



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CARIRI**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DA BIODIVERSIDADE**  
**CURSO DE AGRONOMIA**

**Dados do projeto de pesquisa**

**Título do projeto de pesquisa**

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

**Grande área/área:** Ciências Agrárias/Fisiologia de Plantas Cultivadas

**Grupo de pesquisa vinculado ao projeto:** Fisiologia e Bioquímica do Estresse em Plantas

**Linha de pesquisa do grupo:** Gramíneas tropicais como fonte de bioetanol

**Categoria do projeto:** projeto novo, ainda não avaliado

**Palavras-chave:** *Panicum maximum*, biocombustíveis, parede celular.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Biocombustíveis lignocelulósicos: o etanol**

A demanda por combustíveis e energia tem incrementado em decorrência do aumento da população mundial e da melhoria nos padrões e qualidade de vida, causando impactos negativos no meio-ambiente local e global. Em tal sentido, propostas para a produção e consumo de energias “limpas” a partir de fontes alternativas e sustentáveis têm recebido bastante atenção (Agarwal *et al.*, 2014). O uso de biocombustíveis, produzidos a partir da biomassa vegetal, tem um papel importante na solução desses problemas e vem sendo adotado em muitos países (Solomon, 2010).

Nos últimos anos, no entanto, a produção de biocombustíveis, denominados de *primeira geração*, obtidos a partir do caldo sacarino e amido, tem sofrido fortes críticas, pois sua obtenção poderia colocar em risco a produção de alimentos, aumentar os preços das *commodities* agrícolas e, ser ineficaz em relação à redução da emissão de gases com efeito estufa. Ainda que alguns dos biocombustíveis produzidos atualmente tenham bom desempenho no que se refere à sustentabilidade econômica e ambiental, o foco dos debates se dá em torno dos biocombustíveis de *segunda geração*, os quais são obtidos a partir da biomassa não-comestível (biomassa lignocelulósica). Estes têm a vantagem de eliminar, em menor quantidade, substâncias poluentes ou com efeito estufa e prometem reduzir os custos e demandas com a produção dos combustíveis fósseis (Eisentraut, 2010).

A biomassa pode ser utilizada na fabricação de quatro tipos principais de biocombustíveis: etanol, metanol, biodiesel e hidrogênio (Solomon, 2010), sendo o primeiro, o principal biocombustível em termos de produção mundial. Segundo a

Renewable Fuels Associations (RFA, 2017), no ano 2017, a produção mundial de etanol atingiu um total de aproximadamente 98 bilhões de litros, sendo o Brasil, o segundo maior produtor, com mais de 26 bilhões de litros produzidos. Deste total nacional, segundo a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis ANP (2018), a região Nordeste contribuiu com aproximadamente 1,5 bilhões de litros (5% do total nacional). Os dados mostram também que a participação do estado do Ceará nesta atividade foi nula. O último registro de produção de etanol no Ceará data do ano de 2016, quando foram produzidos apenas 5 milhões de litros (0,02% do total nacional). Até o momento, de acordo com dados do portal *novaCana.com* (NovaCana, 2018), existe somente uma única usina de açúcar e etanol em operação no Ceará. Estes dados mostram que o estado do Ceará importa praticamente todo o etanol combustível de estados vizinhos, encarecendo o preço final ao consumidor.

A principal rota industrial para produzir o etanol é a fermentação alcoólica através do uso da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Durante este processo, açúcares (especialmente glicose e frutose, mas também sacarose, maltose, galactose e amido) são convertidos em etanol, energia, CO<sub>2</sub>, biomassa celular e outros subprodutos (Lopes *et al.*, 2016; Schöler e Schüller, 1994). A tecnologia para produção de bioetanol de *primeira* e *segunda geração* tem mostrado potencial em escala industrial. As matérias-primas baseadas em caldo sacarino requerem somente de um processo de extração para obter a solução açucarada; enquanto que as baseadas em amido necessitam, primeiro, passar por um processo de hidrólise para converter o amido em glicose. A biomassa lignocelulósica também deve ser hidrolisada para obtenção dos açúcares fermentáveis, porém tratamentos prévios devem ser utilizados para modificar sua estrutura macro e microscópica, remover os polímeros de lignina e hemiceluloses da matriz da parede, diminuir a cristalinidade da celulose e aumentar a área superficial e porosidade da biomassa (Zabed *et al.*, 2017).

