

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

UIRAJÁ CAYOWA MAGALHÃES RUSCHONI

Ocorrência de  $\beta$ -1-3: $\beta$ -1-4 glucanos em tecidos de cana-de-açúcar que representam  
diferentes estágios de desenvolvimento da planta

Lorena  
2021



UIRAJÁ CAYOWA MAGALHÃES RUSCHONI

Ocorrência de  $\beta$ -1-3; $\beta$ -1-4 glucanos em tecidos de cana-de-açúcar que representam diferentes estágios de desenvolvimento da planta

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de concentração de Biotecnologia Industrial.

Orientador: Prof. Dr. André Luís Ferraz

Versão Original

Lorena

2021

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

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

Ruschoni, Uirajá Cayowa Magalhães  
Ocorrência de beta(1,3):beta(1,4) glucanos em tecidos de cana-de-açúcar que representam diferentes estágios de desenvolvimento da planta / Uirajá Cayowa Magalhães Ruschoni; orientador André Luís Ferraz - Versão Original. - Lorena, 2021.  
68 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2021

1. Glucanas mistas. 2. Hemiceluloses. 3. Recaltriciância. 4. Gramineas. I. Título. II. Ferraz, André Luís, orient.

## Agradecimentos

À Deus, por permitir que meu caminho tenha mais flores que espinhos. Aos meus pais Sônia e João, meus irmãos Uíara e Ubiratan, meus cunhados Cristiane, Fábio, Leticia e Lucas, aos sobrinhos todos, e meu namorado Luiz. Sem o amor de vocês o mundo não teria sentido. À minha mentora, amiga, mãe e conselheira de vida, Priscila Brasil Souza Cruz. Às famílias Credidio, da tia Geralda e da Cleusa, vocês me acolheram e por isso sou grata.

Ao meu orientador André Ferraz, pelo exemplo de integralidade, profissionalismo e humildade. Seus conhecimentos me ensinaram muito até aqui. Ao José Moreira, por ser simples e na simplicidade revelar o que realmente importa desta vida. Aos professores Elisson Romanel e Tatiane Franca, por contribuírem com o desenvolvimento deste trabalho. Aos professores Fernando Segato e Talita, e a doutora Gabriela Berto. As confraternizações foram melhores por eu ter vocês por perto. Aos funcionários e amigos, “little Lucy”, “little Snake”, Bárbara, Paulinho, Isnaldi e Djalma, pelo apoio incondicional. Ao secretário Andrézinho, pelas broncas, e-mails, lembretes e pipocas “marias pororocas”.

Aos amigos do LCM Ana, Angela, Otto e Flávia. Compartilhar esse pedaço da vida com vocês foi extremamente gratificante. Aos amigos dos laboratórios vizinhos, Lucas, Yummi, Caio, Felipe e Diego, pelos cafés, risadas e pokémons. Aos amigos do departamento Sarah, Fanny, Ítalo, Fernanda, Paula, Jesus, William M., Wilian, Pedro, Julio, Henrique, Isa, Valadares e Mendes. O quanto se pode enriquecer como ser humano eu aprendi com vocês. Aos amigos feitos em Lorena, Elder, Sophia, Simone, Mariana, Andressa, Dimona, Marina, Duda, Beanca, Maiara, Fran, Nat, Leo, Carol, Rodolfo e Rep. Mãe Joana. Vocês acrescentaram ainda mais brilho a está experiência. Ao meu clã, por serem a razão de eu ter sempre magia no olhar, e aos amigos-irmãos, Bruno, Thayline, Rodolfo, Guilherme, Joana, Gabriele, Igor, Doug, Gunther, Lauriane, Mayra e Ariadne, através de ligações, mensagens e ausências, sempre torceram e estiveram presentes por mim. À UERGS, por ter me formado profissionalmente e pessoalmente.

À Escola de Engenharia de Lorena e ao PPGBI, o meu mais sincero obrigada pela oportunidade de realizar está pesquisa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. À FAPESP pelo processo nº 2014/06923-6, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).



Aos meus pais, Sônia e João, por fazerem todos os meus sonhos se tornarem realidade.





“E as coisas que começaram a acontecer a partir daquele momento eram tão lindas e grandiosas que não consigo descrevê-las” (LEWIS, 2014, p.213)



## RESUMO

RUSCHONI, U. C. M. **Ocorrência de  $\beta$ -1-3; $\beta$ -1-4 glucanos em tecidos de cana-de-açúcar que representam diferentes estágios de desenvolvimento da planta.** 2021. 68 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2021.

As biorrefinarias de biomassa lignocelulósica requerem processos eficientes para diminuir ou eliminar a recalcitrância da parede celular vegetal ao processo de hidrólise enzimática. Há evidências de que a ocorrência de  $\beta$ -1-3; $\beta$ -1-4 glucanos (glucanas mistas) nas paredes celulares vegetais proporciona materiais menos recalcitrantes. No entanto, também há evidências de que as glucanas mistas são progressivamente substituídas por xilanas ao longo do processo de diferenciação celular. Desta forma, entender como a recalcitrância está associada à composição química e a distribuição topoquímica destas hemiceluloses pode contribuir com o desenvolvimento de biorrefinarias mais eficientes. O presente estudo gerou informação relativa ao acúmulo e a eventual degradação de glucanas mistas em diferentes tecidos de cana de açúcar ao longo do processo de diferenciação celular. Para tanto o teor de glucanas mistas foi quantificado em dois híbridos de cana de açúcar. O estudo do híbrido H140 evidenciou a diminuição do conteúdo de glucanas mistas com o avanço da progressão do desenvolvimento dos entrenós. O híbrido H89, no entanto, apresentou um padrão distinto, com teor de MLG significativamente reduzido nas regiões de medula e interface do entrenó 1, enquanto que o córtex dos entrenós de 1 a 5 foram estatisticamente equivalentes. Os dados referentes aos teores de glucanas mistas detectados ao longo do processo de desenvolvimento das plantas em estudo sustentam que pode ocorrer substituição de glucanas mistas por xilanas com a progressão do processo de diferenciação celular ou simplesmente que o espessamento da parede celular secundária que ocorre ao longo do processo de diferenciação reduza a contribuição mássica da glucana mista para os tecido de entrenó analisados. Em tecido foliar, a análise de composição química revelou diferenças na estrutura das hemiceluloses constituintes da parede celular, essencialmente na estrutura das glucuronoarabinoxilanas. Os teores de glucans mistas foram da ordem de  $0,6 \pm 0,1$  % (H89) e de  $0,4 \pm 0,1$  % (H140), embora os teores de glucanas totais foram elevados em ambos híbridos ( $33,7 \pm 0,4$  % e  $35,5 \pm 0,7$  %, respectivamente). As análises de imunohistoquímica e microscopia de fluorescência foram efetivas na imunolocalização de glucanas mistas em tecidos de cana-de-açúcar.

**Palavras-chave:** Glucanas mistas. Hemiceluloses. Recalcitrância. Gramíneas.

## ABSTRACT

RUSCHONI, U. C. M. **Occurrence of  $\beta$ -1-3: $\beta$ -1-4 glucan in sugarcane tissues sampled at varied plant development phases.** 2021. 68 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2021.

Lignocellulosic biomass biorefineries require efficient processes to decrease or eliminate the recalcitrance of the plant cell wall to the enzymatic hydrolysis process. There is evidence that the occurrence of  $\beta$ -1-3: $\beta$ -1-4 glucan (mixed linkage glucans - MLG) in plant cell walls provides less recalcitrant materials. However, there is also evidence that MLG are progressively replaced by xylans throughout the cell development process. Thus, understanding how recalcitrance is associated with chemical composition and the topochemical distribution of these hemicelluloses can contribute to the development of more efficient biorefineries. The present provided information regarding the accumulation and eventual degradation of MLG in different sugarcane tissues during the cell differentiation process. MLG were quantified in two sugarcane hybrids. The H140 hybrid showed a reduction in MLG content with the progression of the internodes development. The H89 hybrid, however, showed a distinct pattern, with significantly reduced MLG content in the central regions of internode 1, while the rind of internodes 1 to 5 were statistically equivalent. Data obtained for MLG contents through progressive internodes development phases support that MLG can be substituted by other hemicelluloses like xylans or simply that the cell wall thickening observed along cell wall differentiation decreases the mass contribution of MLG to the whole tissues. Leaf tissues were also analyzed indicating that glucuronoarabinoxylans predominates in the hemicellulose while the MLG levels were restricted to  $0.6 \pm 0.1\%$  (H89) and  $0.4 \pm 0.1\%$  (H140). The same tissues contained high total glucan contents ( $33,7 \pm 0,4 \%$  and  $35,5 \pm 0,7 \%$  for H89 and H140, respectively), despite low amounts of MLG. Immunohistochemistry and fluorescence microscopy analyzes were also performed demonstrating the suitability of the techniques for immunolocation of MLG in sugarcane tissues.

**Keywords:** Mixed Linkage Glucans. Hemicelluloses. Recalcitrance. Grass.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Microscopia ótica de um corte transversal de um entrenó maduro de cana-de-açúcar, indicando os feixes vasculares (elementos de vaso-V, células do floema-Ph, fibras-Fibers) e células de parênquima. Adaptada de Ferraz et al. (2014) .....21
- Figura 2.** Seção transversal do entrenó de cana-de-açúcar, mostrando a ocorrência de feixes vasculares (*vascular bundle*) e células de parênquima (*parenchyma cells*) nas regiões de cortex e medula. A: colmo *in natura*; B: ampliação de um corte observado por microscopia eletrônica de varredura, adaptada de Sant’Anna et al. (2013) .....22
- Figura 3.** Seções transversais da lâmina foliar, exibindo as seguintes estruturas e tipos celulares: bc - células buliformes; l - grande; m - médio; s - pequeno; vb - feixe vascular; x - xilema; p - floem; le - epiderme inferior; ue - epiderme superior; s – estômatos; c – colênquima; f – fibras. Adaptada de Moore, (1987).....24
- Figura 4.** Magnificação de junção entre três células no entrenó de cana-de-açúcar, mostrando as diferentes espessuras das camadas de lamela média (ML), de parede celular primária (PCW) e de parede celular secundária (SCW) observadas por microscopia eletrônica de transmissão. Adaptada de Sant’Anna et al. (2013).....25
- Figura 5.** Estrutura e organização da parede celular primária vegetal do tipo II atribuídas às gramíneas. Presença de celulose, glucanas mistas e pectinas (homogalacturana-HG e ramnogalacturana substituída-RG I). Adaptada de Buckeridge et al. (2004).....26
- Figura 6.** Estrutura química das pectinas homogalacturana-HG (A) e ramnogalacturanas-RG I (B) encontradas nas paredes primárias dos vegetais. Adaptada de Teleman (2009).....27
- Figura 7.** Micrografias de ultravioleta (278 nm) de entrenós maduros de cana de açúcar mostrando acúmulo de lignina na parede primária das células e na lamela média de fibras de córtex (a) e medula (b). As cores rosa, azul claro, tons de verde, amarelo e preto indicam alta absorção em 278 nm e elevado teor de lignina. Vermelho, azul escuro e marrom indicam menores absorções em 278 nm e menores teores de lignina. Adaptada de Siqueira et al. (2011).....28
- Figura 8.** Estrutura genérica de uma  $\beta$ -1,3-1,4-glucana. Adaptada de Scheller; Ulvskov (2010) .....30
- Figura 9.** Imunolocalização de MLG em *Sorghum bicolor* por microscopia de transmissão eletrônica (TEM) demonstrando a heterogeneidade de deposição de

glucanas mistas em diferentes estruturas celulares. ML-Lamela média; SF-Fibra; Cy-Citoplasma; CyGT-Citoplasma parenquimático; CyPh-Citoplasma floema; CyCC-Citoplasma de células não-diferenciadas do aglomerado vascular; PmPc-Membrana plasmática do pericarpo do grão; StEs-Endosperma das reservas de amido; Seta-imunolocalização de MLG. Adaptada de Ermawar et al. (2015).....	31
<b>Figura 10.</b> Teores de MLG (A) e digestibilidade direta com celulases comerciais (B) de regiões de medula, interface medula-córtex e córtex de seis híbridos diferentes de cana de açúcar. Adaptada de Costa et al. (2016) .....	32
<b>Figura 11.</b> Seção transversal do entrenó de <i>Zea mays</i> (milho) após 24h de pré-tratamento biológico (microbiota de rúmen), mostrando a ocorrência de aglomerados vasculares (scl) pouco digeridos e de tecido parenquimático (par) mais degradado. Adaptada de Jung; Casler (2006).....	33
<b>Figura 12.</b> Digestibilidade de <i>Zea mays</i> sob ação de celulases nos níveis teciduais (microscopia ótica A-não tratada e B-tratada microscopia ótica após 15h de digestão com celulosomas bacterianos a 55 °C), celulares (C - microscopia ótica após 7 dias de tratamento com celulosomas bacterianos indicando com seta a fragmentação da parede celular) e moleculares (D – ATM demonstrando com setas o efeito de <i>peeling</i> individual das microfibrilas de celulose cristalina sob ação dos celulosomas bacterianos). Adaptada de Ding et al. (2012).....	35
<b>Figura 13.</b> Micrografias de imunofluorescência de celulose cristalina (CBM3a - a, b, c) e xilana (LM11 - d,e, f) em cortes transversais de brotos de bambu (TOPO-jovem; MEIO-fase intermediária de desenvolvimento; BASE-maduro). Px e Mx- xilema; Fs-fibras; Ep- epiderme; P- parênquima. Adaptada de Chang et al. (2013) .....	36
<b>Figura 14.</b> Imunohistoquímica de entrenó maduro do híbrido H89 mostrando presença de glucanas mistas (anti-MLG), arabinoxilana-GAX (LM11) e xilana (CRCC M140). P-parênquima; V-aglomerado vascular. Adaptada de Costa et al. (2016) .....	37
<b>Figura 15.</b> Representação da amostragem de tecido foliar (A) e de entrenós (B). Adaptada de McCormick, Cramer, Watt (2006) e Collucci et al. (2019).....	39
<b>Figura 16.</b> Representação transversal das seções de corte e separação de amostras a partir das regiões entrenodais da cana-de-açúcar.....	40
<b>Figura 17.</b> Representação da região corte para obtenção amostras para infiltração com resina e corte em ultra micrótomo.....	41
<b>Figura 18.</b> Posicionamento da amostra durante blocagem com resina Spurr para obtenção dos blocos de corte em ultra micrótomo.....	42

<b>Figura 19.</b> Curva de calibração de glicose com o reagente glicose oxidase/peroxidase (GOPOD). A indicação de concentração de glicose se refere à massa de glicose no tubo de reação. ....	44
<b>Figura 20.</b> Princípio de análise de beta-glicanos por enzimas em kit comercial. Adaptada de Megazyme® (2018) .....	47
<b>Figura 21.</b> Cromatogramas indicando picos de celotriose e celotetraose para amostras de medula (preto), interface (vermelho) e cortex (azul)do entrenó 1 do híbrido H89.....	49
<b>Figura 22.</b> Quantificação de glucanas mistas para o Híbrido H140, reportadas em teor percentual em base seca de amostra de cana-de-açúcar, demonstrando análise estatística t-student bicaudal pareado ( $p < 0,05$ ). <b>LETRAS MAIÚSCULAS</b> – Comparação dos entrenós de uma mesma região utilizando o entrenó 1 como referência. <b>letras minúsculas</b> – Comparação de todos entrenós de uma mesma região sem um entrenó específico como referência. ....	50
<b>Figura 23.</b> Quantificação de glucanas mistas para o Híbrido H89, reportadas em teor percentual em base seca de amostra de cana-de-açúcar, demonstrando análise estatística <i>t-student</i> bicaudal pareado ( $p < 0,05$ ). <b>LETRAS MAIÚSCULAS</b> – Comparação dos entrenós de uma mesma região utilizando o entrenó 1 como referência. <b>letras minúsculas</b> – Comparação de todos entrenós de uma mesma região sem um entrenó específico como referência. ....	51
<b>Figura 24.</b> Escurecimento dos entrenós jovens (E1 demonstrado em A) comparado com o entrenó maduro (E11 demonstrado em B). ....	53
<b>Figura 25.</b> Micrografias de teste de viabilidade dos anticorpos anti-MLG e Alexa Fluor 514®. A- Amostra tratada com os anticorpos primário e secundário analisada sob filtro E-YFP de fluorescência que capta a região de emissão do Alexa Fluor 514® ( <i>exp.time</i> 100 ms); B - Amostra tratada somente com o anticorpo secundário e analisada sob o filtro E-YFP de fluorescência que capta a região de emissão do AlexaFluor 514 ( <i>exp.time</i> 100 ms - note a ausência completa de fluorescência). C-D são controles observados sob filtro U-FUW de ampla faixa que capta emissão de compostos aromáticos ( <i>exp.time</i> 25 ms), sendo que C é o mesmo corte visto em A e D é o mesmo corte visto em B. ....	57
<b>Figura 26.</b> Cortes transversais de medula do híbrido H89, submetidas a tratamento imunohistoquímico e microscopia de fluorescência com filtro EYFP e <i>exposure time</i> de 100 ms (A), 200 ms (B) e 1 s (C). ....	58

<b>Figura 27.</b> Planilha de calculo dos valores de p com IC de 95% para os teores de MLG obtidos nas regiões dos entrenós do Híbrido H89.....	65
<b>Figura 28.</b> Planilha de calculo dos valores de p com IC de 95% para os teores de MLG obtidos nas regiões dos entrenós do Híbrido H140.....	66
<b>Figura 29.</b> Cromatogramas mostrando os tempos de retenção (min) para os padrões de celobiose (preto), celotriose (vermelho) e celotetraose (azul) .....	67
<b>Figura 30.</b> Espectro excitação/emissão do filtro U-FUW .....	68
<b>Figura 31.</b> Espectro excitação/emissão do filtro EFYP .....	68
<b>Figura 32.</b> Espectro excitação/emissão do sistema de ALEXA 514, evidenciando a região de excitação do filtro EFYP (~500 nm) .....	68



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Dimensões celulares de parênquima, vasos e fibras na região de entrenós maduros de cana-de-açúcar.....	22
<b>Tabela 2.</b> Teores de MLG reportados na literatura e obtidos no presente trabalho para o entrenó 11 dos híbridos H89 e H140 .....	48
<b>Tabela 3</b> – Teores de MLG detectados no entrenó 1 do híbrido H89 obtidos a partir de duas colheitas obtidas em anos subsequentes .....	49
<b>Tabela 4</b> – Composição química do tecido foliar jovem amostrados dos híbridos H89 e H140. Os dados se referem a composição da parede celular, ou seja, material livre de extrativos*.....	55



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>21</b>
2.1	GRAMÍNEAS: CLASSIFICAÇÃO E CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS .	21
2.1.1	Composição da parede celular primária e da parede celular secundária de gramíneas.....	26
2.2	GLUCANAS MISTAS .....	29
2.2.1	Biossíntese de MLG.....	32
2.3	ORIGEM DA RECALCITRÂNCIA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA (GRAMINEAS).....	33
2.3.1	Avaliações microscópicas e imunohistoquímicas de tecidos vegetais aplicadas ao estudo da recalcitrância de gramíneas.....	34
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>39</b>
4.1	MATERIAL VEGETAL.....	39
4.2	PREPARO DE AMOSTRAS DE ENTRENÓS.....	40
4.3	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE TECIDO FOLIAR .....	42
4.4	QUANTIFICAÇÃO DE GLUCANAS MISTAS .....	43
4.5	ESTATÍSTICA.....	45
4.6	PROPORÇÃO CELOTRIOSE E CELOTETRAOSE NA MLG .....	45
4.7	MAPEAMENTO DE MLG POR IMUNOHISTOQUÍMICA E MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA .....	46
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
5.1	DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A QUANTIFICAÇÃO DE GLUCANAS MISTAS NOS ENTRENÓS DE CANA DE AÇÚCAR.....	47
5.2	QUANTIFICAÇÃO DE MLG AO LONGO DO PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO DOS ENTRENÓS DE CANA DE AÇÚCAR.....	50
5.3	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E QUANTIFICAÇÃO DE MLG EM TECIDO FOLIAR JOVEM.....	54
5.4	DETECÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE MLG.....	56
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>59</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>

<b>APÊNDICE A – PLANILHA ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA A QUANTIFICAÇÃO DE MLG NO HÍBRIDO H89 .....</b>	<b>65</b>
<b>APÊNDICE B – PLANILHA ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA A QUANTIFICAÇÃO DE MLG NO HÍBRIDO H140 .....</b>	<b>66</b>
<b>APÊNDICE C – CROMATOGRAMAS DE PADRÕES CELOBIOSE, CELOTRIOSE E CELOTETRAOSE .....</b>	<b>67</b>
<b>ANEXO A – ESPECTROS DOS FILTROS DE EXCITAÇÃO LED E DO SISTEMA DE ALEXA COMO IMUNOMARCADOR .....</b>	<b>68</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As gramíneas são angiospermas monocotiledôneas, ordem *Poales* e família das *Poaceae* e compreendem um grupo de cultivares vegetais difundidas agro-industrialmente. Seus resíduos agrícolas são estudados como matéria prima no contexto de biorrefinarias, como os exemplos do milho (*Zea mays*), do trigo (*Triticum* spp.), do sorgo sacarino (*Sorghum bicolor*) e da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) (CHERUBINI; ULGIATI, 2009; ZENG et al., 2012; ERMAWAR et al., 2015; BRIENZO et al., 2016). Comumente, as biorrefinarias são entendidas como um conceito de atividade industrial que almeja utilizar os resíduos agroindustriais a partir da desfragmentação da biomassa lignocelulósica, gerando uma gama diversificada de produtos (JONG; JUNGMEIER, 2015; GUTIERREZ; SERNA; ALZATE, 2017).

