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

**Avaliação da composição química da parede celular de plantas de tabaco
(*Nicotiana tabacum*) que superexpressam o gene *ugdh* de soja, que codifica a
enzima UDP-glicose desidrogenase (EC 1.1.1.22)**

Juliano Bragatto

**Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas**

**Piracicaba
2007**

Juliano Bragatto
Licenciado em Química

Avaliação da composição química da parede celular de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que superexpressam o gene *ugdh* de soja, que codifica a enzima UDP-glicose desidrogenase (EC 1.1.1.22)

Orientador:
Prof Dr. CARLOS ALBERTO LABATE

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Bragatto, Juliano

Avaliação da composição química da parede celular de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que superexpressam o gene *ugdh* de soja, que codifica a enzima UDP-glicose desidrogenase (EC 1.1.1.22) / Juliano Bragatto. - - Piracicaba, 2007.
73 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Desidrogenase 2. Enzimas 3. Fibras vegetais 4. Fumo 5. Parede celular vegetal
6. Plantas transgênicas 7. Xilema I. Título

CDD 633.71

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

Dedico este trabalho aos meus pais, Luiz Antonio e Maria Rosa, pelo incondicional apoio e incentivo, em especial a minha esposa Simone, pelo amor e compreensão em todos os momentos desta jornada.

AGRADECIMENTOS

Ao estimado professor Dr. Carlos Alberto Labate, pelos valiosos ensinamentos, pela oportunidade, confiança e acima de tudo pela importante amizade construída ao longo desses anos.

A Dra. Mônica T. V. Labate, pelo incondicional apoio na realização deste trabalho e ao Dr. David H. Moon, pelo apoio e pela amizade.

Aos excelentes estagiários Luiz Otávio Pagotto e Karina de Lima, pela grande ajuda em todos os trabalhos realizados.

Aos amigos do Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas, José Matheus Bonatto, Maria Juliana Calderan Rodrigues, Edenilson Rabelo, Thiago Falda Leite, Lilia Barbosa, Gisele Lacerda, Dra. Daniela D. Nascimento, Dra. Inêz Faraldo, Dr. Guillermo Salvatierra, Gunta Gutmanis, Alexandra A. Magro, pela harmoniosa convivência.

Ao grande amigo Dr. Esteban González, pelos importantes ensinamentos na minha vida acadêmica.

Aos amigos do laboratório e do “happy hour” Dra. Mayra C. C. Gallo, Danielle Gregório, Fernanda Salvato, Dr. Alexander de Andrade, Raphael T. Carneiro, Dra. Ana Letícia Bertolo, Eduardo Leal, Felipe Boaretto, Gabriela Conti, Livia Franceschini, Paulo André “Pity”, Cristiano Barbosa, Maurício Caldas, agradeço pelos valiosos momentos de alegria.

Aos meus queridos sobrinhos Luiz Felipe “Tal”, Luiz Fernando “Dico”, Luiz Eduardo “Dudu”, Gabriela “Bi” e Juliana pelo carinho e por se fazerem sempre presentes nos momentos de alegria. Aos meus estimados irmãos, Marcelo, Luiz Antonio, Adriana, Andréia, minha cunhada Eliana, e ao meu cunhado Severino Bezerra.

Aos Funcionários do Departamento de Genética, Dr. Luiz Humberto Gomes, Nivaldo Laerte Pivetta, Carmo José Bueno de Campos, Rudinei de Jesus Graciani, Antonio Marques Silveira, Benedito Edson Soares, Reginaldo Martiniano da Silva.

Aos colegas do laboratório de Anatomia da Madeira ESALQ-USP, Maria Aparecida R. C. Bermudez e Carlos Sette, em especial ao professor Dr. Mario Tomazello.

A secretária do departamento de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Maria Solizete Granziol Silva, pelo excepcional atendimento.

Aos professores do curso de Fisiologia e Bioquímica de Plantas da ESALQ-USP, pelos ensinamentos e abertura de novos horizontes.

Ao CNPq pelo financiamento da minha bolsa de estudos e Companhia Suzano de Papel e Celulose, em especial ao Shinitiro Oda.

A todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	12
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Parede celular	17
2.2 Componentes químicos da parede celular	20
2.2.1 Celulose	20
2.2.2 Hemiceluloses	20
2.2.3 Pectinas	22
2.2.4 Lignina	23
2.3 Biossíntese da parede celular	24
2.4 Enzima UDP-glicose desidrogenase (EC 1.1.1.22).....	28
2.5 Composição química da madeira: influência nas características da polpa ou papel	29
2.6 Características das fibras: influência nas propriedades da polpa ou papel.....	31
2.7 Cromatografia dos carboidratos.....	34
2.8 Características das plantas de tabaco	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 Caracterização das plantas transgênicas e controles	38
3.2 Preparo das sementeiras e condições de cultivo	38
3.3 Esquema dos experimentos	38
3.4 Análise das plantas cultivadas em casa de vegetação	40
3.4.1 Condições de cultivo	40
3.4.2 Coleta do caule.....	40
3.4.3 Coleta seletiva dos diferentes tecidos do caule	40
3.4.4 Preparo das amostras e remoção dos extrativos	41
3.4.5 Hidrólise dos carboidratos da parede celular.....	41
3.5 Análise das plantas cultivadas em câmara de crescimento.....	42

3.5.1 Condições de cultivo	42
3.5.2 Coleta das folhas e caules	43
3.5.3 Determinação do conteúdo de carboidratos do tecido foliar	43
3.5.3.1 Quantificação de hemiceluloses	43
3.5.3.2 Quantificação de celulose	44
3.5.4 Determinação do conteúdo de hemiceluloses e celulose nas amostras de caule	44
3.6 Parâmetros do HPAE-PAD para as análise dos carboidratos	45
3.6.1 Parâmetros utilizados para a quantificação dos monossacarídeos	45
3.6.2 Parâmetros utilizados para a quantificação dos ácidos urônicos	45
3.7 Análise das fibras	46
3.7.1 Coleta do tecido xilemático das plantas de tabaco para obtenção das dimensões das fibras.....	46
3.7.2 Preparo das lâminas do macerado de fibras	47
3.8 Análise anatômica do caule de tabaco	48
3.8.1 Coloração dos cortes transversais e longitudinais do caule de tabaco	48
3.9 Delineamento experimental e análise estatística	49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 Avaliação fenotípica das plantas transgênicas	50
4.2 Composição química do caule	51
4.3 Composição química do tecido xilemático	52
4.4 Composição química do tecido medular	53
4.5 Mensurações das fibras	54
4.6 Análise química dos componentes da parede celular primária do tecido foliar.....	56
4.7 Análise das diferentes partes do caule	57
4.8 Análise histológica do caule	58
5 CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS	62

RESUMO

Avaliação da composição química da parede celular de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que superexpressam o gene *ugd*, que codifica a enzima UDP-glicose desidrogenase (EC 1.1.1.22)

Os elementos celulares que constituem o tecido xilemático de várias espécies vegetais são amplamente utilizados em diversos setores industriais, com inúmeras aplicações, como por exemplo, a geração de energia e produção de celulose e papel. A parede celular das células vegetais é formada basicamente por celulose, hemiceluloses e lignina. A formação dos polímeros de celulose e hemicelulose dependem exclusivamente do suprimento de precursores chamados de nucleotídeos-açúcares, tais como UDP-glicose, UDP-glucuronato, UDP-xilose, UDP-arabinose, UDP-manose e UDP-galactose. A biossíntese da parede celular é altamente regulada do ponto de vista metabólico, e envolve a participação de várias enzimas que catalisam uma série de reações. Estratégias para alterar o fluxo metabólico destes precursores, podem originar modificações na deposição dos polissacarídeos na parede celular. Em particular, para o setor de celulose e papel tal estratégia pode resultar em fibras com determinadas características, melhorando a qualidade da polpa celulósica ou do papel produzido. O UDP-glucuronato é um dos principais precursores de polissacarídeos hemicelulósicos da parede celular, sendo formado a partir de UDP-glicose pela ação da enzima UDP-glicose desidrogenase (EC. 1.1.1.22). Esta enzima é chave na regulação da biossíntese das pentoses e hexoses da parede celular de plantas superiores. Com o objetivo de modular a síntese dos polissacarídeos hemicelulósicos na parede celular, o presente trabalho analisou o impacto da superexpressão do gene *ugd* em plantas transgênicas de tabaco. Foram realizadas análises da composição química da parede celular primária e secundária de folhas e caules, bem como avaliações morfológicas das fibras do tecido xilemático, e também cortes histológicos da região basal do caule. Da parede secundária do tecido xilemático determinou-se o conteúdo de lignina klason e solúvel, bem como a concentração dos carboidratos via HPAE-PAD. No tecido xilemático, todas as plantas transgênicas apresentaram aumento do conteúdo de xilose, embora não significativo. Juntamente, ocorreu um aumento de arabinose significativo em três linhagens transgênicas. Paralelamente, todas as plantas transgênicas tiveram redução do conteúdo de lignina klason, embora significativo em apenas uma linhagem. A relação hexoses/pentoses reduziu em todas as linhagens transgênicas, sendo significativa em três linhagens. As análises histológicas do caule mostraram que os transformantes apresentaram um aumento do tecido xilemático em relação às plantas controles. As análises morfológicas das fibras mostraram que todas as plantas transgênicas apresentaram reduções significativas no comprimento, em relação às plantas controles. No tecido foliar, o conteúdo de polissacarídeos da parede celular primária apresentou uma redução significativa em todas as plantas transgênicas.

Palavra-chave: Tabaco; Fibra; Tecido xilemático; Parede celular vegetal; UDP-glicose desidrogenase; HPAE-PAD

ABSTRACT

Evaluation of the chemical composition of the cell wall of transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum*) that superexpress the gene *ugdh*, that codes for the enzyme UDP-glucose dehydrogenase (EC 1.1.1.22)**

The cellular elements that constitute the xylematic tissue of various plant species are widely used in diverse industrial sectors, with numerous applications, for example, the generation of energy and production of cellulose and paper. Plant cell walls are basically formed by cellulose, hemicellulose and lignin. The formation of cellulose and hemicellulose polymers depend exclusively on the supply of the precursors called nucleotide sugars, such as UDP-glucose, UDP-glucuronate, UDP-xylose, UDP-arabinose, UDP-mannose and UDP-galactose. The biosynthesis of the cell wall is highly regulated from the metabolic point of view and involves the participation of various enzymes that catalyse a series of reactions. Strategies to alter the metabolic flux of these precursors could give rise to modifications in the deposition of polysaccharides in the cell wall. In particular, for the cellulose and paper sector these strategies could result in fibers with determined characteristics, improving the quality of the cellulose pulp or the paper produced. UDP-glucuronate is one of the principal precursors of the hemicellulose polysaccharides of the cell wall, which is formed from UDP-glucose by the action of UDP-glucose dehydrogenase (EC1.1.1.22). This is a key enzyme in the regulation of the biosynthesis of the pentoses and hexoses in the cell walls of higher plants. With the objective of modulating the synthesis of the hemicellulose polysaccharides in the cell wall, the present study analysed the impact of the superexpression of the *ugd**h* gene in transgenic tobacco plants. Chemical analyses were performed to determine the chemical composition of the primary and secondary cell walls of leaves and stems, as well as morphological evaluations of the fibers of the xylematic tissue and histological cuts through the base of the stem. The Klason and soluble lignin content as well as the carbohydrate concentrations (using HPAE-PAD) were determined in the secondary cell walls of the xylematic tissue. All of the transgenic plants showed an increase in xylose content, albeit not significant. A significant increase in arabinose content was observed in three transgenic lines. In parallel all the transgenic plants presented a reduction in Klason lignin, but only significant in one line. The ratio hexose/pentose was reduced in all transgenic lines, being significant in three. Histological analyses on the stem showed that the transformants presented an increase in the xylematic tissue when compared to the controls. The morphological analyses of the fibers showed that all the transgenic plants presented significant reductions in length when compared to the controls. In the leaf tissue, the polysaccharide content of the primary cell wall showed a significant reduction in all of the transgenic plants.

Keywords: Tobacco; Fiber; Xylematic tissue; Plant cell wall; UDP-glucose dehydrogenase; HPAE-PAD

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da célula vegetal, com parede celular primária e secundária	18
Figura 2 - Esquema das estruturas de celulose (a) e xiloglucanas (b)	21
Figura 3 - Representação esquemática da formação dos monossacarídeos	27
Figura 4 - Reação realizada pela enzima UDP-glicose desidrogenase	28
Figura 5 - Ilustração dos elementos celulares presentes em espécies lenhosas.....	32
Figura 6 - Estruturas e elementos anatômicos do caule de tabaco	37
Figura 7 - Fluxograma dos experimentos.....	39
Figura 8 - Detalhe da amostragem da coleta do caule de tabaco	44
Figura 9 - Ilustração da coleta do material para análise dos carboidratos em diferentes tecidos e mensurações das fibras	47
Figura 10 - Plantas transgênicas e controles	50
Figura 11 - Principais componentes da parede celular da região da medula do caule de tabaco...	54
Figura 12 - Principais carboidratos encontrados na parede celular do tecido foliar de plantas de tabaco	57
Figura 13 - Conteúdo de carboidratos presentes em diferentes secções (ápice, meio e base), de plantas transgênicas e controles	58

Figura 14 - Cortes transversais do caule de plantas de tabaco com 60 dias de idade	59
Figura 15 - Cortes transversais do caule de plantas de tabaco com 90 dias de idade	59
Figura 16 - Cortes transversais do caule de plantas de tabaco com 120 dias de idade	60
Figura 17 - Cortes longitudinais do caule de plantas de tabaco com 120 dias de idade	60

LISTA DE TABELAS

Tabela1 - Composição química da parede celular do caule total das plantas transgênicas e controles	52
Tabela 2 - Composição química da parede celular do tecido xilemático das plantas transgênicas e controles	53
Tabela 3 - Características das fibras do tecido xilemático de plantas de tabaco e parâmetros da qualidade das fibras	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AHexs – ácidos hexênuronicos

A₂₁₅ A₂₈₀ (nm) – Absorbância em 215 ou 280 nanômetros de comprimento de onda

água milliQ - água ultrapura filtrada em filtro Millipore (0,45µm)

°C - grau Celsius

CG – Controle *Gateway*, planta de tabaco transformada com vetor *Gateway* desprovido do cDNA do gene de interesse *ugdh*

cm – centímetro

etanol 95 GL – álcool grau Gay-Lussac 95

EC – código de classificação das enzimas

g – grama

g – força gravitacional

GalA – ácido galacturônico ou galacturonato

HPAE-PAD – High Performance Anion Exchange- Pulsed Amperometric Detection

H₂SO₄ – ácido sulfúrico

HNO₃ – ácido nítrico

L – litro

M- molar

Mesh – diâmetro do orifício da peneira (µm)

mg – miligrama

mm – milímetros

mM – milimolar

mL – mililitro

ms – milisegundo

mV – milivolts

N₂ - Nitrogênio líquido

NaCl – Cloreto de Sódio

NaOAc – Acetato de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

psi – libra por polegada quadrada, unidade de pressão

rpm – rotações por minuto

TFA – ácido trifluoroacético

UDP – uridina difosfato

UDP-Glic – UDP-glicose

UDP-Ara – UDP- arabinose

UDP-Gal – UDP-galactose

UDP-GalA – UDP-galacturonato ou UDP-ácido galacturônico

UDP-Man – UDP-manose

UDP-GlcA – UDP-ácido glucurônico

UDP-GlcUA – UDP-glucuronato

UDP-Xil – UDP-xilose

UGDH – proteína UDP-glicose desidrogenase

ugdh – gene codificador da enzima UDP-glicose desidrogenase

μg – micrograma

μL – microlitro

v/v – volume por volume

WT – espécie selvagem (não transformante)

1 INTRODUÇÃO

As plantas superiores fixam o carbono através do processo fotossintético, considerado por muitos o processo biológico mais importante. Este processo biológico transforma a luz solar em energia química, sendo os carboidratos a forma mais importante. Os diferentes tipos de carboidratos sintetizados podem ser usados como precursores de vários componentes celulares (aminoácidos, lipídios e ácidos nucleicos) e também como componentes estruturais da parede celular. A biossíntese dos componentes da parede celular, tais como celulose, hemiceluloses, pectinas e lignina dependem do fornecimento dos açúcares que são produzidos durante o processo fotossintético (TAIZ; ZEIGER, 2004). Desta maneira, os produtos fotossintéticos são utilizados principalmente na produção de biomoléculas de celulose, à qual pode ser utilizada para diferentes fins comerciais (ENGLEHARDT, 1995).

A celulose e as hemiceluloses são formadas por unidades básicas, chamadas de monossacarídeos (arabinose, ramnose, galactose, glicose, xilose e manose). A biossíntese desses monômeros e a incorporação dos mesmos na parede celular envolvem a atividade de várias enzimas e substratos de nucleotídeo-açúcares, tais como: UDP-glicose, UDP-glucuronato, UDP-galactose, UDP-xilose e UDP-arabinose (REITER; VANZIN, 2001). Nas dicotiledôneas, a maior parte dos polissacarídeos hemicelulósicos são formados a partir dos substratos UDP-D-xilose e UDP-D-glucuronato, e em menor proporção a partir de UDP-glicose e UDP-manose (DALESSANDRO; NORTHCOTE, 1977a).