Os processos industriais de fermentação apresentam rendimentos que variam de 85% a 93% com tempos de fermentação de 6 a 60 h, e o rendimento de etanol obtido pode atingir entre 7–12% (v/v) do total de biomassa usada. Por ser um processo biológico, o rendimento da fermentação está sujeito a diversos fatores físicos, químicos e biológicos que influenciam na quantidade e qualidade do produto final. No que diz respeito das características da biomassa fermentável, a presença de maior conteúdo de celulose, baixos teores de lignina e hemiceluloses, e redução da cristalinidade são atributos desejáveis para aumentar a eficiência no processo de fermentação.

## 1.2 A parede de células vegetais

Muitos produtos como alimentos, vestido, insumos para construção e energia, fornecidos pelas plantas, são gerados a partir dos componentes da parede celular, a qual se trata de uma matriz extracelular rica em polissacarídeos, caracterizada pela sua complexidade, dinâmica estrutural e resistência. Nas últimas décadas, a obtenção de biocombustíveis a partir da biomassa vegetal (maioritariamente formada por parede celular) tem concentrado muita atenção por se tratar de um tipo de energia renovável e ecologicamente “limpa”. O etanol é produzido a partir da degradação enzimática dos polissacarídeos formadores da parede celular, cujas unidades monoméricas e diméricas liberadas constituem uma fonte importante de açúcares fermentáveis. Portanto, as paredes de células vegetais são de enorme interesse para a biotecnologia, já que a manipulação da

síntese desta estrutura das plantas e sua remodelagem têm um grande impacto para melhorar o rendimento de culturas e manter uma produção contínua de biocombustíveis.

Quimicamente, as paredes de células vegetais são compostas de três classes principais de polissacarídeos: celulose, hemiceluloses, pectinas e o polímero de fenóis, lignina. A composição destes polímeros estruturais varia entre as paredes celulares primária e secundária, entre os tecidos da uma planta e entre espécies diferentes. Além dessas macromoléculas, encontram-se também proteínas com função estrutural e de defesa.

Durante o crescimento da planta, uma intensa atividade metabólica sobre os componentes da parede celular ocorre, a qual se dá em ciclos repetitivos que levam ao incremento de pressão de turgidez, relaxamento do estresse da parede, e finalmente, à expansão do volume celular (Taiz e Zeiger; 2009; Salisbury e Ross; 2012). Autores têm salientado que para incrementar o crescimento vegetal e a biomassa para a produção de biocombustíveis, é necessário um melhor entendimento e caracterização dos genes responsáveis pela biossíntese dos componentes da parede celular e dos elementos reguladores (fitohormônios) que contralam a formação e arquitetura da parede (Joshi *et al.*, 2018; Rai *et al.*; 2016).

A celulose é o principal constituinte das paredes celulares e contribui maioritariamente à biomassa dos tecidos aéreos da planta. A estrutura consiste de um polímero linear de unidades de D-glicose, unidas por ligações glicosídicas  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4. Cada cadeia é sintetizada individualmente e se organizam lado a lado, através de ligações de hidrogênio intercadeias e de forças de van der Waals para formar feixes para-cristalinos de cerca de 36 cadeias, denominados *microfibrilas*.

A maquinaria enzimática que monta as cadeias de celulose, o *complexo celulose sintase* (CSC), atravessa a membrana plasmática, com uma parte posicionada para o citosol que liga o substrato UDP-glicose e um domínio que se projeta para o apoplasto, responsável pelo alongamento e cristalização das moléculas de celulose (Nelson; Cox, 2011). Além da sintase da celulose, diversas outras proteínas fazem parte do CSC, como aquelas que ancoram o complexo aos microtúbulos corticais; proteínas semelhantes à celulose sintase envolvidas na síntese e liberação de outros glucanos e proteínas requeridas para aliviar o estresse tensional durante a síntese da celulose (McFarlane *et al.*, 2014).

