

**SABRINA GALETTI CHERELLI**

**QUANTIFICAÇÃO DO AMIDO NA MADEIRA DE SERINGUEIRA [*Hevea  
brasiliensis* (Willd. ex Adr. de Juss.) Muell-Arg.]**

**Botucatu**

**2018**



**SABRINA GALETTI CHERELLI**

**QUANTIFICAÇÃO DO AMIDO NA MADEIRA DE SERINGUEIRA [*Hevea  
brasiliensis* (Willd. ex ADR. de Juss.) Muell-Arg.]**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia – Energia na Agricultura.

Orientador: Adriano Wagner Ballarin

Coorientadora: Magali Leonel

**Botucatu**

**2018**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

C521q Cherelli, Sabrina Galetti, 1986-  
Quantificação do amido na madeira de seringueira  
[*Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. de Juss.) Muell-Arg.]  
/ Sabrina Galetti Cherelli. - Botucatu: [s.n.], 2018  
72 p.: fots. color., grafs. color., ils. color., tabs.

Tese (Doutorado)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2018  
Orientador: Adriano Wagner Ballarin  
Coorientadora: Magali Leonel  
Inclui bibliografia

1. Seringueira. 2. Amido. 3. Madeira. 4. Hidrólise.  
I. Ballarin, Adriano Wagner. II. Leonel, Magali. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas.  
IV. Título.

Elaborada por Ana Lucia G. Kempinas - CRB-8:7310

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"

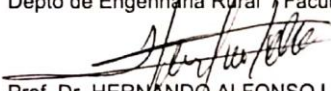
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: “QUANTIFICAÇÃO DO AMIDO NA MADEIRA DE SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex ADR de Juss.) Muell-Arg.)”

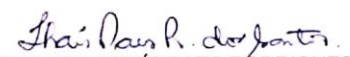
AUTORA: SABRINA GALETTI CHERELLI  
ORIENTADOR: ADRIANO WAGNER BALLARIN  
COORIENTADORA: MAGALI LEONEL

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (ENERGIA NA AGRICULTURA), pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. ADRIANO WAGNER BALLARIN  
Depto de Engenharia Rural / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu

  
Prof. Dr. HERNANDO ALFONSO LARA PALMA  
Departamento de Recursos Naturais / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu

Prof. Dr. JOSÉ NIVALDO GARCIA  
Depto de Ciências Florestais / ESALQ Usp

  
Profa. Dra. THAÍS PAES RODRIGUES DOS SANTOS  
CERAT - Pós-Doutoranda / Faculdade de Ciências Agrômicas - UNESP

  
Profa. Dra. ANA PAULA CERINO COUTINHO  
Centro de Ciências Exatas e Ciências Sociais / UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

Botucatu, 18 de dezembro de 2018.



*À minha amada avó,  
Maria da Glória (em memória),  
com muito amor, dedico*





## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Adriano Wagner Ballarin, pela orientação, ensinamentos, dedicação e exemplo de professor e pessoa.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Magali Leonel pela coorientação e ensinamentos que tornaram possível o desenvolvimento desse trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Carmen Regina Marcati por colocar à disposição seu laboratório e equipamentos e estar sempre disposta à conversar, trocar ideias e compartilhar seus conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Sergio Augusto Rodrigues pela ajuda na análise estatística dos resultados.

À todo o pessoal de campo pela ajuda na coleta do material de estudo.

À APTA Regional Nordeste Paulista e APTA Regional Centro Oeste pelas árvores fornecidas para o desenvolvimento do projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de doutorado concedida e pela bolsa de estudos concedida no Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior - PDSE (Processo - 88881.136044/2017-01).

À University of Sheffield, na pessoa do Dr. Chandra Bellasio, pela orientação e ensinamentos durante meu Doutorado Sanduíche em Sheffield.

Às amigas Thaís, Juliana e Liliane por toda ajuda no preparo do material, nas análises laboratoriais e principalmente pelo companheirismo, o que tornou meus dias mais divertidos e leves durante o doutorado.

Aos meus queridos pais e família por todo apoio durante esses anos.

Ao André, meu grande amor, meu companheiro de vida, por toda paciência durante os dias difíceis e por toda ajuda no desenvolvimento desse projeto.



## RESUMO

O amido é o principal carboidrato de reserva das plantas, composto por dois tipos de  $\alpha$ -glucanas, amilose e amilopectina, e tem um importante papel no metabolismo das árvores, incluindo sua importância para estudos de resposta das plantas às diferentes situações durante seu ciclo fenológico e como uma ferramenta complementar para predição do desempenho de sistemas de sangria nas seringueiras, assim como a associação de seu acúmulo com o crescimento e com a rebrota. Este constituinte é encontrado em grande quantidade na madeira de *H. brasiliensis*. Contudo, a quantificação de amido em madeira ainda é considerada problemática por diversas razões que vão desde a escolha até a implementação de um método adequado, apesar da grande quantidade de estudos encontrados na literatura. Considerando a importância deste carboidrato nas plantas e a problemática envolvida na escolha de um método de quantificação adequado para madeira, quantificou-se o teor de amido em amostras provenientes da direção radial (sentido medula – casca) em discos de *H. brasiliensis* por dois protocolos diferentes, buscando, entre as técnicas convencionais de hidrólise (ácida e enzimática), qual é a mais apropriada para esta espécie e sugerir um protocolo de quantificação de amido viável às empresas produtoras de seringueira, caso queiram utilizar a quantificação de amido num processo de controle de qualidade da espécie, e aos laboratórios de pesquisa com madeiras. Também analisou-se a distribuição radial de amido em amostras de *H. brasiliensis* coletadas em duas estações do ano e dois locais de crescimento das árvores e adicionalmente estimou-se a longevidade do alburno desta espécie por meio de análises microscópicas. Para o estudo metodológico, analisou-se cinco amostras radiais de discos de quinze árvores por dois diferentes protocolos. No protocolo 1 utilizou-se ácido para a hidrólise do amido e o método antrona para quantificação de glicose e no protocolo 2 utilizou-se enzimas para a hidrólise do amido e peroxidase-glicose oxidase (PGO) e o-dianisidina para quantificação de glicose. Para analisar a distribuição radial do amido em diferentes estações do ano e diferentes locais de crescimento das árvores, utilizou-se o protocolo 2 (hidrólise enzimática) em cinco amostras radiais de discos de oito árvores em ambos locais de crescimento e estações seca e chuvosa. Para observação da distribuição radial do amido e estimativa da longevidade do alburno desta espécie, utilizou-se análise microscópica pela observação de grânulos de amido corados com lugol e a

observação de tilos comuns para caracterização de cerne. Comparando o teor de amido entre os dois protocolos utilizados, observou-se que o teor de amido foi significativamente maior no protocolo 1. Ambos os protocolos apresentaram boa precisão, apresentando um baixo coeficiente de variação. O protocolo 1 apresentou-se mais vantajoso em termos de tempo, facilidade de execução e custo de análise, podendo ser utilizado a nível de comparação de resultados, pois se mostrou sensível o suficiente para detecção de diferenças entre as amostras radiais estudadas. A periculosidade do protocolo 1 é maior devido a instabilidade do ácido perclórico, que pode sofrer decomposição de forma explosiva, devendo ser manuseado com os equipamentos de segurança adequados. A acurácia dos valores obtidos pelos protocolos não pôde ser avaliada diretamente, uma vez que não se encontra um valor padrão exato de porcentagem de amido na madeira de seringueira em diferentes amostras radiais. Isso nos leva a sugerir à empresas produtoras de seringueira e à laboratórios de pesquisa com madeira o protocolo 1, quando o objetivo da análise for a comparação entre resultados, e o protocolo 2, quando o objetivo for uma quantificação de amido com maior exatidão, devido à maior seletividade do amido pelas enzimas. A distribuição de amido na seringueira é decrescente desde o alburno até o cerne, apresentando maiores quantidades no alburno, com declínio no alburno mais externo sugerindo seu consumo na atividade do câmbio vascular para o crescimento radial. Encontrou-se maior teor de amido na madeira coletada no inverno e em árvores que cresceram no local com solo do tipo Latossolo. A longevidade média do alburno foi de 20 anos, mostrando que as árvores de 25 anos amostradas possuem cerne formado com grande presença de amido, contradizendo relatos encontrados na literatura sobre a depleção ou ausência de amido no processo de morte das células parenquimáticas e consequente formação de cerne. Portanto, pode-se afirmar que, para *H. brasiliensis* não deve-se utilizar a ausência de amido para caracterização de cerne.

**Palavras-chave:** *Hevea brasiliensis*, distribuição radial de amido, hidrólise ácida, hidrólise enzimática, longevidade do alburno.

## ABSTRACT

Starch is the principal carbohydrate reserve in plants, represented by two types of  $\alpha$ -glucans, amylose and amylopectin and has a significant role in tree metabolism including its importance for studies of plant response to different situations during its phenological cycle and as a complementary tool to predict the performance of tapping systems in rubberwood, as well as the association of its accumulation to rebudding and growth. This constituent is found in great content in the wood of *H. brasiliensis*. However, the starch analysis is still problematic despite of the large amount of studies found in the literature. Considering these key factors, the starch content was quantified in samples from the radial direction (pith – bark) of *H. brasiliensis* disks by two different protocols, seeking, among the existing conventional hydrolysis techniques (acid and enzymatic), which is the most appropriate for that species and to suggest a protocol for starch quantification that can be viable to the rubberwood producing companies in a quality control process of the species and to research laboratories that works with wood characterization. It was also analyzed the radial distribution of starch content of *H. brasiliensis* samples collected in two different seasons of the year and two different growth site and additionally, it was estimated the sapwood longevity of this species by microscopic analyzes. For the methodological study, we analyzed five radial samples from disks of fifteen trees by two different protocols. The protocol 1 used acid to hydrolyze the starch and anthrone method for glucose assay and protocol 2 used enzymes to hydrolyze the starch and peroxidase-glucose oxidase (PGO) and o-dianisidine for glucose assay. To analyze the radial distribution of starch content in different seasons and different growth sites it was used the protocol 2 (enzymatic hydrolysis) in five radial samples from disks of eight trees in both growth site in the dry season and rainy season. To observe the radial distribution and estimate the sapwood longevity of this species it was used microscopic analysis by the observation of starch grains stained with lugol and the observation of common tylosis to characterize heartwood. Comparing the starch content between the two protocols, the starch content was significantly higher in protocol 1. Both protocols showed precision, presenting a low co-efficient of variation between the measurements. Protocol 1 was more advantageous in terms of time, ease of execution and cost of analysis, and could be used in the comparison of results, since it was sensitive enough to detect differences between the radial

samples studied. The hazard of protocol 1 is higher due to instability of perchloric acid, which may be explosively decomposed and need to be handled with appropriate safety equipment. The precision of the values obtained by the protocols could not be directly evaluated, since it is not possible to find an exact standard value of starch percentage in the rubberwood different radial samples. This leads us to suggest to the companies producing rubber trees and the research laboratories with wood protocol 1, when the aim of the analysis is the comparison between results, and protocol 2, when the aim is a quantification of starch with greater precision due to the greater selectivity of starch by enzymes. The starch distribution in rubberwood is decreasing from the sapwood to heartwood, being the highest percentages found in the sapwood with a decline in the outermost sapwood suggesting its consumption by the vascular cambium activity for radial growth. The largest starch content was found in the winter samples and in the trees that grew in Latosol. The sapwood longevity was in average 20 years, showing that the 25-years-old trees sampled has heartwood with starch content, contradicting the literature about the starch depletion or absence in the process of parenchyma cells death and consequent heartwood formation. Therefore it can be assert that we should not use the absence of starch to characterize the heartwood in *H. brasiliensis*.

**Keywords:** *Hevea brasiliensis*, starch radial distribution, acid hydrolysis, enzymatic hydrolysis, sapwood longevity

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>15</b>
<b>CAPÍTULO 1 - TEOR DE AMIDO EM SERINGUEIRA: HIDRÓLISE ENZIMÁTICA OU À BASE DE ÁCIDO?.....</b>	<b>19</b>
RESUMO.....	19
INTRODUÇÃO .....	21
MATERIAL E MÉTODOS .....	24
Material .....	24
Preparo das amostras .....	25
Quantificação do teor de amido.....	26
Análise dos resultados .....	30
RESULTADOS .....	30
DISCUSSÃO .....	31
CONCLUSÃO.....	34
AGRADECIMENTOS .....	34
REFERÊNCIAS.....	35
<b>CAPÍTULO 2 - AMIDO NO CERNE E LONGEVIDADE DO ALBURNO EM <i>Hevea brasiliensis</i> (Willd. ex Adr. de Juss.) Muell-Arg.....</b>	<b>41</b>
RESUMO.....	41
INTRODUÇÃO .....	43
MATERIAL E MÉTODOS .....	44
Material .....	44
Preparo das amostras .....	47
Quantificação do teor de amido.....	48
Análise microscópica das amostras .....	49
Análise dos resultados .....	50
RESULTADOS.....	50
Quantificação do teor de amido.....	50
Análise microscópica das amostras .....	52
DISCUSSÃO .....	53

CONCLUSÃO .....	58
AGRADECIMENTOS.....	59
REFERÊNCIAS .....	59
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
REFERÊNCIAS INTRODUÇÃO GERAL .....	69



## INTRODUÇÃO GERAL

A espécie *Hevea brasiliensis*, popularmente conhecida como seringueira, tem como *habitat* natural a Região Amazônica; mas, atualmente, podem ser encontradas plantações de seringueira no sul e sudeste asiático, África e América do Sul e Central (JALANI; RAMLI, 2003).

No Brasil, essa espécie é tradicionalmente utilizada para a extração de borracha natural, produto com crescente demanda mundial (ROSSMANN et al. 2006), sobretudo devido à sua diversidade de aplicações industriais. Esses aspectos justificam o grau de importância econômica desta espécie. No Brasil, a seringueira é cultivada em doze estados: São Paulo, Bahia, Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás, Espírito Santo, Pará, Tocantins, Mato Grosso do Sul, Paraná, Amazonas e Acre (BRAGA 2015), sendo São Paulo o estado com maior produção (~60% da produção nacional) (OLIVEIRA et al. 2015).

Após sua vida produtiva para a obtenção da borracha natural, que normalmente dura de 25 a 30 anos, dependendo da frequência de exploração, a seringueira é cortada para reforma do seringal. A madeira obtida nessa fase é utilizada, na maioria das vezes, em aplicações de menor valor agregado como lenha e carvão, embora apresente propriedades físicas, mecânicas e de usinabilidade favoráveis e com menores custos quando comparada a outras espécies (KILLMANN; HONG 2000, BALSIGER et al. 2000, HASHIM et al. 2005, TEOH et al. 2011), boas características de trabalhabilidade e, também estéticas, pois possui uma cor clara, quase esbranquiçada possibilitando a realização de tratamentos para obtenção de outros matizes. No entanto, não há tradição de uso da madeira de seringueira no Brasil (OKINO et al. 2009) a despeito de suas boas propriedades tecnológicas (EUFRADE JÚNIOR et al. 2015), sendo assim considerado, o uso como lenha, uma perda significativa do seu valor agregado.

Segundo Gonçalves (2002), até o final do século passado as pesquisas com seringueira foram predominantemente direcionadas para o desenvolvimento de clones com dupla aptidão, para produção de borracha e, também, de madeira, tornando a cultura mais atrativa, útil, importante e lucrativa. Contudo, apesar de possuir potencial tecnológico com grande leque de aplicações, a madeira de seringueira apresenta alto teor de amido, atingindo mais de 8% em relação a madeira de outras espécies que apresentam teores que oscilam entre 1 a 3% (SANTANA; EIRAS 1999). O alto teor de amido sugere uma maior susceptibilidade

ao ataque de organismos xilófagos. Em estudos conduzidos com madeira de seringueira, seca ao ar, na Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu – UNESP, foi observado um ataque generalizado por insetos do gênero *Lyctus* no material experimental, o que levou a hipótese da relação com o elevado teor de amido. Este fato limita as potencialidades de usos mais nobres da madeira de seringueira pois ficam condicionadas à exigência de tratamentos preservantes profiláticos, com impregnação de produtos químicos, ou tratamentos térmicos como observado em estudo realizado por Severo et al. (2016). Contudo, faz-se importante ressaltar que, esses tratamentos podem não ser viáveis, tanto do ponto de vista econômico (no caso do tratamento térmico), como do ponto de vista ambiental (produtos químicos).

A quantificação do teor de amido na madeira torna-se então importante, por condicionar diretamente a sua biodeterioração por agentes xilófagos e, indiretamente, a sua classificação para usos finais. Contudo, a composição química de espécies vegetais, especialmente daquelas encontradas nas florestas tropicais, ainda está longe de ser descrita em sua totalidade. Considerando a biodiversidade existente nas florestas brasileiras e os poucos estudos bioquímicos existentes a respeito de nossas essências arbóreas, constata-se facilmente a necessidade de mais pesquisas envolvendo a caracterização química destas espécies (LUNZ et al. 2004).

