**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Caracterização do proteoma da parede celular de folhas e
entrenós jovens e maduros de cana-de-açúcar**

Juliana Guimarães Fonseca

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciência. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2014**

Juliana Guimarães Fonseca
Biotecnologista

**Caracterização do proteoma da parede celular de folhas e entrenós
jovens e maduros de cana-de-açúcar**

Orientador:
Prof. Dr. **CARLOS ALBERTO LABATE**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciência. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2014**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Fonseca, Juliana Guimarães

Caracterização do proteoma da parede celular de folhas e entrenós jovens e maduros de cana-de-açúcar / Juliana Guimarães Fonseca. - - Piracicaba, 2014.
102 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Parede celular 2. Proteínas 3. Cana-de-açúcar 4. Etanol celulósico 5. LC-MS^E
I. Título

CDD 633.61
F676c

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

DEDICATÓRIA

A minha família, pelo amor infindável e apoio inigualável, dedico.

AGRADECIMENTOS

Eu queria demonstrar minha completa gratidão a todos que me ajudaram de alguma forma na realização deste trabalho. Agradeço, primeiramente, ao Prof. Labate, pela orientação, aprendizado e carinho nesses dois anos de convívio.

Agradeço à Mônica pelo constante suporte tanto profissional quanto pessoal, pelos seus dotes culinários, humildade e delicadeza. Pelas piadas, risadas, carinho, mas, principalmente, agradeço à sua amizade.

Eu queria agradecer a todos os integrantes da turminha Max Feffer: Ivan, Felipinho, Fabrício, Flávia, Ana Paula, Mari, Thaís, Ilara, Mônica, Andressa, Carol, Maria Letícia, Bruna, Sarina, Alessandra, Naty, Haná, Marizângela, Janaína, Fernando, Simone, Ju e Livia, por terem sido minha família esalquiana, pelo convívio diário e por terem sido meu suporte nas horas que eu mais precisei.

Agradeço especialmente ao Fabrício pelas inúmeras análises de bioinformática, dúvidas do Excel, formatação e trabalhos braçais na casa-de-vegetação, por ter sido um ótimo amigo todos os momentos. A Thaís por ter passado minhas amostras no Synapt e auxílio na análise de dados. Ao Felipinho, pelos conselhos, apelidos e críticas, por me atormentar diariamente e me fazer ganhar um irmão mais velho mais ranzinza e amável do mundo. Ao Ivan pelos ensinamentos de biologia, carisma, honestidade e amizade sincera desde o primeiro dia de trabalho. À Flávia, por ter sido minha amiga-irmã desde a faculdade, passando comigo por todas as fases da minha vida, fazendo meus dias mais leves e felizes. À Mari pela sintonia, desabafos, colo, conselhos no café e cumplicidade em todas as horas. À Ana por ter sido essa pessoa maravilhosa comigo, por ficar feliz por minhas conquistas, torcer pelo meu sucesso e por me fazer sambar e rir quando as coisas não davam certo.

Agradeço principalmente à Ju por todo o ensinamento, paciência, didática, respeito, carinho, lealdade e amizade. Por ser um exemplo de ética e profissionalismo, sendo minha professora e orientadora desde meu TCC. Se hoje eu trilho caminhos bonitos, pode ter certeza que grande parte dessas conquistas é obra sua, obrigada.

Agradeço à minha família por ter me suportado nos momentos de puro estresse, por sempre verem o melhor em mim, por nunca perderem a fé quando eu pensei em desistir, obrigada.

Eu gostaria de agradecer também aos professores e funcionários do departamento de genética pelo auxílio e dedicação.

Eu agradeço a CNPQ, BIOEN e FAPESP (numero do processo: 2013/08091-5) pelo suporte financeiro neste projeto.

EPÍGRAFE

“Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E pra se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão.

É preciso, antes de mais nada, querer.”

Amyr Klink

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 DESENVOLVIMENTO.....	17
2.1 Revisão Bibliográfica	17
2.1.1 Aspectos gerais da cana-de-açúcar	17
2.1.1.1 O colmo	20
2.1.1.2 A Folha	21
2.1.1.3 Numeração de folhas e entrenós de cana-de-açúcar.....	22
2.1.2 O etanol de cana-de-açúcar.....	23
2.1.2.1 Etanol celulósico	26
2.1.2.2 Etanol do bagaço de cana-de-açúcar.....	27
2.1.3 Proteômica	28
2.1.3.1 Proteômica de Parede.....	30
2.1.3.1.1 Parede Celular Vegetal.....	30
2.1.3.1.2 Proteínas de Parede Celular	32
2.1.3.1.2.1 Extração das proteínas de parede celular	35
2.2 Material e métodos	35
2.2.1 Material vegetal	35
2.2.2 Extração de proteínas de parede celular de cana-de-açúcar baseada no método de Boudart et al., 2005.....	37
2.2.3 Sequenciamento de proteínas.....	39
2.3 Resultados e discussão	40
2.3.1 Validação das proteínas de parede celular.....	40
2.3.2 Quantificação do número de proteínas de parede celular	41
2.3.3 Determinação das classes funcionais de PPCs	46
2.3.3.1 Comparação entre as classes funcionais	65
2.3.3.1.1 Comparação dos dois tecidos em diferentes estádios de desenvolvimento	72
2.3.3.1.2 Comparação dos entrenós em diferentes estádios de desenvolvimento...74	
2.3.3.1.2.1 Análise estatística: PCA e PLS-DA.....	76
2.3.3.1.3 Comparação das folhas em diferentes estádios de desenvolvimento	80
2.3.3.1.3.1 Análise estatística: PCA e PLS-DA.....	81
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
REFERÊNCIAS.....	89

RESUMO

Caracterização do proteoma da parede celular de folhas e entrenós jovens e maduros de cana-de-açúcar

Este estudo trata das proteínas relacionadas ao desenvolvimento e à formação da parede celular vegetal de cana-de-açúcar, com o objetivo de auxiliar no desenvolvimento de novas tecnologias para a produção de etanol celulósico a partir do bagaço de cana. Com isso, as proteínas de parede celular de entrenós e folhas de plantas com 4 meses de idade em dois estádios de desenvolvimento, juvenil e maduro, foram identificadas. Para extração foi utilizado o método não destrutivo por infiltração a vácuo utilizando dois sais, 0,2 M de CaCl_2 e 2 M de LiCl seguido de centrifugação. As amostras complexas foram digeridas, fracionadas, sequenciadas por LC-MS^E. Os peptídeos foram processados utilizando o ProteinLynx 2.5 e comparados com a base de dados de ESTs traduzidos de cana e sorgo. A anotação das proteínas foi realizada com base no programa PFAM e divididas em classes funcionais. Apenas as proteínas que apareceram em pelo menos duas das três repetições biológicas foram utilizadas na análise principal. Para prever a localização subcelular das proteínas selecionadas utilizaram-se os softwares: SignalP, TargetP, Predotar e TMHMM. Apenas aquelas proteínas que foram preditas para serem secretadas por dois ou mais programas foram consideradas como proteínas de parede celular (PPC). Ao todo, 543 proteínas foram consideradas como PPC: 205 em entrenós jovens, 143 em entrenós maduros, 124 em folhas jovens e 71 em folhas maduras. Dentre essas proteínas, 365 foram consideradas diferentes, e caracterizadas em dez classes funcionais. A análise estatística compreendeu a análise de PCA e PLS-DA, havendo diferença estatística entre os tratamentos analisados. Neste trabalho, foram encontradas 66 glicosil-hidrolases e 39 peroxidases, sendo 14 e 11 exclusivas de tecidos juvenis, respectivamente. Essas proteínas são conhecidas por terem funções relacionadas à quebra e ao remodelamento dos polissacarídeos da parede celular vegetal, e, portanto, foram indicadas neste estudo como alvo de pesquisas futuras que utilizem as próprias enzimas da planta para otimização da produção do etanol celulósico. Individualmente, este estudo foi o que mais identificou PPCs dentre a literatura existente, além de ter sido pioneiro na utilização da análise quantitativa para PPC.

Palavras-chave: Parede celular; Proteínas; Cana-de-açúcar; Etanol celulósico; LC-MS^E

ABSTRACT

Proteome Characterization of young and mature leaves and internodes from sugarcane

This study provides information about the proteins of the cell wall of sugarcane at different stages of development and formation. The aim of this study is to assist in the development of new technologies for the production of cellulosic ethanol from sugarcane bagasse. Cell wall proteins from 4-month-old internodes and leaves of sugarcane in two developmental stages, juvenile and mature, have been identified. Protein extraction was performed with a non-destructive method by using vacuum infiltration with two salts, 0.2 M CaCl_2 and 2 M LiCl, followed by centrifugation. Complex samples were digested, fractionated and sequenced by LC-MS^E. Peptides were processed by ProteinLynx 2.5 and compared to the translated sugarcane and sorghum ESTs database. The annotation of the proteins was performed using PFAM and the functional classification was according to the one used in other related studies. Only the proteins that appeared in at least two of the three biological replicates were used in the main analysis. In order to predict the subcellular localization of these proteins, SignalP, TargetP, TMHMM and Predotar softwares were used. Only those proteins that were predicted to be secreted by two or more programs were considered as cell wall proteins (PPS). Altogether, 543 proteins were classified as PPC: 205 in immature internodes, 143 in mature internodes, 124 in young leaves and 71 in matured leaves. Among these proteins, 365 were considered different, and divided into ten functional classes. Statistical analysis was made with PCA and PLS-DA, confirming that there were statistical differences among the treatments. In this work, 66 glycoside hydrolases and 39 peroxidases were identified, being 14 and 11 unique to young tissues, respectively. These proteins have their function related to plant cell wall polysaccharides breakdown and remodeling, and, therewith, the glycoside hydrolases and peroxidases found in this study were indicated to be the target of future research using the plant's own enzymes to optimize the cellulosic ethanol production. Individually, this study was the one that most identified PPC among the existing literature, and is a pioneer in the use of quantitative analysis for PPCs.

Keywords: Cell wall; Proteins; Sugarcane; Cellulosic ethanol; LC-MS^E

1 INTRODUÇÃO

O consumo de fontes fósseis de energia aumentou de forma exponencial, sendo assim, os combustíveis fósseis são aqueles mais largamente empregados por nossa civilização (Leite, 2009). Em condições sem alteração da matriz energética mundial, os combustíveis fósseis responderiam por 90% do aumento projetado na demanda mundial, até 2030. No entanto, as reservas comprovadas de petróleo do mundo somam 1,137 trilhões de barris, 78% dos quais no subsolo dos países do cartel da OPEP. Essas reservas permitem suprir a demanda mundial por 40 anos, mantendo-se o atual nível de consumo. É evidente que, tanto as reservas, quanto o consumo se incrementarão ao longo deste período, o que elevaria o consumo de petróleo para 120 milhões de barris/dia, em 2025 (BIODIESELBR, 2012).

Entretanto, o uso de combustíveis fósseis passou a ser questionado pela comunidade científica por estar relacionado a problemas de escassez, ambientais e geopolíticos (SACHS, 2005). Nesse contexto, a segurança energética é um dos principais desafios deste século. O Brasil tem muito a contribuir, pois possui uma matriz energética que ultrapassa 40% de fontes renováveis, sendo que a média mundial em 2010 era de apenas 13%, fazendo com que o país possua uma posição de destaque no cenário mundial (EPE, 2014).

A energia a partir da biomassa tornou-se uma das mais importantes fontes renováveis nos últimos anos (MATSUOKA et al., 2009). O etanol é, provavelmente, o biocombustível mais utilizado no mundo, uma vez que se trata de diferentes fontes de biomassa, tais como o amido, a sacarose, o óleo, entre outros (STICKLEN, 2008). Com a introdução do Protocolo de Kyoto, mais atenção foi direcionada ao etanol brasileiro, já que quando é considerado todos os processos agro-industriais, o etanol produzido a partir da cana-de-açúcar é o que mais gera créditos de carbono (SOARES; ROSSEL, 2007). Qualidade do solo, condições climáticas e tecnologia agrícola, colocaram a cana-de-açúcar brasileira como uma das mais promissoras fontes de energia renovável do planeta (LEITE et al., 2009).

O chamado etanol de segunda geração é baseado na sacarificação da matéria-prima celulósica através de vários pré-tratamentos que transformam a celulose em açúcares fermentescíveis que, por sua vez, podem fermentar e produzir o álcool (BUCKERIDGE et al., 2008; CARROL E SOMERVILLE, 2009; BUCKERIDGE et al., 2010). As principais barreiras para a obtenção desse

combustível são o elevado custo de produção de celulase em reatores biológicos, e em especial, os custos de pré-tratamento da matéria-prima lignocelulósica (STICKLEN, 2008). Estima-se que a combinação de processos biológicos na hidrólise deverá render um processo ainda mais eficiente. O maior gargalo neste processo será a produção em escala comercial de enzimas hidrolíticas e micro-organismos selecionados e/ou modificados para essa finalidade (BUCKERIDGE et al., 2008; CARROL E SOMERVILLE, 2009; BUCKERIDGE et al., 2010), juntamente com o melhoramento genético e tecnologia de DNA recombinante que possibilitam o aumento da produção de bioetanol (AMORIM et al., 2011).

A fim de estudar as funções da parede celular da planta, uma abordagem proteômica é essencial, principalmente as relacionadas às proteínas presentes em um compartimento particular numa determinada fase de desenvolvimento (JAMET et al., 2006).

A compreensão de como a planta desenvolve o seu próprio processo de crescimento e expansão das células, através da caracterização de proteínas é um estudo de base que pode ser aplicado no futuro. Como exemplo, uma planta que tenha a parede celular mais facilmente degradável, pode diminuir o custo de enzimas necessário para a produção de etanol de celulose. Portanto, a caracterização de proteínas da parede celular da cana-de-açúcar, por exemplo, pode gerar informações sobre quais componentes e processos levam a uma melhor resposta aos interesses econômicos e ambientais (CALDERAN-RODRIGUES, 2012).

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Aspectos gerais da cana-de-açúcar

No Brasil, a cana-de-açúcar tem uma relevância histórica, econômica, social e política, sendo a principal fonte de matéria-prima para a produção de açúcar e álcool (SZMRECSÁNYI, 1979). Depois de 2003, com as crescentes preocupações ambientais, as atenções se voltaram para bioetanol brasileiro, uma vez que é um dos biocombustíveis mais sustentáveis. Além do Brasil, a cana-de-açúcar é cultivada em mais de cem países (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION- FAO, 2008), fazendo parte, hoje, da economia de todo o mundo.

A segurança energética é um dos principais desafios deste século. O Brasil tem muito a contribuir, possuindo uma posição de destaque no cenário mundial, principalmente por sua forte estratégia em agroenergia, que representa mais da metade dessa fonte renovável. Um dos principais casos de sucesso da aplicação da agroenergia foi o Proálcool, lançado em 1975, que prestou uma grande contribuição ao desenvolvimento tecnológico do setor sucroalcooleiro (CALDERAN-RODRIGUES, 2012).

A cana-de-açúcar e seus derivados, principalmente o etanol, que representa uma importante fonte renovável de biocombustível, são a segunda principal fonte de energia primária da matriz energética nacional, sendo que seu consumo já é superior ao da gasolina, podendo inclusive se transformar em uma *commodity* global e em importante fonte de energia (MENOSSI *et al.*, 2007).

A rápida expansão da produção de cana-de-açúcar no Brasil tem levantado uma série de perguntas sobre suas consequências associadas à questão da sustentabilidade. Os impactos positivos são a eliminação de compostos de chumbo emitidos pela queima da gasolina e menor emissão de gases nocivos. Há também a redução das emissões de CO₂, uma vez que o etanol requer apenas uma pequena quantidade de combustíveis fósseis para a sua produção. Também é considerado um combustível renovável, contribuindo pouco para o aquecimento global, já que o dióxido de carbono, liberado pela combustão do álcool em um ano, é reabsorvido pelas plantas na safra seguinte (OLIVÉRIO, 2006). Esses impactos são aspectos

positivos notáveis para a qualidade do ar, pois onde a colheita mecânica foi introduzida, eliminou-se a necessidade de queima da cana-de-açúcar.

Quanto à preocupação internacional sobre as áreas de plantação de cana-de-açúcar, o zoneamento agro-ecológico da cultura foi criado, o que proporcionou um mapeamento das áreas onde a cana-de-açúcar pode ou não ser cultivada. Esse zoneamento, introduzido em 2009, proíbe o plantio canavieiro no Pantanal, Amazônia e Alto da Bacia do Paraguai. Ainda assim, o produtor deve escolher áreas que não necessitam de irrigação plena para economizar água e energia, não utilizar terras com inclinação de até 12 graus, promovendo a colheita mecanizada, além de promover a utilização de áreas degradadas ou de pastagens (EMBRAPA, 2012). Em suma, a realidade brasileira garante alguma tranquilidade no que diz respeito à disponibilidade de áreas para o cultivo de matérias-primas dos biocombustíveis para abastecer o mercado local (SUAREZ et al., 2009). Assim, seria possível aumentar a área cultivada de cana-de-açúcar sem degradar novas áreas de ecossistemas importantes (CALDERAN-RODRIGUES, 2012).

A cana-de-açúcar pertence à família Poaceae e ao gênero *Saccharum*, que abrange várias espécies. Porém, as variedades atualmente cultivadas, na sua maioria, são híbridas. As principais características dessa família são o tipo de inflorescência, o crescimento do caule em colmos, folhas com lâmina em sílica em suas bordas e bainha aberta (JOAQUIM, 1998). É uma planta perene, própria de climas tropicais e subtropicais. Há várias espécies pertencentes ao gênero *Saccharum*: *S. officinarum* L., *S. spontaneum* L., *S. robustum* J., *S. sinnensis* R. e *S. barberi* J. Diversos pesquisadores afirmam que *S. sinensis* e *S. barberi* são originárias de retrocruzamento de *S. officinarum* e *S. spontaneum*. Entretanto, as variedades, hoje em cultivo comercial, são híbridas de várias espécies onde procura-se conciliar a rusticidade e resistência à doenças, às boas qualidades fisiológicas e alto teor de açúcar das variedades nobres de *S. officinarum* (CASAGRANDE; VASCONCELOS, 2010), diferindo principalmente quanto ao conteúdo de fibras e açúcares (JOAQUIM, 1998).

Os híbridos são altamente poliplóides e aneupoliplóides, apresentam em média de 100 a 120 cromossomos de acordo com a cultivar e possuem um genoma básico com 760 a 926 Mpb (MENOSSEI et al, 2007). O genoma da cana-de-açúcar é poliplóide, e devido ao seu tamanho e complexidade, a pesquisa torna-se mais difícil e mais demorada em comparação às ferramentas de genética molecular disponíveis

em plantas, tais como o modelo de *Arabidopsis* e arroz (INMAN-BAMBER et al., 2005). Apesar da complexidade do genoma da cana-de-açúcar, alguns estudos podem ser realizados com base na quantidade de informações já disponíveis nas coleções de etiquetas de sequências expressas (ESTs) (CALDERAN-RODRIGUES, 2012).

Sua reprodução se faz assexuadamente, ou seja, através de colmos que, pela brotação de suas gemas, dão origem aos colmos primários dos quais surgirão os secundários, depois os terciários, até a formação de uma touceira (SCHLITTLER, 2006). Pode atingir cerca de 2 a 5 metros de altura e apresentar várias tonalidades de cor. É composta principalmente por água e açúcares, que se concentram nos colmos, sendo a sacarose o carboidrato predominante. Os colmos são marcados por nós bem definidos e entrenós distintos, quase sempre espessos, apresentando assim um alto teor de fibras. A composição química da cana-de-açúcar é bastante variável quanto à proporção dos elementos, porém quantitativa e qualitativamente, exhibe regularidades em todas as variedades (SCHLITTLER, 2006).

Os colmos consistem de uma série de entrenós, um acima do outro, cada um possuindo uma folha. As folhas estão geralmente ligadas alternadamente aos nós, formando duas fileiras em lados opostos, que se encontram, aproximadamente, no mesmo plano (RUINARD, 1966).

A sacarose, principal substância desejada pela indústria, é produzida nas folhas, translocada pelo floema e armazenada no colmo (MOORE, 1995). Desde os primeiros meses de crescimento e desenvolvimento da cana-de-açúcar, o armazenamento do açúcar se processa paulatinamente, nos entrenós completamente desenvolvidos da base do colmo. O acúmulo máximo de sacarose só ocorre, quando a planta encontra condições restritivas ao seu crescimento, sendo o processo de acúmulo total de açúcares, comumente descrito como amadurecimento (RODRIGUES, 1995).

A cana-de-açúcar pode atingir alto teor de açúcar com apenas alguns meses de idade, bastando para isso ausência de água, nutrientes e outros fatores necessários ao seu desenvolvimento. Não significando este fato que ela estará fisiologicamente madura, isto é, em ponto de colheita. Dessa forma, apenas a idade adulta não significa maturação total (RODRIGUES, 1995).

Nos programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar, grande parte dos esforços têm sido dedicados para o aumento do rendimento e do conteúdo de

sacarose nas novas variedades. Esse maior aporte de sacarose acumulada é desejável em função do benefício de se produzir a mesma quantidade deste carboidrato em menor biomassa, resultando em redução de custos com colheita, transporte e processamento da produção (BONNETT *et al.*, 2004). Os entrenós maduros aumentam progressivamente a concentração de sacarose a partir da base, podendo chegar a representar por volta de 20% do peso seco em entrenós maduros (MOORE, STAFSTROM e STAEHELIN, 1995). Nos entrenós imaturos observa-se baixo teor de sacarose com predominância de glicose e frutose (MOORE, STAFSTROM e STAEHELIN, 1995).

No entanto, as características morfológicas e fisiológicas responsáveis pelo rendimento melhorado do teor de sacarose em cana-de-açúcar, são pouco compreendidas (INMAN-BAMBER *et al.*, 2005). Sendo que um ponto chave para aumentar a área de produção de cana-de-açúcar, seria desenvolver novas variedades adaptadas ao solo pobre, seca, e também resistentes a pragas e doenças (MATSUOKA *et al.*, 2009). Outra estratégia seria aumentar a produção a partir do desenvolvimento de novas tecnologias que podem utilizar resíduos como matérias-primas para produzir etanol (CALDERAN-RODRIGUES, 2012).

2.1.1.1 O colmo

O caule da cana-de-açúcar é denominado colmo e é composto por juntas, cada uma compreendendo um nó e um entrenó, que se iniciam muito curtos, na base, e depois, gradualmente, aumentam em comprimento até que um máximo é atingido (DILLEWJIN, 1952).

As características das variedades definem o número de colmos por planta, a altura e o diâmetro do colmo, o comprimento e a largura das folhas e a arquitetura da parte aérea, sendo a expressão destes caracteres muito influenciada pelo clima, pelo manejo e pelas práticas culturais utilizadas (RODRIGUES, 1995).

Um nó consiste de um broto lateral, que deixa uma cicatriz se a folha é retirada, uma banda, contendo raiz primordial, e um anel de crescimento (BLACKBURN, 1984; CALDERAN-RODRIGUES, 2012). Cada articulação é uma unidade separada, o que pode gerar uma outra planta, um clone, por propagação vegetativa. Sendo que as articulações da haste estão em diferentes etapas de desenvolvimento ao longo do seu comprimento (MOORE, 1995).

O colmo é sólido e não ramificado (BLACKBURN, 1984), e o diâmetro é maior nas partes que estão enterradas no solo, diminuindo à medida que vai para o topo (DILLEWJIN, 1952). O desenvolvimento da cana-de-açúcar é um processo contínuo, sendo que cada entrenó acumula seu próprio açúcar, sendo os valores de sacarose mais elevados na direção do centro do colmo, declinando no sentido das pontas, até um ponto em que se atinge a maturidade completa e estável, de alta concentração de sacarose. Pelo índice de medida denominado Brix, pode-se estimar o efeito do padrão normal de maturação sobre a acumulação de carboidratos, tanto dentro de um dos entrenós e ao longo do colmo, dando a porcentagem em peso de sólidos solúveis em solução (FERNANDES; BENDA, 1985 apud MOORE, 1995).

O colmo é um órgão complexo composto por tecidos epidérmicos, vasculares, meristemáticos e do parênquima (MOORE, 1995). Na epiderme do caule geralmente há dois tipos de células: alguns mais alongados e retangulares, chamadas células grandes e outras pequenas. As células grandes constituem a maior parte do padrão encontrado na epiderme, enquanto as células pequenas podem ser de dois tipos, células de cortiça e células silicosas (DILLEWJIN, 1952).

As células de cortiça são suberizadas com paredes finas, as quais apresentam uma grande variedade de formas, sendo geralmente pontiagudas. Elas podem aparecer individualmente ou em grupos de dois ou três. Geralmente, no entanto, as células de cortiça estão juntamente com as células silicosas, formando um pequeno grupo. Células silicosas são mais uniformes e raramente estão sozinhas, possuindo estômatos escassos ou ausentes. No entanto, há diferenças nos padrões epidérmicos que ocorrem em cada variedade (DILLEWJIN, 1952).

