

Universidade Estadual de Maringá

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas
(Biologia Celular e Molecular)

Laboratório de Bioquímica Vegetal - BIOPLAN

III Curso de Inverno

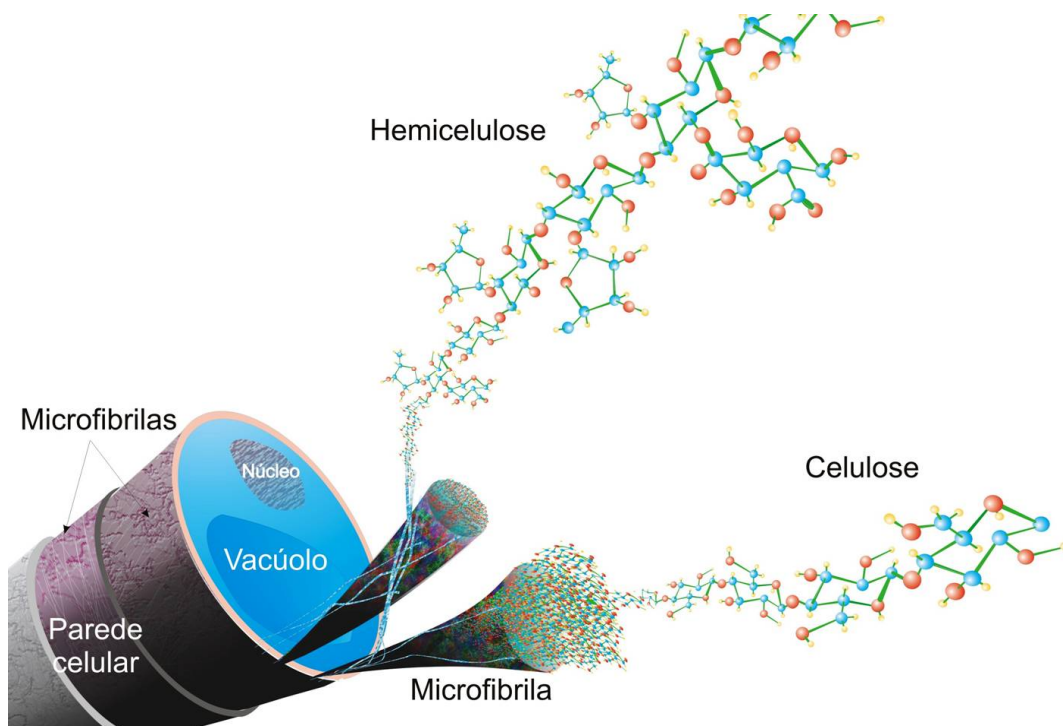
**Produtos naturais para Bioenergia: Uso
de inibidores de lignificação para
produção de etanol celulósico**

Aline Finger Teixeira
Ana Paula Ferro
Anderson Ricardo Soares
Gisele Adriana Bubna
Graciene de Souza Bido
Jennifer Munik Bevilaqua
Joselaine Viganó
Rogério Barbosa de Lima
Rogério Marchiosi
Tiara da Silva Coelho Bortolo
Wanderley Dantas dos Santos
Maria de Lourdes Lúcio Ferrarese
Oswaldo Ferrarese-Filho

Capa: Fotomicrografia de AFM (microscopia de força atômica) da parede celular de células em suspensão de cana-de-açúcar evidenciando microfibrilas de celulose/hemicelulose cortesia Vinícius Pimentel, Marcos Buckeridge e Wanderley dos Santos.

1. INTRODUÇÃO

Após o surgimento da parede celular secundária as plantas desenvolveram a rigidez e hidrofobicidade necessárias para a condução da água, necessária para viver em ambientes terrestres secos (Boerjan *et al.*, 2003). A parede celular, em geral, é formada por uma combinação de polímeros e, entre eles, os polissacarídeos representam a maior parte (80-90%) e estão distribuídos em três classes: celulose, hemiceluloses e pectinas (Buckeridge, 2006).



