

**CRISTIANE RIBEIRO DE SOUSA**

**Caracterização da Mobilização dos Polissacarídeos  
da Parede Celular em Palhada de Cana de Açúcar  
Submetida às Condições de Campo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

**São Paulo  
2011**

**CRISTIANE RIBEIRO DE SOUSA**

**Caracterização da Mobilização dos Polissacarídeos  
da Parede Celular em Palhada de Cana de Açúcar  
Submetida às Condições de Campo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Marcos Silveira Buckeridge

Versão original

**São Paulo  
2011**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Sousa, Cristiane Ribeiro de.

Caracterização da mobilização dos polissacarídeos da parede celular em palhada de cana de açúcar submetida às condições de campo / Cristiane Ribeiro de Sousa. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Marcos Silveira Buckeridge.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Bioquímica de carboidratos.

Versão do título para o inglês: Characterization of cell wall polysaccharides mobilization in sugarcane straw cell wall in the field.

Descritores: 1. Cana de açúcar 2. Parede celular vegetal 3. Polissacarídeos 4. Degradação 5. Etanol celulósico I. Buckeridge, Marcos Silveira II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT III. Título.

ICB/SBIB0123/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
**Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia**  
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a):                      Cristiane Ribeiro de Sousa.

Título da Dissertação:            Caracterização da mobilização dos polissacarídeos da  
parede celular em palhada de cana de açúcar submetida às  
condições de campo.

Orientador(a):                    Marcos Silveira Buckeridge.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,  
em sessão pública realizada a ...../...../.....,

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

Examinador(a):            Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):            Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                    Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Aos meus pais Raimundo e Iracema,  
pela educação, formação e carinho.

Aos meus irmãos Rogério e Ivan,  
Meus amigos Kitaro, Andresa e Elfo e  
ao Rodrigo  
pelo apoio, companheirismo e incentivo.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Instituto de Ciências Biomédicas – ICB/USP e ao Instituto de Biociências – IB/USP, pela oportunidade de realizar este trabalho.

À FAPESP pela bolsa de estudo concedida.

Ao Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge pela oportunidade oferecida, orientação, dedicação, pelo crescimento profissional e pessoal proporcionado a mim, e principalmente pelo carinho e amizade.

À Profa. Dra. Marie-Anne Van Sluys pelo auxílio no início do meu mestrado e durante meu exame de qualificação.

À Dra. Amanda Pereira de Souza e à Msc. Adriana Grandis pelo excelente e importantíssimo apoio tanto durante a idealização do projeto, quanto durante a execução e a finalização de minha dissertação e também pela amizade.

Ao Dr. Leonardo Gomez e à Universidade de York pela realização dos ensaios de Sacarificação.

Ao Laboratório de Ecologia Isotópica do CENA, Piracicaba, São Paulo pela realização da dosagem do conteúdo de Carbono e Nitrogênio.

À Talita, Burzun, Débora, Bruna, Yepes, Leila, Maraba e Ivan por todo o companheirismo, amizade, apoio e pelas proveitosas discussões em todos os chás bávaros.

À Eglee Silvia Igarashi e Viviane L. Costa por todo o apoio e auxílio no laboratório e também pela amizade.

À Sandra. R. M. Grandis e João Claudemir Grandis por disponibilizarem o sítio onde realizei todas as coletas de palhada e pelo carinho com o qual fui recebida.

E a todos os amigos que contribuíram, estiveram presentes durante estes anos e tornaram possível o desenvolvimento deste trabalho.

“Um mestre na arte de viver não faz uma distinção acentuada entre seu trabalho e seu divertimento; entre o labor e o lazer; entre a mente e o corpo; entre o aprendizado e a recreação. Quase não sabe qual é qual. Simplesmente segue sua visão de excelência em tudo o que estiver fazendo, e deixa que os outros determinem se está trabalhando ou se divertindo. Pessoalmente, ele tem a impressão de estar fazendo as duas coisas.”

François René Auguste Chateaubriand (1768-1848)



## RESUMO

SOUSA, C. R. **Caracterização da Mobilização dos Polissacarídeos da Parede Celular em Palhada de Cana de Açúcar Submetida às Condições de Campo.** 2011. 64 f. (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O etanol celulósico é uma alternativa para aumentar a produção de bioetanol no mundo. Para isto, uma possível matéria prima é a palhada da cana de açúcar que é atualmente deixada no campo para decomposição. No entanto, o processo de desmonte da parede celular sob condições de campo é desconhecido e compreender como este processo ocorre é de grande relevância para desenvolver a tecnologia do etanol de segunda geração. O objetivo deste trabalho foi compreender como a palhada de cana de açúcar foi degradada no campo após 3, 6, 9 e 12 meses. Foram analisados os conteúdos de ligninas, proteínas e carboidratos não-estruturais. A composição da parede celular foi determinada por fracionamento e determinação da composição dos monossacarídeos. Os carboidratos não estruturais desapareceram rapidamente durante os primeiros 3 meses no campo. Na parede celular, foi observada uma redução de 26% no rendimento do resíduo concomitante ao aumento de 13,3 % nas frações de clorito de sódio e oxalato de amônio, compostas por pectinas, arabinoxilanos mais ramificados e  $\beta$ -glucanos mais solúveis. Mudanças na composição dos monossacarídeos de cada fração mostraram que o primeiro polímero a ser solubilizado foi o arabinoxilano (após 3 meses) seguido dos  $\beta$ -glucanos e celulose (após 6 meses). A solubilização precoce dos arabinoxilanos sugerem que este polímero é mais acessível que os  $\beta$ -glucanos no campo e sua solubilização permitiu a degradação da celulose após 6 meses. Apesar da solubilização precoce dos arabinoxilanos, a razão hexose:pentose reduziu-se, sugerindo que as pentoses deste polímero foram degradadas mais lentamente. A análise dos dados obtidos permitiu a sugestão de uma possível ordem de enzimas a serem utilizadas para produção de etanol de segunda geração, iniciando-se com xilanases e continuando com endo-glucanases (liquenase e celulasas).

**Palavras-chave:** Cana de Açúcar. Parede Celular Vegetal. Polissacarídeos. Degradação. Etanol Celulósico.

## ABSTRACT

SOUSA, C. R. **Characterization of Cell Wall Polysaccharides Mobilization in Sugarcane Straw Cell Wall in the Field.** 2011. 64 p. Masters Thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Cellulosic ethanol is an alternative for increasing the amount of bioethanol production in the world. In Brazil, besides bagasse, a possible feedstock for such processes is the sugarcane straw, which is actually left in the field. However, the process that leads the cell wall disassembly under field conditions is unknown and understanding how this happens is considered a good opportunity to improve 2<sup>nd</sup> generation bioethanol technology. In the present work we aimed at studying how sugarcane straw is degraded in the field after 3, 6, 9 and 12 months. Non-structural carbohydrates, lignin and protein contents were analysed. Cell wall composition was determined by cell wall fractionation and determination of monosaccharide composition. Non-structural carbohydrates quickly disappeared during the first 3 months in the field. In the cell walls a decrease (ca.26%) in yield of the residues (cellulose) was observed concomitantly with an increase of 13.3% in ammonium oxalate and sodium chloride fractions, which are composed of pectin, branched arabinoxylan and soluble  $\beta$ -glucan. Changes in monosaccharide composition from each fraction showed that the first polymer to be solubilised is the arabinoxylan (after 3 months) followed by  $\beta$ -glucans and cellulose (after 6 months). The earlier solubilisation of arabinoxylans suggests that this polymer is more accessible than  $\beta$ -glucan in the field and that its solubilisation allowed cellulose degradation after 6 months. In spite of the earlier arabinoxylan easier solubilisation, the hexose:pentose ratio decreased, suggesting that the pentoses from polymers are degraded more slowly. Our data suggest a possible order of enzymes to be used in the sugarcane straw cell wall saccharification, beginning with xylanases, and subsequently with endo-glucanases (lichenases and cellulases).

**Key words:** Sugarcane. Plant Cell Wall, Polysaccharide. Degradation. Cellulosic Ethanol.

## SUMÁRIO

<b>1 <u>INTRODUÇÃO</u></b> .....	11
<b>1.1 O BIOETANOL, A CANA DE AÇÚCAR E O USO DOS SEUS RESÍDUOS</b> .....	11
<b>1.1 A POSSIBILIDADE DO ETANOL CELULÓSICO</b> .....	12
<b>1.2 PAREDE CELULAR</b> .....	14
<b>1.3 A PALHADA DE CANA DE AÇÚCAR</b> .....	16
<b>2 <u>OBJETIVOS</u></b> .....	19
<b>2.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	19
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	19
<b>3 <u>MATERIAL E MÉTODOS</u></b> .....	20
<b>3.1 COLETA DO MATERIAL E LOCAL DE ESTUDO</b> .....	20
<b>3.2 UMIDADE RELATIVA DO SOLO E PARÂMETROS CLIMÁTICOS</b> .....	21
<b>3.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS</b> .....	22
<b>3.3.1 QUANTIFICAÇÃO DOS AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS</b> .....	22
<b>3.3.2 EXTRAÇÃO E DOSAGEM DE AMIDO</b> .....	23
<b>3.3.3 FRACIONAMENTO DA PAREDE CELULAR</b> .....	24
<b>3.3.3.1 Remoção dos açúcares solúveis</b> .....	24
<b>3.3.3.2 Remoção de amido</b> .....	24
<b>3.3.3.3 Remoção de lignina</b> .....	25
<b>3.3.3.4 Fracionamento das porções de pectinas, hemiceluloses e celulose</b> .....	25
<b>3.3.3.5 Determinação do teor de celulose</b> .....	26
<b>3.3.4 HIDRÓLISE ÁCIDA DAS FRAÇÕES DE PAREDE CELULAR E ANÁLISE DOS PERFIS DE MONOSSACARÍDEOS</b> .....	26
<b>3.3.5 DETERMINAÇÃO DA SACARIFICAÇÃO DA PALHADA DE CANA DE AÇÚCAR</b> .....	27
<b>3.3.6 EXTRAÇÃO E DOSAGEM DE LIGNINA</b> .....	28
<b>3.3.7 DOSAGEM DO CONTEÚDO DE <math>\beta</math>-GLUCANOS</b> .....	29
<b>3.3.8 DOSAGEM DO CONTEÚDO DE PROTEÍNAS TOTAIS</b> .....	30
<b>3.3.9 QUANTIFICAÇÃO DE CARBONO E NITROGÊNIO</b> .....	30
<b>3.4 ANÁLISE DE DADOS</b> .....	31
<b>3.4.1 ANÁLISE DO RENDIMENTO DAS FRAÇÕES</b> .....	31

3.4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	31
<b>4 <u>RESULTADOS</u></b> .....	<b>33</b>
4.1 PARÂMETROS CLIMÁTICOS E UMIDADE DO SOLO.....	33
4.2 DEGRADAÇÃO DOS CARBOIDRATOS NÃO-ESTRUTURAIS .....	35
4.3 DEGRADAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA PAREDE CELULAR.....	36
4.4 PROPORÇÃO DOS MONOSSACARÍDEOS DAS FRAÇÕES DE PAREDE CELULAR.....	38
4.5 SACARIFICAÇÃO DA PAREDE CELULAR DE PALHADA DE CANA DE AÇÚCAR.....	41
4.6 VARIAÇÕES NOS CONTEÚDOS DE LIGNINA E PROTEÍNAS.....	42
4.7 VARIAÇÃO NO CONTEÚDO DE B-GLUCANOS .....	44
4.8 VARIAÇÕES NOS TEORES DE CARBONO E NITROGÊNIO E DE SEUS RESPECTIVOS DELTAS <sup>15</sup> N E <sup>13</sup> C NA PALHADA DE CANA DE AÇÚCAR .....	46
<b>5 <u>DISCUSSÃO</u></b> .....	<b>48</b>
5.1 PARÂMETROS CLIMÁTICOS E UMIDADE DO SOLO.....	48
5.2 DEGRADAÇÃO DOS CARBOIDRATOS NÃO-ESTRUTURAIS .....	49
5.3 DEGRADAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA PAREDE CELULAR E MUDANÇAS NAS PROPORÇÕES DOS MONOSSACARÍDEOS.....	50
5.4 VARIAÇÕES NOS TEORES DE LIGNINA E PROTEÍNAS.....	53
5.5 DEGRADAÇÃO DOS B-GLUCANOS.....	55
5.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	56
<b>6 <u>CONCLUSÕES</u></b> .....	<b>58</b>
REFERÊNCIAS .....	59

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 O BIOETANOL, A CANA DE AÇÚCAR E O USO DOS SEUS RESÍDUOS**

O Brasil e os Estados Unidos são líderes mundiais na produção de etanol, utilizando como matéria-prima a cana de açúcar e o milho, respectivamente (GOLDEMBERG, 2007). No entanto, o Brasil é o país que acumula a maior e a mais diversificada experiência na produção deste biocombustível a partir de cana de açúcar, principalmente devido ao programa Proálcool, implantado com sucesso no ano de 1975 (MACEDO, 1998). Mesmo com o sistema de bioenergia a partir de cana de açúcar mais eficiente do mundo, apenas 1/3 da biomassa produzida é efetivamente utilizada na produção de bioetanol (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA DE AÇÚCAR, 2007). Essa parte é proveniente dos açúcares solúveis, principalmente da sacarose, presentes no caldo retirado do colmo. Estes açúcares são fermentados por leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, produzindo o etanol. Do restante da biomassa produzida, 1/3 é formado pelo bagaço (resíduo proveniente do colmo após a retirada do caldo que contém sacarose) e a outra terça parte é formada pela palha (BANCO NACIONAL DO DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL, 2008).

Atualmente, o bagaço da cana de açúcar é queimado a fim de aquecer as caldeiras e também para a geração de energia elétrica para a própria usina. Esse processo apresenta baixa eficiência, mas isso não representa um problema, pois a oferta de bagaço supera a demanda das usinas por eletricidade (BRAUNBECK e CORTEZ, 2008). Somado a isso, o excedente de energia elétrica é vendido para redes públicas, proporcionando uma renda adicional às usinas.

Já a palhada de cana de açúcar era queimada no sistema tradicional de colheita, que ainda é realizado em cerca de 70% das áreas cultivadas com cana no Brasil (BNDES, 2008). Este procedimento vem sendo aos poucos substituído pela colheita mecanizada da cana crua picada (sem queima) por conta de restrições ambientais às práticas de queima. Com isto, a palhada passou a ser depositada no campo sofrendo decomposição no decorrer do tempo.

A palhada deixada sobre o solo também pode ser utilizada para produção de bioeletricidade e com esta intenção, existem algumas iniciativas para

desenvolvimento de formas de retirar a palhada do solo e levá-la à indústria, discutidas por Gómez et al. (2010). Porém, como a oferta de bagaço supera a demanda por energia, a palhada acaba não competindo com o bagaço na cogeração de energia elétrica. Segundo Ripoli (2000), uma tonelada de palhada equivale a algo entre 1,2 e 2,8 EBP (equivalente barris de petróleo), sendo encontrados de quatro a nove toneladas de palhada (peso seco) por hectare de canavial. Assim, a não utilização de todo esse material vegetal pode ser considerado um desperdício energético. Portanto, o uso da energia presente na palhada seria economicamente mais interessante para o necessário aumento na produção de etanol do que o uso do bagaço, pois este já tem fins lucrativos bastante estabelecidos.

### **1.1 A POSSIBILIDADE DO ETANOL CELULÓSICO**

A energia armazenada nas ligações glicosídicas presentes nos polissacarídeos da parede celular pode ser utilizada para a produção de bioenergia como alternativa ao uso de combustíveis fósseis (BUCKERIDGE et al., 2010; PAULY e KEEGSTRA, 2010). No entanto, a parede celular é uma estrutura recalcitrante à degradação biológica, sendo difícil o acesso a esta energia (BUCKERIDGE et al., 2008; CARROL e SOMERVILLE, 2009; BUCKERIDGE et al., 2010). Segundo Cortez (2008), a utilização desta energia armazenada poderia aumentar a produção de etanol em até 40%.

No entanto, a utilização destes polissacarídeos para a produção de etanol em larga escala ainda não ocorre de maneira eficiente, principalmente devido a problemas decorrentes da otimização do processo. Alguns coquetéis comerciais compostos por enzimas hidrolíticas promovem a degradação da biomassa. Contudo, o tempo de degradação ainda é alto, elevando o custo do processo (SOCCOL et al., 2010). Esta dificuldade está relacionada ao fato de os polissacarídeos da parede celular não estarem prontamente disponíveis, pois a lignina e outros compostos aromáticos estão ligados à celulose e à hemicelulose, protegendo-as fisicamente (ANDERSON e AKIN, 2008; BUCKERIDGE et al., 2008). Uma das formas já possíveis de liberação destes polissacarídeos é através de um pré-tratamento químico, que pode ser seguido de hidrólise ácida para a degradação dos açúcares,

separando os monossacarídeos (SOCCOL et al., 2010). Nos processos industriais, a hidrólise ácida tem sido realizada principalmente com o ácido sulfúrico (OLIVEIRA et al., 2005). Uma das dificuldades da hidrólise ácida está na necessidade de neutralização da solução contendo açúcares para proceder à fermentação, geralmente, utilizando-se hidróxido de cálcio, que não é recuperado (ALI; MARK; DANIEL, 2006). O uso de ácidos reduz o tempo de vida dos equipamentos, além de produzir resíduos tóxicos às leveduras como os furfurais, que são gerados a partir do ataque dos ácidos aos açúcares livres (BUCKERIDGE et al., 2010). Também são gerados compostos não fermentáveis, contribuindo consideravelmente para o aumento nos custos do processo (JOHNSON e ELANDER, 2008). Ainda que estas dificuldades façam parte do processo, a Indústria Dedini S/A promete para o ano de 2012, a comercialização do etanol de celulose (OLIVEIRA, 2005).