Os carboidratos de reserva, como o amido, cumprem papéis funcionais distintos dentro das árvores incluindo transporte, metabolismo energético e osmorregulação; além disso, fornecem substratos para a síntese de compostos de defesa ou troca com simbiontes envolvidos em aquisição ou reserva de nutrientes (HARTMANN; TRUMBORE 2016). Podem ser mobilizados para a manutenção do metabolismo da planta durante o inverno, como fonte de energia para o crescimento vegetativo durante a primavera e também como reserva em situações de estresse, possuindo grande importância nos estudos das respostas das plantas a diferentes situações durante seu ciclo de vida (BELLASIO et al. 2014). O amido é o principal carboidrato de reserva das plantas, armazenado principalmente em células de parênquima radial e axial e sua quantidade varia com a idade dos tecidos, sendo abundantes nas células próximas ao câmbio, diminuindo em direção ao alburno mais interno (HOCH et al. 2003, KAMPE; MAGEL 2013). De acordo com a literatura clássica, as células do cerne não contêm amido (EADES 1937, FAHN; ARNON 1962, IAWA Committee

1964, BAMBER; FUKAZAWA 1985, HILLIS 1987, SARANPÄÄ; HÖLL 1989, MAGEL et al. 1994, MAGEL 2000, HÖLL 2000, TAYLOR et al 2002, DEHON et al. 2002, BERGSTÖM 2003, PALLARDY 2008, NAKADA; FUKATSU 2012) ou este está presente em quantidades insignificantes (BAMBER 1987, FISHER; HÖLL 1992, HÖLL 2000). Devido aos diversos papéis funcionais que desempenha, são compostos de grande importância na fisiologia, sendo assim, de grande interesse em diversas áreas de pesquisa como agricultura, silvicultura, botânica e ecologia (ROSE et al. 1991).

Várias questões importantes sobre o amido armazenado em árvores permanecem sem resposta, tais como, seu papel na indicação do equilíbrio de carbono na planta, na relação das plantas com o estresse e o tipo de controle de armazenamento e uso (CHAPIN et al. 1990, SALA et al. 2011, 2012, WILEY; HELLIKER 2012). As muitas incertezas sobre como o amido está envolvido na regulação do metabolismo do carbono de toda a árvore, tornam complexas as previsões de crescimento e produtividade sob mudanças ambientais (RYAN 2011).

Atualmente o estudo da química de produtos naturais tem experimentado expressivo avanço, devido ao uso de protocolos modernos de análise orgânica, como cromatografia e espectrometria, que possibilitam o isolamento e identificação de substâncias naturais, mesmo quando presentes em pequenas quantidades. Entretanto, muitas vezes, a análise de amido, sobretudo na madeira, é problemática por diversas razões que vão desde a escolha até a implementação do método de quantificação de amido apropriado. Na literatura é reportada uma grande quantidade de métodos, porém, em sua maioria carentes de detalhamento dos procedimentos laboratoriais, o que dificulta a tarefa de avaliação e seleção de métodos, assim como a interpretação e comparação de resultados obtidos entre diferentes estudos (ROSE et al. 1991). Além disso, são poucos os trabalhos em que é proposta uma metodologia de quantificação de amido específica para a madeira.

Os métodos disponíveis para a quantificação de amido contemplam basicamente as seguintes etapas: separação e remoção de açúcares solúveis da amostra, gelatinização e solubilização dos grânulos de amido, seleção do amido entre os carboidratos interferentes, hidrólise do amido e quantificação da glicose (produto final da hidrólise de amido). Diversos trabalhos comparam os métodos e resultados obtidos na determinação do teor de amido em tecidos de plantas confrontando, sobretudo, as hidrólises ácida e enzimática (CHOW; LANDHÄUSSER 2004, ROSE

et al. 1991, QUENTIN et al. 2015). Os resultados revelados pelos autores evidenciam, em sua maioria, diferentes estimativas de carboidratos não estruturais para tecidos de plantas lenhosas dependendo do método utilizado, tornando difícil a comparação de resultados obtidos por diversos laboratórios para um mesmo material.

Este trabalho foi dividido em dois capítulos. Considerando-se a importância do amido para a determinação do uso final da madeira de seringueira e a problemática envolvida na escolha e implementação de um método apropriado para a quantificação de amido em madeiras, o objetivo principal do Capítulo 1 foi quantificar o teor de amido na direção radial em discos de *H. brasiliensis* por meio de dois protocolos buscando-se, dentre as técnicas convencionais de hidrólise existentes (ácida e enzimática), qual é a mais apropriada para esta espécie, considerando-se as características e diferenças de cada técnica como, tempo gasto nas análises, facilidade de execução, custos envolvidos, periculosidade e confiabilidade dos resultados, para assim sugerir um protocolo de quantificação de amido viável à empresas produtoras de seringueira, caso queiram utilizar a quantificação de amido num processo de controle de qualidade da espécie, e à laboratórios de pesquisa com madeiras. Considerando-se o importante papel do amido no metabolismo das árvores, sua importância para estudos de resposta das plantas a diferentes situações durante seu ciclo, como ferramenta complementar para prevenção de desempenho de sistemas de sangria, além da associação de seu acúmulo ao crescimento e à rebrota, os objetivos do Capítulo 2 foram, quantificar a distribuição radial de amido em diferentes estações do ano e diferentes locais de plantio na madeira de seringueira e, adicionalmente, estimar a longevidade do alburno desta espécie.

## CAPÍTULO 1: TEOR DE AMIDO EM SERINGUEIRA: HIDRÓLISE ENZIMÁTICA OU À BASE DE ÁCIDO?

Sabrina Galetti Cherelli<sup>1\*</sup>, Chandra Bellasio<sup>2</sup>, Thaís Paes Rodrigues dos Santos<sup>3</sup>, Sergio Augusto Rodrigues<sup>4</sup>, Magali Leonel<sup>3</sup>, Adriano Wagner Ballarin<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós Graduação em Agronomia - Energia na Agricultura

<sup>2</sup> Research School of Biology

<sup>3</sup> Centro de Raízes e Amidos Tropicais

<sup>4</sup> Dep. de Bioprocessos e Biotecnologia

<sup>5</sup> Dep. Engenharia Rural

<sup>1,3,4,5</sup> Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu, Univ. Estadual Paulista (UNESP), Avenida Universitária, 3780 – CEP 18610-034 – Altos do Paraíso – Botucatu/SP, Brasil.

<sup>2</sup> Australian National University, Canberra, ATC, Australia

\*corresponding author: sabrina\_galetti@hotmail.com/ +55 (19) 99108 6786

### Resumo:

- **Contexto** O amido é o principal carboidrato de reserva nas plantas, representado por dois tipos de  $\alpha$ -glucanas, amilose e amilopectina, e é encontrado em grande quantidade na madeira de *H. brasiliensis*. No entanto, a análise de amido ainda é problemática apesar da grande quantidade de estudos encontrados na literatura.
- **Objetivos** Quantificar o amido da seringueira por dois métodos e verificar qual é o mais apropriado para a seringueira além de propor um protocolo de quantificação de amido viável à empresas produtoras de seringueira num processo de controle de qualidade da espécie e à laboratórios de pesquisa com madeiras.
- **Amostragem e métodos:** Cinco amostras radiais provenientes de discos de quinze árvores de *Hevea brasiliensis*. Estudo metodológico: Protocolo 1 – Hidrólise do amido por ácido e método antrona para quantificação da glicose; Protocolo 2 – Hidrólise do amido por enzimas e PGO e o-dianisidina para quantificação da glicose.
- **Resultados** O teor de amido variou de 7 a 17% com um padrão bem definido de distribuição radial, aumentando do centro em direção à casca com um decréscimo na região do alburno mais externo. Comparando o teor de amido entre os protocolos, observamos maior porcentagem de amido no protocolo 1. A porcentagem média das amostras radiais analisadas pelo protocolo 1 e 2 foi de 13 e 12, respectivamente. O protocolo 1 se mostrou mais rápido e de mais fácil execução. Os custos das análises por amostra também foram mais vantajosos no protocolo 1, onde se gasta aproximadamente 50% do valor gasto no protocolo 2.

**Conclusão** Ambos os protocolos mostraram boa precisão dos resultados, apresentando baixo coeficiente de variação nas medições, mas o teor de amido foi significativamente maior no protocolo 1, que se apresenta mais vantajoso em termos de tempo, facilidade de execução e custo de análise, podendo ser utilizado a nível de comparação de resultados, pois se mostrou sensível o suficiente para detecção de diferenças entre as amostras radiais estudadas. Entretanto, a periculosidade do protocolo 1 é maior devido a instabilidade do ácido perclórico, que pode sofrer decomposição de forma explosiva, devendo ser manuseado com os equipamentos de segurança adequados. A acurácia dos valores obtidos pelos protocolos não pôde ser avaliada diretamente, uma vez que não se encontra um valor padrão exato de porcentagem de amido na madeira de seringueira em diferentes amostras radiais. Isso nos leva a sugerir às empresas produtoras de seringueira e à laboratórios de pesquisa com madeira o protocolo 1, quando o objetivo da análise for a comparação entre resultados, e o protocolo 2, quando o objetivo for uma quantificação de amido com maior exatidão, devido à maior seletividade do amido pelas enzimas.

**Palavras-chave:** *H. brasiliensis*, amido, hidrólise ácida, hidrólise enzimática

## INTRODUÇÃO

O amido é o principal carboidrato de reserva nas plantas, composto por dois tipos de  $\alpha$ -glucanas, amilose e amilopectina. A amilose é uma  $\alpha$ -glucana linear, relativamente longa contendo aproximadamente 99% de ligações  $\alpha$  (1,4) podendo diferir em tamanho e estrutura dependendo da origem botânica. Possui massa molar de aproximadamente  $105 - 106 \text{ g mol}^{-1}$ , grau de polimerização de 324 – 4920 com aproximadamente 9 a 20 pontos de ramificação equivalentes de 3 a 11 cadeias por molécula. A amilopectina é um polímero com maior massa que a amilose e apresenta uma estrutura bem ramificada de aproximadamente 95% de ligações  $\alpha$ (1,4) e 5% de ligações  $\alpha$ (1,6) (Tester et al. 2004).

O amido no xilema de árvores adultas é armazenado principalmente em células de parênquima radial e axial e sua quantidade varia com a idade dos tecidos. São abundantes nas células próximas ao câmbio, diminuindo em direção ao alburno mais interno, pois a morte das células parenquimáticas é acompanhada pela depleção de amido em direção à zona de transição para o cerne (Hoch et al. 2003, Kampe and Magel 2013). De acordo com a literatura clássica, as células do cerne não contêm amido (Eades 1937, Fahn and Arnon 1962, IAWA Committee 1964, Bamber and Fukazawa 1985, Hillis 1987, Saranpää and Höll 1989, Magel et al. 1994, Magel 2000, Höll 2000, Taylor et al. 2002, Dehon et al. 2002, Bergstöm 2003, Pallardy 2008, Nakada and Fukatsu 2012) ou este está presente em quantidades insignificantes (Bamber 1987, Fisher and Höll 1992, Höll 2000). Estudo recente evidenciou a presença de quantidade considerável de amido no cerne de *Hevea brasiliensis* (Cherelli et al. 2019 – Capítulo 2 da tese).

O amido presente nas células parenquimáticas é um composto de grande importância na fisiologia das plantas; sendo assim, é de grande interesse em diversas áreas de pesquisa como agricultura, silvicultura, botânica e ecologia (Rose et al. 1991). Este é mobilizado para a manutenção do metabolismo basal da planta durante o inverno, como fonte de energia para o crescimento vegetativo durante a primavera e também como reserva em situações de estresse, sendo um importante parâmetro para estudos das respostas das plantas a diferentes situações durante seu ciclo (Bellasio et al. 2014).

Porém, muitas vezes, a quantificação de amido, sobretudo na madeira, é problemática por diversas razões que vão desde a escolha até a implementação do método apropriado. Na literatura é reportada uma grande quantidade de deferentes

métodos, porém, em sua maioria carentes de detalhamento dos procedimentos laboratoriais, o que dificulta a tarefa de avaliação e seleção de métodos, assim como a interpretação e comparação de resultados obtidos entre diferentes estudos (Rose et al. 1991). Além disso, são poucos os trabalhos em que é proposta uma metodologia de quantificação de amido específica para a madeira. Em sua maioria os trabalhos que realizam a determinação de amido na madeira utilizam normas padronizadas para análises em alimentos; porém a madeira e amostras lenhosas em geral possuem diferentes características estruturais incluindo a presença de metabólitos secundários interferentes, baixa reatividade de amido e baixa quantidade de amido (Bellasio et al. 2014).

Nos métodos disponíveis para a quantificação de amido são contempladas basicamente as seguintes etapas: separação e remoção de açúcares solúveis da amostra, gelatinização e solubilização dos grânulos de amido, seleção do amido entre os carboidratos interferentes, hidrólise do amido e quantificação da glicose (produto final da hidrólise de amido). A etapa de hidrólise pode ser conduzida com o uso de ácidos (hidrólise ácida) ou enzimas (hidrólise enzimática) e isso se constitui no principal diferencial entre os métodos. Dentre os métodos que utilizam hidrólise ácida tem-se a hidrólise com ácido perclórico (MacRae et al. 1974, Lustinec et al. 1983, Rose et al. 1991), que é considerada perigosa devido à instabilidade do ácido perclórico; a hidrólise com ácido sulfúrico (Smith et al. 1964), que é considerada a mais simples e mais rápida e a hidrólise com ácido perclórico, seguida por coloração com iodeto e iodato de potássio (Humphreys and Kelly 1961). Dentre os métodos que utilizam hidrólise enzimática tem-se a utilização de somente amiloglicosidase (Ashworth et al. 1993, Giovannelli et al. 2011) ou amiloglicosidase e  $\alpha$ -amilase (Smith 1969, Haissig and Dickson 1979, Batey 1982, Rose et al. 1991, Hendrix 1993, Hoch et al. 2002, 2003, Chow and Landhäusser 2004, Robyt 2009, Bellasio et al. 2014), método considerado mais preciso e mais trabalhoso.

Diversos trabalhos comparam os métodos e resultados obtidos na determinação de amido em tecidos de plantas confrontando, sobretudo, as hidrólises ácida e enzimática (Chow and Landhäusser 2004, Rose et al. 1991, Quentin et al. 2015). Quentin et al. (2015) avaliaram os resultados obtidos por vinte e nove laboratórios de subamostras coletadas de cinco tecidos de plantas lenhosas. Cada laboratório utilizou seu protocolo específico, envolvendo diferentes métodos de gelatinização – hidróxido de sódio, dimetilsulfóxido, hidróxido de potássio, etanol, e  $\alpha$ -amilase – e



diferentes métodos de hidrólise – ácida com ácido perclórico, com ácido sulfúrico e com ácido clorídrico e enzimática somente com amiloglicosidase e associação de  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase. Os resultados evidenciaram que os teores de carboidratos não estruturais para tecidos de plantas lenhosas não podem ser comparados entre os laboratórios, pois diferiram substancialmente para todas as amostras analisadas.

A madeira da seringueira apresenta alto teor amido, podendo chegar a mais de 8% enquanto a madeira de outras espécies apresenta teores de amido que oscilam, em média, de 1 a 3% (Santana and Eiras 1999). A madeira de seringueira apresenta propriedades físicas, mecânicas e de usinabilidade favoráveis e com baixos custos (Killman and Hong 2000, Balsiger et al. 2000, Hashim et al. 2005, Teoh et al. 2011). Na Malásia, 30% dos produtos de madeira exportados e na Tailândia 60% são fabricados a partir de seringueira (Shigematsu et al. 2011). O principal objetivo de seu cultivo no Brasil é a produção de borracha natural (Gouvêa et al. 2011). Não há tradição de uso da madeira de seringueira no Brasil (Okino et al. 2009) a despeito de suas boas propriedades tecnológicas (Eufrade Júnior et al. 2015). O seu alto teor de amido e a baixa concentração de extrativos são cruciais para a susceptibilidade da espécie à deterioração, o que tem sido a principal razão pela qual esta espécie se torna menos atraente para as indústrias de processamento de madeira (Hong et al. 1994, Hong 1995).

Considerando-se o importante papel do amido para a determinação do uso final da madeira de seringueira e a problemática envolvida na escolha e implementação de uma metodologia apropriada para a quantificação de amido na madeira, estudamos nesse trabalho a quantificação de amido na direção radial em discos de *H. brasiliensis* por dois diferentes protocolos buscando-se, dentre as técnicas convencionais de hidrólise existentes (ácida e enzimática), qual é a mais apropriada para a madeira de seringueira, levando-se em consideração as características diferenciadas de cada técnica como, tempo gasto nas análises, facilidade de execução, periculosidade, custos totais por amostra e confiabilidade dos resultados, para assim sugerir um protocolo de quantificação do teor de amido que possa ser viável às empresas produtoras de seringueira num processo de controle de qualidade da espécie.

