

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

DENIS LEANDRO DE FREITAS

**ENGENHARIA FISIOLÓGICA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA:  
MODIFICANDO A PAREDE CELULAR COM INIBIDORES ENZIMÁTICOS DA  
VIA DOS FENILPROPANOIDES**

Maringá  
2018

DENIS LEANDRO DE FREITAS

**ENGENHARIA FISIOLÓGICA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA:  
MODIFICANDO A PAREDE CELULAR COM INIBIDORES ENZIMÁTICOS DA  
VIA DOS FENILPROPANOIDES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (área de concentração Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá, para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Wanderley Dantas dos Santos

Maringá  
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

F866e Freitas, Denis Leandro de  
Engenharia fisiológica da biomassa  
lignocelulósica : modificando a parede celular com  
inibidores enzimáticos da via dos fenilpropanoides  
/ Denis Leandro de Freitas. -- Maringá, 2018.  
58 f. : il. (algumas color.).

Orientador: Prof. Dr. Wanderley Dantas dos Santos.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2018.

1. Fenilpropanoides. 2. Biomassa. 3. Ácido piperonílico. 4. Ácido metilenodioxicinâmico. I. Santos, Wanderley Dantas dos, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDD 23.ed. 571.2

Síntique Raquel de C. Eleuterio - CRB 9/1641

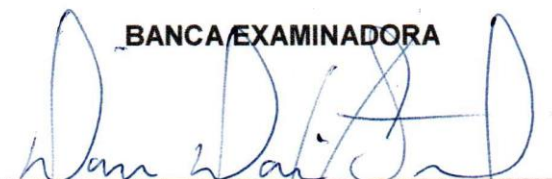
DENIS LEANDRO DE FREITAS

**ENGENHARIA FISIOLÓGICA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA: MODIFICANDO  
A PAREDE CELULAR COM INIBIDORES ENZIMÁTICOS DA VIA DOS  
FENILPROPANOIDES**


Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração - Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 27.02/2018

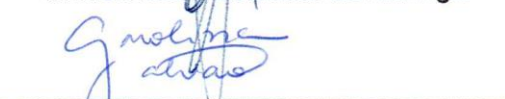
**BANCA EXAMINADORA**



Prof. Dr. Wanderley Dantas dos Santos  
Universidade Estadual de Maringá



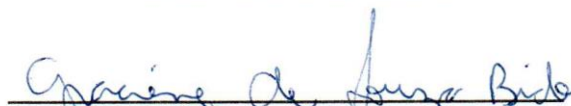
Prof. Dr. José Gilberto Catunda Sales  
Universidade Estadual de Maringá



Prof. Dra. Carolina Weigert Galvão  
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dra. Aline Finger Teixeira  
Instituto Federal do Paraná



Prof. Dra. Graciene de Souza Bido  
UniCesumar

## **BIOGRAFIA**

**Denis Leandro de Freitas**, nasceu em Ponta Grossa-PR em 27/07/1976. Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Ponta Grossa (2010) e Mestrado em Ciências Biológicas (área de concentração Biologia Evolutiva) pelo programa de Pós-graduação em Biologia Evolutiva – PPGBioEvol (2013), na mesma instituição. Tem experiência na área de ensino médio e superior atuando como professor colaborador na UEPG (2012-2013), lecionando nas disciplinas de Microbiologia e Biologia Celular. Atualmente trabalhando com temas relacionados a parede celular vegetal, lignificação, sacarificação de polissacarídeos da parede celular e produção de etanol celulósico.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente aos meus pais, Moysés Celestino de Freitas e Clair Terezinha de Freitas, pelo apoio e dedicação.

A minha esposa Andreza C. K. Freitas e minha filha, Sabrina K. de Freitas, pelo apoio e compreensão.

Ao meu orientador Prof. Wanderley Dantas dos Santos, que me deu a oportunidade de participar desse grande projeto.

Aos colegas de trabalho que ajudaram compartilhando suas experiências, com destaque ao Dyoní Mathias de Oliveira.

À técnica Aparecida Maria Dantas Ramos, pela excelente ajuda profissional e carinhoso apoio pessoal.

Aos professores Osvaldo Ferrarese-Filho e Rogério Marchiosi, pelo suporte.

Aos professores da UEPG, Carolina W. Galvão e Rafael M. Etto, pela parceria.

Aos alunos de IC, Geovana, Lidia e Diego, pela ajuda técnica.

A BASF, CAPES e ao CNPQ, pela concessão da bolsa de estudos e pelo suporte financeiro.

## APRESENTAÇÃO

Esta tese é composta de três artigos científicos. O primeiro deles, intitulado “Inibidores da via dos fenilpropanoides promovem aumento na digestibilidade da biomassa lignocelulósica de milho (*Zea mays*)”. descreve os efeitos dos ácidos 3, 4-metilenodioxicinâmico (MDCA) e piperonílico PIP e da daidzina sobre a recalcitrância da parede celular, potencializando a remoção de açúcares solúveis em biomassas lignocelulósicas. O segundo, “Aumento da digestibilidade na biomassa do capim braquiária (*Brachiaria decumbens*) com aplicação de inibidores da via dos fenilpropanoides”, demonstrando que a pulverização foliar de calda contendo os ácidos MDCA e PIP aumentam a digestibilidade enzimática da biomassa do capim braquiária utilizado como planta forrageira. Encerra com o artigo “Um método rápido e econômico para a remoção de açúcares solúveis da biomassa lignocelulósica para ensaios de digestibilidade” que apresenta um protocolo alternativo, mais rápido e econômico para remover açúcares solúveis da biomassa lignocelulósica para ensaios de digestibilidade. Em consonância com as regras do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, os dois primeiros artigos foram redigidos de acordo com as normas da revista Biomass and Bioenergy (FI = 3,219) e o terceiro da revista Methods (Elsevier) (FI = 3,802).

1. Denis Leandro de Freitas, Diego Eduardo Romero Gonzaga, Geovanna Gentilin Martins, Lídia Rodrigues Cícero, Dyoní M. Oliveira, Carolina Weigert Galvão, Fabiano Aparecido Rios, Gilberto Catunda Sales, Rogério Marchiosi, Osvaldo Ferrarese-Filho, Wanderley Dantas dos Santos. *Inibidores da via dos fenilpropanoides promovem a sacarificação da biomassa lignocelulósica de milho (Zea mays).*

2. Denis Leandro de Freitas, Diego Eduardo Romero Gonzaga, Fabiano Aparecido Rios, Gilberto Catunda Sales, Dyoní M. Oliveira, Rogério Marchiosi, Osvaldo Ferrarese-Filho, Wanderley Dantas dos Santos. *Aumento da digestibilidade na biomassa do capim braquiária (Brachiaria decumbens) com aplicação de inibidores da via dos fenilpropanoides.*

3. Denis Leandro de Freitas, Diego Eduardo Romero Gonzaga, Wanderley Dantas dos Santos. *Um método rápido e econômico para a remoção de açúcares solúveis da biomassa lignocelulósica para ensaios de digestibilidade.*

## RESUMO GERAL

**INTRODUÇÃO** – Ao longo da história evolutiva da vida no planeta, um dos eventos-chave para a conquista do ambiente terrestre foi o surgimento da via dos fenilpropanoides que permitiu às plantas se estabelecerem em terra firme. As funções dos derivados fenilpropanoides são tão diversas quanto as suas variações estruturais. Eles servem como pigmentos, antibióticos, protetores de radiação UV, repelentes de insetos, moléculas de sinalização. Graças à sua capacidade de se polimerizar, os fenilpropanoides ainda formam as unidades monoméricas da lignina, um heteropolímero dos álcoois coniferílico, sinapílico e *p*-cumarílico de difícil degradação, encontrado principalmente em paredes secundárias de células xilemáticas. Este polímero aromático confere rigidez e hidrofobicidade aos vasos, possibilitando o transporte de água a longas distâncias e proteção contra o ataque de patógenos e herbívoros, bem como reduzindo a eficiência de processos industriais voltados à sacarificação da biomassa lignocelulósica. Não obstante, modificações que reduzem o conteúdo de lignina, embora promovam a sacarificação, frequentemente reduzem o crescimento das plantas. A parede celular vegetal possui uma arquitetura complexa que se difere nos diversos grupos vegetais. Tal estrutura foi moldada ao longo de ~500 milhões de anos por processos darwinianos de mutação e seleção. Durante esse tempo ocorreu uma corrida armamentista: de um lado as plantas, que têm na parede celular uma fonte de energia e carbono, e de outro os herbívoros e patógenos. As comelinides, grupo de angiospermas que inclui as gramíneas (Poaceae), possuem uma parede celular típica, denominada parede tipo II, que se distingue dos outros grupos vegetais (não-comelinides). A principal distinção é a presença de altas concentrações do ácido ferúlico nas paredes primárias. Este fenilpropanoide aparece esterificado aos arabinoxilanos, a mais abundante hemicelulose nas comelinides. Como os monolignóis, o ácido ferúlico também pode se polimerizar interligando os arabinoxilanos entre si e ancorando-os à lignina. A reticulação dos arabinoxilanos promovida pelo ácido ferúlico está envolvida na cessação do crescimento celular e na defesa contra o ataque de patógenos, por reduzir o acesso de enzimas celulolíticas aos polissacarídeos da parede. Juntamente com a lignina, o excesso de ácido ferúlico também reduz o poder nutricional de forragens e culturas destinadas à produção de biocombustíveis de segunda geração, por outro lado, como não é essencial para o crescimento vegetal, a redução no conteúdo de ácido ferúlico estrutural não afeta a produtividade. Experimentos preliminares realizados em escala laboratorial mostram que a aplicação de inibidores de enzimas envolvidas na síntese do ácido ferúlico pode reduzir seu conteúdo na parede celular tornando-a mais fácil de ser digerida. Um maior aproveitamento da biomassa lignocelulósica pode inclusive reduzir os impactos ambientais causados pela produção agrícola e pecuária.

**OBJETIVOS** – Este trabalho teve como objetivos: 1) avaliar a sacarificação enzimática da biomassa lignocelulósica do milho, após tratamento com o ácido 3, 4-metilenodioxicinâmico (MDCA), ácido piperonílico (PIP) e daidzina (DZN); 2) avaliar a digestibilidade e a produtividade do capim braquiária após tratamento com inibidores da via dos fenilpropanoides MDCA, PIP e DZN; 3) desenvolver



um método mais eficiente para remover açúcares solúveis da biomassa em ensaios de digestibilidade.

**MÉTODOS** – Para ensaios em laboratório, sementes de milho (*Zea mays* cv. IPR-114) foram semeadas em potes plásticos (400 mL) contendo uma mistura (1:1) de vermiculita/substrato orgânico de origem vegetal e cultivadas por 15 dias em sala de cultivo sob 12 horas de fotoperíodo claro/escuro e temperatura constante (25 °C ±4). As plantas foram regadas a cada dois dias com solução nutritiva de Hoagland e a partir do 7 dia, com solução nutritiva acrescida dos inibidores (MDCA, PIP e DZN). Para os experimentos de aspersão foliar, ao 7º dia de cultivo, as plantas foram borrifadas com solução contendo o inibidor específico mais adjuvante (Aureo®) a 0,5%. Ao 15º dia, as plantas foram coletadas e uma análise biométrica foi realizada. O material foi pesado e levado a estufa a 60 °C para secagem até peso constante. Após secagem completa, todas as amostras foram trituradas em moinho de esfera e reservadas para análises de digestibilidade.

Ensaio de campo com milho (*Zea mays*) foram conduzidos na Fazenda experimental Iguatemi (FEI-UEM). Em duas áreas adjacentes foram feitas aplicações via aspersão foliar em dois tempos diferentes: com 30 e 60 dias após semeadura. Foram utilizados os inibidores MDCA, PIP e DZN. Cada ensaio foi realizado com um número de 5 repetições onde cada parcela (n) consistiu de uma área de 3 m<sup>2</sup>, separadas por 1 m de área de bordadura. A coleta foi realizada aos 120 dias após germinação. As plantas foram secas em estufa a 60 °C até peso constante. Após secagem completa, todas as amostras foram trituradas em moinho de esfera e reservadas para análises de digestibilidade.

Para dois experimentos de campo distintos, utilizamos o capim braquiária (*Brachiaria decumbens*) em uma área do Centro de Treinamento em Irrigação (CTI) da Universidade Estadual de Maringá (UEM) onde o mesmo já estava plantado. Para o primeiro ensaio, foi realizada uma roçada na área, seguida de limpeza e após 10 dias, através de sistema de irrigação, foi feita aplicação em dose única dos inibidores: (PIP) 0,5 e 1,0 µmol L<sup>-1</sup>, e (MDCA) 350 e 700 µmol L<sup>-1</sup>. Após 30 dias do tratamento, 1 m<sup>2</sup> de cada parcela foi coletado e realizado análises biométricas. O material foi pesado e levado a estufa a 60 °C para secagem até peso constante. No segundo ensaio, a aplicação foi feita 7 dias após roçada seguida de limpeza da área. A aplicação dos inibidores foi realizada via aspersão foliar como se segue: daidzina (0,5 e 1,0 mmol L<sup>-1</sup>), PIP (1,0 e 2,0 µmol L<sup>-1</sup>) e MDCA (1,0 e 2,0 mmol L<sup>-1</sup>). Após 30 dias do tratamento, 1 m<sup>2</sup> de cada parcela foi coletado cortando-se cada planta rente ao solo. Com as plantas frescas, foram feitas as análises biométricas. Mais uma vez, o material foi pesado e levado a estufa a 60 °C para secagem até peso constante. Após secagem completa, todas as amostras foram trituradas em moinho de esfera e reservadas para análises de digestibilidade, teor de lignina, ácido ferúlico, ácido cumárico e monômeros.

As biomassas de capim braquiária (*B. decumbens*), do milho (*Z. mays*) e colmo de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) foram lavadas exaustivamente com etanol por dois métodos: o primeiro consiste em incubar a biomassa em etanol a 80 °C em tubo de ensaio por 2 h com agitação periódica, ao final desse período, o sobrenadante é descartado e o procedimento repetido até eliminação completa

de açúcares solúveis. O segundo consiste em um sistema de refluxo baseado no método de Soxhlet, que lava múltiplas amostras ao mesmo tempo sem a necessidade de agitação ou troca de etanol pelo operador.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO** – A daidzina é um inibidor competitivo da coniferaldeído desidrogenase, enzima responsável pela oxidação do coniferaldeído a ácido ferúlico. No entanto, sua adição ao meio nutritivo *in vivo* não afetou a digestibilidade da planta. Uma análise do meio nutritivo revelou que glicosidases secretadas pelas raízes do milho degradavam a daidzina à sua forma aglicona (daidzeína) anulando sua atividade inibitória. A aplicação de inibidores de glicosidades, preveniu sua degradação e promoveu a digestibilidade da parte aérea do milho. A aplicação da daidzina por aspersão foliar não promoveu a digestibilidade das plantas em escala laboratorial. O PIP e o MDCA, por sua vez, promoveram aumentos de até 23% na sacarificação da parte aérea do milho quando aplicados por aspersão foliar em escala de bancada. Ensaios em escala agrícola mostraram que a aplicação dos inibidores por aspersão foliar promoveu a digestibilidade das plantas colhidas no ponto de silagem (120 dias). As plantas tratadas com MDCA e PIP 30 DAG tiveram sua digestibilidade aumentada em até 54%. Por sua vez, os tratamentos com daidzina (0,5 e 1,0 mmol L<sup>-1</sup>) elevaram a digestibilidade da parte aérea do milho em até 87%.

O tratamento do capim braquiária em campo por fertirrigação em dose única foi capaz de aumentar significativamente a digestibilidade da biomassa em 29% (PIP 1,0 μmol L<sup>-1</sup>). Os tratamentos promoveram tendências de aumento na biomassa, expansão foliar, teor de clorofila e produtividade. A significativa redução no conteúdo de ácido ferúlico, o que pode ter contribuído para a expansão foliar, devido ao seu papel no controle do crescimento celular. Os ensaios por aspersão foliar mostraram um aumento na digestibilidade com 4 h de incubação de até 18% nos tratamentos com MDCA e PIP nas menores concentrações e de 15% para o PIP na maior concentração. Após 24 h de digestão, o tratamento com MDCA elevou em 21% a sacarificação, enquanto que o PIP elevou este parâmetro em 16%, ambos nas menores concentrações.

O método de extração de sólidos solúveis por refluxo do solvente reduziu o tempo de remoção de açúcares de 18 h para 7 h ou menos, dependendo material. Devido tratar-se de um processo automatizado, sem a intervenção do operador, o método reduziu drasticamente o tempo de operação (pesagem, agitação, manuseio de líquidos). A técnica ainda reduziu o consumo de etanol em 77% e o consumo de energia elétrica em pelo menos 95% (considerando-se as amostras, mais ricas em sólidos solúveis (cana-de-açúcar).

**CONCLUSÃO** – A aspersão foliar dos três inibidores testados foi efetiva na promoção da digestibilidade da biomassa lignocelulósica do milho e do capim braquiária. Dados biométricos revelaram uma tendência consistente de aumento na produtividade com a aplicação dos inibidores. Os tratamentos apresentaram efeitos mais tardios, tanto em milho quanto em capim braquiária. Isto sugere que o efeito promovido pelos tratamentos aumenta com o recrudescimento normal da digestibilidade das plantas com a idade, sobretudo em relação à daidzina. Em nenhum dos tratamentos o conteúdo de lignina foi alterado e, de modo geral, os efeitos sobre a produtividade são inócuos ou benéficos. O sistema de lavagem por refluxo permitiu extração de açúcares solúveis em várias amostras em

paralelo, reduzindo substancialmente o consumo de solvente, energia elétrica e o tempo de operação quando comparado ao método tradicional utilizado.

Palavras-chave: *fenilpropanoides, Digestibilidade de biomassa, MDCA, PIP, daidzina*

## GENERAL ABSTRACT

**INTRODUCTION** – Throughout the evolutionary history of life on the planet, one of the key events for the conquest of the terrestrial environment was the emergence of the phenylpropanoids pathway, which allowed the plants to settle on dry lands. The functions of the phenylpropanoid derivatives are as diverse as their structural variations. They serve as pigments, antibiotics, UV protectors, insect repellents, signaling molecules and so on. Thanks to their ability to polymerize, phenylpropanoids form the monomer units of lignin, a heteropolymer of the coniferyl, synapyl and p-coumaryl alcohols. Hard to degrade, lignin is found mainly in secondary walls of xylem cells where it confers rigidity and hydrophobicity to the vessels, allowing the transport of water over long distances and protection against the attack of pathogens, herbivores as well as reducing the efficiency of industrial processes aimed at the saccharification of the lignocellulosic biomass. However, modifications that reduce lignin content, while promoting saccharification, often reduce plant growth. The plant cell wall has a complex architecture that differs in the various plant groups. Such a structure was shaped over ~500 million years by Darwinian processes of mutation and selection. During this time an arms race occurred: on the one hand the plants, which have in the cell wall a source of energy and carbon, and on the other the herbivores and pathogens. Commelinid, a group of angiosperms that includes grasses (Poaceae), has a typical cell wall, called the type II cell wall, which differs from other plant groups (non-commelinid). One of the main distinctive features of type II cell wall is the presence of high concentrations of ferulic acid in primary walls. This phenylpropanoid appears esterified to arabinoxylans, the most abundant hemicellulose in the commelinids. Like monolignols, ferulic acid can also polymerize, interconnecting arabinoxylans with each other and anchoring lignin (in secondary cell walls). The crosslinking of arabinoxylans promoted by ferulic acid is involved in the cessation of cell growth and defense against pathogen attack by reducing the access of cellulolytic enzymes to cell wall polysaccharides. Together with lignin, excess ferulic acid reduces the nutritional power of fodder and crops destined to produce second generation biofuels, on the other hand, as it is not essential for plant growth, the reduction in structural ferulic acid content does not affect productivity. Preliminary laboratory-scale experiments have shown that the application of enzyme inhibitors involved in the synthesis of ferulic acid can reduce its content in the cell wall making it easier to digest. A better use of lignocellulosic biomass can even reduce the environmental impacts caused by the agriculture and livestock production.