A safra de cana-de-açúcar em 2019/2020 correspondeu a uma produção de 615,98 milhões de toneladas de biomassa (CONAB, 2019), que pode refletir numa produção de 80,1 milhões toneladas de bagaço em base seca (MASARIN et al., 2011). O bagaço de cana é um resíduo lignocelulósico que contém material fibroso mais rígido e denso, bem como uma medula mais macia, sendo um interessante material de partida de uma biorrefinaria (CHANDEL, et al. 2012; BRIENZO et al. 2016). A palha, também resíduo do setor sucroenergético, trata-se do tecido foliar seco que foi retirado no momento da colheita e que é parcialmente deixada na lavoura para a finalidade de proteção e nutrição do solo (AQUINO et al., 2017).

Os materiais lignocelulósicos são altamente resistentes aos processos propostos em um cenário de biorrefinaria e, para superar essa recalcitrância característica dessas matrizes, utiliza-se de pré-tratamentos para desfragmentar a rígida estrutura das paredes celulares formadas por lignina, celulose e hemiceluloses (FERRAZ et al., 2014). No caso específico de gramíneas, é reportada a forte influência da deposição de lignina e de diferentes hemiceluloses (GAX – glucuronoarabinoxilana e MLG – glucanas mistas) sobre a recalcitrância desses materiais (SCHELLER; ULVSKOV, 2010; COSTA et al., 2013; BRIENZO et al., 2016).

Os teores dos constituintes das paredes celulares das gramíneas varia de acordo com o estágio de desenvolvimento da planta, seja no sentido longitudinal (do topo à base) ou no sentido transversal (do centro do colmo às regiões periféricas). O desenvolvimento da planta ocasiona a diferenciação celular, o acúmulo de parede secundária nas células e o consequente aumento da recalcitrância do material

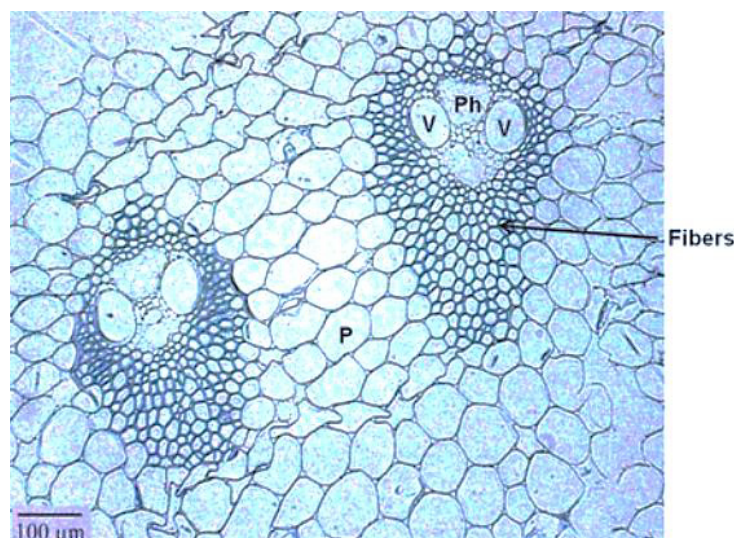
lignocelulósico gerado (VOGEL, 2008; GÍRIO et al., 2010). Os  $\beta$ -1-3: $\beta$ -1-4 glucanos, também denominados como glucanas mistas ou MLG (do inglês *mixed linkage glucans*), representam um dos polissacarídeos das paredes celulares em gramíneas e têm sido associados com a menor recalcitrância de alguns tipos de tecidos (VEGA-SÁNCHEZ et al., 2015; COSTA et al., 2016)

No caso da cana de açúcar, pouco se conhece sobre o acúmulo de MLG ao longo do processo de desenvolvimento e diferenciação celular da planta. Neste sentido, a presente dissertação aborda como essa macromolécula ocorre em diferentes tecidos da planta amostrados ao longo do processo de desenvolvimento dos entrenós. Para isso, um sistema analítico baseado na ação seletiva de enzimas hidrolíticas foi desenvolvido e aplicado no estudo de dois híbridos distintos de cana de açúcar. Técnicas de imunohistoquímica associadas à microscopia de fluorescência também foram empregadas para detectar as MLG nos diferentes tipos celulares.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

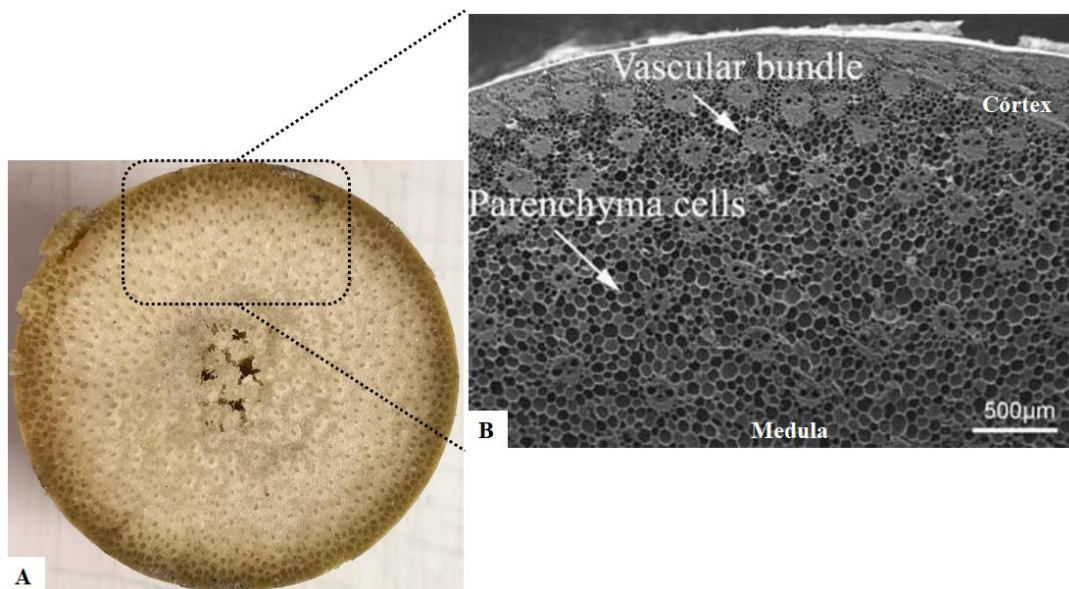
### 2.1 GRAMÍNEAS: CLASSIFICAÇÃO E CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS

As gramíneas são classificadas como angiospermas monocotiledôneas pertencentes à ordem *Poales* e à família das *Poaceae* (CARPITA, 1996). O colmo desses vegetais contém células de parênquima e feixes vasculares que são compostos por uma pequena região com células do floema, além de elementos de vaso e fibras (BUTTERFIELD; MEYLAN, 1980; MOORE, 1987). A Figura 1 ilustra a organização destes tipos celulares em um corte transversal da região de um colmo maduro de cana-de-açúcar.



**Figura 1.** Microscopia ótica de um corte transversal de um entrenó maduro de cana-de-açúcar, indicando os feixes vasculares (elementos de vaso-V, células do floema-Ph, fibras-Fibers) e células de parênquima. Adaptada de Ferraz et al. (2014)

Na região periférica de um entrenó (córtex) do colmo das gramíneas é possível observar ocorrência frequente de feixes vasculares, enquanto que na região mais central do entrenó (medula) predominam as células de parênquima com escasso aparecimento de feixes vasculares (Figura 2) (JUNG; CASLER, 2006; SIQUEIRA et al., 2011; ERMAWAR et al., 2015).



**Figura 2.** Seção transversal do entrenó de cana-de-açúcar, mostrando a ocorrência de feixes vasculares (*vascular bundle*) e células de parênquima (*parenchyma cells*) nas regiões de cortex e medula. A: colmo *in natura*; B: ampliação de um corte observado por microscopia eletrônica de varredura, adaptada de Sant'Anna et al. (2013)

Os diversos tipos de células observadas nos colmos das gramíneas também diferem entre si em função das dimensões que apresentam. Os vasos e fibras são células longas (cerca de 1 mm de comprimento), enquanto que as células de parênquima são células curtas (cerca de 0,3 mm de comprimento) (SANJUAN et al., 2001). Do ponto de vista de biomassa lignocelulósica disponível como matéria-prima para o processamento em biorrefinarias, a espessura das paredes celulares é fundamental, pois determina que tipo celular é mais abundante em termos mássicos no material processado. Neste sentido, os trabalhos de San Juan et al. (2001) e de Collucci et al. (2019) indicaram dimensões médias destes tipos celulares em cana-de-açúcar, tanto com relação ao diâmetro, visto em um corte transversal, como em relação à espessura das paredes. Os dados estão sumarizados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Dimensões celulares de parênquima, vasos e fibras na região de entrenós maduros de cana-de-açúcar

TIPO CELULAR	DIÂMETRO EXTERNO ( $\mu\text{m}$ )	ESPESSURA DA PAREDE ( $\mu\text{m}$ )
<i>Parênquima</i>	$60 \pm 5$	$1,7 \pm 0,2$
<i>Vaso</i>	$80 \pm 7$	$2,7 \pm 0,3$
<i>Fibra</i>	$20 \pm 4$	$4 \pm 1 (2,7 \pm 0,7^*)$

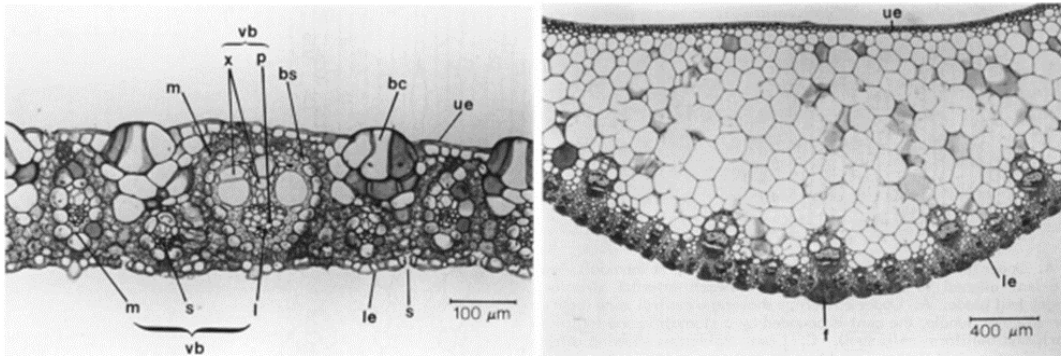
Fonte: adaptado de SANJUAN et al. (2001); \*COLLUCCI et al. (2019)

As células do parênquima, apesar de ocuparem de 30 a 70% do volume do entrenó, representam apenas 10-20% da massa seca dos entrenós desses vegetais



devido a pequena espessura de suas paredes celulares (FERRAZ et al., 2014). Desta forma, fica evidente que do ponto de vista de processamento da biomassa, as fibras, que possuem a maior espessura de parede celular, representam o tipo celular de maior relevância e responsáveis por até 90% da massa seca das biomassas lignificadas (FERRAZ et al., 2014). Ao longo do desenvolvimento da planta ocorre a diferenciação celular que contribui para alterações das características dimensionais e anatômicas observadas nos diferentes tipos celulares em cana-de-açúcar. Neste processo de diferenciação é possível enfatizar o aumento da espessura das paredes celulares das fibras decorrente da deposição de parede secundária (COLLUCCI et al., 2019).

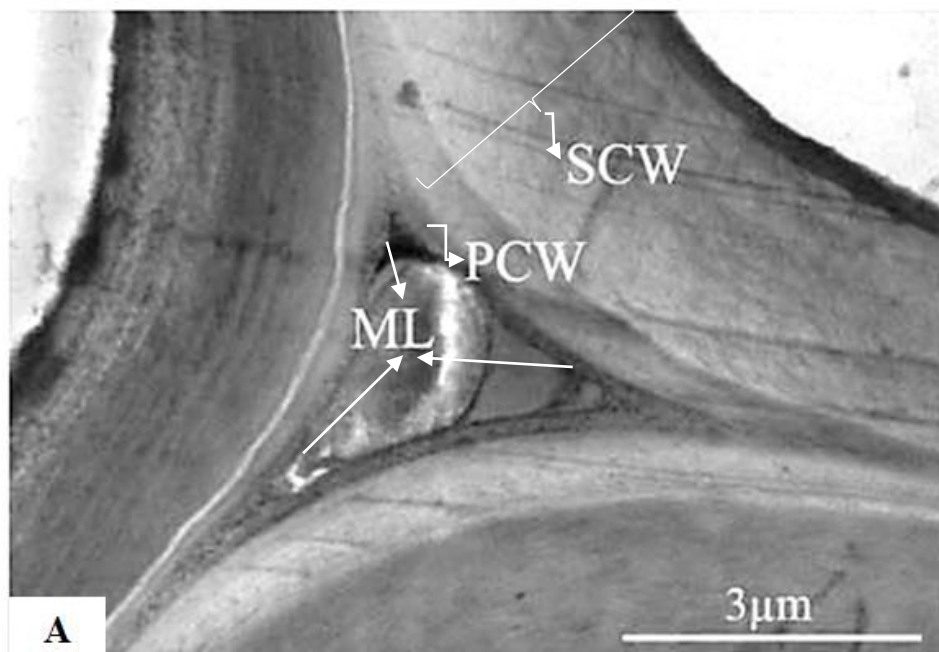
Outro tecido importante oriundo das gramíneas agroindustriais é a palha derivada do corte das folhas durante a colheita mecanizada. Nesse sistema de colheita, as folhas secas, os ponteiros e as folhas verdes são retiradas e dispostas no solo, formando uma cama de palha que protege e nutre o solo (AQUINO et al., 2017). Na cana-de-açúcar, as folhas estão dispostas em duas fileiras verticais (dísticas) alternadas ao longo do colmo, são sésseis e, quando completamente desenvolvidas, abrangem uma lâmina achatada, uma bainha cilíndrica basal e a lígula (apêndice membranoso) (MOORE,1987). Podemos encontrar tipos específicos de células e estruturas neste tecido, como as células buliformes, os estômatos e os tricomas, atribuindo-lhes as funções fotossintética, respiratória e regulatória características (MCCORMICK, CRAMER, WATT, 2006; FERREIRA et al., 2007). Os feixes vasculares das folhas, localizados na borda inferior da lamina foliar, são de três tamanhos e estão dispostos num padrão definido onde um feixe vascular pequeno está entre feixes médios e grandes, todos rodeados de células de mesófilo (MOORE,1987). Essa anatomia é chamada de anatomia de Krantz e é específica para vegetais com metabolismo C4, como a cana-de-açúcar (Figura 3). O feixe vascular, assim como nos tecidos entrenodais, é constituído de xilema, floema e fibras, enquanto que o tecido parenquimático é abundante e localizado entre a camada de epiderme superior e a camada de epiderme inferior (MOORE,1987).



**Figura 3.** Seções transversais da lâmina foliar, exibindo as seguintes estruturas e tipos celulares: bc - células buliformes; l - grande; m - médio; s - pequeno; vb - feixe vascular; x - xilema; p - floem; le - epiderme inferior; ue - epiderme superior; s - estômatos; c - colênquima; f - fibras. Adaptada de Moore, (1987)

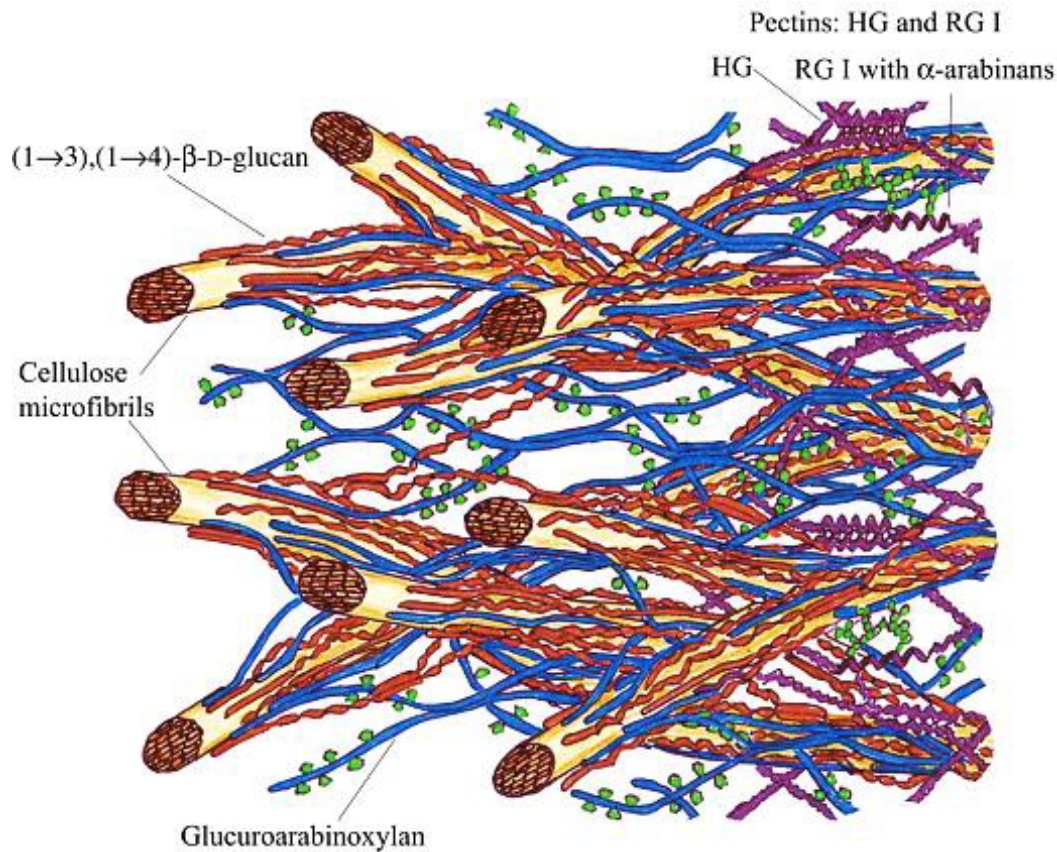
Em um nível de magnificação maior, é possível diferenciar as paredes celulares, de uma forma geral, em paredes primárias e secundárias. As paredes primárias são formadas durante a fase de crescimento celular e apresentam uma estrutura suficientemente rígida para dar o formato alongado típico de fibras e vasos (O'NEIL, YORK, 2003). Ao término do processo de alongamento da célula vegetal tem início a deposição de paredes secundárias que pode ocorrer predominantemente nas fibras e nos vasos e menos frequentemente no parênquima (LINGLE, THOMSON, 2012; COLLUCCI et al., 2019).

As paredes primárias são pouco espessas e comumente estão associadas com a lamela média, medindo juntas aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$  de espessura (SANT'ANNA et al., 2013). Por outro lado, as paredes secundárias podem atingir até 2-4  $\mu\text{m}$  de espessura nas células de cana-de-açúcar (SANJUAN et al., 2001; SANT'ANNA et al., 2013). A Figura 4 ilustra a espessura considerável da parede celular secundária (SCW) frente a espessura da lamela média (LM) e da parede celular primária (PCW).



**Figura 4.** Magnificação de junção entre três células no entrenó de cana-de-açúcar, mostrando as diferentes espessuras das camadas de lamela média (ML), de parede celular primária (PCW) e de parede celular secundária (SCW) observadas por microscopia eletrônica de transmissão. Adaptada de Sant'Anna et al. (2013)

A organização estrutural das paredes primárias das células vegetais pode ser do tipo I, encontradas nas espermatófitas genericamente, ou do tipo II, atribuídas a ordem das *Poales*, que apresentam duas diferenças principais entre si: i) presença de xiloglucana (XyG) como hemicelulose de interação com a celulose para o tipo I, frente ao aparecimento majoritário de glucuronoarabinoxilana (GAX) nas estruturas de parede celular do tipo II; e ii) ocorrência de glucanas mistas exclusiva das células com paredes do tipo II (CARPITA, 1996; BUCKERIDGE et al., 2004). Dessa forma, atribui-se às gramíneas paredes primárias do tipo II (Figura 5) estruturadas com as fibras de celulose encapadas pelas glucuronoarabinoxilanas, onde observa-se teores elevados de hidroxicinamatos, pequenas quantidades de pectina (homogalacturana-HG e ramnogalacturana substituída-RG I) e proteínas estruturais, além de teores variáveis de glucanas mistas (CARPITA, 1996; VOGEL, 2008).