Na parede celular primária grande parte da xilose encontra-se na forma de xiloglucanas, que estão associadas às microfibrilas de celulose por pontes de hidrogênio. Esta interação está envolvida com as propriedades mecânicas específicas da parede celular (AWANO et al., 2001; BINDSCHEDLER et al., 2005). Já na parede celular secundária, a xilose aparece na forma de cadeias poliméricas, chamadas de xilanas, que fazem ligações cruzadas com as microfibrilas de celulose e com a lignina. As xilanas estão presentes nas plantas dicotiledôneas e constituem cerca de 5% da parede primária e 20% da parede secundária. (HATFIELD et al., 1999; AWANO et al., 2001; BINDSCHEDLER et al., 2005).

No caso de dicotiledôneas de fibra curta, como por exemplo, o eucalipto, as cadeias de xilanas sofrem substituições em algumas ramificações com grupos de 4-O-metilglucurônico e ácido glucurônico (EBRINGEROVA; HEINZE, 2000; O'NEILL; YORK, 2003).

As características dos polissacarídeos hemicelulósicos, presentes na madeira utilizada na indústria de celulose e papel, têm influência direta no processo de polpação, mesmo sendo a celulose o componente da polpa que confere resistência às fibras. Polpas com altos teores de celulose e baixos teores de hemiceluloses apresentam menor resistência no processo de refino. Já em altas concentrações, as hemiceluloses protegem a celulose de reações de despolimerização, aumentando o rendimento no processo de polpação (WAGBERG; ANNERGREN, 1997).

Modificações das características das plantas com importância econômica, em particular as que são utilizadas para a produção de papel e celulose, implicam praticamente em técnicas de alteração da composição química da parede celular. Para melhorar as propriedades químicas das fibras, são necessários conhecimentos dos processos moleculares que formam a parede celular (REITER, 2002). A estrutura formada pela matriz de polissacarídeos estabelece as propriedades anatômicas da fibra, tais como: comprimento, largura e espessura da parede celular, e estas propriedades controlam diretamente a qualidade do papel e da polpa. Portanto, acredita-se que, mudanças no metabolismo envolvido no processo de formação da parede celular altere a deposição dos polissacarídeos resultando em fibras com melhores características para a produção de celulose e papel.

Uma das possíveis estratégias para alterar o conteúdo de polissacarídeos nas fibras vegetais está baseada na modulação da via biossintética dos nucleotídeos-açúcares, uma vez que, a manipulação destes componentes pode resultar em efeitos quantitativos e qualitativos na matriz de polissacarídeos (BOLWELL, 2000). Portanto, com o objetivo de alterar a composição dos polissacarídeos da parede celular das plantas superiores, de forma a alterar o fluxo metabólico da síntese de hemiceluloses, promoveu-se a modulação da expressão do gene *ugdh*, responsável pela codificação da enzima UDP-glicose desidrogenase (EC 1.1.1.22), que converte UDP-glicose em UDP-glucuronato (UDP-ácido glucurônico). O UDP-glucuronato é o principal precursor da biossíntese de polissacarídeos pécicos e hemicelulósicos. Desta forma acredita-se que a superexpressão do gene *ugdh*, no sentido de se aumentar o conteúdo de UDP-glucuronato, aumente também o conteúdo de polissacarídeos hemicelulósicos, em especial a xilose. Na planta, modificações no conteúdo de xilose podem melhorar as características da fibra resultando em um incremento de grande interesse em aplicações industriais.

Neste trabalho plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) foram utilizadas, por serem consideradas plantas modelo pelas características que apresentam tais como: boa adaptação na

cultura de tecidos, alta susceptibilidade à infecção por *Agrobacterium tumefaciens*, fácil manipulação molecular, ciclo curto e também por possuir tecido xilemático bem definido com células de parede secundária (BOUDET, 1998, 2003; BOERJAN et al., 2003).

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar o impacto da superexpressão do gene *ugdH*, na composição dos polissacarídeos e outros componentes da parede celular, bem como características anatômicas do caule e dos elementos fibrilares, comparando as plantas transgênicas às controles.

Com base nos resultados obtidos com as plantas transgênicas de tabaco, a mesma estratégia pode ser aplicada para espécies economicamente importantes, como é o caso do eucalipto.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Parede celular

A parede celular é uma das principais estruturas da célula vegetal, constituída por agrupamentos de macromoléculas heterogêneas. Sua composição é muito diversificada. Além dos polissacarídeos, existem também pequenas quantidades de proteínas e substâncias fenólicas. As proporções destes componentes químicos na parede celular sofrem significativas alterações durante a vida da planta. A parede celular é uma estrutura muito complexa que possui diversas funções. Proporciona às células rigidez mecânica, mantém a sua morfologia, controla a expansão celular e transporte intercelular, protege a célula contra uma grande quantidade de organismos potencialmente patogênicos e predadores, e também participa na comunicação intercelular. Como muitas destas funções são exigidas ao mesmo tempo em vários estádios de desenvolvimento do vegetal, a parede celular possui simultaneamente, grande flexibilidade com um máximo de resistência, devido a um sofisticado controle metabólico, com regiões de extrema complexidade, com altos conteúdos de polissacarídeos, proteínas e compostos fenólicos. Assim, a determinação da composição exata destas substâncias na parede celular, fornece importantes informações para o esclarecimento das funções específicas que determinado tipo de célula possui (NORTHCOTE, 1972; BRETT; WALDRON, 1990; CARPITA; GIBEAUT, 1993; GIBEAUT; CARPITA, 1994; DHUGGA, 2001; RAVEN et al., 2001).

Morfologicamente, a parede celular é dividida em três regiões distintas, a lamela média, parede primária e parede secundária (Figura 1). A lamela média é a região de intersecção entre duas células. Esta camada intercelular é rica em substâncias pécticas mergulhadas em um meio aquoso (CARPITA; MAcCANN, 2000; RAVEN et al., 2001).

A parede primária de grande parte dos vegetais é composta por três estruturas independentes, as microfibrilas de celulose (~30%), os polissacarídeos não-celulósicos, que incluem hemiceluloses (~30%) e pectinas (~30%) e as proteínas estruturais (~10%). A parede primária é produzida por células em expansão podendo assim, se alongar com crescimento difuso ou orientado (HAYASHI, 1989; MCCANN; ROBERTS, 1991; CARPITA; GIBEAUT, 1993; RAVEN et al., 2001). Estas estruturas estão localizadas em duas interfases, a microfibrilar e a matricial. A microfibrilar distingue-se da matricial pelo alto grau de cristalinidade visível ao microscópio eletrônico e por possuir composição química homogênea, sendo constituída basicamente de microfibrilas de celulose, normalmente arranjadas em padrão helicoidal,

ordenadas em estruturas longas e finas, unidas por pontes de hidrogênio (ROLAND et al., 1992). Juntamente ao longo das microfibrilas de celulose estão os polissacarídeos não-celulósicos ou hemicelulósicos, localizados em zonas amorfas sem orientação regular. A fase matricial consiste de polissacarídeos, compostos pécicos, glicoproteínas e substâncias fenólicas, de composição variada nas diferentes camadas da parede, tipos de células e diferentes fases do ciclo celular (CARPITA; GIBEAUT, 1993; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Figura 1 - Esquema da célula vegetal com detalhes dos diferentes camadas da parede celular secundária (S1, S2 e S3), a parede primária e a lamela média entre as paredes primárias de células adjacentes (KRETSCHMANN, 2003)

Quando o crescimento celular é finalizado, inicia-se o processo de diferenciação celular, com início da formação da parede secundária. A transição da parede celular primária para a formação da parede secundária é marcada pela redução da síntese de pectina e um grande aumento na síntese de celulose, hemiceluloses e lignina (RAVEN et al., 2001).

A lignificação é a fase final da diferenciação celular, onde a lignina depositada estabelece ligações covalentes e não covalentes com a matriz de carboidratos, formando o chamado complexo lignina-carboidratos (SARKANEN, 1998; LAWOKO, 2005). O processo de diferenciação destas células resulta em uma intensa lignificação e na morte celular programada. A lignificação da parede celular tem início na região da parede celular primária e se estende em dois sentidos, para o exterior em direção à lamela média, ou para o interior da célula, onde se desenvolve a parede secundária (TAIZ; ZEIGER, 2004). Células com parede celular secundária são muito rígidas, como é o caso das fibras e elementos vasculares, e são extremamente importantes para a sustentação do vegetal, atuando no suporte e condução de água e outros fluídos na planta (HOPKINS, 1995).

A parede celular secundária contém tipicamente três camadas distintas, S_1 , S_2 e S_3 , as quais são diferenciadas, em espessura, composição e orientação das microfibrilas de celulose. A camada exterior S_1 é a mais fina (0,1-0,35 μm) e representa apenas 5-10 % da espessura total da parede celular. Nesta camada as microfibrilas de celulose formam um ângulo de 60-80° em relação ao eixo da célula. A camada intermediária S_2 é a mais espessa (1-10 μm) e representa 75-85 % da espessura total da parede celular, e a orientação das microfibrilas forma um ângulo de 5-30° em relação ao eixo da célula. As características relacionadas à espessura e à orientação das microfibrilas influenciam diretamente as propriedades físicas e mecânicas da célula. Assim, a camada S_2 é a mais importante na parede celular. Já a camada S_3 é relativamente fina (0,5-1 μm), e forma um ângulo de 60-90° em relação ao eixo da célula (FENGEL; WAGENER, 1984; EMONS; MULDER, 2000; PLOMION et al., 2001; MELLEROWICZ, et al., 2001).

Numa célula com parede celular secundária, a camada que compreende a lamela média e a parede celular primária é rica em substâncias pécicas quando comparada ao restante do material. A camada S_3 e parte interior da S_2 têm um conteúdo de celulose mais elevado, enquanto a camada S_1 e a parte exterior da camada S_2 são relativamente ricas em hemiceluloses (SELVENDRAN, 1983; TAIZ; ZEIGER, 2004).

A celulose e as hemiceluloses são os componentes da parede celular com maior importância econômica para o setor de papel e celulose. Portanto, conhecer o mecanismo de regulação da biossíntese da celulose e hemiceluloses é um pré-requisito para alterarmos as características das fibras e isto pode ser alcançado através de técnicas de biologia molecular (REITER, 2002).

Os avanços tecnológicos são enormes no sentido de elucidar os mecanismos de formação da parede celular, que envolvem um grande número de genes, relacionados à biogênese, organização e também a mudanças estruturais. Em plantas de *Arabidopsis* aproximadamente 15% do seu genoma está relacionado ao processo de formação e modificação da parede celular, o que nos dá uma idéia da complexidade da estrutura e formação da parede celular das plantas em geral (CARPITA et al., 2001).

2.2 Componentes químicos da parede celular

2.2.1 Celulose

A celulose encontrada na parede celular das plantas é a biomolécula mais abundante na natureza. Todos os anos as plantas produzem aproximadamente 180 bilhões de toneladas de celulose. Esta biomolécula tem enorme valor comercial para diversos setores industriais, em particular pode-se destacar o setor de produção de celulose e papel (FRY, 1988; ENGLEHARDT, 1995).

A celulose é produzida na forma de microfibrilas de celulose, (semi)-cristalina em cadeias lineares de β 1,4 D Glicose ligadas por pontes de hidrogênio (Figura 2) (DELMER, 1999). Cada microfibrila de celulose consiste de aproximadamente 36 cadeias lineares de glicose, cuja organização determina as propriedades mecânicas da célula e promovem o suporte e resistência à parede celular (FRY, 1988; EMONS; MULDER, 2000; EMONS et al., 2002). Em geral, a parede primária contém de 10 a 40% de celulose e a secundária aproximadamente 40 a 60% (McNEIL et al., 1984; BACIC et al., 1988).

2.2.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses são formadas por diversos grupos de polissacarídeos interligados às microfibrilas de celulose. Na parede primária das plantas dicotiledôneas, as hemiceluloses mais abundantes são as xiloglucanas, representando aproximadamente 20% (FRY, 1988).

As xiloglucanas são polissacarídeos cuja cadeia principal é constituída por unidades de (1,4)- β -D-Glicose (Glic) (Figura 2). Mas, grande parte dos resíduos de glicose encontram-se ramificados no carbono-6 por resíduos de α -D-Xil, encontrando alguns destes resíduos de xilose substituídos no carbono-2 por resíduos de β -D-Gal ou com α -L-Fuc(1,2)- β -D-Gal. As xiloglucanas também apresentam função regulatória, pois seus oligossacarídeos, os quais são

denominados de oligossacarinas, regulam o crescimento celular. As xiloglucanas são sintetizadas no complexo de Golgi e então, transportadas para a parede celular (MACNEIL et al., 1984; HAYASHI, 1989; FOSKET, 1994).

Figura 2 - Esquema da estrutura da celulose (a) e xiloglucanas (b)

As xiloglucanas estão associadas às microfibrilas de celulose por pontes de hidrogênio, e promovem a união das microfibrilas de celulose adjacentes. Esta interação parece estar relacionada às propriedades mecânicas da parede celular (FRY, 1988; HAYASHI et al., 1987; HAYASHI, 1989; HAYASHI; MACLACHLAN, 1994; WHITNEY et al., 1995, 1999).

As xilanas são cadeias lineares de monossacarídeos com unidades de xilose. Fazem ligações cruzadas com as microfibrilas de celulose e lignina, representando cerca 5% dos componentes da parede primária e 20% da parede secundária. (HATFIELD et al., 1999; AWANO et al., 2001).

Nas cadeias de xilanas ocorrem substituições em algumas ramificações com grupos de 4-O-metilglucurônico, ácido glucurônico, acetil e arabinose (FRY, 1988; GRUPPEN et al., 1992; EBRINGEROVA; HEINZE, 2000; O'NEILL; YORK, 2003). A natureza dos grupos substituídos nas cadeias de xilanas depende do material vegetal. Por exemplo, altos níveis de grupos de arabinose são encontrados em madeira de coníferas ou “softwood”. Já na madeira de folhosas ou “hardwood” encontra-se principalmente grupos de ácidos glucurônicos (COUGHLAN; HAZLEWOOD, 1993).

As glucuronoxilanas são os polímeros hemicelulósicos mais abundantes, representando cerca de 15 a 30% do total desses polissacarídeos na parede celular secundária de árvores de madeira dura. Há também pequenas quantidades de cadeias de glucomananas, contendo ligações residuais de β -1,4-manose e β -1,4-glicose (TIMELL, 1964; SJÖSTROM, 1981; STEPHEN, 1982). Já as galactoglucomananas estão presentes em grande quantidade na parede celular primária das solanáceas (STEPHEN, 1982).

2.2.3 Pectinas

As pectinas são os principais componentes da lamela média. Sua principal característica é a de funcionar como um agente cimentante, fazendo a união entre as células. Esta propriedade está relacionada à determinação de importantes características da parede primária, como por exemplo, sua porosidade (MOORE et al., 1986).

As pectinas da região da lamela média encontram-se associadas por pontes de Ca^{2+} e são facilmente solubilizadas por extração com agentes quelantes (JARVIS et al., 1981; JARVIS, 1982). Na parede primária, a matriz péctica funciona como um envoltório para as ligações cruzadas entre celulose e as cadeias de xiloglucanas (CARPITA; GIBEAUT, 1993).

As pectinas originadas da lamela média e da parede celular primária têm características estruturais diferentes. As da lamela média são menos ramificadas e possuem cadeias laterais mais curtas do que as da parede celular primária (SELVENDRAN, 1985).

Substâncias pécticas em geral, podem ser polissacarídeos ricos em ácido galacturônico (GalA), e quando estes polímeros de GalA estão metil-esterificados, são chamados de polissacarídeos de pectinas. Já quando se encontram desesterificados, são chamados de ácidos pécticos. Nas paredes celulares também são encontrados os chamados polissacarídeos neutros (arabinanas, galactanas e arabinogalactanas) que apesar de não possuírem uma cadeia de ácido galacturônico se encontram geralmente associados a pectinas (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Os polissacarídeos pécticos podem ser classificados com base em sua estrutura. As homogalacturonanas possuem resíduos do ácido galacturônico (GalA) com ligações α (1-4) e ramnogalacturonanas do tipo I (RG-I), um polissacarídeo com estrutura básica longa e uma variedade de cadeias laterais. Já as ramnogalacturonanas do tipo II (RG-II), são polissacarídeos altamente ramificados que contém ao menos dez açúcares diferentes em um padrão complexo de ligações (TAIZ; ZEIGER, 2004). Assim, acredita-se que a complexidade dos polissacarídeos

pécticos da parede celular das plantas esteja fortemente ligada às funções fundamentais para a organização e o padrão celular (O'NEILL et al., 1990).

2.2.4 Lignina

A lignina é o segundo biopolímero mais abundante, superado apenas pela celulose. É um componente fundamental da madeira, representando cerca de 15 a 35% de seu peso seco. A lignina é um complexo polimérico com caráter fenólico que é resistente à hidrólise. Sua rigidez e hidrofobia são importantes para o suporte mecânico. Característica que provavelmente permitiu a melhor adaptação das plantas. A complexidade deste polímero na célula, lhe confere alta eficiência na condução de água da base até o topo do vegetal e também na defesa ao ataque de patógenos. A distribuição do conteúdo de lignina é diferente para cada região da célula. A maior concentração da lignina está localizada na região da lamela média. Já no interior da parede celular secundária a concentração é menor (FRY, 1988; TERASHIMA et al., 1993; RAVEN et al., 2001).

