ao teor de carboidratos e liofilizada. Os resíduos deslignificados foram submetidos a duas extrações seqüenciais com hidróxido de sódio 0,2 M contendo 3 mg/ mL de boroidreto de sódio (4 mg/ mL), a temperatura ambiente (1h e 14 horas), resultando na **fração solúvel em álcali fraco** (que contém hemiceluloses fracamente ligadas à celulose). Os resíduos dessa extração foram submetidos a

duas extrações seqüenciais em hidróxido de sódio 4 M contendo 3 mg/ mL de boroidreto de sódio em temperatura ambiente (1h e 14 horas) para a obtenção da **fração solúvel em álcali forte** (que contém hemiceluloses fortemente ligadas à celulose). Estas frações também foram reunidas, dialisadas, quantificadas quanto ao teor de carboidratos e liofilizadas. Após a extração com hidróxido de sódio 4 M, os resíduos (celulose) foram neutralizados, lavados em água destilada, liofilizados e pesados, sendo considerados como α-celulose.

2.4.2. QUANTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS

Os açúcares totais presentes nas diferentes frações das paredes celulares foram quantificados pelo método do fenol-sulfúrico (Dubois *et al.* 1956), sendo usada glucose (100 μg/ mL) como padrão. Os ácidos urônicos livres ou ligados foram quantificados pelo método do *m*-hidroxibifenil (Filisetti-Cozzi & Carpita 1991), sendo utilizado como padrão ácido galacturônico (100 μg/ mL).

2.4.3. ANÁLISE DE MONOSSACARÍDEOS NEUTROS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPAEC/ PAD)

Cerca de 5 a 10 mg das frações não celulósicas (oxalato, clorito, álcali fraco e álcali forte) das paredes celulares obtidas no item 2.4.1 foram hidrolisadas com ácido trifluoroacético 2 N a 121 ºC por 1 h, em autoclave. O ácido foi eliminado por evaporação total em evaporador rotatório e os hidrolisados foram ressuspensos em água deionizada. A fração de α-celulose (5-10 mg), foi hidrolisada com ácido sulfúrico 72 %, por incubação em banho-maria a 30 ºC por 45 minutos, diluído sequencialmente a 4 % com adição de água destilada e autoclavagem por 1 h a 121 ºC. O material foi neutralizado com hidróxido de sódio a 50 %. Todos os hidrolisados ácidos foram recolhidos e analisados quanto à presença de monossacarídeos neutros por cromatografia de troca aniônica de alto desempenho com detecção por pulso amperométrico (HPAEC/ PAD) em sistema

Dionex DX 500, coluna CarboPac PA 1, em eluição isocrática com hidróxido de sódio 20 mM por 40 minutos (1 mL/ min). Os perfis de eluição dos monossacarídeos presentes nos hidrolisados foram comparados com aqueles obtidos para padrões de monossacarídeos comerciais (Simões *et al.* 2005, modificado).

2.5. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE LIGNINAS

2.5.1. LIGNINA DE KLASON

Dez miligramas dos resíduos da extração hidroalcoólica das madeiras (item 2.3) foram suspensos em 100 µL de ácido sulfúrico 72 % e incubados em banho-maria a 30 ºC por 45 minutos. Após incubação, o material foi diluído a 4 % em água destilada e autoclavado por 1 h a 121 ºC. O hidrolisado foi recolhido e o resíduo lavado exaustivamente em água destilada fervida e liofilizado, seco em estufa a 60 ºC até peso constante e sendo posteriormente pesado. Este resíduo foi denominado lignina de Klason (Hatfield *et al.* 1994, modificado). Os sobrenadantes dessa hidrólise com ácido sulfúrico 72% tiveram seu teor de ácidos urônicos quantificado (item 2.4.2) e foram analisados por HPAEC/PAD, conforme descrito no item 2.4.3.

2.5.2. LIGNINA DIOXANO

Cerca de 5g dos diferentes resíduos obtidos após extração hidroalcoólica (item 2.3) foram extraídos com 100 mL de uma solução ácida de Dioxano 0,2 N em HCl em manta aquecedora com ebulição suave, por 30 minutos. O material foi filtrado a vácuo em filtro de fibra de vidro Whatman (45 µm), sendo o resíduo descartado e o sobrenadante neutralizado com 4 g de bicarbonato de sódio e novamente filtrado, porém com a inclusão de uma membrana de náilon Whatman (45 µm). O material foi concentrado em evaporador rotatório até volume

de 15-20 mL, em banho-maria a 40 ºC, sendo novamente filtrado. Esse material foi adicionado, gota a gota, em água destilada sob forte agitação, para ocorrer a precipitação da lignina e na seqüência centrifugado a 3000 *g* por 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi aquecido em estufa ventilada (60 ºC) por 40-45 minutos para eliminação do excesso de água. O resíduo foi dissolvido em Dioxano puro e novamente filtrado. Em seguida, esta solução foi gotejada em éter etílico anidro sob agitação e centrifugada a 3000 *g* por 20 minutos. Este procedimento foi repetido por mais 2 vezes para melhor purificação da lignina. Imediatamente, foi adicionado éter de petróleo ao resíduo, e este foi novamente centrifugado. Após a centrifugação, o éter foi descartado e o material foi mantido em capela por uma noite para evaporação completa do éter residual. Após secagem, em estufa a 60 ºC por 24 h, o material foi pesado e denominado Lignina Dioxano (Fukushima & Hatfield 2001). Os sobrenadantes obtidos dessa extração foram analisados por HPAEC/ PAD, conforme descrito no item 2.4.3.

2.6. ENSAIOS DE BIODETERIORAÇÃO POR ORGANISMOS XILÓFAGOS

2.6.1. CUPINS

Este ensaio foi realizado no Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT, São Paulo), sob responsabilidade do Biólogo Gonzalo Antônio Carballera Lopez, do Laboratório de Preservação de Madeiras e Biodeterioração de Materiais.

Os corpos-de-prova de pau-brasil, eucalipto e angico-preto (item 2.1) foram obtidos manualmente a seco. Com dimensões de 2,3 x 0,6 x 7,0 cm, em pares, foram colocados em contato com 40 indivíduos da espécie *Cryptotermes brevis*, na razão de 38 operários e 2 soldados (**Figura 10**), em 6 replicatas. A avaliação foi feita comparativamente com corpos-de-prova de madeira de pinus, considerada altamente suscetível ao ataque de cupins, sob condições laboratoriais idênticas. O ensaio foi instalado em câmara climatizada, sob a temperatura de 27 ºC e umidade relativa de 70 %, por um período de 45 dias, com as observações

sendo efetuadas em intervalos periódicos. Ao término do ensaio foi registrada a porcentagem de cupins mortos, bem como atribuídas notas para o desgaste produzido. As notas variaram de 0 (zero) a 4 (quatro), com a seguinte relação: 0 = nenhum dano; 1 = dano superficial; 2 = dano moderado; 3 = dano acentuado; e 4 = dano profundo – correspondente ao desgaste observado na testemunha. A variável de resposta analisada foi o dano provocado pelos cupins (Gonçalves & Oliveira 2006).

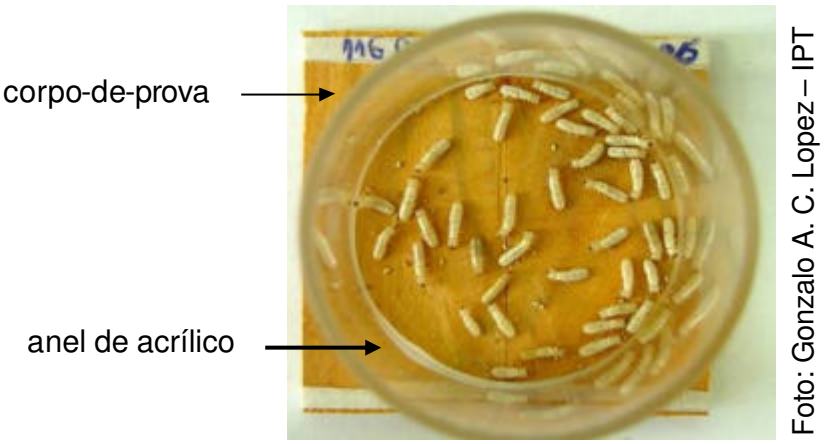


Figura 10. Ensaio de biodeterioração de corpo-de-prova de madeira de pau-brasil por cupins (*Cryptotermes brevis*).

2.6.2. FUNGOS CAUSADORES DE PODRIDÕES BRANCA E PARDA

Estes ensaios foram realizados no IPT sob responsabilidade da Bióloga Maria Beatriz B. Monteiro, do Laboratório de Preservação de Madeiras e Biodeterioração de Materiais e consistiram na exposição dos corpos-de-prova das madeiras estudadas a culturas puras de fungos apodrecedores, causadores de podridão branca e parda, utilizando-se o método "mini-agar-block" (Monteiro 1997).

Corpos-de-prova de pau-brasil, pinus, eucalipto e angico-preto, com dimensões de 8 X 8 X 3 mm foram condicionados em câmara climatizada a aproximadamente 18º C e 75% UR até massa constante, pesados para

determinação de sua massa inicial e esterilizados em autoclave. Paralelamente, foram preparadas placas de Petri contendo meio de cultura composto por malte a 2 % em ágar, sendo cada uma delas inoculada com o fungo *Pycnoporus sanguineus*, causador de podridão branca ou com *Gloeophyllum trabeum,* fungo causador de podridão parda.

Seis dias após a inoculação das placas, os corpos-de-prova de pau-brasil, pinus, eucalipto e angico-preto, esterilizados, foram colocados em 8 placas de Petri, em número de 4 por placa, em contato direto com o meio de cultura, na zona limite de crescimento do fungo (**Figura 11**). As placas foram fechadas e seladas com uma fita adesiva semipermeável, para evitar contaminação por ácaros, fungos oportunistas e bactérias, e incubadas em câmara climatizada a uma temperatura de 26,7 ± 1 ºC e umidade relativa de 70 ± 5 %, durante 16 semanas. Ao final do ensaio, os corpos-de-prova foram, então, removidos das placas de Petri e lavados sob água corrente, secos em estufa e pesados para determinação de sua massa final. A avaliação da deterioração dos corpos-de-prova foi feita por meio da determinação da perda de massa, expressa em porcentagem, devida à atividade de cada espécie fúngica.

Foto: Maria Beatriz B. Monteiro - IPT.

Figura 11. Ensaio de biodeterioração de corpos-de-prova de madeira por fungo de podridão branca (*Pycnoporus sanguineus*).

2.6.3. FUNGO CAUSADOR DE PODRIDÃO MOLE

Estes ensaios foram realizados no IPT sob responsabilidade da Bióloga Maria Beatriz B. Monteiro e consistiram na exposição dos corpos-de-prova a culturas puras do fungo apodrecedor *Chaetomium globosum*, causador da podridão mole na madeira, e seguiu os procedimentos detalhadamente descritos por Brazolin (1998).

Dois tubos de ensaio do fungo, contendo massa micelial e corpos de frutificação foram utilizados para obtenção da suspensão de esporos. Esta suspensão foi feita adicionando-se água esterilizada com 0,05 % de tergitol (agente surfactante) aos tubos de ensaio e esfregando-se a superfície da colônia do fungo com uma alça de platina. A suspensão de esporos (0,5 mL) foi inoculada em placas de Petri e estas incubadas por cerca de 48 horas a 32º C e 90 % de umidade relativa para crescimento micelial do fungo. Corpos-de-prova de pau-brasil, pinus, eucalipto e angico-preto, nas dimensões de 10 x 10 x 2 mm foram condicionados em câmara climatizada a aproximadamente 18º C e 75% UR até massa constante, pesados para determinação de sua massa inicial. Quatro repetições de cada madeira foram utilizadas para cada fungo. Após pesagem, os corpos-de-prova foram flambados para esterilização superficial, colocados em 10 placas de Petri inoculadas com o fungo e o conjunto incubado novamente a 32 ºC e 90% de umidade relativa por 16 semanas. Ao final deste período, os corpos-de-prova foram lavados cuidadosamente em água corrente, secos em estufa por 24 horas e obtidas as suas massas secas finais. A avaliação da deterioração dos corpos-de-prova foi feita por meio da determinação da perda de massa, expressa em porcentagem, devida à atividade do fungo.

2.6.4. ANÁLISE DA DEGRADAÇÃO DA PAREDE CELULAR POR ORGANISMOS XILÓFAGOS

Os corpos-de-prova provenientes dos ensaios de biodeterioração por fungos causadores de podridões parda, branca e mole (itens 2.6.2 e 2.6.3) foram secos em estufa até peso constante e lixados para separar a porção degradada pelos fungos. Os pós resultantes foram submetidos à extração etanólica (conforme descrito no item 2.3) para a obtenção dos extrativos e posterior determinação da composição dos açúcares solúveis e dos açúcares álcoois por GC/MS (conforme descrito no item 2.3.1). O resíduo foi hidrolisado com ácido sulfúrico 72 % para posterior análise da composição de monossacarídeos da parede celular por HPAEC/ PAD (conforme descrito no item 2.4.3).

Hifas dos fungos causadores de podridões, mantidas em meio malte a 2% em ágar, foram submetidas à análise da composição de açúcares solúveis e álcoois por GC/MS (conforme descrito no item 2.3.1) para fins de controle.

2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos nas análises dos extrativos, ligninas e polissacarídeos de parede celular foram submetidos à análise de variância por ANOVA ($p < 0,05$), utilizando-se programa WinSTAT for Excel. Os resultados dos ensaios com organismos xilófagos foram submetidos à análise de variância pelo programa Statistica 5.1, 97 Edition (Statsoft).

RESULTADOS

1. TEOR DE EXTRATIVOS E PRESENÇA DE AÇÚCARES ÁLCOOIS

Na **Figura 12** são apresentados os teores de extrativos solúveis em etanol encontrados nas madeiras de pau-brasil e naquelas utilizadas para fins de comparação. Nota-se que as madeiras de angiospermas apresentaram maior teor, perfazendo cerca de 12% do peso seco, quando comparadas à madeira de pinus (gimnosperma), com rendimento ao redor de 2%.

Não foram observadas diferenças significativas no teor de extrativos entre o cerne de pau-brasil e as demais madeiras de angiospermas estudadas. Usualmente o alburno contém pouca quantidade de extrativos, porém para pau-brasil o alburno excepcionalmente apresentou quantidades muito próximas daquelas encontradas no cerne. A casca de pau-brasil, por sua vez, apresentou maior teor de extrativos quando comparada às demais, mas não diferiu daquele encontrado para o cerne da própria planta. Não foi possível a comparação com a casca das outras madeiras, uma vez que destas foram utilizadas ripas comerciais.

Na **Figura 13** são mostrados os teores de açúcares solúveis e açúcares álcoois encontrados nos extrativos das madeiras analisadas. Para o pau-brasil foram observadas grandes quantidades de sacarose, frutose e glucose no alburno, quando comparado às demais amostras. Para as outras madeiras esses açúcares foram encontrados em quantidades cerca de 10 vezes menor, como em eucalipto e angico-preto ou, praticamente, não foram detectados, como observado no cerne de pau-brasil e em pinus **(Figura 13 A)**. Esses açúcares eram esperados e estão relacionados às características distintas presentes no cerne e no alburno.

Em relação aos açúcares álcoois **(Figura 13 B)**, o alburno de pau-brasil foi a parte da madeira que apresentou maior conteúdo, havendo predomínio quase exclusivo de pinitol, seguido de quantidades bem menores de *chiro*-inositol e galactopinitol B. Em eucalipto, *chiro*-inositol e galactopinitol B foram observados em quantidades similares, enquanto em angico-preto foram encontrados pinitol e

galactopinitol A. *mio*-Inositol foi detectado apenas em pequenas quantidades nas madeiras, exceto em pinus e no cerne de pau-brasil, nos quais foi encontrado apenas galactopinitol B.

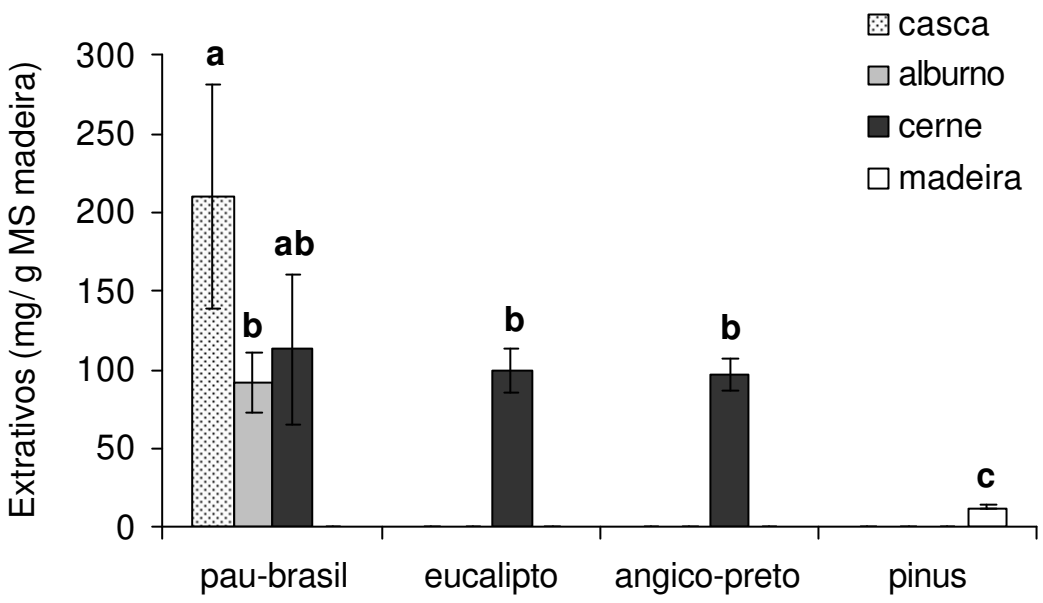


Figura 12. Teor de extrativos (mg/ g massa seca de madeira) encontrado nas madeiras de pau-brasil, eucalipto, angico-preto e pinus. As barras representam o desvio padrão da média de triplicatas. Barras acompanhadas de letras iguais não diferem significativamente por Tukey a 5%.

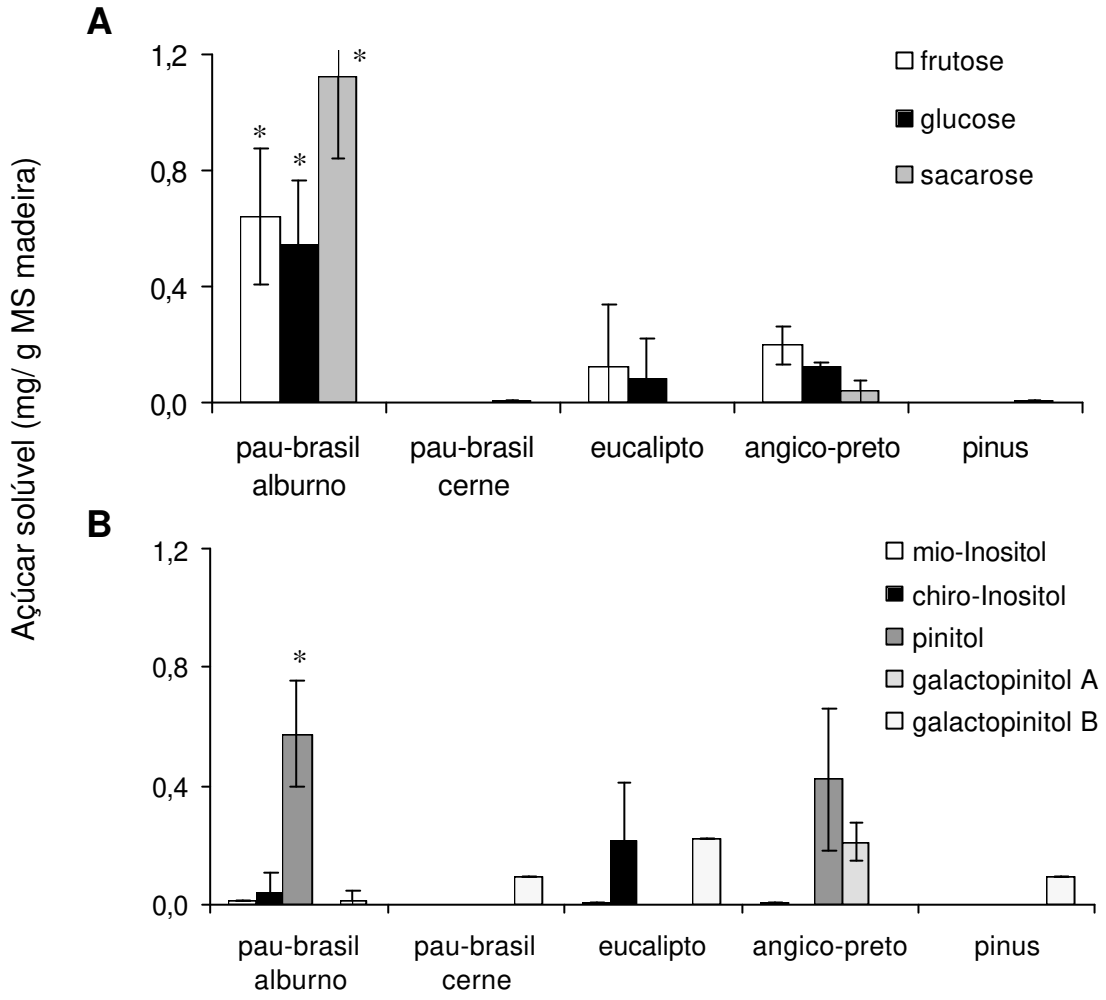


Figura 13. Conteúdo (mg/ g massa seca de madeira) de açúcares solúveis (A) e de açúcares álcoois (B) em extratos hidroalcóolicos de alburno e cerne de pau-brasil, cernes de eucalipto e de angico-preto e madeira de pinus. As barras representam o desvio padrão da média de triplicatas. * valor dividido por 3 para melhor visualização.

2. CONTEÚDO DE LIGNINA

2.1. LIGNINA DE KLASON

Lignina de Klason (LK) é o resíduo ácido insolúvel resultante da solubilização/ hidrólise dos polissacarídeos da parede celular. Após a hidrólise com ácido sulfúrico, em duas etapas, a LK é considerada como a diferença, em peso, do resíduo antes e após a hidrólise.

Na **Tabela 1** encontram-se as estimativas dos teores de LK das madeiras analisadas. O maior valor foi encontrado em eucalipto, diferindo significativamente daquele observado para o alburno e casca de pau-brasil, mas não das demais madeiras. Não foram observadas diferenças significativas entre o cerne e alburno de pau-brasil, embora este último tenha mostrado média inferior quando comparado às demais madeiras. A casca de pau-brasil mostrou o menor valor dentre as amostras analisadas. Esses valores representam entre 50 a 70% das paredes celulares, sendo bastante superiores ao usualmente encontrado em madeiras.

Tabela 1. Teor de Lignina de Klason (mg/ g massa seca de madeira) presente em diferentes partes da madeira de pau-brasil e nas madeiras comerciais de eucalipto, angico-preto e pinus.

