

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ - UEM
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JENNIFER MUNIK BEVILAQUA

**EFEITOS DO ÁCIDO ROSMARÍNICO NA ESTRUTURA DA LIGNINA
VISANDO REDUÇÃO DA RECALCITRÂNCIA DA BIOMASSA
LIGNOCELULÓSICA EM MILHO**

Maringá
2017

JENNIFER MUNIK BEVILAQUA

**EFEITOS DO ÁCIDO ROSMARÍNICO NA ESTRUTURA DA
LIGNINA VISANDO REDUÇÃO DA RECALCITRÂNCIA DA
BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA EM MILHO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área de Concentração – Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese-Filho

Maringá
2017

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

B571e Bevilaqua, Jennifer Munik
Efeitos do ácido rosmarínico na estrutura da
lignina visando redução da recalcitrância da
biomassa lignocelulósica em milho / Jennifer Munik
Bevilaqua. -- Maringá, PR, 2017.
62 f.: il., figs.

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese-Filho.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2017.

1. Lignina - Milho (*Zea Mays* L.). 2. Ácido
rosmarínico. 3. Lignificação. 4. Bioenergia. I.
Ferrarese-Filho, Osvaldo, orient. II. Universidade
Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.
III. Título.

CDD 23.ed. 572.43

MRPB-003611

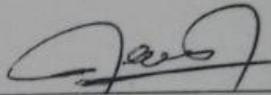
JENNIFER MUNIK BEVILAQUA

EFEITOS DO ÁCIDO ROSMARÍNICO NA ESTRUTURA DA LIGNINA
VISANDO REDUÇÃO DA RECALCITRÂNCIA DA BIOMASSA
LIGNOCELULÓSICA EM MILHO

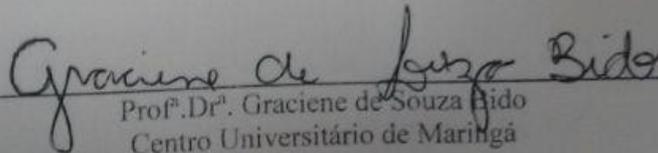
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Área de concentração – Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 30 de março de 2017.

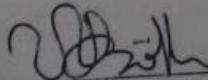
BANCA EXAMINADORA



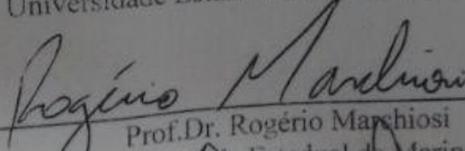
Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese-Filho (Orientador)
Universidade Estadual de Maringá



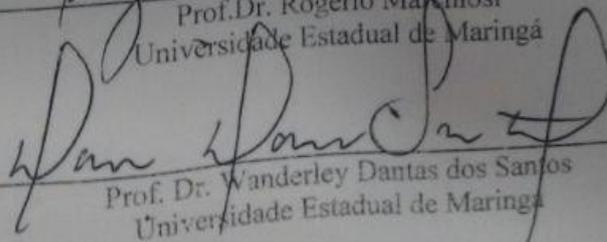
Prof. Dr. Graciene de Souza Bido
Centro Universitário de Maringá



Prof. Dr. Paulo Alfredo Feitoza Böhm
Universidade Estadual do Paraná (UNESPAR)



Prof. Dr. Rogério Marchiosi
Universidade Estadual de Maringá



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

BIOGRAFIA

Jennifer Munik Bevilaqua nasceu em Rolim de Moura/RO em 26/03/1987. Possui graduação em Ciências Biológicas, com habilitação em Licenciatura, pela Universidade Estadual de Maringá (2011). Concluiu o Mestrado no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) também pela Universidade Estadual de Maringá (2014) e iniciou o curso de Doutorado pelo mesmo programa em março de 2014, desenvolvendo o projeto “Efeitos do ácido rosmarínico na estrutura da lignina visando redução da recalcitrância da biomassa lignocelulósica em milho”. Tem experiência na área de Bioquímica, atuando principalmente nos temas relacionados à Bioquímica Vegetal com ênfase no Metabolismo Secundário de Plantas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me sustentou e permitiu eu chegar até aqui e concluir este trabalho de doutorado, e de certa forma concluir mais uma etapa da minha vida;

Agradeço a minha mãe que foi e é essencial na minha vida e na execução deste trabalho. Sempre me apoiando e incentivando mesmo diante das dificuldades que pudessem ser encontradas;

Agradeço ao meu namorado, Marcelo, que tem me impulsionado a concluir com êxito meu doutorado e alcançar novos horizontes e oportunidades que surgirem em minha vida;

Agradeço ao professor Osvaldo pela oportunidade dada de desenvolver não só o presente trabalho, mas também do aprendizado que eu obtive durante estes 8 anos fazendo parte do Bioplan;

Agradeço aos colegas de laboratório que me auxiliaram na execução e desenvolvimento da presente tese e pela relação de amizade estabelecida;

Agradeço a Cidinha, técnica do Laboratório de Bioquímica de Plantas, pelos ensinamentos e ajuda que sempre ofereceu;

Agradeço a CAPES pela concessão de bolsa e a Universidade Estadual de Maringá.

APRESENTAÇÃO DO TRABALHO

Esta tese é composta de dois artigos científicos. Inicia com o artigo “Ácido rosmarínico interfere na via de fenilpropanoides e afeta a composição monomérica de lignina de raízes de milho” que trata dos efeitos do ácido rosmarínico no crescimento e lignificação de raízes de plântulas de milho, e sua possível incorporação na estrutura do polímero com subsequente alteração na sua composição monomérica. Este primeiro artigo se iniciou durante o desenvolvimento da dissertação de mestrado da pós-graduanda e em consonância com o programa de pós-graduação em Ciências Biológicas, visando complementação do estudo realizado, o trabalho teve continuidade no doutorado da pós-graduanda. Sendo assim, a segunda parte da presente tese versa sobre o mesmo tema, porém com novas ferramentas analíticas e se encerra com o segundo artigo “Ácido rosmarínico: um indutor da digestibilidade da biomassa lignocelulósica em milho” que avalia a digestibilidade enzimática de plantas de milho tratadas com o ácido rosmarínico. Em consonância com as regras do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, os artigos serão submetidos às seguintes revistas.

Bevilaqua, J.M., Finger-Teixeira, A., Marchiosi, R. e Ferrarese-Filho, O. Ácido rosmarínico interfere na via de fenilpropanoides e afeta a composição monomérica de lignina de raízes de milho. *Plant Growth Regulation* (JCR = 2,333).

Bevilaqua, J.M., Finger-Teixeira, A. e Ferrarese-Filho, O. Ácido rosmarínico: um indutor da digestibilidade da biomassa lignocelulósica em milho. *Biotechnology Journal* (JCR = 3,781).

RESUMO GERAL

INTRODUÇÃO – Depois da celulose, a substância orgânica mais abundante nas plantas é a lignina, um polímero altamente formado por grupos fenilpropanoides. A estrutura precisa da lignina não é bem conhecida. A sua caracterização é difícil porque não é possível isolar o polímero intacto, o qual está covalentemente ligado à celulose e a outros polissacáridos da parede celular. Lignina é formada, principalmente, pela polimerização de três álcoois hidroxicinâmílicos, os quais variam no grau de metoxilação, além de uma diversidade menor de outros componentes secundários. Estes três precursores, ou monolignóis, são os álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico. Após a polimerização, estes monolignóis são convertidos em unidades monoméricas denominadas *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), respectivamente. Lignina possui alto impacto na indústria de papel e na digestibilidade de plantas forrageiras. O atual estado da arte está relacionado à busca da redução de seu conteúdo, com o intuito de melhorar a produção de biocombustíveis derivados da celulose. O ácido rosmarínico é um éster dos ácidos cafeico e 3,4-diidroxifenilático, encontrado como um metabólito secundário de várias espécies de plantas. Ácido rosmarínico pode ser considerado um composto promissor no campo da bioengenharia, possuindo uma ligação éster frágil que liga duas metades fenólicas; fato crucial para o processo de despolimerização da lignina. Estudos recentes revelaram os genes, enzimas e metabólitos envolvidos na biossíntese do ácido rosmarínico. Assim, estas informações são essenciais para o estudo da expressão do ácido rosmarínico na lignificação das paredes celulares. A utilização prévia de ácido rosmarínico tem sido considerada no campo da bioengenharia, visando o mecanismo de síntese de lignina e sua aplicação no melhoramento de plantas para a produção de biocombustíveis. Sabe-se que fatores internos e externos podem afetar a síntese de lignina. Estudos com putativos inibidores da síntese de lignina têm merecido atenção especial, pois o uso da biomassa vegetal como fonte de carboidratos para obter biocombustíveis e produtos químicos de alto valor agregado tem sido severamente afetado devido à recalcitrância da lignina. De fato, essa recalcitrância dificulta algumas atividades agroindustriais como a digestão da forragem para o gado e a conversão de biomassa vegetal lignocelulósica em biocombustíveis líquidos.