**OBJECTIVES** – This study aims to: 1) evaluate the saccharification of lignocellulosic biomass of maize plants in laboratory, and field-scale after

treatment with phenylpropanoid inhibitors; 2) evaluate the enzymatic digestion of the lignocellulosic biomass of brachiaria grass in agronomical-scale after treatment with phenylpropanoid pathway inhibitors (MDCA, PIP e DZN); 3) develop an efficient and economical method for the removal of soluble sugars in biomass for digestibility assays.

**METHODS** – For laboratory tests, maize seeds (*Zea mays* cv. IPR-114) were sown in plastic pots (400 mL) containing a mixture (1:1) of vermiculite/organic substrate and grown for 15 days in a growing room under 12 hours of light/dark photoperiod with constant temperature ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 4$ ). The plants were watered every two days with Hoagland nutrient solution and at 7th day, with nutrient solution plus inhibitors (MDCA, PIP e DZN). For the leaf spray experiments, at the 7th day of cultivation, the plants were sprayed with solution containing the specific inhibitor plus adjuvant (Aureo®) at 0.5%. At the 15th day, the plants were harvested and a biometric analysis was performed. The material was weighed and dried at  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  for drying to constant weight. After complete drying, all samples were ground in a ball mill and reserved for digestibility analyzes.

Field trials with maize (*Z. mays*) were conducted at the Iguatemi experimental farm (FEI-UEM). In two adjacent areas, applications were made by foliar spraying at two different times: at 30 and 60 days after sowing. The same inhibitors, concentration and volume of those applied in the brachiaria were used. Each trial was performed with a number of 5 replicates where each plot (n) consisted of an area of  $3\text{ m}^2$ , separated by 1 m of border area. The harvesting was performed at 120 days after germination (DAG). Once again, the plants were oven dried at  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ . After complete drying, all samples were ground in a ball mill and reserved for digestibility analyzes.

For two distinct field experiments, we used brachiaria grass (*Brachiaria decumbens*) in an area of the Irrigation Training Center (CTI) of the University of Maringá (UEM) where it was already planted. For the first test, the area was mowed, followed by cleaning and after 10 days, irrigation system was applied in a single dose of the inhibitors: (PIP) 0.5 and  $1.0\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$  and (MDCA) 350 and  $700\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ . After 30 days of treatment,  $1\text{ m}^2$  of each plot was collected and biometric analyzes were performed. The material was weighed and dried at  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  for drying to constant weight. In the second test, the application was done 7 days after mowing followed by cleaning the area. The inhibitors were applied by foliar spraying as follows: daidzin ( $0.5$  and  $1.0\text{ mmol L}^{-1}$ ), PIP ( $1.0$  and  $2.0\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ ) and MDCA ( $1.0$  and  $2.0\text{ mmol L}^{-1}$ ). After 30 days of treatment,  $1\text{ m}^2$  of each plot was collected by cutting each plant close to the soil. With the fresh plants, the biometric analyzes were done. The material was weighed and dried at  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  for drying to constant weight. After complete drying, all the samples are crushed in ball mill and reserved for analysis of digestibility, lignin content, ferulic acid, coumaric acid and monomers.

The biomasses of brachiaria grass, maize and sugarcane (*Saccharum* sp.) were exhaustively washed with ethanol by two methods: the first consists of incubating the biomass in ethanol at  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in a test tube for 2 h, with periodic shaking, at the end this, the supernatant is discarded, and the procedure

repeated until complete elimination of soluble sugars. The second consists of a reflux system based on the soxhlet method, which washes multiple samples at the same time without the need for shaking or ethanol exchange by the operator.

**RESULTS AND DISCUSSION** – Daidzin is a competitive inhibitor of the enzyme coniferaldehyde dehydrogenase responsible for the oxidize coniferaldehyde to ferulic acid. However, its addition to the nutrient medium *in vivo* did not affected the digestibility of maize. An analysis of the nutrient medium revealed that glycosidases secreted by maize roots degraded daidzin to its aglycone form (daidzein), canceling out its inhibitory activity. The application of glycosidase inhibitors prevented their degradation and promoted the digestibility of maize shoot. The application of daidzin by leaf spray did not promote the digestibility of the plants in laboratory scale. The PIP and the MDCA, in turn, promoted increases of up to 23% in saccharification of the aerial part of the corn when applied by foliar sprinkling on a bench scale. Agricultural scale tests showed that the application of the inhibitors by foliar spraying promoted the digestibility of the plants harvested at the silage point (120 days). Plants treated with MDCA and PIP 30 DAG had their digestibility increased by up to 54%. On the other hand, treatments with daidzin (0.5 and 1.0 mmol L<sup>-1</sup>) increased the digestibility of maize up to 87%.

The treatment of brachiaria grass with inhibitors with a single dose applied by fertigation was able to significantly increase biomass digestibility by 28% (PIP 1.0 μmol L<sup>-1</sup>). The treatments promoted trends of increase in biomass, leaf expansion, chlorophyll content and productivity and a significant reduction in ferulic acid content, which may have contributed to leaf expansion due to its role in controlling cell growth. The leaf sprinkling assays showed an increase in digestibility with 4 h of incubation of up to 18% in the treatments with MDCA and PIP in the lowest concentrations and 15% in the PIP in the highest concentration. After 24 h of digestion MDCA treatment increased saccharification by 21%, while PIP increased saccharification by 16%, both at the lowest concentrations tested.

The method of soluble solids extraction by solvent reflux reduced the time to remove sugars (when compared with the traditional method) from 18 h to 7 h or less depending on material. Due to the automated process, without the intervention of the operator, the method drastically reduced the operating time (weighing, shaking, handling of liquids). The technique also reduced ethanol consumption by 77% and electricity consumption by at least 95% (considering the sugarcane samples, which is richer in soluble solids).

**CONCLUSION** – Foliar spraying of the three inhibitors tested was effective in promoting the digestibility of the lignocellulosic biomass of maize and brachiaria grass. Biometric data revealed a consistent trend of increase productivity due to inhibitors application. The treatments had later effects, both in maize and brachiaria grass. This suggests that the effect promoted by the treatments increases with the normal decrease in the digestibility with the plants age. In none of the treatments the lignin content has been altered and, in general, the effects on productivity are innocuous or beneficial. The reflux washing system allowed the extraction of soluble sugars in several samples in parallel, substantially

reducing consumption of solvent, energy and operating time, when compared to the traditional method.

Keywords: *phenylpropanoids, biomass digestibility, MDCA, PIP, daidzin*

## CAPÍTULO I

### **Inibidores da via dos fenilpropanoides promovem aumento na digestibilidade da biomassa lignocelulósica de milho (*Zea mays*)**

#### **Autores**

Denis Leandro de Freitas<sup>1</sup>, Diego Eduardo Romero Gonzaga<sup>1</sup>, Geovanna Gentilin Martins<sup>1</sup>, Lídia Rodrigues Cícero<sup>1</sup>, Dyoni M. Oliveira<sup>1</sup>, Carolina Weigert Galvão<sup>2</sup>, Fabiano Aparecido Rios<sup>3</sup>, Gilberto Catunda Sales<sup>3</sup>, Rogério Marchiosi<sup>1</sup>, Osvaldo Ferrarese-Filho<sup>1</sup>, Wanderley Dantas. dos Santos<sup>1\*</sup>

#### **Afiliação**

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Bioquímica, Laboratório de bioquímica de plantas, Maringá, PR.

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Ponta Grossa, Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Ponta Grossa, PR.

<sup>3</sup>Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Agronomia, Maringá, PR.

\*Autor para correspondência: [wdsantos@uem.br](mailto:wdsantos@uem.br)

## Resumo

O aprimoramento de técnicas que visam um melhor aproveitamento da biomassa lignocelulósica tem ganhado força nas últimas décadas. A produção de biocombustíveis pode revolucionar nossa matriz energética baseada em combustíveis fósseis. Ainda, um melhor aproveitamento de plantas forrageiras pode potencializar a produção pecuária. Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da aplicação de inibidores da via dos fenilpropanoides, responsável pela produção de compostos fenólicos da parede celular (lignina e ácidos hidroxicinâmicos) que interferem na digestibilidade enzimática da biomassa lignocelulósica. Os ácidos metilenodioxicinâmico (MDCA), piperolínico (PIP) e daidzina agem em enzimas específicas da via, modelando a arquitetura da parede celular o que facilita a liberação de açúcares fermentáveis a partir de celulose e hemiceluloses. A aplicação desses inibidores no milho (*Zea mays*) promoveram o aumento da digestibilidade das plantas colhidas ao ponto de silagem.

**Palavras-chave:** *fenilpropanoides, digestibilidade de biomassa, MDCA, PIP, daidzina*

## Introdução

O uso de fontes não renováveis de energia, como carvão e petróleo são insustentáveis a longo prazo. Neste contexto, a biomassa lignocelulósica, a maior fonte de energia proveniente do processo fotossintético, surge como uma fonte sustentável capaz de substituir os combustíveis fósseis. Tecnologias que viabilizem a produção de biocombustíveis através do processamento dessa matéria-prima vegetal, propiciará acesso à essa fonte renovável de energia em um horizonte razoável de desenvolvimento tecnológico. Assim, a produção de etanol e outros combustíveis líquidos a partir da biomassa lignocelulósica poderá revolucionar positivamente a matriz energética atual, tornando sustentável nossa economia baseada em combustíveis não renováveis [1, 2, 3, 4]. A celulose, principal componente da parede celular vegetal, é formada por uma cadeia linear de moléculas de glicose que podem ser separadas para posterior fermentação, entretanto, a parede celular é resistente à degradação. Esta recalcitrância não é um obstáculo casual, mas resultado de um processo de co-evolução competitiva



entre as plantas e organismos que dela se alimentam. Isto tornou progressivamente difícil aos predadores e patógenos o acesso a esses açúcares fermentáveis [5,4]. Ao longo das últimas décadas, um grande esforço tem sido despendido no intuito de desenvolver métodos eficientes para a bioconversão da lignocelulose, sobretudo para a produção de biocombustíveis, como o etanol. Para enfrentar esse desafio, várias abordagens têm sido propostas, sendo que as mais populares são: pré-tratamentos químicos [6], físicos [7] e enzimáticos [8]; desenvolvimento de coquetéis enzimáticos mais poderosos e modificação da biomassa por engenharia genética [9]. Estudos têm mostrado que uma redução no conteúdo de lignina afeta diretamente a sacarificação, aumentando a liberação de açúcares fermentáveis [10, 11, 12]. A lignina interfere adsorvendo as hidrolases inibindo sua ação sobre a celulose [13] e ainda, evita que as fibras de celulose se entumeçam, diminuindo assim, a área de ação das celulases [14].

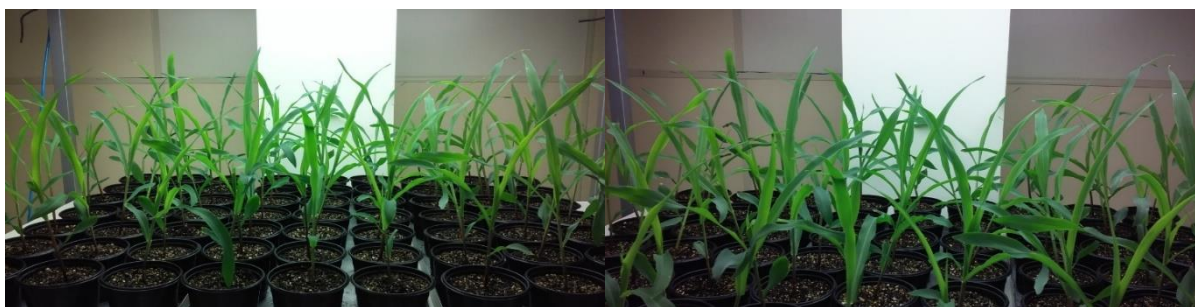
A família Poaceae, muito utilizada como plantas forrageiras, são o alvo de estudos relacionados a digestibilidade da biomassa lignocelulósica. Estas plantas possuem uma arquitetura de parede celular típica que a distingue dos outros grupos vegetais (parede celular tipo II). Este tipo de parede contém teor reduzido de pectinas e xiloglucanos e maior quantidade de glucanos de cadeia mista [glucuronoarabinosilanos (GAX)] e hidroxicinamatos produzidos na via dos fenilpropanoides [15]. Entre estes últimos está o ácido ferúlico (FA), um dos mais abundantes ácidos fenólicos encontrados nas plantas, cujo teor, pode afetar a digestibilidade da biomassa lignocelulósica [16]. O FA pode ser encontrado sob forma solúvel, onde protege a célula contra estresse oxidativo gerado por espécies reativas de oxigênio e radiação UV [17]. As formas insolúveis do FA têm papel estrutural e podem ser encontradas esterificadas à parede celular ancoradas às hemiceluloses ou formando dímeros (ácido diferúlico) interligando cadeias de GAX. O FA pode ainda estar covalentemente ligado por ligação éter à proteínas e à lignina, ancorando-as aos polissacarídeos da parede celular. Dessa forma, o FA atua como um fator-chave na arquitetura da parede celular, influenciando a cessação do crescimento celular e dificultando a ação de hidrolases de patógenos e herbívoros, assim como o processo de sacarificação na produção de etanol celulósico [16, 18]. A incorporação do ácido ferúlico à parede celular é feita a partir da feruloil coenzima A (FA-CoA). Há duas enzimas na via dos fenilpropanoides capazes de produzir FA na sua forma livre: 1) a

cafeoil ortometil transferase (COMT) que catalisa a ortometilação do ácido caféico a FA [19] e 2) a coniferaldeído desidrogenase (CALDH) que catalisa a desidrogenação do coniferaldeído a FA [20]. A forma ativa (FA-CoA) é produzida pela ação da 4-cinamil coenzima A ligase (4CL) sobre o FA livre ou pela enzima cafeoil-CoA ortometil transferase (CCoAOMT), que realiza a ortometilação do cafeoil-CoA [16]. Estudos recentes têm demonstrado que a inibição de certas enzimas da via dos fenilpropanoides pode contribuir para aumentos significativos na digestibilidade da biomassa lignocelulósica. Plantas de cana-de-açúcar tratadas com ácido metilenodioxicinâmico (MDCA), inibidor químico específico da 4CL [21], promoveu aumentos superiores a 2,5 vezes na digestibilidade do bagaço dessas plantas [22]. Outro trabalho mostrou que plantas de cana-de-açúcar tratadas com ácido piperonílico (PIP) (inibidor da enzima cinamato 4-hidroxilase) (C4H) [21] reduziu o conteúdo de ácido ferúlico nos tecidos parenquimáticos, mas induz um aumento do conteúdo nos vasos e fibras [23]. Ferro et. al. 2014 [24] usou uma isoflavona (Daidzina) (DZN) em ensaios *in vitro* e demonstrou que esta é um potente inibidor competitivo da coniferaldeído desidrogenase (CALDH) concluindo que poderia ser usada para redução da recalcitrância da parede celular. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi examinar os efeitos inibitórios desses compostos sobre a sacarificação e produção de ácido ferúlico em plantas de milho (*Zea mays*).

## Material e métodos

### Cultivo de plantas de milho em laboratório

Para ensaios em laboratório, sementes de milho (*Zea mays* cv. IPR-114) foram semeadas em potes plásticos contendo 350 mL de uma mistura (1:1) de vermiculita mais substrato orgânico de origem vegetal (figura 1) e cultivadas por



**Figura 1** – Plantas de milho sendo cultivadas em sala de incubação sob 12 horas de fotoperíodo escuro/claro e temperatura constante (25 °C±4).

15 ou 21 dias em sala de cultivo sob 12 horas de fotoperíodo claro/escuro e temperatura constante (25 °C ±4). As plantas foram regadas a cada dois dias com 65 mL de solução nutritiva de Hoagland e a partir do 7º dia, com solução nutritiva acrescida do inibidor (daidzina, PIP e MDCA). Para os experimentos de aspersão foliar, ao 7º dia de cultivo, 60 mL de cada tratamento foram aplicados uma única vez em cada planta. Essa quantidade de solução foi suficiente para que toda a lâmina foliar de todas as folhas da planta fosse coberta. Para facilitar o processo de espalhamento da droga ao longo da folha, utilizou-se de um adjuvante (Aureo®) a 0,5%. Ao 15º dia, as plantas foram coletadas e o comprimento das raízes e parte aérea (colmo mais folhas) foram medidos e os valores expressos em cm. O material (parte aérea da planta) foi pesado em balança analítica e levado a estufa a 60 °C para secagem até peso constante, em seguida, triturado em moinho bola e reservado para ensaios de digestibilidade.

### Cultivo de milho em campo

Ensaio de campo com milho (*Z. mays*) foram conduzidos na Fazenda experimental Iguatemi (FEI) da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Em duas áreas adjacentes foram feitas aplicações via aspersão foliar em dois tempos diferentes: com 30 e 60 dias após plantio. Cada ensaio foi realizado com um número de 5 repetições onde cada parcela (n) consistiu de uma área de 3 m<sup>2</sup>, separadas por 1 m de área de bordadura. A coleta foi realizada aos 120 dias após germinação. As plantas (folhas e colmos) foram secas em estufa a 60 °C até peso constante, moídas e armazenadas para análise de digestibilidade.

