

## BIOQUÍMICA DA LIGNIFICAÇÃO DE CÉLULAS XILEMÁTICAS

Maria Beatriz de Oliveira Monteiro<sup>1</sup>  
Regina Paula Willemen Pereira<sup>1</sup>  
Heber dos Santos Abreu<sup>1</sup>

### RESUMO

A lignificação é um processo bioquímico que abrange desde a formação dos monolignóis até a polimerização da lignina na parede celular. Além do apoio ao sistema estrutural da parede celular, defesa física e química, a lignina participa no processo de transporte de água no floema vascular e nas células do xilema. As estruturas moleculares das ligninas mostram-se variações complexas de acordo com sua composição. A biossíntese da lignina é composta de duas etapas. A primeira, consta da participação de uma série de enzimas como: PAL, C4H, 4CL, C3H, OMT, F5H, CCR e CAD, que catalisam a formação dos precursores intermediários e finais dentro do compartimento citoplasmático. Durante a formação desses precursores algumas dessas enzimas atuam sobre o núcleo aromático, introduzindo hidroxilas em C-3 e C-5 e as metilando em seguida, enquanto outras promovem a redução da cadeia lateral. Estudos demonstram que a regulação destas enzimas podem modificar a arquitetura molecular e o grau de polimerização da lignina. Atualmente técnicas apuradas de transgenia são usadas para regular as atividades enzimáticas durante a formação da lignina, resultando em diversos benefícios para o setor florestal, agropecuária e meio ambiente.

**Palavras-chaves:** lignina, lignificação, madeira

### ABSTRACT

## BIOCHEMISTRY OF LIGNIFICATION OF XYLEMATICS CELLS

Lignification is a biochemical process that comprise the monolignols formation and precursors polymerization in the cell wall. Besides physical and chemical reinforce properties it contribute to water transport in the xylem cells. The biossíntese involves PAL, C4H, 4CL, C3H, OMT, F5H, CCR and CAD enzymes, which are responsible for all lignin precursors formation in the cytoplasmatic compartment. During the precursors formation some enzymes promote hydroxylations as well as methylations, while others act on aliphatic chain. Studies show that enzymes could modify the lignin molecular architecture and polymerization degree. At present transgenic techniques are available to regulate the enzyme activity during lignin formation, resulting in several benefits to the forest area, agriculture and environment.

**Keywords:** lignin, lignification, wood

### INTRODUÇÃO

A lignificação é um processo bioquímico que abrange a biossíntese de monolignóis, seu transporte e a polimerização na parede celular, que em primeiro estágio é altamente mediado por enzimas intrínsecas à formação dos

precursores nos compartimentos citoplasmáticos. O segundo estágio de formação da lignina ocorre na parede celular e caracteriza-se pela reação de oxidação desidrogenativa dos monolignóis disponíveis. As enzimas oxí-redutoras tais como peroxidases, e isoenzimas correspondentes, atuam na polimerização da lignina, dentro

<sup>1</sup> Departamento Produtos Florestais-Instituto de Florestas-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
BR 465, Km 07, Seropédica-RJ, CEP. 23890-000 - betyka@ufrj.br

Recebido para publicação em 2004

da parede celular, formando um complexo coordenado com peróxido de hidrogênio. A lacase entre outras oxidases também promovem oxidação desidrogenativa dos monolignóis na parede celular (Lewis & Sarkanen, 1998; Whetten et al., 1998; Ranocha et al., 2002). A lignina tem sido considerada como macromoléculas de origem fenilpropanoídica com vital importância na sustentação, resistência aos fatores biológicos, químicos e físicos, (Vance et al., 1980). Além disso, desempenham um importante papel no crescimento e desenvolvimento da planta (Rogers & Campbell, 2004), que provavelmente permitiu a adaptação das plantas aquáticas à vida terrestre (Monties, 1989; Barcelo, 1997; Inoue et al., 1998; Northcote, 1989). A lignina também é indispensável em diversos processos biológicos dos quais os mais importantes são, assegurar a existência de vias rápidas de circulação da água, minerais e conferir rigidez necessária à manutenção da verticalidade do caule principal a vários metros de altura, não apresentando mobilidade entre paredes celulares, o que torna compreensível à preservação desse material ao longo de milhares de anos sob a face da terra, em condições rigorosas de alteração ambiental (Abreu et al., 1999). Sob condições de anoxia, portanto, sua degradação torna-se extremamente difícil, de forma a exigir um alto teor de oxigênio durante o processo de degradação (Davin & Lewis, 2000). Sua arquitetura molecular difere segundo a origem botânica dos táxons, entre células e até mesmo dentro da parede celular, respondendo aos efeitos abióticos e bióticos do ambiente (Larroque & Planchon, 1990; Kitayama et al., 2004). Normalmente as plantas detêm mecanismos coordenados de deposição da lignina, assim sua síntese obedece aos conceitos da topoquímica onde o tempo e local de deposição pode ser endógena e exogenamente afetado (Donaldson, 2001).

#### **Enzimas que atuam na via biossintética da lignina nos compartimentos citoplasmáticos**

O metabolismo dos fenilpropanóides inclui uma série complexa de caminhos bioquímicos que proporcionam às plantas milhares de combinações. Muitos destes são intermediários na síntese de substâncias estruturais das células, como a lignina (Boatright et al., 2004). Estes caminhos se ramificam gerando várias substâncias com funções essenciais no desenvolvimento da planta e interações ambientais (Allina et al., 1998).

E nestes caminhos há atuação de enzimas fundamentais para a biossintese da lignina. Durante a formação dos precursores da lignina algumas dessas enzimas atuam sobre o núcleo aromático dos fenilpropanóides, introduzindo hidroxilas em C-3 e C-5 e as metilando em seguida enquanto outras desempenham importante papel na redução da

cadeia lateral. A biossintese da lignina envolve uma série de enzimas desde a Fenilalanina Amônia-liase (**PAL**), Cinamato-4Hidroxilase (**C4H**), Hidroxicinamoil COA Ligase (**4CL**), 4-Hidroxicinamato 3-Hidroxilase (**C3H**), 5-Adenosil-Metionine:Cafeato/5-Hidroxi (**OMT**), Ferulato-5-Hidroxilase (**F5H**), Hidroxicinamoil COA Redutase (**CCR**) até a Cinamil Álcool Desidrogenase (**CAD**).