As sintases da celulose (CesAs) pertencem à superfamília das glicosiltransferases 2, as quais apresentam oito segmentos transmembranares; e um motivo conservado, D,D,D,QXXRW, posicionado no *loop* entre os segmentos transmembranares segundo e terceiro. Os dois primeiros resíduos de ácido aspártico ligam o substrato UDP-glicose; o terceiro fornece o sítio catalítico para a extensão da cadeia de celulose; e a sequência QXXRW atua com um sítio de ligação para o resíduo terminal da cadeia. De acordo com modelos bacterianos, a síntese de celulose ocorre pela adição, uma a uma, de unidades de UDP-glicose à extremidade terminal não-redutora. Sequências conservadas também presentes nos segmentos transmembranares segundo e terceiro, e o domínio “dedos de zinco” na região N-terminal estão envolvidas na multimerização (formação da estrutura em roseta) das CesA e na interação com proteínas regulatórias. A caracterização *in vitro* da atividade da sintase da celulose tem sido bastante difícil. Entretanto, vários fatores intracelulares influenciam na velocidade de síntese da celulose, principalmente o

fornecimento do substrato UDP-glicose. A UDP-glicose pode ser fornecida pela enzima sintase da sacarose (Susy) ou pela ação combinada das enzimas invertase citosólica e UDP-glicose pirofosforilase. Esta hidrólise é o passo inicial ao metabolismo da glicose, armazenamento ou canalização para a formação da parede celular.

As invertases são as enzimas mais importantes da quebra da sacarose e catalisa a ruptura irreversível da sacarose em frutose e glicose. As isoformas citosólicas não são glicosiladas e tem um ótimo de pH alcalino. A glicose produzida é convertida em glicose-1P, sobre a qual age a enzima UDP-glicose pirofosforilase produzindo UDP-glicose. Diferentemente desta enzima, a Susy é uma enzima encontrada em tecidos não-fotossintéticos e está envolvida na síntese de amido em tecidos de armazenamento; no entanto, isoformas associadas à membrana plasmática tem um papel importante na síntese de celulose e calose. A importância destas enzimas na formação da parede celular tem sido observado em plantas transgênicas de álamo expressando o gene *Susy* isolado de algodão, as quais apresentam um nível maior de celulose em seus tecidos vasculares (Coleman *et al.*, 2009). Por outro lado, análises de transcritos em folhas de *Panicum maximum* comprovaram a expressão de dois transcritos representativos de UDP-glicose pirofosforilase e três transcritos representativos da Susy; contudo genes que codificam para invertases não foram observados nestes tecidos (Toledo-Silva *et al.*, 2013). A expressão destes genes nos tecidos aéreos apoiaria a ideia do estudo dos mesmos em relação a suas atividades enzimáticas.

As hemiceluloses são polissacarídeos ramificados compostos da mistura de açúcares de 5 e 6 carbonos e podem ser extraídos com soluções alcalinas (Heldt e Piechulla, 2011). Sua função é interligar as fibras de celulose e, possivelmente, também as pectinas, contribuindo à integridade estrutural dos tecidos aéreos (Milano *et al.*, 2018). Em monocotiledôneas, o componente primário é um xilano (polímero de xilose); enquanto que em dicotiledôneas é o xiloglucano, polímero de glicose com ramificações contendo o açúcar xilose (Milano *et al.*, 2018; Tenhaken, 2015). Os arabinoxilanos são particularmente abundantes em gramíneas, como trigo e cevada, e consistem de um esqueleto  $\beta$  D 1 $\rightarrow$ 4 xilano com ramificações de arabinose. Outros resíduos como ácido glucorônico e ésteres de ácido ferrúlico estão presente nessas hemiceluloses de gramíneas (Cosgrove, 2005). Uma análise da composição/conteúdo de xilano entre várias espécies de gramíneas mostrou que este chega a ser bastante semelhante. Uma das preocupações na produção de etanol é melhorar a proporção de hexoses em relação às pentoses, dado que tem se demonstrado que isto facilitaria a desconstrução da parede celular e melhoraria a produção de álcool (Rai *et al.*, 2016).

A superfamília *CSL* (*celulose synthase like*) que inclui oito famílias de genes, além da *CESA*, codifica para proteínas com domínios característicos das  $\beta$ -glicosiltransferases, mas carecem da região N-terminal que contem o domínio “dedos de zinco”. Estas proteínas (sintases) são consideradas as responsáveis pela formação dos esqueletos de  $\beta$ -D-glicanos das hemiceluloses, tais como xiloglucanos, xilanos, mananos e outros que estão presentes nas paredes celulares (Cosgrove, 2005). Outras enzimas biossintéticas de moléculas de xilano e xiloglucanos são: as xiloglucano  $\alpha$ -1,6-xilosiltransferases, as xiloglucano fucosiltransferases e as xiloglucano galactosiltransferase, as quais têm sido identificadas no genoma de sorgo (Rai *et al.*, 2016).