**Tabela 1** – Massas e volumes de calda aplicados por hectare em cada tratamento.

Tratamento	Massa ha <sup>-1</sup>	Volume de calda ha <sup>-1</sup>
MDCA 1,0 mmol L <sup>-1</sup>	73g	380 L
MDCA 2,0 mmol L <sup>-1</sup>	146g	380 L
PIP 1,0 µmol L <sup>-1</sup>	0,06g	380 L
PIP 2,0 µmol L <sup>-1</sup>	0,126g	380 L
DZN 0,5 mmol L <sup>-1</sup>	79g	380 L
DZN 1,0 mmol L <sup>-1</sup>	158g	380 L

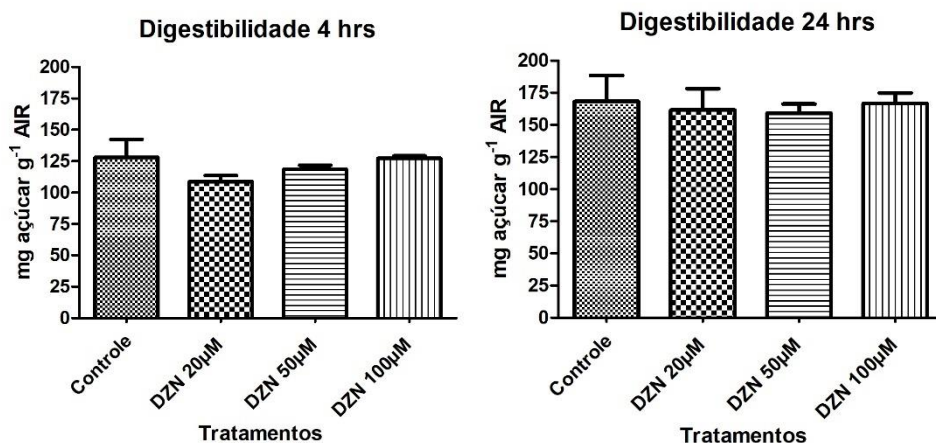
## **Digestibilidade enzimática**

Após secagem, a biomassa foi triturada e lavada exaustivamente com etanol. Para tal, as amostras foram incubadas em 5 mL de etanol 80%, 80 °C, 2 h, sendo centrifugada a 13000 g, 10 min. O procedimento foi repetido sucessivamente por seis ou mais vezes, fim de extrair todo o açúcar solúvel desses tecidos. Esse processo se faz necessário para remoção de sólidos solúveis que possam interferir na análise. Considera-se que a amostra está adequada para os ensaios de digestibilidade quando o teor de açúcares solúveis apresentava absorvância inferior a 0,05 em 490 nm [25]. Por fim, o material (AIR – resíduo insolúvel em álcool) foi seco novamente em estufa a 60 °C. Em cada reação, 15 mg de AIR foram adicionados em microtubo e suspensos em tampão acetato (50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,0) juntamente com 20 U mL<sup>-1</sup> de xilanase obtida do extrato de *Aspergillus niveus* para um volume total de reação de 1,0 mL. As amostras, junto com um controle (amostra sem enzima), foram incubadas a 50 °C por 24 horas, sendo feita uma primeira análise após 04 horas de digestão. Após incubação, uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi analisada pelo método do DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) [26] para detecção de açúcares redutores liberados durante o processo. Os açúcares foram então quantificados por espectrofotômetro a 540 nm e os valores são expressos em mg g<sup>-1</sup> de AIR.

## **Resultados e discussão**

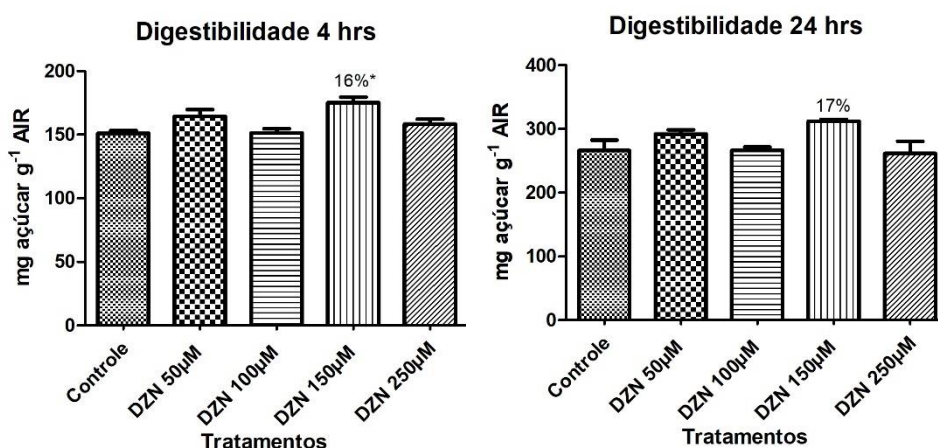
### **Aplicação via absorção radicular**

Para avaliar a eficiência para promover a digestibilidade, foram realizados experimentos utilizando daidzina em diferentes concentrações (0, 20, 50, 100 µmol L<sup>-1</sup>), assim como a associação desta com os inibidores PIP, MDCA. Em um primeiro ensaio, foi utilizado daidzina em três diferentes concentrações (20, 50 e 100 µmol L<sup>-1</sup>) onde a droga foi aplicada por irrigação radicular em plantas de milho de sete dias de idade, sendo cultivadas por mais sete (em sala de cultivo). Neste primeiro experimento não foi observado aumento significativo na digestibilidade (figura 2).



**Figura 2** – Digestibilidade enzimática de plantas de milho de 14 dias após 04 e 24 horas de incubação. Barras indicam valores médios  $\pm$  erro padrão da média (n = 5).

Um novo experimento foi montado com concentrações maiores de daidzina 50, 100, 150 e 250  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Os resultados (figura 3) mostraram um aumento significativo na digestibilidade (16%) com daidzina a 150  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , após 4 h de incubação e 17% (não significativo estatisticamente) após 24 de digestão.

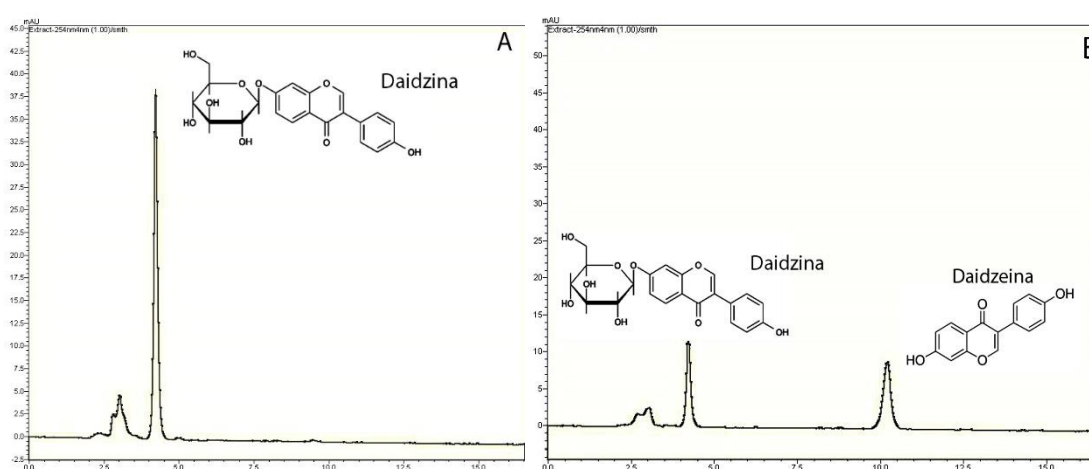


**Figura 3** – Digestibilidade enzimática de plantas de milho de 14 dias após 4 e 24 horas de incubação. Barras indicam valores médios  $\pm$  erro padrão da média (n = 5). Valores indicados com asterisco são significativos de acordo com o teste de Dunnett ( $P \leq 0,05$ ).

A reprodução do mesmo experimento com a concentração de daidzina que apresentou melhores resultados (150  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) não foi conclusiva. Em repetições do mesmo ensaio (resultados não mostrados) chegou-se a encontrar 65,5% de aumento de digestibilidade, porém em um terceiro experimento, esse aumento não passou de 2%, mesmo utilizando iguais condições de cultivo e aplicação da droga. Sendo assim, foi investigado a capacidade de absorção da daidzina pela planta, incubando plântulas de milho (7 dias) em hidroponia, utilizando solução nutritiva de Hoagland acrescida de daidzina a 150  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Os resultados (figura 4) mostraram que o composto é degradado, provavelmente

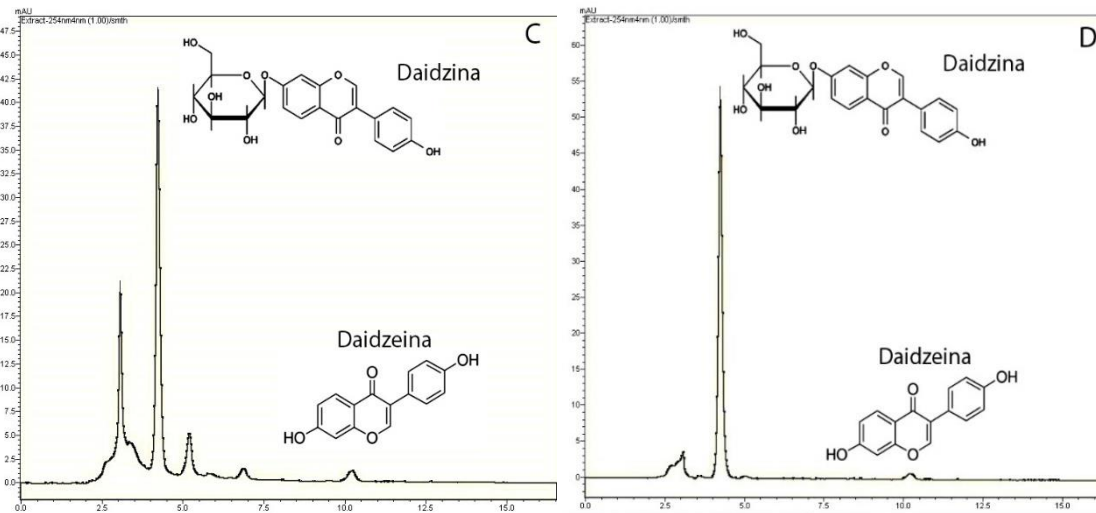
por uma glicosidase produzida pela planta. A hidrólise libera como subprodutos uma glicose e a daidzeína, que não é inibidor da enzima alvo (CALDH). Em um ensaio de 24 horas foi possível verificar que praticamente toda a daidzina é degradada em daidzeína.

A partir daí o foco foi anular essa hidrólise, buscando inibidores de glicosidases para serem adicionados juntamente com a daidzina. Uma busca na literatura revelou que o uso de um extrato alcoólico de folhas de pitangueira (*Eugenia uniflora*) apresenta uma potente atividade inibidora de enzimas glicolíticas [27].

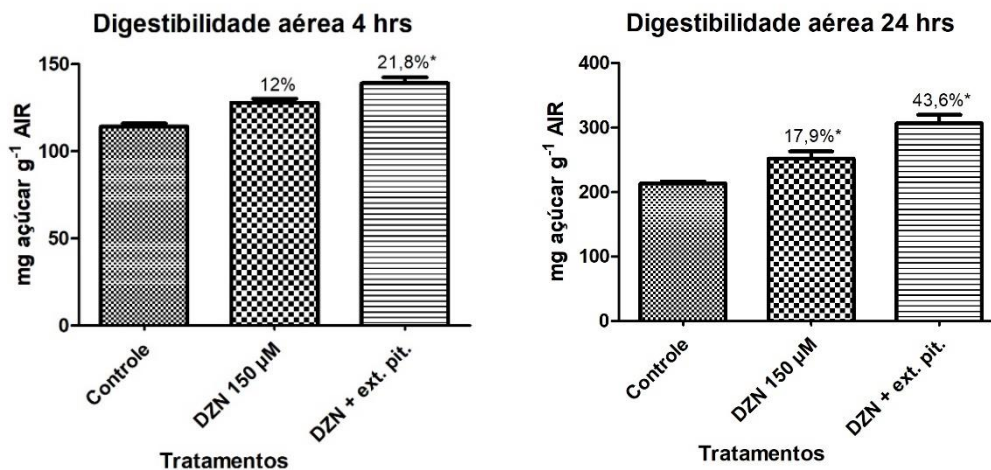


**Figura 4** – Cromatograma da depleção da daidzina após duas horas de incubação na ausência de planta (A) e na presença de planta (B). Os gráficos mostram a absorção da daidzina em 4,2 minutos e de daidzeína aos 10,2 minutos.

Munidos dessa informação, montamos um experimento no qual incubamos plântulas de milho por 3 dias em hidroponia. O meio de cultivo foi preparado utilizando solução nutritiva de Hoagland acrescida de daidzina  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$  e também daidzina mais extrato alcoólico de folhas de pitangueira ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Os resultados mostraram que o extrato foi capaz de inibir o efeito glicolítico de glicosidases das raízes do milho (figura 5). Com isso, realizamos o teste de digestibilidade das plântulas desse mesmo experimento. Os resultados (figura 6) mostraram um aumento de até 43% de sacarificação nas plantas tratadas com daidzina e extrato de pitanga, porém ocorre um efeito antagônico onde se percebeu uma redução significativa na biomassa das plantas tratadas (dados não mostrados).



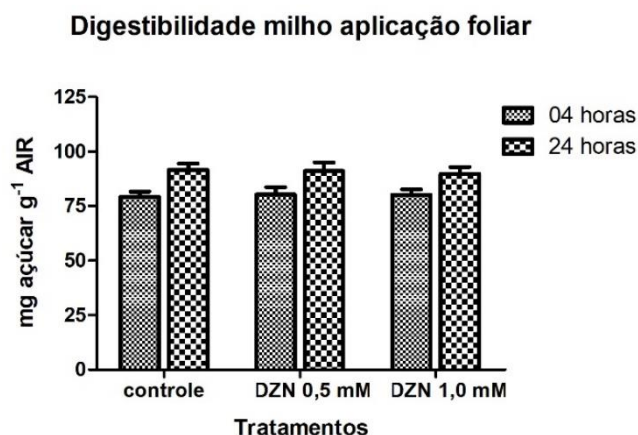
**Figura 5** – Análise em HPLC da depleção da daidzina em solução de hidroponia. Os inibidores presentes no extrato alcoólico de folhas de pitangueira inibem esterases liberadas pela planta, mantendo alta a concentração de daidzina depois de duas horas de incubação (C). A droga é estável quando mantida na ausência de plantas durante 24 horas (D).



**Figura 6** – Digestibilidade enzimática de plantas de milho de 6 dias cultivadas em hidroponia, após 04 e 24 horas de incubação. Barras indicam valores médios  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 3$ ). Valores indicados com asterisco são significativos de acordo com o teste de Dunnett ( $P \leq 0,05$ ).

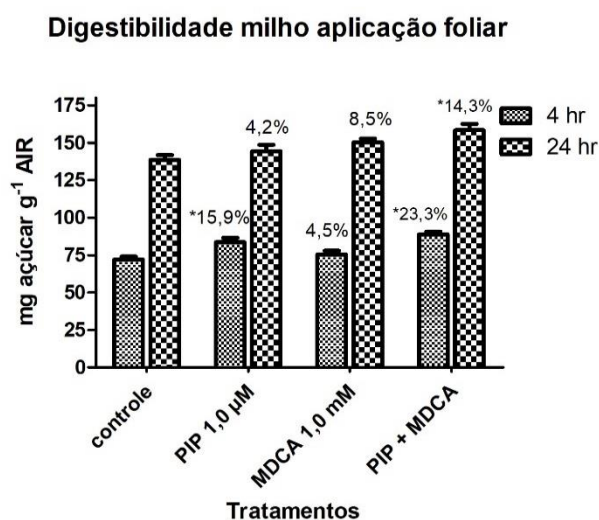
Diante das evidências da desativação da DZN pela ação de glicosidases, durante os tratamentos por hidroponia, iniciamos ensaios com tratamentos por aspersão foliar. Para isso, plantas de milho foram cultivadas em laboratório e borrifadas com daidzina a 0,5 e 1,0 mmol L<sup>-1</sup>. Porém, os tratamentos não foram capazes de elevar a digestibilidade conforme pode ser observado na figura 7. Diversos fatores podem ter impedido a ação da daidzina *in vivo*, como dificuldades de absorção foliar - uma vez que a molécula apresenta uma glicose ligada a uma isoflavona o que poderia interferir em sua difusão através da membrana plasmática - bem como por uma falha no modelo escolhido, uma vez que plantas muito jovens (3 semanas) apresentam baixo teor de lignificação, o

que poderia dificultar a identificação de alterações na digestibilidade que naturalmente já é elevada em tecidos imaturos. Assim, para testar o modelo, iniciamos tratamentos com os inibidores MDCA e PIP.



**Figura 7** – Digestibilidade enzimática de plantas de milho tratadas com daidzina por aspersão foliar após 4 e 24 horas de digestão. As plantas foram cultivadas por 14 dias em sala de cultivo. Barras indicam valores médios  $\pm$  erro padrão da média (n = 5). Valores indicados com asterisco são significativos de acordo com o teste de Dunnett ( $P \leq 0,05$ ).

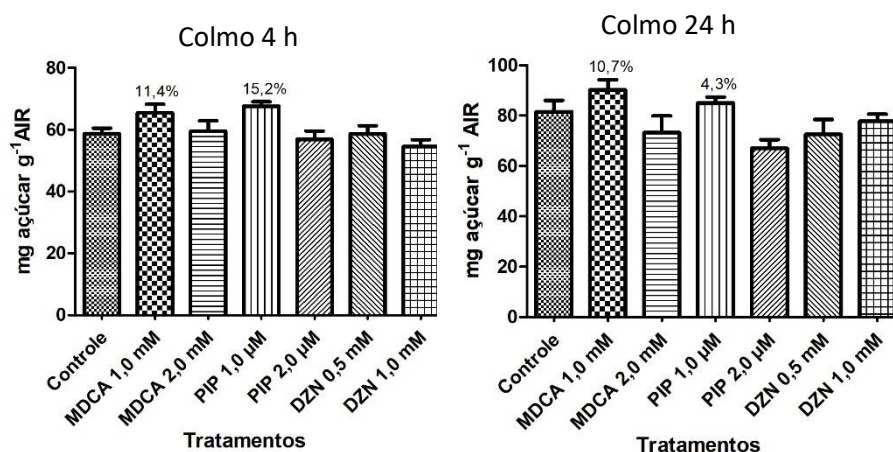
Seguindo o mesmo protocolo da aplicação foliar da daidzina, aplicamos em milho PIP, MDCA e uma combinação dos dois inibidores. Os resultados mostrados na figura 8 revelam um aumento significativo na digestibilidade após quatro horas de incubação nos tratamentos com PIP (15,9%) e na combinação dos dois inibidores (23,3%). Já após 24 horas de digestão somente o tratamento que continha as duas drogas apresentou aumento significativo de 14,3%. Embora os resultados sugiram que o modelo é adequado, novos experimentos



**Figura 8** - Digestibilidade enzimática de plantas de milho tratadas com PIP e MDCA por aspersão foliar após 4 e 24 horas de digestão. As plantas foram cultivadas por 14 dias em sala de cultivo. Barras indicam valores médios  $\pm$  erro padrão da média (n = 5). Valores indicados com asterisco são significativos de acordo com o teste de Dunnett ( $P \leq 0,05$ ).