Madeira		Lignina de Klason* mg/ g MS de madeira	
Pau-brasil	casca	500 ± 50	**a**
	alburno	650 ± 50	**b**
	cerne	700 ± 0	**bc**
Eucalipto	cerne	766 ± 22	**c**
Angico-preto	cerne	719 ± 28	**bc**
Pinus	madeira	709 ± 68	**bc**

* Médias de três determinações. Valores seguidos de letras iguais não mostram diferenças significativas por Tukey a 5%.

Os teores de ácidos urônicos presentes nos hidrolisados de parede celular das madeiras **(Tabela 2)** foram semelhantes para o alburno e cerne de pau-brasil e para o cerne de eucalipto, sendo próximos a 4%. Em pinus o valor encontrado foi bastante inferior, cerca de 50%, indicando menor proporção de polissacarídeos pécticos nas suas paredes celulares.

A análise por HPAEC/PAD dos monossacarídeos presentes nos sobrenadantes obtidos após hidrólise dos polissacarídeos com ácido sulfúrico 72% para determinação da LK está mostrada na **Tabela 2**. Esses dados permitem uma avaliação prévia da composição bruta da parede celular, indicando quais monossacarídeos serão encontrados nas amostras resultantes de seu fracionamento. Xilose foi o monossacarídeo predominante nas madeiras de angiospermas, variando de 50,3–81,5%, seguido de glucose (5,3-26%), galactose (5,2-10,5%) e arabinose (1,6-7,9%). Em pau-brasil, o teor de xilose foi superior no cerne quando comparado ao alburno. Diferentemente das demais amostras

analisadas, a madeira de pinus apresentou um alto teor de manose, sendo também encontrada, em menores quantidades, no cerne de angico-preto. Baixos teores de ramnose foram observados em pinus e angico-preto, indicando que deve haver pequena proporção de polímeros pécticos em suas estruturas, o que é corroborado pela menor proporção de ácidos urônicos encontrada nos hidrolisados. Quantidades maiores de ramnose foram observadas no alburno e no cerne de pau-brasil.

Tabela 2. Porcentagem relativa de ácidos urônicos e de monossacarídeos neutros presentes nos hidrolisados das madeiras após a obtenção da Lignina de Klason.

Madeira		% relativa * Ácidos urônicos	Ram	Ara	Gal	Glc	Xil	Man
Pau-brasil	alburno	3,8	7,8	3,9	8,4	26,0	50,3	-
	cerne	4,1	5,2	5,0	8,3	19,8	57,6	-
Eucalipto	cerne	3,9	1,2	1,6	5,2	6,6	81,5	-
Angico-preto	cerne	3,2	0,4	7,9	10,5	5,3	70,2	2,6
Pinus	madeira	1,8	0,2	14,7	22,3	13,7	15,4	32,0

* Médias de triplicatas. Ram: ramnose; Ara: arabinose; Gal: galactose; Glc: glucose; Xil: xilose; Man: manose. -: não detectado. Valores calculados através das áreas apresentadas pelos monossacarídeos nos cromatogramas.

2.2. LIGNINA DIOXANO

Considerando-se que a determinação de Lignina de Klason apresentou valores superestimados, também foi efetuada a extração de lignina com Dioxano (LDiox). Este método, proposto por Fukushima & Hatfield (2001), e baseado na extração da lignina com uma solução ácida de dioxano, apresenta, segundo os autores, vantagens em relação à LK, como menor contaminação por carboidratos e ausência de grupos acetato, porém é mais indicado para análises quantitativas da lignina.

O aspecto geral das LDiox obtidas para pau-brasil e as outras madeiras analisadas é mostrado na **Figura 14**. É interessante destacar que a coloração da LDiox assemelhou-se àquela presente nas diferentes madeiras analisadas, variando de róseo e amarelo para aquelas extraídas de alburno de pau-brasil **(Figura 14 A)** e madeira de pinus **(Figura 14 E)** e entre marrom e vermelho para aquelas extraídas do cerne das madeiras de angiospermas **(Figuras 14 B, C, D)**.

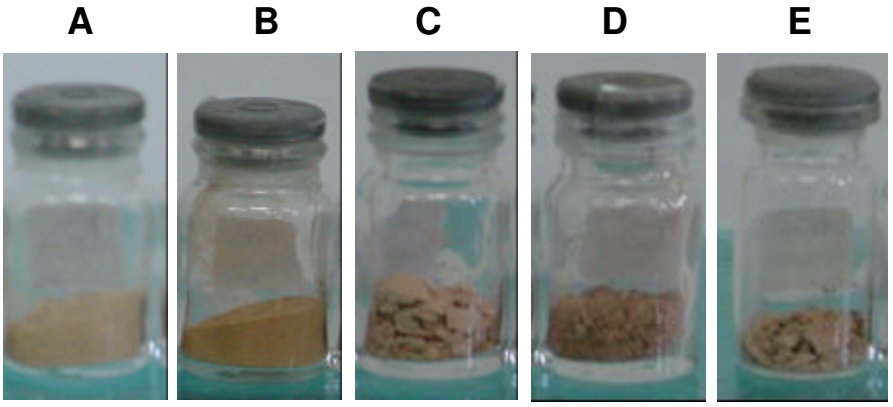


Figura 14. Aspecto final da Lignina Dioxano extraída de alburno (A) e cerne (B) de pau-brasil, cerne de eucalipto (C), cerne de angico-preto (D) e madeira de pinus (E).

Como pode ser observado pela **Tabela 3**, os valores de LDiox foram muito inferiores àqueles obtidos para Lignina de Klason **(Tabela 1)**, além de mostrarem algumas discrepâncias. O maior teor de lignina foi encontrado para o cerne de pau-brasil, embora este não difira significativamente do alburno e daquele encontrado no cerne de eucalipto. A madeira de pinus apresentou a menor proporção de LDiox em relação às demais madeiras analisadas **(Tabela 3)**. Os valores obtidos representam menos do que 10% das paredes celulares.

Tabela 3. Teor de Lignina Dioxano (mg/ g massa seca de madeira) encontrado nas madeiras analisadas.

		Lignina Dioxano *
Madeira		mg/ g MS madeira
Pau-brasil	alburno	85 ± 14 **ab**
	cerne	91 ± 6 **a**
Eucalipto	cerne	83 ± 4 **ab**
Angico-preto	cerne	73 ± 9 **b**
Pinus	madeira	51 ± 12 **c**

* Médias de três determinações. Valores seguidos de letras iguais não mostram diferenças significativas por Tukey a 5%.

De maneira geral, o teor de ácidos urônicos obtidos nos hidrolisados da lignina extraída com dioxano **(Tabela 4)** foi menor quando comparado aos valores obtidos nos hidrolisados para determinação de Lignina de Klason **(Tabela 2)**, exceto para a o alburno de pau-brasil e madeira de pinus, que mostraram quantidades similares em ambas as análises.

Tabela 4. Porcentagem relativa de ácidos urônicos e de monossacarídeos neutros encontrada na Lignina Dioxano extraída das madeiras analisadas.

Madeira	% relativa	Ácidos urônicos	Ram	Ara	Gal	Glc	Xil/ Man
Pau-brasil	alburno	3,7	-	10,9	12,5	15,6	57,4
	cerne	3,4	1,3	7,5	11,7	15,2	60,9
Eucalipto	cerne	2,2	-	1,5	9,5	9,9	76,9
Angico-preto	cerne	2,6	-	10,1	18,2	12,1	56,9
Pinus	madeira	1,4	-	6,6	20,9	32,5	38,3

Ram: ramnose; Ara: arabinose; Gal: galactose; Glc: glucose; Xil: xilose; Man: manose. - não detectado. Valores calculados através das áreas apresentadas pelos monossacarídeos nos cromatogramas.

A análise por HPAEC/ PAD da fração de LDiox para detecção dos carboidratos contaminantes encontra-se também na **Tabela 4**. Nesta análise não foi possível separar os açúcares xilose e manose, que co-eluiram como um único pico no cromatograma. Pode-se observar que o componente majoritário é a xilose/manose em todas as amostras. Considerando-se os dados mostrados na **Tabela 2**, pode-se sugerir que a xilose deve ser o componente principal das madeiras das angiospermas estudadas, exceto em pinus, cuja manose foi observada em maiores proporções. Glucose, galactose e arabinose também foram encontradas, porém em proporções diferentes daquelas mostradas na **Tabela 2**. Tais discrepâncias se devem, provavelmente, à perda diferencial de componentes da parede celular nos dois procedimentos utilizados para a extração de ligninas.

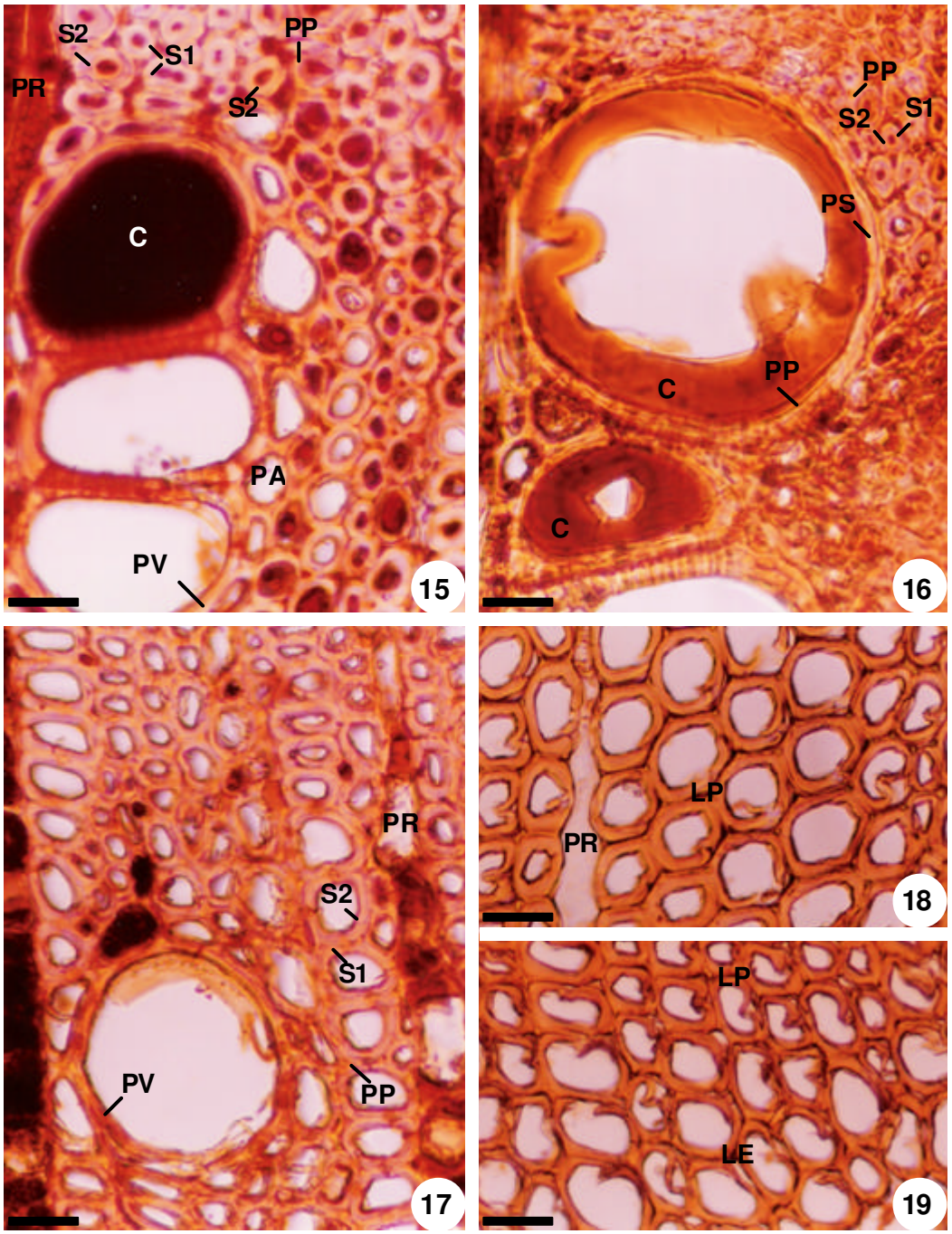
:

2.3. DETECÇÃO DE LIGNINA *IN SITU*

As amostras de madeira utilizadas neste trabalho foram submetidas ao tratamento com reagente de Maüle para visualização de ligninas. Para fins de comparação utilizou-se, também, uma amostra de cerne de pau-brasil oriunda da Bahia, local de sua ocorrência natural.

As fotomicrografias de secções transversais das amostras do cerne de pau-brasil procedentes da Bahia, de angico-preto, eucalipto e da madeira de pinus, após reação de Maüle, encontram-se nas **Figuras 15-19**. Tais secções mostram que as paredes celulares dos elementos de vaso e das fibras de pau-brasil (**Figura 15**), angico-preto (**Figura 16**) e eucalipto (**Figura 17**) reagiram de forma distinta ao reativo de Maüle quando comparadas àquelas de pinus (**Figuras 18, 19**).

Em pau-brasil (**Figura 15**), as paredes celulares das fibras apresentam-se coradas em castanho claro a amarelado na camada interna (S2), em diferentes tonalidades de rosa na camada intermediária (S1) e em tom castanho amarelado brilhante na sua camada mais externa (parede primária-PP), o que indica deposição diferencial de ligninas do tipo siringil (S) e guaiacil (G). Em várias fibras é possível notar a coloração diferenciada das duas camadas da parede celular secundária, S1 e S2 (**Figura 15**). Nos elementos de vaso, as camadas S1 e S2 apresentam-se em tom castanho amarelado, com a tonalidade rosa praticamente ausente, enquanto a parede primária é de difícil visualização e mostra a mesma tonalidade que os demais elementos celulares. O elemento de vaso pode se apresentar obliterado, com conteúdo de coloração castanho-avermelhada, juntamente com as células parenquimáticas (radiais e axiais) e fibras com conteúdo de mesma cor e com paredes celulares coradas em castanho amarelado brilhante (**Figura 15**).



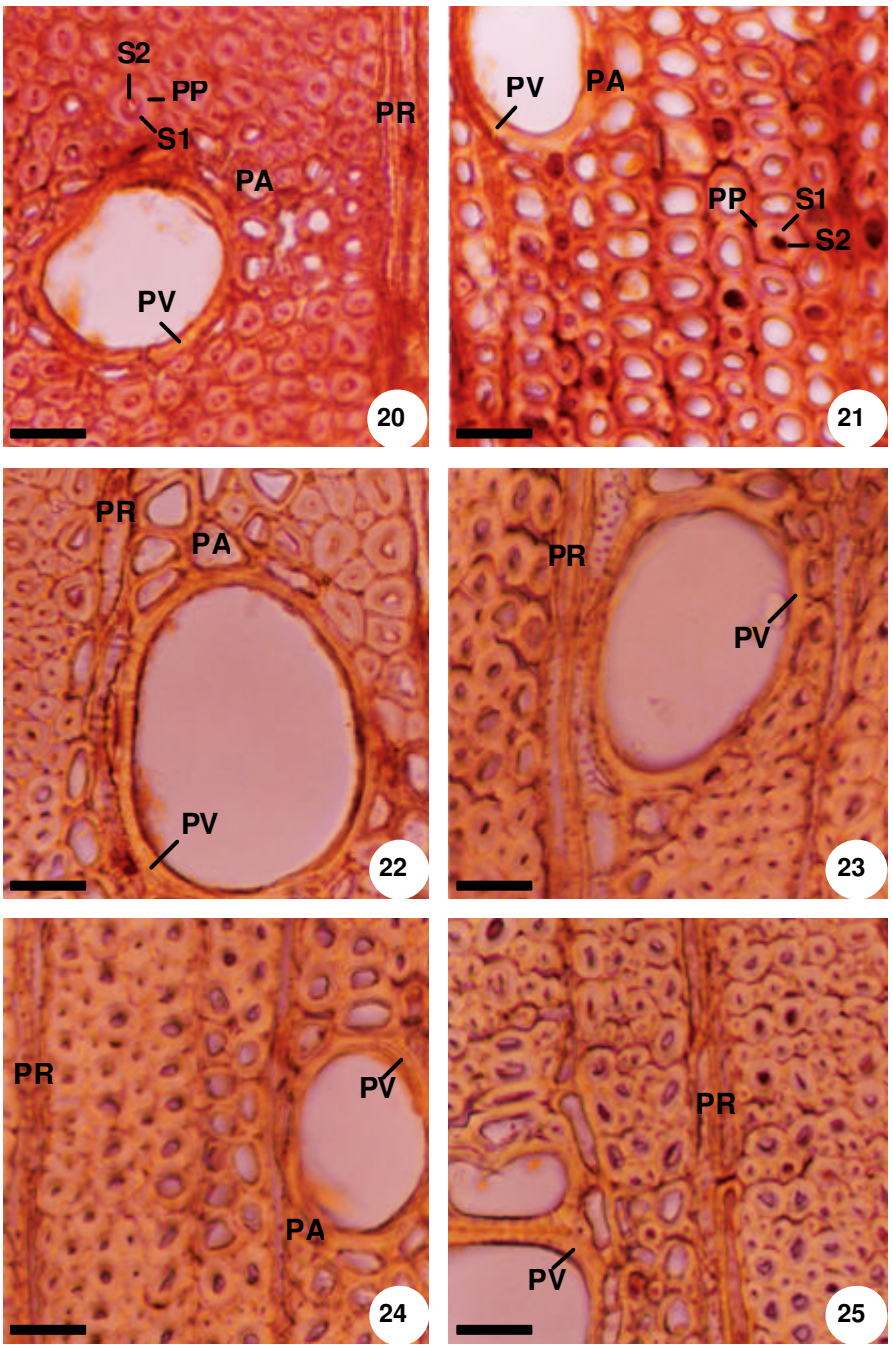
Figuras 15-19. Fotomicrografias de secções transversais de cerne de pau-brasil oriundo da Bahia (Figura 15), angico preto (Figura 16), eucalipto (Figura 17) e madeira de pinus (Figuras 18, 19) após reação de Maüle. C: conteúdo castanho-avermelhado; LE: lenho estival; LP: lenho primaveril; PA: parênquima axial; PP: parede primária; PR: parênquima radial; OS: parede secundária; PV: parede do vaso; S1: camada S1; S2: camada S2. Barra: 25µm.

Na amostra de lenho de angico-preto (**Figura 16**) notam-se elementos de vaso com conteúdo de cor marrom a castanho escuro, cuja parede primária (PP) se cora em amarelo brilhante e a parede secundária (PS) em marrom-amarelado. As fibras apresentam paredes celulares espessadas coradas em tom róseo (S1), indicando maior proporção de lignina do tipo S.

Em eucalipto (**Figura 17**), a parede do elemento de vaso (PV) apresenta-se, também, corada em tom marrom amarelado. As paredes primárias das fibras possuem coloração amarelo brilhante. Nesses elementos celulares, a camada S2 se apresenta em tom róseo mais intenso que a S1, o que difere do observado para o lenho de pau-brasil. As células parenquimáticas radiais mostram paredes celulares menos espessas do que as de pau-brasil e angico-preto, de coloração castanha amarelada brilhante e podem apresentar conteúdo.

A madeira de pinus (**Figuras 18, 19**), cujos elementos condutores são traqueídes, apresenta tanto os elementos traqueais do lenho estival (LE) como do lenho primaveril (LP) com paredes primária e secundária (S1 e S2) coradas em tom marrom-amarelado, indicando predomínio de lignina do tipo G.

As **Figuras 20-25** mostram as fotomicrografias de secções transversais de alburno e cerne de três indivíduos de pau-brasil, oriundos da Reserva Biológica de Moji-Guaçu. Nas secções analisadas, os elementos de vaso não apresentaram conteúdo e suas paredes celulares (PV) mostraram-se coradas em tom castanho amarelado. As fibras possuem paredes primárias (PP) em tom castanho amarelado brilhante e paredes secundárias de castanho a róseo (S1) a castanho amarelado (S2). Nota-se que as paredes das fibras estão mais espessas nas amostras de alburno (**Figuras 20, 22, 24**) quando comparadas àquelas de cerne, onde células parenquimáticas (axiais e radiais) podem apresentar conteúdo (**Figuras 21, 23, 25**). As paredes celulares das fibras de uma das amostras de lenho de pau-brasil, oriunda de Moji-Guaçu, apresentaram coloração em tons de rosa (**Figuras 20, 21**), semelhante à tonalidade observada para as fibras do lenho de pau-brasil oriundo da Bahia.



Figuras 20-25. Fotomicrografias de secções transversais de alburno (Figuras 20, 22, 24) e cerne (Figuras 21, 23, 25) de três indivíduos de pau-brasil oriundos de Moji-Guaçu, após reação de Maüle. PA: parênquima axial; PP: parede primária; PR: parênquima radial; PV: parede do vaso; S1: camada S1; S2: camada S2. Barra: 25µm.

Em relação ao tipo de lignina presente nas amostras, o padrão de coloração marrom-amarelado observado nas paredes celulares dos vasos das amostras de pau-brasil, eucalipto e angico-preto, além da mesma coloração nas traqueídes de pinus, indica o predomínio de lignina do tipo G nestes elementos celulares. As paredes celulares das fibras, ao contrário dos vasos, mostraram padrão de coloração diferente entre as camadas S1 e S2, principalmente nas amostras de pau-brasil da Bahia e angico-preto (**Figuras 15, 16**), variando de tonalidade amarelada na camada S2 a rósea na camada S1. Essas diferenças indicam variações na proporção de lignina guaiacil-siringil (G:S) entre as amostras analisadas, sendo maior proporção de lignina G (amarelado) na camada S2 e de lignina S (róseo) na camada S1 das paredes celulares secundárias.

3. RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DA PAREDE CELULAR

Na **Tabela 5** encontram-se os rendimentos em parede celular das madeiras analisadas após a retirada dos extrativos e outros componentes solúveis em tampão, água, clorofórmio: metanol, acetona e éter. Pode-se observar que, entre as angiospermas, os maiores rendimentos em parede celular foram obtidos para pau-brasil, que diferem significativamente apenas da madeira de angico-preto.

Tabela 5. Rendimento (mg/ g massa seca de madeira) da parede celular das madeiras analisadas.

		Rendimento *		
Madeira		mg/g MS madeira		%
Pau-brasil	alburno	836 ± 10	**c**	83,6
	cerne	814 ± 46	**bc**	81,4
Eucalipto	cerne	702 ± 92	**abc**	70,2
Angico-preto	cerne	667 ± 34	**a**	66,7
Pinus	madeira	723 ± 15	**abc**	72,4

* Médias de três determinações. Valores seguidos de letras iguais não mostram diferenças significativas por Tukey a 5%.

Os rendimentos das frações de parede celular das madeiras analisadas estão mostrados na **Tabela 6**, em mg/ g de parede celular e na **Figura 26**, em diagrama de porcentagens. Para alburno e cerne de pau-brasil, a maior fração encontrada foi a de celulose, seguida das hemiceluloses extraídas em álcali fraco **(Figura 26 A, B)**, que interagem fracamente com a celulose. A fração que corresponde às pectinas (oxalato) foi encontrada em menor proporção no alburno quando comparado ao cerne de pau-brasil. A soma desta fração com aquela obtida pela extração com clorito de sódio, que usualmente também contém parte dos polissacarídeos pécticos, revela que o teor de pectinas é cerca de 3 vezes maior no cerne de pau-brasil quando comparado ao alburno.