Tem sido observado que o radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) afrouxa a parede celular pela remoção não enzimática de átomos de hidrogênio dos polissacarídeos, estimulando o alongamento da célula (Cosgrove, 2005). Peroxidasas associadas à parede celular estariam envolvidas na formação deste radical a partir do ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. Entretanto, a ação das peroxidasas pode reforçar as propriedades mecânicas da parede celular, devido ao seu envolvimento na formação de ligações cruzadas entre os diferentes polímeros da parede. Tem-se apontado que esta atividade seria responsável pela esterificação do ácido ferrúlico aos polímeros hemicelulósicos de arabinoxilanas, o qual resultaria na redução do crescimento vegetal (Tenhaken, 2015). Interessantemente, estas enzimas são reguladas também sob condições de estresse hídrico; contudo, nessa situação, seu papel parece estar mais envolvido com a remoção de radicais livres do que com a modificação da parede celular. Em estudos de transcritos em folhas de *Panicum maximum*, observou-se que as reações de desidrogenação seriam completamente executadas por estas enzimas (Toledo-Silva, 2013). Enzimas com reações similares, como as lacases, não foram detectadas.

A lignina é um polímero presente na parede secundária de células vegetais, sintetizada a partir dos álcoois cinamílicos: coniferil (G), sinapil (S) e coumaril (H), coletivamente chamados de monolignóis. Estes álcoois são formados pela redução dos precursores ácidos ferrúlico, sinápico e coumárico, respectivamente. De modo geral, as reações de redução usam NADPH, o qual é ativado via a formação de um tioéster com Coenzima A (CoA), às custas de moléculas de ATP. A clivagem da ligação tioéster de alta energia dirige a redução do grupo carboxílico a aldeído. Em uma reação subsequente, o NADPH é novamente o agente redutor (Heldt e Piechulla, 2011). Após sua síntese, os monolignóis são transportados para a parede celular, onde a lignina é formada pela desidrogenação destas moléculas associada com enzimas lacases e peroxidasas (Toledo-Silva *et al.*, 2013). A relação destes precursores dentro do polímero de lignina varia entre as diferentes espécies, sendo que em gramíneas, as unidades H são as mais prevalentes (Rubin, 2008).

A lignina se une às celulosas e hemicelulosas através de ligações éster e éter com auxílio do ácido ferrúlico. Considera-se que esta ligação trate-se de um fator limitante para a conversão da biomassa vegetal em biocombustíveis, devido a que ela deve ser separada da celulose com o uso de tratamentos químicos severos que demandam gastos energéticos e problemas ambientais. Uma redução na concentração de lignina teria, portanto, algum efeito positivo para o uso de gramíneas como matéria-prima de álcool. Hu *et al.* (1999) mostraram que a supressão do gene *4CL* que codifica para a enzima ligase do 4-coumarato-CoA em *Populus tremuloides* resultou na redução dos níveis de lignina em 45% e esta redução foi compensada por um 15% no incremento de celulose. Os autores observaram que o crescimento das plantas transgênicas foi substancialmente aumentado e que a integridade estrutural foi mantida tanto a nível estrutural como a nível da planta inteira. Por outro lado, tem sido observado que os teores de lignina tendem a aumentar em plantas submetidas a estresse hídrico, como uma resposta a manter a integridade da parede e a desenvolver maiores pressões de turgidez. Entretanto, estudos de análises de transcritos em plantas de *Panicum virgatum* submetidas a episódios alternados de estresse hídrico mostraram mudanças significativas na expressão de genes da síntese de fenilpropanóides (Zhang *et al.*, 2018), importantes para a síntese de lignina. Genes como *PvPAL1* e *PvCCoAOMT* que codificam para a fenilalanina amônio liase e cafeoil CoA metiltransferase tem sua expressão reduzida durante eventos iniciais de estresse hídrico,

porém incrementada em episódios tardios. O entendimento dessa regulação pode levar a um melhor aproveitamento da biomassa usada para a produção de álcool a partir de plantas com menores níveis de lignina.

Outro constituinte importante das paredes celulares são as pectinas, um grupo complexo e heterogêneo de polissacarídeos formados pelo açúcar ácido D-galacturonato, os quais são conectados por ligações glicosídicas  $\alpha 1 \rightarrow 4$ . Alguns dos grupos carboxílicos estão esterificados a grupos metil; enquanto outros encontra-se livres e estão unidos ao  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{+2}$ . As pectinas funcionam como uma “cola” que une células vizinhas; porém esta união pode ser desfeita durante o crescimento da célula. Baseado nos açúcares presentes nas suas ramificações, três classes de pectinas são conhecidas em plantas: homogalacturonanos (HG), ramanogalacturonanos I (RG-I) e ramanogalacturonanos II (RG-II).

