

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



ANA MARIA DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO DA PAREDE CELULAR DE *Saccharum officinarum* L. (cana-de-açúcar) e *Brachiaria decumbens* Stapf (braquiária)

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Ana Maria da Silva e aprovada pela Comissão Julgadora

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para a obtenção do Título de Doutor em Biologia Celular e Estrutural na área de Biologia Celular.

Orientador: Dr. Marcos Silveira Buckeridge
Co-orientador: Dr. Marcos Pereira Marinho Aidar



UNIDADE	3C
CHAMADA	
EX	
MBO BC/	0670L
OC.	16-123-06
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
REÇO	11,00
DATA	11/02/06
CPD	

3.6 Id 374855

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Silva, Ana Maria da

Si387c

Caracterização da parede celular de *Saccharum officinarum* L. (cana-de-açúcar) e *Brachiaria decumbens* Stapf (braquiária) / Ana Maria da Silva. – Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Marcos Silveira Buckeridge.

Co-orientador: Marcos Pereira Marinho Aidar.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de

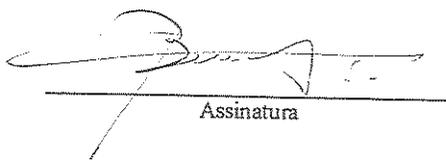
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Glicosídeos. 2. Parede celular vegetal. 3. Oligossacarídeos. I. Marcos Silveira Buckeridge. II. Marcos Pereira Marinho Aidar III. Universidade Estadual

Campinas, 08 de julho de 2005.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Marcos Silveira Buckeridge (Orientador)


Assinatura

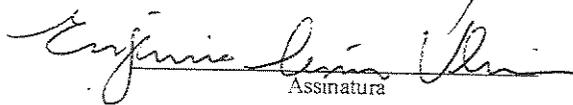
Profa.Dra. Alicia de Francisco


Assinatura

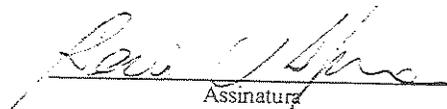
Prof.Dr. Ricardo Antunes de Azevedo


Assinatura

Dr. Eugênio César Ulian


Assinatura

Dr. Denis Ubeda de Lima


Assinatura

Dra. Sonia Machado de Campos Dietrich

Assinatura

Dr. Marco Aurélio Silva Tiné

Assinatura

200601124

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Marcos Buckeridge, por todo o apoio e orientação durante todos esses anos.

Ao Marcos Aidar pela valiosa co-orientação e sincera amizade.

A amiga "Van Van", Vanessa Oliveira pela grande amizade e ajuda na confecção dos gráficos e tabelas.

Ao grupo de parede celular pelo apoio e pelas discussões enriquecedoras durante as reuniões de quarta feira no Chá Bávaro.

Aos amigos e funcionários da Seção de Fisiologia e Bioquímica pelo carinho e apoio ao longo dos anos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Biologia Celular, que me apoiaram em diversos momentos.

A minha família por acreditar no meu sonho, e de me proporcionar condições para poder realizá-lo.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro que tornou possível este trabalho.

ÍNDICE GERAL

RESUMO	7
ABSTRACT	8
INTRODUÇÃO	9
A FAMÍLIA POACEAE.....	9
PAREDE CELULAR.....	11
PAREDE CELULAR EM GRAMÍNEAS.....	14
UTILIDADES DOS B-GLUCANOS E GAXs.....	20
Xiloglucano e outros glucanos.....	24
Pectinas.....	25
Proteínas.....	25
Substâncias aromáticas.....	26
Lignina.....	26
Sílica.....	26
JUSTIFICATIVA	29
DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES	33
CANA-DE-AÇÚCAR.....	33
BRAQUIÁRIA.....	33
OBJETIVOS	34
ARTIGO 1. A PAREDE DA CANA-DEAÇÚCAR: COMPOSIÇÃO, ESTRUTURA E VARIÇÕES DURANTE O DESENVOLVIMENTO	35
RESUMO.....	37
1. INTRODUÇÃO.....	38
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
2.1. Material vegetal.....	39
2.2. Remoção de Açúcares solúveis.....	39
2.3. Remoção do amido das frações de parede celular.....	40
2.4. Remoção de lignina.....	40
2.5. Fracionamento da parede celular.....	40
2.6. Detecção de (1→3),(1→4)-β-glucanos (ou β-glucanos) utilizando digestão com a endo-β-glucanase de <i>Bacillus subtilis</i>	41
2.7. Quantificação de ácidos urônicos.....	41
2.8. Análise dos monossacarídeos neutros da parede celular.....	42
2.9. Análise das ligações glicosídicas.....	43
3. RESULTADOS.....	44
3.2. Composição de monossacarídeos neutros da parede celular de cana-de-açúcar.....	44
3.2. Teores de ácidos urônicos nas paredes celulares de cana-de-açúcar.....	45
3.4. Análise dos β-glucanos por liberação enzimática de oligossacarídeos.....	45
3.5. Alterações estruturais na parede celular de cana-de-açúcar durante o desenvolvimento.....	46
4. DISCUSSÃO.....	49

4.1 Implicações da composição e estrutura da parede celular de cana-de-açúcar para a obtenção de um modelo de parede celular em Poaceae.....	49
4.2 Alterações na parede celular da cana durante o desenvolvimento de flores e folhas.....	52
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

ARTIGO 2. CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE GLUCANOS DE CADEIA MISTA AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO FOLIAR EM *BRACHLARIA DECUMBENS* STAPF..... 64

RESUMO.....	65
1. INTRODUÇÃO.....	68
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	70
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
4. LITERATURA CITADA.....	76
DISCUSSÃO GERAL.....	87
PAREDE CELULAR – DICOTILEDÔNEAS X MONOCOTILEDÔNEAS.....	86
INTERAÇÃO INTERMOLECULAR E ORIENTAÇÃO DAS MICROFIBRILAS DE CELULOSE.....	89
CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE EXPRESSÃO GÊNICA E A OCORRÊNCIA DOS POLÍMEROS.....	91
PERSPECTIVAS PARA A APLICAÇÃO TECNOLÓGICA DE β -GLUCANOS E GAXs.....	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

RESUMO

A partir de análises bioquímicas caracterizamos os polissacarídeos de parede celular de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) (Artigo I), acompanhando a dinâmica destes polímeros ao longo do desenvolvimento da planta. Correlacionamos a dinâmica do desenvolvimento com os dados de expressão gênica das enzimas responsáveis pelo metabolismo da parede celular. Os resultados obtidos a partir da análise de monossacarídeos e de análise estrutural sugerem que os polissacarídeos encontrados na parede celular da cana são os arabinoxilanos, β -glucanos, mananos e pectinas com ramificações neutras compostas principalmente de arabinanos (1 \rightarrow 5) ligados. A análise dos perfis dos oligossacarídeos de β -glucanos dos vários tecidos de cana mostrou que nos diferentes órgãos a razão molar entre tri e tetrassacarídeos se manteve constante. Os eventos observados nas folhas foram similares aos observados nas panículas, com alterações nas frações neutras das pectinas e nos mananos e aumento no nível de ramificações dos xilanos. A extração de β -glucanos nas frações NaOH 0,1M e 4M sugere que nestas frações foram solubilizados os β -glucanos ligados aos arabinoxilanos através de interação intermolecular não covalente. Em conjunto com a análise de monossacarídeos por Cromatografia de troca iônica de alto desempenho com detecção de pulso amperométrico (HPAEC-PAD) e análise de ligações glicosídicas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), foi possível acompanhar a dinâmica dos polissacarídeos da parede celular ao longo do desenvolvimento. Em *Brachiaria decumbens* (Artigo II) constatou-se modificações quantitativas e qualitativas nos β -glucanos ao longo do desenvolvimento foliar. A partir das análises dos oligossacarídeos de β -glucanos através de Cromatografia de troca iônica de alto desempenho com detecção por pulso amperométrico (HPAEC-PAD), verificou-se que em folhas maiores que 30cm a razão tri: tetrassacarídeo sofreu alteração, o que poderia estar relacionado com o fim do período de alongamento celular e crescimento do tecido provocando alteração na estrutura do β -glucano e desta forma promovendo a forte interação com os glucuronoarabinoxilanos (GAXs).

Palavras chaves: interação intermolecular, ligações glicosídicas, oligossacarídeos, parede celular

ABSTRACT

The dynamics of cell wall of sugar cane (*Saccharum officinarum*) was characterized by biochemical analysis (Paper I). The expression of genes that encoding enzymes responsible for cell wall metabolism were correlated with plant development. The results from monosaccharide and structural analysis suggest that the sugar cane cell wall is composed of the polysaccharides arabinoxylans, β -glucans, mannans and pectins with neutral branching galactan. The oligosaccharide profile of β -glucans from several sugar cane tissues indicated a similar ratio between tri and tetrasaccharides. Leaf and inflorescence showed similar alterations regarding pectin neutral fractions and mannans and an increase of xylan branching. The β -glucans fractions produced with 0.1 and 4M NaOH, suggest the solubilization of glucans bound to arabinoxylans by non covalent intermolecular bonds. Together with monosaccharide analyses by (HPAEC-PAD) and glycoside linkages by gas chromatography-mass spectrometry, it was possible to follow the dynamic changes in cell wall polysaccharides along sugar cane development. The structure and composition is consistent with the presence of a (Poaceae-like) type II cell wall. In *Brachiaria decumbens* (Paper II), an African grass species, quantitative and qualitative changes in β -glucans were followed along leaf development. β -glucan analysis by HPAEC-PAD revealed that the ratio tri:tetrasaccharides increased in leaves longer than 30cm. These observations indicate that proportionally more β -(1 \rightarrow 3) linkages are made during development, suggesting that more soluble and possibly less interactive β -glucans are made in the wall during leaf expansion. Than at the end of the growth period.

Key words: cell wall, glycoside linkage, intermolecular interaction, oligosaccharides

INTRODUÇÃO

A FAMÍLIA POACEAE

Também conhecida como Gramineae, a família Poaceae é uma das maiores entre as Angiospermas, com cerca de 10.000 espécies, distribuídas em aproximadamente 700 gêneros (Watson & Dalwitz 1992). As Poaceae incluem plantas de grande importância econômica e ecológica, sendo citados para o Brasil, cerca de 197 gêneros e 1368 espécies (Burman 1985).

A distribuição dos indivíduos dessa família é ampla, podendo ocorrer em diversas condições ambientais. Existem relatos de espécies de Poaceae em todos os continentes, incluindo o continente Antártico (Kellog 1998), o que se deve, em parte, à diversidade genética encontrada na família. Segundo Renvoize & Clayton (1992) essa diversidade é resultado de um processo evolutivo onde a combinação de caracteres morfológicos, ecológicos e fisiológicos favorecem a exploração de diferentes tipos de ambientes pela família, principalmente os abertos.

Um dos aspectos que evidencia a diversidade fisiológica na família Poaceae é a presença de uma via alternativa de fotossíntese, a via C4 ou o ciclo de Hatch-Slack. Esta via metabólica está associada à ocorrência de anatomia foliar do tipo “Kranz”, onde a bainha vascular possui células radialmente dispostas e ricas em cloroplastos.

A via de fotossíntese C4 é referida como a mais eficiente, principalmente em plantas de ambientes com alta irradiância e temperatura mais altas (Percy & Ehleninger 1984). Nessas condições há maior produção de biomassa, quando comparada às plantas com metabolismo fotossintético C3 além da utilização mais eficiente de água e CO₂ (Salisbury & Ross 1992). Espécies

com metabolismo fotossintético do tipo C4 ocorrem abundantemente em savanas tropicais e vegetações arbustivas de regiões semiáridas.

A presença de sistema radicular fasciculado e a produção de estolões e rizomas são características que possibilitam sua atuação na estabilidade de solos, além do crescimento rápido favorecido pela presença de tecidos meristemáticos (Chapman 1996). Estas características tornam as gramíneas apropriadas para o início do processo de recuperação em áreas degradadas.

Entre as espécies de gramíneas cultivadas, estão os cereais, principalmente arroz, trigo, aveia, milho, as forrageiras e a cana-de-açúcar, fato que as coloca em posição de destaque na alimentação do homem e dos animais. Portanto o conhecimento científico sobre a família é essencial, pois significa a compreensão do funcionamento de grande parte das culturas que servem de alimento no mundo (Kellog 1998).

O interesse econômico no cultivo de gramíneas é dependente do bom desempenho fotossintético, e conseqüentemente da produção e acúmulo de carboidratos, seja na forma de amido dos cereais, de sacarose da cana-de-açúcar (produção de açúcar e álcool), fibras dietéticas a partir de endosperma de grãos de aveia, e também produção primária para a alimentação dos herbívoros (Chapman 1996).

Além disso, a fermentação dos compostos presentes nos grãos de cevada ou de centeio é utilizada na produção de cerveja e uísque, respectivamente. Paralelamente no caso de cana-de-açúcar, a fabricação de álcool representa uma alternativa interessante como combustível renovável, levando à diminuição na utilização de combustíveis fósseis não renováveis, que geram gases do efeito estufa e vêm causando mudanças climáticas em todo o planeta (Buckeridge & Aidar 2002).

Igualmente a cana-de-açúcar, *Brachiaria decumbens* apresenta um grande valor econômico. Esta espécie forrageira é uma das mais cultivadas para alimentação do gado leiteiro e de corte do Brasil. Na região do cerrado brasileiro estima-se que 50 milhões de ha são cultivados com o gênero

Brachiaria (Bonfim *et al.* 1993). Além disso, por apresentar crescimento rápido, *Brachiaria decumbens* representa um modelo interessante de estudo da relação entre polissacarídeos de parede celular e crescimento e/ou desenvolvimento, uma vez que se especula que polissacarídeos, por exemplo, os β -glucanos (glucanos de cadeia mista) poderiam ter efeitos sobre o crescimento rápido das gramíneas.

Compreender a dinâmica de crescimento de *B. decumbens* possibilitaria o desenvolvimento técnicas de controle desta espécie, principalmente nas áreas de conservação do cerrado paulista, por exemplo, na fazenda Campininha em Moji Guaçu, onde *B. decumbens* compete com espécies nativas como *Echinolaena inflexa*.

PAREDE CELULAR

Dois tipos de parede celular são encontrados em fanerógamas: paredes primárias e paredes secundárias. As paredes primárias são produzidas por células em crescimento, portanto podem se alongar, enquanto as paredes secundárias não têm essa capacidade (Hayashi 1989).

Nos modelos mais recentes de parede celular, propõe-se que os polímeros formem domínios independentes: celulose-hemicelulose, pectinas e proteínas (McCann & Roberts 1991, Carpita & Gibeauat 1993) (Figura 1).

Enquanto o domínio pectico determina o grau de porosidade e fornece moléculas sinalizadoras para disparar mecanismos de defesa em plantas, o domínio celulose-hemicelulose influencia na forma celular; pois as hemiceluloses interagem especificamente com a celulose, orientando as microfibrilas durante o processo de biossíntese e determinando também a orientação do crescimento. As proteínas desempenham papel estrutural na parede celular.

O principal polissacarídeo da parede celular vegetal é a celulose, um polímero linear formado por resíduos de glucose ligados entre si por ligações do tipo β -(1 \rightarrow 4). Várias moléculas desse

polissacarídeo interagem entre si através de pontes de hidrogênio, de maneira a formar aglomerados moleculares com estrutura paracristalina, denominadas microfibrilas. Acredita-se que a orientação dessas fibrilas tenha papel importante no crescimento celular por alongamento e também na forma celular.

A orientação das microfibrilas é coordenada pelas hemiceluloses, cuja composição e estrutura variam conforme o grupo taxonômico ao qual a planta pertence. Em estudos de orientação de microfibrilas de celulose em raízes de 57 espécies fanerógamas, foi observado que em Poales, as microfibrilas de celulose apresentam orientação longitudinal, enquanto que nas demais fanerógamas a orientação é transversal, com exceção das Arecaceas, que apresentam orientação ao acaso (Kerstens & Verbelen 2002). A orientação das microfibrilas de celulose pode ser uma ferramenta para estudo de biosistemática, entretanto é difícil determinar a relação entre a orientação das microfibrilas de celulose e a organização da estrutura bioquímica da parede celular.

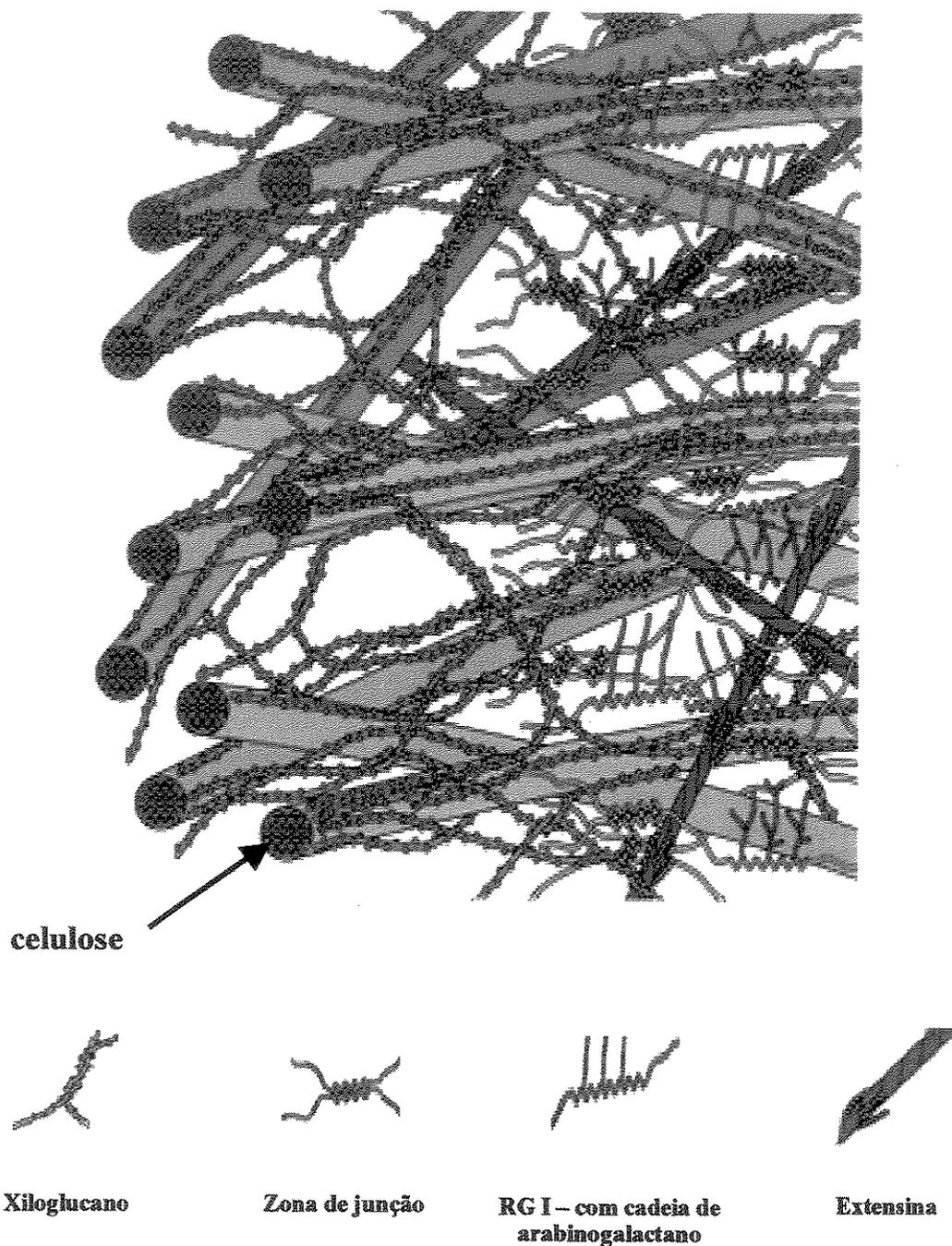


Figura 1 - Modelo de organização estrutural de paredes celulares encontradas em dicotiledôneas e monocotiledôneas não gramíneas, em expansão, ilustrando seus principais componentes, conforme proposto por Carpita e Gibeaut (1993). RGI: rammogalacturonano I.