O colmo não é apenas um órgão de armazenamento, é uma parte integrante do corpo da planta, sendo quase impossível analisá-lo sem destruir a planta quase que totalmente, o que limita fortemente os estudos possíveis (MOORE, 1995).

2.1.1.2 A Folha

As folhas são normalmente acopladas de forma alternada aos nódulos, portanto, formando duas fileiras em lados opostos. A folha da planta da cana-de-açúcar é dividida em duas partes: bainha e lâmina, separadas por uma estrutura de articulação. A bainha, como implica seu nome, cobre completamente o talo, estendendo sobre pelo menos um entrenó completo (BLACKBURN, 1984). Em contraste com as folhas expandidas que podem atingir mais de um metro de

comprimento, as folhas jovens estão no topo, crescendo até atingir o seu máximo ao longo do tempo (DILLEWJIN, 1952).

Quando a junta de lâminas e a bainha da folha superior emergem do rolo de folhas, estas param de expandir, e então seus entrenós tornam-se aparentes. (MOORE, 1995).

Folhas maduras são substituídas por novas, em um processo contínuo (RUINARD, 1966). O número de folhas é pequeno em plantas mais jovens e aumenta gradualmente à medida que a cana-de-açúcar cresce. Durante o período de desenvolvimento, o número de folhas por caule é de cerca de 10, dependendo da variedade e condições de crescimento. As folhas são assimétricas, a nervura central em seu lado adaxial é mais branca e côncava, enquanto sua face abaxial é mais verde e convexa. A bainha da folha é de forma tubular, sendo mais larga na base, se estendendo em direção ao ápice (DILLEWJIN, 1952).

2.1.1.3 Numeração de folhas e entrenós de cana-de-açúcar

O objetivo da numeração de partes da cana-de-açúcar, como folhas e caules, é identificar cada um individualmente, determinando padrões de desenvolvimento e associações. A escolha da folha a ser usada na mensuração, deve seguir a numeração proposta por Kuijper em Van Dillewijn (1952), também utilizada na diagnose foliar, que consiste em designar como +1 a primeira folha de cima para baixo, que se apresenta inserida com a aurícula (colarinho) bem visível (Figura 3). As folhas seguintes passariam a receber a numeração +2, +3, e assim por diante (RODRIGUES, 1995).

As folhas acima da +1 seriam 0, -1, -2, -3, etc. Em geral, deve-se utilizar a folha +3, considerada adulta (RODRIGUES, 1995). Assim, os entrenós numerados como 1, 2 e 3 seriam considerados como os mais jovens, e de 5 em diante poderiam ser considerados maduros (KUIJPER, 1915 apud BENDA, 1971). Em folhas, a partir de -1 podem ser consideradas como as mais jovens e aquelas a partir de 1 ou +1 podem ser consideradas maduras, ou totalmente expandidas em comprimento. A Figura 1 mostra a numeração das folhas pelo sistema Kuiper e nó do colmo (Alexandre S. Pinto) adaptado por (CALDERAN-RODRIGUES, 2012).

Figura 1 - Cana-de-açúcar. A. numeração das folhas pelo sistema Kuyper. B. nó do colmo. (Alexander S. Pinto), adaptado por (CALDERAN-RODRIGUES, 2012)

2.1.2 O etanol de cana-de-açúcar

Em 2008, a demanda mundial de energia a partir de combustíveis fósseis respondeu por 80% do total, enquanto que a energia renovável representou cerca de 13%, dos quais a biomassa contribuiu para 10% (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION- FAO, 2008). O consumo cresceu tanto que a produção de etanol na safra 2012/13 atingiu a marca de 23,6 bilhões de litros, um grande aumento em relação ao volume de 2002/03 (12,5 bilhões de litros) (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO-CONAB, 2014), antes da introdução dos veículos flex. São Paulo é o estado de maior produção de cana-de-açúcar, sendo responsável por quase 61% da produção de etanol no país (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO-CONAB, 2014).

Assim, o fornecimento de energia do mundo precisa de combustíveis renováveis para ajudar a conter o fenômeno do aquecimento global e das emissões de gases do efeito estufa. As tecnologias atuais, juntamente com às que estão sendo desenvolvidas para a conversão de biomassa celulósica em energia, podem contribuir para as necessidades globais de energia e, assim, reduzir os impactos das emissões de CO₂ (CALDERAN-RODRIGUES, 2012).

Pode-se definir biocombustível como todo produto útil para a geração de energia, obtido total ou parcialmente de biomassa (TOLMASQUIM, 2003). Assim, o etanol de cana-de-açúcar produzido no Brasil é o melhor biocombustível sobre o

balanço energético (CALDERAN-RODRIGUES, 2012). As previsões para 2025, de acordo com melhorias no processo de produção de cana-de-açúcar, relata que não apenas a eficiência de geração de etanol aumentará, mas também haverá uma otimização no balanço de energia e redução da emissão de gases de efeito estufa (MACEDO et al., 2008).

O Brasil é o produtor mais competitivo de bioetanol com um mercado interno bem desenvolvido, estimulado pelos carros flex (IBETO et al., 2011 AMORIM, 2011). Os projetos de produção de bioetanol de cana-de-açúcar têm recebido apoio pelo desenvolvimento de novas variedades, clima adequado, solos férteis, e novas tecnologias (LEITE et al. 2009).

O grande passo para a indústria foi após a crise mundial do petróleo de 1973, quando o governo brasileiro lançou o programa "Proálcool", o que reduziu os preços dos combustíveis e da dependência do petróleo (GOLDEMBERG, 2008). O "Proálcool" foi destinado a criar uma fonte alternativa de combustível para veículos a motor baseado no motor de Otto, aumentando a criação de empregos no Brasil (SOARES; ROSSEL, 2007). Atualmente, cerca de 90% dos veículos leves licenciados no Brasil são flex e entre 2003 e setembro de 2011, foram comercializados 14,4 milhões de veículos flex (BRASIL, 2012).

A incorporação de tecnologias inovadoras foi fundamental para aumentar a eficiência industrial, bem como reduzir o impacto ambiental das usinas. Uma vez que o relatório sobre o clima global foi lançado, mostrando que é necessário reduzir as emissões de gases de efeito estufa pela queima de combustíveis fósseis, a corrida para substituir parcialmente a gasolina, um combustível fóssil, por álcool, combustível renovável e menos poluente, tem sido intensificado (SOARES; ROSSEL, 2007).

O consumo cresceu tanto que a produção de etanol em 2010 atingiu a marca de 27,9 bilhões de litros, um grande aumento em relação ao volume de 2002/03 (12,5 bilhões de litros), antes da introdução dos veículos flex (BRASIL, 2012). São Paulo é o estado de maior produção de cana-de-açúcar e vem crescendo cerca de 60%, sendo responsável por quase 61% da produção de etanol no país (UNIÃO DOS PRODUTORES DE CANA-DE-AÇÚCAR- UNICA, 2014).

O desenvolvimento de todo o processo para a produção de etanol de celulose, ou chamado de segunda geração, pode gerar uma mudança notável na indústria do açúcar (MATSUOKA et al, 2009.). Projeções mostram que pode dobrar

a produção de etanol (HAILING; SIMMS-BORRE, 2008), o que é fundamental no cenário atual de redução de emissões de gases de efeito estufa. Além disso, com essa tecnologia, outros resíduos podem ser reutilizados, como palha de arroz, em países onde não se cultiva cana-de-açúcar, tornando-os consumidores de biocombustíveis e contribuindo para o meio ambiente (STICKLEN, 2008). No entanto, apesar da sua importância, a produção comercial não é viável, principalmente, pelo alto custo do isolamento de celulose para a produção de etanol. Assim, alternativas para superar este problema e reduzir os custos, vêm sendo estudadas.

Dessa forma, a produção de etanol, utilizando-se os componentes da parede celular, visa reutilizar os resíduos de processos industriais. Como exemplo da produção de etanol celulósico, o DHR (Dedini Hidrólise Rápida) é um processo que transforma o bagaço de cana-de-açúcar em material fermentescível, por meio de hidrólise ácida, que pode ser usado para a produção de álcool. Etanol celulósico também pode ser obtido por vias enzimáticas, com o pré-tratamento da parede celular, gerando álcool, a partir do material lignocelulósico, após a fermentação. Em 2025, a técnica de hidrólise ácida bem otimizada, geraria um aumento de produção de 400 mil litros provenientes do bagaço recuperado (OLIVÉRIO; PROENÇA, 2004). Assim, seria possível aumentar a produção do etanol, sem a necessidade de aumentar a área cultivada.

Os materiais de plantas têm composição muito semelhante, no entanto, a presença de diferentes substâncias podem causar mudanças significativas nas reações do processo de produção de etanol por meio de componentes da parede celular (SOARES; ROSSEL, 2007). Uma estratégia importante para otimizar a produção de etanol a partir do bagaço é o estudo dos genes e das proteínas envolvidas na síntese de celulose e hemicelulose, bem como de outros componentes presentes na parede celular que desempenham um papel-chave no processo de produção do etanol celulósico. Por conseguinte, o estudo destes componentes no bagaço, tais como as proteínas da parede celular, é essencial para a otimização do processo, caracterização e análise dessas proteínas, permitindo a manipulação genética (CALDERAN-RODRIGUES, 2012).

Essas novas tecnologias resultantes de pesquisas realizadas em universidades e também na indústria, têm mostrado resultados promissores. O melhoramento genético associado à biologia molecular, bem como a biotecnologia,

podem contribuir para a formação de variedades elite através da inserção de caracteres via transformação gênica (MATSUOKA et al., 2009)

2.1.2.1 Etanol celulósico

O processo para obtenção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, baseado na hidrólise enzimática, consta basicamente de quatro etapas, com distintas possibilidades de combinação (SUN e CHENG, 2002): produção de enzimas, pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação.

Cysewski e Wilke (1976) descreveram pela primeira vez a técnica de produção de etanol celulósico, por meio da hidrólise enzimática, seguida de fermentação com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Para se produzir etanol de segunda geração, ou etanol celulósico, através de hidrólise enzimática, a biomassa lignocelulósica deve ser colhida e transportada para uma biorrefinaria, onde é armazenada e está pronta para a conversão. Subsequentemente, a biomassa é então tratada quimicamente ou pré-aquecida a uma temperatura elevada, para ser fracionada em produtos intermédios, além da remoção da lignina. Em seguida, realiza-se a neutralização, desintoxicação e separação dos componentes líquidos e sólidos. Os sólidos são então hidrolisados utilizando-se enzimas produzidas por bactérias ou fungos, em reatores microbianos. Finalmente, os açúcares são separados e fermentados para produção do etanol (STICKLEN, 2008)

Uma vez que a matéria-prima das culturas utilizadas para a produção de etanol, essas devem ter alta concentração de biomassa, como é o caso da cana-de-açúcar, arroz e milho (KNAUF; MONIRUZZAMAN, 2004). Pesquisas com casca de linhaça (GONZÁLEZ-GARCÍA et al, 2009), resíduo da colheita da produção de linho de fibras na indústria de papel, bem como da parte aérea da mandioca e cascas de amendoim também foram realizadas (MARTIN; THOMSEN, 2007) entre outras espécies.

O benefício da produção do bioetanol, não é apenas na redução das emissões de CO₂, mas também na sua baixa toxicidade e rápida degradabilidade (STICKLEN, 2008). Além disso, o etanol celulósico tem vantagens particulares, como a emissão de partículas menos tóxicas, minimizando a poluição ambiental, e reduzindo a quantidade de fertilizantes e pesticidas que contaminam ecossistemas aquáticos (HILL et al., 2009). A disponibilidade elevada de biomassa celulósica em

relação à disponibilidade limitada de açúcar e de grãos, tornou possível que o etanol de segunda geração fosse utilizado para a geração de energia adicional (STICKLEN, 2008).

2.1.2.2 Etanol do bagaço de cana-de-açúcar

Atualmente, cerca de 2/3 da energia presente na cana-de-açúcar não é utilizado para a produção de etanol, o que corresponde à porção de palha, ponta e bagaço (SOARES; ROSSEL, 2007). Bagaço também pode ser queimado e reutilizado para gerar eletricidade, mas o rendimento ainda é insignificante quando comparado à produção de açúcar e álcool. As estimativas indicam que, se este excesso de biomassa fosse reutilizado para a produção de etanol, o rendimento aumentaria em cerca de 30-40%, sem, no entanto, ser necessário aumentar-se a área cultivada. Na safra de 2012/ 2013, foi colhido 588,478 mil toneladas de cana-de-açúcar no país todo, sendo produzidos 23,226 mil m³ de álcool (UNIÃO DOS PRODUTORES DE CANA-DE-AÇÚCAR- UNICA, 2014).

Considerando-se que ocorra um aumento estimado de produtividade de 40% com a introdução de tecnologias de etanol celulósico, a mesma área pode chegar a ter um rendimento de cerca de 37,8 bilhões de litros. Perspectivas para o aumento da produção de etanol de celulose podem levar ao desenvolvimento da "cana-de-açúcar para energia", ou cana-energia como é chamada. Um material que produz uma menor quantidade de sacarose e mais quantidade de fibras, sendo mais resistente (ALEXANDER, 1985) e apresentando um aumento da eficiência de obtenção de etanol de segunda geração.

No entanto, esse processo não é ainda economicamente viável porque a produção é cara, e uma das razões é a recalcitrância da parede celular de cana-de-açúcar. Assim, uma estimativa da produção futura pode ser expandida à medida que novos avanços científicos e tecnológicos vão sendo incorporados em processos de hidrólise de celulose para a produção de etanol (CALDERAN-RODRIGUES, 2012).

O uso de tecnologias capazes de melhorar a eficiência de degradação da parede celular vegetal, requer uma compreensão mais profunda da fisiologia dessa estrutura. Além disso, o estudo de processos enzimáticos, realizados por microrganismos capazes de degradar a parede celular, por possuírem enzimas

específicas para este efeito, pode auxiliar no aprimoramento do uso da energia disponível destes polissacarídeos (CALDERAN-RODRIGUES, 2012).

Etiquetas de seqüências expressas (ESTs) da cana-de-açúcar foram seqüenciadas, pelo programa SUCEST (SUCEST,2012), que contribuiu com a compreensão do genoma dessa cultura. Esse programa sequenciou mais de 260.000 clones de cDNA, resultando em 26 bibliotecas padrão. O estudo mostrou que cerca de 50% dos genes estão relacionados ao metabolismo de proteínas, a transdução de sinais celulares, bioenergética, e resposta ao estresse. Possivelmente, 33.620 genes únicos foram encontradas, o que indica que mais de 90% dos genes da cana-de-açúcar expressos foram sequenciados (VETTORE et al., 2003). Com base nesta informação, outro trabalho descreveu, possíveis seqüências de ESTs de cana-de-açúcar, relacionadas à expressão de genes de componentes da parede celular. Nesta pesquisa, os autores encontraram 459 genes potenciais (LIMA et al., 2001) que estão associados à parede celular vegetal, representados por cerca de 1% dos ESTs encontrados no SUCEST (SUCEST, 2012).

Esses resultados contribuem para a compreensão do mecanismo genético envolvido no processo de formação da parede celular e geram informações que podem dirigir a engenharia genética no futuro. No entanto, mais estudos com relação às proteínas que estão associadas à parede celular de cana-de-açúcar são necessários (CALDERAN-RODRIGUES, 2012).

Um consórcio de vários países, Genome Sequencing Initiative (SUGESI), trabalha com o sequenciamento do genoma da cana-de-açúcar. Com essas informações, será mais fácil a realização de estudos sobre a expressão gênica, que podem ajudar nas novas descobertas para a produção do etanol celulósico (CALDERAN-RODRIGUES, 2012).

2.1.3 Proteômica

Proteínas estão envolvidas em todas as funções biológicas. A compreensão desses componentes celulares promove uma perspectiva única e global de como essas moléculas interagem e cooperam para criar e manter o funcionamento do sistema biológico. As células respondem a modificações internas e externas por meio da regulação do nível e atividade das suas proteínas. Assim, mudanças no proteoma, tanto quantitativa, quanto qualitativamente, promovem uma reação

imediate da célula. O proteoma constitui-se em uma entidade complexa e dinâmica que pode ser definida em termos de sequência, estrutura, abundância, localização, modificação, interação e função bioquímica de seus componentes, necessitando, para tal, de uma diversa gama de tecnologias para ser estudadas (CRUZ, 2012).

Segundo Twyman (2004), a proteômica consiste na análise global das proteínas visando atingir uma completa descrição de células vivas em termos de todos os seus componentes funcionais, a partir de uma análise direta desses componentes, ao invés dos genes que os codificam. Ela possui uma maior riqueza de dados em comparação com a genômica, isso se deve ao fato de que os genes possuem apenas sequências enquanto proteínas possuem sequência, estrutura, funções bioquímicas e fisiológicas. Além do que, sua atividade é influenciada por modificações químicas, localização celular interna ou externa e, talvez o mais importante de todos os fatores, sua interação com outras moléculas (CRUZ, 2012).

A proteômica pode fornecer notações básicas de genômica, tais como o número de proteínas isomorfas codificadas por um gene em particular (MAEDA *et al*, 2003), assim como da natureza molecular da isoforma, por exemplo, modificações químicas como a fosforilação (ROBERTS, 2002). Ela é uma chave tecnológica para o estudo de sistemas biológicos altamente complexos e dinâmicos, pois permite análise de um grande número de proteínas que influenciam diretamente a bioquímica celular e fornece assim, uma análise apurada do estado biológico ou mudanças sistemáticas ao longo do crescimento, desenvolvimento e resposta a fatores ambientais (CHEN & HARMON, 2006).

A proteômica e as tecnologias que permitem o estudo de proteínas em larga escala podem ser divididas em dois grupos principais. O primeiro se refere à atividade científica de descrição de um proteoma particular (ROBERTS, 2002) envolvendo a identificação sistemática e quantificação de todas as proteínas encontradas em uma célula, tecido ou organismo (TWYMAN, 2004). Essa abordagem remete à essência dos sistemas biológicos com o objetivo de fornecer uma discriminação quantitativa do proteoma incluindo todas as variáveis pós-traducionais. Uma versão mais focada dessa abordagem consiste em encontrar diferenças entre amostras relacionadas, como diferenças nos perfis protéicos que acompanham mudanças no estado fisiológico (TWYMAN, 2004). O segundo refere-se à metodologia pela qual o proteoma é estudado (ROBERTS, 2002), envolvendo a investigação de funções e interações protéicas, a partir de uma ampla gama de

métodos experimentais como a análise de sequências protéicas, estrutura, interações e atividade bioquímica (TWYMAN, 2004).

2.1.3.1 Proteômica de Parede

2.1.3.1.1 Parede Celular Vegetal

A caracterização do proteoma da parede da célula não pode ser definida como uma organela, mas é um compartimento da célula muito importante que exige concepção de estratégias específicas para a sua purificação (JAMET et al., 2008). A parede celular vegetal é constituída por uma matriz complexa de carboidratos, proteínas, polímeros, entre outros componentes, sendo que os carboidratos representam cerca de 90% e as proteínas aproximadamente 10% (WOJTASZEK, 1997).

A parede celular vegetal é subdividida em parede primária, parede secundária e terciária. Essas camadas são compostas principalmente por celulose, separadas pela lamela média, que é uma camada fina composta por elevada concentração de lignina. A parede primária é associada ao tecido jovem que está em crescimento e diferenciação. A secundária é caracterizada pela sua presença na fase terminal do desenvolvimento das células, em que a forma e o tamanho da mesma, são permanentemente estabelecidos (LEE et al., 2004). A organização estrutural e a composição da parede celular primária permitem que esta seja forte, fina, flexível e capaz de sofrer extensão elástica e plástica (FRY, 2004).

A parede celular já foi considerada inerte, mas evidências indicam que se trata de uma estrutura dinâmica e ativa em muitos processos, tais como a de sinalização e de coordenação do crescimento e desenvolvimento (REITER, 1998). As paredes das células participam de processos tais como o crescimento e o alongamento celular (FRY et al., 1992), defesa contra agentes patogênicos (BRADLEY et al., 1992), além de proporcionarem um suporte estrutural para as células individuais, tecidos e até da planta inteira. Na cana-de-açúcar, a parede celular também desempenha um papel fundamental na distribuição de sacarose (GLASZIOU; GAYLER, 1972). No entanto, os mecanismos responsáveis por um grande número de funções da parede celular ainda não são bem compreendidos.

Devido à parede ser dinâmica, ela é constantemente modificada durante o crescimento e o desenvolvimento da planta (CHIVASA et al., 2002). Apesar da sua baixa abundância, proteínas de parede compreendem várias centenas de moléculas diferentes com diferentes funções (CARPITA et al., 2001), sendo envolvidas nas alterações dos componentes, na sua estrutura, sinalização e interações com as proteínas da membrana plasmática na superfície da célula (JAMET et al., 2006). Uma vez que os polissacarídeos que compõem a parede da célula podem funcionar como fibras interconectadas, eles são classificados em três categorias: pectinas, hemiceluloses e celulose (CARPITA; MCCANN, 2000).

A celulose e as hemiceluloses predominam na região da parede celular primária, enquanto que a lignina se distribui por toda a estrutura, apresentando máxima concentração na lamela média (Figura 2). A distribuição da celulose, hemicelulose e lignina varia consideravelmente entre essas camadas (FENGEL E WEGENER, 1989).

Figura 2 - Composição da parede celular primária. Fonte: Adaptado de STICKLEN, 2008

A celulose existe na forma de microfibrilas, e os microcapilares que circundam a armação da parede celular são preenchidos com hemicelulose e lignina (FENGEL E WEGENER, 1989). A hemicelulose liga-se através de pontes de hidrogênio às microfibrilas de celulose, formando uma rede que fornece a espinha dorsal estrutural da parede celular da planta. A presença de lignina em algumas paredes celulares dá uma força adicional, e fornece a resistência às pragas e doenças. A celulose e a

hemicelulose são fontes potenciais de açúcares fermentescíveis (HINMAN, et al., 1999; HO et al., 1998; SEREENATH e JEFFRIES, 2000; TAHERZADEH et al., 1999). A presença da lignina na parede celular, entretanto, impede a hidrólise enzimática dos carboidratos.

A última década mostrou progresso na elucidação da estrutura e organização da matriz extracelular, mas demonstrou também a importância da parede como uma interface entre o ambiente biótico e abiótico (HOSONO, 1998). Além disso, a investigação sobre a biologia da planta resultou numa lista cada vez maior de processos de desenvolvimento que são influenciados por interações moleculares e os padrões de sinalização, uma vez que uma porção substancial do proteoma em plantas está localizada na parede celular (LEE et al., 2004).

Além de funções biológicas, a parede celular vegetal atrai grande interesse na área econômica. A parede é utilizada comercialmente para a produção de papel, têxteis de fabricação, as fibras, o carvão, a construção, produtos de madeira e para gerar energia através da queima do bagaço da cana-de-açúcar ou etanol de segunda geração (RODRIGUES, 2012).

2.1.3.1.2 Proteínas de Parede Celular

A caracterização do proteoma da parede celular é confrontada com várias dificuldades, principalmente ligadas à estrutura das paredes das células, bem como a natureza das proteínas de parede celular, já que a maioria possui ponto isoelétrico básico, podendo ser fortemente glicosiladas. Esses fatores fazem da extração, separação e identificação dessas, processos desafiadores (JAMET et al. 2006).

No entanto, apesar da complexidade, a proteômica de parede celular tornou-se um assunto dinâmico. A maioria dos dados disponíveis foram obtidos com *Arabidopsis*. Cerca de 495 proteínas de parede celular de *Arabidopsis* foram identificadas a partir de vários órgãos e de outras fontes, tais como rosetas (BOUDART et al. 2005), hipocótilo (FEIZ et al. 2006), decorrente do estágio de florescimento (MINIC et al., 2007), culturas em suspensão de células (ROBERTS et al., 1997; CHIVASA et al 2002; BORDERIES et al., 2003; BAYER et al., 2006, Calderan et al., 2014), e em células de protoplastos (KWON et al., 2005).

Muitas proteínas podem conter informação dentro da sua sequência de aminoácido que pode ser usada para prever a sua localização celular, por

exemplo, peptídeos sinal, peptídeos de trânsito, de importação nuclear e sinais de exportação (VON HEIJNE, G., 1986).

Existem três características comuns às proteínas de parede celular clássicas. A primeira é um sinal de clivagem de péptidos N-terminal, responsável pelo direcionamento dessas para o retículo endoplasmático (RAPOPORT, 1992), que é o primeiro lugar da via de secreção (VITALE; DENECKE, 1999). O peptídeo sinal não é formado por uma sequência consenso de aminoácido, no entanto, tem uma carga positiva na região N-terminal e uma região hidrofóbica central, seguida por uma região polar que contém o local de clivagem (CHIVASA et al., 2002).

