

MICHELE SILVA

A relação entre o hábito e a composição da parede celular de bambus nativos

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2017

MICHELE SILVA

A relação entre o hábito e a composição da parede celular de bambus nativos

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: DRA. MARIA TEREZA GROMBONE-GUARATINI

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Silva, Michele

S586r A relação entre o hábito e a composição da parede celular de bambus nativos /
Michele Silva -- São Paulo, 2017.
73p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio
Ambiente, 2017.
Bibliografia.

1. Arabinoxilano. 2. Hemicelulose. 3. Poaceae. I. Título

CDU: 547.454

A minha família pelo apoio incondicional, principalmente ao meu avó José Limeira da Silva (*in memorian*).

Aos amigos que me acompanharam durante toda a jornada.

A minha orientadora pela paciência e dedicação ao longo de todo trabalho.

Enfim a todos que de alguma forma participaram direta ou indiretamente de toda a trajetória até a “grande vitória”.

“Eu acredito demais na sorte. E,
tenho constatado que, quanto mais
duro eu trabalho, mais sorte eu
tenho.”

Thomas Jefferson

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por iluminar meu caminho até aqui.

Agradeço a minha família, minha base, pelo apoio, amor e confiança concedidos a mim e pelos valores ensinados. Aos meus avós, José (*in memorian*) e Maria Helena, a quem devo o que sou hoje, por terem acreditado nos meus sonhos e terem feito o possível e o impossível para eu chegar até aqui. A minha mãe, Maria do Carmo, por ter lutado para me dar sempre o melhor (muito obrigada mãe). Aos meus tios, Lurdes e Josemar, que sempre me trataram como filha que me ajudaram e apoiaram quando mais precisei. Ao meu priminho, Leonardo, que às vezes pega no meu pé, mas sei que é carinho. Sem eles não teria chegado onde cheguei.

Ao meu namorado, Fabiano, por estar ao meu lado me apoiando e ajudando o tempo todo, até mesmo no laboratório, tentando entender o que é ciência.

Aos amigos, grandes motivadores, obrigada pelo apoio, pelos momentos de descontração e por ouvirem os desabafos nos momentos difíceis. Agradeço especialmente a Verinha, Manu, Athos, Karina, Letícia, Sanches, Vini, Vitor, Higor, Kanis, Priscila, Camila e a todos do núcleo de pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica de São Paulo (IBt). Agradeço aos amigos que tive o privilégio de conhecer e compartilhar um pouquinho do que aprendi Gustavo Colucci, Bianca, Aline Sá e todo o grupo CarboPlant – UNIFESP

Aos amigos de disciplinas, amizades que quero carregar comigo para sempre, quantos encontros para fazer trabalho que se tornaram também diversão e quantas noites mal dormidas estudando não é mesmo? Vocês foram especiais: Gustavo, Débora, Giovanna, César, Gisele, Jonatha e todos os que compartilharam dos momentos de descontração e desespero.

A Dra. Maria Tereza Grombone-Guaratini por ter feito parte deste trabalho como minha orientadora. Agradeço pela confiança, pela amizade, pela paciência, pela força nos momentos em que parece estar tudo dando errado e a ansiedade e desespero dominam, por todo ensinamento ao longo desde período sem dúvida foram de grande valia. Foi um grande privilégio poder trabalhar com você.

A Dr. Marco Aurélio da Silva Tiné por consentir a realização de toda parte experimental do projeto no núcleo de Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica de São Paulo (IBt), e também, por ter conduzido toda a discussão da parede celular.

Aos pesquisadores e funcionários do Núcleo de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica por permitirem o acesso aos laboratórios e equipamentos e por compartilharem seu conhecimento.

A Ms. Regina Shirasuna pelo auxílio na coleta e identificação da espécie de bambu *Guadua tigoara*.

Ao Dr. Tarciso Filgueiras (IBt) pelo auxílio na escolha e na identificação das espécies de bambu.

Agradeço a Dra. Claudia Furlan (USP), Dra. Magdalena Rossi (USP), Dr. Marcos Buckeridge (USP) e Dra. Aline Cavalari-Corete (UNIFESP) por concederem o uso de seus liofilizadores e a todos da Universidade de São Paulo (USP) e da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) que me auxiliaram.

A CNPq/PIBIC - IBt pela concessão da bolsa de mestrado e a FAPESP pela bolsa de fomento ao projeto temático “Avaliação e caracterização das atividades biológicas e químicas de extratos e frações de *Apoclada simplex* McClure & Smith (Poaceae: bambusoideae)” e o projeto “Análise do padrão de acetilação e feruloilação de arabinosilano de cana-de-açúcar” que auxiliaram na realização deste estudo.

RESUMO

A família Poaceae é uma das mais importantes entre as angiospermas que compõe a flora nacional com cerca de 700 gêneros e, aproximadamente, 10 mil espécies. Esta família encontra-se dividida em doze subfamílias, dentre elas Bambusoideae sendo esta subdividida em três tribos: Bambuseae, Olyreae e Arundinarieae. Os bambus são conhecidos por sua grande importância econômica, ecológica e cultural. O Brasil é o país com maior diversidade de espécies de bambu do Novo Mundo com 89% dos gêneros e 65% das espécies de bambus conhecidos distribuídos entre a Mata Atlântica, o Cerrado e a Amazônia. Plantas que dependem da rigidez dos próprios tecidos para crescer investem mais em tecidos de sustentação, já espécies com hábito escandente, por exemplo, demandam de menor estrutura de suporte. A parede celular é a principal responsável pelas propriedades mecânicas dos tecidos. O objetivo geral deste estudo foi descrever a composição da parede celular do colmo em diferentes estágios do desenvolvimento de *Apoclada simplex* e avaliar se há uma relação entre a composição de polissacarídeos com o hábito ou com a filogenia do grupo em seis espécies de bambus das tribos Bambuseae e Olyreae. As amostras de colmos foram secas, moídas e extraídas com etanol. Os resíduos das extrações foram submetidos ao fracionamento da parede celular por extrações com oxalato de amônio, deslignificação com clorito de sódio e extrações sucessivas com soluções cada vez mais concentradas de NaOH (0,1M, 1M e 4M) com exceção de *Apoclada simplex* (NaOH 1M, 4M e 8M). Estas frações foram neutralizadas, dialisadas e liofilizadas para o cálculo do rendimento. Lignina foi dosada pelo método de Klason. A análise da composição dos monossacarídeos foi realizada por cromatografia de troca aniônica de alta performance com detector de pulso amperométrico para quantificação dos monossacarídeos neutros. O arabinoxilano presente na fração NaOH 4M foi digerido com β -xilanase para a produção de oligossacarídeos. Nossos resultados mostram que mudanças na composição da parede celular estão relacionadas à idade e ao hábito da planta apesar das limitações impostas pela filogenia quanto ao tipo de hemicelulose presente. O padrão de variação de estrutura do arabinoxilano não condiz com a filogenia atual, possivelmente devido às características multifuncionais da parede celular, que está diretamente envolvida com as respostas da planta ao ambiente.

Palavras-chave: Arabinoxilano, *Apoclada*, *Chusquea*, *Filgueirasia*, *Merostachys*, *Parodiolyra*, Poaceae, hemicelulose

ABSTRACT

The Poaceae family is one of the most important among the Angiosperms, with approximately 700 genera and 10.000 species. The family is currently separated in 12 sub-families, among them the Bambusoideae, which is subdivided into three tribes: Bambuseae, Olyreae and Arundinarieae. Bamboos are known for their economical, ecological and cultural importance. Brazil is the country with the biggest bamboo diversity in the neotropics with 89% of the genera and 65% of the species known scattered across the Atlantic Forest, the Cerrado and the Amazon. The plants can be annual or perennial and can be herbs, shrubs or trees and can also show different growth habits. Plants that depend on the stiffness of their own tissues to grow tend to invest more in support tissues and plants that rely on climbing demand less supporting structures. The cell wall is the main component of the mechanical properties of the tissues. The objective of this work was to describe the cell wall composition of the culm of *Apoclada simplex* at different developmental stages and investigate whether there is a connection between the polysaccharide with the habit of the plant or with the phylogeny of the group by studying six species of native bamboos of tribes Bambuseae and Olyreae. The culm samples were dried, milled and extracted with ethanol. The residue of the extractions was submitted to the fractionation of the cell wall by extraction with Ammonium oxalate deslignification with sodium chlorite and successive extractions with increasing concentrations of NaOH (0.1M, 1M and 4M), except for *Apoclada simplex* where the concentrations used were NaOH 1M, 4M and 8M. These fractions were neutralized, dialysed and freeze dried for the calculation of the yield. Lignin was measured by the Klason method. Analysis of the monosaccharide composition was performed by acid hydrolysis of the fractions and quantification of the neutral monosaccharide composition by anion exchange chromatography with amperometric pulsed detection. The analysis of the structure of the arabinoxylan present in the 4M fraction was performed by digestion of the fraction with xylanase for the production of the oligosaccharides. Our results show that changes on the cell wall composition are related to the age and habit of the plant, despite the phylogenetic constraints imposed on the types of hemicellulose present. The structure of the arabinoxylan does not correlate with the current phylogeny, possibly due to the multifunctional characteristics of the cell wall, that is involved in the response of the plant to the environment.

Keywords: Arabinoxylan, *Apoclada*, *Chusquea*, *Filgueirasia*, *Merostachys*, *Parodiolyra*, Poaceae, hemicellulose.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Esquema da arquitetura das paredes celulares dos tipos I e II segundo Carpita & Gibeaut (1993). Na parede do tipo I, temos o domínio microfibrilar (celulose-hemicelulose) composto por xiloglucano, sendo que a proporção entre celulose, hemicelulose e pectinas é equilibrada. Na parede tipo II, encontramos como principal hemicelulose o arabinoxilano, a proporção de pectina neste tipo de parede é menor do que a de celulose e hemicelulose.

Capítulo 2

Figura 1. Estrutura linear da celulose.

Figura 2. Xiloglucano, suas ramificações e pontos de ataque de endo- β -glucanases.

Figura 3. Estrutura dos polímeros de Hemicelulose: glucuronoarabinoxilano (GAX) e glucano de ligação mista.

Figura 4. Estrutura das Pectinas. A – Homogalacturonano. B – Ramnogalacturonano.

Figura 5. Primeiro modelo de parede celular proposto por Peter Albersheim e colaboradores. É possível notar na imagem as ligações covalentes (alguns exemplos circulados), principal forma de manter os polissacarídeos interligados.

Figura 6. Filogenia do grupo com base em sequências de DNA plastidial (cloroplasto) de cinco loci: *ndhF*, *rpl16* intron, *rps 16* intron, *trnD-trnT* e *trnL-trnF*.

Figura 7. Distribuição geográfica das espécies *Filgueirasia arenicola* e *F. cannavieira*.

Figura 8. Distribuição geográfica da espécie *Chusquea capituliflora* Trin. var. *pubescens*.

Figura 9. Distribuição geográfica da espécie *Guadua tagoara*.

Figura 10. Distribuição geográfica da espécie *Merostachys riedeliana*.

Figura 11. Distribuição geográfica da espécie *Parodiolyra micrantha*.

Figura 12. Fotos ilustrativas das espécies estudadas. A – *Chusquea capituliflora*, B – *Parodiolyra micrantha*, C – *Filgueirasia arenicola*, D – *Filgueirasia cannavieira*, E – *Guadua tagoara* e F – *Merostachys riedeliana*.

Figura 13. Cromatogramas representativos dos oligossacarídeos de arabinoxilano produzidos a partir da digestão da fração NaOH 4M com β -xilanase de *Aspergillus niger* (Megazyme®) e analisados em HPAEC/PAD – ICS 3000.

Figura 14. Diagrama de similaridade construído a partir dos oligossacarídeos gerados pela digestão enzimática da fração NaOH 4M com β -xilanase de *Aspergillus niger* (Megazyme[®]) e o auxílio do programa *Statistica* 12 (Statsoft) usando como cálculo de distância o *city-block*. Espécies: C – *Chusquea capituliflora*, FA – *Filgueirasia arenicola*, FC – *Filgueirasia cannavieira*, G – *Guadua tagoara*, M – *Merostachys riedeliana*, P – *Parodiolyra micrantha*.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Rendimento expresso em porcentagem. (A) Rendimentos do fracionamento das porções ocas e cheias dos colmos de *Apoclada simplex*, entre parêntesis estão os teores de celulose; (B) Teor de Lignina de Klason presente nas porções ocas e cheias do colmo de *Apoclada simplex*.

Tabela 2. Análise dos monossacarídeos obtidos a partir do fracionamento dos colmos cheio e oco de *Apoclada simplex*. Açúcares: ara – arabinose e xil – xilose.

Capítulo 2

Tabela 1. Pontos de coleta e hábitos de *Filgueirasia arenicola* (McClure) G.F. Guala e *F. cannavieira* (McClure) G.F. Guala no estado de Goiás e de *Apoclada simplex* McClure & Smith, *Chusquea capituliflora* Trin. var. *pubescens* McClure & L.B., *Guadua tagoara* (Ness) Kunth, *Merostachys riedeliana* Rupr. ex Döll e *Parodiolyra micrantha* (Kunth) Davidse & Zuloaga no estado de São Paulo.

Tabela 2. Rendimento expresso em porcentagem das frações de parede celular e lignina e seus respectivos erros padrão. Os valores entre parêntesis são os teores de celulose presente no resíduo.

Tabela 3. Rendimento em porcentagem molar dos monossacarídeos neutros de seis espécies de bambus nativos analisados por HPLC e seus respectivos erros padrão. Açúcares: xil – xilose e ara – arabinose.

ÍNDICE

RESUMO	V
ABSTRACT	VII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XI
CAPÍTULO 1	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVO GERAL	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Material Vegetal	21
3.2 Análise de carboidratos	21
3.3 Fracionamento da parede celular	22
3.4 Análise de monossacarídeos por HPAEC/PAD	22
3.5 Quantificação de lignina	22
3.6 Análise estatística	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 Análise do Fracionamento da Parede celular	24
4.2 Análise dos monossacarídeos de <i>Apoclada simplex</i>	27
5. CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
CAPÍTULO 2	31
1. INTRODUÇÃO	32
1.2 Família Poaceae	36
2. OBJETIVO GERAL	38
2.1 Objetivos específicos	38
3. MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Material vegetal	39

3.2 Remoção de Açúcares Solúveis	44
3.3 Remoção de Amido	44
3.4 Fracionamento da Parede Celular	44
3.5 Análise de Monossacarídeos por HPAEC/PAD.....	45
3.6 Lignina	45
3.7 Comparação da composição e estrutura da parede celular dos colmos de bambu	46
3.8 Análise de oligossacarídeos por HPAEC/PAD	46
3.9 Estatística	46
3.10 Diagramas de similaridade	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1 Análises do fracionamento da parede celular.....	47
4.2 Análise de monossacarídeos neutros.....	57
4.4 Análise de oligossacarídeos e diagrama de similaridade	63
5. CONCLUSÃO	66
CONCLUSÃO GERAL.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

CAPÍTULO 1

Diferenças na composição da parede celular de
Apoclada simplex McClure & Smith em diferentes
estágios de desenvolvimento

1.INTRODUÇÃO

Bambus são amplamente conhecidos por sua grande importância econômica, ecológica e cultural sendo citados na literatura para diversos usos: material de construção civil, fabricação de papel, na alimentação, produtos artesanais, entre outros (Soderstrom & Calderón 1979; Judziewicz *et al.* 1999). Além destas aplicações, um grande número de artigos científicos tem demonstrado que espécies de bambus apresentam atividades farmacológicas como, por exemplo, antioxidantes (Hu *et al.* 2000; Lu *et al.* 2005; Kurokawa *et al.* 2006; Park *et al.* 2007).

Bambus lenhosos são descritos como um dos mais importantes e valiosos recursos florestais não madeireiros, tendo em vista o limitado estoque global de madeira, e uma das plantas agrícolas não anuais mais importantes do mundo (Lybeer *et al.* 2006; Wen *et al.* 2015). Em áreas tropicais e subtropicais, os bambus representam aproximadamente 20-25% da biomassa total, o que contribui para o seu status como um dos mais importantes recursos renováveis (Bansal & Zoolagud 2002). O Brasil é o país com maior diversidade de espécies de bambus do Novo Mundo (Judziewicz *et al.* 1999), sendo 89% dos gêneros e 65% das espécies de bambus conhecidas distribuídas na Mata Atlântica, Cerrado e Amazônia (Filgueiras & Gonçalves 2004). Boa parte das espécies típicas de bambus do estado de São Paulo concentram-se em áreas de Mata Atlântica, onde a riqueza biológica é grande.

Bambus apresentam uma grande amplitude ecológica em resposta às perturbações do dossel podendo se tornar espécies dominantes após a abertura em clareiras de origem natural ou antrópica (González *et al.* 2002). Além disso, possuem um crescimento muito rápido, da base do colmo para o topo da planta (He *et al.* 2013). Esta capacidade de crescimento agressivo e a plasticidade em traços funcionais como, por exemplo, a adaptação de plantas de hábito arbóreo para escandente estão entre as estratégias de ajuste morfológico relacionadas ao mecanismo de expansão e ocupação de espaço (Montti *et al.* 2013).

Plantas com distintas arquiteturas requerem diferentes propriedades mecânicas dos órgãos. Portanto, plantas que dependem da rigidez dos próprios tecidos para crescer investem mais em tecidos de sustentação, já espécies com hábito escandente, por exemplo, demandam de menor estrutura de suporte (Taiz 1984; Wolf *et al.* 2012).