Tabela 6. Rendimento (mg/ g) das frações de parede celular para as madeiras das espécies estudadas.

		Rendimento (mg/ g parede celular) *				
Madeira		Oxalato	Clorito	Álcali fraco	Álcali forte	Resíduo
		(Pectinas)		(Hemiceluloses)		(Celulose)
Pau-brasil	alburno	17± 13	39 ± 8	348 ± 48	77 ± 4	480 ± 41
	cerne	55 ± 5	87 ± 5	354 ± 32	85 ± 5	387 ± 35
Eucalipto	cerne	35 ± 5	85 ± 8	165 ± 6	141 ± 18	483 ± 42
Angico-preto	cerne	41 ± 6	105 ± 22	123 ± 24	105 ± 15	466 ± 45
Pinus	madeira	37 ± 3	113 ± 12	96 ± 4	150 ± 15	385 ± 11

* Médias de três determinações, com desvio padrão da média.

Pinus, eucalipto e angico-preto apresentaram padrão de fracionamento semelhante entre si, porém diferente da madeira de pau-brasil. O principal componente da madeira de pinus foi a celulose, seguida das hemiceluloses extraídas em álcali forte, que interagem fortemente com a celulose **(Figura 26 E)**. As amostras de eucalipto e angico-preto mostraram rendimentos similares nas diferentes frações. Para ambas as espécies, a maior fração correspondeu à celulose **(Figura 26 C, D)**, seguida de hemiceluloses extraídas em álcali fraco e forte. A fração de pectinas (oxalato) foi similar em proporção àquela encontrada no cerne de pau-brasil.

As principais diferenças entre a madeira de pau-brasil e o cerne de eucalipto e angico-preto foram observadas nas frações de álcali fraco e forte, que extraem polissacarídeos hemicelulósicos. Para as hemiceluloses que interagem fracamente com a celulose (álcali fraco) foram observados valores cerca de 50% maiores na madeira de pau-brasil **(Figura 26 A, B)**.

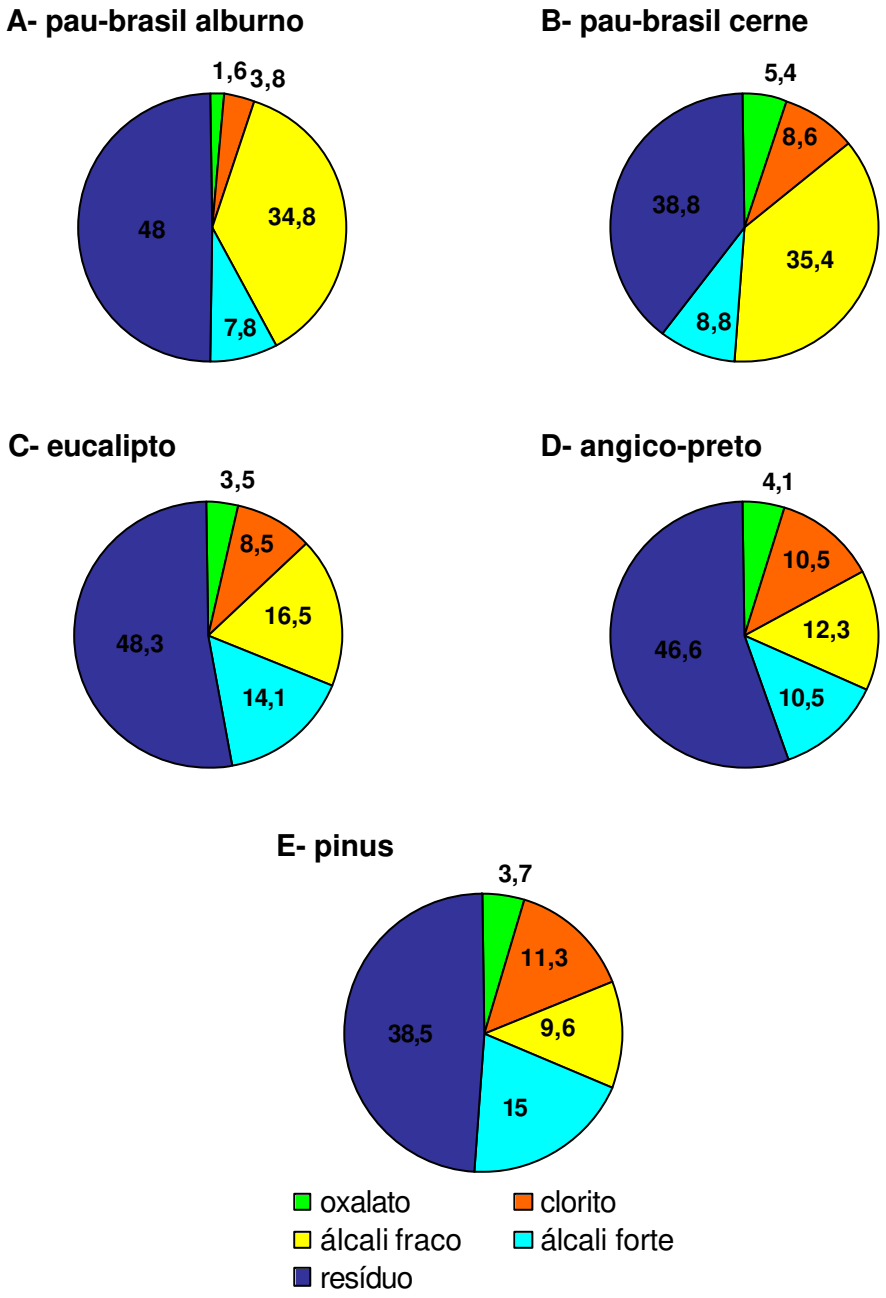


Figura 26. Rendimentos das frações (%) das paredes celulares de alburno (A) e cerne de pau-brasil (B), eucalipto (C) e angico-preto (D) e pinus (E). Os valores foram calculados com base na média de triplicatas, segundo Tabela 6.

A análise da composição em monossacarídeos e o teor de ácidos urônicos presentes nas frações de parede celular são mostrados nas **Figuras 27** e **28**. Com exceção do resíduo, a presença de ácidos urônicos foi observada em todas as frações das madeiras analisadas, representando não mais do que 5% da parede celular, confirmando os dados apresentados nas Tabelas 2 e 4. Maiores teores foram detectados nas frações clorito de sódio **(Figura 27 B)** e álcali fraco **(Figura 28 A)**.

Para o alburno de pau-brasil, a fração oxalato de amônio, que extrai preferencialmente os polissacarídeos pécticos da parede celular, mas também polissacarídeos hemicelulósicos **(Figura 27 A)** revelou predomínio de glucose seguida de xilose. Para o cerne, o contrário foi observado, sendo a diferença mais marcante encontrada na parede celular da madeira de pau-brasil. Diferenças também foram detectadas nos teores relativos de ramnose, que foi maior no alburno, e de arabinose, superior no cerne de pau-brasil, em concordância com a Tabela 2. Quando a madeira de pau-brasil foi comparada às outras madeiras, pode-se observar composição bastante distinta para a fração péctica, destacando-se a presença de manose em eucalipto e pinus e cerca de 30% de galactose em angico-preto.

A fração clorito de sódio **(Figura 27 B)**, que também extrai polissacarídeos pécticos e alguns polímeros hemicelulósicos revelou perfil bastante similar de monossacarídeos para o alburno e o cerne de pau-brasil e para o cerne de eucalipto, com predomínio de xilose. Para angico-preto, as proporções de arabinose e galactose foram cerca de 50% maiores que aquelas observadas para pau-brasil e eucalipto. Ausência de ramnose foi observada para as frações oxalato em eucalipto **(Figura 27 A)** e para a fração clorito de sódio em eucalipto e angico-preto **(Figura 27 B)**. Para esta última, toda ramnose presente na parede celular aparentemente foi extraída pelo tratamento com oxalato de amônio. Em pinus, manose foi o açúcar encontrado em maior proporção. Destaca-se, também, para a madeira de pinus, a ausência de arabinose nas frações oxalato e clorito de sódio.

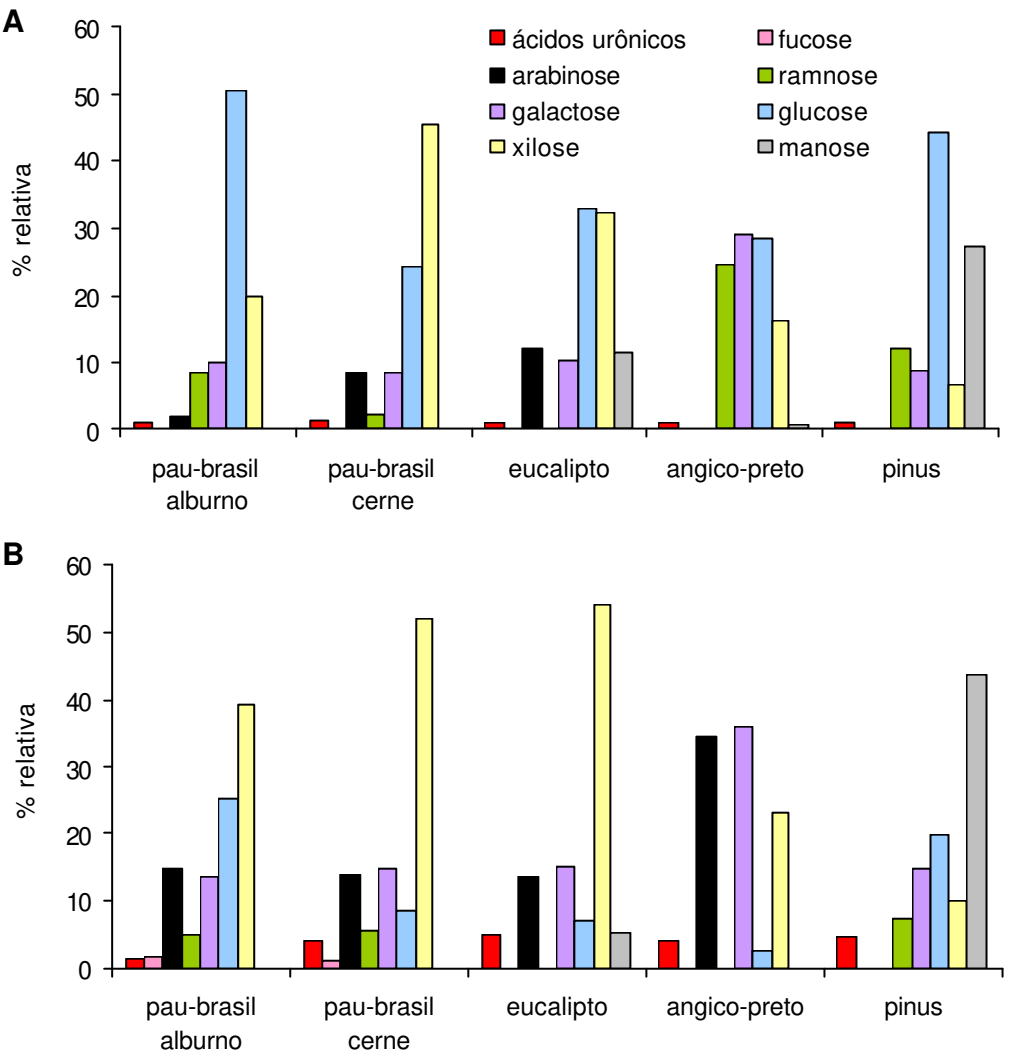


Figura 27. Proporção (% relativa) de ácidos urônicos e monossacarídeos neutros encontrados nas frações das paredes celulares de pau-brasil, eucalipto, angico-preto e pinus, após análise por HPAEC/ PAD dos hidrolisados ácidos. Frações: oxalato de amônio (A), clorito de sódio (B). Os valores representam a média de triplicatas.

Xilose foi o monossacarídeo predominante nas frações extraídas com álcali fraco para todas as madeiras analisadas **(Figura 28 A)**. Exceto pela ausência de ramnose em angico-preto e dos baixos teores de galactose em angico-preto e eucalipto, não foram observadas grandes alterações nas proporções dos outros monossacarídeos para as amostras de angiospermas. Isso indica que, apesar dessa fração ser variável em termos de rendimento entre as diferentes madeiras **(Figura 26)**, sua composição apresenta perfil semelhante. Para a madeira de pinus, novamente, foram observadas quantidades consideráveis de manose, ausente na fração álcali fraco das demais madeiras **(Figura 28 A)**.

Perfil similar, com predomínio de xilose, foi observado para a fração álcali forte de todas as madeiras de angiospermas **(Figura 28 B)**. Para pinus, houve predomínio de manose. A fração do resíduo, que contém predominantemente celulose, apresentou, como esperado, glucose como seu maior componente, sendo observada em maior quantidade na amostra de angico-preto **(Figura 28 C)**. Foi observada pequena contaminação da fração da celulose com outros monossacarídeos, como manose em pinus e xilose para as demais madeiras, provavelmente remanescentes de polissacarídeos abundantes em outras frações, mas que não foram extraídos com álcali forte **(Figura 28 B)**.

Os resultados obtidos pela análise da composição de monossacarídeos das frações de paredes celulares, por HPAEC/PAD, foram similares aos encontrados na análise dos hidrolisados obtidos após extração da Lignina de Klason **(Tabela 1)**. Devido à elevada proporção de xilose, os dados sugerem a presença de um xilano pouco substituído com arabinose, como o principal polissacarídeo presente nas paredes celulares do alburno e dos cernes de pau-brasil, eucalipto e angico-preto. Para pinus, a composição sugere a presença de um glucomanano como o principal polissacarídeo hemicelulósico da parede celular de sua madeira.

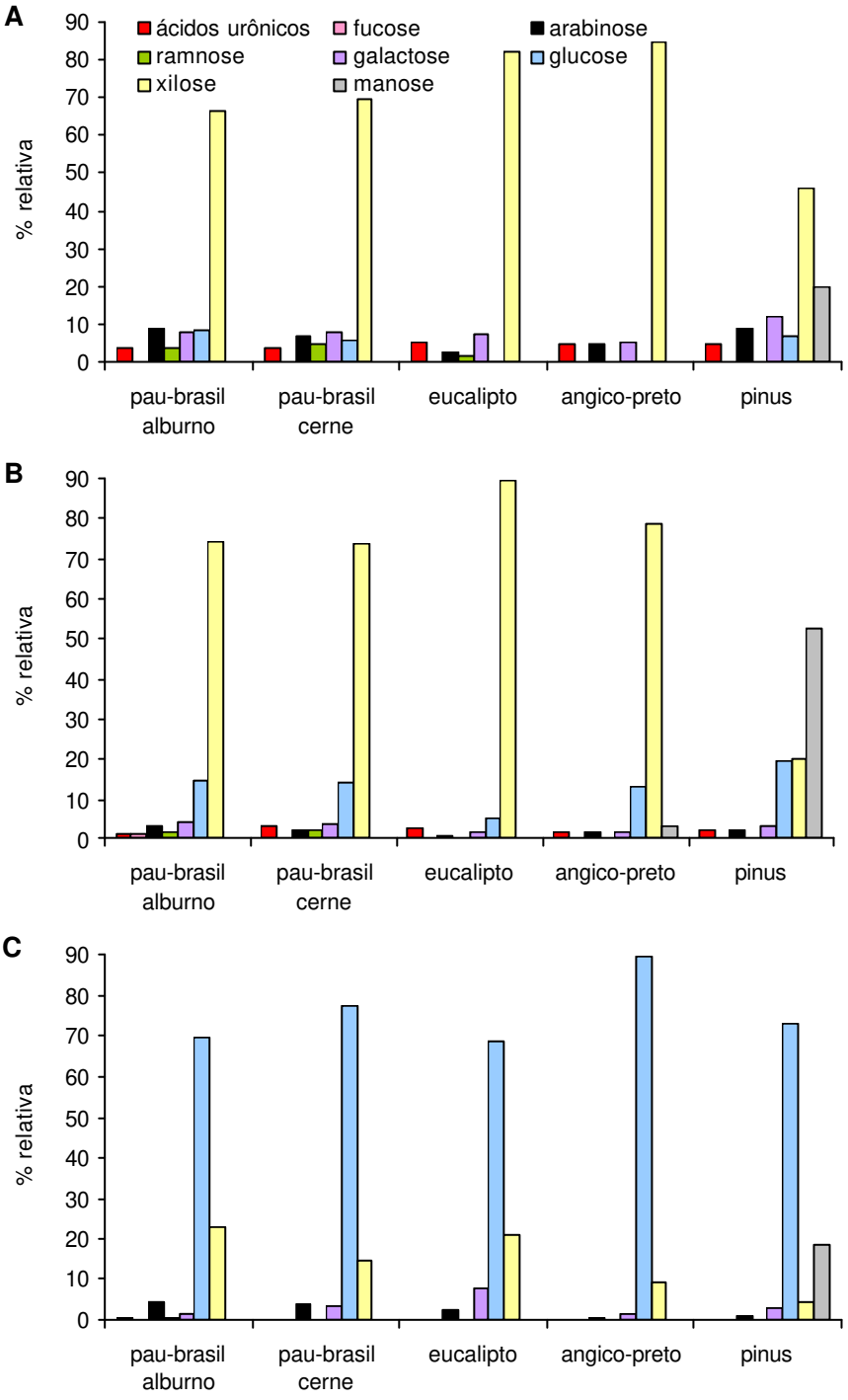


Figura 28. Proporção (% relativa) de ácidos urônicos e monossacarídeos neutros encontrados nas frações das paredes celulares de pau-brasil, eucalipto, angico-preto e pinus. Frações: álcali fraco (A), álcali forte (B) e resíduo (C). Os valores representam a média de triplicatas.

4. BIODETERIORAÇÃO DA MADEIRA

Para avaliar a resistência natural da madeira a cupins e fungos xilófagos causadores de apodrecimento usualmente são realizados ensaios acelerados em laboratório, nos quais as madeiras são expostas aos microrganismos por um período de tempo, geralmente meses. A avaliação do ensaio é efetuada pela medida da perda de massa dos corpos de prova após a exposição.

Na **Tabela 7** estão os resultados da degradação do alburno e cerne de pau-brasil, dos cernes de eucalipto e de angico-preto e da madeira de pinus, quando submetidas ao ataque de cupins de madeira seca. Observa-se que tanto o cerne de pau-brasil quanto o de angico-preto sofreram desgaste superficial, quando comparados às demais madeiras, sugerindo similaridade de resistência ao ataque desse cupim. A porcentagem de indivíduos mortos também foi maior em pau-brasil e em angico-preto, o que sugere o envolvimento dos extrativos, possivelmente tóxicos a esses insetos.

Tabela 7. Moda de resultados de desgaste e % de mortalidade após ataque de cupins de madeira seca nas diferentes madeiras analisadas.

Madeira		Moda do desgaste *	% de mortalidade
Pau-brasil	alburno	2	82,2 **a**
	cerne	1	85,2 **a**
Eucalipto	cerne	4	32,5 **b**
Angico-preto	cerne	1	86,3 **a**
Pinus	madeira	4	55,4 **b**

0: nenhum desgaste; 1: desgaste superficial; 2: desgaste moderado; 3: desgaste acentuado; 4: desgaste profundo, correspondente àquele produzido na amostra controle (pinus). Ensaio realizado por Gonzalo A. C. Lopez (IPT, São Paulo). Médias acompanhadas de letras iguais não diferem significativamente ($p<0,05$).

Nos ensaios com fungos apodrecedores **(Tabela 8)**, nota-se que a madeira mais deteriorada pela podridão mole foi o alburno de pau-brasil, enquanto que a podridão parda deteriorou, em maiores porcentagens, o cerne de eucalipto. O cerne de pau-brasil apresentou, para todas as podridões, desgaste superficial, sendo os resultados de perda de massa próximos daqueles obtidos para angico-preto, para as podridões branca e parda. Pinus, apesar de ser descrito como madeira altamente suscetível ao ataque de fungos apodrecedores, apresentou perda de massa incipiente por ação do fungo da podridão parda, o qual provocou acentuada deterioração da madeira de eucalipto.

Tabela 8. Biodeterioração das diferentes madeiras por fungos apodrecedores.

		Perda de massa (%) *		
Madeira		Podridão branca	Podridão parda	Podridão mole
Pau-brasil	alburno	5,7 ± 2,1 **a**	17,8 ± 2,5 **a**	31,7 ± 10,7 **a**
	cerne	0,3 ± 1,4 **b**	1,4 ± 1,0 **b**	2,1 ± 1,2 **b**
Eucalipto	cerne	9,1 ± 2,2 **c**	22,6 ± 4,2 **c**	16,1 ± 9,5 **d**
Angico-preto	cerne	1,2 ± 1,0 **b**	2,4 ± 3,5 **b**	6,0 ± 3,3 **c**
Pinus	madeira	9,8 ± 5,9 **c**	0,9 ± 0,8 **b**	0

***** Valores de perda de massa abaixo de 3% indicam a ocorrência de apodrecimento apenas incipiente. Ensaio realizado por Maria Beatriz B. Monteiro (IPT, São Paulo). Médias acompanhadas de letras diferentes diferem significativamente ($p<0,05$), para cada espécie de fungo.

Nas **Figuras 29** e **30** estão os teores de carboidratos solúveis (frutose, glucose, sacarose e rafinose) e açúcares álcoois, respectivamente, encontrados nos extrativos do material removido dos corpos-de-prova após ensaios com fungos apodrecedores. Os valores foram comparados com aqueles descritos na **Figura 13**, visto que aqueles representam as madeiras antes dos bioensaios, sendo considerados como tempo zero (T0).