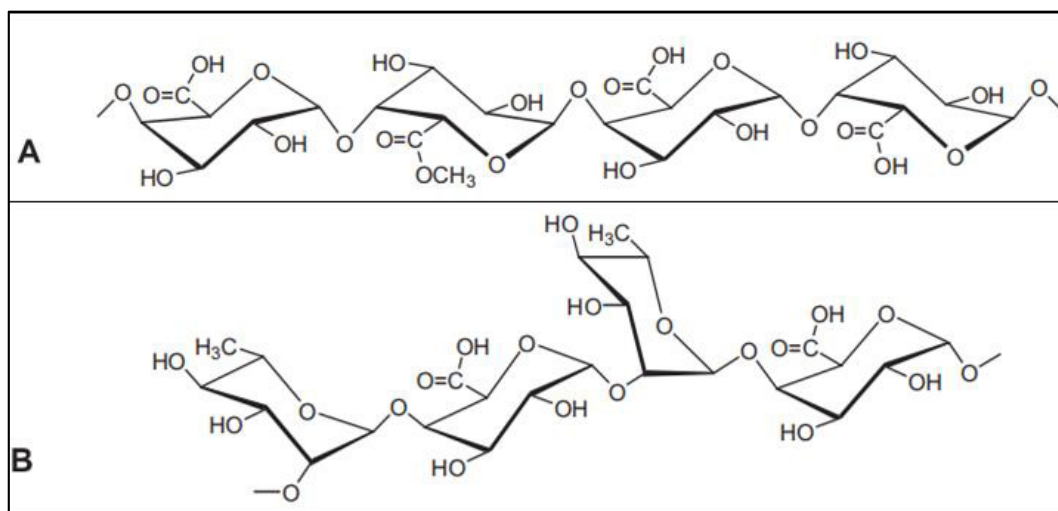
**Figura 5.** Estrutura e organização da parede celular primária vegetal do tipo II atribuídas às gramíneas. Presença de celulose, glucanas mistas e pectinas (homogalacturana-HG e ramnogalacturana substituída-RG I). Adaptada de Buckeridge et al. (2004)

### 2.1.1 Composição da parede celular primária e da parede celular secundária de gramíneas

Além de diferenças de espessura, as paredes celulares primárias e secundárias também apresentam diferenças de composição. No caso específico das gramíneas, a parede primária praticamente não contém lignina, enquanto que a celulose é responsável por 20-30% da massa seca dessa camada estrutural, juntamente com teores de 20-40% de xilanas, 1-5% de xiloglucanas, 10-30% de glucanas mistas e presença de pectina (VOGEL, 2008; O'NEIL, YORK, 2003). A pectina pode representar entre 2 e 10% da massa seca destas paredes primárias e a presença desse material confere resistência mecânica e influencia na adesão das células de tecidos jovens (VOGEL, 2008; TELEMAN, 2009).

As pectinas são polissacarídeos formados por cadeias principais de resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1-4, como as homogalacturana (HG), que confere organização helicoidal da macromolécula, ou ramnogalacturanas

substituídas (RG I), que apresentam na cadeia principal unidades de L-ramnopiranosil e ácido D-galacturônico alternadas (TELEMAN, 2009). A Figura 6 demonstra as estruturas genéricas de HG e RG I.



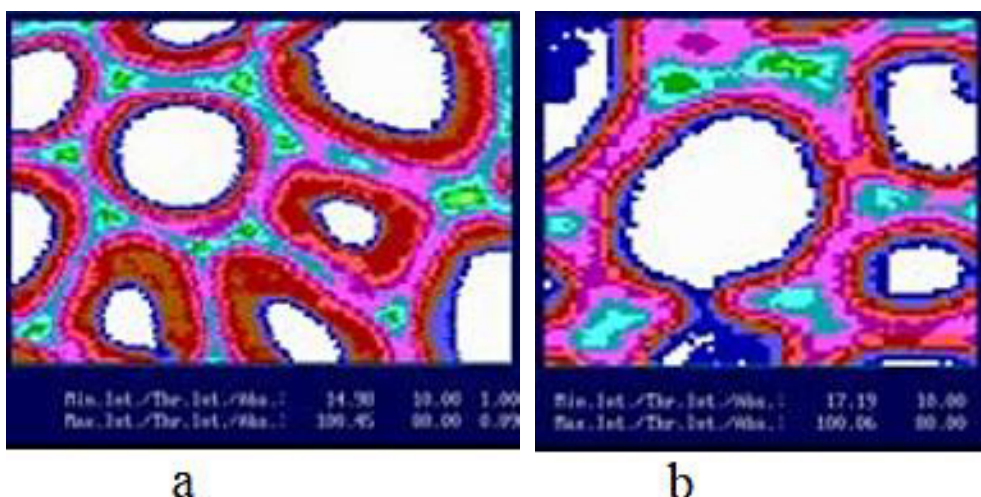
**Figura 6.** Estrutura química das pectinas homogalacturana-HG (A) e ramnogalacturanas-RG I (B) encontradas nas paredes primárias dos vegetais. Adaptada de Teleman (2009)

As glucanas mistas estão presentes como hemicelulose da parede celular primária e são formadas por unidades de celotetrasil e celotriosil que estabelecem ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1-3, conferindo uma estrutura não linear a esta molécula (detalhamento maior sobre as glucanas mistas no item 2.2) (CARPITA, 1996; VOGEL, 2008; SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

A parede celular secundária contrasta com as paredes primárias não somente por ser significativamente mais espessas, mas também quanto a composição que é alterada ao longo dos processos de diferenciação e maturação dos tecidos da planta. Os teores de lignina são descritos entre 7 e 20%, enquanto que a celulose alcança teores de 35-45% e a hemicelulose, representadas majoritariamente pelas glucuronarabinosilanas (GAX), tem teores de 15-30% (ISHII, 1997; VOGEL, 2008; GÍRIO et al., 2010).

A lignina é uma macromolécula aromática formada de unidades fenilpropanóides *p*-hidroxifenil (H), guaicil (G) e siringil (S) que derivam dos álcoois hidroxicinâmicos *p*-coumarílico, coniferílico e sinapílico, respectivamente (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003). Nas gramíneas, é observada uma lignina constituída das três unidades fenilpropanóides G, H e S, além da presença de ácidos hidroxicinâmicos, como o ácido ferúlico e o ácido *p*-cumárico (JUNG; CASLER, 2006; FERRAZ et al., 2014).

As proporções reportadas para as unidades H:G:S no bagaço de cana são de 2:38:60, com acilação extensiva e preferencial do carbono- $\gamma$  das unidades S com *p*-cumaratos e acilação menos frequente do carbono- $\gamma$  das unidades G com acetatos (DELRÍO et al., 2015). A lignina é o componente que aparece na parede celular secundária como componente de reforço, juntamente com GAX, entre as fibrilas de celulose, além de presença observada na lamela média, em regiões medulares ou de córtex, conforme indicado na Figura 7 apresentada no estudo de Siqueira et al. (2011). O trabalho informa que os teores de lignina variam de 12% na medula rica em tecido parenquimático para 19% no córtex abundante em feixes vasculares e fibras.



**Figura 7.** Micrografias de ultravioleta (278 nm) de entrenós maduros de cana de açúcar mostrando acúmulo de lignina na parede primária das células e na lamela média de fibras de córtex (a) e medula (b). As cores rosa, azul claro, tons de verde, amarelo e preto indicam alta absorção em 278 nm e elevado teor de lignina. Vermelho, azul escuro e marrom indicam menores absorções em 278 nm e menores teores de lignina. Adaptada de Siqueira et al. (2011)

O grupo das hemiceluloses, com ocorrência majoritária nas paredes celulares secundárias, abrange macromoléculas bastante heterogêneas e formadas a partir de diversos monossacarídeos como as hexoses (D-glicose, D-galactose, D-manose) e pentoses (D-xilose, L-arabinose), e seus derivados (ácido D-glucurônico, ácido 4-O-metil-D-glucurônico e ácido D-galacturônico), além da presença de moléculas pendentes como L-ramnose, L-fucose e grupos acetila (GÍRIO et al., 2010; FERRAZ et al., 2014).

As glucuronoarabinoxilanas ou GAX são as hemiceluloses mais abundantes nas gramíneas, correspondendo a 15-30% do peso de biomassa seca (GÍRIO et al., 2010). A estrutura da GAX compreende uma cadeia principal de resíduos de D-xilopirranose unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -1-4, com os seguintes substituintes: unidades de  $\alpha$ -

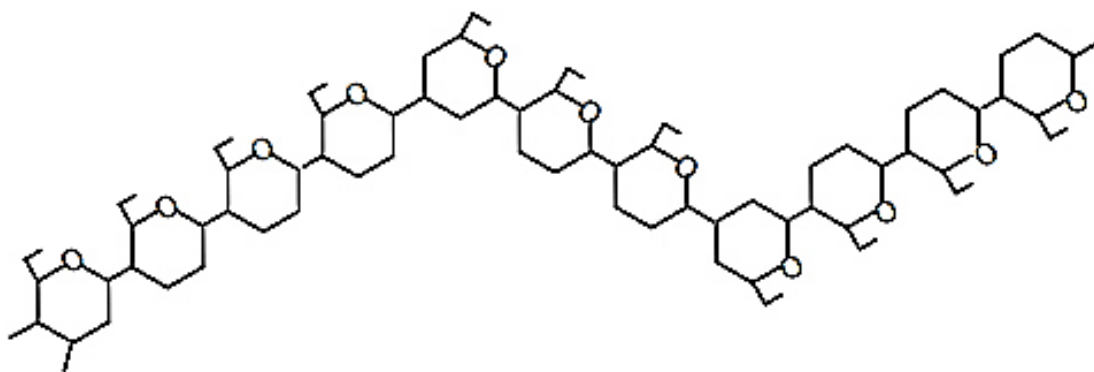
arabinofuranosil ligadas nas posições O-3, moléculas de ácido 4-O-metilglucurônico como grupos substituintes nas posições O-2, grupos acetil ocupando as posições O-2 ou O-3 e ácidos hidroxicinâmicos, principalmente ácido ferúlico, na posição O-5 de uma arabinose (CARPITA, 1996; TELEMAN, 2009; SCHELLER, ULVSKOV, 2010; MASARIN et al., 2011). A presença do ácido ferúlico, permite a formação de ligações cruzadas com moléculas de lignina ou de outra GAX adjacente.

A celulose é o polissacarídeo predominante na parede celular secundária (38-45%) e corresponde a um homopolímero formado de unidades de celobiose integradas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1-4, formando cadeias lineares que estabelecem entre si pontes de hidrogênio entre os resíduos de hidroxila dos C6-C2 e C5-C3 (HENRIKSSON; LENNHOLM, 2009). Nas plantas superiores, o modelo descrito para a celulose é de 36 cadeias de celulose conformadas numa estrutura hexagonal sintetizadas por rosetas, formando longas fibrilas elementares de celulose cristalina com poucas regiões amorfas (DELMER; AMOR, 1995; CARPITA, 1996).

A anatomia complexa das gramíneas associada com as fortes interações físico-químicas estabelecidas entre os componentes que formam as paredes celulares são responsáveis pela resistência da parede celular lignificada ao ataque por micro-organismos e ao processamento químico e enzimático destes componentes. A esta resistência à desconstrução química e/ou biológica se atribui o termo recalcitrância (SEIDL; GOULART, 2016). Do ponto de vista das biorrefinarias, é necessário desenvolver formas de diminuir esta recalcitrância, quer através de alterações na própria planta ou através da desconstrução por processos físico-químicos denominados como pré-tratamento.

## 2.2 GLUCANAS MISTAS

As glucanas mistas são um tipo de hemicelulose presentes exclusivamente nos vegetais classificados como gramíneas (CARPITA, 1996; BUCKERIDGE et al., 2004). Essas glucanas mistas (Figura 8) são constituídas de unidades de celotriosil e celotetrasil (3 e 4 resíduos de glicose ligados através de ligações glicosídicas  $\beta$ -1-4, respectivamente) unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1-3, numa taxa de aproximadamente 2:1 ou 3:1 (CARPITA, 1996; VOGEL, 2008; SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

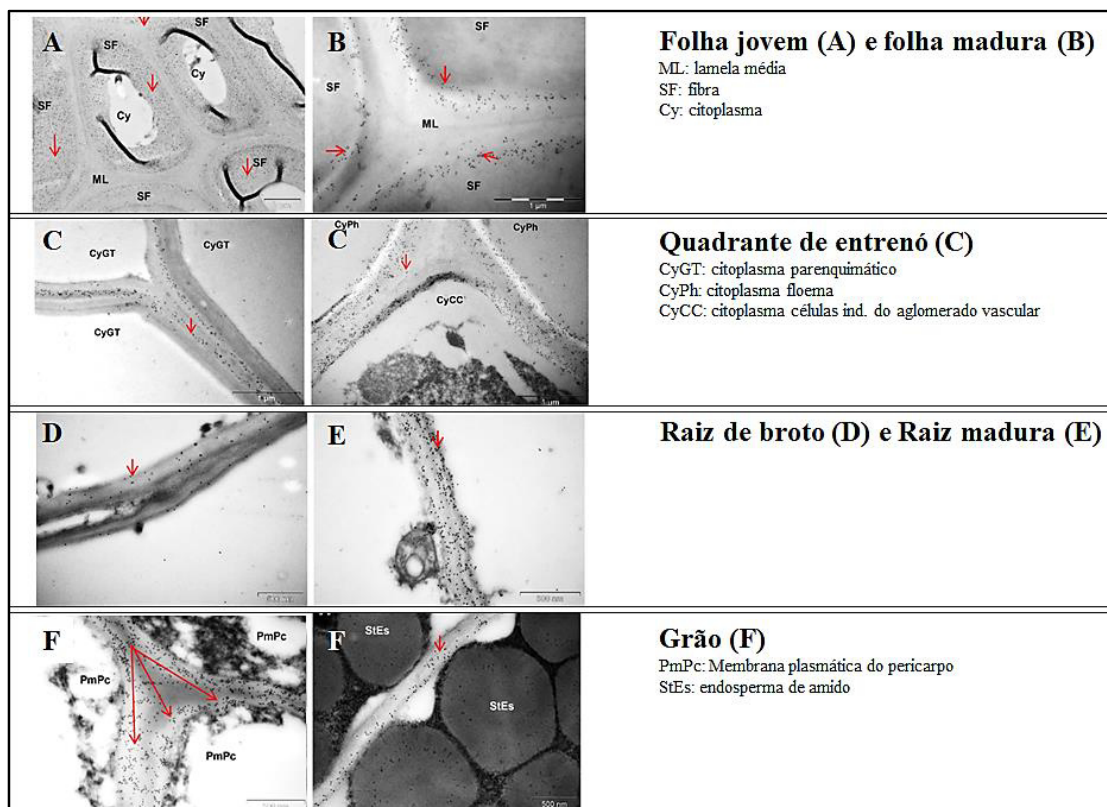


**Figura 8.** Estrutura genérica de uma  $\beta$ -1,3-1,4-glucana. Adaptada de Scheller; Ulvskov (2010)

Diversos trabalhos identificaram e quantificaram essa macromolécula em diferentes fontes vegetais, e atribuíram diversas funções a presença desse componente. Os estudos sobre MLG concentra-se em células do endosperma de gramíneas, agindo como um polissacarídeo de reserva, embora também reportada como um importante componente constituinte de outros tecidos vegetativos dessas plantas (BUCKERIDGE et al., 2004; VOGEL, 2008). Vega-Sánchez et al. (2013) elencaram diversos papéis que as MLG podem exercer em diferentes tecidos de diferentes plantas como, por exemplo, regulando o crescimento celular, onde as MLG são renovadas nas paredes celulares de organismos jovens e seus coleótilos, interrompendo esse desenvolvimento, ou como um tipo de polissacarídeo de reserva do endosperma de gramíneas, enquanto que em caules e folhas as glucanas mistas aparecem em uma resposta a maturação do tecido exercendo um reforço à parede celular.

A presença das MLG nos tecidos da maioria das gramíneas é um conhecimento estabelecido, embora pouco se entenda sobre sua função celular e distribuição nos diferentes tecidos. O estudo de Ermawar et al. (2015) com variedades de *Sorghum bicolor* foi capaz de mapear as glucanas mistas em diferentes tecidos e com concentrações diferentes através do emprego de microscopia eletrônica de transmissão utilizando imunomarcador de ouro ligado à MLG (Figura 9).



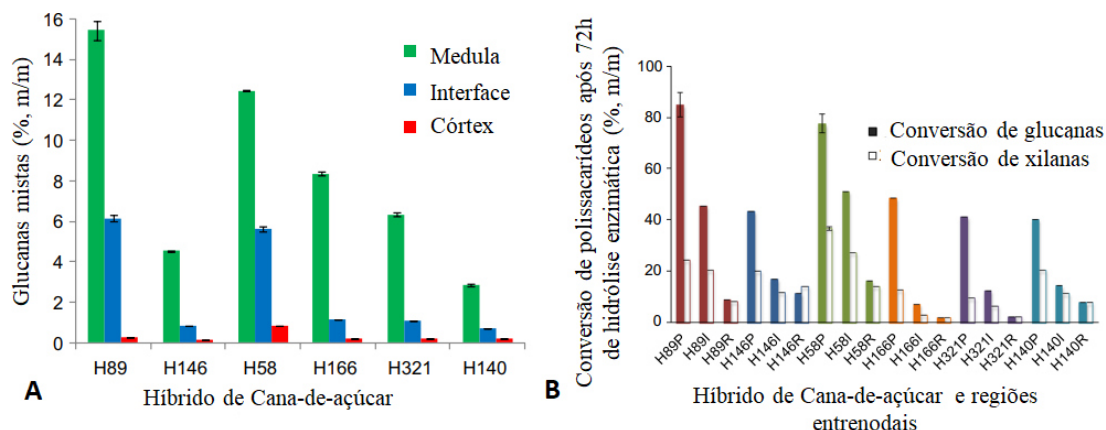


**Figura 9.** Imunolocalização de MLG em *Sorghum bicolor* por microscopia de transmissão eletrônica (TEM) demonstrando a heterogeneidade de deposição de glucanas mistas em diferentes estruturas celulares. ML-Lamela média; SF-Fibra; Cy-Citoplasma; CyGT-Citoplasma parenquimático; CyPh-Citoplasma floema; CyCC-Citoplasma de células não-diferenciadas do aglomerado vascular; PmPc-Membrana plasmática do pericarpo do grão; StEs-Endosperma das reservas de amido; Seta-imunolocalização de MLG. Adaptada de Ermawar et al. (2015)

Os autores ressaltam que, no caso dos entrenós de *Sorghum bicolor*, as quantidades de glucanas mistas diminuem no sentido em que o desenvolvimento e a diferenciação dos tecidos avançam e que tecidos mais recalcitrantes, como o córtex que apresenta teor de 0,73% de MLG em peso seco, tem menos MLG que os tecidos mais digeríveis, exemplificada pela medula do mesmo entrenó com 1,71% de teor de MLG observado. Adicionalmente, o trabalho de Kim et al. (2018) identificou a presença de MLG em coleótilos de *Brachypodium distachyon* e cevada, através de imunohistoquímica associada a microscopia eletrônica de varredura.

O estudo de Costa et al. (2016) inovou ao reportar a presença de glucanas mistas em cana-de-açúcar, e correlacionar sua ocorrência com a baixa recalcitrância de algumas regiões do colmo (Figura 10). Através deste trabalho atribuiu-se uma influência positiva da presença das glucanas mistas sobre a redução da recalcitrância de entrenós maduros de cana-de-açúcar, identificando que há prevalência desse material nas regiões medulares dos colmos. A digestão enzimática direta da região de medula de colmos maduros de vários híbridos diferentes de cana-de-açúcar mostrou

que a medula alcançava conversões de glucanas entre 40-85%, enquanto que as regiões de córtex, onde MLG é menos abundante, apresentaram apenas 2-9% de conversão de polissacarídeos nas mesmas condições de hidrólise enzimática.



**Figura 10.** Teores de MLG (A) e digestibilidade direta com celulasas comerciais (B) de regiões de medula, interface medula-córTEX e córtEX de seis híbridos diferentes de cana de açúcar. Adaptada de Costa et al. (2016)

### 2.2.1 Biossíntese de MLG

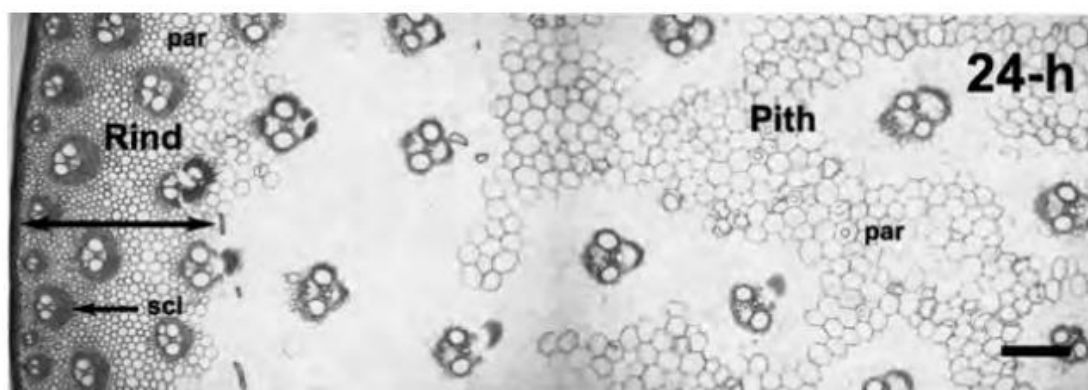
A ocorrência e a função da MLG também foi estudada em transformantes de *Arabidopsis* que superexpressaram o gene responsável pela síntese de MLG (gene *CslF6*) (VEGA-SÁNCHEZ et al., 2015). A detecção da MLG com imunomarcadores revelaram que o acúmulo das glucanas mistas ocorre de forma diferenciada em distintas estruturas celulares e em diversas etapas de maturação dos tecidos.

