UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

THALES HENRIQUE DE FREITAS COSTA

Estudo da deposição de hemiceluloses na parede celular de gramíneas e seu efeito sobre a recalcitrância

Lorena 2016

THALES HENRIQUE DE FREITAS COSTA

Estudo da deposição de hemiceluloses na parede celular de gramíneas e seu efeito sobre a recalcitrância

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de Conversão de Biomassa.

Orientador: Prof. Dr. André Luís Ferraz

Edição reimpressa e corrigida

Lorena Novembro, 2016 AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

> Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado da Escola de Engenharia de Lorena, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Costa, Thales Henrique de Freitas Estudo da deposic?a?o de hemiceluloses na parede celular de grami?neas e seu efeito sobre a recalcitra?ncia / Thales Henrique de Freitas Costa; orientador André Luís Ferraz - ed. reimp., corr. -Lorena, 2016. 121 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2016 Orientador: André Luís Ferraz

1. Cana-de-açúcar. 2. Sorgo. 3. Recalcitrância. 4. Hemicelulose. 5. Imunofluorescência. I. Título. II. Ferraz, André Luís, orient.

Aos meus avós: Mirinha, Letícia, Zé Chica e Seu João.

Agradecimentos

- Antes de tudo e todos agradeço à Deus, que me criou e tem sido fiel para completar a boa obra em minha vida. A Ele quero servir todos os dias!
- Ao melhor orientador que eu poderia ter no mestrado e doutorado: André Ferraz. Sua orientação é exemplo! Obrigado por tudo!
- Ao Henrik Scheller, do Joint BioEnergy Institute, por aceitar me receber e me supervisionar em meu doutorado sanduíche em Berkeley.
- Aos meus pais, Leila e José Alves, minhas irmãs, Thayane e Thâmara, e meu cunhado Léo, pelo apoio incondicional, amor e por segurar as cordas de oração em minha vida. Amo vocês! A todos tios, tias, primos e avós em Caratinga, obrigado por serem a melhor grande família de todas!
- A minha família em Mogi das Cruzes: tia Socorro, tio Carlos, tio Edvan, Dani, Gau, Matheus, Vó Letícia, Raquel, Dudu e seu João. Obrigado por me receberem com tanto amor sempre que busquei refúgio.
- Aos grandes amigos que fizeram parte da minha história em Lorena e marcaram pra sempre essa passagem: Fernanda, pela amizade sincera; Angela, pelos bolos e conversas; Pepel, por me fazer chegar em Lorena; Germano, por ser o melhor amigo que está sempre pronto a ajudar.
- A todos que são ou passaram pelo debiq; em especial os amigos: José Moreira, Cobrinha, Gui, Raphael, Omar, Gabi, Carlaile, Maiara, Felipe, Dani Sporck, Bárbara, Isabela e Isa.
- A todos os amigos da Aliança Bíblica Universitária do Brasil, em especial aos amigos da ABU-SP/MS, IPL 2016 e claro, a melhor ABU de todas: ABU-Lorena, obrigado por acreditarem em mim e servirem junto comigo. Paulinho (PDT), obrigado por me abençoar tanto e ser um diferencial na minha vida. Rebeca, obrigado por todos os compartilhar e ser a melhor amiga ABUense. Amo todos vocês e sentirei saudades.
- All my friends I met in Berkeley: Marc, Randy, Wendy, James, Nadeen, Christian, Matt, Nick, Caleb, Jamie, Rebekah, Graeme, Verônica, Giovani, Irina and Paul Hussey. You are the best! Miss you all!
- A Capes, CNPq e programa "Ciências sem Fronteiras" pelo apoio financeiro e USP pela oportunidade de estudo.

Fé que pensa, razão que crê! (lema da Aliança Bíblica Universitária do Brasil)

RESUMO

COSTA, T. H. F. **Estudo da deposição de hemiceluloses na parede celular de gramíneas e seu efeito sobre a recalcitrância**. 2016. 121p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena-SP, 2016.

Este estudo avaliou a ocorrência e as características da hemicelulose em gramíneas e sua correlação com a recalcitrância da biomassa lignocelulósica frente à digestão enzimática. As amostras de gramíneas incluíram seis híbridos de cana-de-acúcar com teores variados de lignina e hemicelulose, além de uma variedade de sorgo forrageiro. Os entrenós de cana-de-açúcar madura foram fracionados em três regiões distintas: medula, interface medula-córtex e córtex. O sorgo foi fracionado em: medula e córtex. As medulas apresentaram alto teor de glucanas (40-55%) e baixo teor de ligninas (14–22%). O teor de xilanas aumentou da medula (14–20%) para o córtex (20-23%). A composição da hemicelulose também foi avaliada. Xilose (9-23%), glicose (1-12%) e arabinose (1-4%) foram os monômeros mais abundantes ao fim das análises. As medulas apresentaram xilanas mais arabinosiladas e alta deposição de glucanas não celulósicas. O teor de $(1\rightarrow 3), (1\rightarrow 4)$ -ß-D-glucanas foi elevado nas medulas (1,4-15%) e diminuiu no sentido do córtex (0,1 – 1%). As arabinoxilanas de cana-de-acúcar foram submetidas à um estudo estrutural, confirmando que as cadeias de xilanas são substituídas. A lignina foi avaliada por pirólise acoplada com espectrometria de massas, revelando uma estrutura HGS em cana-de-açúcar e uma razão S/G sem um padrão progressivo entre as frações do entrenó. As amostras de cana-de-acúcar também foram avaliadas guanto à distribuição de hemiceluloses entre os diferentes tecidos e células através de microscopia de imunofluorescência. Uma análise preliminar revelou que anticorpos específicos para xilana e $(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)$ -ß-D-glucana se ligaram aos extratos hemicelulósicos. Cortes das amostras foram tratados com os anticorpos CRCC-M140 e LM11 (para xilanas menos e mais substituídas) e outro contra $(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)$ -ß-Dglucanas. Epítopos de xilanas menos substituídas estiveram presentes principalmente em feixes vasculares e não foram detectados em parênquima de medulas. Epítopos de arabinoxilana foram encontrados em todas as frações e tipos celulares. A imunofluorescência de $(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)$ -β-D-glucanas mostrou que estes estão depositados principalmente em células do parênguima de medulas; em feixes vasculares estes foram detectados apenas em células do floema e protoxilema. O índice de cristalinidade foi estimado para as amostras. Altos índices de cristalinidade foram encontrados para amostras do córtex (0.44–0.56). As amostras (sem prétratamentos) foram digeridas com enzimas celulolíticas comerciais. As medulas foram hidrolisadas mais facilmente (32-85% de conversão de glucanas após 72h), enquanto amostras do córtex foram mais recalcitrantes (2-9%). As interfaces apresentaram conversões intermediárias (7-46%). A hidrólise da xilana ocorreu em menor escala para todas frações, possivelmente devido ao alto grau de substituição das xilanas. A digestibilidade das glucanas foi diretamente proporcional ao grau de substituição das xilanas (R^2 =0,86) e ao teor de (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)-ß-D-glucanas nas amostras (R^2 = 0,92). Entre as amostras de gramíneas, aqueles que apresentam menor recalcitrância reuniram características que incluem baixo teor de lignina, alto teor de $(1\rightarrow 3), (1\rightarrow 4)$ ß-D-glucanas e alto grau de substituição das xilanas. Essas características poderiam ser utilizadas como indicadores nos processos de geração e seleção de plantas para a produção de biomassas lignocelulósicas de elevada digestibilidade.

Palavras chave: Cana-de-açúcar. Sorgo. Recalcitrância. Hemicelulose. Imunofluorescência.

ABSTRACT

COSTA, T. H. F. **Study of the hemicellulose deposition in the cell wall of grasses as related to recalcitrance**. 2016. 121p. Thesis (Doctor of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena-SP, 2016.

This work assessed the occurrence and features of hemicellulose in grasses as related to lignocellulosic biomass recalcitrance to enzymatic hydrolysis. The grasses materials included six sugarcane hybrids with varying lignin and hemicellulose content, besides a variety of forage sorghum. The mature sugarcane internodes were dissected into three different regions: pith, pith-rind interface and rind. The sorghum was dissected into pith and rind. Pith samples presented high glucan content (40-55%) and low lignin content (14-22%). The xylan content increased from pith region (14-20%) to rind (20-23%). Hemicellulose composition was also assessed. Xylose (9-23%), glucose (1-12%) and arabinose (1-4%) were the most abundant monomers at the end of the analyzes. Pith samples had the most arabinosilated xylans and high content of non-cellulosic glucans. The $(1\rightarrow 3), (1\rightarrow 4)$ -ß-D-glucan content was high in piths (1.4-15%) and decreased towards rind (0.1-1%). The sugarcane arabinoxylans were submitted to a study of their structure, which confirmed the xylan backbone was substituted. Lignin was assessed by pyrolysis coupled with mass spectrometer, which showed an HGS polymer in sugarcane and a S/G ratio without a progressive pattern between internode fractions. The sugarcane samples were also evaluated as related hemicellulose distribution between different tissues to and cells bv immunofluorescence microscopy. A preliminary analysis showed that antibodies specific to xylan and mixed-linkage glucan bound to hemicellulose extracts. Plant sections were treated with the antibodies CRCC-M140 and LM11 (for less and more substituted xylans) and another one against mixed-linkage glucans. Less decorated xylan epitopes were mainly present in vascular bundles and were not detected in pith parenchyma. Arabinoxylan epitopes were found in all fractions and cell types. The mixed-linkage glucan immunofluorescence showed they were mainly deposited in parenchyma cells from piths; they were only detected in phloem and protoxylem cells in vascular bundles. The crystallinity index was estimated for all samples. High crystallinity indexes were found in rind samples (0,44-0,56). The non-pretreated materials were digested with commercial cellulolytic enzymes. Piths were easily hydrolyzed (32-85% of glucan conversion after 72h), while rind samples were more recalcitrant (2-9%). Interface samples showed intermediary conversions (7-46%). Xylan hydrolysis occurred in a less extent for all fractions, possibly due to a high substitution level on xylans. The glucan digestibility was proportionally related to the substitution level of xylan (R^2 =0,86) and the mixed-linkage glucan content (R^2 = 0,92). Among the grasses samples, those with lower recalcitrance had features such as low lignin content, high mixed-linkage glucan content and high substitution level of xylans. These features could serve as indicators in the process of generation and selection of plants for lignocellulosic biomass production with high digestibility degree.

Keywords: Sugarcane. Sorghum. Recalcitrance. Hemicellulose. Immunofluorescence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Anatomia do tipo atactostelo, típica do caule de gramíneas26
Figura 2 – Feixe vascular típico de caule de milho (A) e sorgo (B)27
Figura 3 – Estrutura tridimensional da parede celular secundária de uma célula
lignificada28
Figura 4 – Esquema representando uma fração da cadeia de celulose, formada
por unidades consecutivas de celobiose
Figura 5 – Ilustração esquemática dos tipos de hemiceluloses encontradas na
parede celular vegetal
Figura 6 – Estrutura modelo de lignina, com a respectiva indicação dos tipos de
ligação entre as unidades fenil propano
Figura 7 – Fórmulas estruturais dos ácidos cumárico e ferúlico presentes na
parede celular de gramíneas
Figura 8 – Diferulato fazendo ligação cruzada entre duas arabinoxilanas
Figura 9 – Esquema de degradação da celulose a partir da ação das enzimas
endo-1,4-ß-D-glucanase (EG), celobiohidrolases (CBHI e CBHII), 1,4-ß-D-
glucosidase (BGL), celobiose desidrogenase (CDH) e monooxigenases líticas
de polissacarídeos (LPMO1, 2 e 3)
Figura 11 – Esquema apresentando o modo de separação das diferentes regiões
da cana-de-açúcar e sorgo
Figura 12 – Fragmentos obtidos após preparação das amostras do entrenó da
cana-de-açúcar 146 e sorgo51
Figura 13 – Difratograma de raio-x de Avicel PH-10157
Figura 14 – Somatório dos principais açúcares que compõem pectina (ramnose,
galactose e ácido galacturônico) detectados em amostras de cana-de-açúcar.
Figura 15 – Teor de $(1\rightarrow 3),(1\rightarrow 4)$ -ß-D-glucanas nas frações de entrenós de
amostras de gramíneas (seis híbridos de cana-de-açúcar e uma variedade de
sorgo)
Figura 16 – Exemplo de ação de xilanases da família GH11 mostrando como
produto o fragmento substituído de menor tamanho que essas enzimas
podem liberar71

Figura 17 – Cromatograma do "fingerprinting" obtido a partir de uma amostra da interface do H58 com indicação dos oito picos de interesse utilizados no presente estudo......72 Figura 18 – Cromatograma do "fingerprinting" obtido a partir de uma amostra da medula do H146......75 Figura 19 – Razão S/G de diferentes regiões em híbridos de cana-de-açúcar....77 Figura 20 – Ensaio imunológico (dot blot) de extrato hemicelulósico da medula e córtex do híbrido 58 tratados com anticorpos contra epítopos de xilana: Figura 21 – Ensaio imunológico (dot blot) de extrato hemicelulósico das amostras de cana-de-açúcar tratados com anticorpo contra epítopo de $(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)$ -ß-Figura 22 - Micrografias de fluorescência de frações do entrenó de seis híbridos de cana-de-açúcar tratados com anticorpo primário monoclonal CRCC-M140 e anticorpo secundário Alexa Fluor 514. 82 Figura 23 – Micrografias de fluorescência de frações do entrenó de seis híbridos de cana-de-açúcar tratados com anticorpo primário monoclonal LM11 e Figura 24 – Micrografias de fluorescência de frações do entrenó de seis híbridos de cana-de-açúcar tratados com anticorpo primário monoclonal específico para $(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)$ -ß-D-glucana e anticorpo secundário Alexa Fluor 514. 86 Figura 25 – Micrografias de fluorescência da medula do híbrido de cana-deaçúcar 58, tratado com anticorpo primário monoclonal específico para (1→ Figura 26 – Avaliação da intensidade de fluorescência de um corte transversal da medula do híbrido de cana-de-açúcar 58 tratado com anticorpo monoclonal específico para glucanas mistas e anticorpo secundário Alexa Fluor 514.... 87 Figura 27 – Índice de cristalinidade estimado por difração de raio-X das frações de entrenó de cana-de-açúcar e sorgo...... 88 Figura 28 – Difratograma de raio-x das frações da medula e córtex do híbrido de cana-de açúcar 58. 90 Figura 29 – Conversões enzimáticas de glucana e xilana da medula (M), interface (I) e córtex (C) de seis híbridos de cana-de-açúcar e uma variedade de sorgo Figura 30 – Conversões enzimáticas de xilana da medula, interface e córtex do híbrido de cana-de-açúcar 321 apenas com coquetel enzimático comercial

(Cellic CTec2) (em preto) e coquetel enzimático suplementado com xilanase Figura 31 – Correlação entre conversão de glucanas após 72h de hidrólise e a razão arabinose/xilana de GAX de frações do entrenó de seis híbridos de Figura 32 – Correlação entre conversão de glucanas após 72h de hidrólise e o teor de $(1\rightarrow 3), (1\rightarrow 4)$ -B-D-glucanas de frações do entrenó de seis híbridos de cana-de-açúcar e uma variedade de sorgo.94 Figura 33 – Conversão enzimática de $(1\rightarrow 3), (1\rightarrow 4)$ -ß-D-glucanas de cevada à Figura 34 – Correlação entre conversão de glucanas após 72h de hidrólise e o índice de cristalinidade de frações do entrenó de seis híbridos de cana-deaçúcar e uma variedade de sorgo......96 Figura 35 – Correlação entre conversão de glucanas após 72h de hidrólise e a razão S/G de frações do entrenó de seis híbridos de cana-de-açúcar.........97 Figura 36 – Correlação da conversão de celulose com um parâmetro representado pela razão entre celulose disponível e área ocupada por feixes vasculares em amostras de híbridos de cana-de-açúcar estudadas por Costa Figura 37 - Micrografias de fluorescência em maior aumento de frações do entrenó dos híbridos de cana-de-açúcar 89, 146, 166 e 321 tratados com anticorpo primário monoclonal específico para $(1\rightarrow 3), (1\rightarrow 4)$ -ß-D-glucana e anticorpo secundário Alexa Fluor 514......118 Figura 38 – Cinética da conversão enzimática de glucanas à glicose em frações do entrenó de seis híbridos de cana-de-açúcar......119 Figura 39 – Cinética da conversão enzimática de xilanas à xilose em frações do entrenó de seis híbridos de cana-de-açúcar.....120 Figura 40 – Cinética da conversão enzimática de glucanas e xilanas à monômeros em frações do entrenó de sorgo forrageiro......121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química aproximada de parede celular típica de
gramíneas
Tabela 2 – Composição química de bagaços de cana-de-açúcar provenientes de
híbridos, classificados em ordem crescente de teor de lignina
Tabela 3 – Anticorpos envolvidos em experimentos imunológicos. Os anticorpos
foram diluídos com tampão PBS contendo 5% de leite em pó sem gordura. 61
Tabela 4 – Composição química de frações do entrenó de seis diferentes híbridos
de cana-de-açúcar e uma variedade de sorgo64
Tabela 5 - Composição dos polissacarídeos não celulósicos de seis diferentes
híbridos de cana-de-açúcar determinada através de hidrólise branda com
ácido trifluoroacético (TFA) 2 mol.L ⁻¹ 65
Tabela 6 - Composição dos polissacarídeos não celulósicos de frações do
entrenó de sorgo determinados por metanólise ácida67
Tabela 7 – Teor de celulose nas frações de entrenós de amostras de gramíneas
(seis híbridos de cana-de-açúcar e uma variedade de sorgo)
Tabela 8 - Quantidades relativas de cada oligossacarídeo detectado por
fingerprinting
Tabela 9 - Composição S/G/H da lignina de variedades de cana-de-açúcar por
pirólise77
Tabela 10 - Produtos de degradação identificados na pirólise da lignina de
bagaço de cana-de-açúcar e seus precursores monolignóis de origem 117

LISTA DE ABREVIATURAS

- GAX Glucuronoarabinoxilana
- H(x) Híbrido de cana-de-açúcar número (x)
- IC Índice de cristalinidade
- FPU Unidades de papel de filtro
- TFA Ácido trifluoroacético

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 2	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 2	24
2.1 CANA-DE-AÇÚCAR E SORGO 2	24
2.1.1 ESTRUTURA E ANATOMIA VEGETAL	24
2.2 PAREDE CELULAR EM GRAMÍNEAS 2	25
2.2.1 CELULOSE	27
2.2.2 GLUCURONOARABINOXILANA	28
2.2.3 $(1\rightarrow 3), (1\rightarrow 4)$ -B-D-GLUCANAS	29
2.2.4 OUTROS POLISSACARÍDEOS	;1
2.2.5 LIGNINA E ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS	;1
2.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PAREDE CELULAR DE GRAMÍNEAS 3	;4
2.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA	6
2.4.1 RECALCITRÂNCIA DA PAREDE CELULAR À BIODEGRADAÇÃO E	A
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	8
2.5 DISTRIBUIÇÃO TOPOQUÍMICA DE COMPONENTES DA PARED	E
CELULAR	4
2.5.1 IMUNOFLUORESCÊNCIA 4	-5
3 OBJETIVOS	17
	10
	0 1 Q
4.1 COLLIA E PREPARO DAS AMOSTRAS DE GRAMINEAS	:0 :2
HIDRÓLISE COM ÁCIDO SULEÚRICO	;2
422 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DOS POLISSAÇARÍDEOS NÃ	0
	33
4 2 3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE $(1 \rightarrow 3)$ $(1 \rightarrow 4)$ -R-D-GLUCANAS	54
424 CARACTERIZAÇÃO DE ARABINOXII ANAS DE CANA-DE-ACÚCAR PO	R
"FINGERPRINTING"	55
4.2.5 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE CRISTAI INIDADE DOS MATERIA	
	S

4.2.6 COMPOSIÇÃO HGS DA LIGNINA EM AMOSTRAS DE CANA-DE-
AÇÚCAR
4.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM CELULASES COMERCIAIS 58
4.4 ENSAIOS IMUNOLÓGICOS DE AMOSTRAS DE CANA-DE-AÇÚCAR 59
4.4.1 AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS NA PRESENÇA DE EXTRATOS
HEMICELULÓSICOS - DOT BLOTS 59
4.4.2 MAPEAMENTO DAS HEMICELULOSES ATRAVÉS DA
IMUNOFLUORESCÊNCIA60
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 62
5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE ENTRENÓS DE CANA-DE-AÇÚCAR E
SORGO 62
5.2 ESTUDO DA ESTRUTURA DE ARABINOXILANAS EM CANA-DE-
AÇÚCAR (TÉCNICA DE "FINGERPRINTING")70
5.3 COMPOSIÇÃO DA LIGNINA DOS HÍBRIDOS DE CANA-DE-AÇÚCAR 76
5.4 DETECÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DAS HEMICELULOSES NOS
HÍBRIDOS DE CANA-DE-AÇÚCAR
5.5 ÍNDICE DE CRISTALINIDADE DAS FRAÇÕES DO ENTRENÓ DE
AMOSTRAS DE GRAMÍNEAS88
5.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS FRAÇÕES DO ENTRENÓ DE CANA-DE-
AÇÚCAR E SORGO 89
6 CONCLUSÕES
REFERÊNCIAS102
APÊNDICE A – Compostos identificados na pirólise da lignina
APÊNDICE B – Micrografias complementares de imunofluorescência 118
APÊNDICE C – Cinéticas enzimáticas119

1 INTRODUÇÃO

Os principais combustíveis utilizados no mundo atualmente são de origem fóssil. Esses combustíveis não-renováveis apresentam custos elevados e variáveis e ainda são os principais causadores das alterações climáticas que ocorrem no planeta devido a grande emissão de gases poluentes. Em resposta a todos esses impasses, os biocombustíveis apareceram como uma alternativa ao uso de combustíveis fósseis, por serem produzidos a partir de fontes renováveis e emitirem menos gases prejudiciais em seu ciclo de produção e uso. Sendo assim, nos últimos anos, os biocombustíveis tem sido foco de pesquisas científicas na área de novas matrizes energéticas (BAEYENS et al., 2015).

Em países tropicais como o Brasil, gramíneas de metabolismo C4, como cana-de-açúcar e sorgo, representam culturas importantes à economia. A partir do caldo da cana-de-açúcar pode-se produzir o etanol, o qual é comumente referenciado como etanol de primeira geração. O etanol de segunda geração, por outro lado, tem como fonte o bagaço gerado nos processos industriais. Esse etanol surgiu como uma alternativa para a expansão da produção de etanol através da utilização da planta como um todo. Esse bagaço gerado por cana-de-açúcar ou qualquer outra gramínea é uma biomassa lignocelulósica, constituída em sua maior parte por componentes da parede celular vegetal: polissacarídeos (celulose e hemicelulose) e lignina (GOLDEMBERG, 2008). Duas etapas são importantes na geração do etanol de segunda geração: a quebra dos polissacarídeos do material lignocelulósico à monômeros e a fermentação desses açúcares até etanol. Entretanto, um dos principais desafios desse processo envolve a dificuldade da quebra dos materiais até monômeros fermentescíveis com rendimentos elevados. A essa dificuldade chamamos recalcitrância.

A hidrólise enzimática é a principal ferramenta utilizada na digestão dos polissacarídeos e geração de açúcares monoméricos. No entanto, as enzimas por serem macromoléculas proteicas não conseguem acessar de forma significativa seus substratos, como a celulose, devido a recalcitrância dos materiais lignocelulósicos. Essa acessibilidade enzimática é um ponto chave de estudo. Entre os principais fatores que limitam a infiltração das enzimas na parede celular está a baixa porosidade deste material, que se deve a presença de hemicelulose

e lignina que cimentam as microfibrilas de celulose (YANG et al., 2011). A fim de contornar a recalcitrância e aumentar a posterior acessibilidade das enzimas aos polissacarídeos dos materiais lignocelulósicos, pré-tratamentos químicos se tornaram necessários para a obtenção significativa dos produtos de hidrólise. Apesar de indispensável, os diversos tipos de pré-tratamentos químicos tem se mostrado custosos e severos tanto para o bioprocesso quanto para o meio-ambiente (ALVIRA et al., 2010; BAEYENS et al., 2015).

