

EFEITO DOS INIBIDORES DE SÍNTESE DE LIGNINA NA COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR EM CANA-DE-AÇÚCAR E EM CANA-ENERGIA

Gabriel de Oliveira Correia¹ (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Lucas Diego Figueiredo², Wanderley Dantas dos Santos², Claudete Aparecida Mangolim¹ (Orientador), e-mail: mangolimca@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / ¹Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular / ²Departamento de Bioquímica / Centro de Ciências Biológicas/Maringá, PR.

Área: 2.02.00.00-5 Genética / Subárea: 2.02.03.00-4 Genética Vegetal

Palavras-chave: Bioetanol 2º Geração, Lignina, Parede Celular Vegetal

Resumo:

Na produção de etanol celulósico, é interessante que as cultivares de cana contenham baixo teor de lignina e altas taxas de hemicelulose e celulose. Estes componentes estão presentes na parede celular vegetal e podem ser separados para posterior fermentação. O uso do bagaço de cana para a produção de etanol, após a conversão de seus polissacarídeos em açúcares monoméricos, promove aumento de 40 a 50% na produção de bioetanol de 2º Geração. Para a produção de etanol celulósico, seria preferido o uso de cultivares contendo níveis relativamente altos de celulose, em detrimento àquelas com níveis relativamente altos de lignina. Contudo, a lignina é importante devido ao seu maior conteúdo energético. A lignina desempenha um papel estrutural importante, evitando o acamamento da cultura no campo, mas tornando a colheita difícil. Assim, em um programa de melhoramento e de seleção de cana-de-açúcar, os benefícios da lignina precisarão ser equilibrados em contrapartida com o seu efeito negativo. O objetivo deste trabalho foi utilizar inibidores da via dos fenilpropanóides: ácido o ácido metilenodioxicinâmico (MDCA), ácido piperolínic (PIP) e daidzeína (DNZ) por meio de aspersão foliar, avaliando conteúdo de lignina e digestibilidade de 4 cultivares, duas de cana-de-açúcar “convencional” (RB867515 e RB966928), e dois clones desenvolvidos pela RIDESA em seu último estágio de melhoramento genético, um deles de “Tipo I”, com 18% de fibra e o outro de “Tipo II”, com 23% de fibra.

Introdução:

Países como Brasil, Estados Unidos, Canadá e alguns países da União Europeia, recebem investimentos tecnológicos para a produção de etanol celulósico, e esta forma pode tornar-se uma das principais opções para o setor de energia. Estudos revelam que para a produção de etanol celulósico, as cultivares devem ter baixo teor de lignina, e apresentar altas taxas de celulose e hemicelulose (Ferraz, 2016). Até o momento, a planta não é totalmente utilizada, o seu bagaço é constituído basicamente de polissacarídeos, mas a recalcitrância deste material impede a degradação destas moléculas para posterior fermentação (Chen e Liu, 2014). A parede celular pode ser separada para posterior fermentação, mas ela é resistente à degradação enzimática

(Wingre et al., 2003). A parede celular vegetal é formada principalmente pela celulose, composta por cadeias de glicoses unidas por ligações β -1,4, que estão dispostas em microfibrilas imersas em uma matriz amorfa de polissacarídeo, composta principalmente de pectinas e hemiceluloses. Na cana-de-açúcar há sugestão de que as arabinoxilanas estão fortemente ligadas à celulose. A primeira evidência da distribuição de arabinoxilana em cana-de-açúcar foi demonstrada por Costa et al. (2016) que utilizaram o anticorpo LM11 e realizaram análise imuno-histoquímica. O parênquima paliçádico e as células lignificadas ao redor dos feixes vasculares apresentam arabinoxilana em suas paredes. A última fração da parede celular da cana é composta por cerca de 10% de pectinas, sendo considerada uma valiosa matéria prima para a produção de biocombustíveis de segunda geração, há pesquisas em busca de desenvolver métodos eficientes para a bioconversão da lignocelulose para a produção de etanol. A redução no conteúdo de lignina pode afetar diretamente a sacarificação, aumentando a liberação de açúcares fermentáveis. A lignina interfere adsorvendo as hidrolases, inibindo a ação sobre a celulose e evitando que as fibras entumescam, diminuindo assim a área de ação das celulasas (Chernoglazov et al., 1998). O bagaço de cana é uma biomassa lignocelulósica, formada pela parede celular da planta, que é composta por três macromoléculas: celulose, hemicelulose e lignina. A lignina é o único componente não polissacarídico sendo formada pela polimerização de precursores fenilpropanóides. O ácido ferúlico é um ácido livre dos fenilpropanóides que inibe as hidrolases e também pode ser um intermediário na síntese dos monômeros da lignina (Santos et al., 2008).

