EFEITOS DO ENTACAPONE, UM INIBIDOR DA CAFEATO O-METILTRANSFERASE, SOBRE O CRESCIMENTO E LIGNIFICAÇÃO EM MILHO (*Zea mays L.*)

Tatiane Ferreira Borges (Bolsista CNPq/Balcão), Angela Valderrama Parizotto (Coautora), Ana Paula Ferro (Coautora), Wanderley Dantas dos Santos (Coautor), Rogério Marchiosi (Coautor), Osvaldo Ferrarese Filho (Orientador), e-mail: osferrarese@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá/Departamento de Bioquímica/Centro de Ciências Biológicas/Maringá, PR.

Botânica/Fisiologia Vegetal

Palavras-chave: Lignina, via fenilpropenóides, folhas de milho.

Resumo

Modificações na composição e na estrutura da lignina podem resultar na redução da recalcitrância da parede celular. Esse é um efeito de interesse comercial e industrial por aumentar a sacarificação dos carboidratos da parede permitindo a produção de etanol de segunda geração. A cafeato *o*-metiltransferase (COMT) é uma enzima chave na via dos fenilpropanoides que leva a produção da lignina. A inibição química dessa enzima parece permitir a modificação da estrutura da lignina por reduzir a produção de ácido ferúlico, aumentando dessa forma a digestibilidade da parede celular. Neste trabalho, plântulas de milho foram tratadas com entacapone, um inibidor da COMT, por um período de 8 dias. Em seguida foram determinados parâmetros biométricos assim como os teores e a composição monomérica da lignina. Os resultados demonstraram um aumento significativo das biomassas fresca e seca das folhas, sugerindo uma maior capacidade da planta de absorver água e alocar carbono nas folhas. Não foram observadas alterações no comprimento das folhas, nos teores de lignina e na composição monomérica da lignina. Dessa forma, a inibição da COMT de milho pelo entacapone parece não alterar a estrutura da lignina.

Introdução

O recente cenário econômico e ambiental tem fortalecido a necessidade de produzir, de forma sustentável, substitutos para os combustíveis fósseis. Um importante reservatório para o biocombustível está baseado no uso de produtos de lignocelulose (Andersen et al., 2008). A celulose e a lignina

formam a lignocelulose que compõe quase a totalidade dos rejeitos de plantas utilizadas como matéria prima pela indústria, como o bagaço e a palha. Uma das principais funções da lignina é manter a integridade estrutural e rigidez da fibra e pode impedir o distanciamento das fibrilas além de adsorver parte das enzimas hidrolíticas em pré-tratamentos da biomassa (Fang et al., 2009). A parede celular de gramíneas, como o milho, é denominada de parede tipo II, apresentando altas concentrações de hidroxicinamatos, como o ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico (Carpita et al., 2001).

Os resíduos de ácido ferúlico se ligam aos polissacarídeos sendo que seus dímeros incorporados na lignina de gramíneas (Boerjan et al., 2003) podem atuar como um agente de ligação cruzada entre carboidratos e lignina ou entre carboidratos. O ácido ferúlico é produzido na via dos fenilpropanoides (via de formação da lignina) a partir de ácido cafeico pela enzima cafeato *o*-metiltransferase (COMT). Com a inibição química desta enzima e a menor produção de ácido ferúlico, parece ser possível, modificar as propriedades da parede celular das plantas de acordo com nossos interesses, como afrouxar a parede celular para uso industrial ou alimentar, com impacto reduzido sobre a planta e meio ambiente. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo, verificar se a aplicação do entacapone, inibidor enzimático da COMT, produz alterações no crescimento, no teor e na composição monomérica da lignina em folhas de milho.