Um processo mais eficiente do que a hidrólise ácida é o uso de enzimas que hidrolisem a parede celular, rompendo as ligações entre os polissacarídeos presentes, liberando monossacarídeos que poderão ser fermentados para a produção do etanol. O uso de enzimas hidrolíticas tem algumas vantagens sobre o pretratamento químico e a hidrólise ácida, como temperaturas e valores de pH mais amenos, levando a necessidade de uso de reatores mais simples e mais baratos (JOHNSON e ELANDER, 2008). Por outro lado, esse processo requer o uso de maquinaria complexa e enzimas específicas produzidas por microrganismos e/ou pelas próprias plantas. A maquinaria bioquímica de desmonte da parede celular presente em microrganismos como fungos e bactérias representa a maior expectativa para viabilização do etanol celulósico em longo prazo (BUCKERIDGE et al., 2010). Para acessar a celulose, os microrganismos necessitam hidrolisar as hemiceluloses que recobrem as microfibrilas. Alguns estudos demonstram que fungos como os dos gêneros *Trichoderma* e *Penicillium* produzem diversos tipos de glicosidases, celulases, quitinases, proteases e lipases, entre outras hidrolases que podem ser utilizadas para a degradação da parede (POLIZELI et al., 2010).

Outro desafio para a obtenção de etanol a partir de celulose é a fermentação de pentoses. Como será discutido a seguir, a parede celular do tipo II, presente em cana de açúcar possui como uma de suas hemiceluloses principais o arabinoxilano, que é composto das pentoses xilose e arabinose (SAAVEDRA et al., 1988; BUCKERIDGE et al., 2010). Algumas espécies como o fungo *Pachysolen*

*tannophilus* são capazes de utilizar xilose e fermentar parcialmente outras pentoses depois de consumirem a glicose e a celobiose disponíveis (HINMAN et al., 1989). Porém, a levedura usualmente empregada na produção de etanol a partir de sacarose (*Saccharomyces cerevisiae*) é pouco eficiente na conversão de pentoses, além de ter sua fermentação de hexoses inibida pela presença das pentoses (GOLDMAN, 2010).

## **1.2 PAREDE CELULAR**

A parede celular é uma estrutura complexa e dinâmica presente em quase todas as células vegetais. Esta estrutura está relacionada a processos fisiológicos como dar forma e tamanho às células, conferir resistência mecânica aos tecidos, controlar a expansão celular, atuar sobre o transporte intercelular, participar da sinalização e do reconhecimento entre células, armazenar compostos de reserva e moléculas reguladoras e sinalizadoras que controlam diversos processos fisiológicos celulares, além de participar dos mecanismos de proteção contra microrganismos (BUCKERIDGE et al., 2008; DARWILL et al., 1992; ALDINGTON e FRY, 1993). Nos modelos mais recentes, é proposto que os polímeros da parede celular formam três domínios independentes: celulose-hemicelulose, pectinas e proteínas (McCANN e ROBERTS, 1991; CARPITA e GIBEAUT, 1993). O domínio celulose-hemicelulose influencia na forma celular enquanto o domínio péctico determina o grau de porosidade da parede, fornece moléculas sinalizadoras para disparar mecanismos de defesa e armazena cálcio ao longo da planta. O domínio protéico, por sua vez, tem papel estrutural e enzimático na parede.

O principal polissacarídeo da parede celular vegetal é a celulose, um polímero linear formado por resíduos de glicose ligados entre si por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4). A interação de 36 moléculas desse polissacarídeo através de pontes de hidrogênio forma aglomerados moleculares com estrutura para-cristalina denominados microfibrilas. Acredita-se que a orientação destas microfibrilas tenha papel importante na manutenção do formato da célula e também no crescimento celular por alongamento. A orientação das microfibrilas é coordenada pelas hemiceluloses, cuja composição e estrutura variam conforme o grupo taxonômico ao qual a planta pertence (BUCKERIDGE et al., 2008).



Há 30 anos foi proposto um modelo que diferencia a composição química da parede celular de Eudicotiledôneas e Monocotiledôneas (DARVILL et al., 1980). Carpita e Gibeaut (1993) discutiram e aprofundaram a teoria dos três domínios (ou matrizes) da parede celular. Os autores propuseram que no reino vegetal as paredes celulares poderiam ser divididas em paredes do tipo I e do tipo II. A divisão proposta foi baseada principalmente na composição das hemiceluloses e na proporção entre as matrizes. Na parede do tipo I, o xiloglucano é a principal hemicelulose e as proporções entre os domínios são: 30% de celulose, 30% de hemiceluloses, 30% de pectinas e 10% de proteínas.

A parede do tipo II é característica das plantas da família Poaceae (gramíneas). Esse tipo de parede, em contraposição à do tipo I, apresenta um teor bem menor de pectinas (quase zero em certos casos) e teores igualmente baixos de xiloglucanos (CARPITA e GIBEAUT, 1993). Nas paredes do tipo II, as principais hemiceluloses são o  $\beta$ -glucano ou glucano de ligação mista e o glucuronoarabinoxilano (GAX).

Os  $\beta$ -glucanos são formados por uma cadeia de glicoses ligadas entre si com ligações do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) com interrupções de ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) que podem ser encontrados em gramíneas e cereais (CARPITA, 1996). A estrutura dos  $\beta$ -glucanos foi definida a partir de uma endoglucanase de *Bacillus subtilis*, a liquenase (WOODWARD; FINCHER; STONE, 1985). Esta enzima hidrolisa apenas ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) precedidas de uma ligação  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) (PARRISH; PERLIN; REESE, 1960), formando assim, oligossacarídeos de tamanhos diferentes, com proporção dependendo da quantidade de ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) presentes neste  $\beta$ -glucano. A hidrólise de  $\beta$ -glucanos por liquenase libera principalmente oligossacarídeos com três ( $G_{1\rightarrow 4}G_{1\rightarrow 3}G$ ) e quatro ( $G_{1\rightarrow 4}G_{1\rightarrow 4}G_{1\rightarrow 3}G$ ) glicoses, porém, também é possível encontrar oligossacarídeos com até seis glicoses. A relação entre a proporção do trissacarídeo e o tetrassacarídeo informa a proporção de ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) presentes no polissacarídeo (ANDERSON e STONE, 1975). Quanto menor essa relação, menor a proporção de ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) e, conseqüentemente, mais a estrutura do  $\beta$ -glucano se parece com a da celulose, tornando-se menos solúvel (BUCKERIDGE et al., 2004).

Já os GAX são constituídos por uma cadeia principal de resíduos de xilose ligadas entre si com ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) com ramificações de arabinose através de ligações  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 2) e/ou  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 3), e de ácido glucurônico através de ligações  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6).

Como em cana de açúcar ainda não foi observada a presença de ramificações de ácido glucurônico conforme Buckeridge, 2011 (em fase de elaboração)<sup>1</sup>, o GAX será chamando apenas de arabinoxilano neste trabalho. Os arabinoxilanos são solúveis em água ou em álcali. O grau de ramificação do polímero é um fator que determina sua solubilidade, ou seja, quanto maior o número de ramificações, mais solúvel é o polímero. Um arabinoxilano com razão arabinose/xilose menor do que 0,69, ou seja com menos do que 30% de ramificações com arabinose, é considerado insolúvel em soluções alcalinas (ROUBROEKS; NANDERSSON; AMAN, 2000).

Estas duas hemiceluloses entrelaçadas se associam fortemente com a microfibrila de celulose e formam parte do esqueleto da parede, o qual mantém a integridade do tecido (FINCHER e STONE, 1986; BUCKERIDGE et al., 2004). Outra diferença encontrada nas paredes de Poales é a presença de compostos aromáticos em paredes ainda não-lignificadas (CARPITA, 1996). Estes compostos aromáticos estão presentes principalmente na forma de ácido ferúlico e interligam os arabinoxilanos na parede celular (DOS SANTOS et al., 2004). Estas ligações entre o arabinoxilanos e o ácido ferúlico promovem a cessação do crescimento celular e reduzem a acessibilidade de hidrolases de patógenos na parede celular (DOS SANTOS et al., 2008).

### **1.3 A PALHADA DE CANA DE AÇÚCAR**

A palhada ou palhiço de cana de açúcar é a camada de resíduos vegetais composta por folhas secas, ponteiros e até pedaços do colmo sendo formada após colheita sem prévia queima (RIPOLI e RIPOLI, 1991).

Há relatos de que a presença da palhada em decomposição sobre o solo auxilia no aumento da produtividade da cana de açúcar, pois melhora a qualidade do solo aumentando a infiltração de água, diminuindo a erosão e a evaporação, melhorando sua estrutura e sendo fonte de nutrientes para a macro e a microflora de solo e também para a própria cultura de cana de açúcar (WOOD et al., 1991). Timm (2002) verificou que a presença da palhada reduziu as temperaturas médias na camada

---

<sup>1</sup> BUCKERIDGE, M. S. São Paulo, 2011.

superficial do solo na ordem de 7 °C, evitando picos de temperatura na superfície durante o período inicial de estabelecimento da cana soca.

Por outro lado, alguns autores mostram que a deposição de palhada de cana sobre a superfície do solo pode causar problemas relacionados ao manejo da cultura (FURLANI NETO; RIPOLI; VILA NOVA, 1997) como, por exemplo, a baixa taxa líquida de mineralização de nitrogênio no período de um ano agrícola (TRIVELIN; VICTORIA; RODRIGUES, 1995), a dificuldade em controlar seletivamente as plantas daninhas e o aumento de populações de pragas que se abrigam e multiplicam sob a palhada (MACEDO; BOTELHO; CAMPOS, 2003). Somado a isso, o volume de palhada sobre a soqueira pode dificultar sua emergência, causando falha na rebrota (VASCONCELOS, 2002), afetando negativamente o desenvolvimento da cultura reduzindo o número de colmos e seu peso úmido em torno de 13 % (TIMM, 2002).

Em face às vantagens e desvantagens decorrentes da presença da palhada no solo, Manechini et al. (2005) conduziram um experimento durante o período de três a cinco anos, em três diferentes usinas do Estado de São Paulo, analisando o efeito de diferentes porcentagens de palha (100%, 66%, 33% e 0%) deixada no campo após a colheita mecanizada da cana de açúcar sobre a população de ervas daninhas. Os autores concluíram que é alta a probabilidade de se conseguir efeito similar ao dos herbicidas químicos com a permanência de 66% da palha sobre o solo (cerca de 7,5 toneladas por hectare). Outros estudos recomendam manter cerca de 50% da palha sobre o solo para que haja redução da erosão, o reciclo de nutrientes e a manutenção de um nível mínimo de umidade no solo (HASSUANI et al., 2005). Sendo assim, há a possibilidade da utilização da palhada remanescente para obtenção de energia a partir da co-geração e/ou a produção de etanol a partir de celulose.

A mineralização da palhada é dependente de fatores ambientais (temperatura, disponibilidade hídrica e de oxigênio), da composição química da palhada (principalmente da relação de carbono e nitrogênio) e dos teores de lignina, celulose, hemicelulose e polifenóis (HERMAN et al., 1977; NG KEE KWONG et al., 1987). A decomposição desta massa vegetal se dá principalmente através da ação de microrganismos como bactérias e fungos. Porém, a maioria dos fungos tem maior acesso ao substrato uma vez que as hifas do micélio penetram nos tecidos vegetais melhor do que as bactérias e, dessa forma, têm acesso à maior área do tecido

vegetal devido à maior superfície de contato, sendo esta área indisponível para outros organismos do mesmo ambiente (WUBAH; AKIN; BONEMAN., 1993; e BONINI et al., 1997). Esses microrganismos são capazes de expressar maquinaria enzimática necessária para degradar a celulose, hemiceluloses compostas por hexoses e outros componentes da parede celular vegetal e usar seus produtos de degradação como fonte de carbono (KIRK e MOORE, 1972).

Em palha de arroz, observou-se que a degradação da celulose é maior em solo inundado, onde há menor concentração de oxigênio (DEVEVRE e HORWATH, 2000). Já em cana de açúcar, foi observado que 80% da hemicelulose, 50% da celulose e 30% da lignina são degradados na palha 11 meses após a colheita (OLIVEIRA et al., 1999). Embora já se saiba que durante a degradação da palhada de cana de açúcar ocorre redução dos polímeros da parede celular, Oliveira et al. (1999) não avaliaram profundamente qual a série de eventos que possibilitam o acesso a cada um dos polissacarídeos, permitindo sua degradação.

Neste contexto, para que seja possível a utilização de parte da palhada para a produção de etanol celulósico a partir de hidrólise enzimática, é necessária a aquisição de informações detalhadas sobre a dinâmica desta degradação. O conhecimento sobre a ordem na qual os polissacarídeos são degradados na palhada de cana dará indícios sobre quais e em qual sequência as enzimas deverão ser utilizadas para que a parede celular seja aproveitada em eventuais processos para a produção de etanol celulósico.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste estudo foi compreender como ocorre a mobilização dos polissacarídeos da parede celular da palhada de cana de açúcar durante o período de um ano pós-colheita.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar a composição dos polissacarídeos da parede celular da palhada de cana de açúcar aos 0, 3, 6, 9 e 12 meses pós-colheita;
- Determinar o conteúdo de açúcares solúveis, amido, lignina, proteínas e  $\beta$ -glucanos presentes na palhada de cana aos 0, 3, 6, 9 e 12 meses pós-colheita;
- Relacionar a mobilização dos componentes da palhada com os parâmetros climáticos como temperatura e precipitação;
- Relacionar os dados de mudança de composição da parede celular com as prováveis enzimas atuantes neste processo durante a mobilização dos polissacarídeos presentes na parede celular da palhada.

### 3 **MATERIAL E MÉTODOS**

#### 3.1 **COLETA DO MATERIAL E LOCAL DE ESTUDO**

As amostras de palhada de *Saccharum ssp.* da variedade SP80 1816 foram obtidas da safra 2008/2009, conforme Tabela 1. As coletas foram realizadas em um talhão contendo cerca de 50 fileiras de cana, localizado no sítio Vitória, na cidade de Piracicaba, São Paulo (S 22° 43,079' / WO 47° 41,917') (Figura 1). Após o corte da cana, a palhada remanescente foi reunida em leiras (aleirada) a cada 5 ruas, com o auxílio de um trator acoplado a um aleirador.

**Tabela 1 - Calendário das coletas realizadas.**

<b>Tempo de exposição</b>	<b>Mês da coleta</b>
0 meses	jun/09
3 meses	set/09
6 meses	dez/09
9 meses	mar/10
12 meses	jun/10

Para o início das coletas foi realizada uma marcação do talhão de aproximadamente 10.000 m<sup>2</sup>. Para a coleta de material, foram selecionadas cinco leiras considerando uma distância entre 12 a 15 metros entre elas. Dentro de cada leira, três pontos foram amostrados, sendo eles a 10, 30 e 50 m da borda do talhão, que foram homogeneizados, formando uma amostra composta. Todas as coletas foram realizadas durante o período da manhã, entre 10 e 12 horas. A primeira coleta continha as folhas verdes retiradas da planta antes da colheita em junho de 2009, (tempo zero). Todas as coletas subseqüentes que continham palhada exposta às condições de campo por diferentes intervalos de tempo foram comparadas com a primeira e entre si quanto às análises bioquímicas descritas na seção 3.3



**Figura 1** - Imagem de satélite mostrando no centro, o talhão onde foram realizadas as coletas de palhada. Quadrados brancos mostram os pontos aproximados de coleta distribuídos pelo talhão.

As amostras foram transportadas para o laboratório, onde a palhada foi separada do solo por flotação em água de torneira, congelada e seca em liofilizador. O material seco foi pulverizado em moinho de bola e submetido às análises bioquímicas descritas no item 3.3.

### **3.2 UMIDADE RELATIVA DO SOLO E PARÂMETROS CLIMÁTICOS**

Foram realizadas amostragens do solo que estava em contato com a palhada coletada, para determinar sua umidade relativa. As amostras de solo foram acondicionadas em frascos de vidro, que imediatamente foram lacrados a fim de evitar evaporação de água durante o deslocamento até o laboratório. Os frascos foram pesados para determinação da massa úmida e, em seguida, foram colocados em estufa a 60 °C até a obtenção da massa seca constante. A porcentagem de umidade do solo foi calculada a partir da fórmula:

$$Umidade\ relativa = \frac{Massa\ úmida - Massa\ seca}{Massa\ úmida} \times 100\%$$

Os parâmetros climáticos (temperatura, umidade relativa do ar e pluviosidade) foram obtidos no banco de dados do Posto Agrometeorológico do Departamento de

Ciências Exatas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), no município de Piracicaba – SP (latitude: 22°30’30”S, longitude: 47°38’00”W e altitude: 546 m), disponível em [www.lce.esalq.usp.br/anos](http://www.lce.esalq.usp.br/anos).

### **3.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS**

#### **3.3.1 QUANTIFICAÇÃO DOS AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS**

Para dosagem do teor de açúcares solúveis totais (AST), 20 mg de material seco e pulverizado foram dispostos em microtubos de 2 mL e extraídos seis vezes consecutivas utilizando 1,5 mL de etanol 80% (v/v) a 80 °C durante 20 minutos. Após cada extração, os tubos foram centrifugados a 10.600 g e o sobrenadante foi recuperado, unindo-se todas as 6 extrações. Para certificação de que todo o conteúdo de açúcares solúveis foi extraído da amostra, em uma alíquota de 50 µL da sexta extração foi determinado o conteúdo de açúcares pelo método colorimétrico fenol 5% e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 95-97%, como descrito por Dubois et al. (1956).