OBJETIVOS – Diante do descrito acima, o objetivo geral deste trabalho foi investigar os efeitos do ácido rosmarínico no processo de lignificação em milho e avaliar a digestibilidade da biomassa vegetal tratadas com o possível substituinte monolignol. Para isso, o trabalho foi dividido em duas partes, sendo que na primeira as plântulas foram cultivadas em hidroponia por 24 horas e os ensaios realizados com as raízes. Na segunda parte, os experimentos foram conduzidos em vasos contendo vermiculita (de 7 a 14 dias) e as análises foram realizadas com raízes, caules e folhas. Foram monitoradas as taxas de crescimento, depleção do ácido rosmarínico, conteúdo de lignina e composição monomérica, teor de ácidos fenólicos livres, atividades enzimáticas da via dos fenilpropanoides e, por fim, determinada a digestibilidade da biomassa lignocelulósica de raízes, caules e folhas de plântulas/plantas de milho cultivadas em solução nutritiva e/ou vermiculita, após os tratamentos com ácido rosmarínico.

MÉTODOS – Sementes de milho foram acondicionadas em papel Germitest e postas a germinar (câmara escura, 25 °C) por 72 horas para posterior incubação em hidroponia, ou por 48 horas para posterior transferência para vasos contendo vermiculita. Em relação aos sistemas hidropônicos, após o período de germinação, 25 plântulas foram cultivadas em solução nutritiva (pH 6,0) contendo ou não ácido rosmarínico (0,25; 0,5; 0,75; 1,0 e 1,5 mM). Os experimentos foram realizados em câmara de germinação (25 °C, fotoperíodo 12/12 horas claro/escuro, com densidade de fluxo de fótons de 280 $\mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$) durante 24 horas. As raízes foram medidas antes da incubação e no final dos experimentos, e a variação do comprimento foi obtida pela diferença entre eles. A biomassa fresca foi determinada imediatamente após a incubação e a biomassa seca foi estimada após secagem em estufa a 60 °C, até obtenção de valor constante. Já, as plântulas germinadas por 48 horas foram selecionadas e transferidas para vasos contendo vermiculita (três plântulas para cada vaso). Os vasos foram regados a cada dois dias com solução nutritiva de Hogland e mantidos sob fotoperíodo de 12 horas a 25 °C. A partir do quinto dia os sistemas receberam solução nutritiva contendo ou não o tratamento com ácido rosmarínico (0,25; 0,75 e 1,5 mM). Ao término dos experimentos, e com auxílio de régua milimetrada foram medidos os comprimentos (raíz, caule e folha) de todas as plantas, para cada repetição. Os resultados foram expressos em centímetros. Os diferentes órgãos das plantas foram separados por excisão e imediatamente determinados às biomassas frescas. A seguir, as raízes, caules e folhas foram acondicionados em estufa, a 60 °C, até a obtenção de massa constante para determinação da biomassa seca. Os valores médios das repetições foram obtidos e os resultados expressos em gramas. O conteúdo de lignina, a digestibilidade e atividades da 4-hidroxicinamoil-CoA ligase (4CL) foram avaliados por espectrofotometria, enquanto a composição monomérica, o teor de ácidos fenólicos livres, a taxa de depleção do ácido rosmarínico e as atividades da fenilalanina amônia liase (PAL), tirosina amônia liase (TAL), cinamato 4-hidroxilase (C4H), cafeato *O*-metiltransferase (COMT) e hidroxicinamil álcool desidrogenase (CAD) foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os testes de Dunnett e *t* de Student foram aplicados para avaliar as diferenças entre os parâmetros e valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO – Em relação aos experimentos realizados em hidroponia, por 24 horas, os resultados obtidos no presente trabalho revelaram que os tratamentos com ácido rosmarínico (0,75 a 1,5 mM) reduziram os comprimentos das raízes, em comparação com o experimento controle. As biomassas frescas e secas mostraram discretos aumentos, sob a ação de ácido rosmarínico 1,5 mM. Em comparação com o experimento controle, os teores de lignina nas raízes não foram afetados pelo ácido rosmarínico. Entretanto, a composição monomérica de lignina foi significativamente alterada. Os teores do monômero H foram reduzidos pelo ácido rosmarínico, nas concentrações avaliadas. Os teores do monômero S diminuíram na maior concentração (1,5 mM), em comparação com seus respectivos controles, enquanto não houve diferença significativa em relação ao monômero G. Em geral, os efeitos sobre a composição monomérica resultaram nas reduções dos teores de lignina (quando referida como a soma H+G+S), em comparação com seus respectivos controles. Embora o teor de lignina total não tenha sido afetado pelo composto,

diminuições dos níveis de H, G e S podem ser consequência de possíveis mudanças estruturais no polímero. Os resultados encontrados aqui apoiam a idéia de que ácido rosmarínico é copolimerizado com lignina modificando sua estrutura química. No que tange aos efeitos do ácido rosmarínico sobre as enzimas, os resultados revelaram que as atividades da PAL e da TAL diminuíram significativamente, com destaque para a TAL que foi fortemente inibida pelo composto. Isso foi devido, provavelmente, ao fato de que essa enzima funciona preferencialmente na via metabólica do milho. A inibição da atividade da TAL foi acompanhada por um aumento significativo na atividade da C4H. Tendo em vista que ácido *p*-cumárico é o produto da reação catalisada pela TAL e, também, da reação da C4H, é possível que esta enzima possa sensivelmente ser ativada compensando a baixa atividade da TAL. Em outras palavras, o baixo teor de ácido *p*-cumárico, formado a partir de L-tirosina (reação da TAL), induziria o aumento da atividade da C4H. Outra enzima que teve sua atividade inibida foi a COMT, apesar de o conteúdo de ácido ferúlico ter sido discretamente aumentado. Por outro lado, as atividades da 4CL e da CAD não foram afetadas pelo ácido rosmarínico, bem como o conteúdo de ácido *p*-cumárico. E por fim, as análises de digestibilidade demonstraram aumento na quantidade de açúcares liberados pelas plantas tratadas com ácido rosmarínico quando comparadas ao controle. Em relação aos experimentos conduzidos em vasos, por 7 e 14 dias, os resultados demonstraram não haver influência do ácido rosmarínico sobre o crescimento e lignificação das plantas de milho. No entanto, ocorreu grande aumento da digestibilidade em comparação com as plantas controle. De um modo geral, os resultados obtidos corroboram a hipótese de copolimerização do ácido rosmarínico com a lignina. Neste aspecto, a sua incorporação modificaria a estrutura da lignina interferindo na composição monomérica, e possivelmente contribuindo com o aumento da digestibilidade. Isso pode ser um indicativo do possível uso do ácido rosmarínico como um substituinte monolignol e indutor da digestibilidade para fins bioenergéticos. Os dados enzimáticos obtidos contribuem para o fortalecimento dessa hipótese, com especial destaque para o papel inibidor do ácido rosmarínico sobre as primeiras enzimas que atuam na via de fenilpropanoides e para a COMT o que, de acordo com os resultados do presente trabalho, demonstrou ser um ponto de entrada para o ácido rosmarínico na via dos fenilpropanoides.

CONCLUSÕES – Embora a lignina confira rigidez à parede celular, ela revela possuir plasticidade estrutural, a qual pode ser afetada por diferentes fatores. Como notado, o ácido rosmarínico influenciou o crescimento e a lignificação das raízes de milho crescidas em hidroponia, enquanto em plantas de maior idade não houve interferência sobre o crescimento e lignificação. De um modo geral, os resultados suportam a ideia de que o ácido rosmarínico seja incorporado à lignina, podendo atuar como substituinte monolignol. Evidência pode ser constatada pelo aumento na digestibilidade, e pelas significativas reduções nos teores de monômeros em raízes crescidas sob hidroponia, em especial o monômero H. Em resumo, os efeitos causados pelo ácido rosmarínico se devem não somente à sua possível copolimerização, mas também às interferências causadas na biossíntese de lignina, em especial sobre enzimas das reações iniciais da via de fenilpropanoides.

