

INIBIDORES LIGNOCELULÓSICOS E A DIGESTIBILIDADE DE CANA-ENERGIA (*SACCHARUM SPP.*)

Gabriel de Oliveira Correia (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Viviane Fátima de Oliveira, Claudete Aparecida Mangolim (Orientador), e-mail: mangolimca@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Molecular/ Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas - Genética Vegetal

Palavras-chave: Cana Energia, Digestibilidade, Inibidores.

Resumo:

O uso do bagaço da cana para produção de bioetanol de segunda geração, possui inúmeros benefícios quando o impacto ambiental, produtividade e otimização da produção para as indústrias sucroalcooleiras são abordados. O bagaço tem uma vantagem, muitas vezes negligenciada, em comparação com outras fontes celulósicas, se caracteriza como um produto relativamente limpo, com baixo conteúdo de matéria estranha, e desprovido de inibidores naturais. O objetivo deste trabalho foi avaliar três inibidores de lignina, o Ácido Metilendioxicianâmico (MDCA), o Ácido Piperolínico (PIP) e a Daidzeína (DZN), para avaliar alterações no processo de deposição de lignina, digestibilidade e sacarificação em dois clones de cana-energia desenvolvidos pela RIDESA, um deles denominado de “*Tipo I*” denominado - PRBIO 172, que contém 18% de fibra e outro de “*Tipo II*” – PRBIO 130, com 23% de fibra, comparados com duas cultivares de cana-de-açúcar comerciais a RB 867515 e RB 966928, denominadas “cana convencional”. Tanto o tipo como a concentração de inibidores da via de síntese de fenilpropanóide alteraram o conteúdo de lignina e proporcionam aumento na taxa de sacarificação sendo apontados como genótipo específico. A cultivar RB 966928, que é uma cultivar sacarínica, e o clone da cana-energia PRBIO 172 apresentaram os maiores aumentos no processo de sacarificação quando pulverizadas com os inibidores PIP, DZN e MDCA. Os inibidores PIP, DZN e MDCA aumentam mais rapidamente a sacarificação do clone PRBIO 172, e mais lentamente a sacarificação do clone PRBIO 130. Esse fenômeno pode estar ligado com a arquitetura da parede celular das diferentes canas.

Introdução:

O uso do bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) para produção de bioetanol de segunda geração, possui inúmeros benefícios, como diminuir os impactos dos gases do efeito estufa, ser economicamente mais viáveis, se

caracterizar como uma fonte de energia limpa de forma geral esta fonte tem vantagens negligenciadas, em comparação com outras fontes celulósicas. Nos últimos anos começaram a ser cultivadas no país variedades de cana obtidas a partir do cruzamento das espécies *Saccharum officinarum* e *Saccharum spontaneum* e de híbridos comerciais de cana-de-açúcar. O resultado foi uma cana mais robusta, com maior teor de fibra e potencial produtivo, ideal para fabricação de biocombustíveis e outros produtos bioquímicos de segunda geração, e para geração e/ou cogeração de energia elétrica. As “supercanas” têm sido desenvolvidas por empresas como a GranBio e a Vignis e por instituições como o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), apontadas como a solução para aumentar a produtividade dos canaviais do país, produzir etanol de segunda geração (o etanol celulósico) (CTBE, 2019).

O etanol celulósico da supercana é obtido a partir de uma biomassa lignocelulósica. Segundo Fengel (1989), a biomassa lignocelulósica constitui a maior fonte de carboidratos naturais do mundo. A dificuldade de converter essa biomassa em insumos químicos é que são materiais lignocelulósicos, constituídos de fibras de celulose envolvidas em uma matriz de polioses e lignina que age como barreira natural ao ataque de micro-organismos e/ou enzimas e tornando os materiais pouco reativos. A composição química da biomassa lignocelulósica, contém 35-50% de celulose, 20-35% de hemicelulose, 10-25% de lignina e pequena quantidade de cinzas e extrativos.

A extração da celulose a partir da biomassa lignocelulósica envolve a digestibilidade do bagaço e este processo deve ser estudado e aprimorado. Estudos realizados por Freitas (2018) utilizando inibidores da via dos fenilpropanóides em milho e capim braquiária, a partir de aspersão foliar, mostram que houve um aumento na digestibilidade sem alterar o conteúdo de lignina. A hipótese no presente estudo é que o uso de inibidores pode ser uma estratégia promissora para potencializar a digestibilidade do bagaço da cana-energia. O objetivo foi avaliar três inibidores da via de síntese de lignina, o Ácido Metilenedioxícínâmico (MDCA), o Ácido Piperolínico (PIP) e a Daidizina (DZN), no processo de digestibilidade e quantificação de lignina em *Sacharum spp.*, sendo avaliadas duas cultivares de cana-energia e duas cultivares de cana-de-açúcar tradicionais.

Materiais e métodos:

No presente estudo foram utilizadas duas cultivares convencionais comerciais de cana-de-açúcar (RB 867515 e RB 966928), e mais dois clones desenvolvidos pela RIDESA. Um dos clones denominado PRBIO 172 é uma cana-energia do “Tipo I”, esta contém 18% de fibra o outro clone é do “Tipo II” e foi denominado PRBIO 130, este clone apresenta 23% de fibra. Após 60 dias da germinação, foi realizada a aspersão foliar com os inibidores da via dos fenilpropanóides com auxílio de um pulverizador manual com pressão. As plantas foram aspergidas com uma solução de ácido piperonílico (PIP) nas concentrações 0,25 e 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, uma solução de ácido 3,4-

metilenodioxicinâmico (MDCA) nas concentrações 1,0 e 2,0 mmol L⁻¹ e uma solução de daidzeína (DZN) nas concentrações 1,0 e 2,0 mmol L⁻¹. De cada cultivar e clone foram coletados ao acaso cinco colmos de quatro plantas de cada material genético e de cada tratamento totalizando um número de 20 colmos de cada tratamento. As amostras foram separadas por tratamentos e moídas.