As pectinas são frequentemente modificadas em plantas submetidas à deficiência hídrica. Em estudos com duas cultivares de trigo com tolerância diferencial ao estresse hídrico, observou-se o incremento nas cadeias laterais dos polímeros pectínicos RG-I e RG-II, possivelmente devido a que as pectinas formam um gel hidratado o qual limita o dano celular (Leucci *et al.*, 2008).

Estas moléculas contribuem também com a biomassa recalcitrante para a produção de álcool devido às numerosas ligações que formam com outros polímeros da matriz (Rai *et al.*, 2016). Porém não tem sido verificada sua contribuição para a produção de álcool devido à baixa concentração em que se encontra na parede celular.

### 1.3 *Panicum maximum* (Jacq.)

O capim panicum (família Poaceae) é uma gramínea perene, com fotossíntese tipo C4 e tolerância a ambientes secos e de temperatura elevada. Uma classificação baseada na variabilidade morfológica e agrônômica encontrada na espécie, a divide nos grupos de *porte alto/médio*, com alturas superiores a 1,5 m; e as de *porte menor*, com alturas inferiores a 1,5 m (ACIAR - Australian Center for International Agricultural Research, 2019). A potencialidade do capim *Panicum* como fonte alternativa de biomassa para a produção de álcool tem sido reconhecida em vários trabalhos (Fernandes *et al.*, 2014; Jank *et al.*, 2013).

*Panicum maximum* é uma das gramíneas mais abundantes no cariri cearense e encontra-se distribuída nos três tipos climáticos (tropical quente semi-úmido, tropical quente semiárido brando e quente semiárido) descritos para a região. As condições climáticas e de solo prevalentes nesses ambientes são diferentes entre si e podem influenciar nas características biológicas e na adaptação à baixa umidade do solo da região desses materiais. Materiais com boa produção de massa e adaptados à deficiência hídrica podem ser coletados desses ambientes e usados como matéria-prima para a produção de etanol.

Estudos visando estabelecer diferenças na massa da parte aérea, crescimento da folha, número de perfilhos e parâmetros fisiológicos como a transpiração entre ecótipos de capim *Panicum* coletados em municípios localizados em cada região climática demonstraram não haver diferenças significativas nestes parâmetros. Algumas cultivares com aquelas encontradas em municípios como Assaré e Caririaçu têm uma elevada produção de biomassa, semelhante com aquela observada em cultivares melhoradas (dados não

apresentados). No entanto, diferenças nos teores de carboidratos solúveis e celulose foram constatadas. Por exemplo, as cultivares melhoradas, tais como Mombaça e Tanzânia tem conteúdo bastante elevado de celulose em todos os tecidos da parte aérea; porém, os teores de sacarose e açúcares redutores são baixos. Em contraste, cultivares naturalizadas como aquela coletada no município de Assaré – Ceará têm padrões de acúmulo de açúcares estruturais e não estruturais oposto. Estes dados sugerem que o perfil de carboidratos característico nas cultivares citadas se deva a diferenças na atividade de enzimas envolvidas com a síntese destas moléculas. Análises de transcritos de folhas em quatro cultivares de *Panicum maximum* identificaram 21 transcritos da sintase da celulose A (CesA), 3 transcritos da Sintase da Sacarose (Susy), dois transcritos da pirofosforilase da UDP-glicose (UGPase) e quatro transcritos da  $\beta$ -glucosil transferase do esterol (Toledo-Silva *et al.*, 2013). Nas condições de crescimento em que foram analisadas as plantas, os autores não identificaram genes da enzima invertase. Para a síntese de lignina, foram identificados transcritos envolvidos com a formação dos monolignóis (unidades de guaicil, siringil e p-hidroxifenil) e com reações de hidrogenação catalisadas por enzimas peroxidases, mas não por lacases.