A lignina é biossintetizada nas plantas vasculares em um complexo processo de reações, iniciado pelo metabolismo do ácido shiquímico, seguido da via do aminoácido aromático L-fenilalanina. A fenilalanina amônialiase (PAL), é uma enzima que regula o metabolismo fenólico nas células vegetais, convertendo o aminoácido L-fenilalanina em ácido trans-cinâmico, que posteriormente é hidroxilado para ácido ρ -coumárico. Esse último, pela ações de enzimas específicas produz os três principais componentes da lignina, o ρ -coumarílico, coniferílico e sinapílico. Portanto por definição, lignina é um complexo de biopolímeros com estrutura de natureza aromática, com alto peso molecular, composto por várias combinações de três tipos de ligninas, a lignina ρ -hidroxi-fenila, lignina guaiacila e siringila, tendo como precursores os três álcoois do tipo fenilpropanóides (ρ -coumarílico, coniferílico e sinapílico), respectivamente. A deposição dos monômeros da lignina na parede celular vai depender da espécie vegetal, tipo de célula e estágio do desenvolvimento do tecido. No complexo polimérico da lignina ocorre uma variedade de ligações, incluindo ester, éter e carbono-carbono. A ligação éter é dominante, representando aproximadamente 2/3 das ligações. O restante das ligações são do tipo carbono-carbono e éster. Como resultado destas ligações, ocorre a formação de uma complexa rede tridimensional hidrofóbica, com importantes ligações covalentes e não covalentes com a celulose e as hemiceluloses, em particular com as cadeias de xilanas (BOLWELL, 1993; SJÖSTRÖM,

1993; WHETTEN et al., 1998; BOUDET, 1998, 2003; ANTEROLA; LEWIS, 2002; BOERJAN et al., 2003).

2.3 Biossíntese da parede celular

A fotossíntese pode ser considerada como o processo biológico mais importante para os vegetais superiores. Através desse mecanismo as células fotossintetizantes captam a luz solar e a convertem em diferentes formas de energia química, sendo os carboidratos as formas mais importantes. Os diferentes tipos de carboidratos sintetizados podem ser usados como precursores de vários componentes celulares (aminoácidos, lipídios e ácidos nucleicos) e também como componentes estruturais da parede celular. A biossíntese dos componentes da parede celular, tais como celulose, hemiceluloses, pectina e lignina dependem do fornecimento dos açúcares que foram fixados pelo processo fotossintético (TAIZ; ZEIGER, 2004).

A parede celular é constituída de vários polissacarídeos formando uma rede estrutural complexa. Para organizar essa rede de polissacarídeos, a célula necessita de um amplo mecanismo biossintético. Assim, estima-se que aproximadamente 2000 genes estão envolvidos no processo de biossíntese e manutenção da parede celular (CARPITA et al., 2001; PERRIN et al., 2001).

O processo central da biossíntese de polissacarídeos é realizado pela ação das glicosiltransferases (GTs). Essas enzimas formam ligações glicosídicas com misturas de açúcares, mais precisamente com os nucleotídeos-açúcares da região citoplasmática. Este processo conhecido como via de interconversão dos nucleotídeos-açúcares (Figura 3), envolve inúmeras reações enzimáticas (REITER; VANZIN, 2001).

A biossíntese dos polímeros da parede celular ocorre em diferentes regiões da célula. Por exemplo, a celulose é sintetizada na superfície da membrana plasmática pelas proteínas de celulose sintase (CesA), que formam um complexo protéico em forma de rosetas na superfície da membrana plasmática (BROWN, 1996; DELMER, 1999; KIMURA et al., 1999). Já as hemiceluloses e os polissacarídeos pécnicos são sintetizados no complexo de Golgi (GIBEAUT; CARPITA, 1994; SCHEIBLE; PAULY, 2004). Nesse caso, os nucleotídeos-açúcares devem ser transportados para dentro do lume do complexo de Golgi para que os polissacarídeos sejam sintetizados (KEEGSTRA; RAIKHEL, 2001). No interior do complexo de Golgi as GTs transferem um resíduo de açúcar para a cadeia dos polissacarídeos em construção, formando o

complexo polimérico, que é então transportado via vesículas secretoras do complexo de Golgi, para a superfície da parede celular (DOBLIN et al., 2003; SCHEIBLE; PAULY, 2004).

Os nucleotídeos-açúcares são monossacarídeos que têm moléculas de nucleotídeos ligadas a carboidratos e esta conjugação de moléculas gera energia para a célula. Os dois principais nucleotídeo-açúcares são ADP-Glicose (ADP-Gli) e UDP-Glicose (UDP-Gli), que são os formadores dos dissacarídeos e polissacarídeos, tais como a sacarose, amido e celulose. O UDP-Gli é o UDP-açúcar mais importante para a formação da parede celular, sendo precursor primário dos polímeros de celulose, hemiceluloses e pectinas (GIBEAUT, 2000; SEIFERT, 2004). Os açúcares precursores dos polímeros da parede celular são, UDP-arabinose (UDP-Ara), UDP-xilose (UDP-Xil), ácido UDP-galacturônico (UDP-GalA), UDP-apiose, que são sintetizados a partir de um precursor comum, o ácido UDP-glucurônico (UDP-GlcA), considerado como um intermediário biossintético essencial de muitos precursores da matriz de polissacarídeos (SEITZ et al., 2000; REITER; VANZIN, 2001). O UDP-GlcA, pode ser irreversivelmente formado a partir de UDP-Gli pela enzima UDP-D- glicose desidrogenase (UGD, EC 1.1.1.22) ou através de uma via alternativa conhecida como via de oxigenação do inositol (SEITZ et al., 2000). Existem evidências de que as duas vias metabólicas coexistem, variando a importância de cada rota durante o desenvolvimento da planta (ROBERTS; LOEWUS, 1973; VERMA; DOUGALL, 1979; RUBERY, 1972; DALESSANDRO; NORTHCOTE, 1977 a, 1977 b; WITT, 1992).

A biossíntese de UDP-xilose é mediada pela enzima UDP-glucuronato descarboxilase (EC 4.1.1.35), que catalisa a conversão de UDP-D-glucuronato a UDP-D-xilose, em uma reação irreversível (DALESSANDRO; NORTHCOTE, 1977a; BAR-PELET et al., 2001). Até o momento têm sido propostas duas vias através das quais sintetiza-se o UDP-glucuronato a partir de glicose-6-fosfato; a via de oxidação dos nucleotídeos-açúcares e a via de oxidação do mio-inositol (SEITZ et al., 2000).

A primeira via enzimática, denominada via de oxidação dos nucleotídeo-açúcares (*SNOP*, *Sugar Nucleotide Oxidation Pathway*) consiste da conversão, por meio da ação da enzima fosfoglucomutase (EC 5.4.2.2), de D-glicose-6-fosfato a D-glicose-1-fosfato. Logo formada, a glicose 1-fosfato é convertida em UDP-glicose pela enzima UDP-glicose pirofosforliase (EC 2.7.7.9). Finalmente, a enzima UDP-glicose desidrogenase (EC 1.1.1.22) e uma uridiltransferase são as responsáveis pela conversão do açúcar UDP-glicose a UDP-glucuronato (LOEWUS; LOEWUS, 1983; LOEWUS; MURTHY, 2000). A UDP-glicose desidrogenase é uma enzima

dependente de NAD^+ . Tanto a uridiltransferase, que constitui a UDP-glicose, quanto a desidrogenase, sofrem retroinibição, o que significa que são fortemente inibidas pelos produtos da reação. Além disso, estas enzimas sofrem inibição por certos produtos derivados do ácido UDP-glucurônico, como a UDP-xilose. O requerimento de NAD^+ e as restrições cinéticas impostas pelos produtos inibidores são aspectos muito importantes nesta via de síntese de ácido UDP-glucurônico (NELSETUEN; KIRKWOOD, 1971; FEINGOLD, 1982; KLECZKOWSKI, 1994; KÄRKÖNEN, 2005).

A outra via de síntese do UDP-glucuronato é conhecida como via de oxidação do mio-inositol (MIOP, *Myo Inositol Oxidation Pathway*). Esta via metabólica não requer diretamente a síntese de UDP-glicose, nem a redução acoplada ao NAD^+ , para produzir UDP-glucuronato. A conversão do mio-inositol livre, em UDP-glucuronato é catalisada por três enzimas: MI oxigenase (E.C.1.13.99.1), glucuronoquinase (E.C.2.7.1.43) e glucuronato 1-fosfato uridiltransferase (E.C.2.7.7.44). O UDP-glucuronato é o principal metabólito da biossíntese dos nucleotídeos-açúcares (UDP-D-xilose, UDP-D-apiose, UDP-D-arabinose e UDP-D-galacturonato), sendo assim considerado o intermediário central na síntese de polissacarídeos da parede celular. A importância deste metabólito para a biossíntese da parede vegetal é tão crucial que em folhas de *Arabidopsis*, por exemplo, foi demonstrado que aproximadamente 50% da massa da parede celular é produzida através dos derivados de UDP-glucuronato (ZABACKIS et al., 1995; SEITZ et al., 2000; REITER; VANZIN, 2001).

Apesar de ainda não existir uma elucidação completa de como os fluxos metabólicos dos diversos nucleotídeos-açúcares afetam a biossíntese de polissacarídeos da parede celular, é necessária a caracterização genética das enzimas envolvidas na via de interconversão dos nucleotídeos-açúcares. Essas informações são importantes para o entendimento da regulação das complexas rotas metabólicas, de forma a permitir assim, modificações do conteúdo de polissacarídeos da parede celular. As técnicas de biologia molecular podem auxiliar assim, na modulação da expressão de alguns genes envolvidos no processo de síntese da parede celular (REITER; VANZIN, 2001; HARPER; BAR-PELED, 2002).

Figura 3 - Representação esquemática da formação de xilanos, celulose e glucuronato a partir do açúcar Glicose 6-P na via de oxidação de açúcares nucleotídeo (SNOP) e através da via de oxidação do mio-inositol (MIOP). 5.5.1.4, mio-inositol 1-fosfato sintase (MIPS); 3.1.3.25, mio-inositol monofosfatase (IMP); 1.13.99.1, mio-inositol oxigenase (MIOX); 3.2.1.31, β -glucuronidase; 2.7.1.43, glucuronoquinase; 2.4.1.17, glucuronosil-transferase; 2.7.7.44, glucuronato 1-P uridiltransferase; 5.4.2.2, fosfoglucomutase; 2.7.7.9, UDP-glicose pirofosforilase; 1.1.1.22, UDP-glicose desidrogenase; 4.1.1.35, UDP-glucuronato descarboxilase; 2.4.2.24, 1-4 β -D-xilano sintase; 2.4.1.12, celulose sintase

2.4 Enzima UDP-D-glicose desidrogenase (EC 1.1.1.22)

A enzima UDP-glicose desidrogenase (UGDH) é extremamente importante para a formação de hemiceluloses e pectinas; componentes essenciais da parede celular das plantas superiores (JOHANSSON et al., 2002). Como primeiro passo para formação dos açúcares constituintes da parede celular, a reação de conversão de UDP-açúcar é catalisada pela UGDH, que converte o substrato UDP-glicose (UDP-Glic) a UDP-D-glucuronato (UDP-GlcUA) (Figura 4). O UDP-GlcUA é o precursor direto da síntese de pectinas e importantes hemiceluloses, tais como xilose e conseqüentemente arabinose (REITER; VANZIN, 2001).

Figura 4 - Reação realizada pela enzima UDP-glicose desidrogenase (EC 1.1.1.22), que oxida UDP-glicose a UDP-glucuronato, e é dependente de NAD (GAINEY et al., 1975)

O gene *ugdh* foi clonado e estudado em diferentes espécies vegetais, tais como soja (TENHAKEN; THULKE, 1996), *Arabidopsis* (SEITZ et al., 2000) e álamo (JOHANSSON et al., 2002) e recentemente de *Eucalyptus grandis* (LABATE et al., 2007 submetido). Segundo esses autores, os genes *udpgdh* são altamente conservados entre as espécies vegetais quando se refere à composição de aminoácidos e também apresentam homologia com as seqüências de mamíferos.

Nas plantas, a proteína UGDH é encontrada na região citoplasmática da célula, tem peso molecular ao redor de 52-53 kDa e pode sofrer retroinibição por UDP-xilose (DAVIES; DICKINSON, 1972; DALESSANDRO; NORTHCOTE, 1977; HINTERBERG et al., 2002; TURNER; BOTHA, 2002). Nos vegetais, foi verificado que o nível de expressão da enzima UGDH está associado ao estágio de desenvolvimento do tecido vascular, indicando uma importante função na síntese da parede secundária (BINDSCHEDLER et al., 2005). A alta atividade da enzima UGDH foi observada em plantas jovens, mais especificamente em tecido em crescimento de plântulas de *Arabidopsis* (SEITZ et al., 2000). Já em álamo, alta atividade enzimática foi observada na região cambial (DALESSANDRO; NORTHCOTE, 1977).

2.5 Composição química da madeira: influência nas características da polpa celulósica.

A composição química dos vegetais utilizados em diversos setores industriais pode definir as características do produto final. A determinação dos componentes químicos é de extrema importância, pois a partir destas informações pode-se definir o comportamento do material fibroso como, por exemplo, madeira de eucalipto utilizada no processo de polpação para a produção de papel.

Nas indústrias de celulose e papel, os parâmetros químicos como, teores de extrativos, conteúdo de lignina, celulose e hemiceluloses, são considerados os mais relevantes e normalmente são relacionados aos aspectos de rendimento e consumo de produtos químicos durante o processo de deslignificação (CARVALHO et al., 1998; WALLIS et al., 1996).

Materiais com elevado conteúdo de lignina e extrativos não são desejáveis, pois estabelecem correlação negativa com o rendimento no processo de polpação. Já, altas frações de carboidratos são correlacionadas positivamente com o rendimento da polpa (WALLIS et al., 1996).

A produção da polpa celulósica a partir da madeira envolve uma série de processos, cujo objetivo principal é o isolamento das fibras, preservando-se componentes como a celulose e as hemiceluloses (SMOOK, 1990; SANJUAN, 1997). Os componentes não celulósicos, como lignina e extrativos devem ser removidos, pois estes interferem no processo de fabricação do papel, assim como comprometem a qualidade do produto final.

No Brasil, o processo de produção de polpa química mais utilizado é o processo kraft, que envolve o cozimento da madeira com uma solução contendo hidróxido e sulfeto de sódio, a altas temperaturas, em torno de 160 °C. Durante este processo é possível remover-se grande parte da lignina presente na madeira. Entretanto, a polpa resultante ainda apresenta uma coloração escura, tornando-se necessária a realização de branqueamento a fim de atingir-se níveis de alvura aceitáveis para as diversas aplicações da celulose (CLARKE et al., 1997; IPT, 1998; GRIMA-PETTERNATI ; GOFFNER, 1999).

Atualmente muitas empresas do setor de celulose e papel utilizam no processo de branqueamento da polpa celulósica o peróxido de hidrogênio(H_2O_2). Este reagente químico gera menos compostos tóxicos, mas ainda se utiliza no processo convencional de branqueamento, reagentes químicos à base de cloro (cloro, dióxido de cloro, hipoclorito de sódio). Esse processo

apresenta grandes inconvenientes, como o excessivo consumo de energia e a formação de compostos organoclorados, especialmente dioxinas e furanos com elevado grau de toxicidade (mutagênicos e bioacumulativos). Além disso, o grande volume de água utilizado nos processos de branqueamento e o descarte dessas águas residuárias, com alto teor de organoclorados constituem um dos mais sérios problemas ambientais do setor de celulose e papel (RAPPE et al., 1987; ONYSKO, 1993; CLARKE et al., 1997; IPT, 1998).

A determinação do teor de lignina em materiais lignocelulósicos pode ser dividida em dois tipos, a lignina klason (lignina residual), que se encontra polimerizada na parede celular e é representada em maior quantidade em materiais lenhosos, e a lignina solúvel, que tem estruturas químicas menos resistentes à degradação e à solubilização. Acredita-se que a lignina solúvel seja mais fácil de se remover durante o cozimento alcalino Kraft (GOMIDE et al., 2005).

Gomide e colaboradores (2005) verificaram que clones de eucalipto que apresentam maior conteúdo de lignina solúvel, também apresentam maior conteúdo de estruturas do tipo siringil em relação as do tipo guaiacil. As estruturas de lignina do tipo siringil, por não possuírem o carbono reativo C5 disponível para a reação na etapa de polimerização da biossíntese de lignina, apresentam estruturas menos condensadas e conseqüentemente, são mais facilmente deslignificadas nos processos de cozimento kraft.

Além da lignina, o conteúdo de hemiceluloses influencia no processo de polpação, mesmo sendo a celulose o componente da polpa que confere resistência às fibras, polpas com altos teores de celulose e baixos teores de hemiceluloses são menos resistentes ao processo de refino. Isso pode ser explicado, pelo fato das hemiceluloses protegerem a celulose contra o processo de despolimerização (WAGBERG; ANNERGREN, 1997).