GENERAL ABSTRACT

INTRODUCTION – After the cellulose, the most abundant organic compound in plants is the lignin, a polymer highly formed by phenylpropanoic groups. The precise structure of lignin is not well known. Lignin characterization is difficult because is not possible to isolate the intact polymer, and it is covalently linked to cellulose and other cell wall polysaccharides. Lignin is formed by free radical polymerization of mainly three hydroxycinnamic alcohols, which vary in their degree of methoxylation, in addition to a diversity of other minor components. These three precursors are *p*-coumaryl, coniferyl and sinapyl alcohols, which are also named monolignols. After polymerization, these monolignols are converted to *p*-hydroxyphenyl (H), guaiacyl (G) and syringyl (S) units, respectively. Lignin has a high impact in paper industry and digestibility of forage plants. The state of art of lignin is related to the reduction of its content in plants to improve biofuels production from cellulose. Rosmarinic acid is an ester of caffeic acid plus 3,4-dihydroxyphenyl-lactic, and a secondary metabolite found in several plant species. Rosmarinic acid can be considered a promising compound with an easily cleavable ester bond linking the two phenolic moieties to depolymerize lignin. Recent studies have revealed genes, enzymes and metabolites involved in the biosynthesis of rosmarinic acid. So, these information are essential to study the expression of rosmarinic acid on lignification of cell walls. A previous use of rosmarinic acid has been considered in the field of bioengineering, targeting the mechanism of lignin synthesis and its application in plant breeding for production of biofuels. It is known that external or internal factors can affect the lignin synthesis. Studies with putative inhibitors of lignin synthesis has deserved a particular attention because the use of plant biomass as a source of carbohydrates to obtain biofuels and chemicals with high aggregate value has been severely affected due to the recalcitrance of lignin. Indeed, this recalcitrance hinders some agro-industrial activities such as digestion of forage for livestock and conversion of lignocellulosic plant biomass to liquid biofuels. Therefore, these chemical and mechanical properties have attracted attention of bioengineering.

AIMS – In view of the above, the general objective of this work was to investigate the effects of rosmarinic acid on the lignification process in maize and to evaluate the digestibility of the vegetal biomass treated with the possible substituent monolignol. For this, the work was divided in two parts, being that in the first the seedlings were cultivated in hydroponics for 24 hours and the assays were made in roots. In the second part, the experiments were conducted in pots containing vermiculite (7 and 14 days) and the assays were performed on roots, stems and leaves. Growth rates, rosmarinic acid depletion, lignin content and its monomeric composition, free phenolic acid content, enzymatic activities of the phenylpropanoid pathway and finally the digestibility of the lignocellulosic biomass of roots, stems and leaves of seedling/ plants were monitored of maize grown in nutrient solution and/or vermiculite, after treatments with rosmarinic acid.

METHODS – Maize seeds were put on paper Germitest and germinated (darkroom, 25 °C) for 72 hours for later incubation in hydroponics or for 48 hours for later transfer to

pots containing vermiculite. Regarding the hydroponic systems, after the germination period, 25 seedlings were cultivated in nutrient solution, pH 6.0, containing or not 0 to 1.5 mM of rosmarinic acid. Experiments were carried out in a growth chamber (25 °C, 12-h light/12-h dark cycle, with photon flux density of 280 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) during 24 h. Roots were measured before incubation and at the end of experiments, and the variation in length was obtained by the difference among them. Fresh root weight was determined immediately after incubation, and the dry weight was estimated after oven-drying at 60 °C until it reached a constant weight. The seedlings germinated for 48 hours were selected and transferred to pots containing vermiculite (three seedlings for each pot). The pots were watered every two days with nutrient from Hogland and kept under photoperiod for 12 hours at 25 °C. From the fifth day the systems received nutritional solution containing or not treatment with rosmarinic acid (0.25, 0.75 and 1.5 mM). At the end of the cultivation experiments, the lengths (root, stem and leaf) of all plants were measured with each millimeter ruler for each replicate. The results were expressed in centimeters. The different organs of the plants were separated by excision and immediately determined to the fresh biomasses. Next, the roots, stems and leaves were conditioned in an oven at 60 °C until a constant mass was obtained to determine the dry biomass. The mean values of the replicates were obtained and the results expressed in grams. Lignin content, enzymatic digestibility and activities of 4-hydroxycinnamoyl-CoA ligase (4CL) were determined spectrophotometrically, whereas the lignin monomeric composition, free phenolic acid content, rosmarinic acid depletion rate, and phenylalanine ammonia lyase (PAL), tyrosine ammonia lyase (TAL), cinnamate 4-hydroxylase (C4H), caffeate *O*-methyltransferase (COMT) and hydroxycinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) activities were assayed by high performance liquid chromatography (HPLC). The Dunnett and Student *t* tests were applied to evaluate the differences between parameters and *p* values ≤ 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION – Regarding the experiments performed in hydroponics for 24 hours, the results obtained in the current research revealed that 0.75 to 1.5 mM of rosmarinic acid reduced root length. At 1.5 mM, it slightly increase fresh and dry weights. When compared to the control experiments, lignin contents were not affected by rosmarinic acid. In roots, lignin contents were not changed by rosmarinic acid, but it significantly influenced lignin monomer composition. The monomer H was the most affected by rosmarinic acid for all tested concentrations. The contents of S monomers decreased under action of 1.5 mM rosmarinic acid, compared to their respective controls, whereas there was no significant difference in relation to the G monomer. In general, the effects on monomer composition resulted in decreases of lignin (when referred to as the sum H+G+S) contents and changes in the H:G:S ratios. Although the total lignin content has not been affected by the compound, decreases in levels of H, G and S can be a consequence of possible structural changes in lignin. The results found herein support the idea that rosmarinic acid is copolymerized with lignin modifying its structure chemical. With respect to the enzymes, the results revealed significant decreases in PAL and TAL activities by action of rosmarinic acid. TAL was strongly inhibited because it acts preferably in the metabolic pathway of maize. Enzyme inhibition has been associated with a significant increase in C4H activity. Because *p*-

coumaric acid is the product of the TAL and C4H reactions, it is probably that this enzyme can be activated substantially offsetting the low activity of TAL. In simplest words, the low level of *p*-coumaric acid, which is formed from L-tyrosine reaction (TAL), would induce an increase in C4H activity. Another enzyme that had its inhibited activity was COMT, although the ferulic acid content was slightly increased. On the other hand, the activities of 4CL and CAD were not affected by rosmarinic acid as well as *p*-coumaric acid content. Finally, the digestibility analyzes showed an increase in the amount of sugars released by the plants treated with rosmarinic acid when compared to the control. Overall, the results support the hypothesis of rosmarinic acid copolymerization with lignin. In this aspect, the incorporation can modify the lignin structure interfering in the monomer composition and possibly contributing to increased digestibility. This can be indicative of the possible use of rosmarinic acid as a monolignol substituent and inducer of digestibility for bioenergy purposes. The enzymatic data contribute to strengthening this hypothesis, with special emphasis about the role of the rosmarinic acid as a inhibitor of the first enzymes involved in the phenylpropanoid pathway and for COMT, which, according to the results of the present work has been shown to be an entry point for rosmarinic acid in the phenylpropanoid pathway.

CONCLUSIONS – Although lignin confers rigidity to the cell wall, it reveals structural plasticity, which can be affected by different factors. As noted, rosmarinic acid influenced the growth and lignification of maize roots grown in hydroponics, while in older plants there was no interference with growth and lignification. In general, the results support the idea that rosmarinic acid is incorporated in the lignin and may act as a monolignol substituent. Evidence can be verified by the increase in digestibility, and by the significant reductions in the content of root monomers grown in hydroponics, especially H. In summary, the effects caused by rosmarinic acid are due not only to its possible combinatorial copolymerization but also to interferences caused by lignin biosynthesis, especially on enzymes from the initial reactions of the phenylpropanoid pathway.

ÁCIDO ROSMARÍNICO INTERFERE NA VIA DE FENILPROPANOIDES E AFETA A COMPOSIÇÃO MONOMÉRICA DE LIGNINA DE RAÍZES DE MILHO

J.M. Bevilaqua, A. Finger-Teixeira, R. Marchiosi, O. Ferrarese-Filho*

Laboratório de Bioquímica de Plantas, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil

Autor para correspondência:

Oswaldo Ferrarese-Filho (✉)

Laboratório de Bioquímica de Plantas

Departamento de Bioquímica

Universidade Estadual de Maringá

Av. Colombo, 5790

CEP 87020-900, Maringá, PR, Brasil

Tel.: +55 44 3011 4717

E-mail: osferrarese@gmail.com

Resumo

Estudos sugerem que o ácido rosmarínico pode ser copolimerizado na estrutura da lignina, alterando sua composição e, possivelmente, reduzindo a recalcitrância da parede celular. Dessa forma, no presente trabalho avaliamos os efeitos do ácido rosmarínico no crescimento e lignificação das raízes de milho. Os resultados revelaram que o ácido rosmarínico: 1) foi absorvido pelas plântulas com maior intensidade a partir de 18 horas de exposição e praticamente não afetou o comprimento das raízes; 2) diminuiu as atividades da PAL, TAL e COMT, enquanto aumentou a atividade da C4H sem alterar as atividades da 4CL e CAD; 3) serviu de substrato para a COMT; 4) aumentou o conteúdo de ácido ferúlico livre; 5) diminuiu os teores de lignina (referida como a soma H+G+S) e reduziu os teores do monômero H, e 6) aumentou a digestibilidade. Os resultados indicam que a suposta incorporação do ácido rosmarínico na estrutura da lignina afeta a composição monomérica decorrente da sua ação sobre a via de fenilpropanoides. Em resumo, os efeitos causados pelo ácido rosmarínico se devem não somente à sua possível copolimerização, mas também às interferências causadas na biossíntese de lignina.