Como a deposição de lignina e hemicelulose é um dos principais entraves para a produção de etanol celulósico, alternativas que poderiam permitir o desenvolvimento de pré-tratamentos mais amenos envolvem: obtenção de plantas que apresentem teores reduzidos de lignina e/ou hemicelulose, escolha de diferentes espécies de gramíneas com potencial para serem substratos lignocelulósicos e utilização de partes específicas de gramíneas como substrato. As plantas com baixos teores de lignina e xilanas, em hipótese, exigiriam prétratamentos menos severos ou até mesmo nenhum pré-tratamento mediante conversão enzimática direta, utilizando extratos enzimáticos ricos em celulases e hemicelulases (HIMMEL et al., 2007). A abordagem com plantas modificadas tem sido descrita na literatura recente, porém ainda são necessários estudos adicionais que abordem, em detalhes, as origens da recalcitrância da parede celular nas plantas de uma forma em geral e especialmente em plantas selecionadas por apresentarem baixos teores de lignina ou hemicelulose. Os dados então gerados poderiam enriquecer um conjunto de parâmetros utilizados no desenvolvimento de plantas geneticamente transformadas ou na seleção de híbridos mais adequados para os processos de hidrólise enzimática.

Na literatura são poucos os trabalhos que envolvem o estudo da relação entre a deposição da hemicelulose e sua diversidade química e topoquímica em gramíneas com a recalcitrância dos materiais. Isto deixa claro que avançar no conhecimento sobre possíveis contribuições da deposição desses polissacarídeos na recalcitrância dos materiais lignocelulósicos de gramíneas é importante, a fim de viabilizar a geração de matérias-primas lignocelulósicas mais adequadas ao processo de obtenção de biocombustíveis de segunda geração. Este trabalho, portanto, procura desvendar uma série de características inerentes à hemicelulose e sua relação com a recalcitrância de diferentes regiões de entrenós de diferentes amostras de cana-de-açúcar e sorgo forrageiro. Para isto, o presente estudo aborda o uso de uma série de técnicas de caracterização que incluem, além da avaliação da digestibilidade direta frente à ação de enzimas hidrolíticas, também a determinação do teor de componentes da parede celular, composição da hemicelulose e lignina, análise da cristalinidade dos materiais e uso de anticorpos no mapeamento indireto de componentes hemicelulósicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CANA-DE-AÇÚCAR E SORGO

A cana-de-açúcar é uma monocotiledônea perene, de metabolismo C4, pertencente ao gênero *Saccharum* L. e à família das Gramíneas (Poaceae). No Brasil, a cana-de-açúcar se tornou uma das culturas vegetais de maior interesse pelo fato de seu sistema C4 favorecer seu estabelecimento em regiões tropicais e pelos produtos finais gerados por ela. O estado de São Paulo e outros adjacentes são responsáveis por 85% da produção de cana-de-açúcar no Brasil. Aproximadamente metade dessa produção de cana-de-açúcar é destinada à geração de etanol de primeira geração (GOLDEMBERG, 2008).

O sorgo também é uma monocotiledônea de sistema metabólico C4, pertencente ao gênero *Sorghum bicolor* L. Moench, que inclui os sorgos do tipo granífero, sacarino e fibroso, e membro da família das gramíneas (Poaceae). No entanto, geralmente o sorgo é uma cultura anual, sendo necessário um novo plantio a cada colheita. Em território brasileiro, o sorgo é popularmente utilizado junto ao milho para sanar as demandas de grãos destinados a alimentação de aves e suínos e também como forrageiras para bovinos (COELHO et al., 2002), estando presente principalmente na região centro-oeste do Brasil. Alguns estudos sugerem que a produção de etanol a partir de sorgo, suco e bagaço, é bastante favorável, podendo atender à uma grande parte da demanda de combustíveis renováveis (GNANSOUNOU; DAURIAT; WYMAN, 2005; KIM, et al., 2012; WU et al., 2011).

2.1.1 ESTRUTURA E ANATOMIA VEGETAL

Em gramíneas o caule é o principal objeto de estudo e utilização por conter as células de estocagem e a maior parte da biomassa. O caule dessas plantas é do tipo colmo, com nós e entrenós bem definidos, sendo recoberto externamente por uma única camada de células, denominada epiderme. Os nós usualmente são menores que os entrenós e formam a ligação entre os entrenós. A anatomia celular do caule é do tipo atactostelo, típico de gramíneas, o qual compreende feixes vasculares distribuídos sem uma ordem definida em meio a células parenquimáticas (Figura 1). Os feixes vasculares tem função de transporte de água e nutrientes e suporte mecânico nas monocotiledôneas, sendo compostos por floema, vasos do xilema e muitas vezes lacunas de ar, circundados por fibras (Figura 2). O parênquima é o tecido que ocupa o maior volume no caule de gramíneas e suas células contêm grandes vacúolos com função de estocagem de carboidratos; em geral sacarose, frutanas (polímeros solúveis de frutose) ou amido (polímero de glicose insolúvel) dependendo da espécie, cultivar, estágio de desenvolvimento ou localização no caule (HALFORD et al., 2011).

A anatomia do entrenó de gramíneas é complexa e diversa em termos de espessura da parede celular, diâmetro do lúmen e distribuição dos tipos celulares ao longo de uma seção transversal (COSTA, 2012; SANJUÁN et al., 2001). Nos entrenós geralmente se destacam duas regiões distintas: a parte central, denominada medula (*pith* em inglês) e a parte periférica, denominada córtex (*rind* em inglês). A medula apresenta grandes quantidades de células do parênquima e diâmetros maiores para todos tipos celulares. O córtex por sua vez apresenta uma concentração maior de feixes vasculares e fibras e células com menor diâmetro. Apesar dessa organização, em todo entrenó de caule de gramíneas encontram-se distribuídos pequenas quantidades de feixes vasculares e parênquima (Figura 1). A anatomia dos nós de gramíneas tende a se diferenciar daquela dos entrenós, principalmente no que diz respeito ao formato e distribuição dos feixes vasculares (ARTSCHWAGER, 1948; BRIENZO et al., 2016; MAJUMDAR; SAHA, 1957).

2.2 PAREDE CELULAR EM GRAMÍNEAS

As paredes celulares dos materiais lignocelulósicos são a matéria-prima quando se trata da produção de biocombustíveis de segunda geração. A biomassa lignocelulósica proveniente de gramíneas tem sido o principal alvo de estudos, pois as gramíneas são culturas anuais de alta produtividade e estão associadas à geração de diversos itens de consumo como açúcar de mesa, grãos e forragem para animais. As biomassas lignocelulósicas oriundas das gramíneas geralmente são obtidas na forma de sub-produtos, como, por exemplo, bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de sorgo sacarino, e são compostas basicamente pela parede das células que antes constituíam o caule da planta integralmente (KIM; DAY, 2011).



Figura 1 – Anatomia do tipo atactostelo, típica do caule de gramíneas.

Fonte: Anatomy of Monocot Stem, (2016) (modificado).

A parede celular de um vegetal lignificado é composta essencialmente por três macromoléculas: celulose e hemicelulose, que compreendem os polissacarídeos, e lignina, único componente principal aromático. Subcamadas da parede celular são formadas a partir de orientações específicas dos agregados microfibrilares de cadeias de celulose (FENGEL; WEGENER, 1989). Essas microfibrilas por sua vez estão envolvidas por lignina e hemicelulose que cimentam a parede celular formando um material de baixa porosidade. Conforme ilustrado na Figura 3, a parede de uma célula lignificada é formada por várias subcamadas denominadas de: parede primária (P), parede secundária externa

(S1), parede secundária principal (S2) e parede secundária interna (T, ou S3) (PROMION; LEPROVOST; STOKES, 2001).

Figura 2 – Feixe vascular típico de caule de milho (A) e sorgo (B). Os tipos celulares estão indicados: PC – parênquima; V –vaso do xilema; FC – fibras; FL – floema; L – lacuna do protoxilema; VB – feixe vascular.



Fonte: (A) Ding et al. (2012) (modificado); (B) Palmer et al. 2008.

2.2.1 CELULOSE

A celulose é o principal e mais abundante polímero da parede celular primária e secundária em plantas e o mais importante substrato para a produção de açúcares fermentescíveis. Esse polissacarídeo é um homopolímero formado por moléculas de anidroglicose (D-glicose) unidas por ligações glicosídicas do tipo ß-(1-4) (Figura 4). Várias dessas cadeias glicosídicas se juntam para formar as microfibrilas de celulose, as quais, por sua vez, se organizam para formar fibrilas de celulose cristalina e para-cristalina. Além de uma porção cristalina, a celulose também apresenta uma porção amorfa e a quantidade relativa de cada porção pode ser estimada em termos do índice de cristalinidade (PARK et al., 2010).

Figura 3 – Estrutura tridimensional da parede celular secundária de uma célula lignificada, apresentando a lamela média, parede primária, parede secundária externa (S1); parede secundária principal (S2) e parede secundária interna ou parede terciária (S3).



Fonte: Plomion, Leprovost e Stokes (2001) (modificado).

Figura 4 – Esquema representando uma fração da cadeia de celulose, formada por unidades consecutivas de celobiose.



Fonte: Horn et al. (2012).

2.2.2 GLUCURONOARABINOXILANA

As principais hemiceluloses encontradas na parede celular de gramíneas são glucuronoarabinoxilana, $(1\rightarrow 3),(1\rightarrow 4)$ -ß-D-glucanas, xiloglucanas e

(gluco)mananas (SCHELLER; ULVSKOV, 2010). Dentre estes polissacarídeos, o componente hemicelulósico predominante em gramíneas é a glucuronoarabinoxilana, presente tanto em paredes celulares primárias quanto secundárias (VOGEL, 2008). Esse polissacarídeo apresenta um esqueleto formado por resíduos de anidroxilose ligados por ligações do tipo $\beta(1-4)$ com grupos pendentes do tipo α -L-arabinofuranosil nas posições *O*-3 e ácidos α -D-glucurônicos ligados nas posições *O*-2 (Figura 5). Grupos acetil também podem estar presentes como grupos pendentes nas posições *O*-3 e *O*-2 da cadeia de xilana.

2.2.3 $(1\rightarrow 3),(1\rightarrow 4)$ -B-D-GLUCANAS

As $(1\rightarrow 3), (1\rightarrow 4)$ -ß-D-glucanas ou simplesmente "glucanas mistas" (mixedlinkage glucans em inglês) são glucanas não celulósicas encontradas quase que exclusivamente em gramíneas, já que estas não são normalmente detectadas em eudicotiledôneas (VOGEL, 2008). Esse polissacarídeo apresenta a mesma estrutura básica da celulose, com resíduos de anidroglicose ligados por ligações do tipo $\beta(1-4)$, porém diferencia-se pela presença de ligações do tipo $\beta(1-3)$ que ocorrem geralmente a cada 3 ou 4 resíduos de glicose (Figura 5). Essas glucanas estão presentes principalmente em paredes primárias tendo papel importante na expansão celular (Tabela 1). A abundância desse polissacarídeo na parede gramíneas geralmente dependendo celular de varia do estágio de amadurecimento em que o tecido vegetal se encontra, sendo encontrados principalmente em paredes primárias de tecidos em expansão . Normalmente, à medida que o tecido vegetal se expande e a parede celular amadurece, as betaglucanas em geral são degradadas e substituídas por glucuronoarabinoxilana (SCHELLER; ULVSKOV, 2010). Apesar disso, glucanas mistas já foram detectadas também em paredes secundárias de gramíneas, como o arroz, através de técnicas indiretas (VEGA-SÁNCHEZ et al., 2013).

Figura 5 – Ilustração esquemática dos tipos de hemiceluloses encontradas na parede celular vegetal. "Ac" representa grupos acetil, "Fer" representa ácidos ferúlicos esterificados e "OMe" grupos metila.



Galactoglucomanana, típico de madeira de coníferas.

Fonte: Scheller e Ulvskov (2010) (modificado).

2.2.4 OUTROS POLISSACARÍDEOS

Gramíneas ainda apresentam outros polissacarídeos não celulósicos em suas paredes celulares, como xiloglucanas e glucomananas, mesmo que em pequenas quantidades (Tabela 1). As estruturas esquemáticas destes açúcares são apresentadas na Figura 5. Xiloglucanas estão presentes principalmente em paredes primárias e são comumente encontradas em células meristemáticas antes da síntese e deposição de glucanas e glucuronoarabinoxilanas. Glucomananas estão presentes em sua maior parte na parede celular primária, onde interagem firmemente com microfibrilas de celulose (CARPITA, 1996). Substâncias pécticas também podem ser encontradas na parede celular de gramíneas em pequenas quantidades. Dois componentes fundamentais destes polímeros são o ácido poligalacturônico, um homopolímero formado por resíduos de ácido $(1\rightarrow 4)$ - α -D-galacturônico, e ramnogalacturonana I, um heteropolímero com unidades dissacarídicas repetidas de $(1\rightarrow 2)$ - α -L-ramnosil- $(1\rightarrow 4)$ - α -D-galacturônico (CARPITA, 1996).

2.2.5 LIGNINA E ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS

Lignina é uma macromolécula aromática presente na parede celular secundária de plantas, a qual, junto com a hemicelulose preenche os espaços entre as microfibrilas de celulose e acumula-se na lamela média entre as células. Esta macromolécula é formada pela condensação de três precursores fenólicos: álcool coniferílico (guaiacil), álcool sinapílico (siringil) e álcool cumarílico (*p*-hidroxifenil) (Figura 6). A lignina de gramíneas é comumente classificada como sendo do tipo p-hidroxifenil-guaiacil-siringil ou H-G-S, por apresentar quantidades significativas de cada um dos 3 precursores. Os precursores p-hidroxifenil e guaiacil, no entanto, muitas vezes são superestimados uma vez que muitas análises são feitas por métodos degradativos e incluem como parte da lignina os subprodutos provenientes dos ácidos cumárico e ferúlico, respectivamente (DEL RÍO et al., 2015; HE; TERASHIMA, 1990). De fato, uma característica

determinante de monocotiledôneas é a presença de ácidos hidroxicinâmicos, até mesmo em paredes não lignificadas. Estes ácidos representam uma parte significativa dos componentes aromáticos de gramíneas, estando presentes até mesmo na lignina total determinada pelo procedimento Klason, devido a reações de condensação em meio ácido empregado no método analítico (GRABBER; RALPH; HATFIELD, 2000; LAM; LIYAMA; STONE, 1994). Esses componentes da parede celular têm uma estrutura fenólica similar aos precursores da lignina e a maior parte é formada pelos ácidos ferúlico e cumárico (Figura 7) (HARRIS; HARTLEY, 1980). Estes componentes aromáticos podem estar ligados como grupos pendentes ou fazer pontes entre hemiceluloses e lignina, através de ligações do tipo éster e éter (RALPH, 2010). O ácido ferúlico, por exemplo, é o principal componente nessa ligação cruzada entre polissacarídeos ou polissacarídeo-lignina e a conexão geralmente se dá na forma de diferulatos (Figura 8) (CARPITA, 1996; HATFIELD; RALPH; GRABBER, 1999).

Figura 6 – Estrutura modelo de lignina, com a respectiva indicação dos tipos de ligação entre as unidades fenil propano.



Fonte: Amidon et al. (2011) (modificado).

Figura 7 – Fórmulas estruturais dos ácidos cumárico e ferúlico presentes na parede celular de gramíneas.



Fonte: Ralph (2010).

Figura 8 – Diferulato fazendo ligação cruzada entre duas arabinoxilanas.



Fonte: Santiago e Malvar (2010).

2.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PAREDE CELULAR DE GRAMÍNEAS

Já é bem estabelecido que a parede celular de gramíneas apresenta diferenças significativas em termos de composição química comparada à parede celular de eudicotiledôneas (CARPITA; GIBEAUT, 1993). Na Tabela 1 são apresentadas as composições aproximadas da parede celular primária e secundária de gramíneas. Pode-se observar que além dos principais componentes, proteínas estruturais e sílica também podem estar presentes na parede celular de gramíneas.

Individualmente, a composição química da parede celular pode variar dependendo de diversos fatores como espécie, variedade, condições de manejo e partes diferentes da planta. Por exemplo, a composição química de amostras de bagaço de cana-de-açúcar e sorgo sacarino proveniente de usinas de açúcar de Lousiana-EUA apresentaram, respectivamente, 42% e 45% de celulose, 25% e 27% de hemiceluloses, 20% e 21% de lignina e 5% e 0,4% de cinzas (KIM; DAY, 2011). Pandey et al. (2000) relataram uma composição generalizada de aproximadamente 50% de celulose, 25% de hemicelulose, 25% de lignina e 2% de cinzas para bagaço de cana-de-açúcar. Bagaço de cana-de-açúcar oriundo de plantações feitas no Brasil apresenta teores de 43% de celulose, 28% de hemiceluloses e 23% de lignina total determinado por Silva (1995) e 44%, 27% e 24%, respectivamente, conforme descrito por Mendes et al. (2011). Para dois tipos de bagaço de sorgo sacarino, Wu et al. (2011) encontraram uma composição de cerca de 39% de glucanas, 23% de xilanas, 15% de lignina e 2% de cinzas. Em um estudo de Masarin et al. (2011) foi observado que a composição do bagaço de cana-de-açúcar pode variar significativamente dependendo da variedade de cana-de-açúcar. Em um conjunto de 13 amostras, os teores mínimos e máximos de extrativos, celulose, hemicelulose e lignina foram de 1,6 - 7,5 %, 38,2 - 43,2 %, 25,2 - 31,6 % e 16,8 - 24,5 %, respectivamente. Uma variação significativa na composição química também foi observada quando comparados diferentes bagaços de gramíneas provindos de diferentes regiões do entrenó das plantas (BARROS-RIOS et al., 2012; COSTA et al., 2013; MENDES et al., 2015; ZENG et al., 2012). A diferença no teor de lignina entre regiões da medula e córtex é a característica mais significativa à todas as

gramíneas. Por exemplo, Costa et al. (2013) demonstraram para cana-de-açúcar que o bagaço de medula de um dos híbridos de cana-de-açúcar apresenta 53% de glucanas, 20% de hemiceluloses totais e 13% de lignina. Por outro lado, o bagaço provindo de outra região mais periférica do entrenó do mesmo híbrido, chamada córtex, apresentou 43% de glucanas, 27% de hemiceluloses totais e 19% de lignina total. Para milho, Zeng et al. (2012) encontraram 43% de glucanas e 19% de lignina em medulas e 42% de glucanas e 27% de lignina em frações do córtex.

Tabela 1 – Composição química aproximada de parede celular típica de gramíneas.

Composição química (% m / m em massa seca)				
Componente	Parede primária	Parede secundária		
Celulose	20-30	35-45		
Hemicelulose*				
Xiloglucana	2-5	Traços		
Glucuronoarabinoxilana	20-40	40-50		
(Gluco)manana	2	0-5		
(1→3),(1→4)-ß-glucana	2-15	Traços		
Pectinas	5	0,1		
Proteínas estruturais	1	Traços		
Fenólicos				
Ác. Ferúlico e Cumárico	1-5	0,5-1,5		
Lignina	Traços	20		
Sílica		5-15		

Composição química (% m / m em massa seca)

Fonte: Vogel (2008) (modificado). *Dados de Hemicelulose: Scheller e Ulvskov (2010).

2.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA

A despolimerização da celulose e hemicelulose até monômeros fermentescíveis se dá através da hidrólise das ligações glicosídicas presentes nos polissacarídeos. Este tipo de reação depende de catalisadores e a abordagem ideal que gera a menor quantidade de sub-produtos e apresenta os maiores rendimentos envolve o uso de enzimas (CHENG; TIMILSINA 2011).

O método clássico de hidrólise dos materiais lignocelulósicos envolve a ação de três classes de hidrolases, que atuam sobre a celulose (Figura 9). Essas hidrolases clássicas são constituídas pelas enzimas: endo-1,4-ß-D-glucanase (EC 3.2.1.4), a qual hidrolisa a cadeia de celulose aleatoriamente, exo-1,4-ß-D glucanases (ou celobiohidrolases quando processivas) (tipo I, EC 3.2.1.176 e tipo II, EC 3.2.1.91), responsáveis por hidrolisar a celulose a partir de suas extremidades liberando celobiose como produto e 1,4-ß-D-glucosidase (EC 3.2.1.21). Esta última enzima não atua diretamente sobre a celulose, mas sim sobre a celobiose e também oligômeros liberando como produto a glicose. Estes três grupos de enzimas, comumente denominadas endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase, tem ação sinergística sobre a celulose promovendo uma eficiente degradação do polissacarídeo (JEOH; WILSON; WALKER, 2006). Outras enzimas envolvidas na degradação da celulose, as quais utilizam um mecanismo de oxirredução, foram elucidadas nos últimos anos (HORN et al., 2012). Monooxigenases líticas de polissacarídeos (Lytic polysaccharide monooxygenase – LPMO, em inglês) são enzimas dependentes de cobre que catalisam a oxidação direta da cadeia de celulose e assim a quebra da ligação glicosídica. As reações mediadas por essas enzimas dependem de um doador de elétrons para redução do cobre II à cobre I, que junto ao oxigênio molecular é capaz de oxidar a ligação glicosídica. A celobiose desidrogenase (EC 1.1.99.18) por sua vez oxida celobiose e celooligossacarídeos à suas respectivas lactonas. Há evidências de que a celobiose desidrogenase tenha como papel a geração de elétrons necessários às LPMOs no sistema de degradação da celulose, mas também possa participar no processo de degradação da lignina em fungos (RYTIOJA et al., 2014).
Figura 9 – Esquema de degradação da celulose a partir da ação das enzimas endo-1,4-ß-D-glucanase (EG), celobiohidrolases (CBHI e CBHII), 1,4-ß-D-glucosidase (BGL), celobiose desidrogenase (CDH) e monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMO1, 2 e 3).



Fonte: Rytioja et al. (2014).

Devido a diversidade de polissacarídeos que constituem as hemiceluloses, a sua degradação enzimática depende de uma variedade maior de enzimas. Por exemplo, a hidrólise de metil-glucuronoarabinoxilana, principal hemicelulose de gramíneas, exigiria a presença de: endo-1,4- β -xilanase (EC 3.2.1.8) e β -xilosidase (EC 3.2.1.37), além de enzimas que atuam nas ramificações da cadeia principal, como α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), α -glucuronidase (EC 3.2.1.139), acetilxilana-esterase (EC 3.1.1.72) e feruloil-esterase/p-cumaril-esterase (EC 3.1.1.73). As enzimas que atuam em ramificações muitas vezes são necessárias pois contribuem para o sinergismo hemicelulolítico (SAHA, 2003; VÁRNAI et al., 2014). O processo básico se dá com a formação de xilooligossacarídeos e xilose através das endoxilanases e ação das ß-xilosidases sobre a xilobiose e xilooligossacarídeos liberando xilose a partir da extremidade não redutora. Uma xilobiohidrolase, a qual cliva xilana em xilobiose, também já foi descrita em fungo basidiomiceto (GHOSH; NANDA, 1994). Glucanas mistas, por outro lado, podem ser hidrolisadas por endoglucanases e ß-glicosidase, da mesma forma que na celulose. No entanto, muitas vezes se faz necessária a atuação da liguenase (EC 3.2.1.73), a qual hidrolisa ligações glicosídicas ß-(1-4) em glucanas contendo ligações ß-(1-4) e ß-(1-3) (WOODWARD; FINCHER; STONE, 1983). Enzimas oxidativas que atuam sobre a hemicelulose também tem sido descobertas recentemente (RYTIOJA et al., 2014).

Os extratos celulolíticos comerciais, comumente empregados nos processos de hidrólise enzimática, apresentam uma mistura complexa de enzimas essenciais à degradação da celulose e hemicelulose, cujas atividades estão atualmente bem descritas na literatura. O extrato mais utilizado nas preparações comerciais é produzido pelo fungo Hypocrea jecorina (mais conhecido como Trichoderma reesei). 0 gual apresenta alta uma concentração de celobiohidrolases (cerca de 80 % das proteínas) (ROSGAARD et al., 2007). O processo de sacarificação se dá na faixa de pH 4,5 - 5,0 e temperatura de 40 - 50 °C. Uma das principais preparações comerciais baseada no extrato de H. Jecorina utilizada nos últimos anos é a Cellic Ctec2 (Novozymes), na qual foi detectada inclusive a presença de LPMOs em conjunto com atividades de celulases clássicas de endo-glucanase e ß-glicosidase (CANNELLA et al, 2012).