As hemiceluloses são muito hidrofílicas e estão relacionadas à habilidade da fibra em absorver água, o que aumenta a flexibilidade das mesmas assim como a área de contato, proporcionando ligações interfibrilares mais fortes. Tais fatores favorecem a formação de fibras mais coesas, que consomem menos energia no processo de refino (WAGBERG; ANNERGREN, 1997; LAINE; HYNYNEN, 1997; BARZYC et al., 1997).

O conteúdo das hemiceluloses encontrado na pasta celulósica é determinado principalmente pelo álcali ativo do processo de cozimento da madeira. Assim, quando se utiliza uma alta concentração alcalina, menor é a retenção das hemiceluloses e conseqüentemente tais

condições alteram as propriedades físico-químicas da polpa (índice *kappa*, viscosidade, alvura e rendimento).

A principal hemicelulose encontrada na madeira de eucalipto (fibra curta) é a xilana, que é caracterizada por uma estrutura central formada por resíduos 1,4 β -xilose e por algumas ramificações com grupos de 4-O-metilglucurônico e ácido glucurônico (FRY, 1989; HAYASHI, 1989).

No processo de polpação, as condições de alta temperatura e alcalinidade, favorecem a formação dos ácidos hexenurônicos (AHexs), pelas modificações dos ácidos 4-O-metilglucurônico e ácido glucurônico presentes nas xilanas. A formação destes compostos tem um grande impacto no processo de produção de polpa kraft branqueada. Estes ácidos formam ligações covalentes com a lignina, consumindo reagentes químicos eletrofílicos de branqueamento (cloro, dióxido de cloro, ozônio e perácidos). Os AHexs são responsáveis por uma fração significativa do índice *Kappa* (lignina da polpa *kraft*), principalmente para as de fibra curta (JIANG et al., 2000; COSTA et al., 2001). Por outro lado, os AHexs contêm grupos funcionais de enol-éter e carboxila relativamente estáveis sob condições alcalinas. Tais estruturas protegem as xilanas contra a reação de despolimerização terminal, preservando assim o rendimento da polpa durante o tratamento alcalino a altas temperaturas (COSTA et al., 2001).

2.6 Características das fibras: influência nas propriedades da polpa celulósica.

As espécies vegetais apresentam elevada diversidade de células, com diferentes formas e dimensões (traqueídeos, células do parênquima, elementos de vaso e fibras do xilema e do floema) (Figura 5).

As fibras são células peculiares das angiospermas e nas espécies lenhosas representam cerca de 20-80% do seu lenho. Normalmente, desempenham a função de sustentação (BURGER; RICHTER, 1991). Especificamente para o eucalipto, a porcentagem total de fibras (fibras libriiformes + fibrotraquídes) é de 65%, a de vaso 17%, e a de tecido parenquimatoso é de 18% (FOELKEL; BARRICHELO, 1975a; BARRICHELO; BRITO, 1976). Por definição, as fibras são células alongadas e afiladas, que fornecem suporte mecânico às plantas vasculares. Geralmente ocorrem em feixes, sendo sua maior característica a espessa parede celular secundária, constituída basicamente de microfibrilas de celulose e uma matriz de lignina e hemiceluloses.

As fibras são praticamente classificadas de acordo com o local onde são originadas; fibras foliares, fibras de sementes e fibras do xilema (madeira) (RAVEN et al., 2001).

Figura 5 - Ilustração dos elementos celulares e tecido xilemático presente em espécies lenhosas, adaptado dos site <http://unisanta.br/imagens/anatomia/xilema/macerado.html> e <http://biologia.edu.ar/botanica/images>. (A) corte transversal de um tronco de uma espécie lenhosa, (B) tecido xilemático, (C) bloco didático orientado do tecido xilemático, (D) elementos celulares constituintes do xilema das angiospermas, a- elementos de vaso, b-fibras, c-células do parênquima

Várias são as fontes vegetais utilizadas comercialmente para o fornecimento de fibras, entre elas podemos destacar, o eucalipto (*Eucalyptus ssp*), algodão (*Gossypium hirsutum*), cânhamo (*Cannabis sativa*), linho (*Linum usitatissimum*), etc. Estas fibras vegetais naturais têm um amplo mercado de aplicações, como por exemplo, o setor de celulose e papel que utiliza principalmente fibras do xilema de árvores de eucalipto.

No estágio jovem das árvores de eucalipto, o câmbio vascular produz uma madeira chamada de juvenil. A madeira juvenil tem algumas características não desejáveis para produção da celulose e papel. Este tipo de madeira contém alto conteúdo de lignina e baixo teor de celulose, além de produzir fibras com menor comprimento. Estas características vão sendo modificadas com a idade. Portanto, o aumento do comprimento das fibras em função da idade é o resultado do aumento do comprimento das células que as originam, denominadas de iniciais fusiformes. A estabilização do comprimento das fibras, para inúmeras espécies de eucalipto, somente irá ocorrer quando as células do câmbio atingirem comprimento máximo, iniciando a formação da madeira adulta (TOMAZELLO FILHO, 1987).

As características das fibras como, comprimento e largura, controlam diretamente as propriedades do papel produzido. Em particular, o comprimento da fibra está associado à resistência ao rasgo e às dobras (DINWOODIE, 1965; CARVALHO, 1998).

O papel produzido a partir de fibras de eucalipto (fibra curta), pode ter qualidade inferior em relação à resistência ao rasgo. Essa característica indesejável pode ser reparada com a incorporação de fibras de algumas coníferas (fibra longa) às polpas de folhosas (BAMBER, 1985). As fibras mais curtas têm menor tendência para flocular no processo de fabricação do papel, o que resulta em uma melhora na formação da folha e lisura superficial, favorecendo a produção de papel com uma distribuição mais homogênea dos poros. Essa característica beneficia a absorção de tinta, e conseqüentemente resulta em uma melhor qualidade de impressão

Outra característica muito importante para as propriedades do papel é a largura da fibra. As fibras mais largas produzem um papel com menor resistência ao ar, maior volume específico aparente e maior resistência ao rasgo. A espessura da parede também é uma característica anatômica importante da fibra e geralmente está relacionada à rigidez. As fibras com maior espessura de parede podem sofrer maior desfibrilamento durante o processo de refino, o que aumenta o potencial de ligações interfibrilares e conseqüentemente a resistência à tração do papel (CARVALHO et al., 1998).

Pela determinação das características das fibras tais como, comprimento, largura, diâmetro do lúmen e espessura da parede celular, pode-se avaliar alguns fatores da qualidade das fibras para a fabricação de papel. Fatores como índice de Runkel, fração parede, coeficiente de flexibilidade, são os mais usados na avaliação das fibras.

O índice de Runkel, proposto pelo próprio Runkel (1952), relaciona duas características importantes da fibra, o diâmetro do lúmen e a espessura da parede celular. Esse índice considera que, fibras de madeira com índice baixo, favorecem a produção de polpas de boa qualidade e com boa capacidade de integração.

A fração parede mede a relação, expressa em porcentagem, entre a espessura da parede celular e a metade da largura da fibra. Em geral se a fração parede é alta, ou seja, acima de 40%, isso indica que as fibras são extremamente rígidas, e apresentam pouca flexibilidade com diminuto potencial de ligação. Esse tipo de fibra tende a dar origem a um papel com volume específico aparente alto. Devido a esta característica, quando as fibras são comprimidas durante a formação do papel, o grau de colapso é menor do que as fibras com frações parede baixas

(GONÇALEZ et al., 1986). Na seleção de madeira destinada à produção de papel, foram qualificadas, segundo Paula (1999) a madeira com índice de fração parede menor, como sendo a de melhor qualidade para a produção de papel.

O coeficiente de flexibilidade é normalmente expresso em porcentagem pela relação entre o diâmetro do lúmen e a largura da fibra. A flexibilidade da fibra influencia o número de ligações interfibrilares. Na prática, este parâmetro indica o grau de achatamento (colapso) que as fibras sofrem durante o processo de fabricação do papel. (FOLKEL; BARRICHELO, 1975b). O coeficiente de flexibilidade possibilita avaliar a capacidade de flexão da fibra e o potencial de ligações interfibrilares, sendo correlacionado diretamente à resistência à tração e ao arrebatamento (GONÇALVES et al., 1986).

As medidas das dimensões das fibras devem ser realizadas em amostras retiradas da madeira ou do material lenhoso, e não da polpa branqueada, devido a três fatores. Primeiramente, quando a madeira é reduzida a cavacos, cortam-se muitas fibras, e isso pode interferir nas medições. Em segundo lugar, as condições de polpação e branqueamento alteram as dimensões das fibras. Durante esses processos, a lignina e as hemiceluloses são solubilizadas da parede celular, o que tornam as fibras mais finas. E finalmente, durante o processo de polpação as fibras sofrem tratamentos mecânicos em misturadores, e desintegradores que deformam as mesmas e induzem curvaturas que podem distorcer as mensurações (TREPANIER, 1998; LEVLIN; SÖDERHJEM, 1999; BRAATEN; MOLTEBERG, 2004).

2.7 Cromatografia dos Carboidratos

O conhecimento da composição química de determinados materiais lignocelulósicos, em particular o conteúdo de carboidratos presentes na madeira e também na polpa celulósica utilizada na indústria de celulose e papel é muito importante. Assim, a análise de carboidratos, tornou-se uma importante ferramenta para a determinação da qualidade da madeira. Portanto, a partir da composição dos carboidratos pode-se destinar a madeira para diferentes processos de fabricação do papel.

As técnicas cromatográficas destinadas à análise de carboidratos receberam inúmeras modificações nos últimos 40 anos. As primeiras separações cromatográficas utilizavam cromatografia de papel com detecção fotométrica, mas tal técnica era pouco sensível. No início da década de 70, surgiu a cromatografia a gás, que ofereceu rápidas separações e boa

reprodutibilidade na determinação de monossacarídeos (BORCHARDT; PIPER, 1970). Com a obtenção de ótimos resultados, em meados da década de 70, a cromatografia gasosa já substituía a cromatografia de papel em muitos laboratórios da indústria de celulose e papel. Entretanto, essa técnica também possuía suas limitações. A técnica era muito demorada e utilizava grande quantidade de reagentes para derivatizar os carboidratos, convertendo os monossacarídeos em derivados voláteis.

Com o objetivo de eliminar o processo de derivatização dos carboidratos, novos métodos surgiram, e a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (*HPLC- High-Performance Liquid Chromatography*) se desenvolveu rapidamente. Devido a altos investimentos nesta área, uma nova vertente da cromatografia líquida de alta eficiência surgiu em meados da década de 80. Como resultado dos avanços tecnológicos, o desenvolvimento da cromatografia de troca aniônica HPAE (*High Performance Anion Exchange*) permitiu a obtenção de melhores resultados nas análises de monossacarídeos. E em seguida, o acoplamento ao detector amperométrico pulsante PAD (*Pulsed Amperometric Detection*), possibilitou a quantificação direta dos carboidratos de baixa concentração, e com um mínimo de preparação e purificação da amostra (ROCKLIN; POHL, 1983).

O princípio da cromatografia de troca aniônica se baseia na natureza ácida fraca dos carboidratos, e na capacidade de separação altamente seletiva em condições de pH elevado. Nas análises de monossacarídeos, utilizam-se colunas com fase estacionária de forte troca aniônica. Tais colunas são muito eficientes, pois os carboidratos são separados segundo suas constantes de dissociação (pK_a). Assim, quanto menor o valor do pK_a maior é a acidez e ionização deste monossacarídeo que permanece mais tempo no interior da coluna. A detecção destes carboidratos é efetuada por medição da corrente elétrica gerada pela oxidação do carboidrato na superfície do eletrodo de ouro (DIONEX CORPORATION, 1993).

Na cromatografia de troca aniônica são utilizados como eluentes soluções fortemente alcalinas, normalmente de hidróxido de sódio (NaOH). Tais eluentes ativam a ionização dos grupos carboxilos dos carboidratos, promovendo a perda de carga positiva (H^+). Assim os carboidratos ficam carregados negativamente, o que possibilita a interação dos carboidratos com o enchimento da coluna que se encontra carregada positivamente (LEE, 1990).

2.8 Características das plantas de tabaco

As plantas de tabaco são consideradas plantas modelo em estudos de biologia e fisiologia vegetal por possuírem algumas características importantes como, boa adaptação à cultura de tecido e alta susceptibilidade à infecção por *Agrobacterium tumefaciens*. Além de ser uma planta de ciclo curto, o que possibilita avançar rapidamente nas gerações seguintes, o tabaco também tem a capacidade de produzir tecido xilemático bem definido, o que justifica o fato de ser amplamente utilizado em pesquisas relacionados à parede celular (BOUDET, 1998, 2003; BOERJAN et al., 2003).

As plantas de tabaco são excelentes modelos de estudo em experimentos de engenharia genética, substituindo muito bem espécies como o eucalipto, que embora já tenha sido transformado por González et al. (2002) não tem ainda uma rotina de transformação genética bem estabelecida e rápida (TEULIÉRES et al., 1994).

O tabaco é uma dicotiledônea da família das Solanáceas, que apresenta como particularidade a presença de floema em feixes na região perimedular. O xilema compreende um segmento em torno de toda a medula (Figura 6). No caule de tabaco adulto que apresenta estruturas mais desenvolvidas, parte do parênquima se transforma em colênquima. O tecido xilemático é muito similar ao xilema de espécies lenhosas e apresenta elementos característicos de plantas vasculares, em particular as fibras e os vasos. Em espécies arbóreas, o tecido xilemático produz células com parede secundária com várias camadas chamadas de S₁, S₂ e S₃, como ilustrado na Figura 1. Já a parede celular das plantas de tabaco contém somente duas camadas distinguíveis; a parede primária com a lamela média e a parede secundária. O tecido medular de caules de tabaco é constituído basicamente de células de parênquima (HEPWORTH; VINCENT, 1998).

Em plantas herbáceas como é o caso do tabaco, os vasos e as fibras são os principais elementos lignificados do tecido xilemático, mas a composição de lignina é diferente nesses tipos de células. Geralmente os vasos são ricos em monômeros de lignina do tipo guaiacil e as fibras ricas no tipo siringil (FERGUS; GORING, 1970). Esta mesma distribuição dos monômeros de lignina pode ser encontrada em caules de *Arabidopsis*, onde os vasos contêm preferencialmente unidades guaiacil e as fibras são ricas em unidades siringil (CHAPPLE et al., 1992).

Figura 6 - Estruturas e elementos do caule de plantas de tabaco em vários aumentos (a), (b), (c), (d) e (e). Lâmina do macerado de fibras (f), com diversos tipos celulares isolados.

M- região da medula; **X**- tecido xilemático; **PC**- parênquima cortical; **EN**- endoderme; **P**- pêlos peridérmicos; **CC**- camada cambial; **RFE**- região do floema externo; **F**-fibra; **R**-raios; **FI**-floema interno; **V**-vaso; **C**-células parenquimáticas

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização das plantas transgênicas e controles

Plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), variedade Petit Havana SR1, foram obtidas a partir de plantas selvagens (WT) via transformação genética por *Agrobacterium tumefaciens* com a linhagem (EHA105)(HOOD et al., 1986) recombinante, contendo o gene *ugdh* da UDP-glicose desidrogenase (EC. 1.1.1.22) de soja previamente clonado no vetor binário *Gateway* pK7WG2D (KARIMI et al., 2002). As linhagens homozigotas para o transgene de interesse foram selecionadas pela capacidade de enraizamento e crescimento em meio contendo canamicina (50mg/L) e sucessivas autofecundações e análise genética das progênes da geração F2. As plantas homozigotas selecionadas da geração F2 foram transferidas para vasos contendo substrato organo-mineral (Plantmax) e vermiculita (tamanho médio) na proporção de (v:v). Essas linhagens foram previamente submetidas às análises moleculares via Southern (SOUTHERN, 1975) e Northern blot (SAMBROOK, 1989).

Cinco linhagens transgênicas (2M, 42, 51, 55 e 79) e dois controles, (WT e CG), sendo a linhagem transgênica gateway (CG) obtida pela transformação da linhagem selvagem (WT) com vetor gateway “vazio” (desprovido do transgene de interesse), foram utilizados nas análises químicas da parede celular.

3.2 Preparo das sementeiras e condições de cultivo

As sementes das linhagens homozigotas de tabaco transgênicas e das linhagens controles (WT e CG) foram semeadas em vasos contendo substrato organo-mineral (Plantmax) e vermiculita na proporção de (v:v). As sementeiras foram mantidas por 10 dias em câmaras de crescimento (CONVIRON E15) sob um regime fotoperiódico de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, fluxo luminoso de $250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e temperatura de 25°C. Após este período, as plântulas foram transplantadas para vasos individuais, permanecendo na câmara de crescimento por mais 5 dias antes de serem transferidas para a casa de vegetação onde permaneceram até o momento da coleta do material vegetal para as análises.

3.3 Esquema dos experimentos

Em todas as análises, foram utilizadas 5 plantas por genótipo, sendo dois genótipos controles (CG e WT), e cinco genótipos transgênicos (2M, 42, 51, 55 e 79), totalizando 35

plantas por experimento. Os experimentos foram conduzidos em dois ambientes, casa de vegetação e câmara de crescimento (Figura 7).