Outra característica das proteínas que serão secretadas é a ausência dos tetrapeptídeos de retenção KDEL/HDEL na região N-terminal. Esses tetrapeptídeos fazem com que a proteína permaneça retida ao retículo endoplasmático, não sendo direcionada para as vias de secreção (CALDERAN-RODRIGUES, 2012).

Já as proteínas de membranas integrais tem um domínio hidrofóbico, que é o domínio transmembrana, o que faz com que essas sejam incorporadas na bicamada lipídica (CHIVASA et al., 2002). A partir disso, prediz que a ausência de domínios transmembranas ou a presença de apenas um domínio, faz com que as proteínas não fiquem retidas na membrana, e conseqüentemente, sejam de parede celular (CHIVASA et al., 2002). Numerosos programas computacionais foram desenvolvidos com o intuito de prever a localização das proteínas, a maioria das quais dependem da presença desses sinais (NAKAI, K. e HORTON, P., 1999).

Proteínas da parede celular podem ser classificadas em várias categorias funcionais. As três principais categorias funcionais são: proteínas modificadoras de parede (DARLEY et al, 2001.), proteínas estruturais (CASSAB, 1998) e proteínas de defesa, sintetizadas em resposta a estresses bióticos e abióticos. Entretanto, outros estudos podem estender essa classificação funcional, adicionando classes como proteinases, proteínas desconhecidas e proteínas de diferentes funções (BOUDART et al., 2005).

A parede celular da planta está envolvida em muitos campos de pesquisa, devido à versatilidade já citada, quando se trata da sua função. Por isso, pode estar relacionada, não só com a matriz estrutural que envolve todas as células da planta, mas também com o apoplasto ou com o ambiente extracelular (ROSE; LEE, 2010).

A parede celular das plantas contém várias classes de proteínas estruturais, classificadas de acordo com a sua composição de aminoácidos, tais como

hidroxiprolina, glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (HRGP), proteínas ricas em glicina (GRP) e as proteínas ricas em prolina (PRP). Essas proteínas são reguladas pelo desenvolvimento da planta e suas quantidades variam em função do tipo de tecido. Um exemplo de HRGP é a extensina (CARPITA; MCCANN, 2000), que está envolvida no relaxamento e extensão da parede celular (COSGROVE, 2003).

Além das proteínas estruturais, as paredes celulares contêm também proteínas arabinogalactânicas (AGPs), que são enzimas altamente glicosiladas, contendo resíduos, principalmente de galactose e arabinose (TAIZ; ZEIGER, 2004). Enzimas, tais como peroxidases, têm um papel na interrupção da expansão da célula, fazendo com que a parede se torne rígida (ANDREWS et al 2002; PEDREIRA et al, 2004, PRICE et al, 2003). A expansão de células é regulada por vários estímulos, tais como a gravidade, luz, estresse, hormônios, e anóxia (HOSONO, 1998). Vários estudos descrevem correlações entre esses fatores de regulação e as mudanças na estrutura dos polissacarídeos da parede primária e expressão de proteínas localizadas na parede, ou genes de atividade da enzima correspondente (LEE et al., 2004).

Três tipos de proteínas de parede podem ser distinguidos de acordo com suas interações com os componentes da parede. Proteínas frouxamente ligadas, não tem interação com os polissacarídeos da parede e podem mover-se livremente no espaço intercelular. As proteínas fracamente ligadas podem ser ligadas à matriz através de interações de Van der Waals, pontes de hidrogênio ou interações iônicas. As proteínas que se ligam à parede por ligações fortes, são resistentes à extração salina, tal como as extensinas, que são unidas por ligações covalentes (JAMET et al., 2008).

A composição e estrutura das proteínas das paredes celulares das plantas são diferentes de acordo com seu desenvolvimento e tecido, assim pode-se também comparar diferentes órgãos e relacioná-los com as suas funções e com seu estágio de desenvolvimento (JAMET et al., 2008).

Dados de proteômica não fornecem informações sobre as funções das proteínas identificadas, e por isso as funções da maior parte das proteínas de parede celular permanecem desconhecidas. Análises de bioinformática para identificar os domínios funcionais, fornecem apenas algumas pistas de quais seriam essas funções. Dados adicionais (genéticos, biológicos e bioquímicos das células) são necessários para compreender totalmente a função da proteína (ZHONG et al.

2002). O aumento dos recursos genéticos oferecem ferramentas adicionais para testar o papel de genes específicos na estrutura e na função de proteínas de parede celular (CALDERAN-RODRIGUES, 2012).

2.1.3.1.2.1 Extração das proteínas de parede celular

Muito pouco se sabe sobre o proteoma da parede celular, o que provavelmente reflete maiores desafios técnicos que devem ser ultrapassados (LEE et al., 2004). Um dos desafios é minimizar a contaminação por proteínas a partir de outras organelas ou locais. Assim, protocolos eficientes foram desenvolvidos para isolar organelas que envolvem degradação dos tecidos, seguida por centrifugação, separando os espectros de organelas em frações altamente enriquecidas, de acordo com sua densidade. Qualquer perturbação do tecido que compromete a integridade da membrana plasmática leva à contaminação da fração de parede celular por proteínas intracelulares, muitas das quais se ligam à matriz de parede com uma afinidade elevada (FEIZ et al., 2006). No entanto, sem o rompimento da parede celular, algumas metodologias não são tão eficientes, porque seria necessário que os tampões de extração entrem em contato com as proteínas.

A análise das proteínas de parede celular depende da qualidade da preparação da amostra. A extração é particularmente complexa, uma vez que as proteínas presentes no apoplasto podem ser livres ou ligadas a uma matriz de polissacarídeos por meio de interações de Van der Waals, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas ou iônicas, ou ainda por ligações covalentes (BORDERIES et al., 2003).

2.2 Material e métodos

2.2.1 Material vegetal

Foi utilizado o cultivar de cana-de-açúcar SP80-3280, esse cultivar foi escolhido pelo fato de seu genoma estar sendo sequenciado, ser uma das cultivares utilizada no projeto SUCEST (VETTORE , 2003), para o sequenciamento de cana-de-açúcar , além de ser a variedade usada por trabalhos anteriores no laboratório (CALDERAN-RODRIGUES, 2012 ; SILVA,

2012). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação do Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas, localizado na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - USP, em Piracicaba, São Paulo, usando padrões práticos de cultivo de cana-de-açúcar. Primeiramente as mudas foram plantadas em vasos de 20L, aguadas diariamente, utilizando-se solução nutritiva composta por 4g/l do suplemento comercial PlantProd 3 vezes por semana, e posteriormente, foram transplantadas para vasos maiores com capacidade de 100L até atingirem 4 meses de idade. Escolheu-se essa idade devido a planta já possuir os órgãos desenvolvidos, já estando diferenciadas as folhas do colmo, porém ainda uma planta em desenvolvimento, o que se adéqua ao objetivo de buscar ploteínas de parede celular em células em crescimento e expansão.

As plantas utilizadas para a extração foram sorteadas de maneira aleatória como prediz os princípios da experimentação. Foram selecionadas 9 plantas para realizar as 12 extrações dos diferentes tecidos com 3 repetições biológicas: 3 extrações de entrenó imaturo, 3 extrações de entrenó maduro, 3 extrações de folha jovem e 3 extrações de folha madura; a fim de se comparar as diferentes fases do desenvolvimento da cana de uma mesma planta, de acordo com as proteínas encontradas na parede celular. Durante a coleta das folhas, tomou-se o cuidado de coletar somente a lâmina, já que a bainha possui forma e função bem diferente. Da mesma forma, no colmo foram coletados somente os entrenós.

Foram denominadas como jovens, as folhas 0, -1, -2 e -3, e como maduras, +1, +2, +3 e +4 (Figura 3). Em relação aos entrenós, foram considerados imaturos, contando da base apical para a base inferior, os entrenós 1, 2, 3, e como sendo maduros, 5, 6 e 7 (Figura 4), seguindo a numeração proposta por Kuijper (1952).

Figura 3 - Denominação da folha +1 para contagem

Figura 4 - Numeração dos entrenós da parte apical e basal

2.2.2 Extração de proteínas de parede celular de cana-de-açúcar baseada no método de Boudart et al., 2005

Foi utilizada a metodologia baseada em Boudart et al., (2005), que estabeleceu um protocolo de extração de proteínas de parede celular de roseta de *Arabidopsis*, e posteriormente foi adaptado para proteínas de parede de cana-de-açúcar por Calderan-Rodrigues (2012). Os materiais vegetais foram coletados, lavados em água miliQ, cortados em pedaços de cerca de 7 cm e então mergulhados verticalmente em Becker contendo solução de 5 mM de tampão de acetato de sódio, pH 4,6, 0,2 M de CaCl_2 , 0,3 M de manitol e 0,1% (v/v) de coquetel anti-protease (Sigma). O Becker foi colocado em um dissecador conectado a uma bomba de vácuo, e os materiais vegetais infiltrados à vácuo por dez minutos. Após

isso, transferiram-se os materiais infiltrados para tubos de centrifuga “swinging buckets”, que contêm um suporte para isolar o líquido que será expelido e submetido à centrifugação (200 x g por 20 minutos em temperatura de 4 °C). O fluido resultante no fundo dos tubos foi medido e coletado com uma micropipeta. O processo de infiltração a vácuo e centrifugação foram repetidos uma vez, e o volume dos fluidos foram medidos.

Os materiais, então, foram duas vezes infiltrados e centrifugados, como nos passos anteriores, numa nova solução: 5 mM de tampão de acetato de sódio, pH 4.6, 2 M de LiCl, 0,3 M de manitol, 0,1% (v/v) de coquetel antiprotease. O resultado dos fluidos coletados em cada tecido está relatado na Tabela 1.

Tabela 1 - Fluidos Coletados após cada infiltração nas soluções salinas de CaCl_2 e LiCl em cada tecido com 3 repetições biológicas

	FJ Rep 1	FJ Rep 2	FJ Rep 3	FM Rep 1	FM Rep 2	FM Rep 3	EJ Rep 1	EJ Rep 2	EJ Rep 3	EM Rep 1	EM Rep 2	EM Rep 3
CaCl_2	3ml	3 ml	2.5ml	3ml	3ml	2.5ml	1.5ml	2ml	3ml	4ml	4ml	3ml
CaCl_2	2ml	2.5ml	3.5ml	2ml	2.5ml	3.5ml	1ml	1ml	2ml	1ml	2ml	1.5ml
LiCl	2.5ml	4ml	3.5ml	2.5ml	4ml	3.5ml	1ml	1ml	1ml	4ml	2ml	1.5ml
LiCl	2.5 ml	3ml	2.5ml	2.5ml	3ml	3.5ml	1ml	1ml	3ml	3ml	2ml	2ml
Totais	10ml	12.5ml	12ml	10ml	12.5ml	12ml	4.5ml	5ml	9ml	12ml	10ml	8ml
Peso Inicial	25.0g	25.65g	25.20g	25.20g	25.04g	25.15g	65,0g	55.26g	72,0g	123.11g	143.3g	143.43g
Peso Final	23.56g	24.02g	23.91g	24.14g	23.09g	23.33g	62,0g	53.32g	69,4g	117,46g	139.50g	140.02g

*FJ: folha jovem; FM: folha madura; EJ: entrenó jovem; EM: entrenó maduro

Misturaram-se os extratos de cálcio e lítio, os quais foram recuperados, dessalinizados por coluna de filtração em gel (EconoPac 10DG BioRad), utilizando 100 mM de formato de amônio, de acordo com o protocolo, e liofilizados (Figura 5). A quantificação e validação da qualidade das extrações foram realizadas posteriormente em espectrômetro de massas. A maior vantagem da tecnologia de identificação multidimensional proteica (MudPIT) é a eliminação da eletroforese com gel de poliacrilamida (PAGE) ou 2D-PAGE para a separação de proteínas. (YATES, 2004; BOARETTO e MAZZAFERA, 2013). A manipulação limitada da amostra melhora a probabilidade de que alterações sutis ao longo do proteoma. Resumidamente, a amostra foi solubilizada e digerida, posteriormente separada por cromatografia líquida multidimensional e inseridas no espectrômetro de massas (YATES, 2004).

Figura 5 - Metodologia de extração de proteínas de parede celular de cana-de-açúcar por infiltração a vácuo (Boudart et al., 2005)

2.2.3 Sequenciamento de proteínas

As análises por LC-MS^E foram realizadas injetando-se 9 μ L de cada amostra digerida (correspondente a 5 μ g do total de proteínas digeridas,) no sistema de cromatografia líquida de ultraperformance (Ultraperformance Liquid Chromatography - UPLC) nanoACQUITY, com tecnologia 2D de fase reversa dupla (Waters). Essa técnica combina a separação das proteínas usando-se um pH de 10, na separação da primeira dimensão e um pH de 2 na segunda dimensão, com auxílio de colunas de fase reversa (GILAR et al., 2005). A primeira dimensão foi realizada em uma coluna XBridge BEH C18 (5 μ m, 300 μ m x 50 mm) (Waters). A eluição foi realizada usando-se 5 gradientes binários diferentes de 20 mM de formiato de amônio pH 10 e acetonitrila, a um fluxo de 2 μ L.min⁻¹. A proporção de acetonitrila da primeira fração até a décima variou de 7,4 a 65%. Os peptídeos eluídos da coluna da primeira dimensão foram diluídos em linha com 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila a um fluxo de 20 μ L.min⁻¹ e capturados por uma coluna C18 Symmetry (5 μ m, 180 μ m x 20 mm) (Waters). A separação, na segunda dimensão, foi realizada em uma coluna HSS T3 (1.8 μ m, 75 μ m x 100 mm) (Waters), usando-se um gradiente binário de 7 a

40% de acetonitrila, em 0,1% (v:v) de ácido fórmico durante 54 minutos, a um fluxo de 350 nL.min⁻¹, e foi utilizado a fosforilase- β como padrão (REGIANI, 2013).

A aquisição dos dados foi realizada em um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF) Synapt G2 HDMS com cela de *Ion Mobility*, equipado com uma fonte nanolockspray operando no modo positivo (Waters, Manchester, UK). Para todas as análises, o espectrômetro de massas operou no modo “V”, com poder de resolução típico mínimo de 12500. O espectrômetro de massas foi calibrado com [Glu1] fibrinopeptídeo B (GFP) humana a 200 fmol. μ L⁻¹ e a mesma solução foi empregada para o "lock mass" utilizando-se o íon de dupla carga com uma amostragem a cada 30 segundos. Os experimentos foram realizados no modo MS^E (análise independente de dados) que consiste na aquisição alternada, entre espectros obtidos à baixa (3 eV) e alta (15-50 eV) energia de colisão, aplicadas ao módulo trap do ‘T-wave’ CID, em presença de gás argônio, que produz íons precursores e produtos em sequência. O tempo de varredura foi de 0,8 segundos em cada modo, no intervalo de m/z entre 50 e 2000. Todavia, o offset RF do analisador quadrupolar foi ajustado para que permitisse a transmissão apenas de massas acima de m/z 300, de forma a assegurar que todas as massas inferiores a esse intervalo fossem oriundas, exclusivamente, de dissociações na câmara de colisão (REGIANI, 2013).

Para a identificação e quantificação proteica, as intensidades dos espectros obtidos foram calculadas por método estequiométrico, em detrimento ao padrão interno de concentração conhecida conforme a linearidade do método (SILVA et al., 2006). E para que uma proteína tenha sido quantificada é necessário a identificação de pelo menos 3 peptídeos prototípicos.

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Validação das proteínas de parede celular

A análise dos dados, gerados pelo espectrômetro de massas, foi realizada por meio do programa ProteinLynx da Micromass. Devido às características específicas apresentadas pelas proteínas de parede celular, utilizaram-se os programas que predizem a localização subcelular dessas proteínas, como o TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>), SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e Predotar (<https://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html>), que utilizam a

sequência das proteínas identificadas para predição de sua localização subcelular. O TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) prediz a presença de hélices transmembranas, a quantidade delas e a posição na sequência. Dessa forma, somente aquelas proteínas que apresentaram alta probabilidade de possuírem o peptídeo sinal de direcionamento para o retículo endoplasmático (N-terminal positivamente carregado e uma região central hidrofóbica seguida por uma região-c polar contendo um sítio de clivagem) e não contenham um motivo de retenção nessa organela (tetrapeptídeo C-terminal KDEL ou HDEL) e até um domínio transmembrana, foram considerados para análise dos resultados, pois são características de proteínas que utilizam a via secretória, consideradas neste trabalho, assim como em outros (CALDERAN- RODRIGUES et al., 2014 ; DOUCHÉ et al., 2013) proteínas de parede celular. Além disso, uma validação manual foi realizada para eliminação de falsos positivos, ou seja, proteínas preditas como secretadas pelos programas, mas que na realidade são proteínas clássicas encontradas em outros compartimentos celulares. Essa validação foi realizada com o auxílio da Professora Elisabeth Jamet, autora da maioria dos trabalhos em proteômica de parede celular e expert da área. Esse trabalho foi desenvolvido em parceria com o Laboratório de Pesquisa em Ciências Vegetais (LRSV) Toulouse, França.

2.3.2 Quantificação do número de proteínas de parede celular

Das proteínas totais identificadas e analisadas, 543 foram consideradas proteínas de parede celular na somatória de todos os tecidos: EJ = 205 proteínas; EM = 143 proteínas; FJ = 124 proteínas; FM= 71 proteínas, como mostra a Tabela 2. A localização subcelular das proteínas foi validada posteriormente por meio de uma análise mais criteriosa de acordo com sua função.

Tabela 2 - Quantidade de proteínas extraídas por infiltração a vácuo nos diferentes tecidos estudados

Tratamentos	n° de proteínas previstas para serem secretadas	n° de proteínas previstas como intracelulares	Total do n° de proteínas
EJ	205	308	513
EM	143	554	697
FJ	124	310	434
FM	71	184	255
Total do n° de proteínas	543	1356	

*EJ= entrenó jovem, EM= entrenó maduro, FJ= folha jovem, FM= folha madura

A extração proteica foi eficiente, pois um grande número de proteínas foi identificado. Entretanto, verificou-se que uma mesma proteína poderia aparecer também nos outros tecidos estudados. Para verificar quantas proteínas de parede celular diferentes foram extraídas, fez-se o diagrama de Venny (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) (Figura 9) verificando-se que das 543 proteínas consideradas de parede celular, apenas 365 não se repetiam nos demais tecidos. Portanto, 365 proteínas de parede celular diferentes foram identificadas, divididas entre os vários tecidos utilizados nas extrações.

Figura 6 - Diagrama de Venny com as proteínas de parede celular extraídas em todos os tecidos: entrenó jovem (EJ), entrenó maduro (EM), folha jovem (FJ) e folha madura (FM)

A partir das intersecções obtidas pelo diagrama de Venny, foram estabelecidas quais proteínas são comuns nos diferentes tecidos, e quais proteínas são exclusivas de um determinado tecido.

Comparando o número total de PPCs diferentes encontradas neste estudo, ou seja, 365, com estudos que também identificaram PPCs em outras espécies (Tabela 3), percebe-se que este trabalho foi um dos que conseguiu identificar o maior número de proteínas.

Tabela 3 – Dados de outros estudos sobre proteômica da parede celular adaptado de Albenne et al., 2014

Plant species	Type of proteome	Number of identified CWP's
Dicots		
<i>Arabidopsis thaliana</i>	cell wall	495
<i>Brassica napus</i>	xilema sap	162
<i>Gossypium hirsutum</i>	N-glycoproteome	116
<i>Linum usitatissimum</i>	cell wall	106
<i>Medicago sativa</i>	cell wall	199
<i>Populus deltoides</i>	cell wall	142
<i>Solanum lycopersicum</i>	cell wall	161
<i>Solanum tuberosum</i>	cell wall	136
Monocots		
<i>Brachypodium distachyon</i>	cell wall	314
<i>Oryza sativa</i>	cell wall	270
<i>Saccharum officinarum</i>	cell wall	69

De acordo com a Tabela 3, percebe-se que em *Arabidopsis*, uma das espécies mais estudadas, que possui mais informações por ser uma planta modelo, dos vinte trabalhos realizados, cerca de 495 proteínas de parede celular (PPCs) diferentes foram identificadas. Já em *Brassica*, algodão, linho, alfafa, *Populus*, tomate e batata, 162, 116, 106, 199, 142, 161 e 136, PPCs diferentes foram identificadas, respectivamente. Além disso, utilizando espécies mais próximas nessa comparação, como as monocotiledôneas, percebe-se que, por exemplo, em *Brachypodium* 314 PPCs diferentes foram identificados, um número próximo ao encontrado neste estudo, porém ainda assim inferior. Em arroz, também monocotiledônea, quase 100 proteínas a menos foram encontradas em cinco trabalhos. Por sua vez, no trabalho anteriormente desenvolvido com células em suspensão de cana-de-açúcar, foram encontradas apenas 69 PPCs (Calderan et al., 2014). Portanto, a utilização de uma planta em crescimento, da qual se analisou diferentes tecidos, aliada a técnica de infiltração a vácuo e análises por LC-MS, propiciou a identificação de um maior número de proteínas em relação aos resultados encontrados na literatura, sendo somente inferior àqueles encontrados em cerca de vinte trabalhos com *Arabidopsis* (ALBENNE et al., 2014). Além disso, a existência de um método de extração já adaptado para folhas e colmos de cana-de-açúcar pode ter auxiliado na obtenção de um grande número de proteínas. Ou seja, individualmente, este trabalho foi o que identificou o maior número de proteínas preditas para serem secretadas dentre

aquelas do mesmo tema existentes na literatura.

As proteínas encontradas na parede celular de folhas e entrenós de cana-de-açúcar foram verificadas quanto à sua identidade, e através dessa análise estimou-se a contaminação com proteínas intracelulares (Figura 7).

Figura 7 - Dados em porcentagem de proteínas de parede celular (PPC) extraídas de entrenós e folhas, e de contaminantes

Conforme observado na Figura 7, a porcentagem média de contaminantes em todos os tecidos foi alta, sendo maior que a de PPCs. Outros trabalhos que utilizaram metodologias similares obtiveram porcentagens acima de 60% e 90% em cana-de-açúcar (CALDERAN-RODRIGUES, 2012) e *Arabidopsis* (BOUDART et al., 2005), respectivamente. Apesar de se tratar de um método não destrutivo, por isso pressupõem-se uma menor quantidade de contaminantes em comparação com outras metodologias, foi possível recuperar e identificar um grande número de PPCs, conforme já discutido.

Por outro lado, é conhecido que a extração de PPCs apresenta uma série de desafios e não mostra resultados homogêneos nas diversas espécies e metodologias utilizadas. Por exemplo, em caules de linho, folhas e caules de *Populus*, e xilema (SAP) também de *Populus*, foram obtidas porcentagens de contaminantes de aproximadamente 11% (DAY et al., 2013), 48% (PECHANOVA et al., 2010) e 34% (DAFOE & CONSTABEL 2009), respectivamente. Esses números mostram a grande variação de pureza dos extratos analisados. Outro aspecto que pode ser levado em consideração neste estudo, que diverge de trabalhos anteriores,

é o tipo de identificação de proteínas realizada por meio do LC-MS^E, que se caracteriza por promover uma separação mais eficiente dos peptídeos, e dessa forma, ser uma metodologia mais sensível na sua detecção.

Além disso, a presença de proteínas intracelulares pode ser explicada devido as características únicas das paredes celulares de gramíneas (CARPITTA; GIBEAUT, 1993) podendo aumentar a retenção dessas proteínas na parede. Ou também pelo fato dos entrenós e folhas, por não caberem nos tubos de centrifugação, necessitem ser cortados, enquanto que no protocolo original (BOUDART et al., 2005), utiliza-se a planta inteira, diminuindo a quantidade de contaminantes.

Verificando os tecidos isoladamente, nota-se que o total de proteínas de parede celular encontradas foram: 225 de 533 em EJ (43%); 192 de 746 em EM (26%); 136 de 446 em FJ (31%); e 84 de 268 em FM (28%). Em *Brachypodium distachyon* (DOUCHÉ et al., 2013), também uma monocotiledônea, os resultados mostraram uma maior porcentagem de PPCs em média, sendo: FJ 46%, FM 57%, EJ 61% e EM 75%, apesar ter sido utilizando uma metodologia destrutiva para a extração de proteínas. Entretanto, no que diz respeito à porcentagem média de contaminantes em folhas, os dois trabalhos apresentaram maior valor em comparação a entrenós. Sendo assim, ambos trabalhos com monocotiledôneas apresentaram resultados semelhantes em relação ao maior número de contaminantes em folhas.

2.3.3 Determinação das classes funcionais de PPCs

Outra análise realizada foi a classificação das proteínas em categorias de acordo com sua função com base nas famílias de proteínas identificadas pelo programa Pfam (<http://pfam.xfam.org/>). As classes estabelecidas para a classificação funcional foram as mesmas escolhidas por outros trabalhos com parede celular (Douché et al., 2013; Calderan-Rodrigues et al., 2014), o que possibilita a comparação de dados entre eles. Esse procedimento facilita também a interpretação dos resultados, já que, proteínas inter-relacionadas, provavelmente envolvidas no mesmo processo, são agrupadas e podem ser analisadas conjuntamente (Tabela 3). Na tabela 3, as proteínas marcadas com um X são aquelas que apareceram no trabalho anterior com células em suspensão de cana-de-açúcar (CALDERAN-RODRIGUES et al., 2014).