Análises de expressão gênica em *P. maximum* sob condições de estresse hídrico não têm sido realizados; contudo, têm sido conduzidos experimentos com outras espécies do mesmo gênero (*P. virgatum*), nas quais se verificou que um grupo importante de genes ativado durante o estresse hídrico são aqueles envolvidos com a síntese de lignina e cuja expressão se incrementa ainda mais quando a planta é exposta a outros episódios de estresse hídrico após o inicial (Zhang *et al.* 2018). A concentração elevada de lignina é tida como um fator limitante para a produção de etanol; por tanto, cultivares que menor quantidade de estas substâncias ajudaria a superar este obstáculo que dificulta a produção de etanol. Quantificação de lignina nas cultivares caririenses estão sendo conduzidas.

## 2 OBJETIVOS E METAS A SEREM ALCANÇADOS

### 2.1 Objetivo geral:

Analisar o conteúdo de açúcares estruturais e não estruturais e de lignina 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.

### 2.2. Objetivos específicos

- a. Quantificar os teores dos açúcares solúveis glicose, frutose e sacarose em folhas e caules de ecótipos e cultivares de capim panicum
- b. Quantificar os teores de amido e celulose em folhas e caules de ecótipos e cultivares de capim panicum.
- c. Quantificar os teores de lignina em folhas e caules de ecótipos e cultivares de capim panicum.
- d. Avaliar as atividades das enzimas do metabolismo dos carboidratos em folhas e caules de ecótipos e cultivares de capim panicum.

## 2.3 Metas

- a. Consolidar uma linha de pesquisa na área de bioquímica de carboidratos de importância tecnológica no Centro de Ciências Agrárias e da Biodiversidade (CCAB - Curso de Agronomia) da Universidade Federal do Cariri.
- b. Valorizar recursos naturais encontrados no cariri cearense.
- c. Contribuir na formação de recursos humanos (alunos de iniciação científica).
- d. Publicar um artigo completo em revista científica indexada, bem como resumos simples e expandidos em congressos e/ou reuniões.

## 3. METODOLOGIA A SER UTILIZADA

### 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 45° e 90° 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 Medidas de crescimento



A massa fresca (MF) de folhas, colmos e raízes será determinada pela pesagem em balança semianalítica.

### **3.4 Determinação de açúcares**

#### **3.4.1 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/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (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.

#### **3.4.2 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.

### **3.5 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).

### **3.6 Ensaios enzimáticos**

#### **3.6.1 Invertase da parede celular**

O estudo desta enzima será realizado de acordo com o método descrito por Weber *et al.* (1995). Para a extração da enzima, 200 mg de folhas e colmos frescos serão homeogeneizados em 20 mM acetato de sódio a pH 5.2 por 10 minutos e, em seguida, centrifugados a 18.000 g por 20 minutos. O precipitado será ressuspenso no tampão de extração e usado para a determinação das invertases ácidas associadas à parede celular. 200  $\mu\text{L}$  deste extrato será misturado com 200  $\mu\text{L}$  do tampão 50 mM ácido cítrico-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 4.5, 100 mM sacarose. Após a incubação por 30 min a 30°C, a reação será parada em

banho-maria a 100°C por dois minutos. Uma alíquota da suspensão será usada para a determinação de açúcares redutores de acordo com a reação descrita por Miller (1959).

### 3.6.2 Sintase da sacarose

Para a extração e determinação da atividade desta enzima será utilizado o método descrito por Coleman *et al.* (2009). 200 mg de folhas e colmos frescos serão homogeneizados com 1 g PVPP e 4 vol de tampão de extração 50 mM Hepes-KOH pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 5 mM ácido  $\epsilon$ - amino caproico, 0,1% Triton X100 (v/v), 10% glicerol (v/v). As amostras serão centrifugadas a 14.000 g durante 20 min a 4°C. Os extratos serão desalinizados em uma coluna cromatográfica DG 10 (BioRad) previamente equilibrada com o tampão de extração sem a inclusão do Triton X100 e PVPP. Os efluentes serão coletados em tubos de microcentrífuga resfriados e ensaiados imediatamente. O ensaio da sacarose sintase será determinado na direção da ruptura da molécula usando 50  $\mu$ L do extrato vegetal. O conteúdo de frutose liberada será determinado pela reação com resorcinol em meio ácido como descrito por Liu *et al.* (2008).