A lignina e a celulose formam a lignocelulose, que compõe quase a totalidade dos rejeitos de plantas utilizados como matéria-prima pela indústria, como o bagaço e a palha. O potencial da biomassa como matéria-prima é ainda mais contundente se forem consideradas outras lavouras como a soja, milho, trigo, arroz e aveia (Souza e Macedo, 2010).

A celulose, principal componente da biomassa, é formada por uma cadeia linear de moléculas de glicose ligadas entre si. Estas ligações químicas guardam energia livre e podem ser quebradas para liberar açúcares fermentáveis. Entretanto, a celulose é muito bem protegida pelas plantas, a fim de que não sejam facilmente utilizadas por

predadores. Portanto, o rendimento líquido da conversão da celulose em glicose livre, e a seguir em etanol, é pouco eficiente com as tecnologias disponíveis. Tornar os rendimentos favoráveis possibilitará o melhor aproveitamento dessa rica matéria prima natural encontrada não só no bagaço da cana, mas em outras fontes de biomassa vegetal (serragens, palhadas, cascas) atualmente desperdiçadas ou subutilizadas (Buckeridge et al., 2010).

A desmontagem bioquímica – controlada – da parede celular tem sido proposto como alternativa para tornar viável o uso dos polissacarídeos como fonte de açúcares fermentáveis. Este processo deve preservar intactos os monossacarídeos que serão usados para a fermentação. O desenvolvimento de tecnologias capazes de desmontar a parede celular vegetal requer o aprofundamento do nosso conhecimento sobre a estrutura da lignina e da rede de polímeros que constitui a parede celular. Além disso, o conhecimento das propriedades físicas e biológicas da parede celular em diferentes tecidos e órgãos bem como das suas vias de síntese pode ser usado para modificar as características da parede para uso industrial ou alimentar.

Depois da celulose, a lignina é o polímero mais abundante das paredes celulares (Polle et al., 1994). Ela reduz a digestibilidade dos polissacarídeos de plantas forrageiras, afeta a qualidade do papel e reduz a produção do bioetanol de segunda geração. Os principais programas de pesquisa e desenvolvimento envolvendo a lignina buscam reduzir seu conteúdo, com o intuito de melhorar a produção de biocombustível a partir da celulose (Li et al., 2008).

A lignina é um polímero de constituição difícil de ser estabelecida, devido à complexidade de sua formação, as modificações estruturais durante seu isolamento das paredes celulares, a variação na sua composição monomérica e as ligações covalentes entre a parede celular e outros compostos (carboidratos, proteínas, compostos fenólicos). Dado que a deposição e composição da lignina podem variar com a camada, o tipo de parede celular e com a espécie (Anterola et al., 2002), vários métodos têm sido aplicados para estudá-la de forma complementar. Muito do conhecimento sobre sua estrutura deriva dos métodos de quantificação total e as estimativas dos componentes monoméricos (Micic et al., 2002).

A lignina é formada por uma mistura racêmica de heteropolímeros aromáticos, composto principalmente, de três hidroxicinamil álcoois (*p*-cumaril, coniferil e sinapil) que diferem no seu grau de metoxilação. Eles correspondem às unidades monoméricas *p*-hidroxifenil, guaiacil e siringil (H, G e S, respectivamente; Li et al., 2008). Entretanto,

além de seus componentes básicos, a lignina apresenta outros componentes, que embora presentes em menor quantidade, são igualmente importantes para a determinação das propriedades e funções desse polímero.

Compostos fenólicos como os ácidos *p*-cumárico e ferúlico são componentes da lignina e estão ligados à parede celular, juntamente com dímeros do ácido ferúlico (Barrière et al., 2009). Os resíduos de ácido ferúlico parecem funcionar como sítios de nucleação para a polimerização de lignina (Ishii, 1997), fornecendo pontos de crescimento para o polímero e ligações na parede celular (Jacquet et al., 1995). O ácido ferúlico pode ser esterificado com polissacarídeos da parede celular, principalmente a glicuronoarabinoxilanos, enrijecendo-a e restringindo o crescimento celular (Sánchez et al., 1996; Lam et al., 2001).