Tabela 4 - Proteínas de parede celular encontradas nos 2 tecidos estudados em estádios diferentes (jovem e maduro) com suas respectivas anotações funcionais

(continua)

Numero de acesso SUCEST	Homólogos em Sorgo	Família (PFAM)	Anotação Funcional	Tecidos	Células em Suspensão
Proteínas agindo em polissacarídeos					
SCEPAM2015E05	Sb01g008040.3 PACid 1950280	Glycosyl hydrolase (GH3)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ	
SCQGLR1062D04	Sb01g008040.3 PACid 1950280	Glycosyl hydrolase (GH3)	Proteínas que agem em carboidratos	EM	
SCVPRT2073A02	Sb01g008040.3 PACid 1950280	Glycosyl hydrolase (GH1)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ; FJ	
SCBFAD1045D12	Sb01g010830.1 PACid 1950642	Glycosyl hydrolase (GH1)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ	
SCCCCL3001B10.b	Sb01g010840.1 PACid 1950643	Glycosyl hydrolase (GH1)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ	
SCEQRT1024D03	Sb01g010840.1 PACid 1950643	Glycosyl hydrolase (GH1)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ	
SCRUFL4024E08	Sb01g010840.1 PACid 1950643	Glycosyl hydrolase (GH1)	Proteínas que agem em carboidratos	EM	
SCJFRT1007G04	Sb01g018400.1 PACid 1951530	Glycosyl hydrolase (GH28)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ; EM; FJ; FM	
SCQSRT2034G08	Sb01g018400.1 PACid 1951530	Melibiose	Proteínas que agem em carboidratos	EJ; FJ	
SCBGLR1003C11	Sb01g026390.1 PACid 1952232	Glycosyl hydrolases (GH38)	Proteínas que agem em carboidratos	FJ	
SCCCCL6004H07	Sb01g040750.1 PACid 1954036	Glycosyl hydrolases (GH35)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ	
SCCCSD1C04B09	Sb01g040750.1 PACid 1954036	Glycosyl hydrolases (GH35)	Proteínas que agem em carboidratos	FJ	
SCMCLV1031F09	Sb01g042560.1 PACid 1954247	Glycosyl hydrolases (GH17)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ; EM; FJ	X
SCVPAM1059E12	Sb01g042560.1 PACid 1954247	Glycosyl hydrolases (GH17)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ	
SCEQLB1067F01	Sb01g048140.1 PACid 1954933	Glycosyl hydrolases (GH19)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ	
SCRLSD1009B11.b	Sb01g048140.1 PACid 1954933	Glycosyl hydrolases (GH19)	Proteínas que agem em carboidratos	FM	
SCVPLB1020E05	Sb01g048140.1 PACid 1954933	Glycosyl hydrolases (GH19)	Proteínas que agem em carboidratos	EM	
SCEZAM2035C11	Sb01g048880.1 PACid 1955021	Glycosyl hydrolases (GH28)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ; EM	
SCJLRT1020F06	Sb02g004650.1 PACid 1955828	Glycosyl hydrolases (GH18)	Proteínas que agem em carboidratos	FJ	
SCSGRT2065E07.b	Sb02g004650.1 PACid 1955828	Glycosyl hydrolases (GH18)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ; FJ; FM	
SCACRZ3108F03	Sb02g004660.1 PACid 1955829	Glycosyl hydrolases (GH18)	Proteínas que agem em carboidratos	EM	

Tabela 4 - Proteínas de parede celular encontradas nos 2 tecidos estudados em estádios diferentes (jovem e maduro) com suas respectivas anotações funcionais

(continuação)

Numero de acesso SUCEST	Homólogos em Sorgo	Família (PFAM)	Anotação Funcional	Tecidos	Células em Suspensão
SCAGLB1071G05	Sb02g010650.1 PACid 1956610	Melibiose	Proteínas que agem em carboidratos	EJ; EM	
SCJLRZ1024G07	Sb02g010650.1 PACid 1956610	Melibiose	Proteínas que agem em carboidratos	EJ	
SCUTLR1037C07	Sb02g010650.1 PACid 1956610	Melibiose	Proteínas que agem em carboidratos	EJ	
SCAGLR1021F11	Sb02g028400.1 PACid 1958059	Glycosyl hydrolase (GH1)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ	
SCCCST1007A09	Sb02g028400.1 PACid 1958059	Glycosyl hydrolase (GH1)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ	
SCQSLR1089H10	Sb02g030220.1 PACid 1958285	Glycosyl hydrolase (GH1)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ; EM; FJ; FM	
SCJLRZ1023F05	Sb02g035600.1 PACid 1958937	Glycosyl hydrolase (GH14)	Proteínas que agem em carboidratos	EM	
SCUTAM2089E05	Sb02g035600.1 PACid 1958937	Glycosyl hydrolase (GH14)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ	
SCEPLR1030F01	Sb02g042960.1 PACid 1959851	Melibiose	Proteínas que agem em carboidratos	EM	
SCEQLB1068H06	Sb02g043530.1 PACid 1959921	Alpha-L-AF_C	Proteínas que agem em carboidratos	EJ	
SCEQRZ3023D01	Sb03g007230.1 PACid 1960886	Glycosyl hydrolases (GH31)	Proteínas que agem em carboidratos	EM	
SCJFRT2055C03	Sb03g007230.1 PACid 1960886	Glycosyl hydrolases (GH31)	Proteínas que agem em carboidratos	FJ; FM	
SCRFFL5039E01	Sb03g007230.1 PACid 1960886	Glycosyl hydrolases (GH31)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ	
SCJLLR1054F05	Sb03g008350.2 PACid 1961038	Glycosyl hydrolase (GH1)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ; EM; FJ	
SCSBSB1057E03	Sb03g008350.2 PACid 1961038	Glycosyl hydrolase (GH1)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ	
SCJLLR1108B10	Sb03g028140.1 PACid 1962487	Glycosyl hydrolase (GH28)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ	
SCSGLR1025B11	Sb03g028140.1 PACid 1962487	Glycosyl hydrolase (GH28)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ	
SCQSAM1030G04	Sb03g029700.1 PACid 1962678	Carbohydrate Esterase (CE)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ	
SCEZHR1048C09	Sb03g034100.1 PACid 1963232	Glycosyl hydrolase (GH17)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ; EM; FJ; FM	
SCJLAM2093B10	Sb03g040600.1 PACid 1963989	Glycosyl hydrolase (GH18)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ	
SCQSLB1049G04	Sb03g040600.1 PACid 1963989	Glycosyl hydrolase (GH18)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ	
SCSBRT3039A04	Sb03g040600.1 PACid 1963989	Glycosyl hydrolase (GH18)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ; FJ; FM	
SCCCFL6001E11	Sb03g041680.1 PACid 1964123	Pectinesterase	Proteínas que agem em carboidratos	EJ	

Tabela 4 - Proteínas de parede celular encontradas nos 2 tecidos estudados em estádios diferentes (jovem e maduro) com suas respectivas anotações funcionais

(continuação)

Numero de acesso SUCEST	Homólogos em Sorgo	Família (PFAM)	Anotação Funcional	Tecidos	Células em Suspensão
SCEPLR1051C09	Sb03g041680.1 PACid 1964123	Pectinesterase	Proteínas que agem em carboidratos	EJ; FJ; FM	X
SCQSRT2031D12	Sb03g045490.1 PACid 1964584	Glycosyl hydrolase (GH17)	Proteínas que agem em carboidratos	FJ; FM	
SCCCRZ2001D03	Sb04g027700.1 PACid 1967450	Glycosyl hydrolase (GH3)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ; FJ; FM	
SCEQLB1063E01	Sb04g027700.1 PACid 1967450	Glycosyl hydrolase (GH3)	Proteínas que agem em carboidratos	EM	
SCCCLR1C01G11	Sb04g034530.1 PACid 1968297	Glycosyl hydrolases (GH17)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ	
SCCCRZ1004H06	Sb04g034530.1 PACid 1968297	Glycosyl hydrolases (GH17)	Proteínas que agem em carboidratos	EM	
SCCCST2001A03	Sb04g036200.1 PACid 1968498	Glycosyl hydrolases (GH79)	Proteínas que agem em carboidratos	EM	
SCCCCL2001B01.b	Sb05g001560.1 PACid 1968978	GDA1_CD39	Proteínas que agem em carboidratos	EJ	
SCBFLR1083E01	Sb05g019600.1 PACid 1970378	Glycosyl hydrolases (GH38)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ; FJ	
SCEZRZ1014E12	Sb05g019600.1 PACid 1970378	Glycosyl hydrolases (GH38)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ	
SCSBFL1035B12	Sb05g019600.1 PACid 1970378	Glycosyl hydrolases (GH38)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ; EM	
SCEQLR1050H09	Sb05g020400.1 PACid 1970463	Glycosyl hydrolases (GH16)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ; EM; FJ; FM	X
SCEZRZ3016H03	Sb05g020400.1 PACid 1970463	Glycosyl hydrolases (GH16)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ; FJ	
SCCCLR1024D12	Sb05g027690.1 PACid 1971385	Glycosyl hydrolases (GH17)	Proteínas que agem em carboidratos	EM	
SCJFRZ2032H11	Sb05g027690.1 PACid 1971385	Glycosyl hydrolases (GH17)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ	
SCRURT2006B10	Sb05g027690.1 PACid 1971385	Glycosyl hydrolases (GH17)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ	
SCCCRZ2001F03	Sb06g019840.1 PACid 1972824	Glycosyl hydrolases (GH1)	Proteínas que agem em carboidratos	EM	
SCCCCL3003E07.b	Sb06g021230.1 PACid 1972997	Glycosyl hydrolases (GH19)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ; FJ; FM	
SCCCCL7002H01	Sb06g021250.1 PACid 1972999	Glycosyl hydrolases (GH19)	Proteínas que agem em carboidratos	FJ; FM	
SCAGRT2037A11	Sb06g023450.1 PACid 1973258	Glycosyl hydrolases (GH3)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ	
SCCCLB1024D03	Sb06g027560.1 PACid 1973754	PAE (Pectinacetylerase)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ	
SCCCCL4009F05	Sb06g030270.1 PACid 1974079	Glycosyl hydrolases (GH3)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ; FJ	
SCJFLR1013H10	Sb06g030270.1 PACid 1974079	Glycosyl hydrolases (GH3)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ; EM	

Tabela 4 - Proteínas de parede celular encontradas nos 2 tecidos estudados em estádios diferentes (jovem e maduro) com suas respectivas anotações funcionais

(continuação)					
Numero de acesso SUCEST	Homólogos em Sorgo	Família (PFAM)	Anotação Funcional	Tecidos	Células em Suspensão
SCCCLR1048B08	Sb08g001540.1 PACid 1977284	Alpha-L-AF_C	Proteínas que agem em carboidratos	EM	
SCJFLR1035D05	Sb08g001540.1 PACid 1977284	Alpha-L-AF_C	Proteínas que agem em carboidratos	FJ; FM	
SCQSRT1034D03	Sb08g001540.1 PACid 1977284	Alpha-L-AF_C	Proteínas que agem em carboidratos	EJ; FJ	
SCJLLR1107C01	Sb08g019250.1 PACid 1978769	Glycosyl hydrolases (GH79)	Proteínas que agem em carboidratos	EM	
SCSGAM2103F11	Sb08g019250.1 PACid 1978769	Glycosyl hydrolases (GH79)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ	
SCVPLB1019D09	Sb08g019250.1 PACid 1978769	Glycosyl hydrolases (GH79)	Proteínas que agem em carboidratos	EM	
SCCCLR1065F02	Sb09g024320.1 PACid 1981354	Glycosyl hydrolases (GH17)	Proteínas que agem em carboidratos	EM	
SCCCCL5004G07	Sb10g000660.1 PACid 1982214	Glycosyl hydrolases (GH28)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ; FJ; FM	
SCEQRT1026F09	Sb10g000660.1 PACid 1982214	Glycosyl hydrolases (GH28)	Proteínas que agem em carboidratos	FM	X
SCRFFL4006E01	Sb10g000660.1 PACid 1982214	Glycosyl hydrolases (GH28)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ; EM; FJ; FM	
SCCCSD2002C05	Sb10g006230.1 PACid 1982911	Pectinesterase	Proteínas que agem em carboidratos	FJ; FM	
SCSBSD2058D04	Sb10g012220.1 PACid 1983604	Glycosyl hydrolases (GH1)	Proteínas que agem em carboidratos	EM	
SCSGCL6072E02	Sb10g027110.1 PACid 1984696	Gal_mutarotas_2/GH	Proteínas que agem em carboidratos	FJ; FM	
SCCCRZ2001F06	Sb10g027600.1 PACid 1984764	Glycosyl hydrolases (GH1)	Proteínas que agem em carboidratos	EM	
SCBGST3106E01	Sb10g028580.1 PACid 1984898	Glycosyl hydrolases (GH16)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ	
SCEQLR1093E12	Sb10g028580.1 PACid 1984898	XET_C (Xyloglucan endo-transglycosylase)	Proteínas que agem em carboidratos	EJ; FJ	
Proteínas relacionadas com o metabolismo de lipídios					
SCACLR2029H09	Sb01g033830.1 PACid 1953172	LTP 2 (Probable Lipid transfer)	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	EJ; FJ; FM	
SCCCCL3001E03.b	Sb01g033830.1 PACid 1953172	LTP 2 (Probable Lipid transfer)	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	EJ; FJ; FM	X
SCVPRZ3031D11	Sb01g044330.1 PACid 1954452	LTP 2 (Probable Lipid transfer)	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	FJ	
SCCCLB1025F02	Sb02g009320.1 PACid 1956451	LTP 2 (Probable Lipid transfer)	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	FJ; FM	
SCSFAD1072D08	Sb02g030940.1 PACid 1958371	Protease inhibitor/seed storage/LTP family	Proteínas relacionadas ao metabolismo de	EJ; EM; FJ; FM	

Tabela 4 - Proteínas de parede celular encontradas nos 2 tecidos estudados em estádios diferentes (jovem e maduro) com suas respectivas anotações funcionais

(continuação)

Numero de acesso SUCEST	Homólogos em Sorgo	Família (PFAM)	Anotação Funcional	Tecidos	Células em Suspensão
			lipídeos		
SCEQHR1082B01	Sb02g037820.1 PACid 1959211	Lipase_GDSL	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	EJ	
SCBFLR1046E09	Sb03g038280.1 PACid 1963733	LTP 2 (Probable Lipid transfer)	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	EJ	
SCCCAM2002F12	Sb03g038280.1 PACid 1963733	LTP 2 (Probable Lipid transfer)	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	EJ	
SCVPRZ2041C11	Sb03g038280.1 PACid 1963733	LTP 2 (Probable Lipid transfer)	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	FJ	
SCCCAD1001C08	Sb03g039880.1 PACid 1963911	LTP 2 (Probable Lipid transfer)	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	EM; FJ; FM	
SCCCLR2C03F01	Sb03g039880.1 PACid 1963911	LTP 2 (Probable Lipid transfer)	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	EJ; FJ; FM	
SCJFLR1035D02	Sb06g016160.1 PACid 1972351	LTP 2 (Probable Lipid transfer)	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	EJ	X
SCVPLR1049D04	Sb06g016160.1 PACid 1972351	LTP 2 (Probable Lipid transfer)	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	EM; FJ; FM	
SCCCRZ1002B03	Sb06g016170.1 PACid 1972352	LTP 2 (Probable Lipid transfer)	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	EJ; EM; FJ	
SCCCLR1024C05	Sb08g002660.1 PACid 1977434	Tryp_alpha_amyl	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	EJ; FJ; FM	X
SCCCLR1076G12	Sb08g002660.1 PACid 1977434	Tryp_alpha_amyl	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	EM	
SCAGLB1069G08	Sb08g002670.1 PACid 1977435	Tryp_alpha_amyl	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	EM	
SCCCLR2002D12	Sb08g002670.1 PACid 1977435	Tryp_alpha_amyl	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	EM	
SCBGLR1114E07	Sb08g002690.1 PACid 1977437	Tryp_alpha_amyl	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	FM	
SCCCCL3004H07.b	Sb08g002690.1 PACid 1977437	Tryp_alpha_amyl	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	FJ; FM	
SCCCLR1048F06	Sb08g002690.1 PACid 1977437	Tryp_alpha_amyl	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	FJ; FM	

Tabela 4 - Proteínas de parede celular encontradas nos 2 tecidos estudados em estádios diferentes (jovem e maduro) com suas respectivas anotações funcionais

(continuação)

Numero de acesso SUCEST	Homólogos em Sorgo	Família (PFAM)	Anotação Funcional	Tecidos	Células em Suspensão
SCMCLR1123B01	Sb08g002690.1 PACid 1977437	Tryp_alpha_amyl	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	EJ	
SCUTST3131G03	Sb08g002690.1 PACid 1977437	Tryp_alpha_amyl	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	EJ; FJ; FM	
SCVPLB1020D03	Sb08g002690.1 PACid 1977437	Tryp_alpha_amyl	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	EM; FJ; FM	
SCQGSB1083B11	Sb08g016690.1 PACid 1978433	Protease inhibitor/seed storage/LTP family	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	EJ	
SCVPRZ2043H01	Sb08g016690.1 PACid 1978433	Protease inhibitor/seed storage/LTP family	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	EJ	X
SCMCRT2087E02	Sb08g016690.2 PACid 1978434	Protease inhibitor/seed storage/LTP family	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	EJ; EM	
SCVPFL3046E09.b	Sb08g016690.2 PACid 1978434	Protease inhibitor/seed storage/LTP family	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	EJ	X
SCCCLR1080B06	Sb09g027600.1 PACid 1981746	LTP 2 (Probable Lipid transfer)	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	FJ	
SCAGRT2042G05	Sb10g003930.1 PACid 1982618	Lipase GDSL	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	EM	
SCJFST1015F01	Sb10g003930.1 PACid 1982618	Lipase GDSL	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	EJ	
SCCCLR1076D05	Sb10g025250.2 PACid 1984466	Protease inhibitor/seed storage/LTP family	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	EJ; FJ; FM	
SCEPAM1021H07	Sb10g025250.2 PACid 1984466	Protease inhibitor/seed storage/LTP family	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	EJ	
SCMCRT2088G02	Sb10g025250.2 PACid 1984466	Protease inhibitor/seed storage/LTP family	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	EJ	
SCUTLR1037D04	Sb10g025250.2 PACid 1984466	Protease inhibitor/seed storage/LTP family	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	EM	
SCUTLR1058B04	Sb10g025250.2 PACid 1984466	Protease inhibitor/seed storage/LTP family	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	EM	
SCVPFL3047F02.b	Sb10g025250.2 PACid 1984466	Protease inhibitor/seed storage/LTP family	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	EJ; FJ	X
SCAGST3137F01	Sb10g029740.1 PACid 1985037	LTP 2 (Probable Lipid transfer)	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos	EJ	

Tabela 4 - Proteínas de parede celular encontradas nos 2 tecidos estudados em estádios diferentes (jovem e maduro) com suas respectivas anotações funcionais

(continuação)

Numero de acesso SUCEST	Homólogos em Sorgo	Família (PFAM)	Anotação Funcional	Tecidos	Células em Suspensão
Sinalização					
SCBGLR1114G06	Sb01g005770.1 PACid 1949994	Fasciclin	Sinalização	EM	
SCCCRZ2C03E11	Sb01g005770.1 PACid 1949994	Fasciclin	Sinalização	EJ	
SCQSLR1040G04	Sb02g028120.2 PACid 1958019	Fasciclin	Sinalização	FJ	
SCRLFL3004F11.b	Sb02g028120.2 PACid 1958019	Fasciclin	Sinalização	EM	
SCACLR1129A05	Sb03g005280.1 PACid 1960641	Fasciclin	Sinalização	EJ; FJ	
SCCCCL4010B12	Sb03g005280.1 PACid 1960641	Fasciclin	Sinalização	EM	
SCJFRT2060C11	Sb03g030690.1 PACid 1962794	Fasciclin	Sinalização	EM	
SCRFLR1034D04	Sb03g030690.1 PACid 1962794	Fasciclin	Sinalização	EJ; FJ	
SCJFFL1C01C08.b	Sb03g039440.1 PACid 1963857	Fasciclin	Sinalização	EJ	
SCEPLR1051D01	Sb04g029330.1 PACid 1967671	Fasciclin	Sinalização	EJ; FJ	
SCCCCL7001H04	Sb06g026030.1 PACid 1973566	Fasciclin	Sinalização	EJ	
SCEZRZ3015A12	Sb06g026030.1 PACid 1973566	Fasciclin	Sinalização	EJ	
SCQGRT1038H03	Sb07g028140.1 PACid 1976971	Fasciclin	Sinalização	EJ	
SCVPRZ2036F10	Sb07g028140.1 PACid 1976971	Fasciclin	Sinalização	EJ; FJ	
SCCCLR1C07D10	Sb09g004700.1 PACid 1979888	Fasciclin	Sinalização	EM	
SCCCRZ3002G10	Sb09g004700.1 PACid 1979888	Fasciclin	Sinalização	EJ	X
SCEPAM1024D04	Sb09g004750.1 PACid 1979896	Fasciclin	Sinalização	EJ; EM	
SCJFHR1034E09	Sb09g028490.1 PACid 1981849	Fasciclin	Sinalização	EM	
Membrana					
SCCCSB1003H06	Sb04g024440.1 PACid 1967047	GDPD (Glycerophosphoryl diester phosphodiester)	Membrana	EJ; EM; FJ	
SCCCLB1021D04	Sb06g019730.1 PACid 1972810	GDPD (Glycerophosphoryl diester phosphodiester)	Membrana	EJ; EM	
SCEQLR1091D05	Sb09g002240.1 PACid 1979578	Lectin_legB and Pkinase	Membrana	EM	

Tabela 4 - Proteínas de parede celular encontradas nos 2 tecidos estudados em estádios diferentes (jovem e maduro) com suas respectivas anotações funcionais

(continuação)

Numero de acesso SUCEST	Homólogos em Sorgo	Família (PFAM)	Anotação Funcional	Tecidos	Células em Suspensão
Miscelânea					
SCUTAD1032E08	Sb02g000670.1 PACid 1955311	Dirigent (Defense-related)	Miscelânea	FJ	
SCVPLR2005E09	Sb02g000670.1 PACid 1955311	Dirigent (Defense-related)	Miscelânea	EM	
SCEZRZ1012G04	Sb02g000690.1 PACid 1955313	Dirigent (Defense-related)	Miscelânea	EJ	
SCRFHR1008D11	Sb02g000690.1 PACid 1955313	Dirigent (Defense-related)	Miscelânea	EM	
SCJFST1017F06	Sb02g000700.1 PACid 1955314	Dirigent (Defense-related)	Miscelânea	EJ	
SCRFSO2023E07	Sb02g002150.1 PACid 1955514	CAP (Cysteine-rich secretory proteins)	Miscelânea	FM	
SCCCLR1001B04	Sb02g037350.1 PACid 1959155	Thaumatococcus	Miscelânea	EM	
SCJFST1015D05	Sb02g037350.1 PACid 1959155	Thaumatococcus	Miscelânea	FJ; FM	
SCRURT2012C09	Sb02g037350.1 PACid 1959155	Thaumatococcus	Miscelânea	EJ; FJ; FM	
SCQSRT1035D12	Sb03g037720.1 PACid 1963670	Thaumatococcus	Miscelânea	FJ	
SCEQAM2039A03	Sb03g039330.1 PACid 1963844	Thaumatococcus	Miscelânea	EJ	
SCBFLR1083D06	Sb04g003600.1 PACid 1965306	PP2C (Protein phosphatase 2C)	Miscelânea	EJ; FJ	
SCCCL3002B04.b	Sb04g003600.1 PACid 1965306	pp2C (Protein phosphatase 2C)	Miscelânea	EJ	
SCCCLB1002D05	Sb05g005150.1 PACid 1969430	Dirigent	Miscelânea	EJ	X
SCVPST1061C06	Sb05g005150.1 PACid 1969430	Dirigent	Miscelânea	EM	
SCEZLB1007A09	Sb05g005200.1 PACid 1969436	Dirigent	Miscelânea	EM	
SCQGLR2017D03	Sb05g005400.1 PACid 1969460	Dirigent	Miscelânea	EM	
SCRFLB1054D10	Sb05g005400.1 PACid 1969460	Dirigent	Miscelânea	EM	
SCSBSB1096D03	Sb05g008790.1 PACid 1969952	Dirigent	Miscelânea	EM	
SCBGST3104F06	Sb06g015600.1 PACid 1972298	Carb_anhydrase	Miscelânea	EJ	
SCEZHR1085E07	Sb07g029050.1 PACid 1977082	Phi_1	Miscelânea	EM	
SCQGLR2025F03	Sb08g018680.1 PACid 1978692	Thaumatococcus	Miscelânea	EJ	