**Fenilalanina Amônia-liase (PAL)** é uma das principais enzimas que atuam na formação dos precursores da lignina, catalisando a desaminação da fenilalanina a ácido trans-cinâmico (Raes et al., 2003). De acordo com Bate et al., (1994) e Sewalt et al., (1997) a PAL se torna limitante quando sua atividade é reduzida de 20% para 25%, tal redução foi comprovada em tabaco transgênico (*Nicotiana tabacum*).

**Cinamato-4Hidroxilase (C4H)** controla a conversão do cinamato em *p*-cumarato. É o primeiro citocromo monooxigenase P450-dependente do caminho do fenilpropanóide (Sino-Lelong et al., 1997). São catalisadas três reações de hidroxilação sucessivas no anel na formação do monolignol, começando pela enzima C4H, seguindo pela C3H e a F5H (Dixon et al., 2001).

**Hidroxicinamoil COA Ligase (4CL)** catalisa a formação de tio ésteres de CoA de ácido *p*-cumárico, cafeico, ferúlico, 5-hidroxiferúlico, e ácido sinápico (Lee et al., 1997; Hu et al., 1998). A abundância potencial de substratos pode explicar a existência de isoenzimas (4CL) na maioria das plantas superiores. Além das diferentes especificidades dos substratos, os genes aparentam um padrão de expressão (espaço-temporal) tipicamente distinto (Lewis e Yamamoto, 1990; Hu et al., 1998; Harding et al., 2002). Recentes experimentos com transgênicos demonstraram que o papel do 4CL obtiveram resultados contraditórios em diferentes espécies, sugerindo variação nas plantas. *Arabidopsis* transgênicas com atividade reduzida de 4CL tiveram diminuição de lignina guaiacila, mas com pouca alteração na lignina siringila (Lee et al., 1997). Transgênico de tabaco com atividade reduzida de 4CL, tiveram uma maior redução do conteúdo de lignina siringila do que guaiacila, apesar de que ambos os tipos de lignina foram alterados (Kajita et al., 1997; Kajita et al., 1996).

**4-Hidroxicinamato 3-Hidroxilase (C3H)** foi nomeada originalmente depois de sua função na hidroxilação do ácido *p*-cumárico. Recentemente pesquisa mostrou que C3H<sub>1</sub> converte éster cuiquimato e quinato de ácido *p*-cumárico preferencialmente no ácido cafeico correspondente, considerando que ácido *p*-cumárico e *p*-cumaroil - CoA não sejam substratos desta enzima (Schoch et al., 2001; Franke et al., 2002; Nair et al., 2002). Estudos conduzidos por Franke et al. (2002) demonstraram que o

ref8 (mutante de *Arabidopsis*) defeituoso no gene que codifica a enzima C3H e que a caracterização fenotípica deste, revelaram que a falta da atividade desta enzima conduziu a diversas mudanças no metabolismo do fenilpropanóide. Estas perturbações causaram mudanças na resistência da parede da célula do ref8 para a ação de hidrolases de polisacarídeos, e aumentou a suscetibilidade ao ataque de fungos.

**5-Adenosil-Metionine:Cafeato/5-Hidroxi (COMT)** foi postulado por ser uma enzima bifuncional metilando o ácido cafeico e ácido 5-hidroxiferúlico nas plantas superiores. Porém, resultados obtidos *in vitro* usando transgênicos revelaram que o papel predominante de COMT é a metilação de 5-hidroxiconiferaldeído e/ou álcool 5-hidroxiconiferílico para sinapaldeído e/ou álcool sinapílico, respectivamente (Osakabe et al., 1999; Li et al., 2000; Chen et al., 2001; Guo et al., 2001; Parvathi et al., 2001; Goujon et al., 2003). **CCoAOMT** catalisa a metilação de cafeoil-CoA a feruloil-CoA (*in vitro* e *in vivo*) e 5-hidroxiferuloil-CoA para sinapoil-CoA (pelo menos *in vitro*), junto com COMT, é responsável pela metilação dos precursores dos monolignóis (Ye et al., 1994; Zhong et al., 1998; Pincon, et al., 2001). De acordo com **Zhong et al. (1998) usando a técnica antisense** mostrou que a redução da CCoAOMT resultou em uma diminuição no teor e composição da lignina. Porém, lignina guaiacila teve uma maior taxa de redução, resultando no aumento da relação S/G (siringila/guaiacila). Também foi observado que a redução simultânea de CCoAOMT e CAOMT resultou na diminuição no teor de lignina total. A redução da CAOMT diminuiu apenas em unidades de lignina siringila. Estes resultados comprovaram que reações de metilação são catalisadas pelas enzimas CCoAOMT e CAOMT.

**Hidroxicinamoil COA Redutase (CCR)** que catalisa a conversão de ésteres cinamoil-CoA a cinamaldeídos, é uma das enzimas da parte específica do caminho do monolignol na biossíntese da lignina. Segundo Piquemal et al (1998) em tabaco a baixa regulação de CCR tem efeito no teor e composição da lignina, onde a relação S/G é maior, principalmente por causa de uma redução em unidades de G, porém a lignina é mais condensada. O aumento da celulose ligada a uma diminuição da lignina observado com a baixa regulação da 4CL em álamos não parece ser um fenômeno comum; mutantes *irx4* deficientes em CCR apresentam menor teor de lignina mas nenhum aumento no teor de celulose (Jones, et al., 2001).

**Ferulato-5-Hidroxilase (F5H)** é uma monooxigenase citocromo-P450-dependente (P450) participa da biossíntese de monômeros da lignina siringila, através da 5-hidroxilação do coniferaldeído e/ou do álcool coniferílico (Humphreys et al., 1999; Li et al., 2000; Humphreys & Chapple, 2002).

