



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CARIRI**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DA BIODIVERSIDADE**  
**PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E**  
**BIOLOGIA MOLECULAR**

**ANDRÉ OLIVEIRA SANTOS**

**ANÁLISE DE CRESCIMENTO E PERFIL DE CARBOIDRATOS E LIGNINA NA**  
**BIOMASSA DE CULTIVARES E ECÓTIPOS DE CAPIM-GUINEA VISANDO O**  
**POTENCIAL NA PRODUÇÃO DE ETANOL**

**CRATO/CE**

**2020**

ANDRÉ OLIVEIRA SANTOS

**ANÁLISE DE CRESCIMENTO E PERFIL DE CARBOIDRATOS E LIGNINA NA  
BIOMASSA DE CULTIVARES E ECÓTIPOS DE CAPIM-GUINEA VISANDO O  
POTENCIAL NA PRODUÇÃO DE ETANOL**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Cariri, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Juan Carlos Alvarez-Pizarro.

**CRATO**

**2020**

Dados internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Cariri  
Sistema de Bibliotecas

---

S237a Santos, André Oliveira.

Análise de crescimento e perfil de carboidratos e lignina na biomassa de cultivares e ecótipos de capim guinea visando o potencial na produção de etanol/ André Oliveira Santos. – 2020.

70 f.; il. color.

(Inclui bibliografia p.60-70).

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Cariri, Faculdade de Medicina de Barbalha – FAMED, Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Barbalha, 2020.

Orientação: Prof. Dr. Juan Carlos Alvarez-Pizarro.

I. Megathyrsus maximus. 2. Celulose. 3. Açúcares fermentáveis. I. Título

---

CDD 662.88

Bibliotecário: João Bosco Dumont do Nascimento –CRB 3/1355

ANDRÉ OLIVEIRA SANTOS

**ANÁLISE DE CRESCIMENTO E PERFIL DE CARBOIDRATOS E LIGNINA NA  
BIOMASSA DE CULTIVARES E ECÓTIPOS DE CAPIM-GUINEA VISANDO O  
POTENCIAL NA PRODUÇÃO DE ETANOL**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Cariri, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

Aprovada em 06/04/2020.

BANCA EXAMINADORA



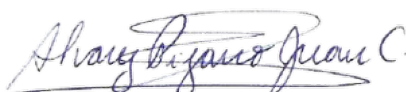
---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Kamila Câmara Correia  
Universidade Federal do Cariri



---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Cícera Raquel Fernandes Rodrigues  
Centro Universitário Doutor Leão Sampaio



---

Prof. Dr. Juan Carlos Alvarez-Pizarro  
Orientador  
Universidade Federal do Cariri

Aos meus pais, Maria e Assis, e irmãos,  
Leonardo, Juliano e Lucas.  
À minha esposa, Valéria.

“Primeiro, lembre-se de olhar para as estrelas e não para os seus pés. Segundo, nunca desista do trabalho. O trabalho lhe dá significado e propósito, e a vida é vazia sem ele. Terceiro, se você tiver sorte o suficiente para encontrar o amor, lembre-se de que ele existe e não o jogue fora.”

Stephen W. Hawking

## AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente aos meus pais, Maria de Oliveira dos Santos e Francisco de Assis Ferreira dos Santos (*in memoriam*) por sua dedicação à minha formação e apoio quase incondicional em todos os momentos; a meus irmãos Leonardo Oliveira Santos, Juliano Oliveira Santos e Lucas Oliveira Santos por sua ajuda e companheirismo.

À minha amável esposa, Valéria Alves Teixeira, por seu amor, sua paciência e compreensão durante estes últimos anos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Juan Carlos Alvarez-Pizarro, por sua confiança e dedicação depositados neste projeto, bem como seu apoio à minha formação acadêmica.

Aos alunos do grupo de pesquisa em Bioquímica e Fisiologia Vegetal, liderados por Prof. Juan, em especial: Leticia Rejane Lima Araujo, Layla Victória da Silva Sousa, Iago Gondim Ferreira e Cícero Aparecido Ferreira Araújo, por sua imensa contribuição ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores associados/colaboradores do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Cariri, por suas contribuições e suporte nos momentos mais difíceis.

Aos meus colegas na pós-graduação: Joana Varlla, Plínio Palácio, Rafael Barbosa, Victor Marcel, Giullian Felipe, Dimas Batista e Cícera Edna, por todos os momentos de discussões e apoio mútuo.

Aos membros da banca avaliadora, Prof.as Dr.as Kamila Câmara Correia e Cícera Raquel Fernandes Rodrigues, por suas valiosas contribuições, que engrandeceram este trabalho.

À CAPES e FUNCAP pelo auxílio financeiro (processo nº. 88887.176142/2018-00).

## RESUMO

Espécies vegetais com bom crescimento, elevada composição em açúcares fermentáveis e baixos teores de lignina e cinzas são fontes adequadas para a obtenção de etanol. As gramíneas forrageiras são apropriadas para estes fins, devido a seu rápido crescimento e elevada produção de biomassa. Objetivou-se estudar tais características nas cultivares comerciais – Tanzânia, Mombaça e Aruana – e nos ecótipos – Assaré, Barbalha e Caririaçu – coletados da região do Cariri cearense, da gramínea capim-guinea. As sementes foram coletadas, desinfetadas e semeadas em vasos contendo areia de textura média com capacidade de campo de 80%. A partir do 15.º dia, as plantas foram irrigadas alternadamente com solução nutritiva de Hoagland de 1/3 de força iônica e água destilada. Aos 45 e 90 dias de cultivo foram analisados parâmetros morfofisiológicos: comprimento e largura da folha, número de perfilhos, calibre do colmo e transpiração. A parte aérea das plantas com 45 dias de cultivo foi dividida em: limbo primário, limbo secundário, colmo primário e colmo secundário e os tecidos armazenados a -20 °C para análises bioquímicas. Analisou-se os teores de glicose, frutose, açúcares redutores, sacarose, amido, celulose e lignina. A biomassa total não apresentou diferenças entre os materiais estudados aos 45 dias; contudo, a biomassa da cultivar Aruana foi a menor aos 90 dias de cultivo. Aos 45 dias, os teores de glicose e de frutose da parte aérea total foram significativamente maiores no ecótipo Assaré. Em relação aos teores de frutose, ainda foram encontradas diferenças significativas nos limbos primários e secundários entre as cultivares e ecótipos, se destacando, novamente, o alto teor no ecótipo Assaré. Os teores de sacarose seguiram um padrão de acúmulo bastante heterogêneo em cada tecido da parte aérea; porém, quando analisados em conjunto se destacaram Assaré, Tanzânia e Aruana. De modo geral, os teores de celulose nos tecidos analisados foram maiores na cultivar Mombaça e menores na cultivar Assaré, padrão observado também, quando analisada toda a parte aérea. Em relação à lignina, não houve diferenças nos teores em limbos primários e colmos secundários, porém, nas folhas secundária houve diferenças significativas entre as cultivares Mombaça e Tanzânia e, nos colmos primários, se destacou Barbalha pelo seu baixo conteúdo. Na parte aérea total, o ecótipo Caririaçu apresentou menores teores de lignina. De uma maneira geral, o teor total de açúcares resulta principalmente da contribuição da celulose. O ecótipo Assaré destacou-se ao apresentar teores de açúcares solúveis e amido duas vezes superiores aos teores de açúcares estruturais. Concluiu-se que as cultivares Mombaça e Tanzânia e o ecótipo Caririaçu seriam adequadas para a produção de etanol, com base na biomassa e teor de carboidratos solúveis.



**Palavras-chave:** *Megathyrsus maximus*. Celulose. Açúcares fermentáveis.

## ABSTRACT

Plant species with good growth, high composition in fermentable sugars and low levels of lignin and ash are suitable sources for ethanol production. Forage grasses are considered appropriate for these purposes, due to their rapid growth and high biomass production. This work aims to study such characteristics in commercial cultivars - Tanzânia, Mombaça and Aruana - and ecotypes - Assaré, Barbalha and Caririaçu – of guinea grass, collected from the Cariri region, Ceará. Seeds were collected, disinfected and sown in pots containing medium texture sand with an 80% field capacity. From the fifteenth day, plants were irrigated alternately with Hoagland's nutrient solution of 1/3 ionic strength and distilled water. On 45th and 90th days of cultivation, morphophysiological parameters were analyzed: leaf length and width, number of tillers, stem caliber and transpiration. Shoots of the plants at 45 days were collected, divided into: primary blade, secondary blade, primary culm and secondary culm and the tissues were stored at -20 ° C for biochemical analysis. Levels of glucose, fructose, reducing sugars, sucrose, starch, cellulose and lignin were analyzed. Total biomass showed no differences between the materials studied at 45 days. Growth of cultivar Aruana was the lowest at 90 days of cultivation. At 45 days, the glucose and fructose contents of total shoot was significantly higher in ecotypes Assaré and Barbalha than in cultivar Mombaça. Regarding fructose content, significant differences were found in primary and secondary blades between cultivars and ecotypes, highlighting the high content in Assaré ecotype. Sucrose levels followed a very heterogeneous accumulation pattern in each tissue shoots, however, when tissues were analyzed together, Assaré, Tanzânia and Aruana stood out. In general, cellulose contents in tissues were higher in the cultivar Mombaça and lower in cultivar Assaré, a pattern also observed when shoots were analyzed. Regarding lignin, there were no differences in levels of primary blades and secondary culms, however, in secondary blades there were significant differences between the cultivars Mombaça and Tanzânia, and in primary culms Barbalha stood out due to its low content. In shoots, Caririaçu ecotype showed lower levels of lignin. In general, total sugars content results mainly from the contribution of cellulose. The ecotype Assaré highlighted by presenting levels of soluble sugars and starch twice as high as the levels of its structural sugars. Based on biomass and sucrose contents it was concluded that the cultivars Mombaça and Tanzânia and the ecotype Caririaçu would be suitable to produce ethanol.

**Keywords:** *Megathyrus maximus*. Cellulose. Fermentable sugars.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática simplificada do particionamento de carbono nas plantas .....	20
Figura 2 – Estruturas químicas de alguns monossacarídeos e dissacarídeos .....	24
Figura 3 – Representação da parede celular vegetal e de seus constituintes.....	25
Figura 4 – Representação de um oligômero de glicose, representativo da celulose, e de sua via de síntese .....	26
Figura 5 – Representação das cadeias de hemiceluloses de gramíneas.....	27
Figura 6 – Representação simplificada do processo de conversão de fenilalanina nos monolignóis e sua polimerização em lignina.....	29
Figura 7 – Esquema simplificado de rotas de produção de etanol .....	30
Figura 8 – Disposição dos vasos de cultivo na casa de vegetação .....	36
Figura 9 – Imagem de uma planta de capim-guinea mostrando os tecidos estudados.....	36
Figura 10 – Temperatura e umidade relativa do ar durante o experimento .....	42
Figura 11 – Parâmetros morfofisiológicos .....	43
Figura 12 – Acúmulo de biomassa .....	45
Figura 13 – Quantificação de sacarose .....	46
Figura 14 – Quantificação de açúcares redutores.....	48
Figura 15 – Quantificação de glicose .....	49
Figura 16 – Quantificação de frutose .....	50
Figura 17 – Quantificação de amido.....	52
Figura 18 – Quantificação de celulose .....	53
Figura 19 – Teores de carboidratos solúveis totais carboidratos totais .....	54
Figura 20 – Teores de lignina em função da massa fresca das amostras.....	55
Figura 21 – Teores de lignina em função da massa seca das amostras.....	56
Figura 22 – Percentuais de açúcares e lignina na biomassa .....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina dinucleotídeo fosfato
AR	Cultivar Aruana
AS	Ecótipo Assaré
ATP	Adenosina trifosfato
BA	Ecótipo Barbalha
C-1	Carbono na posição 1 dentro da cadeia
C <sub>3</sub>	Plantas com metabolismo C <sub>3</sub>
C <sub>4</sub>	Plantas com metabolismo C <sub>4</sub>
CA	Ecótipo Caririaçu
CAM	Plantas com metabolismo ácido das crassuláceas
CAT	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
CCB	Ciclo de Calvin–Benson
CINV	Enzima invertase da parede celular
CSC	Complexo celulose sintase
DHAP	Diidroxiacetona fosfato
FK	Enzima frutoquinase
Fru-6P	Frutose 6-fosfato
Glc-1P	Glicose 1-fosfato
Glc-6P	Glicose 6-fosfato
HXK	Enzima hexoquinase
MF	Massa fresca
MO	Cultivar Mombaça
MS	Massa seca
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
PGI	Fosfoglicoisomerase
PGM	Fosfoglicomutase
P <sub>i</sub>	Fosfato inorgânico
RuBisCO	Enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase
SUS	Enzima sacarose sintase
TA	Cultivar Tanzânia
Triose-P	Triose fosfato

UDP	Uridina difosfato
UGP	UDP-glicose pirofosforilase

## LISTA DE SÍMBOLOS

CO <sub>2</sub>	Gás carbônico
H <sub>2</sub> O	Água
O <sub>2</sub>	Gás oxigênio
H <sup>+</sup>	Próton
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Glicose
%	Percentual
°C	Graus Celsius
mL	Mililitro (10 <sup>-3</sup> litros)
g	Gramas
m/v	Fração entre massa do reagente e volume da solução
v/v	Fração entre volume do reagente e volume da solução
g	Aceleração da gravidade
h	Hora
min	Minuto
rpm	Rotações por minuto
μL	Microlitro (10 <sup>-6</sup> litros)
Cu <sup>2+</sup>	Íons cúpricos
nm	Nanômetro (10 <sup>-9</sup> metros)
mM	Milimolar (10 <sup>-3</sup> mol por litro)
M	Molar (1 mol por litro)
pH	Potencial hidrogeniônico
NaCl	Cloreto de sódio
mg	Miligrama (10 <sup>-3</sup> gramas)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Fixação de carbono e particionamento de fotossintatos .....</b>	<b>19</b>
<i>2.1.1</i>	<i>Assimilação fotossintética de carbono.....</i>	<i>19</i>
<i>2.1.2</i>	<i>Adaptações do metabolismo de fixação de carbono.....</i>	<i>21</i>
<i>2.1.3</i>	<i>Particionamento intra e intercelular de fotossintatos.....</i>	<i>21</i>
<b>2.2</b>	<b>Carboidratos em plantas.....</b>	<b>22</b>
<i>2.2.1</i>	<i>Carboidratos solúveis e de reserva.....</i>	<i>22</i>
<i>2.2.2</i>	<i>Carboidratos estruturais da parede celular.....</i>	<i>24</i>
<b>2.3</b>	<b>Lignina.....</b>	<b>28</b>
<b>2.4</b>	<b>Carboidratos e produção de etanol.....</b>	<b>28</b>
<b>2.5</b>	<b>O capim-guinea (<i>Megathyrsus maximus</i> Jacq.).....</b>	<b>31</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral .....</b>	<b>33</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
<b>4.1</b>	<b>Material biológico.....</b>	<b>34</b>
<b>4.2</b>	<b>Preparação do substrato para o cultivo .....</b>	<b>34</b>
<b>4.3</b>	<b>Condições de cultivo e colheita das plantas .....</b>	<b>35</b>
<b>4.4</b>	<b>Obtenção de dados morfofisiológicos .....</b>	<b>37</b>
<b>4.5</b>	<b>Análise de carboidratos e lignina .....</b>	<b>37</b>
<i>4.5.1</i>	<i>Preparação dos extratos para determinação de carboidratos.....</i>	<i>37</i>
<i>4.5.1.1</i>	<i>Extratos etanólicos.....</i>	<i>37</i>
<i>4.5.1.2</i>	<i>Extratos perclóricos .....</i>	<i>38</i>
<i>4.5.1.3</i>	<i>Extratos ácidos.....</i>	<i>38</i>
<i>4.5.2</i>	<i><b>Quantificação de carboidratos solúveis.....</b></i>	<i><b>38</b></i>
<i>4.5.2.1</i>	<i>Sacarose .....</i>	<i>38</i>
<i>4.5.2.2</i>	<i>Açúcares redutores .....</i>	<i>39</i>
<i>4.5.2.3</i>	<i>Glicose.....</i>	<i>39</i>
<i>4.5.2.4</i>	<i>Frutose.....</i>	<i>39</i>
<i>4.5.3</i>	<i><b>Quantificação de polissacarídeos.....</b></i>	<i><b>40</b></i>
<i>4.5.3.1</i>	<i>Amido.....</i>	<i>40</i>



4.5.3.2	<i>Celulose</i> .....	40
4.5.4	<b>Quantificação de lignina</b> .....	40
4.6	<b>Desenho experimental e tratamento estatístico</b> .....	41
5	<b>RESULTADOS</b> .....	42
5.1	<b>Dados microclimáticos</b> .....	42
5.2	<b>Morfofisiologia</b> .....	42
5.3	<b>Acúmulo de biomassa</b> .....	44
5.4	<b>Carboidratos solúveis</b> .....	45
5.4.1	<i>Sacarose</i> .....	45
5.4.2	<i>Açúcares redutores</i> .....	47
5.4.3	<i>Glicose</i> .....	47
5.4.4	<i>Frutose</i> .....	49
5.5	<b>Polissacarídeos</b> .....	51
5.5.1	<i>Amido</i> .....	51
5.5.2	<i>Celulose</i> .....	51
5.6	<b>Carboidratos solúveis totais e carboidratos totais</b> .....	53
5.7	<b>Lignina</b> .....	54
5.8	<b>Contribuição de carboidratos e lignina para a biomassa</b> .....	56
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	58
7	<b>CONCLUSÕES</b> .....	63
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	64

## 1 INTRODUÇÃO

A diminuição das emissões de carbono para a atmosfera exige o emprego de fontes de energia renováveis de baixo impacto ambiental e que nos forneça um bom nível de segurança energética (VAN DER WEIJDE *et al.*, 2013). A substituição do petróleo como matéria-prima para fabricação de combustíveis depende de um substituto renovável que sustente boa parte da infraestrutura dedicada ao transporte em larga escala, que necessita principalmente de combustíveis na forma líquida (WYMAN, 2008). Estimativas mostraram que as emissões de gases do efeito estufa do etanol produzido a partir da biomassa de uma gramínea (*Panicum virgatum* L.), quando comparados à gasolina, podem ser até 94% menores (SCHMER *et al.*, 2014). Nesse sentido, existe um interesse na produção de etanol produzido a partir dos polissacarídeos da parede celular de plantas, em especial aquelas que apresentem abundante biomassa e que exijam um custo relativamente baixo para seu cultivo.

Atualmente, a principal rota de produção de etanol é a conversão, mediada por microrganismos, dos carboidratos armazenados na biomassa das plantas na forma de açúcares solúveis e/ou amido, uma vez que estes são mais facilmente processados em biocombustível. No entanto, desperdiça-se a maior fonte de carboidratos na biomassa, constituídos principalmente pelos polissacarídeos estruturais celulose e hemicelulose. Para aproveitá-los, faz-se necessário a conversão destes polímeros em seus monossacarídeos constituintes, a qual é dificultada pela própria complexidade bioquímica da matriz lignocelulósica (BALAT, 2011; SCORDIA *et al.*, 2018).

Desde uma perspectiva econômica, matérias-primas com alto teor de celulose e hemicelulose, além de açúcares solúveis, são preferíveis na indústria, uma vez que estudos mostram que o rendimento de etanol é diretamente proporcional à quantidade destes constituintes na biomassa (VAN DER WEIJDE *et al.*, 2013). Sob esta ótica, a gramínea capim-guinea (*Megathyrsus maximus* Jacq., homótipo *Panicum maximum* Jacq.) apresenta potencial como matéria-prima para a obtenção de açúcares fermentáveis, pois apresentam teores de açúcares comparáveis aos da cana-de-açúcar, a principal matéria-prima para produção de etanol no Brasil. Ademais, outras características vantajosas têm sido descritas para o capim guinea, como alta produtividade de biomassa por hectare e possibilidade de cultivo em terras não agriculturáveis, o que contribui para diminuir a competição com alimentos tradicionais (LIMA *et al.*, 2014). Entretanto, as informações a respeito destas características têm sido obtidas com materiais geneticamente melhorados (cultivares) e pouca

informação existe em relação a ecótipos, que são definidos como materiais que crescem sob condições climáticas específicas.

No Cariri cearense, o capim guinea distribui-se nos diferentes tipos climáticos da região, havendo possibilidade de existir ampla variabilidade entre os ecótipos com reflexos tanto na composição dos açúcares fermentáveis como na biomassa.

Portanto, um estudo com estes ecótipos caririenses pode ajudar a identificar matérias-primas ou fontes propícias para sua exploração com fins de produção de etanol.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

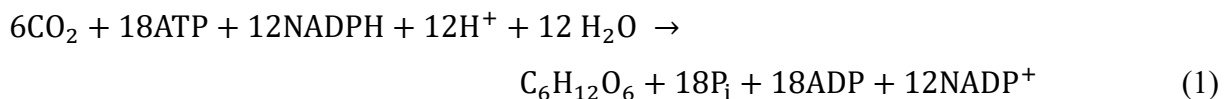
### 2.1 Fixação de carbono e particionamento de fotossintatos

O processo biológico de fixação de carbono, mediado por organismos fotossintéticos como plantas, algas e cianobactérias, converte gás carbônico atmosférico (CO<sub>2</sub>) e água (H<sub>2</sub>O) em compostos de carbono (carboidratos) e gás oxigênio (O<sub>2</sub>) (PIATTONI *et al.*, 2014). O processo metabólico chamado de fotossíntese combina a captura de luz e a síntese de moléculas orgânicas reduzidas, principalmente carboidratos (NELSON; COX, 2011).

Nas plantas, são encontrados dois tipos de tecidos: os fotossintéticos (ou autotróficos), onde ocorrem os processos de captura de luz e fixação de carbono, especificamente dentro dos cloroplastos (Figura 1A), e os não-fotossintéticos (ou heterotróficos), que dependem do particionamento de carbono para manutenção da atividade celular (Figura 1B) (PIATTONI *et al.*, 2014). Em geral, o particionamento intracelular de carbono ocorre entre o cloroplasto e o citosol na forma de trioses-fosfato (triose-P), enquanto a sacarose é o principal metabólito envolvido no particionamento intercelular de carbono (IGLESIAS; PODESTÁ, 2005).