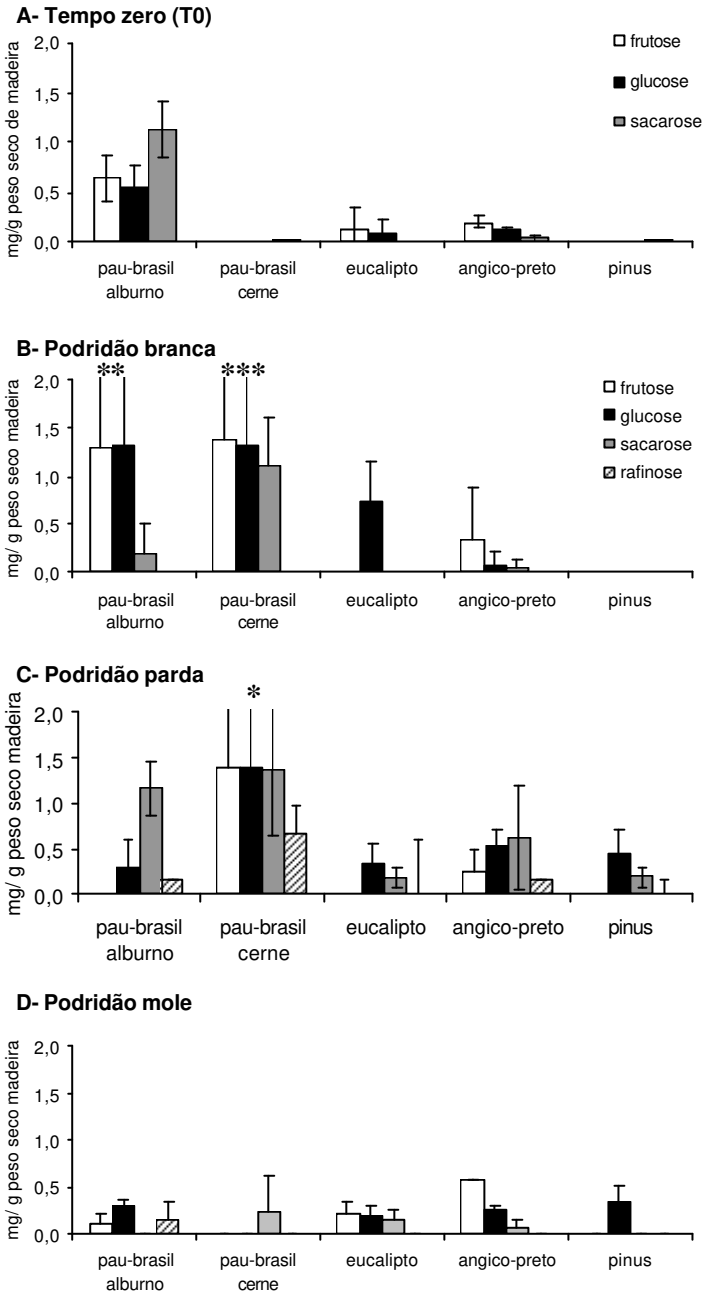


Figura 29. Composição de carboidratos solúveis (mg/ g massa seca de madeira) determinada por GC/MS, nos extratos hidroalcólicos de pau-brasil, pinus, eucalipto e angico-preto após bioensaio de deterioração por fungos apodrecedores. Os valores correspondem à média de três repetições. As barras representam o desvio padrão da média. (*: valores divididos por trinta; **: valores divididos por dois; ***: valores divididos por 10 para melhor visualização).

Para o alburno de pau-brasil, os teores de frutose e glucose, quando comparados ao tempo zero **(Figura 29 A)**, foram bastante variáveis, havendo um ligeiro acréscimo após os ensaios com o fungo de podridão branca **(Figura 29 B)**, concomitantemente ao decréscimo marcante do teor de sacarose. Nas podridões parda **(Figura 29 C)** e mole **(Figura 29 D)** houve redução desses açúcares para essa mesma amostra. No cerne de pau-brasil, a presença desses açúcares, após a degradação pelos fungos de podridões branca e parda, sugere que os mesmos sejam resultado da ação superficial dos fungos sobre a madeira. Possíveis restos de hifas de fungos presentes no material poderiam contribuir para o aparecimento desses açúcares na madeira, mas não seriam suficientes para explicar as quantidades encontradas.

Alterações semelhantes ocorreram em relação aos açúcares álcoois, especialmente no cerne de pau-brasil após o ensaio com os fungos de podridões branca **(Figura 30 B)** e parda **(Figura 30 C)**. Houve, para o cerne de pau-brasil, aumento substancial no teor de galactopinitol B em todas as podridões, além da presença de outros ciclitóis que não foram detectados na análise inicial. Para o alburno de pau-brasil, os resultados foram diferentes para podridão parda, evidenciando maior diversidade (metabolização) desses açúcares após a ação do fungo.

O perfil de degradação observado para eucalipto e angico-preto foi semelhante àquele encontrado para alburno de pau-brasil. Na amostra de pinus não foi observada a presença de galactopinitol B em todas as podridões **(Figura 30 A, B, C)**, embora tenha sido encontrado no T0 em baixas concentrações.

A presença de açúcares que não foram inicialmente detectados nas amostras durante a primeira análise pode ser devida à possível presença de porções do micélio dos fungos que não puderam ser separados das madeiras no material lixado. O micélio desses fungos, crescido em meio de cultura malte a 2% em ágar, foi analisado separadamente pelo mesmo método, para eventual confirmação dessa hipótese. Foram encontrados os ciclitóis *mio*-inositol e pinitol no fungo de podridão branca, *mio*-inositol, pinitol e galactopinitol A no fungo de

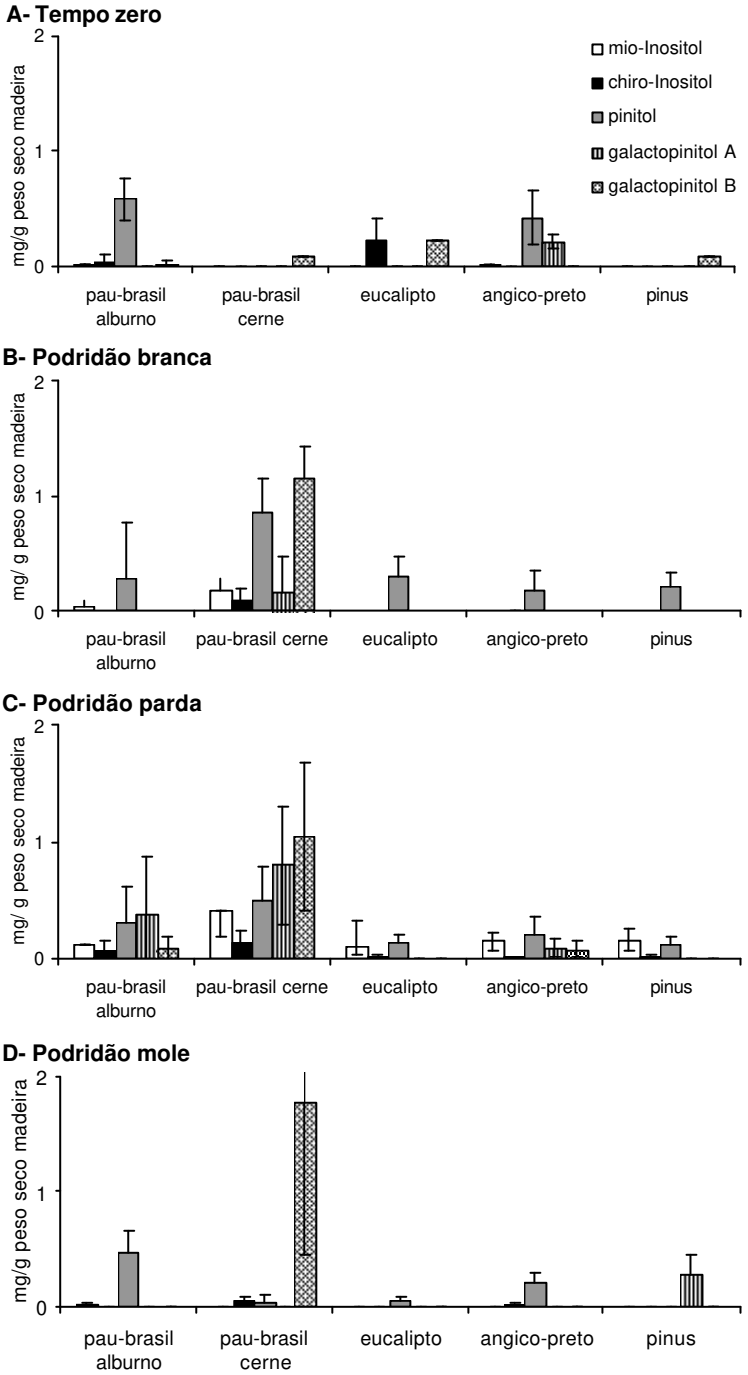


Figura 30. Composição de açúcares álcoois (mg/ g massa seca de madeira) determinada por GC/MS, nos extratos hidroalcólicos de pau-brasil, pinus, eucalipto e angico-preto, após bioensaio de deterioração por fungos causadores de podridões. Os valores correspondem à média de três tratamentos. As barras representam o desvio padrão da média de triplicatas.

podridão parda e *mio*-inositol, *chiro*-inositol, pinitol e galactopinitol B no fungo de podridão mole. Outra possibilidade é que a detecção desses açúcares possa indicar metabolização de componentes da madeira pelo fungo, como por exemplo, a conversão de galactopinitol em pinitol pela remoção da galactose.

A análise dos monossacarídeos presentes no material removido dos corpos-de-prova é mostrada na **Figura 31**. Para fins de comparação, foram utilizados os dados referentes à composição de açúcares obtidos na hidrólise da parede celular bruta para obtenção de Lignina de Klason, uma vez que representam aqueles encontrados nas madeiras sem tratamento (Tempo zero). Para pau-brasil, no alburno **(Figura 31 A)** foi observada a redução nos teores de ramnose em todas as podridões, e galactose nas podridões branca e parda, enquanto que no cerne **(Figura 31 B)** houve diminuição de ramnose em todas as podridões e galactose nas podridões branca e parda, quando comparados aos valores das paredes celulares brutas (tempo zero), antes dos bioensaios. Nas madeiras de eucalipto e angico-preto foi notada a diminuição de xilose nas podridões. Em eucalipto **(Figura 31 C)** ocorreu redução no teor de galactose na podridão parda e desaparecimento do mesmo açúcar na podridão branca. Na amostra de angico-preto **(Figura 31 C)**, o teor de manose foi reduzido nas podridões branca e mole, não sendo detectado este açúcar nos ensaios com a podridão parda. Em pinus **(Figura 31 E)** galactose não foi detectada na podridão parda, assim como a manose nos blocos inoculados com os fungos das podridões parda e branca.

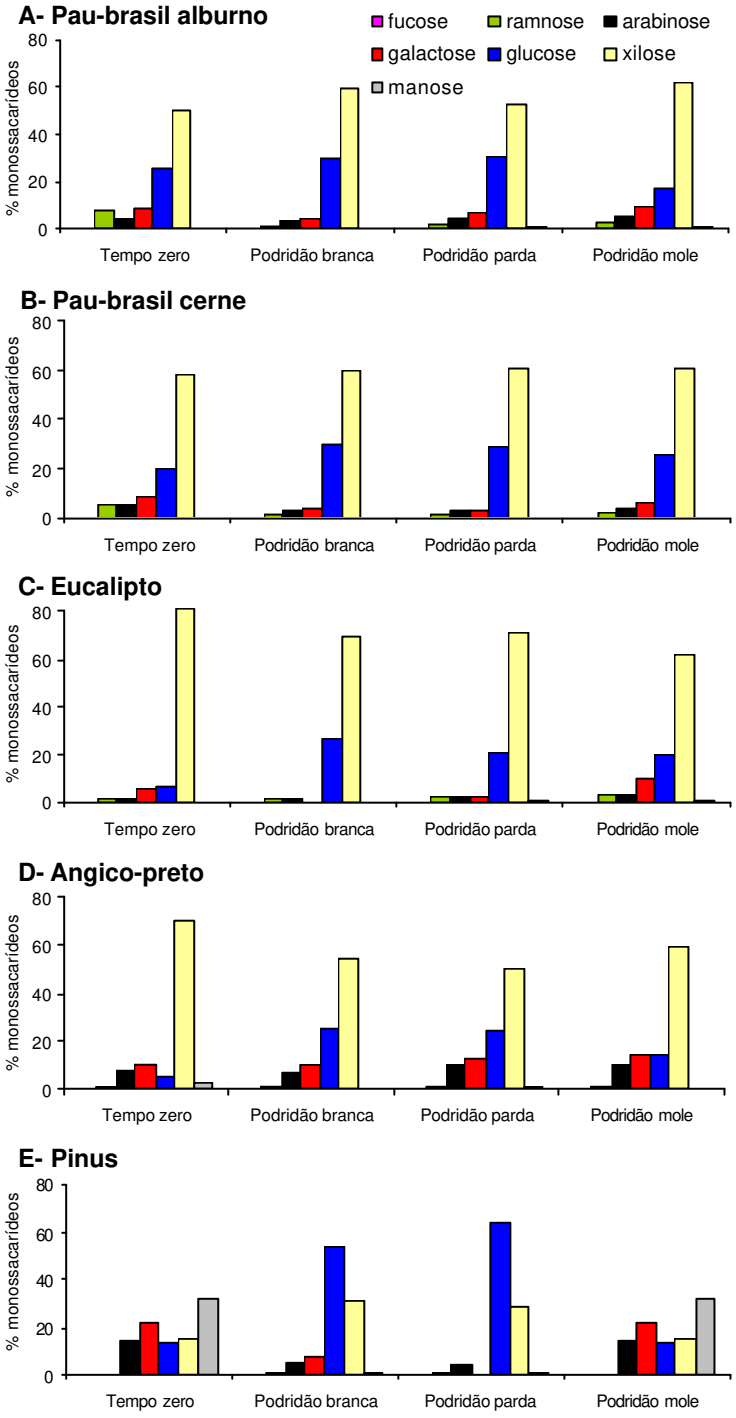


Figura 31. Proporção de monossacarídeos encontrados no material removido dos corpos-de-prova submetidos aos ensaios de biodeterioração com fungos de apodrecimento determinada por HPAEC/PAD. Tempo zero: hidrolisado da parede celular bruta.

DISCUSSÃO

1. Extrativos e a resistência da madeira à degradação

A presença de extrativos confere às madeiras propriedades que estão diretamente relacionadas ao seu grau de resistência a organismos xilófagos. A quantificação dos extrativos solúveis em etanol realizada neste trabalho mostrou que, dentre todas as madeiras estudadas, o cerne de pau-brasil foi a que apresentou o maior teor, perfazendo cerca de 12%. O valor está próximo ao observado por Matsunaga *et al*. (1996), que encontraram cerca de 14% de extrativos solúveis em água quente e 9% solúveis em etanol-benzeno para o cerne de *Guilandina echinata* (= *Caesalpinia echinata*). Longui (2005), analisando as madeiras de maçaranduba (*Manikara* sp.), ipê (*Tabebuia* sp.) e pau-brasil (*C. echinata*), utilizadas na fabricação de arcos para instrumentos de corda, encontrou teor de extrativos hidrossolúveis e solúveis em solventes orgânicos na madeira de pau-brasil similares ao deste trabalho e superiores às demais madeiras. Neste trabalho, o alto teor de extrativos apresentado pelo alburno de pau-brasil pode estar relacionado à parte da madeira utilizada nas análises, que pode ter incluído uma região mais próxima ao cerne ("cerne fisiológico"), uma vez que os valores observados para alburno e cerne não diferiram estatisticamente **(Figura 12)**.

Paes *et al*. (2005) analisando várias madeiras quanto ao conteúdo de extrativos solúveis em água quente, observaram que *Anadenanthera colubrina*, conhecida como angico-vermelho, uma espécie arbórea da família Fabaceae, apresentou valores ao redor de 8%, semelhantes aos encontrados neste trabalho para angico-preto. Em gimnospermas, segundo os dados de literatura, ocorrem quantidades menores dessas substâncias em suas madeiras (Lelis 2001) e isto foi observado na amostra de madeira de pinus aqui analisada. Oliveira & Della Lucia (1994, citados por Oliveira *et al*. 2005) verificaram que *Corymbia citriodora* (espécie de eucalipto) e *Eucalyptus paniculata* possuem 13,9% e 16,4% de extrativos solúveis em metanol, respectivamente, valores esses próximos aos

observados neste trabalho para *E. grandis*. Watanabe *et al.* (2004), quantificando o teor de extrativos solúveis em álcali em *E. camaldulensis* e *E. globosus*, encontraram teores de 18% e 15%, respectivamente, sendo estes valores superiores aos observados para a amostra eucalipto aqui estudada, possivelmente devido ao fato de que álcalis extraem outros componentes, como, por exemplo, as hemiceluloses presentes nas paredes celulares.

Lange & Faix (1999), analisando a madeira de *Lophira alata* (Ochnaceae), conhecida popularmente como azobe, uma angiosperma tropical encontrada na África e com grande importância econômica devido à dureza e durabilidade de sua madeira, encontraram cerca de 2% de extrativos no seu cerne. Os autores consideraram esses valores baixos, pois alegam que em cernes de espécies de ambiente tropical, são encontrados teores entre 8-10%. Esses resultados, juntamente com o fato do teor de extrativos de pau-brasil assemelhar-se ao de angico-preto e eucalipto, indicam que a quantidade de extrativos não é o único fator relacionado à durabilidade natural da madeira, mas que o tipo de substâncias nele encontradas e a contribuição de outros componentes, como a lignina e os polissacarídeos da parede celular, também devem ser considerados. De acordo com Matsunaga *et al*. (2000b), os principais componentes do extrativo de pau-brasil são a protossapanina B e a brasilina, sendo que a primeira corresponde a 40% do total de extrativos dessa madeira. Segundo os autores, ambos os componentes, quando impregnados na madeira de *Picea sitchensis*, uma gimnosperma, alteraram suas propriedades vibracionais, indicando que as características físicas da madeira podem ser influenciadas pelo efeito de seus extrativos. Desse modo, a presença de extrativos parece contribuir química e fisicamente para as características das madeiras.

Nos ensaios de deterioração da madeira por cupins foi observado que os corpos-de-prova do cerne de pau-brasil e angico-preto foram os que menos sofreram desgaste, sendo este considerado superficial quando comparados às demais amostras. Além disso, outra característica que avalia a resistência da madeira é a mortalidade dos cupins, ou seja, quanto maior a taxa de mortalidade,

mais resistente é a madeira. Alguns trabalhos, como o de Silva *et al.* (2004) relatam que esse fato estaria relacionado à presença de um alto teor de extrativos com poder inseticida nessas madeiras. Essa característica já foi relatada para pau-brasil, cujo extrativo tem atividades inseticida (a larvas de mosquito) e moluscicida (Luna *et al*. 2005). As taxas de mortalidade de cupins ocasionadas por pau-brasil e angico-preto foram similares, mostrando que este fato pode estar relacionado ao tipo de substâncias presentes no extrativo. Luna *et al*. (2005) constataram que a casca de angico-preto possui fenóis, flavononas, favonóides, esteróides livres e leucoantocianinas, porém as substâncias presentes no extrativo de sua madeira não foram caracterizadas estruturalmente, nem tiveram sua atividade biológica analisada.

Os corpos-de-prova de eucalipto sofreram desgaste semelhante ao de pinus, que é um exemplo de madeira muito suscetível ao ataque de cupins. Em relação à mortalidade dos cupins, o eucalipto foi a espécie que apresentou a menor taxa. Silva *et al.* (2004), analisando a resistência natural de *Eucalyptus grandis* ao ataque de *Criptotermes brevis*, constataram que sua madeira, independentemente da idade, é altamente suscetível ao ataque de cupim de madeira seca, pois o dano apresentado foi igual ao da amostra mais suscetível (pinus), conforme observado neste trabalho.

É interessante destacar que apesar da atividade inseticida descrita para os extrativos de pau-brasil (Luna *et al.* 2005), várias árvores do arboreto experimental de *C. echinata* na Reserva Biológica de Moji-Guaçu, de onde foram obtidas as madeiras para este trabalho, foram suscetíveis ao ataque de uma coleobroca identificada como *Platypus mutatus*, um "besouro de ambrosia". A infestação foi acompanhada estacionalmente mostrando que cerca de 3% das árvores foram atacadas, e que não houve comprometimento do crescimento vegetal (Girardi *et al*. 2006).

Nos ensaios de deterioração por fungos de podridões realizados neste trabalho, após 16 semanas de exposição, as madeiras que sofreram maior perda de massa foram o alburno de pau-brasil e o cerne de eucalipto, principalmente

pelo ataque dos fungos das podridões parda e mole. Oliveira *et al.* (2005b), estudando a resistência natural de sete espécies de eucalipto, entre elas *E. grandis*, ao apodrecimento causado pelo fungo *Gloeophyllum trabeum* (podridão parda), observaram que após 16 semanas, todas as madeiras analisadas apresentaram perda de massa inferior a 10%, considerando as mesmas resistentes a esse fungo. Paes (2002) analisando alburno e cerne da madeira de *Corymbia maculata* (espécie de eucalipto), verificou que o alburno foi mais deteriorado pelos fungos do que o cerne, em 12 semanas de exposição. De acordo com Silva *et al.* (2004), isso se deve ao fato do alburno ser a parte viva da madeira, que apresenta material nutritivo armazenado, como altos teores de sacarose, tornando-se fonte de nutrientes para os microrganismos. Já o cerne, por não possuir esse tipo de material, é menos suscetível; e, além disso, acumula extrativos. Os resultados mostrados na **Figura 13 A** confirmam a presença de açúcares solúveis no alburno de pau-brasil, que estão ausentes no cerne. Entretanto, o teor de extrativos não foi diferente entre essas duas amostras, reforçando a sugestão de que a qualidade dos mesmos deve contribuir para a resistência do cerne de pau-brasil.

Nos ensaios com o fungo causador da podridão branca, os valores de perda de massa encontrados para os cernes de pau-brasil e angico-preto foram bastante inferiores aos de eucalipto, e menores que o de pinus **(Tabela 8)**. Paes *et al*. (2005) analisando diversas madeiras de angiospermas brasileiras submetidas à deterioração por fungos de podridão mole, entre elas *Anadenanthera colubrina*, popularmente conhecida como angico, verificaram que a perda de massa dessa espécie foi de cerca de 9%, valor um pouco maior ao observado para angico-preto. Para *A. colubrina*, os autores observaram alta durabilidade natural de sua madeira ao ataque de fungos xilófagos, mas não conseguiram associar sua resistência à concentração de extrativos solúveis em água quente encontrada na mesma. Paes *et al*. (2004), analisando diversas madeiras de angiospermas do semi-árido brasileiro também não conseguiram relacionar o teor de extrativos com a durabilidade da madeira, uma vez que madeiras que apresentaram conteúdo

baixo de extrativos foram tão resistentes a fungos xiló fagos quanto madeiras com teor alto dessas substâncias, confirmando que não somente o conteúdo, mas o tipo de substância presente no extrativo é fator crucial na durabilidade natural. Alves *et al.* (2006), estudando a resistência natural de seis espécies de madeiras de angiospermas da região amazônica aos fungos *Pycnoporus sanguineus* (podridão branca) e *G. trabeum* (podridão parda), observaram que todas as espécies se mostraram resistentes a estes fungos.

É importante salientar que os ensaios laboratoriais de biodeterioração não reproduzem exatamente o que acontece com a árvore em seu ambiente natural, apenas fornecem indicações do seu comportamento e ajudam a classificá-la, de forma comparativa, com espécies de madeira cuja durabilidade é conhecida. Isto pode ajudar a explicar os resultados observados para as madeiras nos ensaios com o fungo de podridão mole, que apresentaram uma alta porcentagem de perda de massa, o que não era esperado, uma vez que esses fungos apresentam degradação mais lenta quando comparados à podridão branca e parda (Beatriz B. Monteiro, comunicação pessoal).

Trabalho realizado por pesquisadores do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (SP) mostrou que árvores de *Caesalpinia echinata* plantadas em passeios públicos na cidade de Piracicaba (SP) são menos atacadas por fungos apodrecedores do que as de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides*), espécie conhecida por sua suscetibilidade a organismos xilófagos. Nos passeios públicos da cidade de São Paulo, os indivíduos de pau-brasil apresentaram-se, na sua maioria, sadios. Quando atacados por fungos apodrecedores e cupins subterrâneos, a deterioração ocorreu apenas no alburno, ao contrário do observado para sibipiruna, que teve o ataque estendido ao cerne. Diante disso, a árvore de pau-brasil foi considerada por esses pesquisadores resistente a organismos xilófagos e com potencial para ser utilizada na arborização urbana (Sergio Brazolin, comunicação pessoal).