50

**Cinamil Álcool Desidrogenase (CAD)** catalisa o último passo na biossíntese do monolignol, reduzindo-as a aldeídos e nos álcoois correspondentes. A enzima CAD reduz vários aldeídos, durante diferentes fases de desenvolvimento. Além da função de regulação da lignificação, vários genes da CAD foram caracterizados em resposta a patógenos em plantas (Kiedrowski et al., 1992). A enzima CAD regula a composição da lignina G:S detectada em uma ampla variedade de plantas, cujo polimorfismo sugere que esta enzima apresenta especificidade diferenciada na composição da lignina de Gimnospermas e Angiospermas. Em *Eucalyptus* a CAD<sub>2</sub> mRNA foi detectada em tecidos do xilema e folhas (Abreu et al., 2003).

### Modulação do teor e composição da lignina

A composição e o teor de lignina em madeiras têm conseqüências de natureza técnica e econômica (industriais, ambientais, e agrícolas profundas). Como nos processos industriais de polpação Kraft. Neste processo, a presença de alto teor de unidade siringila na lignina é desejável, pois reduz o custo da produção de celulose e o impacto ambiental (Lapierre et al., 1999; Jouanin et al., 2000). Na agropecuária, a presença da lignina nas gramíneas e alfafa reduz a digestibilidade dos ruminantes (Inoue et al., 1998; Pincon et al., 2001).

A desativação das enzimas que participam em parte da biossíntese da lignina promove acumulação de celulose em árvores transgênicas, isto é uma regulação artificial que altera o metabolismo da lignina; enquanto milhões de anos foram necessários para que as plantas alcançassem os níveis de teor e composição de lignina atual (Robinson, 1990, Taylor, 1993).

Várias pesquisas acenam que as árvores transgênicas podem ser uma solução para o futuro da indústria de polpa celulósica, resultando em alto rendimento de celulose (Boudet 1998). Higuchi et al. (1994), verificaram que plantas com atividade reduzida de CAD apresentaram a cor da madeira original alterada. Eles consideraram que esta pode ser uma nova perspectiva para indústria de móveis. Experimentos com *pt4CL1* decodificado como 4-cumurato coenzima A ligase (4CL) promoveu 45% de redução de lignina e aumento de 15% de celulose (Sederoff, 1999). Um mutante de *Pinus* com deficiência em CAD produziu lignina cuja composição continha o ADC (álcool diidroconiferílico) e APD (álcool Aril-1,3-propano-diol) (Ralph et al. 1999). Sobre o ponto de vista da defesa de plantas, a acumulação extra de lignina pode ser promissora. Um destes caminhos é a desativação da chalcona sintase, através do qual poderá alcançar altos níveis de lignificação em plantas transgênicas. Esta enzima contribui para a formação das chalconas que são precursores dos taninos condensados (Dey & Harbone 1997).

V. 11, n.2, p. 48 - 57, ago./dez. 2004

Pesquisas recentes usando atmosfera artificial de O<sub>2</sub> mostraram que plantas podem produzir lignina em quantidades e composição diferentes (Veiga et al. 1999). O grupo de Bioquímica da Lignina esta trabalhando neste sentido, usando condições especiais para promover a acumulação extra de lignina (Oxidação Vertical). O processo que leva à acumulação de lignina é realizado na parede celular proporcionando uma performance morfológica beneficiando a agricultura e as culturas florestais (Coley 1988).

Segundo Abreu et al. (2003) a modificação da rota biossintética que leva ao álcool coniferílico em angiospermas dicotiledôneas seja por transgenia, mutações ou outras formas de indução, acarretaria na formação de um bloco polimérico de baixo IFM (Índice de Flexibilidade Molecular), maior NTLI (Número Teórico de Ligações Intermonoméricas) e maior número de ligações cruzadas, aumentando, portanto, a resistência da parede celular. Isso poderia minimizar ou impedir a possibilidade de rachaduras, beneficiando diretamente o uso da madeira em diversos ramos da indústria madeireira, exceto a indústria de polpa celulósica. Estudos satisfatórios com *Eucalyptus grandis* quando foram utilizadas aplicações exógena de ácido giberélico e citocinina (BAP) ocorrendo a redução do teor de lignina (Pereira, 2005) e com *Eucalyptus urophylla* com ácido jasmônico e ácido 2,4-diclorofenóxicacético ocorreu aumento do teor de lignina (Monteiro, 2005).

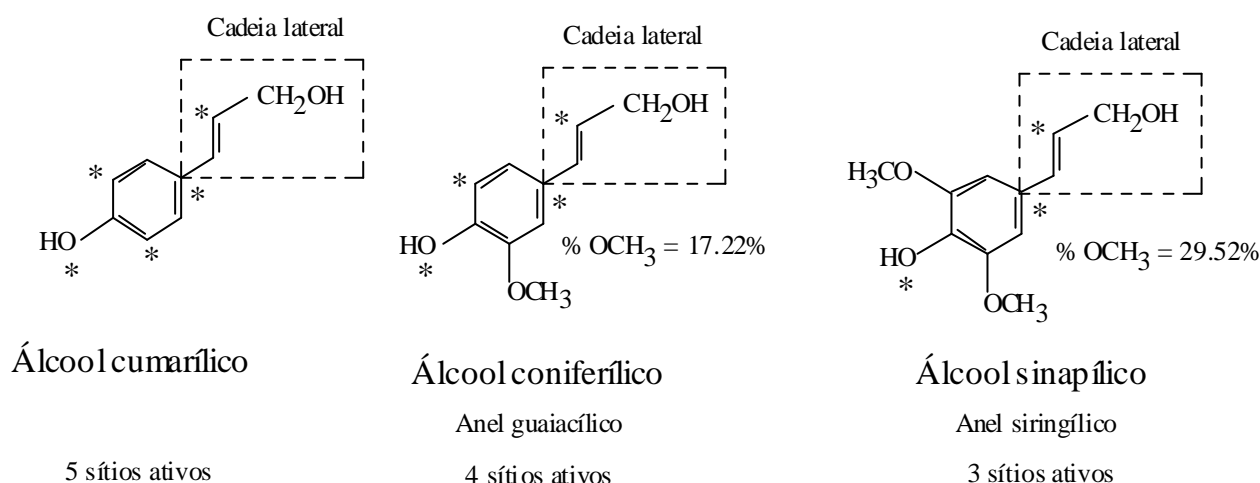
Do ponto de vista funcional, as plantas que