Após o término das extrações, os precipitados foram secos em estufa à 60 °C e armazenados a temperatura ambiente para posterior quantificação do amido (item 3.3.2) e os sobrenadantes foram secos em concentrador de amostras. Após secagem, as amostras foram ressuspensas em 1 mL de água ultrapurificada. Para retirada de pigmentos lipossolúveis como a clorofila, adicionou-se 0,5 mL de clorofórmio seguido de agitação. Os tubos foram centrifugados a 10.600 g e após a centrifugação, a fase superior foi transferida para novos microtubos de 2 mL e novamente centrifugados.

Posteriormente, retirou-se uma alíquota de 500 µL para separação e quantificação dos açúcares (glicose, frutose, sacarose e rafinose) por cromatografia líquida de troca aniônica de alta eficiência e detecção por pulso amperométrico (HPLC/PAD) em sistema Dionex-DX500 (Thermo Scientific + Dionex, São Paulo, SP, Brasil). A coluna utilizada foi Carbopac PA1, eluída com 100% NaOH 200 mM durante 30 minutos. Para a curva padrão foram utilizados os açúcares glicose, frutose, sacarose e rafinose nas concentrações de 50, 100 e 200 µM. A curva padrão foi inserida na sequência de corrida a cada 10 amostras a fim de evitar erros de detecção devido a variações temporais do aparelho na determinação nos tempos



de retenção, bem como para detectar possíveis variações nas concentrações dos açúcares devido à degradação dos mesmos.

### 3.3.2 EXTRAÇÃO E DOSAGEM DE AMIDO

A extração e dosagem do amido foram realizadas a partir do método descrito por Amaral et al. (2008). Ao precipitado obtido após a extração exaustiva dos AST, foram adicionados 500  $\mu$ L de  $\alpha$ -amilase 120 U/mL (EC 3.2.1.1) de *Bacillus licheniformis* (cód. E-ANAAM, Megazyme, Wicklow, Irlanda) em tampão MOPS 10 mM pH 6,5. As amostras foram incubadas a 75 °C durante 30 minutos. Este procedimento foi repetido, adicionando-se mais 500  $\mu$ L de  $\alpha$ -amilase, totalizando 120 unidades de enzima por microtubo.

Após esta etapa, foram adicionados 500  $\mu$ L de amiloglucosidase 30 U/mL (EC 3.2.1.3) de *Aspergillus niger* (cód. E-AMGPU, MEGAZYME) em tampão acetato 100 mM, pH 6,5. As amostras foram incubadas a 50 °C durante 30 minutos. Foram adicionados mais 500  $\mu$ L de amiloglucosidase 30 U/mL e a incubação foi repetida, totalizando 30 unidades desta enzima por microtubo. A reação enzimática foi cessada com a adição de 100  $\mu$ L de ácido perclórico 0,8M.

Após a centrifugação das amostras a 9.300 g por 5 minutos, a quantidade de amido foi obtida através da quantificação da glicose liberada após a hidrólise enzimática deste polímero. Para tanto, foram retiradas dos extratos alíquotas (50  $\mu$ L das amostras de palhada exposta às condições de campo e 25  $\mu$ L das amostras de palhada não exposta) às quais foi adicionado, em quantidade suficiente para totalizar 300  $\mu$ L, Reagente Glicose PAP Liquiform (CENTERLAB, Brasil). Este reagente contém as enzimas glicose oxidase (~1100U/mL) e peroxidase (~700 U/mL), 290  $\mu$  mol/L de 4-aminoantipirina e 50 mM de fenol pH 7,5. A glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose e o peróxido de hidrogênio formado nesta reação reage com a aminoantipirina sob ação catalisadora da peroxidase, formando uma antipirilquinomina vermelha, cuja intensidade de cor é proporcional à quantidade de glicose na amostra. Após incubação durante 15 minutos a 37 °C, o teor de glicose livre foi determinado em espectrofotômetro acoplado a leitor de microplacas de ELISA em comprimento de onda de 490 nm. Como padrão foi utilizada glicose 1 mg/mL (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil).

### **3.3.3 FRACIONAMENTO DA PAREDE CELULAR**

A metodologia adotada para fracionamento de parede celular foi adaptada a partir do procedimento descrito por Gorshkova et al. (1996) e modificado por Silva (2005). O fracionamento foi realizado partindo-se de 500 mg de material seco em liofilizador e pulverizado em moinho de bola.

#### **3.3.3.1 Remoção dos açúcares solúveis**

Para remoção dos açúcares solúveis, 35 mL de etanol 80 % (v/v) foram adicionados aos 500 mg de material seco em tubos de 50 mL e a mistura foi aquecida a 80 °C por 20 minutos sob agitação constante. Em seguida, o material foi centrifugado por 10 minutos a 3.220 g e o sobrenadante contendo os açúcares solúveis foi descartado. Este procedimento foi repetido por 6 vezes, pois a partir de então, não houve mais detecção de açúcares no sobrenadante a partir do método de determinação de açúcares solúveis, descrito por Dubois et al. (1956). Após o término das extrações, o precipitado foi seco em estufa a 60 °C por seis horas para evaporação do etanol remanescente.

#### **3.3.3.2 Remoção de amido**

Após extração dos açúcares solúveis, o precipitado foi submetido a duas extrações de 12 horas com dimetilsulfóxido (DMSO) 90% (v/v), sob agitação constante, para a retirada do amido. Após o término de cada extração, o material foi centrifugado (3.220 g, 10 minutos) e o sobrenadante foi descartado. Ao término das extrações, o precipitado foi lavado 5 vezes com água destilada, congelado, seco em liofilizador.

### **3.3.3.3 Remoção de lignina**

Para remoção da lignina, 40 mL de clorito de sódio 3% (m/v) em ácido acético 0,4% (v/v) foram adicionados ao precipitado restante após a remoção do amido. Esta solução foi mantida em agitação constante por uma hora a 80 °C. Após uma hora de extração, foram adicionados 400 mg de clorito de sódio e 160 µL de ácido acético com a intenção de dobrar a concentração do clorito de sódio ácido. Desta forma, a extração seguiu-se por mais duas horas. Ao término da extração, os tubos foram centrifugados e o sobrenadante foi recuperado, dialisado por 24 h, congelado e liofilizado, constituindo-se na fração de clorito de sódio que contém os componentes hemicelulósicos mais solúveis da parede celular. O precipitado restante após extração de lignina foi lavado 5 vezes com água destilada, congelado, seco em liofilizador.

### **3.3.3.4 Fracionamento das porções de pectinas, hemiceluloses e celulose**

Após liofilização, os precipitados, que continham predominantemente paredes celulares livres de lignina e hemiceluloses menos solúveis foram submetidos ao fracionamento para obtenção dos polissacarídeos de parede celular, conforme descrito por Silva (2005).

Alíquotas dos resíduos foram extraídas duas vezes com 30 mL de solução de oxalato de amônio 0,5% (pH 7,0) a 80 °C por 1 h e os sobrenadantes foram coletados após centrifugação. Os sobrenadantes foram dialisados e liofilizados constituindo a fração oxalato de amônio, que contém principalmente as pectinas da parede celular e hemiceluloses mais solúveis e ramificadas. Os resíduos dessa extração foram extraídos sequencialmente com hidróxido de sódio 0,1M, 1M e 4M (contendo boroidreto de sódio 3 mg/mL), duas vezes cada por 1 h cada extração para a obtenção das frações solúveis em um gradiente de soluções alcalinas. As frações foram neutralizadas com ácido acético, dialisadas e liofilizadas. O rendimento de cada fração foi obtido gravimetricamente.

### 3.3.3.5 Determinação do teor de celulose

O teor de celulose foi determinado no material remanescente, após extração com hidróxido de sódio 4M. Os polissacarídeos não celulósicos que porventura ainda permaneceram nesse resíduo foram submetidos à digestão pela solução de Updegraff (5% ácido nítrico (v/v) e 15% ácido acético (v/v) em água) por 90 minutos a 100 °C. O material remanescente desta hidrólise, chamado de resíduo, é composto principalmente por celulose, e foi lavado várias vezes em água deionizada, liofilizado e sua massa foi obtida gravimetricamente. A massa do resíduo informou a quantidade de celulose presente no material fracionado.

### 3.3.4 HIDRÓLISE ÁCIDA DAS FRAÇÕES DE PAREDE CELULAR E ANÁLISE DOS PERFIS DE MONOSSACARÍDEOS

Cada uma das frações obtidas após o fracionamento da parede foi submetida à hidrólise ácida, com a adição 100 µL de ácido sulfúrico 72% (v/v) em 2 mg de material seco em um tubo cônico de vidro. As amostras foram mantidas em banho-maria a 30 °C por 45 min. Após este período, o ácido foi diluído a 4% adicionando-se 1,7 mL de água ultrapurificada e o material foi autoclavado durante uma hora a 120 °C.

Após este procedimento, o material foi neutralizado com NaOH e submetido à colunas de troca iônica (Dowex<sup>®</sup>- Dow Chemical, SP, Brasil) para a retirada de sais da amostra sendo a primeira coluna a aniônica e a segunda a catiônica. Após a retirada dos sais, as amostras foram filtradas com filtros de 0,22 µm (Merk Millipore, SP, Brasil), congeladas e secas em liofilizador. As amostras foram ressuspensas em 500 µL de água ultrapurificada e o perfil dos monossacarídeos liberados após a hidrólise foi obtido por cromatografia de troca aniônica de alta performance (HPAEC/PAD), utilizando-se uma coluna Carbowac PA1 eluída com 87% de água e 13% de hidróxido de sódio 200 mM com fluxo constante de 1 mL/min. Para melhorar a detecção dos monossacarídeos, foi utilizado hidróxido de sódio 0,5 M com fluxo constante de 0,5 mL/min como eluente de pós-coluna.

### 3.3.5 DETERMINAÇÃO DA SACARIFICAÇÃO DA PALHADA DE CANA DE AÇÚCAR

A digestibilidade da palha de cana de açúcar foi determinada através de um ensaio de sacarificação automatizado desenvolvido na Universidade de York, Inglaterra, pelo Dr. Leonardo D. Gómez (2010). Para tanto, amostras pulverizadas de palha de cana de açúcar foram enviadas para a universidade de York.

Para realizar o ensaio de digestibilidade, 4 mg do material pulverizado foram pesados utilizando-se uma estação de manipulação automática desenvolvida na Universidade de York na qual todos os procedimentos seguintes foram realizados. Após a pesagem, o material foi submetido à pretratamento com 0,5N NaOH a 90 °C por 30 min. Posteriormente, o material foi lavado seis vezes com tampão de acetato de sódio. Após as lavagens, o material sólido foi incubado a 30 °C com o coquetel enzimático que continha uma relação de 4:1 de celulase (*Trichoderma reesei*) e Celobiase (*Aspergillus Níger*) (Novozymes, Bagsverd, Dinamarca) em tampão de acetato de sódio 25 mM em pH 4,5.

A determinação da quantidade de açúcares liberados após a hidrólise foi realizada a partir de uma modificação do método de Anton e Barret (2002) que utiliza 3-metil-2-benzotiazolina hidrozona (MTBH). Neste método, 75 µL do hidrolisado foram adicionados a 25 µL 1N NaOH e a uma solução contendo 0,43 mg/mL de MBTH e 0,14 mg/mL de Ditioneitol (DTT). Esta mistura foi aquecida a 60 °C por 20 min em termociclador e, posteriormente, foram adicionados 100 µl de uma solução oxidante (0,2% de  $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)$ , 0,2% de ácido sulfâmico e 0,1% de HCl) e a mistura foi incubada a 70 °C por 20 min. Após esta incubação, a mistura desenvolveu uma cor azulada. Como padrão foi utilizado glicose comercial e a absorbância do material foi obtida em 620 nm.

### 3.3.6 EXTRAÇÃO E DOSAGEM DE LIGNINA

A extração e dosagem de lignina foi realizada como descrito por Dos Santos et al. (2008), com modificações. Trinta miligramas de material seco foi homogeneizado em almofariz com auxílio de pistilo utilizando-se 1,5 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0. O homogeneizado foi transferido para microtubos de 2 mL e centrifugados, com posterior descarte do sobrenadante. Todas as centrifugações existentes no procedimento de extração e dosagem de lignina foram realizadas a 20.817 *g* por 5 minutos. O precipitado sofreu lavagens sequenciais com diversas soluções seguindo-se o mesmo procedimento: foram adicionados 1 mL de solução, o material foi agitado em vórtex por 2 minutos e o sobrenadante foi descartado. As soluções utilizadas nas lavagens foram: tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7 por duas vezes, seguido de Triton-XR 100 (1% v/v, pH 7) por três vezes, NaCl 1 M em tampão fosfato por duas vezes, água destilada por duas vezes e, por último, acetona 100% por duas vezes.

O precipitado foi seco à temperatura ambiente por 12 horas e compreendeu a fração de parede celular livre de proteínas. Destas frações, foram pesados 15 mg em microtubos de 1,5 mL e adicionados 120  $\mu$ L de ácido tioglicólico 98% e 600  $\mu$ L de HCl 2M. O mesmo procedimento foi adotado para lignina comercial (SIGMA), que foi utilizada como padrão. As amostras em solução permaneceram em banho-maria a 95°C por 4 horas e após resfriamento em temperatura ambiente, o material foi centrifugado e o sobrenadante foi descartado. O precipitado, formado por complexos de lignina - ácido tioglicólico (LGTA), foi lavado 3 vezes com 1 mL de água destilada, centrifugado e seu sobrenadante foi descartado. A este precipitado, foi adicionado 0,5 mL de NaOH 0,5 M e a mistura permaneceu a 30 °C por 18 horas.

Após este período, o material foi centrifugado, o sobrenadante reservado e o precipitado lavado com a solução de NaOH 0,5 M, sendo o sobrenadante adicionado ao anterior. Os dois sobrenadantes reunidos em novos microtubos de 1,5 mL foram acidificados com 180  $\mu$ L HCl 37%. A mistura permaneceu a 4 °C por 4 horas para a precipitação do LTGA e, após este período, o material foi centrifugado e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado 2 vezes com 1 mL água destilada, seco em estufa a 60 °C e ressuspendido com 1 mL de NaOH 0,5M.

A quantificação do conteúdo de LTGA foi realizada a partir de leitura em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 280 nm. O conteúdo de lignina foi expresso como micrograma de LTGA por miligrama de parede celular.

### 3.3.7 DOSAGEM DO CONTEÚDO DE $\beta$ -GLUCANOS

Para a determinação do conteúdo e da solubilidade dos  $\beta$ -glucanos de parede celular de folha e palhada de cana de açúcar foram utilizados 1 mg de cada uma das frações obtidas após fracionamento da parede celular. Como padrão, foi utilizado 1 mg de  $\beta$ -glucano comercial de cevada (MEGAZYME). As alíquotas foram submetidas a hidrólise enzimática com a enzima liquenase de *Bacillus subtilis* 4 U/mL a 40 °C por 3 horas.

A enzima foi desativada através de fervura por 5 minutos. Os microtubos foram centrifugados a 20.800 g por 5 minutos para separação do material não hidrolisado dos oligossacarídeos liberados durante a hidrólise.

O conteúdo de  $\beta$ -glucanos no sobrenadante foi estimado através de dosagem dos açúcares solúveis totais, segundo o método colorimétrico fenol-sulfúrico (DUBOIS, 1956). Em seguida, o material foi filtrado em filtros Millipore<sup>®</sup> 0,22  $\mu$ m e os oligossacarídeos foram separados em coluna de troca aniônica Carbopac PA1, utilizando-se o sistema Dionex ICS-3000. O método utilizado foi adaptado de Tiné et al. (2003). O eluente de base utilizado foi 88 mM de NaOH e o eluente de arraste, uma solução de acetato de sódio 200 mM em NaOH 88 mM. O tempo de corrida para cada amostra foi de 50 minutos com fluxo de 1 mL/min, sendo que um gradiente de 7% a 100% do eluente de arraste foi aplicado à amostra injetada visando separar os oligossacarídeos antes de sua detecção pelo detector amperométrico.

A partir da área dos picos do perfil cromatográfico foi calculada a razão tri:tetrassacarídeos, a fim de obter a proporção de ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3).

### **3.3.8 DOSAGEM DO CONTEÚDO DE PROTEÍNAS TOTAIS**

Para dosagem do conteúdo de proteínas totais, 450 mg de material seco e pulverizado foram homogeneizados com 5 mL de tampão acetato de amônio 1 M pH 5,0 a 5 °C em almofariz com auxílio de pistilo. O almofariz contendo o homogeneizado foi mantido a 5 °C por 40 minutos para melhor extração das proteínas e posteriormente, o homogeneizado foi recolhido em tubos de plástico de 15 mL. Os tubos com o homogeneizado foram centrifugados por 20 minutos a 3.200 g. O sobrenadante foi recolhido e o conteúdo de proteínas foi quantificado pelo método colorimétrico Bradford (1976). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 590 nm, utilizando-se albumina comercial como padrão.

### **3.3.9 QUANTIFICAÇÃO DE CARBONO E NITROGÊNIO**

A quantificação de carbono e nitrogênio na palhada de cana de açúcar foi realizada em colaboração com o Laboratório de Ecologia Isotópica, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) em Piracicaba, SP. Foi determinado o conteúdo de carbono (C) e nitrogênio (N) nas cinco amostras de palhada para cada coleta.

Utilizando uma balança analítica, foram pesados de 1,3 a 1,5 mg de palhada de cana de açúcar previamente seca em liofilizador e pulverizada em moinho de bola. Essas amostras foram colocadas em cápsulas de estanho e analisadas em Elemental para C e N (Carlo-Erba modelo 1110) que por um processo de combustão, volatiliza o material e carrega as amostras através de um fluxo contínuo de gás hélio em linha com um espectrômetro de massas (Finnegan Delta Plus), onde se obtém a concentração de C e N das amostras. Como padrão foram utilizadas folhas de cana de açúcar com concentração conhecida de carbono e nitrogênio.