Várias enzimas estão envolvidas na síntese de lignina, sendo a seqüência metabólica que conduz a esse processo conhecida como via de fenilpropenoides, descrita, simplificada, na figura 1.

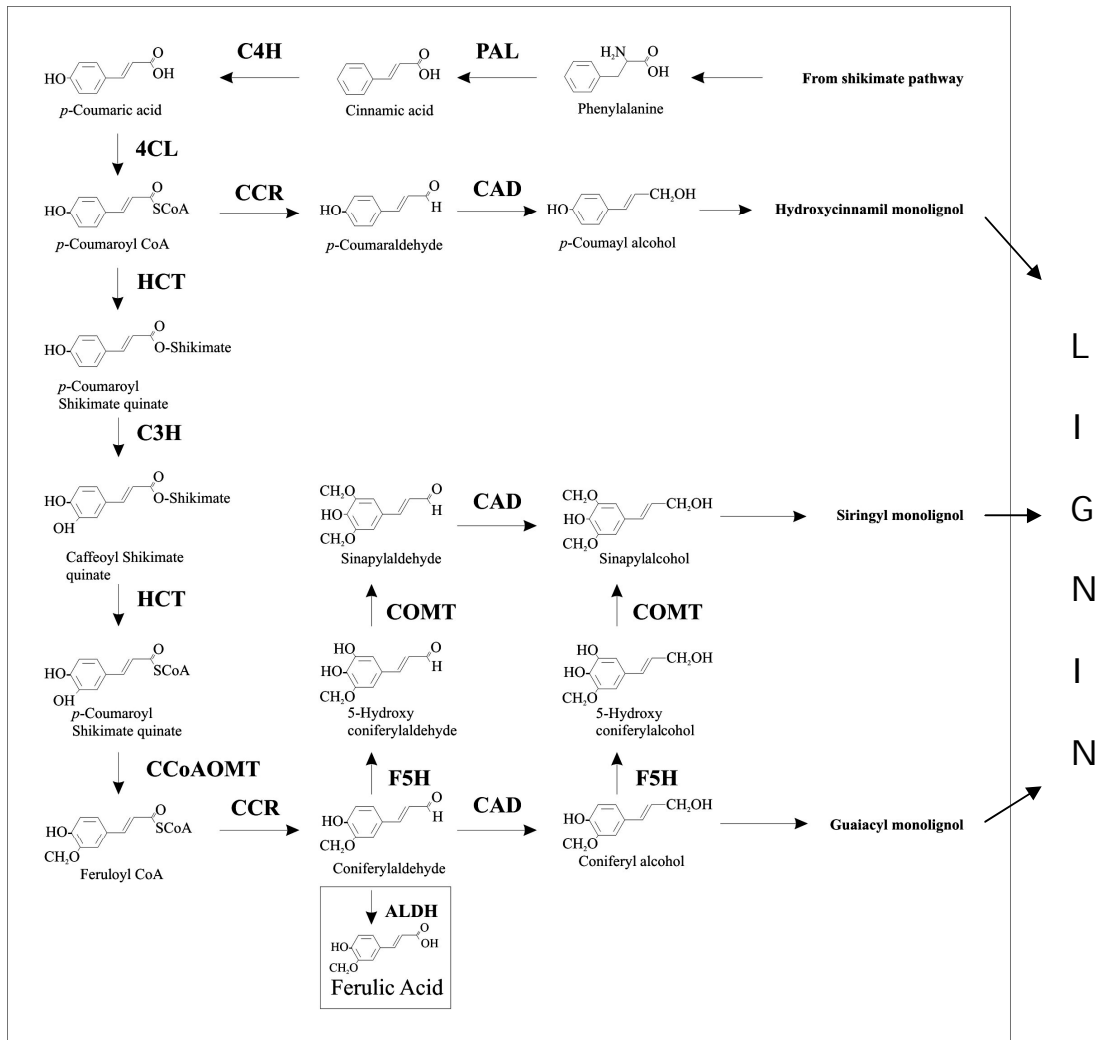


Fig. 1. Via dos fenilpropenóides e biossíntese da lignina simplificada destacando a produção de ácido ferúlico (dos Santos *et al.*, 2008). (**PAL**, fenilalanina amônia liase, **C4H**, cinamato 4-hidroxilase, **4-CL**, 4-cumarato:CoA-ligase, **HCT**, hidroxicinamoil-CoA chiquimato/quinato transferase, **C3H**, *p*-cumaroilchiquimato/quinato 3'-hidroxilase, **CCoAOMT**, cafeoil-CoA *O*-metiltransferase, **CCR**, cinamoil-CoA redutase, **F5H**, ferulato-5-hidroxilase, **COMT**, ácido cafeico *O*-metiltransferase, **CAD**, cinamil álcool desidrogenase, **ALDH**, Aldeído desidrogenase).

A primeira reação da via dos fenilpropenóides é catalisada pela fenilalanina amônia liase (PAL), que converte L-fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico. A 4-cumarato:CoA ligase (4-CL) catalisa a formação de tioésteres CoA dos ácidos cinâmico, *p*-cumárico, cafeico, ferúlico e 5-hidroxiferúlico. Outra etapa na via de síntese de fenilpropenóides de grande importância no desenvolvimento de plantas é a que gera fenólicos precursores para a síntese e deposição de lignina na parede celular. Esses precursores são relatados por Hahlbrock e Scheel (1989) como sendo monômeros de álcoois cinâmicos, hidroxilados e metoxilados, que são sintetizados em dois passos pela cinamoil-CoA redutase (CCR) e cinamil álcool desidrogenase (CAD).

O ácido piperonílico (PIP) é um inibidor irreversível da enzima C4H, que converte ácido *t*-cinâmico em ácido *p*-cumárico, enquanto que o ácido 3,4-(metilenodioxo) cinâmico (MDCA) é um inibidor competitivo da enzima 4-CL, que converte os ácidos hidroxicinâmicos, inclusive o ácido ferúlico, em tio-ésteres de hidroxicinamoil-CoA (Chakraborty *et al.*, 2009).