A parede celular é a principal responsável pelas propriedades mecânicas dos tecidos, sendo composta por três domínios: domínio microfibrilar, o domínio péctico e o domínio proteico. O primeiro domínio é constituído basicamente de celulose e hemicelulose. As microfibrilas de celulose são envoltas por hemicelulose conferindo resistência e rigidez a parede celular (Buckeridge *et al.* 2008). Este domínio está imerso no domínio péctico, que é rico em polissacarídeos altamente solúveis e de carácter ácido, por ser rico em ácidos urónicos (Crosgrave 1997; Buckeridge *et al.* 2000). O domínio das proteínas é composto por algumas proteínas estruturais e enzimas, responsáveis pelo metabolismo dos polissacarídeos de parede (Buckeridge *et al.* 2008). A parede celular, também apresenta lignina, um polímero derivado da polimerização de três unidades monoméricas, os álcoois: *p*-cumaril, coniferil e sinapil, os precursores das unidades fenilpropanóides guaiacil, siringil e *p*-hidrofenil (Barbosa *et al.* 2008).

As principais hemiceluloses encontradas em eudicotiledóneas e monocotiledóneas comelinóides são o xiloglucano (Hayashi & Kaida 2011) e o arabinoxilano (Gibeaut & Carpita 1993), respectivamente. O xiloglucano é um polissacarídeo constituído por uma cadeia principal de glucose unidas por ligações β -(1 $\rightarrow$ 4) com xiloses ramificadas com ligações α -(1 $\rightarrow$ 6) podendo, ainda, conter ramificações com galactose ligadas à xilose (Buckeridge *et al.* 2008). Ainda segundo o autor, arabinoxilano é um polímero composto por uma cadeia principal de xilose unidas por ligações β -(1 $\rightarrow$ 4) com resíduos de arabinose ligados por α -(1 $\rightarrow$ 2) e/ou α -(1 $\rightarrow$ 3).

Tanto as hemiceluloses quanto as pectinas constituem uma classe de polissacarídeos, podendo ser composto por vários polissacarídeos diferentes (Buckeridge *et al.* 2008). O autor ainda relata que uma mesma célula pode conter entre as suas hemiceluloses diversas hemiceluloses combinadas como xilano, xiloglucano e glucano de ligação mista. É essa possibilidade de combinações que conferem diversidade funcional e estrutural à parede celular (Buckeridge *et al.* 2008).

A parede celular possui diversas funções como, por exemplo, dar sustento mecânico à planta. A parede celular é um compartimento metabolicamente ativo e dinâmico da célula vegetal que participa de muitos processos fisiológicos de resposta da planta ao ambiente (Gall *et al.* 2015). Órgãos jovens, com alta taxa de crescimento, por exemplo, costumam ter hemiceluloses diferentes das encontradas nos tecidos maduros, onde não há expansão celular e o mais importante passa a ser defesa contra patógenos e herbívoros (Wolf *et al.* 2012). Ainda segundo estes autores a troca de uma hemicelulose

por outra ao longo do crescimento confere à parede celular a alteração necessária nas propriedades mecânicas da parede.

Embora a arquitetura geral das células de parede celular seja semelhante, entre gramíneas e eucotiledôneas (na medida em que ambos consistem em fibras celulósicas cercadas por uma matriz não celulósica de polissacarídeos) a diferença observada entre os grupos ocorre consideravelmente nos tipos e abundância relativa de polissacarídeos não celulósicos, abundância de proteínas e de compostos fenólicos (Vogel 2008).

Por se tratar de uma gramínea, o bambu apresenta uma parede celular do tipo II (**Fig. 1**) (Carpita & Gibeaut 1993). As principais hemiceluloses esperadas são xilanos e arabinoxilanos, sendo que glucanos de ligação mista e xiloglucano foram identificados nos tecidos em crescimento do bambu *Phyllostachys edulis* (Carrière) J. Houz. (Edashige & Ishii 1998). Além disso, a parede celular de gramíneas costuma apresentar baixos teores de pectinas e maior conteúdo de compostos fenólicos, com até 5% do peso seco de ácido ferúlico (Vogel 2008). O primeiro relato de ácido fenólico covalentemente associado a uma hemicelulose (xiloglucano) foi feito pela análise de parede celular de *P. edulis* (Ishii *et al.* 1990).

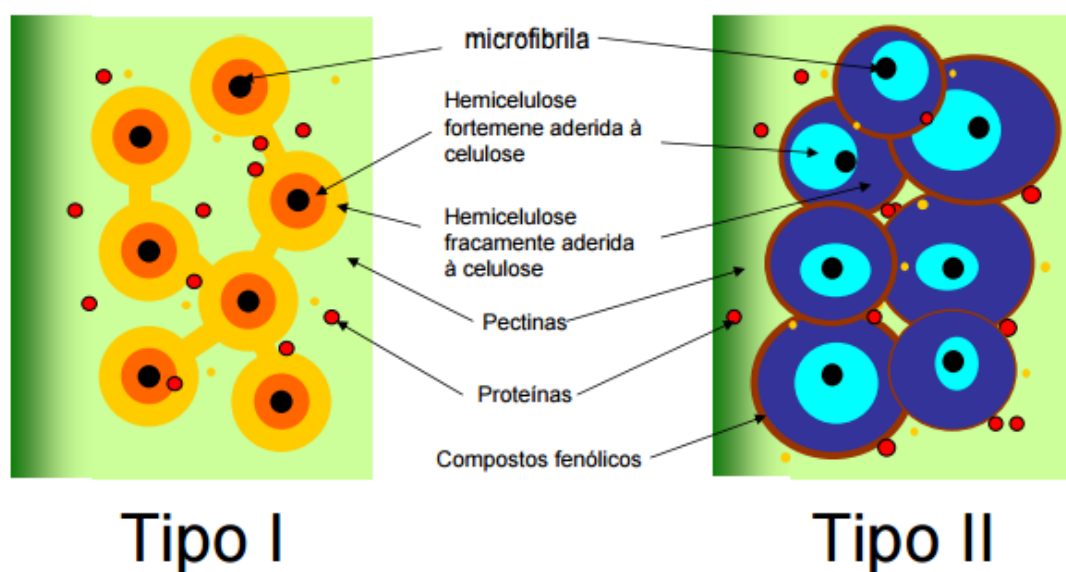


Figura 1. Esquema da arquitetura das paredes celulares dos tipos I e II segundo Carpita & Gibeaut (1993). Na parede do tipo I, temos o domínio microfibrilar (celulose-hemicelulose) composto por xiloglucano, sendo que a proporção entre celulose, hemicelulose e pectinas é equilibrada. Na parede tipo II, encontramos como principal hemicelulose o arabinoxilano, a proporção de pectina neste tipo de parede é menor do que a de celulose e hemicelulose. (Fonte: adaptado de Buckeridge *et al.* 2008).

A parede celular vegetal pode ser dividida ainda em parede primária, secundária e terciária. A parede primária desenvolve-se concomitante ao processo de expansão celular e possui uma espessura entre 0,1 a 0,2 μm (Wilson 1993). Ainda segundo o autor a parede celular secundária encontra-se localizada internamente à parede primária após expansão celular. Este tipo de parede possui três camadas (S1, S2 e S3) diferenciadas pela deposição das microfibrilas de celulose e uma espessura variando entre 1 a 5 μm . Células com parede secundária possuem grau maior ou menor de lignificação e maior resistência às forças de tensão e compressão. O autor ainda relata que a parede celular terciária é caracterizada por ser uma camada membranosa bem fina e localizada mais internamente à parede secundária.

A espécie em estudo, *Apoclada simplex* McClure & Smith, é uma espécie de bambu lignificado fortemente ou medianamente, cespitoso, perene, com rizoma paquimorfo e ereto colmos (3-13 m de altura; 19-40 cm de diâmetro) (Guala 1995). O período entre a floração é de cerca de 20 anos (Smith *et al.* 1981). A espécie é higrófila e heliófila. Caracteriza-se por apresentar distribuição descontínua e irregular formando, às vezes, agrupamentos densos (Smith *et al.* 1981). A espécie é endêmica do Brasil encontrada nas regiões sul e sudeste sendo também a única espécie do gênero (Guala 2003). *Apoclada simplex* é uma espécie com alto potencial ornamental e tem grande importância na construção civil e no artesanato (Smith *et al.* 1981); contudo, a falta de manejo adequado fez com que esta espécie esteja hoje na lista de espécie em perigo de extinção ([http://www.ambiente.sp.gov.br / wp-content / uploads / Resolução / 2004 / 2004_Res_SMA48.pdf](http://www.ambiente.sp.gov.br/wp-content/uploads/Resolucao/2004/2004_Res_SMA48.pdf) acessado em 20/05/2017).

2.OBJETIVO GERAL

Analisar a composição de polissacarídeos da parede celular do colmo de *Apoclada simplex* McClure & Smith em dois estádios de desenvolvimento: colmo jovem (entrenó cheio) e colmo maduro (entrenó oco).

.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

A coleta de colmos jovens (entrenó cheios e preenchidos) e colmos maduros (entrenós ocos) de *Apoclada simplex* foi realizada em maio de 2013 no Parque Estadual do Rio Turvo em uma área contínua de floresta Atlântica (73.893,87 hectares), localizado em São Paulo, sudeste do Brasil (24°53'18,567" S, 48°21'14,295" W, 10-1100 msnm). A Mata Atlântica é um hotspot de biodiversidade (Myers *et al.* 2000). O clima de região é do tipo Cfb de Köppen (1948) (temperado úmido, sem estação seca). As temperaturas médias mínimas e máximas anuais são 27°C (fevereiro) e 15,7°C (julho). A precipitação média é de 3000 mm de setembro a maio, e 1000 mm de precipitação de julho a agosto. O tipo de vegetação predominante na área do parque é a floresta ombrófila densa e mista. Uma exsicata foi depositada no Herbário Maria Eneida Kauffman Fidalgo do Instituto de Botânica de São Paulo.

Colmos de três indivíduos distintos de *Apoclada simplex* (foi considerado um indivíduo diferente colmos encontrados a uma distância de cerca de 2m) com cerca de 3m de altura foram divididos em duas partes: da base do solo até 1,5m de comprimento com folhas expandidas e fotossinteticamente ativas (entrenós ocos) e parte superior $\geq$ 1,5m até o ápice com folhas imaturas e ainda em desenvolvimento (entrenós cheios e preenchidos), secas em estufa à 60°C e moídos em moinho de facas (Tecnal Brasil).

3.2 Análise de carboidratos

Para cada 1g de amostra (três replicatas técnicas) foram feitas extrações exaustivas com etanol a 80% (v/v) a 80°C. O resíduo insolúvel em álcool residual (AIR) foi lavado com água destilada e seco em liofilizador. Adicionou-se ao precipitado 20mL de DMSO 90% (v/v) para remoção do amido. O resíduo foi lavado com água destilada e seco em liofilizador.

3.3 Fracionamento da parede celular

O resíduo insolúvel em DMSO (celula de parede celular) foi submetido à três extrações com 20 mL de oxalato de amônio 0,5 % (pH 7,0) a 80 ° C durante 3 h cada, com agitação contínua. O sobrenadante foi recuperado por centrifugação da suspensão a 13 000 g, dialisado, liofilizado e submetido a dosagens de ácidos urônicos (Filisetti-Cozi& Carpita 1991). Os resíduos da parede celular (removidos com oxalato) foram então extraídos com cloreto de sódio a 3% (p/v), ácido acético a 0,3% (v/v), seguindo-se de sucessivas extrações de NaOH 1,0, 4,0 e 8,0M (cada um contendo 3 mg / mL de boro-hidreto de sódio) à temperatura ambiente durante 1 h cada. Estas frações foram neutralizadas, dialisadas e liofilizadas para que posteriormente o rendimento estimado. O resíduo resultante dessas extrações foi lavado e seu rendimento estimado, além de ser submetido a extrações com Updegraff para análise de celulose.

3.4 Análise de monossacarídeos por HPAEC/PAD

Dois mg de cada fração foram hidrolisados com ácido trifluoroacético 2N (TFA) por 1 hora a 120°C e 1,5 atm. Os hidrolisados foram evaporados em aparelho “speed vac” e ressuspendidos em 2mL de água deionizada para análise por cromatografia de troca aniônica de alta performance com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em sistema Dionex ICS3000, coluna Carbo-Pac PA 1, em eluição isocrática com NaOH 16 mM. Os monossacarídeos foram identificados por comparação com padrões comerciais.

3.5 Quantificação de lignina

Cinquenta mg do resíduo pós extração de açúcar solúvel foram hidrolisados com ácido sulfúrico a 72% e incubados a 30°C por 45 minutos. Após incubação, o ácido sulfúrico contido nas amostras foi diluído a 4% em água destilada e as amostras autoclavadas por uma hora a 121°C. Após autoclagem o hidrolisado foi centrifugado a 2000g e o sobrenadante descartado e lavado exaustivamente em água destilada quente. O resíduo resultante foi seco e pesado e lignina de Klason determinada (Hatfield *et al.* 1994, modificado).

3.6 Análise estatística

As médias dos rendimento (3 réplicas biológicas e 3 réplicas técnicas) de cada um dos tratamentos do fracionamento da parede celular comparadas utilizando uma ANOVA unidirecional (com extracto ou fração como efeito principal), seguido de um Dunn para comparar os grupos de tratamento com um único grupo controle (Zar 1999). A ANOVA não paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de Dunn's, é utilizada quando os dados normalmente não são distribuídos com variações iguais em todos os tratamentos (Zar 1999). O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$. Realizamos todas as análises estatísticas usando o programa de software SigmaStat 3.5, SPSS Inc., EUA.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise do Fracionamento da Parede celular

A Tabela 1 mostra os dados do rendimento a partir do fracionamento da parede celular dos colmos cheio e oco de *Apoclada simplex*.

O rendimento da fração oxalato foi baixo nos dois tipos de colmo indicando baixo teor de pectinas. Não foram detectados nas amostras de *A. simplex* analisadas a presença de ácidos urônicos. Estes resultados ratificam os dados da literatura que caracterizam a parede celular de gramíneas com baixos teores de pectinas e maior conteúdo de compostos fenólicos (Carpita & Gibeaut 1993; Vogel 2008).

Nas principais frações de hemicelulose (NaOH 1M e NaOH 4M), houve uma inversão, sendo que a maior parte das hemiceluloses saem na fração NaOH 1M (hemicelulose fracamente ligadas a celulose) no colmo cheio e no NaOH 4M (hemicelulose fortemente ligada a celulose) no colmo oco, o que indica uma alteração de solubilidade ao longo da maturação, com mudanças na interação entre os polissacarídeos ou até na sua composição. Portanto, a maturação do órgão está associada a uma queda no rendimento de celulose e o aumento no teor de hemicelulose. Tanto o conteúdo como a composição química das hemiceluloses em bambu são influenciadas pelas condições de espécies avaliada como, idade, clima e período de colheita (Peng & She 2014). Ainda segundo os autores, parece que a regra quanto ao conteúdo de hemicelulose em espécies de bambu varia de acordo com a seguinte sequência: jovens > idade, bambu amarelo > madeira > verde, nodal > intermodal, e inferior > meio > topo.

O colmo cheio apresentou uma diferença significativamente maior nas frações do resíduo e celulose. Os dados mostram que a esta porção mais jovem do colmo apresenta maior teor de celulose. De maneira geral, as gramíneas apresentam alto teor de celulose (cerca de 38%) (Pattathil *et al.* 2015).

O desenvolvimento dos órgãos está associado a uma mudança na proporção dos tecidos sendo o colmo cheio rico em tecido parenquimático e o colmo oco rico em tecidos vasculares e de sustentação (Liese & Weiner 1996). As fibras do colmo dos bambus correspondem a mais de 40% do volume do colmo e está, em sua maioria, distribuída nas fibras do cilindro vascular (Wang *et al.* 2012).

Foi observada diferença significativa no teor de lignina entre os colmos, sendo esta maior no colmo cheio (Tabela 1). Os teores de lignina de Klason foram semelhantes ao rendimento da fração clorito de sódio indicando que o tratamento foi, de fato, uma etapa de deslignificação extraindo muito pouco polissacarídeo não sendo possível a análise de composição. Segundo a literatura, o teor de lignina em bambus variam em torno de 20% (Lin & Dence 1992), dados que podem ser comparados aos nossos (Tabela 1). A lignina extraída do sistema dissolvido DMSO/NMI apresentou um rendimento de 26,08% (baseado na lignina de Klason, 23%), que foi ligeiramente superior à da MWL (19,56%). De forma geral, o teor de lignina aumenta com a maturidade da planta (Grabber *et al.* 2004), entretanto não foi observado este processo em nosso trabalho. Os valores obtidos nos diferentes colmos são similares aos encontrados em outras espécies de bambus (Lin & Dence 1992).

Tabela 1. Rendimento expresso em porcentagem. (A) Rendimentos do fracionamento das porções ocas e cheias dos colmos de *Apoclada simplex*, entre parêntesis estão os teores de celulose; (B) Teor de Lignina de Klason presente nas porções ocas e cheias do colmo de *Apoclada simplex*.

		Oxalato de amônio	Clorito de sódio	NaOH 1M	NaOH 4M	NaOH 8M	Resíduo
A. Rendimento (%)	Colmo Cheio	4.5 ± 0.1^a	12.1 ± 1.2^a	28.1 ± 0.6^a	9.9 ± 0.4^a	1.9 ± 0.2^a	43.5 ± 0.6^a (38.7 ^a)
	Colmo Oco	1.2 ± 0.1^b	15.4 ± 0.8^a	21.7 ± 0.8^b	25.0 ± 2.7^a	1.7 ± 0.2^a	34.9 ± 1.7^b (31.3 ^b)
B. Lignina de Klason (%)	Colmo Cheio	16.5 ± 0.3^a					
	Colmo Oco	15.4 ± 0.04^b					

*Letras distintas indicam diferenças significativas ANOVA $p < 0.05$.