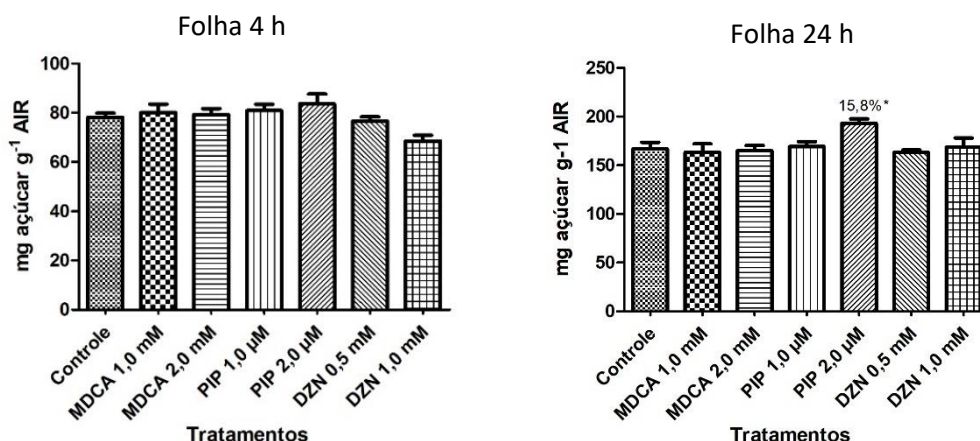
foram realizados em ensaios de campo conduzidos na Fazenda experimental Iguatemi (FEI-UEM). Foram realizadas aplicações de PIP, MDCA e DZN em duas concentrações diferentes, 30 e 60 dias após germinação (DAG). Em ambas as áreas, as plantas foram coletadas com 120 DAG. Aos 60 dias de cultivo e, portanto, 30 dias de tratamento (plantas jovens), realizamos uma coleta, onde cada planta foi separada em colmo e folhas. A digestibilidade média do colmo (figura 9) apresentou uma tendência de elevação nos tratamentos com MDCA e PIP nas concentrações mais baixas (1,0 mmol L<sup>-1</sup> e 1,0 µmol L<sup>-1</sup>, respectivamente), porém esses resultados não foram diferentes do controle pelo teste de Dunnett.



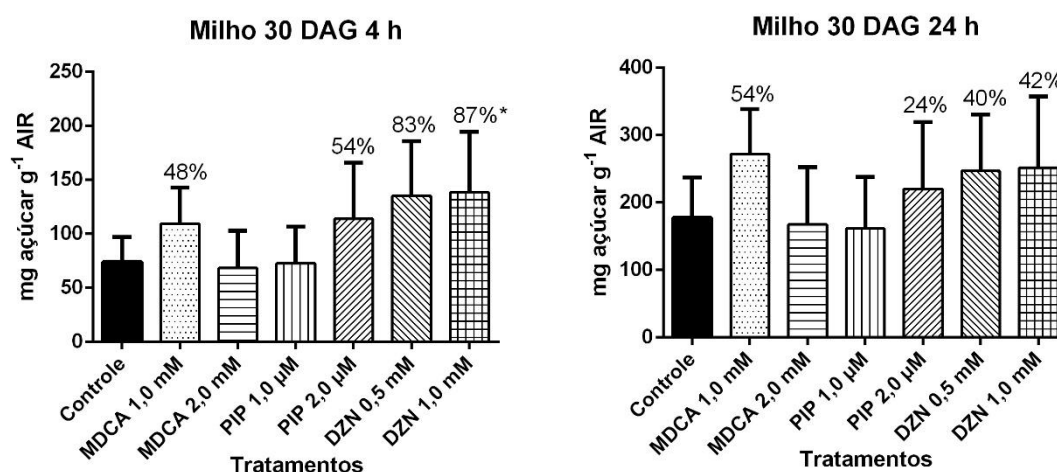
**Figura 9** – Digestibilidade do colmo de milho jovem (60 DAG), tratado com inibidores de lignificação por aspersão foliar (30 DAG), após 4 h de digestão (gráfico à esquerda) e 24 h de digestão (gráfico à direita). Valores médios ± erro padrão da média (n = 5, P ≤ 0,05).

A digestão das folhas por 4 h (figura 10) também não indicou aumentos significativos, embora uma pequena tendência tenha sido observada nos tratamentos com PIP 2,0 µmol L<sup>-1</sup>. Nos ensaios de digestão conduzidos por 24 h, este mesmo tratamento aumentou a digestibilidade em 15,8% de forma consistente quando comparado com o controle. Quando as plantas tratadas 30 DAG foram colhidas no ponto de silagem, os resultados foram bem mais relevantes. Nesta coleta, a parte aérea das plantas (folha, colmo e espiga) foi triturada em conjunto formando uma única biomassa visando simular o que acontece no campo, onde toda a planta é triturada e armazenada para servir de alimento para o gado. O tratamento com MDCA 1,0 mmol L<sup>-1</sup> 30 DAG, aumentou

a digestibilidade em cerca de 48% em 4 h de digestão e após 24h, o aumento chegou a 54% (figura 11).



**Figura 10** – Digestibilidade foliar do milho jovem (60 DAG), tratado com inibidores de lignificação por aspersão foliar (30 DAG), após 4 h de digestão (gráfico à esquerda) e 24 h de digestão (gráfico à direita). Valores médios  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 5$ ). (\*) indica significância estatística segundo o teste de Dunnett ( $P \leq 0,05$ ).

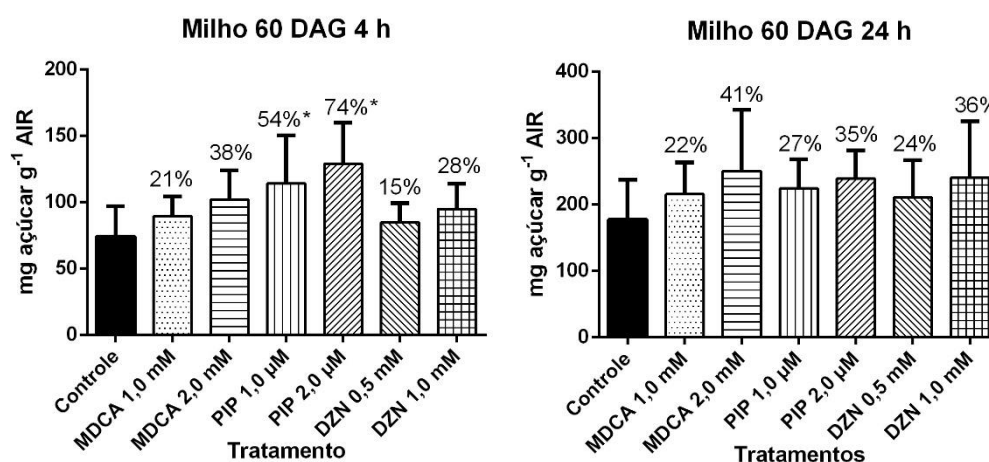


**Figura 11** – Digestibilidade do milho 30 DAG após 4 e 24 h de digestão. Barras marcadas com asterisco (\*) foram diferentes do controle pelo teste de Dunnett, com 90% de confiança.

Quando estas plantas tinham sido coletadas mais jovens (60 DAG) os tratamentos com MDCA 1,0 mmol L<sup>-1</sup> haviam promovido apenas uma tendência de aumento na digestibilidade dos colmos (figura 9). As plantas tratadas com PIP 2,0 mmol L<sup>-1</sup> 30 DAG tiveram sua digestibilidade média aumentada em 54% após 4 h de digestão e em 24% após 24 h em relação ao controle, porém, esse aumento veio acompanhado de uma grande variância, de modo que as diferenças não foram significativas. Aumentos mais expressivos foram observados nas plantas tratadas com daidzina (0,5 e 1,0 mmol L<sup>-1</sup>). Estas plantas apresentaram uma elevação na digestibilidade de 83 a 87% em 4 h e de 40 a

42% em 24 h de digestão. Porém, a variância também aumentou de modo que apenas a análise de 4 h para a daidzina 1,0 mmol L<sup>-1</sup> foi estatisticamente significativa (figura 11).

Nas plantas tratadas 60 DAG a digestibilidade média foi elevada em todos os tratamentos após 4 h de digestão, porém, somente os tratamentos com PIP aumentaram significativamente a digestibilidade do milho (54% com PIP 1,0 µmol L<sup>-1</sup> e 74% com PIP 2,0 µmol L<sup>-1</sup> (figura 12). Após 24 h de digestão enzimática, todos os tratamentos realizados 60 DAG elevaram a digestibilidade média das plantas coletadas no ponto de silagem (figura 12). Este aumento generalizado da digestibilidade observado em 24 h é consistente com os resultados obtidos após 4 h de digestão. Todavia, em 24 h, os aumentos foram menos contundentes (22-41%) que na digestão por 4 h (15-74%) e da mesma forma, a variância aumentada fez com esses valores não fossem significativos estatisticamente segundo o teste de Dunnett (figura 12).



**Figura 12** – Digestibilidade do milho 60 DAG após 04 e 24 h de digestão. Barras marcadas com asterisco (\*) foram diferentes do controle pelo teste de Dunnett, com 90% de confiança.

## Conclusões

A partir de dados de experimentos em laboratório, testamos em campo a eficiência dos inibidores PIP, MDCA e Daidzina por aplicação foliar em milho. A aspersão foliar reduziu drasticamente a quantidade de água a ser utilizada durante os tratamentos. Houve aumento significativo de até 87% na digestibilidade das plantas. Os tratamentos aumentaram a digestibilidade sem alterar o conteúdo de lignina, um resultado relevante, visto que uma redução na

lignina poderia reduzir a resistência das plantas ao ataque de patógenos e/ou promover o acamamento. As plantas de milho tratadas 30 DAG apresentaram aumentos mais discretos na digestibilidade quando colhidas jovens (60 DAG) do que quando colhidas maduras, no ponto de silagem (120 DAG). Estes resultados sugerem que o efeito dos tratamentos sobre a digestibilidade se eleva com o envelhecimento e endurecimento da biomassa. Este fenômeno é útil para a pecuária, visto que o maior tempo de cultivo resulta em aumento de biomassa, mas também implica em uma menor palatabilidade das plantas. Os resultados sugerem fortemente que os tratamentos revertem esta lógica, permitindo que a lignocelulose permaneça tenra, mesmo quando os tecidos atingem maturidade. Ao observarmos os valores de açúcares redutores liberados, claramente notamos que após 24 h de digestão, algumas plantas tratadas maduras são digeridas mais facilmente que as plantas tratadas ou não colhidas jovens. Os tratamentos em estágio precoce (30 DAG) foram mais dependentes da dose que os tratamentos em estágio mais tardio (60 DAG), que aumentaram a digestibilidade de modo geral, independente de dose maior ou menor. Porém, a intensidade desses aumentos na digestibilidade foi menor que a obtida nos tratamentos precoces e a variância nos resultados foi maior. Isto sugere que uma vez encontrada a dose-resposta ideal para cada inibidor, os efeitos dos tratamentos mais precoces tendem a ser mais intensos que tratamentos mais tardios. Este fenômeno é benéfico ao produtor, visto que a aspersão foliar em plantas de milho mais maduras podem ser limitadas pela altura das plantas. Acredita-se que o tratamento inicial pode nuclear a formação de uma parede celular modificada, que facilita o acesso das hidrolases que agem degradando os polissacarídeos da parede celular.

### **Agradecimentos**

Agradecemos a BASF, CAPES e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

### **Referências**

- [1] L. A. B. Cortez, Sugarcane Bioethanol: R&D for productivity and sustainability, Blucher (2010) (part 1) 3-16.
- [2] M. Balat, Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review, Energy Conversion and Management 52 (2011) 858-875.

- [3] W. D. dos Santos, E. A. Gomes, M. S. Buckeridge, Bioenergy and the Sustainable Revolution, In: M. S. Buckeridge, and G. H. Goldman, Routes for Cellulosic Ethanol 1 (2011) 15-26.
- [4] R. Huang, R. Su, W. Qi, Z. He, Bioconversion of Lignocellulose into Bioethanol: Process Intensification and Mechanism Research, Bioenergy Research 4 (2011) 225-245.
- [5] M.S. Buckeridge, A.P. Souza, W.D. dos Santos, Routes for Cellulosic Ethanol in Brazil, In: L. A. B. Cortez. Sugarcane Bioethanol: R&D for productivity and sustainability (2010) part 3 365-380.
- [6] X. Zhao, F. Peng, K. Cheng, D. Liu, Enhancement of the enzymatic digestibility of sugarcane bagasse by alkali-peracetic acid pretreatment Enzyme Microb Technol 44 (2009) 17–23.
- [7] W.E. Kaar, C. V. Gutierrez, C. M. Kinoshita, Steam explosion of sugarcane bagasse as a pretreatment for conversion to ethanol, Bioenergy 14 (3) (1998) 277–287.
- [8] Y. Sun, J. Cheng, Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review, Bioresour Technol 83 (2002) 1–11.
- [9] C. M. Fraser, C. Chapple, The Phenylpropanoid Pathway in Arabidopsis, American Society of Plant Biologists 9 (2011 Dez) e0152.
- [10] V.S. Chang, M. T. Holtzaple, Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity, Applied Biochemistry and Biotechnology 84 (2000) 5-37.
- [11] K.M. Draude, C. B. Kurniawan, S. J. B. Duff, Effect of oxygen delignification on the rate and extent of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic material, Bioresource Technology 79 (2001) 113-120.
- [12] B. Yang, C. E. Wyman, Effect of Xylan and Lignin Removal by Batch and Flowthrough Pretreatment on the Enzymatic Digestibility of Corn Stover Cellulose, Biotechnology and Bioengineering 86 (2004 Feb) 88-95.
- [13] V.M. Chernoglazov, V. M, O. V. Ermolova, A. A. Klyosov, Adsorption of high-purity endo-1,4- $\beta$ -glucanases from *Trichoderma reesei* on components of lignocellulosic materials: cellulose, lignin, and xylan, Enzyme and Microbial Technology 10 (1998 Ago) 503-507.
- [14] C.A. Mooney, S. D. Mansfield, M. G. Touhy, J. N. Saddler, The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods, Bioresource Technology 64 (1998) 113-119.
- [15] N.C. Carpita, M. Defernez, K. Findlay, B. Wells, D. A. Shouse, G. Catchpole, R. H. Wilson, M. C. McCann, Cell wall architecture of the elongating maize coleoptile, Plant Physiol 127 (2001 Out) 551-565.
- [16] D.M. Oliveira, A. F. Teixeira, T. R. Mota, V. H. Salvador, F. C. Moreira-Vilar, H. B. C. Molinari, R. A. C. Mitchell, R. Marchiosi, O. Ferrarese-Filho, W. D. dos Santos, Ferulic acid: a key component in grass lignocellulose recalcitrance to hydrolysis, Plant Biotechnol J. 13 (2015) 1224-1232.

- [17] L. Paiva, R. Goldbeck, W. D. Santos. F. Squima, Ferulic acid and derivatives: molecules with potential application in the pharmaceutical field, *Braz J Pharm Sci* 49 (2013 Jul/Set) 395-411.
- [18] H. Jung, D. Samaca, G. Sarath, Modifying crops to increase cell wall digestibility, *Plant Sci* 185-186 (2012) 65-77.
- [19] R. Vanholme, K. Morreel, C. Darrah, P. Oyarce, J. H. Grabber, J. Ralph, W. Boerjan, Lignin Biosynthesis and Structure, *New Phytol* 196 (2010 Jul) 978-1000.
- [20] R.B. Nair, K. L. Bastress, M. O. Ruegger, J. W. Denault, C. Chapple, The *Arabidopsis thaliana* reduced epidermal fluorescence gene encodes an aldehyde dehydrogenase involved in ferulic acid and sinapic acid biosynthesis, *Plant Cell* 16 (2004 Feb) 544-554.
- [21] M. Schalk, F. Cabello-Hurtado, M. A. Pierrel, R. Atanossova, P. Saindrenan, D. Werck-Reichhart, Piperonylic acid, a selective, mechanism-based inactivator of the trans-cinnamate 4-hydroxylase: a new tool to control the flux of metabolites in the phenylpropanoid pathway, *Plant Physiol.* 118 (1998) 209–218.
- [22] W.D. dos Santos, M. S. Buckeridge, Patente Requerida no Instituto Nacional de Propriedade Industrial, sob o número 020110095739, (2011).
- [23] V.H. Salvador, D. M. Oliveira, D. C. C. Leite, A. G. Ita-Manoel, G. S. Bido, A. P. de Souza, A. L. Ferraz, M. L. T. M. Polizeli, F. M. Squina, O. Ferrarese-Filho, M. S. Buckeridge, Enzymatic inhibition of phenylpropanoid biosynthesis enhances sugarcane bagasse saccharification by reducing polymers cross-linkage and loosening parenchyma cell wall polymers (2015), phd tesis.
- [24] A.P. Ferro, W. D. dos Santos, R. Marchiosi, M. de L. L. Ferrarese, F. A. V. Seixas, O. Ferrarese-Filho, *Zea mays* coniferyl aldehyde dehydrogenase: Three-dimensional structure and inhibition by daidzin (2014), phd tesis.
- [25] M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, & F. Smith, Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 28 (1956) 350-358.
- [26] G. L. Miller, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry* 31 (3) (1959) 426-428.
- [27] I. Arai, S. Amagaya, Y. Komatsu, M. Okada, T. Hayashi, M. Kasai, M. Arisawa, Y. Momose, Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice, *J Ethnopharmacol* 68 (1999) 307-314.

## CAPÍTULO II

### **Aumento da digestibilidade de capim braquiária (*Brachiaria decumbens*) com aplicação de inibidores da via dos fenilpropanoides.**

Denis Leandro de Freitas<sup>1</sup>, Diego Eduardo Romero Gonzaga<sup>1</sup>, Fabiano Aparecido Rios<sup>2</sup>, Gilberto Catunda Sales<sup>2</sup>, Luiz Emilio Vicentin<sup>2</sup>, Dyonis M. Oliveira<sup>1</sup>, Rogério Marchiosi<sup>1</sup>, Osvaldo Ferrarese-Filho<sup>1</sup>, Wanderley Dantas dos Santos<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Bioquímica, Laboratório de Bioquímica de Plantas, Maringá, PR.

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Agronomia, Maringá, PR.

\*Autor para correspondência: [wdsantos@uem.br](mailto:wdsantos@uem.br)

## Resumo

Atualmente, existe uma grande preocupação em relação aos impactos ambientais causados pela expansão das áreas agrícolas, principalmente no que diz respeito a produção de biocombustíveis. O aprimoramento de técnicas que visam um melhor aproveitamento da biomassa lignocelulósica tem ganhado força nas últimas décadas. A produção de biocombustíveis de maneira sustentável, pode revolucionar nossa matriz energética insustentável e poluente baseada em combustíveis fósseis. Ainda, um melhor aproveitamento de plantas forrageiras pode potencializar a produção pecuária e reduzir a emissão de metano. No território nacional aproximadamente 80 milhões de hectares são cobertos por gramíneas, principalmente o gênero *Brachiaria*. Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da aplicação de inibidores da via dos fenilpropanoides, responsável pela produção de fenilpropanoides estruturais como a lignina e o ácido ferúlico que interferem na digestibilidade enzimática da biomassa lignocelulósica. Uma única aplicação (10 dias após a roçada) por fertirrigação de ácido 3, 4-metilenodioxicinâmico (MDCA) e o ácido piperolínico (PIP), que agem inibindo enzimas específicas da via dos fenilpropanoides, reduziu o conteúdo de ácido ferúlico e promoveu um aumento expressivo na digestibilidade das plantas no campo sem afetar o conteúdo de lignina ou a produtividade.