Materiais e métodos:

Neste estudo foram utilizadas duas cultivares convencionais comerciais de cana-de-açúcar (RB 867515 e RB 966928), e dois clones desenvolvidos pela RIDESA, o PRBIO 172 é uma cana-energia do “Tipo I” com 18% de fibra e o outro clone é do “Tipo II”, denominado PRBIO 130 e contém 23% de fibra. Após 60 dias da germinação, foi realizada a aspersão foliar com os inibidores da via dos fenilpropanóides. 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- metilendioxicinâmico (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, 20 colmos de cada tratamento. As amostras de cada tratamento foram moídas. A extração e separação da hemicelulose e celulose foi baseada no uso de dois ácidos com diferentes forças iônicas para quebra das ligações sacarídicas. Inicialmente utilizou-se um ácido fraco, ácido trifluoracético, removeu-se hemicelulose da biomassa previamente macerada e lavada em Soxhlet em etanol 80%. Após solubilização da hemicelulose, as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante analisado. O pellet foi submetido a lavagem com acetona e seco em vácuo. A celulose obtida foi solubilizada em ácido sulfúrico. O sobrenadante foi analisado quantificando os açúcares presentes nos sobrenadantes utilizando o método do fenol sulfúrico. A avaliação dos compostos fenólicos presentes na biomassa, foi realizada utilizando a saponificação da biomassa. Os compostos fenólicos totais e dupla reação de

saponificação foram quantificados após hidrólise da biomassa utilizando ácido trifluoracético. Os compostos fenólicos foram analisados utilizando HPLC.

Resultados e Discussão:

As cultivares denominadas cana energia (PRBIO 130 e 172) apresentaram maior concentração de açúcares na parede em relação àquelas que são originalmente cultivadas para extração de caldo (RB867515 e RB966928). Essa diferença no conteúdo de açúcares de parede ocorre pela diferença na proporção de hemicelulose entre as cultivares, que é cerca de 40% maior na cana energia, em relação as outras cultivares. Para RB867515 os diferentes tratamentos não alteraram o conteúdo total de açúcares presentes na biomassa. Porém, foi identificado que o tratamento com PIP 1 μM reduziu o conteúdo de hemicelulose, enquanto que os tratamentos com a menor concentração DZN e as duas concentrações de MDCA reduziram significativamente o conteúdo de celulose.

Para a cultivar RB966928 apenas os tratamentos com MDCA apresentaram aumento no conteúdo total de açúcares presente na biomassa. Foi constatado que houve aumento de hemicelulose em todos os tratamentos, enquanto que os tratamentos com PIP e o tratamento com maior concentração de MDCA levou a redução na concentração de celulose da referida biomassa.

A cultivar de cana energia PRBIO 130 não apresentou alteração na estrutura sacarídica de sua biomassa, porém a análise das frações de hemicelulose e celulose demonstram que houve aumento da porção de hemicelulose no tratamento com maior concentração de MDCA. Enquanto que os tratamentos com menor concentração de PIP e as duas concentrações de MDCA levaram a redução na quantidade de celulose presente na biomassa desta cultivar.

Apenas no tratamento com maior concentração de MDCA houve redução do conteúdo de açúcares presente na biomassa da cultivar PRBIO 172. De forma oposta ao encontrado na cultivar 130, a biomassa da cultivar 172 apresentou redução no conteúdo de hemicelulose no tratamento com maior concentração de MDCA. Quanto à celulose presente na biomassa desta cultivar, os tratamentos com PIP e MDCA promoveram redução em sua quantificação.