Com base nos resultados aqui apresentados, a madeira de pau-brasil pode ser classificada como resistente à deterioração por fungos xilófagos e

cupins, pois sua porcentagem de deterioração foi menor que a de angico-preto, conhecida por apresentar alta resistência a este tipo de ataque. Essa resistência se deve em parte à presença de extrativos, para os quais já foi relatada atividade tóxica (Luna *et al.* 2005) e que, provavelmente, são os responsáveis pela elevada mortalidade dos cupins-de-madeira-seca observada nos ensaios de laboratório **(Tabela 7)**.

Em relação ao conteúdo de açúcares álcoois presentes nos extrativos, três possibilidades foram avaliadas: a primeira, de que os teores de ciclitóis na madeira não variaram, como observado para pinitol em alburno de pau-brasil e cerne de angico-preto para todas as podridões, quando comparados ao T0; segundo, o teor de ciclitóis aumentou devido à presença do fungo, sugerido para pinitol, *chiro*-inositol, galactopinitol A e B em cerne de pau-brasil, e terceiro, o teor diminuiu pela ação do fungo, notado nos teores de *chiro*-inositol, reduzido a traços e aumento de pinitol possivelmente devido à transformação do galactopinitol B em pinitol devido à remoção da galactose, em todas as podridões, para eucalipto. O aumento de pinitol, pelo mesmo motivo, foi observado em pinus, nas podridões branca e parda **(Figura 30)**.

Para pau-brasil, foi relatada a presença de quantidades significativas de vários ciclitóis, como pinitol, ciceritol, ononitol e galactopinitol A e B, em suas sementes (Garcia *et al*. 2006) e os autores sugeriram que a presença desses açúcares álcoois poderia estar relacionada com a tolerância à dessecação das mesmas. Folhas e raízes de 13 espécies de *Eucalyptus* submetidas ao estresse hídrico responderam ao tratamento com aumento nos teores de *mio*-inositol e de ciclitóis, principalmente quercitol, que provavelmente estariam contribuindo para a aclimatação da espécie no ambiente (Merchant *et al.* 2006).

Diante dos resultados aqui expostos, a hipótese de que esses açúcares não são metabolizados na planta pelos fungos (A. A. Richter, comunicação pessoal) não foi confirmada, uma vez que em algumas madeiras seu conteúdo foi alterado, através de reações de adição ou subtração de galactose. Deste modo, os resultados sugerem que os mesmos não devem estar relacionados à

resistência da madeira ao ataque de fungos causadores de podridões. Outras funções, relativas à possível tolerância a variações ambientais ainda precisam ser investigadas.

2. Lignina e a durabilidade de madeiras

A lignina é um complexo fenólico extremamente importante para as plantas, entretanto, devido à sua heterogeneidade, é um composto difícil de ser quantificado. Ao longo dos anos, vários procedimentos analíticos têm sido empregados para determinar o teor de lignina em paredes celulares; porém, esses métodos usualmente resultam em valores distintos para uma mesma planta. De acordo com Fukushima & Hatfield (2004), os procedimentos comumente empregados estão divididos em duas categorias: 1) métodos analíticos que removem os constituintes de parede celular exceto a lignina e 2) métodos que oxidam o polímero de lignina fora da matriz celular. Na primeira categoria enquadra-se a Lignina de Klason e na segunda a Lignina Dioxano, métodos utilizados neste trabalho.

A análise dos teores de Lignina de Klason (LK) e Lignina Dioxano (LDiox) mostraram diferenças significativas e algumas discrepâncias. Apesar de bastante utilizado, o método de LK, de modo geral, indicou valores muito superiores aos citados em literatura. Longui (2005), utilizando o mesmo método usado neste trabalho, comparou duas categorias de madeira de pau-brasil empregadas na manufatura de arcos de instrumentos de corda de melhor e pior qualidade (tipo top e tipo estudante, respectivamente), e encontrou teor de LK de 70,3% para a primeira e 60,4% para a segunda. Analisando duas angiospermas comercialmente conhecidas pela dureza e resistência de suas madeiras, ipê e maçaranduba, Longui (2005) encontrou 80,3% de teor de LK para ipê e 70,1% para maçaranduba, mostrando que a metodologia, em ambos os casos, superestimou os valores de LK nas diversas amostras estudadas.

Lange & Faix (1999), analisando a madeira de *Lophira alata*, encontraram cerca de 40% de LK nesta espécie. Em *Astronium urundeuva* (aroeira-preta, Anacardiaceae), madeira considerada de boa resistência mecânica, química e biológica, foi encontrado 24% de teor de LK (Morais *et al*. 1999). Baillères *et al.* (1997), analisando a madeira de *Buxus sempervirens* encontraram cerca de 28% de LK nesta espécie. Fukushima & Hatfield (2001), analisando teor de lignina em uma amostra de madeira de *Pinus taeda*, encontraram 25,6% de LK, valor bastante inferior ao encontrado no presente trabalho para *Pinus elliotti*, de cerca de 70% **(Tabela 1)**. Watanabe *et al.* (2004), analisando a LK em *Eucalyptus camaldulensis* e *E. globosus*, encontraram maior teor, de cerca de 25% em *E. camaldulensis* quando comparada a *E. globosus*, que apresentou teor entre 15-30%.

De um modo geral, os resultados de LK obtidos com as madeiras aqui analisadas foram superiores aos encontrados na literatura e não apontaram para a existência de alguma correlação com a resistência da madeira ao ataque de fungos e cupins, uma vez que não foram encontradas diferenças significativas nos teores desse polímero fenólico entre madeiras que mostraram alta e baixa resistência a esses organismos **(Tabela 1)**. Aparentemente, o método de LK superestima os teores de lignina, não sendo eficiente para quantificar ligninas nas madeiras aqui analisadas, refletindo as dificuldades do uso deste método. De acordo com Lange & Faix (1999), valores altos de LK podem ser explicados pela presença de polifenóis, principalmente no cerne, que se condensariam com a lignina durante o tratamento com ácido sulfúrico. Watanabe *et al*. (2004) afirmam que em *Eucalyptus* é necessário fazer uma extração prévia da amostra de madeira com álcali a fim de retirar os polifenóis que possivelmente interferirão na análise. Eventual presença de água residual pode ser descartada, após secagem em estufa. Neste trabalho, a presença de polifenóis não foi analisada, mas optou-se pela quantificação de lignina por outro método.

O método de determinação de lignina solúvel em Dioxano (LDiox) é apontado por Hatfield & Fukushima (2005) como promissor, pois apresenta baixa

contaminação de proteínas e carboidratos. Nas amostras de pau-brasil analisadas no presente trabalho foram encontrados rendimentos em LDiox de 8,5% para alburno e 9,1% para o cerne. Para as angiospermas, os valores obtidos neste trabalho foram menores quando comparados ao descrito para *Populus* sp (álamo, Salicaceae), que possui cerca de 16% de LDiox (Fukushima & Hatfield 2004). O rendimento observado para LDiox de pinus (5,1%) foi semelhante ao encontrado em literatura para *Pinus taeda* (6,3%) (Fukushima & Hatfield 2001). Entretanto, aparentemente, a composição da lignina pareceu influenciar sua extração, uma vez que a lignina de pinus, que é do tipo guaiacil, teve rendimento menor quando comparada às demais madeiras, que possuem uma combinação de lignina do tipo guaiacil:siringil. Na indústria de papel, madeiras com maior teor de lignina siringil são mais facilmente deslignificadas (Pereira *et al*. 1994).

A contaminação da LDiox das angiospermas aqui estudadas por carboidratos foi semelhante no tipo de açúcar encontrado para *Pinus taeda* e *Populus* sp. (Fukushima & Hatfield 2004), com predomínio de glucose e xilose. Fukushima & Hatfield (2001), analisando LDiox extraída de pinus (*Pinus taeda*), também detectaram glucose e xilose, indicando a contaminação por glucanos e xilanos, respectivamente. De acordo com Watanabe & Koshijima (1988), os xilanos são freqüentes componentes de complexos de lignina isolados da parede celular de plantas e existem evidências que os glucuronoxilanos estão ligados covalentemente à lignina através do ácido ferúlico, explicando a presença dos resíduos de xilose na LDiox.

Os resultados obtidos no presente trabalho para LDiox, apesar de mais adequados que LK, foram cerca de 50% menores quando comparados aos descritos em literatura, que citam que as madeiras em geral possuem de 25 a 35% de lignina em suas paredes celulares. Isso confirma a dificuldade de analisar e quantificar esse composto, uma vez que sua estrutura varia entre as espécies, tipos celulares e entre partes de uma mesma planta (Whetten *et al*. 1998). De qualquer modo, em termos comparativos, é possível afirmar que não existem diferenças na quantidade de lignina entre o alburno e o cerne de pau-brasil, e que

esses valores assemelham-se àqueles encontrados para eucalipto. Isso, mais uma vez, reforça a sugestão de que a resistência de pau-brasil a organismos xilófagos não parece estar relacionada ao teor de ligninas presente em suas paredes celulares.

Técnicas microquímicas também têm sido utilizadas para detecção *in situ* dos resíduos que compõem a lignina. As reações comumente utilizadas são a de Wiesner e a de Maüle. O reagente de Wiesner confere coloração vermelho brilhante às paredes lignificadas. Por outro lado, a reação de Maüle é específica para ligninas do tipo siringil (S) e guaiacil-siringil (G:S), dando uma cor vermelho-púrpura nos tecidos que contêm estes dois tipos de lignina (S e G), com espectro de absorção na luz visível ao redor de 520nm, enquanto a predominância de lignina G resulta em cor marrom-amarelada, com ausência de absorção nesse comprimento de onda. Watanabe *et al.* (2004) utilizaram a reação de Maüle, através da qual puderam selecionar a camada S2 da parede celular das fibras, elementos de vaso e parênquima para a microespectrofotometria, demonstrando a eficiência desta reação na identificação das camadas da parede celular. Essa técnica, acoplada com a microespectrofotometria, tem sido usada para avaliar, ou mesmo determinar, a distribuição dessas ligninas nos tecidos. As ligninas presentes em madeiras de angiospermas resultam em coloração avermelhada, enquanto que as madeiras de gimnospermas resultam em coloração amarelada, demonstrando predomínio de lignina S nas primeiras e lignina G nas últimas (Watanabe *et al.* 2004). Em geral, em angiospermas, as paredes secundárias dos vasos contêm predominantemente lignina do tipo guaiacil (G), enquanto que as paredes celulares das fibras possuem alta proporção de lignina do tipo siringil (S), o que justifica a dominância da cor vermelha no tecido como um todo (Yoshizawa *et al*. 1993, 2000). A coloração da reação perde sua intensidade de cor em curto espaço de tempo (até 20 minutos), dificultando sua documentação fotográfica e a análise realizada em microespectrofotometria, que devem ser realizadas imediatamente após a reação (Yoshizawa *et al.* 1999).

A análise microquímica do cerne da madeira de pau-brasil oriunda da Bahia revelou a presença de lignina do tipo guaiacil na parede celular do vaso e em grandes proporções na camada S2 da parede da fibra **(Figura 15)**. A camada S1, por sua vez, apresentou reação que aponta maior quantidade de lignina siringil. Duas amostras de pau-brasil de Moji-Guaçu mostraram semelhanças na coloração das paredes dos vasos entre si, tanto no alburno quanto no cerne, indicando a presença de maior proporção de lignina guaiacil também nesses elementos celulares, corroborando dados de literatura que citam que as paredes celulares dos vasos de angiospermas possuem predominantemente este tipo de lignina **(Figuras 22-25)**. O fato de uma única amostra de alburno de pau-brasil de Moji-Guaçu ter apresentado características semelhantes àquelas do cerne do pau-brasil da Bahia, inclusive com as variações similares na intensidade de coloração observada nas fibras, pode estar relacionado com possíveis diferenças individuais ou com a região do alburno de onde foram obtidas as secções analisadas pela microscopia de luz **(Figuras 20, 21)**. Possivelmente, essa região utilizada corresponda àquela mais próxima ao cerne, o que ocasionou a semelhança em termos de coloração, uma vez que as amostras utilizadas já haviam sido desdobradas sem indicação da porção que ocupavam no disco.

Em resumo, as fibras presentes no lenho de pau-brasil oriundo da Bahia apresentaram padrão de coloração parecido com as da madeira de angico-preto, sugerindo semelhanças na proporção de lignina G:S presente em suas paredes celulares, principalmente na camada S1 da parede celular secundária. Em relação à distribuição de ligninas G:S, o padrão observado para o cerne de pau-brasil foi igual ao de angico-preto, com predomínio de lignina do tipo siringil na camada S1 e guaiacil na camada S2 para ambas madeiras, sendo o contrário observado em eucalipto. O padrão diferente de coloração observado em pau-brasil oriundo da Bahia e de Moji-Guaçu pode estar relacionado ao local de coleta e à idade das plantas. As amostras procedentes de Moji-Guaçu possuíam aproximadamente 25 anos, não sendo conhecida a idade da amostra da Bahia. Comparando-se o diâmetro do tronco das amostras infere-se que a amostra da Bahia possui idade

mais avançada, indicando que esses fatores podem influenciar na composição das ligninas.

Yoshizawa *et al*. (1993), analisando a madeira de *Buxus microphylla* e *Betula ermani* (Betulaceae) através da reação de Maüle, verificaram um padrão de coloração distinto entre as fibras e os vasos, indicando diferenças na proporção de ligninas guaiacil e siringil nos diferentes tecidos e até mesmo em diferentes camadas da parede celular de uma mesma célula. Os resultados aqui obtidos estão de acordo com o proposto por Yoshizawa *et al*. (1999) que sugerem diferenças na deposição de lignina em paredes celulares, fato observado nas camadas S1 e S2 das fibras, principalmente do lenho de pau-brasil.

Por outro lado, Watanabe *et al*. (2004), analisando madeiras de *Eucalyptus camaldulensis* e *E. globosus* após a reação de Maüle (acoplada a microespectrofotometria), verificaram que estas espécies possuem alto teor de polifenóis do tipo siringil em suas paredes celulares, indicando que a presença dos mesmos afeta os resultados das análises microquímicas. Neste caso, a pré-extração dos polifenóis com hidróxido de sódio provocou mudanças na intensidade de coloração e nos espectros de absorção de luz visível das paredes celulares dos elementos de vaso, confirmando essa sugestão.

Como no presente trabalho não foi realizada a pré-extração dos polifenóis antes da aplicação do reativo de Maüle (conforme descrito em Watanabe *et al.* 2004), acredita-se que os resultados obtidos possam estar sendo influenciados pela presença dos mesmos, uma vez que os altos valores obtidos na Lignina de Klason **(Tabela 1)** também podem estar relacionados à presença desses polifenóis. Entretanto, a extração de lignina pelo método Dioxano realizada neste trabalho resultou em valores mais adequados **(Tabela 3)**, uma vez que a lignina é mais pura, apresentando apenas pequena contaminação de proteínas e carboidratos (Hatfield & Fukushima 2005). Comparando-se os resultados obtidos nas **Tabelas 1 e 3**, observa-se que após a extração com Dioxano, foi a amostra de pinus, uma gimnosperma, que apresentou a maior redução na porcentagem de lignina, enquanto aquelas obtidas do alburno e cerne de pau-brasil foram,

proporcionalmente, as menos afetadas dentre as angiospermas estudadas. Observa-se também que a amostra de cerne de eucalipto foi a que apresentou a maior porcentagem de lignina de Klason (sem a extração de polifenóis), enquanto que a amostra de cerne de pau-brasil foi a que apresentou a maior porcentagem de lignina após a extração de polifenóis (método de Dioxano).

Fica claro, assim, que as comparações efetuadas neste trabalho, entre as amostras, são válidas, mesmo sem a extração de polifenóis. Entretanto, há a necessidade de complementar os resultados obtidos, através da extração de novas amostras e análise das secções por reação de Maüle e microespetrofotometria para ambos os tratamentos. Somente desse modo será possível determinar com maior precisão a proporção de resíduos G:S da lignina presente nas paredes celulares de pau-brasil.

3. Parede celular e a resistência à biodeterioração

A disposição, composição e a estrutura da parede celular são fatores que podem contribuir para aumentar a durabilidade natural da madeira. Variações na composição e distribuição de seus componentes conferem à madeira características físicas e mecânicas específicas, que influenciam diretamente a aplicação que será dada à madeira, além de estarem relacionadas à sua resistência à deterioração (Simpson & TenWold 1999).

As análises realizadas neste trabalho revelaram que o alburno e o cerne de pau-brasil diferem basicamente nos teores e composição das frações extraídas em oxalato de amônio e clorito de sódio **(Figuras 26, 27)**. Essas frações concentram polissacarídeos pécticos, que representam cerca de 5,4% e 14% da parede celular do alburno e cerne, respectivamente. A elevada proporção de glucose encontrada nas paredes celulares do alburno de pau-brasil **(Figura 27)** pode indicar a contaminação por amido, polissacarídeo comumente associado à parede celular dos tecidos vivos de troncos, embora testes realizados durante o isolamento das paredes celulares com iodo-iodeto de potássio não tenham

detectado sua presença. A proporção relativa maior de ramnose no alburno e de arabinose no cerne de pau-brasil sugere que os ramnogalacturonanos estejam presentes em maior quantidade no alburno e os arabinanos e arabinoxilanos no cerne.

As demais madeiras mostraram-se bastante variáveis em relação à composição de suas frações pécticas, destacando-se em eucalipto a ausência de ramnose e a detecção de manose e em angico-preto o alto teor de ramnose na fração oxalato e de galactose e arabinose na fração clorito. Esses resultados evidenciam grandes diferenças dessas duas madeiras entre si e com o pau-brasil. Assim, em angico-preto predominam polissacarídeos pécticos como ramnogalacturonanos, galactanos, arabinanos e arabinogalactanos que aparecem como componentes menores em eucalipto e pau-brasil. Em pinus, os altos teores de glucose e manose confirmam o predomínio de glucomananos em suas paredes celulares, como já descrito anteriormente para esta espécie e comumente encontrado em gimnospermas (Rowell *et al.* 2005).

As análises das frações de clorito de sódio e álcali fraco e forte revelaram alto teor de xilose, indicando a presença de um xilano como principal polissacarídeo hemicelulósico presente no alburno e no cerne de pau-brasil **(Figuras 27, 28)**. De um modo geral, em angiospermas, os xilanos e os glucuronoxilanos são os polissacarídeos hemicelulósicos mais abundantes em paredes celulares de madeiras de dicotiledôneas, seguidos de pequena proporção de glucomananos (Bacic *et al*. 1988, Rowell *et al*. 2005), detectados através da presença de manose em eucalipto e angico-preto **(Figuras 27, 28)**.

A principal diferença encontrada em relação ao rendimento das frações da parede celular entre a madeira de pau-brasil e as demais angiospermas analisadas foi o teor de polissacarídeos hemicelulósicos, principalmente os fracamente ligados à celulose. Apesar de variável em rendimento, a composição dessa fração parece ser similar, tendo o xilano como principal polissacarídeo. A razão xilose:arabinose é um indício do grau de ramificação do xilano por unidades de arabinose. Através da análise por HPAEC/ PAD **(Figura 28 A)**, pôde ser

observado maior conteúdo de arabinose no alburno e cerne de pau-brasil, sugerindo que o xilano presente em suas paredes celulares esteja parcialmente substituído por arabinose, visto que a razão xilose:arabinose é de cerca de 7:1 para o alburno e 9:1 no cerne e foi facilmente extraído com álcali de menor força iônica **(Figura 26 A, B)**. Para eucalipto e angico-preto, as análises sugerem a ocorrência de xilanos menos substituídos, uma vez que é necessária força iônica maior para extrair esses últimos da parede celular e a relação xilose:arabinose é maior (46:1 para eucalipto e 100:1 para angico-preto) que aquela encontrada para pau-brasil. As frações álcali fraco e forte nestas madeiras apresentaram rendimentos aproximados, porém, no caso da fração álcali fraco, este rendimento foi 50% menor em eucalipto, quando comparado ao pau-brasil **(Figura 26 C, D)**. O teor de ácidos urônicos **(Figura 28 A, B)** também indica que este xilano pode estar substituído por ácido glucurônico, porém em menores proporções no pau-brasil quando comparado a eucalipto e angico-preto.

Willför *et al*. (2005b), analisando a composição de polissacarídeos em madeiras de angiospermas, entre elas duas espécies de eucalipto, *Eucalyptus dunnii* e *E. globosus*, encontraram altas quantidades de xilose e glucose em ambas, seguidas de menor quantidade de galactose para *E. globosus* e em quantidades semelhantes de galactose e manose para *E. dunnii*, sugerindo a presença de xilanos, glucomananos e também de glucuronoxilanos em suas paredes celulares. Os galactoglucomananos e os glucuronoarabinoxilanos, seguidos de menores quantidades de glucomananos são os principais polissacarídeos hemicelulósicos encontrados em madeiras de gimnospermas (Lepage *et al*. 1986, Bochicchio 2003). Na amostra de pinus analisada foram encontrados altos teores de manose, glucose e xilose, além de quantidades menores de arabinose e galactose, indicando a presença desses polissacarídeos nas paredes celulares analisadas. Willför *et al* (2005a), analisando os polissacarídeos presentes nas madeiras de algumas gimnospermas, entre elas *Pinus banksiana* e *P. resinosa*, encontraram altos teores de manose e xilose, seguidos de menores quantidades de glucose, galactose e arabinose, sugerindo a

presença de galactoglucomananos e mananos como os principais polissacarídeos dessas espécies.

Em resumo, a análise comparativa realizada no presente trabalho sobre a composição da parede celular de pau-brasil e de outras madeiras de importância econômica, indicou que a madeira de pau-brasil difere na composição de ligninas e no teor de hemiceluloses, mas em composição é similar às demais madeiras de angiospermas aqui analisadas, em vários aspectos. Assim, assemelha-se tanto à madeira de eucalipto como a de angico-preto, que possuem baixa e alta resistência, respectivamente. Apesar do teor de polissacarídeos por si só não ser responsável pela resistência da madeira, a semelhança da madeira de pau-brasil com a de angico-preto, que é altamente resistente, sugere que a parede celular pode ser um componente importante dentre os fatores relacionados com a resistência a organismos xilófagos. Quanto à resistência física e mecânica, ensaios realizados por pesquisadores do Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo sugerem que o pau-brasil é uma madeira muito pesada, de alta densidade e alta resistência mecânica, sendo também comparável, em relação a estas características, à madeira de angico-preto (Takashi Yojo, comunicação pessoal).

A análise, por cromatografia líquida de alta eficiência, do material removido dos corpos de prova dos bioensaios com fungos apodrecedores mostrou que houve redução preferencial de xilose nas madeiras de eucalipto e angico-preto, galactose em pau-brasil e eucalipto e ramnose em pau-brasil, como as alterações mais evidentes. Embora seja conhecido o fato que diferentes fungos degradam preferencialmente alguns polissacarídeos em detrimento de outros, as análises efetuadas neste trabalho não permitiram evidenciar esse fato, possivelmente devido à degradação ter sido incipiente para a maioria das madeiras de angiospermas utilizadas. Para os ensaios com a podridão branca, foi nítida a redução dos monossacarídeos que compõem a fração péctica da parede celular, principalmente no alburno e no cerne de pau-brasil **(Figura 31 A, B)**.