**Palavras-chave:** *Fenilpropanoides, Digestibilidade de biomassa, MDCA, PIP, Daidzina, Brachiaria*

## Introdução

O declínio da produção mundial de petróleo, seus altos preços de mercado, distribuição heterogênea no planeta e os impactos ambientais de sua queima fizeram com que a produção de biocombustíveis atingisse volumes inéditos nos últimos 10 anos. O crescimento populacional e a demanda por energia e alimento são um tema de intensos debates entre organizações internacionais e líderes políticos para discutir os impactos da intensificação do uso de biocombustíveis e outras práticas agrícolas que podem ser



potencialmente danosas ao ambiente, como por exemplo, a instalação e condução inadequada de pastagens em monocultivo [1, 2]. A produção agrícola, seja para alimentos, matéria prima ou combustível, afeta os ecossistemas e as espécies dentro deles, incluindo os seres humanos [3]. Diante desse contexto, estratégias de readequação do uso de terra que possam potencializar a produção são necessárias, evitando que novas áreas necessitem ser desmatadas [4, 5]. No Brasil, as áreas de pastagem correspondem a aproximadamente 10% de todo o território nacional, sendo compostas principalmente pelo gênero *Brachiaria* [2] pertencente à família Poaceae, que são o alvo de estudos relacionados a digestibilidade [6, 7]). Estas plantas possuem uma arquitetura de parede celular típica que a distingue dos outros grupos vegetais (parede celular tipo II). Além da celulose, o principal componente da parede celular, a parede tipo II contém teor reduzido de pectinas e maior quantidade de glucanos de cadeia mista, glucuronoarabinoxilanos (GAX) e hidroxicinamatos [8]. Portanto, apesar da baixa digestibilidade, as gramíneas possuem alto potencial energético que pode ser explorado. Entretanto, a parede celular é resistente à degradação. Esta recalcitrância não é um obstáculo casual, mas resultado de um processo de coevolução competitiva entre as plantas e organismos que dela se alimentam. Isto tornou progressivamente difícil aos predadores e patógenos obter acesso a esses açúcares fermentáveis [6, 7].

Desde o início da colonização do ambiente terrestre durante o período Ordoviciano, há 470 milhões de anos [9, 10]. A seleção natural atuou sobre os pioneiros ancestrais das plantas terrestres selecionando linhagens com adaptações que permitiam suportar radiação UV-B, dessecação e a ação da gravidade [11]. Um evento-chave ao longo da história evolutiva da vida no ambiente terrestre foi o surgimento da via dos fenilpropanoides, que tornou as plantas capazes de sobreviver nesse novo ambiente até então inóspito [12]. Os fenilpropanoides são um grupo diversificado de compostos fenólicos, derivados da felnilalanina, com funções tão diversas quanto as suas variações estruturais. Eles servem como pigmentos, antibióticos (fitoalexinas), protetores de radiação UV, repelentes de insetos, moléculas de sinalização e funcionam como componentes reticuladores em estruturas de revestimento e de suporte, como suberina, lignina e outros componentes de parede celular [13, 14, 15]. A lignina é um heteropolímero composto – na maioria das plantas – por três álcoois hidroxicinâmicos que diferem no seu grau de metoxilação. *p*-Coumaril, coniferil

e sinapil álcoois, são oxidativamente polimerizados numa reação catalisada por peroxidases específicas. Produzidos na via dos fenilpropanoides, quando polimerizados, seus resíduos podem ser identificados pela decoração dos anéis aromáticos sendo denominados de unidades *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G), e siringil (S) [16]. A lignina é encontrada principalmente em paredes secundárias de células xilemáticas, cimentando os polissacarídeos da parede celular (celulose e hemiceluloses) o que confere rigidez e hidrofobicidade, além de tornar estas estruturas resistentes à degradação pela maioria dos microorganismos [17]. Estudos têm mostrado que uma redução no conteúdo de lignina afeta diretamente a sacarificação, aumentando a liberação de açúcares fermentáveis [18, 19, 20].

Ao longo das últimas décadas, um grande esforço tem sido despendido no intuito de desenvolver métodos eficientes para a conversão da biomassa lignocelulósica em seus açúcares constituintes. Para isso, várias abordagens têm sido propostas como pré-tratamentos químicos [21], físicos [22] e enzimáticos [23]. O desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas para produzir menos lignina, aumentam a sacarificação, mas também afetam a produtividade [24, 25]. Trabalhos recentes produzidos por nosso grupo têm demonstrado que a aplicação de inibidores da via dos fenilpropanoides durante o desenvolvimento da planta resultam em aumentos expressivos na liberação de açúcares solúveis, durante a digestão enzimática, por interferirem na arquitetura da parede celular [26, 27]. Os resultados apresentados no Capítulo I, entre outros estudos acumulam evidências de que a redução no conteúdo de ácido ferúlico pode elevar a sacarificação da biomassa lignocelulósica sem reduzir a produtividade. Nesse estudo, aplicamos em plantas de capim braquiária (*Brachiaria decumbens*) o ácido metilenodioxicinâmico (MDCA), inibidor da enzima 4-cinamil coenzima A ligase (4CL), o ácido piperonílico (PIP), inibidor da enzima cinamil 4-hidroxilase (C4H) [28] e daidzina, uma isoflavona inibidor da coniferaldeído desidrogenase (CALDH) [29], avaliando seus efeitos sobre a digestibilidade e produtividade.

## **Materiais e métodos**

### **Cultivo de capim braquiária**

Para dois experimentos de campo distintos, utilizamos o capim braquiária (*Brachiaria decumbens*) em uma área do Centro de Treinamento em Irrigação (CTI) da Universidade Estadual de Maringá (UEM) onde o mesmo já estava plantado (figura 1).



**Figura 1** – Visão aérea da área experimental no CTI/UEM.

Para o primeiro ensaio, foi realizado uma roçada na área, seguida de limpeza e após 10 dias, através de sistema de irrigação (figura 2), foi feita aplicação em dose única dos inibidores: ácido piperonílico (PIP) nas concentrações de 0,5 e 1,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , e ácido 3,4-(metilendioxi)cinâmico (MDCA) nas concentrações de 350  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 700  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Cada ensaio foi realizado



**Figura 2** – Sistema de irrigação com proteção plástica para evitar influência do vento e assim evitar perda de solução, garantindo homogeneidade do tratamento.

com 6 repetições em parcelas de 7,5  $\text{m}^2$ . A quantidade de inibidor por área aplicada é mostrada na tabela 1. Nesse primeiro experimento, a quantidade de solução de tratamento aplicada visou a absorção radicular. Após 30 dias do tratamento, 1  $\text{m}^2$  de cada parcela foi coletado cortando-se cada planta rente ao solo. Com as plantas frescas, foram analisados: a massa total, o número de folhas, produtividade ( $\text{ton ha}^{-1}$ ), comprimento e largura da primeira e segunda folha totalmente expandida e índice de clorofila (SPAD). Após secagem em estufa a 60 °C, as amostras foram novamente pesadas, moídas e estocadas

para as análises de digestibilidade, teor de lignina, ácido ferúlico, ácido cumárico e monômeros da lignina.

Tabela 1 - Massas e volumes de calda aplicados por hectare em cada tratamento

Tratamento	Massa ha <sup>-1</sup>	Volume de calda ha <sup>-1</sup>
MDCA 350 µmol L <sup>-1</sup>	1,85 Kg	27 000 L
MDCA 700 µmol L <sup>-1</sup>	3,7 kg	27 000 L
PIP 0,5 µmol L <sup>-1</sup>	2,25 g	27 000 L
PIP 1,0 µmol L <sup>-1</sup>	4,5 g	27 000 L

Para o segundo ensaio, foi feito uma roçada seguida de limpeza da área e após 7 dias feito aplicação, via aspersão foliar dos inibidores: daidzina (0,5 e 1,0 mmol L<sup>-1</sup>), PIP (1,0 e 2,0 mmol L<sup>-1</sup>) e MDCA (1,0 e 2,0 mmol L<sup>-1</sup>). A aplicação foi feita em parcelas de 3 m<sup>2</sup> com 5 repetições para cada tratamento (figura 3). Um espaço de 1 m foi preservado entre cada repetição como área de bordadura. Devido a aplicação e absorção ser via foliar, as soluções foram preparadas com adição de 0,5 % de um adjuvante (Aureo<sup>®</sup>) para facilitar a penetração dos inibidores via epiderme foliar. A tabela 2 mostra as concentrações de cada inibidor por área aplicada. Nesse caso, o objetivo era avaliar a capacidade de absorção via foliar. Após 30

**Tabela 2** – Concentrações, massas e volumes de calda aplicados por hectare em cada tratamento.

Tratamento	Massa ha <sup>-1</sup>	Volume de calda ha <sup>-1</sup>
MDCA 1,0 mmol L <sup>-1</sup>	73 g	380 L
MDCA 2,0 mmol L <sup>-1</sup>	146 g	380 L
PIP 1,0 µmol L <sup>-1</sup>	0,06 g	380 L
PIP 2,0 µmol L <sup>-1</sup>	0,126 g	380 L
DZN 0,5 mmol L <sup>-1</sup>	79 g	380 L
DZN 1,0 mmol L <sup>-1</sup>	158 g	380 L

dias do tratamento, 1 m<sup>2</sup> de cada parcela foi coletado cortando-se cada planta rente ao solo. Com as plantas frescas, foram analisados a massa total, altura total de cada planta, comprimento da 2<sup>a</sup> folha totalmente expandida e índice de clorofila (SPAD). Após secagem em estufa a 60 °C, as amostras foram novamente pesadas, moídas e estocadas para as análises de digestibilidade, teor de lignina e ácido ferúlico.



**Figura 3** – Visão da área 7 (esquerda) e 30 (direita) dias após roçada.

### **Digestibilidade enzimática**

Após secagem, a biomassa foi triturada e lavada exaustivamente com etanol. Para tal, as amostras foram incubadas em 5 mL de etanol 80%, 80 °C, 2 h, sendo centrifugada a 13000 g, 10 min. O procedimento foi repetido sucessivamente por seis ou mais vezes, fim de extrair todo o açúcar solúvel desses tecidos. Esse processo se faz necessário para remoção de sólidos solúveis que possam interferir na análise. Considera-se que a amostra está adequada para os ensaios de digestibilidade quando o teor de açúcares solúveis apresentava absorvância inferior a 0,05 em 490 nm [30]. Por fim, o material (AIR – resíduo insolúvel em álcool) foi seco novamente em estufa a 60 °C. Em cada reação, 15 mg de AIR foram adicionados em microtubo e suspensos em tampão acetato (50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,0) juntamente com 20 U mL<sup>-1</sup> de xilanase obtida do extrato de *Aspergillus niveus* para um volume total de reação de 1,0 mL. As amostras, junto com um controle (amostra sem enzima), foram incubadas a 50 °C por 24 horas, sendo feita uma primeira análise após 04 horas de digestão. Após incubação, uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi analisada pelo método do DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) [31] para detecção de açúcares redutores liberados durante o processo. Os açúcares foram então quantificados por espectrofotômetro a 540 nm e os valores são expressos em mg g<sup>-1</sup> de AIR.

### **Quantificação da lignina e composição dos monolignóis**

Para a quantificação da lignina, 0,3 g de biomassa seca foi homogeneizada em 7 mL tampão fosfato 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,0, com ajuda de almofariz e pistilo e então transferida para tubo de centrífuga. O material foi

centrifugado (1400g, 4min), e o pellet foi lavado sucessivamente e centrifugado como segue: tampão fosfato 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 (7,0 mL, 2x), triton® X-100 1% em tampão fosfato (7 mL, 3x), NaCl 1,0 mol L<sup>-1</sup> em tampão fosfato (7,0 mL, 2x), água destilada (7,0 mL, 2x) e acetona (5,0 mL, 2x). O pellet foi seco em estufa a 60 °C por 24 horas e o material obtido considerado como parede celular livre de proteínas (PFCW) [32]. A lignina foi então determinada pelo método do brometo de acetila como se segue [33]: uma alíquota de 20 mg de cada amostra foi pesada em tudo de ensaio com tampa e em seguida adicionado 0,5 mL brometo de acetila (25% v/v em ácido acético glacial) e incubada a 70 °C por 30 minutos. Depois da digestão completa, a reação foi parada adicionando 0,9 mL de NaOH 2,0 mols L<sup>-1</sup> e as amostras colocadas imediatamente em banho de gelo. Na sequência foi adicionado 0,1 mL de hidroxilamina-HCl 7,5 mols L<sup>-1</sup> e 2 mL de ácido acético glacial. As amostras foram então centrifugadas (1000 g, 5 minutos) e então a absorbância do sobrenadante foi medida em espectrofotômetro a 280 nm, e o conteúdo de lignina expresso como mg g<sup>-1</sup> de parede celular.

A oxidação com nitrobenzeno foi usada para determinar a composição monomérica da lignina [34]. Uma fração da parede celular livre de proteínas (50 mg) foi selada em ampola Pyrex® contendo 1,0 ml de NaOH 2,0 mols L<sup>-1</sup> mais 100 µl de nitrobenzeno e aquecida a 170 °C por 150 minutos, com agitação ocasional durante a reação. Após oxidação, a amostra foi resfriada até temperatura ambiente, lavadas duas vezes com clorofórmio, acidificada para pH 3-4 com HCl 5,0 mols L<sup>-1</sup>, e extraída duas vezes com clorofórmio. Os extratos orgânicos foram combinados, secos e ressuspensos em metanol. As amostras foram filtradas em filtro de seringa descartável 0,45 µm (Hamilton® Co., Nevada, USA) e analisada em sistema HPLC com 2 bombas (Shimadzu 10 Avp) usando uma coluna Phenomenex® C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm). A fase móvel utilizada foi metanol/ácido acético 4% em água (20/80, v/v) com fluxo de 1,2 ml min<sup>-1</sup> para corrida isocrática de 20 min. A quantificação de p-hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído foi realizada a 290 nm utilizando os padrões correspondentes. Os resultados foram expressos como µg monômero mg<sup>-1</sup> de parede celular.

### **Análise do conteúdo de ácido ferúlico e ácido p-cumárico**

O ácido ferúlico foi extraído conforme descrito por de Ascensão e Dubery [35], com modificações [36]. O material seco e triturado (0,1 g) foi macerado com pistilo e gral em 500 µL de metanol 50% e, a seguir, transferidos para um tudo

de centrífuga e incubados em banho-maria (80 °C, 90 min). Depois desse tempo, os tubos foram inseridos imediatamente em banho de gelo para parar a extração. Após o resfriamento, as amostras foram centrifugadas (1000 g, 15 min, 4 °C) e o sobrenadante descartado. O pellet foi lavado mais duas vezes com metanol 50%, centrifugado e secado em estufa a 60 °C por 24 h. O material foi ressuscitado em 1 mL de NaOH 0,5 M e incubado (96 °C, 2 h). Após esse período, as amostras foram colocadas em banho de gelo e acidificadas a pH 2,0 com HCl seguido de centrifugação (1000 g, 15 min, 10 °C). O sobrenadante foi transferido para funil de separação onde foram adicionados 6 mL de éter etílico. Após agitação e separação, a fase aquosa (inferior) foi transferida para outro frasco para uma segunda extração. A fase etérica foi transferida para um balão e a fase aquosa retornada ao funil de separação para uma segunda extração com éter. As duas frações etéreas foram combinadas em um balão e a fase aquosa descartada. As amostras foram evaporadas e analisadas em HPLC. A fase móvel consistiu de uma mistura de metanol mais ácido acético 4% em água (30:70 v/v). As amostras foram ressuscitadas em 1 mL de fase móvel, filtradas (0,45 µm) e analisadas em sistema HPLC com 2 bombas (Shimadzu 10 Avp) usando uma coluna Phenomenex® C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), e fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>. O λ para o ácido ferúlico foi 322 nm para o ácido *p*-cumárico 309 nm (Shimadzu SPD-M10A VP) utilizando-se um padrão como controle. Os resultados são expressos em mg hidroxicinamato g<sup>-1</sup> biomassa.

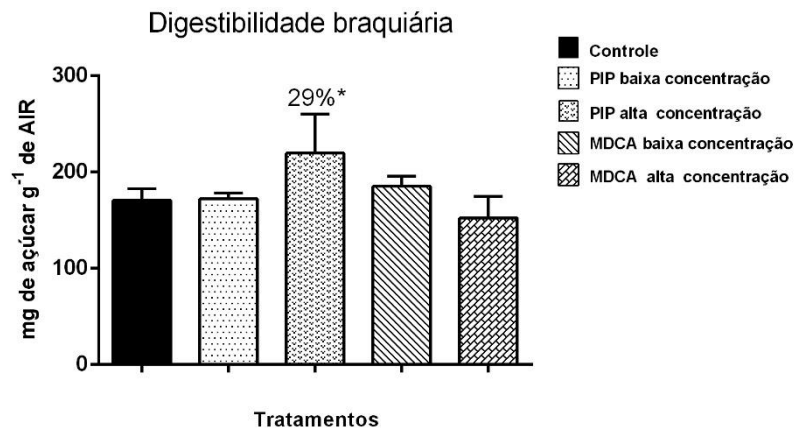
### **Análise estatística**

Para determinar significância das diferenças entre as amostras foi realizado o teste de Dunnett com P≤0,05 ou 0,1 utilizando 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**

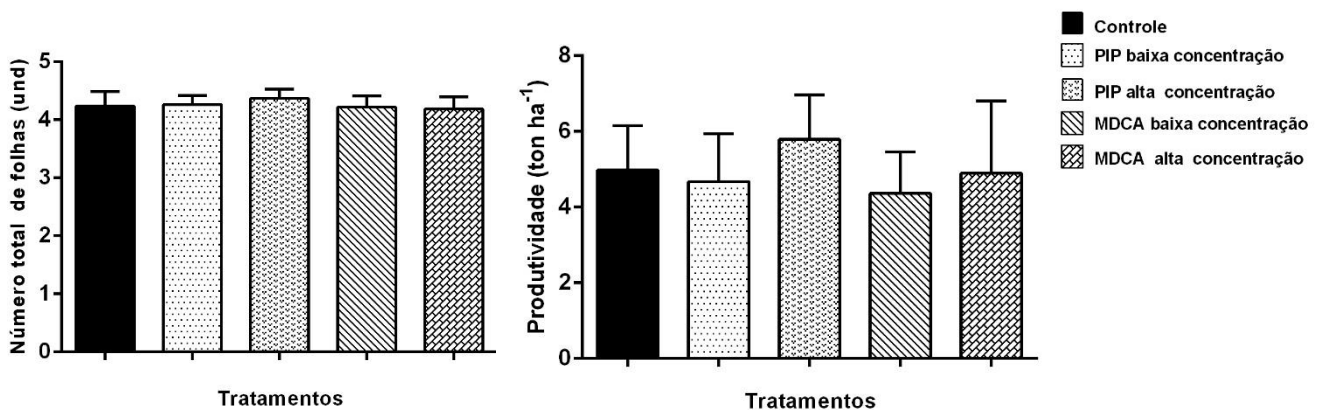
#### **Tratamento em dose única por fertirrigação**

A figura 4 compara a produção de açúcares redutores a partir da hidrólise das amostras dos quatro tratamentos e do controle. A análise estatística (Dunnett) permite constatar que o tratamento com PIP na maior concentração (1,0 µmol L<sup>-1</sup>) aumentou a digestibilidade em 29% em relação ao controle. Na



**Figura 4** – Digestibilidade da biomassa de braquiária 45 dias após a roçada e 35 dias após tratamento em dose única com diferentes concentrações de PIP e MDCA (vide texto). Barras indicam valores médios  $\pm$  erro padrão da média (n = 6). Barras marcadas (\*) são diferentes do controle com 95% de confiança segundo teste de Dunnett.

menor concentração de PIP ( $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e nas duas concentrações de MDCA não foram observadas diferenças significativas na digestibilidade em relação ao controle. A figura 5 compara os tratamentos e testemunha em relação ao número total de folhas de cada planta coletada. Todavia, não se observam diferenças significativas entre os tratamentos. Foi observado uma tendência de aumento na produtividade ( $\text{ton ha}^{-1}$ ), nas maiores concentrações tanto de PIP como de MDCA. Porém, devido às diferenças entre as repetições o resultado também não foi significativo.