### **3.4 ANÁLISE DE DADOS**

#### **3.4.1 ANÁLISE DO RENDIMENTO DAS FRAÇÕES**

Para facilitar a análise da degradação dos polissacarídeos de parede celular durante o tempo de exposição às condições de campo, o valor dos rendimentos do material obtido após diálise e liofilização das primeiras quatro frações foi reunido, formando duas frações. Desta forma, foram reunidos os valores de massa dos rendimentos das frações de clorito de sódio e oxalato de amônio, formando a fração rica em pectinas e hemiceluloses mais solúveis. Também foram reunidos os valores de massa dos rendimentos das frações 0,1 M e 1 M NaOH, formando a fração rica em hemiceluloses menos aderidas à celulose. A fração 4M continuou representando as hemiceluloses mais aderidas à celulose e o resíduo representou a fração rica em celulose.

É importante notar que a reunião dos valores de massa das frações não significa que extrações com as concentrações mais altas dentre as frações reunidas dariam o mesmo resultado. É, portanto, necessário efetuar o fracionamento completo e depois reunir os valores de massa das frações para se obter este resultado, pois os efeitos das substâncias extratoras são distintos dependendo a ordem e do número de concentrações diferentes utilizadas no fracionamento.

O mesmo procedimento foi realizado com os valores das proporções dos monossacarídeos obtidos após hidrólise ácida e análise em HPLC, como descrito no item 3.3.4.

#### **3.4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

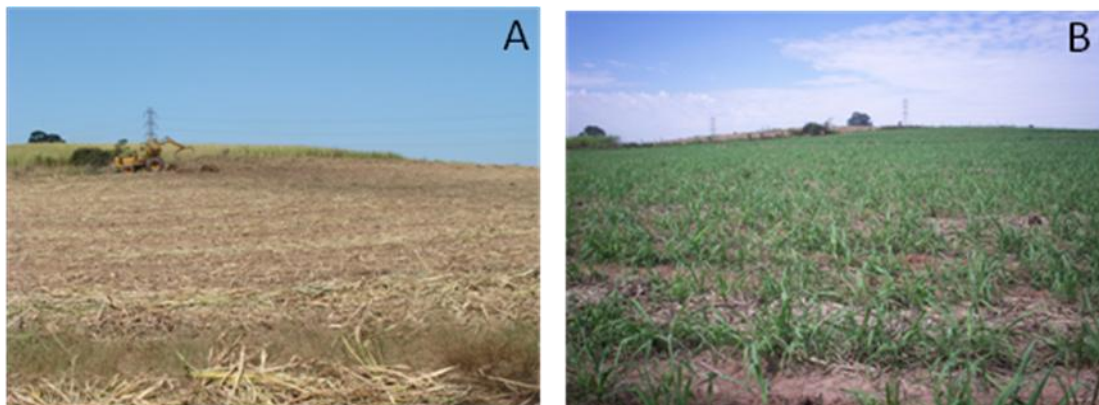
A análise de dados foi realizada com o auxílio do pacote estatístico JMP, versão 5.0.1 (Copyright© 1989 - 2002 SAS Institute Inc.).

Para verificar as diferenças significativas entre as coletas de palhada exposta às condições de campo por até 12 meses foi realizado o teste de variância de um fator

(ANOVA one-way), com teste *a posteriori* de Tukey-Kramer HSD, utilizando nível de significância de 5%.

## 4 RESULTADOS

A Figura 2A mostra o local de coleta com palhada depositada logo após o corte, em junho de 2009. A Figura 2B mostra a cana de rebrota com três meses de idade no mesmo local, em setembro de 2009. Pode-se observar que até três meses de idade da cana, ainda é possível visualizar a palhada nas leiras entre as ruas de cana em crescimento. Com o crescimento da cana, após seis meses não foi mais possível visualizar a palhada sem penetrar no canavial.



**Figura 2** - A) Local de coleta contendo a palhada depositada logo após o corte; B) local de coleta após três meses.

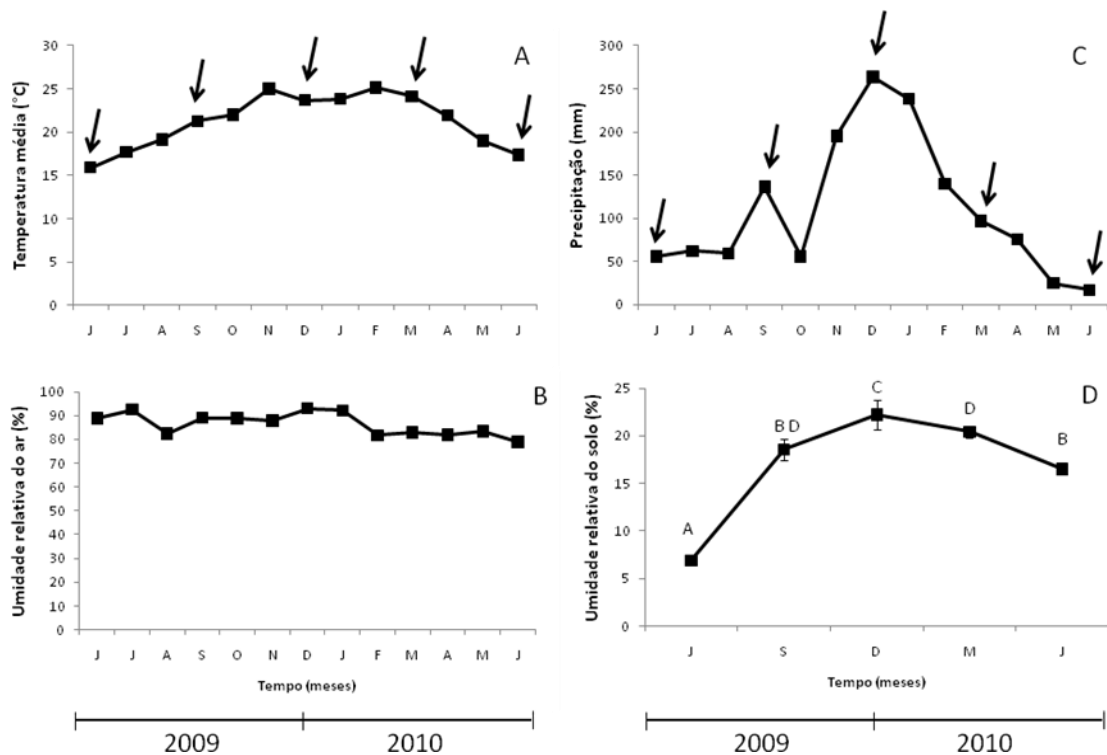
### 4.1 **PARÂMETROS CLIMÁTICOS E UMIDADE DO SOLO**

Os dados de temperatura, umidade relativa do ar e precipitação da cidade de Piracicaba durante o período experimental (junho de 2009 a junho de 2010) podem ser observados na Figura 3. Os dados revelam que junho de 2009 foi o mês que apresentou a menor temperatura média (Figura 3A) durante o período de exposição da palhada às condições de campo (15,9 °C). Após este período, a temperatura média mensal se elevou gradativamente, atingindo o máximo em novembro de 2009 (25 °C). A temperatura foi mantida próxima a 25 °C até março de 2010, quando foi observada uma nova redução, atingindo a média de 17,3 °C, em junho de 2010. Os dados de umidade relativa do ar durante o período estudado podem ser visualizados na Figura 3B. Pode-se observar que os valores de umidade relativa do ar variam de

78% a 93% durante o período analisado, sendo de fevereiro a junho de 2010 o período que apresentou os menores valores de umidade relativa do ar e os meses de outubro de 2009 a janeiro de 2010 o período com os maiores valores.

Com exceção do mês setembro 2009, que apresentou maior precipitação, observou-se que no período de junho a outubro de 2009 a precipitação foi praticamente constante com valores próximos a 60 mm (Figura 3C). De novembro de 2009 a fevereiro de 2010 os valores de precipitação são mais elevados, atingindo seu máximo em dezembro de 2009 (263 mm). Após fevereiro de 2010 a precipitação reduziu novamente até atingir o menor valor do período estudado, em junho de 2010 (17 mm).

A umidade do solo abaixo da palhada coletada durante o experimento pode ser observada na Figura 3D. Na primeira coleta (0 meses), foi observada a menor média de todo o período (7%). A umidade relativa do solo entre setembro/2009 e junho/2010, que corresponde ao período das coletas da palhada em exposição às condições de campo, variou entre 16,51% e 22,19%, sendo que a coleta de dezembro/2009 apresentou a maior quantidade de umidade retida no solo e, a de junho/2010, a menor quantidade (Figura 3D).



**Figura 3** - Condições climáticas e umidade do solo durante a exposição da palhada de cana de açúcar às condições de campo entre jun/09 e jun/10. A) Temperatura média mensal (°C). B) Umidade relativa do ar (%). C) Precipitação mensal (mm). D) Umidade relativa do solo (%). A, B e C são dados provenientes do banco de dados do Posto Agrometeorológico do Departamento de Ciências Exatas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (ESALQ/USP) ([swww.lce.esalq.usp.br/anos](http://swww.lce.esalq.usp.br/anos)). Setas destacam os meses nos quais foram realizadas as coletas. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as coletas ( $P < 0,05$ ).

## 4.2 DEGRADAÇÃO DOS CARBOIDRATOS NÃO-ESTRUTURAIS

Os conteúdos de amido e de açúcares solúveis como glicose, sacarose, frutose e rafinose são apresentados na Tabela 2. O conteúdo de amido observado no tempo 0 foi de aproximadamente 16,04  $\mu\text{g} / \text{mg}$  de massa seca. Após três meses de exposição foi observada uma redução de 90% em relação ao tempo 0, atingindo valores próximos a 2,01  $\mu\text{g} / \text{mg}$  de massa seca, permanecendo em níveis baixos até o 12° mês de exposição.

Para os dados de açúcares solúveis foi observada redução significativa de 54% na quantidade de glicose em relação ao tempo zero nos primeiros três meses de exposição e de 94% após seis meses, sendo pouco detectado após o 9° e 12° mês

de exposição às condições de campo. Os açúcares frutose e sacarose reduziram 94% e 97% respectivamente após os três primeiros meses e, após o 6º mês, esses açúcares atingiram concentrações próximas a zero. O açúcar solúvel refinose apresentou concentração média de 2,44 µg/mg de massa seca na primeira coleta e não foi detectado a partir do 3º mês.

**Tabela 2** - Conteúdo de carboidratos não-estruturais (µg.mg MS<sup>-1</sup>) da palhada de cana de açúcar mantida sob condições de campo durante 12 meses. Valores representam a média aritmética ± erro padrão da média. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as coletas quando o P<0,05 (n=5). n.d.= não detectado.

	<i>Amido</i>	<i>Glicose</i>	<i>Frutose</i>	<i>Sacarose</i>	<i>Rafinose</i>
<b>0 meses</b>	16,04 <sup>A</sup> ± 1,617	6,75 <sup>A</sup> ± 1,215	4,56 <sup>A</sup> ± 1,094	28,01 <sup>A</sup> ± 5,213	2,44 ± 0,486
<b>3 meses</b>	2,01 <sup>B</sup> ± 0,082	3,11 <sup>B</sup> ± 1,063	0,26 <sup>B</sup> ± 0,117	0,05 <sup>B</sup> ± 0,016	n.d.
<b>6 meses</b>	2,86 <sup>B</sup> ± 0,145	0,39 <sup>B</sup> ± 0,206	0,09 <sup>B</sup> ± 0,022	0,01 <sup>B</sup> ± 0,009	n.d.
<b>9 meses</b>	2,62 <sup>B</sup> ± 0,138	0,16 <sup>B</sup> ± 0,008	0,08 <sup>B</sup> ± 0,011	0,01 <sup>B</sup> ± 0,008	n.d.
<b>12 meses</b>	1,57 <sup>B</sup> ± 0,116	0,15 <sup>B</sup> ± 0,009	0,04 <sup>B</sup> ± 0,023	0,04 <sup>B</sup> ± 0,025	n.d.

### **4.3 DEGRADAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA PAREDE CELULAR**

Com as análises efetuadas após o fracionamento da parede celular, foi possível observar que a fração de hemiceluloses mais solúveis, representada pela união das frações clorito de sódio e oxalato de amônio, apresenta aumento significativo do rendimento em todas as coletas a partir de 6 meses de exposição da palhada às condições de campo, quando comparado com o rendimento da mesma fração na palhada da coleta no tempo zero (Tabela 3).

Para a fração de hemiceluloses menos aderidas à celulose, representada pela união das frações 0,1M e 1M de hidróxido de sódio, houve diminuição significativa de 13,3% até 43% no rendimento nas coletas a partir de 6 meses, quando comparados com o rendimento da palhada no tempo 0. Para as hemiceluloses mais aderidas à celulose, representadas pela fração 4M de hidróxido de sódio, a média do rendimento foi de 20,84 mg, não sendo possível verificar diferenças entre os rendimentos de todas as coletas.

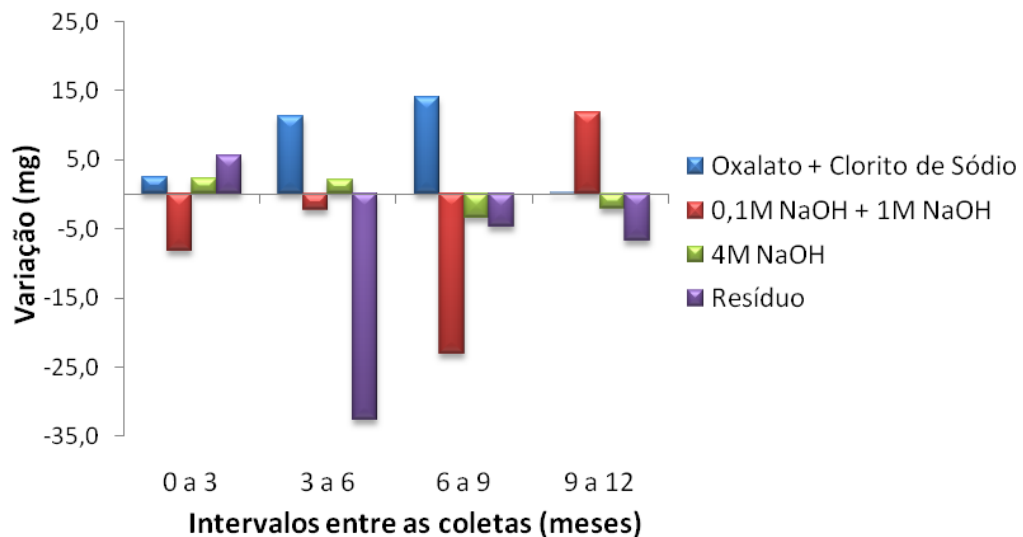
O rendimento do resíduo, que contém principalmente celulose, não é diferente

nas coletas de 0 e 3 meses. No entanto, após 6 e 9 meses de exposição, ocorreu uma redução significativa do rendimento desta fração quando comparado com a palhada das coletas duas primeiras coletas. Após 12 meses de exposição, ocorre uma nova redução significativa no rendimento desta fração tanto em relação às coletas de 0 e 3 meses como em relação às coletas de 6 e 9 meses.

**Tabela 3** - Rendimento das frações de polissacarídeos (mg) obtidos no fracionamento da parede celular da palhada de cana de açúcar mantida sob condições de campo durante 12 meses. Valores representam a média aritmética  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as coletas quando o  $P < 0,05$  ( $n=5$ ).

	Clorito + Oxalato	0,1M + 1M NaOH	4M NaOH	Resíduo
<b>0 meses</b>	81,98 <sup>A</sup> $\pm$ 4,64	77,92 <sup>A</sup> $\pm$ 2,97	19,60 <sup>A</sup> $\pm$ 2,55	118,18 <sup>A</sup> $\pm$ 4,44
<b>3 meses</b>	84,50 <sup>A</sup> $\pm$ 2,10	69,76 <sup>A</sup> $\pm$ 1,30	21,88 <sup>A</sup> $\pm$ 0,47	123,74 <sup>A</sup> $\pm$ 0,52
<b>6 meses</b>	95,74 <sup>AB</sup> $\pm$ 2,36	67,52 <sup>AB</sup> $\pm$ 2,65	23,96 <sup>A</sup> $\pm$ 0,96	91,00 <sup>B</sup> $\pm$ 1,24
<b>9 meses</b>	109,72 <sup>B</sup> $\pm$ 4,96	44,46 <sup>C</sup> $\pm$ 3,22	20,46 <sup>A</sup> $\pm$ 1,37	86,36 <sup>B</sup> $\pm$ 5,77
<b>12 meses</b>	109,88 <sup>B</sup> $\pm$ 1,94	56,28 <sup>BC</sup> $\pm$ 3,74	18,32 <sup>A</sup> $\pm$ 1,79	79,56 <sup>C</sup> $\pm$ 6,08

As variações nos rendimentos das frações entre as coletas de palhada exposta às condições de campo podem ser visualizadas na Figura 4. Nesta figura, verifica-se que as maiores variações obtidas nos rendimentos das frações de parede celular ocorreram entre 3 e 6 meses de exposição às condições do campo. As variações observadas neste período, devem-se principalmente à uma diminuição de aproximadamente 33 mg no rendimento do resíduo, concomitante com um aumento de 11 mg de hemiceluloses mais solúveis e pectinas. No intervalo de 6 a 9 meses essa redução é de 23 mg da fração de hemiceluloses menos aderidas à celulose e de um aumento de 14 mg de hemiceluloses mais solúveis e pectinas.