Tabela 4 - Proteínas de parede celular encontradas nos 2 tecidos estudados em estádios diferentes (jovem e maduro) com suas respectivas anotações funcionais

(continuação)

Numero de acesso SUCEST	Homólogos em Sorgo	Família (PFAM)	Anotação Funcional	Tecidos	Células em Suspensão
SCVPRT2080B07	Sb08g018680.1 PACid 1978692	Thaumatococcus	Miscelânea	EJ	
SCCCLR2002C10	Sb08g018720.1 PACid 1978697	Thaumatococcus	Miscelânea	EM	
SCEQRT2028C09	Sb08g018720.1 PACid 1978697	Thaumatococcus	Miscelânea	FM	
SCQGFL4075C03	Sb08g018720.1 PACid 1978697	Thaumatococcus	Miscelânea	EJ	
SCRULB2062A03.b	Sb08g018720.1 PACid 1978697	Thaumatococcus	Miscelânea	EM	
SCVPLR1028H01	Sb08g018720.1 PACid 1978697	Thaumatococcus	Miscelânea	EJ	
SCAGLR1043H10	Sb08g022420.1 PACid 1979194	Thaumatococcus	Miscelânea	EM	
SCVPRT2073B04	Sb08g022420.1 PACid 1979194	Thaumatococcus	Miscelânea	FJ; FM	
SCACSD2018E08	Sb09g005960.1 PACid 1980052	Acid phosphat B	Miscelânea	FJ	
SCACLV1021E03	Sb09g005970.2 PACid 1980055	Acid phosphat B	Miscelânea	EM	
SCEPLR1030C10	Sb09g005970.2 PACid 1980055	Acid_phosphat_B	Miscelânea	EJ; FJ	
SCQGLR1062E06	Sb10g001940.1 PACid 1982370	CAP (Cysteine-rich secretory proteins)	Miscelânea	EJ	
SCVPLR1049C03	Sb10g001940.1 PACid 1982370	CAP (Cysteine-rich secretory proteins)	Miscelânea	EM	
SCVPRT2073B08	Sb10g001940.1 PACid 1982370	CAP (Cysteine-rich secretory proteins) Phi_1 (Phosphate-induced protein 1 conserved region)	Miscelânea	EJ; FJ; FM	
SCCCLR1C03A09	Sb10g007690.1 PACid 1983092	DREPP	Miscelânea	EM; FJ; FM	
SCCCRZ1003G06	Sb03g000700.1 PACid 1960066	DREPP	Miscelânea	EM	
SCEPAM1015E08	Sb03g000700.1 PACid 1960066	DREPP	Miscelânea	EJ	
SCJFRT1009E11	Sb03g000700.1 PACid 1960066	DREPP	Miscelânea	FJ	
SCCCLR1079C11	Sb04g011100.1 PACid 1966205	DREPP (plasma membrane polypeptide)	Miscelânea	EJ; FJ	
SCACLR2029H06	Sb10g028130.1 PACid 1984845	Thaumatococcus	Miscelânea	EJ	
Oxido-redutase					
SCJLLR1104B12	Sb01g017580.1 PACid 1951431	Cu-oxidase	Oxido-redutase	EJ; EM	
SCSFHR1046B06	Sb01g017580.1 PACid 1951431	Cu-oxidase	Oxido-redutase	EJ	

Tabela 4 - Proteínas de parede celular encontradas nos 2 tecidos estudados em estádios diferentes (jovem e maduro) com suas respectivas anotações funcionais

(continuação)

Numero de acesso SUCEST	Homólogos em Sorgo	Família (PFAM)	Anotação Funcional	Tecidos	Células em Suspensão
SCQSST3114G07	Sb03g036810.1 PACid 1963561	Cu_bind_like	Oxido-redutase	FJ	
SCCCAM1073E09	Sb04g004360.1 PACid 1965405	Cu bind like	Oxido-redutase	EJ	
SCCCLR2002F10	Sb04g008590.1 PACid 1965948	peroxidase	Oxido-redutase	EM	
SCSBST3096D09	Sb04g027290.1 PACid 1967400	Cu_bind_like	Oxido-redutase	FJ	
SCCCRZ2004B02	Sb04g038610.1 PACid 1968775	peroxidase	Oxido-redutase	EJ; FJ; FM	X
SCBGHR1058E08	Sb05g001000.1 PACid 1968907	peroxidase	Oxido-redutase	FJ	
SCCCHR1002F08	Sb05g001000.1 PACid 1968907	peroxidase	Oxido-redutase	EM	X
SCBGFL5081F09	Sb05g001010.1 PACid 1968908	peroxidase	Oxido-redutase	EM	
SCJLRZ1024A10	Sb05g001010.1 PACid 1968908	peroxidase	Oxido-redutase	EJ	
SCUTHR1063E12	Sb05g001010.1 PACid 1968908	peroxidase	Oxido-redutase	EJ; FJ; FM	
SCBFLL4112F05	Sb06g018350.1 PACid 1972630	Cu bind like	Oxido-redutase	EJ; FJ	
SCCCLR1066G10	Sb06g018350.1 PACid 1972630	CU bind like	Oxido-redutase	EM	
SCEQRT1025E03	Sb06g031300.1 PACid 1974197	peroxidase	Oxido-redutase	EJ; FJ; FM	X
SCQGLR2017B10	Sb07g001280.1 PACid 1974708	peroxidase	Oxido-redutase	EM	
SCRFHR1006G03	Sb07g001280.1 PACid 1974708	peroxidase	Oxido-redutase	EM, FJ	
SCVPRT2074G12	Sb07g001280.1 PACid 1974708	peroxidase	Oxido-redutase	EJ	
SCEZLR1009B09	Sb07g011870.1 PACid 1975646	Cu_bind_like	Oxido-redutase	EM	
SCCCTR1C06C05	Sb08g001950.1 PACid 1977340	GDA1_CD39	Oxido-redutase	FJ	
SCEQRT2030A04	Sb08g001950.1 PACid 1977340	GDA1_CD39	Oxido-redutase	EJ; EM	X
SCCCTR2004A03	Sb08g001970.1 PACid 1977342	GDA1_CD39	Oxido-redutase	EM	
SCQGLR2032G02	Sb09g002740.1 PACid 1979635	peroxidase	Oxido-redutase	EJ; FJ; FM	
SCSGAM1094H05	Sb09g002740.1 PACid 1979635	peroxidase	Oxido-redutase	EM	
SCCCLR1C06D03	Sb10g000470.1 PACid 1982191	Cu-oxidase_3	Oxido-redutase	EM	

Tabela 4 - Proteínas de parede celular encontradas nos 2 tecidos estudados em estádios diferentes (jovem e maduro) com suas respectivas anotações funcionais

(continuação)

Numero de acesso SUCEST	Homólogos em Sorgo	Família (PFAM)	Anotação Funcional	Tecidos	Células em Suspensão
SCCCST1004B07	Sb10g000470.1 PACid 1982191	Cu-oxidase	Oxido-redutase	EJ	
SCJFFL1C01G03	Sb10g000470.1 PACid 1982191	Cu-oxidase	Oxido-redutase	EM	
SCAGLR2018C03	Sb10g007430.1 PACid 1983064	Cu bind like	oxido-redutase	EJ; FJ	
SCCCCL3001G02.b	Sb10g007520.1 PACid 1983074	Cu bind like	oxido-redutase	EM	
SCCCLR1068B06	Sb10g007520.1 PACid 1983074	CU bind like	oxido-redutase	EM	
SCMCLR1123H12	Sb10g007520.1 PACid 1983074	CU bind like	oxido-redutase	EJ; EM	
SCUTST3152F08	Sb10g007520.1 PACid 1983074	CU bind like	oxido-redutase	EJ; FJ	
SCJLRT1019B02	Sb10g021610.1 PACid 1983994	peroxidase	Oxido-redutase	EJ; EM	
SCSGRT2062D07	Sb10g021610.1 PACid 1983994	peroxidase	Oxido-redutase	EJ; FJ; FM	
SCEZFL4040H03	Sb10g021640.1 PACid 1983999	peroxidase	Oxido-redutase	EJ	
SCCCRZ2002G09	Sb10g027270.1 PACid 1984716	Cu-oxidase_3	oxido-redutase	EJ; FJ; FM	
SCEZLR1052C03	Sb10g027460.1 PACid 1984740	Cu_bind_like	Oxido-redutase	EM	
SCCCLB1003G10	Sb10g027490.1 PACid 1984746	peroxidase	Oxido-redutase	EJ; FJ	
SCEPLR1051B04	Sb10g027490.1 PACid 1984746	peroxidase	Oxido-redutase	EJ; EM; FJ	
SCCCLB1001G04	Sb10g028500.1 PACid 1984890	Peroxidase	Oxido-redutase	EJ; EM	
SCCCRZ2003E04	Sb01g010520.1 PACid 1950605	Cu_bind_like	Oxido-redutases	EJ	
SCCCCL4008H04	Sb01g016600.1 PACid 1951313	Peroxidase	Oxido-redutases	EJ	X
SCBFRZ2017G05	Sb01g017580.1 PACid 1951431	Cu-oxidase	Oxido-redutases	EJ	
SCJFFL1C05F09.b	Sb01g027330.1 PACid 1952342	peroxidase	Oxido-redutases	EM	
SCEZAD1081F04	Sb01g030530.1 PACid 1952769	peroxidase	Oxido-redutases	FJ	
SCCART1001G12	Sb01g041770.1 PACid 1954156	peroxidase	Oxido-redutases	EJ; EM; FJ; FM	
SCCCRZ2002E08	Sb02g000470.1 PACid 1955290	peroxidase	Oxido-redutases	EM	
SCBGLR1023A04	Sb02g000840.1 PACid 1955334	Cu_bind_like	Oxido-redutases	FJ	

Tabela 4 - Proteínas de parede celular encontradas nos 2 tecidos estudados em estádios diferentes (jovem e maduro) com suas respectivas anotações funcionais

(continuação)

Numero de acesso SUCEST	Homólogos em Sorgo	Família (PFAM)	Anotação Funcional	Tecidos	Células em Suspensão
SCCCRZ2C03A09	Sb02g000840.1 PACid 1955334	Cu_bind_like	Oxido-redutases	EM	
SCRUFL1119B06.b	Sb02g000840.1 PACid 1955334	Cu_bind_like	Oxido-redutases	EM	
SCCCCL7037A10	Sb02g027330.1 PACid 1957924	Peroxidase	Oxido-redutases	EJ; FJ; FM	X
SCJLLR1104H07	Sb02g034420.1 PACid 1958784	Cu-oxidase	Oxido-redutases	EJ	
SCSFRT2069A06	Sb02g034420.1 PACid 1958784	Cu-oxidase	Oxido-redutases	EJ	
SCCCRT1003B03	Sb02g036870.1 PACid 1959102	Cu_bind_like	Oxido-redutases	EJ	
SCVPLR2012H12	Sb02g036870.1 PACid 1959102	Cu_bind_like	Oxido-redutases	EM	
SCCCLR1001E04	Sb03g004380.1 PACid 1960526	Peroxidase	Oxido-redutases	EM	
SCJLLR1102H07	Sb03g004380.1 PACid 1960526	Peroxidase	Oxido-redutases	EJ	
SCEZRZ3127C02	Sb03g010240.1 PACid 1961260	peroxidase	Oxido-redutases	EJ; EM	
SCCCST1002E03	Sb03g010250.1 PACid 1961261	peroxidase	Oxido-redutases	EJ	
SCEPAM2056G07	Sb03g010740.1 PACid 1961319	peroxidase	Oxido-redutases	EJ	
SCEQRT2026A06	Sb03g010740.1 PACid 1961319	peroxidase	Oxido-redutases	FM	
SCEZRZ1012B07	Sb03g010740.1 PACid 1961319	peroxidase	Oxido-redutases	EM	
SCSBLB1033B10	Sb03g010740.1 PACid 1961319	peroxidase	Oxido-redutases	EJ; EM; FJ; FM	
SCVPRZ2035F03	Sb03g010740.1 PACid 1961319	peroxidase	Oxido-redutases	EJ; EM	X
SCVPRZ3029F03	Sb03g010740.1 PACid 1961319	peroxidase	Oxido-redutases	EJ	
SCBFRZ2017C11	Sb03g013190.1 PACid 1961623	peroxidase	Oxido-redutases	EJ; FJ; FM	
SCCCCL4009B07	Sb03g013190.1 PACid 1961623	peroxidase	Oxido-redutases	EM	
SCCCCL3002E11.b	Sb03g013200.1 PACid 1961624	peroxidase	Oxido-redutases	EJ	X
SCCCLR1C05G08	Sb03g024460.1 PACid 1962048	peroxidase	Oxido-redutases	EJ; EM	X
Proteases					
SCEPLR1051D02	Sb01g007820.1 PACid 1950246	Peptidase_C1 A	Protease	EM	

Tabela 4 - Proteínas de parede celular encontradas nos 2 tecidos estudados em estádios diferentes (jovem e maduro) com suas respectivas anotações funcionais

(continuação)

Numero de acesso SUCEST	Homólogos em Sorgo	Família (PFAM)	Anotação Funcional	Tecidos	Células em Suspensão
SCCCRZ2002C04	Sb01g013970.1 PACid 1951012	Subtilisin (Peptidase S8)	Protease	EM	
SCJFFL1C05F05	Sb01g013970.1 PACid 1951012	Subtilisin (Peptidase S8)	Protease	EJ	
SCJLRT1021D04	Sb01g013970.1 PACid 1951012	Subtilisin (Peptidase S8)	Protease	EJ; FJ; FM	
SCSGRZ3061C09	Sb01g013970.1 PACid 1951012	Subtilisin (Peptidase S8)	Protease	EJ	
SCJFRZ2029D05	Sb01g023190.1 PACid 1952077	Subtilisin (Peptidase S8)	Protease	EJ; FJ; FM	
SCRUFL3064H08	Sb01g023190.1 PACid 1952077	Subtilisin (Peptidase S8)	Protease	EJ	
SCBFLR1083E03	Sb01g044790.1 PACid 1954505	TAXi N and TAXi C (Xylanase inhibitor)	Protease	EM	
SCQGHR1013F03	Sb01g044790.1 PACid 1954505	TAXi N and TAXi C (Xylanase inhibitor)	Protease	FJ	
SCQGRT1039F06	Sb01g044790.1 PACid 1954505	TAXi N and TAXi C (Xylanase inhibitor)	Protease	EM	
SCVPLR2012E01	Sb01g044790.1 PACid 1954505	TAXi N and TAXi C (Xylanase inhibitor)	Protease	EJ	
SCVPRZ2038B09	Sb01g044790.1 PACid 1954505	TAXi N and TAXi C (Xylanase inhibitor)	Protease	EJ	
SCEQRT1033D01	Sb02g009600.1 PACid 1956488	Subtilisin (Peptidase S8)	Protease	EJ; FJ	
SCBGST3110C12	Sb02g025810.1 PACid 1957724	Subtilisin (Peptidase S8)	Protease	EJ	
SCCCRT3003E05	Sb02g025920.1 PACid 1957737	Peptidase_C1 A	Protease	FM	
SCEQLB1068G06	Sb02g041610.1 PACid 1959684	Ser carboxypeptidase (Peptidase S10)	Protease	FJ	
SCRFLR2034G09	Sb02g041610.1 PACid 1959684	Ser carboxypeptidase (Peptidase S10)	Protease	EM	
SCCCCL3003A08.b	Sb02g041760.1 PACid 1959702	TAXi N and TAXi C (Xylanase inhibitor)	Protease	EM	
SCEQLR1050E07	Sb02g041760.1 PACid 1959702	TAXi N and TAXi C (Xylanase inhibitor)	Protease	EJ	
SCJFLR1013A10	Sb02g041760.1 PACid 1959702	TAXi N and TAXi C (Xylanase inhibitor)	Protease	EJ	
SCEPRT2044F09	Sb03g005360.1 PACid 1960651	Ser carboxypeptidase (Peptidase S10)	Protease	EJ; EM	
SCJFRZ2029F03	Sb03g005360.1 PACid 1960651	Ser carboxypeptidase (Peptidase S10)	Protease	EJ	
SCRULB1059D04	Sb03g005360.1 PACid 1960651	Ser carboxypeptidase (Peptidase S10)	Protease	EJ	
SCCCLB1004D05	Sb03g005370.1 PACid 1960652	Ser carboxypeptidase (Peptidase S10)	Protease	EM	

Tabela 4 - Proteínas de parede celular encontradas nos 2 tecidos estudados em estádios diferentes (jovem e maduro) com suas respectivas anotações funcionais

(continuação)

Numero de acesso SUCEST	Homólogos em Sorgo	Família (PFAM)	Anotação Funcional	Tecidos	Células em Suspensão
SCCCLR1C01H05	Sb03g005370.1 PACid 1960652	Ser carboxypeptidase (Peptidase S10)	Protease	EJ; EM	
SCCCLR2003G06	Sb03g035680.1 PACid 1963420	Subtilisin (Peptidase S8)	Protease	EJ; FJ	
SCQSRT1035E11	Sb04g026900.1 PACid 1967354	Ser carboxypeptidase (Peptidase S10)	Protease	FJ; FM	
SCQSSB1059G07	Sb04g026900.1 PACid 1967354	Ser carboxypeptidase (Peptidase S10)	Protease	FJ; FM	
SCBGLR1023G11	Sb04g029670.1 PACid 1967716	TAXi N and TAXi C (Xylanase inhibitor)	Protease	EJ	
SCCCLR1068D10	Sb04g029670.1 PACid 1967716	TAXi N and TAXi C (Xylanase inhibitor)	Protease	EM, FJ	
SCJFRT2057C03	Sb04g034980.1 PACid 1968353	Subtilisin (Peptidase S8)	Protease	EM	
SCQGLR1088C06	Sb05g022960.1 PACid 1970771	Subtilisin (Peptidase S8)	Protease	EJ	
SCVPRT2073C10	Sb05g022960.1 PACid 1970771	Subtilisin (Peptidase S8)	Protease	EJ; FJ; FM	
SCRURT2005F02	Sb05g026670.1 PACid 1971244	TAXi N and TAXi C (Xylanase inhibitor)	Protease	FJ; FM	
SCVPRT2080H05	Sb05g026670.1 PACid 1971244	TAXi N and TAXi C (Xylanase inhibitor)	Protease	FJ; FM	
SCCCCL4011C02	Sb05g027350.1 PACid 1971344	TAXi N and TAXi C (Xylanase inhibitor)	Protease	EM	
SCCCCL4015F12	Sb05g027350.1 PACid 1971344	TAXi N and TAXi C (Xylanase inhibitor)	Protease	FJ; FM	
SCBGLR1097G03	Sb05g027510.1 PACid 1971364	TAXi N and TAXi C (Xylanase inhibitor)	Protease	EJ; FJ	
SCEZRZ3015E11	Sb05g027510.1 PACid 1971364	TAXi N and TAXi C (Xylanase inhibitor)	Protease	EJ; FJ; FM	
SCEPSD2071B08	Sb06g014580.1 PACid 1972153	Ser carboxypeptidase (Peptidase S10)	Protease	EM	
SCEQLR1050G05	Sb06g014580.1 PACid 1972153	Ser carboxypeptidase (Peptidase S10)	Protease	EM	
SCEQRT2025H02	Sb06g016860.1 PACid 1972441	Subtilisin (Peptidase S8)	Protease	EJ	
SCCCLR1022B11	Sb06g030800.1 PACid 1974139	Peptidase_C1 A	Protease	EJ; FJ; FM	X
SCUTCL6036H09	Sb06g030800.1 PACid 1974139	Peptidase_C1 A	Protease	EM	
SCCCCL4006G06	Sb06g032320.1 PACid 1974327	Peptidase_C1 A	Protease	EJ	X
SCJFRZ2009E12	Sb06g033560.1 PACid 1974470	TAXi N and TAXi C (Xylanase inhibitor)	Protease	EJ; FJ; FM	
SCRFLR2038B01	Sb06g033560.1 PACid 1974470	TAXi N and TAXi C (Xylanase inhibitor)	Protease	EJ	

Tabela 4 - Proteínas de parede celular encontradas nos 2 tecidos estudados em estádios diferentes (jovem e maduro) com suas respectivas anotações funcionais

(continuação)

Numero de acesso SUCEST	Homólogos em Sorgo	Família (PFAM)	Anotação Funcional	Tecidos	Células em Suspensão
SCCCFL1001E01	Sb09g000960.1 PACid 1979414	Peptidase_C1 A	Protease	EJ	
SCEZRT2018F03	Sb09g019770.1 PACid 1980799	TAXi N and TAXi C (Xylanase inhibitor)	Protease	FJ	X
SCCCLR1C07B06	Sb09g025690.1 PACid 1981514	Peptidase_C26	Protease	EJ	
SCVPRT2077C05	Sb10g023970.1 PACid 1984312	TAXi N and TAXi C (Xylanase inhibitor)	Protease	EJ; EM	X
Proteínas com domínio de interação					
SCRFRZ3057C09	Sb02g031910.1 PACid 1958478	LysM domain	Proteínas com domínio de interação (Proteínas ou carboidratos)	FJ	
SCJLLR1103G09	Sb02g036750.1 PACid 1959084	LRR domain	Proteínas com domínio de interação (Proteínas ou carboidratos)	EM	
SCQGLR1019G02	Sb02g036750.1 PACid 1959084	LRR domain	Proteínas com domínio de interação (Proteínas ou carboidratos)	EJ	
SCSFAD1125C08	Sb02g036750.1 PACid 1959084	LRR domain	Proteínas com domínio de interação (Proteínas ou carboidratos)	EJ	
SCVPLR2019B03	Sb02g036750.1 PACid 1959084	LRR domain	Proteínas com domínio de interação (Proteínas ou carboidratos)	EJ	X
SCVPLR2027A11	Sb02g036750.1 PACid 1959084	LRR domain	Proteínas com domínio de interação (Proteínas ou carboidratos)	EJ; EM; FJ; FM	
SCEZLB1006F09	Sb03g007030.1 PACid 1960859	LRR domain	Proteínas com domínio de interação (Proteínas ou carboidratos)	FJ	
SCSBFL4065H01	Sb05g022600.1 PACid 1970725	Inhibitor_I9	Proteínas com domínio de interação (Proteínas ou carboidratos)	FJ	
SCJFRZ2025E05	Sb09g000430.1 PACid 1979344	LRR domain	Proteínas com domínio de interação (Proteínas ou carboidratos)	EJ; FJ	
SCRUAD1063C06	Sb09g000430.1 PACid 1979344	LRR domain	Proteínas com domínio de interação (Proteínas ou carboidratos)	EJ	
SCCCLR1070F12	Sb09g001743.1 PACid 1979512	LysM domain	Proteínas com domínio de interação (Proteínas ou carboidratos)	EM	
SCEZRZ1014C09	Sb09g030470.1 PACid 1982085	LRR domain	Proteínas com domínio de interação (Proteínas ou carboidratos)	EM	
SCEZLB1013B06	Sb10g006860.1 PACid 1982990	LysM domain	Proteínas com domínio de interação (Proteínas ou carboidratos)	EJ; FJ	

Tabela 4 - Proteínas de parede celular encontradas nos 2 tecidos estudados em estádios diferentes (jovem e maduro) com suas respectivas anotações funcionais

(continuação)

Numero de acesso SUCEST	Homólogos em Sorgo	Família (PFAM)	Anotação Funcional	Tecidos	Células em Suspensão
SCJLRT1013C01	Sb02g042780.1 PACid 1959828	Pectinesterase and PME1	Proteínas com domínio de interação (Proteínas ou carboidratos)	EM	
SCSGLR1025E03	Sb02g042780.1 PACid 1959828	Pectinesterase and PME1	Proteínas com domínio de interação (Proteínas ou carboidratos)	EJ	
SCBFLR1046F11	Sb04g021920.1 PACid 1966727	PME1	Proteínas com domínio de interação (Proteínas ou carboidratos)	EM	
SCBFRZ2045E03	Sb04g021920.1 PACid 1966727	PME1	Proteínas com domínio de interação (Proteínas ou carboidratos)	FM	X
SCEZRZ3016E11	Sb04g021920.1 PACid 1966727	PME1	Proteínas com domínio de interação (Proteínas ou carboidratos)	FJ	
SCQGRT1040D08	Sb04g021920.1 PACid 1966727	PME1	Proteínas com domínio de interação (Proteínas ou carboidratos)	EJ; EM; FJ	
SCVPRZ2040D09	Sb04g021920.1 PACid 1966727	PME1	Proteínas com domínio de interação (Proteínas ou carboidratos)	EJ; FJ; FM	X
SCCCRZ1C01H06	Sb10g029730.1 PACid 1985036	PME1	Proteínas com domínio de interação (Proteínas ou carboidratos)	EJ; FJ; FM	
SCEQRT2028E03	Sb10g029730.1 PACid 1985036	PME1	Proteínas com domínio de interação (Proteínas ou carboidratos)	EM	
SCJFST1016E01	Sb10g029730.1 PACid 1985036	PME1	Proteínas com domínio de interação (Proteínas ou carboidratos)	EM	
SCQSRT2036A12	Sb10g029730.1 PACid 1985036	PME1	Proteínas com domínio de interação (Proteínas ou carboidratos)	EM	
SCSBFL4010B08	Sb10g029730.1 PACid 1985036	PME1	Proteínas com domínio de interação (Proteínas ou carboidratos)	EJ	
SCCCRZ3004D03	Sb03g010730.1 PACid 1961318	Cystatin	Proteínas com domínio de interação (Proteínas ou carboidratos)	FJ	
SCCCLR1C01C09	Sb03g037370.2 PACid 1963628	Cystatin	Proteínas com domínio de interação (Proteínas ou carboidratos)	EM	
SCEPFL3089C05	Sb03g037370.2 PACid 1963628	Cystatin	Proteínas com domínio de interação (Proteínas ou carboidratos)	EJ; FJ	X
Proteínas com função desconhecida					
SCJFFL3C04C03	Sb01g000530.1 PACid 1949340	DUF303	Função Desconhecida	EJ	