A síntese de MLG se dá no complexo de Golgi, depois ocorre o transporte via apoplastos até a parede celular primária, onde a molécula é depositada e estabelece ligações de hidrogênio com as microfibrilas de celulose (CHRISTENSEN et al., 2010; KIM et al., 2018). Genes de biossíntese de MLG são reportados na literatura como pertencentes a superfamília das *cellulose synthase-like* (CSL). Dentro dessa superfamília, os candidatos mais promissores são os genes da família CSLF e CSLH (BURTON et al., 2006; DOBLIN et al., 2009; SCHELLER; ULVSKOV, 2010), com destaque aos genes *CslF6 synthase*, isolados de trigo (*Hordeum vulgare*) e empregados em estudo de engenharia genética de *Arabidopsis thaliana* no intuito de aumentar teores de MLG e reduzir a recalcitrância da biomassa (VEGA-SÁNCHEZ et al., 2015). No entanto, ainda há questões a serem elucidadas no âmbito molecular da biossíntese de glucanas mistas em relação aos mecanismos de inserção de resíduos de D-

glicopiranosil por ligações glicosídicas  $\beta(1,4)$  ou  $\beta(1,3)$  de maneira irregular mas não aleatória (BURTON; FINCHER, 2009).

### 2.3 ORIGEM DA RECALCITRÂNCIA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA (GRAMINEAS)

A recalcitrância da matriz lignocelulósica é uma característica que, entre outros fatores, está associada ao processo de maturação de diferentes tecidos. Jung e Casler (2006), por exemplo, estudaram a digestibilidade de entrenós maduros de milho com a microbiota de rúmen e determinaram que os aglomerados vasculares são mais recalcitrantes ao tratamento biológico empregado do que as células do parênquima (Figura 11). Os autores atribuíram três características que interferem na degradabilidade microbológica direta dos entrenós de milho: i) a presença de teores elevados de lignina é desfavorável, ii) a redução da frequência de ligações cruzadas entre lignina e arabinosilana mediada por ferulato é benéfica e iii) estruturas celulares maduras são menos suscetíveis ao tratamento com a microbiota de rúmen.



**Figura 11.** Seção transversal do entrenó de *Zea mays* (milho) após 24h de pré-tratamento biológico (microbiota de rúmen), mostrando a ocorrência de aglomerados vasculares (scl) pouco digeridos e de tecido parenquimático (par) mais degradado. Adaptada de Jung; Casler (2006)

A mesma observação sobre a recalcitrância diferenciada entre as células de entrenós maduros de diferentes híbridos de cana-de-açúcar foi reportada por Siqueira et al. (2011), através da avaliação dos teores de lignina e ácidos hidroxicinâmicos empregando microespectrofotometria em 278 nm atribuída à absorvância da lignina e em 315 nm atribuída à absorvância dos ácidos hidroxicinâmicos. Os autores concluíram que os feixes vasculares são mais recalcitrantes que as células de parênquima, e que a recalcitrância aumenta da medula para o córtex dos colmos de

cana. A recalcitrância das fibras e dos vasos foi associada à presença de lignina, enquanto que nas células de parênquima atribui-se a recalcitrância observada à presença de teores de ácidos hidroxicinâmicos.

Costa et al. (2016) estudaram o efeito das hemiceluloses características de gramíneas (GAX e MLG) sobre a recalcitrância de seis híbridos de cana-de-açúcar, observando que a existência de GAX com elevado grau de substituição e MLG estão associadas com a baixa recalcitrância de alguns tecidos de cana de açúcar.

Os trabalhos anteriores exemplificaram como a recalcitrância de gramíneas é afetada pela presença de diferentes moléculas constituintes das células que formam as biomassas, no entanto não foi encontrado estudos capazes de relacionar o avanço da maturação com o dinâmica de alterações anatômicas e composicionais e como essas modificações afetam a recalcitrância dos vegetais.

No contexto de uma biorrefinaria estuda-se a aplicação de diversos pré-tratamentos com a finalidade de superar essa propriedade impeditiva ao uso dos constituintes da biomassa lignocelulósica (FERRAZ et al. 2014). Os pré-tratamentos podem ser de diferentes naturezas e aplicados de acordo com o objetivo das etapas posteriores de processamento na cadeia de refino da biomassa, destacando-se os pré-tratamentos físicos (moagem, redução do tamanho de partícula), físico-químicos (*stem-explosion*, *ammonia fiber explosion*-AFEX, hidrotérmico), químicos (ácidos, bases, solventes orgânicos, líquidos iônicos, sais inorgânicos), biológicos (biopolpação) e combinação de diferentes processos (SEIDL; GOULART, 2016).

### **2.3.1 Avaliações microscópicas e imunohistoquímicas de tecidos vegetais aplicadas ao estudo da recalcitrância de gramíneas**

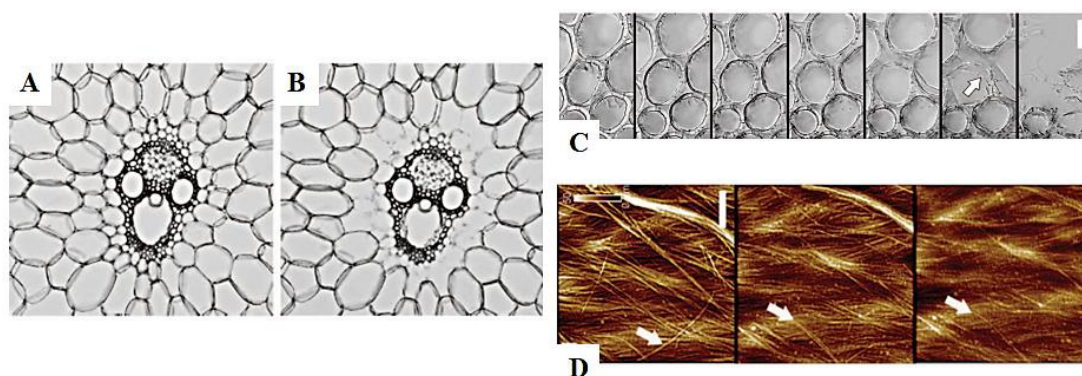
A avaliação da distribuição de componentes estruturais *in situ* das células vegetais tem sido útil para avaliar a relação entre a recalcitrância do material lignocelulósico com as características específicas dos tecidos em diferentes tipos de biomassa.

A detecção de componentes nas camadas da parede celular das plantas tem sido feita empregando diferentes técnicas de microscopia (FERRAZ et al., 2014). A lignina e os compostos aromáticos, por exemplo, podem ser diretamente visualizados nas paredes celulares, pois absorvem na região do ultravioleta, diferindo dos polissacarídeos que demandam o emprego de marcadores específicos. Neste sentido,

os trabalhos desenvolvidos por Fergus et al. (1969), Koch e Kleist (2001) e Siqueira et al. (2011) são alguns exemplos da literatura do emprego de microscopia no ultravioleta para traçar o perfil de distribuição topoquímica de lignina e outros compostos aromáticos através das características óticas desses compostos.

A associação de diferentes técnicas de microscopia permitiram ao grupo de Sant'Anna et al. (2013) entender a deposição de lignina e de celulose cristalina nas diferentes camadas da parede celular secundária (S1, S2 e S3), na parede celular primária e na região de lamela média, confirmando que a lignina é concentrada na lamela média e na parede celular secundária.

O trabalho de Ding et al. (2012) aplicou um conjunto de quatro técnicas microscópicas (microscopia de campo claro, microscopia de laser confocal, microscopia duas-cores SRS e microscopia de força atômica) que permitiram avaliar os mecanismos de digestibilidade enzimática (celulossomas bacterianos e celulases fúngicas) sobre a biomassa lignocelulósica nos níveis teciduais, celulares e moleculares, conforme apresentado na Figura 12. A recalcitrância dos feixes vasculares é bastante evidente ao comparar as Figuras 12A e 12B, onde observa-se desconstrução preferencial das células de parênquima após o tratamento biológico.

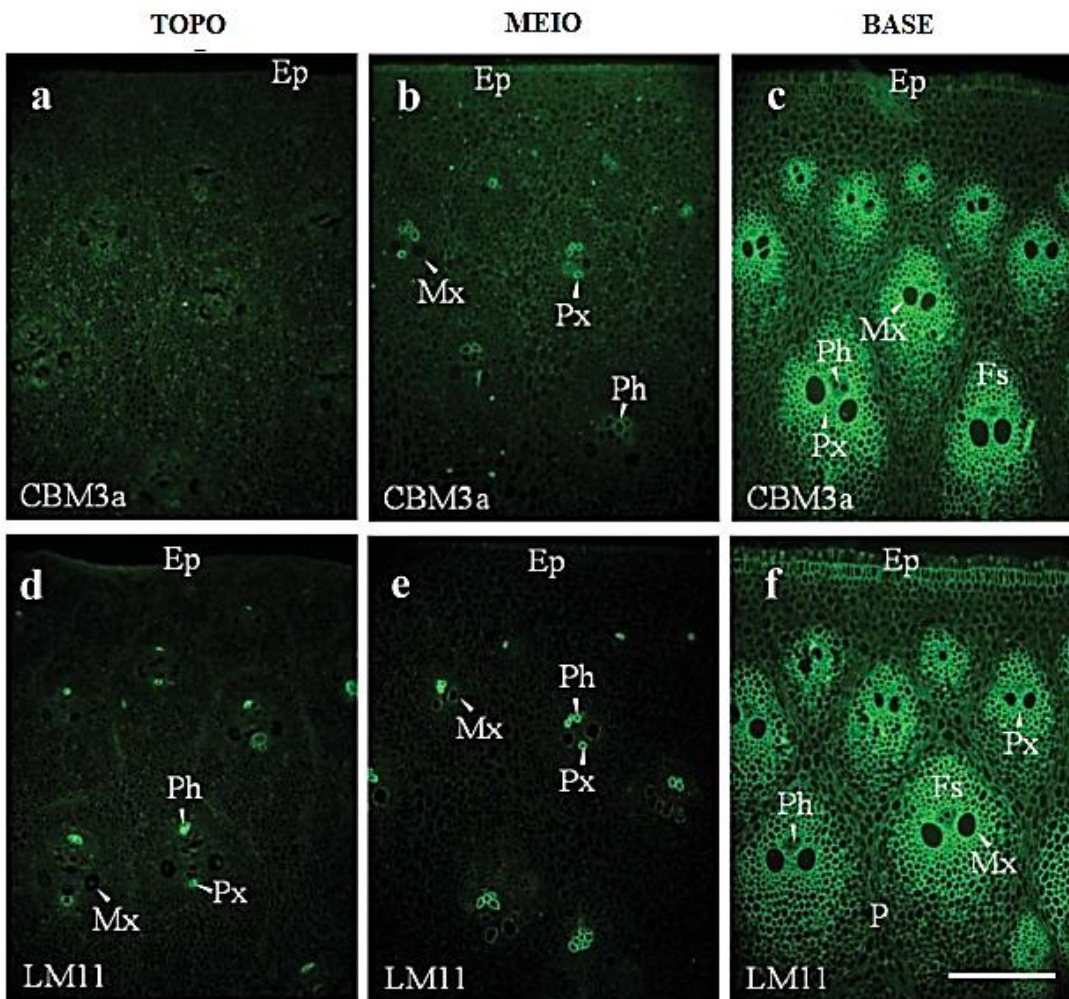


**Figura 12.** Digestibilidade de *Zea mays* sob ação de celulases nos níveis teciduais (microscopia ótica A-não tratada e B-tratada microscopia ótica após 15h de digestão com celulosomas bacterianos a 55 °C), celulares (C - microscopia ótica após 7 dias de tratamento com celulosomas bacterianos indicando com seta a fragmentação da parede celular) e moleculares (D – ATM demonstrando com setas o efeito de *peeling* individual das microfibrilas de celulose cristalina sob ação dos celulosomas bacterianos). Adaptada de Ding et al. (2012)

A estratégia de empregar anticorpos contendo marcadores de ouro ou de imunomarcadores fluoróforos, quando combinados com técnicas de microscopias de fluorescência ou de varredura/transmissão eletrônica, permite localizar com

especificidade os componentes estruturais, como os polissacarídeos, na própria parede celular de diferentes estruturas celulares dos vegetais.

Chang et al. (2013) combinaram a caracterização química com técnicas de coloração de lignina e imunolocalização de hemiceluloses para traçar o perfil de teores desses componentes com o desenvolvimento de brotos de bambu, e concluíram que há um maior acúmulo de celulose cristalina (CBM3a) e xilana (LM11) em estágios de maior maturação dos tecidos (Base) (Figura 13).

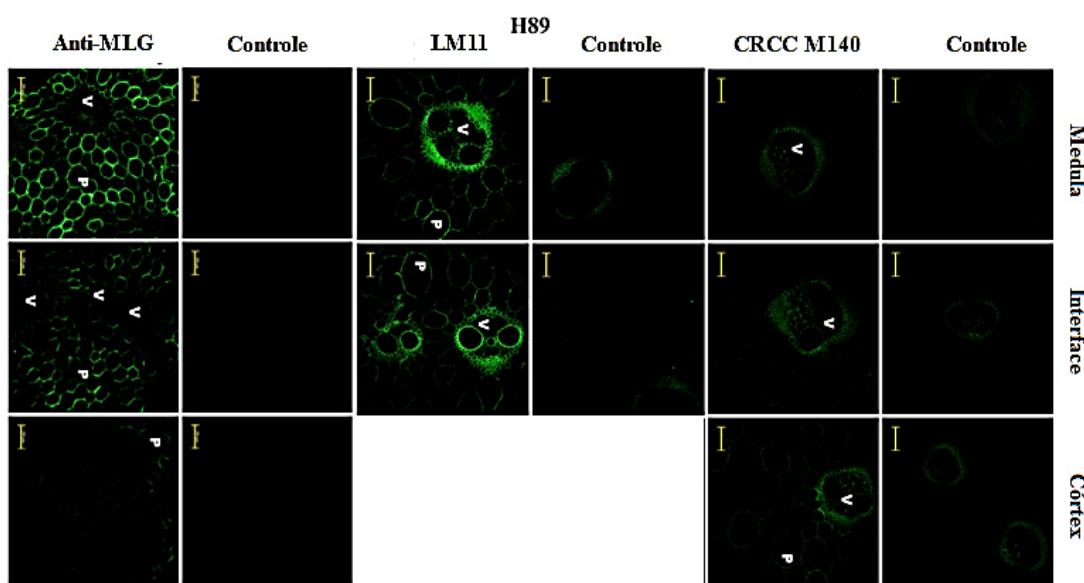


**Figura 13.** Micrografias de imunofluorescência de celulose cristalina (CBM3a - a, b, c) e xilana (LM11 - d, e, f) em cortes transversais de brotos de bambu (TOPO-jovem; MEIO-fase intermediária de desenvolvimento; BASE-maduro). Px e Mx- xilema; Fs- fibras; Ep- epiderme; P- parênquima. Adaptada de Chang et al. (2013)

Meikle et al. (1994) obtiveram um anticorpo monoclonal com parâmetros de especificidade e sensibilidade capazes de quantificar MLG no endosperma de trigo, abrindo caminho para a imunolocalização dessas moléculas. Recentemente, as glucanas mistas foram imunolocalizadas *in situ*, identificadas e quantificadas através

de adaptações do emprego desse anticorpo anti-MLG, em estudos com materiais vegetais distintos, como em folhas de arroz, tecidos de sorgo e transformantes de *Arabidopsis* para acúmulo de MLG (VEGA-SÁNCHEZ et al. 2013; ERMAWAR et al., 2015; VEJA-SÁNCHEZ et al., 2015). Os trabalhos nessa área correlacionam a concentração de MLG com a localização dessa macromolécula nos tecidos vegetais estudados.

A pesquisa desenvolvida por Costa et al. (2016), além de reportar os teores de MLG e GAX, realizou a imunolocalização dessas hemiceluloses em cortes histológicos dos híbridos de cana-de-açúcar, mostrando variações entre as concentrações de hemiceluloses encontradas nas regiões de medula, interface e córtex, conforme exemplificado na Figura 14 para o entrenó 11 do Híbrido H89 de cana-de-açúcar.



**Figura 14.** Imunohistoquímica de entrenó maduro do híbrido H89 mostrando presença de glucanas mistas (anti-MLG), arabinosilana-GAX (LM11) e xilana (CRCC M140). P-parênquima; V-aglomerado vascular. Adaptada de Costa et al. (2016)

### 3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é avaliar o acúmulo e a eventual degradação de glucanas mistas (MLG) em diferentes tecidos de cana-de-açúcar ao longo do processo de desenvolvimento dos híbridos de cana-de-açúcar, empregando metodologias de quantificação enzimática e imunohistoquímica.

Para atingir este objetivo foram executadas as seguintes etapas:

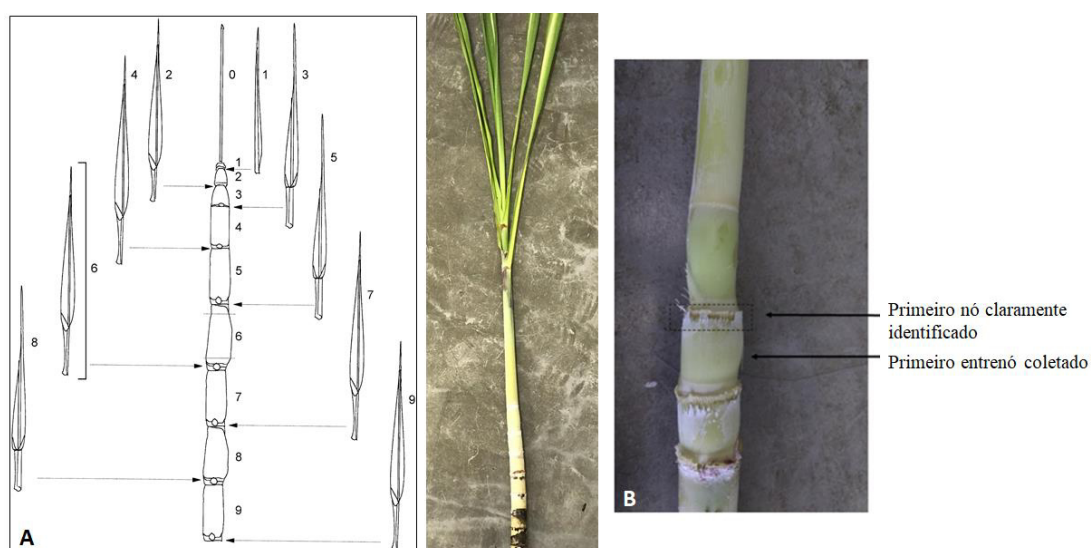
- a) Preparação de amostras representativas da região de córtex, interface e medula de entrenós de cana-de-açúcar que representam estágios progressivos de desenvolvimento da planta;
- b) Preparação de amostras representativas do tecido foliar jovem de cana-de-açúcar;
- c) Implementação de metodologia apropriada para a quantificação de glucanas mistas nas amostras dos entrenós de cana-de-açúcar;
- d) Estabelecimento de metodologia apropriada de imunohistoquímica de glucanas mistas para identificar a ocorrência tecido-específica do polissacarídeo;



## 4 METODOLOGIA

### 4.1 MATERIAL VEGETAL

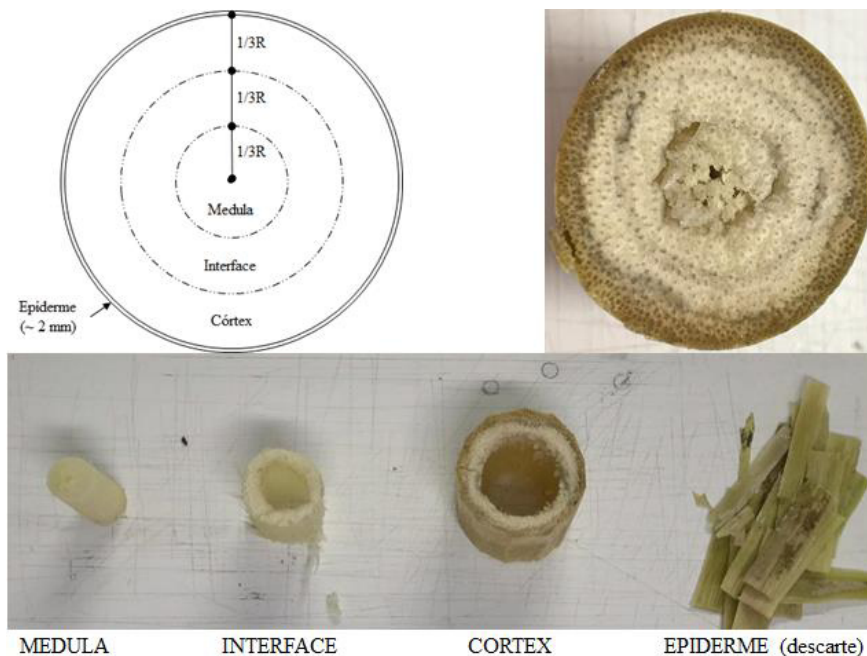
Os entrenós dos híbridos de cana utilizados nos ensaios foram colhidos em 2016 e as amostras armazenadas em freezer, com exceção dos entrenós 1 do híbrido H89 e H140 que foram colhidos em dezembro de 2019. As plantas foram originalmente cultivadas em campo experimental na cidade de Lorena, SP, Brasil (22°43'51" S, 45°07'29" O). O campo contava com 15 híbridos plantados em linhas de 0,60 m × 1,0 m com espaçamento de 3,0 m x 2,0 m entre híbridos. A colheita feita em maio de 2016 corresponde a plantas com 12 meses de cultivo, obtidas a partir do primeiro rebrotamento, enquanto que as amostras colhidas em dezembro de 2019 são de plantas de 12 meses de cultivo após o quarto rebrotamento. A escolha dos híbridos de trabalho considerou a recalcitrância e o teor de glucanas mistas, sendo o híbrido H89 menos recalcitrante e rico em MLG e híbrido H140 o mais recalcitrante e menos abundante em glucanas mistas (MARASIN et al., 2011; COSTA et al., 2016; COLLUCCI et al., 2019). Foram escolhidos os entrenós 1, 3, 5 e 11 numerados no sentido do ápice para a base do colmo para emprego na quantificação de glucanas mistas (Figura 15B). Em 2019 também se realizou coleta de tecido foliar jovem, colhendo as folhas de 0 a 4, que ainda apresentavam coloração verde, conforme demonstrado na Figura 15A.