## MATERIAL E MÉTODOS

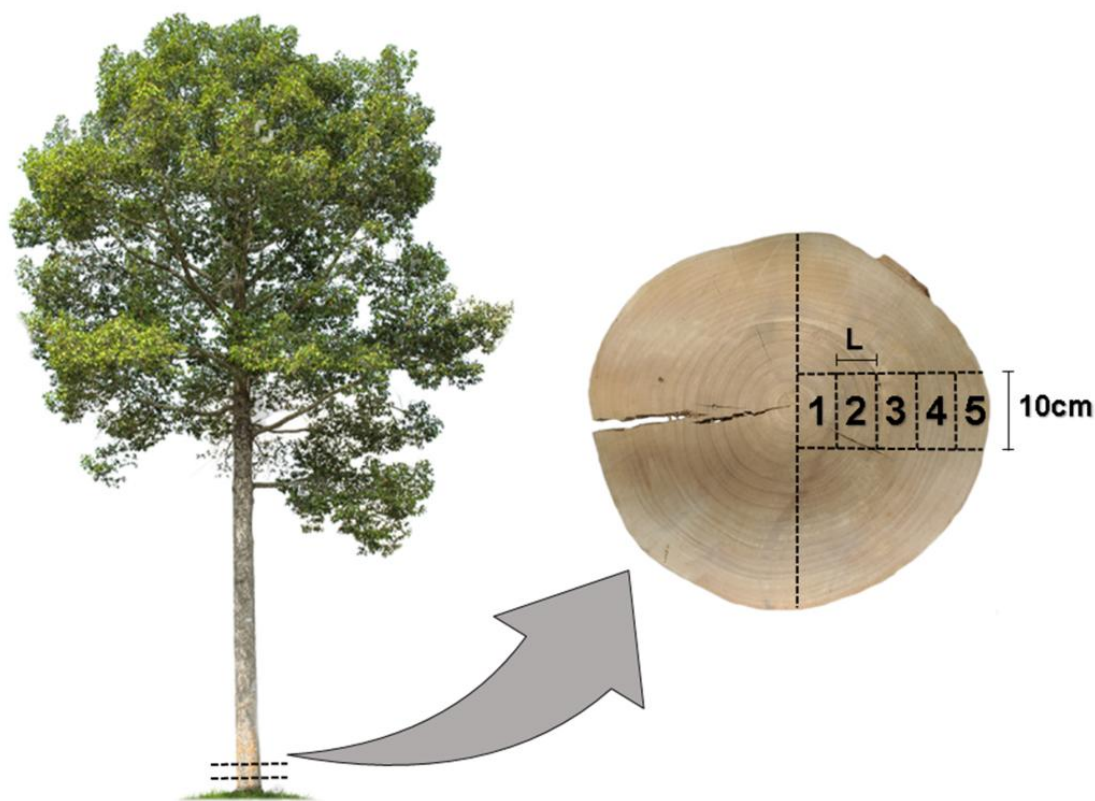
### Material

Utilizamos a madeira proveniente de 15 árvores de 25 anos (idade considerada terminal na extração comercial de látex) do clone comercial RRIM 600 de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex ADR. Juss.) Müll. Arg.] considerando-se sua importância comercial. Coletamos as árvores de um plantio experimental na região de Mococa (APTA Regional Nordeste Paulista), cujas coordenadas geográficas (latitude e longitude) são 21°28' S e 47°01' W, com altitude média de 665m, solo classificado como Argissolo Vermelho. O clima da região é do tipo CwA segundo Köppen. A precipitação média anual é de 1560mm e as médias das temperaturas dos anos de 1992 a 2017 são: temperatura média de 22,9°C, média máxima de 28,1°C e média mínima de 14,6°C (CEPAGRI 2018). Escolhemos as árvores aleatoriamente, e medimos a altura total e o maior raio dos discos amostrados (Tab. 1). Dos discos com espessura média de aproximadamente 8cm retirados da base de cada árvore testamos duas metodologias de quantificação de amido em cinco posições na direção radial do disco (Fig. 1), ao longo do maior raio.

**Tabela 1** – Dados das árvores amostradas e largura das amostras para quantificação do amido.

Árvore	Altura Total	Maior raio	Largura das amostras radiais (L)
	(m)	(cm)	(cm)
1	21,6	18,0	3,6
2	23,8	18,8	3,8
3	19,2	16,6	3,3
4	22,1	19,1	3,8
5	20,5	19,7	3,9
6	17,7	16,6	3,3
7	19,4	17,1	3,4
8	18,0	14,9	3,0
9	19,6	18,0	3,6
10	16,3	13,0	2,6
11	22,6	20,3	4,1
12	22,1	18,4	3,7
13	23,2	16,6	3,3
14	22,4	17,5	3,5
15	20,2	12,9	2,6

**Figura 1** – Esquema da amostragem na direção radial dos discos. L= largura das amostras radiais.



### **Preparo das amostras**

Secamos as amostras de madeira em estufa de esterilização com circulação e renovação de ar (Biothec – BT 312/150 ) a 70°C, moemos em moinho de facas tipo Willey (Marconi – MA 340) e peneiramos em peneira de 200 mesh para obtenção de pó fino, sem a presença de fibras evidentes. Armazenamos o material resultante em sacos plásticos à temperatura ambiente até o início das análises.

Utilizamos em ambos os protocolos um padrão de referência interno (PRI) para garantir ao máximo a precisão dos resultados no que diz respeito aos possíveis erros que podem ocorrer em análises quantitativas como falhas ocasionais, seja do equipamento, do material utilizado, do operador ou do efeito do dia. Preparamos o PRI misturando uma pequena quantidade de cada uma das amostras radiais estudadas e realizamos o quarteamento repetidas vezes para redução às quantidades necessárias para as análises.

## Quantificação do teor de amido

Testamos dois protocolos distintos para quantificação do amido na madeira de seringueira utilizando diferentes quantidades de material, tipos de hidrólise e determinações quantitativas da glicose (Tab. 2). Os dois protocolos exigiram etapas prévias de ajuste de seus procedimentos para melhor adequação às características da espécie estudada.

**Tabela 2** – Características das etapas realizadas em cada protocolo.

	<b>Protocolo 1</b>	<b>Protocolo 2</b>
<b>Quantidade amostra</b>	100mg	40mg
<b>Etapas</b>		
Separação e remoção de açúcares solúveis	etanol aquoso	etanol 80%
Hidrólise	Ácida (ácido perclórico)	Enzimática
<i>Temperatura hidrólise</i>	<i>ambiente</i>	<i>α-amilase – 100°C</i> <i>amiloglucosidase – 50°C</i>
<i>Tempo hidrólise</i>	<i>15 minutos</i>	<i>α-amilase – 12 minutos</i> <i>amiloglucosidase – 45 minutos</i>
Quantificação glicose	método antrona	PGO + o-dianisidina

Em cada um dos protocolos foram realizados testes iniciais com o PRI, em triplicata, por diversos dias. Depois que ajustamos os parâmetros e isolamos os possíveis erros que poderiam ocorrer nas análises quantitativas, o teor de amido foi analisado simultaneamente com as amostras – um PRI para cada dez amostras – para garantir a precisão do protocolo.

### **Protocolo 1 (Ácido) – Componentes e procedimentos**

As análises foram conduzidas seguindo-se o proposto por Sivaci (2006) para estacas de caule de macieira, com adaptações. Realizamos os ajustes da metodologia originalmente proposta para adequação à madeira de seringueira e todas as análises dessa metodologia no Centro de Raízes e Amidos Tropicais (CERAT) /UNESP – Botucatu/SP.

*Reagentes e soluções utilizados*

- I. Etanol PA
- II. Etanol aquoso (5ml de água + 20ml de etanol 80%)
- III. Ácido Perclórico PA (HClO<sub>4</sub>)
- IV. Ácido Perclórico 52% (270ml de ácido perclórico – 72% + 100ml de água)
- V. Antrona PA
- VI. Ácido sulfúrico PA (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- VII. Solução de antrona – 2g de antrona PA em 1000ml de ácido sulfúrico PA

*Procedimento*

Pesamos 100mg da amostra em tubos Falcon<sup>®</sup> de 50ml com tampa de rosca e adicionamos 25ml da solução II para a separação e remoção dos açúcares solúveis. Agitamos em vórtex, centrifugamos a 5.000 *g*, descartamos o sobrenadante e utilizamos o material residual para a quantificação de amido. Adicionamos 5ml de água gelada e 6,5ml do reagente IV em cada tubo e os levamos à agitação constante por 15 minutos em uma placa de agitação para a etapa da hidrólise do amido. Após a agitação adicionamos 20ml de água, levamos os tubos para centrifugação e reservamos o sobrenadante em outro tubo Falcon<sup>®</sup>. Repetimos o mesmo processo com o resíduo e levamos a combinação dos sobrenadantes para resfriamento por 30 minutos à 0°C. Para a quantificação da glicose colocamos uma alíquota de 1,25ml (ajustamos o volume da alíquota para a utilização de menor quantidade no reagente VII na etapa seguinte – no método original são utilizados 2,5ml) do sobrenadante em tubo de ensaio e adicionamos 5ml da solução VII (ajustamos o volume para o nosso material – no método original são utilizados 10ml, porém com 5ml em uma alíquota de 1,25ml obtivemos os mesmos resultados e economizamos reagentes). Levamos os tubos para banho-maria a 100°C durante 7,5 minutos. Transferimos imediatamente os tubos para um banho de gelo até serem resfriados à temperatura ambiente. Lemos a absorbância das amostras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 630nm e calculamos o teor de amido utilizando a curva de calibração para soluções padrão de glicose (Eq. 1).

$$\text{amido (\%)} = [(b \times a - a) 0,9] f d \quad (\text{Equação 1})$$

*b* = coeficiente angular da reta

$a$  = intersecção

$x$  = absorvância lida em 630nm

$0,9$  = fator de conversão de glicose para amido

$fd$  = fator de diluição

## **Protocolo 2 (Enzimático) – Componentes e procedimentos**

Executamos o método enzimático, assumido como método referencial por ser mais atual e otimizado para madeira, seguindo o procedimento descrito em Bellasio et al. (2014) com adaptações. Realizamos os ajustes da metodologia originalmente proposta para adequação à madeira de seringueira, assim como, todas as análises dessa metodologia no *Department of Animal and Plant Sciences - The University of Sheffield* em Sheffield, Reino Unido. Essa metodologia utiliza pequena quantidade de amostra (40mg) e consiste basicamente em duas etapas de hidrólise.

### *Reagentes e soluções utilizados*

- I.  $\alpha$ -amilase (*Bacillus licheniformis*) termoestável de alta pureza (E-BLAAM, Megazyme International)
- II. Amiloglucosidase pura de *Aspergillus niger* em glicerol a 50% e azida sódica a 0,02% (E-AMGDF, Megazyme international)
- III. Ácido sulfúrico PA ( $H_2SO_4$ )
- IV. Ácido sulfúrico 75% – 75ml de ácido sulfúrico PA + 25ml de água deionizada
- V. Ácido acético glacial ( $1,05\text{ g ml}^{-1}$ ) ( $CH_3COOH$ )
- VI. Hidróxido de sódio (NaOH) (1 M)
- VII. Cloreto de cálcio ( $CaCl_2$  5mM)
- VIII. o- dianisidina (Sigma D3252)
- IX. Kit reagente PGO ( Sigma P7119)
- X. Solução padrão de glicose  $1\text{mg.ml}^{-1}$  (Sigma G6918)
- XI. Solução tampão – 5,8ml do reagente IV adicionados a 900ml de água deionizada. O pH foi ajustado para 5,0 com o reagente V (4g em 100ml). Em seguida 0,74g do reagente VI foi adicionado e dissolvido e o volume ajustado para 1000ml.
- XII. Solução de  $\alpha$ -amilase – 1ml do reagente I dissolvido em 29ml da solução X
- XIII. Solução de o-dianizidina – 50mg do reagente VII dissolvidos em 20ml de água deionizada

XIV. Reagente completo para quantificação de glicose: uma cápsula do reagente VIII adicionada a 100ml de água deionizada + 1,6ml da solução XII.

#### *Procedimento*

Pesamos 40mg da amostra em tubos Falcon® com tampa de rosca, adicionamos 3ml da solução XII e uma barra magnética (8mm x 63mm) para a suspensão do material durante a digestão. Colocamos os tubos em banho-maria com agitador magnético por 12 minutos em água fervente para a primeira etapa de hidrólise do amido. Após o tempo de banho resfriamos os tubos para a realização da segunda etapa, feita com adição de 0,15ml do reagente II e colocada em banho-maria com agitação magnética por 45 minutos à uma temperatura de 50°C. Removemos a barra magnética de cada tubo e ajustamos o volume para 10ml com água deionizada. Em seguida levamos os tubos para centrifugação a 9.000 *g* durante 5 minutos à temperatura ambiente. Utilizamos o sobrenadante para a quantificação de glicose e descartamos o material decantado. Etiketamos os tubos de ensaio de 5ml em amostra (A), branco da amostra (BA), padrão glicose (PG) – em triplicata, e branco do padrão (BPG) e adicionamos água: 540µl em A e BA, 580µl em PG e 600µl em BPG. Em seguida adicionamos 20µl do sobrenadante da amostra em A (esse volume necessitou de ajuste para o nosso material – no método original são utilizados 60µl, porém esse volume "estourou" a curva de calibração), 20µl do sobrenadante da amostra branco em BA e 20µl da solução padrão de glicose em PG. Adicionamos em seguida 2ml do reagente XIV em todos os tubos, homogeneizamos e levamos em banho-maria a 37°C por 45 minutos. Após esse período interrompemos a reação adicionando 400µl do reagente IV na mesma ordem em que foi iniciada a adição do reagente XIV. Lemos a absorbância da amostra em espectrofotômetro no comprimento de onda de 530nm e realizamos os cálculos (Eq. 2) onde obtivemos a porcentagem de amido na amostra.

$$\text{amido (\%)} = \frac{(A_A - A_{BA}) m_{PG} V_t 0,9}{(A_{PG} - A_{BPG}) m_A V_A} \quad (\text{Equação 2})$$

$A$  = Absorbância de A, BA, PG, BPG

$m_{PG}$  = massa de glicose adicionada a PG (20µl)

$V_t$  = volume total para qual os tubos foram ajustados após a digestão (10000µl)

$m_A$ = massa da amostra pesada em mg

$V_A$ = volume de sobrenadante usado no ensaio (20 $\mu$ l)

$0,9$ = converte a massa de glicose em massa de amido.

### **Análise dos resultados**

Para avaliar o teor de amido quantificado em cinco amostras radiais (sentido medula – casca) de cada árvore submetida a dois protocolos distintos, foi utilizado o modelo linear generalizado misto com distribuição de probabilidade gama e função de ligação logarítmica, considerando como efeito aleatório as amostras radiais e como efeito fixo o protocolo de quantificação (Nelder and Wedderburn 1972). A qualidade do ajuste foi realizada por meio da análise da função desvio e o teste *LMeans* para comparações entre os níveis dos fatores.

Para avaliar a comparação dos valores de PRI realizados nos dois protocolos, foi utilizado o Teste t de *Student* considerando significativo quando  $p < 0,05$ .

### **RESULTADOS**

A porcentagem de amido das nos dois protocolos variou de 7,3 a 17,3 (Tab. 3), apresentando um padrão de distribuição na direção radial bem definido de aumento da porcentagem de amido até a amostra radial 4 seguido de diminuição na amostra radial 5, mais próxima a casca.

Comparando-se o teor de amido entre os dois protocolos avaliados, observamos uma maior porcentagem no protocolo 1. A média da porcentagem de amido das amostras radiais analisadas no protocolo 1 e 2 foi de 13,0 e 12,0, respectivamente. Os valores que encontramos para PRI também foram significativamente maiores no protocolo 1(14,1) quando comparados aos valores do protocolo 2 (13,1).

Nota-se que o desvio padrão encontrado para todas as amostras foi baixo, mostrando boa precisão dos procedimentos de quantificação de amido em ambos os protocolos.

Analisamos também outros fatores dos protocolos como, tempo gasto nas análises, facilidade de execução, periculosidade e custos totais por amostra. O protocolo 1 mostrou-se mais rápido e de mais fácil execução, sendo possível a análise de 60 amostras em um único dia, enquanto no protocolo 2 conseguimos analisar apenas 40 amostras por dia. Os custos da análise também se mostraram mais vantajosos no protocolo 1, sendo 50% menor que no protocolo 2. Entretanto, a



periculosidade do protocolo 1 é maior devido a instabilidade do ácido perclórico, que pode sofrer decomposição de forma explosiva, devendo ser manuseado com os equipamentos de segurança adequados.

**Tabela 3** – Teor de amido obtidos nas amostras radiais e PRI

Protocolo	Amostras radiais					PRI
	1	2	3	4	5	
1	*8,8 <sup>dA</sup>	12,3 <sup>CA</sup>	14,2 <sup>bA</sup>	17,3 <sup>aA</sup>	12,5 <sup>CA</sup>	14,5 <sup>d</sup>
	** (0,34)	(0,38)	(0,29)	(0,42)	(0,61)	(0,88)
	*** (3,86)	(3,08)	(2,04)	(2,42)	(4,88)	(6,06)
2	7,3 <sup>dB</sup>	11,3 <sup>cB</sup>	13,5 <sup>bB</sup>	16,4 <sup>aB</sup>	11,4 <sup>cB</sup>	13,1 <sup>β</sup>
	(0,31)	(0,31)	(0,24)	(0,24)	(0,29)	(0,83)
	(4,24)	(2,74)	(1,78)	(1,46)	(2,54)	(6,33)

\*Média  
 \*\*Desvio padrão  
 \*\*\* Coeficiente de variação  
 Letras minúsculas – comparação das amostras radiais, dentro dos protocolos  
 Letras maiúsculas – comparação dos protocolos, dentro das amostras radiais  
 Letras gregas – comparação dos valores de PRI, entre os protocolos

## DISCUSSÃO

Nesse estudo identificamos grande porcentagem de amido ao longo de toda amostra radial das árvores de *H. brasiliensis* analisadas. Esse resultado era esperado, uma vez que grandes quantidades de amido têm sido reportadas na literatura, para a espécie, sobretudo, sobre sua relação com a resistência natural desta madeira (Kadir and Sudin 1989, Hong et al. 1994, Hong 1995, Santana and Eiras 1999, Killmann and Hong 2000, Silpi et al. 2007, Milingliang and Zhijuan 2008, Tamolang 2008, Chantuma et al. 2009, Teoh et al. 2011). Contudo, no presente estudo, as porcentagens encontradas são maiores que as relatadas na literatura, 7.5 – 10.2% (Kadir e Sudin 1989), 3,9 – 5,8% (Silpi et al. 2007), ~ 5,5 – 6,5% (Chantuma et al. 2009) e 3,3 – 7,2% (Servolo Filho 2013), mas devemos ressaltar que diversos fatores podem ter influenciado nas diferenças destes resultados, como local de crescimento das árvores, idade das árvores, período fenológico e estação do ano, posição da amostragem, técnicas de pré-processamento das amostras e metodologia de quantificação do amido.