2.4.1 RECALCITRÂNCIA DA PAREDE CELULAR À BIODEGRADAÇÃO E A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Diversos complexos enzimáticos celulolíticos tem sido purificados de fungos de decomposição de materiais lignocelulósicos e aplicados conforme os interesses na indústria e ciência (COSTA, 2012; VÁRNAI; SIIKA-AHO; VIIKARI, 2010). No entanto, para que haja ação eficaz dessas hidrolases sobre os polissacarídeos de biomassas lignocelulósicas, as enzimas precisam ter acesso direto ao substrato os quais são insolúveis e estão empacotados entre si e a lignina na parede celular vegetal. A parede celular lignificada, por sua vez, tem baixa permeabilidade às enzimas, sendo esta uma das principais causas da recalcitrância dos materiais lignocelulósicos, ou em outras palavras, a resistência à degradabilidade biológica (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999). Por esse motivo, altos rendimentos da conversão enzimática da celulose só são alcançados quando há uma baixa recalcitrância do material lignocelulósico. Por exemplo, estudos mostraram que a região da medula de amostras de cana-de-

açúcar não pré-tratadas foram prontamente hidrolisadas na presença de celulases comerciais (COSTA et al., 2013; SIQUEIRA et al., 2011; VÁRNAI et al., 2014). Em palha de milho, a região da medula também foi rapidamente hidrolisada em 24 h de hidrólise enzimática com celulases após pré-tratamento com água quente, comparada à região do córtex (ZENG et al., 2012). Isto se deve à menor recalcitrância da região medular de gramíneas que é composta em sua maior parte por células do parênquima, as quais apresentam uma parede celular menos espessa, sem lignificação significativa. Vários outros estudos também observaram que a remoção de lignina e hemicelulose geraram materiais lignocelulósicos menos recalcitrantes e assim apresentaram um melhor rendimento na conversão enzimática de seus polissacarídeos (ALVIRA, et al., 2010; LEE et al., 2009; VÁRNAI; SIIKA-AHO; VIIKARI, 2010; WU et al., 2011).

Diferentes características do material lignocelulósico podem afetar ou estar relacionadas à recalcitrância da hidrólise da celulose e hemicelulose em uma parede celular lignificada. A porosidade limitada da parede celular, já mencionada, impede a infiltração eficiente das enzimas (FLOURNOY; KIRK; HIGHLEY, 1991; HAMMEL; CULLEN, 2008), e assim estas agem somente nas superfícies imediatamente expostas como lúmen ou superfície externa de células em um material moído (HIMMEL et al., 2007). Devido a presença de lignina e hemicelulose como agentes que encapsulam as microfibrilas de celulose, a distribuição topoquímica desses dois componentes nas células e tecidos vegetais se torna muito importante. Celulases em geral apresentam domínios de ligação ao substrato e assim a oclusão da molécula proteica por outros componentes impede a adsorção efetiva da enzima na superfície da celulose (YANG et al., 2011). Ao aderirem a outros componentes, como a lignina ou hemicelulose, que não seja seu substrato, as enzimas participam de uma adsorção improdutiva, diminuindo assim a eficiência da hidrólise enzimática. Além disso, a baixa degradabilidade da lignina se apresenta como outro fator limitante na ação de microrganismos e enzimas na parede celular lignificada, por ser um polímero fenólico não susceptível a ação enzimática de hidrolases. Outra característica comumente associada à recalcitrância de materiais lignocelulósicos é a cristalinidade da molécula de celulose, a qual pode influenciar negativamente na adsorção efetiva de celulases e no sinergismo das celulases (YANG et al., 2011). Em geral, estudos mostraram que um alto índice de cristalinidade do material contribui negativamente nas taxas de hidrólise enzimática uma vez que a celulose amorfa é rapidamente digerida enquanto a celulose cristalina é digerida mais lentamente por celulases (BRAGATTO et al., 2012; HALL et al., 2010). No entanto, outros estudos apontam o efeito oposto e alguns reportam ainda que o índice de cristalinidade não afetou de forma alguma a eficiência da hidrólise enzimática (KIM; HOLTZAPPLE, 2005; PURI, 1984; SANNIGRAHI; MILLER; RAGAUSKAS, 2010). Essa cristalinidade da celulose, em conjunto com o empacotamento da fibra por outros componentes, levou aos estudos de amorfogênese, que propõem que um inchamento da fibra celulósica ocorre nas fases iniciais da hidrólise enzimática da celulose para que haja acesso eficiente e assim ação das celulases (ARANTES; SADDLER, 2010). Estudos com celulose microcristalina (Avicel), papel de filtro e algodão sugerem que diferentes agentes podem induzir a amorfogênese e atuam em sinergismo com as enzimas celulolíticas. Dentre esses agentes podemos citar os módulos de ligação ao carboidrato (CBM), presente em muitas enzimas hidrolíticas como celulases e xilanases, expansinas vegetais e similares além de outras proteínas.

Devido as diversas características já mencionadas que contribuem com a recalcitrância da parede celular lignificada, se tornou comum a inclusão de uma etapa de pré-tratamento mecânico, químico, biológico, ou mesmo combinados, dos materiais, com o objetivo de fomentar o acesso enzimático aos devidos substratos (ALVIRA et al., 2010; BLANCHETTE, 1997). Em geral, esses prétratamentos visam remover os componentes que impedem a penetração e/ou o acoplamento das celulases à celulose, que são principalmente a hemicelulose e a lignina. Por exemplo, a remoção seletiva de hemicelulose em "switchgrass" por ácido diluído proporcionou um aumento de digestibilidade das glucanas de 3% para 48% em 24h de digestão enzimática (LI et al., 2010). Öhgren et al. (2007) também observaram um aumento na digestibilidade da celulose, de 70% para 90% após 72h de hidrólise com celulases, guando a biomassa de palha de milho pré-tratada com explosão a vapor foi submetida a um tratamento suplementar com xilanases, removendo hemicelulose residual que poderia estar envolvida na obstrução do acesso à celulose. A remoção de lignina fomenta ainda mais o acesso às cadeias de celulose. Por exemplo, um estudo de Várnai, Siika-Aho e Viikari (2010) demonstrou que ao remover 93% da lignina em madeira pré-tratada por explosão a vapor (hidrólise ácida), a digestibilidade do substrato frente a

celulases comerciais foi aumentada em mais de duas vezes. Em outro estudo, a remoção seletiva de lignina na parede celular pela ação de líquidos iônicos foi avaliada, demonstrando uma clara correlação entre os níveis de remoção de lignina da parede celular com a digestibilidade do material residual por celulases comerciais (LEE et al., 2009).

A recalcitrância dos materiais lignocelulósicos frente a hidrólise enzimática e mesmo pré-tratamentos tem impulsionado a busca por plantas otimizadas para o processo dentro de um conceito de biorrefinarias. Essas características envolvem principalmente um menor nível de lignificação ou deposição de fenólicos na parede celular (FU et al., 2011; MASARIN et al., 2011). No entanto, alterações nos níveis de deposição e composição da hemicelulose podem também ser alvos importantes na busca por plantas ideais (VEGA-SÁNCHEZ; RONALD, 2010). Uma das principais ferramentas na busca por plantas com baixa recalcitrância tem sido a transformação genética a fim de alterar os níveis de expressão de genes chave na biossíntese de fenólicos e hemicelulose. Por exemplo, um estudo realizado com alfafa transgênica mostrou que ao suprimir genes chave da biossíntese de lignina foi possível reduzir o teor de lignina à metade do valor originalmente encontrado nas plantas não transformadas (CHEN; DIXON, 2007). Isso favoreceu significativamente a hidrólise enzimática das fibras obtidas a partir das plantas transgênicas. O teor de açúcares liberados por hidrólise enzimática foi duplicado a partir da digestão direta do material transformado sem nenhum pré-tratamento químico. Em outro estudo, no entanto, monômeros de lignina raros foram superexpressos em Arabidopsis thaliana para gerar uma lignina com menor grau de polimerização, o que levou a um aumento na sacarificação das biomassas (EUDES et al., 2012). Outras plantas de A. thaliana também foram transformadas para acumular glucanas mistas em sua parede celular, um componente da hemicelulose associada à baixa recalcitrância da parede celular (VEGA-SÁNCHEZ et al., 2015). O acúmulo se deu a partir da expressão de um gene de síntese de glucanas mistas sob o controle de um promotor associado à senescência. As plantas cresceram e se desenvolveram normalmente e observou-se um aumento de 42 % na sacarificação de suas biomassas comparadas às linhagens não transformadas.

Evidências do efeito negativo da lignificação sobre a hidrólise enzimática também foram observados em dois estudos, onde se avaliou a maturação de

células do xilema de alfafa e incorporação *in vitro* de lignina em parede celular de milho (GRABBER; PANCIERA; HATFIELD, 2002; GRABBER et al., 2009). Em ambos casos, o aumento na lignificação levou a diminuição nos níveis de conversão enzimática da celulose. No entanto, em outro estudo, Grabber et al. (2008) demonstraram que ao incorporar precursores específicos durante a lignificação *in vitro* das células de colmo de milho é possível obter uma parede celular lignificada que pode ser facilmente deslignificada pela ação de soluções alcalinas em baixas temperaturas. Isso foi possível a partir do uso de precursores para a síntese de lignina que correspondiam aos dímeros do ácido ferúlico unidos por uma função éster. Essa alteração na estrutura da lignina proporcionou reações posteriores de deslignificação tão fáceis como a saponificação de triglicerídeos.

Alguns estudos também avaliaram a correlação da eficiência da digestibilidade com a composição da lignina em termos de razão siringil-guaiacil, geralmente aliados a um pré-tratamento químico. Até o momento não há um consenso para todos materiais lignocelulósicos sobre uma correlação positiva ou negativa, com alguns resultados controversos neste tópico (ZENG et al., 2014). Um estudo com switchgrass demonstrou uma diminuição da recalcitrância com a diminuição da razão S/G em material pré-tratado (16 - 21% de aumento na sacarificação) e melhores rendimentos na produção de etanol (FU et al., 2011). Por outro lado, em outro estudo com *A. thaliana*, um aumento da razão S/G só foi significante na eficiência da hidrólise após pré-tratamento com água quente (LI et al, 2010).

De forma similar à lignina, o teor de ácidos hidroxicinâmicos também contribui com a recalcitrância da biomassa à hidrólise enzimática, principalmente em gramíneas. Em um estudo com gramíneas (150 linhagens de *Phalaris aquatica* e 100 linhagens de *Lolium perenne*), foi demonstrado que a quantidade de ácido hidroxicinâmico afetou a recalcitrância da biomassa lignocelulósica frente à hidrólise enzimática direta (LAM; LIYAMA; STONE, 2003). Em outro estudo, Barros-Rios et al. (2012) encontraram estreita correlação entre a alta digestibilidade de medulas de milho, na presença de rúmen e a baixa concentração de ácidos ferúlicos e diferúlicos. Além disso, em um estudo com repressão de genes em plantas de *Brachypodium distachyon*, uma redução nos

níveis de deposição de ácido ferúlico, cumárico e diferulatos levou à uma digestibilidade enzimática da xilana duas vezes maior (RANCOUR et al., 2015).

Um outro fator associado a variação de recalcitrância dos materiais lignocelulósicos está relacionado à diversidade dos tipos de células existentes num determinado material. As espessuras da parede celular e as dimensões das células variam significativamente dependendo se são células de vasos, fibras ou de parênquima. Isso ganha importância adicional quando se incluem nos estudos, além da madeira, os materiais lignocelulósicos obtidos de gramíneas como a cana-de-açúcar, sorgo e milho, que apresentam uma quantidade expressiva de células de parênquima de estocagem em seus colmos. Apesar do parênquima conter células com parede celular menos espessa, esse tecido também é parcialmente lignificado e contêm ácidos hidroxicinâmicos (HE; TERASHIMA, 1990; 1991; SANJUAN et al., 2001; SIQUEIRA et al., 2011). Além disso, Ding et al. (2012) observou em caules de milho que a acessibilidade de enzimas se correlaciona negativamente com o nível de lignificação da parede celular. Todas as enzimas e moléculas de alta afinidade com carboidratos se ligaram de forma intensa a parede primária, que é predominante em células de parênquima. Por exemplo, a Figura 10 mostra o padrão de ligação de celulases fúngicas, o gual se liga preferencialmente à parede de células do parênguima, floema e protoxilema e não tem afinidade pelas células lignificadas. Dessa forma, em gramíneas é possível observar uma diferença na recalcitrância frente à hidrólise enzimática de diferentes tecidos e tipos celulares. Essa diferença é significativa entre as regiões do entrenó: medula e córtex, nas quais predominam tipos diferentes de tecidos, como parênguima e esclerênguima (fibras), respectivamente. Por exemplo, Zeng et al., (2012) avaliaram as diferentes recalcitrâncias das biomassas de duas regiões do caule de milho. Os resultados revelaram um maior rendimento na conversão da celulose contida na medula (24% após 24 h de hidrólise) guando comparada ao córtex (5 % no mesmo tempo de reação). Jung e Casler (2006) também demonstraram que a recalcitrância da medula de milho é menor ao tratar cortes microscópicos do colmo com rúmen. Ao fim de 24h de hidrólise, o resultado visual revelou que células do parênquima da medula foram digeridas e feixes vasculares e células da região do córtex permaneceram intactos. Em outro estudo com variedades de cana-de-açúcar com teores contrastantes de lignina, avaliouse a recalcitrância de diferentes regiões do entrenó. A medula foi a região com mais baixa recalcitrância, sendo digerida prontamente (50% - 85% de conversão da celulose), sem nenhum pré-tratamento além da moagem; o córtex, no entanto, mostrou-se bastante recalcitrante, especialmente na variedade com mais lignina, com valores de conversão de celulose entre 10% e 38% (COSTA et al., 2013). Diferentes respostas à hidrólise enzimática também foram observadas quando comparadas as regiões do nó, o qual é mais lignificado, e entrenó de cana-de-açúcar (BRIENZO et al., 2016). As biomassas provenientes do entrenó foram mais facilmente digeridas do que as do nó (cerca de 25-30% a mais), mesmo quando pré-tratadas com ácido ou base.

Figura 10 – Micrografias de microscopia confocal de cortes transversais de caule de milho tratados com celulases fúngicas marcadas com corante fluorescente. A – região do feixe vascular mostrando ligação das celulases (em verde); B – micrografia combinada com a autofluorescência da lignina (em vermelho).



Fonte: Ding et al., (2012).

2.5 DISTRIBUIÇÃO TOPOQUÍMICA DE COMPONENTES DA PAREDE CELULAR

Um grande número de relatos na literatura indica que a presença de lignina e hemicelulose na parede celular afetam de forma efetiva a recalcitrância de materiais lignocelulósicos (item 1.4.1). O mapeamento desses componentes da parede celular vegetal tem sido uma ferramenta útil para melhor se entender a variação da recalcitrância em biomassas provenientes de diferentes tecidos vegetais (FERRAZ et al., 2014). A distribuição topoquímica da lignina e de ácidos hidroxicinâmicos de cana-de-açúcar foi avaliada em estudos recentes através da microespectrofotometria no ultravioleta (UV), indicando que esses componentes estão distribuídos diferencialmente entre os três principais tipos celulares (célula do parênquima, vaso e fibra) e diferentes regiões do entrenó (COSTA et al., 2013; SIQUEIRA et al., 2011). Através dessa técnica é ainda possível avaliar a deposição da lignina em tecidos vegetais em processo de maturação (BOTTCHER et al., 2013; HE; TERASHIMA, 1990, 1991).

O mapeamento de hemiceluloses é geralmente realizado a partir do uso de anticorpos monoclonais específicos para um determinado componente da parede celular vegetal (FERRAZ et al., 2014). A detecção microscópica se dá geralmente através de anticorpos secundários contendo componentes como partículas de ouro ou fluoróforos (KIM; DANIEL, 2012).

2.5.1 IMUNOFLUORESCÊNCIA

A imunofluorescência é uma técnica microscópica que faz uso da especificidade de anticorpos a seus antígenos a fim de detectar e localizar biomoléculas de interesse. Essa detecção se dá através da fluorescência produzida por fluoróforos ligados aos anticorpos. Essa técnica tem sido usada principalmente na análise de componentes celulares, sejam eles moléculas de DNA, proteínas ou polímeros da parede celular vegetal como xilanas e arabinoxilanas (MCCARTNEY; MARCUS; KNOX, 2005). Por exemplo, Ding et al. (2012) utilizaram essa ferramenta ao marcar celulases e moléculas de interesse com um anticorpo fluorescente para avaliar a extensão da ligação dessas moléculas na parede celular dos diferentes tipos celulares de milho. Isso demonstra o quão versátil é essa técnica podendo ser aplicada de diversas formas.

Nos últimos anos, vários anticorpos específicos para componentes da parede celular vegetal foram desenvolvidos, incrementando o método imunohistoquímico e possibilitando que análises topoquímicas de componentes da parede sejam realizadas em diferentes tipos de plantas. Por exemplo, através da imunolocalização, Chang et al. (2013) observaram que o sinal fluorescente de anticorpos contra epítopos de xilana foram mais intensos em volta de feixes vasculares de bambu, especialmente nas paredes secundárias mais espessas de fibras. Os autores também puderam observar diferenças na deposição de componentes da parede celular através do tempo de maturação e localização dos entrenós. As análises mostraram que a deposição de xiloglucana está associada com a deposição de pectina e xilana. Em um outro estudo com milho, a imunofluorescência foi utilizada para avaliar a redistribuição da xilana depois de a biomassa ser pré-tratada com ácido diluído (BRUNECKY, 2009). Em geral, foi observado que depois do pré-tratamento a fluorescência referente aos epítopos de xilanas se deslocou do centro da parede celular para as bordas – tanto no sentido do lúmen como da lamela média. Em outro estudo com arroz, foi possível detectar a presença de glucanas mistas em parede de células lignificadas do caule e folhas, algo até então incomum (VEGA-SÁNCHEZ et al., 2013).

monoclonais da Anticorpos para componentes parede celular. principalmente polissacarídeos não celulósicos, também tem sido utilizados na análise de extratos líquidos da biomassa. Uma técnica chamada perfil glicômico (glycome profiling em inglês) envolve o fracionamento da parede celular por extração sequenciada de biomassas com diferentes soluções de sais e álcalis e o uso de vários anticorpos contra cada um dos extratos (PATTATHIL et al., 2012; SOUZA et al., 2013). Estes extratos podem conter oligômeros e polissacarídeos provenientes da parede celular, os quais podem ser detectados em placas de nitrocelulose quando ELISA ou até mesmo membranas de testados imunologicamente.

3 OBJETIVOS

Estudar como a distribuição da hemicelulose na parede celular se correlaciona com a recalcitrância frente à hidrólise enzimática em cana-de-açúcar e sorgo forrageiro, empregando variedades de cana-de-açúcar com teores contrastantes de lignina e hemicelulose e sorgo forrageiro como plantas modelo.

Para atingir o objetivo foram executadas as etapas descritas a seguir:

- A partir de entrenós das amostras, foram obtidas frações correspondentes ao córtex, à interface córtex-medula e à medula;
- A composição química de cada amostra foi determinada;
 - A hemicelulose foi caracterizada quimicamente;
 - A estrutura de arabinoxilanas foi analisada;
 - A composição monomérica da lignina foi avaliada;
- Cada material foi caracterizado quanto ao seu índice de cristalinidade;
- A distribuição das hemiceluloses foi avaliada pela técnica de imunofluorescência;
- As frações de cada amostra estudada foram submetidas à digestão enzimática direta com celulases comerciais;
- Os dados de digestibilidade foram correlacionados com as características das paredes celulares.

4 METODOLOGIA

A maior parte dos procedimentos foram realizados no Laboratório de Ciências da Madeira da Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP). A realização de experimentos em outros locais ou em colaboração estão especificados.

4.1 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS DE GRAMÍNEAS

As amostras de cana-de-açúcar foram selecionadas dentro de um grupo de híbridos desenvolvidos experimentalmente por pesquisadores da Universidade Federal de Viçosa (projeto CNPq 552741/2007-8, coordenador Dr. Márcio Barbosa) junto à RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético) (Tabela 2). As plantas em guestão foram selecionadas por apresentarem teores diferenciados de lignina e hemicelulose, levando-se em conta também outros fatores como resposta à hidrólise enzimática direta de todo o caule das plantas e produtividade das mesmas conforme apresentado por Masarin et al. (2011). Assim, do conjunto de 11 híbridos, 6 amostras foram selecionadas para o presente estudo. Os híbridos foram colhidos com 12 meses de cultivo, tendo sido gerados como rebrotamento de um segundo corte da canade-açúcar originalmente plantada (3º corte) em 10 de Março de 2010. O primeiro corte foi realizado após 18 meses de cultivo (em Agosto de 2011). O segundo corte foi realizado em Agosto de 2012 e o terceiro corte (usado no presente estudo) foi realizado em 06 de Junho de 2013. As plantas foram cultivadas em um campo experimental localizado na área I da Escola de Engenharia de Lorena -Universidade de São Paulo. Cada caule colhido foi devidamente numerado. Os 2 primeiros entrenós desde a base foram descartados e foram coletados os próximos 5 entrenós. As extremidades dos caules foram seladas com filme de PVC e então armazenados a -18 °C até o momento de uso.

Para o sorgo, a amostra utilizada foi a variedade de sorgo forrageiro BRS 655 desenvolvido pela Embrapa Milho e Sorgo (EMS). As sementes fornecidas

pela EMS foram plantadas em Setembro de 2014 no mesmo campo experimental onde estavam os híbridos de cana-de-açúcar. A semeadura ocorreu conforme recomendação do desenvolvedor para produção de silagem (CULTIVO DO SORGO, 2014). O solo de cada cova foi suplementado com 100g de calcário dolomítico e 100g de adubo NPK 10:10:10. Ao longo do cultivo o solo foi irrigado e após germinação, o solo foi enriquecido com 20g de adubo NPK 10:10:10 em Outubro de 2014. Os caules foram colhidos depois de 90 dias de cultivo. Cada caule colhido foi devidamente numerado, os 2 primeiros entrenós desde a base foram descartados e os próximos 5 entrenós foram coletados. As extremidades dos caules foram seladas com filme de PVC e então armazenados a -18 °C até o momento de uso.

Híbridos	Lignina total	Hemicelulose	Glucanas	Extrativos	Soma
89	16,8 ± 0,1	$27,3 \pm 0,3$	40,3 ± 0,1	7,5 ± 0,1	92,0
146	18,6 ± 0,1	$31,6 \pm 0,8$	$40,9 \pm 0,3$	$2,4 \pm 0,1$	93,5
58	18,6 ± 0,1	$26,3 \pm 0,1$	$40,9 \pm 0,3$	$2,6 \pm 0,2$	88,4
53	$19,4 \pm 0,5$	$27,1 \pm 0,4$	$42,2 \pm 0,5$	2,7 ± 0,1	91,3
166	$19,6 \pm 0,5$	$31,5 \pm 0,1$	$43,2 \pm 0,4$	1,9 ± 0,1	96,2
87	$19,7 \pm 0,1$	$27,3 \pm 0,8$	$42,2 \pm 0,3$	$3,9 \pm 0,4$	93,1
321	$20,2\pm0,4$	31,0 ± 1,0	$40,4 \pm 0,5$	1,6 ± 0,3	92,9
50	$20,5 \pm 0,1$	$30,0 \pm 2,0$	42,0 ± 1,0	$2,5 \pm 0,1$	94,6
8	$20,5 \pm 0,4$	$26,6 \pm 0,7$	40,0 ± 1,0	$3,2 \pm 0,4$	90,0
121	$20,6 \pm 0,1$	$28,2\pm0,5$	39,0 ± 1,0	$4,9 \pm 0,2$	92,9
140	21,5 ± 0,2	$27,0 \pm 0,3$	$38,2 \pm 0,5$	5,1 ± 0,5	91,8
Bagaço de cana moído	$24,0 \pm 0,1$	26,0 ± 1,0	42,0 ± 2,0	$2,2 \pm 0,4$	93,8
Cultivar de referência	$24,5 \pm 0,5$	$25,2 \pm 0,4$	$38,2 \pm 0,2$	2,6 ± 0,1	90,5

Tabela 2 – Composição química de bagaços de cana-de-açúcar provenientes de híbridos, classificados em ordem crescente de teor de lignina.

Fonte: Masarin et al. (2011).

Os entrenós das amostras de cana-de-açúcar e sorgo foram separados em função das regiões típicas existentes nos entrenós de gramíneas conforme esquema ilustrado na Figura 11. Para a cana-de-açúcar, as frações corresponderam a medula, interface medula-córtex e córtex. A fração externa, correspondente à epiderme somada a uma parte da região mais periférica do córtex (cerca de 1-2 mm de espessura), foi descartada. Para o sorgo as frações corresponderam à medula e córtex apenas, devido ao diâmetro diminuto do caule. Para o preparo das frações os nós foram descartados e as regiões do entrenó delimitadas foram separadas com auxílio de um estilete no sentido longitudinal, gerando pequenos cavacos (Figura 12).

Figura 11 – Esquema apresentando o modo de separação das diferentes regiões da cana-de-açúcar e sorgo. Para definição das circunferências dividiu-se o raio em três e duas partes iguais, para cana-de-açúcar e sorgo, respectivamente.



Fonte: arquivo pessoal.

Para eliminação da sacarose, todos os cavacos foram submetidos à extração em Soxhlet com água destilada. A extração prosseguiu até que não houvesse açúcar significativo presente na água de extração (cerca de 5 ciclos de 8 h cada um). O teor de açúcares totais na água concentrada no balão de extração foi determinado através do método do fenol-ácido sulfúrico. O critério utilizado para definir o término da extração foi a ausência de cor no teste citado. O

teste em questão se deu com a mistura de 1 mL de amostra, 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado e 25 μL de fenol 80%. Os tubos foram agitados e resfriados a temperatura ambiente e a cor desenvolvida foi avaliada visualmente.