Tabela 4 - Proteínas de parede celular encontradas nos 2 tecidos estudados em estádios diferentes (jovem e maduro) com suas respectivas anotações funcionais

(continuação)

Numero de acesso SUCEST	Homólogos em Sorgo	Família (PFAM)	Anotação Funcional	Tecidos	Células em Suspensão
SCVPRT2083B12	Sb01g001880.1 PACid 1949514	PD40	Função Desconhecida	EM	
SCBFLR1083D11	Sb01g004270.1 PACid 1949801	DUF642	Função Desconhecida	EM	
SCCCCL4009G04	Sb01g004270.1 PACid 1949801	DUF642	Função Desconhecida	EJ	X
SCJLRT1014H01	Sb01g004270.1 PACid 1949801	DUF642	Função Desconhecida	EM	
SCSGLR1084A12	Sb01g004270.1 PACid 1949801	DUF642	Função Desconhecida	EJ	X
SCJFRZ1005C03	Sb01g005280.1 PACid 1949935	PITH	Função Desconhecida	EM	
SCRFLR1055F07	Sb01g005280.1 PACid 1949935	PITH	Função Desconhecida	EJ	
SCSBST3098G08	Sb01g029250.1 PACid 1952597	DPBB_1	Função Desconhecida	EM	
SCCCLR1065A10	Sb01g029330.1 PACid 1952609	DPBB_1	Função Desconhecida	FJ	
SCCCRZ2001B07	Sb01g031470.1 PACid 1952879	PP1	Função Desconhecida	EJ; EM	
SCQSLR1040E09	Sb01g031470.1 PACid 1952879	PP1	Função Desconhecida	EM	
SCRFHR1007E04	Sb01g031470.1 PACid 1952879	PP1	Função Desconhecida	EJ; EM	
SCVPHR1095E09	Sb01g039360.1 PACid 1953865	Stress-antifung	Função Desconhecida	FJ	
SCJFLR1017E03	Sb02g003360.1 PACid 1955658	E1_DerP2_DerF2	Função Desconhecida	EJ	
SCEQRT1024E12	Sb02g035830.1 PACid 1958967	DUF538	Função Desconhecida	EM	
SCCCLB1001B05	Sb03g027650.1 PACid 1962430	DUF_642	Função Desconhecida	EM; FM	
SCEZRZ3099G01	Sb03g043560.1 PACid 1964353	DUF538	Função Desconhecida	EJ; EM	
SCEQRT1029F09	Sb04g027230.1 PACid 1967391	DPBB_1	Função Desconhecida	EJ	
SCCCCL4013D09	Sb07g026630.1 PACid 1976789	DUF_568	Função Desconhecida	EM	
SCQGLR1041H04	Sb07g026630.1 PACid 1976789	DUF_568	Função Desconhecida	EM	
SCBGRT1047G10	Sb02g004500.1 PACid 1955809	Cupin 1 (Germin-like)	Função Desconhecida	EJ; FJ; FM	
SCCCLR1048F12	Sb03g005150.1 PACid 1960624	CUPin_1	Função Desconhecida	EM	
SCJFRZ2013F04	Sb03g005150.1 PACid 1960624	CUPin_1	Função Desconhecida	EJ	

Tabela 4 - Proteínas de parede celular encontradas nos 2 tecidos estudados em estádios diferentes (jovem e maduro) com suas respectivas anotações funcionais

(conclusão)

Numero de acesso SUCEST	Homólogos em Sorgo	Família (PFAM)	Anotação Funcional	Tecidos	Células em Suspensão
SCRLST3166D09	Sb03g005150.1 PACid 1960624	CUPin 1	Função Desconhecida	EJ; FJ; FM	
SCACAM2042B09	Sb04g021670.1 PACid 1966696	Cupin 1	Função Desconhecida	EJ	
Proteínas sem classificação					
SCSGLV1009H10.b	Sb02g031170.1 PACid 1958399	Ribonuclease_T2		FJ	
SCCCSD1094H05	Sb03g043760.1 PACid 1964377	RRM_1		EM	
SCCCHR1002G07	Sb04g029590.1 PACid 1967707			FJ	
SCAGFL1089C05	Sb08g018710.1 PACid 1978696			EJ	
SCJLLR1106C06	Sb08g018710.1 PACid 1978696			EJ; FJ; FM	
SCRUFL1020A01	Sb08g018710.1 PACid 1978696			EM	
SCSFST1066G10	Sb08g018710.1 PACid 1978696			EJ	

2.3.3.1 Comparação entre as classes funcionais

Das 365 proteínas de parede celular encontradas, apenas 9 estão presentes nos quatro tratamentos, mostrando que há diferenças entre as proteínas extraídas e os tecidos estudados, diferente do que foi encontrado nos trabalhos de Douché et al. (2013), que identificou 63 de 314 proteínas presentes nos quatro órgãos. Em relação às proteínas exclusivas de cada tecido, foram encontradas 111 proteínas nos entrenós jovens, 100 nos entrenós maduros, 29 nas folhas jovens e 8 em folhas maduras.

Vinte e cinco PPCs são comuns em EJ e FJ (órgãos de crescimento), apenas 1 PPC, com função desconhecida, é comum em EM e FM (órgãos de maturação). Comparando o mesmo tecido em diferentes estádios de desenvolvimento, obtiveram-se: 21 PPCs comuns apenas em EJ e EM e 16 PPCs apenas em FJ e FM. 43 PPCs encontradas em três dos quatro tratamentos analisados.

Como já mencionado, as PPCs foram divididas em 10 classes funcionais : PPS= Proteínas agindo em polissacarídeos; PML= Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos; PS= Proteínas de sinalização; PM= Proteínas de membrana; PMS= Miscelânea; PO-Red= Proteínas óxidorredutases; PROT= Proteases; PDI= Proteínas com domínio de interação; PFD= Proteínas com função desconhecida; PSC= Proteínas sem classe definida (Tabela 5).

Tabela 5 - Distribuição das proteínas de parede celular de cana-de-açúcar em classes funcionais nos diferentes tecidos: EJ, EM, FJ e FM

Classe Funcional	EJ	EM	FJ	FM
PPS	26,34	20,28	23,39	26,76
PML	10,73	8,39	14,52	19,72
OS	5,37	4,89	4,03	0
PM	0,98	2,1	0,81	0
PMS	8,88	11,19	9,68	9,9
PO-Red	19,51	23,08	17,74	15,49
PROT	14,15	11,19	14,52	16,9
PDI	6,34	7,69	9,68	5,63
PFD	6,34	9,79	3,23	4,23
PSC	1,46	1,4	2,42	1,41

*Os valores são expressos em porcentagens do número total de PPCs.

A distribuição das proteínas identificadas dentro dessas classes foi ligeiramente diferente em cada tratamento (Tabela 5). Em proteínas agindo como

polissacarídeos (PPS) ocorreu maior porcentagem em EJ (26,34%) e FM (26,76%), corroborando os resultados obtidos por Douché et al., (2013), que encontrou 23,5% em EJ e 26,5% em FM. As PPCs foram representadas por 66 glicosil hidrolases (Tabela 4), de acordo com resultados obtidos por trabalhos anteriores que mostraram que as proteínas agindo em polissacarídeos foram o grupo mais representativo de PPCs (BAYER et al., 2006; BOUDART et al., 2005; CALDERAN-RODRIGUES, 2012), sendo a classe mais abundante em todos os tecidos, com exceção do EM. A função dessas proteínas está relacionada ao rearranjo de polissacarídeos durante o desenvolvimento da parede (CASSAB; VARNER, 1988; FRESHOUR et al., 1996; NICOL; HOFTE, 1998; ROSE; BENNETT, 1999), possibilitando flexibilidade na estrutura até mesmo em plantas maduras (CASSAB & VARNER, 1988), mostrando a importância do metabolismo de polissacarídeos dentro da matriz extracelular (BOUDART et al., 2005). As glicosil hidrolases são uma família de proteínas intensamente estudadas por estarem ligadas ao remodelamento dos polissacarídeos da parede, e, conseqüentemente podem estar envolvidas na quebra da parede celular requerida para a produção de etanol celulósico.

As famílias de GH encontradas neste estudo compreendem: GH1, GH3, GH14, GH16, GH17, GH18, GH19, GH28, GH31, GH35, GH38 e GH39, sendo GH1, GH17, GH3 e GH28 as mais abundantes. Essa proporção foi semelhante à encontrada por Douché et al., (2013). Os dados mostram que a proporção de famílias GH1 foram maiores quando se utilizou a metodologia de infiltração a vácuo (CALDERAN-RODRIGUES, 2012; DOUCHÉ et al., 2013). A proporção de famílias de GH entre monocotiledôneas e dicotiledôneas são diferentes devido à diversidade de composição e estrutura das paredes celulares.

As paredes primárias de dicotiledôneas são ricas em pectinas e as principais hemiceluloses são xiloglucanas. Por sua vez, as monocotiledôneas contém arabinoxilanas e (1,3) (1,4) – β – D- glucanas, uma pequena proporção de pectina, e também componentes fenólicos, tais como ácidos ferúlico e cumárico. Além disso, as paredes celulares também exibem diferenças como as arabinoxilanas mais complexas em monocotiledôneas, cadeias laterais de arabinosil que podem ser entrelaçadas com a lignina por meio de ésteres feruloil. No entanto, devido as diferentes técnicas de extração utilizadas e também devido à diversidade de órgãos analisados, pode-se fazer uma comparação superficial dos proteomas de parede

celular de mono e dicotiledôneas. Similarmente aos resultados encontrados por Douché et al., (2013) nenhuma GH13 foi identificada neste trabalho, embora várias delas tenham sido identificadas em células em suspensão de arroz (CHEN et al., 2008; CHO et al., 2009; JUNG et al., 2008), as quais são relacionadas ao metabolismo de amido. Da mesma forma as GH18 são muito mais numerosas em monocotiledôneas quando comparadas com *Arabidopsis thaliana* (DOUCHÉ et al., 2013 ; CALDERAN- RODRIGUES et al., 2014). Essa família de GH compreende enzimas que agem contra xilanases bacterianas ou fúngicas (GEBRUERS et al., 2004), enzimas que agem na extensão celular (OKAMOTO et al., 2000) ou quitinases que agem na transdução de sinais ou proteção contra patógenos (BRUNNER et al., 1998; SASAKI et al., 2006).

Identificadas também em estômago de cupins, as famílias de proteínas GH1 e GH3 foram designadas como β -glicosidases e, portanto, celulasas, sendo enzimas que preferencialmente hidrolisam ligações glicosídicas β -1-4. Por sua vez, a GH16 encontrada neste estudo foi relacionada à função de hemicelulase, e provavelmente é uma β -1-3-glucanase. As proteínas pertencentes à família GH28 desempenharam a função de pectinases, sendo caracterizadas como poligalacturonases. Já as GH31 encontradas foram identificadas como amilases. As celulasas, hemicelulasas e pectinases são enzimas-alvo prospectadas para desempenharem a degradação dos polissacarídeos da parede celular vegetal – processo fundamental para produção do etanol celulósico (FRANCO-CAIRO et al., 2011). Sendo assim, as 66 glicosil-hidrolases identificadas neste estudo podem servir de base para outros estudos que visem a otimização da produção de etanol de segunda geração.

Já a classe de oxidoredutases (PO-Red) apresentou uma maior quantidade nos entrenós, maduros (23,08%) e jovens (19,51%) em comparação com as folhas, maduras (17,74%) e jovens (15,49%). Esses resultados condizem com os resultados encontrados em proteínas de parede celular de *Brackypodium* (DOUCHÉ et al., 2013). É também, neste trabalho, a classe mais representativa em EM. A classe de oxidoredutases foi composta predominantemente por peroxidases (39), “Cu-oxidase” (9) e “Cu-bind like” (blue copper binding proteins) (18), semelhante às famílias encontradas em entrenós de cana-de-açúcar com 2 meses de idade (CALDERAN-RODRIGUES 2012) e *Brachypodium* (DOUCHÉ et al., 2013).

As peroxidases são enzimas de parede celular, identificadas em muitos estudos (SLABAS et al., 2004; BAYER et al., 2006; KONG et al., 2010), e estão

localizadas principalmente na matriz extracelular, vacúolos e relacionadas ao crescimento das paredes celulares, envolvidas na oxidação de seus polímeros (BAYER et al., 2006) e em mecanismos de defesa (ALMAGRO et al., 2008). Durante o ciclo hidrolítico, as peroxidases podem produzir espécies reativas de oxigênio, as quais quebram, de maneira não enzimática, os polissacarídeos da parede celular, favorecendo a extensão da parede, e durante o ciclo peroxidativo, as peroxidases podem promover a troca de componentes da parede celular, tais como proteínas estruturais ou lignina, (IRSHAD et al., 2008).

Essas proteínas foram encontradas em abundância neste trabalho e em trabalhos anteriores de proteínas de parede celular com cana-de-açúcar (CALDERAN-RODRIGUES et al., 2014) e com *Brachypodium distachyon* (DOUCHÉ et al., 2013) entretanto, curiosamente, no protocolo original (BOUDART et al., 2005), com *Arabidopsis thaliana*, elas não foram encontradas. Uma das possíveis causas para a ausência da identificação de peroxidases seria a limitação da metodologia, pois já se sabia que as peroxidases formavam um grupo de proteínas extremamente abundante na parede, codificadas por famílias multigênicas contendo cerca de 70 membros (BOUDART et al., 2005). No entanto, como no presente trabalho e em outros (CALDERAN-RODRIGUES, 2012) várias peroxidases foram identificadas, essa hipótese de que a metodologia foi ineficiente foi descartada. Precusores de chemocianina, “blue copper binding proteins”, foram também encontradas no proteoma de parede celular (CHEN et al., 2009; LIGAT et al., 2011) e podem estar relacionadas com a formação do tubo polínico.

Tradicionalmente, as oxido-redutases estão presentes em maior proporção em monocotiledôneas do que em *Arabidopsis*. No entanto, neste trabalho a proporção de peroxidases foi menor que em *A. thaliana*, já que as proteínas identificadas mostraram uma distribuição mais homogênea com relação a função. As peroxidases agem na ligação de aminoácidos aromáticos com polissacarídeos e por isso podem ser de interesse para estudos que busquem genes-alvo para estratégias de conversão de biomassa. Ainda as três peroxidases classe III encontradas no trabalho de Cesarino et al., 2012, que estudou colmos de cana-de-açúcar, também foram identificadas nesse trabalho.

Visando a compreensão dos mecanismos de formação e afrouxamento da parede celular para a diminuição dos custos do pré-tratamento e, consequentemente, maior produção do bioetanol celulósico, optou-se por dar maior

destaque às GHs e peroxidases presentes somente nos tecidos jovens (EJ e FJ), já que são tecidos em pleno desenvolvimento.

Notou-se que algumas dessas GHs (Tabela 4) estavam presentes em ambos tecidos: a proteína SCVPRT2073A02, pertencente à família GH1, e provavelmente uma celulase; a proteína SCCCCL4009F05, da família GH3, também provavelmente uma celulase; e a proteína SCEZRZ3016H03, da família GH16, uma provável hemicelulase. As proteínas da família das celulases, hemicelulases e pectinases normalmente são utilizadas em coquetéis enzimáticos que vão agir no processo de produção do etanol de segunda geração. Dessa forma, as proteínas supracitadas são indicadas para estudos de manipulação genética e estratégias para obtenção de etanol celulósico com a utilização de enzimas próprias da planta.

Outras proteínas que foram encontradas nessas famílias e que podem ser alvos para estudos de manipulação genética visando a produção de etanol de palha e bagaço são algumas proteínas GH1, possivelmente celulases, que estavam presentes exclusivamente em EJ, tais como: SCBFAD1045D12, SCCCCL3001B10.b, SCEQRT1024D03, SCAGLR1021F11, SCCCST1007A09 e SCSBSB1057E03. Assim como as proteínas da família GH3, também prováveis celulases: SCEPAM2015E05 e SCAGRT2037A11. Apenas uma proteína, SCBGST3106E01, GH16, com possibilidade de ser uma hemicelulase, foi encontrada exclusivamente em EJ. Duas proteínas, SCJLLR1108B10 e SCSGLR1025B11 foram também exclusivas de EJ, pertencente à família GH28, e possivelmente pectinases.

Em relação às peroxidases, a proteína SCCCLB1003G10 foi a única peroxidase presente em ambos tecidos jovens. Nove peroxidases foram exclusivas de EJ: SCJLRZ1024A10, SCVPRT2074G12, SCEZFL4040H03, SCCCCL4008H04, SCJLLR1102H07, SCCCST1002E03, SCEPAM2056G07, SCVPRZ3029F03 e SCCCCL3002E11.b, e apenas duas foram exclusivas de FJ: SCBGHR1058E08 e SCEZAD1081F04. Como já citado, as peroxidases atuam na quebra dos componentes da parede celular, e, por esse motivo, indica-se que elas também devem ser consideradas em estudos que visem a modificação dos componentes da parede celular da cana-de-açúcar para produção de etanol celulósico.

Considerando as proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos (PML), houve maior quantidade nas folhas FJ (14,52%) e FM (19,72%), chegando praticamente a dobrar em relação ao valor encontrado em entrenós. Os resultados

foram diferentes daqueles obtidos por DOUCHÉ et al., (2013), que no geral obtiveram uma proporção muito similar entre os tecidos. Essa alta proporção de PMLs em folhas provavelmente está relacionada ao fato de que a folha possui cutículas nas suas duas faces nesse tecido, sendo que indícios apontam que as lipases estão envolvidas na sua formação (VOLOKITA et al., 2010). As proteínas ligadas ao metabolismo de lipídeos foram todas consideradas como transportadora de lipídeos, com exceção da lipase, o que condiz com o que foi encontrado nos trabalhos anteriores com cana-de-açúcar (CALDERAN-RODRIGUES, 2012) em outras espécies (CHEN et al., 2009; BOUDART et al., 2005). As LTP2 foram encontradas por serem reguladas na epiderme das hastes, contribuindo para a formação da cutícula durante o alongamento da parede (SUH et al., 2005), além de induzir a sinalização sistêmica de resistência, capacidade de promover a expansão da parede celular e ativação de poligalacturonases (NIEUWLAND et al., 2009). Por outro lado, a família GDSL pode atuar como lipídeos da suberina ou cutícula (IRSHAD et al., 2008), sendo encontrada, neste trabalho, apenas em entrenós.

As proteínas pertencentes à classe miscelânea foram representadas por taumatinas, também encontradas em outros estudos (BOUDART et al., 2005; BAYER et al., 2006; KONG et al., 2010), proteínas secretórias ricas em cisteínas, fosfatases, proteínas de resposta a resistência de doenças e membros da família “dirigent” . As taumatinas foram também encontradas em outros trabalhos (ZHU et al., 2006; ROBERTSON, 1997; MILLAR et al., 2009). As osmatinas, também pertencente às taumatinas, são proteínas antifúngicas, que por estabelecerem interações específicas com a membrana plasmática, são responsáveis pela sinalização da morte celular programada (LEE et al., 2010), sendo uma família de proteínas de resistência a doenças, envolvidas também na lignificação da parede (DAVIN; LEWIS, 2005), sugerindo que há possibilidade da formação de uma parede celular secundária se desenvolver nestes tecidos (CALDERAN-RODRIGUES, 2012).

Uma grande quantidade de proteases foi encontrada (EJ= 14,15%; EM=11,19%; FJ= 14,52%; FM= 16,9%), o que condiz com os resultados obtidos no trabalho de DOUCHÉ et al. (2013), que também apresentou maior porcentagem em folhas. Proteases da parede celular também desempenham papel na defesa celular contra ataques de patógenos (BAYER et al., 2006). As cisteínas proteases regulam funções fisiológicas, tais como: senescência e germinação de sementes, além de defesa, representando o tipo característico de enzimas proteolíticas

(MARTÍNEZ et al., 2011). Proteínas “subtilisin”, também conhecidas como subtilases, são enzimas dependentes de serinas e desempenham papel de degradação, além de funções específicas no crescimento vegetal e sinalização (RAUTENGARTEN et al., 2005; SCHALLER, 2004). Em estudos com *Arabidopsis*, subtilases possuem papel na geração de sinais de resposta à regulação estômatal (VON GROLL; BERGER; ALTMAN, 2002), além da formação de cutícula e diferenciação da epiderme (TANAKA et al., 2001).

As proteínas com domínio de interação encontradas neste estudo foram: cistatina, PME1, e LRR. Cistatinas foram também encontradas em outros trabalhos anteriores (BOUDART et al., 2005; CHEN et al., 2009; BORDERIES et al., 2003). As pectinaesterases executam a desesterificação da pectina (PRESSEY, 1984), o que pode resultar em mudanças nas propriedades das interações entre polímeros da parede celular associados ao crescimento da planta (YAMAOKA; CHIBA, 1983). Como neste trabalho utilizou-se plantas com 4 meses de idade, ou seja, plantas em crescimento, a presença dessas proteínas está de acordo com o processo de desenvolvimento vegetal.

Todas as proteínas sinalizadoras foram classificadas como pertencentes à família fasciclin (11,23%). Além de participarem dos mecanismos de sinalização, elas participam dos mecanismos de adesão celular, sendo o grupo mais comum de proteínas de sinalização em PPCs (CALDERAN-RODRIGUES, 2012).

Apesar de classificadas como possuindo função desconhecida, merecem destaque as proteínas da família DUF642, que *in vitro* mostraram afinidade a celulose, podendo ligar-se a ela (VÁZQUEZ-LOBO et al., 2012), além de ter aparecido em outros trabalhos predominantemente em tecidos jovens (CALDERAN-RODRIGUES, 2012; DOUCHÉ et al., 2013). Curiosamente, as PFDs foram identificadas em grande número nos entrenós, sendo que apenas 4 das 26 foram também observadas em folhas. As proteínas “germin-like” (CUPin), provavelmente estão envolvidas na modificação de carboidratos da parede celular (DUNWELL et al., 2001).

Menos proteínas puderam ser extraídas da parede celular de tecidos maduros em relação aos tecidos de crescimento, semelhante aos resultados encontrados por Douché et al., (2013), sugerindo um alto grau de entrelaçamento dos polímeros da parede, dificultando sua extração (DOUCHÉ et al., 2013). Além disso, proteínas estruturais não foram encontradas neste trabalho, assim como em trabalhos

anteriores (CALDERAN-RODRIGUES, 2012; DOUCHÉ et al., 2013), talvez por serem fortemente ligadas à estrutura da parede ou, ainda, por serem pouco abundantes, dificultando sua identificação.

2.3.3.1.1 Comparação dos dois tecidos em diferentes estádios de desenvolvimento

Para a análise dos espectros das proteínas, primeiramente foi realizada a análise por componentes principais (PCA). Deve-se ressaltar que este tipo de análise não leva em consideração os grupos, mas sim as características de cada indivíduo e cada componente principal (CP), o qual é constituído a partir da combinação linear das variáveis originais (REGIANI, 2013). Sendo assim, foi construído um modelo de PCA no conjunto de dados através da comparação entre quatro grupos: EJ versus EM versus FJ versus FM.

Os dados brutos foram processados e na média, 365 proteínas foram consideradas para análise estatística. Para reforçar a validação, fez-se a avaliação cruzada pelo modelo de PLS-DA, construído a partir do PCA. Na Figura 8 está representado o PLS-DA dos quatro grupos de estudo e uma tendência de separação entre eles foi observada.

Figura 8 - Gráfico de *Scree plot* de variância pelo PLS-DA do grupo: EJ X EM X FJ X FM

Para melhor visualização e comprovação dos resultados obtidos pelo PLS-DA, foi realizada a análise hierárquica de cluster (Figura 9), método de variância mínima de Wards (WISHART, 1972). Este método consiste em formar clusters de tal forma que a variância entre eles seja mínima, definindo um cluster como um conjunto de entidades independentes, tais que a soma dos quadrados dos erros entre os membros de cada cluster é mínima (BLASHFIELD, 1976), sendo que este método tende a resultar em agrupamentos de tamanhos aproximadamente iguais devido a sua minimização de variação interna (HAIR et al., 2005).