Os fungos de podridão parda degradam preferencialmente celulose e hemiceluloses (Irbe *et al*. 2001), o que foi parcialmente observado, uma vez que os teores de xilose e galactose, ligados provavelmente a polissacarídeos hemicelulósicos, tiveram sua quantidade reduzida no cerne de eucalipto. Entretanto, o conteúdo de glucose, que é o principal componente da celulose, parece não ter sido afetado. De acordo com Brazolin & Tomazello Filho (1999), os fungos de podridão mole degradam preferencialmente a celulose, embora as hemiceluloses também sejam degradadas. Porém, no perfil de degradação observado, ocorreu a redução preferencial no conteúdo de galactose em todas as amostras, exceto para angico-preto, e xilose em eucalipto e angico-preto, sugerindo a degradação de hemiceluloses, além do desaparecimento de manose em angico-preto e pinus, evidenciando a remoção do manano presente em suas paredes celulares. Em pinus, ficou bastante evidente a degradação do glucomanano pela podridão branca e parda, levando a uma drástica redução no teor de manose da parede celular **(Figura 31 E)**.

CONCLUSÕES

O conjunto de resultados obtidos no desenvolvimento desta pesquisa amplia consideravelmente o conhecimento sobre as características bioquímicas da madeira de pau-brasil e permite concluir que:

- ✓ A madeira de pau-brasil segue o padrão normalmente observado para as angiospermas, como alto teor de extrativos no cerne, predomínio de lignina G nas paredes celulares dos elementos de vaso e lignina S nas paredes das fibras e xilanos como principal polissacarídeo hemicelulósico presente em suas paredes celulares;
- ✓ Devido à degradação incipiente e após a comparação com madeiras de resistência conhecida, o cerne de pau-brasil é considerado altamente resistente ao ataque de organismos xilófagos. O alburno ocasionou alta mortalidade de cupins, sugerindo que ele é resistente ao ataque de cupim-de-madeira-seca;
- ✓ Diferenças no teor de ligninas e polissacarídeos hemicelulósicos entre a madeira de pau-brasil e de angico-preto indicam que a resistência natural apresentada pelo pau-brasil não pode ser atribuída a um fator isolado, mas se deve possivelmente à interação de vários dos seus componentes, que incluem extrativos e polímeros da parede celular.

Em resumo, dados aqui apresentados sugerem que a madeira de pau-brasil deve ter desempenho semelhante àquelas de alta resistência, como o angico-preto, podendo, desse modo, ser uma alternativa de uso para os mesmos fins quando esse tipo de madeira é requerido. Entretanto, o pau-brasil é uma espécie de crescimento lento e que se encontra atualmente na lista do IBAMA de espécies ameaçadas de extinção, de modo que sua indicação para usos múltiplos, além dos fins mais nobres como a confecção de arcos para instrumentos de corda, para os quais tem sido destinada, deve considerar esses fatos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar, F.F.A., Kanashiro, S., Tavares, A.R., Pinto, M.M., Stancato, G.C., Aguiar, J. & Nascimento, T.D.R. 2005. Germinação de sementes e formação de mudas de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil): efeito do sombreamento. Revista Árvore 29: 871-875.

Aldington, S. & Fry, S.C. 1993. Oligosaccharins. Advances in Botanical Research 19: 1-101.

Alves, M.V.S., Costa, A.F., Espig, D.S. & Vale, A.T. 2006. Resistência natural de seis espécies de madeiras da região amazônica a fungos apodrecedores, em ensaios de laboratório. Ciência Florestal 16: 17-26.

Awano, T., Takabe, K. & Fujita, M. 2002. Xylan deposition on secondary wall of *Fagus crenata* fiber. Protoplasma 219: 106-115.

Bacic, A., Harris, P.J. & Stone, B.A. 1988. Structure and function of plant cell walls. *In* The Biochemistry of Plants: a comprehensive treatise. Volume 14: Carbohydrates. J. Preiss (org.). Academic Press, Califórnia, pp. 297-371.

Baillères, H., Castan, M., Monties, B., Pollet, B. & Lapierre, C. 1997. Lignin structure in *Buxus sempervirens* reaction wood. Phytochemistry 44: 35-39.

Bergander, A. & Salmén, L. 2002. Cell wall properties and their effects on the mechanical properties of fibers. Journal of Material Science 37: 151-156.

Blanchete, R.A. 1991. Delignification of wood-decay fungi. Annual Review of Phytopathology 29: 381-398.

Bochicchio, R. 2003. Aspectos estruturais, interações e dinâmica de crescimento da parede celular de caules de gimnospermas nativas. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 147p.

Boudet, A.M. 2000. Lignins and lignification: selected issues. Plant Physiology and Biochemistry 38: 81-96.

Brazolin, S. 1998. Podridão mole em madeira de *Tabebuia* sp. (ipê) em torre de resfriamento de água: identificação e avaliação da capacidade de degradação dos fungos e alterações na estrutura anatômica da madeira.

Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/ USP, Piracicaba, 139p.

Brazolin, S. & Tomazello Filho, M. 1999. Alterações na estrutura anatômica de madeira de *Tabebuia* sp. (Ipê) de torre de resfriamento de água, por fungos de podridão mole. Scientia Florestalis 55: 97-105.

Brazolin, S.; Fernandes, J.L.G.; Lopes, G.A.C.; Monteiro, M.B.B. & Zenid, G.J. 2001. Biodeterioração de madeiras em edificações. IPT, São Paulo, 54p.

Burger, L.M. & Richter, H.G. 1991. Anatomia da madeira. Nobel, São Paulo, 154p.

Campbell, M.M. & Sederoff, R.R. 1996. Variation in lignin content and composition. Plant Physiology 110: 3-13.

Carpita, N.C. & Gibeaut, D.M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. The Plant Journal 3: 1-30.

Carpita, N. & McCann, M. 2000. The Cell Wall. *In* Biochemistry & Molecular Biology of Plants. B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones (eds.). American Society of Plants Physiologists, pp. 52-108.

Carvalho, P.E.R. 1994. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidade e uso da madeira. EMBRAPA-CMNPG/ SPI, Brasília, 640p.

Cassab, G.I. 1998. Plant cell wall proteins. . Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 49: 281-309.

Chudnoff, M. 1984. Tropical timbers of the world. Agricultural Handbook 607. USDA Forest Service, Washington, 466p.

Darvill, A.G., Augur, C., Bergmann, C., Carlson, W., Cheong, J.J., Eberhard, S., Hahn, M.G. *et al.* 1992. Oligosaccharins: oligosaccharides that regulated growth, development and defense responses in plants. Glicobiology 2: 181-198.

Dixon, R.A., Chen, F., Guo, D. & Parvathi, K. 2001. The biosynthesis of monolignols: a "metabolic grid"or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? Phytochemistry 57: 1069-1084.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28: 350-356.

Dumville, J.C. & Fry, S.C. 2000. Uronic acid-containing oligosaccharins: their biosynthesis, degradation and signalling roles in non-diseased plant tissues. Plant Physiology and Biochemistry 38: 125-140.

Ferraz, A., Rodriguez, J., Freer, J. & Baeza, J. 2001. Biodegradation of *Pinus radiata* softwood by white- and brown- rot fungi. World Journal of Microbiology & Biotechnology 17: 31-34.

Filisetti-Cozzi, T.M.C.C. & Carpita, N.C. 1991. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. Analytical Biochemistry 197: 157-162.

Fukushima, R.S. & Savioli, N.M.F. 2001. Correlação entre digestibilidade *in vitro* da parede celular e três métodos analíticos para a avaliação quantitativa da lignina. Revista Brasileira de Zootecnia 30: 302-309.

Fukushima, R.S. & Hatfield, R.D. 2001. Extraction and isolation of lignin for utilization as a standard to determine lignin concentration using the acetyl bromide spectrophotometric method. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49: 3133-3139.

Fukushima, R.S. & Hatfield, R.D. 2004. Comparison of the acetyl bromide spectrophotometric method with other analytical lignin methods for determining lignin concentration in forage samples. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 3713-3720.

Garcia, I.S., Souza, A., Barbedo, C.J., Dietrich, S.M.C. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. 2006. Changes in soluble carbohydrates during storage of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. Brazilian Journal of Biology 66: 29-41.

Girardi, G.S.; Gimenez, R.A. & Braga, M.R. 2006. Occurrence of *Platypus mutatus* Chapuis (Coleoptera: Platypodidae) in a brazilwood experimental plantation in southeast of Brazil. Neotropical Entomology 35: 864-867.

Gonçalves, F.G. & Oliveira, J.T.S. 2006. Resistência ao ataque de cupim-de-madeira-seca (*Cryptotermis brevis*) em seis espécies florestais. Revista Cerne 12: 80-83.

Gorshkova, T.A., Wyatt, S. E., Salnikov, V.V., Gibeaut, D.M., Ibragimov, M.R., Lozovaya, V.V. & Carpita, N.C. 1996. Cell-wall polysaccharides of developing flax plants. Plant Physiology 110: 721-729.

Grabber, J. H., Ralph, J., Hatfield, R.D. & Quideau, S. 1997. *p*-hydroxyphenil, guaiacyl and syringyl lignins have similar inhibitory effects on wall degradability? Journal of Agricultural and Food Chemistry 45: 2530-2532.

Haselein, C.R., Lopes, M.C., Santini, E.J., Longhi, S.J., Rosso, S., Fernandes, D.L.G. & Menezes, L.F. 2004. Características tecnológicas da madeira de árvores matrizes de *Eucalyptus grandis*. Ciência Florestal 14: 145-155.

Hatfield, R.D., Jung, H.G., Ralph, J., Buxton, D.R. & Weimer, P.J. 1994. A comparison of the insoluble residues produced by the Klason lignin and acid detergent lignin procedures. Journal of Science and Food Agriculture 65: 51-58.

Hatfield, R.D. & Vermerris, W. 2001. Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. Plant Physiology 126: 1351-1357.

Hatfield, R. & Fukushima, R.S. 2005. Can lignin be accurately measured? Crop Science 45: 832-839.

Hoch, G., Richter, A. & Körner, Ch. 2003. Non-structural carbon compounds in temperate forest trees. Plant, Cell and Environment 26: 1067-1081.

Horbowicz, M., Brenac, P. & Obendorf, R.L. 1998. Fagopyritol B1, *O*-α-D-galactopyranosyl-(1→2)-D-*chiro*-inositol, a galactosyl cyclitol in maturing buckwheat seeds associated with desiccation tolerance. Planta 205: 1-11.

Irbe, I., Andersone, I., Andersons, B. & Chirkova, J. 2001. Use of ^{13}C NMR, sorption and chemical analyses for characterisitics of brown-rotted Scots pine. International Biodeterioration & Biodegradation 47: 37-45.

Istek, A., Sivrikaya, H., Eroglu, H. & Gulsoy, S.K. 2005. Biodegradation of *Abies bornmülleriana* (Mattf.) and *Fagus orientalis* (L.) by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. International Biodeterioration & Biodegradation 55: 63-67.

Joseleau, J.P. & Ruel, K. 1997. Study of lignification by noninvasive techniques in growing maize internodes. Plant Physiology 114: 1123-1133.

Kuria, K.A.M., Coster, S., Muriuki, G., Masengo, W., Kibwage, I., Hoogmartens, J. & Laekeman, G.M. 2001. Antimalarial activity of *Ajuga remota* Benth (Labiatae) and *Caesalpinia volkensii* Harms (Caesalpiniaceae): in vitro confirmation of ethnopharmacological use. Journal of Ethnopharmacology 74: 141-148.

Lange, W. & Faix, O. 1999. Lignin-polyphenol interaction in azobe (*Lophira alata*) heartwood. A study on milled wood lignin (MWL) and Klason residues. Holzforschung 53: 519-524.

Lelis, A.T., Brazolin, S., Fernandes, J.L.G., Lopez, G.A.G., Monteiro, M.B.B. & Zenid, G. 2001. Biodeterioração de madeiras em edificações. Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, 54p.

Lepage, E.S. 1986. Química da madeira. *In* Manual de preservação de madeiras. Volume 1. E.S. Lepage (coord.). Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, pp. 69-97.

Lichtenegger, H., Reiterer, A., Stsnzl-Tschegg, E. & Fratzl, P. 1999. Variation of cellulose microfibril angles in softwoods and hardwoods- a possible strategy of mechanical optimization. Journal of Structural Biology 128: 257-269.

Longui, E.L. 2005. Pau-brasil e outras espécies nativas empregadas na fabricação de arcos para instrumentos de corda: um estudo comparativo. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo, 65p.

Lorenzi, H. 1992. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Editora Plantarum, Nova Odessa, São Paulo, 352p.

Luna, J.S., Santos, A.F., Lima, M.R.F., Omena, M.C., Mendonça, F.A.C., Bieber, L.W. & Sant´Ana, A.E.G. 2005. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. Journal of Ethnopharmacology 97: 199-206.

Ma, J.M., Horbowicz, M. & Obendorf, R.L. 2005. Cyclitol galactosides in embryos of buckwheat stem-leaf-seed explants fed D-*chiro*-inositol, *myo*-inositol or D-pinitol. Seed Science Research 15: 329-338.

Mainieri, C. 1960. Estudo macro e microscópico de madeiras conhecidas por pau-brasil. Publicação IPT 612, São Paulo, 62p.

Mainieri, C. & Chimelo, J.P. 1989. Fichas de características das madeiras brasileiras. Ficha nº. 19, Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Divisão de Madeiras, São Paulo, pág. 37-38.

Matsunaga, M., Sugiyama, M., Minato, K. & Norimoto, M. 1996. Physical and mechanical properties required for violin bow materials. Holzforschung 50: 511-517.

Matsunaga, M. & Minato, K. 1998. Physical and mechanical properties required for violin bow materials II: Comparison of the processing properties and durability between pernambuco and substitutable wood species. Journal of Wood Science 44: 142-146.

Matsunaga, M., Obataya, E., Minato, K. & Nakatsubo, F. 2000a. Working mechanism of adsorbed water on the vibrational properties of wood impregnated with extractives of pernambuco (*Guilandina echinata* Spreng.). Journal of Wood Science 46: 122-129.

Matsunaga, M., Sakai, K., Kamitakahara, H., Minato, K. & Nakatsubo, F. 2000b. Vibrational property changes of spruce wood by impregnation with water-soluble extractives of pernambuco (*Guilandina echinata* Spreng.) II: structural analysis of extractive components. Journal of Wood Science 46: 253-257.

Merchant, A., Tausz, M., Arndt, S.K. & Adams, M.A. 2006. Cyclitols and carbohydrates in leaves and roots of 13 *Eucalyptus* species suggest contrasting physiological responses to water deficit. Plant, Cell and Environment 29: 2017-2029.

Meskimen, G. & Francis, J.K. 1990. *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden: rose gum eucalyptus. *In* Agricultural Handbook 654. Department of Agriculture, Washington DC, pp. 211-217.

Miller, R.B. 1999. Characteristics and availability of commercially important woods. *In* Wood Handbook-wood as an engineering material. Department of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory, U.S., 463p.

Minato, K., Sakai, K., Matsunaga, M. & Nakatsubo, F. 1997. The vibrational properties of Word impregnated with extractives of some species of Leguminosae. Mokuzai Gakkaishi 43: 1035-1037.

Minorsky, P.V. 2002. The wall becomes surmountable. Plant Physiology 128: 345-353.

Monteiro, M.B.B. 1997. Método alternativo de ensaio acelerado para avaliação da resistência natural de madeiras ao ataque de fungos apodrecedores. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP, Piracicaba, 73 p.

Moraes, F., Hahn, M.G. & Braga, M.R. 2001. Comparative analysis of leaf cell-wall polysaccharides of *Dialypetalanthus fuscescens* and *Bathysa meridionalis*: evidence of biochemical similarities between Dialypetalanthaceae and Rubiaceae-Cinchonoideae. Revista Brasileira de Botânica 24: 289-294.

Morais, S.A.L., Nascimento, E.A., Queiroz, C.R.A.A., Piló-Veloso, D. & Drumond, M.G. 1999. Studies on polyphenols and lignin of *Astronium urundeuva* wood. Journal of Brazilian Chemical Society 10: 447-452.

Noiraud, N., Maurousset, L. & Lemoine, R. 2001. Transport of polyols in higher plants. Plant Physiology and Biochemistry 39: 717-728.

Oliveira, L.F.C., Edwards, H.G.M., Velozo, E.S. & Nesbitt, M. 2002. Vibrational spectroscopy study of brazilin and brazilein, the main constituents of brazilwood from Brazil. Vibrational Spectroscopy 28: 243-249.

Oliveira, J.T.S., Souza, L.C., Della Lucia, R.M. & Souza Jr, W.P. 2005a. Influência dos extrativos na resistência ao apodrecimento de seis espécies de madeira. Revista Árvore 29: 819-826.

Oliveira, J.T.S., Tomasello. M. & Silva, J.C. 2005b. Resistência natural da madeira de sete espécies de eucalipto ao apodrecimento. Revista Árvore 29: 993-998.

Oliveira, J.T.S. & Della Lucia, R.M. 1994. Teores de extrativos de 27 espécies de madeiras nativas do Brasil ou aqui introduzidas. Boletim Técnico 9, Viçosa, 5p.

Onuorah, E.O. 2000. The wood preservative potentials of heartwood extracts of *Milicia excelsa* and *Erythrophleum suaveolens*. Bioresource Technology 75: 171-173.

Paes, J.B. 2002. Resistência natural da madeira de *Corymbia maculata* (Hook.) K.D.Hill. & L.A.S. Johnson a fungos e cupins xilófagos, em condições de laboratório. Revista Árvore 26: 761-767.

Paes, J.B., Morais, V.M. & Lima, C.R. 2002. Resistência das madeiras de aroeira (*Myracrodruon urundeva*), cássia (*Senna siamea*) e ipê (*Tabebuia impetiginosa*) a fungos e cupins xilófagos, em condições de laboratório. Floresta e Ambiente 9: 135-144.

Paes, J.B., Morais, V.M., Farias-Sobrinho, D.W. & Bakke, O.A. 2003. Resistência natural de nove madeiras do semi-árido brasileiro a cupins subterrâneos, em ensaio de laboratório. Revista Cerne 9: 36-47.

Paes, J.B., Morais, V.M. & Lima, C.R. 2004. Resistência natural de nove madeiras do semi-árido brasileiro a fungos xilófagos em condições de laboratório. Revista Árvore 28: 275-282.

Paes, J.B., Morais, V.M. & Lima, C.R. 2005. Resistência natural de nove madeiras do semi-árido brasileiro a fungos causadores da podridão-mole. Revista Árvore 29: 365-371.

Pandey, K.K. 1999. A study of chemical structure of soft and hardwood and wood polymers by FTIR spectroscopy. Journal of Applied Polymer Science 71: 1969-1975.

Pereira, D.E.D., Demuner, B.J., Bertolucci, F.L.G. & Pasquali, S.M. 1994. A relação guaiacil/ siringil como critério de seleção de árvores e sua importância no processo de deslignificação. *In* Anais do 1º Congresso Latino Americano de Deslignificação, Vitória, pp. 21-31.

Peterbauer, T. & Richter, A. 2001. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. Seed Science Research 11: 185-197.

Pickel, B.J. 1951. As principais árvores brasileiras que dão madeira. Anuário Brasileiro de Economia Florestal 4: 142-172.

Piquemal, J., Lapierre, C., Myton, K., O'Connell, A., Schuch, W., Grima-Pettenati, J. & Boudet, A.M. 1998. Down regulation of cinnamoyl-CoA reductase induces significant changes of lignin profiles in transgenic tobacco plants. The Plant Journal 13: 71-83.

Plomion, C., Leprovost, G. & Stokes, A. 2001. Wood formation in trees. Plant Physiology 127: 1513-1523.

Reis, D., Vian, B. & Roland, J.C. 1994. Cellulose-glucuronoxylans and plant cell wall structure. Micron 25: 171-187.

Rezende, C.M., Corrêa, V.F.S., Costa, A.V.M.; Castro, B.C.S. & Alves, R.J.V. 2004. Constituintes químicos voláteis das flores e folhas do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). Química Nova 27: 414-416.

Rizzini, C.T. 1971. Manual de dendrologia brasileira: árvores e madeiras úteis do Brasil. Ed. Edgard Blucher, São Paulo, pp. 112-114.

Roberts, K. 2001. How the cell wall acquired a cellular context. Plant Physiology 125: 127-130.

Rocha, Y.T. 2004. Ibirapitanga: história, distribuição geográfica e conservação do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam. Leguminosae) do descobrimento à atualidade. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 396p.

Rowell, R.M., Pettersen, R., Han, J.S., Rowell, J.S. & Tshabalala, M.A. 2005. Cell wall chemistry. *In* Handbook of wood chemistry and wood composites. Roger M. Rowell (ed.), Washington, pp. 35-74.

Sakai, K., Matsunaga, M., Minato, K. & Nakatsubo, F. 1999. Effects of impregnation of simple phenolic and natural polycyclic compounds on physical properties of wood. Journal of Wood Science 45: 227-232.

Schimitt, U.; Singh, A.P., Thieme, H.; Friedrich, P. & Hoffmann, P. 2005. Electron microscopic characterization of cell wall degradation of the 400,000-year-old wooden Schöningen spears. Holz als Roh- und Werkstoff 63: 118-122.

Schultz, T.P.; Harms, W.B.; Fisher, T.H.; McMurtrey, K.D.; Minn, J. & Nicholas, D.D. 1995. Durability of angiosperm heartwood- the importance of extractives. Holzforschung 49: 29-34.

Schultz, T.P. & Nicholas, D.D. 2000. Naturally durable heartwood: evidence for a proposed dual defensive function of the extractives. Phytochemistry 54: 47-52.

Schwarze, F.W.M.R., Baum, S. & Fink, S. 2000. Resistance of fibre regions in wood of *Acer pseudoplatanus* degraded by *Armillaria mellea*. Mycological Research 104: 1126-1132.

Silva, D.A. & Trugilho, P.F. 2003. Comportamento dimensional da madeira de cerne e alburno utilizando-se a metodologia de análise de imagem submetida a diferentes temperaturas. Revista Cerne 9: 56-65.

Silva, J.C. 2001. Eucalipto: a madeira do futuro. Revista da Madeira, edição especial, 114p.

Silva, J.C., Lopez, A.G.C. & Oliveira, J.T.S. 2004. Influência da idade na resistência natural da madeira de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex. Maiden ao

ataque de cupim de madeira seca (*Cryptotermes brevis*). Revista Árvore 28: 583-587.

Simões, K., Dietrich, S.M.C., Hahn, M.G. & Braga, M.R. 2005. Purification and characterization of a phytoalexin elicitor from spores of the saprobe *Mucor ramosissimus*. Revista Brasileira de Botânica 28: 735-744.

Simpson, W. & TenWold, A. 1999. Physical properties and moisture relations of wood. *In* Wood Handbook- Wood as an engineering material. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory, U.S., 463p.

Singh, A.P. & Daniel, G. 2001. The S2 layer in the tracheid walls of *Picea abies* wood: inhomogeneity in lignin distribution and cell wall microstructure. Holzforschung 55: 373-378.