Plantas com 90 dias de idade após a germinação, mantidas em casa de vegetação foram utilizadas para a determinação dos componentes químicos da parede celular do caule total e dos diferentes tecidos, xilema e medula separadamente, e também para cortes anatômicos transversais da região basal do caule. As plantas com 120 dias de idade foram utilizadas para as determinações das propriedades morfológicas das fibras do tecido xilemático e para os cortes anatômicos da região basal do caule.

Figura 7 - Fluxograma das análises com plantas cultivadas em casa de vegetação e câmara de crescimento

Já as plantas coletadas com 60 dias de idade após a germinação foram cultivadas em câmaras de crescimento e utilizadas nas análises químicas dos componentes da parede celular do

caule e da folha. As secções basais do caule dessas plantas foram utilizadas para cortes anatômicos.

3.4 Análise das plantas cultivadas em casa de vegetação

3.4.1 Condições de cultivo

Na casa de vegetação as plantas de tabaco foram cultivadas em vasos plásticos de 3L, distribuídas aleatoriamente entre os canteiros, com regas diárias de água e fertirrigadas com solução nutritiva (plantmax), três vezes por semana. A casa de vegetação é provida de luminosidade suplementar, controle de luz através de um “timer” luminoso, num regime fotoperiódico de 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

3.4.2 Coleta do caule

O caule das plantas de tabaco (aproximadamente 25 cm), com 90 dias de idade, foi cortado próximo à base. O parênquima cortical (casca) foi removido manualmente, restando praticamente o tecido xilemático e o tecido medular, que foram rapidamente congelados em N₂ líquido (nitrogênio líquido) e liofilizado (câmara de -50 °C). O material liofilizado foi então moído em moinho tipo micro-wiley, seguido pelo processo de remoção dos extrativos, para posteriormente ser utilizado nas análises químicas dos componentes da parede celular. Os carboidratos (arabinose, galactose, glicose, xilose e manose) foram determinados via HPAE-PAD (*High Performance Anion Exchange – Pulsed Amperometric Detection*). Os outros componentes, como as ligninas klason e solúvel, foram determinadas por análise gravimétrica e por espectrofotometria, respectivamente.

3.4.3 Coleta seletiva dos diferentes tecidos do caule

Na coleta seletiva, o caule das plantas de tabaco (aproximadamente 25cm) com 90 dias de idade, foram utilizados. A casca foi removida e o tecido xilemático foi separado manualmente do tecido medular, que foram congelados separadamente em N₂ líquido, liofilizados e moídos em moinho tipo micro-wiley. Após a remoção dos extrativos, as amostras foram utilizadas nas análises químicas para a quantificação dos componentes da parede celular em cada tecido separadamente. No tecido xilemático foram quantificados os carboidratos e os ácidos urônicos

(ácido galacturônico e ácido glucurônico), também via HPAE-PAD, além das ligninas. No caso do tecido medular, foram determinados somente os carboidratos e os ácidos urônicos.

3.4.4 Preparo das amostras e remoção dos extrativos

Após a moagem individualizada de cada tecido vegetal (caule total, tecido xilemático e tecido medular), a serragem final foi peneirada com auxílio de peneiras de 40 e 60 *mesh* com agitador para análise granulométrica eletromagnético, de acordo com a Norma ABCP M1 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA TÉCNICA DE CELULOSE E PAPEL, 1974). A serragem retida na peneira de 60 *mesh* foi transferida para uma plataforma de extração *Soxhlet* para a remoção dos extrativos. Os extrativos solúveis em solventes orgânicos, incluem vários compostos, como os ácidos resinosos, graxos, ésteres, ceras, substâncias insaponificáveis e materiais pigmentados de natureza diversa. A metodologia para a remoção dos extrativos foi adaptada das normas TAPPI T 264 om-88 (TAPPI, 1999). Assim, a remoção dos extrativos foi realizada em duas etapas. A primeira, com uma mistura de toluol/etanol (v:v) durante 4 horas, seguida de etanol 95% (GL) por mais 4 horas.

Após a remoção dos extrativos, determinou-se o teor de umidade do material vegetal, pois todos os dados referentes à composição química do material vegetal são relativos ao peso seco. Para isso a porcentagem de umidade da amostra foi determinada com auxílio de uma estufa 104°C.

3.4.5 Hidrólise dos carboidratos da parede celular

O ácido sulfúrico (H_2SO_4) em altas concentrações é um eficiente desidratante. Carboniza os carboidratos pelo simples processo de retirada de moléculas de água do interior de sua estrutura química. Mas em concentrações mais diluídas, o ácido ataca somente as ligações dos polímeros de carboidratos. Assim, quando a parede celular das plantas de tabaco ou de qualquer material vegetal é tratada com ácidos, como por exemplo, o H_2SO_4 ou ácido nítrico (HNO_3), as cadeias de polissacarídeos da parede celular sofrem hidrólise e liberam seus monômeros constituintes. Conseqüentemente essa reação de hidrólise também produz um resíduo insolúvel que é determinado como lignina residual ou lignina klason. Uma pequena parcela da lignina é solubilizada, e pode ser determinada por espectrofotometria a 215 e 280 nm, segundo a metodologia TAPPI T 259 um-75 (TAPPI, 1991b).

Nesse trabalho, utilizou-se a metodologia que emprega H_2SO_4 72%, para a hidrólise ácida dos carboidratos de acordo com as metodologias descritas por Effland (1977), juntamente com os descritas nas normas TAPPI T249 cm 85 (TAPPI, 1991a).

Durante o processo de hidrólise da parede celular, os polímeros de açúcar têm suas ligações quebradas o que resulta na liberação de seus monômeros constituintes. Esse processo de hidrólise acontece em duas etapas. Primeiro, utiliza-se ácido sulfúrico 72% à baixa temperatura ou temperatura ambiente, para a conversão dos polissacarídeos em oligossacarídeos. A segunda etapa, se faz com a diluição do ácido e elevação da temperatura para 120 °C, que finaliza a conversão dos oligossacarídeos a monossacarídeos.

Para a realização das hidrólises das amostras do caule total, tecido xilemático e tecido medular livre de extrativos, pesou-se aproximadamente 50 mg (peso-seco) em tubo tipo Falcon™ (15 mL), ao qual adicionou 500 µL de H_2SO_4 72% padronizado (24 N, densidade de 1,6338g/cm³ à temperatura de 10°C) de acordo com as normas TAPPI T222 om-88 (TAPPI, 1996).

Logo após a adição do H_2SO_4 72%, as amostras foram mantidas por 1 hora a 30°C, sob agitação com bastão de vidro em intervalos de 15 minutos. Após este período adicionou-se à amostra 14 mL de água milliQ, diminuindo-se a concentração do ácido sulfúrico para aproximadamente 4%. As amostras foram submetidas a um processo de autoclavagem (120 °C, 15 psi) por 1 hora, seguido de um resfriamento em banho de gelo, para completa paralisação do processo de hidrólise. O resíduo proveniente do processo de autoclavagem foi filtrado em uma membrana 47 mm (GF-92 Schleicher & Schuell), acoplada a copo de filtragem com placa porosa, com auxílio de kitassato associado a uma bomba de vácuo. O filtrado final é denominado de hidrolisado secundário, onde se encontra a fração solúvel da lignina, que foi determinada por espectrofotometria, juntamente aos carboidratos e ácidos urônicos que foram determinados no HPAE-PAD. Já a fração residual retida na membrana, corresponde à fração que contém a parcela insolúvel da lignina, a lignina klason.

3.5 Análise das plantas cultivadas em câmara de crescimento

3.5.1 Condições de cultivo

Na câmara de crescimento as plantas foram cultivadas em vasos plásticos de 500 mL e distribuídas totalmente ao acaso no interior da câmara, com regas diárias de água e fertirrigadas

com solução nutritiva (plantmax) três vezes por semana. As condições de cultivo utilizadas foram as mesmas descritas no item 3.2.

3.5.2 Coleta das folhas e caules

Devido à grande quantidade de amido armazenado nos tecidos vegetais, que pode interferir nas análises da composição química da parede celular, as plantas foram mantidas no escuro por 24 horas antes da coleta. Amostras de caule e tecido foliar foram coletadas para as análises químicas dos componentes da parede primária. O caule foi dividido em três partes, denominadas de ápice, meio e base. Na parte basal do caule também foram retiradas secções transversais para análise anatômica.

3.5.3 Determinação do conteúdo de carboidratos em tecido foliar

3.5.3.1 Quantificação das hemiceluloses

Para a determinação do conteúdo das hemiceluloses da parede primária das folhas de tabaco via HPAE-PAD, 500mg de tecido foliar foram coletados e macerados em cadinhos de porcelana sob N₂ líquido com auxílio de um pistilo. A amostra foi transferida para tubos tipo Falcon™ (15 mL) e a lavagem foi feita pela adição de 10 mL de etanol 80% (v/v). Os tubos foram então, mantidos por 40 minutos a 60°C. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 2348 g. Esse processo de lavagem foi repetido por mais duas vezes. Após as lavagens, o material foi liofilizado por 48 horas até completa secagem do resíduo de parede celular.

Pesou-se 1 mg do resíduo de parede celular, transferindo para tubos *ependorf* (2 mL), ao quais adicionou-se 1,5 mL de TFA 2 mol/L (ácido trifluoroacético). Após homogeneização, os tubos foram mantidos em autoclave a (120 °C, 15 psi) por 90 minutos. Em seguida, as amostras foram resfriadas em banho de gelo, e centrifugadas por 10 minutos a 5435 g. Uma alíquota (1 mL) do sobrenadante foi submetida à secagem a vácuo a 30 °C por 12 horas com auxílio do *concentrator 5301 ependorf* para completa remoção do TFA. O *pellet* foi reservado para a quantificação da celulose. O precipitado resultante da secagem do sobrenadante no liofilizador, foi ressuspenso em 1 mL de água milliQ e utilizado para a quantificação das hemiceluloses da parede celular primária do tecido foliar. As amostras contendo o total de hemiceluloses foram diluídas antes de serem injetadas no HPAE-PAD.

3.5.3.2 Quantificação de celulose

Na hidrólise do material vegetal contendo basicamente células de parede primária, o ataque químico com TFA não é completo, pois libera somente os monômeros provenientes das cadeias de hemiceluloses. O resíduo remanescente é composto de microfibrilas de celulose (SELVENDRAN; RYDEN, 1990). Assim, o pellet remanescente (item 3.5.3.1) da centrifugação após o tratamento com TFA, foi utilizado nas determinações do conteúdo de celulose da parede celular primária de tecido foliar, conforme descrito abaixo.

Após secagem a vácuo à temperatura de 30 °C por 10 horas, com auxílio do *concentrator 5301 eppendorf* para completa remoção do TFA, o *pellet* foi lavado com água milliQ, cinco vezes até total remoção dos resíduos de hemiceluloses provenientes do procedimento anterior descrito acima. Após essa lavagem, o *pellet* foi submetido à secagem final nas mesmas condições descrita acima. Em seguida o *pellet* foi também submetido ao processo de hidrólise ácida, utilizando-se ácido sulfúrico 72% com o descrito por effland (1977) em detalhes no item 3.4.5. A determinação do conteúdo de glicose nessas amostras refere-se então ao conteúdo de celulose das mesmas.

3.5.4 Determinação do conteúdo de hemiceluloses e celulose nas amostras de caule

Para a determinação do conteúdo das hemiceluloses e celulose do tecido caulinar, coletaram-se amostras de (± 15 cm) do caule, que foi dividido em três partes de 5cm, denominadas de ápice, meio e base (Figura 8).

Figura 8 - Detalhes da amostragem do caule das plantas de tabaco, cultivadas em câmara de crescimento. (a) planta de tabaco antes da coleta, (b) planta de tabaco sem as folhas para coleta do caule

As amostras do ápice, meio e base do caule foram congeladas e posteriormente maceradas em cadinhos de porcelana e pistilo com N₂ líquido. Em seguida, procedeu-se a lavagem do material com etanol 80% a 60 °C por 40 minutos, seguida de centrifugação a 2350 g por 10 minutos. Este procedimento foi repetido por mais três vezes. O resíduo da parede celular resultante foi seco por liofilização, e utilizado nas determinações do conteúdo das hemiceluloses e celulose, realizadas de acordo com a mesma metodologia descrita acima para o tecido foliar.

3.6 Parâmetros do HPAE-PAD para análise dos carboidratos

3.6.1 Parâmetros utilizados para a quantificação dos monossacarídeos

O hidrolisado secundário e o sobrenadante resultante da centrifugação das amostras de caule e folhas das plantas de tabaco após o tratamento com TFA, foram utilizados para a quantificação do conteúdo de monossacarídeos via HPAE-PAD, de acordo com a metodologia de Fardim e Duran (1999).

As curvas de concentração para cada monossacarídeo foram construída com os referidos padrões: L-Arabinose, D-Galactose, D-Glicose, D-Xilose e D-Manose, todos da Sigma[®], utilizando-se a L-fucose como padrão interno. Essas determinações foram realizadas com o auxílio do equipamento ICS 2500, HPLC Dionex[®] equipado com DS50 gradiente; detector amperiométrico ED50 com eletrôdo de ouro e um amostrador automático AS50. O eluente de arraste utilizado foi H₂O milliQ e o eluente de limpeza foi de 200mM de NaOH, com fluxo de 0,25 mL.min⁻¹, pressão no sistema de aproximadamente 2500 psi. O eluente de pós-coluna utilizado foi 300 mM de NaOH com pressão de gás nitrogênio externo de 20 psi. As amostras foram injetadas com volume de 25 µL determinado pelo *loop*. A coluna utilizada foi a de troca aniônica Dionex[®] CarboPac PA10 (2 x 250 mm) com coluna-guarda CarboPac PA10 (2 x 50mm), e o detector amperométrico associado ao eletrôdo de ouro foi ajustado com os seguintes potenciais: +100mV (0 a 200ms), +100mV de integração (200 a 400ms), -2000mV (410 a 420ms), +600mV (430ms) e -100mV (440 a 500ms).

3.6.2 Parâmetros utilizados para quantificação dos ácidos urônicos

O mesmo hidrolisado secundário e o sobrenadante resultante da centrifugação das amostras de caule e folhas das plantas de tabaco após o tratamento com TFA, foram utilizados para a quantificação do conteúdo de ácidos urônicos via HPAE-PAD. Para a quantificação dos

ácidos urônicos, construiu-se uma curva de concentração para cada ácido urônico com os referidos padrões: ácido D-Glucurônico (Sigma®) e ácido D-Galacturônico (Fluka®). O mesmo equipamento descrito acima foi utilizado para essas determinações. Entretanto, para as separações dos ácidos urônicos o eluente de arraste foi uma mistura de 100mM de NaOH com 150mM de NaOAc, e o eluente de limpeza foi 200mM de NaOH com fluxo de 0,25 mL.min⁻¹, e uma pressão de aproximadamente 2500 psi. Nesse caso não se utilizou eluente de pós-coluna. As amostras foram injetadas com volumes de 25 µL determinado pelo *loop* e a coluna utilizada foi a de troca aniônica Dionex® CarboPac PA100 (2 x 250mm) com coluna-guarda CarboPac PA100 (2 x 50mm).

3.7 Análise das Fibras

3.7.1 Coleta do tecido xilemático das plantas de tabaco para obtenção das dimensões das fibras

As plantas cultivadas por 120 dias, em casa de vegetação (figura 9) foram utilizadas para a obtenção das dimensões das fibras, tais como comprimento, largura, diâmetro do lúmen, assim como para a determinação da espessura da parede.

Para o preparo das amostras, adotou-se o método de Flanklin (1937). Essa metodologia utiliza agentes químicos que removem a lamela média (região de união entre as células), mas mantêm a integridade das fibras, separando as fibras e os vasos. A lamela média é composta basicamente de lignina e pectinas, que funcionam como agente cimentante entre as células. As amostras de três plantas por genótipo foram coletadas de forma totalmente casualizadas, totalizando 21 plantas. Amostras de aproximadamente 2mm x 2mm x 30 mm de largura, espessura e comprimento, respectivamente, foram coletadas da parte basal do tecido xilemático e transferidas para tubos de ensaio contendo água destilada. Após a remoção da água, adicionou-se uma solução de ácido acético glacial e peróxido de hidrogênio (30 volumes) na proporção de 1:1 (v/v). As amostras foram mantidas a 60 °C por 48 horas. Em seguida, removeu-se a solução utilizada na maceração, e o material fibroso foi lavado três vezes com água destilada. O material resultante (fibras isoladas) foi utilizado para o preparo das lâminas e determinações das dimensões das fibras das plantas transgênicas relativas às amostras das plantas controles.