Embora, como já citado anteriormente, diversos autores relatem a ausência ou concentrações insignificantes de amido no cerne – parte central da árvore – os

resultados encontrados neste estudo corroboram os encontrados por Cherelli et al. (2018) (Capítulo 2 da tese) que reportam uma quantidade considerável (6,2 – 9,7%) de amido também na porção central de árvores de *H. brasiliensis*.

O teor de amido foi significativamente maior no protocolo 1 (8,8 a 17,3%), com as diferenças de 0,7 a 1,5 pontos percentuais a mais que os valores encontrados no protocolo 2 (7,3 a 16,4%), dependendo da amostra radial. Os valores que obtivemos para o PRI também apresentaram-se significativamente maiores no protocolo 1 (1,3 pontos percentuais a mais). Alguns métodos ácidos implicam o isolamento de amido por precipitação com iodeto de potássio (KI), porém nem todos os métodos ácidos têm uma etapa seletiva de separação dos carboidratos e, portanto, frequentemente resultam em baixa seletividade porque tanto o amido (carboidrato não estrutural) quanto os carboidratos estruturais são hidrolisados por ácidos concentrados (Bellasio et al. 2014), o que sugere que a falta de uma etapa seletiva no protocolo 1 pode ter sido o responsável pelos maiores valores encontrados. Rose et al. (1991) compararam valores de amido em raízes de pinheiros hidrolisados por ácido perclórico e por enzimas e verificaram que os métodos de ácido perclórico sem precipitação com KI mostraram valores de amido 20 – 40% mais altos que o método considerado padrão – *The Association of Official Analytical Chemists* (AOAC 1984). Os mesmos autores sugerem ainda que os métodos enzimáticos tem maior precisão para extração e etapas colorimétricas.

Diversos estudos, desde a década de 60, reportam a comparação entre protocolos de análise de amido e, ainda assim, são encontradas dificuldades na escolha e implementação de uma metodologia de quantificação de amido apropriada. Isso ocorre devido a grande variabilidade nas características químicas e estruturais de materiais biológicos, incluindo a presença de metabólitos secundários, baixa reatividade do amido e baixo conteúdo de amido em alguns destes materiais. Em amostras de folhas, caules e raízes, o ácido sulfúrico diluído mostrou-se menos adequado para a hidrólise do amido do que a hidrólise enzimática, porque o ácido também quebrou os carboidratos estruturais, resultando em superestimação do teor de amido (Chow and Landhäusser 2004).

Por outro lado, em estudo de determinação de amido em mandioca, Rickard and Behn (1987) não encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os métodos de hidrólise ácida e hidrólise enzimática, sugerindo que, para este tipo de material, o maior custo do método enzimático parece não ser justificado, ao contrário

do que acontece em uma série de outras fontes de amido. A mandioca possui elevados teores de amido em sua composição – aproximadamente 33% (Salla 2010), enquanto que em materiais lenhosos esses teores são bem menores, sendo de 1 a 3% e não ultrapassando 18%, nos casos extremos, como o da seringueira.

Smith et al. (1964) também encontraram valores muito semelhantes de teor de amido extraídos com enzima e ácido de baixa concentração em tecido de forrageiras. Os autores ainda sugerem que o método de extração com ácido envolve muito menos tempo analítico que o método enzimático. No entanto, é importante frisar que para materiais biológicos que contenham baixo teor de amido e grande teor de carboidratos estruturais é adequado utilizar um protocolo que contenha um método de análise específico para glicose (produto final da hidrólise), como a glicose-oxidase (MacRae et al. 1974).

São reportados na literatura diferentes métodos de determinação da glicose após a hidrólise do amido. A utilização do reagente antrona sob condições ácidas possui desvantagens (Rickard and Behn 1987) entre elas a interferência de outros carboidratos como celulose, pectina, arabinose e xilose que formam complexos coloridos com a antrona resultando consequentemente em superestimação dos valores de amido (MacRae and Armstrong 1978). No estudo de Quentin et al. (2015), os protocolos que utilizaram hidrólise enzimática com  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase apresentaram menores variabilidades nos resultados. Os autores apresentaram ainda um protocolo referencial que utiliza a extração de açúcares solúveis com etanol 80%, gelatinização com acetato de sódio, hidrólise enzimática com  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase e sugerem a utilização de HPLC (*High performance liquid chromatography*) como método de quantificação de amido devido à sua precisão (talvez pelas etapas de filtração utilizadas no procedimento que removem os compostos interferentes). No entanto, o processo é demorado, trabalhoso e caro.

Ambos os protocolos analisados neste estudo revelaram boa precisão, com baixo grau de variação entre as medições realizadas (coeficiente de variação de 1,46 a 4,88%). A acurácia dos valores obtidos pelos protocolos não pôde ser avaliada diretamente, uma vez que não temos um valor padrão exato de porcentagem de amido na madeira de seringueira em diferentes amostras radiais. Contudo, o protocolo 2, mais utilizado em estudos recentes, por possuir maior seletividade do amido pelas enzimas, possivelmente apresenta resultados mais

exatos para a seringueira, podendo-se afirmar que para outros materiais lenhosos que apresentam menores teores de amido que esta espécie, o mesmo acontecerá. Possivelmente, com a adição de uma etapa de seletividade do amido – como a precipitação com iodeto de potássio (AOAC 1984) – no protocolo 1, os resultados podem se tornar estatisticamente iguais entre os protocolos.

## **CONCLUSÃO**

Identificamos grande teor de amido no lenho de *H. brasiliensis* quando comparada a madeira de outras espécies, distribuído do cerne (parte mais central) ao alborno (parte mais externa), sendo as maiores porcentagens encontradas no alborno. O teor de amido, quando avaliado pelos dois protocolos apresentou resultados significativamente maiores no protocolo 1. Ambos os protocolos mostraram-se precisos, apresentando baixo grau de variação entre as medições. O protocolo 1 se apresenta mais vantajoso em termos de tempo, facilidade de execução e custo de análise, podendo ser utilizado a nível de comparação de resultados, pois se mostrou sensível o suficiente para detecção de diferenças entre as amostras radiais estudadas. Entretanto, a periculosidade do protocolo 1 é maior devido a instabilidade do ácido perclórico, que pode sofrer decomposição de forma explosiva, devendo ser manuseado com os equipamentos de segurança adequados. A acurácia dos valores obtidos pelos protocolos não pôde ser avaliada diretamente, uma vez que não se encontra um valor padrão exato de porcentagem de amido na madeira de seringueira em diferentes amostras radiais. Isso nos leva a sugerir à empresas produtoras de seringueira e à laboratórios de pesquisa com madeira o protocolo 1, quando o objetivo da análise for a comparação entre resultados, e o protocolo 2, quando o objetivo for uma quantificação de amido com maior exatidão, devido à maior seletividade do amido pelas enzimas.

## **AGRADECIMENTOS**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de doutorado concedida e pela bolsa de estudos concedida no Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior – PDSE (Processo - 88881.136044/2017 – 01), ao Centro de Raízes e Amidos Tropicais (CERAT) e à *The University of Sheffield*

pela concessão dos laboratórios e à APTA Regional Nordeste Paulista e APTA Regional Centro Oeste pelas árvores fornecidas para o estudo.

## REFERÊNCIAS

AOAC. Official Methods of Analysis, 14th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC, 1984.

ASHWORTH EN, STIRM VE, VOLENEC JJ (1993). Seasonal-variations in soluble sugars and starch within woody stems of *Cornus-sericea* L. **Tree Physiology**, United Kingdom, v.13, p.379–388.

BALSIGER J, BAHDON J, WHITEMAN A (2000) Asia-pacific forestry sector outlook study: the utilization, processing and demand for rubberwood as a source of wood supply. **FAO**, Italy.

BAMBER RK (1987). **Sapwood and heartwood**. NSW Department of Primary Industries. Science and Research Division. Forest Resources Research. Technical Papers v. 2 1-7.

BAMBER RK; FUKAZAWA K (1985). Sapwood and heartwood: A review. **Forestry Abstracts, Nature**, United Kingdom . v. 46 p.567-580.

BATEY IL (1982). Starch analysis using thermostable alpha-amylases. **Starch/Staerke**, Germany, v.34, p.125–128.

BELLASIO C, FINI A, FERRINI F (2014). Evaluation of a high throughput starch analysis optimised for wood. **PLoS ONE**, United States, v.9, n. 2: e86645.

BERGSTRÖM B (2003) Chemical and structural changes during heartwood formation in *Pinus sylvestris*. **Forestry**, United Kingdom, v.76, p.45–53.

CAMPELO JÚNIOR JH (2000). Estimativa da transpiração em seringueira. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Brazil, v.8, n.1, p. 35-42.

CEPAGRI – **Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura**. Disponível em: <<https://orion.cpa.unicamp.br/index.html>>. Acesso em Ago. 2018.

CHANTUMA et al. (2009). Carbohydrate storage in wood and bark of rubber trees submitted to different level of C demand induced by latex tapping. **Tree Physiology**, United Kingdom, v. 29 p.1021-1031.

CHOW PS and LANDHÄUSSER SM (2004). A method for routine measurements of total sugar and starch content in woody plant tissues. **Tree Physiology**, United Kingdom, v.24, p.1129 –1136.

DEHON L, MACHEIX JJ, DURAND M (2002). Involvement of peroxidases in the formation of the brown coloration of heartwood in *Juglans nigra*. **Journal of Experimental Botany**, United Kingdom, v.53, p.303-311.

EADES HW (1937). Iodine as an indicator of sapwood and heartwood. **The Forestry Chronicle**, Canada. v.13, n.3, p. 470-477.

EUFRADE JÚNIOR HJ et al. (2015). Potential of rubberwood (*H. brasiliensis*) for structural use after the period of latex extraction: a case of study in Brazil. **Journal of Wood Science**, Germany, v.61, p.384-390.

FAHN A; ARNON N (1962). The living wood fibres of *Tamarix aphylla* and the changes occurring in them in transition from sapwood to heartwood. **New Phytologist**, United Kingdom, v.62, n.1, p.99-104.

FISHER C; HÖLL W (1992). Food reserves of scots pine (*Pinus sylvestris* L.) II. Seasonal changes and radial distribution of carbohydrate and fall reserves in pine wood. **Trees**, Germany, v.6, p.147-155.

GIOVANNELLI A et al (2011). Sampling cambial region and mature xylem for non-structural carbohydrates and starch analyses. **Dendrochronologia**, Germany, v.29, p.177–182.

GOUVÊA LRL et al. (2011). Different methods to assess yield temporal stability in rubber. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brazil, v.46, n.5, p.491-498.

HAISSIG BE, DICKSON RE (1979). Starch measurement in plant-tissue using enzymatic-hydrolysis. **Physiologia Plantarum**, United Kingdom, v.47, p.151–157.

HASHIM R, HOW LS, KUMAR RN, SULAIMAN O (2005). Some of the properties of flame retardant medium density fiberboard made from rubberwood and recycled

containers containing aluminum trihydroxide. **Bioresource Technology**, Netherlands, v. 96, p.1826–1831.

HENDRIX DL (1993). Rapid extraction and analysis of nonstructural carbohydrates in plant-tissues. **Crop Science**, United States, v. 33, p.1306–1311.

HILLIS WE (1987). **Heartwood and tree exudates**. Berlin: Springer-Verlag, 268 p.

HOCH G et al (2002). Altitudinal increase of mobile carbon pools in *Pinus cembra* suggest sink limitation of growth at the Swiss treeline. **Oikos**, United Kingdom, v. 98, p.361–374.

HOCH G et al (2003). Non-structural carbon compounds in temperate forest trees. **Plant, Cell and Environment**, United Kingdom, v.26, p.1067–1081.

HÖLL W (2000). Distribution, fluctuation and metabolism of food reserves in the wood of trees. In: **Cell & Molecular Biology of Wood Formation**. SAVIDGE R; BARNETT J; NAPIER R (eds.) BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford. p.347-362.

HONG LT (1995). **Rubberwood utilization: A success story**. Paper presented at XX International Union of Forestry Research Organizations (IUFRO) World Congress, Tampere, Finland, p. 6 – 12.

HONG LT et al (1994). Durability of rubberwood. In: Hong L. T.; Lim S. C. (Eds.). **Rubberwood processing and utilization**. Kuala Lumpur: Forest Research Institute of Malaysia, p. 37 – 50.

HUMPHREYS FR and KELLY J (1961). A method for the determination of starch in wood. **Analytica Chimica Acta**, Netherlands, v.24, p.66-70.

IAWA Committee on Nomenclature (1964). **Multilingual Glossary of Terms used in Describing Wood Anatomy**. Winterthur: Konkordia.

KADIR AA and SUDIN R (1989). Carbohydrates in rubberwood (*Hevea brasiliensis* Muell.). **Holzforschung**, Austria, v.43, n.3, p.173-178.

KAMPE A; MAGEL E (2013). New insights into heartwood and heartwood formation. In: **Cellular aspects of wood formation. Plant cell monographs**. FROMM J (ed.). Berlin: Springer-Verlag. p. 71–95.

KILLMAN W, HONG LT (2000). Rubberwood - the success of an agricultural by-product. **Unasyiva**, Italy, v.51, n.201, p.66-72.

LORENZI H (1992).. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Ed. Plantarium. 352p.

LUSTINEC et al. (1983). Quantitative determination of starch, amylose and amylopectin in plant tissues using glass fiber paper. **Analytical Biochemistry**, United States, v.132, p. 265-271.

MACRAE JC and ARMSTRONG D G (1978). Enzyme method for determination of linked glucose polymers in biological materials. **Journal of the Science Food and Agriculture**, United States, v.19, p.578-581.

MACRAE JC, SMITH D, MCCREADY RM (1974). Starch estimation in leaf tissue - comparison of results using 6 methods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, United States, v.25, p.1465–1469.

MAGEL EA (2000) Biochemistry and physiology of heartwood formation. In: **Cell and molecular biology of wood formation**. SAVIDGE R, BARNETT J, NAPIER R (eds.), p. 363–376. BIOS Scientific Publishers, Oxford..

MAGEL EA et al (1994). Formation of heartwood substances in the stemwood of *Robinia pseudoacacia* L II. Distribution of nonstructural carbohydrates and wood extractives across the trunk. **Trees**, Germany. v. 8. p.165-171.

MCCREADY et al. (1950). Determination of starch and amylose in vegetables. **Analytical Chemistry**, United States, v.22, p. 1156-1158.

MILINGLIANG J and ZHIJUAN W (2008). Rubberwood preservation by friendly preservatives. In: **Proceedings of the ITTO/CFC International Rubberwood Workshop**. ZHAO Y (ed.), Haikou, China. p. 117-128.

NAKADA R; FUKATSU E (2012). Seasonal variation of heartwood formation in *Larix kaempferi*. **Tree Physiology**, United Kingdom, v. 32, n. 1, p. 1497-1508.

NELDER J; WEDDERBURN RWM (1972). Generalized Linear Models. **Journal of the Royal Statistical Society: A**, United Kingdom, v.135, p.370-384.



OKINO EYA et al (2009). Uso das madeiras de seringueira, pinus e cipreste na fabricação de chapas OSB. **Floresta**, Brazil, v.39, n.2, p.457-468.

PALLARDY, S.G (2008). **Physiology of woody plants**. 3.ed. San Diego: Elsevier/Academic. 454p.

QUENTIN et al (2015). Non-structural carbohydrates in woody plants compared among laboratories. **Tree Physiology**, United Kingdom, v.00, p.1-20.

RICKARD JE and BEHN KR (1987). Evaluation of acid and enzyme hydrolytic methods for the determination of cassava starch. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, United States, v.41, n.4, p.373-379.

ROBYT JF (2009). Enzymes and their action on starch. In: James B and Roy W (Eds.) **Starch** (Third Edition). San Diego: Academic Press. pp. 237–292.

ROSE R et al. (1991). Starch determination by perchloric-acid vs enzymes - evaluating the accuracy and precision of 6 colorimetric methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, United States, v.39, p.2–11.

SALLA DA et al. (2010). Análise energética de sistemas de produção de etanol de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Brazil, v. 14, n. 4, p. 444 - 448.

SANTANA MAE, EIRAS KMM, PASTORE TCM (2001). Avaliação da Madeira de 4 clones de *Hevea brasiliensis* por meio de sua caracterização físico-mecânica. **Brasil Florestal**, Brazil, n.70, p.61-68.

SARANPÄÄ P; HÖLL W (1989). Soluble carbohydrates of *Pinus sylvestris* L. sapwood and heartwood. **Trees**, Germany, v.3, p.138-143.

SERVOLO FILHO HJ (2013). Propriedades mecânicas da madeira de clones de seringueira (*Hevea brasiliensis*- RRIM 600 e GT 1) analisadas em duas épocas do seu ciclo fenológico anual. 93p. Tese (Doutorado em Ciências, Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba - SP/Brazil.

SHIGEMATSU A, MIZOUE N, KAJISA T, YOSHIDA S (2011). Importance of rubberwood in wood export of Malaysia and Thailand. **New Forests**, Netherlands, v.41, n.2, p.179-189.

