

## ENGENHARIA FISIOLÓGICA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA: MODIFICANDO AS PROPRIEDADES DA PAREDE CELULAR COM INIBIDORES ENZIMÁTICOS DA VIA DOS FENILPROPANÓIDES

Diego Eduardo Romero Gonzaga (IC Balcão/CNPq), Wanderley Dantas dos Santos (Orientador), e-mail: [diegoerg@hotmail.com](mailto:diegoerg@hotmail.com), [wdsantos@uem.br](mailto:wdsantos@uem.br).

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

**Colégio de Ciências da Vida/ Ciências Biológicas/ Ciências Biológicas I**

**Palavras-chave:** lignocelulose, parede celular, digestibilidade.

### Resumo

A utilização de determinadas concentrações de inibidores enzimáticos que atuam na via dos fenilpropanóides, realizado em um estudo de campo recentemente, promoveram aumento na digestibilidade da planta *Zea mays*, mostrando evidências que os tratamentos realizados precocemente tendem a aumentar os efeitos quando comparado com os tratamentos tardios.

### Introdução

Na natureza, a lignina é um dos polímeros mais abundantes encontrados, ficando atrás apenas da celulose (Carpita e McCann, 2000). Há quase uma década, estudos realizados na via dos fenilpropanóides, responsáveis pela produção da lignina, foram iniciados para explorar como ocorre o seu metabolismo e qual é a sua influência na estrutura da parede celular. Alguns artifícios inovadores que estão sendo utilizados para o diagnóstico desse fenômeno são as aplicações de inibidores que atuam nas enzimas intrínsecas da via (dos Santos et al. 2008b).

Durante esses estudos, foram alcançados resultados que possibilitaram visualizar que, em determinadas concentrações, alguns inibidores enzimáticos que atuam na via dos fenilpropanóides propõem aumento na digestibilidade do bagaço da cana-de-açúcar, chegando em até 250% (Pat. Req. dos Santos e Buckeridge 2011).

Dessa forma, além de averiguar a arquitetura da parede celular, este estudo pode ser eficiente para o desenvolvimento de agroquímicos inovadores responsáveis em gerar biomassa com menor recalcitrância, não havendo a necessidade de intervenções genéticas.

### Materiais e métodos

#### *Cultivo das plantas estudadas*

Foram realizados ensaios de campo, com a planta de *Zea mays*, na Fazenda Experimental Iguatemi (FEI) da Universidade Estadual de Maringá com a aplicação foliar dos inibidores enzimáticos (I1) 1,0 e 2,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (I2) 1,0 e 2,0  $\text{mmol L}^{-1}$  e (I3) 0,5 e 1,0  $\text{mMol L}^{-1}$ . Os tratamentos foram feitos em

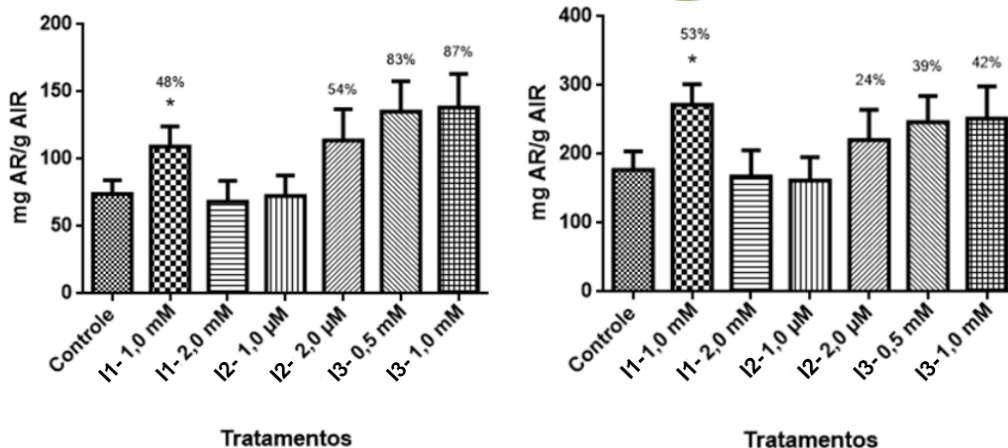
dose única de cada inibidor por aspersão foliar e as aplicações foram feitas 30 e 60 dias após a germinação (DAG). Cada tratamento foi realizado em 5 repetições onde cada parcela consistiu de uma área de 3 m<sup>2</sup>, separadas por 1 m de área de bordadura para evitar possíveis contaminações. As amostras foram coletadas na linha central de cada parcela, porém, as três linhas foram tratadas. A aspersão foi realizada manualmente por operador, que utilizou uma barra com três bicos aspersores. Para melhor espalhamento sobre a lâmina foliar, foi utilizado um adjuvante na concentração de 0,5%. As plantas tratadas 30 DAG foram colhidas 120 DAG e as plantas tratadas 60 DAG foram colhidas 120 DAG, no ponto de silagem. As plantas foram trituradas integralmente e a digestibilidade foi avaliada sobre um homogeneizado de todos os tecidos (colmo, folhas e espigas).