PAREDE CELULAR EM GRAMÍNEAS

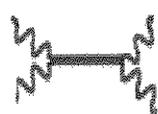
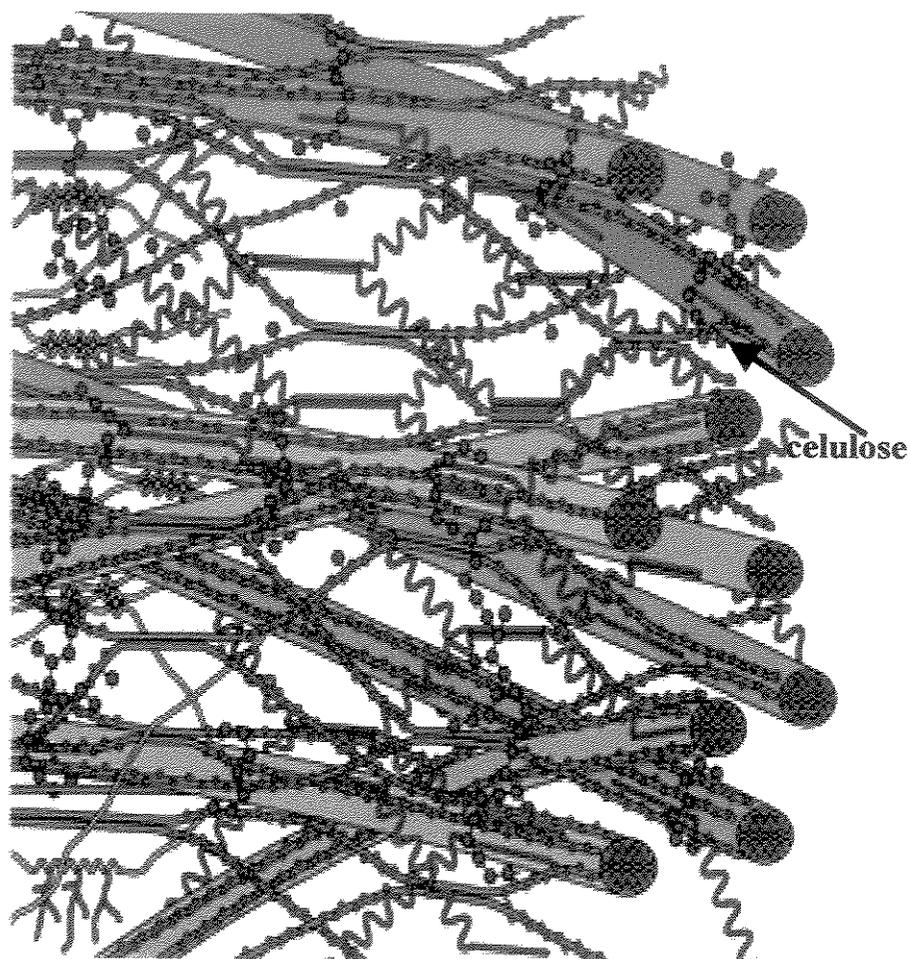
Um modelo que diferencia a composição química de parede celular de Dicotiledôneas e Monocotiledôneas foi proposto há mais de 20 anos (Darvill *et al* 1980). Talvez pela grande importância econômica dos cereais, a maioria das monocotiledôneas estudadas eram gramíneas (Carpita 1996).

Segundo Carpita & Gibeaut (1993) gramíneas e cereais apresentam parede do tipo II (Figura 2). Em gramíneas como em todas as Comelinoideas-monocotiledôneas (Bromeliaceae, Arecaceae, Ciperaceae) os glucuronoarabinoxilanos (GAXs) constituem a hemicelulose principal, apresentando ligações com ácidos ferúlicos que interagem com as microfibrilas de celulose, formando o domínio celulose-hemicelulose da parede celular (Buckeridge *et al* 2004). Esses polissacarídeos são constituídos por uma cadeia carbônica principal de resíduos de xilose β -(1 \rightarrow 4) com ramificações de arabinose através de ligações α (1 \rightarrow 2) e/ou α (1 \rightarrow 3), e de ácido glucurônico através de ligação α (1 \rightarrow 6) (figura 3). Os GAXs, em conjunto com a celulose e os β -glucanos, constituem o arcabouço das paredes celulares das gramíneas, formando parte do esqueleto da parede, o qual mantém a integridade do tecido (Fincher & Stone 1986).

A camada de aleurona da maioria dos cereais é composta predominantemente de GAXs (60-70%) com exceção de cevada (20%) e arroz (40%) (Izydorczyk 1995).

Os arabinoxilanos são solúveis em água e em álcali. O grau de ramificação do polímero é um fator que determina a solubilidade, ou seja, quanto maior o número de ramificações, mais solúvel é o polímero. Um arabinoxilano com razão Ara:Xil <0.69 é considerado insolúvel em soluções alcalinas (Roubreks *et al* 2000).

Em paredes de vasos condutores, os arabinoxilanos são menos ramificados, enquanto que os que constituem as paredes celulares de grãos e tecidos jovens apresentam grau de ramificação elevado (Storsley *et al* 2003).



Betaglucano



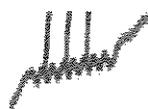
GAX



xiloglucano



Zona de junção



RG I – com cadeia de arabinogalactano

Figura 2 – Modelo de organização estrutural de paredes celulares encontradas em gramíneas, ilustrando seus principais componentes, conforme proposto por Carpita e Gibeaut (1993). GAX: glucuronoarabinoxilano, RG – I: rammogalacturonano I.

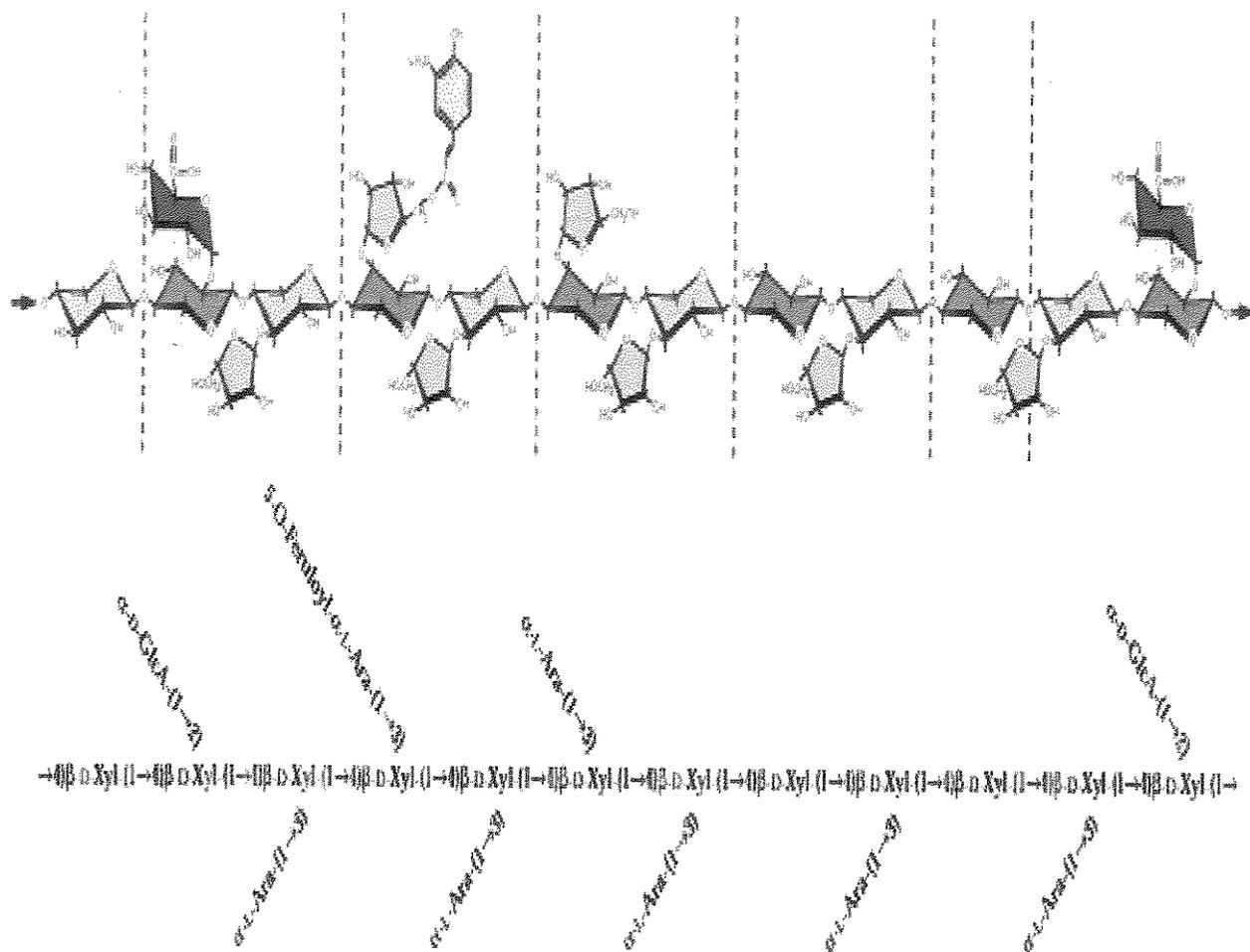


Figura 3 - Glucuronoarabinoxilano presente em gramíneas e na maioria das Comelinóides (Buchanan *et al.* 2000).

Os estudos sobre a estrutura molecular dos arabinoxilanos, utilizando as técnicas como Ressonância Nuclear Magnética (NMR) e análises de metilação mostraram diferentes fragmentos de oligossacarídeos de GAXs não substituídos, monosubstituídos e disubstituídos de trigo, cevada e triticale, respectivamente (Anderson *et al.* 1994, Oscarsson *et al.* 1996).

Tem sido proposto que algumas características dos arabinoxilanos facilitam interações intermoleculares entre esses polímeros com outros polissacarídeos (β -glucanos e celulose), formando um composito da parede celular (Izydorczyk & Biliaderis 1992). Além disso, a presença de ácidos ferúlicos ligados aos arabinoxilanos favorece as interações covalentes entre polissacarídeos-polissacarídeos ou polissacarídeos-proteínas (Fincher & Stone 1986).

As diferentes características moleculares dos arabinoxilanos, por exemplo: grau de ramificação, arranjo espacial dos resíduos de arabinose ao longo da cadeia principal ou conteúdo de ácidos ferúlicos podem influenciar nas propriedades físico-químicas do polímero, como a viscoelasticidade, resistência, entre outras características (MacGregor & Fincher 1993).

Aparentemente, os GAXs surgiram ao longo da evolução em monocotiledôneas como provável substituto do xiloglucano na função de alinhamento das microfibrilas de celulose (Buckeridge *et al.* 2004). Enquanto os GAXs correspondem a 70% do total da parede, as pectinas não ultrapassam 5%. Em função disso, tem sido proposto que os GAXs compartilham com as pectinas a função de porosidade e também a manutenção de um ambiente iônico na parede celular (Buckeridge *et al.* 2004), bem como a inibição intercelular de formação de gelo, principalmente nas culturas de inverno (Kindel *et al.* 1989).

Outra característica muito importante das gramíneas, e de outras Poales (*sensu* Dahlgren 1985), adquirida ao longo da evolução, é a presença de β -glucanos (figura 4), um polímero linear formado por resíduos de glucoses ligadas entre si por ligações β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 4) (figura 5). A

estrutura dos β -glucanos foi definida a partir de uma endoglucanase de *Bacillus subtilis* (Woodward *et al.* 1985) que hidrolisa apenas as ligações β -(1 \rightarrow 4) da molécula precedida de uma ligação β -(1 \rightarrow 3) (Parrish *et al.* 1960), produzindo blocos constitutivos característicos formados por glucoses ligadas β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 4). Os trissacarídeos são do tipo Glc(1 \rightarrow 4)Glc(1 \rightarrow 3)Glc e os tetrassacarídeos são Glc(1 \rightarrow 4)Glc(1 \rightarrow 4)Glc(1 \rightarrow 3)Glc. Cerca de 70% desses oligossacarídeos são trissacarídeos. Nas gramíneas, a razão entre trissacarídeos e tetrassacarídeos varia de 2:1 à 3:1 dependendo da espécie. Esta parece ser uma característica que durante a evolução não sofreu alterações entre os diferentes gêneros, tratando-se de um mecanismo de biossíntese muito conservado, como proposto por Buckeridge *et al.* (1999).

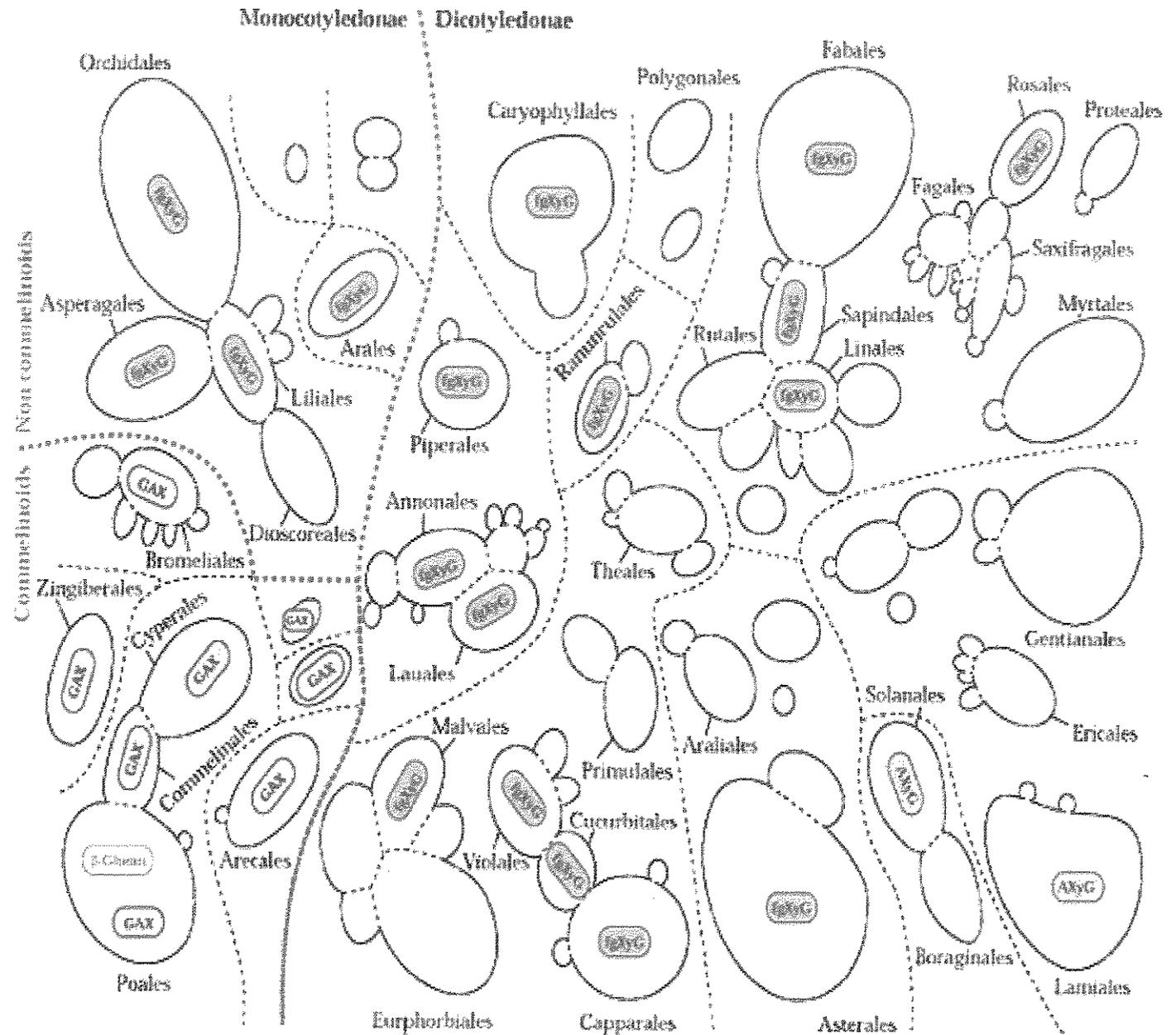


Figura 4 - Ordens de Angiospermas, divididas em dicotiledôneas e monocotiledôneas, com descrições simbólicas dos tipos de polímeros presentes (Carpita et al. 1996). Na figura observa-se a presença exclusiva de β -glucanos na ordem Poales.

Em nenhum outro grupo taxonômico esse polissacarídeo foi encontrado. Entretanto, um similar foi encontrado em *Cetraria islandica* (Wood *et al.* 1994), um fungo liquenizado originário da Antártica. Nesse organismo 86% dos oligossacarídeos são trissacarídeos, e a razão molar entre tri e tetra é de 1:1, o que não se repete, por exemplo, em Poales.

Os β -glucanos são abundantes em paredes celulares de células endospérmicas de sementes de gramíneas, podendo compor 70% desses tecidos (Fincher & Stone 1986). Em plântulas de milho, por exemplo, a quantidade de β -glucanos aumenta durante a expansão dos coleótilos e das folhas (Carpita 1984) e decresce quando o crescimento cessa (Carpita & Kanabus 1998). Em células meristemáticas este polímero é raro, mas em paredes de células em alongamento aparecem em grandes quantidades, coincidindo com a razão máxima de alongamento (Kim *et al* 2000).

UTILIDADES DOS β -GLUCANOS E GAXs

Os GAXs, além de desempenharem funções importantes na parede celular das monocotiledôneas devido as suas características físico-químicas, sendo ainda de grande importância em alguns processos industriais, por exemplo, na produção de cerveja esses podem provocar a turbidez do produto (Izydorczyk 2000), um fator que sempre foi atribuído aos β -glucanos.

Para ciências de alimentos, os arabinoxilanos representam um grande potencial como fibras alimentares. Oligossacarídeos de arabinoxilanos de sabugo de milho, produzidos por uma endoxilanase de *Trichoderma viride*, vêm sendo largamente comercializados como alimento funcional, principalmente pelos japoneses (Brambilla 2004).

Em trigo e centeio, estudos com GAXs têm demonstrado que esses polímeros também são capazes de formar soluções viscosas, e que essa viscosidade diminuiria o nível de colesterol no

sangue. É possível que os arabinosilanos tenham efeitos similares aos dos β -glucanos quando ingeridos na dieta, entretanto, isso ainda não está bem esclarecido (Storsley *et al.* 2003).

De Paula *et al.* (2005) mostraram que o efeito hipoglicemiante de extrato de *Rhynchelytrum repens* (Willd.) C. E. Hubb, injetado em ratos diabéticos, provavelmente seria resultado de uma ação conjunta de glucanos de cadeia mista e arabinosilanos. Os compostos fenólicos que se encontram ligados aos arabinosilanos parecem apresentar efeitos anticancerígenos e hipoglicemiantes. Rong *et al.* (1997) demonstraram em estudos com cobaias, que o gama oryzanol (composto fenólico) apresenta ação antitumoral. Akihisa *et al.* (2000) também em cobaias, relataram o efeito do gama oryzanol na diminuição dos níveis de colesterol no sangue e de lipídeos nas paredes da aorta.

Os β -glucanos têm gerado grande interesse econômico, devido às respostas fisiológicas que produzem como fibra dietética. Quando ingeridos, os β -glucanos aumentam a sensibilidade à insulina (Yokohama *et al.* 1997) e a tolerância à glucose, alterações hormonais que podem contribuir com os efeitos hipocolesterômicos das fibras, reduzindo a absorção de lipídeos (de Francisco & de Sá 2001). De Paula *et al.* (2005) demonstraram que quando injetados intraperitonealmente, os β -glucanos produzem diminuição significativa dos açúcares no aparelho circulatório de ratos.

Existem também evidências de que os β -glucanos agem como protetores ao desenvolvimento de câncer de cólon (Anderson & Chen 1986, McDonald *et al.* 1992, Wood 1993). Através de sua fermentação até ácidos graxos de cadeia curta pela microflora, há uma diminuição do pH, o que inibe a conversão bacteriana dos ácidos biliares em compostos secundários com atividade carcinogênica (de Francisco & de Sá 2001).

Um outro aspecto biotecnológico associado aos β -glucanos está relacionado à indústria de cerveja, pois durante a sua fabricação, a hidrólise incompleta dos β -glucanos prejudica o processo de filtração do produto, tornando-o escuro, prejudicando sua qualidade (Fincher & Stone 1986). No

caso da produção de cerveja, grandes esforços têm sido realizados para tentar diminuir este problema. Um deles é a busca de novas variedades de cevada com teores reduzidos de β -glucanos. Através de melhoramento genético tem se conseguido bons resultados, por exemplo as variedades IBON-1069 e MN684 que apresentaram baixo teor de β -glucanos próximo a 2% (A. M. Silva, A. De Francisco & M.S. Buckeridge, resultados não publicados). Os β -glucanos também têm causado sérios problemas durante a filtração do caldo de cana em usinas de açúcar, uma vez que esses entopem os filtros, causando grandes prejuízos a indústria sucro-alcóoleira (V.R. Panegassi, G.E.Serra & M.S. Buckeridge, resultados não publicados).