Palavras-chave: bioenergia, digestibilidade, lignificação, monolignóis, *Zea mays*

1. Introdução

Devido à sua presença limitada ao reino vegetal, a lignina tem sido classificada como um metabólito secundário (composto fenólico intrínseco à parede celular secundária das plantas), embora seja eficazmente o segundo biopolímero mais abundante depois da celulose (dos SANTOS et al., 2014). Enquanto ausente em briófitas, a lignina é um componente essencial nas paredes celulares de traqueófitas. Tem como funções, rigidez, suporte mecânico, transporte de água, e proteção contra pragas (BOUDET, 2007; SIQUEIRA, 2011; TOBIMATSU et al., 2012; dos SANTOS et al., 2014).

A lignina é um heteropolímero complexo que consiste primariamente dos monômeros *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), unidades formadas pelo acoplamento oxidativo dos álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico, respectivamente, que são produtos da via dos fenilpropanoides. A via dos

fenilpropanoides (**Fig. 1**) está diretamente implicada na síntese de lignina (COSTA et al., 2003). Ela se inicia com a desaminação do aminoácido L-fenilalanina, derivado da via do ácido chiquímico. Fenilalanina amônia liase (PAL) e tirosina amônia liase (TAL) são duas enzimas-chave na via dos fenilpropanoides. Nos passos finais da via, a enzima CAD reduz os cinamaldeídos nos três álcoois: *p*-cumaril, coniferil e sinapil, os quais se polimerizam oxidativamente para a formação da lignina. Estes álcoois correspondem, respectivamente, aos monômeros H, G e S.

A presença da lignina dificulta algumas atividades agroindustriais como a digestão da forragem para o gado e a conversão de biomassa vegetal lignocelulósica em biocombustíveis líquidos. Assim, essas propriedades químicas e mecânicas têm atraído atenção da bioengenharia (BOERJAN et al., 2003; BONAWITZ et al., 2010; TOBIMATSU et al., 2012).

Perturbações da via dos fenilpropanoides podem causar grandes alterações estruturais no polímero devido à incorporação de intermediários da via e outros compostos fenólicos (WAGNER et al., 2011). Estudos das paredes celulares auxiliam na afirmação de que alguns monolignóis substitutos podem ser eficientemente incorporados na lignina da parede celular e afetar suas propriedades. O ácido rosmarínico se destaca como um possível substituinte monolignol (TOBIMATSU et al., 2012).

O ácido rosmarínico (**Fig. 2**) é um composto hidroxilado de ocorrência natural, encontrado em espécies das famílias Lamiaceae e Boraginaceae, tais como *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* L., e *Perilla frutescens*. Ele é biossintetizado a partir dos aminoácidos L-fenilalanina e L-tirosina por oito enzimas que incluem fenilalanina amônia liase e cinamato 4-hidroxilase (**Fig. 3**). O ácido rosmarínico pode também ser quimicamente produzido pela esterificação do ácido cafeico e ácido 3,4-diidroxifenilático (KIM et al., 2015).

Recentemente, ácido rosmarínico e seus derivados têm atraído o interesse para as suas atividades biológicas, que incluem anti-inflamatórios, antioxidantes, anti-angiogênicos, antitumoral, e funções antimicrobianas. Estes atributos têm aumentado a demanda para a produção biotecnológica e aplicação de ácido rosmarínico e seus derivados (KIM et al., 2015).

Com base em estudos anteriores, o ácido rosmarínico pode ser considerado uma substância promissora no campo da bioengenharia, pois possui uma ligação éster, facilmente clivável, unindo duas metades fenólicas. Uma maior facilidade no rompimento desta ligação contribuiria com o processo de despolimerização da lignina, o

que por sua vez auxiliaria na produção de biocombustíveis (RALPH, 2010; TOBIMATSU et al., 2012; VEGA-SÁNCHEZ & RONALD, 2010). A fim de verificar esta hipótese e contribuir para o esclarecimento do mecanismo de ação do ácido rosmarínico, *in vivo*, no presente trabalho foram avaliados os efeitos do ácido rosmarínico no processo de crescimento e lignificação em raízes de plântulas de milho tratadas com este possível substituinte monolignol.

2. Material e métodos

2.1 Procedimentos gerais

Sementes de milho (*Zea mays* cv. IPR-114), obtidas juntas ao IAPAR (Instituto Agrônômico do Paraná) e previamente sanitizadas em solução de NaClO a 2%, foram germinadas em câmara escura, a 25 °C, e as plântulas foram obtidas após três dias. Vinte e cinco plântulas foram transferidas para o sistema experimental com solução nutritiva pH 6,0 (FERRARESE et al., 2000) contendo, ou não, ácido rosmarínico (0,25; 0,5; 0,75; 1,0 e 1,5 mM). Os recipientes foram acondicionados em câmara de crescimento (280 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12 horas, 25 °C) por 24 horas.

No início e término dos experimentos de cultivo, e com auxílio de régua milimetrada, foram medidos os comprimentos de todas as plântulas, para cada repetição. As diferenças entre os comprimentos iniciais e finais foram determinadas, e os resultados expressos em centímetros (HERRIG et al., 2002). As raízes primárias foram separadas por excisão e imediatamente determinadas as biomassas frescas, utilizando-se balança analítica. A seguir, as raízes foram acondicionadas em estufa, a 60 °C, até a obtenção de massa constante e, a seguir, foram rapidamente pesadas em balança analítica. Os valores médios das repetições foram obtidos e os resultados expressos em gramas.

2.2 Depleção do ácido rosmarínico

Para acompanhar a absorção de ácido rosmarínico 1,5 mM pelas raízes nos sistemas hidropônicos, alíquotas de 1,0 mL foram coletadas dos sistemas de incubação após 0, 2, 4, 8, 12, 18 e 24 h. Foram utilizados sistemas de incubação contendo 1,5 mM de ácido rosmarínico e plântulas de milho e sistemas contendo somente a solução nutritiva com 1,5 mM de ácido rosmarínico, sem plântulas. Estes sistemas sem plântulas representam

o controle, já que não havendo plântulas não há a absorção de ácido rosmarínico. O volume das soluções foi aferido para 200 mL utilizando água deionizada no momento que antecedeu as coletas. Todas as alíquotas foram armazenadas em freezer (-20 °C) até o momento das análises. As amostras foram filtradas através de membranas de 0,45 µm e analisadas (20 µL) em HPLC Shimadzu® (Tóquio, Japão). A detecção do ácido rosmarínico se deu por meio de gradiente com dois solventes: acetonitrila 75% contendo ácido trifluoroacético (TFA) 0,02% “A” e água miliQ contendo TFA 0,02% “B”. O gradiente de corrida foi definido pelo aumento gradual da quantidade de “A” em relação a “B”. Iniciou-se com 10% de A, chegando a 50% de A em 10 min. De 10-12 min a proporção de A foi de 50% até 100%. A partir de 12 minutos, e até o término da corrida (25 min) a proporção de 100:0 (A:B) foi mantida, com fluxo de 0,8 mL min⁻¹. As medidas de depleção de ácido rosmarínico foram feitas a 330 nm, sob fluxo de 0,8 mL min⁻¹.

2.3 Determinação da atividade da fenilalanina amônia liase (PAL)

A extração da enzima fundamentou-se na metodologia descrita por Ferrarese et al. (2000) com o seguinte procedimento: A biomassa fresca (2,0 g) de raízes tratadas ou não com ácido rosmarínico, foram maceradas em 5,0 mL de tampão borato 0,1 M (pH 8,8). Após maceração, a suspensão foi centrifugada (12.000 g, 15 minutos, 4 °C) e o sobrenadante utilizado para análise da atividade enzimática. A reação desenvolvida na determinação da atividade da enzima seguiu o descrito por Ferrarese et al. (2000), utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC Shimadzu®, Japão). A fase móvel utilizada foi metanol: água (70%:30%) com fluxo de 0,5 mL min⁻¹. O produto da reação, *t*-cinamato, foi detectado e identificado por comparação com padrão de ácido *t*-cinâmico (Sigma Chemical Co, Missouri, USA). A atividade da fenilalanina amônia liase foi expressa em µmoles de *t*-cinamato formado h⁻¹ g⁻¹ de matéria fresca.