Quando o conteúdo total de ácido *p*-cumárico nos tecidos foi avaliado nas amostras da cana 7515 não se observou diferenças, esta avaliação inclui, além das frações de hemicelulose e lignina, o conteúdo livre presente no tecido. Os tratamentos também não detectaram alterações do conteúdo de ácido *p*-cumárico ligado a hemicelulose ou a lignina. A cultivar 6928 apresentou redução significativa no conteúdo de ácido *p*-cumárico nas diferentes porções da parede celular. As cultivares de cana energia, embora tenham apresentado redução no conteúdo do ácido *p*-cumárico, somente a porção ligada a lignina e a hemicelulose para a cultivar 172 apresentou diferença significativa em relação ao controle. Avaliamos também o conteúdo de ácido ferúlico nas amostras das cultivares de cana 7515 e 6928, ambas apresentaram redução em seu conteúdo ligado a hemicelulose e observou-se redução da lignina somente para a cultivar 6928. As cultivares de cana energia não apresentaram redução no conteúdo de ácido ferúlico em nenhuma das frações e em nenhum dos tratamentos.

Conclusões:

Neste trabalho realizado em ano pandêmico, onde muitas restrições nos foram impostas, foi aperfeiçoado uma metodologia que usa ácidos com diferentes forças iônicas para solubilização das diferentes frações da parede celular, após lavagem exaustiva com etanol à 80°C por refluxo em soxhlet. Esta nova técnica possibilitou a avaliação do conteúdo de hemicelulose e celulose presente na biomassa das diferentes cultivares tratadas com os diferentes inibidores enzimáticos da via dos fenilpropanóides. A parede celular das cultivares PRBIO 172 e PRBIO 130 possui maior conteúdo de açúcar estrutural (hemicelulose e celulose) que as cultivares RIDESA 867515 e RIDESA 966928. A análise da composição bioquímica destas cultivares, mostrou que os inibidores de enzimas da via dos fenilpropanóides promoveram redução no conteúdo de ácido hidroxicinâmicos, *p*-cumárico e ferúlico comprometendo a lignificação, uma vez que estes compostos são polimerizados junto com a hemicelulose, preferencialmente nas fases iniciais do desenvolvimento atuando como compostos de defesa e de enrijecimento estrutural, mas também como pontos de ancoramento para polimerização da lignina *core*.

Agradecimentos:

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

Referências:

CHEN, H.Z.; LIU, Z.H. Multilevel composition fractionation process for high-value utilization of wheat straw cellulose. **Biotechnol Biofuels**. v. 7, n. 137, p. 1-12, 2014.

CHERNOGLAZOV, V.M.; ERMOLOVA, O.V.; KLYOSOV, A.A. Adsorption of high-purity endo-1,4- β -glucanases from *Trichoderma reesei* on components of lignocellulosic materials: Cellulose, lignin, and xylan. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 10, n. 8, p. 503-507, 1998.

COSTA, T.H.F.; VEGA-SÁNCHEZ, M.E.; MILAGRES, A.M.F.; SCHELLER, H.V.; FERRAZ, A. Tissue specific distribution of hemicelluloses in six different sugarcane hybrids as related to cell wall recalcitrance. **Biotechnol Biofuels**. v. 9, n. 99, p. 1-13, 2016.

FERRAZ, G.R. **Identificação, anotação e análise filogenética das famílias gênicas envolvidas na via de biossíntese de lignina em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. 2016. 97f. Dissertação (Mestrado) Programa de pós graduação em Biotecnologia Industrial, Escola de Engenharia de Lorena, USP, Lorena, 2016.

SANTOS, W. D.; FERRARESE, M. L. L.; FERRARESE-FILHO, O. High performance liquid chromatography method for the determination of cinnamyl alcohol dehydrogenase activity in soybean roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 7-9, p. 511-515, 2006.

WINGRE, A.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. **Biotechnol Progress**. v. 19, n. 4. p. 1109-1117, 2003.