Xiloglucano e outros glicanos

Xiloglucano é uma das principais hemiceluloses de dicotiledôneas. Sua cadeia principal é composta de glucose ligada $\beta(1\rightarrow4)$. Esta cadeia possui ramificações regulares com xilose $\alpha(1\rightarrow6)$ ligadas e algumas destas xiloses possuem ainda ramificações com galactose ligada. Em paredes celulares primárias pode haver ainda uma fucose ligada à galactose através de ligações $\alpha(1\rightarrow2)$ (Tiné 2002).

Baixas proporções de xiloglucanos são encontradas em gramíneas. Aparentemente os xiloglucanos apresentam a mesma estrutura química daqueles encontrados em paredes de dicotiledôneas (parede tipo I). Em células meristemáticas de coleótilos de milho, a deposição de xiloglucanos antecede a de GAX e de β -glucanos (Carpita 1996). Xiloglucanos fucosilados foram encontrados em suspensões celulares de *Fescue* (Mcdougall & Fry 1994), mas em plantas desenvolvidas este polissacarídeo nunca foi detectado. Outros glucanos como glucomananos, galactoglucomananos e mananos podem ser encontrados em gramíneas, principalmente em tecidos em crescimento.

Pectinas

As gramíneas apresentam o ácido poligalacturônico e o ramnogalacturonano do tipo I (RGI) (Figura 6) como os principais polissacarídeos pécticos, mas em baixa quantidade. Os ácidos poligalacturônicos são formados por uma cadeia linear de $\alpha(1\rightarrow4)$ -ácido galacturônico, e os ramnogalacturonanos são heteropolímeros, formados por uma cadeia de dissacarídeos $\alpha(1\rightarrow2)$ -ramnose, $\alpha(1\rightarrow4)$ -ácido galacturônico. As paredes de gramíneas apresentam arabinanos, galactanos, e arabinogalactanos altamente ramificados e de diferentes tamanhos, ligados aos RGI (Shibuya & Nakane 1984, Carpita 1989).

Proteínas

Em parede celular de gramíneas encontram-se as proteínas estruturais THRGP (glicoproteínas ricas em treonina e hidroxiprolina) (Hood *et al.* 1991) como homólogas as HRGP (glicoproteínas ricas em hidroxiprolina) (proteínas típicas de parede do tipo I), principalmente nas paredes celulares dos tecidos vasculares de milho (Smallwood *et al.* 1995). Outra classe de proteínas estruturais compreende as GRPs (proteínas ricas em glicina), encontradas somente em tecido vascular de arroz e cevada (Lei & Wu 1991). Estas proteínas ainda não têm funções claramente definidas cientificamente, mas acredita-se que teriam um papel estrutural e também nos mecanismos de defesa das plantas.

Proteínas não estruturais como enzimas também são encontradas em parede celular de gramíneas. Estas são hidrolases, transferases, esterases, peroxidases entre outras, as quais atuam nos processos de modificação da parede, em diferentes estágios do crescimento e desenvolvimento da planta. Por exemplo, as expansinas α e γ encontradas em pólen de milho, as quais segundo Cosgrove (1999) atuam diretamente no afrouxamento da parede celular, desligando as pontes de hidrogênio entre celulose e hemicelulose, facilitando desta forma o acesso das hidrolases.

Substâncias aromáticas

As paredes não lignificadas de gramíneas são ricas em compostos fenólicos. Estes compostos, em conjunto com os glucuronoarabinoxilanos, parecem desempenhar função análoga à das proteínas estruturais na arquitetura da parede de gramíneas (Carpita 1996). Eles formam pontes de ligações covalentes entre as cadeias dos polissacarídeos, tornando a parede celular menos flexível. Tal diminuição da flexibilidade seria mais amena do que ocorre quando as paredes se tornam lignificadas (ver abaixo). Acredita-se também que os ácidos ferúlicos nas paredes celulares podem desempenhar a função de proteção contra radiação ultravioleta, principalmente de plantas que crescem em ambientes abertos, como gramíneas (Landry 1995, Lavola *et al* 1997).

Lignina

Os principais monômeros que compõem a lignina em gramíneas são os alcóois coniferil e sinapil, com uma pequena quantidade de p -OH álcool coumaril (Carpita 1996). A lignina é considerada um elemento de lacre nas paredes celulares, ou seja, a lignina é depositada quando cessa o crescimento da planta (Carpita & MacCann 2001). Não aprofundamos muito na área das ligninas, pois elas não serão abordadas neste trabalho.

Sílica

A sílica é um componente muito abundante em gramíneas, principalmente nas inclusões nas células da epiderme, periderme, e outras células especializadas de raiz, rizoma e ramos aéreos (Parry *et al.* 1984). Muito pouco é conhecido sobre a interação de sílica com componentes de parede celular (Carpita, 1996). Alguns trabalhos relatam a interação de sílica com componentes de paredes

em diatomáceas (Kröger *et al.* 1994). Igualmente a todas as fanerógamas, as gramíneas apresentam cutina, suberina e ceras nas células especializadas (Bacic *et al.* 1981).

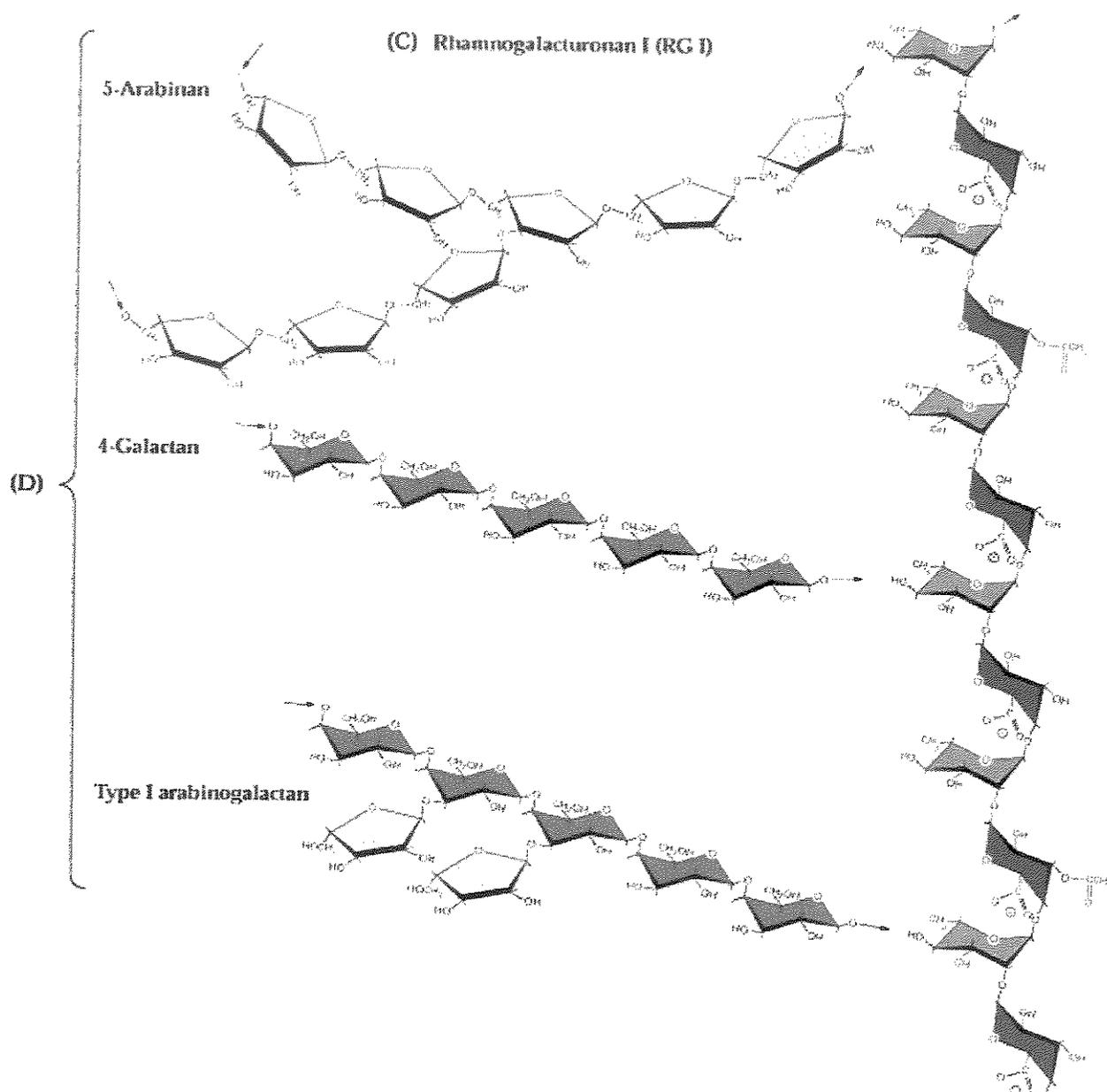


Figura 6 – Polissacarídeos pécicos encontrados nas gramíneas em grande quantidade
(Buchanan *et al.* 2000)

JUSTIFICATIVA

Existem poucos trabalhos publicados sobre os polissacarídeos de parede celular de cana-de-açúcar. Reicher *et al.* (1994), numa análise comparativa, demonstraram que xilanos de colmo de cana-de-açúcar apresentam estruturas semelhantes aos xilanos de *Mimosa scabrella*, uma espécie da família Leguminosae. Por outro lado, esse resultado foi muito diferente do encontrado por Saavedra *et al.* (1988) nas variedades cubanas.

Roberts *et al.* (1976), no estudo de polissacarídeos de cana-de-açúcar, abordaram os problemas gerados por esses polímeros (conhecidos pelo termo de Indigeneous Polysaccharides) na fabricação de açúcar e álcool. Entretanto, nenhum trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar os polissacarídeos da parede celular desta espécie como um todo.

As ferramentas de biologia molecular têm sido produtivas para estudar e caracterizar sintases de polissacarídeos de parede celular. O primeiro gene clonado para celulose-sintase foi a partir da bactéria *Acetobacter xyliinum*. Utilizando as seqüências deduzidas de aminoácidos, Pear *et al.* (1996), conseguiram encontrar seqüências conservadas similares em algodão utilizando um programa EST (etiquetas de seqüências transcritas) para esta espécie. Com o advento dos sequenciamentos dos genomas de diversas espécies (milho, arroz, *Arabidopsis* e cana-de-açúcar) várias famílias de genes suspeitos de estarem relacionados à síntese de celulose, os "CesA" foram encontrados (Hooland *et al.* 2000).

O programa Genoma da cana (SUCEST-FAPESP) produziu aproximadamente 300 mil fragmentos de genes expressos nesta planta (Arruda 2001). Após o sequenciamento, 74 grupos de "data mining" estudaram e identificaram genes importantes para diversos aspectos do crescimento, desenvolvimento e defesa em cana-de-açúcar.

Utilizando a técnica de Blast como ferramenta, Lima *et al.* (2001) estudaram os genes relacionados à parede celular de cana-de-açúcar. Neste trabalho, foram descobertos 459 genes potenciais relacionados ao metabolismo da parede celular, compreendendo cerca de 1,1% de todos os genes encontrados no programa genoma da Cana (SUCEST-FAPESP). Os genes relacionados à síntese de celulose, os *CesA*, foram os mais abundantes. A partir do mapa de superfície construído (Figura 7) naquele trabalho, foi possível demonstrar diferentes graus de expressão destes genes ao longo do desenvolvimento da cana.

É amplamente conhecido que os *CesA* compreendem uma grande família gênica, e a esta família pertence à subfamília dos *Csl*, a qual se acredita ser a responsável pela expressão gênica de outros polissacarídeos de parede, por exemplo, os xiloglucanos, arabinoxilanos, β -glucanos, e outros.

O padrão da expressão de genes relacionados à parede celular, mostrado no mapa de superfície (figura 7) refletiu bem as características fisiológicas para cada tecido. Como os carboidratos são os principais componentes da parede celular, compreender as mudanças químicas que ocorrem nos diferentes tecidos durante o crescimento e desenvolvimento da planta, é um dos caminhos importantes para compreender como diversos processos fisiológicos relacionados ao crescimento e desenvolvimento são controlados na planta (Lima *et al* 2001).

A caracterização da expressão gênica das enzimas do metabolismo da parede celular da cana-de-açúcar tornou-se uma ferramenta valiosa para a análise dos polissacarídeos da parede celular nos diferentes tecidos ao longo do crescimento e desenvolvimento da cana-de-açúcar.

No presente trabalho, foi possível correlacionar os dados de expressão gênica obtidos por Lima *et al.* (2001) com a caracterização dos polissacarídeos da parede celular nos diferentes tecidos da cana-de-açúcar (Artigo 1).

Uma outra abordagem apresentada neste trabalho está relacionada ao estudo de mobilização e da estrutura β -glucanos em tecidos vegetativos em gramíneas, o que apresenta uma grande lacuna, uma vez que o enfoque principal nos trabalhos é geralmente voltado para β -glucanos de cereais, devido a sua grande importância econômica. Recentemente, Trethewey & Harris (2002) quantificaram os β -glucanos em diferentes tecidos de cevada (*Hordeum vulgare*), entretanto não foram abordadas possíveis diferenças na estrutura do polímero ao longo do crescimento.

Durante o crescimento celular ocorrem diversas mudanças nos componentes da parede. Tem sido sugerido uma presença transitória dos β -glucanos durante o período do desenvolvimento e desaparecendo quando cessa o crescimento. Com o propósito de se investigar o comportamento dos β -glucanos na parede celular de tecidos vegetativos, foram realizadas análises quantitativas e qualitativas de β -glucanos durante o desenvolvimento foliar em *Brachiaria decumbens*, uma vez que esta espécie por apresentar um crescimento rápido com produção de um grande número de folhas possibilitou analisar os β -glucanos em fases diferentes de desenvolvimento da planta (Artigo 2).

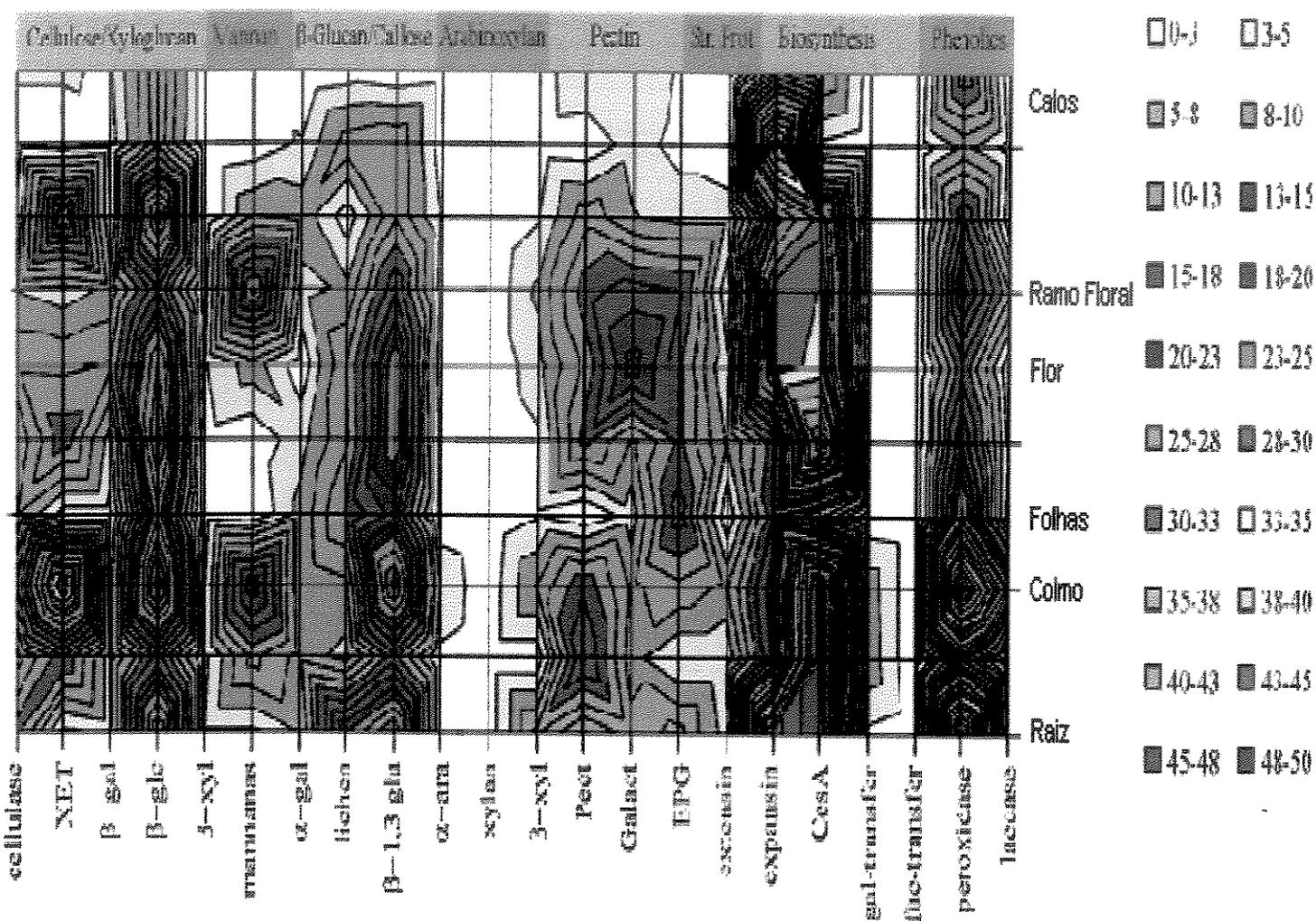


Figura 7 – Mapa de superfície de reads dos genes de parede celular de acordo com suas bibliotecas de origem. Os polímeros de parede celular estão agrupados na parte superior do mapa de acordo com os genes (enzimas) descritos como mostram os quadrados localizados a direita. Na parte inferior do mapa estão descritas as enzimas do metabolismo de parede celular. A direita estão descritos os órgãos analisados no artigo. (Figura adaptada de Lima *et al.* 2001, com permissão).

DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES

Cana-de-açúcar

Saccharum officinarum L. Nome Popular: conhecida como cana-de-açúcar. Plantas perenes, cespitosas, mais de 2m de altura; colmos com nós glabros. Lâmina foliares lanceoladas, inflorescência subaberta, plumosa. (Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo, 2001).

A sua origem geográfica é atribuída ao Sudoeste Asiático, Java, Nova Guiné e também à Índia. Inicialmente foi cultivada a espécie *Saccharum officinarum* L. e com o passar do tempo, cultivares desta espécie sofreram problemas de doenças e de adaptação ecológica, e foram substituídas pelos híbridos interespecíficos do gênero *Saccharum*. A variedade SP-80 3280 e o clone SP87-432, utilizados neste trabalho foram os mesmos utilizados no projeto Genoma SUCEST-FAPESP desenvolvidos no Centro de Tecnologia Canavieira em Piracicaba.

Braquiária

Brachiaria decumbens Stapf

Plantas perenes, 50cm, colmos ramificados. Lâminas foliares lanceoladas, inflorescências 2-5 ramos unilaterais. (Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo).

Nativa da África tropical, introduzida como forrageira na América tropical (Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo, 2001).

OBJETIVOS

* Caracterizar a parede celular da cana-de-açúcar. Composição, estrutura e variações durante o desenvolvimento e identificar nos diferentes tecidos, os perfis de oligossacarídeos de β -glucanos, de forma a correlacionar esses dados com aqueles obtidos com o enfoque adotado pelo projeto Genoma (SUCEST-FAPESP) (Artigo 1).

* Identificar as diferenças quantitativas e qualitativas dos β -glucanos ao longo do desenvolvimento foliar em *Brachiaria decumbens*, procurando averiguar se a ocorrência desse polissacarídeo está associada somente ao início do desenvolvimento foliar ou se estende ao longo do desenvolvimento da planta (artigo 2).