2.4 Determinação da atividade da tirosina amônia liase (TAL)

A enzima foi extraída como descrito por Khan et al. (2003). Após o período de incubação, a biomassa fresca (1,0 g) de raiz foi macerada em 50 mM de tampão Tris-HCl (pH 8,5). Os homogeneizados foram centrifugados (2.200 g, 10 minutos, 4°C) e o sobrenadante usado como preparação enzimática. A mistura de reação (100 µmoles de

tampão Tris-HCl pH 8,0 e uma apropriada amostra de extrato enzimático em um volume final de 0,95 mL) foi incubada a 40 °C por 5 minutos para o ensaio da atividade da TAL. L-Tirosina (5,5 μmoles) foi adicionado para iniciar a reação, que foi interrompida após uma hora com 50 μl de 5 M HCl. Todas as amostras foram filtradas em filtro de 0,45 μm e analisadas por HPLC, como descrito anteriormente. A fase móvel foi metanol/ácido acético 4% em água (30/70, v/v), com fluxo de 1,0 mL min⁻¹ para uma corrida isocrática de 15 minutos. O produto da reação, *p*-cumarato, foi analisado em 320 nm e identificado por comparação com seu respectivo padrão. A atividade da TAL foi expressa em μmol ácido *p*-cumárico h⁻¹ g⁻¹ de matéria fresca.

2.5 Determinação da atividade da cinamato 4-hidroxilase (C4H)

O isolamento microsomal foi adaptado a partir das metodologias descritas por Myton e Fry (1995), Krochko et al. (1998) e Ishii-Iwamoto e Bracht (2003) com o seguinte procedimento: 2,0 g de raízes frescas, tratadas ou não com ácido rosmarínico, foram maceradas em 8,0 mL do meio de isolamento, contendo tampão fosfato de sódio e potássio 100mM, DTT 1,0 mM, EDTA a 1,0 mM, sacarose 0,4 M e albumina bovina 0,5% para um pH final de 7,2. Após maceração, a suspensão foi filtrada e posteriormente ultracentrifugada (20.000g, 20 minutos, 4 °C). O sobrenadante foi novamente ultracentrifugado (100.000 g, 60 minutos, 4 °C). O pellet microsomal foi ressuspenso em 0,5 mL de meio de extração, contendo tampão fosfato de sódio e potássio 100 mM (pH 7,2), DTT 1,0 mM e EDTA 1,0 mM. Essa suspensão foi utilizada para análise da atividade enzimática. O volume final do meio de reação (1,0 mL) continha 0,1 ml de extrato enzimático (microsomo isolado), 1,0 mM NADPH, 0,2 mM de ácido *t*-cinâmico em tampão de incubação (tampão fosfato de sódio e potássio 100 mM, pH 7,2; 1,0 mM de DTT e 1,0 mM de EDTA). A reação foi iniciada com a adição do ácido *t*-cinâmico, conduzida a 36 °C por 20 minutos, sendo interrompida com a adição de 50 μL de HCl 5 M. Todas as amostras foram filtradas em filtro de 0,45 μm e analisadas em HPLC. A fase móvel foi metanol/ácido acético 4% em água (30/70, v/v), com fluxo de 1,0 mL min⁻¹. O produto da reação, *p*-cumarato, foi analisado em 309 nm e identificado por comparação com seu respectivo padrão. A atividade da C4H foi expressa em μmol de ácido *p*-cumárico formado h⁻¹ mg⁻¹ proteínas.

2.6 Determinação da atividade da 4-hidroxicinamoil-CoA ligase (4CL)

Após incubação, raízes frescas (2,0 g) foram maceradas em meio de extração contendo tampão Tris/HCl 0,2 M (pH 7,5); 5,0 mM de ditioneitol, 10,0 mM de MgCl₂ e 20% de glicerol. A suspensão foi centrifugada (10.000 g, 20 minutos, 4 °C), sendo o sobrenadante considerado como extrato enzimático. O volume final do meio de reação (1,0 mL) continha 0,4 mL de extrato enzimático, 4,0 mM ATP, 0,4 mM de ácido *p*-cumárico e 0,2 mM de CoA em tampão de incubação (tampão Tris/HCl 0,2 M pH 7,5; 5,0 mM de DTT e 10,0 mM de MgCl₂). A reação foi iniciada com a adição de CoA, conduzida a 35 °C por 10 minutos e lida em espectrofotômetro (Shimadzu® UV-2450, Tóquio). O aumento da absorbância em 333 nm, decorrente da formação de *p*-cumaroil-CoA, foi monitorado contra branco desprovido de CoA e ATP. A atividade da 4CL foi expressa em μmol de *p*-cumaroil-CoA formado h⁻¹ g⁻¹ de matéria fresca.

2.7 Determinação da atividade da cafeato *O*-metiltransferase (COMT)

Após a incubação, 2,0 g de raízes frescas foram maceradas em meio de extração, contendo tampão Tris/HCL 100 mM pH 7.2; MgCl₂ 0,2mM; DTT 2 mM; glicerol 10% (v/v). O extrato foi centrifugado (10.000 g, 10minutos, 4°C), o sobrenadante coletado e utilizado como preparação enzimática (INOUE et al., 1998). Os ensaios foram conduzidos em meio de reação composto por Tampão Tris/HCL 100 mM pH 7.2; MgCl₂ 0,2 mM; DTT 2 mM; SAM 300 μM e 200 μL de extrato enzimático. A reação foi iniciada com a adição 50 μM de ácido cafeico, conduzida a 30 °C, totalizando um volume de 1 mL e interrompida após 30 min com 50 μL de HCL 3 M. As amostras foram filtradas através de membranas de 0,45 μm (Hamilton® Co., Nevada, USA) e analisadas (20 μL) em HPLC Shimadzu® (Tóquio, Japão). A fase móvel utilizada foi metanol/ácido acético 4% (30/70, v/v), com fluxo de 1,0 mL min⁻¹. O ácido ferúlico produzido pela COMT foi identificado a 322 nm por comparação com os valores do tempo de retenção do padrão. As reações na qual ácido rosmarínico serviu também de substrato seguiram as mesmas condições descritas acima, porém com uma fase móvel diferente, ou seja, a mesma descrita anteriormente para os ensaios de depleção do ácido rosmarínico.

2.8 Determinação da atividade da hidroxicinamil álcool desidrogenase (CAD)

A enzima foi extraída a partir de 2,0 g de raízes frescas em um meio de extração contendo 40 mM de β -mercaptoetanol e tampão fosfato de potássio. O homogeneizado foi centrifugado e o sobrenadante usado como extrato enzimático (dos SANTOS et al., 2006). A determinação enzimática foi avaliada em HPLC pela reação de redução do sinapaldeído em sinapil álcool. A atividade da CAD foi avaliada pelo consumo do substrato, e os resultados foram expressos em μmol sinapaldeído por $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ de matéria fresca.

2.9 Determinação dos ácidos fenólicos livres

Os ácidos hidroxicinâmicos (ferúlico e *p*-cumárico) foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Raízes secas (0,25 g) e moídas foram homogeneizadas com 5 mL de HCl 2 N, com o auxílio de um gral e pistilo. Posteriormente este extrato foi transferido para vidros com tampas rosqueáveis e levados a fervura por 30 min. Em seguida, as amostras foram resfriadas e filtradas com papel filtro. Para posterior análise, as amostras foram diluídas 5 vezes, filtradas em membranas de 0,45 μm e analisadas (20 μL) em HPLC (Shimadzu[®], Tóquio, Japão).

A separação dos ácidos fenólicos se deu por meio de gradiente com dois solventes: ácido acético 4% “A” e metanol “B”. O gradiente de corrida foi definido pelo aumento gradual da quantidade de “B” em relação a “A”. No tempo de 0-15 min tem-se a proporção de 0:100 (B:A); de 15-45 min chega-se a seguinte proporção 60:40 (B:A); de 45-60 retorna-se a condição inicial de 0:100 (B:A), com fluxo de 0,8 mL/min. O ácido ferúlico foi determinado a 322 nm e o ácido *p*-cumárico a 309 nm, comparando-se com seus respectivos padrões. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g} \text{g}^{-1}$ de massa seca.

2.10 Quantificação de lignina

As biomassas secas (0,3 g) de raízes, obtidos após incubação, foram homogeneizadas em 50 mM de tampão fosfato pH 7,0 (7,0 mL) e transferidas para um tubo de centrifuga (FERRARESE et al., 2002). O precipitado foi centrifugado (1.400 g, 6 minutos), lavado e centrifugado sucessivamente como segue: mais duas vezes com 50 mM tampão fosfato pH 7,0 (7,0 mL); três vezes com 1% (v/v) Triton[®] X-100 em tampão pH 7,0 (7,0

mL); duas vezes com 1 M NaCl em tampão pH 7,0 (7,0 mL); duas vezes com água destilada (7,0 mL) e duas vezes com acetona (5,0 mL). O material foi seco em estufa (80 °C, 24 horas) e a massa definida como a fração da parede celular livre de proteínas. Esse material foi usado para determinar o teor total de lignina pelo método do brometo de acetila (MORRISON, 1972). Uma porção (20 mg) do material foi acondicionada em tubo de centrífuga e 0,5 mL de brometo de acetila 25% foram acrescentados. As amostras foram aquecidas por 30 minutos a 70°C, transferidas para banho de gelo e a reação interrompida com adição de 0,9 mL de NaOH 2 M. A seguir, foram adicionados 0,1 mL de hidroxilamina-HCl 7,5 M e 2,0 mL de ácido acético gelado. Após centrifugação (1.000 g, 5 minutos), o sobrenadante foi diluído e usado para as leituras em 280 nm. Uma curva padrão a partir do padrão de lignina (Aldrich 37,096-7) foi gerada para determinação da concentração de lignina. Os resultados foram expressos mg lignina g⁻¹ de parede celular.