### 3.6.3 Sintase da sacarose fosfato

A atividade desta enzima será determinada pelo método de Stitt *et al.* (1998). As amostras (200 mg de tecido fresco de folhas e colmos) serão homogeneizadas em tampão de extração 50 mM MOPS pH 6,9, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2% PVP, 4 mM DTT, 0,02% BSA. Após centrifugação, uma alíquota de 50  $\mu$ L do extrato será adicionada a 150  $\mu$ L do tampão de ensaio 50 mM Hepes pH 7,1, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM frutose-6-fosfato, 20 mM glicose-6-fosfato, 3 mM UDP-glicose, 0,02% BSA e incubada por 20 min a 30°C. A reação será parada em banho-maria a 100°C. Uma alíquota (100  $\mu$ L) do extrato será adicionado a 1 mL do tampão de ensaio 100 mM Tris pH 8,1, 0,5 mM PEP, 0,15 mM NADH, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 1,25  $\mu$ g por cada 10 mL de desidrogenase de lactato ligada a NAD, 62,5  $\mu$ g por cada 10 mL de quinase do piruvato. A amostra será incubada a 37°C por 30 min e sua absorbância lida a 340 nm. Os extratos serão ensaiados para verificar a degradação do UDP.

### 3.6.4 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  $\beta$ -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.

### 3.6.5 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% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 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.

### 3.6.6 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 CaCl<sub>2</sub> (tampão ConA) durante 1 h em banho de gelo e com agitação ocasional. A suspensão será filtrada em coluna de Sepharose/ Conavalina-A e o material adsorvido será eluído com tampão ConA contendo 100 mM de  $\alpha$ -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.

### 3.7 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.

### 5 Principais contribuições científicas, tecnológicas ou de inovação da proposta

Através da análise composicional dos polímeros da parede celular e outros açúcares e da atividade de enzimas que controlam seu metabolismo, espera-se inicialmente identificar cultivares promissoras como matéria-prima para a produção de etanol. O capim estudado é bastante presente na região do Cariri no Ceará e, certamente, alguns ecótipos podem ser mais produtivos e adaptados às condições climáticas encontrados nesse lugar. Identificar esses ecótipos/cultivares pode futuramente contribuir à produção industrial de bioetanol e elevar a matriz energética do Estado que depende fortemente deste recurso.

### 6 CRONOGRAMA

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 e lignina
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.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACIAR – Australian Center for International Agricultural Research. [www.aciar.gov.au](http://www.aciar.gov.au)

AGARWAL, A. K.; PANDEY, A.; GUPTA, A. K.; AGGARWAL, S. K.; KUSHARI, A. (ORGS.). **Novel Combustion Concepts for Sustainable Energy Development**. New Delhi: Springer India, 2014.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. [www.anp.gov.br](http://www.anp.gov.br)

CAMPOS, Â. D.; SILVEIRA, E. M. D. L. Metodologia para determinação da peroxidase e da polifenol oxidase em plantas. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**, p. 2–4, 2003.

COLEMAN, H. D.; YAN, J.; MANSFIELD, S. D. Sucrose synthase affects carbon partitioning to increase cellulose production and altered cell wall ultrastructure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 31, p. 13118–13123, 2009.

COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 11, p. 850–861, 1 nov. 2005.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, mar. 1956.

EISENTRAUT, A. **Sustainable Production of Second-Generation Biofuels**. Paris: OECD Publishing, 2010.

FERNANDES, F. D.; RAMOS, A. K. B.; JANK, L.; *et al.* Forage yield and nutritive value of Panicum maximum genotypes in the Brazilian savannah. **Scientia Agricola**, v. 71, n. 1, p. 23–29, 2014

FUKUSHIMA, R. S. *et al.* Comparison of acetyl bromide lignin with acid detergent lignin and Klason lignin and correlation with in vitro forage degradability. **Animal Feed Science and Technology**, v. 201, p. 25–37, 2015.

HELDT, H. W.; PIECHULLA, B.; HELDT, F. **Plant Biochemistry**. 2005.

HU, W.-J. *et al.* Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. **Nature Biotechnology**, v. 17, n. 8, p. 808–812, 1 ago. 1999.

JANK, L.; DE LIMA, E. A.; SIMEÃO, R. M.; ANDRADE, R. C. Potential of *Panicum maximum* as a source of energy. **Tropical Grasslands – Forrajes Tropicales**, v. 1, p. 92–94, 2013.

JOSHI, R.; SINGLA-PAREEK, S. L.; PAREEK, A. Engineering abiotic stress response in plants for biomass production. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 14, p. 5035–5043, 2018.

KELIJ, S.; MAJD, A.; NEMATZADE, G. Phenylalanine Ammonialyase Gene Expression and Activity in Relation to Lignin Deposition in Salt Stressed *Aeluropus Littoralis*. **Advanced Studies in Biology**, v. 5, n. 9, p. 403–412, 2013.