Figura 9 - Ilustração da coleta do material para a análise dos carboidratos em diferentes tecidos e mensurações das fibras: (a) plantas de tabaco cultivadas em casa de vegetação, (b) corte transversal do caule de tabaco com dupla coloração, verde para células lignificadas e vermelho para células ricas em celulose, (c) tecido xilemático, (d) fibras da região xilemática isoladas, (e) cromatograma de carboidratos da região do xilema do caule de tabaco, (f) cromatograma de carboidratos da região da medula do caule de tabaco

3.7.2 Preparo das lâminas do macerado de fibras

As lâminas para análise de microscopia foram preparados a partir do material contendo as fibras isoladas, previamente coradas com uma solução de safranina. Os resultados das mensurações das fibras foram obtidos com o auxílio de um microscópio óptico *Zeiss Axioskop* acoplado a uma ocular micrométrica. As imagens das fibras foram capturadas por uma câmera fotográfica digital *Media Cybernetics* modelo PLA662 acoplada a um microcomputador. As medidas do comprimento das fibras foram obtidas com um aumento de 25 vezes. Já as medidas de largura e espessura da parede, assim como o diâmetro do lúmen, foram obtidos com um aumento de 200 vezes. O comprimento das fibras representa o valor médio de um total de 225 fibras por genótipo. No caso das medidas de largura e espessura da parede, como também o

diâmetro do lúmen, os valores médios obtidos representam 135 fibras por genótipo. Todas as medidas foram obtidas com o auxílio do software *Image tool* versão 3.0[®].

Os valores de comprimento, largura da fibra, diâmetro do lúmen e espessura da parede obtidos, foram utilizados para o cálculo de alguns índices relacionados à qualidade das fibras importantes para o processo de fabricação do papel. Por exemplo, o índice de Runkel foi determinado pela razão entre duas vezes o valor da espessura da parede pelo diâmetro do lúmen. Já a fração parede das fibras das plantas de tabaco, foi determinada usando-se a fórmula $(2EP/L.100)$, onde (EP) representa a espessura da parede da fibra e (L) o diâmetro da fibra (PAULA; ALVEZ, 1997). E o coeficiente de flexibilidade das fibras, foi determinado pela fórmula $(100.d/L)$, onde (d) é o diâmetro do lúmen e (L), o diâmetro da fibra.

3.8 Análise Anatômica do caule de tabaco

Plantas de tabaco com 60 dias de idade, provenientes de câmaras de crescimento assim como as plantas com 90 e 120 dias de idade, cultivadas em casa de vegetação foram utilizadas para a obtenção dos cortes transversais de caule para as análises de microscopia. Os caules das plantas com 60 e 90 dias de idade foram cortados manualmente na orientação transversal na região basal, com o auxílio de lâminas de aço *inox (gillette)*. Já no caso dos caules de plantas com 120 dias, os cortes transversais e longitudinais, também na região basal, foram realizados com o auxílio de um micrótomo de deslize *Leica SM200R*, com espessuras entre 60 e 80 μm .

3.8.1 Coloração dos cortes transversais e longitudinais do caule de tabaco

Todos os cortes transversais e longitudinais das amostras de caule de plantas de tabaco, obtidas manualmente ou feitas com o auxílio do micrótomo, foram armazenados em água milliQ e posteriormente clarificados com uma solução de hipoclorito de sódio 20%, antes de serem coradas. O método de coloração utilizado foi o de contraste específico, com vermelho congo (*congo red*) e o verde iodo (*iodine green*) de acordo como descrito por Dop e Gautié (1928). Primeiro, as secções foram coradas com verde iodo 1% por 2 minutos. Este corante reage com a lignina presente no material, colorindo de verde escuro as células lignificadas. Em seguida, as secções foram lavadas com água milliQ por duas vezes, até completa remoção do excesso do verde iodo para poderem ser submetidas à coloração com o vermelho congo 1% por 30 segundos, que reage com a celulose presente no material, colorindo de vermelho as células ricas em

celulose. Após a coloração as secções foram novamente lavadas com água milliQ por duas vezes, até remoção do excesso de corante. As secções duplamente coradas foram posicionadas em lâminas para visualização em microscópio óptico provido de ocular micrométrica acoplado a uma câmera fotográfica digital para registro das imagens.

3.9 Delineamento experimental e análise estatística

Todos os experimentos foram conduzidos de forma inteiramente casualizadas para os 7 genótipos (tratamentos) ou seja, 5 linhagens transgênicas (2M, 42, 51, 55 e 79) e duas linhagens controles (WT e CG).

Todas as análises de composição química da parede celular foram realizadas em triplicata por parcela utilizando-se 5 plantas (parcela) de cada genótipo num total de 35 plantas analisadas. Já as amostras de caule utilizadas, tanto para os cortes histológicos, quanto para as determinações das medidas das fibras do xilema, foram coletadas 3 plantas (parcela) de cada genótipo, num total de 21 plantas analisadas.

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa *SAS* (2000) e o nível de significância estatística estabelecido como $p < 0,05$. O teste de Dunnett de comparação de médias foi o teste utilizado para as comparações do efeito da superexpressão do gene *ugdh* de soja na composição química da parede celular das plantas transgênicas relativo ao planta controle. A planta transgênica *gateway* (CG) foi utilizada como planta controle nas análises estatísticas, uma vez que não mostrou diferenças estatisticamente significativas com relação à planta selvagem (WT).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação fenotípica das plantas transgênicas

Todas as plantas transgênicas de tabaco que superexpressam o gene *ugdh* de soja desenvolveram-se normalmente, tanto em câmara de crescimento como em casa de vegetação, e não mostraram diferenças fenotípicas aparentes (Figura 10). Os parâmetros fenotípicos considerados foram diâmetro do caule, área foliar e altura. A exceção foi a planta 66 que apresentou um desenvolvimento muito restrito, com internódios curtos, caule inteiramente oco com pontos de oxidação na região da medula, foi desconsiderada nas análises químicas e histológicas, por não apresentar características desejáveis no desenvolvimento da parede secundária. Esse fenótipo pode ser decorrência do local de inserção do transgene de interesse, no genoma dessa planta.

Alguns trabalhos indicam que alterações na composição química da parede celular podem ocorrer sem que haja um comprometimento do desenvolvimento ou viabilidade das plantas transformadas. Reiter e colaboradores (1997) obtiveram plantas mutantes de *Arabidopsis* que apresentaram alterações da composição de polissacarídeos da parede celular, embora não tenham mostrado modificações fenotípicas ou fisiológicas no seu desenvolvimento em relação às plantas de *Arabidopsis* selvagem utilizadas como controle.

Figura 10 - Fenótipos das plantas transgênicas (2M, 42, 51, 55, 66 e 79) e controles (WT e CG)

*A planta 66 foi desconsiderada nas análises de composição química da parede celular, assim como nas análises histológicas

4.2 Composição química do caule

Os dados da Tabela 1 resumem os resultados obtidos da análise realizada com amostras de caule total (tecido xilemático e medula) e mostram que as plantas de tabaco transgênicas cultivadas em casa de vegetação apresentam um aumento do conteúdo de xilose, embora, estatisticamente significativa somente para a planta 2M em relação à planta controle (CG). Com relação ao conteúdo de glicose, houve uma redução para todas as linhagens, mas estatisticamente significativa só para a planta 55. Essas diferenças podem ser explicadas pelo fato do gene *ugdh* estar envolvido na regulação do fluxo metabólico dos carboidratos classificados como pentoses e hexoses, importantes na constituição da parede celular.

O conteúdo de lignina klason aumentou para todas as plantas transgênicas, sendo estatisticamente significativo somente para as linhagens 2M e 79. O aumento deste componente na composição química do caule também foi observado em plantas transgênicas de alfafa (*Medicago sativa*) que superexpressam o gene *ugdh* (SAMAC et al., 2004). Paralelamente, os cortes histológicos do caule das plantas transgênicas de tabaco, mostram uma extensão do tecido xilemático, correspondendo a uma grande proporção do caule total (Figuras 14, 15, 16 e 17). O alargamento do tecido xilemático, rico em lignina em relação à medula, que praticamente não contém lignina, corrobora o fato do aumento do conteúdo das ligninas klason e solúvel observado nas análises do caule total. O aumento da proporção do tecido xilemático poderia explicar também o aumento do conteúdo de xilose nas amostras de caule total das plantas transgênicas em relação às plantas controles.

Tabela 1 - Composição química da parede celular das amostras de caule total das linhagens de tabaco transgênicas (2M, 42, 51, 55 e 79) relativas ao controle (CG). Valores são médias expressas em mg/g de matéria seca

	CG	2M	42	51	55	79
LIGNINA KLASON	174,180	183,100 *	171,880	177,240	176,580	183,360 *
LIGNINA SOLÚVEL	20,800	21,380	22,160	22,180	21,520	21,700
ARABINOSE	6,042	5,922	6,330	5,476	5,586	5,756
GALACTOSE	14,293	13,856	14,249	14,376	14,303	13,293
GLICOSE	413,132	421,071	413,913	407,333	404,326 *	405,150
XILOSE	179,751	189,082 *	179,705	175,669	184,756	182,386
MANOSE	12,803	12,990	13,043	13,638	13,659	13,071

* Diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5 % pelo teste de *Dunnnett*

4.3 Composição química do tecido xilemático

Do ponto de vista tecnológico, a composição química da parede celular do tecido xilemático é a que pode fornecer informações com respeito à qualidade do material vegetal para a produção de celulose e papel, pois é nesta região que se encontram as fibras responsáveis pela qualidade da celulose e papel produzidos no processo de fabricação. A Tabela 2 mostra os dados da composição química do tecido xilemático. Observa-se que houve um pequeno acréscimo, embora não significativo no conteúdo de xilose para todas as plantas transgênicas. Kärkönen et al. (2005) mostrou que em plantas de milho mutantes com baixa atividade da enzima UGDH ocorreu o inverso, ou seja, o conteúdo de xilose diminuiu.

O conteúdo de lignina klason reduziu em todas as plantas transgênicas, embora seja estatisticamente significativo somente para a planta 2M. Estas alterações já foram mostradas em outros trabalhos, que postularam, que há uma relação inversa do conteúdo de lignina e xilose em várias espécies vegetais, como o tabaco (CHABANNES et al., 2001), abeto (LAWOKO et al., 2005) e álamo (DAVISON et al., 2006).

O conteúdo de arabinose do tecido xilemático é significativamente maior em três linhagens transgênicas (42, 55 e 79). Esse aumento de arabinose parece ser reflexo do

deslocamento da rota metabólica para o acúmulo de xilose, uma vez que este monossacarídeo é o precursor para a síntese de arabinose.

A razão entre o conteúdo de hexoses e pentoses reduziu para todas as linhagens transgênicas em relação ao controle (CG), sendo significativo para as plantas (42, 51 e 79). Estes valores confirmam que a superexpressão do gene *ugdH* alterou o fluxo de açúcares para a síntese das pentoses (xilose e arabinose) e ácidos urônicos (ácido galacturônico e ácido glucurônico), em relação à síntese de hexoses (galactose, glicose e manose).

Tabela 2 - Composição química da parede celular das amostras de tecido xilemático dos caules das linhagens de tabaco transgênicas (2M, 42, 51, 55 e 79) relativas ao controle (CG). Valores são médias expressas em mg/g de matéria seca

	CG	2M	42	51	55	79
LIGNINA KLASON	179,678	169,997 *	174,711	176,144	176,133	175,656
LIGNINA SOLÚVEL	36,811	37,267	37,411	36,311	36,466	36,989
ARABINOSE	1,727	1,832	2,019 *	2,042 *	2,026 *	1,962 *
GALACTOSE	5,639	5,432	5,276	6,624 *	5,723	5,275
GLICOSE	409,757	405,548	399,865	400,340	405,509	404,050
XILOSE	172,242	173,548	176,434	175,902	173,130	176,849
MANOSE	21,110	20,333	19,181 *	19,940	19,414	20,652
ÁCIDO GALACTURÔNICO	6,586	5,661	5,360 *	6,069	5,859	5,903
ÁCIDO GLUCURÔNICO	0,769	0,708	0,762	0,815	0,770	0,876
HEXOSES/ PENTOSES	2,408	2,374	2,299 *	2,310 *	2,370	2,317 *

* Diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5 % pelo teste de *Dunnnett*

4.4 Composição química do tecido medular

A região da medula é um tecido caulinar formado basicamente de células de parênquima, constituído de hemiceluloses, celulose e pectinas.

A figura 11 mostra o conteúdo dos principais constituintes da parede celular do tecido medular das plantas transgênicas em relação ao controle (CG). O conteúdo de pectina que resulta da somatória do conteúdo de ácido galacturônico, galactose e arabinose, aumentou em todas as plantas transgênicas em relação ao controle (CG). Embora não seja estatisticamente significativo, mostra uma tendência de aumento como efeito da superexpressão do gene *ugdh*.

Figura 11 - Composição química dos principais componentes da parede celular da região da medula das amostras do caule das plantas de tabaco transgênicas (2M, 42, 51, 55 e 79) relativa ao controle (CG): (A) arabinose, (B) galactose, (C) glicose, (D) xilose, (E) pectina, (F) ácidos urônicos totais, valores expressos em mg/g peso seco

* Diferenças estatisticamente significativamente ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de *Dunnnett*

4.5 Mensurações das fibras

As características anatômicas das fibras de madeira de espécies arbóreas estão relacionadas às propriedades da polpa celulósica e conseqüentemente à qualidade do papel produzido (GOMIDE et al., 2005).

As fibras de espécies arbóreas, como por exemplo, as encontradas no tecido xilemático de eucalipto têm valores médios de comprimento e espessura de parede muito próximos aos encontrados para as plantas de tabaco analisadas.

As plantas transgênicas apresentaram uma redução significativa do comprimento da fibra de aproximadamente 10% para todos os genótipos (Tabela 3). Essa diminuição é muito interessante, uma vez que no processo de fabricação do papel, fibras mais curtas melhoram a textura do papel. Enquanto as fibras mais longas favorecem a resistência ao rasgo. As fibras mais curtas produzem um papel com distribuição mais homogênea dos poros, o que facilita a absorção de tinta, e conseqüentemente melhora a qualidade de impressão.

Todos os genótipos transgênicos apresentaram um aumento da largura das fibras (Tabela 3), embora esse aumento não seja estatisticamente significativo. A largura da fibra é uma característica anatômica tão importante quanto o comprimento, uma vez que fibras mais largas conferem ao papel menor resistência ao ar, maior volume específico aparente, resultando em uma maior resistência ao rasgo.

O índice de Runkel mostra a interação entre duas características importantes das fibras, o diâmetro do lúmen e espessura da parede celular. Quanto ao valor desse índice, observamos que todas as plantas transgênicas apresentaram um valor baixo desse índice, mas estatisticamente significativo somente para a planta 2M. Esse índice determina a qualidade da polpa. Assim, fibras de madeira com índice de Runkel baixo produzem polpa celulósica considerada de boa qualidade para a produção de papel (RUNKEL, 1952).

Outro parâmetro analisado foi a fração parede, que também reduziu para todas as linhagens transgênicas em relação ao controle, embora apenas estatisticamente significativo nas plantas 2M e 79. Esse índice reflete o grau de flexibilidade das fibras. Quanto menor, maior a flexibilidade da mesma e melhor a qualidade do papel. Paralelamente a esse parâmetro, avaliou-se também o coeficiente de flexibilidade das fibras, e pela Tabela 3, observamos que houve um aumento desse coeficiente para todas as plantas transgênicas, em relação ao controle, embora também significativo somente para o caso das plantas 2M e 79. O aumento deste parâmetro é muito vantajoso para melhorar a qualidade da polpa celulósica. Fibras altamente flexíveis melhoram a interação inter-fibrilar. Na prática, este parâmetro indica o grau de achatamento (colapso) que as fibras sofrem durante o processo de polpação (FOLKEL; BARRICHELO,

1975b). O coeficiente de flexibilidade também está diretamente relacionado à resistência à tração e ao arrebentamento (GONÇALVEZ et al., 1986).

Tabela 3 - Características das fibras da região do tecido xilemático dos caules das linhagens de tabaco transgênicas (2M, 42, 51, 55 e 79) e controle (CG) e parâmetros para análise da qualidade da fibra.

	Comprimento (μm)	Largura da fibra (μm)	Diâmetro do lúmen (μm)	Espessura da parede (μm)	Índice de Runkel	Fração parede (%)	Coeficiente de flexibilidade (%)
CG	953	30,71	20,76	4,97	0,48	32,41	67,58
2M	871 *	31,77	22,58	4,59 *	0,40*	28,98 *	71,01 *
42	860 *	31,78	21,94	4,92	0,44	30,97	69,05
51	855 *	31,48	21,52	4,98	0,46	31,64	68,36
55	868 *	32,52	22,65	4,88	0,43	30,04	69,65
79	855 *	32,6	22,85	4,87	0,42	29,89 *	70,11 *

* Diferenças estatisticamente significativamente ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de *Dunnnett*

4.6 Análise química dos componentes da parede celular primária de tecido foliar

Os resultados da Figura 12 (A e B) mostram uma queda do conteúdo significativo de celulose para todas as plantas transgênicas em relação à planta controle. Paralelamente, algumas plantas mostraram reduções significativas no conteúdo de monossacarídeos hemicelulósicos. Em vista disso, a superexpressão do gene *ugdh* nas plantas de tabaco transgênicas pode ter interferido no “pool” de UDP-glucuronato, precursor primário para a síntese de ácido glucurônico. Em todas as linhagens transgênicas observou-se que o conteúdo de ácido glucurônico reduziu significativamente. A redução deste metabólito pode ter alterado assim o conteúdo de celuloses e hemiceluloses nas plantas transgênicas. A importância do ácido glucurônico para a biossíntese e construção da parede celular é tão crucial que em folhas de *Arabidopsis*, aproximadamente 50% da massa da parede celular primária é produzida através dos derivados de UDP-glucuronato (SEITZ et al., 2000).