#### 2.1.1 Assimilação fotossintética de carbono

O ciclo de redução fotossintética do carbono, mais conhecido como ciclo de Calvin–Benson (CCB), em homenagem aos pesquisadores que primeiramente o desenvolveu, é responsável pela assimilação de CO<sub>2</sub> atmosférico (BENSON; CALVIN, 1950). Este processo metabólico ocorre em três etapas (carboxilação, redução e regeneração), e é representado pela equação global (Eq. 1):

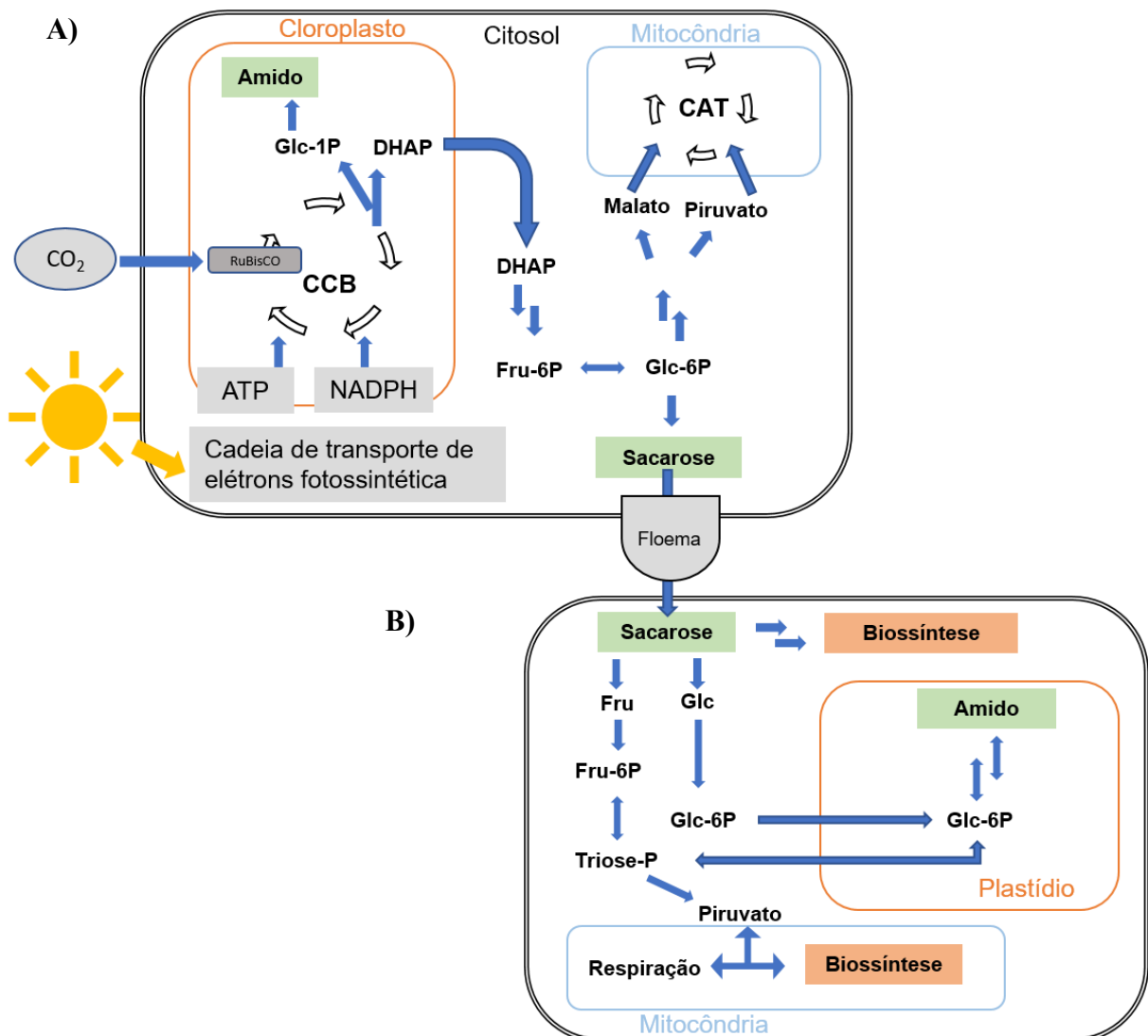


Percebe-se claramente a grande quantidade de energia, na forma de ATP e NADPH, necessária para a síntese de uma molécula de glicose.

De uma forma simplificada, o CO<sub>2</sub> é incorporado por intermédio da enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO). A eficiência da carboxilação é baixa, uma vez que a RuBisCO não tem especificidade completa pelo CO<sub>2</sub> e que a concentração atmosférica deste gás é mais baixa do que a requerida para alcançar a metade da atividade enzimática máxima (NELSON; COX, 2011; XU; SHEN, 2001). Esta ineficiência é

compensada pelas plantas ao sintetizarem a RuBisCO em altas concentrações, tornando esta enzima, provavelmente, a proteína mais abundante do planeta (ELLIS, 1979). No entanto, a RuBisCO também exibe uma atividade de oxigenase, incorporando  $O_2$  e liberando  $CO_2$ , num processo conhecido por fotorrespiração, o que diminui a assimilação de carbono (PIATTONI *et al.*, 2014). Não obstante, há um ganho líquido de carbono, permitindo o uso das trioses-fosfato na síntese dos produtos fotossintéticos finais, sacarose e amido (IGLESIAS; PODESTÁ; ANDREO, 1997).

Figura 1 – Representação esquemática simplificada do particionamento de carbono nas plantas



Fonte: adaptado (PIATTONI *et al.*, 2014). Metabolismo de carbono em tecidos fonte durante períodos com incidência de luz (A) e em tecidos dreno (B).

### **2.1.2 Adaptações do metabolismo de fixação de carbono**

A atividade oxigenase da RuBisCO é altamente custosa para as plantas, sendo a relação  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  dentro dos cloroplastos um fator crítico na eficiência de fixação de carbono (IGLESIAS; PODESTÁ; ANDREO, 1997; PORTIS, 2001; XU; SHEN, 2001). Outro fator importante para as plantas é o balanço da perda de água através dos estômatos durante a captura de  $\text{CO}_2$  (PORTIS, 2001). Algumas plantas desenvolveram mecanismos adicionais a fim de aumentar a eficiência durante o processo de assimilação de carbono. Assim, as plantas superiores podem ser classificadas em  $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_4$  ou aquelas com metabolismo ácido das crassuláceas (CAM), dependendo do processo de fixação de carbono. O ciclo de Calvin–Benson é comum a todas elas, porém outras rotas de fixação ocorrem separadas espacialmente ou temporalmente nas plantas  $\text{C}_4$  e CAM, respectivamente (PIATTONI *et al.*, 2014).

Para contornar a fotorrespiração, as plantas  $\text{C}_4$  capturam o  $\text{CO}_2$  em um local diferente daquele onde ocorre o ciclo de Calvin–Benson, o que está diretamente relacionado à anatomia das folhas destas plantas. As plantas  $\text{C}_4$  são caracterizadas por apresentarem dois tipos distintos de células fotossintéticas dispostas de forma concêntrica: as células do mesófilo e as células da bainha dos feixes vasculares (PIATTONI *et al.*, 2014). Durante os períodos iluminados do dia, a captura de  $\text{CO}_2$  ocorre nas células do mesófilo, que é fixado na forma de bicarbonato e este sendo posteriormente transportado para as células da bainha, onde ocorre a descarboxilação, gerando  $\text{CO}_2$  em concentrações mais altas que a atmosférica (HELDT; PIECHULLA; HELDT, 2005; IGLESIAS; PODESTÁ; ANDREO, 1997). Como a enzima que media essa fixação de  $\text{CO}_2$  em bicarbonato não aceita  $\text{O}_2$  como substrato, a fotorrespiração é bastante diminuída (IGLESIAS; PODESTÁ; ANDREO, 1997). Ainda, a concentração de  $\text{CO}_2$  mais elevada aumenta a eficiência de fixação de carbono pela RuBisCO, reduzindo em até 50% o consumo de água no processo, em relação ao metabolismo do tipo  $\text{C}_3$ . Assim, as espécies que apresentam o metabolismo  $\text{C}_4$  se adaptam a diferentes ecossistemas, principalmente aqueles com clima quente e seco (HELDT; PIECHULLA; HELDT, 2005).

### **2.1.3 Particionamento intra e intercelular de fotossintatos**

Nas plantas, a fotossíntese ocorre primariamente nas folhas, mais especificamente nos cloroplastos. É nos cloroplastos que ocorre a síntese das trioses-fosfato, que têm como destino principal a síntese de amido, uma reserva transitória de carbono e energia. Alternativamente, as trioses-fosfato podem ser exportadas para o citosol (Figura 1A) e servem

como fontes para produção de sacarose ou suprem as demandas energéticas do metabolismo celular (PIATTONI *et al.*, 2014) Apesar de ser a principal reserva nas plantas, com algumas exceções, o amido é uma fonte estacionária de carbono, não sendo possível sua mobilização para outros tecidos. Para tanto, estas reservas são mobilizadas na forma de sacarose (Figura 1B) (IGLESIAS; PODESTÁ, 2005).

As folhas são responsáveis pela assimilação de carbono (fontes) enquanto órgãos não-fotossintéticos são especializados em outras funções (drenos). De toda forma, é necessário que haja um intercâmbio de metabólitos entre estes tecidos, e as plantas desenvolveram dois tipos de condutores: o xilema, que transporta águas e minerais das raízes para outros órgãos, e o floema, com função de transporte de metabólitos e nutrientes das folhas para os tecidos heterotróficos (LALONDE; WIPF; FROMMER, 2004).

Nas fontes, uma vez que as trioses-fosfato são exportadas para o citosol, estes compostos podem ser metabolizados, direta ou indiretamente, em diversas vias bioquímicas Figura (1A): glicólise, gliconeogênese, síntese de sacarose (a sacarose em excesso é acumulada nos vacúolos para utilização durante períodos sem luz), ciclo dos ácidos tricarboxílicos (CAT) e via das pentoses fosfato oxidativa (PIATTONI *et al.*, 2014). A glicólise, então, produz as moléculas primordiais para reações anabólicas como síntese de ácidos orgânicos, de lipídios, de aminoácidos e proteínas, além de apoiar o fornecimento de energia e carbono para o crescimento e manutenção (PIATTONI *et al.*, 2014).

Nos drenos, o carbono é fornecido na forma de sacarose (Figura 1B), que uma vez no citosol é degradada aos seus constituintes (glicose e frutose). Estes, por sua vez, abastecem os processos de obtenção energética e de biossíntese (PIATTONI *et al.*, 2014).

## **2.2 Carboidratos em plantas**

### **2.2.1 Carboidratos solúveis e de reserva**

Os carboidratos, mais comumente chamados de “açúcares”, são os produtos primários da atividade fotossintética, e representam a maior proporção dos compostos orgânicos das plantas. Nelas, os carboidratos desempenham várias funções, por exemplo a formação de estruturas (celulose, hemiceluloses, etc.), reserva energética (amido e frutanos), proteção contra ressecamento dos tecidos (gomas e mucilagens), sinalização celular relacionada ao desenvolvimento vegetal, entre outras (KOCH, 2004; THARANATHAN *et al.*, 1987). Todos os carboidratos das plantas são sintetizados a partir de hexoses (carboidratos

com seis carbonos em sua estrutura molecular), que por sua vez são produzidos por reações bioquímicas no ciclo de Calvin–Benson. Nesta rota bioquímica são utilizados ATP e NADPH produzidos na fase luminosa da fotossíntese, além de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) e água, tendo como produto final as hexoses e outros produtos (BERG *et al.*, 2015).

Os carboidratos das plantas são geralmente divididos em três grupos principais: monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos. Quimicamente, os monossacarídeos são compostos de carbono com três ou mais átomos deste elemento, que apresentam várias unidades do grupo hidroxila (OH<sup>-</sup>) e um grupo aldeído ou cetona, e, portanto, são poli-hidroxialdeídos ou poli-hidroxicetonas de fórmula molecular geral (CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>.

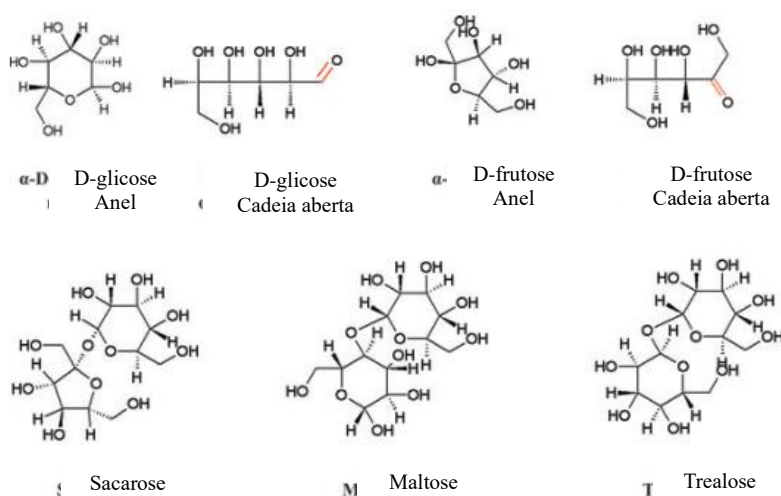
Os monossacarídeos, ao se unirem através de uma ligação *O*-glicosídica, originam os açúcares dos outros dois grupos, e esta ligação ocorre invariavelmente entre a hidroxila do carbono 1 (C-1) de um monossacarídeo e qualquer outro oxigênio hidroxílico do carboidrato adjacente (BERG *et al.*, 2015). Ainda, a forma estrutural predominante dos açúcares é a de anéis, podendo apresentar a forma de cadeia aberta em equilíbrio com a cíclica (BERG *et al.*, 2015). Tanto na forma de cadeia aberta quanto na cíclica, os grupos aldeídos e cetonas destes compostos são geralmente os grupos funcionais mais reativos. Estes grupos funcionais, quando nas cadeias abertas e não ligados a nenhum outro átomo, à exceção do carbono da cadeia principal, podem atuar como agentes redutores em determinadas reações químicas. Os monossacarídeos e oligossacarídeos que contêm estes grupos reativos livres são conhecidos como *açúcares redutores*.

Ainda que haja uma grande variedade de açúcares em organismos vegetais, aqueles mais abundantes são os monossacarídeos glicose e frutose e os dissacarídeos sacarose e maltose (Figura 2). Estes monossacarídeos e oligossacarídeos são bastante solúveis em água ou solução aquosa de etanol (70-80% em volume), recebendo a denominação de *açúcares solúveis* em decorrência desta propriedade.

Como as plantas são fotoautótrofas obrigatórias, tendo na luz solar a única fonte de energia para síntese de fotoassimilados, se faz necessário fontes de energia que as permitam dar continuidade aos processos bioquímicos durante a noite. O amido é o principal metabólito de reserva em muitas plantas e é acumulado de forma quase linear durante o dia nas plantas em rápido crescimento, sendo consumido durante à noite de forma similar, sem, no entanto, ser exaurido completamente antes do amanhecer (SALISBURY; ROSS, 2012; STITT; ZEEMAN, 2012).



Figura 2 – Estruturas químicas de alguns monossacarídeos e dissacarídeos



Fonte: adaptado (HALFORD *et al.*, 2011). Estruturas da glicose e frutose, nas formas de anel e de cadeia aberta, e os dissacarídeos sacarose, maltose e trealose. Os grupos carbonila da glicose e frutose estão destacados em vermelho.

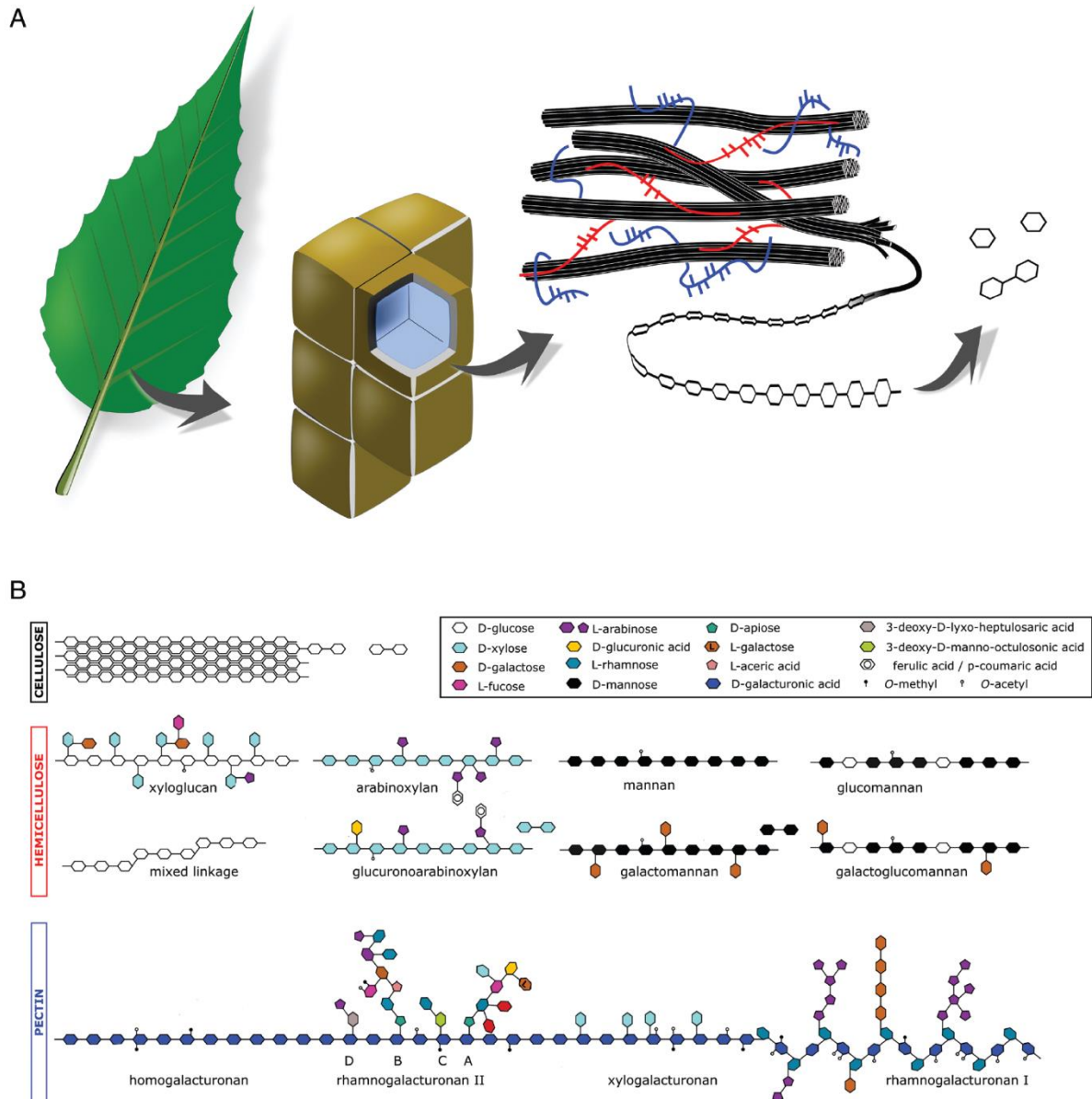
Quimicamente, o amido é um polissacarídeo complexo, depositados na forma de grânulos e constituído de unidades de glicose, podendo ser fracionado em dois tipos de cadeia polimérica: amilose e amilopectina. A amilose, que corresponde a aproximadamente 30% do amido total, é constituída predominantemente de cadeias lineares com cerca de 1.000 resíduos de glicose cada, conectados por ligações  $\alpha(1\rightarrow4)$ . Os outros 70% do amido se apresentam na forma de amilopectina, cadeias altamente ramificadas com ligações intercadeia  $\alpha(1\rightarrow6)$ , em geral a cada 20 resíduos. Dentro do grânulo de amido, as cadeias de amilopectina são distribuídas radialmente, podendo ocorrer a formação de hélices duplas entre cadeias adjacentes. Estas hélices, por sua vez, podem ser arrançadas regularmente, conferindo propriedades cristalinas aos grânulos, tornando-os pouco solúveis em água. (MARTIN; SMITH, 1995).

### 2.2.2 Carboidratos estruturais da parede celular

A parede de células vegetais corresponde a uma matriz extracelular resistente e complexa (MCFARLANE; DÖRING; PERSSON, 2014). Existem três classes principais de polissacarídeos: celulose, hemiceluloses e pectinas (Figura 3). Além dessas macromoléculas,

encontram-se também proteínas com função estrutural e de defesa, além de lignina, um polímero de diversos compostos fenólicos.

Figura 3 – Representação da parede celular vegetal e de seus constituintes

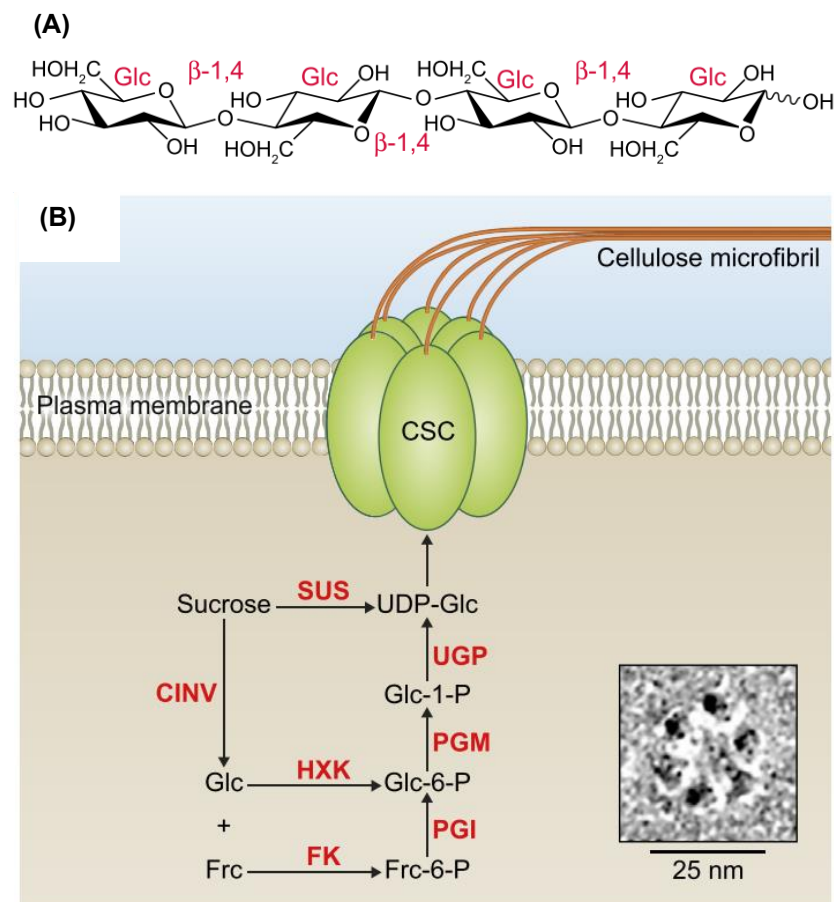


Fonte: adaptado (VAN DE WOUWER; BOERJAN; VANHOLME, 2018). A parede celular vegetal é composta de microfibrilas de celulose (preto) incorporadas em uma matriz de pectina (azul) e hemicelulose (vermelho) (A). Representação esquemática dos principais polissacarídeos encontrados nas plantas, mostrando a diversidade de arranjos entre os diferentes carboidratos dentro de cada cadeia polissacarídica (B).