Figura 12 – Fragmentos obtidos após preparação das amostras do entrenó da cana-de-açúcar 146 e sorgo. O mesmo foi feito para todos os outros híbridos de cana-de-açúcar.



Fonte: arquivo pessoal.

As amostras de biomassa extraídas foram secas ao ar até aproximadamente 10% de umidade. Uma parte destas amostras foi moída em moinho com malha de 20 Mesh. Cada material moído teve sua umidade quantificada em balança OHAUS-IV e foi estocado em sacos plásticos à temperatura ambiente até o momento das análises. Uma outra parte dos cavacos foi mantida inteira e estocada a -18 °C até o momento das análises microscópicas.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

4.2.1 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA ATRAVÉS DA HIDRÓLISE COM ÁCIDO SULFÚRICO

Cerca de 1 g em (massa seca) das amostras de biomassa vegetal moída a 20 mesh foram extraídos em extrator de Soxhlet com etanol 95% durante 6 h. O teor de extrativos foi determinado pela diferença de massa antes e após o processo de extração. As amostras sem extrativos foram secas ao ar, tiveram nova umidade quantificada e então foram hidrolisadas com ácido sulfúrico para caracterização química (FERRAZ et al., 2000). Em tubo de ensaio, aproximadamente 0,075 g de material extraído foi mantido a 30 °C durante 1 hora na presença de 750 µL de ácido sulfúrico 72% (p / p). Em seguida foi adicionado ao tubo 20 mL de água destilada. O material parcialmente hidrolisado foi autoclavado a 120 °C / 1 atm por 1 h. Depois de resfriado o material foi filtrado a vácuo em filtro sinterizado nº 3 SCHOTT. O material retido foi seco em estufa a 100 °C até que atingisse massa constante para determinação gravimétrica de lignina insolúvel. Para determinação de lignina solúvel, o filtrado foi analisado em espectrofotômetro UV-visível a 205 nm considerando a absortividade da lignina solúvel igual a 105 L.g⁻¹.cm⁻¹. A fração solúvel foi ainda filtrada em SepPack C18 e analisada em HPLC para determinação do teor de açúcares monoméricos e ácido acético. Para isso foi utilizada uma coluna BioRad HPX-87H a 45 °C, ácido sulfúrico 0,005 mol.L⁻¹ como fase móvel e fluxo de 0,6 mL/min. Um detector de índice de refração foi utilizado a uma temperatura controlada de 35 °C. Todas as análises foram realizadas em triplicatas. Os valores apresentados na tese se referem às médias seguidas dos respectivos desvios padrão.

4.2.2 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS NÃO CELULÓSICOS

A composição da hemicelulose e outros polissacarídeos não celulósicos das amostras de cana-de-açúcar foram determinados a partir da hidrólise branda com ácido trifluoroacético (TFA), de acordo com ØBro et al. (2004). As amostras de cana-de-açúcar foram pré-tratadas com amilases para remoção de traços de amido. Para tanto, cerca de 30 mg (massa seca) das amostras moídas a 20 Mesh foram transferidas para tubos de 2 mL, aos quais foram adicionados 450 µL de tampão MOPS - ácido 3-(n-morfolino) propanosulfônico - (50mM, pH 7,0) contendo 3 U/mL de α-amilase (Megazyme). Essa reação foi incubada por 1h a 85 °C com agitação. Em seguida, 600 µL de tampão acetato de sódio (200 mM, pH 4,5) contendo 3 U/mL de amiloglicosidase e 1 U/mL de pulunanase (ambas da Megazyme) foram adicionados à reação, a qual foi incubada por 2h a 50 °C com agitação. Ao fim da reação, aos tubos foram adicionados cerca de 1 mL de etanol 96%. Os tubos foram então agitados em vórtex e posteriormente centrifugados por 5 min a 15000 G. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 1 mL de etanol 70%; o tubo foi novamente agitado em vórtex e centrifugado. Essa última etapa foi repetida, descartando-se sempre o sobrenadante. Ao final do tratamento enzimático as amostras foram secas à vácuo por uma noite em temperatura ambiente.

Cerca de 5-10 mg de amostras livres de amido (massa seca) foram então adicionadas a tubos de 2 mL para posterior hidrólise com TFA. Aos tubos com a biomassa livre de amido foram adicionados 850 µL de água deionizada e logo em seguida 150 µL de ácido trifluoroacético. A reação foi mantida a 120 °C por 1h. Ao fim da hidrólise ácida os tubos foram resfriados e o TFA evaporado sob vácuo por uma noite em temperatura ambiente. Com os materiais secos, 1 mL de água deionizada foi adicionada aos tubos, os quais foram agitados em vórtex até que não houvesse precipitado evidente. As amostras foram centrifugadas por 10 min a 15000 G e do sobrenadante foi coletado uma alíquota (cerca de 500 µL) para análise em cromatógrafo líquido com detector amperométrico pulsado (HPAEC-PAD). Para as análises foi utilizada uma coluna de troca iônica do tipo PA-20 (Dionex) com fluxo de 0,4 mL/min. Como eluentes foram utilizados NaOH 10 mM

por 10 min seguido de NaOH 450 mM por 20 min. Os açúcares foram detectados através do uso de padrões externos (Sigma). Todas as análises foram realizadas em triplicatas. Os valores apresentados na tese se referem às médias seguidas dos respectivos desvios padrão. Esse procedimento foi realizado no Joint BioEnergy Institute (JBEI), Emeryvile, Califórnia (EUA).

Os polissacarídeos não-celulósicos das amostras de sorgo foram avaliadas segundo o procedimento de metanólise ácida, seguida de acetilação dos monômeros e caracterização por cromatografia gasosa. Essa análise foi realizada no Laboratório de Recursos Renovables da Universidad de Concepción, Chile, seguindo a metodologia descrita por Bertaud, Sundemberg e Holmbom (2002).

4.2.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE (1→3),(1→4)-ß-D-GLUCANAS

As $(1\rightarrow 3), (1\rightarrow 4)$ -ß-D-glucanas foram detectadas e quantificadas através do uso do Kit Megazyme baseado no método descrito em McCleary e Codd (1991) para análise de glucanas mistas. Para extração das glucanas mistas, cerca de 5 a 10 mg de amostras livre de amido foram extraídas em tubos de 2 mL. A biomassa foi umidificada com 20 µL de solução de etanol (50% v/v) e em seguida 400 µL de tampão fosfato de sódio (20 mM, pH6,5) foi adicionado ao tubo. Ao serem agitados, os tubos foram imediatamente incubados em água fervente por 1min, agitados novamente e então incubados a 100 °C por mais 2min. Depois dos tubos permanecerem a 50 °C por 5min, foi adicionado à mistura 20 µL da liguenase (1 U) e os tubos incubados por 1h a 50 °C com agitação vigorosa contínua. Posteriormente, 500 µL de tampão acetato (200 mM, pH 4,0) foi adicionado. Os tubos foram resfriados a temperatura ambiente (cerca de 22 °C) e centrifugados a 1000 g por 10 min. Alíquotas de 10 µL do sobrenadante foram adicionadas a novos tubos de 2 mL aos guais também foram adicionados 10 µL de ß-glicosidase (0,02 U) em tampão acetato de sódio (50 mM, pH 4,0). Os novos tubos foram incubados por 1h a 50 °C. Em seguida, foram adicionados 300 µL do reagente GOPOD (glucose oxidase/peroxidase em inglês) aos tubos de reação e então as misturas foram incubadas a 50 °C por mais 20 min. Após 1h depois do fim do ensaio, a absorbância das soluções foi medida a 510 nm em espectrofotômetro. A

quantidade de beta-glucanas foi calculada segundo fórmula contida no kit utilizado: *Glucanas mistas (% m / m)* = $\Delta A \times \frac{F}{M} \times 8,46$, onde ΔA representa a diferença de absorbância entre amostra e branco, **F** é o fator de conversão de valores de absorbância para massa de glicose (*F=100/Absorbância de 100 µg de glicose*) e **M** é a massa seca inicial da amostra. Todas as análises foram realizadas em triplicatas. Os dados reportados correspondem à média seguida dos respectivos desvios padrão.

4.2.4 CARACTERIZAÇÃO DE ARABINOXILANAS DE CANA-DE-AÇÚCAR POR "FINGERPRINTING"

As xilanas de cada amostra de cana-de-açúcar foram caracterizadas quanto a sua estrutura segundo o método de "fingerprinting" descrito em Chiniquy et al., (2012), com algumas modificações. A arabinoxilana e outros polissacarídeos da hemicelulose foram extraídos das amostras com KOH 4M, contendo 1% de NaBH₄. A extração ocorreu à temperatura ambiente em tubos falcon de 50 mL, com uma suspensão de 10 mg de material / mL de KOH 4M, durante 24h com agitação constante (100 rpm). Após incubada, a suspensão foi centrifugada por 15 min a 4000 g e o sobrenadante transferido para outro tubo. Os extratos foram então dialisados por 48h com água deionizada (com guatro trocas de água) a 4 °C, liofilizados e pesados. Os extratos liofilizados foram diluídos com água deionizada a uma concentração de 0,2 mg / mL e o teor de açúcares totais estimado pelo método do fenol-ácido sulfúrico descrito em Pattathil et al. (2012). Em seguida as amostras foram diluídas a fim de que a concentração de açúcares fosse 20 µg / mL para todos extratos. Os extratos foram estocados a -20 °C até o momento de uso. Dos extratos preparados, 1,5 mL foi incubado com 1U de endoxilanase M6 (família GH11 - Megazyme) em tampão acetato de amônio (0,05M, pH 6,0), a 42 °C durante 24h. A reação foi interrompida incubando os tubos a 100 °C por 10 min. As amostras foram então centrifugadas e os oligossacarídeos no sobrenadante separados em um cromatógrafo líquido Dionex DX600 equipado com detector amperométrico pulsado e coluna de troca iônica CarboPac PA200 (3x 250 mm). Três eluentes foram utilizados: água deionizada, NaOH 0,1M e NaOH 100mM/acetato de sódio 1M. Picos referentes a xilose, xilobiose e outros xilooligossacarídeos foram identificados, segundo padrões analisados previamente. Esse procedimento foi realizado no Joint BioEnergy Institute (JBEI), Emeryvile, Califórnia (EUA)

4.2.5 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE CRISTALINIDADE DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

O índice de cristalinidade dos materiais foi determinado por técnica de raio-X. As amostras moídas a 20 Mesh e secas ao ar foram analisadas em difratômetro de raio-X com radiação de cobre (Panalytical). Para o cálculo do índice de cristalinidade utilizou-se o método da altura dos picos, como descrito por Park et al., (2010). A fórmula utilizada foi: $IC = (I_{002} - I_{am})/I_{002}$, onde IC é o índice de cristalinidade, I_{002} é a intensidade do pico 002 em aproximadamente 22 graus de 20 e I_{am} é a intensidade do vale entre os picos 101 e 002 em aproximadamente 19 graus de 20 (Figura 13). Todas as análises foram realizadas em triplicatas. Os dados reportados correspondem à média seguida dos respectivos desvios padrão.

4.2.6 COMPOSIÇÃO HGS DA LIGNINA EM AMOSTRAS DE CANA-DE-AÇÚCAR

A composição química da lignina das amostras de cana-de-açúcar foi analisada por pirólise seguida de cromatografia gasosa (GC/espectrometria de massa - GC/MS), utilizando o método descrito por Del Río et al. (2012) com algumas modificações. Para preparação, amostras moídas e secas ao ar foram extraídas com diferentes solventes para remoção de possíveis interferentes do processo, provenientes de extrativos e pectina. Em tubos falcon de 50 mL, 200 mg (peso seco) de material foram extraídos com diversos solventes, aplicados de

forma sequencial. Em todo o procedimento, os 200 mg originais de amostra foram tratados com 40 mL de solvente e a mistura submetida a um banho de ultrassom por 20 min. Após cada tratamento, a mistura foi centrifugada (10 min, 2800*g*) e o solvente descartado. Os solventes empregados foram, sequenciamente: etanol 80 % (v / v) (sendo a extração repetida mais duas vezes); acetona; clorofórmio:metanol (1:1) e acetona. As amostras sólidas residuais foram então secas ao ar.

Figura 13 – Difratograma de raio-x de Avicel PH-101. Os picos 101 e 002 empregados no cálculo do índice de cristalinidade estão representados.



Fonte: Park et al. (2010).

A pirólise das amostras extraídas foi realizada com ajuda de um pirolisador Pyroprobe 5200 (CDS Analytical, Inc.) acoplado a um GC/MS (Thermo Electron Corporation com cromatógrafo a gás do tipo Trace e espectrômetro de massa Polaris-Q) equipado com uma coluna Agilent HP-5MS (30m x 0,25 mm de diâmetro, 0,25 µm em espessura do filme de fase estacionária). A reação de pirólise ocorreu a 550 °C. O cromatógrafo foi programado para atuar na faixa de 50 °C (1min) a 300 °C, a uma taxa de 30 °C/min. A temperatura final foi mantida por 10 min. O gás hélio foi utilizado como carreador com fluxo constante de 1 mL/min. O espectrômetro de massa foi operado no modo de detecção de íons totais entre 50 e 650 u.m.a. e a fonte de íons foi mantida a 300 °C. Os compostos foram identificados de acordo com a biblioteca NIST (*National Institute of Standards and Technology*, EUA) e estudos prévios (DEL RÍO; GUTIÉRREZ, 2006; DEL RÍO et al., 2015; LOPES et al., 2011; RALPH; HATFIELD, 1991). As áreas dos picos foram calculadas para os produtos de degradação da lignina e as áreas somadas foram normalizadas. Os dados foram apresentados em termos de porcentagem de lignina S, G e H e razão S/G. Todas as análises envolvendo lignina foram realizadas no Joint BioEnergy Institute (JBEI), Emeryvile, Califórnia (EUA)

4.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM CELULASES COMERCIAIS

Para a hidrólise enzimática dos diversos materiais lignocelulósicos estudados, foi utilizada a preparação enzimática comercial Cellic CTec 2 (Novozymes). Papel de filtro foi utilizado para determinar a atividade enzimática de celulase em unidades de papel de filtro (FPU) de acordo com Mandels, Andreotti e Roche (1976). O teor de proteínas totais foi estimado pelo método de Lowry, segundo Ghose (1987).

As amostras moídas foram hidrolisadas com 10 FPU / g de substrato, cerca de 35 mg proteína / g de substrato. As reações foram realizadas em tubos de 2,0 mL com consistências de 2% de substrato. O volume final da reação foi de 1 mL com tampão citrato de sódio 100 mM, pH 5,0 contendo 0,01% de azida sódica. Os experimentos foram realizados sob agitação de 120 rpm e a 45 ± 2 °C por 72 h. Durante o processo de sacarificação, as reações foram amostradas em intervalos de 4, 8, 24, 48 e 72 h. Nos pontos de amostragem os tubos foram transferidos para banho de gelo para parada de reação e então centrifugados a 3400*g* por 15 min a 10 °C. Uma alíquota de 20 μ L foi coletada do sobrenadante e diluída com água destilada para determinação dos teores de glicose e xilose em HPLC, conforme descrito no ponto 3.2.1. Glucana mista também foi hidrolisada nas mesmas condições, substituindo a biomassa por $(1\rightarrow3),(1\rightarrow4)$ -ß-D-glucanas de cevada (Megazyme) e hidrólise de 48h. Em todos experimentos foi coletada uma alíquota controle, logo após adição da enzima (tempo zero). Os açúcares

presentes na amostra controle foram subtraídos das subsequentes amostragens. Todas as análises foram realizadas em triplicatas. Os dados reportados correspondem à média seguida dos respectivos desvios padrão.

A fim de checar se o extrato comercial continha atividade de xilanase insuficiente, novas hidrólises foram realizadas para se avaliar a suplementação com xilanase e β -xilosidase (10 U / g de substrato, cada). Essas enzimas foram purificadas de *Celvibrio mixtus* e *Selenomonas ruminantium*, respectivamente, e fornecidas pela Megazyme. Essas novas hidrólises foram realizadas a 50 ± 2 °C e em triplicatas. Todas as análises foram realizadas em triplicatas. Os dados reportados correspondem à média seguida dos respectivos desvios padrão.

4.4 ENSAIOS IMUNOLÓGICOS DE AMOSTRAS DE CANA-DE-AÇÚCAR

Todas as análises com anticorpos e fluorescência foram realizadas em conjunto com o Joint BioEnergy Institute (JBEI), Emeryvile, Califórnia (EUA).

4.4.1 AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS NA PRESENÇA DE EXTRATOS HEMICELULÓSICOS - DOT BLOTS

Extratos hemicelulósicos foram utilizados para análises imunológicas semiquantitativas com anticorpos específicos para componentes da parede celular vegetal (dot blots). A extração da hemicelulose ocorreu à temperatura ambiente em tubos de 2 mL com uma suspensão de 10 mg de material / mL de KOH 4M, durante 24h com agitação constante (600 rpm). Após incubada, a suspensão foi centrifugada por 15 min a 4000 *g* e o sobrenadante transferido para outro tubo. O extrato foi neutralizado com ácido acético 8,7M e diluições seriadas 1:10 dos extratos foram preparadas. Em seguida, dois microlitros de cada diluição foram adicionados à superfície de uma membrana de nitrocelulose, com duas replicatas cada. A membrana foi lavada com tampão PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mL, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4) por 5 min e bloqueada com leite em pó sem gordura dissolvido em PBS, a 5%, por no mínimo 1h. Após bloqueadas, as membranas foram tratadas com anticorpos monoclonais primários, seguidos de anticorpos secundários, ambos diluídos em leite/PBS, segundo a Tabela 3. O tratamento com anticorpo primário foi a 4 °C, *overnight* e agitação constante. O tratamento com anticorpo secundário se deu em temperatura ambiente, durante 1h e agitação constante. As membranas foram lavadas com tampão PBS por 5 min, três vezes, entre a aplicação do anticorpo primário e o secundário. Ao fim da reação com anticorpo secundário as membranas também foram lavadas com tampão PBS quatro vezes e em seguida tratadas com kit de detecção Supersignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific). As ligações dos anticorpos aos extratos hemicelulósicos nas membranas foram identificadas através da produção de quimioluminescência em câmara escura. Uma membrana livre de extratos foi adicionada como controle negativo.

4.4.2 MAPEAMENTO DAS HEMICELULOSES ATRAVÉS DA IMUNOFLUORESCÊNCIA

Componentes da hemicelulose da parede celular de canas-de-açúcar foram mapeados através da imunofluorescência, que utiliza a fluorescência de anticorpos para detecção indireta de epítopos em cortes microscópicos. Cortes histológicos de cada região dos entrenós com 60-80 µm de espessura foram produzidos para cada uma das amostras através de um micrótomo de vibração Leica VT1000S. Em seguida, os cortes foram transferidos para placa de 24 poços contendo tampão PBS. O tampão foi trocado por três vezes para lavagem de 5min com agitação constante. Os cortes então foram bloqueados com 500 µL de leite em pó sem gordura dissolvido em PBS a 5%, por no mínimo 1h. Após bloqueados, os cortes foram tratados com anticorpos monoclonais primários, seguidos de anticorpos secundários, ambos diluídos em leite/PBS, segundo a Tabela 3.Cada tratamento ocorreu com 500 µL de anticorpo diluído em leite/PBS, durante 1h, com agitação constante. Os cortes foram lavados com PBS por 5 min, três vezes, entre a aplicação do anticorpo primário e o secundário. Ao fim da reação com anticorpo secundário os cortes foram novamente lavados com

tampão PBS quatro vezes. Ao fim do tratamento com anticorpos os cortes foram dispostos em lâminas e observados em microscópio Leica DM 4000 B, com os seguintes cubos de filtro para fluorescência: TX2 para Alexa Fluor 568 e YFP para Alexa Fluor 514. Micrografias das amostras foram obtidas e o software ImageJ foi utilizado para processar as imagens.

Tabela 3 – Anticorpos envolvidos em experimentos imunológicos. Os anticorpos foram diluídos com tampão PBS contendo 5% de leite em pó sem gordura.

Dot blots							
An	ticorpos primários	5	Anticorpos secundários				
Nome	Epítopo	Diluição	Anticorpo*	Diluição			
LM10	Xilana	1:100	HRP* anti-	1:15000			
LM11	Arabinoxilana	1:100	camundongo	1:15000			
CCRC M140	Xilana	1:100	HRP* anti-rato				
MLG	Glucanas mistas	1:10000		1:15000			
	Imu	nohistoquín	nica				
Anticorpos primários Anticorpos secuno			Indários				
Nome	Epítopo	Diluição	Anticorpo	Diluição			
I M11	Arabinovilana	1:10	Alexa Fluor 568	1.10000			
			anti-camundongo	1.10000			
CCRC M140	Xilana	1:10	Alexa Fluor 514	1:10000			
MLG	Glucanas mistas	1:1500	anti-rato	1:10000			

*HRP: peroxidase de raiz-forte

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dois tipos de gramíneas foram selecionadas: cana-de-açúcar e sorgo. Seis linhagens de um grupo de híbridos de cana-de-açúcar com teores de lignina contrastantes foram selecionados a partir dos dados listados na Tabela 2. Os híbridos de cana-de-açúcar 58, 89, 140, 146, 166 e 321 foram escolhidos com base na quantidade de lignina e hemicelulose total presente nas plantas. Para o sorgo, uma linhagem do tipo forrageiro, proveniente da Embrapa, foi selecionada. Para os experimentos realizados, os entrenós foram dissecados a fim de representar três regiões do entrenó, sendo elas a medula, a interface e o córtex para cana-de-açúcar e duas regiões para o sorgo: medula e córtex. As amostras foram então avaliadas quanto a composição química de sua hemicelulose e lignina e foram submetidas a análises com anticorpos específicos para componentes da parede celular e tratamentos enzimáticos.

5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE ENTRENÓS DE CANA-DE-AÇÚCAR E SORGO

A biomassa lignocelulósica proveniente de cada uma das regiões das gramíneas em estudo foi caracterizada quimicamente como mostrado na Tabela 4. Para os híbridos de cana-de-açúcar, as frações da medula apresentaram alto teor de glucanas (40 - 55 %) e baixo teor de lignina (14 - 22 %). Por outro lado, amostras do córtex apresentaram-se mais lignificadas (20 - 22 %) e com menor teor de glucanas (40 - 44 %). Hemiceluloses totais (xilana mais arabinosil mais acetil) tiveram teores similares na medula (21 - 27 %), interface (24 - 28 %) e córtex (25 - 28 %). Os teores de xilana por si só, no entanto, aumentaram no sentido da medula (14 - 20 %) para o córtex (20 - 23 %). Em sorgo, observou-se uma distribuição diferente para os teores de glucanas e hemiceluloses totais entre medula e córtex. A medula apresentou um baixo teor relativo de glucanas (40%) e alto teor de hemiceluloses totais (25%), enquanto o córtex apresentou o maior teor de glucanas (44%) e menor teor de hemiceluloses totais (22%). A distribuição

foi similar para o teor de lignina com 22% em medula e 25% no córtex. Foi calculada a proporção em massa seca das frações do entrenó do sorgo (90% para o córtex e 10% para a medula). Esses dados em conjunto com o teor de lignina possibilitam estimar o teor total de lignina através de uma média ponderada (24,5%). Esse valor coloca o sorgo como a variedade com maior teor de lignina comparada às outras amostras estudadas. Esta alta quantidade de lignina, além de xilana e baixo teor de glucanas, proporciona uma maior semelhança do sorgo com o híbrido de cana-de-açúcar 140, o mais lignificado dentre os híbridos.

A composição detalhada das hemiceluloses de cada amostra também foi analisada. Para os híbridos de cana-de-açúcar utilizou-se o método de hidrólise ácida com TFA, o qual praticamente não hidrolisa celulose cristalina e assim permite avaliar a composição de monossacarídeos não-celulósicos (ØBRO et al., 2004). Observou-se que xilose (9 - 19 %), seguido de glicose (1 - 12 %) e arabinose (2 - 4 %), foram os monossacarídeos mais abundantes liberados na hidrólise com TFA (Tabela 5). No entanto, a quantidade de xilose liberada por TFA foi menor quando comparada com aquela liberada no hidrolisado preparado com ácido sulfúrico, o que sugere que a hidrólise da hemicelulose foi incompleta nas condições de reação utilizadas. Outros açúcares também foram detectados no hidrolisado com TFA, porém em menor quantidade como, galactose (0,2 - 1,1 %), ramnose (0,07 - 0,16 %), ácido galacturônico (0,2 - 0,6 %) e traços de fucose e ácido glucurônico. Picos do cromatograma referentes ao ácido 4-Ometilglucurônico também foram detectados, mas não quantificados devido a inexistência de padrão analítico deste composto.