Figura 9 – Clusterização usando método Ward dos quatro tratamentos: EJ, EM, FJ e FM

A tendência de separação dos grupos indicada pela análise de PLS-DA foi comprovada pelo método hierárquico de Ward (Figura 9), em que houve diferença estatística entre os tratamentos, classificando-os em clusters diferentes. Nota-se pelo teste hierárquico que houve maior semelhança entre os mesmos tecidos com diferentes estágios de desenvolvimento, como o esperado.

2.3.3.1.2 Comparação dos entrenós em diferentes estádios de desenvolvimento

Comparando as proteínas de parede celular extraídas de entrenós jovens e maduros (Figura 10), percebe-se que as classes mais representativas de ambos estádios de desenvolvimento foram as PPS e PO-Red.

Figura 10 - Número de proteínas de parede celular, identificadas e sua respectiva classificação funcional, em entrenós, jovens e maduros, de cana-de-açúcar

Neste trabalho, assim como em Douché et al., (2013), houve mais PPS em entrenós jovens do que em maduros, talvez devido a função dessas proteínas estarem relacionadas ao rearranjo dos polissacarídeos durante o desenvolvimento da parede (CASSAB; VARNER, 1988; FRESHOUR et al., 1996; NICOL; HOFTE, 1998; ROSE; BENNETT, 1999), sendo mais abundante em tecidos em pleno crescimento do que em tecidos com certo grau de maturação. Como já foi discutido neste trabalho, por serem proteínas relacionadas ao rearranjo dos polissacarídeos, podem estar envolvidas em processos de interesse econômico para a produção do etanol celulósico, tais como o processo de quebra da parede celular.

Os resultados obtidos, em relação as PO-Red, também foram semelhantes aos encontrados em *Brachypodium* (DOUCHÉ et al., 2013), em que houve uma

maior proporção dessas proteínas em EM (23,08%) do que em EJ (19,51%), sendo a classe mais representativa em EM, como já foi discutido neste trabalho. Estudos sobre peroxidases em entrenós de cana, com diferentes estádios de desenvolvimento: juvenil (apical), em desenvolvimento (intermediário) e maduros (basal), revelaram que a atividade da peroxidase foi maior em entrenós intermediários e maduros do que em jovens (CESARINO et al., 2012). Uma explicação para esses resultados é que a classe de PO-Red foi composta em sua maioria por peroxidases, cuja função está relacionada com a polimerização da lignina (BOERJAN, RALPH e BAUCHER, 2003; CESARINO et al., 2012), que é mais comumente encontrada em tecidos maduros. A participação de peroxidases na biossíntese da lignina tem sido estudada em muitos trabalhos em várias espécies e células em suspensão, tais como: *A. thaliana* (COSIO & DUNAND, 2010; TOKUNAGA et al., 2009), tabaco (BLEE et al., 2001), *Zinnia elegans* (GABALDON et al., 2005), poplar (CHRISTENSEN et al., 2001) e gimnospermas (KOUTANIEMI et al., 2005; MARJAMAA et al., 2006). No entanto, poucos estudos foram feitos com monocotiledôneas (MARJAMAA et al., 2009), apesar do fato dessas espécies ter muito mais genes de peroxidases que dicotiledôneas (PASSARDI et al., 2004).

Como houve diferença em relação a distribuição das proteínas entre as classes funcionais nos diferentes estádios de desenvolvimento estudados, fez-se uma análise de componentes principais (PCA) e sua validação por regressão parcial por quadrados mínimos (PLS-DA), para verificar se realmente existia essa tendência de separação entre os tratamentos.

2.3.3.1.2.1 Análise estatística: PCA e PLS-DA

Para a análise dos espectros das proteínas, primeiramente foi realizada a análise de componentes principais (PCA). Deve-se ressaltar que este tipo de análise não leva em consideração os grupos, mas sim as características de cada indivíduo e cada componente principal (CP), o qual é constituído a partir da combinação linear das variáveis originais (REGIANI, 2013). Sendo assim, foi construído um modelo de PCA no conjunto de dados através da comparação entre dois grupos: EJ versus EM.

Os dados brutos foram processados e na média, 365 proteínas foram consideradas para análise estatística. Para reforçar a validação, fez-se a avaliação cruzada pelo modelo de PLS-DA, construído a partir do PCA. Na Figura 11 está representado o PLS-DA dos grupos EJ versus EM uma tendência de separação

entre os dois grupos de estudo é observada.

Figura 11 - Gráfico de *Scree plot* de variância pelo PLS-DA do grupo: EJ X EM

Pelo modelo de PLS-DA, apenas os quatro primeiros componentes (vetores) contribuíram positivamente para o modelo (valor de Q2 positivo = 64,3%). A variação das proteínas foi de 99,3% (R2) e a exatidão correspondeu a 83,3% pelo modelo formado. A partir do modelo PLS e da validação, foram selecionados os 15 proteínas com maior importância para a projeção do componente com maior Q2 como prováveis biomarcadores, ou seja, foram selecionadas as 15 proteínas que mais contribuíram para a separação dos grupos (Figura 12).

Figura 12 - As 15 proteínas do componente dois que mais contribuíram para a variância entre os grupos. A cor vermelha indica maior intensidade relativa no respectivo grupo, enquanto a cor verde indica menor intensidade relativa no grupo

A partir do ranking das proteínas que mais contribuíram para o modelo matemático PLS-DA, fez-se a Tabela 6, com os dados de expressão provindos do *software ProteinLynx Global Server v.2.5 (PLGS)*.

Tabela 6 - Dados de expressão das 15 proteínas selecionadas por PLS-DA

Accession	Score	EM:EJ_Ratio	EM:EJ_p	Família (PFAM)	Classe Funcional
SCCCAD1001C08	25736.79	EM	EM	LTP 2 (Probable Lipid transfer)	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos
SCRFHR1006G03	21694.78	EM	EM	Peroxidase	Oxido-redutase
SCCCLR1048B08	8227.6	EM	EM	Alpha-L-AF_C	Proteínas que agem em carboidratos
SEJFRZ1005C03	2642.29	EM	EM	PITH	Função Desconhecida
SCCCLR1001B04	1711.32	EM	EM	Thaumatococcus	Miscelânea
SCSBSB1096D03	1144.97	EM	EM	Dirigent	Miscelânea
SCBFLR1083D11	574.05	EM	EM	DUF642	Função Desconhecida
SCCCCL4013D09	1601.85	EM	EM	DUF 568	Função Desconhecida
SCVPRT2073B04	1371.72	3.287081395	1	Thaumatococcus	Miscelânea
SCBGHR1058E08	1590.38	EM	EM	peroxidase	Oxido-redutase
SCRFHR1008D11	715.52	EM	EM	Dirigent (Defense-related)	Miscelânea
SEJFST10015D05	1582.25	7.170676694	1	Thaumatococcus	Miscelânea
SEMCLV1031F09	39660.9	1.41906754	1	Glycosyl hydrolases (GH17)	Proteínas que agem em carboidratos
SCEPLR1051D02	2340.42	2.410899695	1	Peptidase_C1 A	Protease
SCCCLR1068D10	841.69	3.35348478	1	TAXI N and TAXI C (Xylanase inhibitor)	Protease

Observando a coluna da razão do EM pelo EJ (EM:EJ_Ratio), nota-se que dez das quinze proteínas selecionadas foram exclusivas do entrenó maduro, pertencendo a diversas classes funcionais, não havendo uma predominante. As cinco restantes tiveram diferentes valores de expressão do tecido maduro em relação ao de crescimento, com valor de p significativo ($p=1$). As proteínas SEJFST10015D05 e SCVPRT2073B04, ambas taumatinas, foram expressas 7,17 e 3,28 vezes mais em entrenós maduros em relação aos jovens, respectivamente, possivelmente por estas proteínas estarem envolvidas na lignificação da parede (DAVIN; LEWIS, 2005), sugerindo uma possível formação de parede celular secundária nestes tecidos (CALDERAN-RODRIGUES, 2012), como já foi discutido anteriormente.

As proteases, SCEPLR1051D02 e SCCCLR1068D10, foram mais expressas em entrenó maduro 2,4 e 3,35 vezes, respectivamente, possivelmente por estarem envolvidas na formação da cutícula e diferenciação da epiderme (TANAKA et al., 2001), mais comumente encontradas em tecidos diferenciados. A glicosil hidrolase (GH17), SEMCLV1031F09, foi expressa 1,41 vezes mais no entrenó maduro, correspondendo aos resultados obtidos em *Brachypodium* (DOUCHÉ et al., 2013), em que as GH17 foram identificadas em órgãos maduros, desenvolvendo atividade de 1,3- β -glucanases (DOUCHÉ et al., 2013). Na natureza, as β -glucanases são

encontradas como parte de sistemas de renovação e rearranjo de β -glucanas presentes na parede celular vegetal (BULL e CHESTERS, 1966), possuindo a função de obtenção da glicose como fonte de energia, além do desarranjo estrutural localizado da parede celular vegetal (BARRAS e STONE, 1969). Mesmo possuindo um valor de expressão menor que as proteases, observa-se que a GH17 contribui mais significativamente para a separação dos grupos (Figura 12).

2.3.3.1.3 Comparação das folhas em diferentes estádios de desenvolvimento

Comparando as proteínas de parede celular extraídas de folhas jovens e maduras (Figura 13), percebe-se que as classes mais representativas nos dois estádios de desenvolvimento foram as PPS. Individualmente, nota-se que a segunda classe mais representativa de FJ foi de PO-Red e de PML em FM.

Figura 13 - Porcentagem de proteínas de parede celulares identificadas e sua respectiva classificação funcional, em folhas, jovens e maduras, de cana-de-açúcar.

Neste trabalho, assim como em Douché et al., (2013), houve estreita diferença entre os diferentes estádios de desenvolvimento, ocorrendo maior

proporção de PPS em folhas maduras (26,76%) do que em jovens (23,39%), assim como também aconteceu em relação as PML (FM= 19,72% e FJ= 14,52%). Considerando as PML, a maior proporção em FM provavelmente está relacionado à formação da cutícula, em ambas faces da folhas, pelas lipases durante o alongamento da parede (VOLOKITA et al., 2010), mais comumente encontrada em tecidos mais maduros. Em relação as PPS, apesar de se esperar maior proporção em folhas jovens assim como ocorreu nos entrenós, devido ao rearranjo e expansão da parede celular, trata-se do estudo com plantas jovens de 4 meses de idade que está em pleno desenvolvimento, não havendo alto grau de maturação mesmo em tecidos mais desenvolvidos.

Como houve diferença em relação à distribuição das proteínas entre as classes funcionais nos diferentes estádios de desenvolvimento estudados, fez-se uma análise de componentes principais (PCA) e sua validação por regressão parcial por quadrados mínimos (PLS-DA), para verificar se realmente existia essa tendência de separação entre as os tratamentos.

2.3.3.1.3.1 Análise estatística: PCA e PLS-DA

Para a análise dos espectros das proteínas, primeiramente foi realizada a análise de componentes principais (PCA). Deve-se ressaltar que este tipo de análise não leva em consideração os grupos, mas sim as características de cada indivíduo e cada componente principal (CP), o qual é constituído a partir da combinação linear das variáveis originais (REGIANI, 2013). Sendo assim, foi construído um modelo de PCA no conjunto de dados através da comparação entre dois grupos: FJ versus FM.

Os dados brutos foram processados e na média, 365 proteínas foram consideradas para análise estatística. Para reforçar a validação, fez-se a avaliação cruzada pelo modelo de PLS-DA, construído a partir do PCA. Na figura 14 está representado o PLS-DA dos grupos FJ versus FM uma tendência de separação entre os dois grupos de estudo é observada

Figura 14 - Gráfico de *Score plot* de variância pelo PLS-DA do grupo: FJ X FM

Pelo modelo de PLS-DA, apenas os quatro primeiros componentes (vetores) contribuíram positivamente para o modelo (valor de Q2 positivo= 89%). A variação das proteínas foi de 97% (R2) e a exatidão correspondeu a 100% pelo modelo formado. A partir do modelo PLS e da validação, foram selecionadas as 15 proteínas com maior importância para a projeção do componente com maior Q2 como prováveis biomarcadores, ou seja, foram selecionadas as 15 proteínas que mais contribuíram para a separação dos grupos (Figura 15).

Figura 15 - As 15 proteínas do componente dois que mais contribuíram para a variância entre os grupos. A cor vermelha indica maior intensidade relativa no respectivo grupo, enquanto a cor verde indica menor intensidade relativa no grupo

A partir do ranking das proteínas que mais contribuíram para o modelo matemático PLS-DA, fez-se a Tabela 7, com os dados de expressão provindos do *software ProteinLynx Global Server v.2.5 (PLGS)*.

Tabela 7 - Dados de expressão das 15 proteínas selecionadas por PLS-DA

Accession	Score	FM:FJ_Ratio	FM:FJ_P	Família (PFAM)	Classe Funcional
SCEZLB1006F09	17742.84	0.027323725	0	LRR domain	Proteínas com domínio de interação (Proteínas ou carboidratos)
SCAGLR2018C03	2776.16	FJ	FJ	Cu bind like	oxido-redutase
SCEZAD1081F04	8541.77	0.304221247	0	peroxidase	Oxido-redutases
SCVPRZ3031D11	1779.17	0.472366553	0	LTP 2 (Probable Lipid transfer)	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos
SCJFRT1009E11	2846.04	FJ	FJ	DREPP	Miscelânea
SCEQLB1068G06	694.69	FJ	FJ	Ser carboxypeptidase (Peptidase S10)	Protease
SCCCRZ1002B03	1607.36	FJ	FJ	LTP 2 (Probable Lipid transfer)	Proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos
SCQSLB1049G04	2605.27	0.251578554	0	Glycosyl hydrolase (GH18)	Proteínas que agem em carboidratos
SCCCRT3003E05	19682.06	1.236871465	0	Peptidase_C1 A	Protease
SCQSAM1030G04	672.07	FJ	FJ	Carbohydrate Esterase (CE)	Proteínas que agem em carboidratos
SCCCLR1C01C09	9106.21	FM	FM	Cystatin	Proteínas com domínio de interação (Proteínas ou carboidratos)
SCCCHR1002G07	3535.55	FJ	FJ		Proteínas sem classificação
SCBGLR1023A04	1541.93	FJ	FJ	Cu_bind_like	Oxido-redutases
SCACSD2018E08	292.35	FJ	FJ	Acid phosphat B	Miscelânea
SCCCCL4009F05	1841.45	FJ	FJ	Glycosyl hydrolases (GH3)	Proteínas que agem em carboidratos

Observando a coluna da razão do EM pelo EJ (EM:EJ_Ratio), nota-se que nove das quinze proteínas selecionadas foram exclusivas de folha jovem, pertencentes a diversas classes funcionais, não havendo uma predominante. Apenas uma, SCCCLR1C01C09, foi exclusiva de FM. As cinco restantes tiveram diferentes valores de expressão do tecido maduro em relação ao de crescimento, com valor de p significativo ($p=0$), mostrando que, na maioria, houve maior expressão em FJ do que em FM (numerador menor que 1) e somente uma (SCCCRT3003E05) foi 1,23 vezes mais expressa em FM.

Fazendo a conversão dos valores de expressão, tem-se que a proteína SCEZLB1006F09 (razão de 0.027) (Tabela 7), pertencente à classe funcional PDI, foi expressa aproximadamente 36,63 vezes mais em FJ em comparação com a FM, sendo a proteína que mais contriuiu para a separação dos grupos (Figura 19), possivelmente por executarem a desesterificação da pectina (PRESSEY, 1984), associadas com o crescimento da planta (YAMAOKA; CHIBA, 1983) e envolvidas em uma série de mecanismos de defesa nas plantas, como a ativação da explosão oxidativa, o fluxo de íons de cálcio e as cascatas de proteínas quinases associadas à indução de genes relacionados à patogênese e repostas de hipersensibilidade (VAN DER BIEZEN & JONES, 1998; PEYYALA & FARMAN, 2006)

As proteínas SCEZAD1081F04, SCVPRZ3031D11 e SCQSLB1049G04 foram mais expressas em FJ aproximadamente 3,2, 2,1 e 3,9 vezes, respectivamente.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A parede celular vegetal é responsável por vários processos essenciais para o desenvolvimento vegetal, tais como: resposta a doenças e ao estresse, sinalização, comunicação com outras células, secreção de proteínas e crescimento e expansão celular. Entretanto, pouco se compreende sobre as proteínas envolvidas em tais processos, sendo necessários estudos que permitam maior compreensão do funcionamento da parede e de suas funções.

Apesar das dificuldades inerentes à extração de PPCs, já que não se trata de uma organela isolada, estando interligada fortemente numa matriz; ao estudo da expressão gênica em cana-de-açúcar e à própria técnica de proteômica, este estudo conseguiu contribuir para diferentes áreas, tais como: identificação de 365 PPCs diferentes pertencentes à via de secreção; das quais 334 foram identificadas pela primeira vez; comparação estatística entre dois tipos de tecidos com diferentes estádios de desenvolvimento; estabelecimento de relações quantitativas das proteínas identificadas; identificação de proteínas-alvo que podem servir de base para estudos que as relacionem com a produção do bioetanol celulósico.

Comparando os resultados encontrados neste trabalho com outros da literatura, individualmente, este estudo foi o que mais identificou proteínas de parede celular vegetal. Esse número pode ser ainda maior já que o genoma da cana-de-açúcar não está completamente sequenciado. Isso atesta que embora a técnica de extração utilizada seja não-destrutiva foi possível identificar um número grande de proteínas, devido também à alta sensibilidade do espectrômetro de massas utilizado na identificação.

É preciso ressaltar também, que considerando os trabalhos relacionados à caracterização de proteínas da parede celular vegetal, este estudo foi pioneiro ao realizar, além da identificação, a quantificação dessas proteínas. Foi possível assim, estabelecer diferenças estatísticas na expressão protéica de folhas jovens em relação às maduras, e o mesmo ocorreu com entrenós. Essas diferenças contribuíram para o entendimento do processo de crescimento, desenvolvimento e maturação desses dois órgãos. Com base nessas diferenças, foi possível selecionar proteínas que estivessem presentes apenas nos órgãos juvenis, como as glicosil-hidrolases e peroxidases, e indicá-las como possíveis alvos para estudos que visem otimizar a produção de etanol de segunda geração. Assim, a partir dos resultados

obtidos neste trabalho, recomenda-se que estudos futuros de manipulação genética tenham como alvo a modificação da expressão das glicosil-hidrolases e peroxidases indicadas, que estão envolvidas no remodelamento das redes de polissacarídeos presentes na parede celular, que são a matéria-prima para a produção de etanol celulósico.

Portanto, além de prover base para futuras pesquisas sobre os mecanismos de desenvolvimento da parede celular da cana-de-açúcar, este trabalho forneceu novas ferramentas para a engenharia genética, obtendo um panorama do proteoma da parede celular tanto de entrenós quanto de folhas em cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS

ALBENNE, C.; CANUT H.; HOFFMANN, L.; JAMET, E. Plant cell wall proteins: a large body of data, but what runaways? **Proteomes**, Toulouse, v.2, p.224-242, 2014.

ALMAGRO, L.; ROS, L.V.G.; BELCHI-NAVARRO, S.; BRU, R.; BARCELO, A.R.; PEDRENO, M.A. Class III peroxidases in plant defence reactions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 2, p. 377-390, Feb. 2009.

ANDREWS, J.; ADAMS, S.R.; BURTON, K.S.; EVERED, C.E. Subcellular localization of peroxidase in tomato fruit skin and the possible implications for the regulation of fruit growth. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 378, p. 2185-2191, Nov. 2002.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO- Disponível em: <www.anp.gov.br>. Acesso em: 18 jul. 2014.

ALEXANDER, A. G. **The energy cane alternative**. Amsterdam: Elsevier, 1985, 509p.

AMORIM, H. V.; LOPES, M.L.; OLIVEIRA, J.V.D.; BUCKERIDGE, M.S.; GOLDMAN, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 91, n. 5, p. 1267-1275, Sept. 2011.

BARRAS, D.R.; STONE, B.A. β -1,3- glucan hydrolases from *Eglena gracilis*. I. The Nature of hydrolases. **Biochimica et Biophysica Acta**, Berlin, v. 191, p. 329-341, 1969.

BAYER, E. M.; BOTTRILL, A.R.; WALSHAW, J.; VIGOUROUX, M.; NALDRETT, M.J.; THOMAS, C.L.; MAULE, A.J. *Arabidopsis* cell wall proteome defined using multidimensional protein identification technology. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, n. 1, p. 301- 311, Jan. 2006.

BIODIESELBR disponível em:
<<http://www.biodieselbr.com/energia/agroenergia/planonacionalagroenergia.htm>>. Acesso em: 06 nov. 2013.

BLASHFIELD, R.K. Mixture Model Tests of Cluster Analysis: Accuracy of Four Agglomerative Hierarchical Methods. **Psychological Bulletin**, Pensilvânia, v. 83, n. 3, p. 337-388, 1976.

BLEE, K.A.; JUPE, S.C.; RICHARD, G.; ZIMMERLIN, A.; DAVIES, D.R.; BOLWELL, G. P. Molecular identification and expression of the peroxidase responsible for the oxidative burst in French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and related members of the gene family, **Plant Molecular Biology**, Weinheim, n.47, p. 607-620, 2001.

BOARETTO, L.F.; MAZZAFERA, P. The proteomes of feedstocks used for the production of second-generation ethanol: a lacuna in the biofuel era. **Annals of Applied Biology**, Campinas, n. 163 p. 12-22, Apr. 2013.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BARCHER, M. Lignin biosynthesis, *Annu. Rev. Plant Biology*, Weinheim, n. 54, p. 519-546, 2003

BONNET, G.; CASU, R.; ERA, A.; GROF, C.; GLASSOP, D.; MCINTYRE, L.; MANNERS, J. Identification of genes contributing to high sucrose accumulation in sugarcane. **Anais eletrônicos**, Brisbane, 2004.

BORDERIES, G.; JAMET, E.; LAFITTE, C.; ROSSIGNOL, M.; JAUNEAU, A.; BOUDART, G.; MONSARRAT, B.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.-T.; BOUDET, A.; PONTLEZICA, R. Proteomics of loosely bound cell wall proteins of *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures: A critical analyses. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 24, n. 19-20, p. 3421- 3432, 2003.

BOUDART, G.; JAMET, E.; ROSSIGNOL, M.; LAFITTE, C.; BORDERIES, G.; JAUNEAU, A.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.-T.; PONT-LEZICA, R. Cell wall proteins in apoplastic fluids of *Arabidopsis thaliana* rosettes: Identification by mass spectrometry and bioinformatics. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, n. 1, p. 212-221, Jan. 2005.

BRADLEY, D.J.; KJELBOM, P.; LAMB, C.J. Elicitor-induced and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant-cell wall protein - a novel, rapid, defense response. **Cell**, Cambridge, v. 70, n. 1, p. 21-30, Jul. 1992.

BRUNNER, F.; STINTZI, A., FRITIG, B., LEGRAND, M., Substrate specificities of tobacco chitinases. **Journal Plant**, Cambridge, v. 14, p. 225–234, 1998.

BUCKERIDGE, M.S.; SILVA, G.B.; CAVALARI, A.A. Parede Celular. In: KERBAUY, G.B. (Ed). **Fisiologia Vegetal**, 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008 p. 165-181.

BULL, A. T.; CHESTERS, C.G.C. The Biochemistry of Laminarin and the Nature of Laminarinase. **Advances in Enzymology**, Weinheim, v. 28, p.325-364, 1966.

CALDERAN-RODRIGUES, M. J. **Characterization of the proteome of sugarcane primary cell wall**. PA.2012. 180p. Tese (Doutorado em Ciências). - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

CALDERAN-RODRIGUES, M.J; JAMET, E.; BONASSI, M.B.C.R; GUIDETTI-GONZALEZ, S.; BEGOSSI, A.C.; SETEM, L.V.; FRANCESCHINI, L.M.; FONSECA, J.G.; LABATE, C.A. Cell wall proteomics of sugarcane cell suspension cultures. **Proteomics**, Weinheim, , n. 14, p. 738- 749, 2014.

CARPITA, N.; TIERNEY, M.; CAMPBELL, M. Molecular biology of the plant cell wall: searching for the genes that define structure, architecture and dynamics. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 47, n. 1/2, p. 1-5, Jan. 2001.

CASAGRANDE, A. A.; VASCONCELOS, A.C.M. Fisiologia da parte aérea. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: IAC, 2010. cap 3, p.57-78.

CASSAB, G.; VARNER, J.E. Cell wall proteins. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 39, p. 321-353, Jun. 1988.

CESSARINO, I.; ARAÚJO, P.; MAYER, J.L.S.; LEME, A.F. P.; MAZZAFERA, P. Enzymatic activity and proteomic profile of class III peroxidases during sugarcane stem development. **Plant Physiology and Biochemistry**, Toulouse , v. 55, p. 66-76, 2012.