A celulose é o principal polissacarídeo das paredes de células vegetais e contribui majoritariamente à biomassa dos tecidos aéreos da planta. A estrutura consiste em um polímero linear de unidades de *D*-glicose, unidas por ligações glicosídicas  $\beta(1\rightarrow4)$  (Figura 4A). Cada cadeia é sintetizada individualmente, a partir de unidades de UDP-glicose, que se

organizam lado-a-lado através de ligações de hidrogênio intra e intercadeias e de forças de Van der Waals. As cadeias celulósicas agregam-se formando feixes com cerca de 36 cadeias individuais (Figura 4B), que recebem o nome de *microfibrilas* (LI *et al.*, 2014). Essa organização em feixes dá origem a regiões altamente organizadas (cristalinas), que, de forma similar aos grânulos de amido, são insolúveis em água (VAN DE WOUWER; BOERJAN; VANHOLME, 2018).

Figura 4 – Representação de um oligômero de glicose, representativo da celulose, e de sua via de síntese



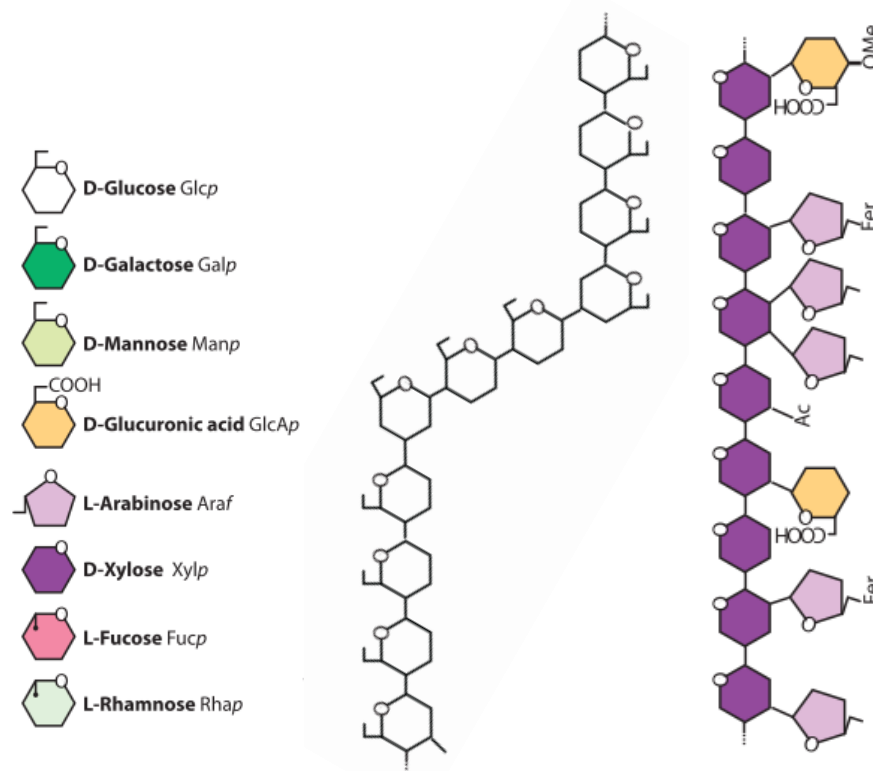
Fonte: adaptado (ZHONG; CUI; YE, 2019). Estrutura de um oligômero de glicose com ligações  $\beta(1\rightarrow4)$ , representativo de uma cadeia de celulose (A). Um modelo do complexo celulose sintase (CSC) na membrana plasmática e as vias de síntese de UDP-glicose, o substrato para síntese de celulose (B). No detalhe é mostrada uma micrografia do CSC, com suas subunidades interconectadas, que se apresentam na forma de roseta.

Quando as microfibrilas de celulose deixam o *complexo celulose sintase* (CSC), interagem com hemiceluloses para formar redes supramoleculares estáveis. Essa interação influencia no grau de cristalinidade das microfibrilas de celulose, impedindo-as de formarem

feixes volumosos, e a manutenção da rede de microfibrilas interconectadas (LI *et al.*, 2014; MCFARLANE; DÖRING; PERSSON, 2014).

As hemiceluloses são um grupo heterogêneo de polissacarídeos da parede celular que são caracterizados por não serem classificados nem como celulose ou pectina, e possuem cadeias de principais resíduos de glicose, manose ou xilose, unidas com ligações  $\beta(1\rightarrow4)$ . Compreendem de 10–40 % da composição da parede celular, variando entre espécies e tipo da célula em questão. Em gramíneas, os principais constituintes das hemiceluloses são os glicoarabinoxilanos,  $\beta$ -glicanos, xiloglicanos e mananos (SCHELLER; ULVSKOV, 2010). A representação das cadeias de hemiceluloses de gramíneas e de seus componentes é exibida na Figura 5.

Figura 5 – Representação das cadeias de hemiceluloses de gramíneas



Fonte: Adaptado (SCHELLER; ULVSKOV, 2010). Representação dos monômeros constituintes das hemiceluloses presentes em gramíneas (esquerda), das cadeias  $\beta$ -glicanas de ligações mistas (centro) e glicuronoarabinoxilano (direita). “Ac” representa grupo acetil ( $-\text{COCH}_3$ ), “Fer” corresponde ao ácido ferúlico, e “Me” representa grupos metila ( $-\text{CH}_3$ ).

### 2.3 Lignina

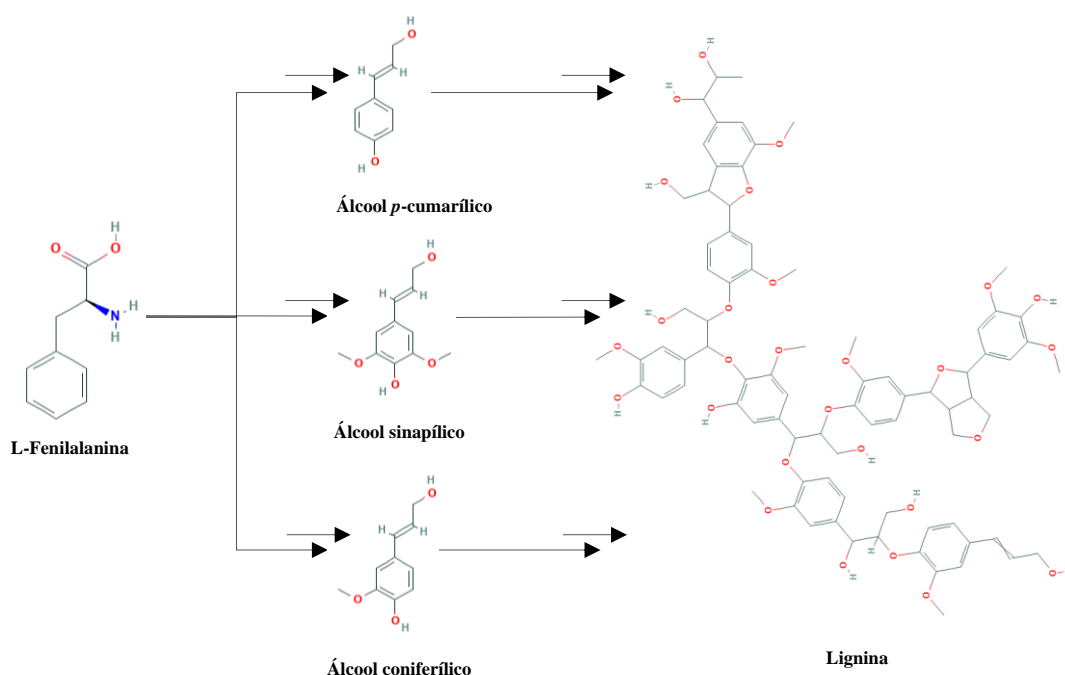
A lignina é um polímero formado de diversos monômeros aromáticos, também conhecidos por monolignóis, sendo os três principais os álcoois coniferílico, siringílico e *p*-cumarílico (Figura 6). Este polímero compreende cerca de 10–30% da biomassa vegetal e é depositado predominantemente nas paredes de células vegetais espessadas, tornando-as rígidas e impermeáveis. Além dessa deposição programada de lignina, sua biossíntese também pode ser induzida por diversas condições de estresse biótico e abiótico (VANHOLME *et al.*, 2010).

A biossíntese dos monolignóis começa com a reação de desaminação da L-fenilalanina e passa por sucessivas reações de hidroxilação do anel aromático, seguido de uma metilação fenólica e oxidação da cadeia lateral carboxílica em um grupo álcool. Na sequência, os monolignóis são transportados para a parede celular, onde são enzimaticamente oxidados e polimerizados (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003). Uma vez que a lignina atua na proteção dos açúcares da parede celular contra a degradação por micro-organismos, estas cadeias poliméricas também são um fator limitante na obtenção destes açúcares para fins industriais, incluindo a produção de etanol. A remoção de lignina da biomassa vegetal é um processo caro, logo pesquisadores têm feito esforços em buscar plantas que depositem menos lignina na parede ou que produzam lignina mais predisposta a sofrer degradação química (VANHOLME *et al.*, 2010).

### 2.4 Carboidratos e produção de etanol

A demanda por combustíveis e energia tem incrementado em decorrência do aumento da população mundial e da melhoria nos padrões e qualidade de vida, o que tem causado impactos negativos ao meio-ambiente. Em função destes impactos, propostas para a produção e consumo de energias menos poluentes e sustentáveis têm recebido bastante atenção (AGARWAL *et al.*, 2014). A fabricação de biocombustíveis, tais como, etanol, metanol, biodiesel e hidrogênio, produzidos a partir dos carboidratos da biomassa vegetal, tem atualmente um papel importante na solução desses problemas e vem sendo adotada em muitos países (SOLOMON, 2010).

Figura 6 – Representação simplificada do processo de conversão de fenilalanina nos monômeros e sua polimerização em lignina



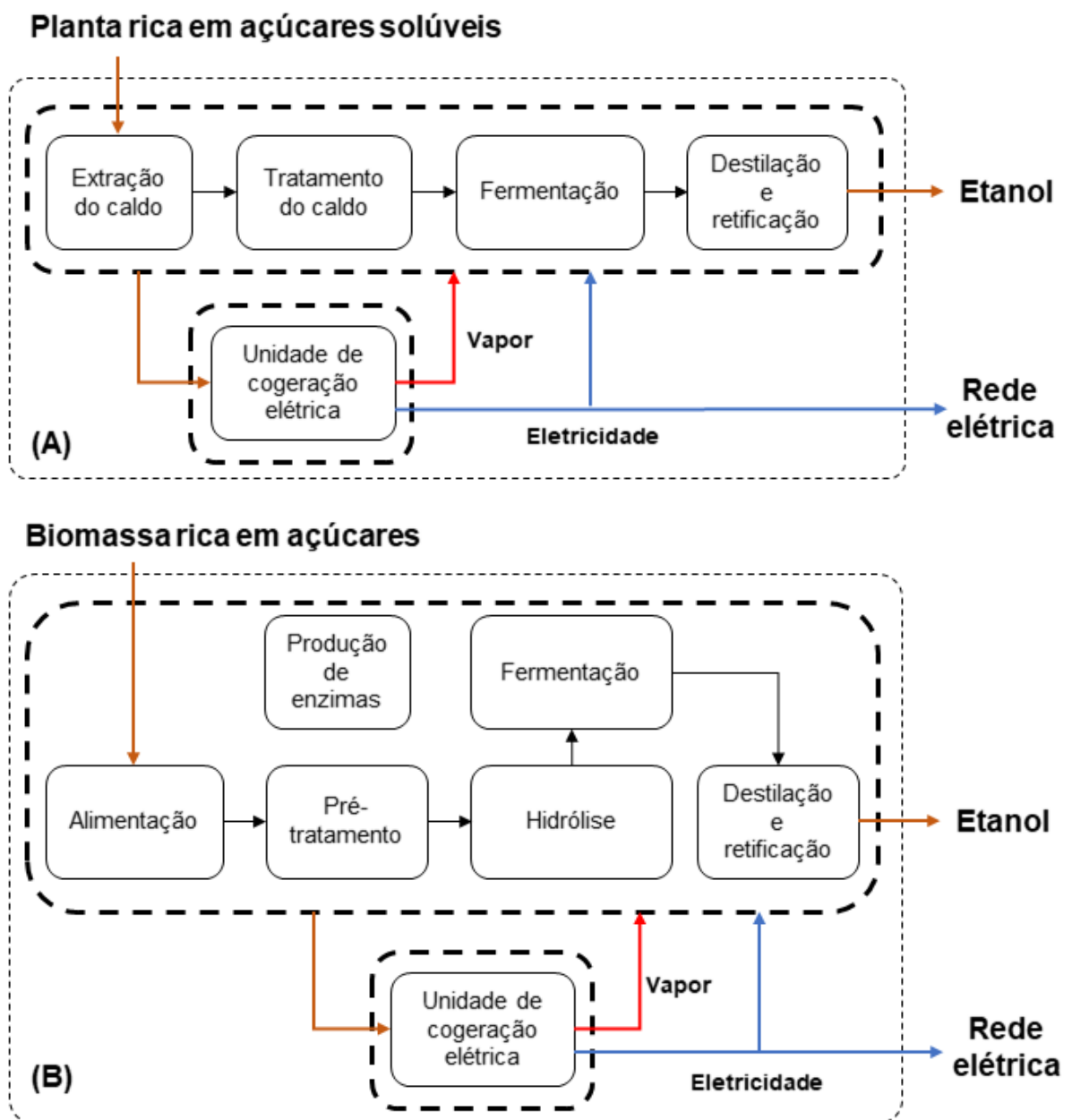
Fonte: adaptado (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003). O aminoácido L-fenilalanina é o precursor dos monômeros que serão depositados na parede celular.

Atualmente, praticamente todo etanol é produzido via fermentação, mediada por microrganismos (com destaque para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*), de carboidratos de plantas mediada por microrganismos. Nesse processo fermentação alcoólica, açúcares (especialmente glicose e frutose, mas também sacarose, manose, maltose, galactose, xilose e arabinose) são convertidos em etanol, energia, CO<sub>2</sub>, biomassa celular e outros subprodutos (GÍRIO *et al.*, 2010; LOPES *et al.*, 2016; SCHÖLER; SCHÜLLER, 1994). Ao etanol produzido a partir de açúcares solúveis, principalmente sacarose e amido, bem como ao processo produtivo, dá-se o nome de *primeira geração* (JONKER *et al.*, 2015).

Nos processos de primeira geração, os açúcares são primeiramente extraídos através de processos físicos; o caldo é tratado e fermentado; a solução fermentada é destilada e o produto tem seu conteúdo etanólico ajustado (retificado) antes de ser vendido (Figura 7A). Matérias-primas como cana-de-açúcar, beterraba e sorgo sacarino são ricas em açúcares solúveis, requerendo somente um processo de extração para obter a solução açucarada; já aquelas ricas em amido, por exemplo o milho e grãos de sorgo sacarino, necessitam passar previamente por um processo de hidrólise para converter o amido em glicose (ZABED *et al.*, 2017). Os resíduos da biomassa, por sua vez, podem ser reaproveitados na forma de eletricidade e calor, que são produzidos em unidades industriais integradas à usina principal,

que são utilizados. A energia elétrica excedente, por fim, é vendida para as concessionárias (JONKER *et al.*, 2015). Nos últimos anos, no entanto, a produção de biocombustíveis, denominados de *primeira geração* têm sofrido fortes críticas, pois sua obtenção poderia colocar em risco a produção de alimentos, aumentar os preços das *commodities* agrícolas e ser ineficaz em relação à redução da emissão de gases do efeito estufa (EISENTRAUT, 2010).

Figura 7 – Esquema simplificado de rotas de produção de etanol



Fonte: adaptado (JONKER *et al.*, 2015). Produção de etanol de primeira geração (A) e de segunda geração (B). Algumas unidades industriais podem usar um esquema integrando os dois processos.

Ainda que alguns dos biocombustíveis produzidos atualmente tenham bom desempenho no que se refere à sustentabilidade econômica e ambiental, o foco dos debates centra-se em torno dos biocombustíveis de *segunda geração*, os quais são obtidos a partir da fermentação dos açúcares da biomassa lignocelulósica (JONKER *et al.*, 2015). Nos processos de segunda geração, a biomassa rica em açúcares estruturais é pré-tratada físico-quimicamente a fim de modificar os arranjos morfológico e químico da parede celular do material vegetal. A etapa de pré-tratamento é a mais cara do processo, e visa remover os polímeros de lignina e hemiceluloses da matriz da parede, diminuir a cristalinidade da celulose e aumentar a área superficial e porosidade da biomassa (ZABED *et al.*, 2017), deixando-a mais susceptível ao ataque de compostos químicos e/ou de enzimas durante a etapa de hidrólise. Após hidrólise, que mais comumente é feita por meio de enzimas hidrolíticas, o caldo é fermentado e o processo então segue de forma similar ao de primeira geração (Figura 7B). Estes processos de segunda geração têm a vantagem de liberar, em menor quantidade, substâncias poluentes e/ou causadoras do efeito estufa, com impactos socioeconômicos positivos (EISENTRAUT, 2010).

Com base nas características dos processos envolvidos na produção de etanol de segunda geração, percebe-se que, no que diz respeito às características da biomassa, são atributos desejáveis para aumentar a eficiência nos processos de hidrólise e fermentação: alta biomassa (fornecem mais açúcares fermentáveis); alto conteúdo de celulose (principal fonte de açúcares na biomassa); baixos teores de lignina e hemiceluloses (simplificam o processo de pré-tratamento e reduzem custos), e redução da cristalinidade do polímero de celulose (aumentar a acessibilidade dos químicos ou enzimas que promovem a hidrólise deste polissacarídeo).

## **2.5 O capim-guinea (*Megathyrsus maximus* Jacq.)**

O capim-guinea é uma gramínea perene pertencente à família Poaceae, que apresenta metabolismo fotossintético do tipo C<sub>4</sub>. Suas características anatômicas e morfológicas variam amplamente de acordo com as cultivares ou ecótipos. Os descritores botânicos para esta espécie são: crescimento vegetativo caracterizado por ser ereto e cespitoso; apresentando folhas lanceoladas, largas e eretas, com pilosidade ou glabras; inflorescências tipo panícula, em formato oblongo ou piramidal, com ramificações primárias na base da inflorescência longas, e as secundárias, também longas e bem desenvolvidas, presentes em todas as ramificações primárias; as espiguetas são oblongas, cegas ou agudas, e arredondadas



nas costas, com pilosidades e distribuídas uniformemente pelas ramificações (MACHADO *et al.*, 2010).

Devido à variabilidade morfológica e agrônômica existente na espécie, o Australian Center for International Agricultural Research (ACIAR) tem proposto a divisão desta em duas categorias principais: as de porte alto/médio (maior que 1,5 m de altura), caracterizadas por serem robustas e perenes, com diâmetro médio de colmo de 10 mm, folhas com 40-100 cm de comprimento, e panículas longas (até 60 cm) e largas (até 30 cm) produzindo entre 700 mil a 2 milhões de sementes/kg; e as de porte menor (menor que 1,5 m de altura), de aparência menos robusta, com diâmetro de colmo de até 5 mm, com folhas, panículas e tamanho de espiguetas menores que as de porte maior.

De acordo com mapas de distribuição da espécie fornecidos pela Global Biodiversity Information Facility (GBIF, 2017), o capim-guinea encontra-se distribuído em todo o território brasileiro. Estudos que tenham visado realizar um levantamento do germoplasma desta gramínea encontrada na região do Cariri no Ceará, e sua caracterização a partir de informações anatômicas, morfológicas, bioquímicas ou moleculares, são ainda escassos. Entretanto, a possibilidade de existir ampla variabilidade entre esses materiais é bastante alta, se considerarmos os diferentes tipos climáticos que têm sido descritos para a região – clima tropical quente subúmido, clima tropical quente semiárido brando e clima tropical quente semiárido (MEDEIROS *et al.*, 2007) – que podem ter influência nas características biológicas das plantas presentes na região.

Vários autores têm salientado o potencial de capim-guinea como matéria-prima para produção de etanol de segunda-geração, uma vez que tanto a produtividade de biomassa quanto os teores de açúcares fermentáveis obtidos na conversão da biomassa são comparáveis àqueles de cana-de-açúcar (JANK *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2014).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Estudar a biomassa e a composição em açúcares fermentáveis e lignina de ecótipos e cultivares da gramínea *Megathyrsus maximus* Jacq. para avaliar seu potencial como matéria-prima para a produção de etanol de segunda geração.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Avaliar parâmetros morfofisiológicos e de crescimento de capim-guinea, de cultivares comerciais e ecótipos da região do Cariri cearense, cultivados em casa de vegetação.
2. Quantificar açúcares solúveis e estruturais na biomassa de capim-guinea: frutose, glicose, sacarose, açúcares redutores, amido e celulose.
3. Quantificar a lignina total presente na biomassa.
4. Entender o potencial dos ecótipos e cultivares na produção de etanol.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Material biológico

No presente trabalho foram utilizadas sementes de cultivares melhoradas e de ecótipos de capim-guinea (*Megathyrsus maximus* Jacq.). As cultivares usadas foram: Mombaça (MO), Tanzânia (TA) e Aruana (AR), sendo estas doadas pela Embrapa Semiárido (Petrolina – PE). As sementes dos ecótipos foram obtidas a partir de inflorescências coletadas no Cariri cearense entre maio e julho de 2018 nas cidades de: Assaré, localizada a 6°54'09"S, 39°52'08"W e com clima tropical quente semiárido; Barbalha, localizada a 7°20'04"S, 39°23'39"W e com clima tropical quente subúmido; e Caririaçu, localizada a 7°03'14"S, 39°17'23"W e com clima tropical quente semiárido brando. As inflorescências coletadas foram secas à sombra, no Laboratório de Biologia do Centro de Ciências Agrárias e da Biodiversidade (CCAB), no campus Crato da Universidade Federal do Cariri, por um período de dez dias, com posterior limpeza manual para retirada do revestimento das sementes. As sementes nuas foram acondicionadas em sacos de papel devidamente identificados como ecótipos Assaré (AS), Barbalha (BA) e Caririaçu (CA). Todos os materiais foram armazenados em recipientes de vidro contendo sílica gel, e mantidos sob refrigeração à temperatura de 10 °C.