2.11 Determinação da composição monomérica de lignina

A oxidação com nitrobenzeno foi usada para determinar a composição monomérica da lignina de raiz (ZANARDO et al., 2009). Fração da parede celular livre de proteínas (50 mg) foi selada em uma ampola Pyrex[®] contendo 1,0 mL de NaOH 2,0 M mais 0,1 mL de nitrobenzeno e aquecida a 170 °C por 2,5 horas, com agitação ocasional da amostra. Após oxidação, a amostra foi resfriada em banho de gelo, lavadas duas vezes com clorofórmio, acidificada para pH 3-4 com HCl 5,0 M, e extraída duas vezes com clorofórmio. Os extratos orgânicos foram combinados, secos e ressuspensos em metanol. Todas as amostras foram filtradas em filtro de seringa descartável 0,45 µm e analisada por HPLC. A fase móvel foi metanol/ácido acético 4% em água (20/80, v/v) com fluxo de 1,2 mL min⁻¹ para corrida isocrática de 20 minutos. As quantificações de *p*-hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído foram realizadas a 290 nm utilizando os padrões correspondentes. Os resultados foram expressos como µg monômero mg⁻¹ de parede celular.

2.12 Extração de açúcares solúveis

Antes da avaliação da digestibilidade enzimática foi realizada a remoção dos açúcares solúveis, por meio de sucessivas lavagens com álcool 80%. Para isto, a

biomassa seca da raiz foi moída e transferida para tubos falcon e então adicionado 9 mL de etanol 80%. Posteriormente, os tubos foram acondicionados em um shaker a 55 °C, sob agitação de 200 rpm por 4 horas. Após este período, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em etanol 80%, sendo novamente incubado a 55 °C por mais 4 horas, sob agitação. Este procedimento foi realizado por cerca de seis vezes, até que todo o açúcar solúvel tivesse sido extraído.

Para avaliar a eficiência da extração, foi retirada uma alíquota do sobrenadante para detectar a presença de açúcares pelo método do fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). Após 15 minutos de reação foi realizada a leitura espectrofotométrica em 490 nm. Após a retirada total de açúcares solúveis, os extratos de parede celular foram centrifugados (3200 rpm, 5 min.) e o precipitado insolúvel secado em estufa, a 60 °C.

2.13 Procedimento de pré-tratamento alcalino

Após a completa retirada dos açúcares solúveis, as amostras foram submetidas a um pré-tratamento alcalino, adaptado de Lima et al. (2014). Depois de seco, 200 mg de amostra foi pesada em tubos de vidro e adicionados 8 mL de NaOH 0,25M e acondicionados em banho seco a 130 °C por 40 minutos. Depois deste período reacional, as amostras foram colocadas em banho de gelo e, em seguida, centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e para total remoção da base foram realizadas quatro lavagens com álcool 80%. Em cada lavagem, o pH do sobrenadante foi medido até que estivesse entre 6-7. Por fim, as amostras foram centrifugadas (3200 rpm, 5 min.) e descartado o sobrenadante. O precipitado foi secado em estufa a 60 °C, para posterior determinação da digestibilidade enzimática.

2.14 Digestibilidade enzimática

Primeiramente foi determinada a atividade enzimática a fim de calcular a quantidade de enzima a ser aplicada. Para isso, foi adicionado em um tubo de ensaio 50 µL de xilano 1% e 50 µL do extrato enzimático de *Aspergillus niveus*, diluída 100 vezes, sendo incubado a 50 °C por 30 minutos. Após este período, a reação foi interrompida com 100 µL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) 1%, e imediatamente fervida a 100 °C por 5 minutos, acondicionado em banho de gelo, e adicionado 800 µL de água. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm.

Posteriormente, foi realizada a digestibilidade da biomassa através de adaptações do método proposto por Delabona et al. (2013) e Gonçalves et al. (2012). Para isso, foi pesado 0,015 g de biomassa seca em tubos eppendorf, e efetuada a ressuspensão em tampão acetato 50 mM pH 5,0. A seguir, foi adicionado 20 U/mL do extrato enzimático e a mistura incubada a 50 °C por 24 horas. Após este período, a suspensão foi homogeneizada. Então, 100 µL do sobrenadante foram retirados e analisados os açúcares redutores liberados pelo método do DNS (MILLER, 1959). A leitura foi realizada no espectrofotômetro a 540 nm. O teor de açúcares redutores liberados foi expresso por mg g⁻¹ de resíduo insolúvel em etanol.

2.15 Análises estatísticas

Para testar a significância das diferenças observadas foi utilizado o programa estatística Prism[®] (GraphPad 6.0, USA). Os dados foram expressos como as médias dos experimentos ± erro padrão das médias. As diferenças entre os parâmetros foram avaliadas pelo teste de comparação múltipla de Dunnett e *t* de Student, e os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. Resultados e Discussão

3.1 Depleção do ácido rosmarínico na solução nutritiva

O consumo de ácido rosmarínico 1,5 mM na solução nutritiva (**Fig. 4**) foi acompanhado em diferentes tempos, onde sistemas sem plântulas contendo ácido rosmarínico foram considerados como controle, já que não haveria consumo do tratamento na ausência das plântulas. Do tempo 0 até 18 horas não houve diferença significativa no teor de ácido rosmarínico na solução nutritiva dos sistemas controle, comparado ao tempo inicial. No entanto, com 24 horas já se pode notar um decréscimo significativo (24%) na concentração de ácido rosmarínico presente na solução, em comparação com o tempo 0. Embora não houvesse plântulas nos sistemas controle que pudessem absorver o composto, esta diminuição em 24 horas pode estar relacionada à oxidação e instabilidade do ácido rosmarínico. Estudos visando extrair o ácido rosmarínico de *Salvia officinalis* demonstraram que a presença de antioxidantes contribui com a eficácia da extração (OLIVEIRA, 2010).

Os sistemas com plântulas apresentaram diferença significativa em todos os tempos de coleta, exceto as 2 horas. Com 4 horas de incubação houve um decréscimo de 11% de ácido rosmarínico na solução nutritiva das plântulas tratadas. O tempo de 8 horas se manteve bastante similar ao tempo anterior, mas também demonstrou diminuição de 12% em relação ao inicial. Um decréscimo de 24% foi observado com 12 horas de incubação e, a partir de 18 horas, ocorreu o desaparecimento de 99% do ácido rosmarínico na solução dos sistemas tratados. Estes dados indicam que com o passar do tempo as plântulas de milho absorveram o ácido rosmarínico, e que a maior absorção se deu a partir de 18 horas ou entre 12 e 18 horas de incubação. Portanto, mais de 24 horas de exposição das plântulas ao tratamento em hidroponia não seriam viáveis, o que também contribuiu para a escolha do período de exposição das plântulas ao tratamento em condições de hidroponia.

3.2 Efeitos do ácido rosmarínico no crescimento das raízes

Os tratamentos com ácido rosmarínico (0,75 mM, 1,0 mM e 1,5 mM) reduziram os comprimentos das raízes de milho, sendo o efeito maior (inibição de 24,8% em relação ao controle) na mais alta concentração (**Fig. 5A**). O ácido rosmarínico não afetou as biomassas frescas e secas nas menores concentrações. Entretanto, a 1,5 mM foi observado aumentos destes parâmetros biométricos. No que tange aos dados obtidos convém ressaltar que o crescimento das raízes é caracterizado por elevada atividade metabólica e, por esta razão, elas são suscetíveis ao estresse causado por vários compostos químicos. Assim, é possível que os efeitos observados sobre o comprimento das raízes de milho, nas mais altas concentrações, sejam decorrentes da elevada fitotoxicidade causada pelo ácido rosmarínico, dificultando o desenvolvimento da plântula. Há evidência indicando alterações anatômicas nas raízes de soja submetida ao aleloquímico ácido ferúlico. Redução do crescimento das raízes foram acompanhadas de aumentos nos seus diâmetros na região medial e nos diâmetros dos cilindros vasculares das regiões medial e basal (dos SANTOS et al., 2008). Para estes autores, a cessação do crescimento das raízes estaria associada à expansão do cilindro vascular, compressão das células da região quiescente e diminuição da distância entre este e as primeiras células diferenciadas. Diante disso, análises morfológicas e anatômicas das raízes de milho, submetidas a altas concentrações de ácido rosmarínico, poderão esclarecer os resultados obtidos.

