

Plano de Trabalho

1. Dados do plano de trabalho:

Título do plano de trabalho: Análise de carboidratos e de enzimas do seu metabolismo em cultivares de *Panicum maximum*

Modalidade da Bolsa Solicitada: PIBIC

Projeto de Pesquisa vinculado: Metabolismo dos açúcares fermentáveis e lignina em cultivares caririenses de *Panicum maximum* (Jacq.) com potencial para a produção de bioetanol

2. Objetivos:

Geral:

Analisar o conteúdo de açúcares estruturais e não estruturais e estudar a atividade das principais enzimas que controlam seu metabolismo em cultivares e ecótipos de *Panicum maximum* para avaliar seu potencial como matéria-prima na produção de álcool.

3. Metodologia

3.1 Material biológico

No presente trabalho serão usadas sementes da espécie *Panicum maximum* (Jacq.) da cultivar melhorada Mombaça doada pela Embrapa Semiárido e de ecótipos nativos dos municípios de Assaré da região Cariri do Ceará.

3.2 Condições de cultivo e coletas

O substrato para o cultivo das gramíneas será constituído de areia de textura média, a qual será lavada com abundante água corrente para retirar o excesso de sais e secada ao ambiente por um período de no mínimo sete dias. Após a secagem, a areia será colocada em vasos com capacidade para 5 litros e umedecida com água destilada até atingir 70% da capacidade de campo. Feito isto, os vasos serão colocados em casa de vegetação com luminosidade, temperatura e umidade relativa do ar naturais, e em seguida, usados para realizar a semeadura. Após esterilização com álcool por dois minutos, grupos de 10 sementes serão colocados em seis pontos equidistantes sobre a superfície do substrato e deixados para germinar e crescer por duas semanas. Até o décimo segundo dia as plantas serão irrigadas com água destilada e, posteriormente, com solução nutritiva de Hoagland de 1/3 de força iônica, em dias alternados. No décimo quarto dia, será realizado um desbaste para deixar seis plantas de tamanho uniforme por vaso. As plantas serão cultivadas nessas condições ao longo de todo o experimento, sendo coletadas aos 45º e 90º dia de cultivo para as respectivas análises.

Para verificar o efeito da deficiência hídrica, as condições de cultivo e tempos de coleta serão as mesmas como descrito acima. O nível de deficiência hídrica no solo será equivalente a 35% da capacidade de campo e será aplicado após um mês de iniciado o cultivo.

O total de água diário perdido por evaporação será calculado a partir da perda de água observada em vasos com areia e sem plantas (brancos). Quando necessário, a reposição de água será corrigida com valor equivalente a perda devida à transpiração. A água será repostada diariamente e de forma parcelada em quatro horários distintos.

3.3 Determinação de açúcares

3.3.1 Preparação de extratos etanólicos e quantificação de açúcares solúveis

Açúcares solúveis serão determinados em extratos etanólicos preparados a partir de folhas e colmos. Serão determinados açúcares solúveis totais pela reação com fenol/H₂SO₄ (Dubois *et al.*, 1956); glicose, pela reação com sulfato de cobre e arsenomolibdato; frutose, pela reação com resorcinol em meio ácido; e sacarose pela reação com antrona em meio alcalino, como descrito por Liu *et al.* (2008). O conteúdo dos açúcares será expresso em $\mu\text{mol.g}^{-1}$ MF.

3.3.2 Extração e quantificação de polissacarídeos

O material remanescente da preparação dos extratos etanólicos será utilizado para a determinação sequencial de amido e celulose. O amido será extraído com ácido perclórico e quantificado pela quantidade de glicose liberada após hidrólise com antrona como descrito no item 3.4.1.

Para a determinação dos polissacarídeos estruturais da parede celular, o resíduo remanescente será submetido a uma dupla extração com ácido sulfúrico de acordo com Theander *et al.* (1995). Aliquotas da segunda extração ácida será usada para a determinação de celulose (glicose), a qual será hidrolisada e quantificada espectrofotometricamente pela sua reação com antrona a 620 nm.

Paralelamente, o método descrito por Updegraff (1969) para a quantificação de celulose será usado com o intuito de comparar os resultados com os da metodologia anterior.

3.4 Ensaios enzimáticos

3.4.1 Invertase da parede celular

O estudo desta enzima será realizado de acordo com o método descrito por Weber *et al.* (1995).

3.4.2 Sintase da sacarose

Para a extração e determinação da atividade desta enzima será utilizado o método descrito por Coleman *et al.* (2009).

3.4.3 Sintase da sacarose fosfato

A atividade desta enzima será determinada pelo método de Stitt *et al.* (1998).

3.5 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento do experimento com cultivares de *Panicum maximum* sob condições controle e de deficiência hídrica no solo será inteiramente casualizado com um arranjo fatorial (2 x 2 x 2), correspondendo a dois materiais (assaré – variedade crioula e mombaça – variedade melhorada), dois tempos de coleta (aos 45 e 90 dias de cultivo) e dois níveis de umidade (70 e 35% de capacidade de campo). Cada cultivar será analisada através de seis repetições (uma repetição = um vaso), sendo cada repetição constituída por seis plantas.

Os dados serão sujeitos à análise de variância (ANOVA) e serão comparados usando-se o teste de Tukey a 5% de significância. Os resultados serão apresentados como a média \pm erro padrão.

4. Plano de atividades

MÊS	ATIVIDADE
1	Colheita de cultivares naturalizadas
1,2,3,4	Instalação, acompanhamento e coleta dos experimentos com cultivares melhoradas e naturalizadas
4,5,6,7,8	Preparação de extratos para análise de açúcares
8,9,10,11	Preparação de extratos e análises enzimáticas
11	Processamento de dados e análise estatística.
12	Preparação de resumos para eventos científicos e elaboração de relatório final.