4.2 Análise dos monossacarídeos de *Apoclada simplex*

A tabela 2 apresenta os dados relacionados à análise dos monossacarídeos gerados pela hidrólise ácida dos polímeros fracionados.

Os monômeros encontrados na fração oxalato de amônio e nas diferentes molaridades de hidróxido de sódio, auxiliaram a identificar os polímeros que compõem a parede celular dos colmos em estudo. Na tabela 2 podemos observar a xilose como principal monossacarídeo em todas as frações, exceto no resíduo. A proporção de xilose é significativamente maior no colmo cheio. A presença de arabinose é mais acentuada nas frações oxalato de amônio e NaOH 1M o que explica a alteração de solubilidade do xilano ao longo das frações. De fato a razão arabinose/xilose cai de 0,7 (fração oxalato) para 0,2 (NaOH 4M). Fucose e ramnose foram os monossacarídeos que apresentaram os menores teores em todas as frações, sendo que, em algumas delas, como a fração NaOH 4M, só foram detectados traços, reforçando o baixo teor de pectinas na parede celular.

Um estudo realizado com colmos do bambu *Sinocalamus affinis* (Rendle) McClure mostrou que as razões arabinose/xilose (Ara/Xil) decrescem ao longo do fracionamento. Essa modificação na estrutura do polímero possibilita alterações nas interações dos polímeros entre si e com a celulose (Guan *et al.* 2015). Em duas espécies de Poales, o milho (“Corn Stover”) e “Switch Grass” a hemicelulose mais abundante foi o arabinoxilano (~27% e ~4% de xilose e arabinose, respectivamente). O trabalho ainda revela que foi detectado um percentual muito baixo ou quase zero de manose e galactose (Pattathil *et al.* 2015), o que também foi observado em nossas amostras.

Na fração oxalato de amônio houve uma diferença significativa entre os colmos cheio e oco com relação ao teor de glucose. O elevado teor de glucose no colmo cheio sugere outras hemiceluloses como o glucano de ligação mista e o xiloglucano. A presença desses polissacarídeos pode estar associado a paredes de tecidos em crescimento, uma vez que foi descrito em milho como sendo típico de coleóptilo (Carpita *et al.* 2001). O alto teor de galactose na fração oxalato sustenta a possibilidade de uma parede com teor elevado de xiloglucano, já que a quantidade de pectinas é pequena.

O alto teor de glucose no resíduo é esperado, já que esta fração é rica em celulose, como observado na tabela 2.

Como padrão geral, a fração oxalato de amônio mostrou as maiores diferenças entre os colmos cheio e oco sugerindo a presença de diferentes polissacarídeos em

distintos estágios de desenvolvimento, provavelmente refletindo a diferente proporção dos tecidos nos órgãos (parênquima, xilema e esclerênquima).

Tabela 2. Análise dos monossacarídeos obtidos a partir do fracionamento dos colmos cheio e oco de *Apoclada simplex*. Açúcares: ara – arabinose e xil – xilose.

		Porcentagem molar %						
		fucose	ramnose	arabinose	galactose	glucose	xilose	ara/xil
Oxalato	Colmo Cheio	0.1 ± 0.1 ^a	traço	23.2 ± 2.7 ^a	16.0 ± 2.4 ^a	30.8 ± 4.7 ^a	31.6 ± 0.7 ^a	0.7
	Colmo Oco	0.05 ± 0.05 ^a	traço	19.4 ± 0.6 ^a	9.3 ± 1.3 ^a	15.1 ± 0.5 ^b	56.8 ± 2.3 ^b	0.3
NaOH 1M	Colmo Cheio	0.01 ± 0.01 ^a	traço	18.5 ± 0.4 ^a	4.5 ± 0.2 ^a	4.3 ± 0.1 ^a	72.9 ± 0.6 ^a	0.3
	Colmo Oco	0.3 ± 0.1 ^b	0.06 ± 0.02	15.9 ± 0.4 ^a	3.4 ± 0.03 ^b	4.5 ± 0.1 ^a	75.9 ± 0.4 ^b	0.2
NaOH 4M	Colmo Cheio	0.1 ± 0.06	0.2 ± 0.04	16.5 ± 0.3 ^a	4.0 ± 0.2 ^a	11.8 ± 0.3 ^a	67.4 ± 0.7 ^a	0.2
	Colmo Oco	traço	traço	11.9 ± 0.7 ^b	0.8 ± 0.1 ^b	8.3 ± 0.9 ^b	80.0 ± 1.7 ^b	0.2
NaOH 8M	Colmo Cheio	traço	0.06 ± 0.04 ^a	13.8 ± 0.2 ^a	4.5 ± 0.2 ^a	16.6 ± 0.4 ^a	65.2 ± 0.5 ^a	0.2
	Colmo Oco	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1 ^a	17.0 ± 0.8 ^b	6.5 ± 1.5 ^a	14.3 ± 1.0 ^a	62.1 ± 2.0 ^a	0.3
Resíduo	Colmo Cheio	0.1 ± 0.04	traço	5.3 ± 0.2 ^a	1.9 ± 0.1 ^a	67.9 ± 2.1 ^a	25.4 ± 1.8 ^a	0.2
	Colmo Oco	traço	traço	5.6 ± 0.5 ^a	1.6 ± 0.3 ^a	65.9 ± 2.5 ^a	27.5 ± 1.5 ^a	0.2

*Letras diferentes indicam diferenças significativas ANOVA $p < 0.05$.

5. CONCLUSÃO GERAL

As análises dos colmos jovem e maduro de *Apoclada simplex* nos revela que a maturação destes está associada a uma queda no teor de celulose e ao aumento dos teores de hemicelulose.

A fração oxalato de amônio mostrou as maiores diferenças entre os colmos sugerindo a presença de distintos polissacarídeos em diferentes estágios de desenvolvimento, provavelmente refletindo a diferente proporção dos tecidos nos órgãos.

Com relação à composição da parede celular de *A. simplex* observou-se a presença de glucano de ligação mista e xiloglucano no colmo cheio e de xilanos no colmo oco sugerindo uma alteração na estrutura da parede, pois a planta passa de um estágio de crescimento (colmo cheio) para um de sustentação (colmo oco), ou seja, a mudança na composição e estrutura da parede celular ao longo da maturação se deve a presença de glucanos de ligação mista no colmo cheio e xilanos no colmo oco.

Os resultados obtidos neste trabalho nos mostra, portanto, a mudança da composição da parede celular ao longo do desenvolvimento do bambu *A. simplex*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANSAL, A.K. & ZOOLAGUD, S.S. 2002. Bamboo composites: Material of the future. *Journal of Bamboo and Rattan*, 1(2): 119-130.
- BARBOSA, L.C.A., MALTHA, C.R.A. & SILVA, V.L. 2008. Determinação da relação siringila/guaiacila da lignin em madeiras de eucalipto por pirólise acoplada à cromatografia gasosa de espectrometria de massas (PI-CG/EM). *Química Nova*, 31(8): 2035-2041.
- BUCKERIDGE, M.S., SANTOS, H.P. & TINÉ, M.A.S. 2000. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiology & Biochemistry*, 38:141-156.
- BUCKERIDGE, M.S., CAVALARI, A.A. & SILVA, G.B. 2008. Parede Celular in Kerbauy, G.B 2ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, p. 165-181.
- CARPITA, N.C. & GIBEAUT, D.M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 3:1-30.
- CARPITA, N.C., DEFERNEZ, M., FINDLAY, K., WELLS, B., SHOUE, D.A., CARCHPOLE, G., WILSON, R.H. & MCCANN, M.C. 2001. Cell Wall Architecture of the Elongating Maize Coleoptile. *Plant Physiology*, 127: 551-565.
- CROSGROVE, D. J. 1997. Relaxation in high-stress environment: the molecular basis of extensible cell walls and cell enlargement. *The Plant Cell*, 9:1013-1041.
- EDASHIGE, Y. & ISHII, T. 1998. Hemicellulosic polysaccharides from bamboo shoot cell-walls. *Phytochemistry*, 46: 1675-1682.
- FILGUEIRAS, T.S. & SANTOS-GONÇALVES, A.P. 2004. A Clecklist of the Basal Grasses and Bamboos in Brazil (Poaceae). *The Journal of the American Bamboo Society*, 18:7-18.
- FILISSETTI-COZZI, T.M.C.C. & CARPITA, N.C. 1991. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry*, 197:157-162.
- GONZÁLEZ, M.E.; VEBLEN, T.T.; DONOSO, C. & VALERIA, L. 2002. Tree regeneration responses in lowland Nothofagus dominated forest alter bamboo dieback in South-Central Chile. *Plant Ecology*, 161: 59-73.
- GRABBER, J.H.; RALPH, J. & LAPIERRE, C. 2004. Genetic and molecular basis of grass cell-wall degradability. I. Lignin – cell wall matrix interactions. *Comptes Rendus Biologies*, 327(5): 455-465.
- GUALA, G.F. 2003. A new Genus of Bamboos from the Cerrado of Brazil. *Journal of the American Bamboo Society*, 17: 1-3.

- GUAN, Y., ZHANG.B., QI, X.M., PENG, F., YAO, C.L. & SUN, R.C. 2015. Fractionation of bamboo hemicelluloses by graded saturated ammonium sulphate. *Carbohydrate Polymers*, 129: 201-207.
- HATFIELD, R.D., JUNG, H.J.G., RALPH, J., BUXTON, D.R. & WEIMER, P.J. 1994. A comparison of the insoluble residues produced by the Klason lignin and acid detergent lignin procedures. *J. Sci. Food Agric.* 65:51-58.
- HAYASHI, T & KAIDA, R. 2011. Functions of Xyloglucan in Plant Cells. *Molecular Plant*. 4(1):17-24.
- HE, C.Y., CUI, K. ZHANG, J.G., DUAN, A.G. & ZENG, Y.F. 2013. Next-generation sequencing-based mRNA and microRNA expression profiling analysis revealed pathways involved in the rapid growth of developing culms in Moso bamboo. *BMC Plant Biology*, 13(1): 119-132.
- HU, C. ZHANG, Y. & KITTS, D.D. 2000. Evaluation of antioxidant and prooxidant activities of bamboo *Phyllostachys nigra* var. *henonis* leaf in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3170-3176.
- ISHII, T, HIROI, T. & THOMAS, J.R. 1990. Feruloylated xyloglucan and p-coumaroyl arabinoxylan oligosaccharides from bamboo shoot cell-walls. *Phytochemistry*, 29: 1999-2003.
- JUDZIEWICZ, E.J., CLARCK, L.G., LONDOÑO X. & STERN, M. J. 1999. American bamboos. Washington DC. Smithsonian Institute Press, p. 398.
- KUROKAWA, T. ITAGAKI, S., YAMAJI, T., NAKATA, C. NODA, T., HIRANO, T. & ISEKI, K. 2006. Antioxidant activity of a novel extract from bamboo Grass (AHSS) against ischemia-reperfusion injury in rat small intestine. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29: 2301-2303.
- LIESE, W. & WEINER, G. 1996. Ageing of bamboo culms. A review. *Wood Science and Technology*, 30: 77-89.5
- LIN, S.Y. & DENCE, C.W. 1992. *Methods in lignina chemistry*. Springer, Berlin Heidelberg. New York, p. 29-88.
- LU, Y., WU, X.Q., TIE, X.W., ZHANG, Y. & ZHANG, Y. 2005. Toxicology and safety of anti-oxidant of bamboo leaves. Part 1: Acute and subchronic toxicity studies on anti-oxidant of bamboo leaves. *Food and chemical Toxicology*, 43: 783-792.
- LYBEER, B., KOCH, G., VAN ACKER, J. & GOETGHEBEUR, P. 2006. Lignification and cell wall thickening in nodes of *Phyllostachys*

- viridiglaucescens*(Carrière) A. et C. Rivière and *Phyllostachys nigra* (Loddiges ex Lindley) Munro. Annals of Botany 97: 529-539.
- MONTTI, L. VILLAGRA, M., CAMPANELLO, P.I., GATTI, M.G., GOLDSTEIN, G. 2013. Functional traits enhance invasiveness of bamboo over co-occurring tree saplings in the semideciduous Atlantic Forest. Acta Oecologia, p. 1-9.
- MYERS, N., MITTERMEIER, R.A., MITTERMEIER, C.G., FONSECA, G.A.B. & KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature, 403: 853-858.
- PARK, H.S., LIM, J.H. & KIM, H.J. 2007. Antioxidant flavones glycosides from the leaves of *Sasa borealis*. Archives of Pharmacal Research, 30: 161-166.
- PATTATHIL, S., HAHN, M.G., DALE, B.E. & CHUNDAWAT, S.P.S. 2015. Insights into plant cell wall structure, architecture, and integrity using glycome profiling of native and AFEXTM-pre-treated biomass. Journal of Experimental Botany, 66(14): 4279-4294.
- PENG, P., SHE, D. 2014. Isolation, structural characterization, and potential applications of hemicelluloses from bamboo: A review. Carbohydrate Polymers, 112: 701-720.
- RESOLUÇÃO SMA N° 48 <http://www.ambiente.sp.gov.br/wp-content/uploads/Resolucao/2004/2004_Res_SMA48.pdf > acessado em 20/05/2017.
- SMITH, L.L, WASSHAUSEN, D.C. & KLEIN, R.M. 1981. Flora Ilustrada Catarinense. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, SC, p. 435.
- SODESTROM, T.M. & CALDERÓN, C.E. 1979. A Commentary on the bamboos (Poaceae: Bambusoideae). Biotropica, 11:161-172.
- TAIZ, L. 1984. Plant cell expansion: regulation of cell wall mechanical properties. Annual Review of Plant Physiology, 35: 585-657.
- VOGEL, J. 2008. Unique aspects of the grass cell wall. Current Opinion in Plant Biology, 11: 301-307.
- WANG, X., REN, H., ZHANG, B., FEI, B. & BURGET, I. 2012. Cell wall structure and formation of maturing fibres of moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*) increase buckling resistance. J.R. Soc. Interface. 9: 988-996.
- WEN, J.L., SUN, S.L., XUE, B.L., SUN, R.C. 2015. Structural elucidation of inhomogeneous lignins from bamboo. International Journal of Biological Macromolecules, 77: 250-259.
- WILSON, J.R. 1993. Organization of forage plant tissues. In: JUNG, H.G., BUXTON, D.R., et al. (Eds). Forage cell wall structure and digestibility. Madison: American

Society of Agronomy, Crop Sci, Society of American, Soil Sci. Society of America, p. 1-32. WOLF, S., HÉMATY, K. & HÖFTE, H. 2012. Growth Control and Cell Wall Signaling in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 63: 381-407.

ZAR, J.H. 1999. *Biostatistical analysis*. Pearson Education India.

CAPÍTULO 2

Relação entre o hábito e a composição da parede celular de seis espécies de bambus nativos

1. INTRODUÇÃO

A parede celular vegetal é um componente da célula vegetal que envolve externamente a membrana plasmática e o conteúdo celular (Kraus *et al.* 2006). É um compartimento dinâmico que muda ao longo da vida celular, determinando a forma da célula, limitando o crescimento celular e influenciando o desenvolvimento e a morfologia da planta (Carpita *et al.* 2015). Fazendo uma analogia simples e didática Lockhart (2015) comparou a parede celular vegetal às paredes de um quarto que conferem proteção, estabilidade e estrutura. Ainda segundo este autor, a parede celular possui uma estrutura extremamente complexa que confere resistência suficiente para suportar ataques bióticos e abióticos e enfrentar a alta pressão osmótica interna. Portanto a parede celular é um compartimento metabolicamente ativo da célula que participa diretamente de diversos processos fisiológicos da planta em resposta às variações ambientais.

A estrutura e a composição da parede celular variam em função do grupo estudado, do tipo de tecido avaliado (Fangel *et al.* 2012), do estágio de desenvolvimento (Suzuki & Itoh 2001; Lybeer & Kock 2005) e das condições de estresses bióticos e abióticos incluindo seca, alagamento, calor, frio, salinidade, metais pesados, luz e poluentes atmosféricos (Gall *et al.* 2015). Essas variações nas características físico-químicas e ultra-estruturais da parede celular são controladas pela composição relativa de vários componentes da parede que incluem a celulose, a lignina, as hemiceluloses, pectinas, bem como entre as interações entre esses polissacarídeos (Patahill *et al.* 2015)

A parede celular atingiu, com a evolução, níveis elevados de complexidade tanto na estrutura de seus polissacarídeos como na forma como estes interagem entre si. Sendo assim, a composição da parede celular também está ligada à filogenia nos grandes grupos de plantas (Popper *et al.* 2011).

Tendo em vista que, diferenças na arquitetura da planta, implicam em diferenças nas propriedades mecânicas dos órgãos (Taiz 1984; Wolf *et al.* 2012) é esperado que a estrutura da parede celular varie em função do hábito da plantas, ou seja, plantas com porte diferente requerem tecidos com diferentes propriedades mecânicas. Espécies com hábito escandente, por exemplo, demandam menor estrutura de suporte, uma vez que estão apoiadas em outras plantas.

Comparativamente, plantas que dependem da rigidez dos próprios tecidos para crescer investem mais em tecidos de sustentação.

1.1 Caracterização química da parede celular

A parede celular é constituída por polissacarídeos, proteínas e compostos aromáticos distintos, sendo que, tanto a composição molecular quanto os arranjos entre estes componentes diferem entre espécies, tecidos, células e até regiões da parede de um mesmo protoplasto (Carpita *et al.* 2015).