2. OBJETIVOS

- a) Compreender a arquitetura e as propriedades da parede celular vegetal, bem como sua complexidade e diversidade;
- b) Relacionar a via dos fenilpropenóides com os processos bioenergéticos;
- c) Identificar a importância das atividades enzimáticas e a interferência de inibidores na via dos fenilpropenóides;
- d) Determinar o crescimento (comprimento e biomassa fresca e seca) de plântulas tratadas ou não com PIP;
- e) Quantificar o conteúdo de lignina total e sua composição monomérica, determinando a proporção dos principais monômeros (*p*-hidroxifenil, guaiacil e siringil).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultivo e preparação das plântulas

Sementes de milho (*Zea mays*) serão desinfectadas com 2% hipoclorito de sódio por 5 min, lavadas com água, postas a germinar no escuro, a 25°C, entre folhas de papéis Germitest CEL-060. Após três dias, vinte e cinco plântulas serão cultivadas em hidroponia. Elas serão suspensas em uma placa de acrílico perfurada e transferidas para um recipiente de vidro (10 × 16 cm) contendo 200 ml de solução nutritiva, pH 6,0, contendo ou não PIP. O recipiente será mantido em câmara de crescimento (25°C, 12/12 h fotoperíodo luz/escuro, irradiância de 280 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 24 h.

3.2. Crescimento de plântulas de milho

Para avaliação do crescimento das raízes, estas foram medidas no início e final de cada experimento, com auxílio de régua milimetrada. As diferenças entre os comprimentos iniciais e finais serão determinadas e os resultados expressos em centímetros. As raízes serão excisadas e, imediatamente, determinada a biomassa fresca, utilizando-se balança analítica. Os resultados serão expressos em gramas. Em seguida as raízes serão acondicionadas em estufa, à temperatura de 60°C, até a obtenção de peso constante, para obtenção da biomassa seca.