- SILPI et al (2007). Carbohydrate reserves as a competing sink: evidence from tapping rubber trees. **Tree Physiology**, United Kingdom, v. 27, p.881-889
- SIVACI A (2006). Seasonal changes of total carbohydrate contents in three varieties of apple (*Malus sylvestris* Miller) stem cuttings. **Scientia Horticulturae**, Netherlands, v.109, p.234–237.
- SMITH D (1969) Removing and analysing total non-structural carbohydrates from plant tissue. **Wisconsin Agricultural Experiment Station Research Report**, United States, v. 41, p.1-11.
- SMITH et al. (1964). Extraction of total available carbohydrates from grass and legume tissue. **Plant Physiology**, United States, v. 39, p. 960-962
- TAMOLANG FB (2008). Status of rubberwood processing and utilization in the Philippines. In: **Proceedings of the ITTO/CFC International Rubberwood Workshop**. ZHAO Y (ed.) Haikou, China. p. 83-98.
- TAYLOR AM; GATNER BL; MORRELL JJ (2002). Heartwood formation and natural durability – a review. **Wood and Fiber Science**, United States. v. 34, n. 4, p. 587-611.
- TEOH PY, DON MM, UJANG S (2011). Assessment of the properties, utilization, and preservation of rubberwood (*Hevea brasiliensis*): a case study in Malaysia. **Journal of Wood Science**, Germany, v. 57, p.255–266.
- TESTER FR, KARKALAS J, QI X (2004). Starch-composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, England, v.39, p.151-165.

## **CAPÍTULO 2: AMIDO NO CERNE E LONGEVIDADE DO ALBURNO EM *Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. de Juss.) Muell-Arg.**

Sabrina Galetti Cherelli<sup>1\*</sup>, Carmen Regina Marcati<sup>2</sup>, Chandra Bellasio<sup>3</sup>, Thaís Paes Rodrigues dos Santos<sup>4</sup>, Sergio Augusto Rodrigues<sup>5</sup>, Magali Leonel<sup>4</sup>, Adriano Wagner Ballarin<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós Graduação em Agronomia - Energia na Agricultura

<sup>2</sup> Dep. Ciência Florestal

<sup>3</sup> Research School of Biology

<sup>4</sup> Centro de Raízes e Amidos Tropicais

<sup>5</sup> Dep. de Bioprocessos e Biotecnologia

<sup>6</sup> Dep. Engenharia Rural

<sup>1,2,4,5,6</sup> Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, Univ. Estadual Paulista (UNESP), Avenida Universitária, 3780 – CEP 18610-034 – Altos do Paraíso – Botucatu/SP, Brasil.

<sup>3</sup> Australian National University, Canberra, ATC, Australia

\* autor correspondente: sabrina\_galetti@hotmail.com/ +55 (19) 99108 6786

### **Resumo:**

- **Contexto** O amido tem um grande papel no metabolismo das árvores incluindo sua importância nos estudos de resposta das plantas a diferentes situações durante seu ciclo fenológico e como ferramenta complementar de predição da performance de sistemas de sangria em seringueira, assim como a associação de seu acúmulo na brotação e crescimento.
- **Objetivos** Analisar a distribuição radial de amido em duas estações do ano e em dois sítios de desenvolvimento das árvores de seringueira e adicionalmente estimar a longevidade do alburno dessa espécie.
- **Métodos** Amostras: cinco amostras radiais de oito discos de madeira de seringueira em duas estações do ano (estação seca e estação chuvosa) em dois sítios de desenvolvimento das árvores com diferentes tipos de solo (latossolo e argissolo). O protocolo de quantificação de amido utilizado foi o de hidrólise enzimática descrito em Bellasio et al. (2014). Análises microscópicas: distribuição radial do amido pela observação de grãos de amido corados com lugol e observação de tilos comuns para caracterização de cerne. Longevidade das células de parênquima: cálculos a partir das medições da largura de cerne e alburno.
- **Resultados** A porcentagem de amido variou de 6,2 a 17,5 com um padrão bem definido de distribuição radial de aumento do centro à casca com decréscimo no alburno mais externo. Ambos estação do ano e sítio de desenvolvimento das árvores mostraram diferenças significantes na porcentagem de amido. A

longevidade das células de parênquima nas árvores analisadas foi em torno de 18 a 21 anos.

- **Conclusão** A madeira de *H. brasiliensis* apresenta grande quantidade de amido, do alburno ao cerne, sendo as maiores porcentagens encontradas no alburno, com declínio no alburno mais externo sugerindo seu consumo pela atividade do câmbio vascular para o crescimento radial. A maior porcentagem de amido foi encontrada nas amostras coletadas na estação seca e no sítio com solo do tipo latossolo. A média da longevidade do alburno foi de 20 anos, mostrando que as árvores amostradas de 25 anos possuem cerne com conteúdo de amido, portanto, podemos afirmar que, para árvores de *H. brasiliensis*, não se deve utilizar a ausência de grãos de amido para caracterização de cerne.

**Palavras-chave:** amido, cerne, longevidade do alburno, *H. brasiliensis*

**Mensagem-chave:** A madeira de *H. brasiliensis* mostrou grande quantidade de amido do cerne ao alburno, contradizendo o descrito na literatura sobre a depleção ou ausência do amido no cerne. Portanto, podemos afirmar que, nesta espécie, não se deve utilizar a ausência de grãos de amido para caracterizar cerne.

## INTRODUÇÃO

A *Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. de Juss.) Muell-Arg., popularmente conhecida como seringueira, tem grande importância econômica, sobretudo por ser a principal fonte de látex, produto com crescente demanda mundial e múltiplas aplicações na indústria. Seu habitat natural é a região amazônica do Brasil, embora existam plantações comerciais da espécie em diversos estados brasileiros (IBA 2017). Por ser uma espécie com hábitos decíduos, mais pronunciados em regiões onde períodos secos são constantes, a seringueira possui estágios fenológicos bem definidos, sendo a sazonalidade de sua área foliar na fase adulta determinada pelo clima. No estado de São Paulo a senescência ocorre durante o inverno, no período de junho a agosto (Gonçalves et al. 1989, 1997).

De acordo com Dickson (1989) árvores decíduas produzem novas folhas a um baixo custo de carbono por unidade de área foliar, mas a um alto custo de carboidratos de reserva (açúcares solúveis e amido). Além da relação do consumo do amido para a rebrota, a seringueira utiliza grande quantidade de energia, na forma de carboidratos de reserva, para a reconstrução foliar, resultando em baixa produção de látex (Vieira et al. 2010). Sendo assim, a quantificação dos teores destes carboidratos, como o amido, tem sido proposta como uma ferramenta complementar para prever o desempenho a longo prazo dos sistemas de sangria (Silpi et al. 2007), e quando se busca associar seu acúmulo aos fluxos de lançamentos periódicos de folhas (Servolo Filho 2013).

Os carboidratos de reserva cumprem papéis funcionais distintos dentro das árvores incluindo transporte, metabolismo energético e osmorregulação; além disso, fornecem substratos para a síntese de compostos de defesa ou troca com simbiontes envolvidos em aquisição ou reserva de nutrientes (Hartmann and Trumbore 2016). Esses carboidratos nos tecidos são utilizados ou armazenados na forma de amido (Giovannelli et al. 2011) e podem ser mobilizados para a manutenção do metabolismo da planta durante o inverno, como fonte de energia para o crescimento vegetativo durante a primavera e também como reserva em situações de estresse, possuindo grande importância nos estudos das respostas das plantas a diferentes situações durante seu ciclo de vida (Bellasio et al. 2014). Várias questões importantes sobre os carboidratos armazenados em árvores permanecem sem resposta como, por exemplo, seu papel na indicação do equilíbrio de carbono na planta, na relação das plantas com o estresse e o tipo de controle de

armazenamento e uso (Chapin et al. 1990, Sala et al. 2011, 2012, Wiley and Helliker 2012). As muitas incertezas sobre como o amido está envolvido na regulação do metabolismo do carbono de toda a árvore, tornam complexas as previsões de crescimento e produtividade sob mudanças ambientais (Ryan 2011).

Em um conceito básico, quando o nível de carboidratos produzidos pela fotossíntese não é suficiente para atender a demanda de manutenção, crescimento ou metabolismo, as árvores usam os carboidratos de reserva. Sendo assim, o armazenamento de carboidratos em árvores é considerado uma função passiva, protegendo as diferenças temporárias entre a disponibilidade de carbono e a demanda no ciclo anual da árvore. No entanto, o armazenamento de carboidratos pode ser um processo que compete com outros fatores por assimilação (Silpi et al. 2007) como em árvores de seringueira, por exemplo, onde a sangria realizada periodicamente induz a produção de látex, processo que exige grande quantidade de carbono desviando uma proporção significativa dos produtos assimilados (Chantuma et al. 2009). Partindo-se desse princípio, o desvio adicional de assimilados para a produção de látex resultaria em um decréscimo dos carboidratos de reserva. Entretanto, o desvio adicional criado pela sangria não resulta em um decréscimo, mas sim, em um aumento no teor de carboidratos não estruturais na madeira de seringueira (Silpi et al. 2007).

Considerando-se o importante papel do amido no metabolismo das árvores, sua importância para estudos de resposta das plantas a diferentes situações durante seu ciclo e como ferramenta complementar para predição de desempenho de sistemas de sangria, além da associação de seu acúmulo à brotação e crescimento, estudamos nesse trabalho a distribuição radial do conteúdo de amido da madeira de seringueira em diferentes estações do ano e diferentes locais de crescimento das árvores. Adicionalmente, estimamos a longevidade do alburno desta espécie.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material**

Neste estudo utilizamos a madeira de 32 árvores adultas de 25 anos (idade considerada terminal na extração comercial de látex) do clone comercial RRIM 600 de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex ADR. Juss.) Müll. Arg.] considerando-se sua importância comercial. Escolhemos as árvores aleatoriamente e medimos a altura total das árvores e o maior raio em cada um dos discos amostrados (Tab. 1).

Coletamos discos da base das árvores em dois diferentes plantios experimentais na região de Mococa (APTA Regional Nordeste Paulista) e região de Ribeirão Preto (APTA Regional Centro Oeste) na região sudeste do Brasil. O espaçamento de ambos os plantios era de 7,0m entre linhas e 3,0m entre plantas e as características dos locais são:

- Mococa – coordenadas geográficas (latitude e longitude): 21°28' S e 47°01' W, com altitude média de 665m, solo classificado como Argissolo Vermelho. O clima da região é do tipo CwA, segundo Köppen. A precipitação média anual é de 1560mm e as médias das temperaturas dos anos de 1992 a 2018 são: temperatura média de 22,9°C, média máxima de 28,1°C e média mínima de 14,6°C (CEPAGRI, 2018).
- Ribeirão Preto – coordenadas geográficas (latitude e longitude): 21°12' S e 47°52' W, com altitude média de 646m, solo classificado como Latossolo Vermelho. O clima da região é do tipo Aw, segundo Köppen. A precipitação média anual é de 1427mm e as médias das temperaturas dos anos de 1992 a 2018 são: temperatura média de 23,1°C, média máxima de 28,0°C e média mínima de 14,5°C (CEPAGRI, 2018).

As coletas foram realizadas em duas estações do ano:

- Inverno (Agosto): período em que as árvores de seringueira estavam sem folhas. Estação mais seca e fria do ano na região Sudeste do Brasil pois contabiliza o mais baixo índice pluviométrico e o registro das mais baixas temperaturas (IPMet 2018).
- Verão (Fevereiro): período em que as árvores de seringueira estavam com folhas e frutos. Estação com maior quantidade de radiação solar, o que favorece o aumento das temperaturas, da precipitação, da umidade relativa do ar e da nebulosidade (IPMet 2018).

Da base de cada árvore, em cada período de coleta (inverno e verão) e em cada local (Argissolo e Latossolo) cortamos dois discos pareados da base das árvores (com espessura média de 8cm) (Fig. 1). De um dos discos (Fig. 1A) retiramos cinco amostras igualmente espaçadas na direção radial (sentido medula – casca) do maior

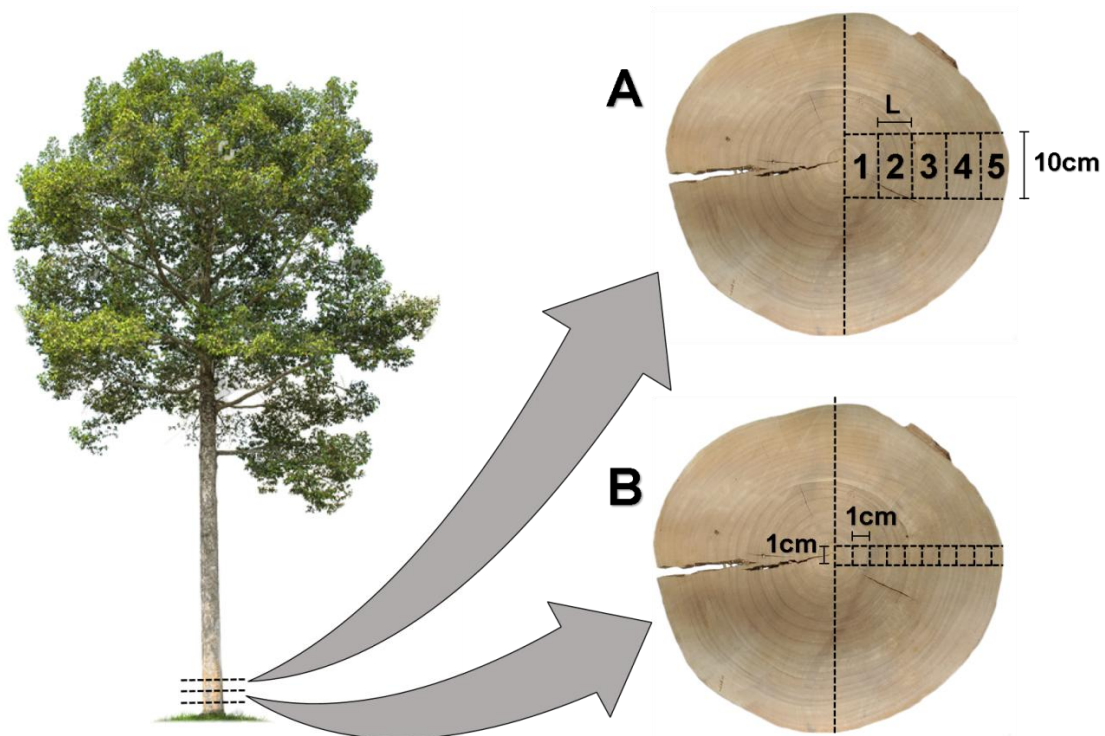
raio para o procedimento de quantificação de amido e do outro disco retiramos amostras com distância de 1 em 1cm ao longo do maior raio para as análises microscópicas (Fig. 1B).

**Tabela 1 –** Tipos de solo de cada local e estação do ano em que foi feita a coleta e características das das amostras.

Local	Estação	Árvore	Altura Total	Maior raio	Largura amostras radiais (L)
			(cm)	(cm)	(cm)
Argissolo	Inverno	1	21,6	18,0	3,60
		2	23,8	18,8	3,76
		3	19,2	16,6	3,32
		4	22,1	19,1	3,82
		5	20,5	20,0	4,00
		6	17,7	16,6	3,32
		7	19,4	17,1	3,42
		8	18,0	14,9	2,98
	Verão	1	22,0	18,0	3,60
		2	20,5	14,5	2,90
		3	22,4	18,5	3,70
		4	22,3	20,5	4,10
		5	21,2	16,3	3,26
		6	21,1	18,5	3,70
		7	20,2	14,5	2,90
		8	22,4	18,5	3,70
Latossolo	Inverno	1	22,0	13,0	2,60
		2	22,3	19,8	3,96
		3	21,0	15,5	3,10
		4	22,0	19,0	3,80
		5	21,6	18,7	3,74
		6	23,5	19,1	3,82
		7	19,5	18,1	3,62
		8	19,2	20,7	4,14
	Verão	1	19,0	15,3	3,06
		2	20,4	14,2	2,84
		3	22,2	15,7	3,14
		4	20,2	19,0	3,80
		5	22,6	22,0	4,40
		6	20,6	14,5	2,90
		7	20,0	13,3	2,66
		8	19,2	15,0	3,00



**Figura 1 –** Esquema da amostragem na direção radial dos discos. A) Amostragem para a quantificação de amido no sentido medula – casca (1 a 5). L= largura das amostras radiais; B) amostragem para as análises microscópicas a cada 1 cm a partir da medula.



### Preparo das amostras

Utilizamos amostras de madeira secas em estufa a 70°C, transformamos em cavacos, moemos em moinho de facas tipo Willey e classificamos em peneira de 200 mesh para separar a fração de pó fino de madeira sem presença de fibra evidente.

Para garantir ao máximo a precisão dos resultados no que diz respeito aos possíveis erros que podem ocorrer em análises quantitativas, como falhas ocasionais, seja do equipamento, do material utilizado, do operador ou do efeito do dia, utilizamos um padrão de referência interno (PRI) que foi preparado misturando-se uma pequena quantidade de cada uma das amostras estudadas e realizando o quarteamento repetidas vezes para redução às quantidades necessárias para as análises. Foram realizados testes iniciais com PRI isoladamente, em triplicata, por diversos dias e depois de ajustados os parâmetros e isolados os possíveis erros, o teor de amido foi analisado simultaneamente com as amostras – um PRI para cada dez amostras.

### Quantificação do teor de amido

Realizamos a quantificação seguindo o procedimento descrito em Bellasio et al. (2014). Escolhemos essa metodologia por ser atual e otimizada para melhorar a precisão e a acurácia na análise de amido em madeira. A metodologia consiste basicamente em duas hidrólises enzimáticas. Adicionamos a um tubo Falcon<sup>®</sup>: 40mg de amostra, 3ml de  $\alpha$ -amilase (*Bacillus licheniformis*) de alta pureza (E-BLAAM, Megazyme International) em solução tampão de acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 e  $\text{CaCl}_2$  5mM e uma barra magnética (8mm x 63mm) para realizar a primeira hidrólise. Incubamos os tubos por 12 minutos em água fervente num agitador magnético. Após o tempo de incubação, resfriamos os tubos para a realização da segunda hidrólise com adição de 0,15ml de amiloglicosidase (*Aspergillus niger*) de alta pureza (E-AMGDF, Megazyme international), por 45 minutos em temperatura de 50°C em banho-maria com agitador magnético. Removemos a barra magnética de cada tubo e ajustamos o volume para 10ml com adição de água destilada. Em seguida, levamos os tubos para centrifugação a 9000 giros durante 5 minutos em temperatura ambiente. Realizamos a quantificação de glicose utilizando 20 $\mu$ l do sobrenadante com adição de 580 $\mu$ l de água e 2,0ml de reagente completo para quantificação de glicose (kit PGO com adição de 1,6ml de solução de o-dianisidina – 50mg de o-dianisidina purificada em 20ml de água deionizada). Utilizamos absorbância de 530nm em espectrofotômetro e em seguida realizamos os cálculos para obtenção da porcentagem de amido (Eq. 1).