ARTIGO 1

**A PAREDE CELULAR DA CANA-DE-ACÚCAR: COMPOSIÇÃO, ESTRUTURA E
VARIÇÕES DURANTE O DESENVOLVIMENTO**

A ser traduzido e submetido à revista "Carbohydrate Polymers"

**A PAREDE CELULAR DA CANA-DE-AÇÚCAR: COMPOSIÇÃO, ESTRUTURA E
VARIAÇÕES DURANTE O DESENVOLVIMENTO**

Ana Maria da Silva¹, Nicholas C. Carpita² & Marcos Silveira Buckeridge^{1*}

1. Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Instituto de Botânica, Avenida Miguel Stéfano
3687, Água Funda, 04301-902, São Paulo, SP
2. Department of Plant Pathology, Purdue University, West Lafayette, IN 47907-1155

* Autor para correspondência

e-mail: msbuck@usp.br

RESUMO - Os polissacarídeos de parede celular de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) foram caracterizados a partir de análises químicas e foi acompanhada dinâmica destes polímeros ao longo do desenvolvimento das panículas e folhas. Correlacionamos a dinâmica do desenvolvimento com os dados de expressão gênica das enzimas responsáveis pelo metabolismo da parede celular. Os resultados obtidos a partir da análise de monossacarídeos, e de análise estrutural sugerem que os polissacarídeos encontrados na parede celular da cana são os arabinoxilanos, β -glucanos e pectinas com ramificações neutras principalmente de arabinanos. A análise dos perfis dos oligossacarídeos de β -glucanos dos vários tecidos de cana mostrou que nos diferentes órgãos a razão molar entre tri e tetrassacarídeos se manteve constante. Os eventos observados nas folhas foram similares aos observados nas panículas, com diminuições nas frações neutras das pectinas e nos mananos e aumento no nível de ramificações dos xilanos durante o desenvolvimento. A análise das frações obtidas por extração com NaOH 4M sugere que possivelmente nestas foram solubilizados os β -glucanos ligados aos arabinoxilanos através de interação intermolecular não covalente. Em conjunto com a análise de monossacarídeos por HPAEC-PAD, e análise de ligações glicosídicas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, foi possível acompanhar a dinâmica dos polissacarídeos da parede celular ao longo do desenvolvimento e foi demonstrado que a composição e a estrutura da parede celular de cana-de-açúcar são compatíveis com o modelo de parede tipo II, com predominância de arabinoxilanos, β -glucanos e baixos teores de pectinas. A comparação dos resultados de análise estrutural durante o desenvolvimento com os padrões de expressão gênica obtidos por Lima et al. (2001, GMB 24:191-198) mostra clara compatibilidade entre os dois padrões (expressão gênica e estrutural). No entanto, mais estudos ao nível celular terão que ser efetuados para compreender a complexidade dessas alterações nas paredes celulares de cana-de-açúcar.

Palavras chaves: ligações glicosídicas, oligossacarídeos, parede celular

1. Introdução

Considerando o cenário nacional nos últimos 35 anos, o estado de São Paulo assumiu a liderança na produção e na tecnologia de cana-de-açúcar no país, tendo se constituído também na região que mais se preocupou com obtenção de novas variedades. A cana-de-açúcar é uma das culturas mais importante no mundo e o Brasil é responsável por 25% da produção mundial de cana (Kurame *et al* 2001).

No Brasil vários programas de melhoramento de cana foram iniciados, sendo que, em 1910, foram fundadas as Estações experimentais de Escada, em Pernambuco, e de Campos, no Rio de Janeiro (Pimentel, 1985).

O projeto Genoma Cana iniciado em 1998 identificou 50 mil genes da cana-de-açúcar para descobrir genes envolvidos com o desenvolvimento, a produção e o teor de açúcar da planta, assim como sua resistência a doenças e a condições adversas de clima e solo (Vettore *et al.* 2001).

A partir dos dados do projeto de sequenciamento de ESTs da cana-de-açúcar (SUCEST/FAPESP) e utilizando BLAST (tblastn) como ferramenta, foi realizada uma busca de genes homólogos aos elementos envolvidos nos processos de metabolismo de parede celular e já descritos para outras plantas (Lima *et al.* 2001). Essa busca de genes no banco de dados resultou em 459 genes potenciais (clusters) que correspondem a 3283 clones (reads), o que corresponde a cerca de 1.1% do número total de clones. Foram construídos mapas de superfície (Lima *et al.* 2001) para correlacionar os genes com as bibliotecas dos diferentes tecidos (Figura 7- Introdução). Foram encontradas correlações positivas ou neutras entre os genes em uma mesma biblioteca. Os genes relacionados à síntese de celulose (família CesA) foram os de maior expressão na planta. O padrão de expressão dos genes relacionados à parede celular, baseado no número de “reads” por cluster

refletiu bem as características fisiológicas esperadas para cada tecido. Este trabalho foi o pioneiro em apresentar uma visão geral do metabolismo de parede celular através da expressão dos genes em vários tecidos ao mesmo tempo.

No presente trabalho o objetivo foi caracterizar os polissacarídeos de parede celular acompanhando a dinâmica destes ao longo do desenvolvimento da planta, e correlacionar esta dinâmica com os dados de expressão gênica das enzimas responsáveis pelo metabolismo de parede celular como mostrado por Lima et al (2001).

2. Material e Métodos

2.1. Material vegetal

Folha jovem, folha adulta, colmo e raiz da variedade comercial **SP80-3280** (híbrido); panículas imaturas de 10 e 50cm do clone **SP87-432** e colmo de uma variedade não identificada de *Saccharum spontaneum* (variedade selvagem) foram cedidos pelo Dr. Eugênio César Ulian do Centro de Tecnologia Canavieira (Piracicaba-SP).

2.2. Remoção de Açúcares solúveis

O material vegetal foi seco em estufa a 60°C por 4 dias e pulverizado em moinho de bola. Para a remoção de açúcares solúveis, 300mg de material seco foram colocados em tubos de 50ml, ao qual se adicionou 20ml de etanol a 80% e submeteu-se a aquecimento a 80°C por 20 minutos com agitação constante. Em seguida o material foi centrifugado e o sobrenadante descartado. Ao todo foram realizadas 6 extrações. Este número de extrações foi usado após um experimento inicial em que foram dosados os teores de açúcares pelo método de fenol-sulfúrico (Dubois, 1956) em

extrações sequenciais até que não houvesse mais detecção de açúcares (resultados não mostrados). O precipitado foi seco em estufa a 60°C por 24 horas.

2.3. Remoção do amido das frações de parede celular

Para remoção de amido, adicionou-se ao precipitado da extração de açúcares solúveis 20ml de DMSO 90%, e a mistura foi mantida em agitação constante por 24 horas.

Ao termino da extração, o material foi centrifugado e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado 5 vezes com água destilada e a cada lavagem o material foi centrifugado e uma alíquota foi retirada e avaliada para a presença de amido usando uma solução de Iodo/Iodeto de potássio (Iugol), cuja a coloração azul indica a presença de amido. Não tendo sido detectado amido em geral após 5 extrações aquosas, o sobrenadante foi descartado, e o precipitado seco em estufa a 60°C por 24 horas.

2.4. Remoção de lignina

Ao precipitado da remoção de amido foram adicionados 20ml de clorito de sódio 490 mM em ácido acético. Esta solução foi mantida em banho aquecido a 65°C por 1 hora (Gorshokova *et al*, 1996). Após a extração de lignina o material foi centrifugado, o precipitado lavado 10 vezes com água destilada, o sobrenadante descartado e o precipitado seco em estufa por 24 horas a 60°C.

2.5. Fracionamento da parede celular

As frações contendo diferentes polissacarídeos foram obtidas utilizando-se o método descrito por Gorshokova *et al.* (1996) com algumas modificações. O material deslignificado (item 2.4) foi submetido à extração com oxalato de amônio 0,5M, pH 7, a 80°C por 3 horas com agitação contínua. Este procedimento extrai principalmente as pectinas mais solúveis.

O material despectinizado foi extraído sequencialmente com NaOH 0,1, 1 e 4M. Para extração, foi adicionado à suspensão boroidreto de sódio em uma concentração de 3 mg/ml e o procedimento foi feito à temperatura ambiente por 1 hora para cada extração. A cada passo, as soluções eram neutralizadas, dialisadas primeiro contra água corrente de torneira, em seguida contra água destilada e então liofilizadas. O peso de cada fração foi considerado como o rendimento.

2.6. Detecção de (1→3),(1→4)-β-glucanos (ou β-glucanos) utilizando digestão com a endo-β-glucanase de *Bacillus subtilis*

Para um tubo de polipropileno (Eppendorf - Hamburgo - Alemanha) de 1,5ml foi transferido 1mg de material seco e adicionados 200μl de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5 e 40μl da enzima endoglucanase de *Bacillus subtilis* (liquenase – MEGAZYME®) e incubados em banho-maria a 40°C por três horas e 1mg de β-glucano de cevada (MEGAZYME®) foi utilizado como padrão. A incubação foi interrompida com fervura de 3 minutos, o material foi centrifugado a 13200g por 2 minutos. Os β-glucanos no sobrenadante foram estimados através da dosagem de açúcares totais pelo método fenol-sulfúrico (Dubois 1956), em seguida o material foi seco, ressolubilizado em água deionizada (150μl) e filtrado em filtro milipore 0,45μ. Os oligossacarídeos liberados pela hidrólise enzimática foram separados em coluna de troca iônica (Carbo-Pac PA1,Dionex) calibrada com 0,5M NaOH, eluição de acetato de sódio 0,5M NaOH e analisados em HPLC-Dionex, como descrito por Gibeaut & Carpita (1993).

2.7. Quantificação de ácidos urônicos

Os ácidos urônicos foram determinados pelo método η-hydroxibifenil (Filisetti-Cozzi & Carpita, 1991) utilizando ácido galacturônico (1mg.ml⁻¹) como padrão.

2.8 Análise dos monossacarídeos neutros da parede celular

Para a análise de monossacarídeos as frações de paredes celulares foram submetidas à hidrólise ácida. Para um tubo cônico de vidro foi transferido 1mg de material seco de cada fração de parede. Em seguida, foram adicionados 100µl de ácido sulfúrico 72 %, e mantido em banho a 30°C por 45 minutos. Após este período de pré-hidrólise, foram acrescentados ao tubo 1,7 ml de água destilada e o material foi autoclavado por 1 hora a 120° C. Em seguida o material foi neutralizado com hidróxido de sódio 50% e submetido à coluna de troca iônica (Dowex®) para retirada de sais. Os açúcares totais foram quantificados pelo método de fenol-sulfúrico (Dubois, 1956) utilizando como padrão glucose 100 µg.ml⁻¹. Os monossacarídeos foram separados por cromatografia aniônica de alta resolução e detectados com um detector amperométrico (HPAEC-PAD) utilizando coluna Carbopack PA1 num sistema Dionex DX-500 (Tiné et al 2003).

2.9. Análise das ligações glicosídicas

O material liofilizado armazenado em dessecador com P_2O_5 foi metilado com *n*-butilitium e iodeto de metila como descrito por Gibeaut e Carpita (1993). Os alditóis acetatos parcialmente metilados foram separados por cromatografia gasosa e identificados por espectrometria de massa como descrito por Carpita e Shea (1989).

3. Resultados

3.1. Análise quantitativa do fracionamento da parede celular de cana-de-açúcar

A **Tabela 1** mostra o rendimento quantitativo das frações de parede celular. Uma apreciação global mostra baixo rendimento da fração péctica (oxalato de amônio e NaOH 0,1M) no colmo e alto na raiz, enquanto nas folhas e nas panículas as proporções foram equilibradas em relação às frações de hemiceluloses (NaOH 1 e 4 M). Os dados correspondentes após a extração com clorito de sódio, foram adicionados na **Tabela 1** como uma estimativa grosseira do teor de lignina. As proporções nesse caso são bastante baixas em relação aos outros componentes.

Nas panículas e nas folhas foi possível visualizar alterações nas proporções durante o desenvolvimento (**Tabela 1**). Nas primeiras, houve uma queda acentuada na proporção de pectinas com um aumento concomitante em hemiceluloses, enquanto nas folhas não se observaram grandes diferenças entre os dois estágios de desenvolvimento (jovem e adulta).

3.2. Composição de monossacarídeos neutros da parede celular de cana-de-açúcar

A análise dos monossacarídeos nas diferentes frações da parede celular da cana-de-açúcar resultou em uma distribuição dinâmica dos polissacarídeos nos diferentes órgãos e em diferentes etapas do desenvolvimento da planta (**Tabela 2**). Observou-se que os órgãos em crescimento apresentaram alto teor de glucose principalmente nas frações oxalato de amônio e NaOH 0,1M. Nessas frações supostamente ocorreu maior solubilização dos β -glucanos do que em tecidos em crescimento.

De maneira geral, glucose e xilose foram os monossacarídeos encontrados em maior proporção na maioria das frações em todos os tecidos (**Tabela 2**). O terceiro monossacarídeo mais abundante foi a arabinose e em alguns casos a galactose. Tais resultados, em conjunto com os dados de análise estrutural e de β -glucano sugerem que os principais polímeros encontrados na parede

celular da cana sejam o arabinosilano, o β -glucano e as pectinas com ramificações neutras de arabinanos e galactanos.

3.3. Teores de ácidos urônicos nas paredes celulares de cana-de-açúcar

Os rendimentos de ácidos urônicos nas paredes celulares de cana são mostrados na **Tabela 3**. Neste caso foram analisadas as frações oxalato de amônio e a fração NaOH 4M que são aquelas em que se encontram os maiores teores relativos de pectinas e hemiceluloses respectivamente. Confirmando esta tendência geral, observou-se que as frações de hemicelulose não apresentaram níveis detectáveis de ácidos urônicos, enquanto que nas frações pecticas os teores variaram entre 10 e 20% aproximadamente. Um contraste importante nos tecidos de cana-de-açúcar, foi a presença de baixos teores (ou ausência) de pectinas nas frações de oxalato de amônio dos tecidos de panículas e do colmo. Isto pode estar relacionado a um teor muito alto de paredes típicas de tecido vascular, que contém altas proporções de xilanos.

3.4. Análise dos β -glucanos por liberação enzimática de oligossacarídeos

Nas análises de ligações glicosídicas por metilação (ver abaixo no item 3.5) há grande dificuldade de interpretar as alterações em β -glucanos devido à interferência dos produtos metilados de celulose (4-glc) e calose (3-glc), que são idênticos aos dos β -glucanos. Por este motivo, neste trabalho utilizou-se para estudos específicos de β -glucanos métodos de hidrólise enzimática específica com liquenase (uma endo- β -glucanase que ataca especificamente β -glucanos) para avaliar as proporções entre tri e tetrassacarídeos. Estas proporções podem indicar alterações estruturais nesses polímeros de parede celular. Por exemplo, quanto maior for a proporção de trissacarídeo, maior será a proporção de ligações β -(1 \rightarrow 3) no polímero, enquanto que quanto maior for a proporção de tetrassacarídeos, mais β -(1 \rightarrow 4) terá o polímero. A análise dos perfis dos

oligosacarídeos de β -glucanos dos vários tecidos de cana (Tabela 4) mostrou que nos diferentes órgãos a razão molar entre tri e tetrassacarídeos se manteve constante (aproximadamente 2:1) com exceção da fração oxalato de amônio do colmo da variedade SP80-3280 (2,8:1), da fração NaOH 4M do colmo de *Saccharum spontaneum* (3:1) e dos calos (3,3:1).

Apesar dos β -glucanos extraídos nas frações oxalato de amônio ou NaOH 4M terem proporção tri:tetrassacarídeos praticamente idênticas, estes foram extraídos em frações distintas do procedimento utilizado. Isto parece indicar que no caso dos β -glucanos, as proporções entre as ligações β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 4) no polímero não modifica a interação dos β -glucanos com celulose e/ou com o arabinoxilano.

3.5. Alterações estruturais na parede celular de cana-de-açúcar durante o desenvolvimento

Com o objetivo de compreender alterações na estrutura química dos polissacarídeos de parede celular durante o desenvolvimento, para as determinações estruturais foram escolhidas as frações oxalato de amônio e NaOH 4M de panículas e folhas. As frações de raiz e colmo não foram incluídas nestas análises, pois possuíamos apenas um estágio de desenvolvimento delas, enquanto para inflorescências e folhas possuíamos dois estágios. As frações NaOH 0,1M e 1M das panículas e folhas também não foram usadas para análises estruturais pois ambas geralmente se apresentam como misturas de hemiceluloses e pectinas. Os dados da Tabela 5 foram organizados de forma a mostrar as variações nas estruturas de polímeros relacionados às pectinas e hemiceluloses em panículas de 10 e 50cm e de folha jovem e folha adulta de maneira a facilitar a comparação entre os tecidos e as frações polissacarídicas. As análises por metilação das frações indicam que há polissacarídeos típicos de pectinas tanto em frações solúveis em álcali mais concentrado como naquelas mais solúveis em álcali diluído e oxalato de amônio. No entanto, como será visto abaixo,

há uma predominância de certos polímeros típicos das pectinas nas frações solúveis em oxalato de amônio e de polímeros tipicamente hemicelulósicos nas frações solúveis em álcali concentrado.

As tendências gerais podem ser agrupadas da seguinte forma:

PANÍCULA

Pectinas: frações solúveis em oxalato de amônio: as variações principais foram uma tendência a um aumento em arabinose terminal (t-ara) e ramificada no carbono 2 (2-Ara) concomitantemente à diminuição na proporção de 4-Gal (Tabela 5). Estes resultados denotam um aumento de arabinanos e uma diminuição nos arabinogalactanos do tipo I (4-ligados). Paralelamente, foi observada uma variação acentuada no nível de 4-Xil, sugerindo um aumento na contaminação com xilanos na fração de pectinas. É provável que o aumento na proporção de arabinose terminal também se deva a um aumento no grau de ramificação dos xilanos, que seriam, portanto, arabinoxilanos. Um alto grau de ramificação dos xilanos explicaria a extração destes na fração péctica, uma vez que arabinoxilanos altamente ramificados são mais solúveis e menos propensos à interação com celulose, β -glucanos e outros xilanos (típico das hemiceluloses) menos ramificados. Houve também uma queda nos níveis de mananos durante o desenvolvimento das panículas.

Hemiceluloses: frações solúveis em NaOH 4M: na fração de hemiceluloses, observamos um padrão compatível com as frações de pectinas. Em primeiro lugar, observa-se uma diminuição nas proporções de 5-, 2,5- e 3,5-Ara, o que parece concordar com os aumentos em ara terminal observados na fração péctica mencionado acima. Tais diminuições podem explicar o maior teor de Ara terminal através de uma hidrólise de arabinanos durante o crescimento das panículas de 10cm para 50cm. Paralelamente, houve uma drástica diminuição de 4,6-gal e diminuições mais discretas em 4-Gal e 6-Gal, indicando que galactanos (polissacarídeos pécticos associados à fração de

hemiceluloses) estariam também sendo hidrolisados. No caso das hemiceluloses, houve também um aumento nos xilanos (aumento em 4-Xil e t-Xil) e uma diminuição nos mananos (4-Man e 4,6-Man).

FOLHAS

Pectinas: frações solúveis em oxalato de amônio: nas folhas, as principais variações em pectinas durante o desenvolvimento parecem estar associadas aos galactanos e menos com os arabinanos, como aconteceu nas panículas. Neste caso, os galactanos que foram afetados, ou seja, os que diminuíram, foram os 3,6 ligados (arabinogalactanos do tipo II). Concomitantemente às alterações nos galactanos, houve diminuição na proporção de arabinose terminal (t-Ara) sugerindo que, como nas inflorescências, as folhas também parecem ter sofrido a retirada de ramificações neutras das pectinas.

Hemiceluloses: frações solúveis em NaOH 4M: esta fração também apresentou variações em compostos típicos das pectinas, com uma diminuição na proporção de arabinose terminal (que também pode estar associada com os arabinoxilanos), um grande aumento em arabinose 3-ligada (3-Ara) e diminuição em 3,6-Gal, denotando uma provável hidrólise de arabinogalactano do tipo II. É possível que arabinanos menos solúveis sejam formados durante o desenvolvimento e por isso tenham sido extraídos nesta fração. Quanto às hemiceluloses, houve um aumento na proporção de 3,4-Xil, o que indica um aumento de ramificação dos xilanos e talvez explique o aumento na arabinose terminal nestas frações. Semelhante ao observado nas panículas, uma diminuição dos mananos (vista através de 4-Man) foi observada de forma geral durante o desenvolvimento.

4. Discussão

Os dados apresentados neste trabalho mostram uma visão geral sobre a composição e estrutura dos polissacarídeos da parede celular de cana-de-açúcar de vários tecidos da planta. Além das análises de raiz e colmo da variedade SP80-3280 e de uma das espécies utilizadas para a obtenção dos híbridos (*Saccharum spontaneum*), uma parte substancial das análises estruturais mais complexas foi feita com tecidos de flores do clone SP87-432 e folhas da SP8-3280 em dois estágios diferentes de desenvolvimento e permitem especular sobre o metabolismo da parede celular para este processo nesses dois órgãos.

De maneira geral, foi observado que a parede celular dos diferentes tecidos de cana-de-açúcar não é homogênea em termos de proporção entre os diferentes domínios da parede celular. Nas panículas, por exemplo, alteraram as proporções entre pectinas e hemiceluloses, invertendo o balanço entre os dois domínios durante o desenvolvimento. Em panículas imaturas há proporcionalmente mais pectinas, e ao longo do desenvolvimento (maduras) as pectinas diminuem ou as hemiceluloses aumentam.