#### *Análise dos polissacarídeos da parede celular*

Após a coleta da biomassa, passou-se pelo processo de secagem em estufa a 60°C até adquirir peso constante. A biomassa foi triturada em moinho faca e 300 mg foram pesados em suportes específicos e estes foram incubados ao etanol, a temperatura de 60°C, até que a extração dos açúcares solúveis fosse completada. No final da lavagem, uma alíquota do sobrenadante de cada amostra foi analisada para verificar a presença de açúcares solúveis pelo método do fenol-sulfúrico, usando glicose como padrão (Dubois et al., 1956). Após o procedimento de lavagem, foi realizada a análise da digestão utilizando-se um extrato enzimático de *Aspergillus niveus* com 20 U de atividade xilanolítica. As amostras da parede celular livres de açúcares solúveis (15mg) foram ressuspensas em 928 µL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0, juntamente com 10 µL de (Azida®) e, posteriormente, homogeneizado. Em seguida, foram acrescentados 62 µL da enzima xilanase e as amostras foram incubadas por 4h e 24h a uma temperatura de 50°C. A quantificação de açúcares redutores liberados pela digestão foi feita através do método DNS (ácido dinitrossalicílico; Miller, 1959). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o Teste de Fisher – ANOVA. As Barras marcadas com um asterisco (\*) e com dois asteriscos (\*\*) foram diferentes do controle com 90% e 95% de confiança, respectivamente.

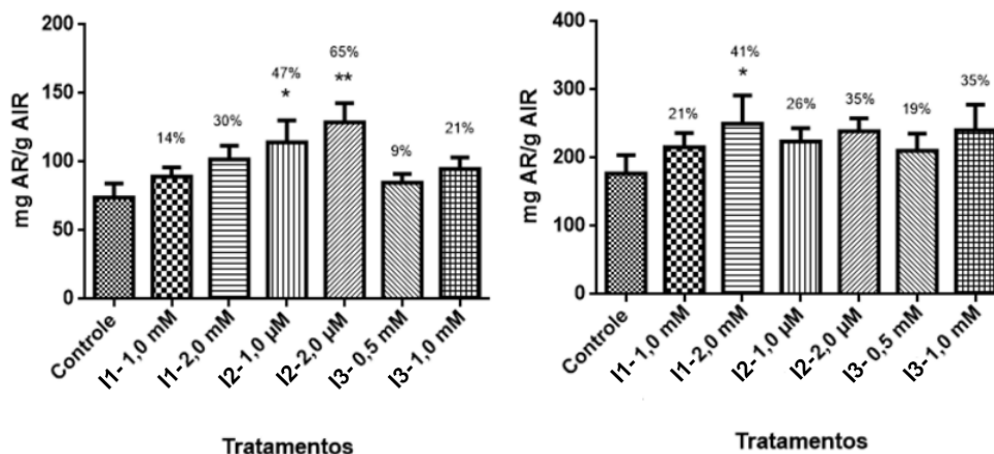
#### **Resultados e Discussão**

As figuras 1 e 2 apresentam os resultados da digestibilidade de 4h e 24h, respectivamente, das plantas tratadas 30 DAG e coletadas 120 DAG e as figuras 3 e 4 apresentam os resultados da digestibilidade de 4h e 24h, respectivamente, das plantas tratadas 60 DAG e coletadas 120 DAG.