**Figura 4** - Variações de massa (mg) calculadas a partir dos rendimentos das frações de parede celular, nos os intervalos das coletas de palhada de cana de açúcar mantida sob condições de campo durante 12 meses. Barras representam a média da variação de cada fração em relação à mesma na coleta anterior.

Quando foi comparada a variação que ocorreu entre os rendimentos de todas as frações na palhada no tempo zero com a palhada exposta durante 12 meses, foi observado um aumento de 27,9 mg nas hemiceluloses mais solúveis e pectinas, uma redução de 21,6 mg nas hemiceluloses menos aderidas à celulose e uma redução de 38,6 mg do resíduo, enquanto as hemiceluloses mais aderidas à celulose praticamente não se alteraram. Desta forma, quando se considera a variação entre a massa total dos polissacarídeos das frações obtidas após fracionamento de parede celular das coletas de 0 e 12 meses, verifica-se que a palhada que ficou exposta durante 12 meses apresentou uma redução total de 33,64 mg nesta massa, quando comparada à palhada no tempo 0 (Figura 4).

#### **4.4 PROPORÇÃO DOS MONOSSACARÍDEOS DAS FRAÇÕES DE PAREDE CELULAR**

A proporção dos monossacarídeos das frações após hidrólise ácida pode ser visualizada na Tabela 4. Os monossacarídeos mais representativos na fração de hemiceluloses mais solúveis da palhada no tempo 0 são: xilose (43,4%), seguidos



de glicose (39,8%), arabinose (14,2%) e galactose (2,6%). Nesta mesma fração, com o decorrer do tempo de exposição da palhada, observa-se um aumento significativo nos seguintes monossacarídeos: xilose (29,5% após 3 meses, aumentando gradativamente até 71,4% após 12 meses), galactose (210% após 3 meses aumentando até 300% após 12 meses). Já a proporção de glicose sofre diminuição significativa de 23,6% a 55% nas coletas de palhada sob exposição às condições de campo.

A composição da fração de hemiceluloses menos aderidas à celulose da palhada não exposta às condições de campo é de 68,4% de xilose, 20,7% de arabinose, 8,5% de glicose e 2,3% de galactose. Durante o período de exposição houve redução gradativa da proporção de arabinose de cerca de 8% após 3 meses até 33% após 12 meses. A proporção de galactose sofreu aumento de 57,8% após 3 meses, porém, este aumento não permaneceu após seis meses. A proporção de xilose sofreu aumento significativo de 7,5% apenas após 6 meses, permanecendo constante a partir de então. A proporção de glicose sofreu elevação de 17% já a partir do terceiro mês de exposição, porém, este aumento é significativo (cerca de 40%) apenas após o nono mês.

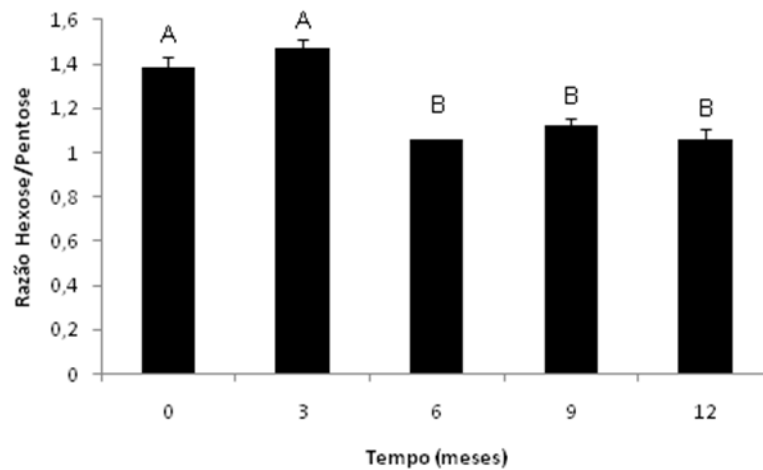
Observa-se na fração de hemiceluloses mais aderidas a celulose da palhada não exposta às condições de campo, a seguinte proporção de monossacarídeos: 36,7% de xilose, 55,1% de glicose, 7% de arabinose e 1,1% de galactose. A proporção de arabinose sofre reduções que variam de 30% a 74% durante o período de exposição da palhada às condições de campo, enquanto a proporção de galactose sofre reduções que variam entre 19,8% e 85%. A proporção da xilose reduziu 57,2% nas coletas realizadas após 3 e 6 meses de exposição, retornando a valores próximos aos encontrados na coleta de palhada no tempo 0 após 9 e 12 meses. A proporção de glicose mostrou um comportamento contrário ao da xilose, sofrendo aumento de aproximadamente 45% após 3 e 6 meses, também retornando a valores próximos aos encontrados na palhada não exposta às condições de campo após 9 e 12 meses.

A proporção de monossacarídeos do resíduo apresentou proporções de glicose próximas a 100% em todas as coletas (dados não mostrados).

**Tabela 4** - Proporção dos monossacarídeos (%) após hidrólise ácida em cada fração de parede celular da palhada de cana de açúcar mantida sob condições de campo durante 12 meses. Valores representam a média aritmética  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as coletas quando o  $P < 0,05$  ( $n=5$ ).

Coleta		Proporção dos Monossacarídeos			
		Arabinose	Galactose	Glicose	Xilose
Clorito + Oxalato	0 meses	14,22 <sup>A</sup> $\pm$ 0,59	2,60 <sup>A</sup> $\pm$ 0,44	39,79 <sup>A</sup> $\pm$ 2,37	43,38 <sup>A</sup> $\pm$ 2,13
	3 meses	11,04 <sup>B</sup> $\pm$ 0,95	8,06 <sup>B</sup> $\pm$ 0,56	24,60 <sup>B</sup> $\pm$ 2,53	56,22 <sup>B</sup> $\pm$ 1,39
	6 meses	14,23 <sup>A</sup> $\pm$ 0,49	6,68 <sup>B</sup> $\pm$ 0,52	17,89 <sup>B</sup> $\pm$ 0,84	60,84 <sup>B</sup> $\pm$ 0,75
	9 meses	13,91 <sup>A</sup> $\pm$ 0,73	6,51 <sup>B</sup> $\pm$ 0,51	22,91 <sup>B</sup> $\pm$ 2,11	56,67 <sup>B</sup> $\pm$ 1,74
	12 meses	16,78 <sup>AB</sup> $\pm$ 0,47	10,40 <sup>B</sup> $\pm$ 1,13	30,38 <sup>B</sup> $\pm$ 3,55	74,61 <sup>B</sup> $\pm$ 2,87
0,1M + 1M NaOH	0 meses	20,71 <sup>A</sup> $\pm$ 3,15	2,35 <sup>A</sup> $\pm$ 0,42	8,55 <sup>A</sup> $\pm$ 1,64	68,40 <sup>A</sup> $\pm$ 4,67
	3 meses	19,04 <sup>B</sup> $\pm$ 0,48	3,71 <sup>B</sup> $\pm$ 0,44	10,04 <sup>AB</sup> $\pm$ 1,23	67,42 <sup>A</sup> $\pm$ 1,59
	6 meses	14,04 <sup>C</sup> $\pm$ 0,49	1,66 <sup>A</sup> $\pm$ 0,16	10,75 <sup>AB</sup> $\pm$ 0,96	73,55 <sup>B</sup> $\pm$ 0,74
	9 meses	13,99 <sup>C</sup> $\pm$ 0,33	2,29 <sup>A</sup> $\pm$ 0,27	11,99 <sup>B</sup> $\pm$ 1,24	71,72 <sup>B</sup> $\pm$ 1,13
	12 meses	13,40 <sup>C</sup> $\pm$ 0,43	2,39 <sup>A</sup> $\pm$ 0,11	11,69 <sup>AB</sup> $\pm$ 1,15	72,52 <sup>B</sup> $\pm$ 0,97
4M NaOH	0 meses	7,03 <sup>A</sup> $\pm$ 0,87	1,13 <sup>A</sup> $\pm$ 0,95	55,12 <sup>A</sup> $\pm$ 7,72	36,72 <sup>A</sup> $\pm$ 7,18
	3 meses	4,92 <sup>AB</sup> $\pm$ 1,10	0,82 <sup>AB</sup> $\pm$ 0,31	78,35 <sup>BC</sup> $\pm$ 4,87	15,90 <sup>B</sup> $\pm$ 3,53
	6 meses	1,83 <sup>C</sup> $\pm$ 0,25	0,16 <sup>B</sup> $\pm$ 0,03	82,76 <sup>C</sup> $\pm$ 1,75	15,24 <sup>B</sup> $\pm$ 1,49
	9 meses	3,43 <sup>BC</sup> $\pm$ 0,42	0,89 <sup>AB</sup> $\pm$ 0,19	62,85 <sup>AB</sup> $\pm$ 4,99	32,83 <sup>A</sup> $\pm$ 4,38
	12 meses	3,56 <sup>BC</sup> $\pm$ 0,34	1,19 <sup>A</sup> $\pm$ 0,11	60,77 <sup>AB</sup> $\pm$ 2,86	34,49 <sup>A</sup> $\pm$ 2,47

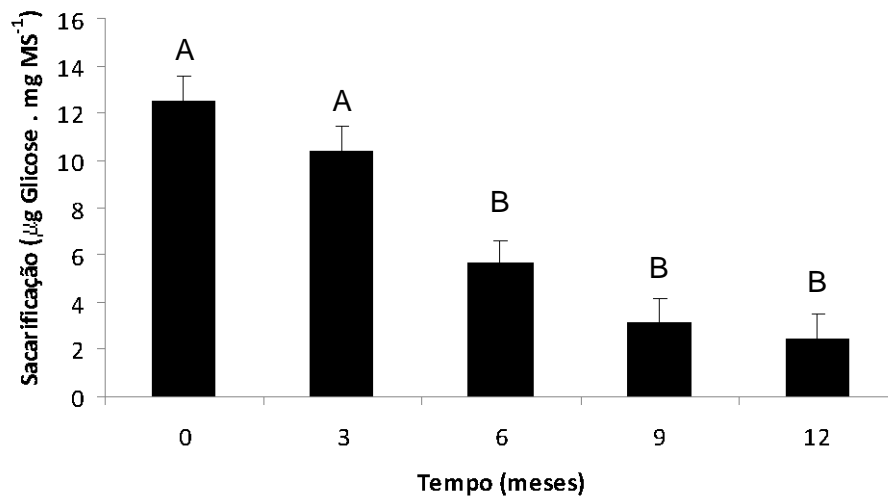
A Figura 5 apresenta a relação hexose/pentose encontrada nos polissacarídeos de parede celular de palhada de cana de açúcar mantida no campo por até 12 meses. Na coleta de palhada mantida por 3 meses sob condições de campo observa-se um aumento de 6% nesta relação, porém não significativo, quando comparado com a da primeira coleta. No entanto, a partir de 6 meses, a relação hexose/pentose reduziu 23% e se manteve constante até o 12<sup>o</sup> mês.



**Figura 5** - Razão hexose/pentose da parede celular da palhada de cana de açúcar mantida sob condições de campo durante 12 meses. Barras representam a média aritmética  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as coletas quando o  $P < 0,05$  ( $n=5$ ).

#### **4.5 SACARIFICAÇÃO DA PAREDE CELULAR DE PALHADA DE CANA DE AÇÚCAR**

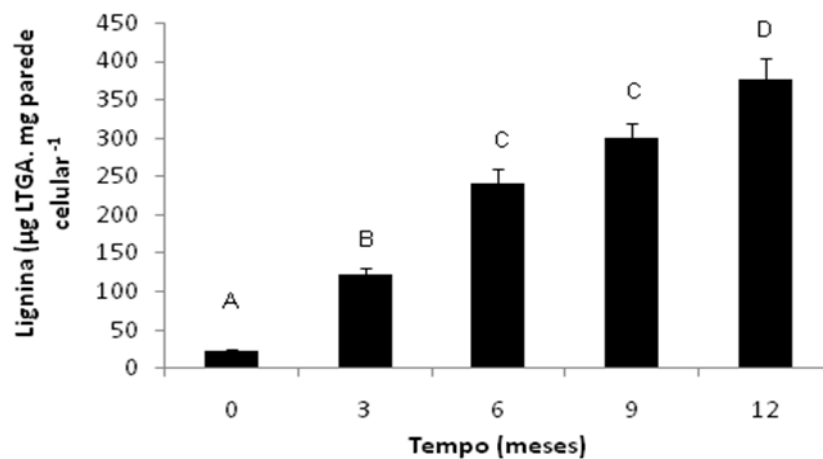
Os dados de sacarificação da palhada de cana de açúcar coletada a cada três meses podem ser visualizados na Figura 6. Pode-se observar que a sacarificação, mostrada em  $\mu\text{g}$  de glicose / mg de massa seca, reduziu-se no decorrer do tempo de exposição da palhada às condições de campo de 16,5% após 3 meses a até 80% após 12 meses. Porém, esta redução é significativa apenas após 6 meses, quando houve uma redução de 54% na sacarificação.



**Figura 6** - Sacarificação ( $\mu\text{g Glicose} \cdot \text{mg MS}^{-1}$ ) da parede celular da palhada de cana de açúcar mantida sob condições de campo durante 12 meses. Barras representam a média aritmética  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as coletas quando o  $P < 0,05$  ( $n=5$ ).

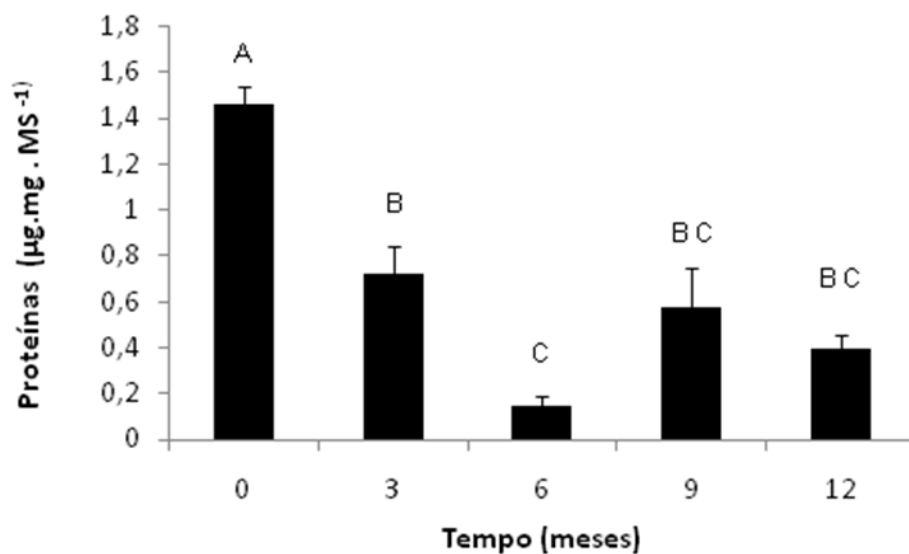
#### **4.6 VARIAÇÕES NOS CONTEÚDOS DE LIGNINA E PROTEÍNAS**

O conteúdo de lignina por massa de parede celular na palhada de cana de açúcar sofre uma elevação gradual durante a exposição da palhada às condições de campo. Na Figura 7, verifica-se o aumento de 440% no conteúdo de lignina após 3 meses, sendo que este aumento alcançou 1660% após 12 meses de exposição da palhada às condições de campo em relação à palhada no tempo zero.



**Figura 7** - Conteúdo de lignina ( $\mu\text{g LTGA.mg parede celular}^{-1}$ ) da palhada de cana de açúcar sob condições de campo durante 12 meses. Barras representam a média aritmética  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as coletas quando o  $P < 0,05$  ( $n=5$ ).

Na Figura 8, verifica-se a variação do conteúdo de proteínas na palhada de cana durante o período estudado. Pode-se observar uma redução gradual do teor de proteínas até 6 meses de exposição, quando este é 90% menor do que o encontrado na primeira coleta. Contudo, esta redução não se manteve após 9 meses, quando houve uma elevação não significativa no conteúdo protéico.



**Figura 8** - Conteúdo de proteínas ( $\mu\text{g.mg massa seca}^{-1}$ ) em palhada de cana de açúcar sob condições de campo durante 12 meses. Barras representam a média aritmética  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as coletas quando o  $P < 0,05$  ( $n=5$ ).

#### **4.7 VARIAÇÃO NO CONTEÚDO DE $\beta$ -GLUCANOS**

O conteúdo de  $\beta$ -glucanos encontrado nas frações de polissacarídeos de todas as coletas de palhada de cana de açúcar é mostrado na Tabela 5. Observando apenas o conteúdo de  $\beta$ -glucanos das frações de parede celular de palhada no tempo zero, pode-se verificar que este é maior nas três primeiras frações, sendo que a fração na qual foi encontrada a maior quantidade deste polissacarídeo foi 0,1 M NaOH. Este conteúdo, porém, é reduzido em cerca de 49% nas frações 1 M e 4 M NaOH e cerca de 63% no resíduo.

Durante o tempo de exposição da palhada às condições de campo, o conteúdo de  $\beta$ -glucanos variou, sempre comparado com palhada no tempo zero, elevando-se cerca de 43% na fração de clorito de sódio após 3 meses. Após este período, o conteúdo de  $\beta$ -glucanos nesta fração reduziu-se, apresentando-se 20% menor após 9 meses de exposição, retornando a valores próximos aos da primeira coleta após 12 meses.