### 4.2 Preparação do substrato para o cultivo

Foi utilizado como substrato para o crescimento das plantas areia de textura média coletada em leito de rio. A areia foi peneirada, lavada de seis a sete vezes em bacias com água potável para retirada de impurezas e sais, até que água de lavagem praticamente não apresentasse turbidez. Foi então deixada em ambiente aberto para secagem por cinco a sete dias. Não foi realizado qualquer tipo de caracterização físico-química no substrato lavado. Em seguida, recipientes plásticos escuros foram preenchidos com 5.180 g de areia e umedecidos com 820 mL de água destilada, quantidade estimada para atingir aproximadamente 80% de capacidade de campo.

### 4.3 Condições de cultivo e colheita das plantas

As sementes de cada material foram desinfetadas com solução de hipoclorito de sódio comercial (água sanitária, com aproximadamente 2% (m/v) de hipoclorito de sódio) diluída a 1/4 (v/v) em água destilada durante cinco minutos, e em seguida, lavadas com abundante água da torneira. As sementes foram plantadas em covas com 1,0 cm de profundidade, formadas sobre a superfície de areia em cada um dos vasos.

As plantas foram cultivadas sob condições de casa de vegetação também localizada no CCAB, no período de 14 de setembro a 13 de dezembro de 2018. A irrigação diária se deu em três horários (08h, 12h30, 17h), com água suficiente para manter a capacidade de campo determinada. Nos horários das 08h e das 17h foram medidas a temperatura ambiente e a umidade relativa do ar. A partir do 12.º dia de cultivo, e em dias alternados, foi introduzida a irrigação com solução nutritiva de Hoagland com 1/3 de força iônica (HOAGLAND; ARNON, 1950). No 20.º dia de cultivo, foi realizado o desbaste das plantas, deixando-se somente três plantas por vaso. A fim de diminuir possíveis efeitos de sombreamento, foram realizados a cada 10 dias reposicionamentos de todos os vasos de forma aleatorizada. No último horário de rega, cada vaso foi pesado para ajustar o valor da massa total correspondente à capacidade de campo pretendida, de tal forma a manter o nível de umidade constante ao longo do experimento. Na Figura 8, observam-se plantas dos diferentes ecótipos e cultivares de capim-guinea cultivadas em casa de vegetação.

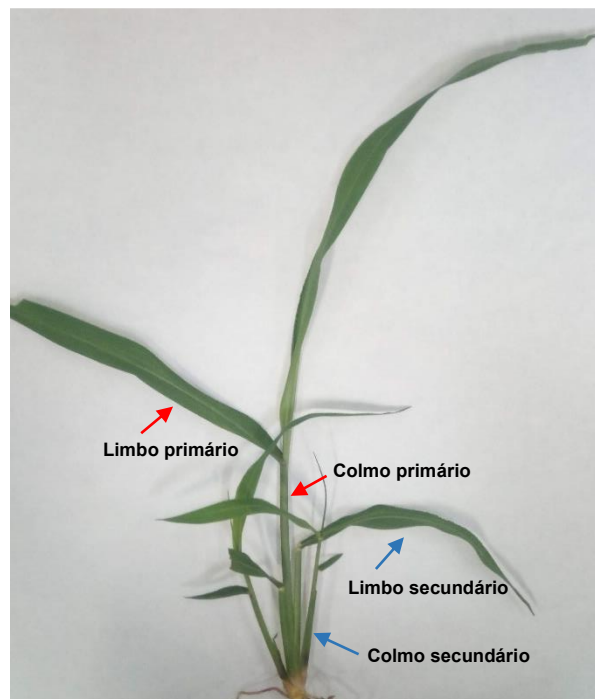
Plantas de 45 e 90 dias de cultivo tiveram suas partes aéreas removidas e separadas em colmo primário, colmos secundários (perfilhos), limbos primários (interligadas ao colmo primário), e limbos secundários (interligadas aos perfilhos), como mostrado na Figura 9. Cada tecido foi embrulhado em folha de alumínio, devidamente identificado e imediatamente armazenados a -20 °C, assim permanecendo até o momento de sua utilização nas análises.

Figura 8 – Disposição dos vasos de cultivo na casa de vegetação



Fonte: autor (2018).

Figura 9 – Imagem de uma planta de capim-guinea mostrando os tecidos estudados



Fonte: autor (2019). Tecidos primários (setas vermelhas) e tecidos secundários (setas azuis).

#### 4.4 Obtenção de dados morfofisiológicos

Nos dias imediatamente anteriores às datas de colheita foram medidos os parâmetros morfofisiológicos. Para tanto, no intervalo das 8–9 h da manhã, todos os vasos foram regados com água destilada, retirados da casa de vegetação e postos sob incidência de luz solar direta. Após aclimatação por 30 min, foram medidos os seguintes parâmetros em uma planta de cada vaso:

- Para o colmo primário: calibre do colmo, utilizando paquímetro, e densidade populacional de perfilhos (contagem de perfilhos).
- Para o limbo completamente estendido mais próximo ao ápice, conectado ao colmo primário: comprimento do limbo largura do limbo, na metade do comprimento do limbo, todas estas utilizando uma trena métrica; e condutância estomática, com auxílio de porômetro de folha (modelo SC-1, Decagon Devices).

#### 4.5 Análise de carboidratos e lignina

Embora tenham sido realizadas coletas em dois tempos, as análises de carboidratos e lignina foram realizadas com material coletado aos 45 dias de cultivo.

##### *4.5.1 Preparação dos extratos para determinação de carboidratos*

###### *4.5.1.1 Extratos etanólicos*

Carboidratos solúveis foram determinados em extratos etanólicos preparados a partir dos tecidos frescos, previamente descongelados. O almofariz foi aprisionado em gelo, dentro de um recipiente de poliestireno expandido (isopor), tomando-se o cuidado de deixar somente o bico do almofariz para fora das paredes do recipiente. Aproximadamente 300 mg de biomassa foi transferida para o almofariz e homogeneizada com 1,8 mL de etanol 80%. As amostras foram colocadas sobre mesa agitadora por 1 h, regulada a uma velocidade de 90 rpm, a 10 °C. Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 4.000 x g por 15 min e os sobrenadantes coletados em tubos de ensaio. Ao precipitado foi adicionado 1,8 mL de etanol 80% e deu-se início a mais um ciclo de extração. Todo o processo foi repetido três vezes para cada amostra de tecido, e ao final os sobrenadantes coletados foram combinados e os volumes

finais ajustados para 10 mL com água destilada. Os extratos foram armazenados a -20 °C até o momento de cada análise.

#### *4.5.1.2 Extratos perclóricos*

O precipitado remanescente da extração etanólica foi utilizado para o preparo de extratos com a finalidade de quantificar o amido. A extração foi realizada seguindo o método descrito por ROSE *et al.* (1991). O precipitado foi suspenso em 2 mL de ácido perclórico a 30% (v/v). As amostras foram deixadas sob agitação por 1 h em mesa agitadora, regulada a uma velocidade de 90 rpm. As amostras foram centrifugadas a 4000 x g por 15 min e os sobrenadantes coletados em tubos de ensaio e estes foram mantidos sob refrigeração a -20 °C até o momento de cada análise. O precipitado foi lavado três vezes com água destilada e as amostras centrifugadas entre cada lavagem nas condições já descritas.

#### *4.5.1.3 Extratos ácidos*

Para quantificar a celulose, foram realizadas a extração de lignina e hidrólise da celulose, utilizando o precipitado da extração perclórica e seguindo a metodologia proposta por UPDEGRAFF (1969). O precipitado foi suspenso em 2 mL de reagente nítrico-acético [ácido nítrico a 1/10 (v/v) em ácido acético 80% (v/v)]. As amostras foram deixadas em banho-maria a 94 °C por 30 min e em seguida centrifugados a 3000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado três vezes com água destilada, com centrifugação entre cada lavagem nas mesmas condições descritas. Ao precipitado remanescente foi adicionado 2 mL de ácido sulfúrico 67%, e os tubos deixados em repouso por 1 h para hidrólise completa do material. Os extratos foram diluídos para a décima parte com água destilada, e mantidos sob refrigeração a -20 °C até o momento de sua utilização.

### **4.5.2 Quantificação de carboidratos solúveis**

#### *4.5.2.1 Sacarose*

A sacarose foi determinada seguindo o procedimento desenvolvido por VAN HANDEL (1968). Resumidamente, em tubos de ensaio foram adicionados 50 µL do extrato etanólico e 50 µL de etanol 80%, deixando-os sobre chapa de aquecimento a 100 °C por 10

min até redução quase completa do volume. Em seguida, adicionou-se 100 µL de hidróxido de potássio a 30% (m/v) e a amostra foi novamente aquecida a 100 °C por 10 min. Após resfriamento, foram adicionados 3 mL de solução de antrona a 0,15% (m/v) em ácido sulfúrico 76% (v/v), preparada no dia da análise, e as amostras foram incubadas em banho-maria a 40 °C por 15 min. Em seguida, as leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro a 620 nm.

#### 4.5.2.2 Açúcares redutores

O teor de açúcares redutores foi determinado pelo método de Somogyi-Nelson, como descrito por MALDONADE *et al.* (2013). Foram pipetados 100 µL do extrato etanólico e adicionado 200 µL do reagente contendo íons  $\text{Cu}^{2+}$  (solução SN-I). As amostras foram incubadas em banho-maria a 94 °C por 6 min. Após resfriamento, foi adicionado 200 µL do reagente de arsenomolibdato (solução SN-II) e as amostras agitadas e deixadas em repouso por 5 min. Na sequência, foram adicionados 5 mL de água destilada e feitas as leituras de absorvância em espectrofotômetro a 540 nm.

#### 4.5.2.3 Glicose

A quantificação de glicose foi realizada pelo método proposto por CHIANG e JOHNSON (1977). Em tubos de ensaio, foram adicionados 450 µL do reagente de *o*-toluidina [tiourea a 1,5% (m/v) e *o*-toluidina a 6% (v/v) em ácido acético glacial] a 50 µL do extrato etanólico. Em seguida, as amostras foram aquecidas em banho-maria a 94 °C por 10 min. Após resfriamento, adicionou-se 500 µL de ácido acético glacial e mediu-se a absorvância em espectrofotômetro a 630 nm.

#### 4.5.2.4 Frutose

Teores de frutose foram determinados seguindo o método originalmente proposto por ROE (1934), com pequenas modificações. Em tubos de ensaio, foram adicionados 100 µL do extrato etanólico, 200 µL do reagente de resorcinol [resorcinol a 0,1% (m/v) em etanol absoluto] e 700 µL de ácido clorídrico a 30% (v/v). As amostras foram incubadas em banho-maria a 80 °C por 8 min, e após resfriamento a leitura de absorvância foi realizada em espectrofotômetro a 530 nm.



### **4.5.3 Quantificação de polissacarídeos**

#### **4.5.3.1 Amido**

Para determinar o amido foi seguida a metodologia de ROSE *et al.* (1991). Em tubos de ensaio foram adicionados 100  $\mu$ L do extrato perclórico e 900  $\mu$ L do reagente de antrona preparado no dia [antrona a 0,15% (m/v) em ácido sulfúrico a 76% (v/v)]. Os tubos foram colocados em banho-maria a 94 °C por 12 min e após resfriamento foi medida a absorvância em espectrofotômetro a 620 nm.

#### **4.5.3.2 Celulose**

Para quantificar a celulose utilizou-se a metodologia proposta por UPDEGRAFF (1969), a mistura da reação consistiu de 30  $\mu$ L do extrato ácido, 370  $\mu$ L de ácido sulfúrico a 6,7% (v/v) e 1 mL do reagente de antrona [antrona a 0,2% [m/v] em ácido sulfúrico concentrado]. As amostras foram agitadas, os tubos tampados e deixadas em banho-maria a 94 °C por 16 min. Após resfriamento em banho de gelo por 2 min, foi medida a absorvância em espectrofotômetro a 620 nm.

### **4.5.4 Quantificação de lignina**

A lignina foi quantificada de acordo com o método de MOREIRA-VILAR *et al.* (2014), com pequenas modificações. Aproximadamente 300 mg de massa seca foram homogeneizadas com 10 mL de tampão fosfato de sódio a 50 mM pH 7,0 com auxílio de almofariz e pistilo. Em seguida, as amostras foram transferidas para tubos de ensaio e centrifugadas a 800 x g por 5 min. O precipitado remanescente foi sequencialmente lavado duas vezes com 10 ml de tampão fosfato de sódio a 50 mM pH 7,0; três vezes com solução de Triton-X100 a 1% (v/v) em tampão fosfato a 50 mM pH 7,0; duas vezes com NaCl a 1,0 M em tampão fosfato de sódio a 50 mM pH 7,0; duas vezes com água destilada; e duas vezes com acetona. O precipitado final foi seco em estufa a 60 °C por 24 h, e a matéria seca obtida foi definida como fração da parede celular livre de proteínas. Para a quantificação de lignina, aproximadamente 20 mg da fração de parede celular livre de proteínas foi colocada em tubo de reação contendo 1 mL de solução de brometo de acetila [brometo de acetila a 25% (v/v) em ácido acético glacial]. As amostras foram aquecidas a 70 °C por 30 min, e na sequência

foram rapidamente resfriadas em banho de gelo por 2 min. Foram adicionados 1,8 mL de hidróxido de sódio a 2,0 M, 0,2 mL de solução de hidroxilamina-HCl a 5,0 M e 4 mL de ácido acético glacial. As leituras de absorbância das amostras foram realizadas em espectrofotômetros a 280 nm.

#### **4.6 Desenho experimental e tratamento estatístico**

Adotou-se um desenho experimental com fatorial 6x2, sendo 6 materiais (três cultivares e três ecótipos) e 2 tempos de colheita (aos 45 e 90 dias após a semeadura). A disposição dos vasos dentro da casa de vegetação foi feita de forma completamente ao acaso.

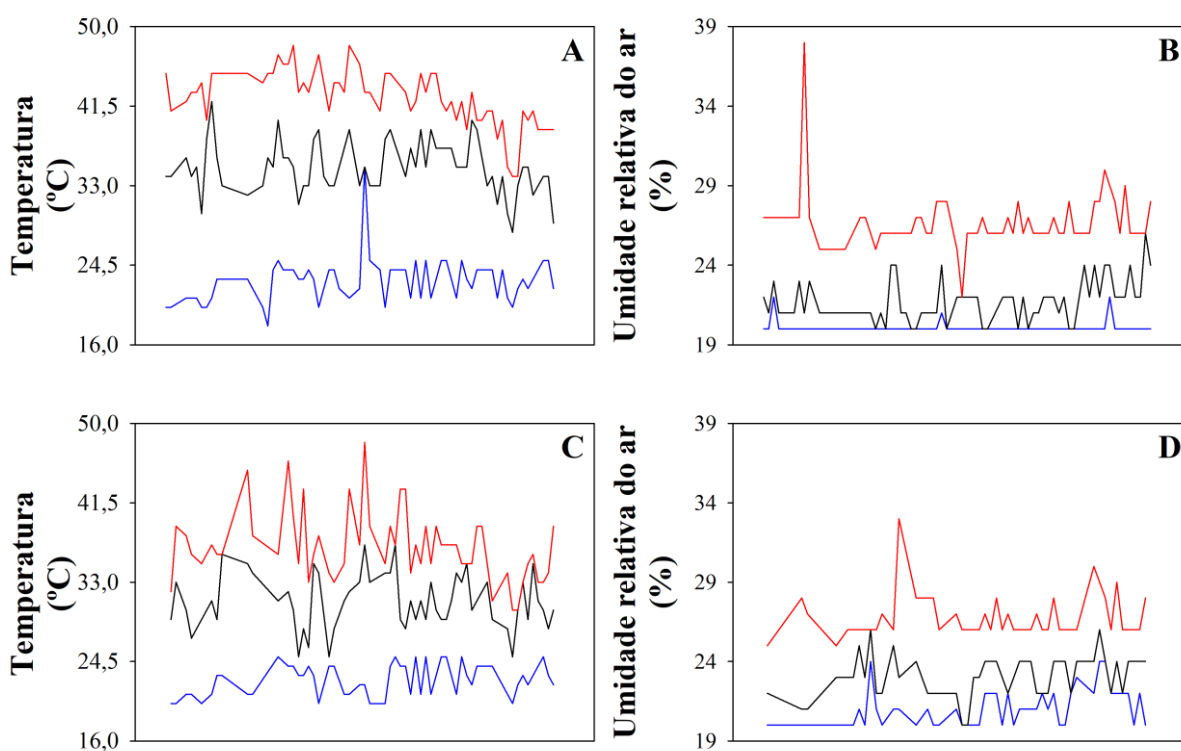
Os dados morfofisiológicos foram sujeitos a uma análise de variância (ANOVA *two-way*) sendo os fatores cultivar/ecótipo e tempo de coleta; e as análises bioquímicas foram sujeitas a uma ANOVA *one-way*, sendo o fator analisado cultivar/ecótipo. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a um nível de significância de 95%. Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão de seis amostras ( $n = 6$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Dados microclimáticos

Durante o experimento, no período diurno, a temperatura variou em média entre 23–42 °C (Figura 10A) e a umidade relativa do ar entre 20–27% (Figura 10B). Já para o período noturno, a temperatura oscilou entre 23–37 °C (Figura 10C) e a umidade relativa do ar entre 21–27% (Figura 10D).

Figura 10 – Temperatura e umidade relativa do ar durante o experimento



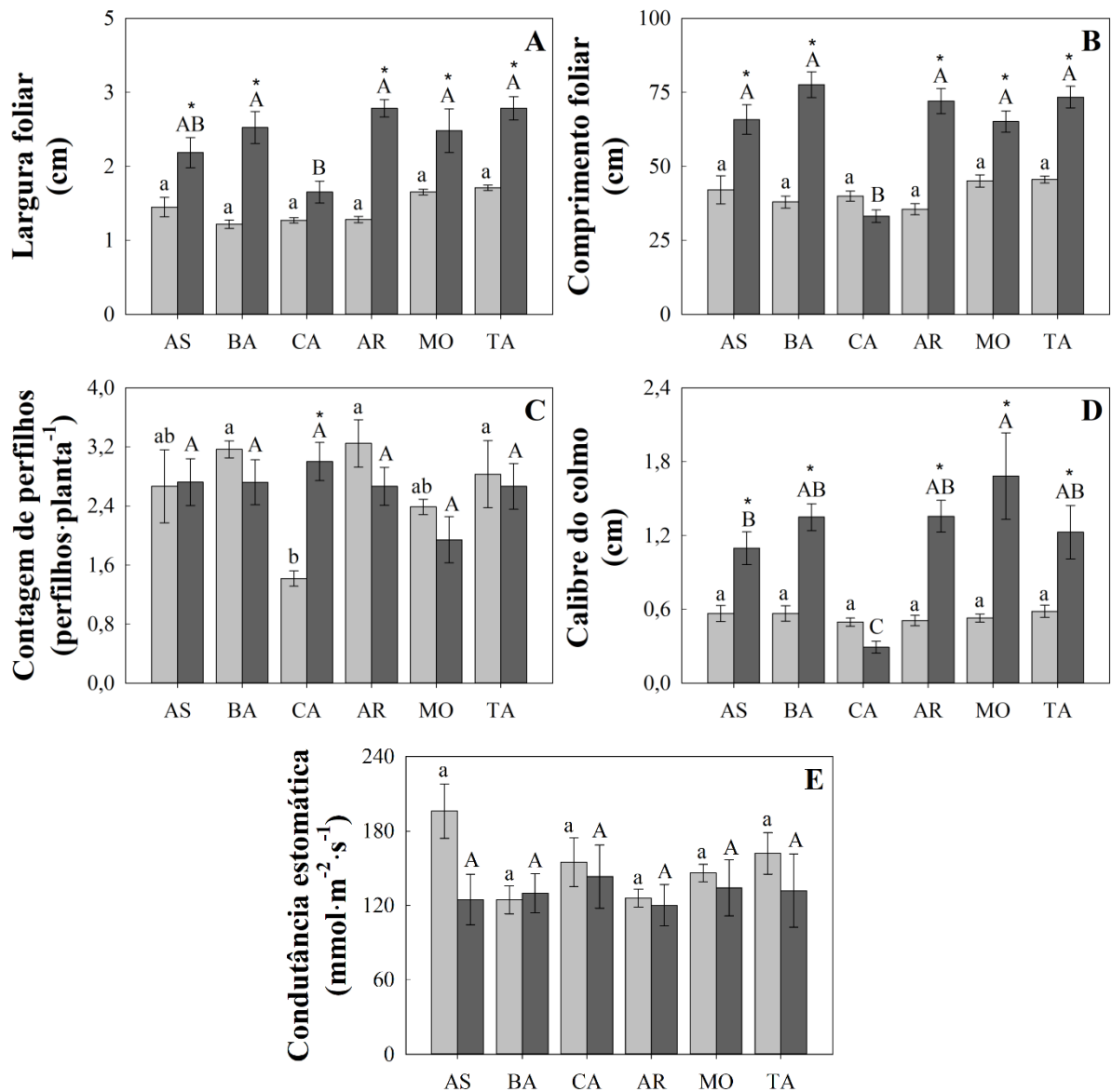
Fonte: dados da pesquisa (2018). Dados de temperatura ambiente e umidade relativa do ar durante o dia (A e B) e durante a noite (C e D). São representados os valores mínimos (azul), do momento da leitura (preto) e máximos (vermelhos).

### 5.2 Morfofisiologia

Houve interação estatística significativa entre os fatores tempo e material vegetal para a variável largura foliar (Figura 11A). À exceção do ecótipo Cariraçu, os outros materiais testados apresentaram diferenças significativas para os dois tempos de cultivo. Este mesmo ecótipo apresentou folhas mais estreitas que os demais aos 90 dias de cultivo. O

comportamento descrito anteriormente se repetiu para a variável comprimento foliar (Figura 11B). Houve interação significativa entre os fatores para a contagem de perfilhos; o ecótipo Caririaçu apresentou diferenças entre os tempos de coleta, vindo a se igualar ao número de perfilhos dos outros materiais aos 90 dias (Figura 11C). Para a variável calibre do colmo, também houve interação estatística entre os fatores estudados; diferenças significativas entre os tempos de coleta foram encontradas para a maioria dos materiais testados, exceto para o ecótipo Caririaçu (Figura 11D). Não houve diferenças significativas para os dois fatores testados em relação à variável condutância estomática (Figura 11E).