3.3 Efeitos do ácido rosmarínico nos teores de lignina, composição monomérica e digestibilidade enzimática

O ácido rosmarínico não afetou os conteúdos de lignina nas raízes de milho (**Fig. 5C**), porém influenciou significativamente os teores dos seus monômeros (**Fig. 5C**). De fato, o monômero H foi o mais afetado. Como pode ser notado, o ácido rosmarínico reduziu significativamente os teores de H, os quais variaram de 32% (0,25 mM) a 48,6% (1,5 mM). O teor do monômero G não foi significativamente alterado, em comparação com seus respectivos controles, enquanto o teor do monômero S diminuiu 38% na mais alta concentração de ácido rosmarínico. As alterações observadas na composição monomérica resultaram em reduções nos teores de lignina (quando expressa como a soma H+G+S) e nas razões S/G (**Fig. 5C**). Interessantemente, o conteúdo de lignina (H+G+S) diminuiu 27% (1,5 mM), em comparação com o controle. Claramente, essas reduções foram devidas principalmente aos baixos teores dos monômeros H, observados em todos os tratamentos com ácido rosmarínico. Como pode ser notado, ácido rosmarínico diminuiu a razão S/G nas maiores concentrações em relação controle (**Fig. 5C**).

No conjunto, os dados referentes à composição monomérica da lignina e as relatadas alterações na lignina (referida como H+G+S) e nas razões S/G são cruciais para o entendimento do papel do ácido rosmarínico, como proposto neste trabalho. Há fortes evidências de que o ácido rosmarínico (além de outros monolignóis substituintes) seja copolimerizado na estrutura da lignina na parede celular (RALPH, 2010; TOBIMATSU et al., 2012). Neste contexto, alguns estudos avaliando a biossíntese de lignina revelaram substancial plasticidade da sua estrutura (BOERJAN et al., 2003; VANHOLME et al., 2008). Perturbações da via de fenilpropanóides podem causar alteração estrutural do polímero devido ao influxo de intermediários metabólicos e outros compostos fenólicos na rota metabólica (RALPH et al., 2010). A inclusão de novos monômeros fenólicos compatíveis com aqueles naturalmente presentes na estrutura da lignina evidencia, portanto, a maleabilidade do processo de lignificação nas paredes celulares de muitas espécies de plantas. Este fato, *per se*, é relevante nos estudos que visem reduzir a recalcitrância da biomassa lignocelulósica e que têm como meta a liberação de maior quantidade de carboidratos fermentáveis para a produção de biocombustíveis.

Para verificar a influência do ácido rosmarínico na digestibilidade enzimática (**Fig. 9**) amostras de raízes (biomassa seca), após incubação em hidroponia, foram submetidas a um período de 24 horas de incubação com um extrato de xilanase. Pode-se perceber uma tendência de aumento nas concentrações de ácido rosmarínico utilizadas, sendo que em 1,5 mM houve um acréscimo de 9% da digestibilidade enzimática, comparado aos sistemas controle.

Utilizando um procedimento de lignificação artificial de paredes celulares de milho, Tobimatsu et al. (2012) efetuaram a polimerização *in vitro* de lignina com diferentes derivados hidroxicinâmicos conjugados, incluindo o ácido rosmarínico. Recorrendo a técnicas de caracterização espectroscópica (2D-RMN), esses autores constataram que o ácido rosmarínico, em especial, é copolimerizado na estrutura da lignina e, como consequência, aumenta a digestibilidade melhorando a sacarificação da parede celular. Os experimentos descritos no presente trabalho foram efetuados *in vivo* e os dados obtidos sugerem que o ácido rosmarínico, se de fato foi estruturalmente incorporado como descrito por Tobimatsu et al. (2012), tem importante papel na alteração da composição monomérica da lignina de raízes de milho. Além disso, pelo fato de que a biossíntese de lignina possui relevante maleabilidade, a aplicação exógena do ácido rosmarínico, como descrita neste trabalho, pode afetar enzimas da via de fenilpropanoides. Diante desta possibilidade, experimentos adicionais foram realizados determinando-se as atividades de algumas enzimas dessa via metabólica.

3.4 Efeitos do ácido rosmarínico sobre enzimas da via de fenilpropanoides

Alguns estudos evidenciam que vários compostos fenólicos afetam as atividades de enzimas da via dos fenilpropanoides, como PAL, C4H e POD, entre outras. Neste trabalho, foram analisadas duas enzimas-chave (PAL e TAL), as quais atuam nas reações iniciais da via metabólica. As concentrações escolhidas de ácido rosmarínico foram 0,25 mM, 0,75 mM e 1,5 mM. Essa escolha foi baseada nos resultados obtidos nos ensaios de crescimento das raízes (**Fig. 5A**) e na composição monomérica de lignina (**Fig. 5C**). Em relação a PAL (**Fig. 5B**), a qual catalisa a conversão de L-fenilalanina em ácido *t*-cinâmico, foram notadas reduções significativas das atividades (em torno de 23% em relação ao controle), sob ação do ácido rosmarínico. Devido a existência de isoenzimas da PAL, é bem conhecido que sua atividade catalítica pode ser estimulada

(dos SANTOS et al., 2004) ou inibida (ZANARDO et al., 2009; LIMA, 2009) por diferentes compostos fenólicos. Como notado aqui, o ácido rosmarínico inibiu a enzima.

Em monocotiledôneas, TAL possui atividade análoga à PAL e catalisa a conversão de L-tirosina em ácido *p*-cumárico. Os resultados mostraram que suas atividades foram reduzidas pelo ácido rosmarínico nas concentrações testadas (**Fig. 5B**). As reduções foram diretamente proporcionais às concentrações do ácido rosmarínico, variando de 30% (0,25 mM) a 70% (1,5 mM). Levando em conta que as atividades da PAL e da TAL estão presentes no mesmo polipeptídeo, e sabendo que lignina de gramíneas tem como precursor primário L-tirosina (IIYAMA et al., 1993), as inibições causadas pelo ácido rosmarínico sobre a TAL indicam que essa enzima atua de modo preferencial na via metabólica do milho.

Reduções nas atividades da TAL, sob tratamento com ácido rosmarínico, foram acompanhadas por significativos aumentos nas atividades da C4H (**Fig. 5B**), a qual catalisa a hidroxilação do ácido *t*-cinâmico em ácido *p*-cumárico. Houve aumento de 58 e 75% da atividade da C4H nas concentrações de 0,75 e 1,5 mM, respectivamente, em comparação com o controle. Aumentos nas atividades da C4H provavelmente estão relacionados às inibições da TAL pelo ácido rosmarínico (**Fig. 5B**). Tendo em vista que TAL produz ácido *p*-cumárico, o qual é o produto também da C4H, esta pode ser ativada de modo a compensar a baixa atividade da TAL. Em outras palavras, a reduzida formação de ácido *p*-cumárico, proveniente da reação da TAL, teria efeito indutor sobre a atividade da C4H. Isto é plausível, pois as atividades da 4CL não foram afetadas pelo ácido rosmarínico (**Fig. 5B**), sugerindo que apesar do aumento da atividade da C4H (**Fig. 5B**), a produção de ácido *p*-cumárico pode não ter sido suficiente para a suprir a ação catalítica da C4H.

Outra enzima que não apresentou diferença significativa em sua atividade foi a CAD (**Fig. 5B**). Esta enzima é a responsável pela redução dos cinamaldeídos nos três álcoois: *p*-cumaril, coniferil e sinapil que correspondem, respectivamente, aos monômeros H, G e S; estes álcoois se polimerizam oxidativamente para formar lignina. Já, a atividade enzimática da COMT (**Fig. 5B**), responsável pela metilação do ácido cafeico, foi inibida em 26% na menor concentração do tratamento com ácido rosmarínico 0,25 mM.

Tendo em vista que a estrutura do ácido rosmarínico é composta por uma esterificação do ácido cafeico e ácido 3,4-diidroxifenilático, foram realizados experimentos adicionais da COMT, a fim de verificar um possível ponto de entrada do ácido rosmarínico na via dos fenilpropanoides. Reações contendo somente ácido

rosmarínico como um possível substrato da COMT e reações contendo ácido rosmarínico e ácido cafeico juntos foram conduzidas nas mesmas condições estabelecidas para a determinação da COMT com seu substrato natural, que é o ácido cafeico.