Figura 12 - Conteúdo de carboidratos da parede celular primária de tecido foliar das plantas transgênicas (2M, 42, 51, 55 e 79) e controle (CG). Valores expressos em mg/g de peso seco

* Diferenças estatisticamente ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de *Dunnett*

4.7 Análise das diferentes partes do caule de tabaco

A Figura 13 (A, B, C e D) resume os dados do conteúdo de carboidratos em diferentes regiões do caule das plantas transgênicas relativas ao controle. Pode-se observar que há um gradiente crescente no conteúdo de xilose e celulose, na direção do ápice para a base. Esse gradiente de concentração se deve ao fato de que na base do caule, há maior quantidade de células fibrilares ricas em celulose e xilose quando comparadas às células parenquimatosas localizadas preferencialmente no meio e no ápice do caule. Já o conteúdo de ácido galacturônico e pectinas apresentaram redução do ápice para a base. Isso ocorre devido à formação do tecido xilemático, sendo mais pronunciado na base do caule das plantas de tabaco. O conteúdo de pectinas e ácido galacturônico aumentou ligeiramente nas linhagens transgênicas em relação à planta controle.

Figura 13 - Conteúdo de carboidratos em diferentes secções (ápice, meio, base), do caule de plantas transgênicas (2M, 42, 51, 55, 79) e controle (CG); (A)-conteúdo de xilose, (B)-conteúdo de celulose, (C)-conteúdo de ácido galacturônico, (D)- conteúdo de pectina. Valores são médias expressas em mg/g peso seco

4.8 Análise histológica do caule

Pelo contraste específico dos cortes transversais e longitudinais dos caules das plantas de tabaco transgênicas e controle, que colore de vermelho células ricas em celulose (medula e parênquima cortical), e de verde as células ricas em lignina (tecido xilemático). Na figura 14 pode-se observar que a formação do anel xilemático e o processo de lignificação estão adiantados nas linhagens transgênicas em relação ao controle. As Figuras 15, 16 e 17 mostram que as plantas transgênicas apresentaram um aumento significativo do tecido xilemático em relação ao controle.

Estas alterações do tecido xilemático podem ser decorrência de modificações hormonais. Sabe-se que os hormônios controlam diretamente o processo de xilogênese. Em alguns casos alta concentração de citocinina pode inibir a produção de xilema (FOSKET; ROBERTS, 1964; ROBERTS et al., 1988).

Figura 14 - Cortes transversais do caule das plantas de tabaco transgênicas e controle duplamente coradas com verde iodo (lignina) e vermelho congo (celulose), plantas com 60 dias de idade cultivadas em câmara de crescimento: (a) planta CG, (b) planta 2M, (c) planta 42, (d) planta 51, (e) planta 55, (f) planta 79, barra =200 μ m

Figura 15 - Cortes transversais do caule das plantas de tabaco transgênicas e controle duplamente coradas com verde iodo (lignina) e vermelho congo (celulose), plantas com 90 dias de idade cultivadas em casa de vegetação: (a) planta CG, (b) planta 2M, (c) planta 42, (d) planta 51, (e) planta 55, (f) planta 79, barra =2mm

Figura 16 - Cortes transversais do caule das plantas de tabaco transgênicas e controle duplamente coradas com verde iodo (lignina) e vermelho congo (celulose), plantas com 120 dias de idade cultivadas em casa de vegetação: (a) planta CG, (b) planta 2M, (c) planta 42, (d) planta 51, (e) planta 55, (f) planta 79, barra = 2mm

Figura 17 - Cortes longitudinais do caule das plantas de tabaco transgênicas e controles duplamente coradas com verde iodo (lignina) e vermelho congo (celulose), plantas com 120 dias de idade cultivadas em casa de vegetação: (a) planta CG, (b) planta 2M, (c) planta 42, (d) planta 51, (e) planta 55, (f) planta 79, barra=1mm

5 CONCLUSÕES

- A análise da composição química do tecido xilemático mostrou que as plantas transgênicas apresentaram um acréscimo no conteúdo de xilose e uma redução no conteúdo de lignina klason.
- A relação entre hexoses/pentoses na parede celular foi menor nas plantas transgênicas, demonstrando alterações na síntese de polissacarídeos da parede celular.
- Em todas as linhagens transgênicas houve uma redução significativa do comprimento da fibra do tecido xilemático.
- Na fase inicial de desenvolvimento do caule, as plantas transgênicas apresentaram uma formação do anel xilemático mais adiantada em relação ao controle.
- As plantas transgênicas adultas apresentaram maior proporção do tecido xilemático em relação ao tecido medular quando comparadas à planta controle.

REFERÊNCIAS

- ANTEROLA, A.M.; LEWIS, N.G. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. **Phytochemistry**, Oxford, v. 61, p. 221-294, 2002.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA TÉCNICA DE CELULOSE E PAPEL. **Normas técnicas**. São Paulo, 1974. 1v.
- AWANO, T.; TAKABE, K.; FUJITA, M. Xylan and lignin deposition on the secondary wall of *fagus crenata* fibers. In: MOROHOSHI, N.; KOMAMINE, A. (Ed.). **Molecular breeding of woody plants**. Arnstadt: Elsevier Science, 2001. p. 137-142.
- BACIC, A.; HARRIS, P.J.; STONE, B.A. Structure and function of plant cell walls. In: PRIESS, J. (Ed.). **The biochemistry of plants**. New York: Academic Press, 1988. p. 297-371.
- BAMBER, R.K. The wood anatomy of eucalyptus and paper making. **Appita Journal**, Carlton, v. 38, n. 3, p. 210-216, 1985.
- BAR-PELET, M.; GRIFFITH, C.L; DOERING, T.L. Functional cloning and characterization of a UDP-glucuronic acid decarboxylase: the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* elucidates UDP-xylose synthesis. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, New York, v. 21, p. 12003-12008, 2001.
- BARRICHELO, L.E.G.; BRITO, J.O. **A madeira das espécies de eucalipto como matéria prima para a indústria de celulose e papel**. Brasília; PRODEPEF, 1976. 145 p. (Série de Divulgação, 13).
- BARZYC, D.; PAGE, D.H.; RAGAUSKAS, A. Carboxylic acid groups and fibre bonding. In: FUNDAMENTAL RESEARCH SYMPOSIUM, 11., 1997, Cambridge: [s.n.], 1997. p. 839-907.
- BINDSCHEDLER, L.V.; WHEATLEY, E.; GAYE, E.; COLE, J.; COTTAGE, A.; BOLWELL, G.P. Characterisation and expression of the pathway from UDP-glucose to UDP-xylose in differentiating tobacco tissue. **Plant Molecular Biology**, The Hague, v. 57, p. 285-301, 2005.
- BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, p. 519-546, 2003.
- BOLWELL, P.G. Dynamic aspects of the plant extracellular matrix. **International Review of Cytology**, New York, v. 146, p. 261-324, 1993.
- BOLWELL, P.G. Biosynthesis of Plant Cell Wall Polysaccharides. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, Ibaraki-ken, v.12, n. 65, p. 143-160, 2000.

BORCHARDT, L.G.; PIPER, C.V. Gás-chromatographic method for carbohydrates as aditol-acetates. **Tappi Journal**, Atlanta, v. 53, n. 2, p. 257-260, 1970.

BOUDET, A.M. A new view of lignification. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 3, p. 67-71, 1998.

BOUDET, A.M. Lignins and lignification: selected issues. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 38, n. 1/2, p. 81-96, 2000.

BOUDET, A.M. Towards an understanding of the supramolecular organization of the lignified wall. In: ROSE, J. (Ed.). **In the plant cell wall**. Oxford: Blackwell, 2003. p. 155-182.

BRAATEN, K.R.; MOLTEBERG, D.A. Mathematical method for determination fiber wall thickness and fiber width. **Tappi Journal**, Atlanta, v. 3, n. 2, p. 9-12, 2004.

BRETT, C.; WALDRON, K.W. **Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls**. Hyman, London: Unwin, p. 75-111, 1990.

BROWN, R.M.J. The biosynthesis of cellulose. **Journal of Macromolecular Science-Pure and Applied Chemistry**, London, v. 33, p. 1345-1373, 1996.

BURGER, L.M.; RICHTER, H.G. **Anatomia da madeira**. São Paulo: Nobel, 1991. 154 p.

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**, New York, v. 47, p. 1-5, 2001.

CARPITA, N.C.; GIBEAUT, D.M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **The Plant Journal**, Oxford, v. 3, p.1-30, 1993.

CARVALHO, H.G.; OLIVEIRA, R.C.; GOMIDE, J.L.; COLODETTE, J.L. Efeito da idade de corte da madeira e de variáveis de refino nas propriedades da celulose Kraft branqueada de eucalipto. In: CONGRESSO ANUAL DE CELULOSE E PAPEL DA ABTCP, 31., 1998, São Paulo. **Anais ...** São Paulo: ABTCP, 1998. p. 367-381.

CHABANNES, M.; BARAKATE, A.; LAPIERRE, C.; MARITA, J.M.; RALPH, J.; PEAN, M.; DANOUN, S.; HALPIN, C.; GRIMA-PETTERNATI, J.; BOUDET, A.M. Strong decrease in lignin content without significant alteration of plant development is induced by simultaneous down-regulation of cinnamoyl CoA reductase (CCR) and cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) in tobacco plants. **The Plant Journal**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 257-270, 2001.

CHAPPLE, C.; VOGT, T.; ELLIS, B.; SOMERVILLE, C. An Arabidopsis mutant defective in the phenylpropanoid pathway. **The Plant Cell**, Rockville, v. 4, p. 1413-1424, 1992.

CLARKE, J.H.; RIXON, J.E.; CIRUELA, A.; GILBERT, H.J.; HAZLEWOOD, G.P. Family-10 and Family-11 xylanases differ in their capacity to enhance the bleach ability of hardwood and softwood paper pulps. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 48, p. 177-183, 1997.

COSTA, M.M.; MOUNTEER, A.H.; COLODETTE, J.L. Ácidos hexenurônicos. Part I: origem, quantificação, reatividade e comportamento durante a polpação kraft. **O Papel**, São Paulo, v. 62, n. 5, p.75-85, 2001.

COUGHLAN, M.P.; HAZLEWOOD, G.P. Beta-1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, San Diego, v. 17, p. 259-289, 1993.

DALESSANDRO, G.; NORTHCOTE, D.H. Possible control site of polysaccharide synthesis during cell growth and wall expansion of pea seedlings (*Pisum sativum* L.). **Planta**, Berlin, v. 134, p. 39-44, 1977a.

DALESSANDRO, G.; NORTHCOTE, D.H. Changes in enzymic activities of nucleoside diphosphate sugar interconversions during differentiation of cambium to xylem in sycamore and poplar. **The Biochemical Journal**, London, v. 162, p. 267-279, 1977b.

DAVIES, M.D.; DICKINSON, D.B. Properties of uridine diphosphoglucose dehydrogenase from pollen of *Lilium longiflorum*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 152, p. 53-61, 1972.

DAVISON, B.H.; DRESCHER, S.R.; TUSKAN, G.A.; DAVIS, M.F.; NGHIEM, N.P. Variation of S/G ration and lignin content in a *Populus* family influences the release of xylose by dilute acid hydrolysis. **Applied biochemistry and biotechnology**, Clifton, 129-132: p. 427-35, 2006.

DELMER, D.P. Cellulose biosynthesis: Exciting times for a difficult field of study. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. Palo Alto, v. 50, p. 245-276, 1999.

DHUGGA, K.S. Building the wall: genes and enzyme complexes for polysaccharide synthases. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, p. 488-493, 2001.

DINWOODIE, J.M. The relationship between fiber morphology and paper properties: A review of literature. **Tappi Journal**, Atlanta, v. 48, n.8, p. 440-447, 1965.

DIONEX CORPORATION. Analysis of carbohydrates by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAE-PAD). **Dionex Technical Note**, Sunnyvale, v. 20, p. 1-12, 1993.

DOBLIN, M.S.; VERGARA, C.E.; READ, S.; NEWBIGIN, E.; BACIC, A. Plant cell wall biosynthesis: making the bricks. In: ROSE, J.K.C. (Ed.). **The plant cell wall**. Oxford: Blackwell, chap. 6, p. 183-222, 2003.

DOP, P.; GAUTIÉ, A. **Manuel de technique botanique**. 2.ed. Paris: Lamarre, 1928. 594 p.

EBRINGEROVA, A.; HEINZE, T. Xylan and xylan derivatives – biopolymers with valuable properties, naturally occurring xylan structures, isolation procedures and properties. **Macromolecular Rapid Communications**, Weinheim, v. 21, p. 542-556, 2000.

EFFLAND, M.J. Modified procedure to determine acid-insoluble lignin in wood and pulp. Atlanta, v. 6, n. 10, p. 143-144, 1977.

EMONS, A.M.C.; MULDER, M. How the deposition of cellulose microfibrils builds cell wall architecture. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 5, p. 35-40, 2000.

EMONS, A.M.C.; SCHEL, J.H.N.; MULDER, M. The geometrical model for microfibril deposition and the influence of the cell wall matrix. **Plant Biology**, New York, v. 4, p. 22-26, 2002.

ENGLEHARDT, J. Sources, industrial derivatives, and commercial applications of cellulose. **Carbohydrates Europea**, Amsterdam, v. 12, p. 5-14, 1995.

FARDIM, P.; DURÁN, N. Wood and pulp carbohydrate analysis using HPLC and eletrochemical detection. **Chemistry Preprint Archive**, Zurich, v. 7, p. 158-163, 2001

FEINGOLD, D.S. Aldo (and keto) hexoses and uronic acids. In: LOEWUS, F.A.; TANNER, W. (Ed.). **Carbohydrates I: intracellular carbohydrates**. Heidelberg: Springer.1982. p. 3-76. (Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, v. 13A).

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin; New York: Walter de Gruyter, 1984. 613 p.

FERGUS, B.J.; GORING, D.A.I. The location of guaiacil and syringyl lignins in birch xylem tissue. **Holzforschung**, Berlin, v. 24, p. 113-117, 1970.

FOELKEL, C.E.B.; BARRICHELO, L.E.G. Avaliação das madeiras para a produção de celulose através de suas características estruturais: uma referência para o gênero *Eucalyptus*. Seminário de Integração Floresta-Indústria, Piracicaba, **IPEF**, Piracicaba, v. 9, p. 5-33, 1975a.

FOELKEL, C.E.B.; BARRICHELO, L.E.G. Estudo comparativo das madeiras de *Eucalyptus spp.*, para a produção de celulose sulfato. **IPEF**, Piracicaba, n. 10, p. 17-37, 1975b.

FOSKET, D.E. Characteristics of plants cells that are important in development. In: **Plant growth and development**, San Diego, p. 258-261, 1994.

FOSKET, D.E.; ROBERTS, L.W. Induction of wound-xylem differentiation in isolated Coles stem segments in vitro. **Americam Journal of Botany**, New York, v. 51, p. 19-25, 1964.

FREUDENBERG, K. The constitution and biosynthesis of lignin. In: FREUDENBERG, K.; NEISH, A.C. (Ed.). **Constitution and biosynthesis of lignin**. New York: Springer-Verlag, 1968. p. 45-122.

FRY, S.C. **The growing plant cell wall**: chemical and metabolic analysis. London: Longman Scientific and Technical, 1988. 246 p.

FRY, S.C. The structure and functions of xyloglucan. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 40, p.1-11, 1989.

GAINEY, P.A.; PHELPS, C.F. Interaction of uridine diphosphate glucose dehydrogenase with the inhibitor uridine diphosphate xylose. **Biochemistry Journal**, London, v. 145, p. 129-134, 1975.

GIBEAUT, D.M. Nucleotide sugar and glycosyltransferases for synthesis of cell wall matrix polysaccharides. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 38, p. 69-80, 2000.

GIBEAUT, D.M.; CARPITA, N.C. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, Bethesda, v. 8, p. 904-915, 1994.

GOMIDE, J.L.; COLODETTE, J.L.; OLIVEIRA, C.R.; SILVA, C.M. Caracterização tecnológica, para produção de celulose, da nova geração de clones de *Eucalyptus* do Brasil. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 1, p. 129-137, 2005.

GONÇALVES, J.C.; GOMIDE, J.L.; VITAL, B.R. Estudos tecnológicos da madeira de brotações de *Eucalyptus grandis* para a produção de celulose Kraft. **Revista Árvore**, Curitiba, v. 10, n.1, p. 1-15, 1986.

GONZALEZ, E.R.; DE ANDRADE, A.; BERTOLO, A.L.; LACERDA, G.C.; CARNEIRO, R.T.; DEFAVARI, V.A.P.; LABATE, M.T.V.; LABATE, C.A. Production of transgenic *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* using the sonication-assisted Agrobacterium transformation (SAAT) system. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 29, n.1, p. 97-102, 2002.

GRIMA-PETTENATI, J.; GOFFNER, D. Lignin genetic engineering revisited. **Plant Science: an International Journal of Experimental Plant Biology**, Shannon, v. 145, p. 51-65, 1999.