sintetizam ligninas moduladas parecem adotar estratégias compensatórias para manter a integridade da parede celular. De acordo com Baucher et al. (1996) a diminuição da atividade da CAD em plantas transgênicas viabiliza a polimerização da lignina via cinamaldeído substituindo o caminho tradicional do álcool cinamílico. A diminuição da atividade da CCR em tabaco devido ao aumento do ferulato de tiramina permitiu a incorporação como componente integrante do bloco polímero lignínico (Ralph et al., 1998). Reforço adicional foi observado em plantas transgênicas pelo aumento significativo em outra parede associada por substâncias fenólicas (Piquemal, 1998).

Em algumas plantas transgênicas, a variação na composição da lignina não teve nenhum efeito distinto na fisiologia da planta (Boudet et al., 1995), porém, foi observada alteração na composição da lignina (Whetten et al., 1998).

#### Arranjo molecular da lignina

A complexidade estrutural das ligninas depende das ligações formadas entre as unidades constitucionais (C<sub>3</sub>C<sub>6</sub>) durante o processo de lignificação. Os monolignóis fenilpropanóides como: os álcoois: cumarílico, coniferílico e sinapílico são atualmente definidos como precursores majoritários da lignina (Figura 1). Estes precursores apresentam vários sítios reativos capazes de constituir ligações cruzadas entre si, envolvendo átomos de carbono do anel aromático nas posições 3, 4 e 5 ou 3/5 e sobre a cadeia lateral.



**Figura 1.** Precursores majoritários da lignina e respectivos sítios reativos (\*).

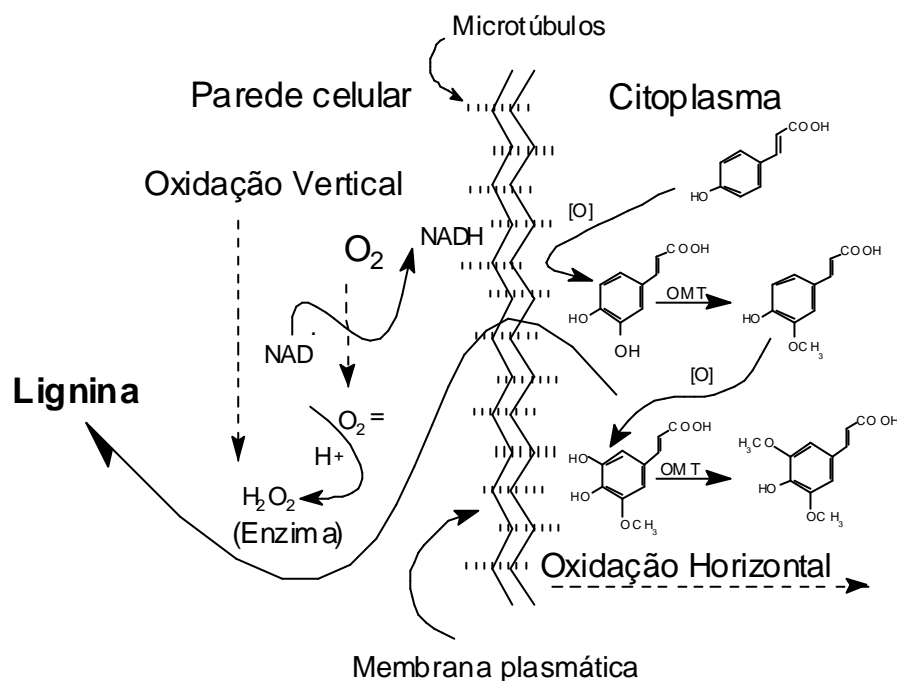
**Figure 1.** Majority lignin precursors and their actives sites (\*).

V. 11, n.2, p. 48 - 57, ago./dez. 2004

51

A estrutura da lignina tem sido também objeto de estudo em inúmeros trabalhos científicos, aos quais estabelecem propostas estruturais e formação biossintética (Boerjan, 2003). Considera-se para os mesmos a existência de um provável controle biológico diferenciado segundo os aspectos inerentes a classe botânica a que o vegetal pertence, a influência genética, aos aspectos espaciais da subestrutura da parede celular, entre outros aspectos. Dois estádios de formação da lignina são preconizados, a formação enzimática e a formação semi-enzimática. Sendo a primeira considerada como oxidação horizontal ocorrendo no citoplasma e a segunda oxidação vertical que acontece na parede celular (Abreu et al., 1999) (Figura 2). De um modo geral a complexidade estrutural das ligninas depende