LEUCCI, M. R. *et al.* Water stress and cell wall polysaccharides in the apical root zone of wheat cultivars varying in drought tolerance. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, n. 11, p. 1168–1180, jul. 2008.

LIU, H. *et al.* Transgenic salt-tolerant sugar beet (*Beta vulgaris* L.) constitutively expressing an *Arabidopsis thaliana* vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene, AtNHX3, accumulates more soluble sugar but less salt in storage roots. **Plant, Cell and Environment**, v. 31, n. 9, p. 1325–1334, 2008.

LOPES, M. L.; PAULILLO, S. C. DE L.; GODOY, A.; *et al.* Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 64–76, 2016. Sociedade Brasileira de Microbiologia.

MCFARLANE, H. E.; DÖRING, A.; PERSSON, S. The Cell Biology of Cellulose Synthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, n. 1, p. 69–94, 29 abr. 2014.

MILANO, E. R. *et al.* Quantitative trait loci for cell wall composition traits measured using near-infrared spectroscopy in the model C4 perennial grass *Panicum hallii*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2018.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, mar. 1959.

MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. D. F.; MARCONCINI, J. M. **Procedimentos para análise lignocelulósica**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2010.

MOREIRA-VILAR, F. C. *et al.* The acetyl bromide method is faster, simpler and presents best recovery of lignin in different herbaceous tissues than klason and thioglycolic acid methods. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NOVACANA. [www.novacana.com](http://www.novacana.com)

RAI, K. M.; THU, S. W.; BALASUBRAMANIAN, V. K.; *et al.* Identification, Characterization, and Expression Analysis of Cell Wall Related Genes in *Sorghum bicolor* (L.) Moench, a Food, Fodder, and Biofuel Crop. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. August, p. 1–19, 2016.

RICHARDSON, A.; DUNCAN, J.; MCDUGALL, G. J. Oxidase activity in lignifying xylem of a taxonomically diverse range of trees: identification of a conifer laccase. **Tree Physiology**, v. 20, n. 15, p. 1039–1047, 1 set. 2000.

RFA - Renewable Fuels Associations. <https://ethanolrfa.org>.

RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v. 454, n. 7206, p. 841–845, 2008.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Fisiologia das plantas**. 1. ed. ed. Cengage Learning, 2012.

SCHÖLER, A.; SCHÜLLER, H.-J. A carbon source-responsive promoter element necessary for activation of the isocitrate lyase gene ICL1 is common to genes of the gluconeogenic pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and cellular biology**, v. 14, n. 6, p. 3613–3622, 1994.

SOLOMON, B. D. Biofuels and sustainability. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1185, p. 119–134, 2010.

STITT, M. *et al.* Coarse control of sucrose-phosphate synthase in leaves: Alterations of the kinetic properties in response to the rate of photosynthesis and the accumulation of sucrose. **Planta**, v. 174, n. 2, p. 217–230, maio 1988.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

TENHAKEN, R. Cell wall remodeling under abiotic stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. January, p. 1–9, 2015.

THEANDER, O. *et al.* Total dietary fiber determined as neutral sugar residues, uronic acid residues, and Klason lignin (the Uppsala method): collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 78, n. 4, p. 1030–1044, 1995.

TOLEDO-SILVA, G. *et al.* De Novo Transcriptome Assembly for the Tropical Grass *Panicum maximum* Jacq. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1–10, 2013.

UPDEGRAFF, D. M. Semimicro determination of cellulose in biological materials. **Analytical Biochemistry**, v. 32, n. 3, p. 420–424, 1969.

VOGEL, K. P. *et al.* Quantifying Actual and Theoretical Ethanol Yields for Switchgrass Strains Using NIRS Analyses. **Bioenergy Research**, v. 4, n. 2, p. 96–110, 2011.

WEBER, H. Seed Coat-Associated Invertases of Fava Bean Control Both Unloading and Storage Functions: Cloning of cDNAs and Cell Type-Specific Expression. **the Plant Cell Online**, v. 7, n. 11, p. 1835–1846, 1995.

ZABED, H.; SAHU, J. N.; SUELY, A.; BOYCE, A. N.; FARUQ, G. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 71, n. December, p. 475–501, 2017. Elsevier.

ZHANG, C. *et al.* Transcriptional and physiological data reveal the dehydration memory behavior in switchgrass (*Panicum virgatum* L.). **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–22, 2018.