Realizamos as análises no *Department of Animal and Plant Sciences – The University of Sheffield*, Sheffield, Reino Unido.

$$\text{amido (\%)} = \frac{(A_A - A_{BA}) m_{PG} V_t 0,9}{(A_{PG} - A_{BPG}) m_A V_A} \quad (\text{Equação 2})$$

$A$  = Absorbância de A, BA, PG, BPG

$m_{PG}$  = massa de glicose adicionada a PG (20 $\mu$ l)

$V_t$  = volume total para qual os tubos foram ajustados após a digestão (10000 $\mu$ l)

$m_A$  = massa da amostra pesada em mg

$V_A$  = volume de sobrenadante usado no ensaio (20 $\mu$ l)

0,9 = converte a massa de glicose em massa de amido.

### **Análise microscópica das amostras**

Para melhor visualização e avaliação da distribuição dos grãos de amido ao longo do raio, retiramos as amostras de madeira a cada 1cm ao longo do maior raio. Realizamos o amolecimento das amostras mantendo-as por dez dias em água e glicerina (proporção 50 – 50) e as seccionamos com espessura de 15 a 20  $\mu\text{m}$  em micrótomo de deslizamento. Utilizamos o reagente lugol para observação dos grãos de amido corados com o reagente em tons escuros nas seções transversais. Analisamos os cortes anatômicos corados em microscópio de luz (AXIOSKOP II - ZEISS). Analisamos também a presença de tilos nas amostras, o que caracteriza o cerne. Contudo, é importante informar que todas as árvores amostradas passaram pelo processo de extração de látex, que quando realizado de maneira descuidada, pode causar ferimentos no câmbio vascular das árvores induzindo a formação de tilos de injúria, como mecanismo de defesa da planta. Por esse motivo, fez-se necessária uma observação mais detalhada ao longo de todo o raio das árvores para a distinção de tilos causados por injúrias e tilos característicos de morte programada das células de parênquima.

Para a análise de longevidade das células parenquimáticas, coletamos baguetas de seis árvores da região de Mococa (Argissolo), com utilização de trado manual. Seccionamos as amostras em suas faces radial e tangencial, na espessura de 15 a 20 $\mu\text{m}$ , com micrótomo de deslizamento e analisamos ao microscópio de luz (AXIOSKOP II - ZEISS). Assim como nos cortes corados com lugol, observamos presença de tilos ao longo do raio das amostras para estimar a largura de cerne e albarno. Por meio dos dados mensurados de diâmetro à altura do peito, raio e albarno calculamos, com as Equações 1 e 2, o período aproximado em que as árvores permaneceram com células parenquimáticas vivas, que pode ser assumida como a idade aproximada em que iniciou-se a morte programada das células com formação de cerne.

$$t = \frac{\text{raio}}{\text{idade}} \quad (\text{Equação 1})$$

$$\text{longevidade das células parenquimáticas} = \frac{A}{x} \quad (\text{Equação 2})$$

$t$  = taxa de crescimento médio da árvore ( $\text{cm.ano}^{-1}$ )

$\text{raio}$  = raio da árvore (cm)

*idade*= idade real das árvores (anos)

*A*= largura do alburno das árvores (cm)

*longevidade das células parenquimáticas*= duração da vida das células de parênquima (anos)

### **Análise dos resultados**

Para avaliar quantitativamente o amido ao longo do raio de cada árvore, considerando a estrutura fatorial com dois locais de coleta e duas épocas do ano, utilizamos modelos lineares generalizados com distribuição de probabilidade gama e função de ligação logarítmica (Nelder and Wedderburn 1972). Avaliamos a qualidade do ajuste por meio da análise da função desvio e o teste *LSmeans* para comparações entre os níveis dos fatores.

Analizamos qualitativamente a presença dos grãos de amido e presença de tilos comuns (para caracterização de cerne) em microscópio de luz ao longo do raio das amostras.

## **RESULTADOS**

### **Quantificação do teor de amido**

O teor de amido que encontramos nas amostras variou de 6,2% a 17,5% (Tab. 2), apresentando um padrão de distribuição na direção radial bem definido de aumento da porcentagem de amido até a amostra radial 4 seguido de diminuição na amostra radial 5, mais próxima a casca.

Comparando-se o teor de amido nas duas estações do ano, observamos uma maior porcentagem nas árvores coletadas no inverno ao longo de todo o raio para os dois locais de coleta (Fig. 2). A média do teor de amido no inverno, considerando-se os dois locais foi de 13,1% e no verão 11,9%.

Quando comparamos a porcentagem de amido entre os locais de coleta, o local com Latossolo apresentou maior porcentagem de amido em toda direção radial, nas duas estações do ano (Fig. 3). A média do teor de amido, considerando-se as duas estações, foi de 13,5% no Latossolo e 11,5% no Argissolo.

O Latossolo de textura argilosa apresenta fertilidade química favorável e boas propriedades físicas, enquanto o Argissolo de textura argilosa, apesar da elevada capacidade de armazenamento de água, pode apresentar limitações no aspecto

físico relacionadas à pouca profundidade e presença de cascalhos ou calhaus em superfície (IAC/APTA 2015).

Nota-se que o desvio padrão encontrado para todas as amostras foi baixo, mostrando boa precisão do procedimento de mensuração do amido e, como consequência, maior confiabilidade dos resultados obtidos.

**Tabela 2** – Teor de amido obtidos nas amostras radiais.

Local	Estação	Amostras radiais				
		1	2	3	4	5
Argissolo	Inverno	7,5 <sup>dAβ</sup>	11,3 <sup>cAβ</sup>	13,6 <sup>bAβ</sup>	16,3 <sup>aAβ</sup>	11,5 <sup>cAβ</sup>
		** (0,28)	(0,36)	(0,23)	(0,27)	(0,38)
	Verão	6,2 <sup>eBβ</sup>	9,6 <sup>dBβ</sup>	12,8 <sup>bBβ</sup>	15,6 <sup>aBβ</sup>	10,6 <sup>cBβ</sup>
		(0,30)	(0,26)	(0,41)	(0,18)	(0,27)
Latossolo	Inverno	9,7 <sup>dAα</sup>	13,7 <sup>cAα</sup>	15,4 <sup>bAα</sup>	17,5 <sup>aAα</sup>	14,0 <sup>cAα</sup>
		(0,26)	(0,31)	(0,39)	(0,22)	(0,34)
	Verão	8,7 <sup>dBα</sup>	12,5 <sup>cBα</sup>	14,3 <sup>bBα</sup>	16,3 <sup>aBα</sup>	12,4 <sup>cBα</sup>
		(0,19)	(0,40)	(0,31)	(0,41)	(0,33)
		(2,18)	(3,20)	(2,17)	(2,52)	(2,66)

\*Média

\*\*Desvio Padrão

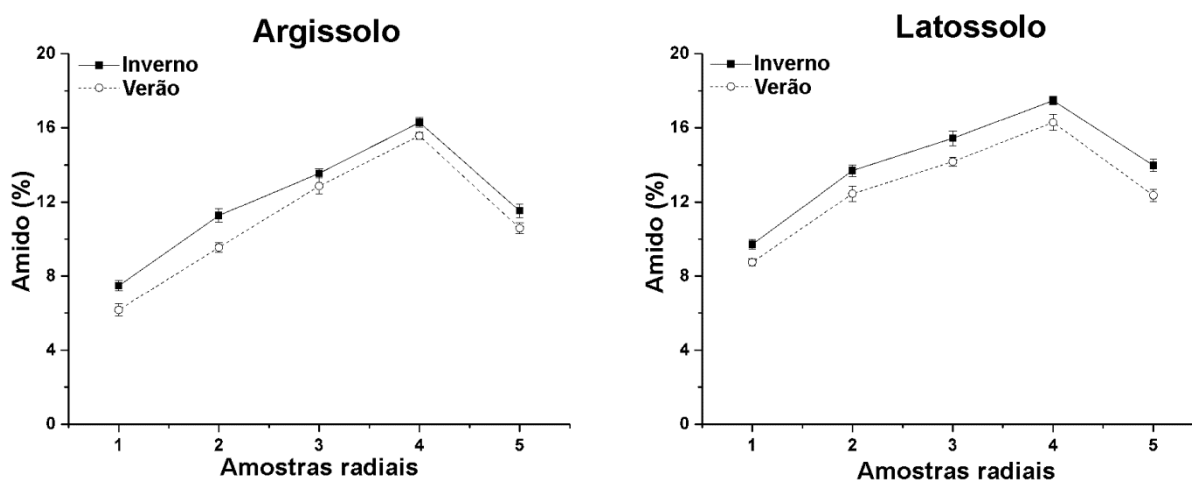
\*\*\* Coeficiente de Variação

Letras minúsculas – comparação das amostras radiais, de acordo com o sítio e a estação

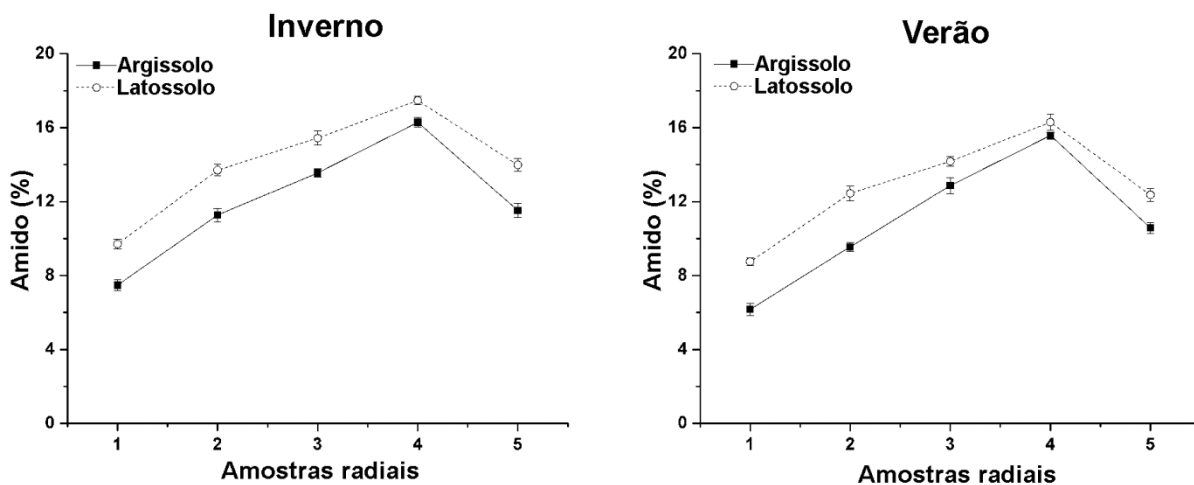
Letras maiúsculas – comparação das estações, de acordo com o local e amostras radiais

Letras gregas – comparação dos locais, de acordo com a estação e amostras radiais

**Figura 2** – Porcentagem de amido das amostras radiais dos discos segundo as estações.



**Figura 3** – Porcentagem de amido das amostras radiais dos discos segundo os locais de coleta.



### Análise microscópica das amostras

Nos cortes transversais corados com lugol, observamos a presença de grande quantidade de grãos de amido em toda direção radial (Fig. 4) de todas as amostras analisadas. As imagens ilustradas na Fig. 4 foram selecionadas a cada 2cm de uma árvore com 18cm de raio.

Observamos os tilos a partir da medula em um raio médio de 2,0 a 3,3cm o que representa é a largura do cerne. O alburno varia de 6,5 a 12,0cm. Também observamos tilos de injúria, causados possivelmente pelo processo de extração de látex, com ocorrência pontual e, na região mais próxima ao câmbio vascular.

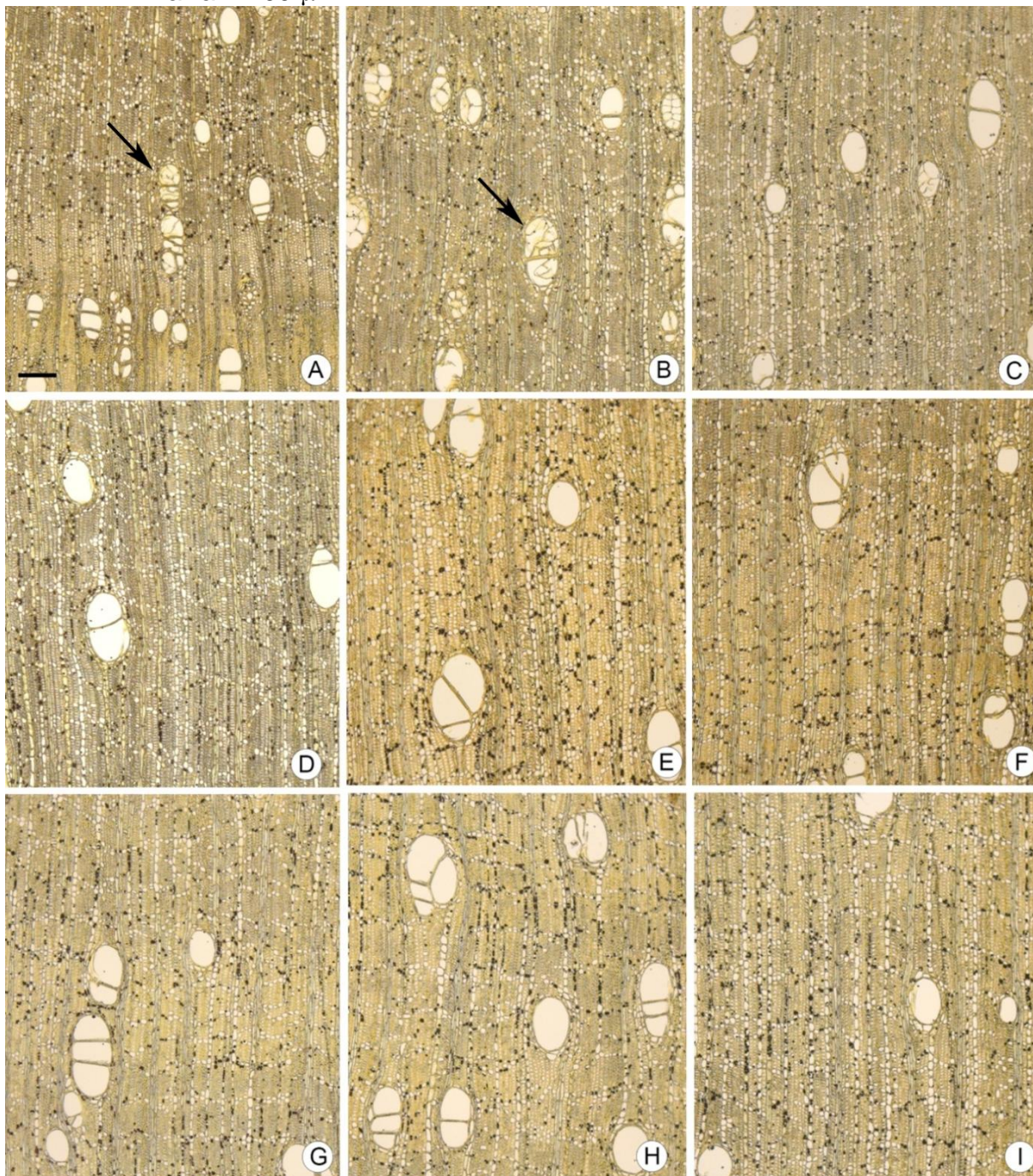
Por meio dos cálculos da longevidade das células parenquimáticas realizados nas baguetas constatamos que as árvores analisadas apresentam células parenquimáticas vivas por 18 a 21 anos (Tab. 3).

**Tabela 3** – Dados de raio, cerne e alburno e resultado dos cálculos da idade aproximada em que as árvores iniciaram o processo de formação de cerne. \*árvores coletadas em Argissolo.

Árvore*	Raio	Cerne (cm)	Alburno	Longevidade aproximada das células do parênquima
				(anos)
1	14,5	2,5	12,0	21
2	11,0	2,4	8,6	20
3	15,3	3,3	12,0	20
4	13,0	2,0	11,0	21
5	14,5	3,1	11,4	20
6	9,0	2,5	6,5	18



**Figura 4** – Grãos de amido ao longo do raio em seções transversais das amostras de uma árvore em Argissolo, coletada no verão. A é amostra próxima à medula e I próxima ao câmbio vascular. As setas apontam vasos preenchidos por tilos. Todas as imagens estão no mesmo aumento. Barra = 200  $\mu\text{m}$ .



## DISCUSSÃO

Nesse estudo identificamos a presença de grãos de amido no cerne de árvores de *Hevea brasiliensis* e a longevidade média do alburno que foi de 20 anos.

Encontramos grande quantidade de amido em todas as amostras analisadas, na direção radial. Grandes quantidades de amido no lenho de *H. brasiliensis* têm sido reportadas por diversos autores que relacionam a presença deste carboidrato à menor resistência natural desta madeira (Kadir and Sudin 1989, Hong et al. 1994, Hong 1995, Santana and Eiras 1999, Killmann and Hong 2000, Silpi et al. 2007, Milingliang and Zhijuan 2008, Tamolang 2008, Chantuma et al. 2009, Teoh et al. 2011).