GRUPPEN, H.; HOFFMAN, R.A.; KORMELINK, F.J.M.; VORAGEN, A.G.J.; KAMERLING, J.P.; Vliegenthart, J.F.G. Characterization by ¹H NMR spectroscopy of enzymatically derived oligosaccharides from alkali-extractable wheat-flour arabinoxylan. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 233, p. 45-64, 1992.

HARPER, A.D.; BAR-PELED, M. Biosynthesis of UDP-Xylose. Cloning and characterization of a novel *Arabidopsis* gene family, *UXS*, encoding soluble and putative membrane-bound UDP-Glucuronic acid decarboxylase isoforms. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 130, p. 2188-2198, 2002.

- HATFIELD, R.D.; RALPH, J.; GRABBER, J.H. Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 79, p. 403-407, 1999.
- HAYASHI, T. Xyloglucans in the primary-cell wall. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 40, p. 139-168, 1989.
- HAYASHI, T.; MACLACHLAN, G. Pea xyloglucan and cellulose: I. Macromolecular organization. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 75, n. 3, p. 596-604, 1984.
- HAYASHI, T.; MARSDEN, M.; DELMER, D. P. Pea xyloglucan and cellulose. V. Xyloglucan-cellulose interaction *in vitro* and *in vivo*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 83, p. 384-389, 1987.
- HEPWORTH, D.G.; VINCENT, J.F.V. The mechanical properties of xylem tissue from tobacco plants (*Nicotiana tabacum* "Samsun"). **Annals of Botany**, Denver, v. 81, p. 751-759, 1998.
- HINTERBERG, B.; KLOS, C.; TENHAKEN, R. Recombinant UDP-glucose dehydrogenase from soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, p. 1011-1017, 2002.
- HOOD, E.E.; HELMER, G.L.; FRALEY, R.T.; CHILTON, M.D. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 168, n. 3, p. 1291-1301, 1986.
- HOPKINS, W.G. **Introduction to plant physiology**. New Yor: John Willey, 1995. 464 p.
- HWANG, R.H.; KENNEDY, J.F.; MELO, E.H.M.; WHITE, C.A. A probable lignin structure by conformational analysis. **Carbohydrates Polymers**, v. 10, p. 15-30, 1989.
- INSTITUO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS. **Celulose e papel**. 2.ed. São Paulo, 1998. v. 2: Tecnologia de fabricação da pasta celulósica, 402 p.
- JARVIS M.C. The proportion of calcium-bound pectin in plant cell walls. **Planta**, Berlin, v. 154, p. 344-346, 1982.
- JARVIS M.C.; HALL, M.A.; THRELFALL, D.R.; FRIEND, J. The polysaccharide structure of potato cell walls: chemical fractionation. **Planta**, Berlin, v. 152, p. 93-100, 1981.
- JIANG, Z.; LIEROP, B.V.; BERRY, R. Hexenuronic acid groups in pulping and bleaching chemistry. **Tappi Journal**, Atlanta, v. 83, n. 1, p. 167-175, 2000.
- JOHANSSON, H.; STERKY, F.; AMINI, B.; LUNDERBERG, J.; KLECZKOWSKI, L.A. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding poplar UDP-glucose dehydrogenase, a key gene of hemicellulose/pectin formation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1576, p. 53-58, 2002.

KARIMI, M.; INZÉ, D.; DEPICKER, A. Gateway vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 7, n. 5, p. 193-195, 2002.

KÄRKÖNEN, A. Biosynthesis of UDP-GlcA: via UDPGDH or myo-inositol oxidation pathway?. **Plant Biosystems**, Bologna, v. 139, p. 46-49, 2005.

KÄRKÖNEN, A.; MURIGNEUX, A.; MARTINANT, J.P.; PEPEY, E.; TATOUT, C.; DUDLEY, B.J.; FRY, S.C. UDP-glucose dehydrogenases of maize: a role in cell wall pentoses biosynthesis. **Biochemistry Journal**, London, v. 391, p. 409-415, 2005.

KEEGSTRA, K.; RAIKHEL, N. Plant glycosyltransferases. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, p. 219-224, 2001.

KIMURA, S.; LAOSINCHAI, W.; ITOH, T.; CUI, X.; LINDER, C.R.; BROWN, R.M.J. Immunogold labelling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant *Vigna angularis*. **The Plant Cell**, Rockville, v.11, p. 2075-2085, 1999.

KLECZKOWSKI, L.A. Glucose activation and metabolism through UDP-glucose pyrophosphorylase in plants. **Phytochemistry**, Oxford, v. 37, p. 1507-1515, 1994.

KRETSCHMANN, D. Velcro mechanisms in wood. **Natural Materials**, Madison, v. 2, p. 775-776, 2003.

LAINE, J.; HYNYNEN, R. The effect of surface chemical composition and charge on the fiber and paper properties of unbleached Kraft pulps. In: FUNDAMENTAL RESEARCH SYMPOSIUM, 11., 1997, Cambridge. **Proceedings of the Fundamentals of Papermaking Materials**, Leatherhead, 1997. p. 859-891.

LAWOKO, M.; HENRIKSSON, G.; GELLERSTEDT, G. Structural differences between the lignin-carbohydrate complexes presents in wood and chemical pulps. **Biomacromolecules**, Washington, DC, v. 6, p. 3467-3473, 2005.

LEE, Y.C. High-performance anion-exchange chromatography for carbohydrate analysis. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 189, p. 151-16, 1990.

LEVLIN, J.E.; SÖDERHJELM, L. **Pulp and paper testing**. Atlanta: Tappi Press, 1999. 288 p. (Papermaking Science and Technology Series, 17).

LOEWUS, F.A.; LOEWUS, M.W. *Myo*-inositol: its biosynthesis and metabolism. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 34, p. 137-161, 1983.

LOEWUS, F.A.; MURTHY, P.P.N. *myo*-Inositol metabolism in plants. **Plant Science: an International Journal of Experimental Plant Biology**, Shannon, v. 150, p. 1-19, 2000.
MACCANN, M.C.; ROBERTS, K. Architecture of the primary cell wall. In: LLOYD, C.W. (Ed.). **The cytoskeletal basis of plant growth and form**. San Diego: Academic Press, 1991. p. 109-129.

MACNEIL, M.; DARVILL, A.G.; FRY, S.C. ALBERSHEIM, P. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 53, p. 625-663, 1984.

MELLEROWICZ, E.; BAUCHER, M.; SUNDBERG, B.; BOERJAN, W. Unravelling cell wall formation in the woody dicot stem. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 47, p. 239-274, 2001.

MOORE, P.J.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P.; STAEHELIN, A.L. Immunogold localization of xyloglucan and rhamnogalacturonan I in the cell walls of suspension-cultured sycamore cells. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 82, p. 787-794, 1986.

NELSETUEN, G.L.; KIRKWOOD, S. The mechanism of action of uridine diphosphoglucose dehydrogenase. **Journal of Biological Chemistry**, Tokyo, v. 246, p. 3828-3834, 1971.

NORTHCOTE, D.H. Chemistry of the plant cell wall. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 23, p. 113-132, 1972.

O'NEILL, M.A.; YORK, W.S. The composition and structure of plant primary cell walls. In: ROSE, J.K.C. (Ed.). **The plant cell wall**. Oxford: Blackwell, 2003. p. 1-54.

O'NEILL, M.A.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. The pectic polysaccharides of primary cell walls. In: DEY, P.M. (Ed.). **Methods in plants biochemistry**. London: Academic Press, 1990. v. 2, p. 415-441.

ONYSKO, K.A. Biological bleaching of chemical pulps: a review. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 11, p. 179-198, 1993.

PAULA, J.E.; ALVES, J.L.H. **Madeiras nativas: anatomia, dendrologia, dendrometria, produção e uso**. Brasília: Fundação Mokiti Okada, 1997. 543 p.

PAULA, J.E. Caracterização anatômica de madeiras nativas do cerrado com vistas à produção de energia. **Cerne**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 26-40, 1999.

PERRIN, R.; WILKERSON, C.; KEEGSTRA, K. Golgi enzymes that synthesize plant cell wall polysaccharides: finding and evaluating candidates in the genomic area. **Plant Molecular Biology**, The Hague, v. 47, p. 115-130, 2001.

PLOMION, C.; LEPROVOST, G.; STOKES, A. Wood formation in trees. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 127, p. 1513-1523, 2001.

RAPPE, C.; ANDERSSON, R.; BERGQVIST, P.A.; BROHEDE, C.; HANSSON, M.; KJELLER, L.O.; LINDSTROEM, G.; MARKLUND, S.; NYGREN, M. Overview on envirometal fate of chlorinated dioxins and dibenzofuran, souces, levels and isomeric pattern in various matrices. **Chemosphere**, Fukuoka, v. 16, p. 1603-1618, 1987.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biology of plants**. New York: Worth Publ., 2001. 791 p.

REITER, W.D. Biosynthesis and properties of the plant cell wall. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, p. 536-542, 2002.

REITER, W.D.; VANZIN, G.F. Molecular genetics of nucleotide sugar interconversion pathways in plants. **Plant Molecular Biology**, New York, v. 47, n.1/2, p. 95-113, 2001.

REITER, W.D.; CHAPPLE, C.; SOMERVILLE, C.R. Mutants of *Arabidopsis thaliana* with altered cell wall polysaccharide composition. **The Plant Journal**, Oxford, v. 12, n. 2, p.335-345, 1997.

ROBERTS, L.W.; GAHAN, P.B.; ALONE, R. **Vascular differentiation and plant growth regulators**. Berlin; Heidelberg; New York: Springer, 1988. 154 p.

ROBERTS, R.M.; LOEWUS, F. The conversion of D-glucose-6 [^{14}C] to cell wall polysaccharide material in *Zea mays* in the presence of high endogenous level of myo-inositol. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 52, n.6, p. 646-650, 1973.

ROCKLIN, R.D.; POHL, C.A. Determination of carbohydrates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. **Journal of Liquid Chromatography**, New York, v.6, p. 1577-1590, 1983.

ROLAND, J.C.; REIS, D.; VIAN, B. Liquid crystal order and turbulence in the planar twist of the growing plant cell walls. **Tissue and Cell**, Siena, v. 24, n. 3, p. 335-345, 1992.

RUBERY, P.H. The activity of uridine diphosphate-D-glucose: nicotinamide-adenine dinucleotide oxidoreductase in cambial tissue and differentiating xylem isolated from sycamore trees. **Planta**, Berlin, v. 103, p. 188-192, 1972.

RUNKEL, R.O.H. Pulp from tropical wood. **Tappi Journal**, Atlanta, v. 35, n. 4, p. 174-178, 1952.

SAMAC, D.A.; LITTERER, L.; TEMPLE, G.; JUNG, H.J.G.; SOMERS, D.A. Expression of UDP-glucose dehydrogenase reduces cell wall polysaccharide concentration and increases xylose content in alfalfa stems. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, San Diego, v. 10, p.1167-1182, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 765 p.

SANJUAN, D. R. **Obtención de pulpas y propiedades de las fibras para papel**. Gualadajara: Universidad de Gualadajara, 1997. 293 p.

SARKANEN, S. Template polymerization in lignin biosynthesis. In: LEWIS, N.G.; SARKANEN, S. (Ed.). **Lignin and lignan biosynthesis**. Washington, DC: American Chemical Society Symposium, 1998. p. 194-208.

SAS INSTITUTE. **Statistical Software V8**. Cary, 2000.

SCHEIBLE, W.R.; PAULY, M. Glycosyltransferases and cell wall biosynthesis: novel players and insights. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, p. 1-11, 2004.

SEIFERT, G.J. Nucleotide-sugar interconversions and cell wall biosynthesis: how to bring the inside to the outside. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, p. 277-284, 2004.

SEITZ, B.; KLOS, C.; WURM, M.; TENHAKEN, R. Matrix polysaccharide precursors in *Arabidopsis* cell walls are synthesized by alternate pathway with organ-specific expression patterns. **The Plant Journal**, Oxford, v.21, p. 537-546, 2000.

SELVENDRAN, R.R. The chemistry of plant cell walls. In: BIRCH, G.G.; PARKER, K.J. (Ed.). **Dietary fiber**. London; New York: Applied Sciences, 1983. p. 95-147.

SELVENDRAN, R.R. Developments in the chemistry and biochemistry of pectic and hemicellulosic polymers. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 2, p. 51-88, 1985. Supplement.

SELVENDRAN, R.R.; RYDEN, R. Isolation and analysis of plant cell walls. In: DEY, P.M. (Ed.). **Carbohydrates**. London: Academic Press, 1990. chap. 16, p. 549-579.

SJÖSTRÖM, E. **Wood chemistry: fundamentals and applications**. New York: Academic Press, 1981. 223 p.

SJÖSTRÖM, E. **Wood chemistry: fundamentals and applications**. 2nd ed. New York: Academic Press, 1993. 293 p.

SMOOK, G.A. **Manual para técnicos de pulpa y papel**. Vancouver: A. Wilde, 1990. 397 p.

SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 98, n. 3, p. 503-517, 1975.

STEPHEN, A.M. Other plant polysaccharides. In: ASPINALL, G.O. (Ed.). **The polysaccharides**. New York: Academic Press, 1982. v. 2, p. 97-113.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Paredes celulares: estruturas, biogênese e expansão. In: _____. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. cap. 15, p. 339-364.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY. **Test method T249 cm-85: carbohydrate composition of extractive-free wood and wood pulp by gas-liquid chromatography**. Atlanta, 1991a. 1v.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY. **Test method T259 cm-75:** species identification of nonwood plant fibers. Atlanta, 1991b. 1v.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY. **Test method T222 om-88:** acid insoluble lignin wood and pulp. Atlanta, 1996. 1v.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY. **Test method T264 om-88:** preparation wood for chemical analysis. Atlanta, 1999. 1v.

TENHAKEN, R.; THULKE, O. Cloning of an enzyme that synthesizes a key nucleotide-sugar precursor of hemicellulose biosynthesis from soybean: UDP-glucose dehydrogenase. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 112, p. 1127-1134, 1996.

TERASHIMA, N.; FUKUSHIMA, K. HE. L.F.; TAKABE, K. In: JUNG, H.G.; BUXTON, D.R.; HATFIELD, R.D.; RALPH, J. (Ed.). **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: ASA, CSSA, SSSA, 1993. p. 247-270.

TEULIÉRES, C.; MARQUE, C.; BOUDET, A.M. Genetic transformation of *Eucalyptus*. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Plant protoplasts and genetic engineering**. Berlin: Springer-Verlag, 1994. p. 289-306. (Biotechnology in Agriculture and Forest, 29).

TIMELL, T.E. Wood hemicellulosic. Part A. **Advances in Carbohydrate Chemistry**, New York, v. 19, p. 247-302, 1964.

TOMAZELLO FILHO, M. Variação radial da densidade básica e da estrutura anatômica da madeira de *Eucalyptus globulus*, *E. pellita* e *E. acmenoides*. **IPEF**, Piracicaba, n. 36, p. 35-42, 1987.

TREPANIER, R.J. Automatic fiber length and shape measurement by image analysis. **Tappi Journal**, Atlanta, v. 81, n. 6, p. 152-154, 1998.

TURNER, W.; BOTHA, F.C. Purification and kinetic properties of UDP-glucose dehydrogenase from sugarcane. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 407, p. 209-216, 2002.

VERMA, D.C.; DOUGALL, D.K. Biosynthesis of *myo*-inositol and its role as a precursor of cell wall polysaccharides in suspension cultures of wild-carrot cells. **Planta**, Berlin, v. 146, p. 55-62, 1979.

WAGBERG, L.; ANNERGREN, G. Physicochemical characterization of papermaking fibres. In: FUNDAMENTAL RESEARCH SYMPOSIUM, 11., 1997, Cambridge. **Proceedings of fundamental papermaking materials**. Cambridge: C. F. Baker, 1997. p.1-82.

WALLIS, A.F.A.; WEARNE, R.H.; WRIGHT, P.J. Chemical analysis of polysaccharides in plantation eucalypt woods and pulps. **Appita Journal**, Atlanta, v. 49, n. 4, p. 258-262, 1996.

WHETTEN, R.W.; MACKAY, J.J.; SEDEROFF, R.R. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 49, p. 585-609, 1998.

WHITNEY, S.E.C.; GOTHARD, M.G.E.; MITCHELL, J.T.; GIDLEY, M.J. Roles of cellulose and xyloglucan in determining the mechanical properties of primary plant cell walls. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 121, p. 657-663, 1999.

WHITNEY, S.E.C.; BRIGHAM, J.E.; DARKE, A.H.; GRAND-REID, J.S.; GIDLEY, M.J. *In vitro* assembly of cellulose/xyloglucan networks: ultrastructural and molecular aspects. **The Plant Journal**, Oxford, v. 8, p. 491-504, 1995.

WITT, H.J. UDP-glucose metabolism during differentiation and dedifferentiation of *Riella helicophylla*. **Journal of Plant Physiology**. Oxford, v. 140, n. 3, p. 276-281, 1992.

ZABLACKIS, E.; HUANG, J.; MULLER, B.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. Structure of plant-cell walls. 34. characterization of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* leaves. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 107, p. 1129-1138, 1995.