Os dados obtidos a partir da hidrólise com TFA corroboram os da hidrólise com ácido sulfúrico (Tabela 4) que indicam que GAX substituída com grupos acetil predomina nas hemiceluloses de cana-de-açúcar com teores de xilana aumentado da medula para o córtex, independentemente do híbrido estudado. Além disso, observou-se que os teores de arabinose diminuem da medula para o córtex, indicando que as GAXs do córtex são menos substituídas com grupos arabinosil do que as GAXs de medula. A detecção de galactose, ramnose e ácido galacturônico indica que pectina está presente na parede celular das amostras de cana-de-açúcar, mesmo que em pequenas quantidades (HARHOLT et al., 2010).

ğ
Ę,
SC
Ð
σ
<u>e</u>
ă
ğ
Ŀ.
/a
<u>_</u>
Ĕ
Ъ
Ð
Ē
ö
Ϋ́,
ğ
φ
ģ
ά
ЯU
ö
Ð
р
SC
ğ
Ľ.
Ĵ,
~
ë
ц
Ð
ē
Чİ
ŝ
Ū.
Ō
<u>e</u>
.0
цĊ
ē
Jti
ē
0
σ
ŝ
ŏ
aç
fr
Ð
q
Sa
ĭ
Ĩ,
nb
õ
ສັ
ŝ.
00
đ
ž
0
Ÿ
-
7
ğ
a

				Composi	ção química (%	<u>6, m/m em mi</u>	assa seca)		
Variedades gramíneas	Região do entrenó	Extrativos em etanol	Glucana	Xilana	Arabinosil	Acetil		Lignina	
5						1	Insolúvel	Solúvel	Total
H 89	Medula	1,4 ± 0,2	$55,0 \pm 0,1$	$14,5 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,1$	2,7 ± 0,1	$11,0 \pm 0,5$	2,9 ± 0,3	13,9 ± 0,4
	Interface	2,2 ± 0,1	$46,5 \pm 0,3$	$18,9 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,1$	3,5 ± 0,1	$17,3 \pm 0,2$	3,2 ± 0,3	20,5 ± 0,3
	Córtex	2,6 ± 0,1	$43,7 \pm 0,3$	$22,7 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$	3,7 ± 0,1	$19,4 \pm 0,5$	2,3 ± 0,2	21,7 ± 0,4
H 146	Medula	3,2 ± 0,1	$44,1 \pm 0,5$	20,4 ± 0,1	2,6 ± 0,1	4,1 ± 0,1	$15,0 \pm 0,4$	2,9 ± 0,1	$17,9 \pm 0,3$
	Interface	4,8 ± 0,2	$38,1 \pm 0,9$	20,7 ± 0,6	1,8 ± 0,1	4,2 ± 0,2	$18,8 \pm 0,1$	3,3 ± 0,4	$22,0 \pm 0,3$
	Córtex	4,3 ± 0,4	$43,6 \pm 0,1$	21,3 ± 0,1	1,1 ± 0,1	3,6 ± 0,1	$18,9 \pm 0,2$	2,8 ± 0,4	$21,6 \pm 0,3$
H 58	Medula	$1,4 \pm 0,2$	$51,8 \pm 0,1$	$17,5 \pm 0,1$	2,9 ± 0,1	3,9 ± 0,3	10,2 ± 0,2	4,1 ± 0,7	$14,3 \pm 0,5$
	Interface	$3,4 \pm 0,2$	$47,0 \pm 0,1$	$19,9 \pm 0,1$	2,4 ± 0,1	4,0 ± 0,1	14,3 ± 0,9	2,7 ± 0,2	$17,0 \pm 0,6$
	Córtex	$3,0 \pm 0,2$	$44,1 \pm 0,2$	$22,5 \pm 0,2$	1,4 ± 0,1	4,3 ± 0,3	16,8 ± 0,7	3,3 ± 0,1	$20,1 \pm 0,5$
H 166	Medula	3,3 ± 0,2	$50,0 \pm 0,1$	$17,6 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$	3,4 ± 0,1	14,1 ± 0,1	2,7 ± 0,1	16,9 ± 0,1
	Interface	5,1 ± 0,1	$42,1 \pm 0,6$	20,1 ± 0,2	$1,6 \pm 0,1$	3,6 ± 0,4	18,0 ± 0,1	2,8 ± 0,1	20,8 ± 0,1
	Córtex	3,2 ± 0,1	$43,8 \pm 0,1$	20,4 ± 0,3	$1,2 \pm 0,1$	3,7 ± 0,1	19,2 ± 0,1	2,4 ± 0,1	21,6 ± 0,1
H 321	Medula	$5,1 \pm 0,1$	$43,1 \pm 0,1$	$19,6 \pm 0,5$	$2,9 \pm 0,2$	3,7 ± 0,1	$16,9 \pm 0,1$	3,2 ± 0,1	$20,1 \pm 0,1$
	Interface	$2,4 \pm 0,2$	$38,5 \pm 0,2$	$20,2 \pm 0,1$	1,9 \pm 0,1	4,1 ± 0,1	$20,8 \pm 0,1$	3,0 ± 0,2	$23,8 \pm 0,1$
	Córtex	$4,0 \pm 0,1$	42 ± 2	$20,7 \pm 0,7$	1,4 \pm 0,1	3,8 ± 0,1	$19,5 \pm 0,2$	2,4 ± 0,1	$22,0 \pm 0,2$
H 140	Medula	$3,6 \pm 0,1$	$39,9 \pm 0,4$	$19,2 \pm 0,2$	2,0 ± 0,1	3,0 ± 0,3	$19,0 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,5$	$21,9 \pm 0,4$
	Interface	$2,5 \pm 0,3$	$40,8 \pm 0,1$	$21,6 \pm 0,1$	1,8 ± 0,1	4,6 ± 0,1	$17,5 \pm 0,9$	$3,2 \pm 0,8$	$20,7 \pm 0,8$
	Córtex	$3,1 \pm 0,1$	$40,5 \pm 0,7$	$22,1 \pm 0,4$	1,3 ± 0,1	3,1 ± 0,4	$19,8 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,1$	$22,4 \pm 0,2$
Sorgo	Medula	$6,29 \pm 0,2$	$39,7 \pm 0,5$	$22,0 \pm 0,6$	2,2 ± 0,1	0,6 ± 0,1	$19,0 \pm 0,6$	3,0 ± 0,2	$22,0 \pm 0,5$
	Córtex	$3,87 \pm 0,2$	$43,6 \pm 1,7$	$20,8 \pm 0,8$	1,1 ± 0,1	0,6 ± 0,1	22,5 ± 0,4	2,3 ± 0,1	$24,8 \pm 0,3$

hidrólise br	anda com ác	cido trifluoroacé	itico (TFA) 2 mo	I.L ⁻¹ .				
Híbridos	Região	A	Vçúcares monon	réricos liberados	s por hidrólise c	om TFA (%, m/	m em massa sec	a)
de cana- de-açúcar	do entrenó	Ramnose	Arabinose	Galactose	Glicose	Xilose	Ácido galacturônico	Ácido glucurônico
H 89	Medula	0,15 ± 0,02	3,2 ± 0,6	$0,8 \pm 0,2$	12 ± 2	11 ± 2	$0,5 \pm 0,1$	traços
	Interface	0,14 ± 0,01	2,7 ± 0,1	$0,6 \pm 0,1$	8,8 ± 0,8	12,6 ± 0,5	$0,4 \pm 0,1$	traços
	Córtex	0,09 ± 0,01	1,9 ± 0,1	$0,3 \pm 0,1$	4,3 ± 0,4	15 ± 1	$0,4 \pm 0,1$	nd
H 146	Medula	0,17 ± 0,04	3,7 ± 0,7	0,9 ± 0,2	$12,3 \pm 0,2$	9 ± 1	0,7 ± 0,1	traços
	Interface	0,11 ± 0,01	2,6 ± 0,2	0,6 ± 0,1	$8,7 \pm 0,7$	13 ± 1	0,5 ± 0,1	traços
	Córtex	nd	1,9 ± 0,2	0,3 ± 0,1	$2,7 \pm 0,9$	14 ± 1	0,3 ± 0,1	nd
H 58	Medula	$0,13 \pm 0,02$	2,9 ± 0,1	0,7 ± 0,1	6,3 ± 0,2	15,2 ± 0,9	0,5 ± 0,1	traços
	Interface	$0,09 \pm 0,04$	2,3 ± 0,7	0,4 ± 0,1	1,9 ± 0,5	16 ± 4	0,5 ± 0,1	nd
	Córtex	$0,09 \pm 0,01$	2,1 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,9 ± 0,2	17,4 ± 0,7	0,4 ± 0,1	nd
H 166	Medula	0,16 ± 0,03	$3,4 \pm 0,7$	$0,7 \pm 0,2$	8 ± 1	15 ± 2	0,6 ± 0,1	traços
	Interface	0,09 ± 0,01	$2,4 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,1$	4,1 ± 0,6	16 ± 1	nd	nd
	Córtex	nd	$1,7 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$	2,2 ± 0,4	17,2 ± 0,9	0,4 ± 0,1	nd
H 321	Medula	0,12 ± 0,01	2,9 ± 0,1	$0,7 \pm 0,1$	$11,5 \pm 0,8$	$13,1 \pm 0,6$	$0,5 \pm 0,1$	traços
	Interface	0,09 ± 0,01	2,5 ± 0,1	$0,4 \pm 0,1$	$4,8 \pm 0,3$	$16,0 \pm 0,9$	$0,4 \pm 0,1$	nd
	Córtex	0,07 ± 0,02	1,8 ± 0,3	$0,3 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,3$	15 ± 2	$0,2 \pm 0,1$	nd
H 140	Medula Interface Córtex	$0,15 \pm 0,01$ $0,10 \pm 0,01$ $0,13 \pm 0,01$	3,9 ± 0,1 2,8 ± 0,3 3,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1 0,7 ± 0,1 0,7 ± 0,1	9,2 ± 0,3 4,4 ± 0,9 4,5 ± 0,5	$16,2 \pm 0,3$ $16,5 \pm 0,9$ $17,9 \pm 0,5$	0,5 ± 0,1 0,4 ± 0,1 0,4 ± 0,1	p p u p u
nd = não d€	stectado; fuc	cose não foi dete	ectada nas amo	stras avaliadas				

Tabela 5 - Composição dos polissacarídeos não celulósicos de seis diferentes híbridos de cana-de-açúcar determinada através de

65

A soma destes três principais açúcares permite estimar que substâncias pécticas. estão presentes principalmente na medula (1,2 - 2,6 %) da cana-de-açúcar, e o teor diminui no sentido do córtex (0,5 - 1,2 %) (Figura 14). Parte da arabinose detectada também poderia ser proveniente da pectina, especialmente na medula onde ambos teores de substâncias pécticas e arabinose são maiores. Resíduos de arabinose presentes na pectina se apresentam geralmente na forma de cadeias de unidades de arabinofuranosil ancoradas em ramnogalacturonanas I (CARPITA, 1996).

Figura 14 – Somatório dos principais açúcares que compõem pectina (ramnose, galactose e ácido galacturônico) detectados em amostras de cana-de-açúcar. Os açúcares monoméricos foram liberados por hidrólise branda feita com ácido trifluoracético (TFA) 2 mol.L⁻¹.



Fonte: arquivo pessoal

Para o sorgo, as amostras foram submetidas a análise detalhada das hemiceluloses por metanólise ácida. Os resultados mostraram que xilose foi o monossacarídeo mais abundante detectado em ambas regiões do sorgo (21 – 23 %) (Tabela 6). Em ordem de abundância foram também detectados glicose (3 – 5 %), manose (2 – 3 %) e arabinose (~ 1%). Diferente dos híbridos de cana-de-açúcar, os teores de xilana e arabinose da medula e córtex do sorgo

apresentados por esse método são similares, indicando que o padrão de substituição das xilanas por grupos arabinosil são semelhantes, o que é corroborado pelos dados da hidrólise das amostras com ácido sulfúrico. Ambas análises também confirmam que arabinoxilanas substituídas por grupos acetil são as principais hemiceluloses em sorgo. A detecção de manose pelo método de metanólise ácida indica que mananas estão presentes na hemicelulose de sorgo, mesmo que em pequenas quantidades (VOGEL, 2008).

Tabela 6 – Composição dos polissacarídeos não celulósicos de frações do entrenó de sorgo determinados por metanólise ácida.

Região do	Açúcare	s monoméricos	(%, m/m em mass	sa seca)
entrenó	Arabinose	Manose	Xilose	Glicose
Medula	$1,2 \pm 0,7$	$2,8 \pm 0,1$	$22,8 \pm 0,4$	$4,7 \pm 0,1$
Córtex	$0,5 \pm 0,3$	$2,4 \pm 0,1$	20,9 ± 1,7	3,1 ± 0,1

Um fato interessante das análises de hemicelulose de ambas espécies de gramíneas foi o alto teor de monômeros de glicose detectado ao fim do procedimento nas amostras de medula. Esse resultado indica que polissacarídeos ricos em resíduos de glicose estão presentes na fração hemicelulósica de canade-açúcar e sorgo, principalmente na medula. Xiloglucanas e glucomananas são hemiceluloses constituídas de resíduos de glicose que podem estar presentes em paredes celulares primárias de gramíneas, porém estes açúcares em geral ocorrem em baixas quantidades (SCHELLER; ULVSKOV, 2010). Glucanas com ligações mistas, por outro lado, estão presentes na parede celular de gramíneas em quantidades significativas (BURTON; FINCHER, 2009; VEGA-SÁNCHEZ et al., 2013). Assim, a fim de revelar o teor de $(1\rightarrow 3),(1\rightarrow 4)$ -ß-D-glucanas, as amostras foram submetidas a uma análise guantitativa através do emprego de um kit enzimático que envolve extração inicial das glucanas mistas com água quente e a subsequente hidrólise enzimática do polissacarídeo até glicose. O kit em questão emprega liquenases para promover a hidrólise das ligações ß-1-4 imediatamente antes da presença das ligações ß-1-3, enquanto que os oligossacarídeos gerados são hidrolisados à glicose por ação de ß-glicosidase. A glicose formada é finalmente detectada por via indireta através de reação com glicose oxidase e detecção colorimétrica do peróxido gerado (MCCLEARY; CODD, 1991). Os resultados mostram que as glucanas mistas são abundantes nas gramíneas, com uma distribuição diferencial entre as regiões do entrenó (Figura 15). Amostras da medula apresentaram os mais altos teores de glucana mista (1,4 - 15 %), principalmente as medulas de híbridos de cana-de-açúcar com baixo teor de lignina como o H89 e H58. Na interface das canas-de-açúcar o teor dessas glucanas diminuiu (1 - 6 %) e foi detectado em baixas quantidades nas amostras de córtex de ambas gramíneas (0,1 - 1 %). Esses resultados estão de acordo com a distribuição da glicose observada nas análises dos açúcares hemicelulósicos (Tabelas 5 e 6).

Figura 15 – Teor de $(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)$ -ß-D-glucanas nas frações de entrenós de amostras de gramíneas (seis híbridos de cana-de-açúcar e uma variedade de sorgo). Sorgo foi dividido em apenas duas frações de entrenó: medula e córtex; a cana-de-açúcar foi dividida em medula, interface e córtex.



Fonte: arquivo pessoal

A maior deposição de $(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)$ -B-D-glucanas nas medulas parece estar relacionada a um grande número de células do parênquima geralmente encontradas na região central de entrenós de gramíneas (COSTA et al., 2013; SIQUEIRA et al., 2011; WILSON; MERTENS; HATFIELD, 1993). Glucanas com ligações mistas tem sido observadas em sua maior parte em paredes celulares primárias de gramíneas, principalmente em tecidos parenquimáticos de alongamento (CARPITA et al., 2001; TRETHEWEY; CAMPBELL; HARRIS, 2005). Desta forma, um grande número de células parenquimáticas poderia explicar a predominância desse polissacarídeo no centro de entrenós de cana-de-açúcar e sorgo. Por outro lado, os córtex apresentaram teores de glucana mista próximos do zero, o que pode estar relacionado à presença de tecidos mais lignificados e ricos em xilana. De fato, ao estimar o teor real de celulose a partir da subtração do teor de glucanas mistas (Tabela 7), os dados revelam que os teores de celulose entre todas as regiões do entrenó são próximos (37 - 43 %) e que o principal diferencial entre eles são os teores de xilana e lignina e a presença de glucanas na hemicelulose. Em estudos prévios, as glucanas mistas se mostraram dependentes do estágio de amadurecimento em coleóptilos, pois seus teores baixavam à medida que o alongamento do tecido cessava (CARPITA, 1984; CHRISTENSEN et al., 2010). Em um certo momento, a maior parte das glucanas mistas são degradadas e substituídas por GAX em tecidos maduros e paredes secundárias de gramíneas (SCHELLER; ULVSKOV, 2010). Essas duas observações juntas sugerem que algumas das amostras de entrenó de cana-deaçúcar e sorgo estudadas tenham características similares a de tecidos imaturos apesar de todas plantas terem sido cortadas no momento em que se supõe a plena maturação fisiológica (CULTIVO DO SORGO, 2014; DEUBER, 1988).

Nas amostras de sorgo o teor de glucanas mistas foi significativamente menor do que nas amostras de cana-de-açúcar, principalmente entre medulas onde a diferença se torna mais proeminente. Isto está de acordo com as composições observadas a partir dos dados gerados pelo método de hidrólise com ácido sulfúrico, onde a medula do sorgo apresenta um teor de glucanas menor do que da maioria dos híbridos de cana-de-açúcar (Tabela 4). Neste sentido, vale notar que a medula do sorgo apresentou um teor de glucanas mistas ainda mais baixo do que o observado na medula do híbrido de cana-de-açúcar 140, de alto teor de lignina. Isso se deve provavelmente ao alto teor de parede celular lignificada nas amostras. Além disso, devido a presença de manose na hemicelulose (Tabela 6), parte significativa da glicose nessa fração poderia estar presente na forma de glucomananas (VOGEL, 2008).

Tabela 7 – Teor de celulose nas frações de entrenós de amostras de gramíneas (seis híbridos de cana-de-açúcar e uma variedade de sorgo). O valor foi estimado a partir da subtração do teor de $(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)$ -ß-D-glucanas do teor glucanas totais, obtido da hidrólise com ácido sulfúrico.

Variedades de	Teor de celulose (%, m / m em massa seca)				
gramíneas	Medula	Interface	Córtex		
H 89	$39,6 \pm 0,3$	40,3 ± 0,3	43,4 ± 0,2		
H 146	$39,6 \pm 0,4$	$37,3 \pm 0,6$	43,5 ± 0,1		
H 58	39,3 ± 0,1	41,3 ± 0,1	43,3 ± 0,1		
H 166	41,6 ± 0,1	$40,9 \pm 0,4$	43,9 ± 0,1		
H 321	$36,7 \pm 0,1$	$37,4 \pm 0,1$	41,8 ± 1,3		
H 140	37,1 ± 0,3	40,1 ± 0,1	$40,3 \pm 0,5$		
Sorgo	$38,4 \pm 0,4$	-	43,1 ± 1,2		

5.2 ESTUDO DA ESTRUTURA DE ARABINOXILANAS EM CANA-DE-AÇÚCAR (TÉCNICA DE "FINGERPRINTING")

Visto que as concentrações de xilana e arabinose se diferenciam entre as regiões de um entrenó dos híbridos de cana-de-açúcar, a estrutura das diferentes arabinoxilanas foi avaliada pela técnica de *fingerprinting* (CHINIQUY et al., 2012). A técnica se baseia na ação de endoxilanases sobre os polissacarídeos previamente extraído do material lignocelulósico por ação de KOH 4M (PATTATHIL et al., 2012). O padrão de clivagem das xilanas pela ação das endoxilanases empregadas está ilustrado na Figura 16. A endoxilanase empregada (família GH11) promove a hidrólise das ligações glicosídicas ß-1-4 entre anidroxiloses não ramificadas e também em anidroxiloses substituídas por

grupos arabinosil. No entanto, de acordo com Kolenová, Vrsanská e Biely (2006), o menor fragmento que xilanases da família GH11 podem liberar ao hidrolisar cadeias de xilanas substituídas ácido metilglucurônico por é um tetraxilooligossacarídeo contendo uma substituição no segundo resíduo de xilose. Esse padrão de hidrólise resulta no acúmulo de oligossacarídeos X-X(S)-X-X (ou SX₄), onde S representa a substituição. Se a substituição está na ponta da cadeia pode-se acumular também oligossacarídeos do tipo SX₂. O procedimento, portanto, permite gerar oligossacarídeos de xilose e arabinoxilose em diferentes proporções e possibilita um diagnóstico do padrão de substituição encontrado na xilana em estudo.

Figura 16 – Exemplo de ação de xilanases da família GH11 mostrando como produto o fragmento substituído de menor tamanho que essas enzimas podem liberar. O substrato utilizado é o ácido aldohexaurônico.



Fonte: Kolenová, Vrsanská e Biely (2006).

A Figura 17 mostra um cromatograma típico de "fingerprinting" com os picos de oligossacarídeos de interesse assinalados, conforme descrito por Chiniquy et al., (2012). A formação de X1 até X6 decorre da ação da endoxilanase em frações da cadeia onde não existe substituição por arabinose. Já o acúmulo de oligossacarídeos AX2 e AX4 resulta da ação em regiões substituídas. Em

geral, quanto maior o acúmulo de oligossacarídeos AX2 e AX4, maior será o grau de substituição das xilanas.

Figura 17 – Cromatograma do "fingerprinting" obtido a partir de uma amostra da interface do H58 com indicação dos oito picos de interesse utilizados no presente estudo. Legenda: X – xilose; A – arabinose.



Fonte: arquivo pessoal.

A quantidade relativa de cada oligossacarídeo foi muito similar quando comparadas diferentes regiões e híbridos de cana-de-açúcar, mostrando que este tipo de análise indica não haver grandes diferenças estruturais entre as arabinoxilanas de diferentes amostras (Tabela 8). Pequenas diferenças entre as regiões do entrenó foram observadas apenas nos híbridos 140 e 146. A similaridade entre as quantidades relativas de cada oligossacarídeo pode ser devido à uma extração seletiva do KOH, que proporciona um meio básico onde xilanas mais substituídas são mais solúveis do que aquelas com pouca ou nenhuma substituição (WEN et al., 2011). Uma vez que o extrato final liofilizado apresentava massa muito pequena (menor do que 3 mg), não foi possível medir o rendimento de extração adequadamente, não se detectando um padrão de rendimentos diferenciado entre as amostras (massa extraída/massa inicial; dados não apresentados). Assim, passamos a assumir que as xilanas substituídas foram extraídas preferencialmente e em quantidades independentes do tipo de fração do
entrenó e híbrido de cana-de-açúcar. Apesar disso, foram observadas distinções entre as abundâncias dos oligossacarídeos dentro de uma mesma amostra. Xilobiose (X2) foi o fragmento liberado em maior quantidade (cerca de 40%) comparado às outras porções oligossacarídicas principais, o que indica que a arabinoxilana nessas amostras de cana-de-açúcar tem um alto grau de substituição. Esse dado é corroborado pela alta concentração de arabinoxilobiose (AX2) e arabinotetraxilooligossacarídeo (AX4) – cerca de 15% - e baixas quantidades do trixilooligossacarídeo em diante (X3, X4, X5 e X6) (menos de 5%).

Tabela 8 – Quantidades relativas de cada oligossacarídeo detectado por fingerprinting. Legenda: X – xilose; A – arabinose.