O conteúdo de  $\beta$ -glucanos na fração de oxalato de amônio aumentou 37% após três meses. No entanto, houve redução gradativa deste polissacarídeo a partir deste período sendo 59,5% menor após 12 meses de exposição. Nas frações 0,1 M e 1 M NaOH, o conteúdo de  $\beta$ -glucanos também se elevou 13% e 33% respectivamente nos primeiros três meses de exposição. Porém, tais variações não são significativas e pode-se deduzir que o teor foi constante ao longo do período de observação. Já o teor da fração 0,1 M NaOH reduziu significativamente após 9 meses, porém, um novo aumento é observado após 12 meses de exposição. O conteúdo de  $\beta$ -glucanos da fração 1 M NaOH sofreu flutuações ao longo do tempo, sendo que aos 6 meses de exposição ele é reduzido, se elevando aos 9 meses e tornando a se reduzir após 12 meses.

Na fração 4 M NaOH o teor de  $\beta$ -glucanos reduziu 78,8% já nos três primeiros meses, continuando com o teor reduzido durante o tempo de exposição, chegando a uma redução de 82% após 12 meses de exposição. Já no resíduo, o teor de  $\beta$ -glucanos sofreu redução de 77,3% durante os três primeiros meses de exposição,

elevando-se cerca de 43% após este período até o nono mês e voltando a reduzir-se após 12 meses a níveis próximos aos encontrados após 3 meses de exposição.

**Tabela 5** - Fração solúvel de  $\beta$ -glucanos ( $\mu\text{g.mg}$  parede celular<sup>-1</sup>) das frações de parede celular de palhada de cana de açúcar mantida sob condições de campo por até 12 meses. Valores representam a média aritmética  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as coletas quando  $P < 0,05$  ( $n=5$ .)

Coleta/Fração	Clorito	Oxalato	0,1M NaOH	1M NaOH	4M NaOH	Resíduo
<b>0 meses</b>	259,74 <sup>AB</sup> $\pm$ 15,64	232,74 <sup>B</sup> $\pm$ 16,61	291,06 <sup>A</sup> $\pm$ 23,92	151,92 <sup>A</sup> $\pm$ 12,03	145,80 <sup>A</sup> $\pm$ 12,26	106,92 <sup>A</sup> $\pm$ 10,32
<b>3 meses</b>	372,24 <sup>A</sup> $\pm$ 29,10	318,60 <sup>A</sup> $\pm$ 27,67	331,38 <sup>A</sup> $\pm$ 24,47	202,05 <sup>AB</sup> $\pm$ 13,04	30,67 <sup>B</sup> $\pm$ 4,71	24,35 <sup>B</sup> $\pm$ 5,83
<b>6 meses</b>	257,22 <sup>AB</sup> $\pm$ 34,66	139,68 <sup>C</sup> $\pm$ 17,29	258,84 <sup>AB</sup> $\pm$ 20,22	168,48 <sup>A</sup> $\pm$ 8,31	61,56 <sup>B</sup> $\pm$ 2,57	55,13 <sup>AB</sup> $\pm$ 3,13
<b>9 meses</b>	209,70 <sup>B</sup> $\pm$ 16,76	83,88 <sup>C</sup> $\pm$ 13,40	211,14 <sup>B</sup> $\pm$ 21,04	234,00 <sup>B</sup> $\pm$ 17,88	60,75 <sup>B</sup> $\pm$ 8,06	75,06 <sup>AB</sup> $\pm$ 20,91
<b>12 meses</b>	264,00 <sup>AB</sup> $\pm$ 39,64	94,68 <sup>C</sup> $\pm$ 2,33	323,04 <sup>A</sup> $\pm$ 10,54	169,28 <sup>A</sup> $\pm$ 9,34	26,20 <sup>B</sup> $\pm$ 16,35	25,80 <sup>B</sup> $\pm$ 15,45

A razão tri:tetrassacarídeo pode ser observada na Tabela 6. Verificando-se apenas as frações de parede celular de palhada da coleta no tempo zero, pode-se observar que a razão tri:tetrassacarídeo é muito próxima nas três primeiras frações e diminui gradativamente até 49% no resíduo.

Quando analisa-se a razão tri:tetrassacarídeo em cada fração, verifica-se em clorito de sódio, um aumento gradativo desta razão, sendo ela 16% maior após 12 meses quando comparada à palhada no tempo zero. A fração oxalato de amônio sofreu redução de 6% nesta razão após 12 meses. Na fração 0,1 M NaOH, há um aumento na razão tri:tetrassacarídeo de cerca de 5% após 6 meses de exposição, porém este aumento não é mantido ao longo das outras coletas. Na fração 4 M, a relação tri:tetrassacarídeo sofreu aumento em todas as coletas mantidas sob condições de campo, porém, o maior aumento (30%) foi verificado após 9 meses. No resíduo, esta razão sofreu aumento significativo a partir de 9 meses de exposição, porém este aumento atinge seu máximo de 43% após 12 meses. Não foram verificadas variações significativas na razão tri:tetrassacarídeo da fração 1 M NaOH.

**Tabela 6** - Razão tri:tetrassacarídeo das frações de parede celular de palhada de cana de açúcar mantida sob condições de campo por até 12 meses. Valores representam a média aritmética  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as coletas quando  $P < 0,05$  ( $n=5$ .)

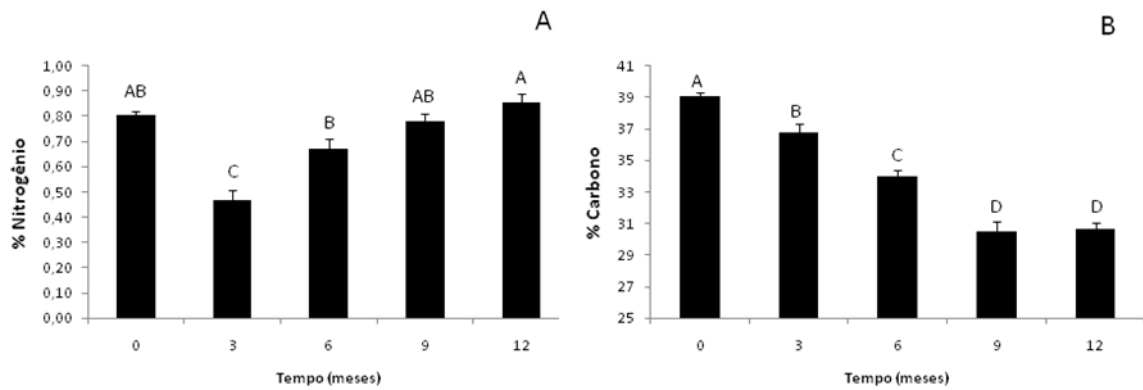
Coleta/Fração	Clorito	Oxalato	0,1M NaOH	1M NaOH	4M NaOH	Resíduo
<b>0 meses</b>	2,31 <sup>A</sup> $\pm$ 0,12	2,26 <sup>AB</sup> $\pm$ 0,01	2,29 <sup>A</sup> $\pm$ 0,02	1,94 <sup>A</sup> $\pm$ 0,22	2,02 <sup>A</sup> $\pm$ 0,15	1,14 <sup>A</sup> $\pm$ 0,12
<b>3 meses</b>	2,28 <sup>AB</sup> $\pm$ 0,19	2,27 <sup>AB</sup> $\pm$ 0,02	2,32 <sup>AB</sup> $\pm$ 0,01	2,24 <sup>A</sup> $\pm$ 0,05	2,41 <sup>AB</sup> $\pm$ 0,03	1,28 <sup>AB</sup> $\pm$ 0,02
<b>6 meses</b>	2,64 <sup>AB</sup> $\pm$ 0,01	2,42 <sup>A</sup> $\pm$ 0,13	2,40 <sup>B</sup> $\pm$ 0,02	2,38 <sup>A</sup> $\pm$ 0,16	2,73 <sup>BC</sup> $\pm$ 0,05	1,17 <sup>A</sup> $\pm$ 0,04
<b>9 meses</b>	2,76 <sup>B</sup> $\pm$ 0,02	2,32 <sup>AB</sup> $\pm$ 0,06	2,38 <sup>AB</sup> $\pm$ 0,04	2,18 <sup>A</sup> $\pm$ 0,01	2,61 <sup>C</sup> $\pm$ 0,16	1,46 <sup>BC</sup> $\pm$ 0,04
<b>12 meses</b>	2,68 <sup>AB</sup> $\pm$ 0,09	2,12 <sup>B</sup> $\pm$ 0,03	2,34 <sup>AB</sup> $\pm$ 0,02	2,19 <sup>A</sup> $\pm$ 0,01	2,53 <sup>BC</sup> $\pm$ 0,05	1,63 <sup>C</sup> $\pm$ 0,01

#### **4.8 VARIAÇÕES NOS TEORES DE CARBONO E NITROGÊNIO E DE SEUS RESPECTIVOS DELTAS <sup>15</sup>N E <sup>13</sup>C NA PALHADA DE CANA DE AÇÚCAR**

As percentagens de N (nitrogênio) e C (carbono) na palhada possuem variações significativas entre as coletas ao longo dos 12 meses (Figura 9). A concentração de N variou ao longo do tempo, sendo que aos 3 meses a percentagem foi menor (cerca de 40%) em relação à todas as outras coletas. As coletas que correspondem 6 e 12 meses são diferentes entre si e ambas são significativamente iguais às coletas de 0 e 9 meses. Após a redução de N entre as coletas 0 a 3 meses houve um aumento parabólico da concentração tornando as outras coletas semelhantes ao conteúdo inicial de N (Figura 9A).

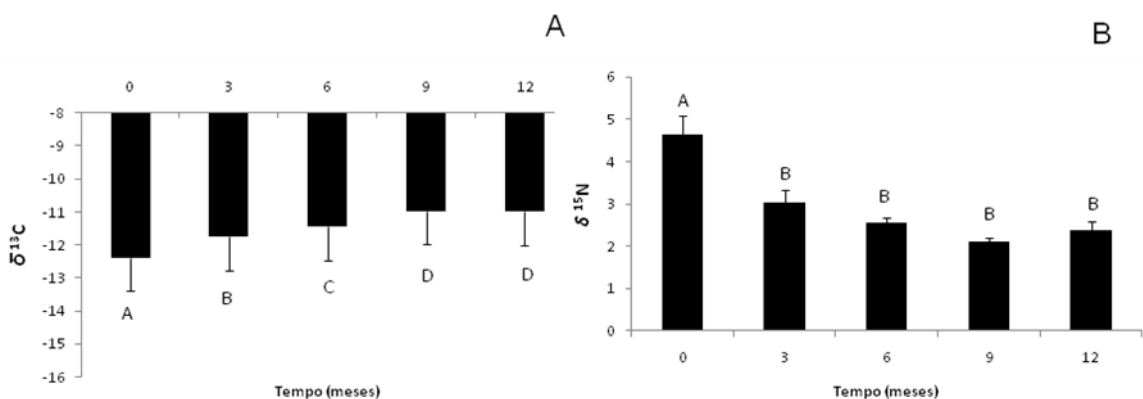
A percentagem de C decresceu linearmente ao longo dos 12 meses de coleta como pode ser observado na Figura 9B. Na coleta de 0 meses a concentração de carbono era de aproximadamente 39% decrescendo para 37% (3 meses), 34% (6 meses), e 31% (9 e 12 meses). Apenas são semelhantes as concentrações de C aos 9 e 12 meses e em todas as outras coletas há diferenças significativas entre as coletas.





**Figura 9** - Conteúdo de Nitrogênio (A) e Carbono (B) da palhada de cana de açúcar sob condições de campo durante 12 meses. Barras representam a média aritmética  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as coletas quando o  $P < 0,05$  ( $n=5$ ).

Analisando a relação entre os isótopos  $^{13}\text{C}$  e  $^{12}\text{C}$ , foi observado que o delta  $^{13}\text{C}$  (Figura 10A) apresentou um aumento gradativo a partir do tempo 0. Esse aumento é significativamente diferente entre todas as coletas exceto entre 9 e 12 meses onde não há diferenças nessa razão. No caso da variação entre  $^{15}\text{N}$  e  $^{14}\text{N}$  foi observada uma redução significativa apenas do tempo 0 entre as demais coletas (Figura 10B).



**Figura 10** - Razões  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C}$ ) (A) e  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N}$ ) (B) da palhada de cana de açúcar sob condições de campo durante 12 meses. Barras representam a média aritmética  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as coletas quando o  $P < 0,05$  ( $n=5$ ).

## **5 DISCUSSÃO**

### **5.1 PARÂMETROS CLIMÁTICOS E UMIDADE DO SOLO**

Os parâmetros climáticos obtidos durante o período de exposição da palhada de cana foram coincidentes com o verificado para o clima da região nos últimos dez anos, como observado a partir do banco de dados do Posto Agrometeorológico do Departamento de Ciências da ESALQ/USP ([www.lce.esalq.usp.br/anos](http://www.lce.esalq.usp.br/anos)): período de outono-inverno com temperaturas mais baixas e pouca precipitação e período primavera-verão com temperaturas elevadas e precipitação alta. Uma exceção foi o mês de outubro, quando a precipitação foi 41% menor do que a média verificada nos últimos dez anos, causando uma descontinuidade no aumento da precipitação observada na Figura 3C.

Segundo os dados obtidos pelo site do Departamento de Ciências Exatas da ESALQ/USP, a precipitação no período estudado foi cerca de 20% maior do que a média dos últimos dez anos, sendo aproximadamente 235 mm maior no volume de chuvas total e, por consequência, houve elevação na umidade relativa do ar em aproximadamente 5,7%, o que pode ter influenciado no padrão de degradação de carboidratos avaliados no presente estudo.

Com exceção dos meses de março e junho de 2010, quando o solo se manteve úmido mesmo com a redução na pluviosidade, a variação da umidade relativa do solo durante o período estudado mostrou o mesmo comportamento da variação da pluviosidade. Segundo Stratton et al. (1998), solos com cobertura conservam mais umidade no período de seca do que solos descobertos. Desta forma, a camada de palhada depositada sobre o solo pode ter sido responsável pela conservação da umidade do solo observada no início do ano de 2010.

## 5.2 DEGRADAÇÃO DOS CARBOIDRATOS NÃO-ESTRUTURAIIS

Em estudo com humificação de restos vegetais de abeto (*Picea abies*), Lähdesmäki e Piispanen (2002) observaram que os conteúdos de açúcares solúveis, amido e proteínas decaíam rapidamente, enquanto os conteúdos de lignina e celulose diminuía com velocidade muito menor. Borges et al. (1999) verificaram que durante a fermentação da silagem do sorgo houve rápida degradação dos carboidratos solúveis seguida da degradação do amido e, posteriormente, dos carboidratos estruturais.

O rápido decaimento dos carboidratos não estruturais também foi observado com o processo de degradação de palhada de cana de açúcar, no qual houve redução de 90% do conteúdo de amido desde a coleta realizada após 3 meses de exposição (Tabela 2), o que corrobora a idéia de que o amido seja o polissacarídeo a ser degradado com maior velocidade. O conteúdo de amido encontrado em folhas de cana neste trabalho (1,6%, Tabela 2) corrobora o encontrado em outros estudos com folha de cana (BRANDÃO, 2010) e também o encontrado para folha de *Miscanthus x giganteus* (DE SOUZA, 2011, em fase de elaboração)<sup>2</sup>, uma gramínea muito próxima geneticamente da cana (NAIDU et al., 2003) e para folha de milho (ALISON e WEINMANN, 1970). No entanto, valores maiores (aproximadamente 4%) podem ser observados em folhas de *Switchgrass* (BURNER et al., 2009). A palhada de cana de açúcar não apresenta grande quantidade de amido quando comparado com o grão de milho, que apresenta cerca de 72% de sua massa seca composta de amido (PAES, 2006). Desta forma, a vantagem do uso da palhada para a produção de etanol de celulose reside principalmente na hidrólise dos polissacarídeos da parede celular e fermentação dos monossacarídeos liberados.

Concomitantemente ao amido, os açúcares solúveis também são removidos rapidamente no processo de degradação da palhada de cana (Tabela 2). Foi observado que a glicose é uma das principais fontes de carbono utilizadas por fungos encontrados durante a decomposição de bagaço de cana de açúcar

---

<sup>2</sup> DE SOUZA, A. P. São Paulo, 2011

(SANDHU e SIDHU, 1980). No entanto, foi verificada a presença de quantidade significativa de glicose até o terceiro mês de degradação. Diferentemente disto, os outros açúcares solúveis analisados (frutose, sacarose e rafinose) apresentaram valores próximos à zero no mesmo período. A permanência da glicose na palhada pode indicar que este açúcar é proveniente da digestão dos polissacarídeos presentes na parede celular da palhada.

Comparando os dados de carboidratos não-estruturais encontrados na palhada com os encontrados no colmo, 7% vs. 30% da massa seca (DE SOUZA, 2007), é possível sugerir que o conteúdo de açúcares fermentáveis que poderiam ser utilizados para a produção de etanol na palhada não é significativo.

### ***5.3 DEGRADAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA PAREDE CELULAR E MUDANÇAS NAS PROPORÇÕES DOS MONOSSACARÍDEOS***

Dentre as frações de hemiceluloses analisadas durante o estudo, a que apresentou maior redução foi a fração de hemiceluloses menos aderidas à celulose (0,1M e 1M NaOH) (Tabela 3). A redução no rendimento desta fração composta principalmente de arabinoxilanos devido à alta proporção de xilose observada na Tabela 4, sugere que estes polissacarídeos estejam sendo solubilizados e não sendo mais observados nesta fração.

Somando-se a isso, a proporção da fração das hemiceluloses mais solúveis e pectinas aumentou. O aumento da proporção de xilose nesta fração (Tabela 4) sugere que fragmentos dos arabinoxilanos que foram solubilizados da fração de hemiceluloses menos aderidas à celulose poderiam ser aqueles que posteriormente foram encontrados na fração de hemiceluloses mais solúveis e pectinas, causando a elevação em suas proporções. Isto porque os polímeros da parede celular poderiam ter sofrido transformações devido à intempéries (pH, lixiviação por chuvas etc). É muito difícil explicar estas alterações, uma vez que a ação microbiológica sobre a palhada poderia também ter exercido um papel nestas transformações.