Figura 11 – Parâmetros morfofisiológicos



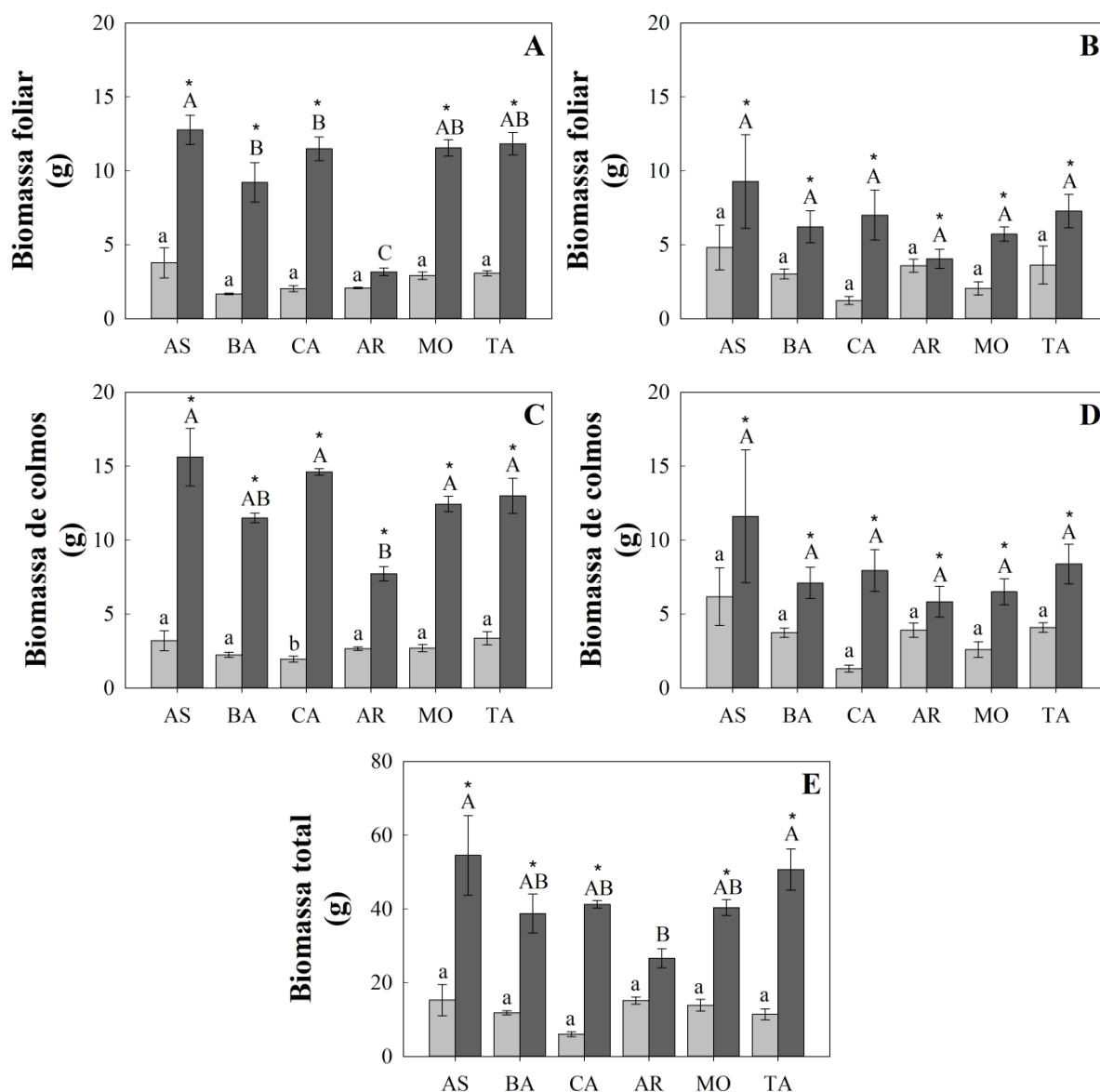
Fonte: dados da pesquisa (2019). Largura de limbos primários (A), comprimento de limbos primários (B), número de perfilhos (C), calibre do colmo primário (D), e condutância estomática (E) em cultivares (AR, MO e TA) e ecótipos (AS, BA e CA) de capim-guinea, cultivados sob condição de casa de vegetação. Os

dados foram obtidos de plantas com 45 (cinza claro) e 90 dias (cinza escuro) de cultivo. Letras minúsculas e maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas observadas aos 45 e 90 dias, respectivamente. O símbolo \* indica diferenças significativas entre os tempos de cultivo.

### 5.3 Acúmulo de biomassa

Diferenças significativas entre os tempos de coleta foram encontradas para todos os materiais, havendo aumento considerável na produtividade de biomassa para o maior tempo de coleta, ainda que a cultivar Aruana apresentasse valor significativamente mais baixo nos tecidos primários que os outros materiais. Para a biomassa foliar primária (Figura 12A), houve interação entre os dois fatores testados. Com exceção da cultivar Aruana, todos os materiais apresentaram biomassa consideravelmente maior para o tempo de 90 dias, com acúmulo semelhante de biomassa entre os materiais vegetais. Para a biomassa de limbos secundários (Figura 12B). Não houve diferenças significativas para as biomassas de colmos primários (Figura 12C) em cada tempo de cultivo. As biomassas de colmos secundários (Figura 12D) foram significativamente diferentes entre os dois tempos avaliados, porém não houve diferenças significativas entre os materiais quando considerados cada tempo de cultivo. Quando analisado o acúmulo de biomassa da parte aérea da planta (Figura 12E), foi verificada interação entre os fatores analisados. Apenas no segundo tempo de coleta observaram-se diferença na biomassa total, sendo Assaré e Tanzânia os materiais que acumularam maior biomassa, enquanto Aruana acumula menos. No período entre os dois tempos de coleta, o ecótipo Caririaçu aumentou sua biomassa em quase sete vezes, destacando-se dos outros materiais, com aumento na biomassa entre 3,3 a 3,6 vezes.

Figura 12 – Acúmulo de biomassa



Fonte: dados da pesquisa (2019). Acúmulo de biomassa em limbos primários (A), limbos secundários (B), colmos primários (C), colmos secundários (D), e na parte aérea total da planta (E) em cultivares (AR, MO e TA) e ecótipos (AS, BA e CA) de capim-guineia, cultivados sob condição de casa de vegetação. Os dados foram obtidos de plantas com 45 (cinza claro) e 90 dias (cinza escuro) de cultivo. Letras minúsculas e maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas observadas aos 45 e 90 dias, respectivamente. O símbolo \* indica diferenças significativas entre os tempos de coleta.

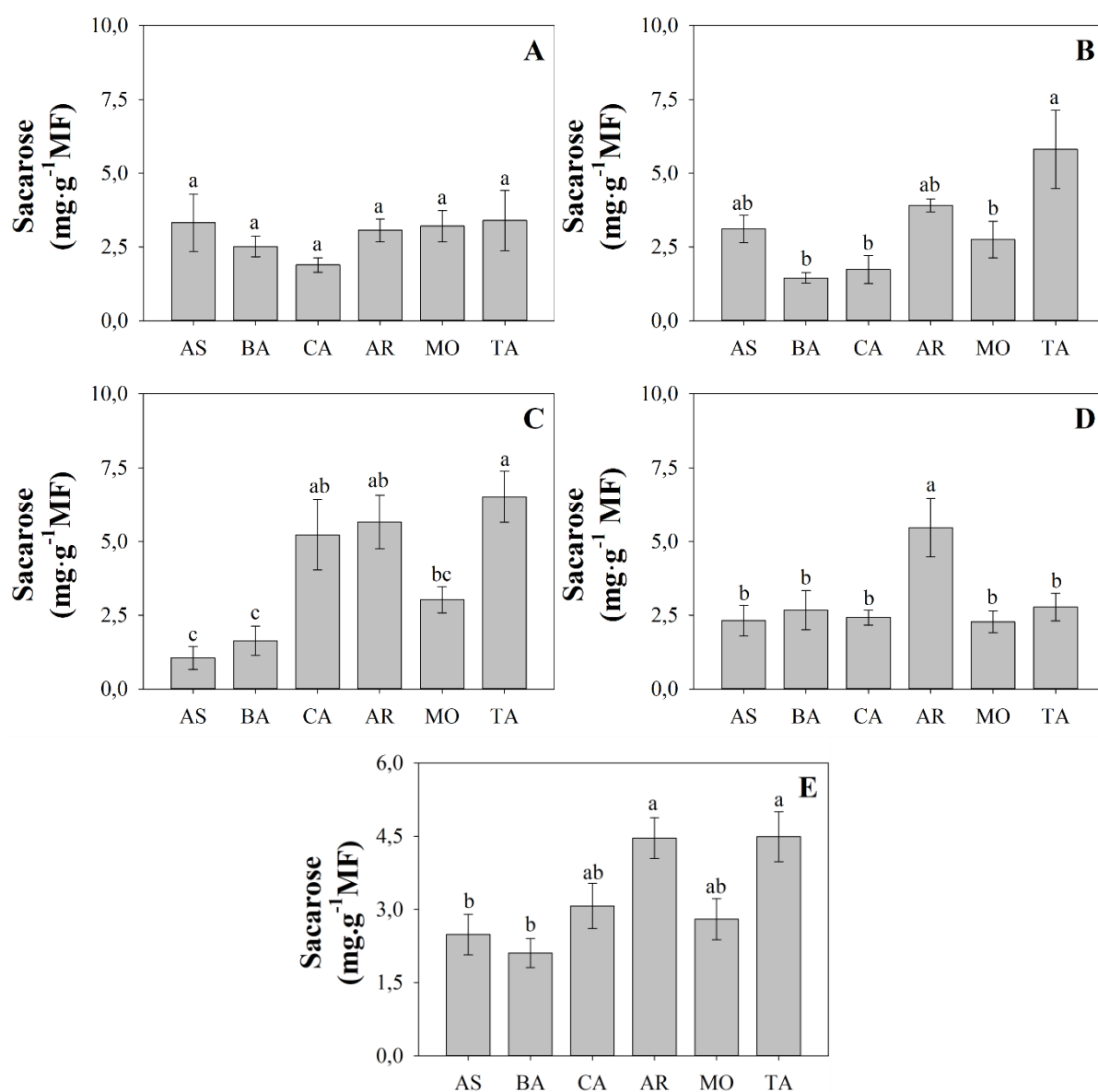
## 5.4 Carboidratos solúveis

### 5.4.1 Sacarose

Os teores de sacarose nos limbos primários (Figura 13A) não apresentaram diferenças significativas entre os materiais analisados. Já para os limbos secundários, a

cultivar Tanzânia mostrou o valor mais alto para os teores deste açúcar (Figura 13B). Nos colmos primários, a quantidade de sacarose presente foi consideravelmente maior para a cultivar Tanzânia e menor para Assaré e Barbalha (Figura 13C). Nos colmos secundários, os teores de sacarose da cultivar Aruana foram, em média, duas vezes maiores quando comparados aos dos outros materiais (Figura 13D). Quando analisada a quantidade total de sacarose nos tecidos aéreos, estes foram duas vezes maiores em Aruana e Tanzânia que em Barbalha e Assaré (Figura 13E).

Figura 13 – Quantificação de sacarose



Fonte: dados da pesquisa (2019). Teores de sacarose em limbos primários (A), limbos secundários (B), colmos primários (C), colmos secundários (D) parte aérea da planta (E), em cultivares (AR, MO e TA) e ecótipos (AS, BA e CA) de capim-guinea, cultivados sob condição de casa de vegetação. Dados obtidos de plantas com 45 dias de cultivo. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas.

### **5.4.2 Açúcares redutores**

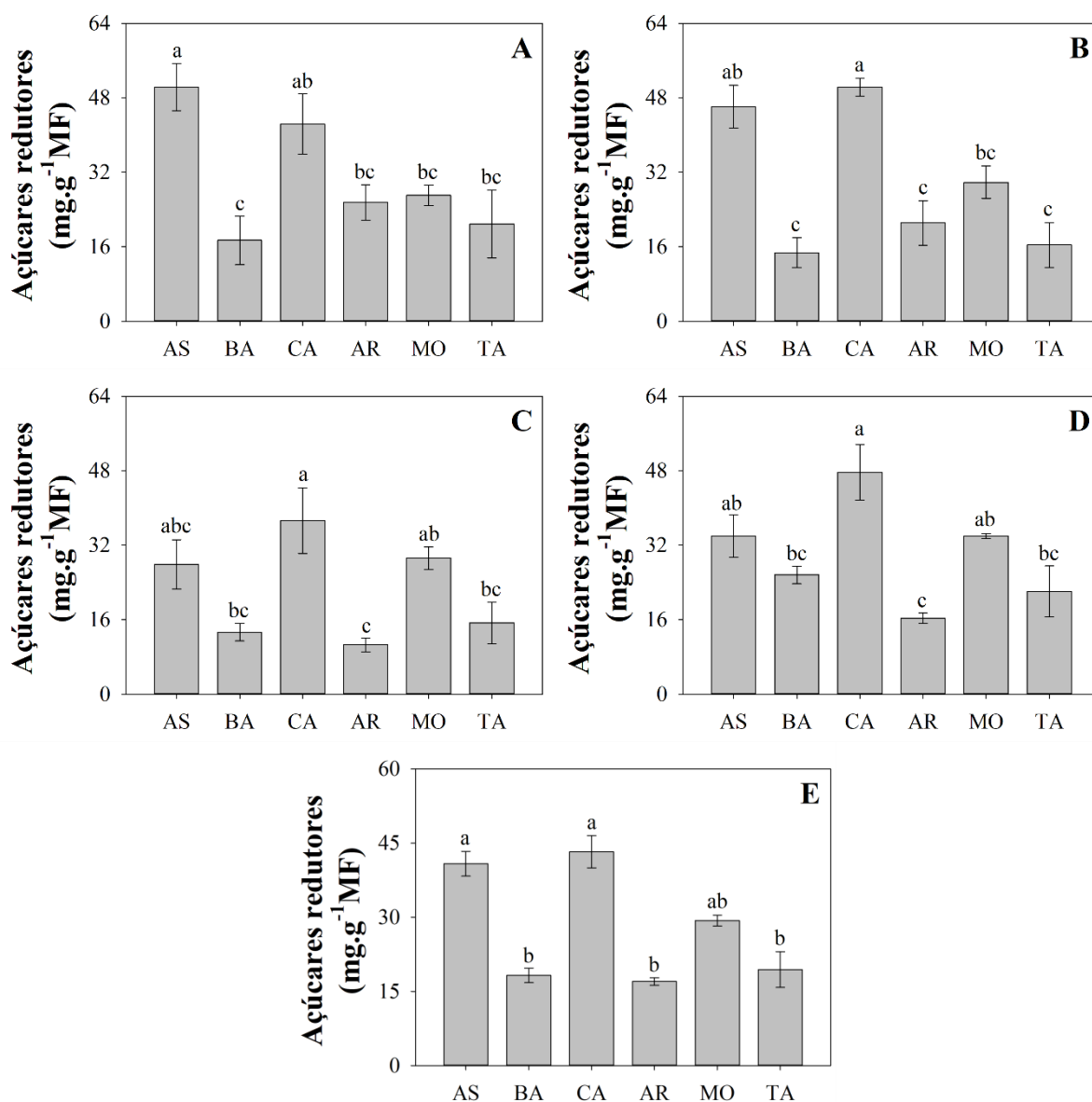
Para a fração de açúcares redutores, realizou-se a subtração dos teores de glicose e frutose para que não houvesse dupla contribuição destes carboidratos na contribuição para a biomassa (Seção 5.6). Em limbos primários, os maiores teores foram observados no ecótipo Assaré, sendo estes superiores a Barbalha, Aruana, Mombaça e Tanzânia (Figura 14A). Em média, o valor para Assaré foi 1,5 vezes superior do que nas cultivares e 1,6 vezes superior ao do ecótipo Barbalha. Nos limbos secundários (Figura 14B), destacou-se Caririaçu, que apresentou valores equivalentes aos de Assaré e aproximadamente duas vezes maiores que nos outros materiais. Nos colmos primários (Figura 14C), destacaram-se os teores de Caririaçu, Assaré e Mombaça, sendo duas vezes maiores que os demais. Os maiores teores de açúcares redutores nos colmos secundários (figura 14D) também foram encontrados em Caririaçu, Assaré e Mombaça, sendo 1,8 vezes maiores que nos outros materiais. Quando analisados todos os tecidos em conjunto (Figura 14E), verificou-se que Assaré e Caririaçu apresentaram valores até 2,3 vezes maiores em comparação a Barbalha, Aruana e Tanzânia.

### **5.4.3 Glicose**

Os teores de glicose em todos os materiais foram estatisticamente semelhantes nos tecidos de limbos primários e secundários (Figuras 15A e 15B), e colmo primário (Figura 15C). Os colmos secundários da cultivar Mombaça contiveram os menores teores desse açúcar, sendo maiores em Barbalha (Figura 15D). Quando consideramos todos os tecidos em conjunto (Figura 15E), o ecótipo Barbalha apresentou os maiores teores de glicose, porém não houve diferenças significativas Assar, Caririaçu, Aruana e Tanzânia. Os menores teores de glicose foram observados na parte aérea de Mombaça.

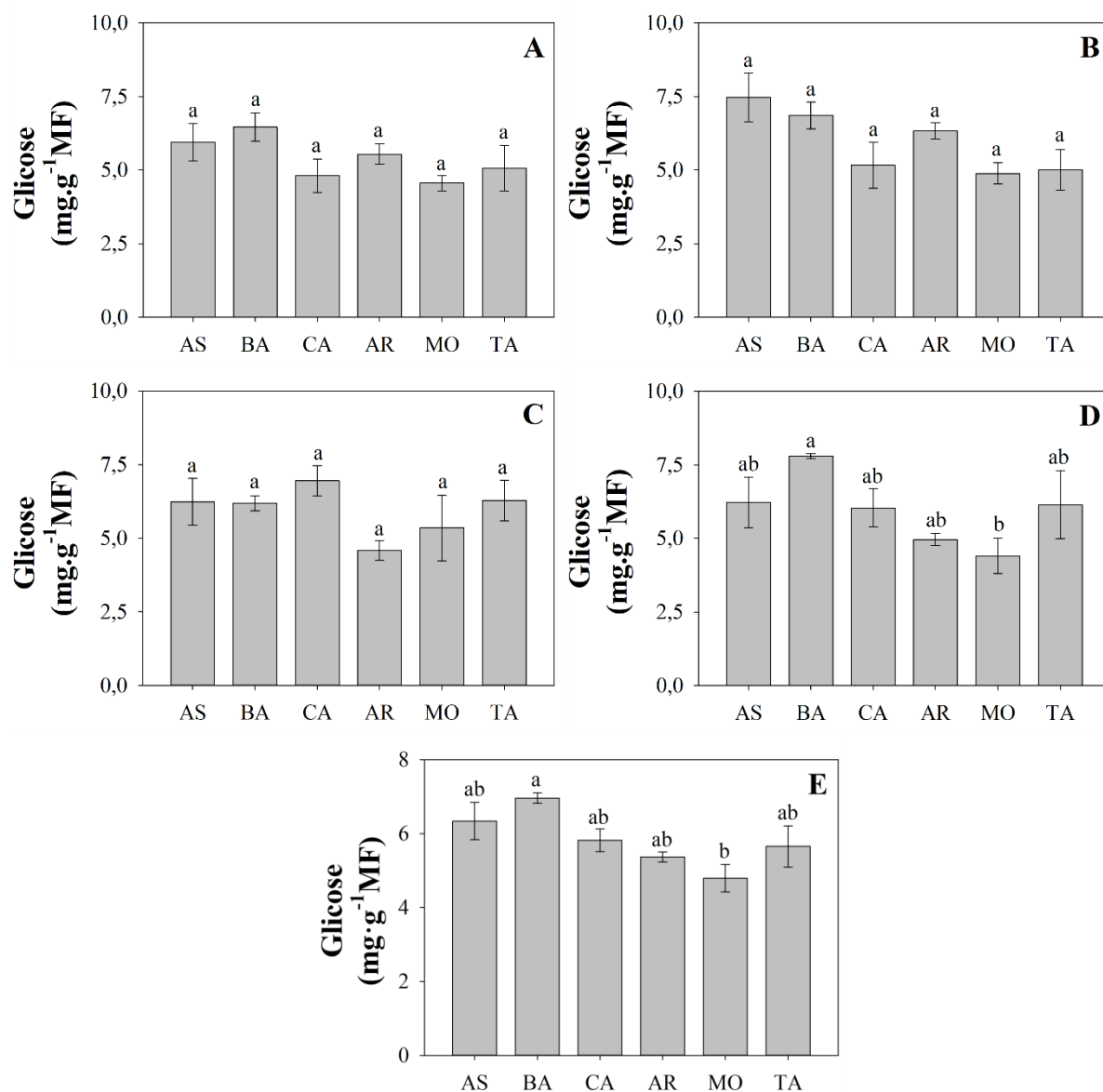


Figura 14 – Quantificação de açúcares redutores



Fonte: dados da pesquisa (2019). Teores de açúcares redutores, exceto glicose e frutose, em limbos primários (A), limbos secundários (B), colmos primários (C), colmos secundários (D) parte aérea da planta (E), em cultivares (AR, MO e TA) e ecótipos (AS, BA e CA) de capim-guinea, cultivados sob condição de casa de vegetação. Dados obtidos em plantas colhidas aos 45 dias pós o plantio. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os materiais.