CHEN, S.; HARMON, A.C. Advances in Plant Proteomics. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, p. 5504-5516, May. 2006.

CHEN, X.Y.; KIM, S.T.; CHO, W.K.; RIM, Y.; KIM, S.; KIM, S.W.; KANG, K. Y.; PARK, Z.W.; KIM, J.Y. Proteomics of weakly bound cell wall proteins in rice calli. **Journal Plant Physiology**, Weinheim, v. 166, p. 665–685, 2008.

CHIVASA, S.; NDIMBA, B.K.; SIMON, W.J.; ROBERTSON, D.; YU, X.L.; KNOX, J. P.; BOLWELL, P. SLABAS, A.R. Proteomic analysis of the *Arabidopsis thaliana* cell wall. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 23, n. 11, p. 1754-1765, Jun. 2002.

CHO, W.K.; CHEN, X.Y.; CHU, H.; RIM, Y.; RIM, S.; KIM, S.T.; KIM, S.W.; PARK, Z.Y.; KIM, J.Y. The proteomic analysis of the secretome of rice calli. **Journal Plant Physiology**, Weinheim, v. 135, p. 331–341, 2009.

CHRISTENSEN, J.H.; BAUW, G.; WELINDER, K.G.; MOUTAGU, M. VAN.; BOERJAN, W. Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in poplar xylem. **Journal Plant Physiology**, Weinheim, v. 118, p. 125-135, 1998.

CHRISTENSEN, J.H.; OVERNEY, S.; ROHDE, A.; DIAZ, W.A.; BAUW, G.; SIMON, P.; VAN MONTAGU, M.; BOERJAN, W. The syringaldazine-oxidizing peroxidase PXP 3-4 from poplar xylem: cDNA isolation, characterization and expression. **Plant Molecular Biology**, Weinheim, v. 47, p. 581-593, 2001.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em <<http://www.conab.gov.br/>> Acesso em: out. 2014.

COSGROVE, D.J. Wall structure and wall loosening. A look backwards and forwards. **Journal Plant Physiology**, Minneapolis, v. 125, n. 1, p. 131-134, Jan. 2001.

COSGROVE, D.J. Expansion of the plant cell wall. **The Plant Cell Wall**, Oxford: Blackwell, n. 8, p. 237-263, 2003.

COSIO, C.; DUNAND, C. Transcriptome analysis of various flower and silique development stages indicates a set of class III peroxidase genes potentially involved in pod shattering in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Genomics**, Versoix, n. 11, p. 519-546, 2003.

CRUZ, L.P. **Caracterização do proteoma de entrenós maduros e imaturos de cana-de-açúcar durante o estágio de maturação** – PA. 2012. 200p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

CYSEWSKI, G.R.; WILKE, C R. Utilization of cellulosic materials through enzymatic hydrolysis. I. Fermentation of hydrolysate to ethanol and single-cell. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 18, n. 9, p. 1297-1313, 1976.

DAFOE, N.; CONSTABEL, P. Proteomic analysis of hybrid poplar xylem sap. **Phytochemistry**, New York, n. 70, p. 856–863, 2009.

DAVIN, L.B.; LEWIS, N.G. Lignin primary structures and dirigent sites. **Current Opinion Biotechnology**, London, v. 16, p. 407- 415, 2005.

DAY, A.; FÉNART, S.; NEUTELINGS, G.; HAWKINS, S.; ROLANDO, C.; TOKARSKI, C. Identification of cell wall proteins in the flax (*Linum usitatissimum*) stem. **Proteomics**, London, n. 13, p. 812–825, 2013.

DILLEWJIN, C.V. Botany of sugarcane. **The Chronica Botânica** , Massachusetts, n. 5, p. 371, 1952.

DOUCHÉ, T.; SAN CLEMENTE, H.; BURLAT, V.; ROUJOL, D.; VALOT, B.; ZIVY, M.; PONT-LEZICA, R.; JAMET, E. *Brachypodium distachyon* as a model plant toward improved biofuel crops: Search for secreted proteins involved in biogenesis and disassembly of cell wall polymers. **Proteomics**, London, n. 13, p. 2438 – 2454, 2013.

DUNWELL, J.M.; CULHAM, A.; CARTER, C.E.; SOSA-AGUIRRE, C.; GOODENOUGH, C.W. Evolution of functional diverse cupin superfamily. **Trends in Biochemical Science**, London, v. 26, n. 12, p. 740-746, Dec. 2001.

EMBRAPA. **Atlas do meio ambiente do Brasil**. Brasília: Terra Viva, 1994. 138 p.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. **Situação bioenergética no estado de São Paulo**. São Paulo, 2014. 322 p.

FAO. **Agriculture**: Towards 2015/30, Technical Interim Report, Global Perspective Studies Unit, FAO, Rome, 2013. 65p.

FEIZ, L.; IRSHAD, M.; PONT-LEZICA, R.F.; CANUT, H.; JAMET, E. Evaluation of cell wall preparations for proteomics: a new procedure for purifying cell walls from *Arabidopsis* hypocotyls. **Plant Methods**, London, v. 2, p. 10-23, 2006.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 613p. (Book, 5).

FRANCO-CAIRO, J.P.L.; LEONARDO, F.C.; ALVAREZ, T.M.; RIBEIRO, D.A.; BUCHLI, F.; COSTA-LEONARDO, A M.; CARAZZOLLE, M.F.; COSTA, F.F.; LEME, A.F.P.; PEREIRA, G.A.P.; SQUINA, F.M. Functional characterization and target Discovery of glycoside hydrolases from the digestome of the lower termite *Coptotermes gestroi*. **Biotechnology for Biofuels**, Rockville, v. 4, p. 50, 2011.

FRESHOUR, G.; CLAY, R.P.; FULLER, M.S.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.G.; HAHN, M.G. Developmental and tissue-specific structural alterations of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* roots. **Plant Physiology**, Rockville, v. 110, n. 4, p. 1413-1429, Apr. 1996.

FRY, S.C.; SMITH, R.C.; RENWICK, K.F.; MARTIN, D.J.; HODGE, S.K.; MATTHEWS, K.J. Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme-activity from plants. **Biochemical Journal**, London, n. 282, p. 821-828, Mar 1992.

FRY, S.C. Primary cell wall metabolism: tracking the carriers of the wall polymers in living plant cells. **New Phytologist**, Oxford, v. 161, n. 3, p. 641-675, Mar. 2004.

GABALDON, C.; ROS, L.V.G.; PEDRENO, M.A.; ROS BARCELÓ, A. Nitric oxide production by the differentiating xylem of *Zinnia elegans*. **New Phytologist**, Oxford, n. 165, p. 121-130, 2005.

GILAR M.; OLIVOVA P.; DALY A.E.; GEBLER J.C. Two-dimensional separation of peptides using RP-RP-HPLC system with different pH in first and second separation dimensions. **Journal of Separation Science**, Oxford, n. 28, p. 1694–1703, 2005.

GLASZIOU, K.T.; GAYLER, K.R. Sugar accumulation in sugarcane-role of cell walls in sucrose transport. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 49, n. 6, p. 912-921, 1972.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S.T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production in sugarcane. **Science**, Oxford, v. 36, n. 6, p. 2086-2097, Jun. 2008.

GONZÁLEZ-GARCÍA, S.; LUO, L.; MOREIRA, M.T.; FEIJOO, G.; HUPPES, G. Life cycle assessment of flax shives derived second generation ethanol fueled automobiles in Spain. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 13, p. 1922-1933, Oct. 2009.

HAILING, P.; SIMMS-BORRE, P. Overview of lignocellulosic feedstock conversion into ethanol-focus on sugarcane bagasse. **International Sugar Journal**, Glamorgan, v. 110, n. 1311, p. 191-202, Mar 2008.

HAIR, J.F.; BLACK, W.C.; BABIN, B.J.; ANDERSON, RE.; TATHAM, R.L. **Análise multivariada de dados**. 5 ed. Porto Alegre: Bookman, p.143-154, 2005

HILL, J.; POLASKY, S.; NELSON, E.; TILMAN, D.; HUO, H.; LUDWIG, L.; NEUMANN, J.; ZHENG, H.; BONTA, D. Climate change and health costs of air emissions from biofuels and gasoline. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 106, n. 6, p. 2077-2082, Feb. 2009.

INMAN-BAMBER, N.G.; BONNETT, G.D.; SMITH, D.M.; THORBURN, P.J. Sugarcane physiology: Integrating from cell to crop to advance sugarcane production. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 92, n. 2/3, p. 115-117, Jun. 2005.

GEBRUERS, K.; BRIJS, K.; COURTIN, C., FIERENS, K.; GOESAERT, H.; RABIJINS, A.; RAEDSCHELDERS, G.; ROBBEN, J.; SANSEN, S.; SORENSEN, J.F.; CAMPENHOUT, S.V.; DELCOUR, J.A. Properties of TAXI-type endoxylanase inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1696, p. 213–221, 2004.

GILAR M.; OLIVOVA P.; DALY A.E.; GEBLER J.C. Two-dimensional separation of peptides using RP-RP-HPLC system with different pH in first and second separation dimensions. **Journal of Separation Science**, Glamorgan, n. 28, p.1694–1703, 2002

IRSHAD, M.; CANUT, H.; BORDERIES, G.; PONT-LEZICA, R.; JAMET, E. A new picture of cell wall protein dynamics in elongating cells of *Arabidopsis thaliana*: Confirmed actors and newcomers. **Bmc Plant Biology**, London, v. 8, p. 16-32, Sept. 2008.

JAMET, E.; CANUT, H.; BOUDART, G.; PONT-LEZICA, R. F. Cell wall proteins: a new insight through proteomics. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 33-39, Jan. 2006.

JAMET, E.; PONT-LEZICA, R. The puzzle of protein location in plant proteomics. In: RANCOURT, G.(Ed) **Proteomics: Methods, Applications and Limitations**. Hauppauge: Nova Science Publishers, 2010. Chap. 1, p. 1-13.

JOAQUIM, A.C. **Identificação de variedades de cana-de-açúcar em três classes texturais de solos, na região de Araraquara – SP, através de análise de nível de cinza em imagens LANDSAT/TM**. 1998. 118p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

JUNG, Y.-H.; JEONG, S.-H.; KIM, S.; SINGH, R.; LEE, J.E.; CHO, Y.S.; AGRAWAL, G.K.; RAKWAL, R.; JWA, N.S. Systematic secretome analyses of rice leaf and seed callus suspensioncultured cells: workflow development and establishment of high-density two-dimensional gel reference maps. **Journal of Proteome Research**, Oxford, v. 7, p. 5187–5210, 2008.

KNAUF, M.; MONIRUZZAMAN, M. Lignocellulosic biomass processing: a perspective. **International Sugar Journal**, Glamorgan, v. 106, n. 1263, p. 147-150, Mar 2004.

KONG, F.-J.; OYANAGI, A.; KOMATSU, S. Cell wall proteome of wheat roots under flooding stress using gel-based and LC MS/MS-based proteomics approaches. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1804, p.124-136, 2010.

KOU TANIEMI, S.; TOIKKA, M.M.; KARKONEN, A.; MUSTONEN, M.; LUNDELL, T.; SIMOLA, L.K.; KILPELAINEN, L.A.; TEERI, T.H. Characterization of basic p-coumaryl and coniferyl alcohol oxidizing peroxidases from a lignin-forming *Picea abies* suspension culture, **Plant Molecular Biology**, Glamorgan, n. 58, p. 141-157, 2005.

LEE, S.-J.; SARAVANAN, R. S.; DAMASCENO, C. M. B.; YAMANE, H.; KIM, B.-D.; ROSE, J. K. C. Digging deeper into cell wall proteome. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 42, n. 12, p. 979-988, Dec 2004.

LEE, H.; DAMSZ, B.; WOLOSHUK, C.P.; BRESSAN, R.A.; NARASIMHAN, M.L. Use of the plant defense protein osmotin to identify fusarium oxysporum genes that control cell wall properties. **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 9, n. 4, p. 558-568, Apr 2010.

LEITE, R.C.D.; LEAL, M.R.L.V.; CORTEZ, L.A.B.; GRIFFIN, W.M.; SCANDIFFIO, M.I.G. Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol? **Energy**, Oxford, v. 34, n. 5, p. 655-661, May 2009.

LIGAT, L.; LAUBER, E.; ALBENNE, C.; SAN CLEMENTE, H.; VALOT, B.; ZIVY, M.; PONT-LEZICA, R.; ARLAT, M.; JAMET, E. Analysis of the xylem sap proteome of *Brassica oleracea* reveals a high content in secreted proteins. **Proteomics**, Weinheim, n. 11, p. 1798–1813, 2011.

LIMA, D.U.; SANTOS, M.A.; TINÉ, F.R.D.; BUCKERIDGE, M.S. Patterns of expression of cell wall related genes in sugarcane. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 24, p.191-198, 2001.

MACEDO, I.C.; SEABRA, J.E.A.; SILVA, J.E.A.R. Green house gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. **Biomass & Bioenergy**, Oxford, v. 32, n.7, p. 582-595. Jul. 2008.

MARJAMAA, K.; HILDEN, K.; KUKKOLA, E.; LEHTONEN, M.; HOLKERI, H.; HAAPANIEMI, P.; KOUTANIEMI, S.; TEERI, T.H.; FAGERSTEDT, T.H.; LUNDELL, T. Cloning, characterization and localization of three novel class III peroxidases in lignifying, xylem of Norway spruce (*Picea abies*), **Plant Molecular Biology**, Oxford, v. 61, p. 719-732, 2006.

MARTÍN, C.; THOMSEN, A.B. Wet oxidation pretreatment of lignocellulosic residues of sugarcane, rice, cassava and peanuts for ethanol production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 82, n. 2, p. 174-181, Feb. 2007.

MARTINEZ, M.; CAMBRA, I.; GONZALEZ-MELENDI, P.; SANTAMARIA, M.E.; DIAZ, I. C1A cysteine-proteases and their inhibitors in plants. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 145, n. 1, p. 85-94, May 2012.

MATSUOKA, S.; FERRO, J.; ARRUDA, P. The Brazilian Experience of Sugarcane Ethanol Industry. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 45, n. 3, p. 372-381, Jun. 2009.

MENOSSE, M.; dos SANTOS, R.R.; FILHO, S.O.; PENNA, T.C.V. Perspectives on bioenergy and biotechnology in Brazil. **Biochemistry and Biotechnology**, Duluth, v. 121, p. 59-70, Sept 2007.

MILLAR, D.J.; WHITELEGGE, J.P.; BINDSCHEDLER, L.V.; RAYON, C.; BOUDET, A.-M.; ROSSIGNOL, M.; BORDERIES, G.; BOLWELL, G.P. The cell wall and secretory proteome of a tobacco cell line synthesising secondary wall. **Proteomics**, Weinheim, v. 9, n. 9, p. 2355-2372, May 2009.

MINIC, Z.; JAMET, E.; NEGRONI, L.; DER GARABEDIAN, P. A. A subproteome of *Arabidopsis thaliana* trapped on Concanavalin A is enriched in cell wall glycoside hydrolases. **Journal of Experimental Botany**, Amsterdam, v. 58, n. 10, p. 2503-2512, Feb. 2007.

MOORE, P.J.; STAFSTROM, J.P.; STAEHELIN, L.A. Immunocytochemical localization of xyloglucan rhamnogalacturonan-I and extensin in plant cell walls. **Journal of Cellular Biochemistry**, Atlanta, v. 10C, p.17-17 1995.

NAKAI, K.; KANEHISA, M. Expert System for Predicting Protein Localization Sites in Gram-Negative Bacteria. **Proteins-Structure Function and Genetics**, New York, v. 11, n. 2, p. 95-110, 1991.

NICOL, F.; HOFTE, H. Plant cell expansion: scaling the wall. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 1, n. 1, p. 12-17, Feb. 1998.

NIEUWLAND, J.; FERON, R.; HUISMAN, B.A.H.; FASOLINO, A.; HILBERS, C.W.; DERKSEN, J.; MARIANI, C. Lipid transfer proteins enhance cell wall extension in tobacco. **Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 7, p. 2009-2019, Jul. 2005.

OKAMOTO-NAKAZATO, A.; TAKAHASHI, T.; KIDO, N.; OWARIBE, K.; KATOU, K. Molecular cloning of yieldins regulating the yield threshold of cowpea cell walls: cDNA cloning and characterization of recombinant yieldin. **Plant Cell Environ**, Rockville, v. 23, p.155–164, 2000.

OLIVÉRIO, J.L. Technological evolution of the Brazilian Sugar and Alcohol Sector: Dedini's contribution". **International Sugar Jornal**, Glamorgan, v. 4, p. 101-108, 2006.

PASSARDI, F.; LONGET, D.; PENEL, C.; DUNAND, C. The class III peroxidase multigenic family in Rice and its evolution in land plants. **Phytochemistry**, Glamorgan, v. 65, p. 1879- 1893, 2004.

PECHANOVA, O.; HSU, C.Y.; ADAMS, J.P.; PECHAN, T.; VANDERVELDE, L.; DRNEVICH, J. Apoplast proteome reveals that extracellular matrix contributes to multistress response in poplar, **BMC Genomics**, Glamorgan, v.11, p.674, 2010.

PESSOA-JR, A.; CONCEIÇÃO, I.R.; MENOSSI, M.; dos SANTOS, R.R.; FILHO, S. O.; PENNA, T.C.V. Perspectives on bioenergy and biotechnology in Brazil. **Biochemistry and Biotechnology**, Duluth, v. 121, p. 59-70, Sept 2005.

PEYYALA, R.; FARMAN, M.L. Magnapor the *oryzae* isolates causing gray leaf spot of perennial ryegrass possess a functional copy of the AVR1-CO39 avirulence gene. **Plant Molecular Pathology**, Dordrecht, v.7, p.157-165, 2006.

PREDICTION OF SORTING SIGNALS AND LOCALIZATION SITES IN AMINO ACIDS SEQUENCES – PSORT. Disponível em: <http://psort.hgc.jp/>. Acesso em: 24 set. 2013.

PREDICTION OF TRANSMEMBRANE HELICES IN PROTEINS – TMHMM.
Disponível em: <<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>>. Acesso em: 16 setl. 2013.

PROJETO GENOMA DA CANA. Disponível em:
<<http://cnrgv.toulouse.inra.fr/Projects/The-Sugarcane-Genome-Sequencing-Initiative-SUGESI-Strategies-for-Sequencing-a-Highly-Complex-Genome>>. Acesso em: 20 mar. 2011.

REGIANI, T. **Análise dos perfis proteômico e lipídômico do líquido folicular de pacientes com endometriose e seus endometriomas submetidas ao tratamento de fertilização in vitro** – PA. 2013. 109p. Tese (Doutorado em Ciências). - Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 2013.

ROBERTS, K. The plant extracellular matrix. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v. 1, p. 1020-1027, Oct. 1994.

ROBERTSON, D.; MITCHELL, G.P.; GILROY, J.S.; GERRISH, C.; BOLWELL, G. P.; SLABAS, A. R. Differential extraction and protein sequencing reveals major differences in patterns of primary cell wall proteins from plants. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 272, n. 25, p. 15841-15848, Jun. 1997.

RODRIGUES, J.D. **Fisiologia da cana-de-açúcar**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” , Instituto de Biociências, n, 5, p.101, 1995.

ROSE, J.C.; BENNETT, A.B. Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: Parallels between cell expansion and fruit ripening. **Trends in Plant Science**, Athens, n.4, p.176-183, 1999.

RUINARD, J. Varietal differences in leaf-spindle structure and growth distribution in leaves and stems of sugarcane. **Annals of Botany**, London, v. 30, n. 117, p. 1-&, 1966.

SACHS, I. Da civilização do petróleo a uma nova civilização verde. **Revista de Estudos Avançados da USP**, São Paulo, v. 19, n. 55, set./ dez. 2005.

SASAKI, C.; V°ARUM, K.; ITOH, Y.; TAMOI, M.; FUKAMIZO, T., *Rice chitinases: sugar recognition specificities of the individual subsites*. **Glycobiology**, São Paulo, v.16, p.1242–1250, 2006.

SCHALLER, A. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. **Planta**, Berlin, v. 220, n. 2, p. 183-197, Dec. 2004.

SCHLITTNER, L.A.F.S. **Engenharia de um bioprocesso para a produção de etanol de cana-de-açúcar** - PA. 2006, 154p. Dissertação (Mestrado em Química) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

SILVA, D. I. R. **Caracterização do proteome nuclear de folhas de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) de 1 a 4 meses de idade**. – PA.2012. 180p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

SILVA J.S.; GORENSTEIN M.V.; LI G.Z.; VISSERS J.P.C.; GEROMANOS S.J. Absolute quantification of proteins by LC-MSE. *Molecular Cellular Proteomics*, Weinheim, n. 5, p. 144–156, 2006.

SOARES, P.A.; ROSSEL, C.E.V. **NAIPPE**: o setor sucroalcooleiro e o domínio tecnológico. **Nova Série**, Rio de Janeiro, n.7, p. 107, 2007.

STICKLEN, M.B. Plant Genetic Engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 9, p. 433-443, Jul. 2008.

STICKLEN, M.B. Plant Genetic Engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 9, p. 433-443, Jul. 2008.

SUAREZ, P.A.Z.; SANTOS, A.L.F.; RODRIGUES, J.PALVES. .; M.B. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. **Química Nova**, Ribeirão Preto, v. 32, n. 3, p. 135-142, 2009.

SUGARCANE FUNCTIONAL GENOMICS DATABASE - SUCEST. Disponível em <<http://sucest-fun.org>> . Acesso em 12 nov. 2012.

SUH, M.C.; SAMUELS, A.L.; JETTER, R.; KUNST, L.; POLLARD, M.; OHLROGGE, J.; BEISSON, F. Cuticular lipid composition, surface structure, and gene expression in *Arabidopsis* stem epidermis. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 139, p. 1649-1655, 2005.

SUN, Y.; CHENG, J.Y. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, Sydney, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. v.3, 364p.

TOKUNAGA, N.; KANETA, T.; SATO, S. Analysis of expression profiles of three peroxidase genes associated with lignification in *Arabidopsis thaliana*, **Plant Physiology**, Minneapolis, n. 136, p. 237-249, 2009.

TOLMASQUIM, M.T. Fontes renováveis de energia no Brasil. **Interciência**, Rio de Janeiro, n. 52, p.103, 2003.

TWYMAN, R.M. Principles of Proteomics. **BIOS Scientific**, New York, n. 34, p. 400, 2004.

UNIÃO DOS PRODUTORES DE CANA-DE-AÇÚCAR- UNICA. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php>>. Acesso em: 24 set. 2013.

VAN DER BIEZEN, E. A.; JONES, J.G.D. The NBARC domains: A novel signaling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. **Current Biology**, London, v. 8, n.7, p. R226-R228, 1998.

VÁZQUEZ-LOBO, A.; ROUJO, D; ZUÑIGA-SÁNCHEZ, E.; ALBENNE, C. et al., The highly conserved spermatophyte cell wall DUF642 protein family: phylogeny and first evidence of interaction with cell wall polysaccharides *in vitro*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. Orlando, n. 63, p. 510–520, 2012.

VERDONK, J.; HATFIELD, R.; SULLIVAN, M. Proteomic analysis of cell walls of two developmental stages of alfalfa stems. **Plant Science**, Oxford, n. 3, p. 279, 2012.

VETTORE, A. L. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 13, n. 12, p. 2725- 2735, Dec 2003.

VOLOKITA, M., ROSILIO-BRAMI, T., RIVKIN, N., ZIK, M., Combining comparative sequence and genomic data to ascertain phylogenetic relationships and explore the evolution of the large GDGL-lipase family in land plants. **Molecular Biology Evolution**, Oxford, n.28, p. 551–565, 2010.

VON HEIJNE, G. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 14, n. 11, p. 4683-4690, 1986.

VON GROLL, U.; BERGER, D.; ALTMANN, T. The subtilisin-like serine protease SDD1 mediates cell-to-cell signaling during *Arabidopsis* stomatal development. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 1527-1539, 2002.

WISHART, D. A general tripartite clustering method and similarity generating function. **Statistic Divison Report**, London: Civil Service Department, v. 12, p. 67-78, 1972.

WOJTASZEK, P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. **Biochemical Journal**, London, v. 322, p. 681-692, Mar. 1997.

YAMAOKA, T.; CHIBA, N. Changes in the coagulating ability of pectin during the growth of soybean hypocotyls. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 24, n. 7, p. 1281-1290, 1983.

YATES J.R. Mass spectral analysis in proteomics. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, Amsterdam, v. 33, p. 297–316, 2004.

ZHU, J.; CHEN, S.; ALVAREZ, S.; ASIRVATHAM, V.S.; SCHACHTMAN, D.P.; WU, Y.; SHARP, R. E. Cell wall proteome in the maize primary root elongation zone. I. Extraction and identification of water-soluble and lightly ionically bound proteins. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 140, n. 1, p. 311-325, Jan. 2006.