**Figura 15.** Representação da amostragem de tecido foliar (A) e de entrenós (B). Adaptada de McCormick, Cramer, Watt (2006) e Collucci et al. (2019)

## 4.2 PREPARO DE AMOSTRAS DE ENTRENÓS

Os entrenós de cada cana foram fracionados, com auxílio de um furador de rolhas, nas regiões de córtex, medula e a interface entre córtex e medula, conforme indicado na Figura 16. Antes do fracionamento, a região mais periférica que corresponde à casca (epiderme) foi eliminada com o auxílio de uma lâmina de barbear.

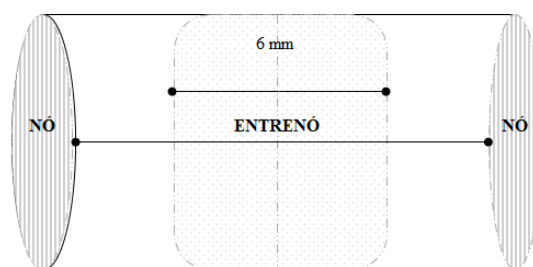


**Figura 16.** Representação transversal das seções de corte e separação de amostras a partir das regiões entrenodais da cana-de-açúcar.

Para evitar interferência nas análises posteriores e aumentar a vida útil das amostras, a sacarose foi extraída de duas maneiras, dependendo da finalidade de uso das amostras. Para as amostras destinadas para a quantificação de MLG extraiu-se a sacarose por desfibramento do material em um “*mixer*” Philco PMX700. Para isso, cada fração do entrenó foi suspenso em 400 mL de água destilada e desfibrado por períodos de 50 s. Para as regiões de córtex empregou-se 5 ciclos de lavagem, enquanto que para as interfaces e as medulas foram empregados 4 e 3 ciclos de lavagem, respectivamente. O número de ciclos de lavagens foi definido pela detecção de açúcares totais na fração líquida empregando o método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). Quando a água de lavagem não apresentou coloração após o ensaio, o material sólido foi considerado livre de sacarose. Após a extração de sacarose, as amostras foram secas por 24 horas em estufa a 40 °C, congeladas com nitrogênio líquido e moídas em moinhos de bolas SPEX Geno/Grinder 2010 equipado

com um recipiente de aço inox de ~15 mL e 3 bolas de moagem. O período de agitação para moagem foi 6 minutos a 1500 rpm. O material moído foi armazenado à -20 °C até o momento de uso.

As amostras destinadas à avaliação imunohistoquímica e análise de microscopia de fluorescência foram obtidas a partir da região central do entrenó, conforme ilustrado na Figura 17 e serão seccionadas conforme apresentado na Figura 16. Para este cenário, a sacarose foi extraída a frio em shaker orbital com temperatura controlada em 15 °C. Foram efetuadas trocas de água destilada a cada 6 horas durante o período de sete dias.

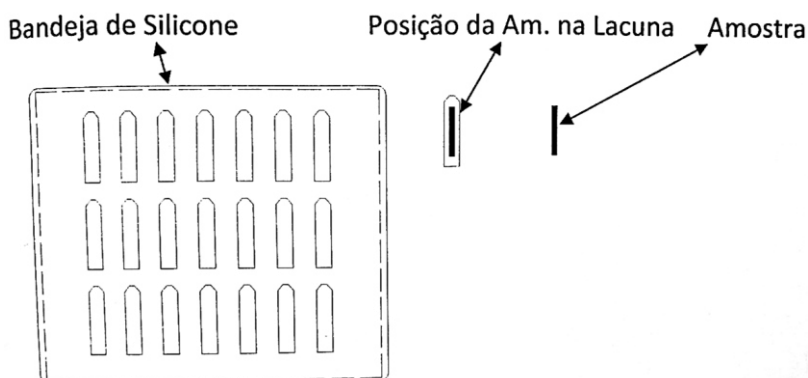


**Figura 17.** Representação da região corte para obtenção amostras para infiltração com resina e corte em ultra micrótomo.

Após esse período foi realizada blocagem da amostra em resina Spurr (Sigma-Aldrich) de baixa viscosidade seguindo etapas a seguir. A resina foi preparada conforme o “padrão de consistência firme” do fabricante.

- a) Desidratação com 1 mL de soluções gradientes de água e acetona por 20 minutos seguindo as proporções de: 1º - 3:1 água:acetona; 2º - 1:2 água:acetona; 3º - 1:1 água:acetona; 4º - 1:2 água:acetona; 5º - 1:3 água:acetona; 6º - acetona pura. A última etapa foi repetida duas vezes, deixando a amostra imersa em acetona por 24 h.
- b) Infiltração com 1 mL de soluções gradientes de acetona e resina por 24 horas seguindo as proporções de: 1º - 3:1 acetona:resina; 2º - 2:1 acetona:resina; 3º - 1:1 acetona:resina; 4º - 1:2 acetona:resina; 5º - 1:3 acetona:resina; 6º - resina pura. A última etapa foi repetida duas vezes.
- c) A amostra impregnada com resina foi posicionada no sentido longitudinal no interior de poços de um molde de silicone, conforme mostrado na Figura 18. O poço foi preenchido com resina Spurr até a metade do volume e então a amostra foi posicionada de forma paralela às bordas do poço. Finalmente o poço

foi completado com resina e a bandeja de silicone colocada em uma placa de vidro e levada a estufa por 48 horas à 70 °C para cura da resina.



**Figura 18.** Posicionamento da amostra durante blocagem com resina Spurr para obtenção dos blocos de corte em ultra micrótomo

#### 4.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE TECIDO FOLIAR

A determinação do teor de extrativos, lignina, polissacarídeos e cinzas foi efetuada empregando três gramas (3 g) do tecido foliar jovem (folhas 0-cartucho, +1, +2, +3 e +4, conforme Figura 15A). O material foi moído (20 mesh) *in natura* e colocados em um extrator de Soxhlet com etanol 95% por 6 h para determinação do teor de extrativos. Em tubos de ensaio, aproximadamente 0,3 g das amostras de tecido foliar livre de extrativos foram submetidas à hidrólise ácida durante 1 h a 30 °C usando 3,0 mL de ácido sulfúrico 72%(m/m). Em seguida, a mistura foi transferida quantitativamente para frascos Erlenmeyer de 250 mL com adição de 79,0 mL de água destilada. O material parcialmente hidrolisado foi autoclavado a 120 °C por 1 h. Depois de resfriado, o material foi filtrado sob vácuo em filtro com placa de vidro sintetizado nº 3 (SCHOTT). O material retido foi seco em estufa a 100 °C até que atingisse massa constante para determinação gravimétrica de lignina insolúvel. A lignina solúvel foi determinada através da análise de uma parte do filtrado (diluição 1:10) em espectrofotômetro UV-visível a 205 nm, considerando a absorvidade da lignina solúvel igual a 105 L.g<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>. Outra parte da fração solúvel foi filtrada em SepPack C18 e analisada em HPLC para determinação do teor de açúcares monoméricos e ácido acético. Para a análise por HPLC foi utilizada uma coluna BioRad HPX-87H a 45 °C, um detector de índice de refração a uma temperatura controlada de 35 °C, ácido sulfúrico 5 mM como fase móvel e fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>. Essa metodologia foi adaptada do estudo de Ferraz e colaboradores (2000).

#### 4.4 QUANTIFICAÇÃO DE GLUCANAS MISTAS

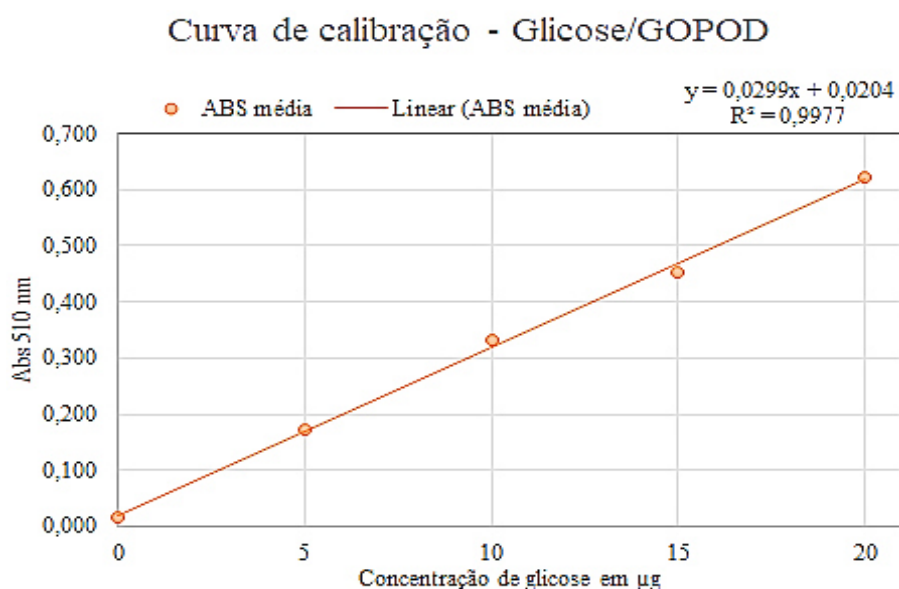
A metodologia de quantificação de glucanas mistas foi baseada em estudo de Costa et al. (2016), com alterações e permitiu quantificar glucanas mistas empregando o kit comercial “*Mixed-Linkage Beta-Glucan Assay Procedure*” (McCleary Method, Megazyme, Irlanda).

As amostras de sólidos moídas em moinhos de bolas foram descongeladas e pesadas entre 8-12 mg em tubos *ependorf* de capacidade de 5 mL. A massa seca exata de cada amostra foi calculada em função da determinação de umidade das mesmas amostras, empregando 100 mg de amostra pesadas em pesa-filtro e secas até massa constante em estufa a 105 °C. Este material foi submetido inicialmente à extração de amido adicionando 180 µL de solução  $\alpha$ -amilase de *Bacillus licheformis* (3 U/mL) em tampão PBS (NaCl 50 mM, KCl 1 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3,6 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,7 mM, pH 7,4) aos sólidos contidos no tubo e a mistura foi incubada por 1 hora à 85 °C. Posteriormente, adicionou-se 240 µL do coquetel enzimático de pulunanase de *Bacillus licheformis* (1 U/mL) e amiloglicosidade de *Rhizopus* sp. (3 U/mL) em tampão acetato de sódio (200 mM, pH 4,5) e incubou-se a reação de hidrólise por 2 horas à 50 °C. Após a reação foram adicionados 400 µL de etanol 96 % e a suspensão foi centrifugada a 4000 xG e o sobrenadante descartado. Os sólidos foram lavados em dois ciclos com 400 µL de etanol 70% seguidos de centrifugação em condições já descritas anteriormente. Essa metodologia foi adaptada de Harholt et al. (2006).

Os sólidos livres de amido foram tratados com 20 µL de solução de etanol 50% em tampão fosfato (20 mM, pH 6,5) por 1 minuto em banho à 100 °C, seguido de agitação vórtex e manutenção por mais 2 minutos na mesma temperatura. Os tubos foram resfriados a 50 °C por 5 minutos em um banho termostatizado e então foi adicionado 24 µL de lichenase (50 U/mL, tampão fosfato de sódio 20 mM, pH6,5) do kit comercial de análise e os tubos foram agitados ocasionalmente enquanto mantidos incubados à 50 °C. Para finalizar essa reação, 500 µL de tampão acetato de sódio (200 mM, pH 4,0) foram adicionados e os tubos foram mantidos a temperatura ambiente por 30 minutos. A suspensão foi centrifugada por 10 min à 1000G. Uma alíquota de 5-35 µL do sobrenadante foi incubado (em duplicata) com 35 µL de  $\beta$ -glicosidase (2 U/mL, tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,0) por 10 minutos à 50 °C em tubos de 2 mL de capacidade. Uma reação de referência (branco) foi realizada empregando o

sobrenadante incubado com 35  $\mu\text{L}$  de tampão acetato de sódio (50 mM, pH 4,0). Em seguida, 360-335  $\mu\text{L}$  de água e 600  $\mu\text{L}$  de reagente glicose oxidase/peroxidase (GOPOD) foram adicionados ao frasco *ependorf* e a reação ocorreu por 20 minutos à 50 °C. Após o término da reação, os frascos foram deixados em repouso por 1 hora e depois efetuou-se a leitura da absorbância em espectrofotometro UV-Vis em 510 nm.

Os resultados de absorbância obtidos para as amostras foram comparados com a curva padrão construída a partir de diluições de uma solução de glicose 1 mg/ml com os volumes de 0, 5, 10, 15 e 20  $\mu\text{L}$  diluídos em 150, 197,5, 195, 182,5 e 190  $\mu\text{L}$  de tampão acetato de sódio (50 mM, pH 4,2) e 250, 197,5, 195, 182,5 e 190  $\mu\text{L}$  de água destilada (pH ~5,12), respectivamente. As reações das soluções de glicose padrão foram feitas em triplicata, adicionando 600  $\mu\text{L}$  de reagente GOPOD por 20 min a 50 °C e efetuando a leitura de absorbância em 510 nm, após 1 hora da reação em repouso. A curva de calibração pode ser consultada na Figura 19.



**Figura 19.** Curva de calibração de glicose com o reagente glicose oxidase/peroxidase (GOPOD). A indicação de concentração de glicose se refere à massa de glicose no tubo de reação.

A partir da umidade da amostra, da sua massa pesada e da correlação entre a curva padrão de glicose com a absorbância medida para as amostras, o teor percentual de MLG nas amostras foi calculado pela Equação 1.

$$\text{massa de glicose (mg)} = \left[ \frac{(ABS_{510nm} - 0,0204)}{0,0299} * 944 \right] * 0,001$$

$$\text{massa de MLG (mg)} = \text{teor de glicose (mg)} * 0,9 \quad (1)$$

$$\text{MLG \% (g/100 g de cana em base seca)} = \frac{\text{massa de MLG (mg)}}{\text{massa seca da amostra (mg)}} * 100$$

#### 4.5 ESTATÍSTICA

A metodologia de quantificação de glucanas mistas foi desenvolvida empregando uma triplicata biológica composta por três indivíduos diferentes dos híbridos 89 e 140. Cada região foi digerida em triplicata para extração de amido e conversão de MLG por enzima lichenase, com exceção do entrenó 1 que contou com uma duplicata nesta etapa de análise. A partir os dados de triplicatas biológicas autênticas foi feita a análise de distribuição normal e teste T em par com distribuição bicaudal considerando média diferentes no nível de. Esta avaliação foi feita com o cálculo de p empregando o software Excel 2013 (COLLUCCI et al., 2019). Nesse teste avaliou-se as interações e diferenças estatísticas na região quando comparada com a mesma região do entrenó 1, atribuindo letra maiúscula para o agrupamento, e na região quando comparada com a mesma região do entrenó precedente, indicado por letra minúscula nos gráficos dos resultados. A compilação dos dados brutos e os valores calculados de p podem ser encontrados nos Apêndice A e Apêndice B para o híbrido H89 e H140, respectivamente.

#### 4.6 PROPORÇÃO CELOTRIOSE E CELOTETRAOSE NA MLG

A molécula de MLG apresenta quebras de linearidade por conta de ligações glicosídicas do tipo beta-1,3, dando um aspecto de “raio” a este polissacarídeo. As unidades de celotriosil e celotetrasil formadoras dessa molécula apresentam influências sobre a acessibilidade de enzimas hidrolíticas sobre outros polissacarídeos de parede celular, como a celulose (ERMAWAR et al., 2015; KIM et al., 2018). Para determinar a proporção celotriosil:celotetrasil, 100 µL do sobrenadante da digestão com a enzima lichenase foi diluído para 1000 µL em água deionizada e submetido a uma análise de cromatográfica líquida de alta performance (HPLC). Na análise empregou-se duas colunas cromatográficas em sequência, a Bio-Rad HPX-87C e a

Bio-Rad HPX-42A, com fluxo de água deionizada de 0,4 mL/min a 65 °C, detector de índice de refração e tempo de eluição de 50 min. Os padrões disponíveis para o cálculo da proporção celotriosil:celotetrasil (DP3:DP4) foram celobiose, celotriose e celotetraose (os cromatogramas estão dispostos no Apêndice C). O cálculo da proporção celotriosil:celotetrasil (DP3:DP4) foi feito a partir da divisão simples das áreas do picos referentes aos oligossacarídeos em questão.

#### 4.7 MAPEAMENTO DE MLG POR IMUNOHISTOQUÍMICA E MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Para obter os cortes transversais foi utilizado o ultra micrótomo Leica EM UC7, configurado para passos de 15 µm em lâmina de diamante Diatome Histo HI11794. Três cortes de cada amostra serão dispostos em um compartimento de placa de 24 poços e mantidos em agitação de 190 rpm durante o tratamento. O tratamento imunohistoquímico foi adaptado do estudo de Costa et al. (2016), onde os cortes transversais serão lavados três vezes com 200 µL de tampão PBS 1x (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, pH 7,4) por 5 minutos e, em seguida, bloqueados com solução leite:tampão PBS 1x (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, pH 7,4) 5% m/v por 1 hora. Posteriormente, os tratamentos serão incubados com 200 µL do primeiro anticorpo monoclonal (MLG anticorpo, diluído 1:1500 em leite:tampão PBS 1x (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, pH 7,4) 5% m/v) por 1 hora, e no caso do branco, o anticorpo anti-MLG foi substituído por solução leite:tampão PBS 1x (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, pH 7,4) 5% m/v. Depois da incubação, as amostras serão lavadas mais três vezes com 200 µL tampão PBS 1x (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, pH 7,4) e passarão por nova incubação com 200 µL do anticorpo secundário de fluorescência (Alexa Fluor 514 – Thermo-Scientific anti-mouse para MLG, diluído 1:10.000 em leite:tampão PBS 1x (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, pH 7,4) 5% m/v – espectro de excitação e emissão apresentados no Anexo A). Ao fim do tratamento, os cortes serão lavados três vezes com 200 µL de tampão PBS 1x, onde deverão ficar retidos até o momento de visualização no microscópio. A visualização ocorrerá no equipamento Olympus BX53 com fonte X-CITE 120 LED nos filtros U-FUW e EYFP (Anexo A), e processamento de imagens empregará o Software CellSens 8.0.



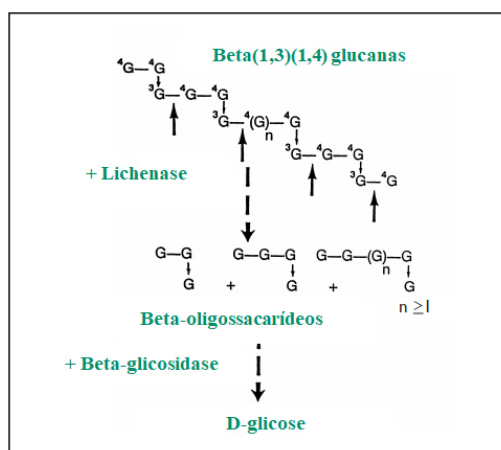
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A QUANTIFICAÇÃO DE GLUCANAS MISTAS NOS ENTRENÓS DE CANA DE AÇÚCAR

O presente estudo avaliou a ocorrência do polissacarídeo  $\beta$ -1-3: $\beta$ -1-4 glucano (figura 8) em dois híbridos de cana de açúcar que contrastam quanto à composição química e à digestibilidade frente a coquetéis enzimáticos celulolíticos (Masarin et al., 2011; Costa et al., 2016). Para simplificar a indicação do polissacarídeo em questão, a abreviatura MLG, com origem na nomenclatura em inglês “ $\beta$ -1-3/ $\beta$ -1-4 mixed-linkage glucan”, será empregada no texto a seguir. Estudos anteriores mostraram que a ocorrência de MLG era significativamente maior em tecidos menos recalcitrantes dos híbridos de cana em estudo (Costa et al., 2013; Costa et al., 2016) bem como em *Arabidopsis thaliana* geneticamente modificada com gene *CslF6* para superexpressar MLG (VEJA-SANCHEZ et al., 2015).

O foco experimental do presente trabalho foi mapear a ocorrência de MLG em tecidos diferenciados a partir do processo de crescimento da planta a fim de verificar se há acúmulo prematuro e eventual degradação do polissacarídeo ao longo do processo de diferenciação, como preconizado por Scheller; Ulvskov, 2010.