4.1 Implicações da composição e estrutura da parede celular de cana-de-açúcar para a obtenção de um modelo de parede celular em Poaceae

Os resultados mostrados em todas as tabelas corroboram a hipótese de que espécies de plantas da família Poaceae apresentam parede celular do tipo II, com domínio péctico reduzido em relação às Dicotiledôneas, baixos teores de ácidos urônicos e a predominância dos polímeros hemicelulósicos arabinoxilano e beta-glucano. Há também uma proporção maior de mananos e possivelmente suas variações tais como glucomananos, galactomananos e/ou galactoglucomananos. Pode-se dizer que esta composição é similar em todos os tecidos analisados. Porém, quando se faz

comparações mais acuradas utilizando órgãos obtidos em diferentes estágios de desenvolvimento, alguns padrões de transformação da parede celular podem ser visualizados.

Se for assumido que em cana-de-açúcar há um padrão de interações intermoleculares formando domínios na parede celular conforme o modelo proposto por Carpita e Gibeaut (1993), pode-se especular que em tecidos que já cessaram o crescimento, a interação entre arabinoxilanos e beta-glucanos dificulta a solubilização destes últimos. Portanto, é possível que em tecidos em crescimento, os β -glucanos desempenhem uma função análoga à dos xiloglucanos nas paredes de dicotiledôneas, ou seja, participem no processo de organização das microfibrilas de celulose, e/ou também como reserva extra de carbono, como sugerem Meier and Reid (1982) e Buckeridge et al. (2004).

Nas frações extraídas em NaOH 4 M (Tabela 2) o teor de glucose foi expressivo em todos os órgãos. Supostamente, nessas frações foram solubilizados os beta-glucanos fortemente ligados aos arabinoxilanos e possivelmente, nesses casos, possa haver uma forte interação intermolecular não covalente entre os polímeros como proposto por Lzydorczyk e McCgregor (2001). A ocorrência de beta-glucanos na parede celular e a dificuldade para removê-lo da parede durante a extração sugerem que este polímero tenha uma função estrutural importante (Darvill, McNeil, Albersheim & Delmer, 1980).

Uma característica notável dos beta-glucanos de cana-de-açúcar é que na maioria dos tecidos, não foram detectadas alterações significativas nas proporções entre tri e tetrassacarídeos. Conforme Buckeridge et al. (1999), em coleóptilos de milho esta proporção só pode ser alterada se o complexo enzimático de biossíntese for isolado da célula. Tentativas desses autores de alterar o padrão de biossíntese de beta-glucanos em tecidos intactos alterando as fontes de monossacarídeos, não lograram visualizar qualquer alteração. Estas observações, em conjunto com as do presente trabalho e também observações de que as proporções entre tri e tetrassacarídeos variam pouco de

espécie para espécie (Harris *et al.* 1997), sugerem que a manutenção de um padrão estrutural seja um fator extremamente conservado em diversos níveis, ou seja, tanto em uma mesma planta como de espécie para espécie. Ainda não há uma explicação clara para tal fenômeno, mas pode-se especular que tal padrão esteja relacionado à função de interação e ordenação das microfibrilas de celulose na parede celular.

Em estudos com cevada, Izydorczyk & MacGregor (2001) demonstraram que a razão molar entre tri e tetrassacarídeos influencia na solubilidade dos beta-glucanos. Quanto maior esta razão, mais solúvel o polímero e isto é explicado pela maior proporção de ligações beta-1,4 tornando a molécula mais parecida com a celulose. Nossos dados demonstraram que ao longo do desenvolvimento da cana aparentemente não ocorrem modificações na estrutura fina (razão tri:tetra) dos β -glucanos, durante sua deposição ou mobilização. A razão molar não se alterou, o que corrobora os dados obtidos por Buckeridge *et al.* (1999) em estudos com coleóptilos de milho. Exceções foram os calos, que apresentaram nas frações oxalato de amônio a razão molar de 3.3:1, e os colmos do híbrido SP80-3280 e *S.spontaneum* nas frações oxalato de amônio e NaOH 4M apresentaram também a razão molar de 3.3:1. Tais diferenças poderiam estar relacionadas, no caso dos calos, ao fato de que calos não apresentam organização em tecidos definidos. Nos outros casos a causa é desconhecida, mas se confirmada essa diferença de razão molar nesses materiais vegetais, possibilidades interessantes podem surgir para o estudo da biossíntese de β -glucanos, pois o mecanismo de biossíntese em calos poderia ser comparado com os demais tecidos da planta, oferecendo dessa maneira uma oportunidade de se encontrar aspectos desconhecidos da biossíntese dos β -glucanos.

A presença de altas proporções de xilose encontradas nas frações de NaOH 1M até 4M, que atingiram 60 a 70% (Tabela 2) em todos os órgãos sugere a liberação dos arabinoxilanos com baixo grau de ramificação com arabinose. Arabinoxilanos com valor baixo de razão molar arabinose:xilose

apresentam uma estrutura que facilita o alinhamento das cadeias de beta-glucanos (Izydorczyk & MacGregor 2001), o que provavelmente corrobora a hipótese de que há uma forte interação intermolecular entre os polímeros. Em conjunto com a análise de monossacarídeos por HPAEC-PAD, a análise de ligações glicosídicas foi decisiva para acompanhar a dinâmica dos polissacarídeos de parede de cana-de-açúcar ao longo do desenvolvimento (ver abaixo), identificando principalmente as ramnoses que compõem as pectinas em gramíneas e os beta-glucanos de cadeia mista. (Tabelas 2 e 4).

De forma geral, os dados obtidos em relação à composição e estrutura da parede celular da cana-de-açúcar são compatíveis com as proposições de Carpita e Gibeaut (1993) de que esta gramínea possui paredes celulares do Tipo II, com predominância de arabinoxilanos, beta-glucanos e baixos teores de pectinas.

4.2 Alterações na parede celular da cana durante o desenvolvimento de flores e folhas

Nossos dados mostram que diversos eventos de modificação nas paredes celulares ocorrem simultaneamente. Os dados obtidos no presente trabalho parecem corroborar de diversas formas as observações feitas por Lima et al. (2001) utilizando análises de expressão gênica. Estes autores propuseram que os processos de biossíntese e degradação ocorrem paralelamente nas paredes celulares de cana.

Apesar da observação, em panículas imaturas, de uma diminuição de 4,6-gal e diminuições mais discretas em 4-Gal e 6-Gal, indicando hidrólise de galactanos (Tabela 5), as análises de monossacarídeos não corroboraram esta observação, através de uma diminuição nos níveis de galactose. Esta observação encontra suporte nas descobertas de Lima et al. (2001) onde se

observaram níveis muito altos de expressão dos genes que codificam a síntese de galactanases e sugerem a existência de hidrólise de galactanos, ou seja diminuição de pectinas.

No caso das hemiceluloses, uma situação similar parece ocorrer durante o desenvolvimento, sendo que as principais variações nestas frações seriam mais relacionadas a um aumento no grau de ramificação da principal hemicelulose de cana, os arabinoxilanos. Isto sugere que a enzima mais ativa neste período seria uma arabinosil-transferase, responsável pelo aumento das ramificações dos arabinoxilanos. Isto também é compatível com as observações de Lima et al. (2001) que verificaram altos níveis de expressão da família de genes responsáveis pela síntese de polissacarídeos (CesA). Porém, não se pode descartar a existência de mecanismos exclusivamente hidrolíticos que promoveriam alterações estruturais compatíveis com um rearranjo das ligações.

Em conjunto, nossos dados indicam que tanto as pectinas quanto as hemiceluloses mais solúveis (xilanos altamente ramificados e provavelmente galacto- ou galactoglucomanos, associados às frações pécticas), sofreram alterações durante o desenvolvimento das flores de cana de açúcar. As transformações observadas são compatíveis com um possível afrouxamento da parede celular, com provável hidrólise das pectinas e conseqüente alteração nas propriedades mecânicas dos tecidos (Knox *et al* 1990) e paralelamente com hidrólise dos mananos com uma possível diminuição do peso molecular e/ou aumento de solubilidade dos xilanos. Estes dois últimos provavelmente corroboram uma tendência de maior flexibilidade das paredes, pois os mananos e xilanos são geralmente associados a uma maior rigidez da parede celular (Groot and Karssen, 1987).

Em uma comparação com as observações de Lima et al. (2001) sobre a expressão de genes de hidrolases de parede celular em tecidos de cana, os dados do presente trabalho corroboram as observações para endo- β -mananase, pois houve queda generalizada no desenvolvimento concomitante a uma observação anterior de maior expressão dos genes que codificam para esta enzima (ver Figura 7 na Introdução).

No caso das hemiceluloses, é possível que o processo mais intenso seja o de biossíntese de xilanos durante o desenvolvimento dos dois órgãos, o que seria corroborado pelos altos níveis de expressão de *CesA* e *Csl* (cellulose like genes) observado por Lima et al. (2001). No entanto, é difícil estabelecer qualquer correlação direta, pois os genes específicos para a biossíntese de hemicelulose ainda não foram completamente identificados.

Uma comparação entre panículas e folhas, sugere que essas apresentam variações na composição e estrutura da parede celular durante o desenvolvimento, e que parece haver um padrão comum entre elas, que são alterações estruturais e diminuição geral nos arabinogalactanos, diminuição dos mananos e alterações estruturais e/ou aumento (provavelmente biossíntese) dos xilanos.

De maneira geral, nossos dados sobre as alterações estruturais nas paredes celulares de diferentes tecidos de cana, em comparação com as observações de Lima et al. (2001) sobre os padrões de expressão gênica, indicam que há um padrão dinâmico de alterações em diferentes níveis de emergência (expressão gênica e metabolismo da parede). Tal padrão denota claramente que a matriz extracelular é um compartimento dinâmico em plantas e remete a objetivos futuros de obter uma compreensão maior sobre aspectos topológicos e funcionais das alterações observadas e assim compreender melhor a importância da parede celular durante o desenvolvimento de plantas.

5. Referências Bibliográficas

- Buckeridge, M.S., Vergara, C. E. & Carpita, N.C. 1999. The mechanism of synthesis of a cereal mixed-linkage (1,3)(1,4)- β -D-glucan in maize: Evidence for multiple sites of glucosyl transfer in the synthase complex. *Plant Physiology* 120 (4): 1105-1116.
- Buckeridge, M.S., Rayon, C., Urbanowicz, B., Tiné M.A.S & Carpita N.C. 2004. Mixed Linkage (1,3)(1,4)- β -Glucans of Grasses. *Cereal Chemistry* 81(1):115-127.
- Carpita, N.C. & Gibeaut, D.M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal* 3: 1-30.
- Darvill, A., McNeil, M., Albersheim, P. & Delmer, D.P. 1980. The primary cell walls of flowering plants. *In*: P.K. Strumpf & E.E. Conn (Eds). *The biochemistry of plants: a comprehensive treatise*. Academic Press, New York. pp. 91-162.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. 1956. Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-358.
- Filisetti-Cozzi, T.M.C.C., and N.C. Carpita. 1991. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry* 197:157-162.

- Gorshokova, T.A., Watt, S.E., Salnikov, V.V., Gibeaut, D.M., Ibraguimov, M. R, Losovaya., V. V & Carpita, N.C. 1996. Cell-wall polysaccharides of developing flax. *Plant Physiology* 110: 721-729.
- Groot, S.P. & Karssen, C.M. 1987. Gibberellins regulate seed-germination in tomato by endosperm weakening- a study with gibberelin - deficient mutants. *Planta* 171: 525:531.
- Knox, J.P., Linstead, P.J., King, J., Coper, C., Roberts, K. 1990. Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root apices. *Planta* 181: 512-21.
- Kurame, E.E., Fenille, R.C. & Rosa Jr, V.E. 2001. Identification of 14-3-3-like protein in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Genetics and Molecular Biology* 24 (1-4), 43-48.
- Izydorczyk, M. S. & MacGregor, A W. 2000. Evidence of intermolecular interactions of beta-glucans and arabinoxylans. *Carbohydrate Polymers* 41:417-420.
- Lima, D. U., Santos, H. P., Tiné, M .A., Molle, F. D. & Buckeridge, M. S. 2001. Patterns of expression of cell wall related genes in sugar cane. *Genetics and Molecular Biology* 24: 191-198.
- Meir, H., J. S. G. Reid, 1982. Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. In: *Encyclopedia of Plant Physiology, new series, Vol. 13a*, Eds. F. A. Loewus, W. Tanner, Springer-Verlag, Berlin, 418-471.

Pimentel, J.S. 1985. Política de pesquisa em melhoramento de cana-de-açúcar. *Açúcar e Álcool*. 5(21): 24-25.

Tiné, M.A.S., Lima, D.U. & Buckeridge, M. S. 2003. Galactose branching modulates the action of cellulase on seed storage xyloglucans. *Carbohydrate Polymers* 52:135-141.

Vettore, A.L., Silva, F. R., Kemper, E.L. & Arruda, P. 2001. The libraries that made Sucest. *Genetic and Molecular Biology*. 24: 1-7.

Tabela 1. Fracionamento da parede celular de cana-de-açúcar variedade SP80-3280 e do clone SP437 (panículas) e *Saccharum spontaneum*. O rendimento da parede celular representa a soma de todas as frações (em %).

Tecidos	Rendimento	Frações					Resíduo	Celulose
		Clorito de sódio	Oxalato	0,1M	1,0M	4,0M		
Calos	92	0	39	8	21	24	8	nd
Panicula 10cm	91	0	60	13	9	9	9	nd
Panicula 50cm	88	8	31	15	12	22	12	80
Colmo SP80-3280	55	3	3	15	2	6	45	68
Colmo <i>S. spontaneum</i>	31	3	7	7	10	4	69	64
Folha adulta	68	7	20	9	25	7	32	86
Folha jovem	66	6	21	7	18	14	34	84,6
Raiz	63	2	37	9	9	6	37	30

Tabela 2. Distribuição dos monossacarídeos solúveis nas frações de parede celular de cana-de-açúcar: oxalato de amônio (0,5M) e hidróxido de sódio (0,1, 1,0 e 4,0M). (% por área de picos do cromatograma).

Trat/Tecido	Monossacarídeos					
	<i>arabinose</i>	<i>ramnose</i>	<i>galactose</i>	<i>glucose</i>	<i>xilose</i>	<i>Manose</i>
Oxalato						
Panicula 10cm	13	0	13	61	13	10
Panicula 50cm	21	13	35	31	0	0
Folha jovem	10	0	6	38	47	0
Folha adulta	6	0	2	63	28	0
Raiz	9	0	7	29	53	2
Colmo SP80-3280	19	0	17	33	31	0
Colmo <i>S. spontaneum</i>	13	6	9	71	0	0
NaOH 0,1M						
Panicula 10cm	22	0	9	37	30	2
Panicula 50cm	23	0	10	25	42	0
Folha jovem	12	10	2	11	75	0
Folha adulta	12	0	2	10	76	0
Raiz	8	0	4	16	72	0
Colmo SP80-3280	16	0	4	15	65	0
Colmo <i>S. spontaneum</i>	13	3	3,4	80,4	0	0
NaOH 1,0M						
Panicula 10cm	14	1	10	49	26	0
Panicula 50 cm	15,9	0	5	31	46	0
Folha jovem	8	0	1	14	77	0
Folha adulta	10	0	2	9	75	4
Raiz	12	0	7	8	73	0
Colmo SP80-3280	10	0	19	30	41	0
Colmo <i>S. spontaneum</i>	15	0	5	9	71	0
NaOH 4,0M						
Panicula 10cm	13	0	16	33	23	15
Panicula 50cm	13	0	4	22	61	0
Folha jovem	4	0	1	54	37	3
Folha adulta	5	0	12	61	20	2
Raiz	8	0	5	24	62	1
Colmo SP80-3280	13	0	4	22	61	0
Colmo <i>S. spontaneum</i>	11	0	6	16	67	0

Tabela 3. Quantificação de ácidos urônicos das frações péctica e hemicelulósica das paredes celulares de cana-de-açúcar ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$).

<i>Tecido</i>	Frações	
	Oxalato de Amônio (Péctica)	NaOH 4M (Hemicelulósica)
Calos	20.94	-
Panicula 10cm	9.91	-
Panicula 50cm	-	-
Raiz	22.24	-
Folha jovem	20.49	-
Folha adulta	21.89	-
Colmo – SP80-3280	-	-
Colmo <i>S. spontaneum</i>	-	-

Tabela 4. Razão molar entre o tri e o tetrassacarídeo de betaglucanos da parede lignificada e frações de parede Oxalato de Amônio e Hidróxido de Sódio 4M (NaOH 4M) de cana-de-açúcar. As razões foram obtidas através da análise por cromatografia líquida de alta performance com detecção por pulso amperométrico (HPAEC/PAD) de oligossacarídeos obtidos por hidrólise exaustiva do polímero de betaglucano com lichenase de *Bacillus subtilis*.

Tecido	Frações	
	Oxalato de amônio	NaOH 4M
	(Péctica)	(Hemicelulósica)
Calos	3,3	-
Panicula 10cm	2	-
Panicula 50cm	1,7	1,7
Raiz	2,1	2,2
Folha adulta	2,3	2
Folha jovem	2,2	2
Colmo SP80-3280	2,8	2,3
Colmo <i>S. spontaneum</i>	2,3	3

Tabela 5. Análise de ligações glicosídicas das frações de parede celular de panículas, folha jovem e folha adulta em cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) (mol%).

Açúcar e ligação	Panículas				Folhas			
	Pectinas		Hemiceluloses		Pectinas		Hemiceluloses	
	10cm	50cm	10cm	50cm	Jovem	Adulta	Jovem	Adulta
Ramnose:								
2-Rha	0.4	0.8	0.4	0.8	0.3	0.4	0.1	0.5
Arabinose:								
t-Araf	7.4	11.1	5.3	5.3	7.0	4.0	2.6	1.0
2-Ara	0.5	1.9	1.6	1.9	1.4	1.1	0.7	0.8
3-Ara	2.0	2.8	4.1	4.0	1.5	1.1	1.2	9.2
5-Ara	5.5	4.8	7.4	4.4	4.0	2.7	2.1	1.6
2,5-Ara	0.7	0.7	1.8	0.9	0.3	0.4	0.6	0.5
3,5-Ara	1.0	0.7	2.0	1.2	0.6	0.5	0.8	0.6
Xilose:								
t-Xyl	0.1	0.6	0.4	1.1	2.1	2.2	0.6	0.6
4-Xyl	4.4	20.7	18.6	33.2	45.8	27.6	42.3	41.7
3,4-Xyl	14.0	14.1	16.7	15.1	7.2	6.9	11.9	20.2
Manose:								
4-Man	1.6	0.5	3.6	1.7	0.4	0.2	3.1	0.8
4,6-Man	0.4	0.1	1.4	0.3	0.1	0.1	0.3	0.2
Galactose:								
3-Gal	1.0	0.7	0.5	0.2	0.7	0.2	0.1	0.1
4-Gal	2.5	1.2	2.5	1.2	0.7	0.3	0.2	0.4
6-Gal	1.3	3.1	1.8	0.6	1.2	1.0	0.2	0.3
3,6-Gal	4.5	5.9	1.8	1.1	1.6	0.8	1.6	0.4
4,6-Gal	0.9	0.3	3.0	0.5	0.3	0.2	-	-
Glucose:								
3-Glc	3.1	3.3	3.6	4.4	4.1	6.4	4.4	1.9

ARTIGO 2

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE GLUCANOS DE CADEIA MISTA AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO FOLIAR EM *Brachiaria decumbens* Stapf.

Submetido à revista "Hoehnea"

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE GLUCANOS DE CADEIA MISTA AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO FOLIAR em *Brachiaria decumbens* Stapf.

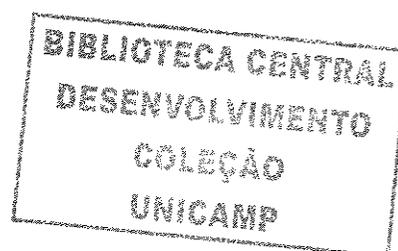
Ana Maria da Silva^{1,2}, Marcos Pereira Marinho Aidar¹ & Marcos Silveira Buckeridge^{1*}.

*Autor para correspondência: msbuck@usp.br

1. Seção de Fisiologia e Bioquímica, Instituto de Botânica, Caixa Postal 4005, 01061-970 São Paulo, SP, Brasil.
2. Doutoranda do departamento de Biologia Celular Estrutural, Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas, SP.