Figura 15 – Quantificação de glicose



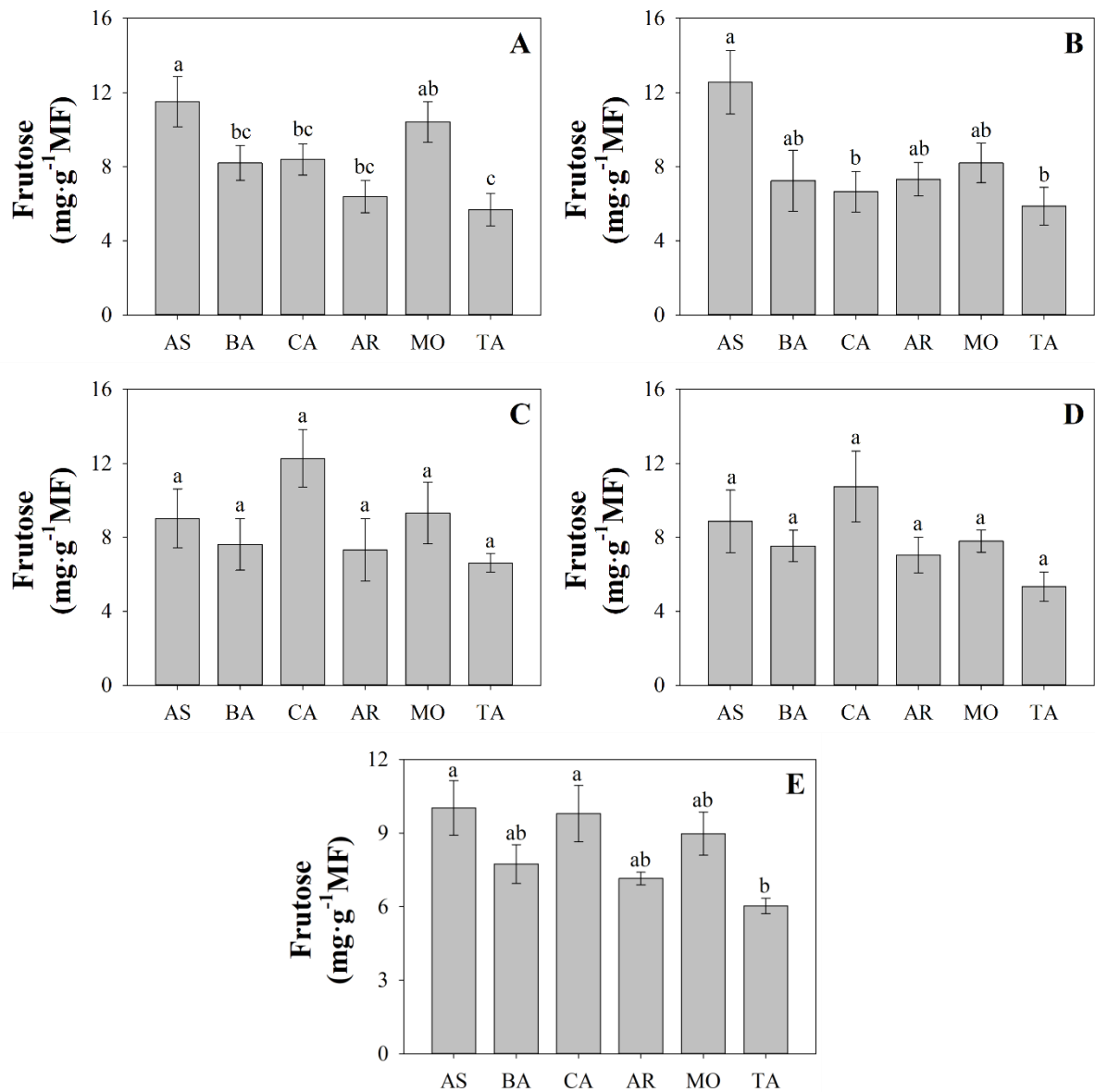
Fonte: dados da pesquisa (2019). Teores de glicose circulante em limbos primários (A), limbos secundários (B), colmos primários (C), colmos secundários (D) parte aérea da planta (E), em cultivares (AR, MO e TA) e ecótipos (AS, BA e CA) de capim-guinea, cultivados sob condição de casa de vegetação. Dados obtidos de plantas com 45 dias de cultivo. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas.

#### 5.4.4 Frutose

Os resultados obtidos para os teores de frutose nas limbos primários mostram que Assaré apresenta os maiores teores deste carboidrato (Figura 16A). O teor de frutose em Assaré e Mombaça foi em média 0,6 vezes maior que em Barbalha duas vezes maior que Tanzânia. Nos limbos secundários, os teores de frutose foram novamente maiores em Assaré, sendo estes duas vezes maiores em relação à cultivar Tanzânia e 1,8 vezes maiores que os do ecótipo Caririaçu. (Figura 16B). Não houve diferenças significativas nos teores deste

carboidrato nos colmos dos materiais testados (Figuras 16C e 16D). Em toda a parte aérea, Assaré e Caririáçu se diferenciaram estatisticamente em relação a Tanzânia, com valores até 1,3 vezes maiores, em média (Figura 16E).

Figura 16 – Quantificação de frutose



Fonte: dados da pesquisa (2019). Teores de frutose circulante em limbos primários (A), limbos secundários (B), colmos primários (C), colmos secundários (D) parte aérea da planta (E), em cultivares (AR, MO e TA) e ecótipos (AS, BA e CA) de capim-guinea, cultivados sob condição de casa de vegetação. Dados obtidos em plantas colhidas aos 45 dias pós o plantio. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os materiais.

## 5.5 Polissacarídeos

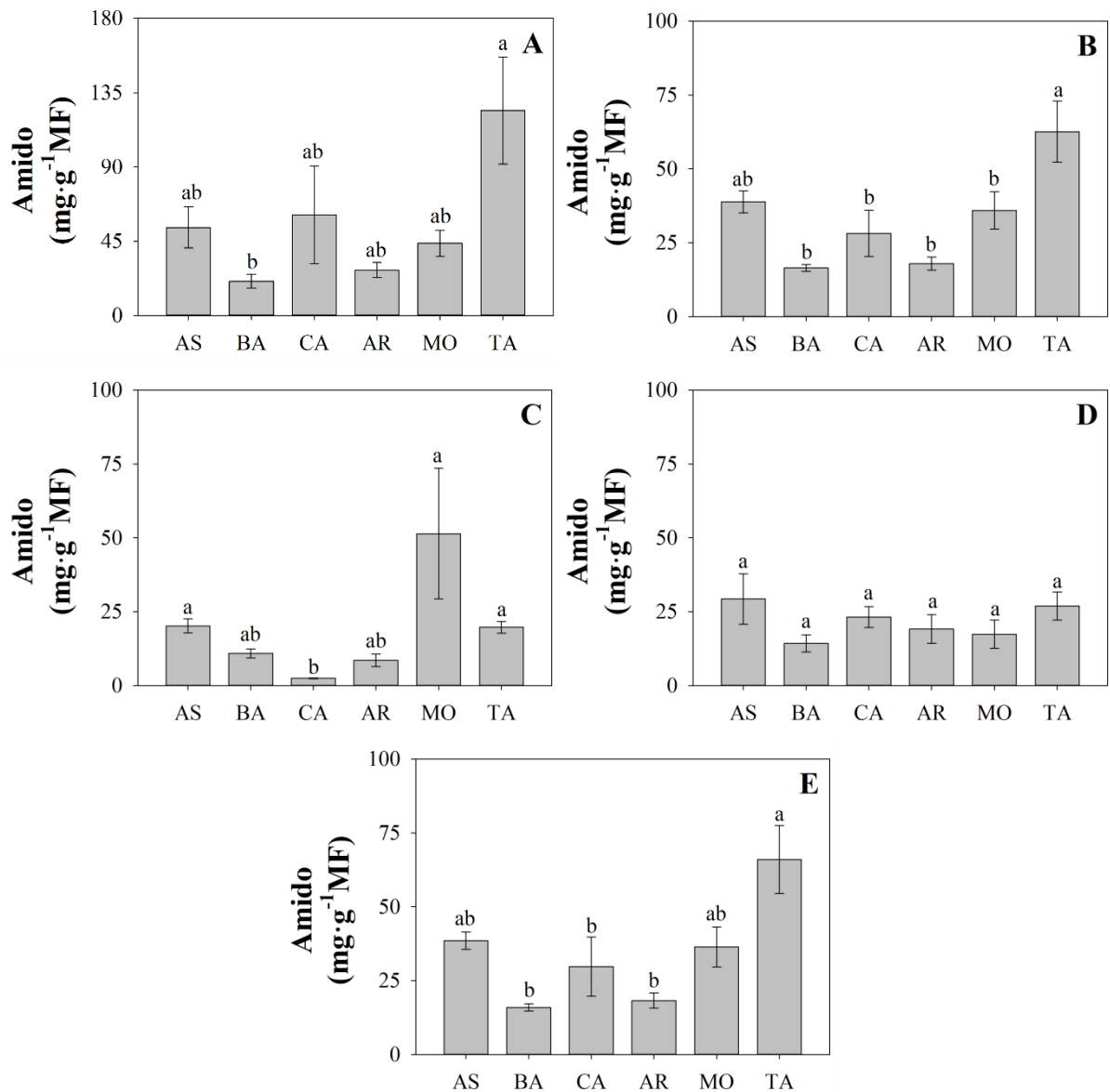
### 5.5.1 Amido

O perfil obtido para os teores de amido mostrou-se bastante heterogêneo. No entanto, em limbos primários (Figura 17A) a cultivar Tanzânia destacou-se ao apresentar valores até três vezes superiores os do ecótipo Barbalha. Nos limbos secundários (Figura 17B), os teores encontrados em Barbalha foram em média 3,6 vezes maiores que os de Barbalha, Caririaçu, Aruana e Mombaça. Nos colmos primários (Figura 17C), verificou-se os maiores teores de amido na cultivar Mombaça, que são mais de vinte vezes maiores em relação ao ecótipo Caririaçu. Não houve diferenças nos teores para os colmos secundários (Figura 17D). A quantificação de amido na parte aérea mostrou o desempenho superior do ecótipo Assaré, em média três vezes maiores que Barbalha, Caririaçu e Aruana (Figura 17E).

### 5.5.2 Celulose

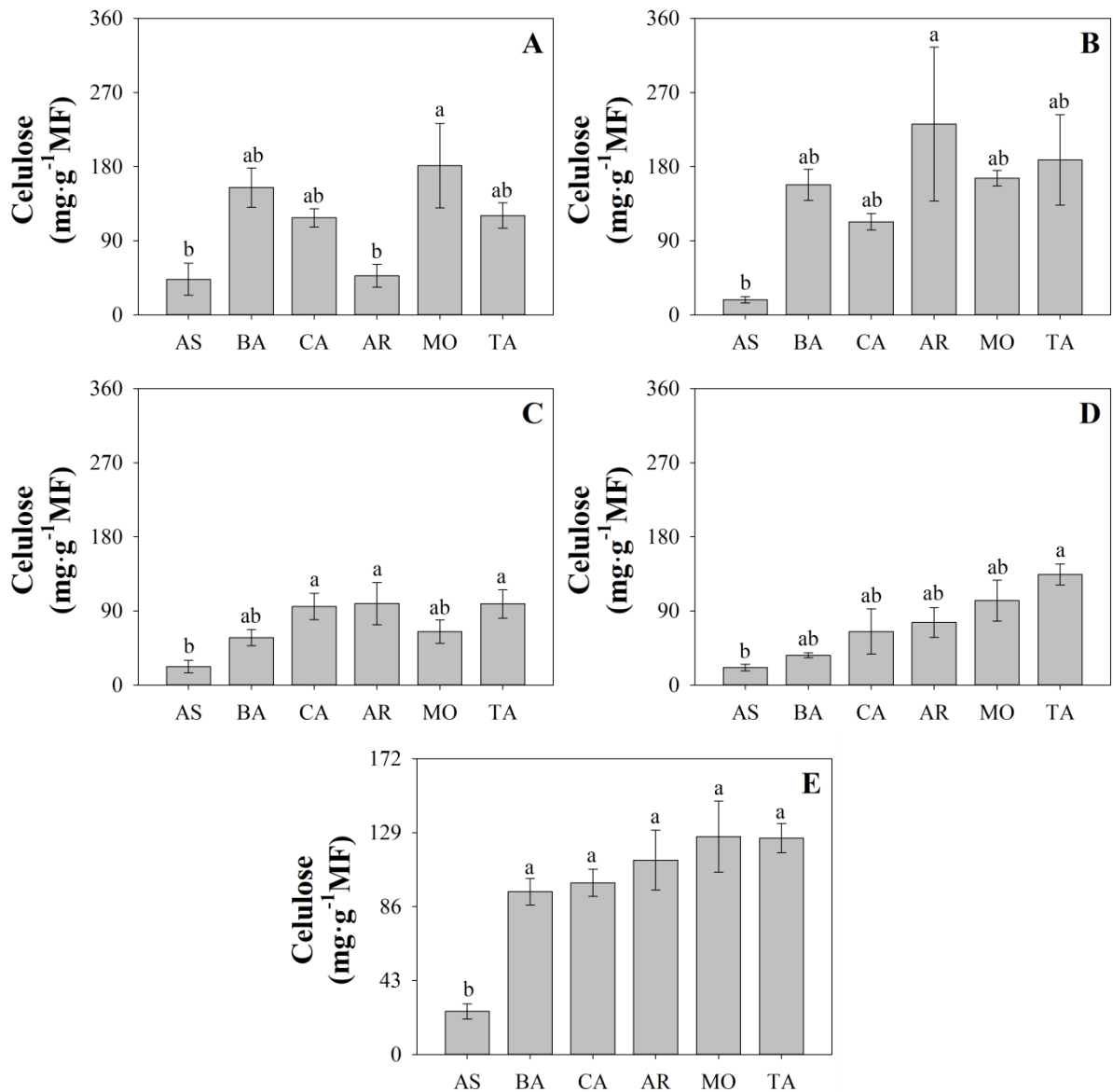
Em limbos primários (Figura 18A), Mombaça apresenta teores quatro vezes maiores que Assaré e Aruana. Para limbos secundários (Figura 18B), as maiores quantidades de celulose foram encontradas em Aruana, em até 12,6 vezes maiores que em Assaré. Em colmos primários e secundários (Figuras 18C e 18D), os teores de celulose mostraram o mesmo padrão, com o ecótipo AS apresentando conteúdo de celulose até 3,8 vezes menor em relação aos demais. Estes resultados influenciaram o teor de celulose na parte aérea total (Figura 18E). Em média o teor de celulose foi em média 1,5 vezes menor em Assaré do que nos outros materiais.

Figura 17 – Quantificação de amido



Fonte: dados da pesquisa (2019). Teores de amido em limbos primários (A), limbos secundários (B), colmos primários (C), colmos secundários (D) parte aérea da planta (E), em cultivares (AR, MO e TA) e ecótipos (AS, BA e CA) de capim-guinea, cultivados sob condição de casa de vegetação. Dados obtidos em plantas colhidas aos 45 dias pós o plantio. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os materiais.

Figura 18 – Quantificação de celulose



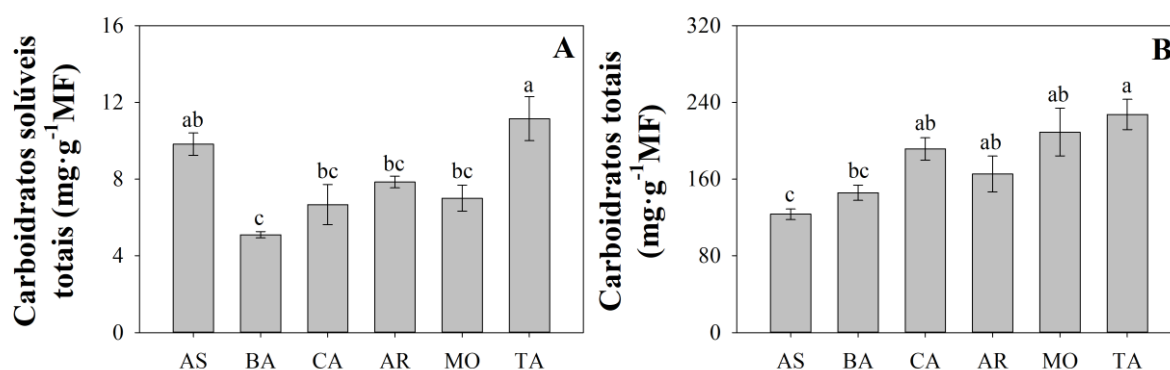
Fonte: dados da pesquisa (2019). Teores de celulose em limbos primários (A), limbos secundários (B), colmos primários (C), colmos secundários (D) parte aérea da planta (E), em cultivares (AR, MO e TA) e ecótipos (AS, BA e CA) de capim-guinea, cultivados sob condição de casa de vegetação. Dados obtidos em plantas colhidas aos 45 dias pós o plantio. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os materiais.

## 5.6 Carboidratos solúveis totais e carboidratos totais

Neste trabalho, definiu-se como carboidratos solúveis totais o somatório dos teores de sacarose, açúcares redutores, glicose e frutose (Figura 19A). O ecótipo Assaré e a cultivar Tanzânia apresentaram os maiores teores de carboidratos solúveis, em média duas vezes superiores os de Barbalha.

Os carboidratos totais foram definidos como a soma dos carboidratos solúveis, amido e celulose (Figura 19B). Verificou-se que os maiores valores para carboidratos totais foram encontrados na cultivar Tanzânia. As cultivares Mombaça e Aruana não diferiram estatisticamente de Tanzânia, como também não houve diferenças com Caririaçu. Por outro lado, o ecótipo Assaré apresentou os menores valores em açúcares totais, sendo estes de aproximadamente pouco menos da metade dos teores de Tanzânia.

Figura 19 – Teores de carboidratos solúveis totais carboidratos totais



Fonte: dados da pesquisa (2019). Carboidratos totais (somatório) em cultivares (AR, MO e TA) e ecótipos (AS, BA e CA) de capim-guineá, cultivados sob condição de casa de vegetação. Dados obtidos de plantas com 45 dias de cultivo. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas.

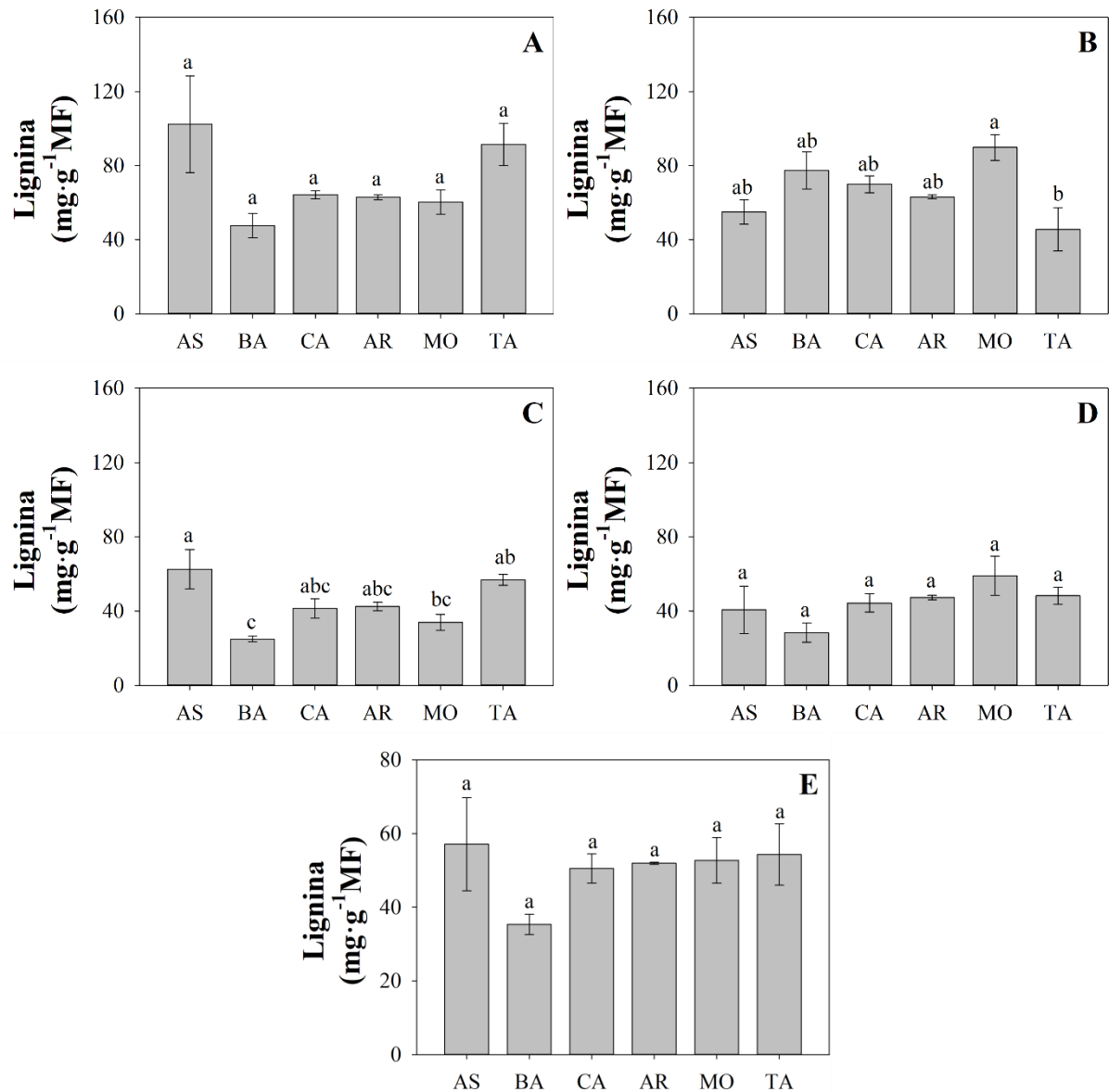
## 5.7 Lignina

Não foram encontradas diferenças significativas nas frações de lignina de limbos primários (Figura 20A). Nos limbos secundários (Figura 20B), observou-se diferenças significativas apenas nas cultivares Mombaça e Tanzânia, sendo que a primeira apresentou teores até 2,8 vezes maiores. O ecótipo Barbalha apresentou a menor quantidade de lignina nos tecidos de colmos primários (Figura 20C). No entanto, não foram encontradas diferenças significativas com Caririaçu, Aruana e Mombaça. Nos colmos secundários (Figura 20D) e em toda parte aérea (Figura 20E) não houve diferenciação entre os materiais.

Como a análise de lignina foi realizada sobre a massa seca das amostras, foi possível calcular os teores também em função desta massa seca (MS). Enquanto nos limbos primários (Figura 21A) o ecótipo Caririaçu apresentou teores até 0,25 vezes menor que a cultivar Tanzânia, nos secundários (Figura 21B) não houve diferença significativa entre os materiais. Nos colmos primários (Figura 21C), o ecótipo Caririaçu mostrou teores até 0,25 vezes menor Mombaça. Em colmos secundários (Figura 21D), os ecótipos Barbalha e Caririaçu apresentaram teores até 0,23 vezes menor que os demais. Quando considerada toda

a parte aérea (Figura 21E), os ecótipos Barbalha e Caririaçu mostraram os menores valores para o teor de lignina, em até 0,20 vezes menor que os demais.