A parede celular é composta basicamente por açúcares (em média 90%), sendo que os monossacarídeos presentes na parede são relativamente constantes (Fry 1988; Brett & Waldron 1996) e organizados em polissacarídeos como a celulose (**Fig. 1**), polímero linear constituído por unidades de glucose ligadas entre si por ligações glicosídicas β -(1-4) (Purves 1954; Marchessault & Sundararajan 1983), sendo este o principal composto da parede celular de plantas superiores.

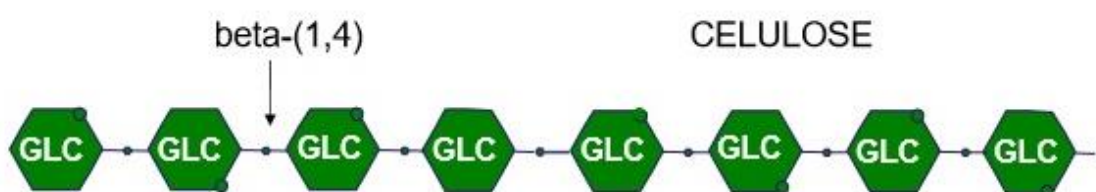


Figura 1. Estrutura linear da celulose. GLC = glucose. Fonte: Adaptado de Buckeridge *et al.* 2008.

As hemiceluloses são polímeros que interagem fortemente com a celulose, sendo as mais abundantes os xiloglucanos presentes em monocotiledôneas não-comelinóides e eudicotiledôneas (Hayashi & Kaida 2010). Estes são polissacarídeos que, como a celulose, possuem uma cadeia principal composta por glucose unidas por ligações β -(1 $\rightarrow$ 4) com ramificações de ligação α -(1 $\rightarrow$ 6) de resíduos de xilose, ou ainda pode conter ramificações de galactose ligada à xilose (**Fig. 2**) (White & Rao 1953; McCann & Roberts 1991). As ramificações com xilose são muito comuns e, na maioria, a cada quatro ou cinco glucoses não possuem tais ramificações (Buckeridge *et al.* 2008), é importante ressaltar que são nestes pontos

onde não ocorrem as ramificações os únicos pontos de acesso ao ataque de endo- β -glucanases. Outro polímero de hemicelulose é o manano.

Os mananos puros são constituídos por manoses unidas por ligações do tipo β -(1 $\rightarrow$ 4) e podem ser classificados como galactomananos e galactoglucomananos (Meier & Reid 1982).

Os galactomananos possuem ramificações em sua cadeia principal com galactose ligadas por ligações glicosídicas do tipo α -(1 $\rightarrow$ 6). Os galactoglucomananos possuem uma cadeia principal constituída por manose e glucose intervaladas, ligadas por ligações β -(1 $\rightarrow$ 4) e ramificações com galactose unidas por ligações α -(1 $\rightarrow$ 6) (Meier & Reid 1982; Buckeridge *et al.* 2008).

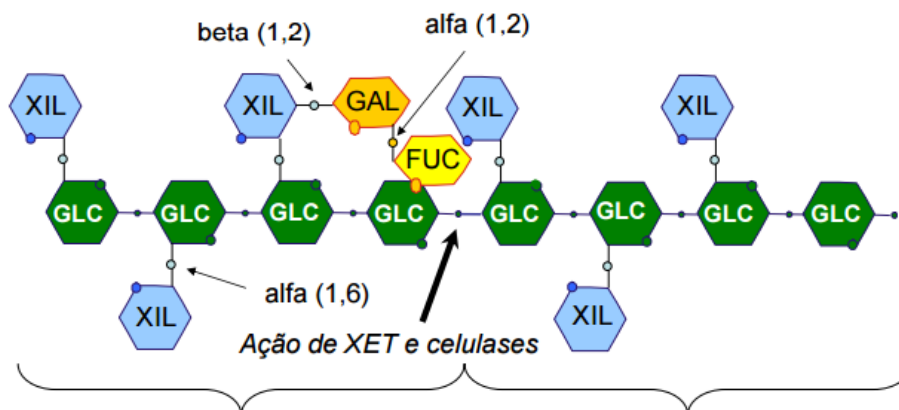


Figura 2. Xiloglucano, suas ramificações e pontos de ataque de endo- β -glucanases. GLC = glucose, FUC = fucose, GAL = galactose e XIL = xilose. Fonte: Adaptado de Buckeridge *et al.* 2008.

Os glucuronoarabinoxilanos, também conhecidos como GAX, são polímeros ácidos muito comumente encontrados em monocotiledôneas com cadeia constituída de xiloses unidas por ligações β -(1 $\rightarrow$ 4) e ramificadas com arabinose e ácido galacturônico. Os β -glucanos, encontrados em monocotiledôneas da ordem Poales, são polímeros de glucose ligadas entre si por ligações β -(1 $\rightarrow$ 4) e obstruções de ligações β -(1 $\rightarrow$ 3), são também chamados de glucanos de ligação mista e não possuem ramificações (Fig. 3).

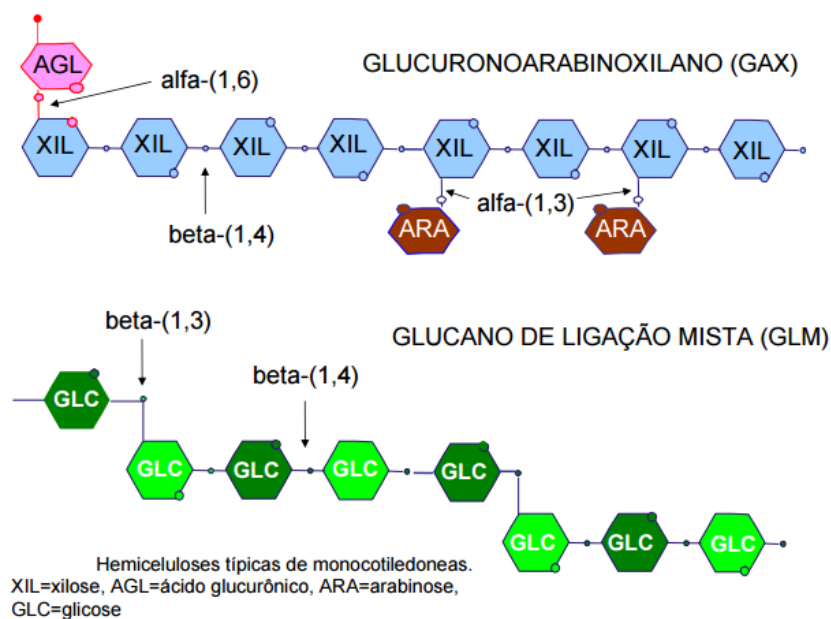


Figura 3. Estrutura dos polímeros de Hemicelulose: glucuronoarabinoxilano (GAX) e glucano de ligação mista (GLM). AGL = ácido glucurônico, ARA = arabinose, XIL = xilose e GLC = glicose. Fonte: Adaptado de Buckeridge *et al.* 2008.

Outros polímeros como as pectinas que possui caráter ácido devido à presença de ácido galacturônico unido por ligações do tipo α -(1 $\rightarrow$ 4) em sua cadeia central compõe a parede celular (Buckeridge *et al.* 2008). Os autores ainda dizem que esta pode ser interrompida por unidades de ramnose que podem estar ligadas a galactanos e arabinanos. Podemos classificar as pectinas em dois principais tipos: as não ramificadas, homogalacturonanos, e as ramificadas denominadas ramnogalacturonanos (Fig. 4). A parede ainda conta com, aproximadamente, 10% de proteínas. Estas podem ter tanto função estrutural quanto enzimática (Buckeridge *et al.* 2008).

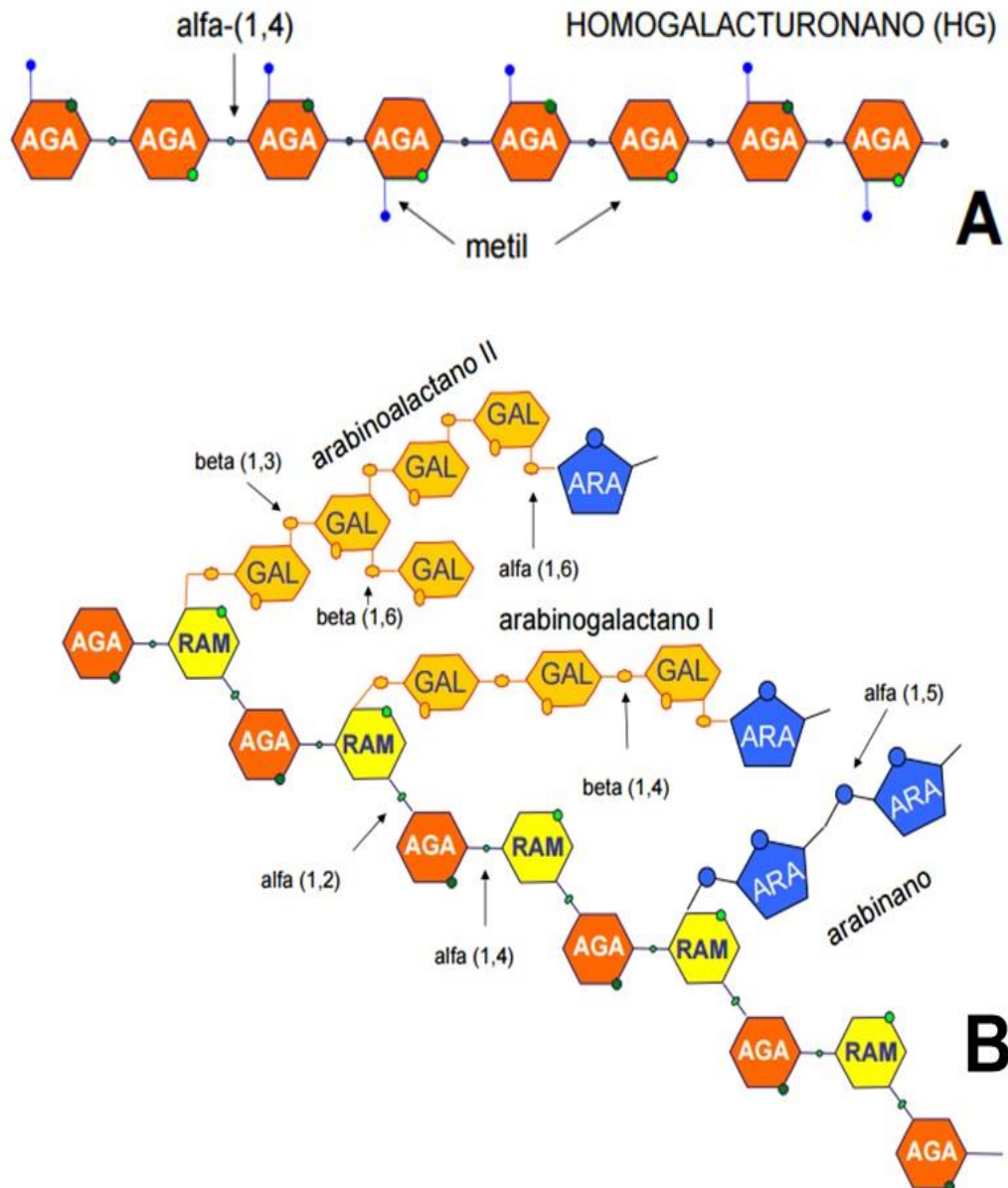


Figura 4. Estrutura das Pectinas. A – Homogalacturonano. B – Ramnogalacturonano. AGA = ácido galacturônico, RAM = ramnose, GAL = galctose, ARA = arabinose. Fonte: Adaptado de Buckeridge *et al.* 2008.

A lignina é também um composto da parede celular vegetal que se caracteriza por ser derivada da polimerização de 3 diferentes unidades monoméricas de álcoois: *p*-cumaril, coniferil e sinapil. Estes álcoois são os precursores das

unidades fenilpropanóidesguaiacil (G), Siringil (S) e *p*-hidroxifenil (H) (Barbosa *et al.* 2008).

Em 1973, Peter Albersheim e seus colaboradores sugeriram o primeiro modelo tridimensional desses polímeros (**Fig. 5**) (Keesgtra *et al.* 1973). No modelo, a parede celular vegetal foi interpretada como uma rede de polímeros interligados por ligações covalentes, formando assim uma estrutura rígida. Além disso, as microfibrilas de celulose estariam interagindo fortemente com o xiloglucano.

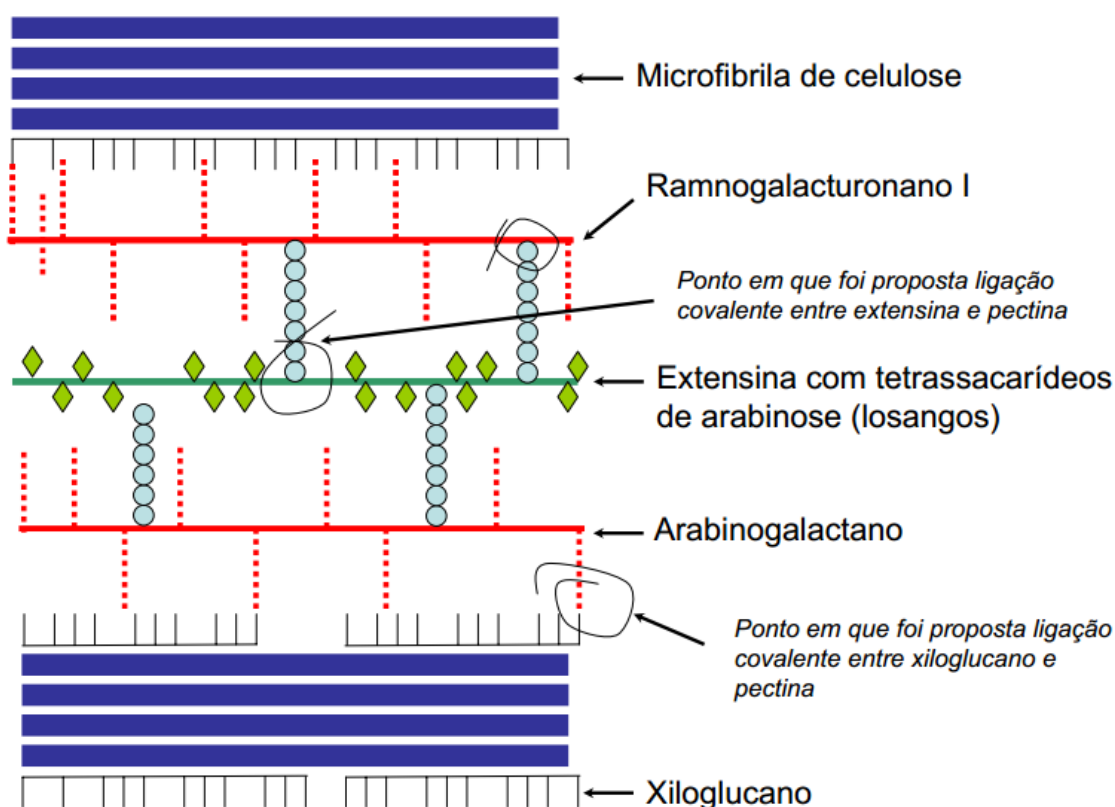


Figura 5. Primeiro modelo de parede celular proposto por Peter Albersheim e colaboradores. É possível notar na imagem as ligações covalentes (alguns exemplos circulados), principal forma de manter os polissacarídeos interligados. Fonte: Adaptado de Buckeridge *et al.* 2008.

Após o primeiro modelo, vários autores procuraram explicar as ligações covalentes sugeridas pelo grupo de Peter Albersheim, mas nada foi encontrado fazendo com que o modelo fosse refutado. Contudo, em 1991, McCann & Roberts propuseram um outro modelo no qual sugeriram que a parede era formada por três

domínios independentes: celulose-hemicelulose, pectinas e o das proteínas. Neste modelo as ligações covalentes não existiam.

Posteriormente, outros modelos foram sugeridos até que, em 1993 Carpita & Gibeaut estudaram melhor a teoria dos três domínios e propuseram que a parede celular deveria ser classificada em duas categorias em função da composição das hemiceluloses. A parede tipo I, presente nas eudicotiledôneas, apresenta como principal hemicelulose o xiloglucano (cerca de 60%) além de celulose, pectinas em quantidade equivalente a 30% e 10% de proteínas. Já a parede tipo II possui o arabinoxilano como hemicelulose principal, além disso apresenta um menor teor de pectinas e xiloglucanos se comparada com a parede tipo I. Este tipo de parede é uma característica das gramíneas que também pode apresentar os β -glucanos ou glucanos de ligação mista. Recentemente, foi sugerido um terceiro tipo de parede celular, cuja principal hemicelulose é o manano; tal parede foi encontrada em Pteridófitas (Silva *et al.* 2011).

Na literatura podemos encontrar vários comparativos entre as composições de parede celular de monocotiledôneas. Por, exemplo, em monocotiledôneas, encontramos três hemiceluloses: xiloglucano, arabinoxilano e os β -glucanos, sendo que os xiloglucanos em gramíneas, por exemplo, estão em baixa concentração (Smith & Harris 1999). Já em monocotiledôneas comelinóides o xiloglucano é a principal hemicelulose encontrada. Nas gramíneas as duas hemiceluloses mais abundantes são os β -glucanos ou glucanos de ligação mista e os arabinoxilanos (Carpita & Gibeaut 1993; Carpita 1996). Um estudo realizado com colmos de *Sasa senanensis* Rehd., uma espécie de bambu, mostrou a principal hemicelulose é um arabinoglucuroxilano derivado do xilano (Yoshida *et al.* 1998). Em cana-de-açúcar, foi observado que, embora os polissacarídeos nas paredes de folhas e colmos sejam semelhantes, estes diferem na proporção de xiloglucanos e arabinoxilanos (Souza *et al.* 2013).