Neste estudo encontramos valores de porcentagem de amido maiores do que os valores relatados por outros autores, 7,5 – 10,2% (Kadir e Sudin 1989), 3,9 – 5,8% (Silpi et al. 2007), ~ 5,5 – 6,5% (Chantuma et al. 2009) e 3,3 – 7,2% (Servolo Filho 2013). Contudo, vale ressaltar que em nenhum destes trabalhos foi estudada a distribuição radial do amido, sobretudo na região central da árvore, composta por cerne, dependendo da idade das árvores amostradas. Os valores encontrados pelos autores se assemelham aos valores que encontramos para o cerne (6,2 – 9,7%). Os valores que encontramos para o alburno foram ainda maiores. Diversos fatores como local de crescimento das árvores, idade das árvores, período fenológico e estação no momento da coleta, posição de amostragem, técnicas de pré-processamento das amostras e metodologia de quantificação de amido podem ter causado essas diferenças de valores nos resultados (Tab. 4).



**Tabela 4 –** Trabalhos que reportam o teor de amido na madeira de *H. brasiliensis*.

Características do estudo	Autores				
	Presente estudo	Kadir e Sudin (1989)	Silpi et al. (2007)	Chantuma et al. (2009)	Servolo Filho (2013)
<b>Local</b>	Brasil	Malásia	Tailândia	Tailândia	Brasil
<b>Idade (anos)</b>	25	25	9	8	26
<b>CAP (cm)</b>	74 - 130	43 - 77	46 - 53	46 - 53	60 - 72
<b>Período fenológico e estação</b>	DS+WOL RS+WWL+FRU	DS + VFL	DS+BRGP	DS+REGR	WOL
			RS+RAGR	RS+MAL+BRGP	WWL
			DS+WOL+WORA	DS+HRAG	
			DS+ EREG+WORA	DS+LRAG	
<b>Posição de amostragem</b>	Base da árvore	6 alturas ao longo do tronco	5 alturas ao longo do tronco	7 alturas ao longo do tronco	Não especificado
<b>Pré-processamento da amostra</b>	Secas à 70°C	Amostras frescas	Secas à 65°C por 2 horas	Secas à 65°C por 2 horas	Secas até 12% de umidade
<b>Metodologia de Hidrólise</b>	$\alpha$ -amilase amiloglicosidase (Bellasio et al. 2014)	HClO <sub>4</sub> (Humphreys; Kelly 1961)	NaOH $\alpha$ -amiloglicosidase	NaOH $\alpha$ -amiloglicosidase (Boehringer 1984)	$\alpha$ -amilase amiloglicosidase (Rickard; Behn 1987)
<b>% amido</b>	6,2 – 17,5	7,5 – 10,2	3,9 – 5,8	~ 5,5 – 6,5%	3,3 – 7,2
<b>Legenda</b>	DS - estação seca	WOL - sem folhas	BRGP - início do período de crescimento radial		
	RS - estação chuvosa	WWL - com folhas	RAGR - crescimento radial		
		VFL - muito poucas folhas	WORA - sem crescimento radial		
		FEL - poucas folhas	REGR - brotação		
		FAL - queda de folhas	EREG - final da brotação		
		MAL - folhas maduras	HRAG - alto crescimento radial		
		FRU - frutos	LRAG - baixo crescimento radial		

Embora alguns autores relatem ausência de material de armazenamento no cerne (Eades 1937, Fahn and Arnon 1962, IAWA Committee 1964, Bamber and Fukazawa 1985, Hillis 1987, Saranpää and Höll 1989, Magel et al. 1994, Magel 2000, Höll 2000, Taylor et al 2002, Dehon et al. 2002, Bergstöm 2003, Pallardy 2008, Nakada and Fukatsu 2012) e outros que as concentrações de amido no cerne são insignificantes (Bamber 1987, Fisher and Höll 1992, Höll 2000), pois a morte das células parenquimáticas é acompanhada pela depleção de amido em direção à zona de transição para o cerne (Hoch et al. 2003, Kampe and Magel 2013), neste estudo, encontramos uma quantidade considerável de amido no cerne de *H. brasiliensis*. A porcentagem de amido variou de 6 a 18% nas amostras, sendo as menores porcentagens (6 a 10%) no cerne e as maiores no alburno, de 16 a 18% nas porções internas e de 11 a 14% na porção mais próxima da casca. Com os resultados que obtivemos nesse estudo, podemos afirmar que a distinção entre cerne e alburno em *H. brasiliensis* não deve ser baseada na presença de amido, mas sim na morte das células do parênquima.

O amido armazenado nas células de parênquima do xilema secundário tem um papel importante para o funcionamento da árvore, já que estes podem ser hidrolisados em açúcares solúveis para serem translocados a partes da árvore que necessitem desses açúcares para o crescimento e podem ser usados quando os fotossintatos produzidos não atendem às necessidades de carbono para sua manutenção e crescimento (Glerum 1980, Kozlowski 1992, Lacoite et al. 1993, 1995, Witt and Sauter 1994, Barbaroux and Bréda 2002, Hoch et al. 2003, Silpi et al. 2007). Nas espécies decíduas, o amido é a única fonte de carboidratos durante o período de brotação (Lacoite et al. 1993, Barbaroux and Bréda 2002), o que se aplica à espécie deste estudo, *H. brasiliensis*. No presente estudo, observamos que a porcentagem de amido diminui na porção mais externa do alburno. O declínio da porcentagem de amido próximo à casca sugere seu consumo na atividade do câmbio vascular para o crescimento radial. O amido que está mais próximo ao câmbio vascular é o mais prontamente disponível.

O teor de amido, quando avaliado em duas estações do ano, foi maior durante o inverno ao longo de todo o raio nos dois locais de coleta, indicando um padrão consistente em relação às mudanças sazonais. Nossos resultados são similares aos resultados relatados para árvores decíduas em que a concentração de carboidratos totais diminui acentuadamente após a rebrota, indicando mobilização para

incorporação direta em novos brotos, incluindo folhas e flores (Lacointe et al. 1993, Witt and Sauter 1994, Barbaroux et al. 2003) ou para sustentar a respiração no aumento do crescimento (Lacointe et al. 1993). O aumento de amido no inverno mostra que as árvores tendem a adaptar seu nível de reservas de carboidratos às necessidades atuais de manutenção, crescimento e reprodução. O estresse hídrico causado pelos curtos períodos de chuva durante o inverno provavelmente limita a assimilação de carbono, o que leva a planta a utilizar os compostos já assimilados na forma de reservas no período de rebrota. Em estudo com lâminas foliares de seringueira, Lima et al. (2002) observaram que durante a estação mais fria e seca, devido à baixa disponibilidade de água, a translocação de compostos assimilados é reduzida, causando possivelmente o armazenamento do carbono assimilado na forma de amido. De acordo com teoria atual para respostas das plantas ao déficit hídrico, o fechamento dos estômatos durante a seca reduz a captação de carbono, o que leva as árvores à dependência das reservas de carboidratos, ligando assim a capacidade de uma árvore em mobilizar e usar o carboidrato armazenado como fonte de atividade metabólica, defesa contra patógenos e osmorregulação diretamente à sobrevivência das árvores (McDowell et al. 2008, McDowell 2011). No entanto, a seca também diminui o potencial hídrico da planta e o turgor celular necessário para a expansão celular após a mitose, o que leva a uma redução concomitante na demanda de carboidrato para o crescimento. Como o crescimento declina antes que a fotossíntese, durante o déficit hídrico, as reservas de carboidratos podem aumentar nas fases iniciais de seca (Muller et al. 2011).

Nossos resultados corroboram os encontrados por Silpi et al. (2007) e Chantuma et al. (2009) que também registraram maior concentração de carboidratos reserva no período de queda das folhas (inverno), seguida por uma grande depleção logo após a rebrota.

Quando comparados os dois locais de coleta nossos resultados mostram maiores porcentagens de amido no local com Latossolo, em toda direção radial, nas duas estações do ano. A seringueira se desenvolve melhor em Latossolos (Cunha et al. 2000, Carmo and Figueiredo 1985) do que em Argissolos, devido ao horizonte subsuperficial do Argissolo que dificulta o desenvolvimento das raízes, sua profundidade, são mais rasos, apresentam geralmente relevo mais acidentado e uma superfície com menor uniformidade, com maiores problemas de disponibilidade de água e de erosão (Carmo and Figueiredo 1985). Sendo assim, a espécie tem

melhor capacidade de crescimento das árvores em Latossolo e, de acordo com De Fay (1999), um crescimento radial estável pode ser benéfico para o acúmulo de amido na madeira, pois os tecidos recém-formados têm uma alta proporção de parênquima, fornecendo “espaço para armazenamento” (Wargo 1979, Lacoïnte et al. 1993, Lacoïnte 2000).

Distinguimos o cerne do alburno em *H. brasiliensis* por meio da presença de tilos comuns que é indicadora da morte programada da célula parenquimática e, portanto, formação do cerne (Chattaway 1949, Chattaway 1952, Trendelenburg 1955, Dadswell and Hillis 1962, Jorgensen 1962, Stewart 1966, Bamber 1976, Hillis 1987, Taylor et al. 2002, Spicer 2005, Pallardy 2008). Constatamos que a morte programada das células de parênquima com consequente formação de cerne se inicia entre 18 e 21 anos de idade das árvores em *H. brasiliensis* deste estudo. Poucos são os estudos sobre longevidade do alburno em espécies arbóreas e, segundo Spicer (2005), existe grande variação no período de tempo em que o alburno permanece vivo entre as espécies, podendo variar de apenas dois anos em *Quercus rubra* (angiosperma) a mais de 150 anos em *Pinus ponderosa* (conífera). A mesma autora afirma que não se sabe até que ponto os padrões radiais de morte celular são característicos de uma espécie, como eles variam dentro de uma árvore ou como mudam com o ambiente. Para estudos de longevidade do alburno, uma melhor compreensão do processo de morte celular das células parenquimáticas e a comparação da morte celular associada à formação do cerne nas diferentes espécies se faz necessária.

## CONCLUSÃO

Concluimos que *H. brasiliensis* apresenta acúmulo de grande quantidade de amido no lenho, do cerne ao alburno, sendo as maiores porcentagens encontradas no alburno; houve um declínio da porcentagem de amido no alburno mais externo (região mais próxima à casca) sugerindo seu consumo pela atividade do câmbio vascular para o crescimento radial; a maior quantidade de amido, em todo o lenho, ocorre no período que as árvores estão sem folhas, no inverno; a maior quantidade de amido em todo o lenho ocorre nas árvores que cresceram em Latossolo; e a longevidade do alburno foi de aproximadamente 20 anos. Podemos afirmar que não devemos utilizar a ausência de grãos de amido para caracterizar o cerne em *H. brasiliensis*.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de doutorado concedida e pela bolsa de estudos concedida no Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior – PDSE (Processo – 88881.136044/2017 – 01); à *The University of Sheffield* pela concessão dos laboratórios; ao laboratório de Anatomia da Madeira – Univ. Estadual Paulista (UNESP) em nome da Professora Carmen Marcati pela assistência nas análises microscópicas e à APTA Regional Nordeste Paulista e APTA Regional Centro Oeste pelas árvores fornecidas para o estudo.

## REFERÊNCIAS

BAMBER RK (1976). **Heartwood, its function and formation**. Wood Science and Technology, Germany. v.10, n.1, p. 1-8.

BAMBER RK (1987). **Sapwood and heartwood**. NSW Department of Primary Industries. Science and Research Division. Forest Resources Research. Technical Papers v. 2 1-7.

BAMBER RK; FUKAZAWA K (1985). Sapwood and heartwood: A review. **Forestry Abstracts, Nature**, United Kingdom . v. 46 p.567-580.

BARBAROUX C et al. (2003). Distribution of aboveground and below-ground carbohydrate reserves in adult trees of two contrasting broad-leaved species (*Quercus petraea* and *Fagus sylvatica*). **New Phytologist**, United Kingdom, v.157, p.605–615.

BARBAROUX C; BRÉDA N (2002). Contrasting distribution and seasonal dynamics of carbohydrate reserves in stem wood of adult-ring porous sessile oak and diffuse-porous beech trees. **Tree Physiology**, United Kingdom, v.22, p.1201–1210.

BELLASIO C.; FINI A.; FERRINI F (2014). Evaluation of a high throughput starch analysis optimised for wood. **PLoS ONE**, United States, v.9, n. 2: e86645.

BERGSTRÖM B (2003) Chemical and structural changes during heartwood formation in *Pinus sylvestris*. **Forestry**, United Kingdom, v.76, p.45–53.

CARMO DN; FIGUEIREDO MS (1985). **Solos para seringueira: manejo e conservação**. Informe Agropecuário, v.11, p.13-17.

CEPAGRI – **Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura**. Disponível em: <<https://orion.cpa.unicamp.br/index.html>>. Acesso em Ago. 2018.

CHANTUMA et al. (2009). Carbohydrate storage in wood and bark of rubber trees submitted to different level of C demand induced by latex tapping. **Tree Physiology**, United Kingdom, v. 29 p.1021-1031.

CHAPIN FS et al. (1990). The ecology and economics of storage in plants. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, United States, v.21, p.423–447.

CHATTAWAY MM (1949). The development of tyloses and secretion of gum in heartwood formation. **Australian Journal of Scientific Research**, Series B: Biological Sciences, Australia, v. 2, p. 227-240.

CHATTAWAY MM (1952). The sapwood-heartwood transition. **Australian Forestry**, United Kingdom, v.16, p. 25-34.

CUNHA TJJ et al. (2000). Influência da diferenciação pedológica no desenvolvimento da seringueira no município de Oratórios, MG. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.145-155.

DADSWELL HE; HILLIS WE (1962). Wood. In: HILLIS WE (Ed.). **Wood extractives**. Academic Press, New York and London. p. 3-55.

DE FAY E (1999). Rhythmic cambial growth and its relationships with apical rhythmic growth in *Hevea brasiliensis*, *Theobroma cacao* and *Terminalia superba* under natural cultivation conditions. Ph.D. Thesis. University of Nancy, França. 485 p.

DEHON L, MACHEIX JJ, DURAND M (2002). Involvement of peroxidases in the formation of the brown coloration of heartwood in *Juglans nigra*. **Journal of Experimental Botany**, United Kingdom, v.53, p.303-311.

DICKSON RE (1989). Carbon and nitrogen allocation in trees. **Annals of Forest Science**, Germany, v.46, p.631–647.

EADES HW (1937). Iodine as an indicator of sapwood and heartwood. **The Forestry Chronicle**, Canada. v.13, n.3, p. 470-477.

- FAHN A; ARNON N (1962). The living wood fibres of *Tamarix aphylla* and the changes occurring in them in transition from sapwood to heartwood. **New Phytologist**, United Kingdom, v.62, n.1, p.99-104.
- FISHER C; HÖLL W (1992). Food reserves of scots pine (*Pinus sylvestris* L.) II. Seasonal changes and radial distribution of carbohydrate and fall reserves in pine wood. **Trees**, Germany, v.6, p.147-155.
- GIOVANNELLI A et al. (2011). Sampling cambial region and mature xylem for non-structural carbohydrates and starch analyses. **Dendrochronologia**, Germany, v.29, p.177–182.
- GLERUM C (1980). Food sinks and food reserves of trees in temperate climates. **New Zealand Journal of Forest Science**, United States, v.1, p.176–185.
- GONÇALVES P et al (1997). **Melhoramento Genético da Seringueira: Uma revisão**, Documentos IAC. 55p.
- GONÇALVES P et al. (1989). Biologia, citogenética e ploidia de espécies do gênero Hevea. **O Agrônômico**, v.41, p.40-64.
- HARTMANN; TRUMBORE (2016). Understanding the roles of nonstructural carbohydrates in forest trees – from what we can measure to what we want to know. **New Phytologist**, United Kingdom, p.1–18.
- HILLIS WE (1987). **Heartwood and tree exudates**. Berlin: Springer-Verlag, 268 p.
- HOCH G et al. (2003). Non-structural carbon compounds in temperate forest trees. **Plant Cell & Environment**, United Kingdom, v.26, p.1067–1081.
- HÖLL W (2000). Distribution, fluctuation and metabolism of food reserves in the wood of trees. In: **Cell & Molecular Biology of Wood Formation**. SAVIDGE R; BARNETT J; NAPIER R (eds.) BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford. p.347-362.
- HONG LT (1995). **Rubberwood utilization: a success story**. Paper presented at the XX International Union of Forestry Research Organizations (IUFRO) World Congress, Tampere, Finland, 6-12 August 1995.

HONG LT et al (1994). Durability of rubberwood. In: Hong LT; Lim SC (eds.). **Rubberwood processing and utilization**. Kuala Lumpur: Forest Research Institute of Malaysia. p.37–50.

IAC– Instituto Agrônomo de Campinas; APTA – Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios. **Solos do Estado de São Paulo**. Disponível em: <https://www.iac.sp.gov.br/solosp/>. Acesso em 22 de agosto de 2018.

IAWA Committee on Nomenclature (1964). **Multilingual Glossary of Terms used in Describing Wood Anatomy**. Winterthur: Konkordia.

IBA– Indústria Brasileira de Árvores (Brazilian tree industry) (2017). **Relatório 2017**. 80p.

IPMet – **Instituto de Pesquisas Meteorológicas**. Faculdade de Ciências Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Bauru. Disponível em: <https://www.ipmet.unesp.br/>. Acesso em 22 de agosto de 2018.

JORGENSEN E (1962). Observations on the formation of protection wood. **Forestry Chronicle**, Canada, v.38, p. 292-294.