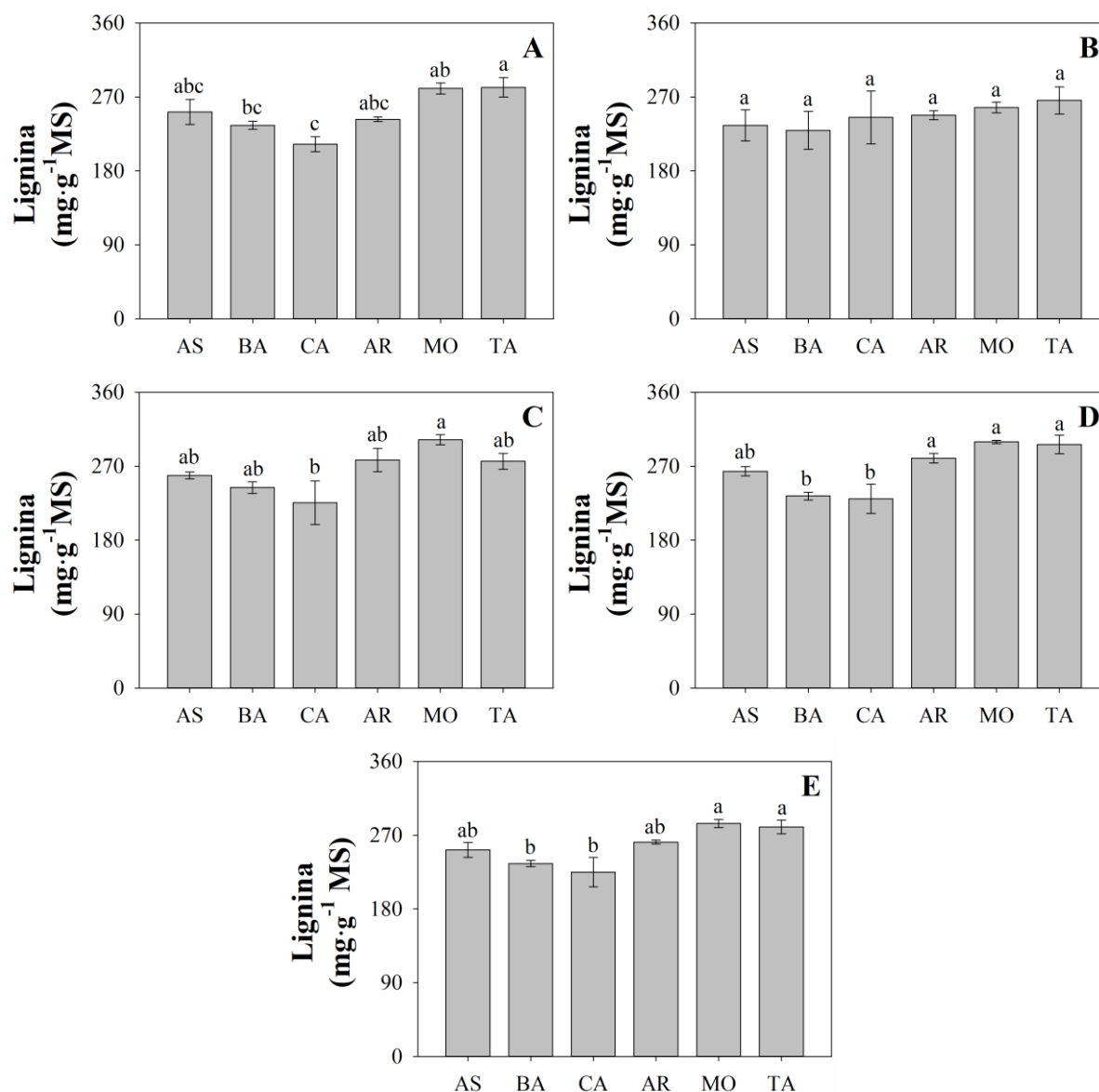
Figura 20 – Teores de lignina em função da massa fresca das amostras



Fonte: dados da pesquisa (2019). Teores de lignina (massa fresca) em limbos primários (A), limbos secundários (B), colmos primários (C), colmos secundários (D) parte aérea da planta (E), em cultivares (AR, MO e TA) e ecótipos (AS, BA e CA) de capim-guineá, cultivados sob condição de casa de vegetação. Dados obtidos em plantas colhidas aos 45 dias pós o plantio. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os materiais.



Figura 21 – Teores de lignina em função da massa seca das amostras



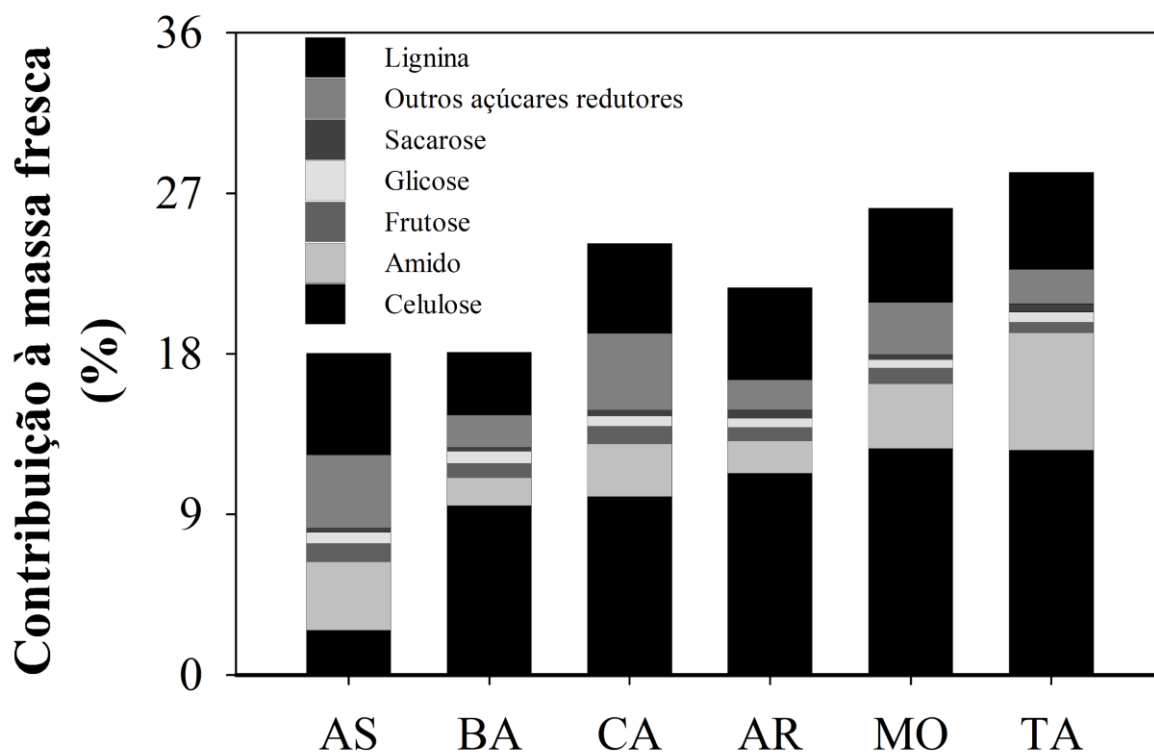
Fonte: dados da pesquisa (2019). Teores de lignina (massa seca) em limbos primários (A), limbos secundários (B), colmos primários (C), colmos secundários (D) parte aérea da planta (E), em cultivares (AR, MO e TA) e ecótipos (AS, BA e CA) de capim-guineia, cultivados sob condição de casa de vegetação. Dados obtidos em plantas colhidas aos 45 dias pós o plantio. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os materiais.

## 5.8 Contribuição de carboidratos e lignina para a biomassa

Analisou-se as contribuições dos açúcares e lignina à biomassa da parte aérea (Figura 22). Foi notado que, à exceção do ecótipo Assaré, a celulose contribuiu maioritariamente ao teor de carboidratos totais, com média de 11,1% na biomassa fresca. Contrariamente, a contribuição deste polissacarídeo na biomassa de Assaré foi apenas de 2,5%. Neste ecótipo, os açúcares solúveis e amido foram preponderantes para a biomassa

fresca total, apresentando contribuições de até 9,8%, valor estatisticamente igual aos do ecótipo Caririaçu e das cultivares Mombaça e Tanzânia. Comparativamente, os valores das contribuições para o ecótipo Barbalha e a cultivar Aruana são aproximadamente metade daquelas do ecótipo Assaré.

Figura 22 – Percentuais de açúcares e lignina na biomassa



Fonte: dados da pesquisa (2020). Contribuição de açúcares e lignina para a biomassa fresca, em cultivares (AR, MO e TA) e ecótipos (AS, BA e CA) de capim-guinea, cultivados sob condição de casa de vegetação. Dados obtidos em plantas colhidas aos 45 dias de cultivo.

## 6 DISCUSSÃO

O acúmulo de biomassa nas plantas segue um padrão sigmoidal, no qual inicialmente observa-se um crescimento exponencial, seguida por uma fase de acúmulo linear e, por fim, uma fase de incrementos decrescentes (GOMIDE; GOMIDE; ALEXANDRINO, 2003). Diversos fatores ambientais e de manejo definem o acúmulo de biomassa (CHAPMAN; LEMAIRE, 1993), e a análise de crescimento permite quantificar este balanço em determinado momento ou intervalo de tempo de interesse (BEADLE, 1993).

Neste trabalho, a densidade populacional de perfilhos ficou, em média, na faixa de 1,4–3,2 perfilhos·planta<sup>-1</sup> para todo o período de cultivo. Tem sido encontradas valores para a densidade populacional de perfilhos em capim-guinea que variam de 5 a 10 perfilhos·planta<sup>-1</sup> para períodos de cultivo entre 32 e 41 dias (BARBOSA *et al.*, 2002; GOMIDE; GOMIDE; ALEXANDRINO, 2003; SILVA *et al.*, 2016). Ainda que valores de densidade populacional de perfilhos dos ecótipos e cultivares aqui estudados foi menor que aqueles encontrados na literatura, sabe-se que o perfilhamento em gramíneas é um processo contínuo e amplamente influenciado por uma combinação de fatores nutricionais, de manejo e ambientais (GARCEZ NETO *et al.*, 2002). Assim, as diferenças nas metodologias adotadas nestes diversos trabalhos podem contribuir fortemente na determinação das respostas para este parâmetro morfológico, ainda que para uma mesma espécie vegetal.

O comprimento médio dos limbos foliares variou entre 38–78 cm, neste trabalho, dentro da faixa de 30–85 cm de comprimento que têm sido determinados para cultivares de capim-guinea (GOMIDE; GOMIDE, 1999, 2000; GOMIDE; GOMIDE; ALEXANDRINO, 2003; SILVA *et al.*, 2016). Os valores de largura do limbo foliar aqui encontrados, entre 1,4–3,3 cm, também se encontram dentro da faixa de valores característicos para a espécie, entre 0,7–4,7 cm (JANK *et al.*, 2008). Embora os parâmetros morfofisiológicos de lâminas foliares tenham sido usados para distinguir genótipos (GOMES *et al.*, 2011), no presente trabalho, estes revelaram poucas diferenças entre os materiais analisados. Possivelmente, uma diferença mais significativa advenha da densidade de folhas por planta, parâmetro não analisado neste trabalho, mas muito comum em análises de crescimento vegetal em estudos já publicados. Este raciocínio ajuda a explicar, ao menos parcialmente, por que o ecótipo Caririaçu, mesmo tendo apresentado o menor desempenho morfofisiológico aos 90 dias de cultivo, obteve acúmulo de biomassa estatisticamente igual à maioria dos materiais estudados.

A biomassa, por sua vez, é o critério primário para a seleção de culturas com potencial na produção de etanol. Para este fim, gramíneas como milho, capim-elefante e

*Panicum virgatum* L. têm sido as espécies mais empregadas devido a sua alta biomassa (ZABED *et al.*, 2017). Neste trabalho, diferenças no acúmulo de biomassa total foram evidenciadas a partir dos 90 dias destacando-se o ecótipo Assaré e a cultivar Tanzânia (Figura 12). As biomassas acumuladas nestes materiais foram significativamente maiores do que a cultivar Aruana, porém estatisticamente iguais aos outros materiais. Estudos mostram que a biomassa se acumula de forma quase linear em plantas de capim-guinea, no período de 30 a 90 dias de cultivo (FRANÇA *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2015; STABILE *et al.*, 2010). Ainda, mostram que as cultivares Mombaça e Tanzânia não diferem significativamente quanto ao acúmulo de biomassa, em cada período analisado. Os dados, em princípio, sugerem que os ecótipos caririenses podem ser matérias-primas promissoras para a produção de etanol, tendo em vista que não diferem estatisticamente das cultivares Mombaça e Tanzânia em relação ao acúmulo de biomassa e que maior biomassa está diretamente relacionada com um maior conteúdo de açúcares. A cultivar Aruana, por outro lado, não seria uma cultivar apropriada para estes fins, devido também a seu pequeno porte. Estas avaliações merecem um tratamento mais aprofundado para estabelecer diferenças genótípicas entre os materiais estudados.

Os açúcares solúveis aqui analisados são de grande importância como substratos para o processo fermentativo, embora sua contribuição para a produção de álcool de segunda geração seja relativamente menor quando comparado a polissacarídeos como celulose. No entanto, estudos de composição química da biomassa geralmente reportam teores em função da massa seca, o que dificulta a comparação direta com os teores obtidos neste trabalho, que foram calculados em função da massa fresca. Logo, para possibilitar a comparação, foram realizados ajustes nos teores reportados em outros estudos, baseando-se no percentual médio de massa seca (21%) das cultivares aqui analisadas na quantificação de lignina, seguindo a fórmula:

$$Teor(MF) = Teor(MS) \times 0,21 \quad (2)$$

Em gramíneas como cana-de-açúcar e sorgo sacarino, os açúcares sacarose, frutose e glicose presentes no suco (uma fração diferente da fração lignocelulósica) podem ser prontamente usados como substratos por *Sacharomyces cerevisiae* e fermentados a etanol (KIM; DAY, 2011). Segundo estes mesmos autores, o suco deve ter uma proporção alta de monossacarídeos em relação à sacarose para seu uso como matéria-prima de etanol. Neste trabalho, todas as cultivares apresentaram uma alta proporção de monossacarídeos para sacarose quando analisados os conteúdos totais na parte aérea, destacando-se o ecótipo Assaré e a cultivar Tanzânia

Neste trabalho, os teores de açúcares redutores se encontraram na faixa de 15–41 mg g<sup>-1</sup>MF, enquanto os reportados variam entre 3,8–12 mg·g<sup>-1</sup>MF (APROBATO, 2015; LIMA *et al.*, 2014). É interessante salientar que esta maior proporção se deva a outros açúcares diferentes da glicose e frutose (Figura 14). O incremento na biomassa, e conseqüentemente nos componentes da parede celular (Seção 2.2.2), necessita de um fornecimento contínuo dos principais monossacarídeos constituintes (glicose, xilose, arabinose, galactose). De fato, análises dos principais constituintes das hemiceluloses do capim-guinea mostraram altas proporções destes monossacarídeos (LIMA *et al.*, 2014); outros estudos mostraram teores aumentados dos açúcares redutores arabinose, galactose, inositol, xilitol, treitol, e especialmente melibiose e xilose, em plantas de capim-guinea cultivadas sob temperatura ambiente acima de 30 °C (DE ASSIS PRADO *et al.*, 2016; WEDOW *et al.*, 2019). Segundo os mesmos autores, os teores elevados de melibiose e xilose, nas plantas expostas a altas temperaturas, sugerem que estes carboidratos atuam como reguladores osmóticos, em resposta a ambientes de elevada temperatura e baixa disponibilidade hídrica. Ainda, plantas sob estresse abiótico fazem uso de moléculas com baixo peso molecular, como os açúcares redutores, para regular a atividade osmótica (DU *et al.*, 2011; GALL *et al.*, 2015; KAPLAN *et al.*, 2004; RIZHSKY *et al.*, 2004; WAHID *et al.*, 2007; WEDOW *et al.*, 2019). O ecótipo Assaré apresentou os maiores teores de açúcares solúveis entre os ecótipos estudados (Figura 19A), e foi coletado de uma região de clima tropical quente semiárido, caracterizado por baixa disponibilidade hídrica em boa parte do ciclo anual e por temperaturas elevadas, sugerindo que este ecótipo faz uso destes metabólitos como mecanismo de adaptação ao ambiente. Sabe-se também que glicose e frutose são utilizadas na manutenção energética das atividades celulares e metabólicas, necessitando a mobilização de carbono para os tecidos heterotróficos (Seção 2.1), que se dá na forma de sacarose, um dissacarídeo de glicose e frutose. Logo, todos estes fatores podem justificar os altos teores transientes de outros açúcares redutores, que não glicose e frutose, encontrados neste trabalho.

Os teores de carboidratos solúveis totais encontrados neste estudo se encontram dentro da faixa que tem sido relatada, entre 4,2–51 mg·g<sup>-1</sup>MF (APROBATO, 2015; CALDEIRA, 2016; GOMES *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2014; VELÁSQUEZ *et al.*, 2010). Contrariamente, alguns autores consideram que matérias-primas com quantidades significativamente altas de açúcares solúveis não significa que sejam adequadas para a produção de álcool, pois estes podem ser extraídos durante os pré-tratamentos com ácidos diluídos (DIEN *et al.*, 2006, 2009; JACKSON DE MORAES ROCHA *et al.*, 2011). No entanto, estes mesmos autores afirmam que a extração dos carboidratos solúveis previamente

à hidrólise da biomassa, típica de um processo de produção de etanol de primeira geração (Figura 7A), pode ser uma alternativa viável para o aproveitamento destes carboidratos à produção deste biocombustível.

Embora o amido não seja considerado em análises que visam entender o valor de culturas ou plantas como fonte de etanol de segunda geração, este pode ter uma contribuição significativa ao teor de açúcares fermentáveis, porém menor que os açúcares solúveis (DIEN *et al.*, 2009). Nas cultivares e ecótipos de capim-guinea aqui estudados, observou-se que a maioria seguiu esse padrão; contudo, verificou-se que a cultivar Tanzânia apresentou um valor bastante próximo ao seu teor observado em açúcares solúveis, não sendo desprezível, portanto, seu aproveitamento como fonte de etanol.

A celulose é o principal polissacarídeo encontrado na fração lignocelulósica que pode ser usado como fonte de energia renovável. Estudos que avaliaram a contribuição da celulose para a biomassa de capim-guinea encontraram valores entre 84–210 mg·g<sup>-1</sup>MF (JANK *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2014). Verificou-se uma contribuição semelhante deste polissacarídeo ao total de açúcares fermentáveis para os materiais estudados neste trabalho, sendo maior quando comparados com os açúcares solúveis. Nossos dados mostram que a cultivar Assaré apresenta teores relativamente baixos em todos os tecidos aéreos, quando comparado aos outros materiais testados (Figura 18). De acordo com alguns autores, o conteúdo de celulose pode ser afetado pela idade da planta e condições de cultivo como também pelo estresse hídrico e térmico (GALL *et al.*, 2015; WANG; MCFARLANE; PERSSON, 2016), o que pode ter determinada a fixação desta característica adaptativa no ecótipo Assaré. Em decorrência disto, esta cultivar não seria uma matéria-prima adequada para a produção de etanol de segunda geração, ainda que apresente elevados teores de açúcares solúveis.

A lignina é o componente da biomassa que mantém unidos os outros componentes da parede celular, influenciando no acesso às microfibrilas de celulose pelas enzimas digestivas. É consenso que matérias-primas lignocelulósicas para a produção de etanol devem ser tratadas para diminuir teores deste polímero (AGBOR *et al.*, 2011; BALAT, 2011; BERNIER-OVIEDO *et al.*, 2018; DIEN *et al.*, 2009; DOS SANTOS *et al.*, 2016; HOOD *et al.*, 2011; IOELOVICH, 2015; JACKSON DE MORAES ROCHA *et al.*, 2011; LI; WENG; CHAPPLE, 2008; MOHAPATRA *et al.*, 2017; SCORDIA *et al.*, 2018; VERARDI; DE BARI, 2012). Logo, materiais que naturalmente possuam menores teores de lignina se tornam vantajosos. Estudos mostram que o capim-guinea apresenta teores de lignina na faixa de 290–350 g·g<sup>-1</sup>MS (APROBATO, 2015; BRÂNCIO *et al.*, 2002; GOMES *et al.*, 2011; JANK *et al.*,

2013; LIMA *et al.*, 2014; STABILE *et al.*, 2010). No presente trabalho, não se encontraram diferenças entre os materiais estudados a respeito do teor de lignina quando expressados em função da massa fresca (Figura 20). Contudo, observou-se que estes foram menores nos ecótipos Barbalha e Caririaçu, com teores entre 225 e 236  $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MS}$ , em relação a Mombaça e Tanzânia, com teores entre 280–284  $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MS}$  (Figura 21). Isto sugere que os ecótipos possuem uma característica que pode ser aproveitada em programas de melhoramento que visam o aumento do rendimento na produção de etanol.

Nossos resultados, portanto, sugerem que todas as cultivares melhoradas apresentam teores altos de açúcares fermentáveis, e apenas o ecótipo Caririaçu apresentou esta característica, o que pode ser de relevância para a produção de etanol. É importante salientar que os resultados apresentados foram obtidos em plantas com 45 dias de cultivo, tempo no qual, não houve diferenças de crescimento entre as cultivares analisadas. Se este padrão de acúmulo de açúcares se mantiver em plantas com maior idade (por exemplo, 90 dias de idade), as cultivares Mombaça e Tanzânia e o ecótipo Caririaçu podem ser consideradas boas fontes de matéria-prima para a produção de etanol, devido a sua alta produção de biomassa (Figura 11E).

## 7 CONCLUSÕES

1. A cultivar Tanzânia destacou-se dentro das cultivares analisadas, tanto na quantidade de biomassa produzida quanto nos teores de carboidratos.

2. O ecótipo Assaré possui bom acúmulo de biomassa, porém os carboidratos fermentáveis são principalmente os solúveis, em detrimento da celulose.

3. Os ecótipos cearense apresentam menores teores de lignina do que nas cultivares melhoradas, podendo serem utilizadas em programas de melhoramento visando a produção de etanol.

4. Dentre os ecótipos, Caririaçu caracteriza-se pelo seu alto conteúdo em carboidratos, baixo teor de lignina e adequado crescimento, apresentando potencial como matéria-prima na produção de etanol.

