

Plano de Trabalho

1. Dados do plano de trabalho:

Título do plano de trabalho: Crescimento e análise do metabolismo da lignina 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 crescimento, o conteúdo de lignina e da 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 Quantificação de lignina

A lignina será quantificada a partir do resíduo remanescente da hidrólise ácida pela reação com brometo de acetila (Fukushima *et al.*, 2015).

3.4 Ensaio enzimáticos

3.4.1 Fenilalanina amônio liase (PAL)

A atividade da PAL será quantificada de acordo com o método de Kelij *et al.* 2013). Amostras (300 mg) de folhas e colmos frescos serão homogeneizadas em tampão Tris-HCl pH 8,8, 15 mM β -mercaptoetanol. O homogenato será centrifugado a 12.000 g por 30 min e o sobrenadante utilizado para o ensaio enzimático. Em seguida, 1 mL do tampão de reação Tris-HCl pH 8,8, 0,5 ml de 10 mM L-fenilalanina, 0,35 mL de água bidestilada e 0,15 mL do sobrenadante serão incubados por 1 h em banho-maria a 37 °C. Em seguida, a reação será parada adicionando 0,5 ml de HCl 6 M. O produto será extraído com acetato de etila puro, e em seguida, evaporado em capela de exaustão de ar. O resíduo sólido é suspenso em 3 ml de NaOH 0,05 M e a quantidade de ácido cinâmico será quantificada espectrofotometricamente a 290 nm.

3.4.2 Peroxidase da parede (POD)

Para a determinação da atividade da POD será usado o método descrito por Campos & Silveira (2003). Amostras de folhas e colmos (200 mg) serão homogeneizadas em 10 mL de tampão fosfato 50 mM pH 7,0, 1 mg de PVP10. O homogeneizado será filtrado e centrifugado a 4000 g por 20 min. 1,5 mL do extrato serão misturados em vortex com 2,5 mL do tampão fosfato-citrato pH 5,0 (fosfato de sódio dibásico 0,2 M e ácido cítrico 0,1 M), 0,25 mL de 0,5% guaiacol. Em seguida, será adicionado 0,25 mL de 3% H₂O₂. A mistura será incubada a 30 °C durante 15 min. A reação será parada em banho de gelo e, em seguida, será adicionado 0,25 mL de 2% metabissulfito de sódio, permanecendo a amostra em repouso por 10 min. A absorbância do produto da reação, o tetraguaicol, será feita a 450 nm.

3.4.3 Lacase

A enzima lacase será extraída e ensaiada de acordo com o método descrito por Richardson *et al.* (2000). Amostras de folhas e colmos (200 mg) serão homogeneizadas em frio com tampão MOPS 25 mM pH 7,0, 0,5% (v/v) PVP, 0,5 mM PMSF. Os resíduos insolúveis serão novamente homogeneizados no mesmo tampão sem a inclusão de PVP e PMSF. O filtrado será descartado e o procedimento repetido três vezes. O resíduo insolúvel será homogeneizado com 25 mM MOPS pH 7,0, 200 mM CaCl₂ (tampão ConA) durante 1 h em banho de gelo e com agitação ocasional. A suspensão será filtrada em coluna de Sepharose/Concavalina-A e o material adsorvido será eluído com tampão ConA contendo 100 mM de α -metil manosídeo. A atividade da lacase será determinada espectrofotometricamente a 420 nm pela oxidação do ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) ou ABTS em tampão 100 mM acetato de sódio pH 5,0.

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 lignina |
| 8,9,10,11 | Preparação de extratos e análises enzimáticas do metabolismo da lignina |
| 11 | Processamento de dados e análise estatística. |
| 12 | Preparação de resumos para eventos científicos e elaboração de relatório final. |