A primeira etapa do presente estudo incluiu o desenvolvimento de metodologia analítica baseada na detecção de glicose liberada de MLG a partir da ação de lichenase e  $\beta$ -glicosidase sobre o substrato (Figura 20).



**Figura 20.** Princípio de análise de beta-glicanos por enzimas em kit comercial. Adaptada de Megazyme® (2018)

O estabelecimento da metodologia comparou dados gerados a partir de entrenós completamente desenvolvidos (entrenó 11) dos híbridos em estudo (H89 e H140) obtidos no presente estudo com aqueles publicados anteriormente (Costa et al., 2016) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Teores de MLG reportados na literatura e obtidos no presente trabalho para o entrenó 11 dos híbridos H89 e H140

Região do entrenó	H140 entrenó 11		H89 entrenó 11	
	<i>Costa et al. (2016)</i>	<i>Presente estudo</i>	<i>Costa et al. (2016)</i>	<i>Presente estudo</i>
<i>Medula</i>	2,90 ± 0,05 %	4,2 ± 0,7 %	15,4 ± 0,5 %	13,8 ± 0,9 %
<i>Interface</i>	0,70 ± 0,01 %	2,6 ± 0,2 %	6,2 ± 0,2 %	11,0 ± 2,0 %
<i>Córtex</i>	0,20 ± 0,02 %	0,3 ± 0,1 %	0,30 ± 0,01 %	1,3 ± 0,4 %

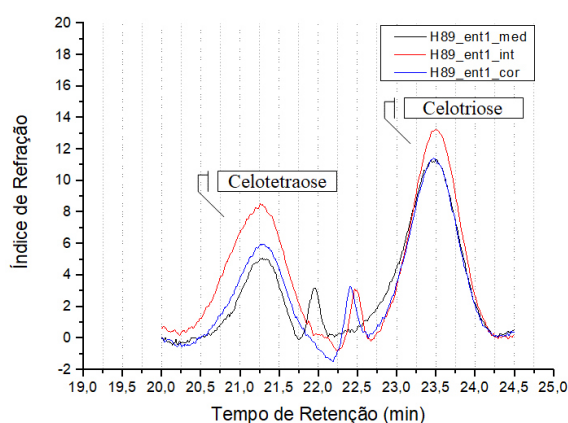
As amostras analisadas no presente trabalho e as amostras analisadas por Costa et al. (2016) correspondem a diferentes colheitas dos mesmos híbridos e, portanto, podem diferir entre si devido a efeitos sazonais de crescimento de cada grupo de híbridos. Os valores reportados no estudo de Costa et al. (2016) e os resultados obtidos no presente trabalho, apesar de apresentarem variações atribuídas à sazonalidade entre colheitas e/ou variações entre os kits analíticos comerciais baseados na ação de enzimas, mostram uma mesma tendência de clara predominância de MLG nos tecidos centrais do colmo (medula) com diminuição expressiva nos tecidos periféricos (córtex), passando pela interface entre esses tecidos. Um segundo grupo comparativo de dados foi obtido com entrenós imaturos (entrenó 1) de um mesmo híbrido (H89) obtido em duas colheitas subsequentes (2018 e 2019) analisados com um único kit analítico (Tabela 3). Também neste caso houve diferença entre os dados absolutos (embora menores), mas novamente a predominância de MLG nos tecidos centrais do entrenó ficou evidenciada.

Com base nos resultados indicados nas Tabelas 2 e 3, pode-se indicar que a metodologia analítica desenvolvida para a quantificação de MLG foi apropriada e permite a elaboração do estudo de mapeamento quantitativo deste polissacarídeo durante o processo de diferenciação celular que pode ser evidenciado pela amostragem de entrenós coletados de forma progressiva desde o topo até a base da planta.

**Tabela 3** – Teores de MLG detectados no entrenó 1 do híbrido H89 obtidos a partir de duas colheitas obtidas em anos subsequentes

Região do entrenó	Data Colheita	Teor Médio MLG (%)
Medula	dez/19	5,8 ± 1,0
	dez/18	7,5 ± 0,6
Interface	dez/19	5,8 ± 0,6
	dez/18	6,3 ± 0,8
Córtex	dez/19	3,4 ± 0,5
	dez/18	2,2 ± 0,3

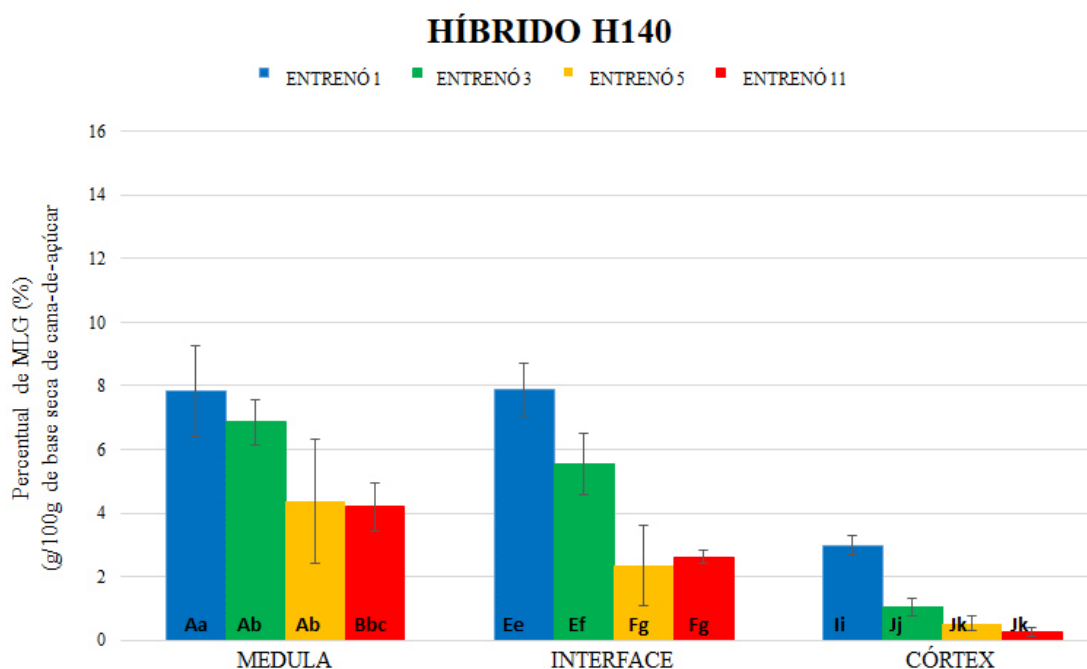
A ocorrência de MLG tem sido descrita em diversas gramíneas, embora a característica estrutural do polissacarídeo não seja idêntica entre as espécies (BURTON; FINCHER, 2009; DOBLIN et al., 2009; ERMAWAR et al., 2015). Usualmente, a extensão das cadeias  $\beta$ -1-4 envolve 3 ou 4 anidroglicosos, com variações na proporção entre diferentes espécies (BURTON; FINCHER, 2009). No caso de cana de açúcar, este dado não está disponível na literatura atualmente e buscamos quantificar a proporção de celotriose e celotetraose gerados após a digestão do entrenó com lichenase na ausência de  $\beta$ -glicosidase. Para isso, as amostras foram analisadas por cromatografia em fase líquida e as intensidades dos picos relativos à celotriose e celotetraose (Figura 21) foram relacionadas, indicando, respectivamente, proporções de 2,2:1, 2,1:1 e 2,0:1 nas regiões de medula, interface e córtex do entrenó 1 do híbrido H89. Os dados indicam uma estrutura de MLG em cana similar à observada por Ermawar et al. (2015) em sorgo *Sorghum bicolor*. Nessa gramínea também há predominância de MLG na medula ( $1.71 \pm 0.83$  %) contra  $0.73 \pm 0.24$  % no córtex do caule jovem da planta, sendo que a proporção de celotriose:celotetraose observada foi de 2,5:1 e de 2,6:1, respectivamente.



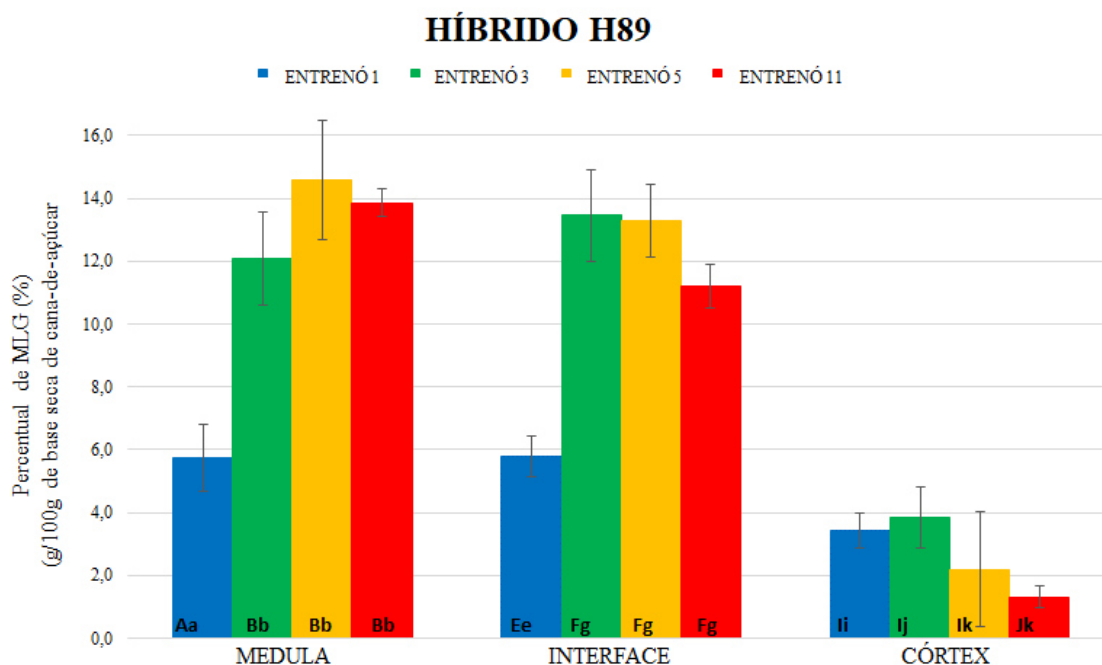
**Figura 21.** Cromatogramas indicando picos de celotriose e celotetraose para amostras de medula (preto), interface (vermelho) e córtex (azul) do entrenó 1 do híbrido H89.

## 5.2 QUANTIFICAÇÃO DE MLG AO LONGO DO PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO DOS ENTRENÓS DE CANA DE AÇÚCAR

Amostras dos entrenós 1, 3, 5 e 11 coletadas dos híbridos H89 e H140 foram fracionadas em medula, interface e córtex e analisadas quanto aos teores de MLG. Os dados obtidos para o híbrido H140 (mais recalcitrante) estão indicados na Figura 22, enquanto aqueles referentes ao H89 (menos recalcitrante) estão na Figura 23. O padrão característico de predominância de MLG na região central do entrenó (medula e interface), já comentado anteriormente para o entrenó 11 do H89, foi evidenciado nos dois híbridos em estudo, independentemente de qual estágio de diferenciação foi avaliado, corroborando com dados já publicados para os entrenós maduros de cana de açúcar (COSTA et al. 2016). Neste sentido, o foco central do presente trabalho foi avaliar a ocorrência de MLG nos estágios progressivos de diferenciação de cada híbrido, motivo pelo qual as comparações indicadas a seguir se restringem a estas observações entre as amostras.



**Figura 22.** Quantificação de glucanas mistas para o Híbrido H140, reportadas em teor percentual em base seca de amostra de cana-de-açúcar, demonstrando análise estatística t-student bicaudal pareado ( $p < 0,05$ ). **LETRAS MAIÚSCULAS** – Comparação dos entrenós de uma mesma região utilizando o entrenó 1 como referência. **letras minúsculas** – Comparação de todos entrenós de uma mesma região sem um entrenó específico como referência.



**Figura 23.** Quantificação de glucanas mistas para o Híbrido H89, reportadas em teor percentual em base seca de amostra de cana-de-açúcar, demonstrando análise estatística *t-student* bicaudal pareado ( $p < 0,05$ ). **LETRAS MAIÚSCULAS** – Comparação dos entrenós de uma mesma região utilizando o entrenó 1 como referência. **letras minúsculas** – Comparação de todos entrenós de uma mesma região sem um entrenó específico como referência.

As avaliações dos tecidos entrenodais do híbrido H140 demonstraram que há uma diminuição progressiva nos teores de MLG ao longo do processo de diferenciação, independentemente de qual região do entrenó esteve sob comparação (Figura 22). Na medula, essa diminuição implica no entrenó mais desenvolvido (E11) conter metade da MLG detectada no entrenó menos desenvolvido (E1). Essa variação foi ainda mais expressiva na interface (E11 com um terço da MLG detectada no E1) e no córtex (E11 com um décimo da MLG detectada no E1).

A comparação dos dados do H140 (Figura 22) com aqueles do H89 (figura 23) mostra que o H89 mostrou um padrão diferenciado, principalmente nas regiões mais centrais dos entrenós. O H89 apresentou teores de MLG significativamente menores no E1 das regiões de medula e interface (Figura 23), enquanto que no córtex os teores de MLG nos entrenós 1 a 5 foram estatisticamente iguais com decréscimo significativo detectado somente no E11.

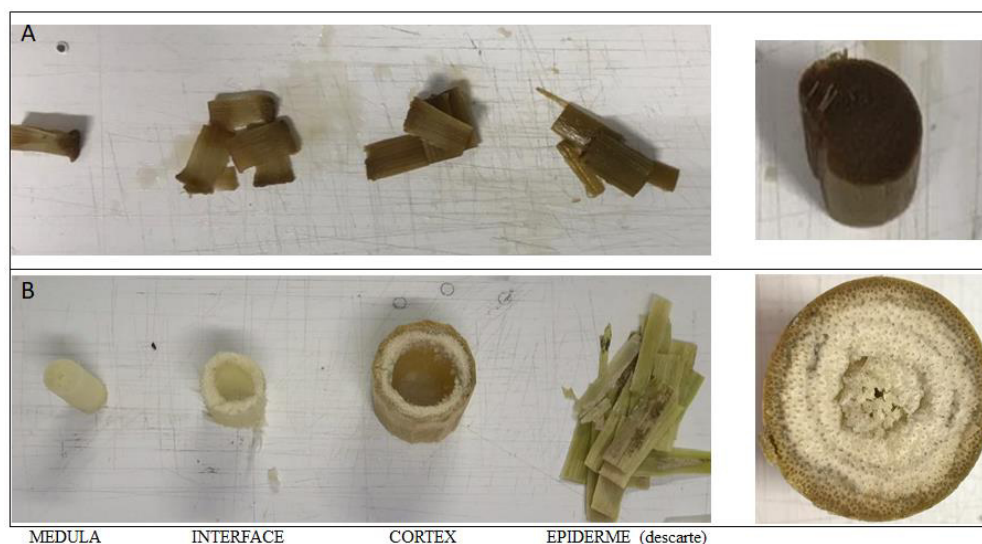
O H89 também se diferenciou do H140 por apresentar um teor elevado de MLG (11-15%) nos entrenós 3 a 11 da medula e interface (Figura 23) quando comparado com os mesmos entrenós e regiões do H140 (3-7%) (Figura 22). Estes dados sugerem um padrão diferenciado de acúmulo de MLG de acordo com os teores absolutos detectados para o polissacarídeo. No entanto, os dados disponíveis ainda não permitem

um perfeito discernimento sobre o eventual padrão de acúmulo e degradação deste polissacarídeo em cana de açúcar. De fato, há mais de uma hipótese que permita sistematizar os dados obtidos, bem como os próprios dados disponíveis na literatura para outras espécies.

Por exemplo, Christensen et al., (2010) avaliaram a composição das paredes celulares ao longo do processo de diferenciação e os perfis transcriptômicos de diferentes gramíneas (*Brachypodium distachyon*, *Hordeum vulgare* e *Triticum aestivum*) e foi considerado na revisão de literatura publicada por Scheller e Ulvskov (2010) que sugeriu que há uma substituição progressiva de MLG por GAX ao longo do processo de diferenciação dos vegetais. Por outro lado, os dados publicados recentemente por Collucci et al. (2019) mostram que ao longo do processo de diferenciação dos entrenós de cana de açúcar, há um espessamento progressivo das paredes celulares das fibras do córtex, atribuído à deposição de parede celular secundária na qual o polissacarídeo predominante é a GAX. Ou seja, os dados de Collucci et al (2019) sugerem que o simples adensamento da parede celular devido a deposição de parede secundária rica em GAX pode levar a uma diminuição proporcional de MLG no tecido que inicialmente continha proporcionalmente menos parede secundária em relação à parede primária rica em MLG.

Neste contexto, se considerarmos somente a região do córtex de cada entrenó que representa cerca de 67-69% da biomassa seca das regiões sob comparação (Costa et al., 2013), podemos sugerir que a diminuição significativa nos teores de MLG de entrenós contrastantes em termos de estágio de diferenciação (E1 *versus* E11) esteja associada com o adensamento da parede celular decorrente da deposição de parede celular secundária nas fibras que predominam nessa região (COLLUCCI et al., 2019) e, conseqüente, o decréscimo dos teores de MLG seria atribuído ao acúmulo de parede secundária e não necessariamente à substituição de MLG por GAX.

Quanto aos baixos teores de MLG nos entrenós 1 e 3 do H89, contrastando com o que foi observado no H140, há uma incerteza (ainda sem conclusão possível) associada a eventual inibição da ação da lichenase e da  $\beta$ -glicosidase usada no ensaio analítico. Essa possibilidade de inibição das enzimas decorre de uma observação experimental feita ao longo do trabalho que indicou o rápido escurecimento dos entrenós em questão logo após a preparação dos cortes, especialmente nas regiões centrais (Figura 24).



**Figura 24.** Escurecimento dos entrenós jovens (E1 demonstrado em A) comparado com o entrenó maduro (E11 demonstrado em B).

O fato de os entrenós iniciais corresponderem a um estágio de desenvolvimento inicial (MCCORMICK; CRAMER; WATT, 2006; FERREIRA et al., 2016) pode refletir em elevada atividade de oxidases atuando sobre polifenóis acumulados nesse tecido (o que justificaria o escurecimento) com eventual consequência de inibição das enzimas hidrolíticas, ou mesmo interferência no método colorimétrico empregado na dosagem da glicose formada. Esta possibilidade também pode ser sustentada pelo fato de que os entrenós iniciais do H89 mostraram elevados teores de glucanas totais (MLG e celulose, correspondendo a cerca de 46% do peso seco do entrenó 1, por exemplo - COLLUCCI et al., 2019) que decresceram progressivamente nos entrenós subsequentes. Além de um teor de glucanas totais decrescente ao longo do processo de diferenciação, o trabalho de Collucci et al (2019) também mostrou elevada digestibilidade do entrenó 1 do H89 que foi associada ao eventual teor elevado de MLG.

Os teores de MLG em diferentes tecidos e órgãos de *Sorghum bicolor* (variedade BTx623) também foi estudado por Ermawar et al. (2015) e comprovam que tecidos maduros apresentam redução significativa das quantidades relativas de glucanas mistas, indo de encontro com os resultados obtidos até o momento com o híbrido H140 em estudo. Paralelamente, o trabalho de Vega-Sánchez et al. (2015) foi capaz de demonstrar que a presença de glucanas mistas em transformantes de *Arabidopsis thaliana* reduz a recalcitrância da parede celular, onde a superexpressão do gene relacionado com a síntese de glucanas mistas (*CsIF6*) refletiu em um ganho no rendimento de sacarificação de glucanas. Os autores discutem ainda que além de a

sacarificação da MLG ocorrer facilmente, também a celulose contida na parece celular com super-expressão gene *CsIF6* envolvido na síntese de MLG tem sua digestibilidade aumentada, sugerindo que a deposição de MLG afeta a organização da celulose (diminuindo a cristalinidade) e com isso facilita a sacarificação como um todo.

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E QUANTIFICAÇÃO DE MLG EM TECIDO FOLIAR JOVEM

A composição química nos permite prever o comportamento da biomassa quando submetida a determinados pré-tratamentos e quais os produtos podem ser obtidos. Em diferentes situações, resíduos de cana, como o bagaço, e tecidos *in natura*, como os entrenós dos híbridos H89 e H140 foram objetos de estudo quanto a composição química (SIQUEIRA et al., 2011; MASARIN et al., 2011; COSTA et al., 2016; COLUCCI et al., 2019). De forma adicional, realizamos no presente estudo a caracterização química do tecido foliar jovem, agregando informação sobre a composição química de biomassa e a influência dos teores de glucanas (MLG) para os trabalhos futuros.

Na Tabela 4 está sumarizada a composição de sacarídeos, grupos acetil, lignina e cinzas para tecido foliar jovem dos híbridos H89 e H140. Podemos observar que a variabilidade nos teores de sacarídeos constituintes de parede celular é baixa. Por exemplo as glucanas totais representam  $33,7 \pm 0,4 \%$  do peso seco do tecido foliar jovem do híbrido H89 frente ao teor de  $35,5 \pm 0,7 \%$  para o híbrido H140. No mesmo sentido, os conteúdos de xilana são de  $21,3 \pm 0,2 \%$  e  $20,2 \pm 0,4 \%$  e os teores de arabinosil representam  $3,4 \pm 0,1 \%$  e  $3,5 \pm 0,1 \%$  do peso seco das células do tecido foliar jovem dos híbridos H89 e H140, respectivamente. Em relação aos conteúdos de acetil obtivemos os valores de  $1,7 \pm 0,5 \%$  (H89) e  $1,2 \pm 0,7 \%$  (H140).