Materiais e métodos

Sementes de milho IPR 114 foram acondicionadas em vasos de 1L com 350g de vermiculita. A partir do 6º dia as plântulas foram tratadas com solução nutritiva contendo entacapone nas concentrações de 0, 50, 100 e 150 µM. No 14º dia as plantas foram retiradas do sistema experimental sendo, em seguida, determinado o comprimento e a biomassa fresca das folhas. A biomassa seca foi obtida após secagem em estufa a 70°C por 48 h. Para determinação dos teores e da composição monomérica da lignina 0,3 g de folhas secas foram inicialmente homogeneizadas em tampão fosfato 50 mM. Após centrifugação o precipitado foi lavado sucessivamente com tampão fosfato 50 mM, Triton® X-100, NaCl 1 M, água e acetona. Em seguida, vinte miligramas do material seco em estufa (60°C, 24 h) foi acondicionado em tubo de vidro e, então, 500 µl de brometo de acetila 25% foram adicionados. Após 30 min a reação foi interrompida com a adição de 0,9 mL de NaOH, seguida de banho de gelo. Foi, então, adicionado as amostras 0,1 mL de hidroxilamina-HCl e 2 mL de ácido acético. O material foi centrifugado e o sobrenadante utilizado para leitura em espectrofotômetro a 280 nm. A concentração de lignina foi determinada de acordo com uma curva padrão e expressa em mg lignina/ g de parede celular.

Para determinação da composição monomérica da lignina foi usada a oxidação com nitrobenzeno. Cinquenta mg da parede celular foram adicionados em uma ampola Pyrex® contendo 1 mL de NaOH e 100 µL de nitrobenzeno. A ampola foi lacrada e a reação posta a ocorrer em estufa a 170°C por 150 min. Após oxidação, os monômeros da lignina foram extraídos com clorofórmio. Os extratos orgânicos foram secos e ressuspendidos em 1 mL de metanol. As amostras foram filtradas e analisadas por HPLC. A fase móvel utilizada foi metanol:ácido acético 4% (20:80, v:v), com fluxo de 1,2 mL min^{-1}. A leitura foi realizada a 290 nm utilizando os padrões correspondentes. Os resultados foram expressos como µg monômero/g de parede celular.

Resultados e Discussão

Os efeitos do entacapone sobre o crescimento de folhas de milho estão mostrados na tabela 1. Embora nenhuma alteração tenha sido observada no comprimento das folhas, foram constatados aumentos significativos nas biomassas fresca e seca em todas as concentrações testadas. O maior incremento nas biomassas fresca e seca, 34 e 35% respectivamente, foram encontrados após tratamento com 100 µM de entacapone. Estes resultados sugerem que a aplicação do entacapone proporcionou uma maior absorção e alocação de água e carbono nas folhas.

Tabela 1. Crescimento de folhas de plantas de milho tratadas com diferentes concentrações de entacapone.

Entacapone (µM)	Comprimento (cm)	Biomassa fresca (g)	Biomassa seca (g)
0	29.3028	1.5196	0.4301
50	29.8194	1.9312*	0.4542
100	30.3333	2.0385**	0.5794**
150	30.3889	2.0162**	0.5702**

Médias (N = 5) diferentes do controle segundo o teste de Dunnett (p< 0,05) estão assinaladas com *.

O tratamento com entacapone não alterou significativamente os teores e a composição monomérica da lignina em folhas de milho (Figura 1A e B). Estes resultados sugerem que a inibição da COMT pelo entacapone não alterou o processo de lignificação em folhas de milho. Não obstante, é possível que a produção de ácido ferúlico pela COMT tenha sido reduzida. Por sua vez, isso contribuiria para o aumento da digestibilidade da parede celular devido à redução do número de ligações cruzadas entre carboidratos e lignina ou entre carboidratos.