Resumo - (Caracterização parcial de glucanos de cadeia mista ao longo do desenvolvimento foliar em *Brachiaria decumbens* Stapf). Em *Brachiaria decumbens* constatou-se modificações quantitativas e qualitativas nos β -glucanos ao longo do desenvolvimento foliar. A partir das análises dos oligossacarídeos de β -glucanos através de Cromatografia de troca iônica de alto desempenho com detecção por pulso amperométrico (HPAEC-PAD), verificou-se que em folhas maiores que 30cm a razão tri: tetrassacarídeo sofreu alteração, o que poderia estar relacionado com o fim do período de alongamento celular e crescimento do tecido provocando alteração na estrutura do β -glucano e desta forma, promovendo a forte interação com os glucuronoarabinosilanos (GAXs).

Palavras chaves: arabinosilanos, expansão foliar, parede celular



Introdução

Uma característica adquirida ao longo do processo evolutivo pelas gramíneas e outras Poales (Dahlgren 1985) foi o aparecimento dos (1→3),(1→4)- β-glucanos ou β-glucanos na estrutura da parede celular (Carpita 1996, Smith & Harris 1999).

Os β-glucanos são polímeros lineares formados por resíduos de glucose unidos entre si por ligações β-(1→3) e β-(1→4) em proporções definidas (figura 1). Em nenhum outro grupo taxonômico esse polissacarídeo foi isolado. Entretanto um polissacarídeo similar foi isolado em *Cetraria islandica* (Wood *et al.* 1994), um fungo liquenizado originário da Antártica.

A estrutura dos β-glucanos foi definida a partir da ação da enzima endoglucanase (liquenase) de *Bacillus subtilis* (Woodward *et al.* 1985), que hidrolisa apenas as ligações β-(1→4) precedidas de uma ligação β-(1→3) (Parrish *et al.* 1960), produzindo blocos constitutivos característicos (tri e tetrassacarídeos), onde cerca de 70% dos oligossacarídeos são trissacarídeos com estrutura molecular $\text{Glc}(1\rightarrow4)\text{Glc}(1\rightarrow3)\text{Glc}$ e os 30% restantes com estrutura $\text{Glc}(1\rightarrow4)\text{Glc}(1\rightarrow4)\text{Glc}(1\rightarrow3)\text{Glc}$. A razão molar entre tri e tetrassacarídeo pode variar entre 2 a 3 dependendo da espécie de gramínea, enquanto que em *Cetraria islandica* 86% são trissacarídeos e a razão molar não ultrapassa 1:1. Esta proporção nunca foi obtida em nenhum estudo com espécies de Poales até o momento. A razão molar é considerada uma característica que aparentemente não se alterou, como sugerido por Buckeridge *et al.* (2001). Esses autores propuseram que esta seria uma característica conservada evolutivamente em função do sistema de biossíntese altamente complexo.

Como a maioria dos polissacarídeos de parede celular, os β-glucanos são sintetizados no Complexo de Golgi. Acredita-se que o modelo de biossíntese está associado à enzima sacarose sintase (SS) que, apesar do nome, efetua a hidrólise de sacarose produzindo frutose livre e UDP-

glucose, este último utilizado como substrato para a síntese de glucanos de parede celular (Buckeridge *et al.* 1999 e 2001).

Os β -glucanos são abundantes em paredes celulares de células endospermicas em sementes de gramíneas, e podem compor até 70% desses tecidos (Fincher & Stone 1986). Em plântulas de milho, a quantidade de β -glucanos aumenta durante a expansão dos cotilédones e das folhas (Carpita 1984) e decresce apenas quando o crescimento cessa (Carpita & Kanabus 1988). Acredita-se que em células meristemáticas esses polissacarídeos sejam raros, mas em paredes de células em alongamento aparecem em grandes quantidades, coincidindo com a razão máxima de alongamento (Kim *et al.* 2000).

Os β -glucanos têm gerado grande interesse econômico devido às respostas fisiológicas que produzem como fibra dietética, pois aumentam a sensibilidade à insulina (Yokohama *et al.* 1997) e tolerância à glucose, provocando alterações hormonais que potencialmente podem contribuir com um efeito hipocolesterômico, reduzindo a síntese do colesterol. Existem também evidências de que os β -glucanos agem como protetores contra o desenvolvimento de câncer de cólon (Anderson & Chen 1986; Mcdonald *et al.* 1992, Wood 1993). Recentemente, De Paula *et al.* (2005) demonstraram que a injeção intraperitoneal de β -glucanos juntamente com arabinoxilano da gramínea africana *Rynchelytrum repens* provocou uma diminuição duradoura (24h) nos níveis de glucose sanguínea em ratos.

Um outro aspecto biotecnológico associado aos β -glucanos está relacionado à indústria de cerveja. Durante a fabricação desta, a hidrólise incompleta dos β -glucanos prejudica o processo de filtração do produto, tornando-o escuro e prejudicando sua qualidade (de Francisco & de Sá 2001).

Grandes esforços têm sido realizados para tentar diminuir este problema. Um deles é a busca de novas variedades de cevada com teores reduzidos de β -glucanos. Através de melhoramento genético tem se conseguido bons resultados, por exemplo, com as variedades IBON-1069 e MN684

que apresentaram baixo teor (cerca de 2%) de β -glucanos (A. M. Silva, A. De Francisco & M.S. Buckeridge, resultados não publicados). Os β -glucanos também têm causado sérios problemas durante a filtração do caldo de cana em usinas de açúcar, uma vez que esses entopem os filtros, causando grandes prejuízos a indústria sucro-alcooleira (V.R. Panegassi, G.E.Serra & M.S. Buckeridge, resultados não publicados).

Muitas espécies de gramíneas, especialmente aquelas originárias da África, como por exemplo *Brachiaria decumbens*, têm sido consideradas invasoras em ambientes naturais da América, devido a sua alta eficiência em competir com espécies nativas (Mantovani & Martins 1988).

Na região do Cerrado Brasileiro estima-se que 85 milhões de ha. são ocupados com pastagens, dos quais cerca de 50 milhões são cultivados com gramíneas do gênero *Brachiaria* (Bonfim *et al.* 2003).

A estrutura e o metabolismo dos β -glucanos em tecidos vegetativos de gramíneas é muito pouco conhecida, uma vez que o enfoque principal nos trabalhos tem sido sempre voltados para os β -glucanos em cereais devido à sua grande importância econômica. Recentemente, Trethewey & Harris (2002) quantificaram os β -glucanos em diferentes tecidos de cevada (*Hordeum vulgare*), entretanto não foram abordadas possíveis diferenças na estrutura do polímero ao longo do crescimento.

Os objetivos deste trabalho foram averiguar as possíveis modificações qualitativas e quantitativas nos β -glucanos ao longo do desenvolvimento foliar em *Brachiaria decumbens* e identificar a possível interação intermolecular entre os β -glucanos e GAXs (glucuronoarabinoxilanos). Esta abordagem é de grande relevância pelo potencial efeito hipoglicemiante destes polissacarídeos, sendo inclusive uma alternativa potencial de uso para esta espécie invasora. Além disso, o conhecimento mais aprofundado sobre a importância destes

compostos na composição e crescimento de *B. decumbens*, pode ser futuramente utilizado como modelo de estudo a ser desenvolvido em espécies nativas brasileiras.

Material e Métodos

Touceiras de *Brachiaria decumbens* foram coletadas na Estação Experimental da Fazenda Campininha em Moji-Guaçu, e transplantadas para os canteiros na Seção de Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica de São Paulo, onde foram cultivadas em canteiros experimentais.

Após um mês de adaptação no canteiro foi feito um corte da parte aérea utilizando um quadrado de 10X10cm com base de 5cm. Para a para a coleta de setembro o material coletado foi separado em 3 classes, de acordo com tamanho das folhas, sendo elas: classe I haste < 20 cm, classe II haste entre 20-30cm, e classe III >30cm. Para a coleta de maio o material foi separado em duas classes: <10cm e 20cm. Todo o material foi pesado, seco em estufa por 5 dias, e moído em moinho de bola (Tecnal Ltda.).

Para a remoção de açúcares solúveis foram utilizadas amostras de 10mg de material seco, em tubos de polipropileno (Eppendorf-Hamburgo-Alemanha), adicionado 1,5ml de etanol 80% e mantidos a 80°C por 20 minutos, centrifugados e descartado o sobrenadante. Ao todo foram realizadas 6 extrações. Após a remoção dos açúcares solúveis o material foi seco em estufa a 60°C por 24 horas. Em seguida lavado três vezes com tampão Tris-HCl 100mM pH 7,4, e seco novamente.

Ao precipitado da remoção de açúcares solúveis foram adicionados 20ml de clorito de sódio 490 mM em ácido acético, mantidos em banho-maria a 65°C (por 1 hora). Após a extração de lignina o material foi centrifugado, o precipitado lavado 10 vezes com água destilada e centrifugado. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco em estufa por 24 horas a 60°C.

Para a remoção de amido, ao material deslignificado e seco foi adicionado 1,5ml de DMSO 90%, os quais foram mantidos sob agitação por 24 horas. Após este período o material foi

centrifugado, o sobrenadante descartado, e o precipitado lavado com água destilada (uma vez), centrifugado e seco em estufa por 24 horas.

A partir do material precipitado obtido na etapa de remoção de amido, a parede celular foi fracionada com NaOH 0,1M e em seguida com NaOH 4,0M de acordo com a metodologia de Gorshkova et al.,1996. Ao precipitado obtido na extração de amido foram adicionados 20ml de solução NaOH 0,1M com NaBH₄ (mg.ml⁻¹), e a solução foi mantida sob agitação constante por 1 hora a temperatura ambiente. Terminada a extração, o material foi centrifugado a 13200g por 5 minutos a 10°C, o sobrenadante coletado e neutralizado com ácido acético glacial, dialisado primeiro com água de torneira por 24 horas e em seguida com água destilada com 6 trocas de intervalo de 2 horas, e sequencialmente realizada a extração com NaOH 4,0M.

Para um tubo de polipropileno de 1,5ml foi transferido 1mg de material seco, adicionados 200µl de tampão NaPO₄ 50mM, pH 6,5 e 40µl da enzima endoglucanase de *Bacillus subtilis* (liquenase – MEGAZYME®) e incubados em banho-maria a 40°C por três horas. Como padrão foi utilizado 1mg de β-glucano de cevada (MEGAZYME®). A incubação foi interrompida com fervura de 3 minutos e o material centrifugado a 13200g por 2 minutos. Os β-glucanos no sobrenadante foram estimados através da dosagem de açúcares totais pelo método fenol-sulfúrico (Dubois 1956). Em seguida o material foi seco, ressolubilizado em água deionizada (150µl) e filtrado em filtro milipore 0,45µ. Os oligossacarídeos liberados pela hidrólise enzimática foram separados em coluna de troca iônica (Carbo-Pac PA1, Dionex) calibrada com 0,5M NaOH, eluição de acetato de sódio 0,5M NaOH como descrito por Gibeuat & Carpita (1993). Os oligossacarídeos de β-glucanos foram determinados por Cromatografia de Troca Iônica de Alta Performance com detecção por Pulso Amperométrico.

Para a análise de monossacarídeos as frações de paredes celulares foram submetidas à hidrólise ácida. Para um tubo cônico de vidro foi transferido 1mg de material seco de cada fração de

parede. Em seguida, foram adicionados 100µl de ácido sulfúrico 72 %, e mantido em banho a 30°C por 45 minutos. Após este período de pré-hidrólise, foram acrescentados ao tubo 1,7ml de água destilada e o material foi autoclavado por 1 hora a 120° C. Em seguida o material foi neutralizado com hidróxido de sódio 50% e submetido à coluna de troca iônica (Dowex) para retirada de sais. Os açúcares totais foram quantificados pelo método fenol-sulfúrico (Dubois, 1956) utilizando como padrão glucose (100µg.ml⁻¹). Os monossacarídeos foram analisados por Cromatografia de Troca Aniônica de Alta Performance com Detecção de Pulso Amperométrico (HPAEC-PAD) utilizando coluna Carbopack PA1 num sistema Dionex DX-500 (Tiné et al 2003).

Resultados e Discussão

Na tabela 1, estão apresentados os resultados de teor de β -glucanos em paredes lignificadas e deslignificadas de folhas de *Brachiaria decumbens*. Os dados apresentados mostram que nas paredes deslignificadas o teor de β -glucanos liberado pela ação da endoglucanase de *Bacillus subtilis* triplicou em relação às paredes lignificadas. A presença de lignina pode ter sido um dos fatores que dificultou o acesso da enzima ao polissacarídeo na parede celular como sugerido por Harris & Hartley (1976). Os ácidos ferúlicos ligados aos arabinosilanos, a principal hemicelulose das gramíneas, poderiam também representar um fator que dificultaria a solubilização dos β -glucanos. Neste experimento, não foram observadas diferenças entre folhas de diferentes classes de tamanho.

Quando analisado o teor de β -glucanos das paredes deslignificadas das diferentes classes de tamanho de folhas em diferentes épocas do ano observou-se que em folhas menores que 10cm, o teor de β -glucanos foi significativamente maior ($p > 0,05$) quando comparado ao das folhas menores que 20cm cm coletadas em maio (tabela 2). Em análises similares feitas em setembro, quando foram encontradas folhas de classe de tamanho acima de 20cm, não se observou variação nos teores de β -glucanos. Uma possível explicação para estas observações seria que os β -glucanos formariam uma trama mais frouxa com os arabinosilanos, tornando-se assim de mais fácil solubilização. Nas folhas maiores do que 20cm, os β -glucanos estariam interagidos fortemente com arabinosilanos numa suposta interação intermolecular como sugerido por Izydorczyk & MacGregor (2001).

Os resultados obtidos com a análise de perfil e razão molar dos oligossacarídeos de β -glucanos estão apresentados na tabela 3. Entre as classes de tamanho de folhas nas coletas de maio e setembro, a razão molar dos oligossacarídeos foi alterada. Entretanto, observa-se uma tendência de aumento da razão nas folhas da classe 20-30cm da coletas em maio se comparadas às coletas de setembro. Este resultado possivelmente está relacionado ao fim do período de alongamento celular e

crescimento dos tecidos. À medida que cessa o crescimento, é provável que ocorra uma modificação estrutural dos β -glucanos que provocaria aumento do número de ligações (1 \rightarrow 4) glucanos e conseqüentemente alteraria a razão molar de tri:tetra no polímero. Quanto maior o número de ligações (1 \rightarrow 4) mais linear o polímero, o que diminui a solubilidade e, favorece a interação com os arabinoxilanos e, portanto tornando menos solúvel o polímero (Roubroeks *et al.* 2000).

Ao contrário, as folhas menores que 10cm poderiam apresentar um número maior de ligações (1 \rightarrow 3), o que conseqüentemente conferiria uma forma zig-zag aos β -glucanos, dificultando a interação com os arabinoxilanos e tornando o polissacarídeo mais solúvel, como proposto por Clarke & Stone (1963).

De uma forma geral, os resultados sugerem que a deposição e mobilização dos β -glucanos poderiam ocorrer no início do crescimento da planta e através de um efeito de diluição se distribuiria para os tecidos expandidos (Kim *et al* 2000). Em tecidos em crescimento, os β -glucanos atuariam no processo de afrouxamento e desmonte da parede, que ao cessar o crescimento se tornaria mais um elemento estrutural, formando o domínio β -glucanos - GAXs interligados às microfibrilas de celulose.

Baseado na solubilidade, os β -glucanos e GAX podem ser classificados como polímeros solúveis em água e em álcali (Lzydorczyk *et al.* 1998a,b). A análise de monossacarídeos neutros das frações de parede revelou um aumento de glucose na fração 4M nas folhas maiores que 30cm, sendo que parte desta glucose pode ser proveniente dos β -glucanos fortemente ligados aos arabinoxilanos e solubilizados nesta fração (tabela 4) (figura 2). Outra parte ainda, seria oriunda do amido, uma vez que o DMSO não o removeu totalmente como se verificou com o teste de iodo-iodeto de potássio (dados não apresentados). Quanto aos arabinoxilanos, na fração 4M houve uma diminuição na razão Ara:Xil (tabela 4), o que poderia indicar a presença de um polímero menos solúvel, como proposto por Roubroeks *et al.* (2000), e fortemente interagido com os β -glucanos como proposto por

Izydorczyk & MacGregor (2000). Em *Rhynchelytrum repens* o mesmo fenômeno foi observado na fração 4M, e aparentemente o efeito hipoglicemiante demonstrado no estudo pode ser resultado da ação de ambos os polímeros (De Paula *et al.* 2005).

Em conjunto, esses resultados sugerem que em folhas jovens de *Brachiaria decumbens*, β -glucanos e arabinosilanos se encontram mais solúveis, possivelmente mediando um afrouxamento da parede celular e conseqüentemente atuando na expansão foliar da planta. Em folhas expandidas esses polímeros possivelmente desempenhariam funções mecânicas, compondo juntamente com a celulose o arcabouço da parede celular. *Brachiaria decumbens* representa um bom modelo para futuros estudos de biossíntese de glucanos de cadeia mista e de arabinosilanos, por apresentar crescimento rápido, possibilitando várias coletas em diferentes fases do desenvolvimento da planta. A partir dos dados obtidos com *Brachiaria decumbens*, os estudos de β -glucanos poderão ser estendidos para outras gramíneas nativas do cerrado, que até o momento não foram estudadas com enfoque em parede celular.

Literatura citada

- Anderson, J.W. & Chen, W.L.** 1986. Cholesterol-lowering properties of oat products. *In*: F.H. Webster (ed.). Oats: Chemistry and technology. American Association of Cereal Chemists, Minnesota. pp. 309-333.
- Bacic, A., & Stone, B.A.** 1981. Chemistry and organisation of aleurone cell wall components from wheat and barley. *Australian Journal of Plant Physiology* 8: 475-495.
- Buckeridge, M.S., Rayon, C., Urbanowicz, B., Tiné M.A.S & Carpita N.C.** 2004. Mixed Linkage (1,3)(1,4)- β -Glucans of Grasses. *Cereal Chemistry* 81(1):115-127.
- Buckeridge, M.S., Vergara, C.E. & Carpita, N.C.** 1999. The mechanism of synthesis of a cereal mixed-linkage (1,3)(1,4) β -D-glucan in maize: Evidence for multiple sites of glucosyl transfer in the synthase complex. *Plant Physiology* 120 (4): 1105-1116.
- Buckeridge, M.S., Vergara, C.E. & Carpita, N.C.** 2001. The mechanism of synthesis of (1,4)-D-Glycans: insight into multi-site mechanisms of glycosyl transfer provided by the cereal mixed-linkage β (1,3)(1,4)-D-glucan synthase. *Phytochemistry* 57: 1045-1053.
- Bonfim, E.R.P., Pinto, J.C., Salvador, N., Morais, A.R. de, Andrade, I.F. & Almeida, O.C.** 2003. Efeito do tratamento físico associado à adubação em pastagem degradada de braquiária,

nos teores de proteína bruta, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido. *Ciência Agrotecnológica*. 27:912-920.

Carpita, N.C. 1984. Cell wall development in maize coleoptiles. *Plant Physiology* 76: 205-212.

Carpita, N.C. 1989. Pectic polysaccharides of maize coleoptiles and proso millet cells in liquid culture. *Phytochemistry* 28: 121-125.

Carpita, N.C. 1996. Structure and Biogenesis of the cell walls of grasses. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Plant Biology* 47: 445-476.

Carpita, N.C., Defernez, M., Fendlay, K., Wells, B., Showe, D.A, Catchpole, G., Wilson, R.H. & McCann, M.C. 2001. Cell wall architecture of the elongating maize coleoptile. *Plant Physiology* 17; 551-565.

Carpita, N.C. & Gibeaut, D.M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal* 3: 1-30.

Carpita, N.C. & Kanabus, J. 1988. Chemical structure of the cell walls of dwarf maize and changes mediated by gibberelin. *Plant Physiology* 88:671-678.

Chapman, G.P. 1996. The biology of grasses. CAB. Internacional, Wallingford. 288p.

Dahlgren, R.M.T., Clifford, H.T, Yes, P.F. 1985. The Families of the Monocotyledons: structure, evolution and taxonomy. Berlin: Springer-Verlag.

De Paula A. C. C. F. F., Souza, R. V., Figueiredo-Ribeiro R. C. L., & Buckeridge, M. S. 2005.

Partial characterization and hypoglycemic activity of polysaccharide fractions containing β -glucan in different parts of plants of *Rhynchelytrum repens* (Willd.) C. E. Hubb., Poaceae. β -glucans and hypoglycemic activity of *R. repens* extracts. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 38:

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. 1956, Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28: 350-358.

Fincher, G.B. & Stone, B. 1986 Cell walls and their components in cereal grain technology. *In:* Pomeranz, Y (ed.). Advances in cereal science and technologic. American Association of Cereal Chemists, Minnesota. pp 207-295.