**Figura 1** – Digestibilidade após 4 h de digestão. **Figura 2** – Digestibilidade após 24 h de digestão.

No ponto de silagem, o tratamento com I1 1 mmol L<sup>-1</sup> 30 DAG aumentou a digestibilidade em cerca de 50% tanto em 4 h (**Fig. 1**) quanto em 24 h de digestão (**Fig. 2**). As plantas tratadas por aspersão foliar 30 DAG com I2 2 mmol L<sup>-1</sup> tiveram sua digestibilidade média aumentada em 54% em 4 h de digestão (**Fig. 1**) e em 24% após 24 h de digestão (**Fig. 2**). Porém, este aumento veio acompanhado por uma grande variância, de modo que os resultados não foram significativos. Tendências ainda maiores na digestibilidade foram observadas nas plantas tratadas com I3. Nestas plantas, a digestibilidade média aumentou de 54 a 87% em 4 h (**Fig. 1**) e de 34 a 42% em 24 h de digestão (**Fig. 2**). Porém também aqui as diferenças não foram estatisticamente significativas devido à alta variância das amostras



**Figura 3** – Digestibilidade após 4 h de digestão **Figura 4** – Digestibilidade após 24h de digestão.

Após 24 h de digestão enzimática todos os tratamentos realizados 60 DAG elevaram a média da digestibilidade das plantas coletadas no ponto de silagem (**Fig. 4**). Este aumento generalizado da digestibilidade observado em 24 h é consistente com os resultados obtidos após 4h de digestão (**Fig. 3**). Todavia, em 24 h, os aumentos foram menos contundentes (19-41%) que na digestão por 4 h. Além disso, após 24 h de digestão, apenas o I1 2

mmol L<sup>-1</sup> apresentou uma diferença significativa da digestibilidade quando comparada à do controle (**Fig. 4**).

### Conclusões

As plantas tratadas 30 DAG apresentaram aumentos mais discretos na digestibilidade quando colhidas aos 60 DAG (dados não mostrados) do que quando colhidas maduras, no ponto de silagem (120 DAG). Estes resultados sugerem que o efeito dos inibidores enzimáticos sobre a digestibilidade eleva-se com o envelhecimento e endurecimento da biomassa. Assim, esse fenômeno é de grande utilidade para a pecuária, visto que o maior tempo de cultivo aumenta a produção de biomassa. Os resultados apresentados sugerem que os tratamentos permitem que a lignocelulose permaneça jovem, mesmo quando os tecidos alcançam grande maturidade. Os tratamentos 30 DAG (**Fig. 1 e 2**) foram mais dependentes das doses que os tratamentos em estágio 60 DAG (**Fig. 3 e 4**). Os tratamentos 60 DAG aumentaram a digestibilidade de modo mais consistente, ou seja, todos os tratamentos aumentaram a digestibilidade independente das doses usadas. Porém, a intensidade dos aumentos na digestibilidade foi menor que a obtida nos tratamentos precoces e a variância nos resultados foi maior.

Dessa forma, os resultados mostram que os tratamentos precoces tendem a ser mais intensos que tratamentos tardios, uma vez encontrada a dose resposta ideal para cada inibidor.

### Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq pelo apoio financeiro.

### Referências

Carpita, N., McCann, M. 2000. **The cell wall.** in: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, (Eds.) B. Buchanan, R. Jones, IL: American Society of Plant Physiologists. Rockville.

dos Santos e Buckeridge, M. S. **Patente Requerida no Instituto Nacional de Propriedade Industrial sob o número 020110095739**, Rio de Janeiro.

dos Santos, W. D., M. L. L. Ferrarese, C. V. Nakamura, K. S. M. Mourão, C. A. Mangolin, O. Ferrarese-Filho. 2008b. **Soybean (Glycine max) Root Lignification Induced by Ferulic Acid. The Possible Mode of Action.** Journal of Chemical Ecology, DOI 10.1007/s10886-008-9522-3.

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

MILLER, J.L. **Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar.** Analytical Chemistry, 31(3), 1959.