3.3. Preparação da parede celular

Tecidos secos (0,3 g), serão homogeneizadas em tampão fosfato 50 mM pH 7,0 (7 ml) e transferidos para um tubo de centrifuga (Ferrarese et al., 2002). O precipitado será centrifugado (1.400×g, 6 min), lavado e centrifugado sucessivamente como segue: mais 2 vezes com tampão fosfato 50 mM pH 7,0 (7 ml); 3 vezes com Triton[®] X-100 1% (v/v) em tampão pH 7,0 (7 ml); 2 vezes com NaCl 1 M em tampão pH 7,0 (7 ml); 2 vezes com água destilada (7 ml) e 2 vezes com acetona (5 ml). O material será seco em estufa (60°C, 24 h) e a massa definida como a fração da parede celular livre de proteínas.

3.4. Quantificação de lignina

A parede celular livre de proteínas será usada para a determinação do teor total de lignina pelo método da lignina solúvel em brometo de acetila (Morrison, 1972). Uma porção (20 mg) do material será acondicionada em tubo de centrífuga e 500 μ l de acetilbromida 25% serão acrescentados. As amostras serão aquecidas a 70°C, 30 min, transferidas para banho de gelo e a reação será interrompida com adição de 0,9 ml de NaOH 2 M. A seguir, serão adicionados 0,1 ml de hidroxilamina-HCl 7,5 M e 2 ml de ácido acético gelado. As amostras serão centrifugadas (1.000 \times g, 5 min), o sobrenadante diluído e usado para a realização das leituras em espectrofotômetro a 280 nm. A concentração de lignina será determinada de acordo com uma curva padrão e será expressa em mg lignina g⁻¹ de parede celular.

3.5. Quantificação da composição monomérica da lignina

Para determinar a composição monomérica de lignina será usada a oxidação com nitrobenzeno (Dean, 1997). Uma fração da parede celular livre de proteínas (50 mg) será colocada em uma ampola Pyrex[®] contendo 1 ml de NaOH 2 M e 100 μ l de nitrobenzeno. A ampola será selada e aquecida a 170°C por 2,5 h, com agitação na metade do tempo de reação. Após oxidação, a amostra será resfriada, lavada duas vezes com clorofórmio, acidificada com 350 μ l de HCl 5 M e extraída duas vezes com clorofórmio. Os extratos orgânicos serão combinados, secos e ressuspensos em metanol. As amostras serão filtradas através de filtro de 0,45 μ m (Hamilton[®] Co., Nevada, USA) e analisadas (20 μ l) em cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu[®] (Tóquio, Japão), equipado com uma bomba LC-10AD, um injetor Rheodyne[®], um detector UV SPD-10A, um módulo de comunicação CBM-101 e uma estação de sistema Class-CR10. Uma coluna de fase-reversa Shimpack[®] CLC-ODS (M) (150 \times 4.6 mm, 5 μ m) será usada a 30°C, com uma pré-coluna equivalente (10 \times 4.6 mm). A coleta de dados e a integração serão realizados com o software Class-CR10 (Shimadzu[®], Tóquio, Japão). A fase móvel será metanol/ácido acético 4% em água (20/80, v/v), com fluxo de 1,0 ml min⁻¹ para corrida isocrática de 20 min. As quantificações de *p*-hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído serão realizadas a 290 nm utilizando os padrões correspondentes. Os resultados serão expressos como μ g monômero mg⁻¹ de parede celular.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHTERHOLT S., PRIEFERT H., STEINBÜCHEL A. 1998. Purification and Characterization of the Coniferyl Aldehyde Dehydrogenase from *Pseudomonas* sp. Strain HR199 and Molecular Characterization of the Gene. *J Bacteriology*. 180:4387-4391.
- ANTEROLA A.M., JEON J.-H., DAVIN L.B., LEWIS N.G. 2002. Transcriptional control of monolignol biosynthesis in *Pinus taeda*. Factors affecting monolignol ratios and carbon allocation in phenylpropanoid metabolism. *J Biol Chem*. 277:18272–18280.
- BARRIERE Y., MECHIN V., LAFARGUETTE F., MANICACCI D., GUILLON F., WANG H., LAURESSERGUES D., PICHON M., BOSIO M., TATOUT C. 2009. Toward the discovery of maize cell wall genes involved in silage quality and capacity to biofuel production. *Maydica*. 54: 161-198.
- BOERJAN W., RALPH J., BAUCHER M. 2003. Lignin biosynthesis. *Ann Rev Plant Biol*. 54:519-546.
- BUCKERIDGE M. S. 2006. Implications of emergence, degeneracy and redundancy for the modeling of the plant cell wall. In: Takahisa Hayashi. (Org.). *The Science and the Lore of the Plant Cell Wall: Biosynthesis, Structure and Function*. Boca Raton: BrownWalker Press. 41-47.
- BUCKERIDGE M.S., SOUZA A.P., DOS SANTOS W.D. 2010. Routes for Cellulosic Ethanol in Brazil. In: Luiz Augusto Barbosa Cortez. (Org.). *Sugarcane Bioethanol: R&D for productivity and sustainability*. Blucher. São Paulo.
- DEAN J.F.D. 1997. Lignin analysis. In: Dashek, W.V. (Ed.). *Methods in Plant Biochemistry and Molecular Biology*. CRC Press. 199-215p.
- Dos SANTOS W.D., FERRARESE M.L.L., NAKAMURA C.V., MOURÃO K.S.M., MANGOLIM C.A., FERRARESE-FILHO O. Soybean (*Glycine max*) root lignification induced by ferulic acid. The possible mode of action. *J Chem Ecol*. 34:1230-1241, 2008.
- FERRARESE M.L.L., ZOTTIS A., FERRARESE-FILHO O. 2002. Protein-free lignin quantification in soybean (*Glycine max*) roots. *Biologia*. 57:541-543.
- HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v.40, p.347-369, 1989.
- ISHII T. 1997. Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Sci*. 127:111–127.
- JACQUET G., POLLET B., LAPIERRE C., MHAMDI F., ROLANDO C. 1995. New ether-