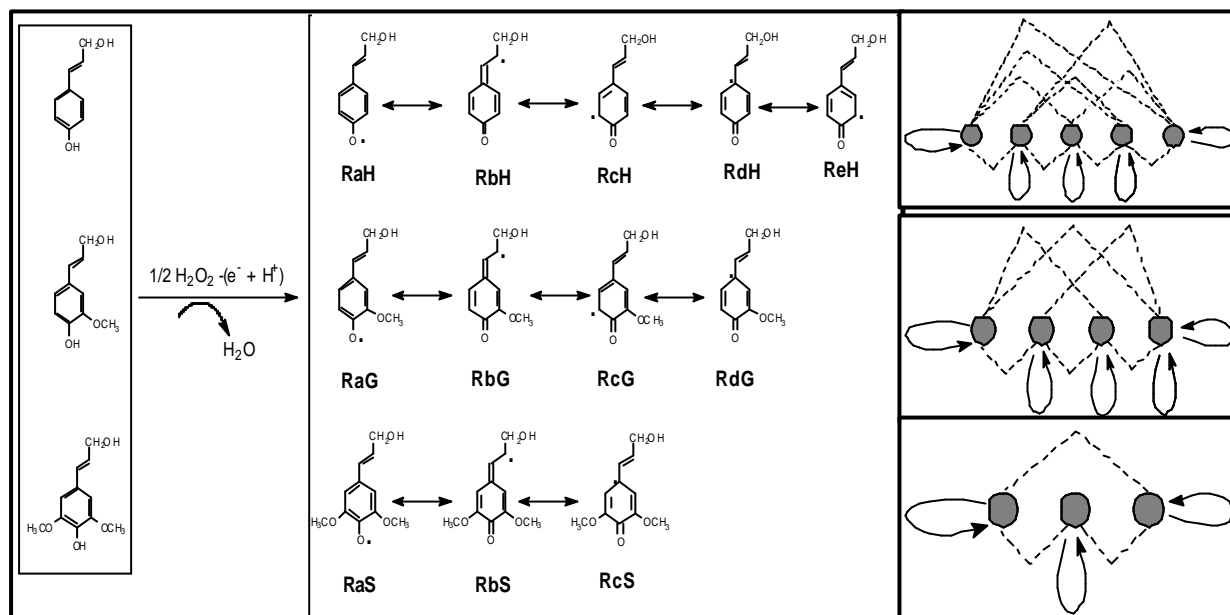
das ligações formadas entre as unidades constitucionais (C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>) durante o processo de polimerização (Micic et al., 2002). Para formar os precursores terminais (ésteres de ácidos fenilpropanóides) sucessivas oxidações e metilações são descritas (Choinowski et al., 1999). O éster *p*-cumarato, por exemplo, é hidroxilado na posição meta a cadeia lateral, formando o éster cafeato. Este precursor intermediário é determinante na síntese dos demais precursores dos monolignóis. Três reações mediadas por cinamil redutase levam aos aldeídos correspondentes (cumaraldeído, coniferaldeído e sinapaldeído), os quais são reduzidos a álcoois através da enzima cinamil álcool desidrogenase (CAD). Todo este processo enzimático ocorre no compartimento citoplasmático.



**Figura 2.** Proposta de oxidação horizontal e vertical durante a formação da lignina (Abreu, 1999)  
**Figure 2.** Proposal for horizontal and vertical oxidations to lignin formation

O segundo estágio da formação da lignina inicia-se pela oxidação dos três monolignóis na condição de precursores terminais. Esses precursores terminais (álcoois *p*-cumárico, coniferílico e sinápico) apresentam vários sítios reativos capazes de constituírem ligações cruzadas entre si, preferencialmente sobre a cadeia lateral (Higuchi, 1997). O aumento do grau de metoxilação a partir dos

precursores: ácido cumárico, ácido coniferílico e ácido sinápico correspondem à diminuição do número de ligações intermoleculares, possibilitando a formação de uma rede de ligações intermonoméricas na maioria envolvendo ligações C-C. Isso, portanto constitui, base na composição química e conseqüentemente nas formas estruturais adquiridas após a polimerização na parede celular (Figura 3).



**Figura 3.** Proposta especulativa de polimerização dos precursores álcoois p-cumarílico, coniferílico e sinapílico para a formação da lignina na parede celular

**Figure 3.** Speculative proposal of precursors polymerization (p-coumaryl, coniferyl and sinapyl alcohol) to lignin formation in the cell wall.

A inicialização da polimerização para a formação da lignina não necessariamente necessita de  $H_2O_2$  + peroxidase; outras enzimas como lacase ou fenol oxidase, podem atuar sobre o sistema celular, descartando a atuação global do peróxido de hidrogênio (Dean et al., 1998; Ranocha et al., 2002). Vários estudos sugerem que lacases localizadas na parede secundária de tecidos vasculares são também capazes de polimerizar monolignóis na presença de  $O_2$  (Dean et al., 1998; Liu et al., 1994; Richardson & McDougall, 1997; Richardson et al. 2000). A possibilidade que lacases são envolvidas no processo de lignificação em plantas superiores foi primeiramente citado por Freudenberg (1958). De acordo com Sterjiades et al. (1992) a lacase de *Acer pseudoplatanus* foi capaz de polimerizar monolignóis, na ausência completa de peroxidase.

Existem evidências que no início da vida das plantas superiores predominavam as ligninas cumarílicas em pteridófitas, e só depois surgiram as ligninas cumarílicas-guaicílicas que dominaram o reino vegetal nas Gimnospermas. Depois com o aparecimento das Angiospermas as ligninas guaicílicas-siringílicas, predominaram, tornando assim a melhor forma composicional adaptativa, mesmo considerando uma maior fragilidade molecular destas biomoléculas.

V. 11, n.2, p. 48 - 57, ago./dez. 2004

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conhecimento do mecanismo de formação da lignina ainda requer muitas pesquisas de natureza teórica e experimental, principalmente relacionando a lignificação com a qualidade do produto final nos diversos segmentos do setor florestal, da agricultura, da agropecuária e ambiental. A ativação e desativação de enzimas do caminho biossintético da lignina tem demonstrado através de vários estudos com sucesso, que podemos modelar a formação da lignina de acordo com a sua finalidade. Pesquisas com reguladores de crescimento como demonstraram Pereira (2005) e Monteiro (2005) pode ser uma linha para futuras pesquisas relacionando aumento e diminuição do teor da lignina.

O controle do teor e da modulação da biossíntese da lignificação oferece um avanço tecnológico, para parcial remoção da lignina de tecidos lenhosos, que é um processo que requer muitos investimentos, especialmente devido a sua importância na indústria de polpa celulósica.