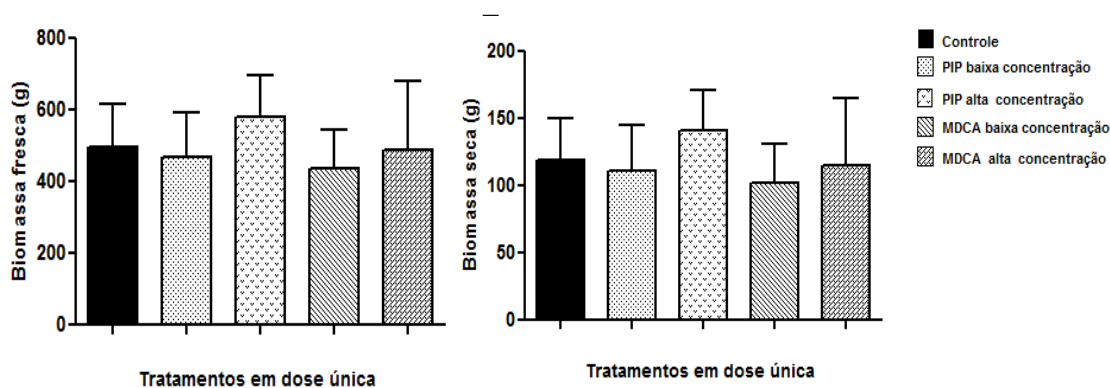


**Figura 5** – Número total de folhas e produtividade do capim braquiária 45 dias após a roçada e 35 dias após os tratamentos em dose única com PIP e MDCA. Valores médios  $\pm$  erro padrão da média (n = 6), analisados com o teste de Dunnett.

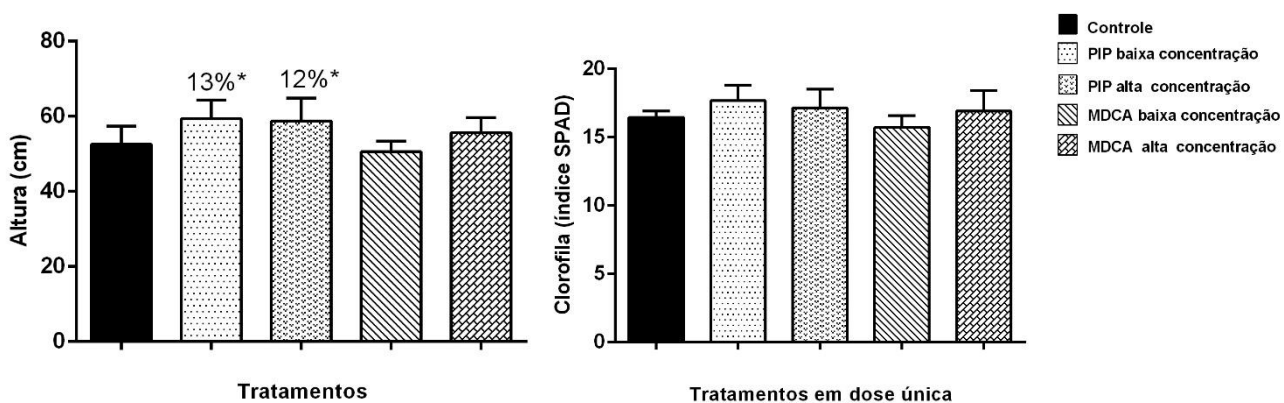
Embora o aumento na biomassa total não tenha sido significativo pelo teste Dunnett, pode-se observar uma tendência de acréscimo nas plantas tratadas com PIP na concentração mais alta, o que ocorreu tanto na biomassa fresca quanto na seca (figura 6). O tratamento com PIP nas duas concentrações



resultou em aumento na altura das plantas, como observado na figura 7. O teor de clorofila analisado pelo índice de SPAD apresentou um discreto aumento, porém não significativo nos tratamentos com PIP e com MDCA na maior concentração (figura 7).

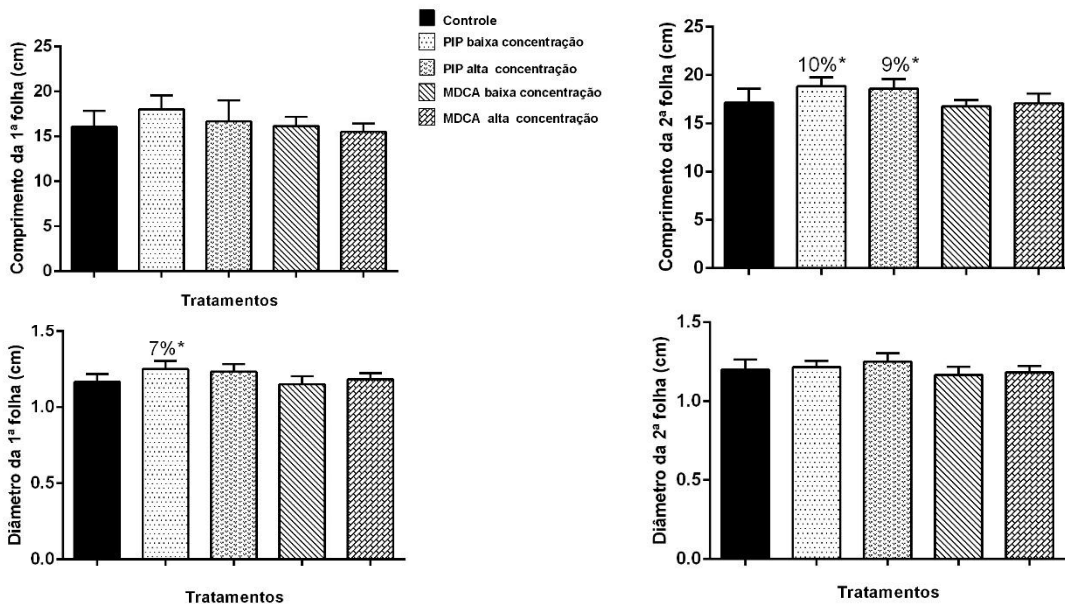


**Figura 6** - Biomassa fresca e seca de capim braquiária 45 dias após a roçada e 35 dias após os tratamentos em dose única com PIP e MDCA. Valores médios  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 6$ ), analisados com o teste de Dunnett ( $P \leq 0,05$ ).



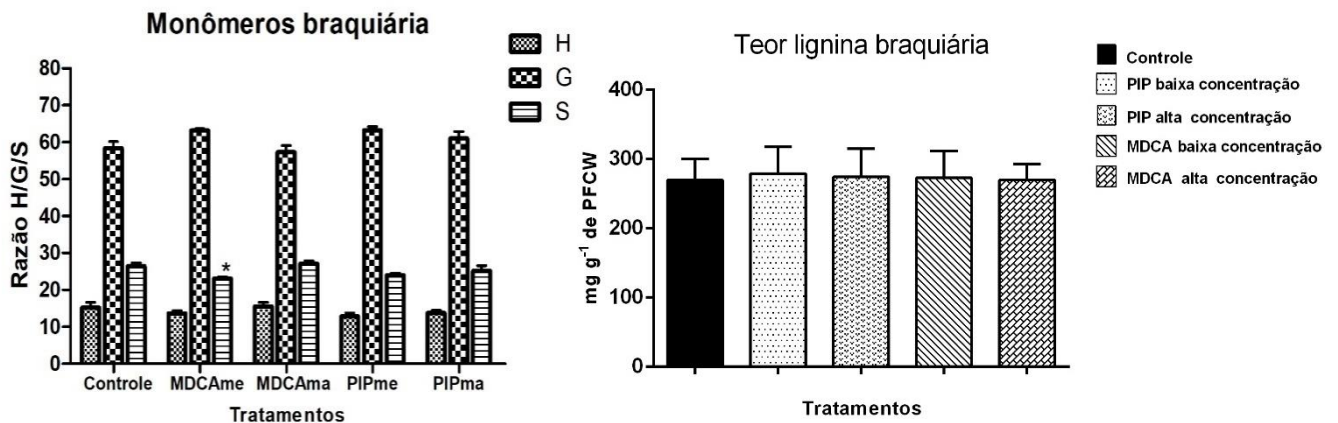
**Figura 7** – Altura total das plantas e índice SPAD das folhas de capim braquiária 45 dias após a roçada, 35 dias após os tratamentos em dose única de PIP e MDCA. Valores médios  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 6$ ). (\*) significativamente diferentes do controle de acordo de acordo com o teste de Dunnett ( $P \leq 0,1$ ).

O comprimento da primeira folha não apresentou variação significativa com os tratamentos, enquanto a largura da primeira folha, bem como o comprimento da segunda folha aumentaram discretamente após ambos os tratamentos com PIP (figura 8). Apesar de seu mecanismo de ação ser a inibição de enzimas da via de síntese da lignina, os inibidores não produziram efeito significativo sobre a mesma (figura 9).



**Figura 8** – Comprimento e largura da primeira e segunda folha. Valores médios  $\pm$  erro padrão da média (n = 6), analisados com o teste de Dunnett. (\*) indica valores significativos ( $P \leq 0,1$ ).

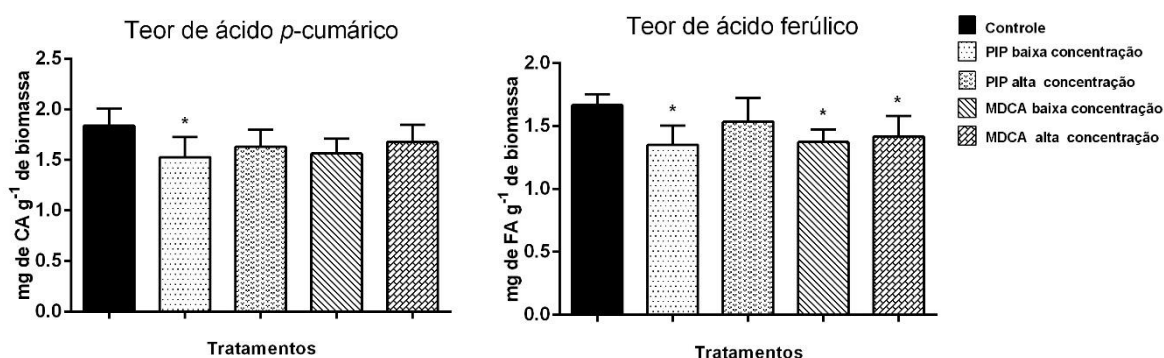
Não foi observado, alteração significativa na composição monomérica da lignina, a exceção de uma pequena redução no monômero S de plantas submetidas ao tratamento com MDCA  $350 \mu\text{mol L}^{-1}$  conforme mostra a figura 9.



**Figura 9** - Razão entre os monômeros e teor de lignina da parte aérea do capim braquiária 45 dias após a roçada e 35 dias após os tratamentos em dose única de PIP e MDCA nas menores (me) e na maiores (ma) concentrações. H, p-hidroxifenil. G, guaiacil. S, siringil monolignól. (\*) indica significância estatística segundo o teste de Dunnett ( $P \leq 0,05$ ). PFCW, parede celular isenta de proteínas.

Além da lignina central (*core lignin*), ácidos hidroxicinâmicos como o ácido *p*-cumárico e o ácido ferúlico também podem desempenhar um papel estrutural importante na parede celular. Na figura 10, observa-se que o ácido *p*-cumárico (CA) apresentou uma tendência de redução em todos os tratamentos, embora apenas o tratamento com PIP na menor concentração foi significativo pelo teste

de Dunnett. Por outro lado, os tratamentos foram mais eficazes em reduzir o conteúdo de ácido ferúlico (FA) esterificado à parede celular, como pode ser observado na figura 10.

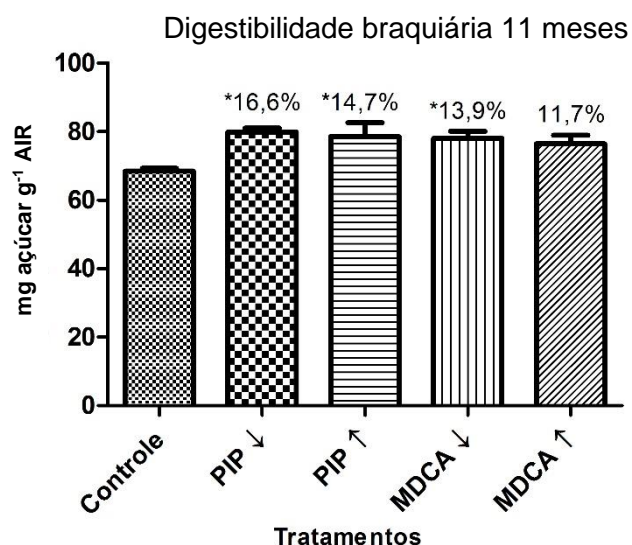


**Figura 10** – Quantificação dos teores de ácido *p*-cumárico (CA) e ácido ferúlico (FA) nos diferentes tratamentos de braquiária. Valores médios  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 6$ ), analisados com o teste de Dunnett. (\*) indica valores significativos com  $P \leq 0,1$ .

Os dados biométricos (massa, altura total das plantas, comprimento e largura das folhas) apresentam uma tendência ao aumento nos tratamentos com PIP acompanhado de melhor digestibilidade do material. Em experimentos anteriores realizados em escala laboratorial, já havia sido observado este tipo de correlação, onde a biomassa apresenta uma tendência de elevação em plantas cuja digestibilidade foi promovida pelo uso de inibidores. Isto pode decorrer do fato de que o FA interliga as moléculas de hemicelulose entre si, bem como ancora a lignina nestas moléculas da parede primária. Assim, além reduzir o acesso de enzimas hidrolíticas, o FA desempenha um papel na cessação do crescimento celular das gramíneas. A aplicação dos inibidores aparentemente afeta particularmente a produção do FA o que, devido a pressão de turgência, uma redução no conteúdo de FA, pode levar a um leve aumento da expansão celular. A redução do ácido ferúlico nos tratamentos com MDCA, provavelmente resultam da inibição da 4CL, uma vez que esta produz feruloil-CoA a forma ativa do ácido ferúlico que é precursor do resíduo esterificado à parede celular. Por sua vez, o PIP inibe a ação da enzima C4H, envolvida na síntese do ácido *p*-cumárico, precursor de todos os compostos fenólicos, inclusive o ácido ferúlico.

As plantas da área onde o experimento foi realizado (figura 01) foram deixadas crescer livremente e, aproximadamente 11 meses após o experimento, novas amostras destas mesmas plantas foram coletadas e reanalisadas para verificar se após esse tempo teríamos ainda diferenças na digestibilidade entre

o controle e tratamentos. A figura 11 mostra os resultados da digestibilidade após 04 h de incubação com extrato enzimático.

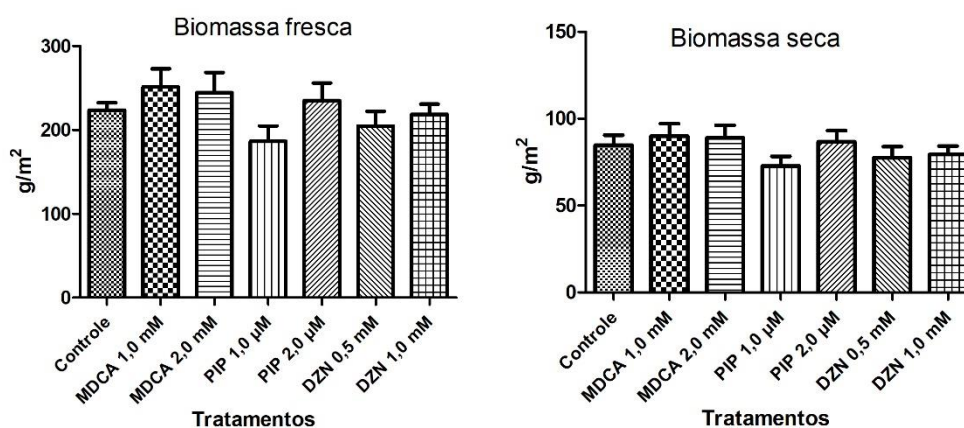


**Figura 11** – Digestibilidade da braquiária de 11 meses de idade após 04 h de incubação com coquetel enzimático. Valores médios  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 5$ ). (\*) indica significância estatística segundo o teste de Dunnett ( $P \leq 0,05$ ).

Os resultados mostram aumento na digestibilidade em todos os tratamentos, onde apenas a aplicação de MDCA, na maior concentração não mostrou resultado significativo segundo o teste de Dunnett. Isto demonstra que aplicação pode ter causado modificações permanentes no tecido da planta, ou pôde nuclear alterações na estrutura da parede celular que perduraram mesmo depois de 11 meses da aplicação. Vale ressaltar que esses resultados foram de plantas que estavam no campo todo esse período e não de plantas resultantes de uma nova rebrota após roçada.