KADIR AA; SUDIN R (1989). Carbohydrates in rubberwood (*Hevea brasiliensis* Muell.). **Holzforschung**, Áustria, v.43, n.3, p.173-178.

KAMPE A; MAGEL E (2013). New insights into heartwood and heartwood formation. In: **Cellular aspects of wood formation. Plant cell monographs**. FROMM J (ed.). Berlin: Springer-Verlag. p. 71–95.

KILLMANN W; HONG LT. (2000). Rubberwood – the success of an agricultural by-product. **Unasylva**, Itália, v.51, n.2, p. 66–72.

KOZLOWSKI TT (1992). Carbohydrate sources and sinks in woody plants. **Botanical Review**, United States, v.58, p.107–222.

LACOINTE A et al. (1993). Mobilization of carbon reserves in young walnut trees. **Acta Botanica Gallica**, France, v.140, p.435–441.

LACOINTE A et al. (1995). Carbohydrate and protein reserves in trees. In: **Contribution to Forest Tree Physiology**. EUROSILVA (Les Colloques, No. 76).



SANDERMANN H.; BONNET-MASIMBERT M (eds.). INRA-Editions, Paris, pp 273–296.

LACOINTE A. (2000). Carbon allocation among tree organs: a review of basic processes and representation in functional structural tree models. **Annals of Forest Science**, Germany, v.58, p.521–533.

LIMA, D.U et al. (2002). Avaliação sazonal da produção de borracha e da dinâmica de carboidratos solúveis em plantas de seringueira (*Hevea brasiliensis* Mull Arg.) cultivadas em Lavras, Minas Gerais. **Revista Árvore**, Viçosa, v.26, n.3, p.377-383.

MAGEL EA (2000) Biochemistry and physiology of heartwood formation. In: **Cell and molecular biology of wood formation**. SAVIDGE R, BARNETT J, NAPIER R (eds.), p. 363–376. BIOS Scientific Publishers, Oxford.

MAGEL EA et al (1994). Formation of heartwood substances in the stemwood of *Robinia pseudoacacia* L II. Distribution of nonstructural carbohydrates and wood extractives across the trunk. **Trees**, Germany. v. 8. p.165-171.

MCDOWELL N et al (2008). Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? **New Phytologist**, United Kingdom, v.178, p.719–739.

MCDOWELL NG (2011). Mechanisms linking drought, hydraulics, carbon metabolism, and vegetation mortality. **Plant Physiology**, United Kingdom, v.155, p.1051–1059.

MILINGLIANG J; ZHIJUAN W (2008). Rubberwood preservation by friendly preservatives. In: **Proceedings of the ITTO/CFC International Rubberwood Workshop**. ZHAO Y (ed.), Haikou, China. p. 117-128.

MULLER B et al (2011). Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. **Journal of Experimental Botany**, United Kingdom, v.62, p.1715–1729.

NAKADA R; FUKATSU E (2012). Seasonal variation of heartwood formation in *Larix kaempferi*. **Tree Physiology**, United Kingdom, v. 32, n. 1, p. 1497-1508.

NELDER J; WEDDERBURN RWM (1972). Generalized Linear Models. **Journal of the Royal Statistical Society: A**, United Kingdom, v.135, p.370-384.

PALLARDY, S.G (2008). **Physiology of woody plants**. 3.ed. San Diego: Elsevier/Academic. 454p.

RYAN MG (2011). Tree responses to drought. **Tree Physiology**, United Kingdom, v. 31, p.237–239.

SALA A et al (2011). Carbon storage in trees: does relative carbon supply decrease with tree size? In: **Size and age-related changes in tree structure and function**. MEINZER FC, LACHENBRUCH B, DAWSON TE (eds.), Springer, Heidelberg, p. 287–306.

SALA A et al (2012). Carbon dynamics in trees: feast or famine? **Tree Physiology**, United Kingdom, v.32, p.764–775.

SANTANA MAE; EIRAS KMM (1999). Madeira de *Hevea brasiliensis*: adequação tecnológica para a sua utilização. Brasília, DF: Laboratório de Produtos Florestais do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 90 p. Não publicado.

SARANPÄÄ P; HÖLL W (1989). Soluble carbohydrates of *Pinus sylvestris* L. sapwood and heartwood. **Trees**, Germany, v.3, p.138-143.

SERVOLO FILHO, H.J (2013). Propriedades mecânicas da madeira de clones de seringueira (*Hevea brasiliensis*- RRIM 600 e GT 1) analisadas em duas épocas do seu ciclo fenológico anual. Tese (Doutorado em Ciências, Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 90p.

SILPI et al (2007). Carbohydrate reserves as a competing sink: evidence from tapping rubber trees. **Tree Physiology**, United Kingdom, v. 27, p.881-889.

SPICER R (2005). Senescence in secondary xylem: heartwood formation as an active developmental program. In: **Vascular transport in plants**. HOLBROOK NM; ZWIENIECKI MA (eds). Elsevier Academic Press. p. 457-475.

STEWART MC (1966). Excretion and heartwood formation in living trees. **Science**, United States, v.153, p.068-1074.

TAMOLANG FB (2008). Status of rubberwood processing and utilization in the Philippines. In: **Proceedings of the ITTO/CFC International Rubberwood Workshop**. ZHAO Y (ed.) Haikou, China. p. 83-98

TAYLOR AM; GATNER BL; MORRELL JJ (2002). Heartwood formation and natural durability – a review. **Wood and Fiber Science**, United States. v. 34, n. 4, p. 587-611.

TEOH PY, DON MM, UJANG S (2011). Assessment of the properties, utilization, and preservation of rubberwood (*Hevea brasiliensis*): A case study in Malaysia. **Journal of Wood Science**, Germany, v.57, p. 255–266.

TRENDELENBURG R; MAYER-WEGELIN H (1955). **Das Holz als Rohstoff** (Wood as raw material), Hanser Verlag, Germany. 541 pp.

VIEIRA MR et al. (2010). Redução na produção de látex da seringueira provocada pela infestação de ácaros. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 57, n. 5, p. 608-613.

WARGO PM (1976). Variation of starch content among and within roots of red and white oak trees. **Forest Science**, United States, v.22, p.468–471.

WILEY E; HELLIKER B (2012). A re-evaluation of carbon storage in trees lends greater support for carbon limitation to growth. **New Phytologist**, United Kingdom, v.195, p.285–289.

WITT W; SAUTER JJ (1994). Starch metabolism in poplar wood ray cells during spring mobilization and summer deposition. **Physiologia Plantarum**, United Kingdom, v.92, p.9–16.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante esta tese foram analisados alguns aspectos relativos ao teor de amido em madeira de seringueira. A tese foi dividida em dois capítulos, sendo um de maior enfoque metodológico e outro de estrutura, função e distribuição do amido na espécie estudada.

No Capítulo 1, levando em consideração a problemática envolvida na escolha e implementação de um método apropriado para a quantificação de amido em madeira, estudamos dois protocolos com diferentes técnicas de hidrólise do amido levando em conta as características diferenciais de cada espécie, como tempo gasto nas análises, facilidade de execução, custos por amostra, periculosidade e confiabilidade dos resultados. Ambos os protocolos mostraram boa precisão dos resultados, apresentando baixo coeficiente de variação nas medições, mas o teor de amido foi significativamente maior no protocolo 1, que se apresenta mais vantajoso em termos de tempo, facilidade de execução e custo de análise, podendo ser utilizado a nível de comparação de resultados, pois se mostrou sensível o suficiente para detecção de diferenças entre as amostras radiais estudadas. Entretanto, a periculosidade do protocolo 1 é maior devido a instabilidade do ácido perclórico, que pode sofrer decomposição de forma explosiva, devendo ser manuseado com os equipamentos de segurança adequados. A acurácia dos valores obtidos pelos protocolos não pôde ser avaliada diretamente, uma vez que não se encontra um valor padrão exato de porcentagem de amido na madeira de seringueira em diferentes amostras radiais. Isso nos leva a sugerir à empresas produtoras de seringueira e à laboratórios de pesquisa com madeira o protocolo 1, quando o objetivo da análise for a comparação entre resultados, e o protocolo 2, quando o objetivo for uma quantificação de amido com maior exatidão, devido à maior seletividade do amido pelas enzimas.

No Capítulo 2 estudamos a distribuição radial do teor de amido em diferentes estações do ano e diferentes locais de plantio e, adicionalmente, estimamos a longevidade do alburno dessa espécie. O estudo da longevidade do alburno nas árvores amostradas foi de extrema importância para que pudéssemos afirmar a presença de cerne nessa espécie, a despeito do grande teor de amido encontrado na parte central das árvores. Os resultados mostram que a madeira de seringueira possui grande acúmulo de amido do alburno até o cerne, sendo as maiores

porcentagens encontradas no alburno com um declínio da porcentagem de amido no alburno mais externo (região mais próxima à casca) sugerindo seu consumo atividade do câmbio vascular para o crescimento radial. As árvores amostradas no inverno, apresentaram maior quantidade de amido, em toda direção radial, nos dois locais de plantio estudados, sendo o maior teor de amido encontrado nas árvores que cresceram em Latossolo. O estudo da longevidade do alburno nos mostrou que as árvores de 25 anos amostradas começaram a produzir cerne com aproximadamente 20 anos, e que o cerne dessa espécie apresenta amido, portanto, podemos afirmar que não devemos utilizar a ausência de grânulos de amido para caracterizar o cerne em *H. brasiliensis*.



## REFERÊNCIAS INTRODUÇÃO GERAL

- BALSIGER J, BAHDON J, WHITEMAN A (2000) Asia-pacific forestry sector outlook study: the utilization, processing and demand for rubberwood as a source of wood supply. **FAO**, Italy.
- BAMBER RK (1987). **Sapwood and heartwood**. NSW Department of Primary Industries. Science and Research Division. Forest Resources Research. Technical Papers v. 2 1-7.
- BAMBER RK; FUKAZAWA K (1985). Sapwood and heartwood: A review. **Forestry Abstracts, Nature**, United Kingdom . v. 46 p.567-580.
- BELLASIO C, FINI A, FERRINI F (2014). Evaluation of a high throughput starch analysis optimised for wood. **PLoS ONE**, United States, v.9, n. 2: e86645.
- BERGSTRÖM B (2003) Chemical and structural changes during heartwood formation in *Pinus sylvestris*. **Forestry**, United Kingdom, v.76, p.45–53.
- BRAGA C (2015). **Indicadores econômicos da produção de borracha natural no Brasil**. CNA BRASIL. Disponível em: <[http://portal-integrado.cna.hom.dotgroup.com.br/assets/arquivos/artigostecnicos/artigo-07\\_0.91037400%201514912077.pdf](http://portal-integrado.cna.hom.dotgroup.com.br/assets/arquivos/artigostecnicos/artigo-07_0.91037400%201514912077.pdf)>Acesso em: Setembro 2018.
- CHAPIN FS et al. (1990). The ecology and economics of storage in plants. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, United States, v.21, p.423–447.
- CHOW PS and LANDHÄUSSER SM (2004). A method for routine measurements of total sugar and starch content in woody plant tissues. **Tree Physiology**, United Kingdom, v.24, p.1129 –1136.
- DEHON L, MACHEIX JJ, DURAND M (2002). Involvement of peroxidases in the formation of the brown coloration of heartwood in *Juglans nigra*. **Journal of Experimental Botany**, United Kingdom, v.53, p.303-311.
- EADES HW (1937). Iodine as an indicator of sapwood and heartwood. **The Forestry Chronicle**, Canada. v.13, n.3, p. 470-477.

EUFRADE JÚNIOR HJ et al. (2015). Potential of rubberwood (*H. brasiliensis*) for structural use after the period of latex extraction: a case of study in Brazil. **Journal of Wood Science**, Germany, v.61, p.384-390.

FAHN A; ARNON N (1962). The living wood fibres of *Tamarix aphylla* and the changes occurring in them in transition from sapwood to heartwood. **New Phytologist**, United Kingdom, v.62, n.1, p.99-104.

FISHER C; HÖLL W (1992). Food reserves of scots pine (*Pinus sylvestris* L.) II. Seasonal changes and radial distribution of carbohydrate and fall reserves in pine wood. **Trees**, Germany, v.6, p.147-155.

GONÇALVES PS. Uma história de sucesso. A seringueira no Estado de São Paulo. **O Agrônomo**, Campinas, v.54, n.1, p.6-14, 2002.

HARTMANN; TRUMBORE (2016). Understanding the roles of nonstructural carbohydrates in forest trees – from what we can measure to what we want to know. **New Phytologist**, United Kingdom, p.1–18.

HASHIM R, HOW LS, KUMAR RN, SULAIMAN O (2005). Some of the properties of flame retardant medium density fiberboard made from rubberwood and recycled containers containing aluminum trihydroxide. **Bioresource Technology**, Netherlands, v. 96, p.1826–1831.

HILLIS WE (1987). **Heartwood and tree exudates**. Berlin: Springer-Verlag, 268 p.

HOCH G et al (2003). Non-structural carbon compounds in temperate forest trees. **Plant, Cell and Environment**, United Kingdom, v.26, p.1067–1081.

HÖLL W (2000). Distribution, fluctuation and metabolism of food reserves in the wood of trees. In: **Cell & Molecular Biology of Wood Formation**. SAVIDGE R; BARNETT J; NAPIER R (eds.) BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford. p.347-362.

IAWA Committee on Nomenclature (1964). **Multilingual Glossary of Terms used in Describing Wood Anatomy**. Winterthur: Konkordia.

JALANI BS, RAMLI O. **Production systems and Agronomy, Rubber**. In: Thomas B, Murphy DJ, Murray BG (eds) Encyclopedia of applied plant sciences, Three volume set. Elsevier Academic Press, London, pp 970–978. 2003.



KAMPE A; MAGEL E (2013). New insights into heartwood and heartwood formation. In: **Cellular aspects of wood formation. Plant cell monographs**. FROMM J (ed.). Berlin: Springer-Verlag. p. 71–95.

KILLMAN W, HONG LT (2000). Rubberwood - the success of an agricultural by-product. **Unasyuva**, Italy, v.51, n.201, p.66-72.

LUNZ AM. **Suscetibilidade a Scolytidae e Platypodidae (Coleoptera) e prospecção fitoquímica da madeira de quatro essências arbóreas em duas formações florestais**. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2004, 64p.

MAGEL EA (2000) Biochemistry and physiology of heartwood formation. In: **Cell and molecular biology of wood formation**. SAVIDGE R, BARNETT J, NAPIER R (eds.), p. 363–376. BIOS Scientific Publishers, Oxford..

MAGEL EA et al (1994). Formation of heartwood substances in the stemwood of *Robinia pseudoacacia* L II. Distribution of nonstructural carbohydrates and wood extractives across the trunk. **Trees**, Germany. v. 8. p.165-171.

NAKADA R; FUKATSU E (2012). Seasonal variation of heartwood formation in *Larix kaempferi*. **Tree Physiology**, United Kingdom, v. 32, n. 1, p. 1497-1508.

OKINO EYA et al (2009). Uso das madeiras de seringueira, pinus e cipreste na fabricação de chapas OSB. **Floresta**, Brazil, v.39, n.2, p.457-468.

OLIVEIRA MDM et al. Custos de manutenção e rentabilidade da seringueira em plena produção, região Noroeste do estado de São Paulo, 2014. Análise e Indicadores do Agronegócio, São Paulo, v. 10, n. 2, p. 1-5, fev. 2015. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/ftp/iea/AIA/AIA-11-2015.pdf> . Acesso em: Outubro 2017.

PALLARDY, S.G (2008). **Physiology of woody plants**. 3.ed. San Diego: Elsevier/Academic. 454p.

QUENTIN et al (2015). Non-structural carbohydrates in woody plants compared among laboratories. **Tree Physiology**, United Kingdom, v.00, p.1-20.

ROSE R et al. (1991). Starch determination by perchloric-acid vs enzymes - evaluating the accuracy and precision of 6 colorimetric methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, United States, v.39, p.2–11.

ROSSMANN H et al. (2006). A competitividade da borracha natural no Brasil. In: Gameiro AH (org.) Competitividade do agronegócio brasileiro. Santa Cruz do Rio Pardo, Viena. p.218–235.

RYAN MG (2011). Tree responses to drought. **Tree Physiology**, United Kingdom, v. 31, p.237–239.

SALLA DA et al. (2010). Análise energética de sistemas de produção de etanol de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Brazil, v. 14, n. 4, p. 444 - 448.

SANTANA MAE, EIRAS KMM, PASTORE TCM (2001). Avaliação da Madeira de 4 clones de *Hevea brasiliensis* por meio de sua caracterização físico-mecânica. **Brasil Florestal**, Brazil, n.70, p.61-68.

SARANPÄÄ P; HÖLL W (1989). Soluble carbohydrates of *Pinus sylvestris* L. sapwood and heartwood. **Trees**, Germany, v.3, p.138-143.

SEVERO ETD et al. Changes in the chemical composition and decay resistance of thermally-modified *Hevea brasiliensis* wood. **PLoS ONE**, United States, v.11, n.3: e0151353. 2016

TAYLOR AM; GATNER BL; MORRELL JJ (2002). Heartwood formation and natural durability – a review. **Wood and Fiber Science**, United States. v. 34, n. 4, p. 587-611.

TEOH PY, DON MM, UJANG S (2011). Assessment of the properties, utilization, and preservation of rubberwood (*Hevea brasiliensis*): a case study in Malaysia. **Journal of Wood Science**, Germany, v. 57, p.255–266.

WILEY E; HELLIKER B (2012). A re-evaluation of carbon storage in trees lends greater support for carbon limitation to growth. **New Phytologist**, United Kingdom, v.195, p.285–289.