5. As cultivares Mombaça e Tanzânia também mostraram potencial para produção de etanol de segunda geração ao apresentarem elevados níveis de carboidratos totais



## REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A. K.; PANDEY, A.; GUPTA, A. K.; AGGARWAL, S. K.; KUSHARI, A. (EDS.). **Novel Combustion Concepts for Sustainable Energy Development**. New Delhi: Springer India, 2014.
- AGBOR, V. B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D. B. **Biomass pretreatment**: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*, v. 29, n. 6, p. 675–685, 2011.
- APROBATO, A. U. **Análises fisiológicas e bioquímicas da forrageira tropical *Panicum maximum* Jacq. (Poaceae) cultivada em elevado CO<sub>2</sub> atmosférico e aquecimento**. 2015. Tese (Doutorado em Ciências) – FFCLRP – DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.
- BALAT, M. **Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway**: A review. *Energy Conversion and Management*, v. 52, n. 2, p. 858–875, 2011.
- BARBOSA, R. A.; DO NASCIMENTO, D.; EUCLIDES, V. P. B.; REGAZZI, A. J.; DA FONSECA, D. M. **Características morfogênicas e acúmulo de forragem do capim-tanzânia (*Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia) em dois resíduos forrageiros pós-pastejo**. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 31, n. 2, p. 583–593, 2002.
- BEADLE, C. L. Growth analysis. *In*: HALL, D. O.; SCURLOCK, J. M. O.; BOLHÀR-NORDENKAMPF, H. R.; LEEGOOD, R. C.; LONG, S. P. (Eds.). **Photosynthesis and Production in a Changing Environment**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1993. p. 36–46.
- BENSON, A. A.; CALVIN, M. **Carbon Dioxide Fixation By Green Plants**. *Annual Review of Plant Physiology*, v. 1, n. 1, p. 25–42, 1950.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; GATTO, G. J.; STRYER, L. **Biochemistry**. 8. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2015.
- BERNIER-OVIEDO, D. J.; RINCÓN-MORENO, J. A.; SOLANILLA-DUQUÉ, J. F.; MUÑOZ-HERNÁNDEZ, J. A.; VÁQUIRO-HERRERA, H. A. **Comparison of two pretreatments methods to produce second-generation bioethanol resulting from sugarcane bagasse**. *Industrial Crops and Products*, v. 122, n. November 2017, p. 414–421, 2018.
- BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. **LIGNIN BIOSYNTHESIS**. *Annual Review of Plant Biology*, v. 54, n. 1, p. 519–546, 2003.
- BRÂNCIO, P. A.; JUNIOR, D. do N.; EUCLIDES, V. P. B.; REGAZZI, A. J.; ALMEIDA, R. G.; FONSECA, D. M.; BARBOSA, R. A. **Avaliação de Três Cultivares de *Panicum maximum* Jacq. sob Pastejo**. *Composição Química e Digestibilidade da Forragem*. *R. Bras. Zootec.*, v. 31, n. 4, p. 1605–1613, 2002.
- CALDEIRA, R. R. **AValiaÇÃO DA PRODUÇÃO E DA QUALIDADE DO CAPIM PANICUM MAXIMUM CV. MASSAI**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais)

– Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

CHAPMAN, D. F.; LEMAIRE, G. Morphogenetic and structural determinants of plant regrowth after defoliation. *In*: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS 1993, Australia. **Anais [...]**. Australia: 2003.

CHIANG, B.-Y.; JOHNSON, J. A. **Measurement of Total and Gelatinized Starch by Glucoamylase and o-Toluidine Reagent**. *Cereal Chem*, v. 3, n. 54, p. 429–435, 1977.

DE ASSIS PRADO, C. H. B.; DE CAMARGO-BORTOLIN, L. H. G.; CASTRO, É.; MARTINEZ, C. A. **Leaf Dynamics of Panicum maximum under Future Climatic Changes**. *PLoS ONE*, v. 11, n. 2, p. 1–17, 2016.

DIEN, B. S.; JUNG, H. J. G.; VOGEL, K. P.; CASLER, M. D.; LAMB, J. A. F. S.; ITEN, L.; MITCHELL, R. B.; SARATH, G. **Chemical composition and response to dilute-acid pretreatment and enzymatic saccharification of alfalfa, reed canarygrass, and switchgrass**. *Biomass and Bioenergy*, v. 30, n. 10, p. 880–891, 2006.

DIEN, B. S.; SARATH, G.; PEDERSEN, J. F.; SATTLER, S. E.; CHEN, H.; FUNNELL-HARRIS, D. L.; NICHOLS, N. N.; COTTA, M. A. **Improved sugar conversion and ethanol yield for forage sorghum (sorghum bicolor L. Moench) lines with reduced lignin contents**. *Bioenergy Research*, v. 2, n. 3, p. 153–164, 2009.

DOS SANTOS, L. V.; DE BARROS GRASSI, M. C.; GALLARDO, J. C. M.; PIROLLA, R. A. S.; CALDERÓN, L. L.; DE CARVALHO-NETTO, O. V.; PARREIRAS, L. S.; CAMARGO, E. L. O.; DREZZA, A. L.; MISSAWA, S. K.; TEIXEIRA, G. S.; LUNARDI, I.; BRESSIANI, J.; PEREIRA, G. A. G. **Second-Generation Ethanol: The Need is Becoming a Reality**. *Industrial Biotechnology*, v. 12, n. 1, p. 40–57, 2016.

DU, H.; WANG, Z.; YU, W.; LIU, Y.; HUANG, B. **Differential metabolic responses of perennial grass Cynodon transvaalensis×Cynodon dactylon (C4) and Poa Pratensis (C3) to heat stress**. *Physiologia Plantarum*, v. 141, n. 3, p. 251–264, 2011.

EISENTRAUT, A. **Sustainable Production of Second-Generation Biofuels**. Paris: OECD Publishing, 2010.

ELLIS, R. J. **The most abundant protein in the world**. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 4, n. 11, p. 241–244, 1979.

FRANÇA, A. F. S.; BORJAS, A. D. R.; OLIVEIRA, E. R.; SOARES, T. V.; MIYAGI, E. S.; SOUSA, V. R. **PARÂMETROS NUTRICIONAIS DO CAPIM-TANZÂNIA SOB DOSES CRESCENTES DE NITROGÊNIO EM DIFERENTES IDADES DE CORTE**. *Ciência Animal Brasileira*, v. 8, n. 4, p. 695–703, 2007.

GALL, H.; PHILIPPE, F.; DOMON, J.-M.; GILLET, F.; PELLOUX, J.; RAYON, C. **Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress**. *Plants*, v. 4, n. 1, p. 112–166, 2015.

GARCEZ NETO, A. F.; DO NASCIMENTO, D.; REGAZZI, A. J.; DA FONSECA, D. M.; MOSQUIM, P. R.; GOBBI, K. F. **Respostas morfogênicas e estruturais de Panicum maximum cv. Mombaça sob diferentes níveis de adubação nitrogenada e alturas de corte**.

Revista Brasileira de Zootecnia, v. 31, n. 5, p. 1890–1900, 2002.

GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY (GBIF). *Panicum maximum* Jacq. 2017. Disponível em: <<https://www.gbif.org/species/2705868>>. Acesso em: 3 maio. 2018.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. **Hemicelluloses for fuel ethanol: A review**. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, 2010.

GOMES, D. I.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. de C.; FUKUSHIMA, R. S.; DE SOUZA, M. A.; VALENTE, T. N. P.; PAULINO, M. F.; DE QUEIROZ, A. C. **Evaluation of lignin contents in tropical forages using different analytical methods and their correlations with degradation of insoluble fiber**. *Animal Feed Science and Technology*, v. 168, n. 3–4, p. 206–222, 2011.

GOMIDE, C. A. D. M.; GOMIDE, J. A. **Análise de Crescimento de Cultivares de *Panicum maximum* Jacq.** *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 28, n. 4, p. 675–680, 1999.

GOMIDE, C. A. de M.; GOMIDE, J. A.; ALEXANDRINO, E. **Índices morfogênicos e de crescimento durante o estabelecimento e a rebrotação do capim-mombaça (*Panicum maximum* Jacq.)**. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 32, n. 4, p. 795–803, 2003.

GOMIDE, C. A. M.; GOMIDE, J. A. **Morfogênese de cultivares de *Panicum maximum* jacq.** *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 29, n. 2, p. 341–348, 2000.

HALFORD, N. G.; CURTIS, T. Y.; MUTTUCUMARU, N.; POSTLES, J.; MOTTRAM, D. S. **Sugars in crop plants**. *Annals of Applied Biology*, v. 158, n. 1, p. 1–25, 2011.

HELDT, H. W.; PIECHULLA, B.; HELDT, F. **Plant Biochemistry**. 4.ed. Tradução da quarta edição alemã. London: Academic Press, 2011.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil. Circular**. California Agricultural Experiment Station, v. 347, n. 2, 32 pp., 1950.

HOOD, E. E.; NELSON, P.; POWELL, R.; KUMAR KHANAL, S. **Plant Biomass Conversion**. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2011.

IGLESIAS, A. A.; PODESTÁ, F. E. Photosynthate Formation and Partitioning in Crop Plants. *In: PESSARAKLI, M. (Ed.). Handbook of Photosynthesis*. 2. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2005. p. 524–544.

IGLESIAS, A. A.; PODESTÁ, F. E.; ANDREO, C. S. Structural and regulatory properties of the enzymes involved in C3, C4 and CAM pathways for photosynthetic carbon assimilation. *In: PESSARAKLI, M. (Ed.). Handbook of Photosynthesis*. New York, NY: Marcel Dekker, 1997. p. 481–503.

IOELOVICH, M. **Recent findings and the energetic potential of plant biomass as a renewable source of biofuels - A review**. *BioResources*, v. 10, n. 1, p. 1879–1914, 2015.

JACKSON DE MORAES ROCHA, G.; MARTIN, C.; SOARES, I. B.; SOUTO MAIOR, A.

- M.; BAUDEL, H. M.; MORAES DE ABREU, C. A. **Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production.** *Biomass and Bioenergy*, v. 35, n. 1, p. 663–670, 2011.
- JANK, L.; LIMA, E. A. De; SIMEÃO, R. M.; ANDRADE, R. C. **Potential of Panicum maximum as a source of energy.** *Tropical Grasslands – Forrajes Tropicales*, v. 1, p. 92–94, 2013.
- JANK, L.; RESENDE, R. M. S.; VALLE, C. B. Do; RESENDE, M. D. V.; CHIARI, L.; CANÇADO, L. J.; SIMIONI, C. Melhoramento genético de Panicum maximum. *In: RESENDE, R. M. S.; JANK, L.; VALLE, C. B. Do (Eds.). Melhoramento de Forrageiras Tropicais.* Campo Grande - MS: Embrapa Gado de Corte, 2008. p. 55–87.
- JONKER, J. G. G.; VAN DER HILST, F.; JUNGINGER, H. M.; CAVALETT, O.; CHAGAS, M. F.; FAAIJ, A. P. C. **Outlook for ethanol production costs in Brazil up to 2030, for different biomass crops and industrial technologies.** *APPLIED ENERGY*, v. 147, p. 593–610, 2015.
- KAPLAN, F.; KOPKA, J.; HASKELL, D. W.; ZHAO, W.; SCHILLER, K. C.; GATZKE, N.; SUNG, D. Y.; GUY, C. L. **Exploring the Temperature-Stress Metabolome of Arabidopsis.** *Plant Physiology*, v. 136, n. 4, p. 4159 LP – 4168, 2004.
- KIM, M.; DAY, D. F. **Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 38, n. 7, p. 803–807, 2011.
- KOCH, K. **Sucrose metabolism: Regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development.** *Current Opinion in Plant Biology*, v. 7, n. 3, p. 235–246, 2004.
- LALONDE, S.; WIPF, D.; FROMMER, W. B. **TRANSPORT MECHANISMS FOR ORGANIC FORMS OF CARBON AND NITROGEN BETWEEN SOURCE AND SINK.** *Annual Review of Plant Biology*, v. 55, n. 1, p. 341–372, 2004.
- LI, S.; BASHLINE, L.; LEI, L.; GU, Y. **Cellulose Synthesis and Its Regulation.** *The Arabidopsis Book*, v. 12, p. e0169, 2014.
- LI, X.; WENG, J. K.; CHAPPLE, C. **Improvement of biomass through lignin modification.** *Plant Journal*, v. 54, n. 4, p. 569–581, 2008.
- LIMA, M. A.; GOMEZ, L. D.; STEELE-KING, C. G.; SIMISTER, R.; BERNARDINELLI, O. D.; CARVALHO, M. A.; REZENDE, C. A.; LABATE, C. A.; DEAZEVEDO, E. R.; MCQUEEN-MASON, S. J.; POLIKARPOV, I. **Evaluating the composition and processing potential of novel sources of Brazilian biomass for sustainable biorenewables production.** *Biotechnology for Biofuels*, v. 7, n. 1, p. 1–19, 2014.
- LOPES, M. L.; PAULILLO, S. C. de L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R. A.; LORENZI, M. S.; GIOMETTI, F. H. C.; BERNARDINO, C. D.; DE AMORIM NETO, H. B.; DE AMORIM, H. V. **Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry.** *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 47, p. 64–76, 2016.

MACHADO, L. A. Z.; LEMPP, B.; VALLE, C. B. Do; JANK, L.; BATISTA, L. A. R.; POSTIGLIONI, S. R.; RESENDE, R. M. S.; FERNANDES, C. D.; VERZIGNASSI, J. R.; VALENTIM, J. F.; ASSIS, G. M. L. De; ANDRADE, C. M. S. De. **Principais espécies forrageiras utilizadas em pastagens para gado de corte.** *In:* PIRES, A. V. (Ed.). *Bovinocultura de corte.* Piracicaba: FEALQ, 2010. p. 375–417.

MALDONADE, I. R.; CARVALHO, P. G. B.; FERREIRA, N. A.; MOULIN, B. S. F. **Comunicado Técnico 86:** Protocolo para determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2013.

MARTIN, C.; SMITH, A. M. **Starch biosynthesis.** *Plant Cell*, v. 7, n. 7, p. 971–985, 1995.

MCFARLANE, H. E.; DÖRING, A.; PERSSON, S. **The Cell Biology of Cellulose Synthesis.** *Annual Review of Plant Biology*, v. 65, n. 1, p. 69–94, 2014.

MEDEIROS, C. N. De; PONTES, L. M. V. De; ARAGÃO, M. C. A. De; ALMEIDA, N. C. De. **Tipos climáticos do Estado do Ceará.** 2007. Disponível em: <<http://www2.ipece.ce.gov.br/atlas/capitulo1/12/126.htm>>. Acesso em: 17 maio. 2018.

MOHAPATRA, S.; MISHRA, C.; BEHERA, S. S.; THATOI, H. **Application of pretreatment, fermentation and molecular techniques for enhancing bioethanol production from grass biomass – A review.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 78, n. November 2016, p. 1007–1032, 2017.

MOREIRA-VILAR, F. C.; SIQUEIRA-SOARES, R. D. C.; FINGER-TEIXEIRA, A.; DE OLIVEIRA, D. M.; FERRO, A. P.; DA ROCHA, G. J.; FERRARESE, M. D. L. L.; DOS SANTOS, W. D.; FERRARESE-FILHO, O. **The acetyl bromide method is faster, simpler and presents best recovery of lignin in different herbaceous tissues than klason and thioglycolic acid methods.** *PLoS ONE*, v. 9, n. 10, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger.** 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

PIATTONI, C. V.; FIGUEROA, C. M.; PEROTTI, V. P.; PODESTÁ, F. E.; IGLESIAS, A. *In:* Pessarakli, M (org.). **Handbook of Plant and Crop Physiology.** 3. Ed. Boca Raton: CRC Press, 2014.

PORTIS, A. R. Photosynthetic Carbon Metabolism. *In:* **Encyclopedia of Life Sciences.** Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2001.

RIZHSKY, L.; LIANG, H.; SHUMAN, J.; SHULAEV, V.; DAVLETOVA, S.; MITTLER, R. **When Defense Pathways Collide. The Response of Arabidopsis to a Combination of Drought and Heat Stress.** *Plant Physiology*, v. 134, n. 4, p. 1683 LP – 1696, 2004.

RODRIGUES, A. C.; GARCEZ, B. S.; ALVES, A. A.; SOUZA, L. G. da C.; CARVALHO, L. F. De; ARAÚJO, D. L. da C.; LACERDA, M. da S. B.; SILVA, R. N. P. Da. Composição química de gramíneas do gênero *Panicum* em três idades de pós-rebrota. *In:* X CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL, 2015, **Anais [...]** Teresina: 2015.

ROE, J. H. **A COLORIMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF**

**FRUCTOSE IN BLOOD AND URINE.** J. Biol. Chem, n. 107, p. 15–22, 1934.

ROSE, R.; ROSE, C. L.; OMI, S. K.; FORRY, K. R.; DURALL, D. M.; BIGG, W. L. **Starch determination by perchloric acid vs enzymes: evaluating the accuracy and precision of six colorimetric methods.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 39, n. 1, p. 2–11, 1991.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Fisiologia das plantas.** 1. ed. [s.l.] : Cengage Learning, 2012.

SHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. **Hemicelluloses.** Annual Review of Plant Biology, v. 61, n. 1, p. 263–289, 2010.

SCHMER, M. R.; VOGEL, K. P.; VARVEL, G. E.; FOLLETT, R. F.; MITCHELL, R. B.; JIN, V. L. **Energy potential and greenhouse gas emissions from bioenergy cropping systems on marginally productive cropland.** PLoS ONE, v. 9, n. 3, 2014.

SCHÖLER, A.; SCHÜLLER, H.-J. **A carbon source-responsive promoter element necessary for activation of the isocitrate lyase gene ICL1 is common to genes of the gluconeogenic pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** Molecular and cellular biology, v. 14, n. 6, p. 3613–3622, 1994.

SCORDIA, D.; TESTA, G.; VAN DAM, J. E. G.; VAN DEN BERG, D. **Perennial Grasses for Bioenergy and Bioproducts Suitability of Perennial Grasses for Energy and Nonenergy Products.** Perennial Grasses for Bioenergy and Bioproducts, p. 217–244, 2018.

SILVA, J. de L.; RIBEIRO, K. G.; HERCULANO, B. N.; PEREIRA, O. G.; PEREIRA, R. C.; SOARES, L. F. P. **Massa de forragem e características estruturais e bromatológicas de cultivares de *Brachiaria* e *Panicum*.** Ciencia Animal Brasileira, v. 17, n. 3, p. 342–348, 2016.

SOLOMON, B. D. **Biofuels and sustainability.** Annals of the New York Academy of Sciences, v. 1185, p. 119–134, 2010.

STABILE, S. dos S.; SALAZAR, D. R.; JANK, L.; RENNÓ, F. P.; SILVA, L. F. P. **Características de produção e qualidade nutricional de genótipos de capim-colonião colhidos em três estádios de maturidade.** Revista Brasileira de Zootecnia, v. 39, n. 7, p. 1418–1428, 2010.

STITT, M.; ZEEMAN, S. C. **Starch turnover: Pathways, regulation and role in growth.** Current Opinion in Plant Biology, v. 15, n. 3, p. 282–292, 2012.

THARANATHAN, R. N.; MURALIKRISHNA, G.; SALIMATH, P. V; RAGHAVENDRA RAO, M. R. **Plant carbohydrates--An overview.** Proc. Indian Acad. Sci. (Plant Sei.), v. 97, n. 2, p. 81–155, 1987.

UPDEGRAFF, D. M. **Semimicro determination of cellulose in biological materials.** Analytical Biochemistry, v. 32, n. 3, p. 420–424, 1969.

VAN DE WOUWER, D.; BOERJAN, W.; VANHOLME, B. **Plant cell wall sugars: sweeteners for a bio-based economy.** Physiologia Plantarum, v. 164, n. 1, p. 27–44, 2018.

VAN DER WEIJDE, T.; ALVIM KAMEI, C. L.; TORRES, A. F.; VERMERRIS, W.; DOLSTRA, O.; VISSER, R. G. F.; TRINDADE, L. M. **The potential of C4 grasses for cellulosic biofuel production.** *Frontiers in Plant Science*, v. 4, n. May, p. 1–18, 2013.

VAN HANDEL, E. **Direct Microdetermination of Sucrose.** *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, v. 22, p. 280–283, 1968.

VANHOLME, R.; DEMEDTS, B.; MORREEL, K.; RALPH, J.; BOERJAN, W. **Lignin Biosynthesis and Structure.** *Plant Physiology*, v. 153, n. 3, p. 895–905, 2010.

VELÁSQUEZ, P. A. T.; BERCHIELLI, T. T.; REIS, R. A.; RIVERA, A. R.; DIAN, P. H. M.; DE ALMEIDA TEIXEIRA, I. A. M. **Composição química, fracionamento de carboidratos e proteínas e digestibilidade in vitro de forrageiras tropicais em diferentes idades de corte.** *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39, n. 6, p. 1206–1213, 2010.

VERARDI, A.; DE BARI, I. **Hydrolysis of lignocellulosic biomass: current status of processes and technologies and future perspectives.** *Bioethanol*, 2012.

WAHID, A.; GELANI, S.; ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. **Heat tolerance in plants: An overview.** *Environmental and Experimental Botany*, v. 61, n. 3, p. 199–223, 2007.

WANG, T.; MCFARLANE, H. E.; PERSSON, S. **The impact of abiotic factors on cellulose synthesis.** *Journal of Experimental Botany*, v. 67, n. 2, p. 543–552, 2016.

WEDOW, J. M.; YENDREK, C. R.; MELLO, T. R.; CRESTE, S.; MARTINEZ, C. A.; AINSWORTH, E. A. **Metabolite and transcript profiling of Guinea grass (*Panicum maximum* Jacq) response to elevated [CO<sub>2</sub>] and temperature.** *Metabolomics*, v. 15, n. 4, p. 1–13, 2019.

WYMAN, C. E. **Cellulosic Ethanol: A Unique Sustainable Liquid Transportation Fuel.** *MRS Bulletin*, v. 33, n. 4, p. 381–383, 2008.

ZABED, H.; SAHU, J. N.; SUELY, A.; BOYCE, A. N.; FARUQ, G. **Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 71, n. December, p. 475–501, 2017.

ZHONG, R.; CUI, D.; YE, Z.-H. **Secondary cell wall biosynthesis.** *New Phytologist*, v. 221, n. 4, p. 1703–1723, 2019.