Gorshokova, T.A., Watt, S.E., Salmikov, V.V., Gibeaut, D.M., Ibraguimov, M.R, Losovaya., V.V & Carpita, N.C. 1996. Cell-wall polysaccharides of developing flax. Plant Physiology 110: 721-729.

- Harris, P. & Hartley, R. 1976. Detection of bounds ferulic acid in cell walls of the Gramineae by ultraviolet fluorescence microscopy. *Nature* 259: 508-510.
- Izydorczyk, M. S., Macri, L.J. & MacGregor, A. W. 1998a. Structure and physicochemical properties of barley non-starch polysaccharides –I. Water extractable β -glucans and arabinoxylans. *Carbohydrate Polymers* 35: 249-258.
- Izydorczyk, M. S., Macri, L.J. & MacGregor, A. W. 1998b. Structure and physicochemical properties of barley non-starch polysaccharides- II. Alkali-extractable β -glucans and arabinoxylans. *Carbohydrate Polymers* 35: 259-269.
- Izydorczyk, M. S. & Biliaderis, C. G. 1995. Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers* 28: 33-45.
- Izydorczyk, M. S. & MacGregor, A W. 2000. Evidence of intermolecular interactions of beta-glucans and arabinoxylans. *Carbohydrate Polymers* 41:417-420.
- Kerstens, S. & Verbelen, J.P. 2002. Cellulose Orientation in the Outer epidermal Wall of angiosperm Roots: Implications for Biosystematic. *Annals of Botany* 90: 669-676.
- Kim, J.B., Olek, A. T., and Carpita, N. C. 2000. Plasma membrane and cell wall exo- β -D-glucanases in developing maize coleoptiles. *Plant Physiol.* 123:471-485.

- Lima, D. U., Santos, H. P., Tiné, M. A., Molle, F. D. & Buckeridge, M. S.** 2001. Patterns of expression of cell wall related genes in sugar cane. *Genetics and Molecular Biology* 24: 191-198.
- Mantovani, V. & Martins, F.R.** 1988. Variações fenológicas das espécies do cerrado da Reserva Biológica de Moji Guaçu, Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Botânica* 11:101-112.
- McCann, M.C. & Roberts, K.** 1991. Architecture of the primary cell wall. *In: Lloyd, C. W. (ed.). The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form.* London, Academic Press. pp 109-129.
- McDonald, A., Shinnick, F. & Ink, S.** 1992. Review of the effects of oats on human health. *In: The Changing Role of Oats in Human and Animal Nutrition. 4th Int. Oat Conferenc*, ed. A.R. Barr. Vol 1, pp.1-8. Int. Oat Conference Committee. Adelaide. Australia.
- Parrish, F.W., Perlin, A.S. & Reese, E.T.** 1960. Selective enzymolysis of poly- β -glucans, and the structure of the polymers. *Canadian Journal of Chemistry* 38: 2094-2104.
- Parry, D.W., Hodson, M.J. & Samgster, A.G.** 1984. Some recent advances in studies of silicon in higherplants. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* 304: 537-549.
- Pear, J. R., Kawagoe, Y., Schreckengost, W. E., Delmer, D.P. & Stalker, D.M.** 1996. Higher plants contain homologs of the bacterial *celA* genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93, 12637-12642.

- Pearcy, R.W. & Ehleringer, J.** 1984. Comparative ecophysiology of C3 and C4 plants. *Plant Cell and Environment* 7: 1-13.
- Reicheir, F., Ganter, J. L. M. S., Rechia, C. V. G., Sierakowski, M. R. & Gorin, P. A. J.** 1994. Uneven *O*-acetyl distribution in a lightly acetylated D-Xylan from sugar cane. *Ciência e Cultura* 46: 283-285.
- Renvoize, S. A. & Clayton, W. D.** 1992. Classification and evolution of the grasses. In: G.P. Chapman (ed) *Grass evolution and domestication* 3-37, Cambridge University Press. UK.
- Roberts, E.J., Godshall, M. A., Carpenter, F.G. & Clarke, M. A.** 1976. Composition of soluble indigenous polysaccharide from sugar cane. *International Sugar Journal* 78:163-165.
- Rong, N., Assman, L. M. & Nicolosi, R. J.** 1997. Oryzanol decreases cholesterol absorption and aortic fatty streaks in hamsters. *Lipids* 32: 303-309.
- Roubroeks, J.P., Andersson, R.A & Aman, P.** 2000. Structural features of (1,3)(1,4)- β -glucan and arabinoxylan fractions isolated from rye bran. *Carbohydrate Polymers* 42: 3-11.
- Rudall, P., Caddick, L.R.** 1994. Investigation of the presence of phenolic compounds in monocotyledons cell walls using UV fluorescence microscopy. *Annual Botany* 74, 483-491.

- Saveedra, F., Karacsonyi, S. & Adolphi, J.** 1988. Studies on the polysaccharides of sugar cane (*Saccharum officinarum*): structural features of the water-insoluble D-Xylans. *Carbohydrate Research* 180: 61-71.
- Shibuya, N & Nakane, R.** 1984. Pectic polysaccharides of rice endosperm cell walls. *Phytochemistry* 23:1425-1429.
- Smith, B.G. & Harris, P.J.** 1999. The polysaccharide composition of Poales cell walls: Poaceae cell walls are not unique. *Biochemical Systematics and Ecology* 27:33-53
- Storsley, J.M., Izydorczyk, M.S., Biliarides, C.G. & Rossnagel, B.** 2003. Structure and physicochemical properties of β -glucans and arabinoxylans isolated from hull-less barley. *Food Hydrocolloids* 17: 831-844.
- Trethewey, J.K. & Harris, P.J.** 2002. Location of (1,3) and (1,3) (1,4)- β -D-glucans in vegetative cell walls of barley (*Hordeum vulgare*) using immunogold. *New Phytologist* 154:347-358
- Tiné, M.A.S., Lima, D.U. & Buckeridge, M.S.** 2003. Galactose branching modulates the action of cellulase on seed storage xyloglucans. *Carbohydrate Polymers* 52:135-141.

Wood, P.J., Weisz, J. & Blackell, B.A. 1994. Structural studies of (1,3)(1,4)- β -glucans by ^{13}C -nuclear magnetic resonance spectroscopy and by rapid analysis of cellulose-like regions using high-performance anion-exchange chromatography of oligosaccharides released by lichenase. *Cereal Chemistry* 71: 301-307.

Woodward, J. R., Fincher, G. B. & Stone, B.A. 1983. Water soluble (1,3)(1,4)- β -glucans from barley (*Hordeum vulgare*) endosperm. II. Fine structure. *Carbohydrate Polymers* 3: 207 – 225.

Yokohama, W.H., Hudson, C.A., Knuckles, B.E., Chiu, M.C.M., Sagre, R.N., Tulund, J.R. & Scheeman, B.O. 1997. Effect of barley B-glucan in durum wheat pasta on human glycemic response. *Cereal Chemistry* 74: 293-294.

Tabela 1. Quantificação de β -glucanos de paredes celulares em folhas de *Brachiaria decumbens* ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ massa seca). Análise estatística ANOVA ($p < 0,05$); significância indicada pelas letras diferentes: maiúsculas entre o tipo de parede, e as minúsculas entre as classes de tamanho.

Parede	Classes de tamanho (cm)		
	< 20	20-30	> 30
Lignificada	9,2 (3,0) ^{Aa}	6,3 (0,3) ^{Aa}	7,0 (1,4) ^{Aa}
Deslignificada	20,9 (1,7) ^{Ba}	21,7 (2,4) ^{Ba}	22,8 (6,2) ^{Ba}

Tabela 2. Valores médios (desvio padrão entre parêntesis) de rendimento de β -glucanos ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ massa seca). Análise estatística ANOVA ou teste T ($p < 0,05$); significância indicada pelas letras diferentes: maiúsculas entre as datas de coleta; minúsculas entre as classes de tamanho a cada coleta.

Coleta	Classes de tamanho (cm)			
	< 10	< 20	20-30	> 30
maio 2003	53,1 (0,4) ^a	23,9 (4,2) ^{Ab}	-	-
setembro 2003	-	20,9 (1,6) ^{Aa}	21,7 (2,4) ^a	22,8 (6,2) ^a

Tabela 3. Razão molar entre tri e tetrassacarídeos dos β -glucanos de parede celular em folha de *Brachiaria decumbens*. Análise estatística ANOVA ou teste T ($p < 0,05$); significância indicada pelas letras diferentes: maiúsculas entre as datas de coleta; minúsculas entre as classes de tamanho a cada coleta.

Coleta	Classes de tamanho(cm)			
	<10	<20	20-30	>30
Maio 2003	2,03 (0,30) ^a	2,12 (0,04) ^{Aa}	-	-
Setembro 2003		2,93 (0,05) ^{Ba}	3,27 (0,36) ^a	nd

Tabela 4. Distribuição dos monossacarídeos neutros nas frações da parede celular de folhas de *Brachiaria decumbens* (% por área de picos do cromatograma) e razão Ara:Xil.

Classes de tamanho (cm)	Frações									
	0,1M					4,0M				
	ARA	GAL	GLC	XIL	ARA/XIL	ARA	GAL	GLC	XIL	ARA/XIL
<10	33,8	5,4	11,6	49,2	0,69	33,1	6,3	10,4	50,2	0,65
20-30	34,9	6,2	11,7	47,1	0,74	31,1	5,2	12,1	51,1	0,61
>30	34,1	6,1	12,7	47,1	0,72	28,3	5,4	18,7	47,6	0,61

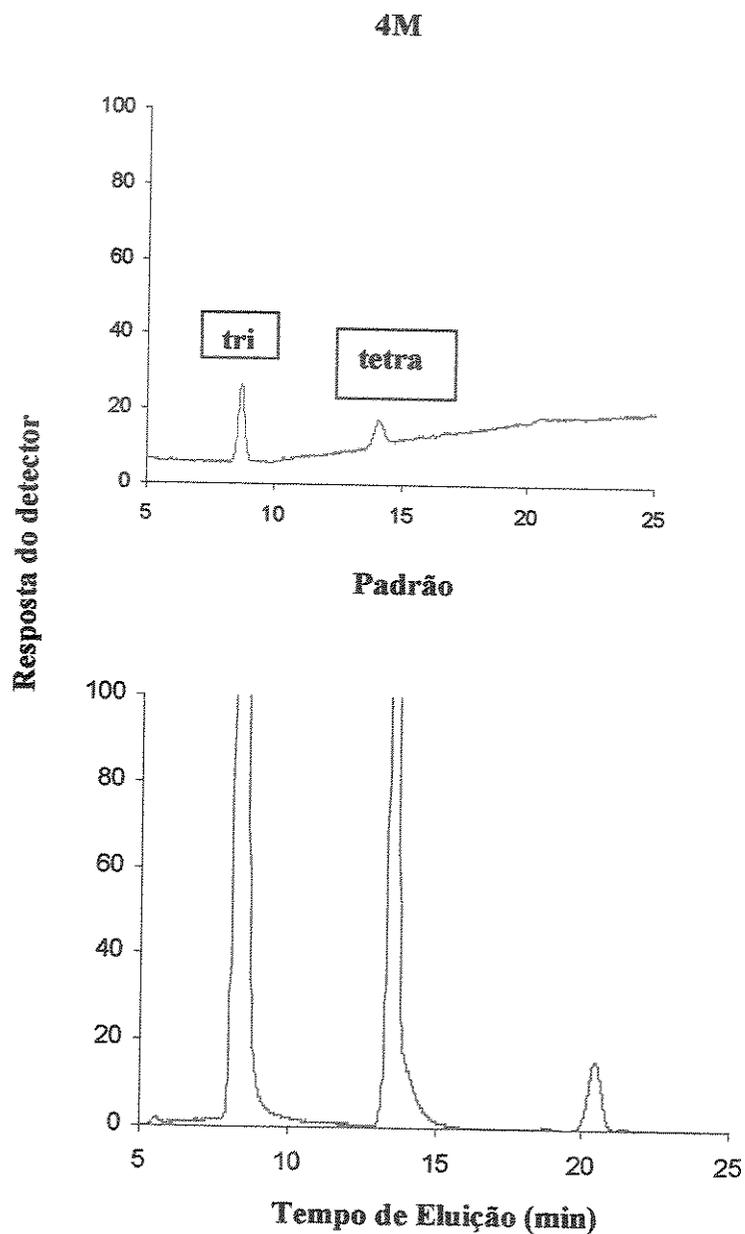


Figura 1 – Perfil cromatográfico dos oligossacarídeos da fração 4M da parede celular de folhas de *B. decumbens* de tamanhos maiores que 30cm. O padrão refere-se ao perfil cromatográfico de oligossacarídeos de β -glucanos de *Hordeun vulgare* Megazyme®.

DISCUSSÃO GERAL

PAREDE CELULAR – DICOTILEDÔNEAS X MONOCOTILEDÔNEAS

Na história da evolução das plantas, desde as algas verdes até as fanerógamas, um dos eventos mais notáveis foi a mudança ocorrida nas paredes celulares (Stebbins 1992; Cassab 1998). As modificações ocorridas nas paredes celulares das fanerógamas, ao longo do processo evolutivo, têm sido fonte inspiradora de muitos estudiosos. Entretanto uma grande lacuna ainda permanece em relação aos processos evolutivos que levaram a transição entre dicotiledôneas e monocotiledôneas e o estabelecimento de plantas dos dois grupos no ecossistema.

Segundo Carpita e Gibeau (1993), as paredes celulares primárias das fanerógamas podem ser classificadas em dois grupos: do tipo I (encontrada na maioria das dicotiledôneas e em algumas monocotiledôneas) e do tipo II (maioria das monocotiledôneas).

As paredes do tipo I apresentam os xiloglucanos como a principal hemicelulose. Esses polissacarídeos estão relacionados com o afrouxamento das ligações intra e intermoleculares que permitem o crescimento e alongamento celular através de uma intensa e controlada atividade de hidrolases e transglicosilases. Além disso, é atribuída a este polissacarídeo a função de alinhamento das microfibrilas de celulose (Hayashi 1989).

O domínio celulose-hemicelulose da parede celular é responsável pela resistência à pressão de turgor e pelo crescimento anisotrópico das células vegetais (Taiz 1984, Reis *et al.* 1994, Baskin *et al.* 1999). A montagem e a expansão da parede primária são dirigidas pela conformação e dinâmica dos polissacarídeos que devem interagir durante estes processos (Lima 2002). Acreditava-se que a presença de fucose na molécula de xiloglucano fosse responsável pela maior interação desta molécula com a celulose. Entretanto, um estudo realizado por Lima *et al.* (2004) demonstrou que a

interação entre XG e celulose está diretamente relacionada ao peso molecular do polímero, ou seja, quanto menor o tamanho da molécula, mais interativa ela se apresenta.

As análises de composição de polissacarídeos da parede primária das monocotiledôneas indicaram que as famílias deste grupo podem ser divididas em dois subgrupos. O primeiro subgrupo, as Comelinoídes, inicialmente foi identificado pela presença de ácidos ferúlicos esterificados e eterificados nas paredes primárias (Harris & Hartley 1976, Rudall & Caddick, 1994). Este mesmo grupo foi identificado como um clado monofilético, tendo como base as seqüências de nucleotídeos do gene *rbcL*. A este subgrupo estão incluídos: banana, gramíneas, gengibre, abacaxi e palmeiras, que compreendem as ordens Arecales, Comelinales, Poales e Zingiberales reconhecidas pelo Angiospermae Phylogeny Group (APG.2002). O segundo subgrupo, as não comelinoídes, não apresenta ácidos ferúlicos esterificados e eterificados, e os GAXs não constituem a hemicelulose principal. As paredes primárias deste subgrupo apresentam uma composição similar às encontradas nas dicotiledôneas (Waldron & Selvedran 1990).

Provavelmente as modificações ocorridas nas paredes de monocotiledôneas estejam relacionadas ao hábito desse grupo, tornando-se necessária a presença de uma parede primária mais “flexível”, para que as plantas pudessem se estabelecer e crescer rapidamente.

Em Poales, o surgimento dos β -glucanos possivelmente foi um avanço dentro do processo evolutivo das monocotiledôneas. Entretanto, não se sabe exatamente quais foram os eventos evolutivos responsáveis por esse acréscimo nas paredes. A ocupação de ambientes abertos, altamente iluminados e o crescimento contínuo das espécies são sugeridos como fatores que levaram ao aparecimento desse polissacarídeo, em todas as famílias da ordem Poales, exceto em Restionaceae (*sensu* Dahlgren), (Buckeridge et al 2004).

Através das análises realizadas no presente trabalho, procuramos demonstrar que os β -glucanos não são polissacarídeos transitórios como relatado na literatura. Os resultados encontrados

nos diferentes órgãos da cana-de-açúcar (artigo 1), sugerem que estes polissacarídeos permanecem nos tecidos como componente estrutural da parede.

Provavelmente os β -glucanos, em conjunto com outro polissacarídeo (xiloglucano, por exemplo), participam do processo de afrouxamento da parede celular durante o crescimento dos tecidos. E à medida que cessa o crescimento, esses polissacarídeos interagem com GAXs numa trama muito forte ou numa interação intermolecular como sugerido por Izydorczyk & MacGregor (2000).

Interação intermolecular e orientação das microfibrilas de celulose

A estrutura química dos polissacarídeos de parede primária de gramíneas e a interação dessas moléculas, formando o que tem sido denominada a arquitetura da parede, têm sido deduzidos a partir do fracionamento da parede celular das amostras analisadas (Carpita et al 2001). Atualmente, técnicas como FESEM (Field-Emission Scanning Electron Microscopy) e FTIR (Fourier Transformed Infrared Spectroscopy) têm contribuído para a interpretação dessas estruturas. A partir dessas novas técnicas foram propostos modelos específicos para parede celular de gramínea como, por exemplo, de distribuição dos polissacarídeos, de grau de ramificação e de interação entre polímeros.

Em dicotiledôneas, como citado anteriormente, sabe-se da participação dos xiloglucanos na orientação das microfibrilas de celulose, através de uma interação específica, a qual pode ser observada e medida em ensaios *in vitro*. Estes ensaios tornaram-se ferramentas promissoras para analisar os efeitos das alterações estruturais do polímero estudado sobre a capacidade de interação entre as hemiceluloses. A interação hemicelulose–celulose depende de características estruturais da

hemicelulose, sendo que, no caso específico dos xiloglucanos, o peso molecular e o grau de galactosilação são fatores preponderantes (Lima et al 2004).

Ensaio *in vitro* sobre interação entre polissacarídeos de parede celular de gramíneas não foram encontrados na literatura. Utilizando as técnicas acima citadas para gramíneas, Carpita *et al* (2001) demonstraram a ocorrência de forte interação entre os β -glucanos e celulose, nas paredes primárias de coleóptilos em *Zea Mays*. Neste trabalho, foi observado que os GAXs com grau de ramificação elevado de arabinose em conjunto com os glucomananos constituem o material intermediário entre as microfibrilas de celulose, portanto menos interativo a celulose. Quanto ao xiloglucano, esse aparece em menor quantidade e fortemente ligado à celulose.

A interação entre β -glucanos e GAXs é pouco conhecida. No caso dos β -glucanos, a razão tri:tetra dos oligossacarídeos influencia diretamente na capacidade de interação, quanto maior a razão molar, mais interativo o polímero (Roubreks, 2000). Em *B. decumbens* (Artigo 2), demonstramos que um ligeiro aumento na razão molar de tri:tetra pode ter provocado uma forte interação dos β -glucanos com o GAX e/ou com a celulose.

No Artigo 1, observamos que tanto os β -glucanos quanto os GAXs se distribuem por toda a planta. Izydorczyk & MacGregor (2000) sugeriram que GAXs e β -glucanos apresentam uma interação intermolecular, o que provavelmente dificulta a separação desses polímeros durante o fracionamento da parede celular, a mesma foi verificada em *B. decumbens* (Artigo 2) ao longo do fracionamento da parede celular nas diferentes concentrações de hidróxido de sódio.

Quanto à orientação das microfibrilas de celulose, não se sabe qual seria a atuação dos GAXs e β -glucanos. Em dicotiledôneas, durante o afrouxamento da parede, a enzima XET (xiloglucano-transglicosilase) atua diretamente nos xiloglucanos, transglicosilando fragmentos do polímero, possibilitando que a parede seja transformada. Outro grupo de proteínas que atua no afrouxamento da parede é o das expansinas, as quais, segundo Cosgrove (1999), atuam no afastamento das

microfibrilas de celulose, facilitando o acesso das XETs aos xiloglucanos. Em cana-de-açúcar observou-se forte expressão gênica de XETs em flores e folhas (Figura 7). Embora o xiloglucano não seja a hemicelulose principal neste grupo de plantas, isto não significa que ao longo da evolução, o polímero tenha perdido completamente a sua função. Até o presente momento pouco se sabe acerca da atuação de xiloglucanos nas paredes de gramíneas.