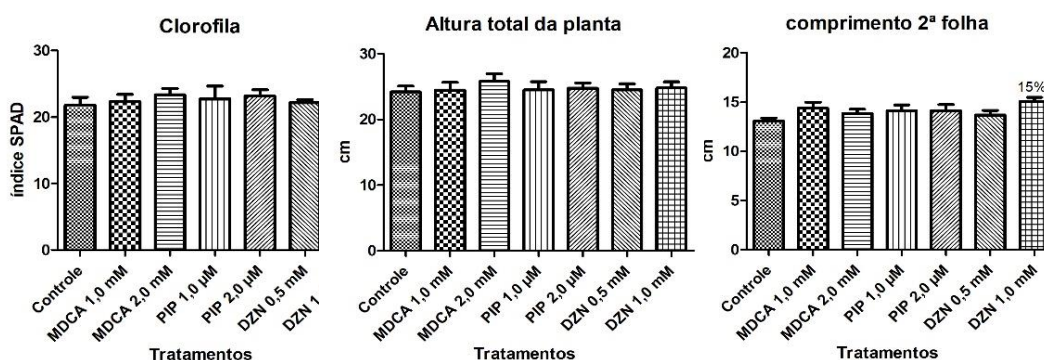
### Tratamento em dose única por aspersão foliar

Após 30 dias do tratamento do capim braquiária, 1 m<sup>2</sup> de cada parcela foi coletado e com as plantas frescas foram analisados a massa total, altura de cada planta, comprimento da 2ª folha totalmente expandida e índice de clorofila (SPAD). Após secagem, foram analisados a biomassa seca, digestibilidade, conteúdo de lignina e ácido ferúlico esterificado a parede celular. Os resultados da figura 12 mostram um aumento na biomassa fresca nos tratamentos com MDCA e uma redução no tratamento com PIP na menor concentração que foi utilizada, porém esses valores não são significativos segundo o teste de Dunnett.



**Figura 12** - Massa fresca e seca correspondente as médias das 5 parcelas de cada tratamento. Foram consideradas apenas a parte aérea (folhas e colmo) de 1 m<sup>2</sup> de cada parcela. Valores médios ± erro padrão da média (n = 5) (P≤0,05).

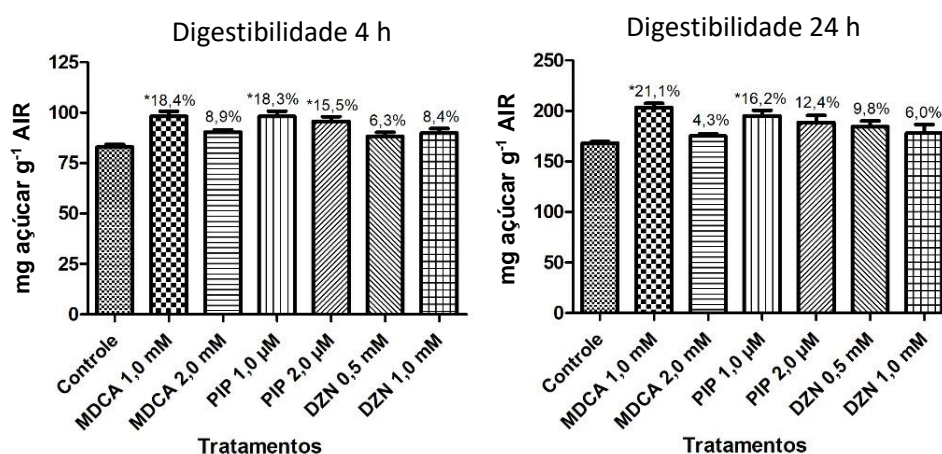
A análise do índice de SPAD para o conteúdo de clorofila não apresentou resultados com alterações significativas quando comparados ao controle. A altura total da planta considerada do colo até o ápice da primeira folha em emergência, não apresentou diferenças significativas. O comprimento da segunda folha totalmente expandida apresentou um aumento em todos os tratamentos, porém apenas o tratamento com DZN na maior concentração foi significativo estatisticamente (15%) (figura 13).



**Figura 13** – Índice SPAD, altura total das plantas e comprimento da 2ª folha totalmente expandida correspondente as médias das 5 parcelas de cada tratamento. Foram consideradas apenas a parte aérea (folhas e colmo) de 1 m<sup>2</sup> de cada parcela. Valores médios ± erro padrão da média (n = 5). (\*) indica que as amostras são diferentes do controle segundo o teste de Dunnett (P≤0,05).

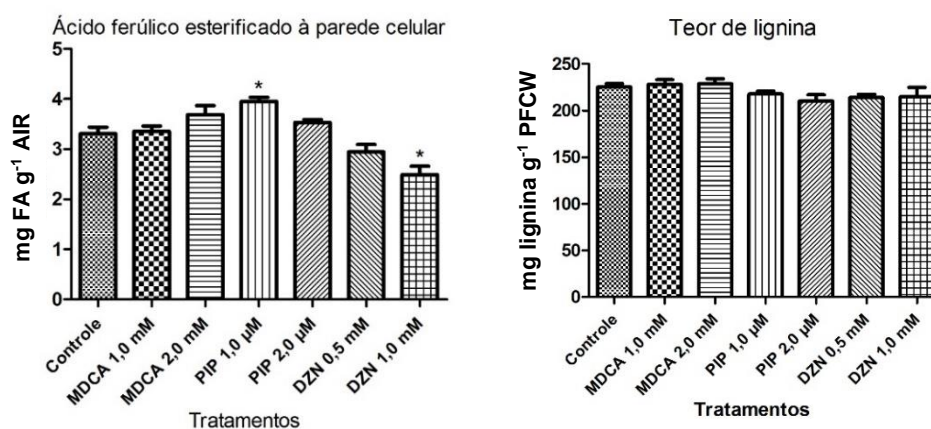
Os resultados de digestibilidade com 4 h de incubação mostram aumentos significativos de até 18% nos tratamentos com MDCA e PIP nas menores concentrações e de 15% para o PIP na maior concentração. Outros tratamentos também apresentaram aumento, porém, não significativos estatisticamente. Após 24 h de digestão, o tratamento com MDCA em sua menor concentração

chegou a 21% de aumento na liberação de açúcares redutores, enquanto que o PIP chegou a 16%, também na concentração menor. Os outros tratamentos também apresentaram maiores valores comparados ao controle, porém não significativos pelo teste de Dunnett (figura 14). Dados indicam que a digestibilidade do capim braquiária gira em torno de 50% com um ganho de massa corporal no gado leiteiro de aproximadamente 560g dia<sup>-1</sup> e com uma produção de 11 L dia<sup>-1</sup> de leite [37]. Melhorar a digestibilidade do pasto pode trazer rendimentos ainda maiores a longo prazo.



**Figura 14** – Digestibilidade enzimática de plantas de milho tratadas com PIP, MDCA e DZN por aspersão foliar. Resultados após 4 e 24 horas de incubação. As plantas foram cultivadas por 14 dias em sala de cultivo. Barras indicam valores médios ± erro padrão da média (n = 5). (\*) indica que as amostras são diferentes do controle segundo o teste de Dunnett (P≤0,05).

Diferentemente do primeiro ensaio, a análise do conteúdo de ácido ferúlico (figura 15) revelou um aumento significativo no tratamento com PIP na menor concentração. Na maior concentração de daizina houve uma redução.



**Figura 15** – Teor de ácido ferúlico esterificado à parede celular e lignina. Valores médios ± erro padrão da média (n = 5). (\*) indica significância estatística segundo o teste de Dunnett (P≤0,05). AIR (resíduo insolúvel em etanol). PFCW – Parede celular livre de proteínas.

Trabalhos em cana-de-açúcar [26] mostraram que a redução no ácido ferúlico estaria associado a aumentos na digestibilidade, o que não observamos aqui, pelo contrário, o tratamento com daidzina com uma redução significativa do ácido ferúlico, não aumentou a digestibilidade, enquanto o tratamento com PIP promoveu aumento do ácido ferúlico e na digestibilidade. A explicação pode estar na expressão da fenilalanina amônia-liase (PAL), a enzima que inicia a via dos fenilpropanoides, que é estimulada por estresse ambiental como radiação UV, radicais livres e tecidos lesionados [38, 39]. Acreditamos que essa discrepância na correlação ácido ferúlico/digestibilidade ocorreu devido aos períodos distintos onde a droga foi aplicada (após 10 dias da roçada no primeiro experimento e 7 dias no segundo). E ainda, os dois experimentos foram conduzidos em períodos distintos, podendo as plantas ter experimentado condições climáticas diferentes. Apesar dos inibidores atuarem diretamente na síntese dos monolignóis, o conteúdo de lignina (figura 19) não foi alterado significativamente em nenhum dos tratamentos; um dado importante uma vez que destaca a função fisiológica deste componente da célula vegetal.

## **Conclusão**

O tratamento das plantas por fertirrigação com PIP promoveu aumentos de até 29% na digestibilidade do capim braquiária, concomitantemente com aumento na produtividade. A aspersão foliar reduziu drasticamente a quantidade de água a ser utilizada durante os tratamentos quando comparada com a fertirrigação. Houve aumento significativo de até 21% na digestibilidade das plantas no tratamento com MDCA e de 16% no tratamento com PIP. Outros tratamentos também promoveram aumentos na digestibilidade menos expressivos. Dados biométricos do tratamento por aspersão revelaram uma tendência consistente, porém não significativa de aumento na biomassa nos tratamentos com MDCA e PIP. O PIP a  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  foi responsável por elevar a concentração de ácido ferúlico e a daidzina a  $1,0 \text{mmol L}^{-1}$  pela redução, sem afetar consistentemente a digestibilidade. Os tratamentos aumentaram a digestibilidade sem alterar o conteúdo de lignina, um resultado relevante, visto que uma redução na lignina poderia reduzir a resistência das plantas ao ataque de patógenos.

## Agradecimentos

Agradecemos a BASF, CAPES e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

## Referências

- [1] J. C. Escobar, E. S. Lora, O. J. Venturini, E. E. Yáñez, E. F. Castillo, O. Almazan, Biofuels: Environment, technology and food security, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13 (2009) 275–1287.
- [2] R. M. Boddey, R. Macedob, R. M. Tarré, E. Ferreira, O. C. de Oliveira, C. de P. Rezende, R. B. Cantarutti, J. M. Pereira, B. J. R. Alves, S. Urquiaga, Nitrogen cycling in *Brachiaria* pastures: the key to understanding the process of pasture decline, *Agriculture, Ecosystems and Environment* 103 (2004) 389–403.
- [3] J. E. Fargione, R. J. Plevin, J. D. Hill, The Ecological Impact of Biofuels, *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 41 (2010 Ago) 351-377.
- [4] A. L. Moreira, Melhoramento de pastagens através da técnica da sobressemeadura de forrageiras de inverno, *Pesquisa & Tecnologia* 3 (1) (2006).
- [5] M. D. Müller, E. N. Fernandes, C. R. T. Castro, D. S. C. Paciullo, F. D. F. Alves, Estimativa de acúmulo de biomassa e carbono em sistema agrossilvipastoril na zona da mata mineira, *Pesquisa Florestal Brasileira* 60 (2009 Dez) 11–17.
- [6] M.S. Buckeridge, A.P. Souza, W.D. dos Santos, Routes for Cellulosic Ethanol in Brazil, In: L. A. B. Cortez. *Sugarcane Bioethanol: R&D for productivity and sustainability* (2010) part 3 365-380.
- [7] W. D. dos Santos, E. A. Gomes, M. S. Buckeridge, Bioenergy and the Sustainable Revolution, In: M. S. Buckeridge, and G. H. Goldman, *Routes for Cellulosic Ethanol* 1 (2011) 15-26.
- [8] N. C. Carpita, M. Defernez, K. Findlay, B. Wells, D. A. Shouse, G. Catchpole, R. H. Wilson, M. C. McCann, Cell wall architecture of the elongating maize coleoptile, *Plant Physiol* 127 (2001 Out) 551-565.
- [9] T. M. Lenton, M. Crouch, M. Johnson, N. Pires, L. Dolan, First plants cooled the Ordovician, *Nature Geoscience* 5 (2012 Fev) 86-89.
- [10] C. Labandeira, The origin of herbivory on land: Initial patterns of plant tissue consumption by arthropods, *Insect Science* 14 (2007) 259-275.
- [11] J. A. Raven, Physiological correlates of the morphology of early vascular plants, *Botanical Journal of the Linnean Society* 88 (1984) 105–126.
- [12] J. Weng, C. Chapple, The origin and evolution of lignina biosynthesis, *New Phytologist* 187 (2010) 273–285.



- [13] K. Hahlbrock, D. Scheel, Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40 (1989) 347–369.
- [14] T. Vogt, Phenylpropanoid Biosynthesis, *Molecular Plant* 3 (1) (2010 Jan) 2-20.
- [15] K. M. Herrmann, L. M. Weaver, The shikimate pathway, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50 (1999) 473-503.
- [16] W. Boerjan, J. Ralph, M. Baucher, *Annu. Rev. Ligninbiosynthesis, Plant Biol.* 54 (2003) 519–546.
- [17] M. M. Campbell and R. R. Sederoff, Variation in lignin content and composition, *Plant Physiol.* 110 (1996) 3-13.
- [18] V. S. Chang, M. T. Holtzapple, Fundamental Factors Affecting Biomass Enzymatic Reactivity, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 84 (2000) 5-37.
- [19] K. M. Draude, C. B. Kurniawan, S. J. B. Duff, Effect of oxygen delignification on the rate and extent of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic material, *Bioresource Technology* 79 (2001) 113-120.
- [20] B. Yang, C. E. Wyman, Effect of Xylan and Lignin Removal by Batch and Flowthrough Pretreatment on the Enzymatic Digestibility of Corn Stover Cellulose, *Biotechnology and Bioengineering* 86 (2004 Feb) 88-95.
- [21] X. Zhao, F. Peng, K. Cheng, D. Liu, Enhancement of the enzymatic digestibility of sugarcane bagasse by alkali-peracetic acid pretreatment *Enzyme Microb Technol* 44 (2009) 17–23.
- [22] W. E. Kaar, C. V. Gutierrez, C. M. Kinoshita, Steam explosion of sugarcane bagasse as a pretreatment for conversion to ethanol, *Bioenergy* 14 (3) (1998) 277–287.
- [23] Y. Sun, J. Cheng, Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review, *Bioresour Technol* 83 (2002) 1–11.
- [24] L. A. Jackson, G. L. Shadle, R. Zhou, J. Nakashima, F. Chen, R. A. Dixon, Improving saccharification efficiency of alfalfa stems through modification of the terminal stages of monolignol biosynthesis, *BioEnergy Research* 1 (2008 Dez) 180-192.
- [25] C. L. Cass, Effects of phenylalanine ammonia lyase (PAL) knockdown on cell wall composition, biomass digestibility, and biotic and abiotic stress responses in *Brachypodium* *Journal of Experimental Botany* 66 (14) 2015 4317–4335.

- [26] W. D. dos Santos, M. S. Buckeridge, Patente Requerida no Instituto Nacional de Propriedade Industrial, sob o número 020110095739, (2011).
- [27] V. H. Salvador, D. M. Oliveira, D. C. C. Leite, A. G. Ita-Manoel, G. S. Bido, A. P. de Souza, A. L. Ferraz, M. L. T. M. Polizeli, F. M. Squina, O. Ferrarese-Filho, M. S. Buckeridge, Enzymatic inhibition of phenylpropanoid biosynthesis enhances sugarcane bagasse saccharification by reducing polymers cross-linkage and loosening parenchyma cell wall polymers (2015), phd tesis.
- [28] M. Schalk, F. Cabello-Hurtado, M. A. Pierrel, R. Atanossova, P. Saindrenan, D. Werck-Reichhart, Piperonylic acid, a selective, mechanism-based inactivator of the trans-cinnamate 4-hydroxylase: a new tool to control the flux of metabolites in the phenylpropanoid pathway, *Plant Physiol.* 118 (1998) 209–218.
- [29] A. P. Ferro, W. D. dos Santos, R. Marchiosi, M. de L. L. Ferrarese, F. A. V. Seixas, O. Ferrarese-Filho, *Zea mays* coniferyl aldehyde dehydrogenase: Three-dimensional structure and inhibition by daidzin (2014), phd tesis.
- [30] M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, & F. Smith, Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 28 (1956) 350-358
- [31] G. L. Miller, Use of dinitrosaiicyic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry* 31 (3) (1959) 426-428.
- [32] M.L.L Ferrarese, A. Zottis, O. Ferrarese-Filho, Protein-free lignin quantification in soybean (*Glycine max*) roots, *Biologia* 57 (2002) 541-543.
- [33] I. M. Morrison, A semi-micro method for the determination of lignin and its use in predicting the digestibility of forage crops, *J Sci Food Agric* 23 (1972) 455.
- [34] J.F.D. Dean, Lignin Analysis. In: Dashek, W.V., Ed., *Methods in Plant Biochemistry and Molecular Biology*, CRC Press, Boca Raton, (1997) 199-215.
- [35] A.R.D.C.F de Ascensão, I. A. Dubery, Panama disease: cell wall reinforcement in banana roots in response to elicitors from *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense race four, *Biochem Cell Biol* 90 (2000) 1173-1180
- [36] W. D. dos Santos, M. L. L. Ferrarese, O. Ferrarese-Filho, High performance liquid chromatography method for the determination of cinnamyl alcohol dehydrogenase activity in soybean roots, *Plant Physiology and Biochemistry*, 44 (2006) 511-515.
- [37] D. S. C. Paciullo, C. A. M. Gomide, J. L. B. Leite, H. Resende, Tecnologia e custo de produção de *Brachiaria decumbens* para uso sob pastejo, *Circular Técnica* 111 – Embrapa (2016).
- [38] R. A. Dixon, N. L. Paiva, Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism, *Plant Cell* 7 (1995) 1085–1097.

[39] R. A. Dixon, L. Achnine, P. Kota, C. J. Liu, M. S. S. Reddy L. J. Wang, The phenylpropanoid pathway and plant defence-a genomics perspective, *Molecular Plant Pathology* 3 (5) (2002) 371–390.

## **Capítulo III**

### **Um método rápido e econômico para a remoção de açúcares solúveis na biomassa lignocelulósica para ensaios de digestibilidade**

#### **Autores**

Denis Leandro de Freitas, Diego Eduardo Romero Gonzaga, Wanderley Dantas dos Santos<sup>1</sup>

#### **Afiliação**

Departamento de Bioquímica, Universidade estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790 – Zona 7, Maringá - PR, 87020-900.

Autor para correspondência: [wdsantos@uem.br](mailto:wdsantos@uem.br)

## Resumo

A produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica tem ganhado força nos últimos anos e várias abordagens têm sido propostas para o desenvolvimento de tecnologias que tornem o processo menos oneroso e mais eficiente: pré-tratamentos, novos coquetéis enzimáticos, modificações genéticas de plantas, fungos e leveduras têm permitido avanços substanciais na eficiência da sacarificação da biomassa. Para avaliar a eficiência da sacarificação em biomassas após pré-tratamentos ou em plantas que foram modificadas geneticamente é usual proceder uma lavagem exaustiva com etanol a fim de remover açúcares solúveis que podem interferir na análise de digestibilidade. Este processo consome grandes quantidades de etanol, energia elétrica e tempo de operação. Assim, neste trabalho, propomos um método rápido e econômico para remoção dos açúcares solúveis através de um sistema de refluxo. Nosso método permite a lavagem de várias amostras ao mesmo tempo, reduz substancialmente o consumo de solvente, energia elétrica e o tempo de operação quando comparado ao método tradicional utilizado.