Amostra	Região	Área relativa nos cromatogramas %							
		X1	X2	(A)X ₂	X3	X4	X5	X6	(A)X ₄
Híbrido 89	Medula	21,2	40,0	15,8	4,2	1,2	0,7	0,09	16,0
	Interface	21,6	42,3	15,0	3,8	0,3	0,3	0,11	15,0
	Córtex	19,9	38,8	17,8	4,8	2,4	0,7	0,01	14,8
Híbrido 146	Medula	23,2	41,4	15,3	4,6	0,9	0,1	-	12,7
	Interface	22,0	40,7	17,0	4,1	1,4	0,7	0,02	13,2
	Córtex	20,6	37,3	19,3	5,3	2,6	1,1	0,07	13,0
Híbrido 58	Medula	21,2	41,1	17,1	4,3	1,8	0,5	-	13,4
	Interface	21,9	41,1	16,4	3,7	1,4	0,8	0,17	14,0
	Córtex	20,4	39,6	17,6	4,3	1,9	1,2	0,23	14,2
Híbrido 166	Medula	22,9	40,8	14,9	4,4	1,1	0,2	-	14,7
	Interface	22,5	40,1	15,5	4,7	1,5	0,4	-	14,7
	Córtex	20,6	39,0	16,8	4,9	1,4	0,6	0,04	16,0
Híbrido 321	Medula	21,4	39,7	15,8	4,7	1,1	0,5	0,02	15,9
	Interface	22,0	39,7	16,3	5,5	2,0	0,1	-	13,2
	Córtex	22,9	41,0	15,0	4,5	1,8	0,3	-	13,4
Híbrido 140	Medula	23,2	41,9	14,8	3,3	1,1	0,5	0,03	13,6
	Interface	21,6	40,5	15,9	4,6	1,4	0,6	0,02	14,3
	Córtex	20,1	39,1	17,3	5,0	1,8	0,9	0,06	15,0

Esses dados estão de acordo com o padrão de clivagem da xilanase (GH11) utilizada e confirmam a abundância de xilanas substituídas por grupos arabinosil nas amostras de cana-de-açúcar estudadas. No entanto, o método atual não apresentou evidências de uma diminuição da substituição de xilanas por arabinose no sentido medula-córtex, fato que foi demonstrado em ambas análises

de composição química por hidrólise ácida (Tabelas 4 e 5). Isso sugere que a análise da composição química dos materiais seria mais adequada na avaliação de padrão de substituições entre diferentes tecidos vegetais. Uma outra questão a se levar em conta é que até o momento do presente estudo, apenas os picos principais haviam sido identificados entre outros de interesse geral. No entanto, alguns dos extratos hemicelulósicos das frações de entrenó dos seis híbridos de cana-de-açúcar analisados indicaram a presença de picos não identificados que corresponderam a áreas significativas do cromatograma. Um exemplo é ilustrado na (Figura 18) para a amostra proveniente do H146. As áreas destes picos diminuem no sentido da medula para o córtex e poderiam indicar oligossacarídeos mais substituídos por arabinose ou ácidos urônicos, como demonstrado pelos dados de hidrólise completa por ácido sulfúrico e TFA (Tabelas 4 e 5).

Figura 18 – Cromatograma do "fingerprinting" obtido a partir de uma amostra da medula do H146. Legendas: A – medula; B – interface; C – córtex. As setas indicam picos não identificados que poderiam ser significativos na avaliação de arabinoxilanas entre as diferentes regiões.



Fonte: arquivo pessoal.

5.3 COMPOSIÇÃO DA LIGNINA DOS HÍBRIDOS DE CANA-DE-AÇÚCAR

Além da determinação do teor de lignina nas diferentes amostras de canade-açúcar avaliadas, as características estruturais desta macromolécula também foram avaliadas a partir da análise dos produtos de pirólise (LOPES et al., 2011). Amostras de cana-de-açúcar foram pirolisadas e os produtos de degradação analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa. Os picos correspondentes a produtos de degradação da lignina foram identificados a partir dos espectros de massa correspondentes, conforme descrito por Lopes et al. (2011) para a análise de bagaço de cana-de-açúcar empregando a mesma técnica. A totalidade dos compostos identificados no cromatograma dos materiais pirolisados está listada no Apêndice A. Os picos foram atribuídos a estruturas originárias de unidades H, G e S desconsiderando os produtos de degradação de ácidos hidroxicinâmicos (4-vinilguaiacol e 4-vinilfenol) de acordo com Del Río et al. (2015). A integração das áreas relativas dos picos somados de cada subestrutura permitiu detectar ligninas do tipo HGS, com baixos teores de lignina H (2 - 5%), valores intermediários de lignina G (13 - 24%) e alto teor de lignina S (71 – 84 %) (Tabela 9). Estes resultados estão de acordo com Bottcher et al. (2013) que também detectaram lignina H em duas amostras de cana-de-açúcar através de uma metodologia que traça um perfil fenólico do material. Além disso, os autores também encontraram vestígios de ácidos hidroxicinâmicos, como ferúlico, cumárico e caféico, que eventualmente podem superestimar a presença dos precursores da lignina dependendo da metodologia empregada.

A composição da lignina também foi analisada em termos da razão S/G (Figura 19). Os dados revelaram que não houve um padrão progressivo de distribuição da razão S/G entre as diferentes regiões dos entrenós de cana-de-açúcar. Os valores de razão S/G mais baixos foram apresentados pelas medulas dos híbridos 89 e 58 (3,0), os quais contêm baixo teor total de lignina. O valor mais alto, no entanto, também foi observado em um desses híbridos, mais especificamente no córtex do híbrido 58 (6,7). As razões S/G foram similares entre as regiões do entrenó dos híbridos 166 e 321 (4,2 – 4,9). Os híbridos 146 e 140 apresentaram razões similares para medula e interface (5,2 – 5,7) e córtex com a menor razão S/G (3,4 – 4,3). A falta de uma distribuição diferenciada típica

entre os híbridos indica que a deposição dos monolignóis siringil e guaiacil depende de outros fatores além da localização anatômica nos entrenós de canade-açúcar. Por exemplo, Bottcher et al. (2013) encontraram diferentes padrões de distribuição quando testadas regiões do entrenó de cana-de-açúcar em diferentes níveis de maturidade. Para medulas, os autores encontraram que a razão S/G aumenta em medulas mais maduras e já no córtex, a razão S/G foi maior em córtex mais jovens, diminuindo quando mais maduros.

Tabela 9 – Composição S/G/H da lignina de variedades de cana-de-açúcar por pirólise.

	Híbrido 89				Híbrido 14	46	Híbrido 58			
	Medula	Interface	Córtex	Medula	Interface	Córtex	Medula	Interface	Córtex	
Η	5%	2%	3%	3%	4%	3%	4%	3%	2%	
G	24%	17%	22%	15%	14%	18%	23%	15%	13%	
S	71%	79%	75%	82%	81%	77%	71%	81%	84%	

	Híbrido 166			ł	líbrido 32 [°]	1	Híbrido 140			
	Medula	Interface	Córtex	Medula	Interface	Córtex	Medula	Interface	Córtex	
Η	2%	3%	3%	2%	3%	3%	3%	2%	5%	
G	17%	18%	17%	16%	18%	18%	15%	16%	21%	
S	80%	78%	79%	80%	77%	78%	81%	82%	73%	

Fonte: arquivo pessoal



Figura 19 – Razão S/G de diferentes regiões em híbridos de cana-de-açúcar.

Fonte: arquivo pessoal.

5.4 DETECÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DAS HEMICELULOSES NOS HÍBRIDOS DE CANA-DE-AÇÚCAR

A fração hemicelulósica das amostras de cana-de-acúcar foram extraídas e testadas com anticorpos específicos para componentes da parede celular através do dos testes de "dot blot" a fim de selecionar anticorpos para caracterização imunohistoquímica. Os epítopos testados foram xilana e $(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)$ -ß-Dglucana. A Figura 20 apresenta os "dot blots" para as regiões da medula e córtex do híbrido 58 e os anticorpos que se ligam em xilana (LM10 e CRCC-M140) e em arabinoxilana (LM11) (MCCARTNEY; MARCUS; KNOX, 2005; PATTATHIL et al., 2010). Estes três anticorpos testados apresentaram ligação ao extrato hemicelulósico das amostras, mostrando potencial para serem usados em cortes microscópicos para fins de imunolocalização de componentes da parede celular. O anticorpo LM11, cujo sítio de ligação pode acomodar xilanas substituídas (MCCARTNEY; MARCUS; KNOX, 2005), apresentou sinais intensos mesmo em diluições mais altas, o que não ocorreu com os sinais de LM10 e CRCC-M140. Isto corrobora os dados de composição química já apresentados, indicando que as xilanas em cana-de-açúcar são substituídas por grupos laterais como arabinosil e indica que o anticorpo LM11 seria mais adequado para a análise de arabinoxilanas em cana-de-açúcar. Os anticorpos LM10 e CRCC-M140, por sua vez, podem ser empregados para revelar os tecidos onde eventualmente ocorram xilanas menos ramificadas.

O dot blot do extrato hemicelulósico de todas as amostras de cana-deaçúcar tratado com anticorpo específico para $(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)$ -ß-D-glucana é apresentado na Figura 21. Observou-se que o mesmo se liga consistentemente aos extratos hemicelulósicos sendo possível sua utilização na imunolocalização de glucanas mistas em cortes microscópicos. Esse resultado também confirmou a distribuição diferencial de glucanas mistas ao longo das diferentes regiões do entrenó das amostras de cana-de-açúcar, detectadas enzimaticamente (Figura 15). A intensidade quimioluminescente representada pelos pontos escuros é muito mais alta nos extratos da medula e interface do que no córtex, o que indica que mais anticorpos se ligaram e assim mais epítopos de glucana mista estão presentes. O córtex por sua vez apresentou baixas intensidades, confirmando a baixa deposição de glucanas mistas nessa região de cana-de-açúcar.

Figura 20 – Ensaio imunológico (dot blot) de extrato hemicelulósico da medula e córtex do híbrido 58 tratados com anticorpos contra epítopos de xilana: CRCC-M140, LM10 e LM11. No eixo horizontal são apresentadas 2 replicatas para uma mesma amostra.



Fonte: arquivo pessoal.

Um estudo prévio de nosso grupo de pesquisas mostrou que a baixa recalcitrância de algumas regiões dos entrenós de cana-de-açúcar de açúcar está relacionada com a maior disponibilidade de celulose e, consequentemente, com a menor presença de lignina e hemicelulose (COSTA et al., 2013). Neste sentido, a presença de glucanas mistas em teores elevados na região da medula, que já havia se demonstrado como a região menos recalcitrante, levantou a questão se todos os tipos de hemicelulose atuam como barreira à hidrólise enzimática da celulose. Desta forma, o presente estudo buscou demonstrar a distribuição topoquímica das glucanas mistas, bem como das xilanas nos diferentes tecidos dos entrenós de cana-de-açúcar de açúcar.

Figura 21 – Ensaio imunológico (dot blot) de extrato hemicelulósico das amostras de cana-de-açúcar tratados com anticorpo contra epítopo de $(1\rightarrow 3),(1\rightarrow 4)$ -ß-D-glucana. No eixo horizontal são apresentadas 2 replicatas para uma mesma amostra.



Fonte: arquivo pessoal.

Cortes transversais de cada amostra foram tratados com anticorpos monoclonais primários que se ligam a epítopos de xilana ou $(1\rightarrow3),(1\rightarrow4)$ -ß-Dglucana e logo depois tratados com anticorpo secundário contendo uma sonda fluorescente (fluorocromo). A marcação de xilana pelo anticorpo CRCC-M140 (indicador de xilanas pouco ramificadas) ocorreu de forma diferencial entre as regiões do entrenó e tecidos das variedades de cana-de-açúcar estudadas (Figura 22). A fluorescência aumentou em intensidade da medula para o córtex na maior parte dos híbridos. A marcação com o anticorpo foi significativamente mais intensa em feixes vasculares, principalmente na parede celular de fibras de amostras do córtex, indicando uma grande deposição de xilana pouco ramificada nestes tecidos. Células de parênquima apresentaram pouca ou nenhuma marcação com o anticorpo CRCC-M140 nas medulas, porém foram marcadas pelo anticorpo no córtex da maioria dos híbridos. Essa distribuição de xilana pouco ramificada ao longo de diferentes regiões dos entrenós está de acordo com a distribuição de arabinose e xilose encontrada nos hidrolisados de ácido sulfúrico e TFA (Tabelas 4 e 5). As regiões de medula apresentavam mais arabinose e proporcionalmente menos xilose, sugerindo a maior ramificação das xilanas na medula e a menor ramificação no córtex. Nos híbridos 89, 146 e 321, a fluorescência não foi tão intensa quanto nos híbridos 58, 166 e 140, principalmente indica na região do córtex. Isto que sequências xilooligossacarídicas específicas para a ligação do anticorpo CRCC-M140 (PATTATHIL et al., 2010) não estão presentes em quantidades similares em todas amostras de cana-de-açúcar analisadas.

Um segundo anticorpo, LM11 (se liga a xilanas substituídas e não substituídas), foi utilizado para determinar a distribuição de xilana nos entrenós de cana-de-açúcar (Figuras 23). A fluorescência revelou que o anticorpo se ligou à todas as paredes celulares, inclusive células parenquimáticas de medulas, em contraste com o anticorpo CRCC-M140. Isso indica uma maior concentração de epítopos compatíveis com LM11 na parede celular dos híbridos de cana-deaçúcar estudados, o que aponta para uma xilana com substituições mais frequentes que dão pouco espaço a um sítio de ligação mais restrito como do anticorpo CRCC-M140 (MCCARTNEY; MARCUS; KNOX, 2005; PATTATHIL et al., 2010). Essa diferença de afinidade entre os anticorpos é principalmente evidenciada na medula, o que corrobora a presença de xilanas mais arabinosiladas nessa região, como demonstrado pela análise por via úmida (Tabelas 4 e 5). A extensa ligação do LM11 enfatiza que este anticorpo seria adequado para a detecção geral de xilanas em gramíneas como a cana-deaçúcar. No entanto, para esse anticorpo a imunofluorescência da região do córtex das amostras foi afetada pela autofluorescência de tecidos lignificados, mesmo utilizando os filtros apropriados para suprimir a autofluorescência da lignina. Por outro lado, o anticorpo CRCC-M140 aparenta ser útil para detectar xilanas menos substituídas devido a sua maior seletividade. Por exemplo, xilanas mais substituídas presentes no parênquima da região das medulas não foram marcadas por esse anticorpo, e feixes vasculares, quando marcados, apresentaram intensa fluorescência.

81

Figura 22 – Micrografias de fluorescência de frações do entrenó de seis híbridos de cana-de-açúcar tratados com anticorpo primário monoclonal CRCC-M140 e anticorpo secundário Alexa Fluor 514. Controles foram tratados com anticorpo secundário apenas. Legenda: V- feixe vascular; P – parênquima. Aumento: 100x; barra de escala corresponde à 100 μm.



Fonte: arquivo pessoal

Figura 23 – Micrografias de fluorescência de frações do entrenó de seis híbridos de cana-de-açúcar tratados com anticorpo primário monoclonal LM11 e anticorpo secundário Alexa Fluor 568. Controles foram tratados com anticorpo secundário apenas. Legenda: V- feixe vascular; P – parênquima. Aumento: 100x; barra de escala corresponde à 100 μm.



Fonte: arquivo pessoal

O anticorpo monoclonal que se liga a $(1\rightarrow 3), (1\rightarrow 4)$ -ß-D-glucana mostrou maior intensidade de fluorescência na parede de células do parênquima da região da medula dos entrenós dos híbridos de cana-de-acúcar (Figura 24). As células parenquimáticas de medulas de híbridos com baixo teor de lignina (H89 e H58) apresentaram as fluorescências mais intensas, o que indica um grande acúmulo de glucanas mistas nessas paredes celulares. Frações da interface também apresentaram evidência do epítopo de glucana mista em células do parênquima, porém pouco ou nenhum epítopo foi detectado no parênguima das regiões do córtex dos híbridos de cana-de-açúcar. Esses dados estão de acordo com o padrão de distribuição de glucanas mistas encontrado nas análises de dot blot (Figura 21) e quantificação com kit enzimático (Figura 15). No aumento de 50x os feixes vasculares não apresentaram quase nenhuma marcação com o anticorpo comparado às células do parênquima (Figura 24). Nessas micrografias de fluorescência os feixes vasculares aparecem como regiões escuras envoltas por células do parênguima. Experimentos similares de imunofluorescência em outras gramíneas mostraram que as $(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)$ -B-D-glucanas estão depositadas principalmente na parede celular primária e são praticamente ausentes na parede celular secundária (TRETHEWEY; HARRIS, 2002; TRETHEWEY; CAMPBELL; HARRIS, 2005). No entanto, em estudos recentes, essas ß-glucanas foram encontradas em parede celular de fibras de feixes vasculares de folhas em desenvolvimento e tecido esclerenquimático de caule de arroz (VEGA-SÁNCHEZ et al., 2012; VEGA-SÁNCHEZ et al., 2013). Quando visualizados sob maior aumento (200x) os feixes vasculares apresentaram marcação com anticorpo para $(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)$ -B-D-glucanas em células específicas do floema e protoxilema (Figura 25; micrografias complementares são apresentadas no Apêndice B). Essa distribuição diferencial foi evidente apenas em amostras da medula, o que indica que feixes vasculares de medula apresentam uma topoquímica para glucanas mistas específica. Além disso, células do parênquima próximas à feixes vasculares na região da medula apresentaram menor intensidade na marcação com anticorpo para glucanas mistas comparadas às células mais distantes (Figura 26). Leroux et al., (2015) encontraram o oposto em espécies de samambaia. Por exemplo, caules de Asplenium eliottii apresentaram forte ligação com anticorpo contra glucanas mistas no parênquima próximo a feixes vasculares e outros tecidos de suporte mecânico. Os autores sugeriram que essas glucanas

possam estar envolvidas com suporte mecânico na parede celular dessas plantas, o que poderia ser o caso no tecido parenquimático de medula, já que a parede celular é pouco espessa e lignificada e precisaria de um complemento para cimentar as microfibrilas de celulose. Kiemle et al. (2014) sugeriram que parte das glucanas mistas em coleóptilos de milho estão intimamente ligados com as microfibrilas de celulose e uma possível função mecânica para esses polissacarídeos ainda não pode ser descartada.

A comparação da distribuição de $(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)$ -B-D-glucanas entre os diferentes híbridos de cana-de-açúcar mostraram que o híbrido 140 foi a única exceção no padrão de resultados. Pouca ou nenhuma fluorescência devido à ligação do anticorpo para glucanas mistas foi detectada na medula e outras regiões do entrenó. Esse resultado é corroborado pela baixa quantidade de glucanas mistas detectada na quantificação enzimática (Figura 15). Além disso, esse híbrido apresentou os maiores teores de lignina comparado a outros híbridos de cana-de-açúcar, o que sustenta a perda ou não-deposição de glucanas mistas em tecidos lignificados e amadurecidos (HENRIK; ULVSKOV, 2010). Por outro lado, os híbridos 58 e 89, com os mais baixos teores de lignina (Tabela 2), apresentou forte ligação do anticorpo a epítopos de $(1\rightarrow 3), (1\rightarrow 4)$ -ß-D-glucana, principalmente em medulas. No híbrido 89, inclusive, foi observada uma leve ligação do anticorpo à fibras e parede celular de vaso de feixes vasculares quando observados em maior aumento (Figura 37 – Apêndice B), como também observado em parede celular de fibras de tecidos jovens de arroz por outros autores (VEGA-SÁNCHEZ et al., 2012). Os híbridos com um alto teor relativo de xilanas (146, 166 e 321), por sua vez, apresentaram marcação de glucanas mistas intermediária.

Figura 24 – Micrografias de fluorescência de frações do entrenó de seis híbridos de cana-de-açúcar tratados com anticorpo primário monoclonal específico para (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)-ß-D-glucana e anticorpo secundário Alexa Fluor 514. Controles foram tratados com anticorpo secundário apenas. Legenda: V- feixe vascular; P – parênquima. Aumento: 50x; barra de escala corresponde à 200 µm.



Fonte: arquivo pessoal

Figura 25 – Micrografias de fluorescência da medula do híbrido de cana-deaçúcar 58, tratado com anticorpo primário monoclonal específico para $(1\rightarrow 3),(1\rightarrow 4)$ -ß-D-glucana e anticorpo secundário Alexa Fluor 514. Controle foi tratado com anticorpo secundário apenas. Legenda: P – parênquima; Px – protoxilema; FL – floema. Aumento: 200x; barra de escala corresponde à 50 µm.



Fonte: arquivo pessoal

Figura 26 – Avaliação da intensidade de fluorescência de um corte transversal da medula do híbrido de cana-de-açúcar 58 tratado com anticorpo monoclonal específico para glucanas mistas e anticorpo secundário Alexa Fluor 514. A intensidade da fluorescência das paredes celulares foi medida de V para P, como indicado pela seta vermelha. Legenda: P – parênquima; V – feixe vascular; X – vaso do xilema; F – fibra. Barra de escala corresponde à 200 μm.



Fonte: arquivo pessoal

5.5 ÍNDICE DE CRISTALINIDADE DAS FRAÇÕES DO ENTRENÓ DE AMOSTRAS DE GRAMÍNEAS

O índice de cristalinidade (IC) de todas as amostras foi estimado por difração de raio-X (PARK et al., 2010). O IC foi calculado através do método da altura dos picos, o qual é útil para analisar diferenças relativas entre amostras celulósicas, como as diferentes regiões do entrenó de cana-de-açúcar e sorgo estudadas (Figura 27). Em todas as variedades de gramíneas, o córtex apresentou os maiores valores estimados para IC (0,44 – 0,56). Os valores da fração do córtex dos híbridos de cana-de açúcar foram similares (0,44 – 0,47). No entanto, o córtex do sorgo se destacou por seu alto valor estimado de IC (0,56). Por outro lado, frações da medula apresentaram os valores mais baixos de IC (0,33 – 0,40). Os valores de IC para interface, presente apenas mas amostras de cana-de-açúcar, foram intermediários, exceto nos híbridos 89 e 166, os quais não apresentaram diferenças entre medula e interface.



Figura 27 – Índice de cristalinidade estimado por difração de raio-X das frações de entrenó de cana-de-açúcar e sorgo.

A proporção de material amorfo foi aparentemente constante em todas amostras pois a altura do mínimo entre os picos 101 e 002, aproximadamente no

Fonte: arquivo pessoal.

ângulo-2θ 19 graus, relacionado à celulose amorfa (PARK et al., 2010), não variou entre as amostras. Altos valores de índice de cristalinidade resultaram de picos 002 mais intensos (Figura 28).

5.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS FRAÇÕES DO ENTRENÓ DE CANA-DE-AÇÚCAR E SORGO

Um dos principais objetivos desse estudo foi verificar se a distribuição de hemicelulose nos diferentes tecidos e tipos celulares está correlacionado com a recalcitrância da parede celular. Cada variedade de gramínea foi hidrolisada com celulases comerciais para avaliar a digestibilidade das biomassas sem nenhum pré-tratamento prévio a não ser moagem. Os resultados de conversão de glucanas a monômeros revelaram um padrão onde frações da medula foram menos recalcitrantes em todas as amostras (conversão de glucana de 32 - 85 % após 72h de hidrólise), enquanto amostras do córtex foram as mais recalcitrantes (conversão de glucana de 2 - 9 % após 72h de hidrólise) (Figura 29). Interfaces das amostras de cana-de-açúcar apresentaram recalcitrância intermediária na conversão de glucanas (7 - 46 % após 72h de hidrólise). O Apêndice C apresenta as cinéticas das conversões enzimáticas de glucanas.

A distribuição diferencial da recalcitrância das diferentes regiões do entrenó de cana-de-açúcar está de acordo com os resultados de estudos anteriores feitos pelo nosso próprio grupo de pesquisas, avaliando um número mais reduzido de amostras (COSTA et al., 2013). De fato, vários estudos tem revelado que a alta recalcitrância da região do córtex em gramíneas está associado com seu alto teor de lignina. Em contrapartida, a baixa concentração de lignina em células do parênquima colabora para que medulas de gramíneas, ricas em parênquima, sejam menos recalcitrantes (COSTA et al., 2013; JUNG; CASLER, 2006; ZENG et al., 2012). Entre as medulas das variedades estudadas, os híbridos 89 e 58, apresentaram as medulas com os mais baixos teores de lignina e hemicelulose (Tabela 2) e também as maiores taxas de conversão de glucanas (85 e 78 % na medula, após 72h de hidrólise, respectivamente). Por outro lado, medulas de híbridos de cana-de-açúcar com alto teor de lignina ou hemicelulose e da

variedade do sorgo apresentaram baixas conversões de glucana (32 – 49 % na medula, após 72h de hidrólise).



Figura 28 – Difratograma de raio-x das frações da medula e córtex do híbrido de cana-de açúcar 58. Picos estão assinalados de acordo com Park et al. (2010).

Fonte: arquivo pessoal.