As técnicas conhecidas de transformação de plantas podem conduzir a respostas positivas, tanto sobre as atividades das enzimas que atuam na fase citoplasmática quanto sobre as enzimas que catalisam a reação de oxidação dos monolignóis na parede celular.

Novas visões bioquímicas sobre a formação da lignina

53

permitiram ajustar os teores de lignina nas plantas, como também modificar a arquitetura molecular e sua deposição nos diferentes locais da parede celular.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES pelo apoio financeiro através de concessão de bolsa do Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Florestais do Instituto de Florestas da UFRRJ.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, H. S.; NASCIMENTO, A. M. & MARIA, M. A. Lignin and structure, **Wood and Fiber**, V.31, p.426-433, 1999.
- ABREU, H. S.; MAÊDA, J.; LATORRACA, J. F.; PEREIRA, R. P. W.; MONTEIRO, M. B. O.; ABREU, F.; CARMO, J. Proposta de modificação da biossíntese da lignina como estratégia para correção de defeitos em madeiras. **Silva Lusitana**, V.11, n.2, p.217-225, 2003.
- ALLINA, S. M; PRI-HADASH, A; THEILMANN, D. A; ELLIS, B. E; DOUGLAS, C. J. 4- Coumarate: coenzymeAligase in hybrid poplar. **Plant Physiology**, 116:743-54, 1998.
- BARCELO, A. R. Lignification in plant cell walls. **Int. Rev. Cytol.** **176**, p.87-132, 1997.
- BATE, N.J; ORR, J; NI, W; MEROMI, A; NADLER-HASSAR, T. Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, V.91, p.7608-7612, 1994.
- BAUCHER, M.; CHABBERT B.; PILATE G; VAN DOORSSELAERE J.; TOLLIER M.T; PETIT-CONIL M.; MONTIES B.; VAN MONTAGU M.; INZÉ D.; JOUANIN L.; BOERJAN W. Red xylem and higher lignin extractibility by down-regulating a cinnamyl alcohol dehydrogenase in poplar. **Plant Physiology**, V.112, p.1479-1490, 1996.
- BOATRIGT, J; NEGRE, F; CHEN, X; KISH, C. M; WOOD, B; PEEL, G; ORLOVA, I; GANG, D; RHODES, D; DUDAREVA, N. Understanding in Vivo Benzenoid Metabolism in Petunia Petal Tissue **Plant Physiology**, V.135, p.1993-2011, 2004.
- BOERJAN, W; RALPH, J; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annu Rev Plant Biol**, V.54, p.519-546, 2003.
- BOUDET A. M. A new view of lignification, **Elsevier Science**, V.3, n.2, p.67-71, 1998.
- BOUDET, A. M.; LAPIERRE, C.; GRIMA-PETTENATI, J. Biochemistry and molecular biology of lignification. **New Phytol.** V.129, p.203-36, 1995.
- CHEN, F; KOTA, P; BLOUNT, J. W; DIXON, R.A. Chemical synthesis of caffeoyl and 5-OH coniferyl aldehydes and alcohols and determination of lignin O-methyltransferase activities in dicot and monocot species. **Phytochemistry**, V.58, p.1035-42, 2001.
- CHOINOWSKI, T.; BLODIG, W.; WINTERHALTER, K. H.; PIONTEK, K. The crystal structure of lignin peroxidase at 170 Å resolution reveals a hydroxy group on the C<sup>β</sup> of tryptophan 171: A nonel radical site formed during the redox cycle. **J Mol Biol**, V.286, p.809-827, 1999.
- COLEY, P. D. Effect of plant growth content leaf lifetime on the amount and type of anti-herbivore, **Oecologia**, V.74, p.531-536, 1988.
- DEAN, J.F.D.; DEAN, P.R.; LAFAYETTE, C.; RUGH, A. H.; TRISTRAM, J.T.; HOOPEES, K. E. L.; ERIKSSON, S.A.; MERKLE. Laccases associated with lignifying vascular tissues. In: N.G. Lewis and S. Sarkanen, Editors, **Lignin and Lignan Biosynthesis**. ACS Symposium Series 697, American Chemical Society, Washington, DC, 1998, 96p.
- DEY, P. P.M & HARBONE, J. B. **Plant Biochemistry**, Academic Press, 1997, p.387-390.
- DAVIN, L. B. & LEWIS, N. G. Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis, **Plant Physiology**, V.123, p.453-462, 2000.
- DIXON, R. A; CHEN, F; GUO, D; PARVATHI, K. The biosynthesis of monolignols: a “metabolic grid,” or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? **Phytochemistry**, V.57:1069-84, 2001.
- DONALDSON, L. A. Lignification and lignin topochemistry — an ultrastructural view, **Phytochemistry**, V.57, n.6, p.859-873, 2001.
- FRANKE, R.; HEMM, M. R.; DENAULT, J. W.; RUEGGER, M. O.; HUMPHREYS, J. M.; CHAPPLE, C. Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the ref8 mutant of Arabidopsis. **The Plant Journal**, V.30, n.1, p.47-59, 2002.