A lignina total mostra redução sutil no híbrido H140 ( $19,8 \pm 0,4 \%$ ), quando comparado com a lignina total do híbrido H89 ( $21,4 \pm 0,3 \%$ ), resultado contraposto aos dados para os entrenós de H89 que apresentaram menor teor de lignina do que o tecido entrenodal do híbrido H140 (COSTA, et al., 2016; COLLUCCI, et al. 2019). O teor de extrativos solúveis em etanol do tecido foliar jovem segue a tendência observada nos tecidos entrenodais (MASARIN, et al., 2011; COSTA et al., 2016), onde o H89 tem teor menor que o H140, sendo de  $17,9 \pm 2,3 \%$  e  $19,5 \pm 2,7 \%$ , respectivamente. Esse valor foi reportado separadamente afim de permitir uma análise



acerca da composição química de constituintes de parede das células formadoras do tecido foliar jovem dos híbridos de cana de açúcar em estudo.

**Tabela 4** – Composição química do tecido foliar jovem amostrados dos híbridos H89 e H140. Os dados se referem a composição da parede celular, ou seja, material livre de extrativos\*.

Híbrido de Cana	Composição química (% m/m em peso seco)					
	Glucanas	Xilanas	Arabinosil	Acetil	Lignina total	Cinzas
H89	33,7 ± 0,4	21,3 ± 0,2	3,4 ± 0,1	1,7 ± 0,5	21,4 ± 0,3	5,0 ± 0,3
H140	35,5 ± 0,7	20,2 ± 0,4	3,5 ± 0,1	1,2 ± 0,7	19,8 ± 0,4	6,3 ± 0,4

(\*) O teor de extrativos nas amostras in natura foi de 17,9 ± 2,3 % e 19,5 ± 2,7 %, para os híbridos H89 e H140, respectivamente

A proporção xilana:arabinosil demonstra que a GAX para o H89 é menos substituída do que a GAX presente no tecido foliar do H140, similar as observações feitas para tecidos entrenodais do córtex no estudo de Costa et al. (2016), onde a GAX presente no híbrido H89 foi destacada como menos substituída do que a GAX encontrada no híbrido H140. Outra atribuição feita aos dados de caracterização química do presente estudo é de que a hemicelulose GAX está menos acetilada no tecido foliar do híbrido H140 do que no mesmo tecido do híbrido H89, indo de acordo com os dados reportados para GAX dos entrenós do híbrido H140 com menos grupos acetil como substituintes quando comparados aos mesmos tecidos entrenodais do híbrido H89 (COSTA, et al., 2016).

O padrão de substituição da GAX difere do que foi reportado no estudo de Masarin et al. (2011) com híbridos de cana e bagaço moído. A referência em questão reporta um padrão de substituição de 10:1:3 (ou 4) unidades de xilose, arabinose e acetila, respectivamente, e menos substituída do que revela a composição química do tecido foliar com um padrão de substituição de 6,3:1:0,5 para a GAX constituinte das células das folhas de H89 e de 5,8:1:0,4 para a GAX encontrada nas folhas de H140.

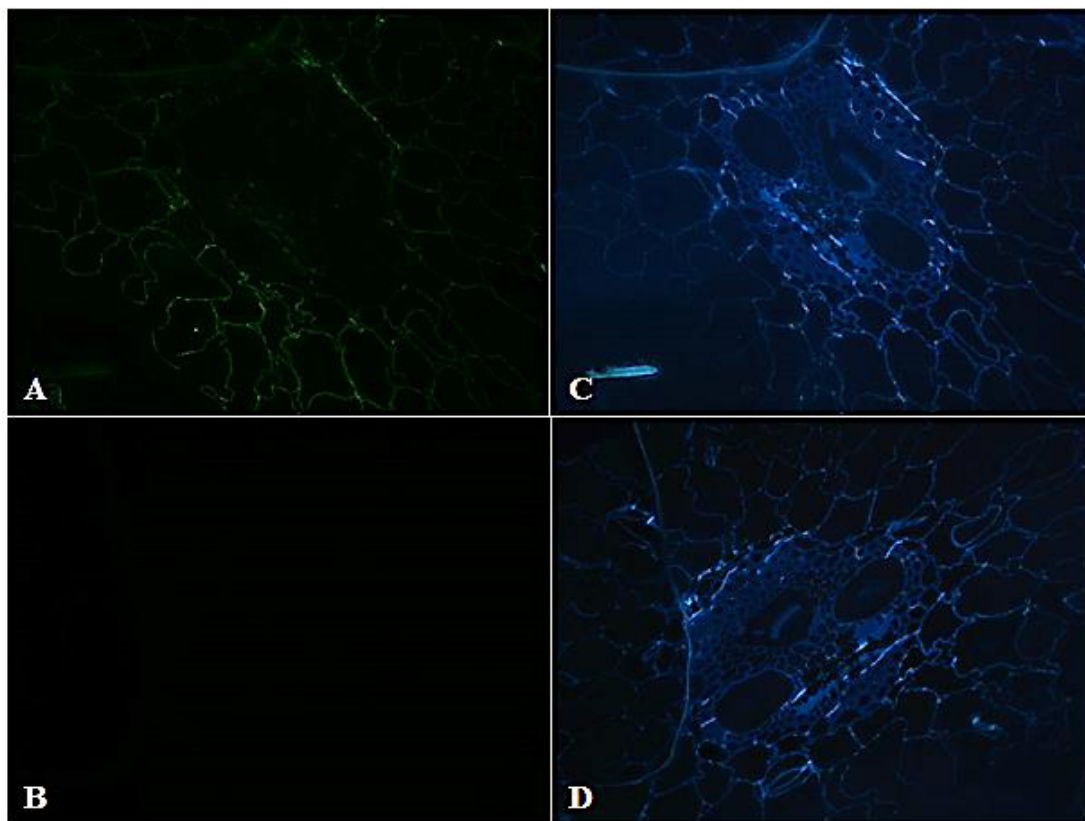
Os ensaios de quantificação de MLG foram aplicados no sentido de reunir informação acerca da presença desse polissacarídeo no tecido foliar. Os valores obtidos foram de 0,6 ± 0,1 % para o híbrido H89 e de 0,4 ± 0,1 % para o híbrido H140. Ao confrontar esse resultado com o teor de glucanas obtido através da caracterização química observamos que a maioria da glicose estrutural deve estar concentrada na forma de celulose, refletindo na baixa contribuição centesimal das glucanas mistas ao peso seco desse material. Em comparação com os entrenós, percebemos que o tecido foliar apresenta conteúdo de glucanas mistas reduzido, e uma disposição similar foi

encontrada em *Sorghum bicolor* com teores de MLG cerca duas vezes maiores em caules do que em folha (ERMAWAR et al., 2015).

#### 5.4 DETECÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE MLG

Diversos trabalhos utilizaram da especificidade da imunohistoquímica para avaliar a distribuição topoquímica de componentes constituintes da parede celular dos vegetais, e recentemente os anticorpos secundários fluoróforos ganharam destaque nessa área de aplicação (VEGA-SÁNCHEZ et al. 2013; ERMAWAR et al., 2015; VEJA-SÁNCHEZ et al., 2015; COSTA et al., 2016). A detecção microlocalizada de MLG prevista no presente trabalho poderá resolver o questionamento entre as hipóteses de degradação da MLG ao longo da maturação dos entrenós de cana ou de diminuição dos teores decorrente do ganho de massa da parede celular devido ao espessamento com a maturação (Collucci et al., 2019) e a deposição de outros componentes que não a MLG (principalmente GAX e lignina).

A viabilidade do emprego do anticorpo primário anti-MLG e do anticorpo secundário de fluorescência AlexaFluor 514® para detectar MLG (espectro de excitação e emissão demonstrados no Anexo A) nos entrenós de cana foi inicialmente avaliada através de ensaio que empregou o entrenó 11 do híbrido 89. Na Figura 25A podemos observar que houve a ligação do anticorpo primário à amostra e que também houve ligação do anticorpo secundário ao anticorpo primário, em função da fluorescência observada. A amostra da Figura 25B, por sua vez, foi tratada apenas com anticorpo secundário, mostrando que não há estabelecimento de ligações inespecíficas desse anticorpo a outros epítomos do corte histológico. As Figuras 25C e 25D, são registros da amostra sob filtro U-FUW de amplo espectro, onde a fluorescência observada é atribuída aos compostos aromáticos presentes na amostra (lignina e ácidos hidroxicinâmicos) (CHANG et al., 2013). A comparação das figuras 25A e 25C, que correspondem ao mesmo corte visualizado com dois filtros diferentes, mostra claramente que as células de parênquima fluorescem na região do verde que é decorrente do anticorpo secundário Alexa Fluor 514®, enquanto que o aglomerado vascular não aparece na Figura 25A, pois não contém quantidades expressivas de MLG. Já na Figura 25C, todas as células fluorescem no azul que é atribuído a presença indiscriminada de compostos aromáticos em todos os tipos celulares.

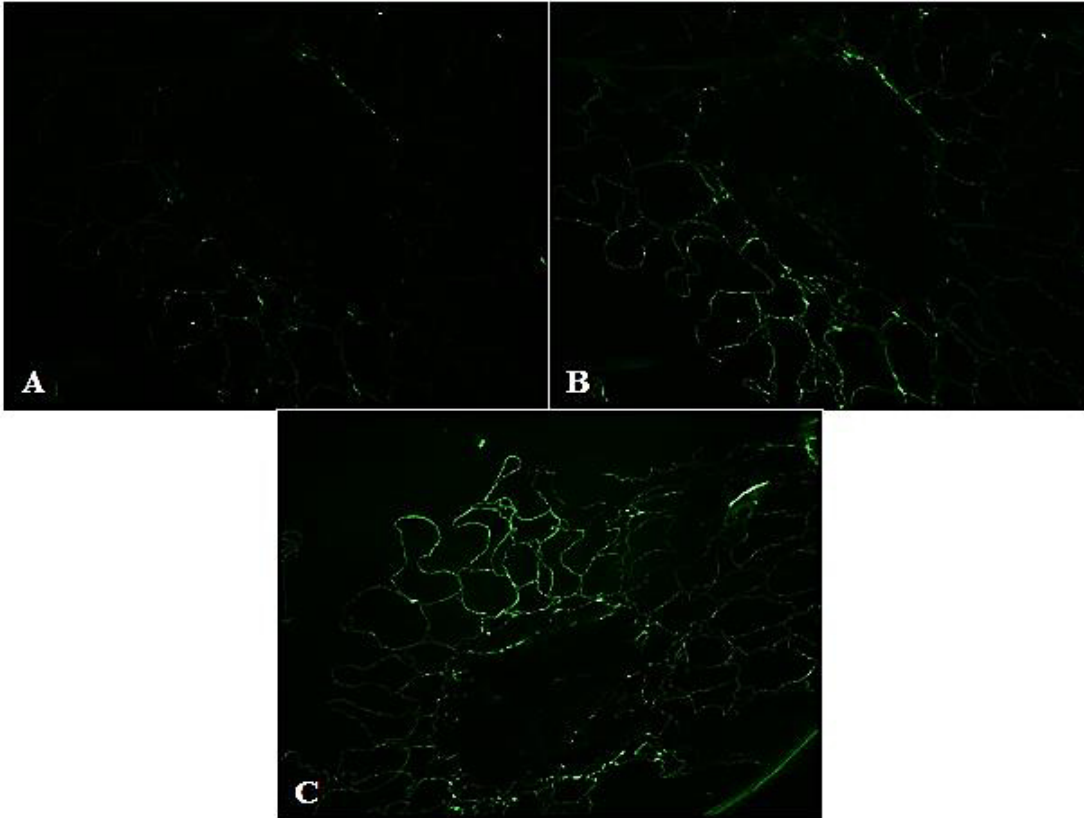


**Figura 25.** Micrografias de teste de viabilidade dos anticorpos anti-MLG e Alexa Fluor 514®. A- Amostra tratada com os anticorpos primário e secundário analisada sob filtro E-YFP de fluorescência que capta a região de emissão do Alexa Fluor 514® (*exp.time* 100 ms); B - Amostra tratada somente com o anticorpo secundário e analisada sob o filtro E-YFP de fluorescência que capta a região de emissão do AlexaFluor 514 (*exp.time* 100 ms - note a ausência completa de fluorescência). C-D são controles observados sob filtro U-FUW de ampla faixa que capta emissão de compostos aromáticos (*exp.time* 25 ms), sendo que C é o mesmo corte visto em A e D é o mesmo corte visto em B.

Para o estudo em questão, as condições de aquisição de imagem são cruciais para garantir dados reprodutíveis e comparáveis entre si. Por exemplo, as imagens 25A e 25B contam com todas as variáveis do microscópio fixadas, inclusive o tempo de exposição (100 ms no caso específico). Isso é relevante, pois a intensidade da fluorescência captada é diretamente proporcional ao tempo de exposição usado na câmara. Por exemplo, mesmo sob o filtro idealizado para captura de fluorescência do Alexa Fluor 514®, pode haver sobreposição de fluorescência de fundo emitida pelos compostos aromáticos. Isso significa que se a imagem escura indicada na Figura 25B for capturada com um tempo mais longo de exposição, será notável algum nível de fluorescência dos compostos aromáticos e não do Alexa Fluor 514®, interferindo com a interpretação dos dados.

Um exemplo de como o tempo de exposição da câmara afeta as imagens geradas pode ser ilustrado com dados obtidos com a medula do entrenó 11 do híbrido H89 (Figura 26). As microscopias demonstram que ao alterar de 100 ms (Figura 26A) o

parâmetro de *exposure time* para 200 ms (Figura 26B) e 1 s (Figura 26C) temos um maior nível de fluorescência chegando à câmara como era esperado. No entanto, visualmente as imagens expostas à 200 ms e à 1 s não são diferentes, e isso pode ser atribuído ao efeito de saturação luminosa (JOHNSON; SPENCE, 2010).



**Figura 26.** Cortes transversais de medula do híbrido H89, submetidas a tratamento imunohistoquímico e microscopia de fluorescência com filtro EYFP e *exposure time* de 100 ms (A), 200 ms (B) e 1 s (C).

Até o presente momento, a metodologia empregada se mostrou efetiva do sentido de micro localizar as glucanas mistas nos diferentes tipos de células dos cortes histológicos de cana-de-açúcar. A continuidade do trabalho de imunohistoquímica empregará as informações da determinação quantitativa de MLG como diretriz para a fixação de parâmetros de análise no microscópio. Assim, a amostra que apresentar o maior teor de MLG no conjunto estudado (diversos entrenós e regiões dos dois híbridos) terá a imagem de fluorescência específica do anticorpo AlexaFluor 514 otimizada para máximo contraste. Na condição experimental usada para gerar esta imagem, serão geradas imagens de todas as demais amostras. Com isso, a expectativa é observar a diminuição progressiva de fluorescência (escurecimento das imagens) nos tecidos que apresentem menores teores de MLG.

## 6 CONCLUSÕES

Até o presente momento, atribui-se duas hipóteses para explicar a redução dos teores de glucanas mistas observadas especialmente na região do córtex com o progresso do desenvolvimento dos entrenós de cana de açúcar (diminuição do teor de MLG do entrenó 1 ao 11). A primeira hipótese considera que a MLG é substituída por GAX com a progressão do processo de desenvolvimento dos entrenós (CHRISTENSEN et al., 2010; SCHELLER; ULVSKOV, 2010). A segunda hipótese considera que o espessamento da parede secundária (Collucci et al., 2019) e a simples deposição adicional de GAX e lignina ao longo do processo de desenvolvimento diminuindo a contribuição centesimal da MLG na análise químico-enzimática. Espera-se o discernimento das duas hipóteses a partir da conclusão do estudo de imunohistoquímica das MLG, pois se houver substituição de MLG por GAX ao longo do processo de amadurecimento, também deveria haver diminuição da fluorescência das paredes celulares tratadas com os anticorpos específicos para MLG, caso contrário, haverá manutenção da intensidade de fluorescência nas amostras de diferentes estágios de maturação nas mesmas condições de análise de imagens.

Em tecido foliar jovem observou-se que apesar da detecção de teores de glucanas elevados, essa glucanas não correspondem a quantidades expressivas de glucanas mistas como se observa principalmente na medula dos entrenós. As GAX dos tecidos foliares jovens também mostraram padrões de substituição distintos do que fora reportado na literatura para os entrenós, podendo ter impacto positivo na quebra da recalcitrância desse material (MASARIN et al., 2011; COSTA et al., 2016).

Pode-se avançar ainda no entendimento da estrutura das MLG de todos os tecidos estudados neste trabalho, através da avaliação cromatográfica e determinação da proporção entre celotriosil e celotretasil, além de se avaliar a presença de outros sacarídeos com diferentes graus de polimerização, como celobiose ou celopentose na MLG de cana e como essa estrutura interfere na recalcitrância desse material lignocelulósico.

## REFERÊNCIAS

- Aquino, G.S. de, Conti Medina, C. de, Costa, D.C. da, Shahab, M., Santiago, A.D., 2017. Sugarcane straw management and its impact on production and development of ratoons. *Ind. Crops Prod.* 102, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.03.018>
- Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M., 2003. Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 516–546. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938>
- Brienzo, M., Abud, Y., Ferreira, S., Corrales, R.C.N.R., Ferreira-leitão, V.S., Souza, W. De, Sant, C., 2016. Characterization of anatomy, lignin distribution, and response to pretreatments of sugarcane culm node and internode. *Ind. Crops Prod.* 84, 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.01.039>
- Brumbley, S.M., Snyman, S.J., Gnanasambandam, A., Joyce, P., Hermann, S.R., Silva, J.A.G., Mcqualter, R.B., Wang, M., Egan, B.T., Paterson, A.H., Albert, H.H., Moore, P.H., 2008. Sugarcane, in: *Transgenic Sugar, Tuber and Fiber Crops*. Queensland, p. 58.
- Buckeridge, M.S., Rayon, C., Urbanowicz, B., Tiné, M.A.S., Carpita, N.C., 2004. Mixed Linkage (1→3),(1→4)-β-D-Glucans of Grasses. *Cereal Chem.* 81, 115–127. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.2004.81.1.115>
- Burton, R. a, Wilson, S.M., Hrmova, M., Harvey, A.J., Shirley, N.J., Medhurst, A., Stone, B. a, Newbigin, E.J., Bacic, A., Fincher, G.B., 2006. Cellulose Synthase – Like CslF Genes. *Science* (80-. ). 1940, 1940–1942.
- Burton, R.A., Fincher, G.B., 2009. (1,3;1,4)-β-D-glucans in cell walls of the poaceae, lower plants, and fungi: A tale of two linkages. *Mol. Plant* 2, 873–882. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp063>
- Butterfield, B.G., Meylan, B.A., 1980. The Structure of Palmwood, in: *Three-Dimensional Structure of Wood*. Chapman and Hall Ltd., London, pp. 48–55.
- Carpita, N.C., 1996. Structure And Biogenesis Of The Cell Walls Of Grasses. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45, 445–476.
- Chandel, A.K., Silva, S., Carvalho, W., Singh, O. V, 2012. Sugarcane bagasse and leaves : foreseeable biomass of biofuel and bio-products. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1002/jctb.2742>
- Chang, W., Chang, M., Chang, S., Yeh, T., Chang, W., Chang, M., 2013. Chemical Composition and Immunohistological Variations of a Growing Bamboo Shoot Chemical Composition and Immunohistological. *J. Wood Chem. Technol.* 33, 144–155. <https://doi.org/10.1080/02773813.2013.769114>
- Cherubini, F., Ulgiati, S., 2020. Crop residues as raw materials for biorefinery systems – A LCA case study. *Appl. Energy* 87, 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.08.024>
- Christensen, U., Alonso-simon, A., Scheller, H. V, Willats, W.G.T., Harholt, J., 2010. Phytochemistry Characterization of the primary cell walls of seedlings of *Brachypodium distachyon* – A potential model plant for temperate grasses. *Phytochemistry* 71, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.09.019>