A hidrólise de xilanas seguiu o mesmo padrão da hidrólise de glucanas, com diminuição da digestibilidade no sentido do córtex (Figura 29; as cinéticas estão apresentadas no Apêndice C). No entanto, a conversão de xilanas para xilose foi menor do que a conversão de glucanas para glicose em todas as amostras avaliadas. Para verificar se o coquetel enzimático continha atividades de xilanase insuficiente, hidrólises contendo as celulases comerciais suplementadas com xilanase e ß-xilosidase foram conduzidas, mas os níveis de conversão de xilana após 72h, não foram significativamente alterados, apenas a velocidade inicial de conversão de xilana foi alterada na interface e no córtex (Figura 30). É possível que o alto grau de substituição das xilanas (incluindo acetilação) em biomassas não pré-tratadas de gramíneas limitaram a digestibilidade desses polissacarídeos (VÁRNAI et al., 2014). A conversão de xilanas para oligossacarídeos solúveis também seria possível como apresentado na análise de fingerprinting (Tabela 8). A comparação dos níveis de conversão de xilana entre

as diferentes variedades de gramíneas revela que os híbridos de cana-de-açúcar 89 e 58 (com o mais baixo teor de lignina) apresentaram os maiores níveis de conversão da xilana em frações da medula (25 e 37 % após 72 h de hidrólise, respectivamente). Por outro lado, híbridos de cana-de-açúcar com baixo teor de lignina, mas alto teor de xilana, apresentaram baixos níveis de conversão da xilana (10 – 20% em medulas dos híbridos 146,166 e 321). Para o sorgo, a conversão de xilana foi intermediária para medula (23%) comparada à outras amostras de medula. O córtex do sorgo, no entanto, apresentou mais uma vez um dos níveis mais altos de conversão de xilanas (14%) comparado à outras amostras de córtex.

Figura 29 – Conversões enzimáticas de glucana e xilana da medula (M), interface (I) e córtex (C) de seis híbridos de cana-de-açúcar e uma variedade de sorgo após 72h de hidrólise.



Fonte: arquivo pessoal

Os dados obtidos demonstram que a recalcitrância diferencial é inerente à diversas características das amostras estudadas. Além dos teores de lignina e xilana, outras características como o grau de substituição das xilanas, se correlacionaram com a recalcitrância da parede celular das gramíneas analisadas

e pode ter afetado a resposta das biomassas à hidrólise enzimática. A substituição da xilana com arabinose aumentou do córtex para a medula em todas as amostras, de acordo com os dados de hidrólise com ácido sulfúrico (Tabela 4). Essa foi a mesma tendência da digestibilidade das biomassas, que aumentou da periferia para o centro dos entrenós. Ambos dados quando contrapostos apresentam uma correlação elevada em um modelo quadrático ($R^2 = 0,86$ - Figura 31).

Figura 30 – Conversões enzimáticas de xilana da medula, interface e córtex do híbrido de cana-de-açúcar 321 apenas com coquetel enzimático comercial (Cellic CTec2) (em preto) e coquetel enzimático suplementado com xilanase e ß-xilosidase (Megazyme) (em vermelho).



Fonte: arquivo pessoal.

Em geral as hemiceluloses são degradadas mais facilmente do que a celulose quando tratadas enzimaticamente, no entanto a substituição da cadeia principal e acetilação gera oligômeros recalcitrantes na hidrólise (AGGER; VIKSO-NIELSEN; MEYER, 2010). Assim, GAX com maior grau de substituição tende a ser mais resistente à hidrólise enzimática completa até xilose do que GAX menos

substituída (DEMARTINI et al., 2013; VÁRNAI et al., 2014). Apesar disso, GAX com menos grupos pendentes em geral permite interações mais fortes entre GAX e a cadeia de celulose (VOGEL, 2008). Por esse motivo, razões arabinose/xilose mais altas presentes nas medulas de híbridos de cana-de-açúcar com baixo teor de lignina (89 e 58) podem ter diminuído a interação celulose-hemicelulose, contribuindo assim para uma menor recalcitrância nessas amostras.

Figura 31 – Correlação entre conversão de glucanas após 72h de hidrólise e a razão arabinose/xilana de GAX de frações do entrenó de seis híbridos de canade-açúcar e uma variedade de sorgo. As diferentes cores indicam a variedade de gramínea, de acordo com a Figura 29. Círculo, quadrado e triângulo representam medula, interface e córtex respectivamente.



Fonte: arquivo pessoal.

O teor de glucanas mistas também se mostrou correlacionado com a digestibilidade das amostras resultando em uma correlação elevada para um modelo quadrático ($R^2 = 0.92$ - Figura 32). Este dado reitera que a recalcitrância de regiões do entrenó de gramíneas não depende apenas do teor de lignina e

hemicelulose, mas também da composição da hemicelulose, principalmente quando a porção de glucanas tem uma contribuição significativa de glucanas mistas. Esse polissacarídeo poderia ser utilizado como indicativo de baixa recalcitrância em materiais lignocelulósicos de gramíneas, pois regiões menos recalcitrantes, como as medulas dos híbridos de cana-de-açúcar 58 e 89, apresentaram alta concentração de glucanas mistas e também elevada digestibilidade.

Figura 32 – Correlação entre conversão de glucanas após 72h de hidrólise e o teor de $(1\rightarrow 3),(1\rightarrow 4)$ -ß-D-glucanas de frações do entrenó de seis híbridos de cana-de-açúcar e uma variedade de sorgo. As diferentes cores indicam a variedade de gramínea, de acordo com a Figura 29. Círculo, quadrado e triângulo representam medula, interface e córtex respectivamente.



Fonte: arquivo pessoal.

Um experimento foi realizado a fim de verificar se as $(1\rightarrow 3),(1\rightarrow 4)$ -ß-Dglucanas poderiam contribuir como uma fonte de monômeros de glicose nas hidrólises enzimáticas em estudo. Um ensaio de hidrólise de glucanas mistas com o complexo enzimático Cellic CTec2 mostrou que 88% da glucana foi convertida em glicose após 4 h de digestão enzimática, se mantendo assim até as 48h de 12% hidrólise 33). Os (Figura remanescentes provavelmente são oligossacarídeos contendo ligações β -(1 \rightarrow 3), as guais não foram clivadas pelo complexo enzimático empregado. A baixa recalcitrância atribuída à presença de glucanas mistas foi explorada recentemente na geração de plantas transgênicas com maior digestibilidade. Transgênicos de Arabidopsis thaliana que apresentaram maior acúmulo de glucanas mistas nas paredes celulares sob o controle de um promotor associado a senescência se mostraram menos recalcitrantes, com um aumento de 42% na digestibilidade enzimática comparada às variedades selvagens (VEGA-SÁNCHEZ et al., 2015).

Outro fator que é comumente associado à recalcitrância da parede celular é a cristalinidade da celulose (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999). Os dados de índice de cristalinidade das amostras estudadas foram analisados contra a digestibilidade enzimática após 72h. Apesar de haver uma certa tendência, por exemplo, amostras do córtex com maior índice de cristalinidade são mais recalcitrantes, não houve um valor de R^2 elevado entre os dados (Figura 34).

Figura 33 – Conversão enzimática de $(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)$ -ß-D-glucanas de cevada à monômeros de glicose por enzimas comerciais.



Fonte: arquivo pessoal.

A composição HGS da lignina por sua vez, nos híbridos de cana-deaçúcar, pareceu não estar correlacionada com a distribuição diferencial da recalcitrância das diferentes regiões do entrenó, visto que a correlação da razão S/G com a recalcitrância mostrou um valor de *R*² muito baixo e a ausência de uma tendência clara (Figura 35). Isto corrobora o fato de que o teor de lignina é mais importante na distribuição da recalcitrância entre diferentes regiões do entrenó de cana-de-açúcar do que sua composição. Um estudo prévio que avaliou a hidrólise de polissacarídeos de amostras não pré-tratadas de alfafa também indicou baixa correlação entre a relação S/G da lignina com a digestibilidade dos materiais (CHEN; DIXON, 2007). Neste trabalho, o teor de lignina também foi mais relevante do que o tipo de lignina quando o parâmetro avaliado foi a recalcitrância da biomassa.

Figura 34 – Correlação entre conversão de glucanas após 72h de hidrólise e o índice de cristalinidade de frações do entrenó de seis híbridos de cana-de-açúcar e uma variedade de sorgo. As diferentes cores indicam a variedade de gramínea, de acordo com a Figura 29. Círculo, quadrado e triângulo representam medula, interface e córtex respectivamente.



Fonte: arquivo pessoal.

Figura 35 – Correlação entre conversão de glucanas após 72h de hidrólise e a razão S/G de frações do entrenó de seis híbridos de cana-de-açúcar. As diferentes cores indicam o híbrido, de acordo com a Figura 29. Círculo, quadrado e triângulo representam medula, interface e córtex respectivamente.



Fonte: arquivo pessoal.

Em um estudo anterior de nosso próprio grupo de pesquisas foi proposto um parâmetro para prever a digestibilidade de amostras não pré-tratadas de cana-de-açúcar que tomou como base a celulose disponível nas amostras e também a área ocupada por feixes vasculares (COSTA et al., 2013). Este parâmetro se mostrou adequado para prever a digestibilidade de 9 amostras provenientes de 3 híbridos de cana-de-açúcar, conforme mostrado na Figura 36. Com o atual conjunto de dados que inclui seis híbridos de cana-de-açúcar, com um total de 18 amostras, além de um mapeamento detalhado das hemiceluloses, ficou claro que a alta recalcitrância de regiões do entrenó de cana-de-açúcar está relacionada com várias características complementares. O encapsulamento das microfibrilas de celulose por hemicelulose e lignina é um fator importante para aumentar a recalcitrância, conforme já amplamente descrito para outros materiais lignocelulósicos, inclusive submetidos a diferentes tipos de pré-tratamento (ALVIRA et al., 2010). No entanto, nosso atual conjunto de dados mostrou que a recalcitrância intrínseca de plantas não pré-tratadas depende também do tipo de hemicelulose presente. Hemiceluloses que, aparentemente ocasionam um menor grau de encapsulamento da celulose, como foi o caso das glucanas mistas e das xilanas com elevado grau de substituição, contribuíram para gerar um material menos recalcitrante que predominou na região medular das amostras de cana-de-açúcar estudadas. Esses fatores, junto com o menor nível de lignificação e menor índice de cristalinidade, podem ter contribuído para uma parede celular menos organizada e assim uma celulose menos empacotada, a qual se tornou mais suscetível à hidrólise enzimática. Para a amostra de sorgo estudada, a lignificação e o teor de xilanas parece ser o principal fator relacionado com a alta recalcitrância das frações, semelhante ao híbrido de cana-de-açúcar 140.

Figura 36 – Correlação da conversão de celulose com um parâmetro representado pela razão entre celulose disponível e área ocupada por feixes vasculares em amostras de híbridos de cana-de-açúcar estudadas por Costa et al. (2013). Celulose disponível foi calculada em função do teor de glucanas, hemicelulose e lignina.



Fonte: Costa et al., 2013.

6 CONCLUSÕES

Gramíneas representam uma família vegetal diversa no que diz respeito a anatomia, tipos de tecidos, tipos celulares e componentes da parede celular. Devido à essas características, biomassas lignocelulósicas provenientes de diferentes partes de um entrenó de uma gramínea respondem de forma diferenciada frente à uma hidrólise.

Na hemicelulose de amostras de cana-de-açúcar e sorgo, GAX foi o polissacarídeo mais abundante e as glucanas mistas o segundo mais abundante. Medulas foram caracterizadas como tecidos mais jovens por conter maior acúmulo de glucanas mistas e em contrapartida menor teor de xilanas e lignina. Por outro lado, frações do córtex apresentaram baixos teores de glucanas mistas e alto teor de lignina e xilana, o que caracteriza tecidos mais envelhecidos. As diferentes frações dos entrenós, medula, interface e córtex, sem pré-tratamento, responderam à hidrólise enzimática com celulases comerciais de forma diferente estabelecendo uma distribuição diferencial da recalcitrância, onde medulas são as regiões menos recalcitrantes, em especial medulas de variedades de cana-deaçúcar com menor teor de lignina total. Essa recalcitrância aumenta do centro do entrenó para fora, onde frações do córtex são as mais recalcitrantes e interfaces tem recalcitrância intermediária. Os dados compilados indicam que a alta recalcitrância pode estar relacionada a um conjunto de características de regiões do entrenó das variedades de gramíneas. Componentes que empacotam a celulose, como lignina e xilana, são os principais contribuintes no aumento da recalcitrância, enquanto que a deposição de glucanas mistas e GAX com elevado grau de substituição contribuem para a geração de materiais menos recalcitrantes. Índices de correlação elevados foram observados entre os teores de glucanas mistas e a digestibilidade das amostras, indicando que esse polissacarídeo poderia ser utilizado como parâmetro na busca por materiais menos recalcitrantes à hidrólise enzimática direta. Por outro lado, dentre as análises realizadas, apenas com os híbridos de cana-de-açúcar, a composição da lignina não apresentou correlação direta com a distribuição da recalcitrância entre diferentes regiões do entrenó, confirmando que o teor de lignina em si é mais importante do que sua estrutura para se estimar a recalcitrância de materiais provenientes de cana-de-açúcar.

O mapeamento indireto de hemiceluloses através de anticorpos específicos revelaram que xilanas são predominantes em todos os tipos celulares. Epítopos de xilanas menos substituídas estiveram presentes principalmente em feixes vasculares e não foram detectados na parede celular de parênguima de medulas. No entanto, epítopos de arabinoxilana foram encontrados em todas as frações e tipos celulares e além disso em maior intensidade de fluorescência, o que confirma mais uma vez a natureza das xilanas em cana-de-acúcar como sendo do tipo GAX. A estrutura dessas GAX apresentou frequente substituição por arabinose quando isoladas e digeridas por xilanase na técnica de fingerprinting, o que pode ter afetado a digestão de xilanas até xilose na hidrólise enzimática. O anticorpo CRCC-M140 se mostrou útil para detecção mais seletiva de xilanas menos substituídas e o anticorpo LM11 foi o anticorpo mais adequado para mapeamento da principal hemicelulose em cana-de-açúcar: GAX. А imunofluorescência de $(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)$ -ß-D-glucanas revelou que esses polissacarídeos estão depositados principalmente na região da medula, em particular na parede celular de células do parênguima de híbridos de cana-deacúcar com baixo teor de lignina. Em feixes vasculares epítopos deste polissacarídeo foram identificados pelo anticorpo apenas em células do floema e protoxilema na região da medula dos entrenós e foram levemente marcados nas células de fibra e xilema no híbrido 89, o qual apresenta o menor teor total de lignina. A deposição de glucanas mistas na medula da maioria das amostras de cana-de-açúcar enfatiza que essa região do entrenó tem características de tecidos vegetais mais jovens. A técnica de imunofluorescência foi eficiente na análise topoquímica de hemiceluloses em cana-de-açúcar e pode ser uma ferramenta útil na busca por matérias-primas lignocelulósicas mais adequadas aos processos industriais de interesse.

Dentre as variedades de gramíneas estudadas, o híbrido de cana-de-açúcar 140 e a variedade de sorgo forneceram as biomassas mais recalcitrantes. Prétratamentos além da moagem seriam necessários ao utilizar materiais lignocelulósicos dessas duas variedades em um processo de obtenção de etanol de segunda geração. Os híbridos de cana-de-açúcar 89 e 58, por outro lado, apresentam características de biomassa que são desejáveis na busca por materiais de baixa recalcitrância (baixo teor de lignina, alto teor de glucanas mistas e alto grau de substituição da GAX). Essas características poderiam ser utilizadas como modelo na geração e seleção de plantas otimizadas para produção de biomassas lignocelulósicas de baixa recalcitrância.

REFERÊNCIAS

AGGER, J.; VIKSO-NIELSEN, A.; MEYER, A. S. Enzymatic xylose release from pretreated corn bran arabinoxylan: differential effects of deacetylation and deferuloylation on insoluble and soluble substrate fractions. **J Agric Food Chem**, v. 58, p. 6141–6148, 2010

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technol**, v. 101, p. 4851-4861, 2010.

AMIDON, T. E.; BUJANOVIC, B.; LIU, S.; HOWARD, J. S. Commercializing biorefinery technology: a case for the multi-product pathway to a viable biorefinery. **Forests**, v. 2, n. 4, p. 929-947, 2011.

ANATOMY of Monocot Stem. Biology4isc. Disponível em http://biology4isc.weebly.com/1-plant-anatomy.html. Acesso em: 15 Jun. 2016.

ANDERSSON, S.; WIKBERG, H.; PESONEN, E.; MAUNU, S. L.; SERIMAA, R. Studies of crystallinity of Scots pine and Norway spruce cellulose. **Trees**, v. 18, p. 346-353, 2004.

ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnol Biofuels**, v. 3, n. 4, 2010.

ARTSCHWAGER, E. Anatomy and morphology of the vegetative organs of *Sorghum vulgare*. **Technical Bulletin**, n. 957, 1948.

BAEYENS, J.; KANG, Q.; APPELS, L.; DEWIL, R.; LV, Y.; TAN, T. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. **Prog Energ Combust**, v. 47, p. 60-88, 2015.

BARROS-RIOS, J.; SANTIAGO, R.; MALVAR, R. A.; JUNG, H. G. Chemical composition and cell wall polysaccharide degradability of pith and rind tissues from mature maize internodes. **Anim Feed Sci Tech**, v. 172, p. 226-236, 2012.

BERTAUD, F.; SUNDEMBERG, A.; HOLMBOM, B. Evaluation of acid methanolysis for wood hemicelluloses and pectins. **Carbohyd Polym**, v. 48, p. 319-324, 2002.

BLANCHETTE, R. A.; KRUEGER, E. W.; HAIGHT, J. E.; AKHTAR, M.; AKIN, D. E. Cell wall alterations in loblolly pine wood decayed by the white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. **J Biotechnol**, v. 53, p. 203-13, 1997.

BOTTCHER, A.; CESARINO, I.; DOS SANTOS, A. B.; VICENTINI, R.; MAYER, J. L. S.; VANHOLME, R.; MORREEL, K.; GOEMINNE, G.; MOURA, J. C. M. S.; NOBILE, P. M.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M.; DOS ANJOS, I. A.; CRESTE, S.; BOERJAN, W.; DE LANDELL, M. G. A.; MAZZAFERA, P. Lignification in sugarcane: biochemical characterization, gene discovery, and expression analysis in two genotypes contrasting for lignin content. **Plants Physiol**, v. 163, p. 1539-1557, 2013.

BRAGATTO, J.; SEGATO, F.; COTA, J.; MELLO, D. B.; OLIVEIRA, M. M.; BUCKERIDGE, M. S.; SQUINA, F. M.; DRIEMEIER, C. Insights on how the activity of an endoglucanase is affected by physical properties of insoluble celluloses. **J Phys Chem B**, v. 116, p. 6128-6136, 2012.

BRIENZO, M.; ABUD, Y.; FERREIRA, S.; CORRALES, R. C. N. R.; FERREIRA-LEITÃO, V. S.; SOUZA, W.; SANT'ANNA, C. Characterization of anatomy, lignin distribution, and response to pretreatments of sugarcane culm node and internode. **Ind Crop Prod**, v. 84, p. 305-313, 2016.

BRUNECKY, R.; VINZANT, T. B.; PORTER, S. E.; DONOHOE, B. S.; JOHNSON, D. K.; HIMMEL, M. E. Redistribution of xylan in maize cell walls during dilute acid pretreatment. **Biotechnol Bioeng**, v. 102, n. 6, p. 1537-1543, 2009.

BURTON, R. A.; FINCHER, G. B. (1,3;1,4)-beta-D-glucans in cell walls of the poaceae, lower plants, and fungi: a tale of two linkages. **Mol Plant**, v. 2, p. 873-882, 2009.

CANNELLA, D.; HSIEH, C-W. C.; FELBY, C.; JØRGENSEN, H. Production and effect of aldonic acids during enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high dry matter content. **Biotechnol Biofuels**, v. 5, n. 26, 2012.

CARPITA, N. C. Cell wall development in maize coleoptiles. **Plant Physiol**, v. 76, p. 205-212, 1984.

CARPITA, N. C. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. **Annu Rev Plant Physiol**, v. 47, p. 445-476, 1996.

CARPITA, N. C.; DEFERNEZ, M.; FINDLAY, K.; WELLS, B.; SHOUE, D. A.; CATCHPOLE, G.; WILSON, R. H.; MCCANN, M. C. Cell wall architecture of the elongating maize coleoptile. **Plant Physiol**, v. 127, n. 2, p. 551-565, 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. **Plant J**, v. 3, p. 1-30, 1993.

CHANG, W.; CHANG M.; CHANG, S.; YEH, T. Chemical composition and immunohistological variations of a growing bamboo shoot. **J Wood Chem Technol**, v. 33, p. 133-155, 2013.

CHEN, F.; DIXON, R. A. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. **Nature Biotechnol**, v. 25, p. 759-761, 2007.

CHENG, J. J.; TIMILSINA, G. R. Status and barriers of advanced biofuel technologies: a review. **Renew Energ**, v. 36, p. 3541-3549, 2011.

CHINIQUY, D.; SHARMAB, V.; SCHULTINKC, A.; BAIDOO, E. E.; RAUTENGARTEN, C.; CHENG, K.; CARROLL, A.; ULVSKOV, P.; HARHOLT, J.; KEASLING, J. D.; PAULY, M.; SCHELLER, H. V.; RONALD, P. C. XAX1 from glycosyltransferase family 61 mediates xylosyltransfer to rice xylan. **P Natl Acad Sci Usa**, v. 109, n. 42, p. 17117-17122, 2012.

CHRISTENSEN, U.; ALONSO-SIMON, A.; SCHELLER, H. V.; WILLATS, W. G.; HARHOLT, J. Characterization of the primary cell walls of seedlings of

Brachypodium distachyon - a potential model plant for temperate grasses. **Phytochemistry**, v. 71, p. 62-69, 2010.

COELHO, A. M.; WAQUIL, J. M.; KARAM, D.; CASELA, C. R.; RIBAS, P. M. Seja o doutor do seu sorgo. **Arquivo do Agrônomo,** n. 14, 2002.

COSTA, T. H F. Avaliação da recalcitrância de diferentes regiões oriundas de entrenós de cana-de-açúcar em híbridos com teores variados de lignina. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. Escola de Engenharia de Lorena, Lorena. 2010.

COSTA, T. H. F.; MASARIN, F.; BONIFÁCIO, T. O.; MILAGRES, A. M. F.; FERRAZ, A. The enzymatic recalcitrance of internodes of sugar cane hybrids with contrasting lignin contents. **Ind Crop Prod**, v. 51, p. 202-211, 2013.

CULTIVO do sorgo. Embrapa Milho e Sorgo. Disponível em <https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sist emasdeproducaolf6_1ga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mod e=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaold=8301&p_r_p_996514994_topicold=1309>. Acesso em: 1 Set. 2014.

DEL RÍO, J. C.; GUTIÉRREZ, A. Chemical composition of abaca (*Musa textilis*) leaf fibers used for manufacturing of high quality paper pulps. **J Agr Food Chem**, v. 54, n. 13, p. 4600-4610, 2006.

DEL RÍO, J. C.; LINO, A. G.; COLODETTE, J. L.; LIMA, C. F.; GUTIÉRREZ, A.; MARTÍNEZ, A. T.; LU, F.; RALPH, J.; RENCORET, J. Differences in the chemical structure of the lignins from sugarcane bagasse and straw. **Biomas Bioenerg**, v. 81, p. 322-338, 2015.

DEL RÍO, J. C.; RENCORET, J.; PRINSEN, P.; MARTÍNEZ, A. T.; RALPH, J.; GUTIÉRREZ, A. Structural characterization of wheat straw lignin as revealed by analytical pyrolysis, 2d-nmr, and reductive cleavage methods. **J Agr Food Chem**, v. 60, n. 23, p. 5922-5935, 2012.

DEMARTINI, J. D.; PATTATHIL, S.; MILLER, J. S.; LI, H.; HAHN, M. G.; WYMAN, C. E. Investigating plant cell wall components that affect biomass recalcitrance in poplar and switchgrass. **Energy Environ Sci**, v. 6, p. 898–909, 2013.

DEUBER, R. Maturação da cana-de-açúcar na região sudeste do Brasil: In: SEMINÁRIO E TECNOLOGIA AGRONÔMICA, 4., **Anais...** Piracicaba, 1988. p. 33-40.

DING, S-Y.; LIU, Y-S.; ZENG, Y.; HIMMEL, M. E.; BAKER, J. O.; BAYER, E. A. How does plant cell wall nanoscale architecture correlate with enzymatic digestibility? **Science**, v. 338, p. 1055-1059, 2012.

EUDES, A.; GEORGE, A.; MUKERJEE, P.; KIM, J. S.; POLLET, B.; BENKE, P. I.; YANG, F.; MITRA, P.; SUN, L.; ÇETINKOL, Ö. P.; CHABOUT, S.; MOUILLE, G.; SOUBIGOU-TACONNAT, L.; BALZERGUE, S.; SINGH, S.; HOLMES, B. M.; MUKHOPADHYAY, A.; KEASLING, J. D.; SIMMONS, B. A.; LAPIERRE, C.; RALPH, J.; LOQUÉ, D. Biosynthesis and incorporation of side-chain-truncated lignin monomers to reduce lignin polymerization and enhance saccharification. **Plant Biotechnol J**, v. 10, p. 609–620, 2012.

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

FERRAZ, A. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Fungos:** uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Educs, 2004, cap. 6, p. 215-242.