- linked ferulic acid-coniferyl alcohol dimers identified in grass straws. *J Agric Food Chem.* 43:2746–2751.
- LAM T.B.T., KADOYA K., IYAMA K. 2001. Bonding of hydroxycinnamic acids to lignin: ferulic and *p*-coumaric acids are predominantly linked at the benzyl position of lignin, not the β -position, in grass cell walls. *Phytochem.* 57:987-992.
- LI X., WENG J-K., CHAPPLE C. 2008. Improvement of biomass through lignin modification. *Plant J.* 54:569-581.
- MICIC M., ORBULESCU J., RADOTIC K., JEREMIC M., SUI G., ZHENG Y., LEBLANC R.M. 2002. ZL-DHP lignin model compound at the air – water interface. *Biophys Chem.* 99:55-62.
- MORRISON I.M. 1972. A semi-micro method for the determination of lignin and its use in predicting the digestibility of forage crops. *J Sci Fd Agric.* 23:455.
- NAIR R.B., BASTRESS K.L., RUEGGER M.O., DENAULT J.W., CHAPPLE C. 2004. The *Arabidopsis thaliana* REDUCED EPIDERMAL FLUORESCENCE1 Gene Encodes an Aldehyde Dehydrogenase Involved in Ferulic Acid and Sinapic Acid Biosynthesis. *The Plant Cell.* 16:544-554.
- POLLE A., OTTER T., SEIFERT F. 1994. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiol.* 106:53-60.
- SÁNCHEZ M., PENA M.J., REVILLA G., ZARRA I. 1996. Changes in dehydrodiferulic acids and peroxidase activity against ferulic acid associated with cell walls during growth of *Pinus pinaster* hypocotyl. *Plant Physiol.* 111:941-946.
- SHOICHET B.K. Virtual screening of chemical libraries. 2004. *Nature.* 16(432):862-865.
- SOUZA E.L.L., MACEDO I.C. 2010. Etanol e bioeletricidade: A cana-de-açúcar na matriz energética brasileira. São Paulo, Luc Projetos de Comunicação. <<http://www.unica.com.br/multimedia/publicacao>>. Acesso em: 10 04 2012.