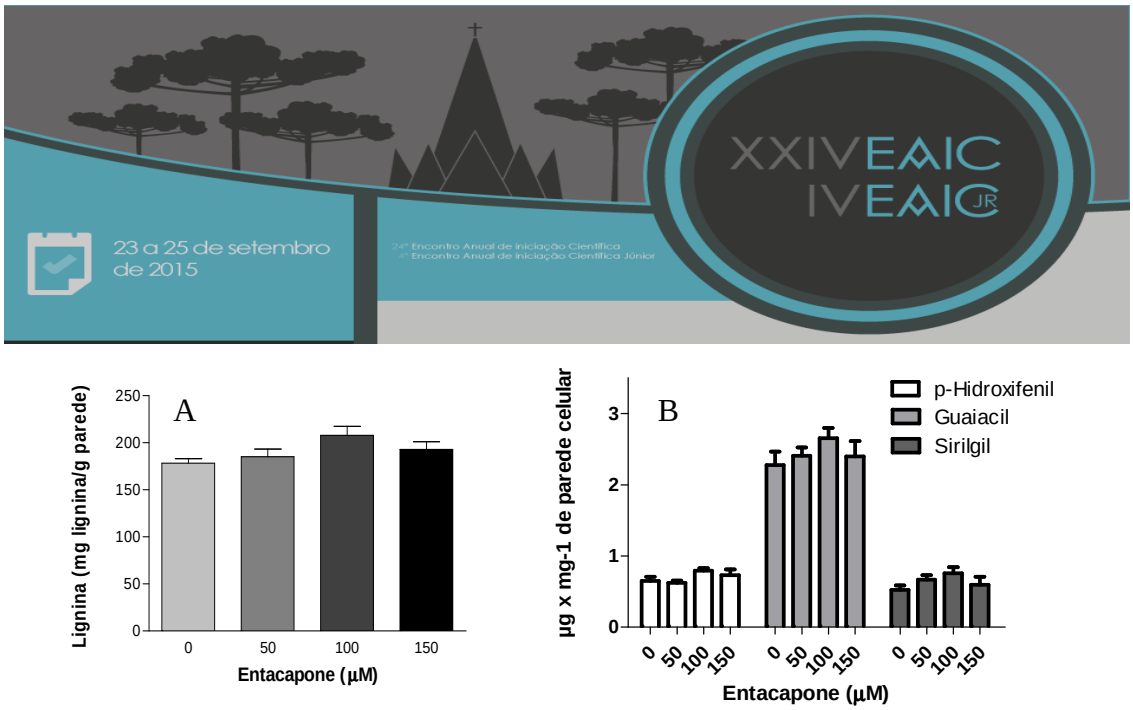

Figura 1. A) Teores de lignina e sua B) composição monomérica nas folhas de plantas de milho tratadas, ou não, com entacapone por 8 dias. Médias (*N* = 4 ± erro padrão da média) diferentes do controle segundo o teste de Dunnett, significativas em nível *p*< 0,05, estão sinalizadas com *.

Conclusões

Plantas de milho expostas ao entacapone apresentam maior alocação de água e carbono nas folhas sem qualquer evidência de alteração no processo de lignificação. Todavia, uma possível redução na produção de ácido ferúlico pela COMT, com consequente diminuição da recalcitrância da parede celular, deve ser investigada em plantas de milho expostas ao entacapone.

Agradecimentos

Ao CNPq, pelo apoio financeiro e concessão da bolsa.

Referências

ANDERSEN, Jr. ZEIN, I., WENZEL, G., DARNHOFER, B., EDER, J., OUZUNOVA, M., LUBBERSTEDT, T. Characterization of phenylpropanoid pathway genes within European maize (Zea mays L.) inbreds. **BMC Plant Biol***,* 8:2, 2008.

BOERJAN, W., RALFH, J., BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Ann Rev Plant Biol**, 54:519-546, 2003.

CARPITA, N., DEFERNEZ, M., FINDLAY, K., WELLS, B., SHOUE, D., CATCHPOLE, G., R. H., Wilson, M. C. McCann. Cell Wall Architecture of the Elongating Maize Coleoptile. **Plant Physiol,** 127: 551-565, 2001.

FANG, R. Y. Lin, X. S. Cheng. Preparation of lignin derivatives and their application as protease adsorbents**. Natural Sci,** 1:185-190, 2009.