FERRAZ, A., BAEZA, J., RODRIGUEZ, J., FREER, J. Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. **Bioresource Technol**, v. 74, p. 201-212, 2000.

FERRAZ, A.; COSTA, T. H. F.; SIQUEIRA, G.; MILAGRES, A. M. F. Mapping of cell wall components in lignified biomass as a tool to understand recalcitrance. In: SILVA, S. S.; CHANDEL, A. K. (Ed.). **Biofuels in Brazil**. Nova lorque, Springer, 2014, cap. 9, p. 173-202.

FLOURNOY, D. S.; KIRK, T. K.; HIGHLEY, T. L. Wood decay by brown-rot fungi - changes in pore structure and cell-wall volume. **Holzforschung**, v. 45, p. 383-388, 1991.

FU, C.; MIELENZ, J. R.; XIAO, X.; GE, Y.; HAMILTON, C. Y.; RODRIGUEZ, M.; CHEN, F.; FOSTON, M.; RAGAUSKAS, A.; BOUTON, J.; DIXON, R. A.; WANG, Z-Y. Genetic manipulation of lignin reduces recalcitrance and improves ethanol production from switchgrass. **P Natl Acad Sci Usa**, v. 108, n. 9, 2011.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure Appl Chem**, v. 59, p. 257-268, 1987.

GHOSH M, NANDA G. Purification and some properties of a xylanase from *Aspergillus sydowii* MG49. **Appl Environ Microbiol**, v. 60, p. 4620-4623, 1994.

GNANSOUNOU, E.; DAURIAT A.; WYMAN, C. E. Refining sweet sorghum to ethanol and sugar: economic trade-offs in the context of North China. **Bioresource technol**, v. 96, p. 985-1002, 2005.

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 808-810, 2008.

GRABBER, J. H.; HATFIELD, R. D.; LU, F. C.; RALPH, J. Coniferyl ferulate incorporation into lignin enhances the alkaline delignification and enzymatic degradation of cell walls. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 2510-2516, 2008.

GRABBER, J. H.; MERTENS, D. R.; KIM, H.; FUNK, C.; LU, F. C.; RALPH, J. Cell wall fermentation kinetics are impacted more by lignin content and ferulate crosslinking than by lignin composition. **J Sci Food Agric**, v. 89, p. 122-129, 2009.

GRABBER, J. H.; PANCIERA, M. T.; HATFIELD, R. D. Chemical composition and enzymatic degradability of xylem and nonxylem walls isolated from alfalfa internodes. **J Agric Food Chem**, v. 50, p. 2595-2600, 2002.

GRABBER, J. H.; RALPH, J.; HATFIELD, R. D. Cross-linking of maize walls by ferulate dimerization and incorporation into lignin. **J Agric Food Chem**, v. 48, p. 6106-6113, 2000.

HALFORD, N. G.; CURTIS, T. Y.; MUTTUCUMARU, N.; POSTLES, J.; MOTTRAM, D. S. Sugars in crop plants. **Ann Appli Biol**, v. 158, p. 1–25, 2011.

HALL, M.; BANSAL, P.; LEE, J. H.; REALFF, M. J.; BOMMARIUS, A. S. Cellulose crystallinity: a key predictor of the enzymatic hydrolysis rate. **FEBS J**, v. 277, n. 6, p. 1571-1582, 2010.

HAMMEL, K. E.; CULLEN, D. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. **Curr Opini Plant Biol**, v. 11, p. 349-55, 2008.

HARHOLT, J., BACH, I. C.; LIND-BOUQUIN, S.; NUNAN, K. J.; MADRID, S. M.; BRINCH-PEDERSEN, H.; HOLM, P. B.; SCHELLER, H. V. Generation of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) accumulating heterologous endo-xylanase and ferulic acid esterase in the endosperm. **Plant Biotechnol J**, v. 8, n. 3, p. 351-362, 2010.

HARRIS, P. J.; HARTLEY, R. D. Phenolic constituents of the cell walls of monocotyledons. **Biochem System Ecol**, v. 8, p. 153–60, 1980.

HATFIELD, R. D.; RALPH, J.; GRABBER, J. H. Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses. **J Sci Food Agr**, v. 79, p. 403-407, 1999

HE, L. F.; TERASHIMA, N. Formation and structure of lignin in Monocotyledons 3. Heterogeneity of sugarcane (*Saccharum officinarum* L) lignin with respect to the composition of structural units in different morphological regions. **J Wood Chem Technol**, v. 10, p. 435–459, 1990.

HE, L.; TERASHIMA, N. Formation and structure of lignin in Monocotyledons IV. Deposition process and structural diversity of the lignin in the cell wall of sugar cane and rice plant studied by ultraviolet microscopic spectrometry. **Holzforschung**, v. 45, p. 191-198, 1991.
HIMMEL, M. E.; DING, S-H.; JOHNSON, D. K.; ADNEY, W. S.; NIMLOS, M. R.; BRADY, J. W.; FOUST, T. D. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v. 315, p. 804-807, 2007.

HORN, S. V.; VAAJE-KOLSTAD, G.; WESTERENG, B.; EIJSINK, V. G. H. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnol Biofuels**, v. 5, n. 45, 2012.

JEOH, T.; WILSON, D. B.; WALKER, L. P. Effect of cellulase mole fraction and cellulose recalcitrance on synergism in cellulose hydrolysis and binding. **Biotechnol Progr**, v. 22, p. 270-277, 2006.

JUNG, H. G.; CASLER, M. D. Maize stem tissues: impact of development on cell wall degradability. **Crop Sci**, v. 46, p. 1801-1809, 2006.

KIEMLE, S. N.; ZHANG, X.; ESKER, A. R.; TORIZ, G.; GATENHOLM, P.; COSGROVE, D. J. Role of (1,3)(1,4)- β -Glucan in cell walls: Interaction with cellulose. **Biomacromolecules**, v. 15, p. 1727-1736, 2014.

KIM, S.; HOLTZAPPLE M. T. Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. **Bioresour Technol**, v. 96, n. 18, 2005.

KIM, J. S.; DANIEL, G. Immunolocalization of hemicelluloses in Arabidopsis thaliana stem. Part I: temporal and spatial distribution of xylans. **Planta**, v. 236, p. 1275-1288, 2012.

KIM, M.; DAY, D. F. Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 38, p. 803-807, 2011.

KIM, M.; HAN, K-J.; JEONG, Y.; DAY, D. F. Utilization of whole sweet sorghum containing juice, leaves, and bagasse for bio-ethanol production. **Food Sci Biotechnol**, v. 21, n. 4, p. 1075-1080, 2012.

KIRK, T. K.; CULLEN, D. Enzimology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In: YOUNG, R; AKHTAR, M. (Ed.). **Enviromentally friendly** **technologies for the pulp and paper industry**. New York: John Wiley and Sons, 1998, p. 273-308.

KOLENOVÁ, K.; VRSANSKÁ, M.; BIELY, P. Mode of action of endo-ß-1,4xylanases of families 10 and 11 on acidic xylooligosaccharides. **J Biotechnol**, v. 121, p. 338-345, 2006.

LAM, T. B. T.; LIYAMA, K.; STONE, B. A. Determination of etherified hydroxycinnamic acids in cell walls of grasses. **Phytochemistry**, v. 36, p. 773 775, 1994.

LAM, T. B. T.; LIYAMA, K.; STONE, B. A. Hot alkali-labile linkages in the walls of the forage grass *Phalaris aquatica* and *Lolium perenne* and their relation to in vitro wall digestibility. **Phytochemistry**, v. 64, p. 603-607, 2003.

LEE, S. H.; DOHERTY, T. V.; LINHARDT, R. J.; DORDICK, J. S. Ionic liquidmediated selective extraction of lignin from wood leading to enhanced enzymatic cellulose hydrolysis. **Biotechnol Bioeng**, v. 102, p. 1368-1376, 2009.

LEROUX, O.; SØRENSEN, I.; MARCUS, S. E.; VIANE, R. L. L.; WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P. Antibody-based screening of cell wall matrix glycans in ferns reveals taxon, tissue and cell-type specific distribution patterns. **BMC Plant Biol**, v. 15, n. 56, 2015.

LI, C.; KNIERIM, B; MANISSERI, C.; ARORA, R.; SCHELLER, H. V.; AUER, M.; VOGEL, K. P.; SIMMONS, B. A.; SINGH, S. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. **Bioresource Technol**, v. 101, p. 4900-4906, 2010.

LOPES, F. J. F.; SILVÉRIO, F. O.; BAFFA, D. C. F.; LOUREIRO, M. E.; BARBOSA, M. H. P. Determination of sugarcane bagasse lignin S/G/H ratio by pyrolysis GC/MS. **J Wood Chem Technol**, v. 31, p. 309-323, 2011.

MAJUMDAR, G. P.; SAHA, B. Nodal anatomy and the vascular system of the shoot of rice plant (*Oryza sativa* L.). **Proc Natn Inst Sci India**, v. 22, n. 5, p. 236-245, 1957.

MANDELS, M.; ANDREOTTI, R; ROCHE, C. Measurement of saccharifying cellulase. **Biotechnol Bioeng Symp**, v. 6, p. 21-33, 1976.

MANSFIELD, S. D.; MOONEY, C.; SADDLER, J. N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnol Prog**, v. 15, p. 804-816, 1999.

MASARIN, F.; GURPILHARES, D. B.; BAFFA, D. C. F.; BARBOSA, M. H. P.; CARVALHO, W.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Chemical composition and enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin contents. **Biotechnol Biofuels**, v. 4, n. 55, 2011.

MCCARTNEY, L.; MARCUS, S. E.; KNOX, J. P. Monoclonal antibodies to plant cell wall xylans and arabinoxylans. **J Histochem Cytochem**, v. 53, n. 4, p. 543-546, 2005.

MCCLEARY, B. V.; CODD, R. Measurement of (1-3),(1-4)-beta-D-glucan in barley and oats-a streamlined enzymatic procedure. **J Sci Food Agr**, v. 55, n. 2, p. 303–312, 1991.

MENDES, F. M.; HEIKKILÄ, E.; FONSECA, M. B.; MILAGRES, A. M. F.; FERRAZ, A.; FARDIM, P. Topochemical characterization of sugar cane pretreated with alkaline sulfite. **Ind Crop Prod**, v. 69, p. 60-67, 2015.

MENDES, F. M.; SIQUEIRA, G.; CARVALHO, W.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Enzymatic hydrolysis of chemithermomecanically pretreated sugarcane Bagasse and two experimental samples with reduced initial lignin content. **Biotechnol Progr**, v. 27, p. 395-401, 2011.

NGUYEN, Q. A.; TUCKER, M. P.; KELLER, F. A.; BEATY, D. A.; CONNORS, K. M.; EDDY, F. P. Dilute Acid Hydrolysis of Softwoods. **Appl Biochem Biotech**, v. 77-79, p. 133-142, 1999.

ØBRO, J.; HARHOLT, J.; SCHELLER, H. V.; ORFILA, C. Rhamnogalacturonan I in *Solanum tuberosum* tubers contains complex arabinogalactan structures. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1429–38, 2004.

ÖHGREN, K.; BURA, R.; SADDLER, J.; ZACCHI, G. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. **Bioresource Technol**, v. 98, p. 2503-2510, 2007.

PALMER, N. A.; SATTLER, S. E.; SAATHOFF, A. J.; FUNNELL, D.; PEDERSEN, J. F.; SARATH, G. Genetic background impacts soluble and cell wall-bound aromatics in *brown midrib* mutants of sorghum. **Planta**, v. 229, p. 115-127, 2008.

PANDEY, A., SOCCOL, C. R., NIGAM, P., SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technol**, v. 74, p. 69-80, 2000.

PARK, S.; BAKER, J. O.; HIMMEL, M. E.; PARILLA, P. A.; JOHNSON, D. K. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. **Biotechnol Biofuels**, v. 3, n. 10, 2010.

PATTATHIL, S.; AVCI, U.; BALDWIN, D.; SWENNES, A. G.; MCGILL, J. A.; POPPER, Z.; BOOTTEN, T.; ALBERT, A.; DAVIS, R. H.; CHENNAREDDY, C.; DONG, R.; O'SHEA, B.; ROSSI, R.; LEOFF, C.; FRESHOUR, G.; NARRA, R.; O'NEIL, M.; YORK, W. S.; HAHN, M. G. A comprehensive toolkit of plant cell wall glycan-directed monoclonal antibodies. **Plant Physiol**, v. 153, p. 514-525, 2010.

PATTATHIL, S.; AVCI, U.; MILLER, J. S.; HAHN, M. G. Immunological approaches to plant cell wall and biomass characterization: glycome profiling. **Methods Mol Bio,** v. 908, p. 61-72, 2012.

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

PURI, V. P. Effect of crystallinity and degree of polymerization of cellulose on enzymatic saccharification. **Biotechnol Bioeng**, v. 26, p. 1219–1222, 1984.

RALPH, J. Hydroxycinnamates in lignification. **Phytochem Rev**, v. 9; p. 65-83, 2010.

RALPH, J.; HATFIELD, R. D. Pyrolysis-GC-MS characterization of forage materials. **J Agr Food Chem**, v. 39, n. 8, p. 1426-1437, 1991.

RALPH, J.; LUNDQUIST, K.; BRUNOW, G.; LU, F.; KIM, H.; SCHATZ, P. F.; MARITA, J. M.; HATFIELD, R. D.; RALPH, S. A.; CHRISTENSEN, J. H.; BOERJAN W. Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4hydroxyphenyl- propanoids**. Phytochem Rev**, v. 3, n. 1-2, p. 29-60, 2004.

RANCOUR, D. M.; HATFIELD, R. D.; MARITA, J. M.; ROHR, N. A.; SCHMITZ, R. J. Cell wall composition and digestibility alterations in *Brachypodium distachyon* achieved through reduced expression of the UDP-arabinopyranose mutase. **Front Plant Sci**, v. 6, n. 446, 2015.

ROSGAARD, L.; PEDERSEN, S.; LANGSTON, J.; AKERHIELM, D.; CHERRY, J. R.; MEYER, A. S. Evaluation of minimal *Trichoderma reesei* cellulase mixtures on differently pretreated barley straw substrates. **Biotechnol Prog**, v. 23, p. 1270-1276, 2007.

RYTIOJA, J.; HILDÉN, K.; YUZON, J.; HATAKKA, A.; VRIES, R. P.; MÄKELÄ, M. R. Plant-Polysaccharide-Degrading Enzymes from Basidiomycetes. **Microbiol Mol Biol R**, v. 78, n. 4, p. 614-649, 2014.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. J Ind Microbiol Biot, v. 30, p. 279-291, 2003.

SANJUÁN, R.; ANZALDO, J.; VARGAS, J.; TURRADO, J.; PATT, R. Morphological and chemical composition of pith and fibers from mexican sugar cane bagasse. **Holz Roh Werkst**, v. 59, p. 447-450, 2001.

SANNIGRAHI P.; MILLER S. J.; RAGAUSKAS A. J. Effects of organosolv pretreatment and enzymatic hydrolysis on cellulose structure and crystallinity in Loblolly pine. **Carbohydr Res**, v. 345, n. 7, p. 965–970, 2010.

SANTIAGO, R.; MALVAR, R. A. Role of dehydrodiferulates in maize resistance to pests and diseases. **Int J Mol Sci**, v. 11, p. 691-703, 2010.

SCHELLER, H, V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. Annu Rev Plant, v. 61, p. 263-289, 2010.

SILVA, F. T. Obtenção de insumos químicos a partir do aproveitamento integral do bagaço de cana. Tese (Doutorado). Unicamp. Instituto de Química, Campinas. 1995.

SIQUEIRA, G.; MILAGRES, A. M. F.; CARVALHO, W.; KOCH, G.; FERRAZ, A. Topochemical distribution of lignin and hydroxycinnamic acids in sugar-cane cell walls and its correlation with the enzymatic hydrolysis of polysaccharides. **Biotechnol Biofuels**, v. 4, n. 7, 2011.

SOUZA, A. P.; LEITE, D. C. C.; PATTATHIL, S.; HAHN, M. G.; BUCKERIDGE, M. S. composition and structure of sugarcane cell wall polysaccharides: implications for second-generation bioethanol production. **Bioenergy Res**, v. 6, n. 2, p. 564-579, 2013.

TRETHEWEY, J. A. K.; CAMPBELL, L. M.; HARRIS, P. J. $(1\rightarrow 3),(1\rightarrow 4)$ -ß-Dglucans in the cell walls of the Poales (sensu lato): an immunogold labeling study using a monoclonal antibody. **Am J Bot**, v. 92, n. 10, p. 1660-1674, 2005.

TRETHEWEY, J. A. K.; HARRIS, P. J. Location of (1-->3)- and (1-->3), (1-->4)beta-D-glucans in vegetative cell walls of barley (*Hordeum vulgare*) using immunogold labelling. **New Phytol**, v. 154, p. 347-358, 2002.

VÁRNAI, A.; SIIKA-AHO, M.; VIIKARI, L. Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce by lignin and hemicellulose. **Enzyme Microb Tech**, v. 46, p. 185-193, 2010.

VÁRNAI, A.; COSTA, T. H. F.; FAULDS, C. B.; MILAGRES, A. M. F.; SIIKA-AHO, M.; FERRAZ, A. Effects of enzymatic removal of plant cell wall acylation (acetylation, *p*-coumaroylation, and feruloylation) on accessibility of cellulose and

xylan in natural (non-pretreated) sugar cane fractions. **Biotechnol Biofuels**, v. 7, n. 153, 2014.

VEGA-SÁNCHEZ, M. E.; LOQUÉ, D.; LAO, J.; CATENA, M.; VERHERTBRUGGEN, Y.; HERTER, T.; YANG, F.; HARHOLT, J.; EBERT, B.; BAIDOO, E. E. K.; KEASLING, J. D.; SCHELLER, H. V.; HEAZLEWOOD, J. L.; RONALD, P. C. Engineering temporal accumulation of a low recalcitrance polysaccharide leads to increased C6 sugar content in plant cell walls. **Plant Biotechnol J**, v. 13, n. 7, p. 903-914, 2015.

VEGA-SÁNCHEZ, M. E.; RONALD, P. C. Genetic and biotechnological approaches for biofuel crop improvement. **Curr Opin Biotech**, v. 21, p. 218-224, 2010.

VEGA-SÁNCHEZ, M. E.; VERHERTBRUGGEN, Y.; CHRISTENSEN, U.; CHEN, X.; SHARMA, V.; VARANASI, P.; JOBLING, S. A.; TALBOT, M.; WHITE, R. G.; JOO, M.; SINGH, S.; AUER, M.; SCHELLER, H. V.; RONALD, P. C. Loss of *Cellulose Synthase-Like F6* function affects mixed-linkage glucan deposition, cell wall mechanical properties and defense responses in vegetative tissues of rice. **Plant Physiol**, v. 159, n. 1, p. 56-69, 2012.

VEGA-SÁNCHEZ, M. E.; VERHERTBRUGGEN, Y.; SCHELLER, H. V.; RONALD, P. C. Abundance of mixed linkage glucan in mature tissues and secondary cell walls of grasses. **Plant Signal Behav**, v. 8, n. 2, 2013.

VOGEL, J. Unique aspects of the grass cell wall. **Curr Opin Plant Biol**, v. 11, p. 301-307, 2008.

WEN, J-L.; XIAO, L-P.; SUN, Y-C.; SUN, S-N.; XU, F.; SUN, R-C.; ZHANG, X-L. Comparative study of alkali-soluble hemicelluloses isolated from bamboo (*Bambusa rigida*). **Carbohyd Res**, v. 346, p. 111-120, 2011.

WILSON, J. R.; MERTENS, D. R.; HATFIELD, R. D. Isolates of Cell Types from Sorghum Stems: Digestion, Cell Wall and Anatomical Characteristics. **J Sci Food Agric**, v. 63, p. 407-417, 1993.

WOODWARD, J. R.; FINCHER, G. B.; STONE, B. A. Water-soluble (1,3),(1,4)beta-D-glucans from barley (*Hordeum vulgare*) endosperm. II. Fine structure. **Carbohydr Polym**, v. 3, p. 207–225, 1983.

WU L.; ARAKANE, M.; IKE M.; WADA, M.; TAKAI T., MITSURU G.; TOKUYASU K. Low temperature alkali pretreatment for improving enzymatic digestibility of sweet sorghum bagasse for ethanol production. **Bioresource Technol**, v. 102, p. 4793-4799, 2011.

YANG, B.; DAI, Z.; DING, S.; WYMAN, C. E. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. **Biofuels**, v. 2, n. 4, p. 421-450, 2011.

ZENG, M.; XIMENES, E.; LADISCH, M. R.; MOSIER, N. S.; VERMERRIS, W.; HUANG, C.; SHERMAN, D. M. Tissue-specific biomass recalcitrance in corn stover pretreated with liquid hot-water: enzymatic hydrolysis (part 1). **Biotechnol Bioeng**, v. 109, n. 2, p. 390-397, 2012.

ZENG, Y.; ZHAO, S.; YANG, S.; DING, S-Y. Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels. **Curr Opin Biotech**, v. 27, p. 38-45, 2014.

APÊNDICE A – Compostos identificados na pirólise da lignina

Tabela 10 – Produtos de degradação identificados na pirólise da lignina de bagaço de cana-de-açúcar e seus precursores monolignóis de origem. Em vermelho estão assinalados os produtos correspondentes à ácidos hidroxicinâmicos de acordo com Del Río et al. (2015).

COMPOSTO	ORIGEM (precursores	Fórmula	Peso
	da lignina)		molecular
fenol	Н	C6H6O	94
2-metilfenol	Н	C7H8O	108
4-metilfenol	Н	C7H8O	108
2-metoxifenol (Guaiacol)	G	C7H8O2	124
Dimetilfenol	Н	C8H10O	122
4-etillfenol	Н	C8H10O	122
4-metilguaiacol	G	C8H10O2	138
4-vinilfenol	Н	C8H8O3	120
3-metoxicatecol	Desconhecido	C7H8O3	140
4-etilguaiacol	G	C9H12O2	152
4-vinilguaiacol	G	C9H10O2	150
4-aliphenol	Н	C9H10O	134
fenol 2,6-dimethoxi (Siringol) / 5-etilpirogalol incluso (UL)	S	C8H10O3	154
Eugenol	G	C10H12O2	164
4-Hidroxibenzaldeído	Н	C7H6O2	122
Vanilina	G	C8H8O3	152
4-Metilsiringol	S	C9H12O2	168
trans-Isoeugenol	G	C10H12O2	164
Homovanilina	G	C9H10O3	166
Derivados do guaiacol	G	G-C3H3	
Acetoguaiacona	G	C9H10O3	166
4-Etillsiringol	S	C10H14O3	182
Guaiacil acetona	G	C10H12O3	180
4-vinilsiringol	S	C10H12O3	180
4-alil-siringol	S	C11H14O3	194
4-propilsiringol	S	C11H16O3	196
Propenilsiringol	S	C11H14O3	194
cis-4-propenilsiringol	S	C11H14O3	194
Siringaldeído	S	C9H10O4	182
Derivados do siringol	S	S-C3H3	
trans-4-propenil-siringol	S	C11H14O3	194
Homosiringaldeído	S	C10H12O4	196
Acetosiringona	S	C10H12O4	196
Siringil acetone	S	C11H14O4	210
Propiosiringone	S	C10H12O4	196
trans-Sinapaldeído	S	C11H12O4	208

Fonte: arquivo pessoal.

APÊNDICE B – Micrografias complementares de imunofluorescência

Figura 37 – Micrografias de fluorescência em maior aumento de frações do entrenó dos híbridos de cana-de-açúcar 89, 146, 166 e 321 tratados com anticorpo primário monoclonal específico para $(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)$ -ß-D-glucana e anticorpo secundário Alexa Fluor 514. Controles foram tratados com anticorpo secundário apenas. O híbrido 140 não apresentou nenhuma fluorescência nessas condições. Legenda: F- fibra; X – vaso do xilema; P – parênquima; Px – protoxilema; FL – floema. Aumento: 200x; barra de escala corresponde à 50 µm.



Fonte: arquivo pessoal.

APÊNDICE C – Cinéticas enzimáticas

Figura 38 – Cinética da conversão enzimática de glucanas à glicose em frações do entrenó de seis híbridos de cana-de-açúcar. Círculo, quadrado e triângulo representam medula, interface e córtex respectivamente.



Fonte: arquivo pessoal.

Figura 39 – Cinética da conversão enzimática de xilanas à xilose em frações do entrenó de seis híbridos de cana-de-açúcar. Círculo, quadrado e triângulo representam medula, interface e córtex respectivamente.



Fonte: arquivo pessoal.

Figura 40 – Cinética da conversão enzimática de glucanas e xilanas à monômeros em frações do entrenó de sorgo forrageiro. Círculo e triângulo representam medula e córtex respectivamente.



Fonte: arquivo pessoal.