Segundo Suzuki & Itoh (2001), o teores de lignina total em *Phyllostachys* spp. foram de 23-26% (Maekawa e Koshijima 1983; Itoh 1990). Tais valores são inferiores aos 25-32% encontrados em *Eucalyptus* spp. (Schöning & Johansson 1965) e aos 30% que constituem *P. thumbergii* (Hafrén *et al.* 1999).

A lignina é o componente principal da parede celular de fibras, células do parênquima e vasos condutores em bambus lenhosos (Lybeer 2006). Em estudos sobre a lignificação durante o crescimento, Itoh (1990) concluiu que há um

aumento progressivo da lignificação nas paredes das fibras e nas células do parênquima. Entretanto, Murphy & Alvin (1997) e Lin *et al.* (2002) observaram que o teor de lignina era crescente durante a maturação. Contudo, nenhum destes estudos investigou a parede celular caracterizando diferentes espécies com distintas formas de crescimento.

1.2 Família Poaceae

A família Poaceae, dentro da qual estão inseridos os bambus, é uma das mais importantes famílias dentre as Angiospermas que compõe a flora nacional sendo composta por cerca de 700 gêneros e, aproximadamente, 10 mil espécies (Judziewicz *et al.* 1999) sendo considerada a quarta maior família em número de espécies no mundo (Watson & Dallwitz 1992), além disso sua importância econômica é incontestável (Schmidt & Longhi-Wagner 2009).

O Brasil é o país com maior diversidade de espécies de bambu do Novo Mundo (Judziewicz *et al.* 1999), o que compreende 89% dos gêneros e 65% das espécies de bambus conhecidas distribuídas entre a Mata Atlântica, o Cerrado e a Amazônia (Filgueiras & Santos-Gonçalves 2004). Atualmente a família Poaceae está dividida em 12 subfamílias, dentre estas, Bambusoideae Lierss. com aproximadamente 1200 espécies (GPWG 2001).

1.2.1 Subfamília Bambusoideae

A Subfamília Bambusoideae é monofilética (**Fig. 6**) e suas espécies estão distribuídas dentro de três tribos: Bambuseae, onde encontram-se os bambus lignificados tropicais, Olyreae, que compreende os bambus herbáceos e Arundinariaeae, que engloba os bambus lignificados temperados (Filgueiras & Santos-Gonçalves 2004; Kelchner *et al.* 2013).

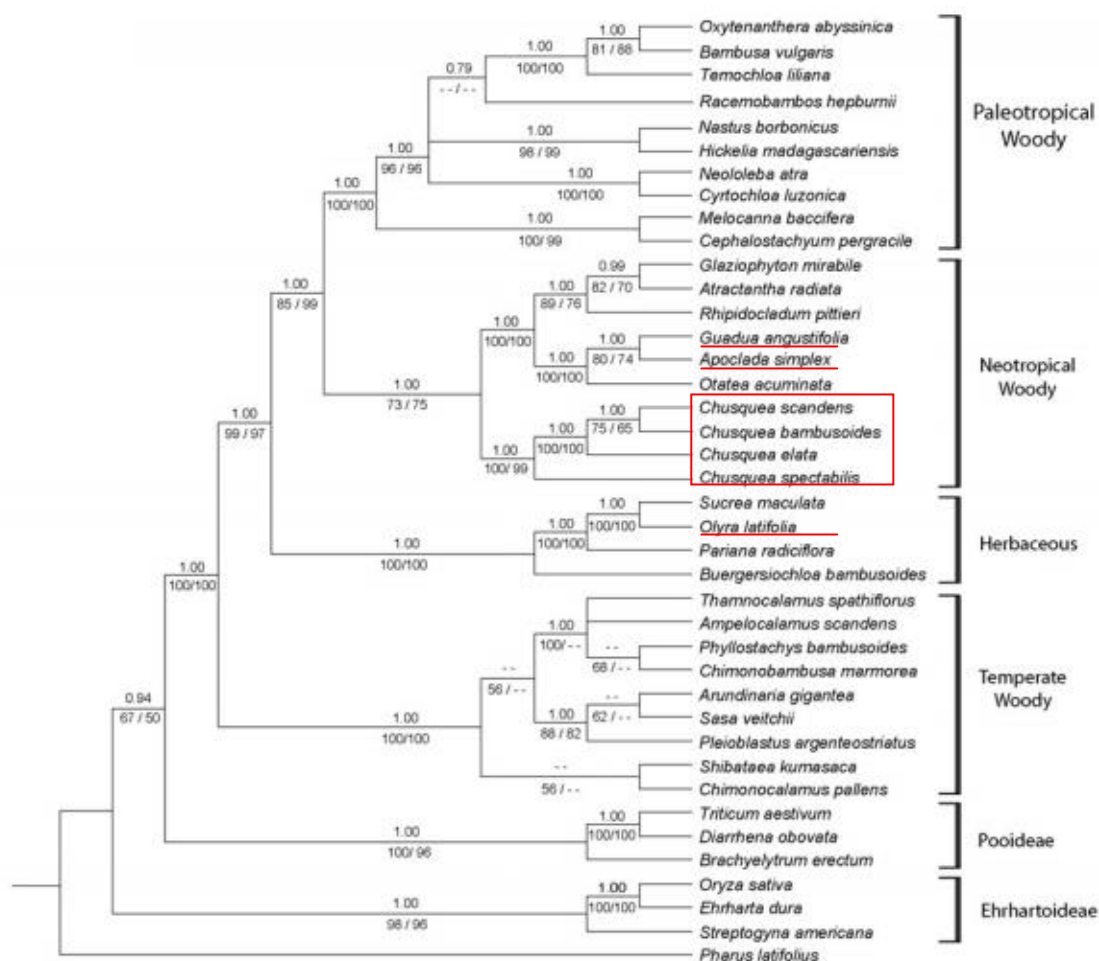


Figura 6. Filogenia da subfamília Bambusoideae com base em seqüências de DNA plastidial (cloroplasto) de cinco loci: ndhF, rpl16 intron, rps 16 intron, trnD-trnT e trnL-trnF. Fonte: Adaptado de Kelchner *et al.* 2013

A tribo Bambuseae é representada por um grande número de gêneros de bambus encontrados como componentes do estrato arbustivo e arbóreo de florestas e cerrado, dentre os quais podemos destacar os gêneros *Aulonemia* Goudot, *Merostachys* Spreng., *Guadua* Kunth, *Chusquea* Kunth e *Apoclada* McClure (Judziewicz *et al.* 1999; BPG 2012). A tribo Olyreae inclui bambus herbáceos que são importante componente deste estrato nas florestas neotropicais (Oliveira & Longui-Wagner 2005).

Bambus são plantas que apresentam uma grande amplitude ecológica em resposta às perturbações do dossel e podem se tornar espécies dominantes após a abertura de clareiras de origem natural ou antrópica (González *et al.* 2002). A capacidade de crescimento agressivo (Griscom & Ashton 2003; 2006) e

plasticidade de traços funcionais como, por exemplo, a adaptação de plantas de hábito arbóreo para escandente está entre as estratégias de ajuste morfológico relacionadas ao mecanismo de expansão e ocupação de espaço (Filgueiras, T.S. comunicação pessoal).

Apesar do empenho em identificar e classificar as espécies da família Poaceae, ainda existem poucos trabalhos que investigam a composição da parede sob o aspecto filogenético, evolutivo e ecológico. Alguns estudos têm com espécies asiáticas de bambus mostraram teores de lignina total em *Phyllostachys* spp. de 23-26% (Maekawa & Koshijima 1983; Itoh 1990; Suzuki & Itoh (2001), valores estes, inferiores aos 25-32% encontrados em *Eucalyptus* spp. (Schöning & Johansson 1965) e 30% em *Phyllostachys thumbergii* (Hafrén *et al.* 1999). Outro estudo mostrou que colmos de *Sasa senanensis* Rehd apresentaram como principal hemicelulose um derivado de xilano uma espécie de arabinoglucuroxilano (Yoshida *et al.* 1998).

Contudo, de acordo com a literatura, até o momento, nenhum trabalho avaliou, para a família Poaceae, a relação entre o hábito e a composição da parede, criando assim uma lacuna de conhecimento que precisa ser investigada.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a parede celular de cinco espécies de bambus lenhosos da tribo Bambuseae e de uma espécie de bambu herbáceo da tribo Olyreae. Nossa expectativa é a de que bambus com diferentes hábitos apresentem diferenças na composição da parede celular .

2.1 Objetivos específicos

Definir a composição de polissacarídeos presentes nas paredes celulares das espécies estudadas em função da composição de monossacarídeos neutros.

Construir árvores de similaridades para comparar a estrutura dos polissacarídeos a fim de verificar se a estrutura e composição da parede celular refletem o hábito das plantas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Todos os espécimes tiveram a coleta do terço intermediário do colmo da planta a fim de evitar tecidos ainda em desenvolvimento e/ou diferenciação. Os indivíduos coletados em triplicata no campo e foram trazidos para laboratório, fragmentados (para acelerar a secagem), secos em estufa a 60° C e moídos em moinho de facas até a obtenção de um pó. Não foi feita separação de nó e entrenó. As descrição, localização e caracterização de cada uma das espécies estão presentes na tabela 1 e figura 13.

Filgueirasia arenicola (McClure) G.F. Guala e *F. cannavieira* (McClure) G.F. Guala, subtribo Arthrostylidiinae, são plantas de colmo ereto, espessado, liso, glabro, verde e oco que crescem formando touceiras vigorosas com altura entre 0,4 a 1,18 metros e com rizoma paquimorfo apresentam um grande potencial forrageiro, por possuírem níveis aceitáveis de proteína bruta e boa digestibilidade (Guala 2001). São encontradas em campos nativos, sendo importantes para o gado e para a fauna nativa (Judziewicz *et al.* 1999; Guala 2001). Possuem grande potencial ornamental por terem porte médio e por permanecerem verdes o ano todo, além de sobreviverem a frequentes queimadas naturais (Soderstrom 1981; Soderstrom *et al.* 1988; Filgueiras 1988; Guala 1995, 2000). No Brasil são encontradas na parte central no Planalto Brasileiro, especificamente nos Estados de Goiás, Mato Grosso e Minas Gerais e no Distrito Federal (Guala 2003; Londoño 2004). *F. cannavieira* foi coletado no município de Cavalcante, GO (13°41,968”S; 47°27,979”W; 994m de elevação) e *F. arenicola* foi coletado no Parque Nacional das Emas, no município de Mineiros, GO (18°6’23’S; 52°55’40’W) (**Fig. 7**).

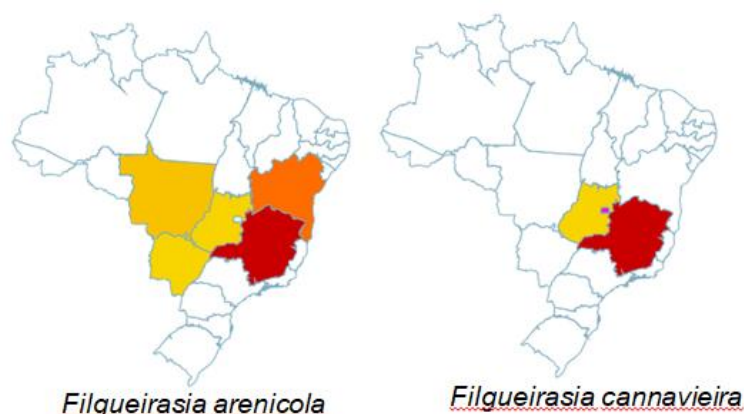


Figura 7. Distribuição geográfica das espécies *Filgueirasia arenicola* e *F. cannavieira*. Fonte: Disponível em

<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB32237>> e

<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB32238>> acesso em 19/10/2017.

Chusquea capituliflora Trin. var. *pubescens* McClure & L.B, subtribo Chusqueinae, é uma espécie heliófila, de colmos eretos a escandentes que apresentam comprimento entre 4-10 metros. Espécie nativa do bioma Mata Atlântica, com distribuição conhecida nas regiões sudeste (MG, RJ, SP) e sul (PR, RS, SC) (Shirasuna 2011) (**Fig. 8**). O material foi coletado no Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI) (23°39'25,40"S;46°37'41,95"W).



Figura 8. Distribuição geográfica da espécie *Chusquea capituliflora* Trin. var. *pubescens*. Fonte: Disponível em

<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB106280>> acesso em 19/10/2017.

Guadua tagoara (Ness) Kunth, subtribo Guaduinae, é uma planta de colmos eretos na base, com 8-20m. Espécie nativa de áreas secundárias na Mata Atlântica

com ampla distribuição neste bioma (**Fig. 9**). Local de coleta: Guarulhos, SP (23°23'28,8"S; 46°25'24,4"W)



Figura 9. Distribuição geográfica da espécie *Guadua tagoara*. Fonte: Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB13253>> acesso em 19/09/2017.

Merostachys riedeliana Rupr. ex Döll, subtribo Arthrostylidiinae, é uma espécie heliófila, subereta, com altura entre 3-5 metros, ocorre exclusivamente na mata pluvial da encosta Atlântica formando densas touceiras. Área de ocorrência: estados de São Paulo e Santa Catarina (Shirasuna 2011) (**Fig. 10**). Material coletado no Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI) (23°38'35,60"S;46°37'10,51"W).



Figura 10. Distribuição geográfica da espécie *Merostachys riedeliana*. Fonte: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB13347>> acesso em 19/10/2017.

Parodiolyra micrantha (Kunth) Davidse & Zuloaga, subtribo Olyrinae, é um bambu herbáceo, com colmos monomórficos, 0,5-3m altura, eretos na base, escandentes a pendentes no ápice. É uma espécie nativa da Mata Atlântica comum em floresta secundária, bordas de florestas e áreas alteradas (**Fig. 11**). A espécie foi coletada no Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI) (23°39'15,37"S; 46°37'25,20"W).



Figura 11. Distribuição geográfica da espécie *Parodiolyra micrantha*. Fonte: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB13424> > acesso em 19/10/2017.

Tabela 1. Pontos de coleta e hábitos de *Filgueirasia arenicola* (McClure) G.F.Guala e *F. cannavieira* (McClure) G.F. Guala no estado de Goiás e de *Apoclada simplex* McClure & Smith, *Chusquea capituliflora* Trin. var. *pubescens* McClure & L.B., *Guadua tagoara* (Ness) Kunth, *Merostachys riedeliana* Rupr. ex Döll e *Parodiolyra micrantha* (Kunth) Davidse & Zuloaga no estado de São Paulo.

Subtribo	Espécie	Hábito	Local de coleta
Arthrostylidiinae	<i>Filgueirasia arenicola</i> (McClure) G.F.Guala e <i>F. cannavieira</i> (McClure) G.F.Guala	Arbustivo	Reserva Quilombola no município de Cavalcante, GO e Parque Nacional das Emas, GO
Chusqueinae	<i>Chusquea capituliflora</i> Trin. var. <i>pubescens</i> McClure & L.B.	Escandente	Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI), SP
Guaduinae	<i>Guadua tagoara</i> (Ness) Kunth	Arbóreo/ Escandente	Guarulhos, SP
Arthrostylidiinae	<i>Merostachys riedeliana</i> Rupr. ex Döll	Arbóreo	Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI), SP
Olyrinae	<i>Parodiolyra micrantha</i> (Kunth) Davidse & Zuloaga	Herbáceo/ Arbustivo	Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI), SP

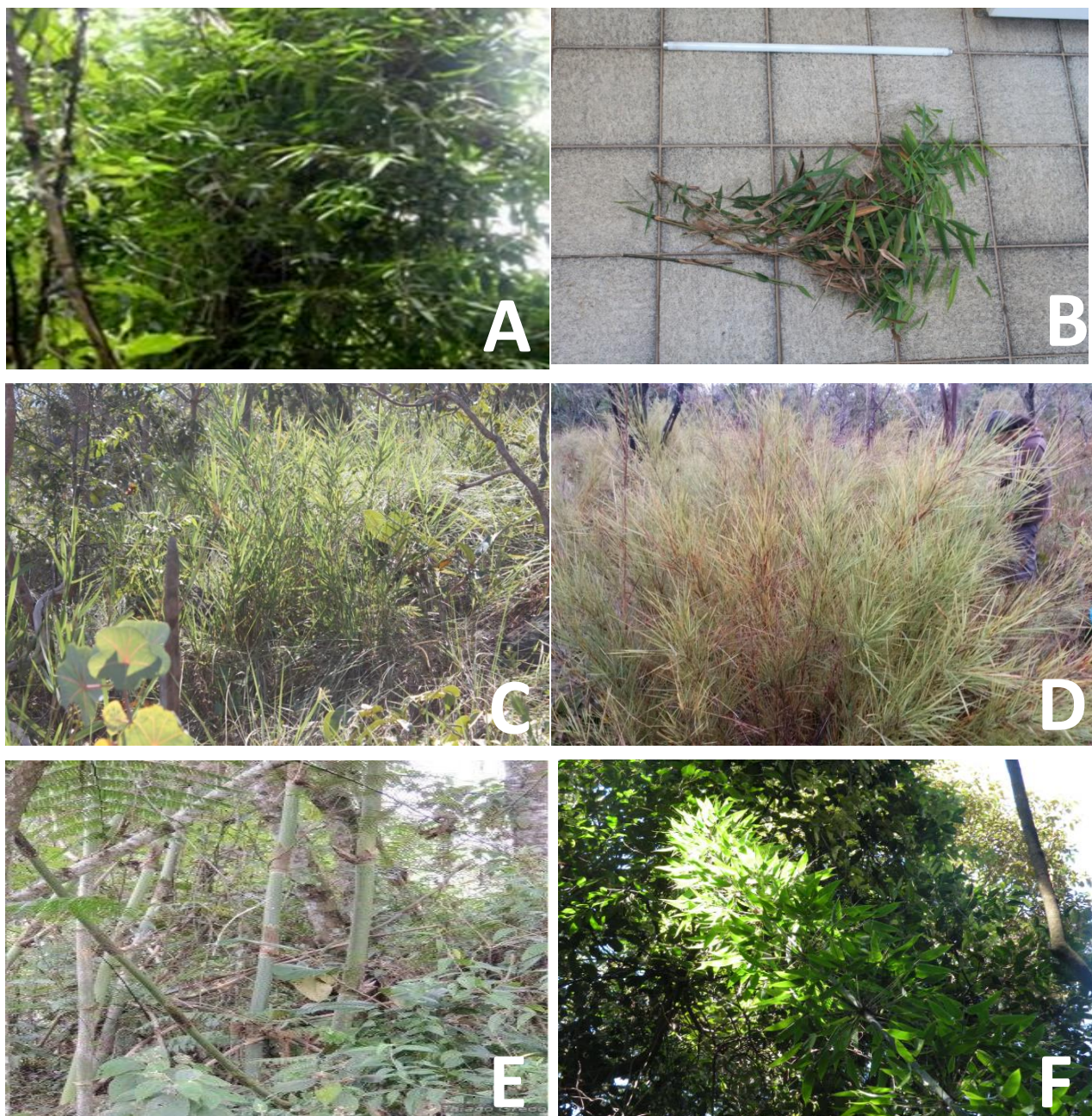


Figura 12. Fotos ilustrativas das espécies estudadas. A – *Chusquea capituliflora*, B – *Parodiolyra micrantha*, C – *Filgueirasia arenicola*, D – *Filgueirasia cannavieira*, E – *Guadua tagoara* e F – *Merostachys riedeliana*.