Outro aspecto interessante em gramíneas é a presença de uma classe específica de expansinas, as β -expansinas. Acredita-se que a afinidade destas proteínas pela parede do tipo II esteja relacionada à presença de GAXs e β -glucanos (Cosgrove 1999).

Outra lacuna existente quanto ao afrouxamento da parede celular de gramíneas é a ausência de endoxilanasas endógenas que atuariam sobre GAXs. Embora muitas das enzimas de microorganismos já tenham sido caracterizadas, não existem transglicosilases para GAXs, em gramíneas. Assim, é possível que os xiloglucanos possam atuar no afrouxamento da parede celular em conjunto com os β -glucanos. Esses polissacarídeos são hidrolisados pelas exo e endoglucanases, e à medida que diminui o teor de β -glucanos, o conteúdo de ácidos ferúlicos e outras substâncias aromáticas aumenta, travando todo o sistema e finalizando o crescimento celular (Carpita 1986., Musel et al 1997).

Correlação entre os níveis de expressão gênica e a ocorrência dos polímeros

Ao correlacionarmos os níveis de expressão gênica e a ocorrência dos polissacarídeos de parede celular, ao longo do desenvolvimento das folhas e panículas em cana, observamos que de forma geral, os eventos ocorridos nas paredes celulares de ambos os órgãos foram similares, com alterações (provavelmente hidrólise) nos compostos neutros das pectinas, dos mananos e por fim um aumento no nível de ramificação dos xilanos. Esses dados corroboram os de expressão gênica

apresentados no mapa de superfície (figura 7), onde os genes que codificam para as celulose-sintases ou betaglucano-sintases, peroxidases, expansinas, β -glucosidases, β -1,3-glucanases, foram os com maior número de *reads* nestes órgãos e essas enzimas participam ativamente nos processos ocorridos durante o afrouxamento da parede ao longo do desenvolvimento da planta.

O padrão de expressão de genes relacionados à parede celular, baseado no número de *reads* refletiu as características fisiológicas esperadas para folhas e panículas o que foi confirmado através da análise bioquímica da parede celular.

De maneira geral, nossos dados sobre as alterações estruturais nas paredes celulares de diferentes tecidos de cana, em comparação com as observações de Lima et al. (2001) sobre os padrões de expressão gênica, indicam que há um padrão dinâmico de alterações em diferentes níveis de emergência (expressão gênica e metabolismo da parede). Tal padrão denota claramente que a matriz extracelular é um compartimento dinâmico em plantas e remete a objetivos futuros de obter uma compreensão maior sobre aspectos funcionais das alterações observadas, e assim compreender melhor a importância da parede celular durante o desenvolvimento de plantas.

Perspectivas para a aplicação tecnológica de β -glucanos e GAXs

Os glucanos de cadeia mista ou β -glucanos são conhecidos a mais de trinta anos, e suas implicações tecnológicas vão além da fabricação de cerveja e utilização como fibra dietética. Existem estudos que abordam a utilização de β -glucanos na produção de biofilmes para tratamento de queimaduras (grupo de Peter Wood, Canadá).

O conhecimento da distribuição dos polissacarídeos de parede celular ao longo do desenvolvimento da cana-de-açúcar poderá ser utilizado como ferramenta para o melhoramento genético desta espécie. A utilização de técnicas genéticas que possibilitassem o aumento ou

diminuição da expressão de genes relacionados à biossíntese destes polissacarídeos possibilitaria o desenvolvimento de variedades de cana com menor teor de β -glucanos, o que diminuiria o problema de entupimento dos filtros causados por estes polímeros durante a produção do açúcar.

O aproveitamento de bagaço de cana-de-açúcar como fonte rica em β -glucanos e GAXs para a produção de fibra dietética bem como substâncias hipoglicemiantes, seria uma alternativa de uso desta biomassa todavia pouco explorada.

Um recente estudo demonstrou que glucuronoxilanos de *Populus grandidentata*, em conjunto com xilitol e manitol, representam um grande potencial para produção de biofilmes (Grondahl *et al* 2004). Estes biofilmes apresentam menor permeabilidade ao oxigênio, o que os torna viáveis para embalagens de alimentos.

Os GAXs de bagaço de cana-de-açúcar e de braquiária representam recursos pouco explorados pela indústria. Entretanto, do ponto de vista ecológico, a utilização dessa biomassa pela indústria farmacêutica e de embalagens, poderia tornar-se uma solução ao seu acúmulo após a colheita, principalmente para a indústria sucroalcooleira.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akihisa, T., Yasukawa, K., Yamura, M., Ukija, M., Kimura, Y., Shimizu, N., & Arai, K. 2000. Triterpene alcohol and sterol ferulates from rice and their anti-inflammatory effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 2313 – 2319.
- Anderson, J.W. & Chen, W.L. 1986. Cholesterol-lowering properties of oat products. *In: F.H. Webster (ed). Oats: Chemistry and technology. American Association of Cereal Chemists, Minnesota. pp. 309-333.*
- Angiosperm Phylogeny Group. 2000. An ordinal classification for the families of flowering plants, *Annual Missouri Botanical Garden* 85: 531-553.
- Arruda, P. 2001. Sugarcane transcriptome. A landmark in plant genomics in the tropics. *Genetics and Molecular Biology* 24:1-4.
- Bacic, A., & Stone, B.A. 1981. Chemistry and organization of aleurone cell wall components from wheat and barley. *Australian Journal of Plant Physiology*. 8: 475-495.
- Baskin, T.I., meeks, H.T.H.M., Liang, B.M. & Sharp, R.E. 1999. Regulation of Growth Anisotropy in Well-watered and Water-Stressed Maize Roots. II. Role of Cortical Microtubules and Cellulose Microfibrils. *Plant Physiology* 119:681-692.

- Bonfim, E.R.P., Pinto, J.C., Salvador, N., Morais, A.R. de, Andrade, I.F. & Almeida, O.C. 2003. Efeito do tratamento físico associado à adubação em pastagem degradada de braquiária, nos teores de proteína bruta, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido. *Ciência Agrotecnológica*. 27:912-920.
- Brambilla, E. M. 2004. Desenvolvimento de ingrediente rico em xilo-oligossacarídeos por modificação enzimática da fibra de milho obtida pela moagem a seco. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Londrina.
- Buckeridge, M.S. & Aidar, M.P.M. 2002. Carbon sequestration in the rain forest: alternatives using environmentally friendly biotechnology. *Biota Neotropica* 2: 1-4.
- Buckeridge, M.S., Rayon, C., Urbanowicz, B., Tiné M.A.S & Carpita N.C. 2004. Mixed Linkage (1→3)(1→4)-β-Glucans of Grasses. *Cereal Chemistry* 81(1):115-127.
- Buckeridge, M.S., Vergara, C.E. & Carpita, N.C. 1999. The mechanism of synthesis of a cereal mixed-linkage (1→3)(1→4)β-D-glucan in maize: Evidence for multiple sites of glucosyl transfer in the synthase complex. *Plant Physiology* 120 (4): 1105-1116.
- Buckeridge, M.S., Vergara, C.E. & Carpita, N.C. 2001. Insight into multi-site mechanisms of glycosyl transfer in (1→4)β-D-glycans provided by the cereal mixed-linkage (1→3),(1→4) β-D-glucan synthase. *Phytochemistry* 57: 1045-1053.

- Buchanan, B.B., Gruissem, W. & Jones, R.L. 2000. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Maryland.
- Burman, A.G. 1985. Nature and composition of grass flora of Brazil. *Willdenowia* 15: 211-233.
- Carpita, N.C. 1984. Cell wall development in maize coleoptiles. *Plant Physiology*. 76: 205-212.
- Carpita, N.C. 1989. Pectic polysaccharides of maize coleoptiles and proso millet cells in liquid culture. *Phytochemistry* 28: 121-125.
- Carpita, N.C., Defomez, M., Fendelay, K., Wells, B., Showe, D.A, Catchpole, G., Wilson, R.H. & McCann, M.C. 2001. Cell wall architecture of the elongating maize coleoptile. *Plant Physiology* 17; 551-565.
- Carpita, N. C. & MacCann, M. 2001. The cell wall. *In* B. Buchanan, W. Gruissem & R. Jones (Eds.) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, pp. 52-106.
- Carpita, N.C. & Gibeaut, D.M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal*. 3: 1-30.

- Carpita, N.C. & Kanabus, J. 1988. Chemical structure of the cell walls of dwarf maize and changes mediated by gibberelin. *Plant Physiology* 88:671-678.
- Carpita, N.C. 1996. Structure and Biogenesis of the cell walls of grasses. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Plant Biology* 47: 445-476.
- Cassab, G. I. 1998. Plant cell wall proteins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 281-309
- Chapman, G.P. 1996. *The biology of grasses*. CAB. Internacional, Wallingford. 288p.
- Cosgrove, D.J. 1999. Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiology Biochemistry* 38:109-124.
- Cosgrove, D.J. 2000. Wall structure and wall loosening. A look backwards and forwards. *Plant Physiology*.
- Dahlgren, R.M.T., Clifford, H.T & Yes, P.F. 1985. *The Families of the Monocotyledons: structure, evolution and taxonomy*. Springer-Verlag, Berlin.
- Darvill, A., McNeil, M., Albersheim, P. & Delmer, D.P. 1980. The primary cell walls of flowering plants. *In*: P.K. Strumpf & E.E. Conn (Eds). *The biochemistry of plants: a comprehensive treatise*. Academic Press, New York. pp. 91-162.

de Francisco, A & de Sá, R. M. 2001. Beta - Glucanas: Localização, Propriedades e utilização. *In*: F. M. Lajolo, F. Saura-Calixto, E. W. Penna & E. W. Menezes (eds.) *Fibra Dietética en Iberoamérica: Tecnología y Salud*. Livraria Varela, São Paulo. pp. 91-101.

De Paula A. C. C. F. F., Souza, R. V., Figueiredo-Ribeiro R. C. L. & Buckeridge, M.S. 2005. Partial characterization and hypoglycemic activity of polysaccharide fractions containing β -glucan in different parts of plants of *Rhynchelytrum repens* (Willd.) C. E. Hubb., Poaceae. β -glucans and hypoglycemic activity of *R. repens* extracts. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38:

Fincher, G.B., & Stone, B. 1986. Cell walls and their components in cereal grain technology. *In*: Pomeranz, Y (ed.). *Advances in cereal science and technology*. American Association of Cereal Chemists, Minnesota. pp 207-295.

Genoma cana. www.comciencia.br/reportagens/cana/can3.htm. Doce Genoma. Novembro 2004.

Harris, P. & Hartley, R. 1976. Detection of bounds ferulic acid in cell walls of the Gramineae by ultraviolet fluorescence microscopy. *Nature* 259: 508-510.

Hayashi, T. 1989. Xyloglucans in the primary cell wall. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40:139-168.

- Holland, N., Holland, D., Helentjaris, T., Dhugga, K.S., Cazares, B.X. & Delmer, D.P. 2000. A comparative analysis of the plant cellulose synthase (*CesA*) gene family. *Plant Physiology* 123: 1313-1323.
- Hood, K.R., Baasiri, R.A., Fritz, S.E. & Hood, E.E. 1991. Biochemical and tissue print analysis of hydroxyproline-rich glycoproteins in cell walls of sporophytic maize tissues. *Plant Physiology* 96:1214-1219.
- Izydorczyk, M.S. & Biliaderis, C.G. 1992. Influence of structure on the physicochemical properties of wheat arabinoxylan. *Carbohydrate Polymers* 17: 237-247.
- Izydorczyk, M. S. & Biliaderis, C. G. 1995. Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers* 28: 33-45.
- Izydorczyk, M. S. & MacGregor, A. W. 2000. Evidence of intermolecular interactions of beta-glucans and arabinoxylans. *Carbohydrate Polymers* 41:417-420.
- Kellogg, E.A. 1998. Relationships of cereal crops and other grasses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95:2005-2010.
- Kellogg, E.A. 2001. Evolutionary history of the grasses. *Plant Physiology* 125:1198-1205.
- Kerstens, S. & Verbelen, J.P. 2002. Cellulose Orientation in the Outer epidermal Wall of angiosperm Roots: Implications for Biosystematic. *Annals of Botany* 90: 669-676.

- Kim, J.B., Olek, A. T., and Carpita, N. C. 2000. Plasma membrane and cell wall exo- β -D-glucanases in developing maize coleoptiles. *Plant Physiol.* 123:471-485.
- Kindel PK, Liao SY, Liske MR. & Olien CR. Arabinoxylans from rye and wheat seed that interact with ice. *Carbohydrate Research* 1989 15;187(2):173-85.
- Kröger, N., Bergstorf C. & Super M. 1994. A new calcium binding glycoprotein family constitutes a major diatom cell wall component. *EMBO Journal* 13: 4676-4683.
- Lavola A., Julkunen-Tiitto R, Aphalo P, de la Rosa, T. & Lehto T. 1997. The effects of UV-B radiation on UV-absorbing secondary metabolites in birchseedlings grown under simulated forest soil conditions. *New Phytologist* 137: 617–621.
- Lei, M. & Wu, Ru. 1991. A novel glycine-rich cell wall protein gene in rice. *Plant Molecular Biology* 16:187-198.
- Lima, D.U., Santos, H.P., Tiné, M.A.S, Molle, F.D. & Buckeridge, M.S. 2001. Patterns of expression of cell wall related genes in sugar cane. *Genetics and Molecular Biology* 24: 191-198.
- Lima, D.U., Loh, W & Buckeridge, M.S. 2004. Xyloglucan- cellulose interaction depends on the side chains and molecular weight of xyloglucan. *Plant Physiology and Biochemistry* 42(5): 389-394.

- Mantovani, V. & Martins, F.R. 1988. Variações fenológicas das espécies do cerrado da Reserva Biológica de Moji Guaçu, Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Botânica* 11: 101-112.
- McCann, M.C. & Roberts, K. 1991. Architecture of the primary cell wall. *In*: Lloyd, C. W. ed. *The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form*. London, Academic Press. pp 109-129.
- McDonald, A., Shinnick, F. & Ink.S. 1992. Review of the effects of oats on human health. *In* *The Changing Role of Oats in Human and Animal Nutrition*. 4th Int. Oat Conference, ed. A.R. Barr. voll, pp. 1-8. Int. Oat Conference Committee, Adelaide. Australia.
- McDougall, G. J. & Fry, S.C. 1994. Fucosylated xyloglucan in suspension-cultured cells of the gramineous monocotyledon, *Festuca arundinacea*. *Journal of Plant Physiology* 142:591-595.
- Macgregor, A.W.; Fincher, G.B. Carbohydrates of the barley grain. *In*: MACGREGOR A.W.; BHATTY R.S. (Ed.) *Barley: Chemistry and technology*. St. Paul: AACCC, 1993. p.73-130
- Oscarsson, M.; Anderson, R.; Salomonsson, A.C.; Aman, P. Chemical composition of barley samples focusing on dietary fibre components. *Journal of Cereal Science*, v.24, p.161-170, 1996.
- Parrish, F.W., Perlin, A.S. & Reese. E.T. 1960. Selective enzymolysis of poly- β -glucans, and the structure of the polymers. *Canadian Journal of Chemistry* 38: 2094-2104.

- Parry, D.W., Hodson, M.J. Samgster, A.G. 1984. Some recent advances in studies of silicon in higherplants. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B.* 304: 537-549.
- Pear, J.R., Kawagoe, Y., Schreckengost, W.E., Delmer, D.P. & Stalker, D.M. 1996. Higher plants contain homologs of the bacterial *celA* genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93 12637-12642.
- Pearcy, R.W. & Ehleringer, J. 1984. Comparative ecophysiology of C3 and C4 plants. *Plant Cell and Environment* 7: 1-13.
- Reicheir, F., Ganter, J.L.M.S., Rechia, C.V.G., Sierakowski, M. R. & Gorin, P.A.J. 1994. Uneven *O*-acetyl distribution in a lightly acetylated D- Xylan from sugar cane. *Ciência e Cultura* 46: 283-285.
- Reis, D., Vian, B.& Roland, J.C. 1994. Cellulose-glucuronoxylans and plant cell wall structure. *Micron* 25:171-187.
- Renvoize, S.A. & Clayton, W.D. 1992. Classification and evolution of the grasses. *In*: G.P.Chapman (edu). *Grass evolution and domestication* 3,37, Cambridge University Press.UK.
- Roberts, E.J., Godshall, M.A., Carpenter, F.G. & Clarke, M.A. 1976. Composition of soluble indigenous polysaccharide from sugar cane. *International. Sugar Journal* 78:163-165.

- Rong, N., Assman, L.M., & Nicolosi, R.J. 1997. Oryzanol decreases cholesterol absorption and aortic fatty streaks in hamsters. *Lipids* 32: 303-309.
- Roubroeks, J.P., Anderson, R.A & Aman, P. 2000. Structural features of (1→3)(1→4)-β-glucan and arabinoxylan fractions isolated from rye bran. *Carbohydrate Polymers* 42: 3-11.
- Rudall, P., Caddick, L.R. 1994. Investigation of the presence of phenolic compounds in monocotyledons cell walls using UV fluorescence microscopy. *Annual Botany* 74, 483-491.
- Saavedra, F., Karacsonyi, S. & Adolfi, J. 1988. Studies on the polysaccharides of sugar cane (*Saccharum officinarum*): structural features of the water-insoluble D-Xylans. *Carbohydrate Research* 180: 61-71.
- Salisbury, F. B. & Ross, C. W. 1992. *Plant physiology*. 4.ed. California: Wadsworth Publishing Company, p. 682.
- Shibuya, N & Nakane, R. 1984. Pectic polysaccharides of rice endosperm cell walls. *Phytochemistry* 23:1425-1429.
- Smallwood, M. Martin, H. & Knox, J.P. 1995. An epitope of rice threonine- and hydroxyproline-rich glycoprotein is common to cell wall and hydrophobic plasma-membrane glycoproteins. *Planta* 196:510-522.

- Smith, B.G. & Harris, P.J. 1999. The polysaccharide composition of Poales cell walls: Poaceae cell walls are not unique. *Biochemical Systematics and Ecology* 27:33-53.
- Stebbins, G.L. 1992. Comparative aspects of plant morphogenesis: A cellular, molecular and evolution approach. *American Journal of Plant* 79:589-598.
- Storsley, J.M., Izydorczyk, M.S., Biliarides, C.G. & Rossnagel, B. 2003. Structure and physicochemical properties of β -glucans and arabinoxylans isolated from hull-less barley. *Food Hydrocolloids* 17: 831-844.
- Taiz, L. 1984. Plant Cell expansion: regulation of cell-wall mechanical properties. *Annual Review Plant Physiology* 35: 585-657.
- Waldron, K.W. & Selvendran, R.R. 1990. Composition of the cell walls of different asparagus (*Asparagus officinalis*) tissues. *Physiology Plant* 80, 568-575.
- Wanderley, M.G.L., Shepherd, G.J. & Giuliatti, A.M. 2001. Poaceae. *In* M.G.L Wanderley, G.J. Shepherd, A.M. Giuliatti (Eds.) *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. São Paulo: HUCITEC.
- Watson, L & Dallwitz, M.J. 1992. *The grass genera of the World*. Wallingford, C.A.B. International, 1081p.

- Wood, P.J. 1993. Physicochemical characteristics physiological properties of oat (1→3), (1→4)-D-Glucan. *In*: F.H. Webster (ed.). Oats: Chemistry and technology. American Association of Cereal Chemists, Minnesota. pp. 83 -112.
- Wood, P.J., Weisz, J. & Blackell, B.A. 1994. Structural studies of (1→3)(1→4)-β-glucans by ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy and by rapid analysis of cellulose-like regions using high-performance anion-exchange chromatography of oligosaccharides released by lichenase. *Cereal Chemistry* 71: 301-307.
- Woodward, J.R., Fincher, G.B. & Stone, B.A. 1983. Water soluble (1→3)(1→4)-β-glucans from barley (*Hordeum vulgare*) endosperm. II. Fine structure. *Carbohydrate Polymers* 3: 207 – 225.
- Yokohama, W.H., Hudson, C.A., Knuckles, B.E., Chiu, M.C.M., Sagre, R.N., Tulund, J.R. & Scheeman, B.O. 1997. Effect of barley B-glucan in durum wheat pasta on human glycemic response. *Cereal Chemistry* 74: 293-294.