**Palavras-chave:** *sistema de refluxo, etanol celulósico, biomassa lignocelulósica.*

## Introdução

A produção de biocombustíveis vem apresentando um crescimento sem precedentes nos últimos anos [1]. A conversão da biomassa lignocelulósica em combustíveis líquidos ganhou força e várias matérias-primas, como o bagaço da cana, trigo, milho, etc, tem mostrado um grande potencial para a produção de bioetanol [2, 3]. A parede celular vegetal é formada por celulose e hemiceluloses que podem ser hidrolisadas liberando açúcares simples, que assim, podem ser fermentados para a produção de etanol. Porém, o acesso a esses açúcares é limitado pela presença de compostos fenólicos e interligações que dificultam a ação das enzimas nos polissacarídeos da parede celular vegetal [4, 5]. Vários métodos vêm sendo propostos para tornar a biomassa lignocelulósica mais fácil de ser digerida, como modificações genéticas e pré-tratamentos [6]. Para se determinar se os diferentes tipos de tratamentos e modificações na biomassa interferem na digestibilidade, o material é normalmente digerido utilizando-se

extratos enzimáticos [7, 8, 9] avaliando-se a quantidade de açúcares redutores liberados após algumas horas. Para facilitar a análise dos açúcares liberados, é conveniente que antes da digestão, a biomassa seja lavada para extração dos açúcares solúveis naturalmente presentes na biomassa *in natura* que podem interferir na análise. Assim, uma lavagem exaustiva com etanol pode ser realizada para este fim. De forma geral, tal procedimento consiste em incubar as amostras em etanol 80% a 80 °C por duas horas, centrifugar, descartar o sobrenadante e repetir o processo de forma exaustiva até que a biomassa esteja livre dos açúcares solúveis. Este processo consome uma grande quantidade de etanol, energia para o aquecimento do solvente e centrifugação, além de consumir sucessivas horas de dedicação exclusiva do operador, sobretudo quando uma grande quantidade de amostra precisa ser analisada. Assim, o objetivo deste trabalho foi aprimorar o processo de lavagem da biomassa lignocelulósica. Para isso, foi utilizada uma lavagem por refluxo baseada no tipo Soxhlet, em um porta-amostras capaz de admitir um grande número de amostras simultaneamente (figura 1).

## Material e Métodos

As biomassas lignocelulósicas de capim braquiária (*Braquiaria decumbens*), milho (*Zea mays*) e colmo de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) foram lavadas pelo método tradicional e pelo método de refluxo a fim de comparar a eficácia do sistema de lavagem. A biomassa fresca foi coletada, seca em estufa a 60 °C até peso constante, triturada em moinho bola e 300 mg foram adicionados em tubo de centrífuga para o método convencional e em um suporte específico (figura 2) para o sistema de refluxo. No método convencional, as amostras foram incubadas em 5 mL de etanol 80%, 80 °C, 2 h, sendo centrifugada a 13000 g, 10 min. O procedimento foi repetido sucessivamente por seis ou mais vezes, dependendo do material a fim de extrair todo o açúcar solúvel desses tecidos. Ao final, uma alíquota do sobrenadante foi testada para a presença de açúcares solúveis pelo método do fenol-sulfúrico, usando glicose como padrão [10]. O método de lavagem por refluxo (figura 1) consistiu em embalar as amostras em telas de nylon semipermeáveis que permitem a perfusão do solvente e solutos, mas não dos componentes sólidos insolúveis da biomassa (figura 2). Estas amostras (0,3 g das 20 amostras) foram depositadas

em um compartimento de lavagem equipado com um agitador magnético responsável por manter a homogeneidade do sistema. O recipiente foi ligado a um balão de destilação através de um sifão e a um condensador. Por sua vez, o balão foi acomodado em uma manta térmica que permite a destilação do volume de etanol adicionado ao balão (500 mL). O vapor de etanol é liquefeito em um condensador resfriado a água, bombeada através de um banho termostático de modo que o etanol líquido, se deposita ainda quente sobre o recipiente contendo as amostras. Ao atingir o nível máximo, o etanol preenche um sifão e escorre completamente até retornar ao balão de destilação.

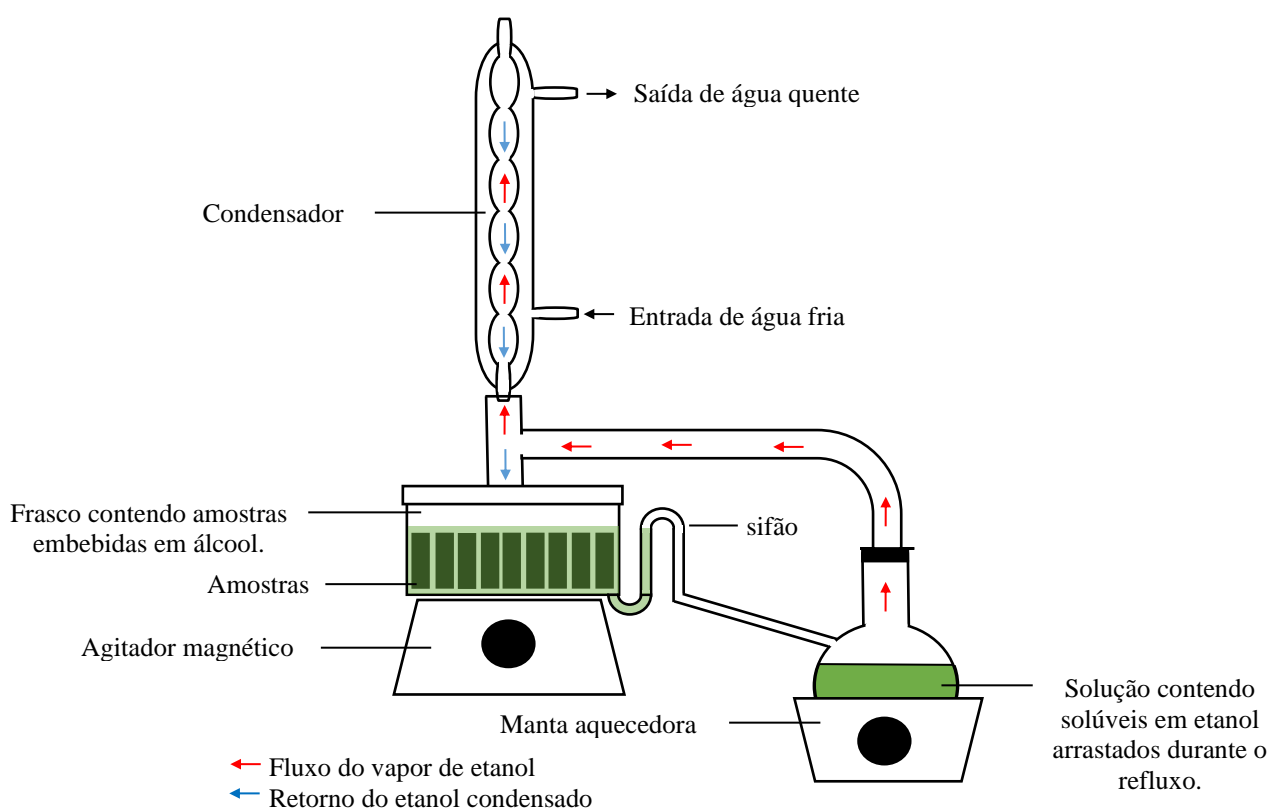


Figura 1 – Diagrama esquemático representando o sistema de lavagem de biomassa por refluxo.

Dessa forma, os sólidos removidos das amostras pelo etanol se acumulam gradativamente no balão de destilação. À medida que o etanol é sucessivamente destilado, as amostras são constantemente lavadas até remoção completa de compostos solúveis.

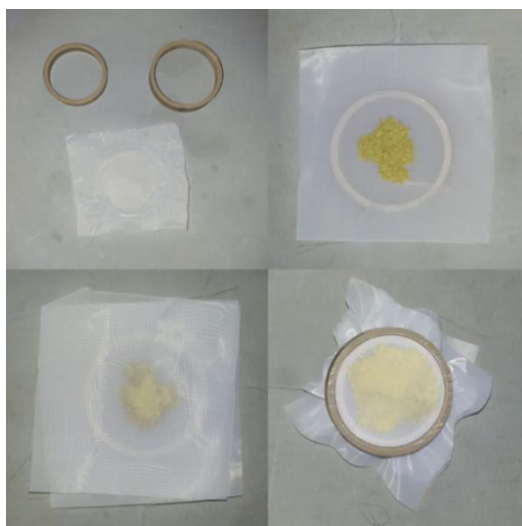


Figura 2 - Sistema de acondicionamento de amostras. Dois anéis de PVC de diâmetros diferentes (2,5 e 2,0 cm) se ajustam prendendo a amostra de interesse entre duas telas de nylon de serigrafia (4,5 x 4,5 cm, malha de 77 fios  $\text{cm}^{-2}$ ).

## Resultados e Discussão

Para lavar as amostras pelo método convencional, utilizamos 10 alíquotas de 0,3 g de cada uma das três espécies. Considera-se que a amostra está adequada para os ensaios de digestibilidade quando o teor de açúcares solúveis apresentava absorvância inferior a 0,05 determinada a 490 nm. Esta absorvância equivale a uma concentração de açúcares inferior a  $372 \mu\text{mol L}^{-1}$  de um padrão de glicose. Esse limiar foi alcançado após 7 lavagens (figura 3). Da oitava lavagem em diante, nota-se que as leituras voltam a subir após terem atingido valores próximos de 0,00 de absorvância (dados não mostrados). Provavelmente este fenômeno se deva à liberação de outros polissacarídeos como pectinas e hemiceluloses mais fracamente ligadas à celulose. Para a lavagem convencional, foi necessário 35 mL por amostra somando um total de 1,05 L de etanol. O procedimento levou aproximadamente 18 h distribuídos em 3 dias de trabalho intensivo do operador e consumiu 58 kWh de energia elétrica, ou  $1,9 \text{ kWh amostra}^{-1}$ .



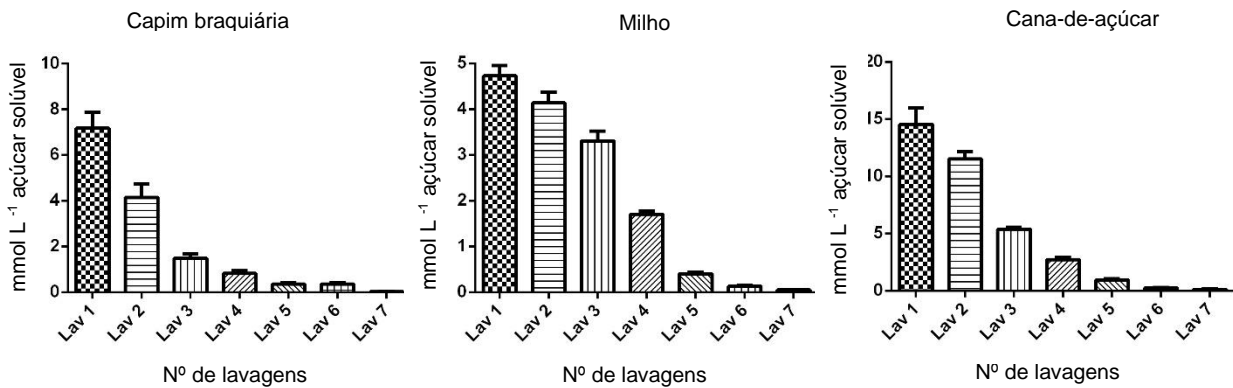


Figura 3 – Redução do teor de açúcares solúveis em função do número de lavagens pelo método convencional.

Para a remoção dos açúcares solúveis pelo método de refluxo, foram necessárias 3,5 h para a braquiária, 4,5 h para o milho e 7 horas para a cana-de-açúcar. No total, foram utilizados 500 mL de etanol para lavagem de todas as 60 amostras (20 amostras de cada espécie), ou seja, aproximadamente 8 mL amostra<sup>-1</sup>. Este mesmo etanol poderia ser utilizado para lavar ainda mais amostras, uma vez que após a lavagem, o etanol pode ser destilado no próprio sistema permitindo recuperação até 80%. Para a lavagem da biomassa de cana, o consumo de energia foi de 10,7 KWh (0,53 KWh amostra<sup>-1</sup>). A figura 4 mostra a redução de açúcar nos três materiais em função do tempo.

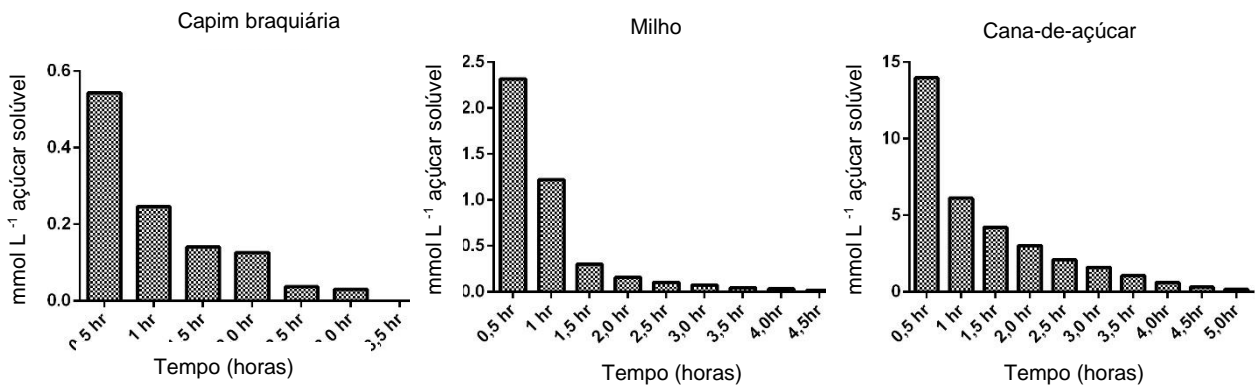


Figura 4 – Redução do teor de açúcar pelo sistema de refluxo. O valor de açúcar, mesmo da primeira lavagem é baixo, quando comparado ao método tradicional, em função de estar diluído em um volume muito maior de etanol (400 mL).

Ao término de cada período de lavagem, cada amostra foi retirada dos anéis de PVC, colocada em um tubo de centrífuga de 15 mL e incubada a 80 °C em 5 mL de etanol 80% por 2 h seguido de centrifugação. Uma alíquota do sobrenadante foi testada para a presença de açúcares solúveis. O objetivo foi testar a eficiência do processo automático que deveria apresentar valores de

açúcar inferiores a 0,372 mmol L<sup>-1</sup> usando o método tradicional. A tabela 1 apresenta os valores da concentração de açúcares solúveis de cada material, obtidos após a lavagem pelo sistema de refluxo. A análise foi feita pelo método do fenol-sulfúrico.

**Tabela 1** – Validação do sistema de refluxo. As amostras lavadas pelo sistema de refluxo foram incubadas em tubos de centrifuga com etanol 80% por 2 h a 80 °C. Os valores expressam a concentração média de açúcares totais em 20 amostras.

<b>Material</b>	<b>mmol L<sup>-1</sup> açúcar ± EPM</b>
Braquiária	0.094 ± 0,001
Milho	0.183 ± 0,018
Cana	0,121 ± 0,008

Em conclusão, o método de refluxo reduziu o tempo de remoção de açúcares solúveis em etanol de 18 h para entre 4 e 7 h, dependendo do tipo de material. Devido tratar-se de um processo automatizado, sem a intervenção do operador, o método reduzindo o trabalho de 24 para 8 homens-hora, incluído o tempo de preparação e operação. A técnica ainda reduziu o consumo de etanol em 77% e o consumo de energia elétrica em 95% considerando-se a mostra mais rica em sólidos solúveis (cana-de-açúcar). O método ainda reduziu o tempo de espera de secagem do material após a lavagem de 2 dias a 60 °C para 12 h (dados não mostrados). Os resultados revelam que, a lavagem pelo sistema de refluxo foi eficaz na remoção de açúcares, apresentando eficiência muito superior ao método tradicional.

## Notas

1. Para que a identificação das amostras não seja removida pelo etanol, está deve ser feita a lápis, no anel de PVC. Quando necessário, esta marcação é facilmente removida com uma borracha.
2. O número de amostras a ser colocado no sistema de refluxo pode ser aumentado, diminuindo-se o diâmetro dos anéis de PVC, conforme o tamanho das alíquotas desejado.
3. Anéis com diâmetros maiores também podem ser usados quando maiores volumes de amostra são necessários.

## Agradecimentos

Agradecemos a CAPES e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

## Referências

- [1] J.C. Escobar, E.S. Lora, O.J. Venturini, E.E. Yáñez, E. F. Castillo, O. Almazan, Biofuels Environment, technology and food security. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13 (2009) 1275–1287.
- [2] B. Buaban, H. Inoue, S. Yano, S. Tanapongpipat, V. Ruanglek, V. Champreda, R. Pichyangkura, S. Rengpipat, L. EURwilaichitr, Bioethanol production from ball milled bagasse using a non-site produced fungal enzyme cocktail and xylose-fermenting *Pichia stipitis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 10 (1) (2010) 18-25.
- [3] R. Van Acker, R. Vanholme, V. Storme, J.C. Mortimer, P. Dupree, W. Boerjan, Lignin biosynthesis perturbations affect secondary cell wall composition and saccharification yield in *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnology for Biofuels* 6 (2013) 46.
- [4] M.S. Buckeridge, A.P. Souza, W.D. dos Santos, Routes for Cellulosic Ethanol in Brazil. In: Luiz Augusto Barbosa Cortez. (Org.). *Sugarcane Bioethanol: R&D for productivity and sustainability*, São Paulo: Blucher part 3 (2010) 365-380.
- [5] W.D. dos Santos, E.A. Gomes, M.S. Buckeridge, Bioenergy and the Sustainable Revolution. In: Buckeridge, M.S. and G.H. Goldman, (Org.) *Routes for Cellulosic Ethanol*, New York: Springer, 2011, pp. 15-26.
- [6] H. Hisano, R. Nandakumar, Z. Wang, Genetic modification of lignin biosynthesis for improved biofuel production. *In Vitro Cell.Dev.Biol-Plant* 45 (2009) 306–313.
- [7] X. Zhao, F. Peng, K. Cheng, D. Liu, Enhancement of the enzymatic digestibility of sugarcane bagasse by alkali-pancreatic acid pretreatment, *Enzyme Microb. Technol.* 44 (2009) 17–23.
- [8] B. Yang, C.E. Wyman, Effect of Xylan and Lignin Removal by Batch and Flowthrough Pretreatment on the Enzymatic Digestibility of Corn Stover Cellulose, *Biotechnology and Bioengineering* 86 (2004) 88-95.
- [9] H. Jung, D. Samaca, G. Sarath, Modifying crops to increase cell wall digestibility, *Plant Sci* 185-186 (2012) 65-77.
- [10] M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, & F. Smith, Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 28 (1956) 350-358.