O resíduo, composto principalmente de celulose e  $\beta$ -glucanos fortemente aderidos à celulose (Tabela 3), mostra uma forte redução em sua proporção após seis meses, o que sugere que, a partir deste período, os polissacarídeos do resíduo

passam a ser degradados. O aumento na proporção de glicose na fração de hemiceluloses mais aderidas à celulose (Tabela 4), concomitante à diminuição da proporção do resíduo aos 6 meses de exposição em relação aos 3 meses (Tabela 3), indica que os fragmentos de polissacarídeos solubilizados no resíduo, composto de polímeros de glicose, devem ter sido extraídos na fração de 4M NaOH. Porém, não foram observados aumentos de glicose nas outras frações de hemiceluloses analisadas. Além disso, há também a observação de que a maior perda de massa ocorreu no resíduo no intervalo entre três a seis meses de exposição e não houve aumento de nenhuma outra fração na mesma proporção (Figura 4). Isto sugere que os polissacarídeos do resíduo foram degradados e retirados da palhada. Com isto, a palhada após seis meses de exposição apresenta menor quantidade de glicose e uma menor razão hexose/pentose como visto na Figura 5. Os dados obtidos indicam que a redução observada no resíduo está relacionada à diminuição de beta-glucanos e celulose.

As mudanças na composição de polissacarídeos e a perda líquida de massa das frações de parede celular da palhada podem ter ocorrido devido a diversas razões. O tempo de exposição no campo pode ter causado estas mudanças a partir de mecanismos abióticos como erosão, abrasão física, degradação fotoquímica e lixiviação da palhada depositada no solo (MOORHEAD e REINOLDS, 1991). No intervalo entre três e nove meses de exposição, houve aumento no regime de chuvas (Figura 3), com isso a perda de massa total ocorrida neste intervalo também pode ser devido à lixiviação. O aumento de chuvas no mesmo período causou um incremento na umidade relativa do solo, o que pode ter causado a multiplicação da microbiota edáfica. A umidade e a temperatura do solo têm influência no crescimento dos microrganismos saprobióticos presentes no solo, desta forma, atuando na decomposição dos componentes da palhada (DEVEVRE e HORWATH, 2000; YU et al., 2007). Em estudos com decomposição de palhada de arroz, foi verificada a maior mineralização de carbono a 25 °C (DEVEVRE e HORWATH, 2000), e no presente estudo durante o período de três a seis meses de exposição, quando houve maior perda líquida de massa da palhada, a temperatura média mensal variou de 20 °C a 24 °C.

As condições de temperatura e umidade observadas possibilitaram a multiplicação de microrganismos que podem ser responsáveis pela solubilização dos

arabinosilanos e pela degradação dos polissacarídeos presentes no resíduo da palhada, composto principalmente por celulose, mas com cerca de 10% de  $\beta$ -glucanos, como foi verificado a partir da quantificação deste polissacarídeo (Tabela 5). A hipótese da presença dos microrganismos decompositores como causa da solubilização e mobilização dos polissacarídeos da parede celular é suportada pelo aumento  $\delta^{13}\text{C}$  verificado ao longo do período estudado (Figura 10A). Segundo alguns pesquisadores (NADELHOFFER e FRY, 1988; ALI; BOSATTA; BALESSENT, 1996), pode haver discriminação isotópica durante a decomposição microbológica, e neste caso, os microrganismos presentes no solo podem ter decomposto preferencialmente compostos com  $^{12}\text{C}$ , causando um aumento na quantidade de  $^{13}\text{C}$  na palhada que permaneceu no solo. Isto pôde ser comprovado por alguns estudos sobre decomposição que mostraram a permanência do  $^{13}\text{C}$  na matéria orgânica do solo verificando uma maior quantidade de  $^{12}\text{C}$  no  $\text{CO}_2$  respirado (BLAIR et al., 1985; MARY et al., 1992; SCHWEIZER et al., 1999; FERNANDEZ e CADISCH, 2003; FERNANDEZ et al., 2003).

Em estudos de sacarificação realizados em palhada de milho com pretatamento com vapor, verificou-se que o rendimento da glicose obtida era maior quando xilanases eram utilizadas como suplementos das celulasas durante a hidrólise (ÖHGRES et al., 2007). Com isto, o arabinosilano constituiria uma das primeiras barreiras impostas aos microrganismos decompositores para alcançar a celulose. Até três meses de exposição, foram verificadas modificações preferencialmente nos arabinosilanos, o que pode ser corroborado pelo aumento da relação hexose/pentose verificado na Figura 5. Isto indica que este polissacarídeo é a hemicelulose mais exposta aos microrganismos, já que é a primeira a ser modificada.

Uma perda líquida de massa total foi verificada apenas após seis meses, ocorrendo principalmente devido à degradação dos polissacarídeos do resíduo (Figura 4), o que também pode ser corroborado pela redução na relação hexose/pentose verificada no mesmo período na Figura 5. Porém, é possível que os arabinosilanos degradados tenham sido preferencialmente solubilizados entre 0 e 3 meses, e em parte utilizados pelos microrganismos através de rotas alternativas de metabolismo das pentoses (LAMPEM e PETERJOHN, 1951). Com a solubilização das hemiceluloses compostas por pentoses, é possível que a acessibilidade da

celulose e dos  $\beta$ -glucanos aderidos à mesma tenha aumentado, acelerando, desta forma, a decomposição da parede celular da palhada de cana de açúcar.

Ainda não se sabe com certeza quais fungos estão associados à palhada de cana de açúcar, contudo, em vários estudos, foram utilizados diferentes fungos para degradar em laboratório, palhada de diversos vegetais, tais como trigo (DINIS et al., 2009), aveia (STEPANOVA et al., 2003) e arroz (RAHMAN et al., 2003). Nestes estudos foram verificadas expressão ou atividade de xilanases e/ou glucanases. Para a hidrólise dos arabinoxilanos é necessária a atuação de diversas enzimas da classe das xilanases. Estas enzimas estão presentes em microorganismos ocupantes de diversos nichos ecológicos, onde há material vegetal em abundância (KLUCZEC-TURPEINEN, 2007). Xilanases de *Trichoderma* spp. e *Aspergillus* spp. são as mais estudadas - revisado por Vries e Visser, 2001.

A diminuição nos teores de  $\beta$ -glucanos e da relação hexose:pentose concomitantes ao aumento de lignina (ver abaixo) tornam menos interessante o uso da palhada após seis meses de deposição no campo para produção de etanol. Este fato é corroborado pelo ensaio de sacarificação (Figura 6), que mostra que os níveis de sacarificação da palhada de cana de açúcar é mais elevado nos primeiros 3 meses, porém, reduz-se significativamente após seis meses e permanece diminuindo ao longo do tempo em que a palha fica no campo. Estes dados em conjunto demonstram que o uso da palha após seis meses de exposição às condições de campo não é recomendado para a produção de etanol de celulose.

#### **5.4 VARIAÇÕES NOS TEORES DE LIGNINA E PROTEÍNAS**

A partir da Figura 7, verifica-se o aumento conteúdo de lignina por miligrama de parede celular, o que sugere que não haja, ou que seja muito reduzida, a degradação deste polímero quando comparado com os outros componentes analisados neste estudo. Outros autores já verificaram que a velocidade de decomposição das hemiceluloses e da celulose é maior do que a da lignina (MELILLO et al., 1982; SANGER et al., 1996).

Para decomposição da lignina, são necessárias enzimas específicas, produzidas por fungos como os da podridão branca. Basidiomicetos que fazem parte deste grupo de fungos são os únicos conhecidos com a capacidade de metabolizar

completamente a molécula de lignina a gás carbônico e água, sendo os maiores responsáveis pela degradação dos tecidos vegetais (KIRK e FARREL, 1987).

Segundo Herman et al. (2008), a degradação de lignina ocorre em função da proporção da mesma no total de lignocelulose. Quanto maior a quantidade de holocelulose (hemicelulose mais celulose), menor a proporção de lignina e sua degradação é mais lenta, já que a holocelulose representa uma fonte de energia mais rica. Quando a quantidade de holocelulose acessível aos microrganismos reduz, a degradação de lignina acelera. No trabalho citado acima, foi estudada a degradação de lignina e holocelulose em serrapilheiras de florestas localizadas na Europa e na América do Norte. Foi verificado que a degradação de lignina passa a ocorrer apenas quando a proporção de lignina/(lignina + holocelulose) é maior do que 40%. No presente estudo, esta proporção chega aos 42% apenas após 12 meses de exposição. Desta forma, é possível que a lignina presente na palhada de cana de açúcar comece a ser mobilizada apenas após este período. Este fato pode ser responsável pelo aumento da proporção da lignina observada no presente estudo, pois este aumento denota a mobilização mais lenta da lignina em relação holocelulose. Contudo, neste caso não é possível calcular a velocidade de degradação de lignina, pois os dados fornecem apenas a variação na sua proporção na parede celular, em relação aos outros componentes. Assim, verifica-se neste trabalho que não há degradação significativa de ligninas até os 12 meses de observação, o que sugere que este polímero só será degradado significativamente após este período. Com isto, observações por períodos mais longos deverão ser realizadas, verificando a degradação da lignina no campo, bem como a detecção microorganismos que realizam este processo.

Em relação às proteínas, verifica-se que cerca de 90% do conteúdo destas desaparece até seis meses depois da deposição da palhada sobre o solo (Figura 8). Hipoteticamente, isto se deveria principalmente à degradação destes compostos por agentes decompositores. Porém, há uma pequena elevação no teor de proteínas após nove meses, o que pode ser proveniente do provável aumento na quantidade de microrganismos que estão decompondo a palhada de cana de açúcar como já discutido anteriormente. Aparentemente não há trabalhos relacionados à decomposição de proteínas em palhada, pois não foram encontradas referências bibliográficas com dados deste tipo. Como mencionado acima, as trocas de



nitrogênio, vistas a partir do valor de  $\delta^{15}\text{N}$ , não parecem ser significativas, especialmente considerando a biomassa da palhada a ser utilizada para a produção de bioenergia.

### **5.5 DEGRADAÇÃO DOS $\beta$ -GLUCANOS**

Através dos resultados obtidos a partir da análise dos  $\beta$ -glucanos, pode-se observar que estes estão presentes em todas as frações de parede celular de folha de cana de açúcar (Tabela 5), confirmando o que foi observado por Silva et al. (2005). Também foi verificado que após a utilização do reagente de Updegraff (1969) que deveria hidrolisar as hemiceluloses remanescentes ao redor da celulose, ainda permanecem  $\beta$ -glucanos no resíduo, onde a celulose predomina. Levando em consideração dados da razão tri:tetrassacaídeo, os dados obtidos mostram que quanto mais aderido à celulose é o  $\beta$ -glucano, menor a razão observada (Tabela 6). Isso pode ser explicado pelo fato de quanto menor for o valor desta razão, menor a proporção de ligações do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) no polímero. Desta forma, o  $\beta$ -glucano fica menos solúvel, pois possui menos interrupções na sua cadeia de ligações tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), o que o torna sua estrutura mais parecida com a da celulose.

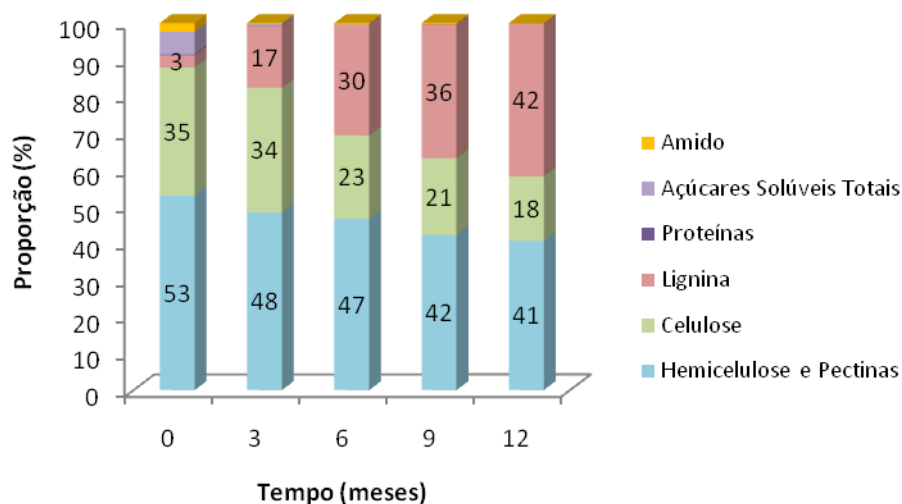
De acordo com a Tabela 5, verificam-se flutuações no teor de  $\beta$ -glucanos nas frações de pectinas e hemiceluloses mais solúveis, porém, não é possível verificar um padrão de mobilização em todas as frações. Desta forma, não é possível inferir se os  $\beta$ -glucanos presentes nas frações mais solúveis estejam sendo solubilizados e mobilizados juntamente com os arabinosilanos.

Contudo, nas frações 4M NaOH e resíduo, pode-se observar uma redução no teor deste polissacarídeo, e uma elevação de sua relação tri:tetrassacarídeo. É possível que os agentes decompositores estejam atuando nestas frações, expressando exoglucanases, degradando preferencialmente as ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), reduzindo sua quantidade em relação à da ligação do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) ainda presentes nos polímeros destas frações. Alternativamente, a presença de enzimas de microorganismos que degradem ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) poderiam ser responsáveis por estas alterações estruturais no  $\beta$ -glucano. Os microorganismos que degradam glucanos produzem enzimas que degradam preferencialmente ligações

do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), como endo-1,4- $\beta$ -glucanases, celobiohidrolases e  $\beta$ -glucosidases (BEGUIN e AUBERT, 1994). Várias endoglucanases atuam aleatoriamente sobre o polímero, produzindo fragmentos do mesmo. A celobiohidrolase atua como uma exoglucanase, liberando celobiose. A  $\beta$ -glucosidase, por fim, hidrolisa a celobiose, liberando glicose (PALMA et al., 2002).

## 5.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Figura 11 compila os dados de mobilização de todos os componentes analisados durante a exposição de palhada de cana de açúcar às condições de campo por 12 meses. Nesta figura, pode-se observar degradação relativamente rápida dos carboidratos não estruturais, como amido e açúcares solúveis e das proteínas, que desapareceram após três meses. Pode-se acompanhar a lenta e gradual redução da proporção das hemiceluloses e pectinas enquanto o resíduo tem sua proporção reduzida a partir de 3 meses. A lignina apresenta um aumento linear em sua proporção no decorrer do tempo de exposição da palhada às condições de campo uma vez que é o componente que possui mobilização mais lenta.



**Figura 11** - Modificação na proporção entre os componentes da parede celular e os carboidratos não estruturais de palhada de cana de açúcar mantida sob condições de campo por até 12 meses.

A partir dos dados obtidos no presente estudo, sugere-se que o arabinoxilano é a hemicelulose mais acessível aos microrganismos, já que são as primeiras hemiceluloses mobilizadas, sendo solubilizadas. Os microrganismos devem utilizar enzimas da classe das xilanases e arabinofuranosidases, utilizando os produtos deste polissacarídeo como fonte de energia para seu crescimento e aumentando a acessibilidade à celulose e aos  $\beta$ -glucanos fortemente aderidos à mesma, que contêm hexoses, mais facilmente metabolizáveis pela maioria dos microrganismos. Há também degradação dos  $\beta$ -glucanos (claramente visto nas frações Oxalato, 4M e resíduo), cujos produtos também devem ser utilizados por microrganismos. Assim, os dados obtidos caracterizam um processo geral de degradação das hemiceluloses ao longo do período observado.

As modificações que ocorrem na palhada até três meses de exposição às condições de campo são importantes em um contexto biotecnológico, pois, estes sofreram modificações em sua estrutura, facilitando a acessibilidade à celulose. Portanto, seria interessante o uso da palhada entre três e seis meses de exposição para a produção de etanol celulósico, pois neste período, a palha torna-se mais acessível à sacarificação. Porém, não é aconselhado esperar mais do que seis meses, pois após este período, a palhada apresenta grande aumento proporcional em lignina, o que se relaciona com o menor nível de sacarificação e, portanto, produziria menos etanol em um processo de segunda geração.

Outra possível contribuição dos dados deste trabalho é a possibilidade de inferir quais épocas são melhores para coleta de microrganismos ao redor da palhada e isolar novas linhagens que possam degradar preferencialmente algum polissacarídeo da parede celular. Para encontrar microrganismos que consigam solubilizar arabinoxilanos, sugere-se a coleta dos microrganismos ao redor da palha por volta do terceiro mês de exposição. De fato, os Drs. Fabio Squina e Rolf Prade, do CTBE já obtiveram 1,1 milhão de sequências de metagenômica do solo da palhada de 3 meses de idade pelo método 454 e estão começando a examinar os genes ali presentes, sendo provável que estes pesquisadores encontrem genes relacionados às enzimas de microrganismos que sejam as mesmas ou similares às que degradam arabinoxilanos e beta-glucanos de palha.