Para a quantificação da lignina, 0,3 g de biomassa seca foi homogeneizada em 7 mL de tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ pH 7,0 com ajuda de almofariz e pistilo, e então transferida para tubo de centrífuga. A lignina foi então determinada pelo método de acetil bromida. A absorvância do sobrenadante foi medida em espectrofotômetro a 280 nm, e o conteúdo de lignina expresso em mg g⁻¹ de parede celular.

A digestibilidade enzimática – sacarificação foi realizada por um período de 4 e 24 horas utilizando um extrato de xilanase de *Aspergillus niveus*. Foi avaliada a digestibilidade dos sete tratamentos da quantificação da lignina. Para os ensaios de digestibilidade foram pesados 15 mg (0,015 g) de biomassa seca moída em tubos de 1,5 mL, que foi ressuspensionado em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0. Em seguida foi adicionado 10 µL de azida de sódio a 2% as amostras foram vortexadas até homogeneizar. Após a mistura do material, foi adicionado 20 U·mL⁻¹ de xilanase e incubado a 50°C em banho-maria por 4 e por 24 h. As leituras foram realizadas utilizando espectrofotômetro em 540 nm, utilizando DNS a 1%. Os resultados foram apresentados como mg de açúcares redutores por grama de resíduo insolúvel em álcool etílico (AIR). Para determinar se as diferenças entre as amostras são ou não significativas foi realizado o teste de Dunnett com P ≤ 0,05. Para esta análise foi utilizado o programa Graph Pad Prism® (Versão 6,0) e os valores foram expressos como a média dos experimentos independentes ± erro padrão da média.

Resultados e Discussão:

Os clones de cana-energia apresentam menor conteúdo de lignina que as cultivares sacarínicas. Os inibidores da via de síntese de fenilpropanóide pulverizados em cultivares de canas-de-açúcar comerciais (RB 867515 e RB 966928) e em clones de cana-energia (PRBIO 130 e PRBIO 172) alteraram tanto o conteúdo de lignina como também proporcionam um aumento na taxa de sacarificação. As plantas com maior conteúdo de lignina apresentam maior redução deste conteúdo e maior aumento na sacarificação do que as plantas com menor conteúdo de lignina. As plantas que produzem mais lignina, seja durante o desenvolvimento ou em resposta a estresses, são proporcionalmente mais afetadas pelo uso de inibidores.

O tipo de inibidor e as concentrações dos mesmos exibem efeitos diferenciados frente aos diferentes genótipos. Diferentes tipos e concentrações de inibidores são mais adequados para reduzir a quantidade de lignina em diferentes genótipos. O uso de inibidores da via dos fenilpropanóides (PIP, DZN e MDCA) reduz de maneira diferenciada a quantidade de lignina em genótipos diferentes de cana-de-açúcar. A cultivar

RB 966928, que é uma cultivar sacarínica e apresentou maiores ganhos na sacarificação quando foram pulverizadas com os inibidores PIP, DZN e MDCA. Para a cana-energia a pulverização com os inibidores PIP, DZN e MDCA, leva a um aumento mais rápido na sacarificação do clone PRBIO 172, e mais lento do clone PRBIO 130. Este clone apresentou os maiores aumentos no processo de sacarificação quando foi pulverizado com os inibidores PIP, DZN e MDCA.

Os inibidores PIP ($0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e DZN ($1,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $2,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) podem ser recomendados para reduzir a quantidade de lignina em clones da cana-energia PRBIO 172. Os inibidores PIP ($0,25$ e $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e DZN ($2,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) podem ser recomendados para reduzir a quantidade de lignina em clones da cana-energia PRBIO 130. Diferentes genótipos de cana-de-açúcar requerem tipos e concentrações de inibidores da via dos fenilpropanóides para reduzir a quantidade de lignina nas plantas. A ação dos inibidores PIP, DZN e MDCA parece ser mais efetiva (com menor tempo de hidrólise enzimática) no processo de sacarificação em genótipos de cana-energia com menor teor de fibras.

Conclusões:

O uso de inibidores da via dos fenilpropanóides (PIP, DZN e MDCA) reduz de maneira diferenciada a quantidade de lignina em diferentes genótipos de cana-de-açúcar e cana-energia. A ação destes inibidores parece ser mais efetiva no processo de sacarificação em genótipos de cana-energia com menor teor de fibras. A cultivar RB 966928 e o clone da cana-energia PRBIO 172 apresentaram maiores ganhos na sacarificação quando são pulverizadas com os inibidores PIP, DZN e MDCA.

Agradecimentos:

Agradecemos ao CNPq pela Bolsa concedida ao Projeto de Iniciação Científica – PIBIC/CNPq-FA-UEM.



Referências:

JORGENSEN, H.; KRISTENSEN J.B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocelluloses into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 1, p. 119 – 134, 2007.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions**, Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

Freitas, L.D, **Engenharia Fisiológica Da Biomassa Lignocelulósica: Modificando A Parede Celular Com Inibidores Enzimáticos Da Via Dos**

29º Encontro Anual de Iniciação Científica
9º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



29 a 31 de outubro de 2020

Fenilpropanoides. Maringá: UEM, 2018, p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós Graduação de Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Celular e Molecular, Universidade Estadual de Maringá, 2018.