- FREUDENBERG K.; HARKIN, J.M.; RECHERT, M.; FUKUZUMI, T. Die and der Verholzung beteiligten Enzyme. Die Dehydrierung des Sinapyl Alkohol. **Chem. Ber.** V91, p.581–590, 1958.
- GOUJON, T; SIBOUT, R; EUDES, A; MACKAY, J; JOUANIN, L. Genes involved in the biosynthesis of lignin precursors in *Arabidopsis thaliana*, **Plant Physiol Biochem**, V41, p.677–687, 2003.
- GUO, D; CHEN, F; INOUE, K; BLOUNT, J. W; DIXON, R.A. Downregulation of caffeic acid 3-*O*-methyltransferase and caffeoyl CoA 3-*O*-methyltransferase in transgenic alfalfa: impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin. **Plant Cell**, V.13, p.73–88, 2001.
- HARDING S.A; LESHKEVICH, J; CHIANG V. L; TSAI, C. J. Differential substrate inhibition couples kinetically distinct 4- coumarate: coenzyme A ligases with spatially distinct metabolic roles in quaking aspen. **Plant Physiology**, V.128, p.428–38, 2002.
- HIGUCHI, T., ITO, T, UMEZAWA, T., HIBINO, T. & SHIBATA, D. Red-brown color of lignified tissues of transgenic plants with antisense CAD gene: Wine-red lignin from coniferyl aldehyde, **Journal of Biotechnology**, V.37, p.151-158, 1994.
- HIGUCHI, T. **Biochemistry and molecular biology of wood**. Springer, 1997, 506p.
- HU, W. J; KAWAOKA, A; TSAI, C. J; LUNG J; OSAKABE, K. Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate: CoA ligase genes in aspen *Populus tremuloides*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, V.95, p.5407–12, 1998.
- HUMPHREYS, J. M; CHAPPLE, C. Rewriting the lignin roadmap. **Curr. Opin. Plant Biol**, V.5, p.224–29, 2002.
- HUMPHREYS, J.M; HEMM, M.R; CHAPPLE, C. New routes for lignin biosynthesis defined by biochemical characterization of recombinant ferulate 5-hydroxylase, a multifunctional cytochrome P450- dependent monooxygenase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, V.96, p.10045–50, 1999.
- INOUE, K.; SEWALT, V.J.; MURRAY, GB.; NI, W. STURZER, C.; DIXON, R.A. Developmental expression and substrate specificities of alfalfa caffeic acid 3-*O*-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-*O*-methyltransferase in relation to lignification. **Plant Physiology**, V.117, p.761–770, 1998.
- JONES, L.; ENNOS, A R.; TURNER, S. R. Cloning and characterization of irregular xylem4 (*irx4*): a severely lignindeficient mutant of *Arabidopsis*. **Plant Journal** V.26, p.205–216, 2001.
- JOUANIN, L.; GOUJON, T.; DE NADAI, V.; MARTIN, M.T.; MILA, I.; VALLET, C.; POLLET, B.; YOSHINAGA, A.; CHABBERT, B.; PETIT-CONIL, M.; LAPIERRE, C. Lignification in transgenic poplars with extremely reduced caffeic acid *O*-methyltransferase activity. **Plant Physiology**, V.123, p.1363–1374, 2000.
- KYTAYAMA, K.; SUZUKI, S.; HORI, M.; TAKYU, M.; AIBA, S.I.; MALAJALAP-LEE, N.; KIKUZAWA, K. On the relationships between leaf-litter lignin and net primary productivity in tropical rain forests. **O junho ecologia**, V.140, p.335-339, 2004.
- KAJITA, S.; HISHIYAMA, S.; TOMIMURA, Y.; KATAYAMA, Y.; OMORI S. Structural characterization of modified lignin in transgenic tobacco plants in which the activity of 4-coumarate: Coenzyme A ligase is depressed. **Plant Physiology**, V.114, p.871-791, 1997.
- KAJITA S, KATAYAMA Y, OMOI S. Alterations in the biosynthesis of lignin in transgenic plants with chimeric genes for 4-coumarate:CoA ligase. **Plant Cell Physiol**. V.37, p.957-651, 1996.
- KIEDROWSKI, S; KAWALLECK, P; HAHLBROCK, K; SOMSSICH, I. E; DANGL, J. L. Rapid activation of a novel plant defense gene is strictly dependent on the *Arabidopsis RPM1* disease resistance locus. **EMBO J** , V.11, p.4677–4684, 1992.
- LEE, D.; MEYER, K.; CHAPPLE, C.; DOUGLAS, C. J. Down-regulation of 4-coumarate:CoA ligase (4CL) in *Arabidopsis*: effect on lignin composition and implications for the control of monolignol biosynthesis. **Plant Cell**. V.9, p.1985-98, 1997.
- LAPIERRE, C.; POLLET, B.; PETIT-CONIL, M.; TOVAL, G; ROMERO, J.; PILATE, G; LEPLÉ, J.C.; BOERJAN, W.; FERRET, V.V; DE NADAI, V; JOUANIN, L. Structural alterations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid *O*-methyltransferase activity have an opposite impact on the efficiency of industrial Kraft pulping. **Plant Physiology**, V.119, p.153–164, 1999.
- LARROQUE, C. M. & PLANCHON C. L. Lignification and physiological factors of yield in maize. **Published in Crop Sci**, V.30, p.1105-1109, 1990.