## **6 CONCLUSÕES**

O presente estudo fornece informações que contribuem para o desenvolvimento da tecnologia de produção de etanol a partir de parede celular, pois, a partir destas informações pode-se imitar o processo que funciona no campo, porém de forma acelerada, inferindo qual a ordem de enzimas utilizar para degradar a parede celular, liberando os monossacarídeos para fermentação e produção do biocombustível e também de outros produtos úteis na indústria. Os resultados obtidos permitem a sugestão de que os arabinoxilanos sejam as hemiceluloses mais externas na parede celular de folha de cana de açúcar e que sua solubilização facilita a acessibilidade à celulose. Desta forma, visando à otimização da produção de etanol a partir de palhada de cana de açúcar, o presente estudo sugere a utilização de enzimas da classe das xilanases e arabinofuranosidasas em uma primeira etapa de degradação do material lignocelulósico, com a intenção de solubilizar estas hemiceluloses, aumentando assim, a acessibilidade da celulose, e, posteriormente, sugere-se utilização de enzimas endo- $\beta$ -glucanases, continuando o processo. Para descobrir microorganismos e enzimas que realizam a degradação da lignina, estudos por um prazo maior do que 12 meses serão necessários em estudos posteriores.

## REFERÊNCIAS\*

- ÅGREN, G. I.; BOSATTA, E.; BALESIDENT, J. Isotope discrimination during decomposition of organic matter: a theoretical analysis. **Soil. Sci. Soc. Am. J.**, v. 60, p. 1121–1126, 1996.
- AMARAL, L. I. V.; GASPAR, M.; COSTA, P. M. F.; AIDAR, M. P. M.; BUCKERIDGE, M. S. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnia**, v. 34, n. 4, p. 425-431, 2007.
- ALDINGTON, S.; FRY, S. C. **Oligosaccharins**. London: Elsevier, 1993.
- ALI, M.; MARK, R.; DANIEL, J. S. Conditioning hemicelluloses hydrolysates for fermentation: effects of overliming pH on sugar and ethanol yields. **Process Biochem.**, v. 41, p. 1806-1811, 2006.
- ANDERSON, W. F.; AKI, D. E. Structural and chemical properties of grass lignocelulosis related to conversion for biofuels. **J. Ind. Microbiol.**, v. 35, p. 355-366, 2008.
- AYERST, G. The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi. **J. of Storage Prod. Res.**, v. 5, p. 127-141, 1969.
- BEGUIN, P.; AUBERT, J. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 13, p. 25–28, 1994.
- BLAIR, N.; LEU, A.; MUNOZ, E.; OLSEN, J.; KWONG, E.; DES MARAIS, D. Carbon isotope fractionation in heterotrophic microbial metabolism. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 50, p. 996–1001, 1985.
- BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL (BNDES). Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável. Disponível em: <[www.bioetanolcana.org](http://www.bioetanolcana.org)> Acesso em: 12 abr. 2010.
- BONINI, V. L. R. Biodegradação de organoclorados no solo por basidiomicetos lignocelulosicos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1997. p. 243- 268.
- BORGES, A. L. C. C. et al. Silagem de sorgo de porte baixo com diferentes teores de tanino e de umidade no colmo. II - Alterações nos carboidratos durante a fermentação. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 51, n. 5, p. 491-497, 1999.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRANDÃO, A. D. Efeito da giberelina A3 e do paclobutrazol no metabolismo de **carboidratos e expressão gênica em plântulas de cana de açúcar (*Sacharum sp.*)**. 2009. 253 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular) - Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, Campinas, 2009.

---

\* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BRAUNBECK, O. A.; CORTEZ, L. A. B. O Cultivo da cana-de-açúcar e o uso dos Resíduos In: ROSILLO-CALLE, F. **Uso da Biomassa Para Produção de Energia na Industria Brasileira**. Campinas: Unicamp, 2008. p. 215-246.

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

BUCKERIDGE, M. S.; DIETRICH, S. M. C. Galactomanan from Brazilian legume seeds. **Rev. Bras. Bot.**, v. 13, p. 109-112, 1990.

BUCKERIDGE, M. S.; DOS SANTOS, W. D.; DE SOUZA, A. P. As rotas para o etanol celulósico no Brasil In: CORTEZ, L. A. B. (Ed.). **Bioetanol para cana de açúcar, P&D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: FAPESP, 2010. p. 365-380.

BUCKERIDGE, M. S.; RAYON, C.; URBANOWICZ, B.; TINÉ, M. A.; CARPITA, N. C. Mixed linkage (1→3)(1→4) Beta-D-glean of grasses. **Cereal Chem.**, v. 81, n. 1, p. 115-127, 2004.

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.

CARROL, A.; SOMERVILLE, C. Cellulosic biofuels. **Annu. Rev. Plant. Biol.**, v. 60, p. 165-182, 2009.

CORTEZ, L. A. B.; LORA, E. E. S.; GOMEZ, E. O. **Biomassa para Bioenergia**. Campinas: Editora Unicamp, 2008.

DARVILL, A. G.; AUGUR, C.; BERGMANN, C.; CARLSON, W.; CHEONG, J. J.; EBERHARD, S.; HAHN, M.G. Oligosaccharins: oligosaccharides that regulated growth, development and defense responses in plants. **Glicobiology**, v. 2, p. 181-198, 1992.

DARWILL, A.; McNEIL, M.; ALBERSHEIM, P.; DELMER, D. P. The primary cell walls of flowering plants. In: STRUMPF, P. K.; CONN, E. E. (Ed.). **The biochemistry of plants: a comprehensive treatise**. New York: Academic Press, 1980. p. 91-162.

DEVEVRE, O. C.; HORWATH, W. R. Decomposition of rice straw and microbial carbon use efficiency under different temperatures and soil moistures. **Soil Biol. Biochem.**, v. 32, p. 1773-1785, 2000.

DE SOUZA, A. P. **A cana-de-açúcar e as mudanças climáticas: efeitos de uma atmosfera enriquecida em CO2 sobre o crescimento, desenvolvimento e metabolismo de carboidratos de Saccharum ssp.** 2007. 127 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, Campinas, 2007.

DOS SANTOS, W. D.; FERRARESE, M.; FINGER, A. et al. Lignification and related enzymes in *Glycine max* root growth-inhibition by ferulic acid. **J. Chem. Ecol.**, v. 30, p. 1203-1212, 2004.

DOS SANTOS, W. D.; FERRARESE, M. L. L.; NAKAMURA, C. V.; MOURAO, K. S. M.; MANGOLIN, C. A.; FERRARESE-FILHO, O. Soybean (*Glicin max*) Root Lignification Induced by Ferulic Acid: The Possible Mode of Action. **J. Chem. Ecol.**, v. 34, p. 1230-1241, 2008.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

FERNANDEZ, I.; CADISH, G. Discrimination against  $^{13}\text{C}$  during degradation of simple and complex substrates by two white rot fungi. **Rapid. Commun. Mass. Spectrom.**, v. 17, p. 2614–2620, 2003.

FERNANDEZ, I.; MAHIEU, N.; CADISH, G. Carbon isotopic fractionation during decomposition of plant materials of different quality. **Global Biogeochem. Cycles**, v. 17, p. 1075–1085, 2003

FILEZZI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Anal. Biochem.**, v. 197, p. 157-162, 1991.

FINCHER, G. B.; STONE, B. Cell walls and their components in cereal grain technology. In: POMERANZ, Y. (Ed.) **Advances in cereal science and technology**. Pullman: American Association of Cereal Chemists, 1986. p. 207-295.

FURLANI NETO, V. L.; RIPOLI, T. C.; VILA NOVA, N. A. Biomassa de cana-de-açúcar: energia contida no palhico remanescente de colheita mecânica. **Stab – Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 15, p. 24-27, 1997.

GOLDENBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**, v. 315, p. 808-810, 2007.

GOLDMAN, G. H. Genetic improvement of xylose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. In: BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. (Ed.). **Routes to Cellulosic Ethanol**. New York: Springer, 2010. p. 115-134.

GÓMEZ, E. O.; DE SOUZA, R. T. G.; ROCHA, G. J. M.; CORTEZ, L. A. B. A palha de cana-de-açúcar como matéria prima para processos de segunda geração In: CORTEZ, L. A. B. (Ed.). **Bioetanol para cana de açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Blucher; FAPESP, 2010. p. 637-659.

HASSUANI, S. J. et al. **Biomass power generation: sugarcane bagasse and trash**. Piracicaba: PNUD-CTC, 2005. (Série Caminhos para Sustentabilidade).

HERMAN, W.A.; MCGILL, W.B.; DORMAAR, J.F. Effects of initial chemical composition on decomposition of roots of three grass species. **Can. J. Soil Sci.**, v.57, p.205-215, 1977.

HERMAN, J.; MOORHEAD, D.; BERG, B. The relationship between rates of lignin and cellulose decay in above ground forest litter. **Soil Biol. Biochem.**, v. 40, p. 2620-2626, 2008.

HINMAN, N. D.; WRIGHT, J. D.; HOAGLAND, W.; WYMAN, C. E. Xylose fermentation, an economic analysis. **Appl. Biochem. Biotech.**, v. 20/21, p. 391-401, 1989.

IZYDORCZYK, M. S.; BILIADERIS, C. G. Influence of structure on the physicochemical properties of wheat arabinoxilan. **Carbohydr. Polim.**, v. 17, p. 237-247, 1992.

JOHNSON, D. K.; ELANDER, R. T. Pretreatments of enhanced Digestibility of Feedstocks, In: HIMMEL, M. E. (Ed.). **Biomass Recalcitrance: Deconstructing The Plant Cell Wall For Bioenergy**. Oxford: Blackwell Publishing Ltd., 2008. p. 436-479.

KIRK, T. K.; FARREL, R. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 41, p. 465-505, 1987.

KIRK, T. K.; MOORE W. E. Removing lignin from wood with white-rot fungi and digestibility of resulting wood. **Wood Fiber Sci.**, v. 4, p. 72–79, 1972.

KLUCZEC-TURPEINEN, B. **Lignocellulose degradation and humus modification by the fungus *Paecilomyces inflatus***. 2007. 84 p. Masters Thesis - Department of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki, Helsinki, 2007.

LIMA, D. U.; SANTOS, H. P.; TINE, M. A.; MOLLE, F. D.; BUCKERIDGE, M. S. Patterns of expression of cell wall related genes in sugar cane. **Genet. Mol. Biol.**, v. 24, p. 191-198, 2001.

LÄHDESMÄKI, P.; PIISPANEN, R. Degradation products and the hydrolytic enzyme activities in the soil humification processes. **Soil Biol. Biochem.**, v. 20, p. 287-292, 1988.

MACEDO, I. C. Greenhouse gas emissions and energy balances in bio-ethanol production and utilization in Brazil. **Biomass and Bioenerg.**, v. 14, p. 77-81, 1998.

MACEDO, N. M.; BOTELHO, P. S. M.; CAMPOS, M. B. S. Controle químico de cigarinha-da-raiz em cana-de-açúcar e impacto sobre a população de artrópodes. **Stab – Açúcar, Alcool e Subprodutos**, v. 21, p. 30-33, 2003.

McCANN, M. C.; ROBERTS, K. Architecture of the primary cell wall. In: LLOYD, C. W. (Ed.). **The Cytoeskeletal Basis of Plant Growth and Form**. London: Academic Press, 1991. p. 109-129.

MARY, B.; MARIOTTI, A.; MOREL, J. L. Use of <sup>13</sup>C Variations at natural abundance for studying the biodegradation of root mucilage, roots and glucose in soil. **Soil. Biol. Biochem.**, v. 24, p. 1065–1072, 1992.

MOORHEAD, D. L.; REYNOLDS, J. The contribution of abiotic processes to buried litter decomposition in the northern Chihuahuan desert. **Oecologia**, v.1, p. 133-135, 1991.

NADELHOFFER, K.J., Fry B. Controls on natural <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C abundances in forest soil organic-matter. **Soil. Sci. Soc. Am. J.**, v. 52, p. 1633–1640, 1988.

NEVINS, D. J.; ENGLISH, P, D.; ALBERSHEIM, P. Changes in cell wall polysaccharides associated with growth. **Plant Physiol.**, v. 43, p. 914-922, 1968.

NG KEE KWONG, K. F.; DEVILLE, J.; CAVALOT, P. C.; RIVIERE, V. Value of cane trash in nitrogen nutrition of sugarcane. **Plant Soil**, v. 102, p. 79-83, 1987.

ÖHGRES, 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.

OLIVEIRA, M. W.; TRIVELIN, P. C. O.; GAVA, G. J. C.; PENATTI, C. P. Degradação da palhada de cana-de-açúcar. **Scientia Agricola**, v 56, n. 4, p. 803-809, 1999.

PAES, M. C. D. Aspectos Físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Embrapa, Milho e Sorgo. **Circular Técnica**, n. 75, 2006.



PALMA, F. E. R. D.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Purification and characterization of two  $\beta$ -glucosidases from thermophilic fungus *thermoascus aurantiacus* Miehe. **Folia. Microbiol.**, v. 47, p. 685–690, 2002.

PARRISH, F. W.; PERLIN, A. S.; REESE, E. T. Selective enzymolysis of poly- $\beta$ -glucans, and the structure of the polymers. **Can. J. Chem.**, v. 38, p. 2094-2104, 1960.

POLIZELI, M. L. T. M.; CORRÊA, E. C. P.; POLIZELI, A.; JORGE, J. A. Hydrolases from microorganisms used for degradaaion of plant cell walll and bioenergy. In: BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. (Ed.). **Routes to Cellulosic Ethanol**. New York: Springer, 2010. p. 115-134.

RAHMAN, A. K. M. S.; SUGITANI, N.; HATSU, M.; TAKAMIZAWA, K. A role of xylanase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase and xylosidase in xylan degradation. **Can. J. Microbiol.**, v. 49, p. 58–64, 2003.

RIPOLI, T. C. C. Energy potencial of sugarcane biomass in Brazil. **Science Agriculture**, v. 57, n. 4, p. 677-681, 2000.

ROUBROEKS, J. P.; NADERSSON, R. A.; AMAN, P. Strucutural features of (1,3)(1,4)- $\beta$ -glucan and arabinoxylan fractions isolated from rye bran. **Carbohyd. Polym.**, v. 42, p. 3-11, 2000.

SAAVEDRA, F.; KARÁCSONYI, S.; ALFÓLDI, J. Studies of the polysaccharides of sugar cane (*Saccharum officinarum*): structural features of the water-insoluble D-xylans. **Carbohyd. Res.**, v. 180, p. 61-71, 1988.

SILVA, A. M. **Parede de cana-de-açúcar: composição, estrutura e variações durante o desenvolvimento**. 2005. 105 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular) – Instituto de Biologia, Univrsidade de Campinas, Campinas, 2005.

SHANDU D. K.; SIDHU, M. S. Fungal succession on decomposing sugarcane bagasse. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, v. 75, n. 2, p. 281-286, 1980.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M. S.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; BON, E. P. S.; MORAES, L. M. P.; ARAÚJO, J. A.; TORRES, F. A. G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technol.**, v. 101, p. 4820-4825, 2010.

STEPANOVA E. V.; KOROLOVA O. V.; VASILCHENKO L. G.; KARAPETYAN K. N.; LANDESMAN E. O.; YAVMETIDINOV I. S.; KOZLOV Y. P.; RABINOVICH M. L. Fungal decomposition of oat straw during liquid and solid-state fermentation. **Appl. Biochem. Microbiol.**, v. 39, p. 74–84, 2003.

STRATTON, M. L.; RECHCIGL, J. E. Organic mulches, wood products, and composts as soil amendmets and conditioners. In: WALLLACE, A.; TERRY, R. E. (Ed.). **Handbook of soil conditioners**. New York: Marcel Dekker. 1998. p. 43-95.

SCHWEIZER, M.; FEAR, J.; CADISH, G. Isotopic ( $^{13}\text{C}$ ) fractionation during plant residue decomposition and its implications for soil organic matter studies. **Rapid. Commun. Mass. Spectrom.**, v. 13, p. 1284–1290, 1999.

TIMM, L. C. **Efeito do manejo da palha de cana de açúcar nas propriedades físico-hídricas de um solo**. 2002. 127 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luís José de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

TINÉ M. A.; LIMA D. U.; BUCKERIDGE M. S. Galactose branching modulates the action of cellulose on seed storage xyloglucans. **Carbohydr. Polym.**, v. 52, p. 135-141, 2003.

TRIVELIN, P. C. O.; VICTORIA, R. L.; RODRIGUES, J. C. S. Aproveitamento por soqueira de cana de açúcar de final de safra do nitrogênio da aquamônia-<sup>15</sup>N e uréia-<sup>15</sup>N aplicado ao solo em complemento a vinhaça. **Pesqui. Agropecu. Bras.**, v. 30, p. 1375-1385, 1995.

UPDEGRAFF, D. M. Semimicro determination of cellulose in biological materials. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 44, n. 8, p. 481-483, 1967.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA DE AÇÚCAR (UNICA). Seminário Cogeração de Energia a Bagaço de Cana no Estado de São Paulo. 2007. Disponível em: [http://www.saneamento.sp.gov.br/bio\\_apresen/Procknor.pdf](http://www.saneamento.sp.gov.br/bio_apresen/Procknor.pdf). Acesso em: 21 jun. 2007.

VASCONCELOS, A. C. M. **Desenvolvimento do sistema radicular da parte aérea de socas de cana de açúcar sob dois sistemas de colheita: crua mecanizada e queimada manual**. 2002. 140 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

VERMERRIS, W.; SABALLOS, A.; EJETA, G.; MOSIER, N. S.; LADISCH, M. R.; CARPITA, N. C. Molecular breeding to enhance ethanol production from corn and sorghum stover. **Crop Sci.**, v. 47, p. 142-153, 2007.

WOOD, A. W. Management of crop residues following green harvesting of sugarcane in North Queensland. **Soil Till. Res.**, v. 20, p. 69-85, 1991.

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

WUBAH, D.; AKIN, D.; BORNEMAN, W. Biology, Fiber-Degradation and Enzymology of Anaerobic Zoozporic Fungi. **Critical Rev. Microbiol.**, v. 19, p. 99-115, 1993.