Fonte: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB13253>> acesso em 19/09/2017)

3.2 Remoção de Açúcares Solúveis

Cerca de 1g de material liofilizado, de cada uma das seis espécies, foi submetido à remoção de açúcares solúveis em cinco extrações com 25 mL de etanol a 80% e mantidos a 80°C por 30 minutos. Em seguida, foram centrifugados a 10.000g e a 2100 rpm. Após a remoção dos açúcares solúveis o resíduo foi seco em liofilizador (modificado de Carvalho *et al.* 1998).

3.3 Remoção de Amido

Foi adicionado ao precipitado da extração de açúcares solúveis 20 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) 90% (v/v) para remoção do amido. A mistura foi mantida em agitação constante por 24h em escuro, modificado de Carpita & Kanabus (1987). Ao termino da extração, o material foi centrifugado e o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com água destilada e liofilizado.

3.4 Fracionamento da Parede Celular

Os polissacarídeos de parede celular foram extraídos com um fracionamento da parede celular em condições sucessivamente mais estridentes. Os resíduos da extração anterior (item 3.3) foram submetidos a três extrações com 20 mL de oxalato de amônio (0,5%), para extração de pectinas, com agitação durante 1h em banho à 80°C com posterior centrifugação, sendo o sobrenadante dialisado, liofilizado e submetidos a dosagens de ácidos urônicos (Filisetti-Cozi & Carpita 1991), usando como padrão ácido galacturônico e o resíduo resultante lavado com água destilada e liofilizado. A lignina foi removida com clorito de sódio 3% e ácido acético 0,3% a 65°C durante uma hora (Carpita 1984). O material insolúvel foi submetido à nova extração com 25 mL de hidróxido de sódio 0,1M, resultando na fração solúvel em álcali fraco (principalmente pectinas). O resíduo insolúvel foi então extraído com 25 mL de hidróxido de sódio a 1M e depois com 4M para obtenção da fração solúvel em álcali forte (hemiceluloses). Estas frações foram neutralizadas, dialisadas e liofilizadas para que o rendimento dos polímeros da

parede celular fosse estimado (modificado de Gorshkova *et al.* 1996). Os resíduos foram lavados em água destilada, liofilizados e pesados e seus rendimentos também foram estimados.

3.5 Análise de Monossacarídeos por HPAEC/PAD

Para análise de composição dos monossacarídeos, 2 mg das frações de paredes celulares foram hidrolisadas com 500 µL de ácido trifluoroacético 2N (TFA) em ampolas de 2 mL que foram seladas em bico de Bunsen. O material foi autoclavado por 1 hora a 120°C a 1,5 atm. Os hidrolisados foram recolhidos e evaporados em aparelho “speed vac”, lavados com 500 µL de etanol e, novamente evaporados e ressuspensos em 1,5 mL de água deionizada para serem analisados. Os hidrolisados foram quantificados quanto ao teor de açúcares totais pelo método de fenol-sulfúrico (Dubois *et al.* 1956). A composição de monossacarídeos neutros foi determinada por cromatografia de troca aniônica de alta performance com detector de pulso amperométrico (HPAEC/ PAD) em sistema Dionex ICS3000, coluna Carbo-Pac PA 1, em eluição isocrática com NaOH 16 mM por 40 minutos. Os perfis de eluição dos monossacarídeos presentes nos hidrolisados foram comparados com aqueles obtidos para padrões de monossacarídeos comerciais.

3.6 Lignina

Foi adicionado 500 µL de ácido sulfúrico a 72% a 50 mg de material (resíduo da extração etanólica). O material foi incubado em banho-maria a 30°C por 45 minutos. Após incubação, foi diluído o ácido a 4% com água destilada e levado para autoclavar por 1h a 121°C. O hidrolisado foi centrifugado a 2000g, e o sobrenadante descartado e o resíduo lavado com água quente por cinco vezes. O material foi seco e pesado para cálculo de rendimento (Hatfield *et al.* 1994, modificado).

3.7 Comparação da composição e estrutura da parede celular dos colmos de bambu

Para se comparar a composição e a estrutura dos polissacarídeos de parede celular presentes nos colmos das seis espécies de bambus, foram realizadas digestões enzimáticas utilizando como substrato: a fração 4M de NaOH extraída dos colmos dos bambus, e a enzima β -xilanase de *Aspergillus niger* (Megazyme[®]).

A restrição no uso dessas enzimas ocorre devido ao conhecimento prévio da composição de hemiceluloses já descrito anteriormente para as espécies: no caso arabinoxilanos (xilanase).

Os perfis de oligossacarídeos foram obtidos conforme descrito por Souza *et al.* (2013). A partir de 1% (peso/volume) da fração 4M de NaOH em tampão acetato de sódio 50mM, pH 5, como substrato. Estes foram incubados com 0,5U/mL da enzima β -xilanase durante 24h a 30°C para avaliar a estrutura do arabinoxilano.

3.8 Análise de oligossacarídeos por HPAEC/PAD

Os perfis de oligossacarídeos foram analisados por cromatografia de troca aniônica de alta performance com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em sistema Dionex ICS3000, coluna Carbo-Pac PA 1, usando NaOH 88mM e acetato de sódio 200mM como eluentes em fluxo de 0,9mL/min por 50 min (Souza *et al.* 2013).

3.9 Estatística

As médias dos rendimento (3 réplicas biológicas e 3 réplicas técnicas) de cada um dos tratamentos do fracionamento da parede celular comparadas utilizando uma ANOVA unidirecional (com extracto ou fração como efeito principal), seguido de um Dunn para comparar os grupos de tratamento com um único grupo controle (Zar 1999). A ANOVA não paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de Dunn's, é utilizada quando os dados normalmente não são distribuídos

com variações iguais em todos os tratamentos (Zar 1999). O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$. Realizamos todas as análises estatísticas usando o programa de software SigmaStat 3.5, SPSS Inc., EUA.

3.10 Diagramas de similaridade

A partir da tabela de integração dos cromatogramas da análise dos oligossacarídeos gerados pela digestão enzimática da fração NaOH 4M com β -xilanase de *Aspergillus niger* (Megazyme[®]) construiu-se um diagrama de similaridade com auxílio do programa *Statistica* 12 (Statsoft) usando como cálculo de distância o *city-block*. A análise foi feita a partir três triplicatas técnicas de três indivíduos de cada espécie.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises do fracionamento da parede celular

Os dados do fracionamento da parede celular dos colmos de seis espécies de bambus nativos: *Chusquea capituliflora*, *Filgueirasia arenicola*, *Filgueirasia cannavieira*, *Guadua tigoara*, *Merostachys riedeliana* e *Parodiolyra micrantha*, que apresentam portes e hábitos distintos são mostrados na tabela 2.

Os rendimentos obtidos através do fracionamento da parede celular mostram que, de modo geral, os bambus avaliados apresentaram baixo teor da fração oxalato de amônio, indicando um baixo teor de pectinas (**Tab. 2**). Não foram encontrados ácidos urônicos em nenhuma das espécies avaliadas. Tais resultados ratificam o descrito pela literatura para gramíneas, cuja uma parede celular tipo II apresenta baixos teores pécicos (Carpita & Gibeaut 1993).

Os rendimentos de lignina tiveram diferenças significativas entre as espécies, sendo que *Parodiolyra micrantha* apresentou o menor teor de lignina. Em cana-de-açúcar, o teor de lignina é o dobro nas folhas (4,5%) que no colmo (2,5%) (Souza *et al.* 2013), sugerindo que a lignina está mais relacionado a outras funções, como por exemplo proteção contra UV e contra ataque de patógenos. Embora Fukushima & Savioli (2001) tenham encontrado maior teor de lignina nos

colmos, as forrageiras analisadas tinham hábito rasteiro e estavam submetidas à mesma de quantidade de luz UV que as folhas e não tinha a função de sustentação de uma planta ereta.

O maior rendimento do fracionamento foi obtido com NaOH 4M, com exceção de *G. tagoara* que possui maior rendimento no resíduo. Vale salientar que *G. tagoara* é a espécie de maior porte e, portanto, necessita de maior tecido de sustentação e dessa forma possui maior teor de celulose. O gênero *Guadua* é caracterizado por uma alta resistência mecânica, durabilidade e fácil manuseio como um material de construção e substituto para a madeira, o que levou a chama-lo de aço vegetal (Pereas Rivas *et al.* 2003). Ainda segundo os autores, o gênero *Guadua* cresce rapidamente em comparação com outros tipos de madeira, podendo atingir em 5 anos 30 metros de altura, diferente de uma árvore comum que necessitaria de 15 ou 20 anos para atingir esta altura e no clima correto, pode chegar até onze centímetros por dia e atinge sua altura em seis meses. Em contraponto, temos que *C. capituliflora*, espécie de hábito escandente, necessita de menos sustentação, possui menor teor de celulose na parede.

O maior rendimento da fração NaOH 0,1M foi em *P. micrantha* que possui quase o dobro das demais espécies nesta fração, mas possui um teor inferior na fração NaOH 4M. Nesta espécie o rendimento da fração clorito de sódio foi também mais alto sugerindo que parte das hemiceluloses tenha saído nessa etapa de deslignificação.

Estudos que também analisaram o teor de hemiceluloses em bambus obtiveram em média, cerca de, 27% de hemiceluloses totais (27,5% *Phillostachys bissetii*, 27,7% *P. bambusoides* e *P. heterocycla*, 26,9% *P. nigra*, 26,5% *P. reticulata*) (Higuchi 1957; Scurlock *et al.* 2000). Entretanto, Scurlock *et al.* (2000) observaram que para as mesmas espécies de bambus citadas anteriormente, o conteúdo de hemiceluloses encontrado variava conforme sua idade e período de colheita. Por exemplo, para *P. nigra* o conteúdo de hemicelulose encontrado foi de 27,7%, 27,2% e 25,8% nas idades de um, dois e 4,5 anos, respectivamente. Outros estudos com bambus revelam que, estes contêm cerca de 40 a 48% de celulose, 25 a 30% de hemicelulose e 11 a 27% de lignina (Scurlock *et al.* 2000) e, que fibras exibem uma estrutura polimalelar com lamelas largas e estreitas o que confere resistência à tração (Cho *et al.* 2008).

Tabela 2. Rendimento expresso em porcentagem das frações de parede celular e lignina e seus respectivos erros padrão. Os valores entre parêntesis são os teores de celulose presente no resíduo.

		Oxalato de amônio	Clorito de sódio	NaOH 0,1M	NaOH 1M	NaOH 4M	Resíduo
Rendimento (%)	<i>Chusquea capituliflora</i>	0.8 ± 0.2 ^a	7.0 ± 0.5 ^{ab}	6.6 ± 1.2 ^b	9.3 ± 1.0 ^{ab}	44.9 ± 1.7 ^a	31.5 ± 0.7 ^a (19.1 ^a)
	<i>Filgueirasia arenicola</i>	1.0 ± 0.01 ^{ab}	7.8 ± 0.8 ^{ab}	6.9 ± 0.3 ^b	10.2 ± 0.2 ^{ab}	42.6 ± 0.6 ^{ac}	31.6 ± 0.1 ^a (29.7 ^{ab})
	<i>Filgueirasia cannavieira</i>	1.3 ± 0.2 ^b	7.8 ± 0.8 ^{ab}	5.3 ± 0.3 ^b	10.8 ± 0.3 ^a	43.5 ± 1.4 ^{ac}	31.2 ± 0.4 ^a (30.8 ^{ab})
	<i>Guadua tagoara</i>	0.6 ± 0.2 ^a	8.3 ± 0.2 ^b	6.2 ± 0.4 ^b	6.4 ± 0.03 ^b	29.0 ± 1.1 ^b	49.5 ± 0.6 ^a (48.9 ^b)
	<i>Merostachys riedeliana</i>	1.3 ± 0.1 ^b	5.2 ± 0.4 ^a	6.6 ± 0.9 ^b	7.0 ± 0.3 ^{ab}	45.7 ± 1.6 ^a	34.6 ± 2.5 ^a (33.2 ^{ab})
	<i>Parodiolyra micrantha</i>	0.7 ± 0.1 ^a	9.5 ± 0.5 ^b	10.2 ± 0.03 ^a	8.6 ± 0.2 ^{ab}	37.8 ± 0.9 ^c	33.2 ± 0.2 ^a (32.0 ^{ab})
Lignina (%)	<i>Chusquea capituliflora</i>	19.0 ± 0.1 ^a					
	<i>Filgueirasia arenicola</i>	19.5 ± 0.3 ^a					
	<i>Filgueirasia cannavieira</i>	19.0 ± 0.4 ^a					
	<i>Guadua tagoara</i>	19.2 ± 0.3 ^a					
	<i>Merostachys riedeliana</i>	19.2 ± 0.1 ^a					
	<i>Parodiolyra micrantha</i>	15.5 ± 0.3 ^b					

*Letras diferentes indicam diferenças significativas ANOVA $p < 0.05$.

4.2 Análise de monossacarídeos neutros

A porcentagem de monossacarídeos neutros das espécies estudadas está apresentada na tabela 2. Assim como descrito na literatura (Carpita & Gibeaut 1993; Buckeridge *et al.* 2008) foi possível inferir a partir da composição de monossacarídeos que as principais hemiceluloses são arabinoxilano, glucano de ligação mista e xiloglucano.

Ao analisarmos a fração oxalato de amônio podemos observar que todas as espécies possuem um arabinogalactano como principal componente neutro da pectina. Desta forma podemos identificar dois padrões distintos de composição de hemicelulose, o primeiro formado por *C. capituliflora*, *F. arenicola* e *F. cannavieira* que possui um menor teor de glucose, o segundo formado por *G. tagoara*, *M. riedeliana* e *P. micrantha* que tem maior teor de glucose, sugerindo que o primeiro possui um menor teor de glucano de ligação mista. O mesmo padrão de separação desses grupos em função da glucose foi observado na fração NaOH 4M embora os polissacarídeos que compõem esta fração precisem ser elucidados. Na parede celular de cana de açúcar a presença de xilanos e xiloglucanos na fração NaOH 4M foi de cerca de 3% (Crivellari 2012). Em cana de açúcar, na fração oxalato de amônio foi observado uma composição semelhante dos monossacarídeos em folhas e colmos, sendo glucose e xilose os monossacarídeos mais abundantes com, aproximadamente, 60% e 34% respectivamente (Souza *et al.* 2013) resultado compatível com os dados do nosso segundo grupo. Os autores, ainda, relatam que os açúcares manose e ramnose, não foram detectados nas frações de parede celular. Outros trabalhos, também mostram xilose como principal açúcar constituindo as hemiceluloses do bagaço de cana-de-açúcar e capins (Fengel & Wegener 1984; Miranda 2010).

Nas demais frações a composição foi dominada por arabinose e xilose o que sugere que o arabinoxilano é o principal componente das frações de hemicelulose como esperado para gramíneas. A arabinose e a glucose foram os principais açúcares secundários, compreendendo 14,6% e 18,1% dos açúcares totais, respectivamente encontrados em *Bambusa rigida* Keng & Keng f. um bambu da China (Wen *et al.* 2011)

Em estudos sobre a composição da parede celular de bambus, também encontramos a xilose como principal monossacarídeo por exemplo *Bambusa rígida* foram constatados em média cerca de 73% de xilose, 15% de glucose, 6% de arabinose e 2% de galactose, entretanto fucose e ramnose não foram detectados nos colmos da espécie (Wen *et al.* 2011). Em *Phyllostachys makinoi* foi observado cerca de 85,2%, 7,9% e 6,1% de xilose, glucose e arabinose, respectivamente na fração NaOH 5% (Fengel & Shao 1984).