Singh, A., Daniel, G. & Nilsson, T. 2002. High variability in the thickness of the S3 layer in *Pinus radiata* tracheids. Holzforschung 56: 111-116.

Singh, A.P., Schmitt, U., Möller, R., Dawson, B.S.W. & Koch, G. 2006. Ray tracheids in *Pinus radiata* are more highly resistant to soft rot as compared to axial tracheids: relationship to lignin concentration. Wood Science and Technology 40: 16-25.

Souza, A.; Moraes, M.G. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. 2005. Gramíneas do cerrado: carboidratos não-estruturais e aspectos ecofisiológicos. Acta Botanica Brasilica 19: 81-90.

Stumpp, E., Rech, V., Sattler, M.A., Barros, N.M. & Abitante, A.L. 2006. Avaliação de sustentabilidade e eficácia de tratamentos preservantes naturais de madeiras de florestas plantadas no RS para o controle do cupim. Ambiente Construído 6: 21-31.

Vasconcelos, L.L. 1994. Primórdios do comércio de pau-brasil. Textos para discussão. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Van Cutsem, P. & Messiaem, J. 1994 Biological effects of pectic fragments in plants cells. Acta Botanica Neerland 43: 231-245.

Vernon, D.M., Tarczynski, M.C., Jensen, R.G. & Bohnert, J. 1993. Cyclitol production in transgenic tobacco. The Plant Journal 4: 199-205.

Vian, B., Reis, D., Mosiniak, M., & Roland, J.C. 1986. The glucuronoxylans and the helicoidal shift in cellulose microfibrils in linden wood: cytochemistry in muro and on isolated molecules. Protoplasma 131: 185-199.

Watanabe, T. & Koshijima, T. 1988. Evidence for ester linkage between lignin and glucuronic acid in lignin-carbohydrate complexes by DDQ-oxidation. Agricultural and Biological Chemistry 52: 2953-2955.

Watanabe, Y., Kojima, Y., Ona, T., Asada, T., Sano, Y., Fuzakawa, K. & Funada, R. 2004. Histochemical study on heterogeneity of lignin in *Eucalyptus* species II. The distribution of lignins and polyphenols in the walls of various cell types. IAWA Journal 25: 283-295.

Whetten, R.W., MacKay, J.J. & Sederoff, R.R. 1998. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 49: 585-609.

Wiedenhoeft, A.C. & Miller, R.B. 2005. Structure and function of wood. *In* Handbook of wood chemistry and wood composites. Roger M. Rowell (ed.), Washington, pp. 9-33.

Willför, S.; Sundberg, A.; Hemming, J. & Holmbom, B. 2005a. Polysaccharides in some industrially important softwood species. Wood Science and Technology 39: 245-258.

Willför, S.; Sundberg, A.; Pranovich, J. & Holmbom, B. 2005b. Polysaccharides in some industrially important hardwood species. Wood Science and Technology 39: 601-617.

Xie, Y.W., Ming, D.S., Xu, H.X., Dong, H. & But, P.P.H. 2000. Vasorelaxing effects of *Caesalpinia sapan*. Involvement of endogenous nitric oxide. Life Sciences 67: 1913-1918.

Yoshizawa, N.; Watanabe, N.; Yokota, S. & Idei, T. 1993. Distribution of guaiacyl and syringyl lignins in normal and compression wood of *Buxus microphylla* var. Insularis Nakai. IAWA Journal 14: 139-151.

Yoshizawa, N., Ohba, H., Uchiyama, J. & Yokota, S. 1999. Deposition of lignin in differentiating xylem cell walls of normal and compression wood of *Buxus microphylla* var. *insularis* Nakai. Holzforschung 53: 156-160.

Yoshizawa, N.; Inami, A.; Miyake, S.; Ishiguri, F. & Yokota, S. 2000. Anatomy and lignin distribution of reaction wood in two *Magnolia* species. Wood Science and Technology 34: 183-196.

Zabel, R.A. & Morrell, J.J. 1992. Wood Microbiology: decay and its prevention. Academic Press, Califórnia, 476p.

Páginas da Internet

http://www.cbmm.com.br. Acessada em maio/2006.

http://www.mgonline.com/natives.html. Acessada em maio/2006.

http://www.anbg.gov.au/images/photo-cd/myrtaceae.Acessada em setembro/2006.

http://www.mailer.fsu.edu. Acessada em setembro/2006.

http://www.tokstok.com.br. Acessada em junho/2006.

http://www.paubrasilvirtual.bio.br . Acessada em outubro/2006.

Artigo

Biodeterioration of Brazilwood *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae – Caesalpinioideae) by rot fungi and termites.

Aceito para publicação na Revista International Biodeterioration and Biodegradation

Biodeterioration of Brazilwood *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae – Caesalpinioideae) by rot fungi and termites

Claudia Alves da Silva[1], Maria Beatriz Bacellar Monteiro[2], Sérgio Brazolin[2], Gonzalo Antonio Carballeira Lopez[2], Andreas Richter[3], Márcia Regina Braga[1*]

[1] *Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Instituto de Botânica, CP 4005, 01061-970, São Paulo, SP, Brazil*
[2] *Laboratório de Preservação de Madeiras e Biodeterioração de Materiais, Centro de Tecnologia de Recursos Florestais, Instituto de Pesquisas Tecnológicas, CP 7141, 01064-970, São Paulo, SP, Brazil*
[3] *Department of Chemical Ecology & Ecosystem Research, University of Vienna, A-1090, Wien, Austria*

* Corresponding author (M.R. Braga)
Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Instituto de Botânica, CP 4005, 01061-970, São Paulo, SP, Brazil, phone: 55 11 5073 6300 ext. 289, fax: 55 11 5073 3678, E-mail address: bragamr@ig.com.br or bragamr@canalvip.com.br

Relevance:
In the present work we demonstrate that the heartwood of *Caesalpinia echinata* Lam, the most appropriate material for violin bows due to the unique vibrational and physical properties, are very resistant to the attack of rot fungi and dry-wood termites. As an endangered species, this information is relevant to its preservation through cultivation in plantations or as an ornamental species in streets and parks, and also for its use as timber-in-service. The information that brazilwood is resistant to rot fungi and termites can expand its utilization as a commercial wood of high durability beyond the manufacturing of violin bows. Considering that the natural populations of this species are scarce, cultivation in plantations is an alternative to increase its production and consequently, its preservation. Resistance to rot fungi and termites is also an important feature for street arborisation.

Abstract

The heartwood of *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae) (commonly called brazilwood) is used for violin bow manufacture due to the unique vibrational and physical properties found in the wood. In the present work, the effects of *Pycnoporus sanguineus* (white-rot fungus), *Gloeophyllum trabeum* (brown-rot fungus), *Chaetomium globosum* (soft-rot fungus) and *Cryptotermes brevis* (dry-wood termite) on weight losses and chemical composition of extractives and cell wall polysaccharides of *Caesalpinia echinata* wood were investigated under laboratory conditions and compared to those obtained for *Anadenanthera macrocarpa*, *Eucalyptus grandis,* and *Pinus elliottii.* The heartwood of *C. echinata* was found to be as resistant as *A. macrocarpa* to the decay fungi tested and to the attack of the dry-wood termite. Pinitol and galactopinitol A were the main sugar alcohols found in the extractives of wood of *C. echinata*, their presence, however, did not appear related to the resistance to fungal decay. Although only incipient stages of decay were found, the modifications in cell wall polysaccharide composition of heartwood of *C. echinata* by rot fungi were related to decrease in polymers other than xylans. The high resistance of *C. echinata* to xylophages is probably due to the presence of toxic extractives in the wood.

Keywords: brazilwood, rot fungi, termites, cell wall, *Caesalpinia echinata*, sugar alcohols

1. Introduction

One of the most limiting factors for the commercial utilization of wood is its low resistance to fungi and termites. Rot fungi and some species of termites are important and potent wood-destroying organisms attacking various components of the wood (Istek et al., 2005; Gonçalves and Oliveira, 2006).

The ability of rot fungi to degrade wood varies among fungal species and depends on the chemical properties of the wood and its structural features. Wood decay is initiated by fungal enzymes, acting on cell-wall components of the wood. Although most of wood-rotting fungi are able to degrade both cellulose and lignin, they exhibit different degradation rates for these substances. According to macroscopic differences of their substrate utilization, wood-rotters are classified into three specific decay groups: white-rot, brown-rot and soft-rot fungi (Tuor et al., 1995).

Insects, like fungi, are major players in the biodegradation of wood. Termites are the main xylophagous insects and dry-wood termites are one of the largest causes of damages in wood used in Brazil (Silva et al., 2004). They can degrade dead wood of living trees and timber-in-service, living deep inside wood. They rely on symbiotic protozoa or bacteria in their hindgut to degrade cellulose (Zabel and Morrell, 1992).

Caesalpinia echinata Lam. (pau-brasil, brazilwood, pernambuco) is a leguminous tree restricted to the Brazilian Atlantic Forest, from the states of Rio Grande do Norte to Rio de Janeiro (Lewis, 1998). Currently, the heartwood of *C. echinata* is used as the most appropriate material for violin bows due to the unique vibrational properties and dimensional stability and durability of the wood (Matsunaga et al., 2000). Due to exploitation and deforestation, *C. echinata* is in the list of the Brazilian species at risk of extinction and is restricted to the only 5% the original forest remains in the northeast of Brazil (Ibama, 1992; Rocha, 2004). As an endangered species, attempts to preserve this species are currently undertaken by cultivation in some experimental plantations in the southeast of Brazil. Cultivation of brazilwood out of its natural habitat requires information about its behavior under new environmental biotic and abiotic conditions.

The heartwoods of some tree species are naturally resistant to insect and fungal attack, largely due to the presence of extractives (Onuorah, 2000), although structural components of the cell wall also contribute to resistance. Recent work has demonstrated that changes in the tree´s environment during growth can affect heartwood extractive content in some species (Taylor et al., 2003). For *C. echinata,* Luna et al. (2005) have reported insecticidal and molluscicidal activities of extracts obtained from its wood and leaves. In spite of these findings, an experimental plantation of brazilwood in southern Brazil was attacked by the ambrosia beetle *Platypus mutatus* Chapuis (=*Megaplatypus mutatus*), a native Coleoptera species of South America (Girardi et al., 2006), which invades live standing trees, drilling the trunks and forming small tunnels infected with a fungus (ambrosia), causing dark staining and wood decay.

During a larger study on the usability of *C. echinata* we evaluate the resistance to biodeterioration caused by rot fungi and a dry-wood termite on the wood, under laboratory conditions using wood samples from an experimental plantation in southern Brazil. We focused on understanding the contribution of cellular components, such as low-molecular-weight compounds, sugar alcohols, and cell wall composition to brazilwood resistance to

biological decay. Woods of *Anadenanthera macrocarpa*, *Eucalyptus grandis*, and *Pinus elliottii* Engelm. var. *elliotti*, which present different resistance to rot fungi and termites, were also analyzed for comparison.

2. Materials and methods

Samples of *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae – Caesalpinioideae) wood were obtained from three 25-year-old trees harvested in an experimental plantation located in the Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, Mogi-Guaçu, SP, Brazil, 22°15´02,4´´S and 47°09´28,9´´W, 660 m alt. Wood cuts were kept in controlled chambers (25 ºC and 70% RH) for 5 months up to fibers rise 25% moisture content.

Wood blocks (10 x 10 x 2 mm) from sapwood and heartwood were sawed, dried at 105 °C for 24 h, and weighed. Samples of heartwoods of *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan (Leguminosae-Mimosoideae) from Aquidauana, MT, which is very resistant to biodeterioration (Mainieri and Chimelo, 1989), and *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden (Myrtaceae) from Estação Experimental de Ciências Florestais de Anhembi, SP, Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP, which showed low resistance to xylophagous organisms, and sapwood of *Pinus elliottii* Engelm. var. elliotti (Pinaceae) from Fazenda Monte Alegre de Agudos, SP, Brazil, which is degraded by rot fungi and termites (B.B. Monteiro, pers. com.), were also assayed for comparison as a group control.

2.1 Laboratory test on the susceptibility of *Caesalpinia echinata* and other woods to wood rot fungi

Pycnoporus sanguineus (Fr.) Murr. (white-rot fungus) from Belgian Coordinated Culture Collection BCCM No. 30513 and *Gloeophyllum trabeum* (pers.:Fr.) Murrill (brown-rot fungus) from American Type Culture Collection- ATCC" No. 11539 were grown on malt extract agar at 27 °C for 6 days, according to Monteiro and Freitas (1997). After this period, wood blocks were placed on the cultures and incubated at 27 °C and 70% RH for 16 weeks in dark. Eight replicates were used for each wood species.

Chaetomium globosum Kunze (soft-rot fungus) from American Type Culture Collection – ATCC No. 6205 was grown on solid culture medium containing ($g.L^{-1}$): 6g ammonium nitrate, 4 g monobasic potassium phosphate, 5 g dibasic potassium phosphate, 4 g magnesium sulphate, 2.5 g glucose, 0.5 g yeast extract and 15 g agar at 27 °C for 15 days, according procedure of Duncan (1965) modified by Brazolin (1998). Fungal spores were suspended in aqueous 0.05% tergitol and 0.5 ml of these spores suspensions were inoculated on the culture medium in Petri dishes. After 48 h at 32°C and 90% RH, the wood blocks were placed on the cultures and incubated at the same conditions for 16 weeks in darkness. Ten replicates were used for each wood species.

After the incubation periods, the wood blocks were washed with tap water, dried at 105 °C for 24 h and weighed. Percentage of weight loss (PWL) was calculated using the formula: PWL = DMi – DMf x 100/ DMi, were DMi = initial dry mass and DMf = final dry mass. Weight loss was considered incipient when was lower than 3%, after 16 weeks of incubation.

2.2 Laboratory test on the susceptibility of wood of *Caesalpinia echinata* and other woods to *Cryptotermes brevis* (Walker)

The wood block dimensions were: 45 x 22 x 3 mm, with the greatest dimension parallel to the wood fiber. A glass cylinder (diameter = 3.5 cm; height = 8 cm) was placed upright on the top of a pair of wood blocks and 38 nymphs and 2 soldiers were placed inside the cylinder, in contact with the blocks. Six replicates were used for each wood species. After the incubation period, 45 days at 27°C and 70% RH scores were given to each pair of blocks, according to the damage caused by the termites as follows: 0 –blocks undamaged; 1 – slight damage; 2 – medium damage; 3 –strong damage; 4 - very strong damage – equivalent to the attack exhibited by the control group, represented in this work by the wood of *P. elliotti.* The percent of dead insects was also recorded.

2.3 Chemical analyses of the wood

For chemical analyses the wood blocks inoculated with the rotters were washed with tap water, dried at 105 °C for 24 h and weighed. Due to the incipient decay, the wood blocks were superficially scraped with sandpaper since grinding the whole blocks could minimize the differences in cell wall composition caused by fungal attack.The resultant fine powder was weighed and submitted to exhaustive extraction with 92% ethanol at room temperature, using a Dionex automatic extractor ASE 300. The extractives were recovered and the residue was washed with distilled water, dried and weighed again. Samples of the woods prior inoculation with rot fungi (controls) were also ground and submitted to ethanol extraction as described above. For soluble sugar analyses, ethanolic and water extracts of each sample were pooled, vacuum concentrated, completely dried at 50 °C and weighed. Aliquots of the dried extractives were placed in a screw-cap tube with 500 µl of chloroform:methanol:water (12:5:1 v/v/v) and the internal standard phenyl-β-D-glucopyranoside and incubated at 60°C for 30 min with occasional agitation. After centrifugation, 350 µl were transferred to an epperndorf tube with the same volume of deionized water. After shaking and phase separation by centrifugation, 200 µl of the water-methanol phase were transferred to a 1.5 mL glass vial, dried in a vacuum concentrator and kept in a desiccator over phosphorous pentoxide for 14 h. Derivatization of the samples were performed by adding 150 µl of pyridine and 50 µl of N,O-bis(trymethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) and trimethyl-chlorosilane (TMCS) (10:1 v/v) in the sealed vials at 75 °C for 1h. Silylated sugars and polyols were then separated and quantified by GC-MS on a DB-1 capillary column (25 m x 0.25 mm inner diameter) as previously described (Hoch et al., 2003). Three replicate samples of the dried extractives were analyzed.

Aliquots of the residues were hydrolyzed with 72% H_2SO_4 in autoclave (121 °C, 1 atm) for 1h. The hydrolysates were neutralized with 50% NaOH and the soluble material recovered by centrifugation in an epperdorf centrifuge at 13.000 rpm for 10 min.

The total sugar contents in the supernatants were quantified by the phenol-sulfuric method (Dubois et al., 1956), using glucose as standard. Uronic acids were estimated by the *m*-hydrophenyl procedure using galacturonic acid (Filisetti-Cozzi and Carpita, 1991).

Neutral sugar composition of the hydrolysates was analysed by HPAEC/PAD (anion chromatography – pulsed amperiometric detection) in with a Dionex DX-500 system using a Carbo-Pac PA1 column eluted with isocratic 20 mM NaOH for 40 min at 1mL min^{-1}, and the sugars identified by comparison of the elution time of commercial monosaccharide standards. Three replicate samples were used for the analyses. The relative percentage of polysaccharides were estimated based on the proportion of xylose for xylans, glucose for glucans, mannose for mannans, and the sum of ramnose, arabinose, and galactose for other polysaccharides (pectic + hemicellulosic polymers) found in the cell wall hydrolysates.

2.4 Statistical Analyses

For the assays with rot fungi non-parametric statistical analysis was performed by Kruskal-Wallis test ($p<0.05$), complemented with Mann-Whitney test using Statistica Program (Statsoft, Inc. 1995). Variance analysis (ANOVA) was performed on experimental chemical data (statistical significance $p < 0.05$) using Winstat for Windows.

3. Results and discussion

3.1. Damage caused by rot fungi and termites

The results of the wood rot resistance test are presented on Table 1. The statistical analysis revealed no significant differences between the degradation of the heartwood of *Caesalpinia echinata* and the heartwood of *Anadenanthera macrocarpa* by the white-rot fungus *Pycnoporus sanguineus* and the brown-rot fungus *Gloeophyllum trabeum.* The degradation by the soft-rot fungus *Chaetomium globosum*, however, showed that the heartwood of *C. echinata* was more resistant than the other three species and the sapwood of brazilwood the most susceptible one.

Usually, hardwoods are more efficiently degraded by white-rot fungi than softwoods (Enoki et al., 1988). However, the data on Table 1 indicate that, under our experimental conditions, *P. elliotti* was as susceptible to decay as *E. grandis* and more susceptible than the sapwood of *C. echinata,* although the weight losses can be considered "early" according the criteria described by Paes et al. (2004). Similar results were reported by Ferraz et al. (2001), who found that the weight losses caused by white-rot fungus in *Pinus radiata* are similar to wood decay observed to two hardwoods.

The wood of *P. elliottii* was not degraded by *Chaetomium globosum* (Table 1). Brazolin (1998) reported that the wood of *E. grandis* was more susceptible to decay by this soft-rot fungus than *P. elliottii*, and suggested that this finding could be related to the lignin composition of the wood. Daniel and Nilsson (1987) correlated the predominance of guaiacyl residues in the lignin with differences in susceptibility of the wood cells of *Betula verrucosa* to soft rot fungi.

The dry-wood termite resistance tests obtained are presented on Table 2. This is a contingence table where the variables are the grades attributed to the degree of damage caused by termites. The heartwood of *C. echinata* was only slightly damaged by the dry-wood termite *Cryptotermes brevis*, being as resistant as *A. macrocarpa*, which is known to present high natural durability ((Mainieri and Chimelo, 1989). Concerning mortality, the

statistical analysis revealed no significant differences between the heartwood and sapwood of *Caesalpinia echinata* and the heartwood of *Anadenanthera macrocarpa*; but significant differences where observed between both species and *Eucalyptus grandis* and *Pinus elliottii* samples.

3.2. Content of extractives and changes in sugar alcohols

The wood resistance to fungal attack has been attributed mainly to the presence of extractives, which are toxic to xylophagous organisms, providing natural durability to the woods (Rowell et al., 2005). As shown in Table 2, the content of extractives is quite similar among samples of *C. echinata*, *A. macrocarpa* and *E. grandis*. However, their susceptibility to rot fungi (Table 1) and termites (Table 3) varied, indicating the extractives differ in their composition. Recently, Luna et al. (2005) reported the presence of insecticidal and molluscididal activities in the extractives of *C. echinata* heartwood, what could explain the high mortality of termites and the incipient weight losses observed after inoculation of rot fungi. Whether these toxic effects of the extractives are due to the presence of brazilin and protosapanin B in the extractives of the heartwood of *C. echinata* (Matsunaga et al., 2000) remains to be elucidated.

Although sugar alcohols are commonly accumulated in seeds during the maturation processes and their presence has been implicated to desiccation tolerance (Peterbauer and Richter, 2001), they have also been described as a fraction of non-structural carbohydrates present in stems of temperate forest trees (Hoch et al., 2003). They compounds may also function as carbon source. However, methylated cyclitols such as pinitol are usually broken down only by a limited number of microbes, what could suggest that they might contribute to resistant of wood tissues to fungal attack. The quantification of these compounds in the extractives obtained from the wood samples analyzed in the present work (Fig. 1) revealed the predominance of D- pinitol in the sapwood, accounting for up to 0.2% of the woody dry mass and the presence of D-*chiro*-inositol and galactopinitol B in the heartwood, representing no more than 0.01%. Changes in the relative proportion of these compounds were observed after incubation of the wood samples with rot fungi (Fig. 1), but these changes were not related to the percentage of loss weight (Table 1).

Excepting for *E. grandis* (Fig. 1D), in which galactopinitol B seemed to be completely converted to D-pinitol, probably to the action of α-galactosidases, the soft-rot fungus did not produce great modifications in the wood sugar alcohol composition of *C. echinata* (Fig. 1A, B) and *A. macrocarpa* (Fig. 1C). On the other hand, the action of the brown fungus on *C. echinata* samples led to the accumulation of a considerable proportion of galactopinitol A (Fig. 1A, B), probably as a breakdown product of higher degree of polymerization galactopinitols. Galactopinitols have so far only been found in plants and we were unable to find it in the fungal mycelium of *Gloeophyllum trabeum* (data not shown).

Data on Fig. 1 suggests that the presence of sugar alcohols are not related to the resistance of the woods to decay caused by rot fungi, since galactopinitol A predominates in the heartwoods of *C. echinata* and *E. grandis*, which showed very distinct susceptibility to fungal attack (Table 1).

3.3. Changes in cell wall sugar composition

As shown in Table 3, the wood cell walls of *C. echinata* presented higher proportion of uronic acids when compared to other woods. *P. elliottii* showed the lowest value. Decrease in the proportion of cell wall neutral sugars was observed after incubation of sapwood of *C. echinata* with the soft-rot fungus (Fig. 2A). This decrease seemed to be due the degradation of glucans and other polysaccharides such as galactans and arabinans (Fig. 3A). Soft-rot fungi are known to secrete hemicellulases and cellulases as the main cell-wall degrading enzymes, which enable the fungal hyphae to grow within the secondary walls (Kleist and Schmitt, 2001; Khalili et al., 2001).