- Collucci, D., Bueno, R.C.A., Milagres, A.M.F., Ferraz, A., 2019. Sucrose content , lignocellulose accumulation and in vitro digestibility of sugarcane internodes depicted in relation to internode maturation stage and Saccharum genotypes. *Ind. Crop. Prod.* 139, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111543>
- Conselho Nacional de Abastecimento (CONAB). Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. V. 6 - Safra 2019/20 n.1 - Quarto levantamento. 2019. <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>. (Acesso 06 jan. 2020).
- Costa, T.H.F., Masarin, F., Bonifácio, T.O., Milagres, A.M.F., Ferraz, A., 2013. The enzymatic recalcitrance of internodes of sugar cane hybrids with contrasting lignin contents. *Ind. Crop. Prod.* 51, 202–211. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.078>
- Costa, T.H.F., Vega-Sánchez, M.E., Milagres, A.M.F., Scheller, H. V., Ferraz, A., 2016. Tissue-specific distribution of hemicelluloses in six different sugarcane hybrids as related to cell wall recalcitrance. *Biotechnol. Biofuels* 9, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0513-2>
- Delmer, D.P., Amor, Y., 1995. Cellulose Biosynthesis. *The Plant Cell Wall* 7, 987–1000.
- DelRío, C., Lino, A.G., Colodette, J.L., Lima, C.F., Martínez, T., Lu, F., Ralph, J., Rencoret, J., Guti, A., 2015. Biomass and Bioenergy Differences in the chemical structure of the lignins from sugarcane bagasse and straw. *Biomass and Bioenergy* 81, 322–338. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.07.006>
- Ding, S., Liu, Y., Zeng, Y., Himmel, M.E., 2012. How Does Plant Cell Wall Nanoscale Architecture Correlate with Enzymatic Digestibility? *Science* (80-. ). 113, 1055–1061.
- Doblin, M.S., Pettolino, F.A., Wilson, S.M., Campbell, R., Burton, R.A., Fincher, G.B., Newbigin, E., Bacic, A., 2009. A barley cellulose synthase-like CSLH gene mediates (1,3;1,4)- $\beta$ -D- glucan synthesis in transgenic Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 5996–6001. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902019106>
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Ermawar, R.A., Collins, H.M., Byrt, C.S., Betts, N.S., Henderson, M., Shirley, N.J., Schwerdt, J., Lahnstein, J., Fincher, G.B., Burton, R.A., 2015. Distribution , structure and biosynthetic gene families of ( 1 , 3 ; 1 , 4 ) - b -glucan in Sorghum bicolor. *Journal of Integrative Plant Biology* 57. <https://doi.org/10.1111/jipb.12338>
- Fergus, B.J., Procter, A.R., Scott, J.A.N., Goring, D.A.I., 1969. The Distribution of Lignin in Sprucewood as Determined by Ultraviolet ~ Ieroseopy. *Wood Sci. Technol.* 3, 117–138.
- Ferraz, A., Baeza, J., Rodriguez, J., Freer, J., 2000. Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. *Bioresour. Technol.* 74, 201–212. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00024-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00024-9)
- Ferraz, A., Costa, T.H.F., Siqueira, G., Milagres, A.M.F., 2014. Mapping of Cell Wall Components in Lignified Biomass as a Tool to Understand Recalcitrance, in: Da Silva, S.S., Chandel, A.K. (Eds.), *Biofuels in Brazil*. Springer, New York, pp. 173–202. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-05020-1>

- Ferreira, E.A., Ventrella, M.C., Santos, J.B., Barbosa, M.H.P., Silva, A.A., Procópio, S.O., Silva, E.A.M., 2007. Leaf blade quantitative anatomy of sugarcane cultivars and clones. *Planta Daninha* 25, 25–34. <https://doi.org/10.1590/s0100-83582007000100003>
- Ferreira, S.S., Hotta, C.T., Poelking, V.G. de C., Leite, D.C.C., Buckeridge, M.S., Loureiro, M.E., Barbosa, M.H.P., Carneiro, M.S., Souza, G.M., 2016. Co-expression network analysis reveals transcription factors associated to cell wall biosynthesis in sugarcane. *Plant Mol. Biol.* 91, 15–35. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0434-2>
- Gírio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., 2010. Bioresource Technology Hemicelluloses for fuel ethanol : A review. *Bioresour. Technol.* 101, 4775–4800. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.088>
- Gutiérrez, C.D.B., Serna, D.L.R., Alzate, C.A.C., 2017. A comprehensive review on the implementation of the biorefinery concept in biodiesel production plants. *Biofuel Res. J.* 15, 691–703. <https://doi.org/10.18331/BRJ2017.4.3.6>
- Harholt, J., Jensen, J.K., Sørensen, S.O., Orfila, C., Pauly, M., Scheller, H.V., 2006. ARABINAN DEFICIENT 1 Is a Putative Arabinosyltransferase Involved in Biosynthesis of Pectic Arabinan in *Arabidopsis* 1 [W] 140, 49–58. <https://doi.org/10.1104/pp.105.072744.1>
- Henriksson, G., Lennholm, H., 2009. Cellulose and Carbohydrate Chemistry, in: Ek, M., Gellerstedt, G., Henriksson, G. (Eds.), *Pulp and Paper Chemistry and Technology - Volume I*. de Gruyter, Berlin, pp. 71–99.
- Ishii, T., 1997. Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Sci.* 127, 111–127.
- Johnson, I.D., Spence, M.T.Z., 2010. *A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, Invitrogen (ed.), California, 11th ed.
- Jong, E. De, Jungmeier, G., 2015. Biorefinery Concepts in Comparison to Petrochemical Refineries, in: *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*. Elsevier B.V., pp. 3–33.
- Jung, H.G., Casler, M.D., 2006. Maize Stem Tissues: Impact of Development on Cell Wall Degradability. *Crop Sci.* 46, 1801–1809. <https://doi.org/10.2135/cropsci2006.02-0086>
- Kim, S.J., Zemelis-Durfee, S., Jensen, J.K., Wilkerson, C.G., Keegstra, K., Brandizzi, F., 2018. In the grass species *Brachypodium distachyon*, the production of mixed-linkage (1,3;1,4)- $\beta$ -glucan (MLG) occurs in the Golgi apparatus. *Plant J.* 93, 1062–1075. <https://doi.org/10.1111/tpj.13830>
- Koch, G., Kleist, G., 2001. Application of Scanning UV Microspectrophotometry to Localise Lignins and Application of Scanning UV Microspectrophotometry to Localise Lignins and Phenolic Extractives in Plant Cell Walls 1). *Holzforschung* 55, 563–567. <https://doi.org/10.1515/HF.2001.091>
- Lewis, C.S., 2014. A última batalha in: WMF (Ed.), *As crônicas de Nárnia*. São Paulo. P. 213. ISBN 978-85-7827-909-7
- Lingle, S.E., Thomson, J.L., 2012. Sugarcane Internode Composition During Crop Development. *Bioenergy Res.* 5, 168–178. <https://doi.org/10.1007/s12155-011-9153-3>



- Masarin, F., Gurpilhares, D.B., Baffa, D.C.F., Barbosa, M.H.P., Carvalho, W., Ferraz, A., Milagres, A.M.F., 2011. Chemical composition and enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin content. *Biotechnol. Biofuels* 55, 1–10.
- McCormick, A.J., Cramer, M.D., Watt, D.A., 2006. Sink strength regulates photosynthesis in sugarcane. *New Phytol.* 171, 759–770. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01785.x>
- Megazyme, 2018. MIXED-LINKAGE ICC Standard Method No . 166 Codex Type II Method.
- Meikle, P.J., Hoogenraad, N.J., Clarke, A.E., Stone, B.A., 1994. A (1-3 ,1-4 )-beta-glucan-specific monoclonal antibody and its use in the quantitation and immunocytochemical location of (1-3 ,1-4 )-beta-glucans. *Plant J.* 5, 1–9.
- Moncadam, J., Aristizábal, V., Cardona, A.C., 2016. Design strategies for sustainable biorefineries. *Biochem. Eng. J.* 116, 122–134. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.06.009>
- Moore, P. H. Anatomy and morphology, in Heinz, D. J. (Ed.): *Sugarcane improvement through breeding*. 1. ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1987, p.85-142. ISBN 0-444-42769-4
- O’neill, M. A.; York, W. S. The composition and structure of plant primary cell walls. In: Rose, J. K. C. (Ed.): *The Plant Cell Wall*, 1. ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2003, p.1-55. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0067>
- SanJuán, R., Anzaldo, J., Vargas, J., Turrado, J., Patt, R., 2001. Morphological and Chemical Composition of Pith and Fibers from Mexican Sugarcane Bagasse. *Holz als Rohund Werkst.* 59, 447–450.
- Sant’Anna, C., Costa, L.T., Abud, Y., Biancatto, L., Avio, F.L., Miguens, C., 2013. Sugarcane Cell Wall Structure and Lignin Distribution Investigated by Confocal and Electron Microscopy. *Microsc. Res. Tech.* 76, 829–834. <https://doi.org/10.1002/jemt.22235>
- Scheller, H.V., Ulvskov, P., 2010. Hemicelluloses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 263–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>
- Seidl, P.R., Goulart, A.K., 2016. Pretreatment processes for lignocellulosic biomass conversion to biofuels and bioproducts. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 2, 48-53. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2016.09.003>
- Siqueira, G., Milagres, A.M.F., Carvalho, W., Koch, G., Ferraz, A., 2011. Topochemical distribution of lignin and hydroxycinnamic acids in sugar-cane cell walls and its correlation with the enzymatic hydrolysis of polysaccharides. *Biotechnol. Biofuels* 4, 2–10. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-7>
- Teleman, A., 2009. Hemicelluloses and Pectin, in: Ek, M., Gellerstedt, G., Henriksson, G. (Eds.), *Pulp and Paper Chemistry and Technology - Volume I*. de Gruyter, Berlin, pp. 101–120.
- Vaz, S., 2017. Sugarcane-Biorefinery. *Adv. Biochem. Eng.* 166. <https://doi.org/10.1007/10>
- Vega-Sánchez, M.E., Loqué, D., Lao, J., Catena, M., Verherbruggen, Y., Herter, T., Yang, F., Harholt, J., Ebert, B., Baidoo, E.E.K., Keasling, J.D., Scheller, H. V., Heazlewood, J.L., Ronald, P.C., 2015. Engineering temporal accumulation of a low recalcitrance polysaccharide leads to increased C6 sugar content in plant cell walls. *Plant Biotechnol. J.* 903–914. <https://doi.org/10.1111/pbi.12326>

- Vega-sánchez, M.E., Verhertbruggen, Y., Scheller, H. V, Ronald, P.C., 2013. Abundance of mixed linkage glucan in mature tissues and secondary cell walls of grasses. *Plant Signal. Behav.* 8, 8–11.
- Vogel, J., 2008. Unique aspects of the grass cell wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 301–307. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.002>
- Zeng, M., Ximenes, E., Ladisch, M.R., Mosier, N.S., Vermerris, W., Huang, C., Sherman, D.M., 2012. Tissue-Specific Biomass Recalcitrance in Corn Stover Pretreated With Liquid Hot-Water : Enzymatic Hydrolysis ( Part 1 ). *Biotechnol. Bioeng.* 109, 390–397. <https://doi.org/10.1002/bit.23337>

## APÊNDICE A – PLANILHA ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA A QUANTIFICAÇÃO DE MLG NO HÍBRIDO H89

Cálculo dos valores de P para dados do teor de MLG

medula	medula	medula	medula	interface	interface	interface	interface	cortex	cortex	cortex	cortex
I1	I3	I5	I11	I1	I3	I5	I11	I1	I3	I5	I11
4,94	12,62	13,37	13,12	5,12	12,94	12,26	8,89	3,92	3,43	1,40	0,95
6,88	10,38	14,23	13,72	6,55	13,75	13,16	11,91	3,11	4,34	3,03	1,26
5,02	13,26	16,21	16,21	5,71	13,71	14,38	12,85	3,27	3,82	2,14	1,75
5,6	12,1	14,6	14,3	5,8	13,5	13,3	11,2	3,4	3,9	2,2	1,3
1,1	1,5	1,5	1,6	0,7	0,5	1,1	2,1	0,4	0,5	0,8	0,4
A	Bb	Bb	Bb	E	Fg	Fg	Fg	I	Ij	Ik	Jk
	0,0495531	0,0158548	0,021088	0,603409	0,0045401	0,0137207	0,0401299	0,1172489	0,0499812	0,0070136	0,0251269
		0,1120759	0,1258501	0,0362828	0,3003412	0,3234578	0,6293415	0,0082167	0,0172841	0,0162192	0,0058676
			0,2285326	0,0094152	0,2381884	0,0327341	0,0323333	0,0080717	0,0058825	0,0047449	0,0021129
				0,0134226	0,3908201	0,1064301	0,047694	0,0098675	0,0082507	0,0067143	0,0030607
					0,000986	0,0067374	0,0306965	0,0674156	0,0061629	0,0002926	0,0082771
						0,6904578	0,1401769	0,0025612	0,0002325	0,0006109	0,0001952
							0,0913185	0,0066749	0,0037756	0,0030999	0,0010229
								0,0319049	0,0193578	0,0104764	0,009795
									0,4763703	0,2208404	0,0405482
										0,0154194	0,0128195
											0,1913831

Se valor > 0,05 (VERMELHO) não há diferença, então agrupa-se com mesma letra

Se valor < 0,05 (VERDE) há diferença, então agrupa-se com letra diferente

letra **MAIÚSCULA**: COMPARA OS ENTRENÓS DE UMA REGIÃO FIXA CONTRA O ENTRENÓ 1 DA MESMA REGIÃO

letra **minúscula**: COMPARA OS ENTRENÓS DE UMA REGIÃO FIXA CONTRA OS OUTROS ENTRENÓS DA MESMA REGIÃO

**Figura 27.** Planilha de calculo dos valores de p com IC de 95% para os teores de MLG obtidos nas regiões dos entrenós do Híbrido H89

## APÊNDICE B – PLANILHA ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA A QUANTIFICAÇÃO DE MLG NO HÍBRIDO H140

Cálculo dos valores de P para dados do teor de MLG

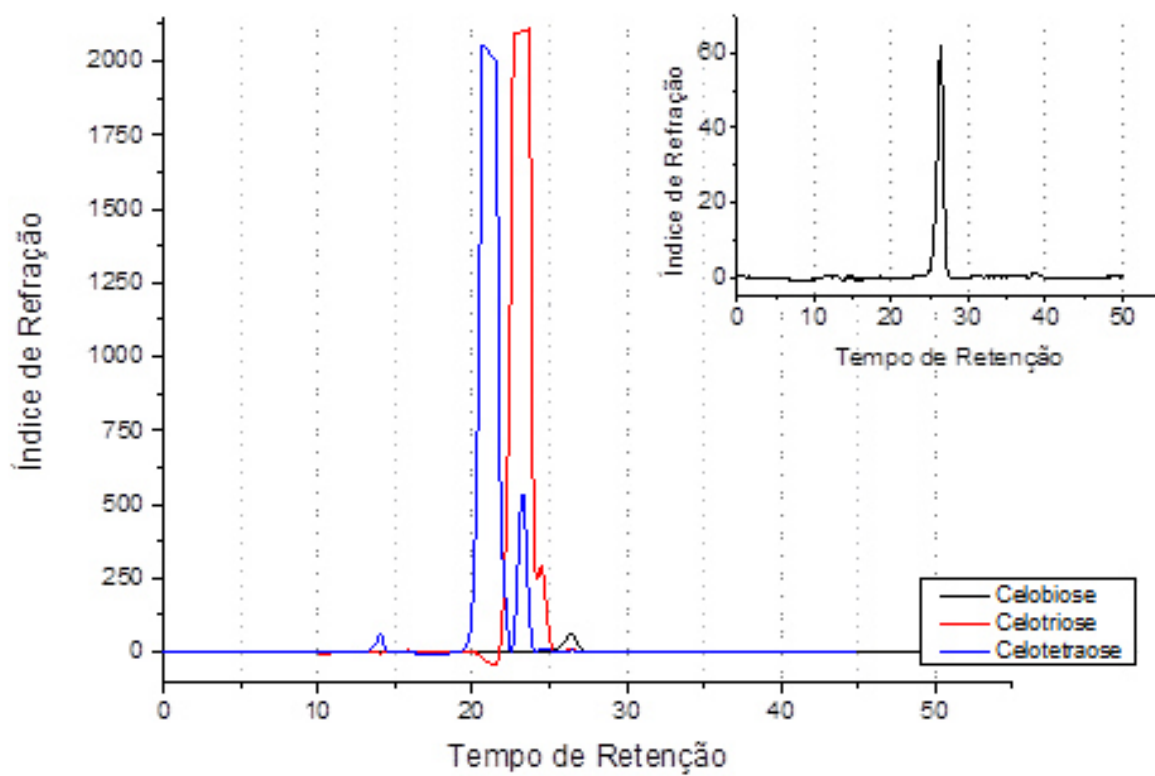
medula	medula	medula	medula	interface	interface	interface	interface	cortex	cortex	cortex	cortex
I1	I3	I5	I11	I1	I3	I5	I11	I1	I3	I5	I11
9,05	6,11	1,77	4,40	8,80	4,59	1,03	2,45	2,78	0,93	0,32	0,17
6,27	7,58	6,22	4,14	7,19	6,80	3,96	2,72	3,33	1,41	0,82	0,27
8,19	6,89	5,08	4,04	7,67	5,26	2,01	2,68	2,82	0,82	0,44	0,37
7,8	6,9	4,4	4,2	7,9	5,5	2,3	2,6	3,0	1,1	0,5	0,3
1,4	0,7	2,3	0,2	0,8	1,1	1,5	0,1	0,3	0,3	0,3	0,1
A	Ab	Ab	Bbc	E	Ef	Fg	Fg	I	Jj	Jk	Jjk
	0,5137224	0,2388228	0,0419888	0,920605	0,2612746	0,0820786	0,0280838	0,0393812	0,0204996	0,0172811	0,0120926
		0,114245	0,0341424	0,3725814	0,0391946	0,0100232	0,006545	0,0051811	0,0028936	0,0020026	0,003614
			0,9196993	0,190974	0,2848488	0,0973854	0,2986625	0,3717779	0,1168201	0,0868747	0,0873534
				0,0111412	0,1988958	0,1812518	0,0136616	0,03461	0,00476	0,003658	0,0016918
					0,1683891	0,0515382	0,0111959	0,0158215	0,0077505	0,0069143	0,0045989
						0,0041739	0,0377316	0,0336561	0,0120872	0,0098779	0,0144062
							0,7527163	0,4498476	0,2120331	0,1261742	0,1344242
								0,1152194	0,010205	0,0022481	0,0005428
									0,0005203	0,0002249	0,0045029
										0,0195798	0,05975
											0,2243781

letra **MAIÚSCULA**: COMPARA OS ENTRENÓS DE UMA REGIÃO FIXA CONTRA O ENTRENÓ 1 DA MESMA REGIÃO

letra **minúscula**: COMPARA OS ENTRENÓS DE UMA REGIÃO FIXA CONTRA OS OUTROS ENTRENÓS DA MESMA REGIÃO

**Figura 28.** Planilha de calculo dos valores de p com IC de 95% para os teores de MLG obtidos nas regiões dos entrenós do Híbrido H140

**APÊNDICE C – CROMATOGRAMAS DE PADRÕES CELOBIOSE,  
CELOTRIOSE E CELOTETRAOSE**



**Figura 29.** Cromatogramas mostrando os tempos de retenção (min) para os padrões de celobiose (preto), celotriose (vermelho) e celotetraose (azul)

## ANEXO A – ESPECTROS DOS FILTROS DE EXCITAÇÃO LED E DO SISTEMA DE ALEXA COMO IMUNOMARCADOR

*U-FUW filter:*

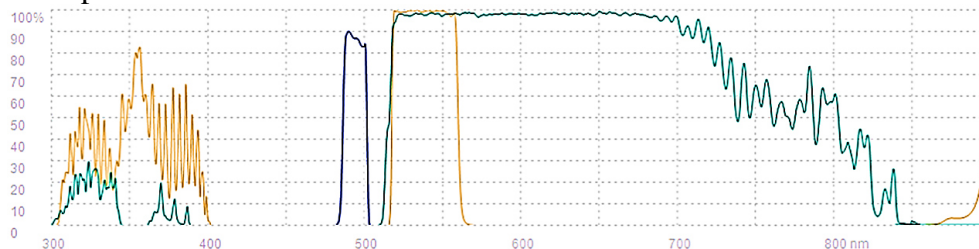
- Excitação – 340-390 nm
- Emissão – a partir de 420 nm
- Espelho dicromático DM 410



**Figura 30.** Espectro excitação/emissão do filtro U-FUW

*EFYP filter:*

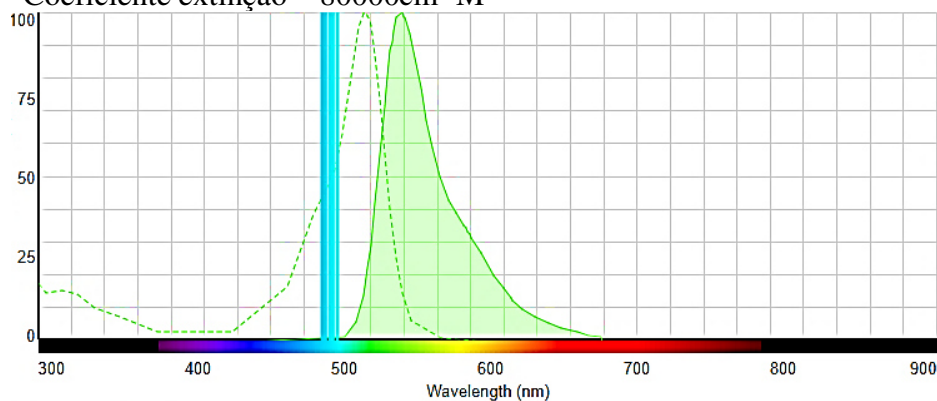
- Excitação – 490-500 nm
- Emissão – 515-560 nm
- Espelho dicromático DM 515



**Figura 31.** Espectro excitação/emissão do filtro EFYP

*AlexaFluor 514 system:*

- Grupo reativo – ester NHS; Reatividade com aminas primárias em proteínas, aminas modificada de oligonucleotídeos
- Excitação/Emissão conjugada – 517/542 nm
- Coeficiente extinção –  $80000\text{cm}^{-1}\text{M}^{-2}$



**Figura 32.** Espectro excitação/emissão do sistema de ALEXA 514, evidenciando a região de excitação do filtro EFYP (~500 nm)