A razão dada por arabinose e xilose (Ara/Xil) é considerada uma medida do grau de linearidade e ramificação de arabinoxilanos, neste caso uma razão elevada nos mostra que o polímero possui cadeias muito ramificadas; enquanto uma razão baixa indica que o polímero hemicelulósico é linear e com poucas cadeias laterais (Peng & She 2014). No presente trabalho, temos que as razões Ara/Xil de todas as espécies são baixas nas frações álcalis, indicando que o polímero hemicelulósico é pouco ramificado. No arabinoxilano do bambu *Phyllostachys makinoi* a proporção de Xil:Ara foi de cerca de 17:1 (Fengel & Shao 1984) e em *Bambusa arundinace* 8:1 (Guha & Pant 1967).

Ao analisar especificamente *P. micrantha* que teve diferenças nas extrações (tab. 1), vemos que a fração NaOH 0,1M que apresenta um rendimento maior que as outras espécies são compostas basicamente de arabinoxilano (91,5%), isso corrobora a hipótese levantada anteriormente de que a hemicelulose de *P. micrantha* está sendo extraída em condições menos caotrópicas. Esta hemicelulose está fracamente ligada a outros polissacarídeos em especial a celulose. Essa interação mais fraca entre hemicelulose e celulose provavelmente está associada a uma parede mais plástica e com maior capacidade de extensão. Cabe destacar que entre as espécies estudadas está é que apresenta maior variação de porte (0,5 a 2 metros de altura) em habitats com vários níveis de perturbação.

Tabela 3. Rendimento em porcentagem molar dos monossacarídeos neutros de seis espécies de bambus nativos analisados por HPLC e seus respectivos erros padrão. Açúcares: xil – xilose e ara – arabinose.

		Porcentagem molar %						xil/ ara
		Fucose	Ramnose	Arabinose	Galactose	Glucose	Xilose	
Oxalato	<i>Chusquea capituliflora</i>	2.0 ± 0.8 ^a	10.2 ± 1.8 ^a	17.5 ± 0.7 ^a	19.5 ± 2.9 ^a	21.1 ± 1.5 ^a	29.7 ± 6.7 ^{ab}	1.7
	<i>Filgueirasia arenicola</i>	0.6 ± 0.1 ^a	5.1 ± 0.4 ^{ab}	19.5 ± 0.3 ^a	15.4 ± 1.1 ^{ab}	14.9 ± 0.4 ^a	44.3 ± 1.6 ^a	2.3
	<i>Filgueirasia cannavieira</i>	1.3 ± 0.4 ^a	7.2 ± 0.5 ^{ab}	17.2 ± 0.9 ^a	11.2 ± 0.6 ^{ab}	22.2 ± 3.9 ^a	40.9 ± 3.8 ^{ab}	2.4
	<i>Guadua tigoara</i>	0.8 ± 0.2 ^a	6.2 ± 0.3 ^{ab}	12.7 ± 2.0 ^a	9.5 ± 1.5 ^{ab}	44.2 ± 12.4 ^a	26.6 ± 8.9 ^{ab}	2.1
	<i>Merostachys riedeliana</i>	0.5 ± 0.2 ^a	1.4 ± 0.3 ^b	10.4 ± 2.9 ^a	7.9 ± 1.9 ^b	52.8 ± 14.5 ^a	26.9 ± 9.3 ^{ab}	2.6
	<i>Parodiolyra micrantha</i>	1.1 ± 0.3 ^a	6.5 ± 1.6 ^{ab}	10.5 ± 2.9 ^a	13.9 ± 3.7 ^{ab}	56.4 ± 11.5 ^a	11.6 ± 3.2 ^b	1.1

NaOH 0.1M	<i>Chusquea capituliflora</i>	0.5 ± 0.1^a	1.5 ± 0.4^{ab}	17.1 ± 2.1^a	5.7 ± 0.5^{ab}	9.2 ± 6.1^a	66.1 ± 4.3^{ab}	3.9
	<i>Filgueirasia arenicola</i>	0.5 ± 0.1^a	0.7 ± 0.04^a	19.5 ± 0.9^a	6.5 ± 0.7^{ab}	2.4 ± 0.1^a	70.5 ± 1.7^{ab}	3.6
	<i>Filgueirasia cannavieira</i>	0.7 ± 0.03^{ab}	0.8 ± 0.1^{ab}	20.8 ± 0.9^a	5.5 ± 0.4^{ab}	2.5 ± 0.1^a	69.8 ± 1.5^{ab}	3.4
	<i>Guadua tagoara</i>	0.8 ± 0.03^{ab}	0.7 ± 0.04^{ab}	14.2 ± 0.9^a	4.8 ± 0.3^a	3.7 ± 0.2^a	75.8 ± 0.5^a	5.3
	<i>Merostachys riedeliana</i>	3.9 ± 1.5^b	2.8 ± 0.8^b	17.9 ± 1.8^a	7.4 ± 0.8^b	7.9 ± 3.1^a	59.9 ± 4.6^b	3.4
	<i>Parodiolyra micrantha</i>	0.7 ± 0.02^{ab}	0.8 ± 0.06^{ab}	17.5 ± 0.4^a	4.9 ± 0.02^a	2.2 ± 0.2^a	73.9 ± 0.7^a	4.2
NaOH 1M	<i>Chusquea capituliflora</i>	1.6 ± 0.3^{ab}	1.4 ± 0.5^a	11.3 ± 1.4^a	2.9 ± 0.6^{ab}	4.5 ± 0.9^a	78.2 ± 2.7^a	6.9
	<i>Filgueirasia arenicola</i>	1.9 ± 0.1^{ab}	2.2 ± 0.1^a	10.6 ± 0.6^{ab}	5.7 ± 0.6^{ab}	3.9 ± 0.6^a	78.7 ± 0.7^a	7.5

NaOH 4M	<i>Filgueirasia cannavieira</i>	2.8 ± 0.01^a	2.4 ± 0.3^a	10.5 ± 0.3^{ab}	1.8 ± 0.1^a	4.5 ± 0.9^a	78.6 ± 1.4^a	7.5
	<i>Guadua tagoara</i>	2.1 ± 0.1^{ab}	2.3 ± 0.2^a	10.8 ± 0.2^a	1.7 ± 0.1^a	3.8 ± 0.2^a	79.4 ± 0.5^a	7.4
	<i>Merostachys riedeliana</i>	1.9 ± 0.01^{ab}	2.3 ± 0.1^a	10.8 ± 0.4^a	2.5 ± 0.6^{ab}	3.37 ± 0.8^a	79.2 ± 0.6^a	7.3
	<i>Parodiolyra micrantha</i>	1.2 ± 0.2^b	1.5 ± 0.6^a	7.6 ± 0.2^b	4.0 ± 0.3^b	4.3 ± 0.5^a	81.3 ± 0.9^a	10.7
	<i>Chusquea capituliflora</i>	0.6 ± 0.1^a	1.0 ± 0.1^a	8.9 ± 1.2^a	4.5 ± 0.4^a	25.4 ± 1.2^a	59.5 ± 2.6^a	6.7
	<i>Filgueirasia arenicola</i>	0.5 ± 0.02^a	1.2 ± 0.2^a	7.8 ± 0.5^a	5.6 ± 0.3^a	24.3 ± 2.2^a	60.6 ± 2.7^a	7.8
	<i>Filgueirasia cannavieira</i>	0.7 ± 0.1^{ab}	1.9 ± 0.4^a	8.6 ± 1.4^a	4.8 ± 0.6^a	22.6 ± 1.6^a	61.5 ± 1.6^a	7.2
	<i>Guadua tagoara</i>	0.6 ± 0.02^a	1.4 ± 0.1^a	11.1 ± 1.4^a	5.6 ± 0.2^a	18.2 ± 3.8^a	63.2 ± 5.0^a	5.7

	<i>Merostachys riedeliana</i>	0.7 ± 0.1^{ab}	1.4 ± 0.2^a	9.4 ± 0.6^a	5.9 ± 0.4^a	15.7 ± 0.7^a	67.0 ± 1.8^a	7.1
	<i>Parodiolyra micrantha</i>	0.9 ± 0.1^b	1.3 ± 0.1^a	10.6 ± 0.5^a	5.8 ± 0.5^a	24.1 ± 2.9^a	57.4 ± 1.8^a	5.4
Resíduo	<i>Chusquea capituliflora</i>	0.1 ± 0.01^a	0.06 ± 0.01^a	0.6 ± 0.01^a	$0.1 \pm 0.01^{a*}$	97.8 ± 0.1^a	1.3 ± 0.1^a	2.3
	<i>Filgueirasia arenicola</i>	0.06 ± 0.01^b	0.03 ± 0.0^b	0.3 ± 0.05^a	0.06 ± 0.01^b	98.8 ± 0.2^b	0.8 ± 0.1^b	2.6
	<i>Filgueirasia cannavieira</i>	0.05 ± 0.0^b	0.03 ± 0.0^b	0.2 ± 0.05^a	0.05 ± 0.0^b	98.9 ± 0.1^b	0.8 ± 0.1^b	3.3
	<i>Guadua tagoara</i>	0.05 ± 0.0^b	0.03 ± 0.0^b	0.2 ± 0.05^a	0.05 ± 0.0^b	98.9 ± 0.1^b	0.8 ± 0.1^b	3.2
	<i>Merostachys riedeliana</i>	0.05 ± 0.0^b	0.03 ± 0.0^b	0.2 ± 0.03^a	0.05 ± 0.0^b	98.8 ± 0.1^b	0.9 ± 0.1^b	4.4
	<i>Parodiolyra micrantha</i>	0.05 ± 0.0^b	0.03 ± 0.0^b	0.2 ± 0.02^a	0.05 ± 0.0^b	98.8 ± 0.1^b	0.8 ± 0.1^b	4.1

*Letras diferentes indicam diferenças significativas ANOVA $p < 0.05$.

4.4 Análise de oligossacarídeos e diagrama de similaridade

Diante do predomínio do arabinoxilano como principal hemicelulose optou-se por fazer uma análise da estrutura fina dos oligossacarídeos baseado no “finger printing” obtido por digestão enzimática.

O perfil de oligossacarídeos de todas as espécies é semelhante ao encontrado em cana de açúcar (**Fig. 9**) em diferentes proporções mesmo que neste ponto não seja possível identificar os oligossacarídeos, construímos um diagrama de similaridade.

Os três grupos formados não condizem com a literatura. Na filogenia mais recente de bambus, os gêneros *Apoclada* e *Guadua* estão mais próximos fazendo parte da subtribo Guaduinae está subtribo forma um grupo monofilético, ou seja, compartilham um ancestral comum e, portanto, características em comum com a subtribo Arthrostylidiinae constituída por espécies dos gêneros *Merostachys* e *Filgueirasia*. Essas duas últimas subtribos formam um grupo irmão com a subtribo Chusqueinae grupo que abriga o gênero *Chusquea* (Kelchner *et al.* 2013).

A construção do diagrama de similaridade (**Fig. 10**) resultou na formação de três grupos: *C. capituliflora*/*G. tagoara*, *M. riedeliana*/*P. micrantha* e *F. arenicola*/*F. cannavieira* mostrando que a estrutura do arabinoxilano não corrobora a filogenia do grupo. Assim como visto por Silva *et al.* (2011) com samambaias, não é possível correlacionar à composição a filogenia do grupo. Isso se deve por a parede ser estrutura celular multifuncional e a influencia de fatores bióticos e abióticos faz com que sua estrutura e composição sejam dinâmicas (Carpita *et al.* 2015; Gall *et al.* 2015).

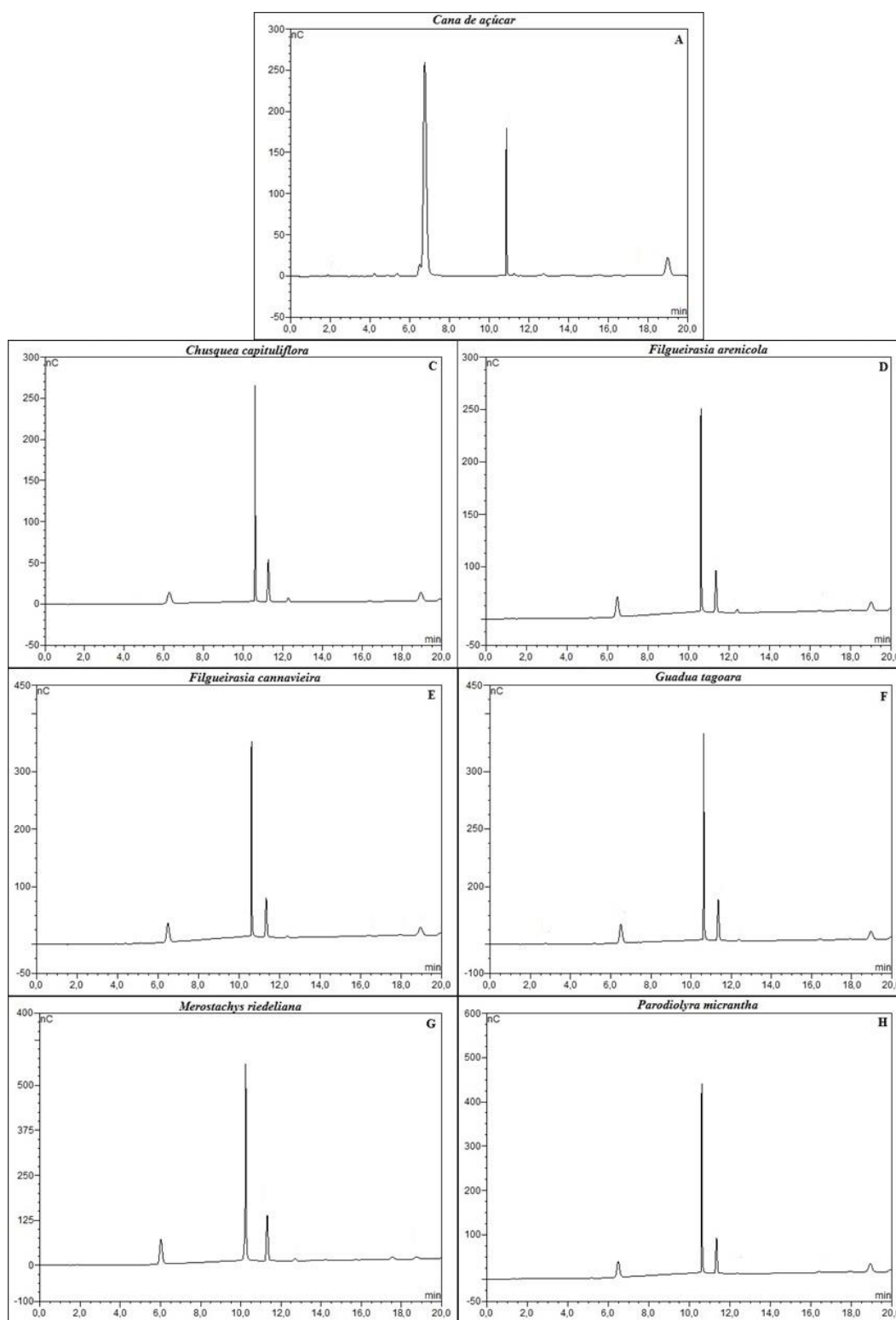


Figura 13. Cromatogramas representativos dos oligossacarídeos de arabinoxilano produzidos a partir da digestão da fração NaOH 4M com β -xilanase de *Aspergillus niger* (Megazyme®) e analisados em HPAEC/PAD – ICS 3000 das seis espécies em estudo, sendo a cana de açúcar utilizada como “padrão”.

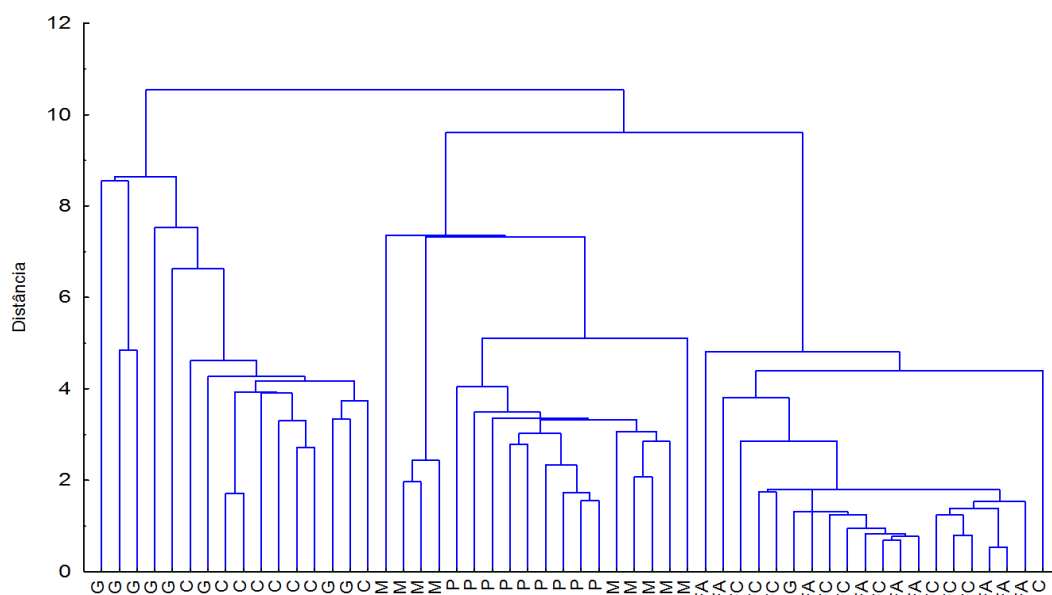


Figura 14. Diagrama de similaridade construído a partir dos oligossacarídeos gerados pela digestão enzimática da fração NaOH 4M com β -xilanase de *Aspergillus niger* (Megazyme[®]) e o auxílio do programa *Statistica* 12 (Statsoft) usando como cálculo de distância o *city-block*. Espécies: C – *Chusquea capituliflora*, FA – *Filqueirasia arenicola*, FC – *Filqueirasia cannavieira*, G – *Guadua tagoara*, M – *Merostachys riedeliana*, P – *Parodiolyra micrantha*.

5. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que o teor de celulose está relacionado com o hábito da planta. A espécie *Guadua tagoara* possui hábito arbóreo e necessita de muita sustentação, apresentando maior teor de celulose, por outro lado à espécie *Chusquea capituliflora* possui hábito escandente necessitando menor sustentação, apresentando menor teor de celulose.

A composição da parede celular nas espécies seguiu o padrão esperado, parede celular tipo II, onde o arabinoxilano é a principal hemicelulose encontrada com exceção da espécie *Parodiolyra micrantha* que apresentou hemiceluloses mais fracamente ligadas a parede sendo extraídas em uma fase mais branda de extração (NaOH 0,1M) sugerindo uma capacidade de extensão e expansão da parede celular o que pode explicar sua grande diversidade estrutural e plasticidade para ocupar habitats tão distintos.

O diagrama de similaridade construído resultou na divisão das espécies em três grupos que não corrobora com a filogenia do grupo, mostrando que a estrutura da parede celular não está relacionada a filogenia dos bambus.

Por conseguinte os resultados mostram que as mudanças na composição da parede celular não estão relacionadas ao hábito da planta e nem a filogenia da família Bambusoideae.

CONCLUSÃO GERAL

A presença de glucano de ligação mista e xiloglucano no colmo cheio (porção mais jovem da planta) em contraposição a presença de xilanos no colmo sugere uma mudança na estrutura da parede a partir que a planta passa de uma condição de crescimento (apíce da planta) para uma condição de sustentação (base da planta). Esta mudança provavelmente está associada a composição dos tecidos dos órgãos que possuem diferentes composições, um órgão mais rico parênquima no colmo cheio e um órgão com mais fibra no colmo oco (Liese & Weiner 1996). Nossos resultados corroboram os trabalhos que mostraram alterações na composição da parede ao longo do desenvolvimento de bambus asiáticos (Scurlock *et al.* 2000; Cho *et al.* 2008).

Nossos resultados possibilitaram concluir que a quantidade de celulose está relacionada com o hábito da planta. *Guadua tagoara*, uma espécie de hábito arbóreo que precisa de muita sustentação apresenta maior teor de celulose, no outro lado do espectro a planta com menor necessidade de sustentação, *Chusquea capituliflora* uma espécie de hábito escandente, apresentou menor teor de celulose.

No caso de *Parodiolyra micrantha*, foi observado que as hemiceluloses estão mais fracamente ligadas à parede sendo extraídas em uma fase mais branda de extração o que sugere uma capacidade de extensão da parede e pode explicar sua diversidade estrutural, assim como, a plasticidade para ocupar habitats área de sub-bosque ou mais perturbadas.

Finalmente, os resultados obtidos por este estudo, embora realizado com poucas espécies, mostram que as mudanças na composição da parede celular estão relacionadas à idade e ao hábito da planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA, L.C.A, MALTHA, C.R.A., SILVA, V.L., COLODETTE, J.L. 2008. Determinação da relação siringila/guaiacila da lignin em madeiras de eucalipto por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (PI-CG/EM). *Química Nova*, 31(8): 2035-2041.
- BPG (BAMBOO PHYLOGENY GROUP) 2012. An updated tribal and subtribal classification of the bamboos (Poaceae: Bambusoideae). *Bamboo Science and Culture: The Journal of the American Bamboo Society*, 24: 1-10.
- BRETT, C. & WALDRON, K. 1990. In *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls*. London: Unwin Hyman, p. 72.
- BRETT, C. & WALDRON, K. 1996. *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls*. 2ed. Chapman and Hall, London.
- BUCKERIDGE, M.S., CAVALARI, A.A. & SILVA, G.B. 2008. Parede Celular in Kerbauy, G.B 2ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, p. 165-181.
- BURTON, R.A., GIDLEY, M.J., FINCHER, G.B. 2010. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nature Chemical Biology*, 6: 724-732.
- CARPITA, N.C. 1996. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47: 445-476.
- CARPITA, N.C. & GIBEAUT, D.M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 3:1-30.
- CARPITA, N.C. & KANABUS, J. 1987. Extraction of starch by dimethyl sulfoxide and quantitation by enzymatic assay. *Analytical Biochemistry*, 161: 132-139.
- CARPITA, N.C., RALPH, J. & MCCANN, M.C. 2015. *The Cell Wall in* BUCHANAN, B.B., GRUISSEM, W. & JONES, R. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. 2^a ed., editora Wiley Blackwell, p1264.
- CRIVELLARI, A.C. 2012. Caracterização estrutural das hemiceluloses de paredes celulares de cana-de-açúcar. Dissertação para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas, na Área de Botânica. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, p. 93.

- DUBOIS, M., GILLES, A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. & SMITH, F. 1956. Colorimetric method of determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-355.
- FANGEL, J.U., ULVSKOV, P., KNOX, J.P., MIKKELSEN, M.D., HARHOLT, J., POPPER, Z.A. & WILLATS, W.G.T. 2012. Cell wall evolution and diversity. *Frontiers in Plant Science*, 3: 1-8.
- FENGEL, D., SHAO, X. 1984. A chemical and ultrastructural study of the bamboo species *Phyllostachys makinoi* Hay. *Wood Science and Technology*, 18(2): 103-112.
- FENGEL, D. & WEGENER, G. 1984. *Wood-chemistry, ultrastructure, reactions*. New York: Walter de Gruyter, p. 613.
- FILGUEIRAS, T.S. 1988. Bambus nativos do Distrito Federal (Graminaeae: Bambusoideae). *Revista Brasileira de Botânica*, 11: 47-66.
- FILGUEIRAS, T.S. & SANTOS-GONÇALVES, A.P. 2004. A Checklist of the Basal Grasses and Bamboos in Brazil (Poaceae). *The Journal of the American Bamboo Society*, 18:7-18.
- FILISSETTI-COZZI, T.M.C.C. & CARPITA, N.C. 1991. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry*, 197:157-162.
- FUKUDA, H. (editor) 2014. *Plant Cell Wall Patterning and Cell Shape*. ISBN: 978-1-118-64. Wiley-Blackwell, p. 432.
- FRY, S.C. 1988. *The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis*. Longman, New York.
- FUKUSHIMA, R.S. & SAVIOLI, N.M.F. 2001. Correlação entre digestibilidade in vitro da parede celular e três métodos analíticos para a avaliação quantitativa da lignin. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2(2): 302-309.
- GALL, H.L., PHILIPPE, F., DOMON, J.M., GILLET, F., PELLOUX, J., RAYON, C. 2015. Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress. *Plants*, 4:112-166.
- GONZÁLEZ, M.E.; VEBLEN, T.T.; DONOSO, C. & VALERIA, L. 2002. Tree regeneration responses in lowland *Nothofagus* dominated forest alter bamboo dieback in South-Central Chile. *Plant Ecology*, 161: 59-73.
- GORSHKOVA, T.A., WYATT, S.E., SALNIKOV, V.V., GIBEAUT, D.M., IBRAGIMOV, M.R., LOZOVAYA, V.V. & CARPITA, N.C. 1996. Cell-wall polysaccharides of developing flax plants. *Plant Physiology*, 110: 721-729.
- GPWG 2001. Phylogeny and subfamilial classification of grasses (Poaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 88: 373-457.

- GRISCOM, B.W. & ASHTON, P.M.S. 2003. Bamboo control of forest succession: *Guadua sarcocarpa* in Southeastern Peru. *Forest Ecology and Management*, 175: 445-454.
- GRISCOM, B.W. & ASHTON, P.M.S. 2006. A self-perpetuating bamboo disturbance cycle in a neotropical forest. *Journal of Tropical Ecology*, 22: 587-597.
- GUALA, G.F. 1995. A Cladistic Analysis and Revision of the Genus *Apoclada* (Poaceae: Bambusoideae: Bambusodae). *Systematic Botany*, 20: 207-223.
- GUALA, G.F. 2000. Spatial habitat characterization and prediction for two endemic sister species of bamboo on the Cerrados of central Brazil. *Journal of the American Bamboo Society*, 14(1):21-27.
- GUALA, G.F. 2001. A brief note on the forage value of *Apoclada* species. *Journal of the American Bamboo Society*, 17: 1-3.
- GUALA, G.F. 2003. A new Genus of Bamboos from the Cerrado of Brazil. *Journal of the American Bamboo Society*, 17: 1-3.
- GUHA, S.R.D., PANT, P.C. 1967. Hemicellulose from bamboo (*Bambusa arundinacea*), *Indian Pulp Paper*, 21: 439-440.
- HAFRÉN, J., FUJINO, T. & ITOH, T. 1999. Changes in cell wall architecture of differentiating tracheids of *Pinus thunbergii* during lignification. *Plant Cell Physiol.* 40: 532-541.
- HATFIELD, R.D., JUNG, H.J.G., RALPH, J., BUXTON, D.R. & WEIMER, P.J. 1994. A comparison of the insoluble residues produced by the Klason lignin and acid detergent lignin procedures. *J. Sci. Food Agric.* 65:51-58.
- HAYASHI, T. & KAIDA, R. 2010. Functions of Xyloglucan in Plant Cells. *Molecular Plant*, p. 1-8.
- HIGUCHI, H. 1957. Biochemical studies of lignin formation III. *Physiologia Plantarum*, 10: 633-648.
- ITOH, T. 1990. Lignification of bamboo (*Phyllostachys heterocycla* Mitf.) during its growth, *Holzforschung*, 44: 191-202.
- JUDZIEWICZ, E.J., CLARCK, L.G., LONDOÑO X. & STERN, M. J. 1999. American bamboos. Washington DC. Smithsonian Institution Press, p. 398.
- KEEGSTRA, K., TALMADGE, K., BAURER, W.D., ALBERSHEIM, P. 1973. Structure of the plant cell walls. *Plant Physiology*, 51: 188-196.

- KELCHNER, S.A. & BAMBOO PHYLOGENY GROUP 2013. Higher level phylogenetic relationships within the bamboos (Poaceae: Bambusoideae) based on five plastid markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 67: 404-413.
- KRAUS, J.E., LOURO, R.P., ESTELITA, M.E.M., ARDUIN, M. 2006. A célula vegetal in *Anatomia Vegetal* Appezzato-da-Glória, B., Carmello-Guerreiro, S.M., 2ed. – Viçosa: Ed. UFV, p. 31- 86.
- LIESE, W. & WEINER, G. 1996. Ageing of bamboo culms, A review. *Wood Science and Technology* 30(2): 77-89.
- LIN, J., HE, X., HU, Y., KUANG, T. & CEULEMANS, R. 2002. Lignification and lignina heterogeneity for various age classes of bamboo (*Phyllostachys pubescens*) stems. *Physiology plantarum*, 114(2): 296-302.
- LOCKHART, J. 2015. Uncovering the Unexpected Site of Biosynthesis of a Major Cell Wall Component in Grasses. *The Plant Cell*.
- LONDOÑO, X. 2004. Distribucion, Morfologia, Taxonomia, Anatomia, Silvicultura y usos de los Bambues del Nuevo Mundo. III Congresso Colombiano de Botanica, Popayan, p. 25.
- LYBEER, B. 2006. Age-related anatomical aspects of some temperate and tropical bamboo culms (Poaceae: Bambusoideae). Tese de Doutorado em Biologia. Universiteit Gent – Faculteit Wetenschappen.
- LYBEER, B. & KOCH, G. 2005. A topochemical and semiquantitative study of the lignifications during ageing of bamboo culms (*Phyllostachys viridiglaucescens*). *IAWA Journal* 26(1): 99-109.
- MARCHESSAULT, R.H. & SUNDARARAJAN, P.R. 1983. In *Cellulose, in the Polysaccharides*. New York: Academic Press, p. 11.
- MCCANN, MC. & ROBERTS, K. 1991. Architecture of the primary cell wall. In: C.W. Lloyd (ed.). *The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form*. Academic Press, London, p109-129.
- MEIER, H. & REID, J.S.G. 1982. Reserve Polysaccharides Other Than Starch in Higher Plants. In: A of the series *Encyclopedia of Plant Physiology*, Chapter: Plant Carbohydrates I, 13: 418-471.
- MIRANDA, C. 2010. Biofuel production from water hyacinth in the Pantanal Wetland. USDA. Agricultural Research Service. *Ecophysiology & Hydrobiology*, 12(1): 77-84.

- MURPHY, R.J., SULAIMAN, O. & ALVIN, K.L. 1997. Ultrastructural aspects of cell wall organization in bamboos. In: Chapman GP (ed) The bamboos. Academic Press, Califórnia, p. 305-312.
- OLIVEIRA, R.P. & LONGHI-WAGNER, H.M. 2005. *Olyra bahiensis* (Poaceae – Olyreae): uma nova espécie para a mata atlântica do estado da Bahia, Brasil. Brazilian Journal of Botany, 28: 835-839.
- PEREA RIVAS, J., VILLEGAS J.; CERQUERA YESINITH C., PILAR, M. 2003. Evaluación y documentación de prácticas sobresalientes sobre el manejo de la cosecha y maduración de la Guadua en el departamento del Huila. Ministerio de agricultura y desarrollo rural. Huila, Neiva, Colombia.
- PATTATHIL, S., HAHN, M.G., DALE, B.E. CHUNDAWAT, S.P.S. 2015. Insights into plant cell wall structure, architecture, and integrity using glycome profiling of native and AFEXTM-pre-treated biomass. Journal of Experimental Botany, 66(14): 4279-4294.
- PENG, P., SHE, D. 2014. Isolation, structural characterization, and potential applications of hemicelluloses from bamboo: A review. Carbohydrate Polymers, 112: 701-720.
- POPPER, Z.A., MICHEL, G., HERVÉ, C., DOMOZYCH, D. S., WILLATS, W.G.T., TUOHY, M. G., KLOAREG, B. & STENGEL, D. B. 2011. Evolution and Diversity of Plant Cell Walls: From Algae to Flowering Plants. Annual Reviews of Plant Biology, 62: 567–90.
- PURVES, C.B. 1954. In Chain structure in cellulose and cellulose derivatives: Part 1 (Ott and Spurlin, eds). New York: Wiley-Interscience, p. 54.
- SCHMIDT, R. & LONGHI-WAGNER, H.M. 2009. A tribo Bambuseae (Poaceae, Bambusoideae) no Rio Grande do Sul, Brasil. Revista Brasileira de Biociência, 7: 71-128.
- SCHÖNING, A.G. & JOHANSSON, G. 1965. Absorptiometric determination of acid-soluble lignin in semichemical bisulfite pulps and in some woods and plants. Svensk Papperstidn, 18: 607-613.
- SCURLOCK, J., DAYTON, D., HAMES, B. 2000. Bamboo: An overlooked biomass resource? Biomass and Bioenergy, 19: 229-244.
- SHIRASUNA, R.T. 2011. Bambus nativos (Poaceae-Bambusoideae) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, Brasil. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, p. 244.

- SILVA, G.B., IONASHIRO, M., CARRARA, T.B., CRIVELLARI, A.C., TINÉ, M.A.S., PRADO, J., CARPITA, C., BUCKERIDGE, M.S. 2011. Cell wall polysaccharides from fern leaves: Evidence for a mannan-rich Type III cell wall in *Adiantum raddianum*. *Phytochemistry*, 72: 2352-2360.
- SMITH, B.G., HARRIS, P.J. 1999. The polysaccharide composition of Poales cell walls: Poaceae cell walls are not unique. *Biochem. Syst. Ecol.*, 27: 33-53.
- SODERSTROM, T.R. 1981. *Sucrea* (Poaceae: Bambusoideae), a New Genus from Brazil. *Brittonia*, 33: 198-210.
- SODERSTROM, T.R., JUDZIEWICZ, E.J. & CLARK, L.G. 1988. Distribution Patterns of Neotropical Bamboos. *Academia Brasileira de Ciências*, Rio de Janeiro, 1987: 121-157.
- SOUZA, A.P., LEITE, D.C.C., PATTATHIL, S., HAHN, M.G. & BUCKERIDGE, M.S. 2013. Composition and structure of sugarcane cell wall polysaccharides: implications for second-generation bioethanol production. *Bioenergy Research*, 6: 564-579.
- SUZUKI, K. & ITOH, T. 2001. The changes in cell wall architecture during lignification of bamboo, *Phyllostachys aurea* Carr. *Trees*, 15: 137-147.
- TAIZ, L. 1984. Plant cell expansion: regulation of cell wall mechanical properties. *Annual Review of Plant Physiology*, 35: 585-657
- WATSON, L. & DALLWITZ, M. 1992. The grass genera of the world. Cambridge: C.A.B. International, Wallingford, England, p. 1038.
- WEN, J.L., XIO, L.L., SUN, Y.C., SUN, S.N., XU, F., SUN, R.C., ZHANG, X.L. 2011. Comparative study of alkali-soluble hemicelluloses isolated from bamboo (*Bambusa rigida*). *Carbohydrate Research*, 346(1): 111-120.
- WHITE, E.V., RAO, P.S. 1953. Constitution of the Polysaccharide from Tamarind Seed. *J. Am. Chem. Soc.* 75(11): 2617-2619.
- WOLF, S., HÉMATY, K. & HÖFTE, H. 2012. Growth Control and Cell Wall Signaling in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 63: 381-407.
- ZAR, J.H. 1999. Biostatistical analysis. Pearson Education India.