The wood rotters did not produce any significant modification in the proportion of cell wall neutral sugars of *C. echinata* heartwood (Fig. 2A), what is in agreement with the incipient weight loss registered for this wood in the laboratory assays (Table 1). Only a small decrease in the relative percentage of polysaccharides other than xylans was detected after incubation with rot fungi (Fig. 3B).

Conversely, the decay caused by the rot fungi in the commercial woods (Fig. 2C, D , E) led to an increase in the proportion of cell wall uronic acids, mainly due to the decrease in the relative percentage of xylans in *A. macrocarpa* and *E. grandis* (Fig. 3C, D) and mannans in *P. elliottii* (Fig. 3E). White- and brown-rot fungi also caused some degradation of other cell-wall polysaccharides in *E. grandis* and *P. elliottii* (Fig. 3 D, E).

It is interesting to note that the pattern of fungal degradation of the samples seemed to be more related to the wood than the microbial species. Although the resistance to decay was shown to be quite different between the sapwood and the heartwood of *C. echinata* (Table 1), for both the reduction of other cell wall polysaccharides was the main modification caused by white- and brown-rot fungi (Fig. 3A, B). Similar behavior is seen in relation to the degradation of mannans in *P. elliottii* (Fig. 2E, 3E). Also, glucans were preferentially degraded in *C. echinata* sapwood by the soft-rot fungus (Fig. 3A), but xylans were reduced in the cell walls of *E. grandis* by its action (Fig. 3D). These results reinforce previous observations of the existence of a fungus-to wood specificity (Aktar et al., 1998; Ferraz et al. 2000).

In some species, wood resistance to fungal attack has been correlated to the content and/or composition of the lignins (Butcher and Nilsson, 1982; Eaton and Hale, 1993). Considering the low decay caused by rot fungi in the heartwood of *C. echinata* (Table 1), the content of lignin after the incubation of wood samples with the white-rot fungus *Pycnoporus sanguineus* was not evaluated. However, no significant differences were found in the lignin content and proportion of guaiacyl and syringil residues among control wood samples of *C. echinata* sapwood and heartwood, *A. macrocarpa* and *E. grandis* (data not shown), suggesting that the differences observed in the wood decay seem not to be directly related to this cell wall component, although it certainly contributes to the natural wood durability.

In conclusion, our analysis clearly demonstrated that the initial stages of brazilwood decay by rot fungi were characterized by a remarkable resistance of xylan-polymers to decomposition. This resistance was not correlated, however, with sugar alcohols present in the extractives, but may be attributed to toxic extractives found in the wood as recently described (Luna et al., 2005). Overall, our findings indicate that the heartwood of

Caesalpina echinata is highly resistant to wood-rot fungi and dry-wood termites, comparable to that of *Anadenanthera macrocarpa,* which is known to be a highly durable wood.

Acknowledgments
We thank Dr. Marcos Mecca Pinto, MSc. João Del Giudice Neto and Paulo Barbosa da Silva for the technical assistance, Dr. Rita de Cássia L. Figueiredo-Ribeiro for the valuable suggestions, and Dr Emerson A. Silva for helping with figures. Thanks are due to FAPESP (Brazil) for the PhD fellowship to C.A. Silva and for the grant to the project (FAPESP, 2000/06422-4, Brazil), and to CNPq for the research fellow grant to M.R. Braga.

References

Aktar, M., Blanchetter, R. A., Myers, G., Kirk, T.K. 1998. An overview of biomechanical pulping research. In: Young, R.A., Akhtar, M. (Eds.), Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry, New York, p.309-340.

Brazolin, S. 1998. Podridão mole em madeira de *Tabebuia* sp. (ipê) em torre de resfriamento de água: identificação e avaliação da capacidade de degradação dos fungos e alterações na estrutura anatômica da madeira. MSc thesis, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, Piracicaba, Brazil.

Butcher, J.A., Nilsson, T. 1982. Influence of variable lignin content amongst hardwood on soft-rot susceptibility and performance of CCA preservatives. IRG/WP/1151. The International Research Group on Wood Preservation, Stockholm.

Daniel, G.; Nilsson, T. 1987. Comparative studies on the distribution of lignin and CCA elements in birch using electron microscopic x-ray microanalysis. IRG/WP/1328.: The International Research Group on Wood Preservation, Stockholm.

Dubois, M., Gilles, A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28:350-355.

Duncan, C.G. 1965. Determining resistance to soft-rot fungi. Res. Paper FPL-48. Madison, WI: US Department of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory, Madison.

Eaton, R.A., Hale, M.D.C. 1993 . Wood -decay, pests and protection. Chapman and Hall, London.

Enoki, A., Tanaka, H., Fuse, G. 1988. Degradation of lignin related to compounds, pure cellulose and wood components by white-rot and brown-rot fungi. Holzforschung 42: 85-93.

Ferraz, A., Baeza, J., Rodriguez, J., Freer, J. 2000. Estimating chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. Bioresource Technology 74: 201-212.

Ferraz, A., Rodriguez, J., Freer, J., Baeza, J. 2001. Biodegradation of *Pinus radiata* softwood by white- and brown-rot fungi. World Journal of Microbiology & Biotechnology 17: 31-34.

Filisetti-Cozzi, T.M.C.C., Carpita, N.C. 1991. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. Analytical Biochemistry 197:157-162.

Girardi, G.S., Gimenéz, R.A., Braga, M.R. 2006. Occurrence of *Platypus mutatus* Chapuis (Coleoptera: Platypodidae) in a brazilwood experimental plantation in Southeastern Brazil. Neotropical Entomology 35: 864-867.

Gonçalves, F.G., Oliveira, J.T.S., 2006. Resistência ao ataque de cupim-da-madeira seca (*Cryptotermes brevis*) em seis espécies florestais. Cerne 12: 80-83.

Hoch, G., Richter, A.A., Körner, C.H. 2003. Non-structural carbon compounds in temperate forest trees. Plant, Cell and Environment 26: 1067-1081.

Ibama. 1992. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (Brasil). Portatia 37(N), de 3 de abril de 1992 (www.ibama.gov.br).

Istek, A., Sivrikaya, H., Eroglu, H., Gulsoy, S.K. 2005. Biodegradation of *Abies bornmülleriana* (Mattf.) and *Fagus orientalis* (L.) by the white-rot fungus

Phanerochaete chrysosporium. International Biodeterioration & Biodegradation 55: 63-67.

Khalili, S., Nilsson, T., Daniel, G. 2001. The use of soft-rot fungi for determining the microfibrilar orientation in the S2 layer of pine tracheids. Holz als Roh- und Werkstoff 58: 439-447.

Kleist, G., Schmitt , U. 2001. Characterisation of a soft rot-like decay pattern caused by *Coniophora puteana* (Schum.) Karst in Sapelli wood (*Entandrophgrama cylindricum* Sprague). Holzforschung 55: 573-578.

Lewis, G.P. 1998. *Caesalpinia*. A revision of the *Poinceanella-Erythrostemun* group. Royal Botanic Gardens, Kew.

Luna, J.S., Santos, A.F., Lima, M.R.F., Omena, M.C., Mendonça, F.A.C., Bieber, L.W., Sant`Anna, A.E.G. 2005. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. Journal of Ethnopharmacology 97: 199-206.

Mainieri, C., Chimelo, J.P. 1989. Fichas de características das Madeiras Brasileiras. Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo.

Matsunaga, M., Sakai, K., Kamitakahara, H., Minato, K., Nakatsubo, F. 2000. Vibrational property changes of spruce wood by impregnation with water-soluble extractives of Pernambuco (*Guilandina echinata* Spreng) II: structural analysis of extractive components. Journal of Wood Science 46: 353-257.

Monteiro, M.B.B., Freitas, A.R. 1997. Método de ensaio acelerado para avaliação da durabilidade natural de madeiras. Revista Árvore.21:.555-561.

Onuorah, E. O. 2000. The wood preservative potentials of heartwood extracts of *Milicia excelsa* and *Erythrophleum suaveolens*. Biosource Technology 75: 171-173.

Paes, J.B., Morais, V.M., Lima, C.R. 2004. Resistência natural de nove madeiras do semi-árido brasileiro a fungos xilófagos em condições de laboratório. Revista Árvore 28: 275-282.

Peterbauer, T., Richter, A.A. 2001. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. Seed Science Research 11: 185-197.

Rocha, Y.T. 2004. Ibirapitanga: história, distribuição geográfica e conservação do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae) do descobrimento à atualidade. PhD Thesis, University of São Paulo, Brasil.

Rowell, R. M., Pettersen, R., Han, J.S., Rowell, J.S., Tshabalala, M.A. 2005. Cell wall chemistry. In: Rowell, R. M. (Ed.), Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites, Washington, pp. 35-74.

Silva, J.C., Lopez, A.G.C., Oliveira, J.T.S., 2004. Influência da idade na resistência natural da madeira de *Eucalyptus grandis* W. Hill. Ex. Maiden ao ataque de cupim de madeira seca (*Cryptotermes brevis*). Revista Árvore 28: 583-587.

Taylor, A.M., Gartner, B.L., Morrell, J.J. 2003. Co-incident variations in growth rate and extractive concentration in Douglas-fir. Forest Ecology Management 186:257-260.

Tuor, U., Winterhalter, K., Fiechter, A. 1995. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. Journal of Biotechnology 41: 1-17.

Zabel, R.A., Morrell, J.J. 1992. Wood Microbiology: Decay and its preservation. Academic Press, San Diego.

Table 1
Weight losses of brazilwood and other woods caused by rot fungi.

Wood	Weight loss (%)		
	Pycnoporus sanguineus (white) (Mean* ± SD)	*Gloeophyllum trabeum* (brown) (Mean*± SD)	*Chaetomium globosum* (soft) (Mean**± SD)
Caesalpinia echinata sapwood	5.68 ± 2.15 A	17.80 ± 2.54 A	31.67 ± 10.69 A
heartwood	0.35 ± 1.44 B	1.38 ± 1.00 B	2.06 ± 1.20 B
Anadenanthera macrocarpa heartwood	1.19 ± 1.04 B	2.40 ± 3.48 B	5.97 ± 3.32 C
Eucalyptus grandis heartwood	9.11 ± 2.19 C	22.63 ± 4.16 C	16.08 ± 9.51 D
Pinus elliottii sapwood	9.84 ± 5.90 D	0.92 ± 0.77 B	0

* n = 8 and ** n = 10. Means with different letters for each rot fungus are significantly different at $p<0.05$.

Table 2
Content of extractives and cell wall composition of brazilwood and other woods

Wood	Extractives* (% dry wood)	Cell wall composition (Relative %)	
		Uronic acids	Neutral sugars
Caesalpinia echinata sapwood	*9.14 ± 1.86 A*	*26.4*	73.6
heartwood	11.31 ± 4.82 A	27.5	72.5
Anadenanthera macrocarpa heartwood	*9.75 ± 0.10 A*	*12.8*	87.2
Eucalyptus grandis heartwood	*9.94 ± 1.41 A*	*14.2*	85.8
Pinus elliottii sapwood	*1.28 ± 0.10 B*	*7.9*	92.1

* Means with different letters are significantly different for ANOVA at $p<0.05$.

Table 3
Damage caused by the dry-wood termite *Cryptotermes brevis* in samples of brazilwood and others woods after 45 days of exposure

Wood	Damage*	Mortality* (%)
Caesalpinia echinata		
sapwood	2	82.2 A
heartwood	1	85.2 A
Anadenanthera macrocarpa		
heartwood	1	86.3 A
Eucalyptus grandis		
heartwood	4	32.5 B
Pinus elliotti		
sapwood	4	55.4 B

*0 – blocks undamaged; 1 – slight damage; 2 – medium damage; 3 –strong damage; 4 - very strong damage. * Means with different letters are significantly different at $p<0.05$.

Legends to the Figures

Fig. 1. Relative proportion of cyclitols found in brazilwood and other woods before and after inoculation with rot fungi. CHI = D-*chiro*-inositol, PIN = D-pinitol, GAL A = galactopinitiol A, and GAL B = galactopinitol B, n = 3.

Fig. 2. Relative proportion of uronic acids and neutral cell wall sugars before (control) after incubation of brazilwood and other woods with rot fungi, n = 3.

Fig. 3. Relative percentage of pectic + hemicellulosic polysaccharides (Pect + Hem), glucans, xylans, mannans and in brazilwood and other woods before and after inoculation with rot fungi, n = 3.

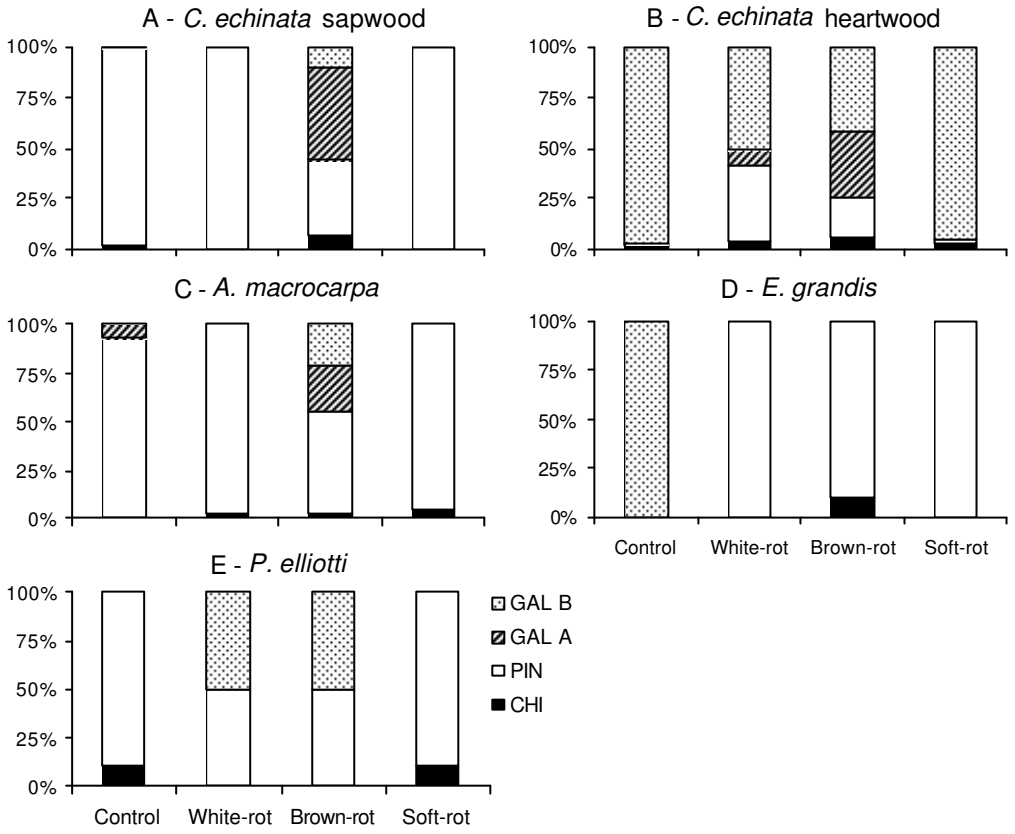

A - C. echinata sapwood
B - C. echinata heartwood
C - A. macrocarpa
D - E. grandis
E - P. elliotti
100%
75%
50%
25%
0%
Control
White-rot
Brown-rot
Soft-rot
GAL B
GAL A
PIN
CHI

Figure 1

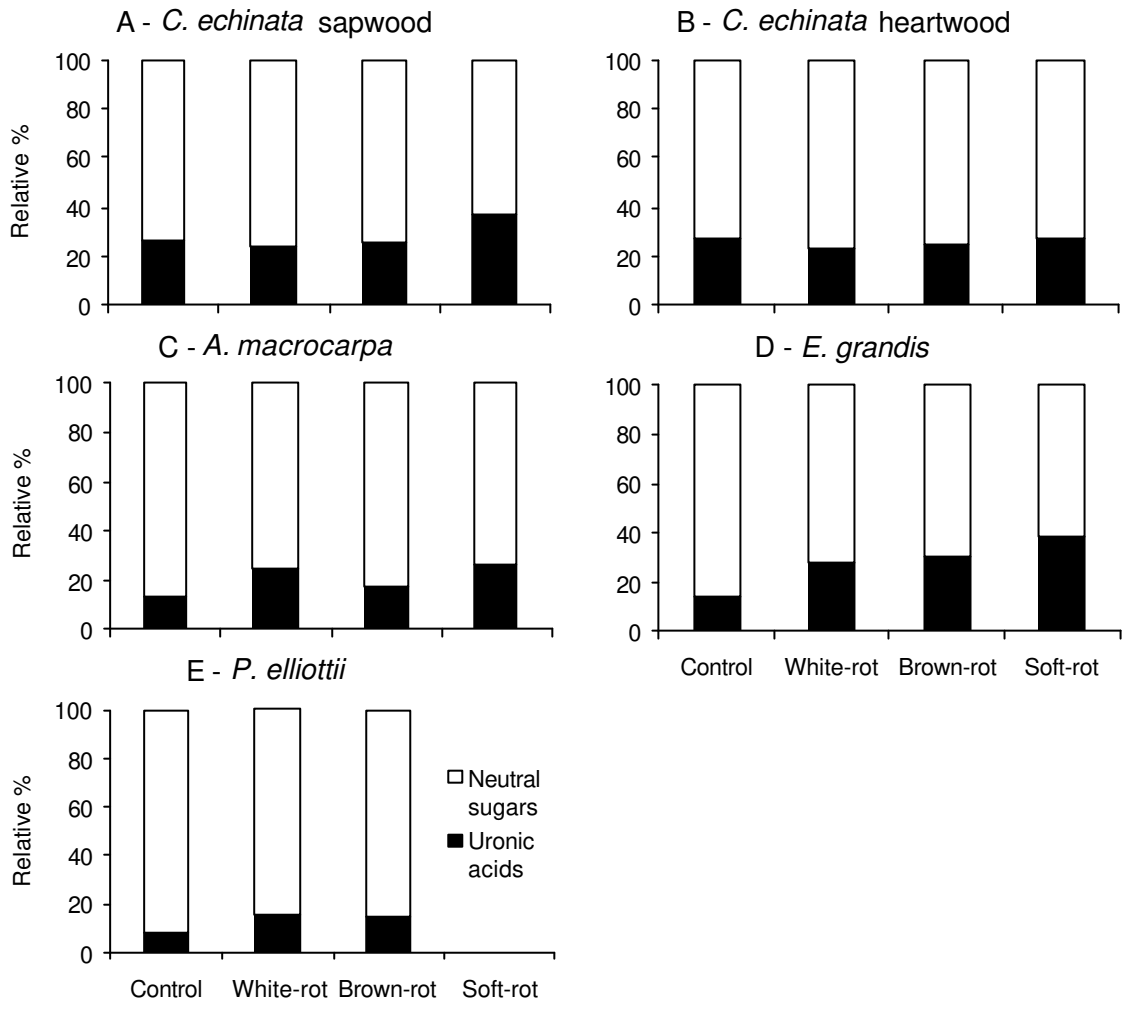

A - C. echinata sapwood
B - C. echinata heartwood
C - A. macrocarpa
D - E. grandis
E - P. elliottii
Relative %
100
80
60
40
20
0
Neutral sugars
Uronic acids
Control
White-rot
Brown-rot
Soft-rot

Figure 2

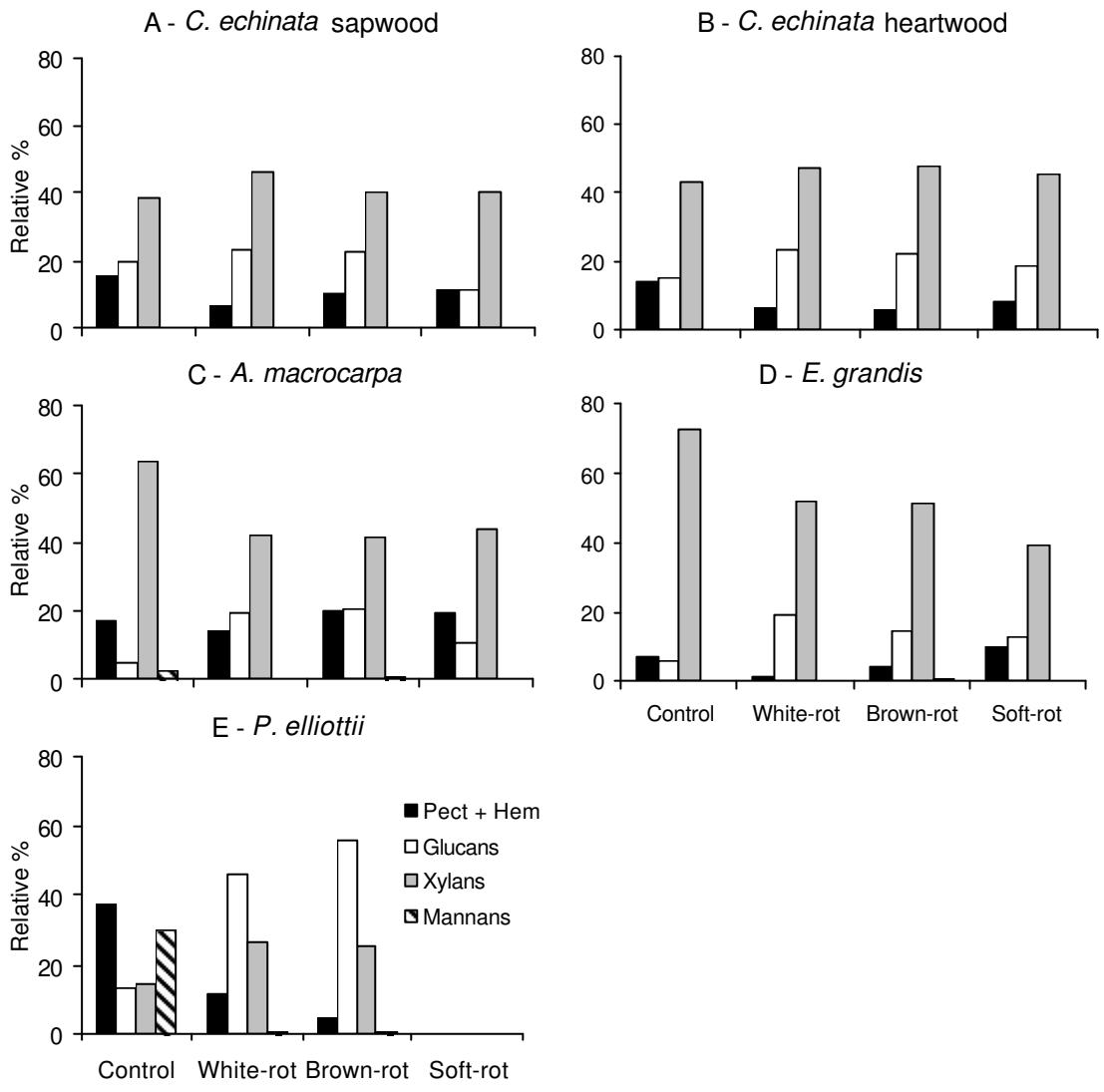

A - C. echinata sapwood
B - C. echinata heartwood
C - A. macrocarpa
D - E. grandis
E - P. elliottii
Relative %
0
20
40
60
80
Control
White-rot
Brown-rot
Soft-rot
Pect + Hem
Glucans
Xylans
Mannans

Figure 3