- LEWIS, N. G. & SARKANEN, S.. **Lignin and lignan biosynthesis**, American Chemical Society. Washington, DC, 1998, 436p.
- LEWIS, N. G. & YAMAMOTO, E. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. **Annu. Rev. Plant Mol. Biol.**, V.41, p.455-496, 1990.
- LI, L.; POPKO, J.L.; UMEZAWA, T.; CHIANG VL. 5-Hydroxyconiferyl aldehyde modulates enzymatic methylation for syringyl monolignol formation, a new view of monolignol biosynthesis in Angiosperms. **J. Biol. Chem.** V.275, p.6537-6545, 2000.
- LIU L.; DEAN J.F.D.; FRIEDMAN W.E.; ERIKSSON K. E. A laccase-like phenoloxidase is correlated with lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* stem tissue. **Plant J.** V.6, p.213-224, 1994.
- MONTEIRO, M. B. O. **Modulação do processo de lignificação por aplicação de ácido jasmônico e 2,4-diclorofenoxiacético em *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake**. Tese de Mestrado, UFRRJ, Seropédica, p, 2005.
- MICIC, M.; ORBULESCU, J.; RADOTIC, K.; JEREMIC, M.; SUI, G. ZHENG Y.; LEBLANC, R. M. ZL-DHP lignin model compound at the air – water interface. **Biophysical Chemistry**, V.99, p.55-62, 2002.
- MONTIES, B. Molecular structure and biochemical properties of lignins in relation with possible self-organization of lignin networks. **Annales des Sciences Forestières**, V.46, p.846-855, 1989.
- NAIR, R. B; XIA, Q; KARTHA, C. J; KURYLO, E; HIRJI, R. N; DATLA, R; SELVARAJ, G Arabidopsis CYP98A3 mediating aromatic 3-hydroxylation. Developmental regulation of the gene, and expression in yeast. **Plant Physiology**, V.130, p.210-20, 2002.
- NORTHCOTE, D. H. Control of plant cell wall biogenesis: an overview. **ACS Symp. Ser.** V.399, p.1-15, 1989.
- OSAKABE, K; TSAO, C. C; LI, L; POPKO, J. L; UMEZAWA, T. Coniferyl aldehyde 5-hydroxylation and methylation direct syringyl lignin biosynthesis in angiosperms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, V.96, p.8955-60, 1999.
- PARVATHI, K; CHEN, F; GUO, D; BLOUNT, J. W; DIXON, R. A. Substrate preferences of *O*-methyltransferases in alfalfa suggest new pathways for 3-*O*-methylation of monolignols. **Plant J.** 25:193-202, 2001.
- PEREIRA, R. P. W. **Atenuação do processo de lignificação em *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) por GA<sub>3</sub> e BAP**. Tese de Mestrado, UFRRJ, Seropédica, 98p, 2005.
- PINCON, G; MAURY, S.; HOFFMANN, L.; GEOFFROY, P.; LAPIERRE, C.; POLLET, B.; LEGRAND, M. Repression of *O*-methyltransferase genes in transgenic tobacco affects lignin synthesis and plant growth. **Phytochemistry**, V.57, p.1167-1176, 2001.
- PIQUEMAL J., LAPIERRE C., MYTON K., O'CONNELL A., SCHUCH W., GRIMA-PETTENATI J. AND BOUDET A.M., Down regulation of cinnamoyl CoA reductase induces significant changes of lignin profiles in transgenic tobacco plants. **Plant J.** V.13, p.71-83, 1998.
- RAES, J; ROHDE, A; CHRISTENSEN, J. H; VAN DE PEER, Y; BOERJAN, W. **Genome-Wide Characterization of the Lignification Toolbox in Arabidopsis**. **Plant Physiology**, V.133, n.3, p.1051-1071, 2003.
- RALPH, J.; KIM, H.; PENG J. & LU, F. Arylpropane-1,3-diols in lignins from Normal and CAD-Deficient pines, **Organic Letters**, V.1, n.2, p.323-326, 1999.
- RALPH J.; HATFIELD R. D.; PIQUEMAL J.; YAHIAOUI N.; PEAN M.; LAPIERRE C.; AND BOUDET A.M., NMR characterization of altered lignins extracted from tobacco plants down-regulated for lignification enzymes cinnamyl-alcohol dehydrogenase and cinnamoyl-CoA reductase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, V.95, p.12803-12808, 1998.
- RANOCHA, P.; CHABANES, M.; CHAMAYOU, S.; JAUNEAU, A.; BOUDET, A. M.; GOFFNER, D. Laccase Down-Regulation Causes Alterations in Phenolic Metabolism and cell wall structure in poplar. **Plant Physiology**, V.129, n.1, p.145-155, 2002.
- RICHARDSON, A.; DUNCAN, J.; MCDUGALL, G J. Oxidase activity in lignifying xylem of taxonomically diverse range of trees: identification of a conifer laccase. **Tree Physiol.** V.20, p.1039-1047, 2000.
- RICHARDSON A. & MCDUGALL G J. A laccase-type polyphenol oxidase from lignifying xylem of tobacco. **Phytochemistry** V.44, p.229-235, 1997.
- ROBINSON, J.M. Lignin, land plants, and fungi: biological evolution affecting phanerozoic oxygen balance, **Geology**, V.15, p.607-610, 1990.

- ROGERS, L. A.; CAMPBELL, M. M. The genetic control of lignin deposition during plant growth and development. *New Phytologist* V.164, n.1 p.17, 2004.
- SEWALT, V. J. H; NI, W; BLOUNT, J. W; JUNG H. G; MASOUD, S. A. Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of L-phenylalanine ammonialyase or cinnamate 4-hydroxylase. *Plant Physiology*, V.115, p.41–50, 1997.
- SCHOCH, G; GOEPFERT, S; MORANT, M; HEHN, A; MEYER, D. CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3O-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway. *J. Biol. Chem*, V.276, p.36566–74, 2001.
- SEDEROFF, R. R. Building better trees with antisense, *Nature Biotechnology*, V.17, p.750-751, 1999.
- SHOWALTER, A. M. Structure and function of plant cell wall proteins, *The plant cell*, V. 5, p.9-23, 1993.
- STERJIADES R.; DEAN J. F. D.; ERIKSSON K. E. Laccase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) polymerizes monolignols. *Plant Physiology*, V.99, p.1162–1168, 1992.
- TAYLOR, N.T. & TAYLOR, E.L. **The biology and evolution of fossil plants**, Prentice-Hall, New Jersey, 1993, 981p.
- VANCE, C. P.; KIRK, T. K.; SHERWOOD, R. T. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, V.18, p.259-288, 1980.
- VEIGA, B. G.A.; ABREU, H. S.; MAJEROWICZ, N. PORTUGAL, C.; PINTO, V.C. Efeito do oxigênio sobre a formação da lignina de *Ipomoea batatas* em ambiente controlado, *Floresta e Ambiente*, V.6, n.1, p.59-64, 1999.
- WHETTEN, R. W.; MACKAY, J. J. & SEDEROFF, R.R. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annual Review of plant physiology and plant molecular biology*, V.49, p.585-609, 1998.
- YE, Z. H; KNEUSEL, R. E; MATERN, U; VARNER, J. E. An alternative methylation pathway in lignin biosynthesis in *Zinnia*. *Plant Cell*, V.6, p.1427-1439, 1994.
- ZHONG R.; HERBERT, W. M.; NEGREL, J.; YE, Z. Dual Methylation Pathways in Lignin Biosynthesis, *Plant Cell*, V.10, p.2033-2046, 1998.