Reações contendo somente ácido rosmarínico 100 μM (**Fig. 6A**) como substrato demonstraram um perfil cromatográfico com dois picos, sendo um do próprio ácido rosmarínico e outro indicando ser o produto da reação, ou seja, há um forte indicativo de que o ácido rosmarínico foi metabolizado pela COMT. Isto é plausível de acordo com os resultados de reações conduzidas com a mesma concentração de ácido rosmarínico, porém na ausência do SAM, que é o cofator enzimático, haja vista que nestas condições não foi observado o aparecimento de nenhum outro composto, salvo o próprio ácido rosmarínico (**Fig. 6B**).

Adicionalmente, reações contendo ácido cafeico 50 μM e ácido rosmarínico 300 μM juntos demonstraram diminuição de 15% na atividade da COMT (**Fig. 7A**), ou seja, houve um decréscimo na formação de ácido ferúlico e conseqüentemente menos ácido cafeico foi consumido (**Fig. 7B**) quando comparado a reação padrão da COMT que só contém ácido cafeico como substrato. Esta queda de 25% no consumo de substrato se deve ao fato de menos ácido cafeico ter sido utilizado pela COMT, visto que nestas reações, ácido rosmarínico foi também utilizado pela enzima como substrato. Estes resultados fortalecem a ideia de que o ácido rosmarínico pode ser realmente metabolizado pela COMT e ser também incorporado na estrutura da lignina por este ponto de entrada na via dos fenilpropanoides.

A análise dos ácidos fenólicos livres (**Fig. 8**) demonstrou que o tratamento com 1,5 mM de ácido rosmarínico aumentou em 25% o teor de ácido ferúlico. Este aumento de ácido ferúlico pode ser consequência das condições de extração dos ácidos fenólicos livres, ou seja, o uso de HCl 2 N e temperatura de 100 °C utilizados na extração dos fenólicos pode ter sido suficiente para hidrolisar a ligação éster presente no ácido rosmarínico. Sendo assim, o aumento de ácido ferúlico pode ser devido sua liberação a partir do ácido rosmarínico metabolizado pela COMT, já que esta enzima converte a porção cafeico do ácido rosmarínico em ácido ferúlico. Já, em relação ao ácido *p*-cumárico não houve alteração significativa em seu teor.

No conjunto, os dados demonstraram influência do ácido rosmarínico na via de fenilpropanoides e seus efeitos nas atividades das enzimas das reações iniciais da via refletiram na formação do monômero H que, como notado, foi reduzida (**Fig. 5C**).

4. Conclusão

Apesar de a lignina conferir rigidez à parede celular, ela revela possuir maleabilidade estrutural, que pode ser afetada por diferentes fatores. Como notado, o ácido rosmarínico influenciou o crescimento e a lignificação das raízes de milho. De um modo geral, os resultados suportam a ideia de que o ácido rosmarínico seja incorporado à lignina, podendo atuar como substituinte monolignol. Evidência pode ser constatada pelas significativas reduções nos teores dos monômeros, em especial H, por sua metabolização através da COMT que demonstrou utilizar o ácido rosmarínico também como substrato e pelo aumento na digestibilidade enzimática das raízes de plântulas de milho. Em resumo, os efeitos causados pelo ácido rosmarínico se devem não somente à sua possível copolimerização na estrutura da lignina, mas também às interferências causadas na biossíntese deste polímero, em especial sobre enzimas das reações iniciais da via de fenilpropanoides.

5. Referências

BOERJAN, Wout; RALPH, John; BAUCHER, Marie. Lignin Biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 519-546, 2003.

BONAWITZ, Nicholas D.; CHAPPLE, Clint. The Genetics of Lignin Biosynthesis: Connecting Genotype to Phenotype. **Annual Review of Genetics**, v. 44, p. 337-363, 2010.

BOUDET, Alain-Michel. Evolution and current status of research in phenolic compounds. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2722–2735, 2007.

COSTA, Michael A.; COLLINS, R. Eric; ANTEROLA, Aldwin M.; COCHRANE, Fiona C.; DAVIN, Laurence B.; LEWIS, Norman G. An in silico assessment of gene function and organization of the phenylpropanoid pathway metabolic networks in *Arabidopsis thaliana* and limitations thereof. **Phytochemistry**, v. 64, n. 6, p. 1097-1112, 2003.

DELABONA, P.S.; COTA, J.; HOFFMAM, Z.B.; PAIXÃO, D.A.; FARINAS, C.S.; CAIRO, J.P.; LIMA, D.J.; SQUINA, F.M.; RULLER, R.; PRADELLA, J.G. Understanding the cellulolytic system of *Trichoderma harzianum* P49P11 and enhancing saccharification of pretreated sugarcane bagasse by supplementation with pectinase and α -L-arabinofuranosidase. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 500–507, 2013.

dos SANTOS, Wanderley Dantas; FERRARESE, Maria de Lourdes Lucio; FINGER, Aline; TEIXEIRA, Aline C. N.; FERRARESE-FILHO, Osvaldo. Lignification and related enzymes in soybean root growth-inhibition by ferulic acid. **Journal of Chemical Ecology**, v. 30, p. 1199-1208, 2004.

dos SANTOS, Wanderley Dantas; FERRARESE, Maria de Lourdes Lucio; NAKAMURA, Celso Vataru; MOURÃO, Káthia Socorro Mathias; MANGOLIN, Claudete Aparecida, FERRARESE-FILHO, Osvaldo. Soybean (*Glycine max*) root lignification induced by ferulic acid. The possible mode of action. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, n. 9, p. 1230-1241, 2008.

dos SANTOS, Wanderley Dantas; MARCHIOSI, Rogério; VILAR, Flávia Carolina Moreira; LIMA, Rogério Barbosa; SOARES, Anderson Ricardo; PARIZOTTO, Ângela Valderrama; OLIVEIRA, Dyonis Matias de; FERRARESE-FILHO, Osvaldo. Polyvalent Lignin: Recent approaches in determination and applications. In: Fachuang Lu. (Org.) **Lignin: structural analysis, applications in biomaterials and ecological significance**. 1ed. Hauppauge, NY: Nova Science Publishers, 2014, v. 1, p. 1-25.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugar and Related Substances. **Analytic Chemistry**, 28(3), p. 350-356, 1956.

FERRARESE, Maria de Lourdes Lucio; FERRARESE-FILHO, Osvaldo; RODRIGUES, João Domingos. Ferulic acid uptake by soybean root in nutrient culture. **Acta Physiology Plantarum**, v. 22, p. 121-124, 2000.

FERRARESE, Maria de Lourdes Lucio; ZOTTIS, Anderson; FERRARESE-FILHO, Osvaldo. Protein-free lignin quantification in soybean (*Glycine max*) roots. **Biologia**, v. 57, n. 4, p. 541-543, 2002.

GONÇALVES, T.A.; DAMÁSIO, A.R.L.; SEGATO, F.; ALVAREZ, T.M.; BRAGATTO, J.; BRENELLI, L.B.; CITADINI, A.P.S.; MURAKAMI, M.T.; RULLER, R.; LEME, A.F.P.; PRADE, R.A.; SQUINA, F.M. Functional characterization and synergic action of fungal xylanase and arabinofuranosidase for production of xylooligosaccharides. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 293–299, 2012.

HERRIG, Vanessa; FERRARESE, Maria de Lourdes Lucio; SUZUKI, Letícia S.; RODRIGUES, João Domingos; FERRARESE-FILHO, Osvaldo. Peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase activities, phenolic acid contents, and allelochemicals-inhibited root growth of soybean. **Biological Research**, v. 35, p. 59-66, 2002.

IYAMA K., LAM T.B.T., STONE B.A. 1993. Cell wall biosynthesis and its regulation. 46: 829–835. In: JUNG H.G., BUXTON D.R., HATFIELD R.D., RALPH J. (Ed.) **Forage Cell Wall Structure and Digestibility**. Madison: University Press, Ithaca, NY. 621–665p.

INOUE, Kentaro; SEWALT, Vicent J. H.; BALANCE, Murray; NI, Writing; STURZER, Cornelia; DIXON, Richard A. Developmental expression and substrate specificities of alfalfa caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase in relation to lignification. **Plant Physiology**, v. 117, n. 3, p. 761-770, 1998.

ISHII-IWAMOTO, E. L. (Org.); BRACHT, A. (Org.) (2003). Métodos de laboratório em bioquímica. SÃO PAULO: Editora Manole Ltda., v. 1. 401p.

KHAN, Wajahatullah; PRITHIVIRAJ, Balakrishnan; SMITH, Donald L. Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. **Journal of Plant Physiology**, v. 160, p. 859-863, 2003.

KIM, Gun-Dong; PARK, Yong Seek; JIN, Young-Ho; PARK, Cheung-Seog. Production and applications of rosmarinic acid and structurally related compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 5, p. 2083-2092, 2015.

KROCHKO, Joan E.; ABRAMS, Garth D.; LOEWEN, Mary K.; ABRAMS, Suzanne R.; CUTLER, Adrian J. (+)-Abscisic acid 8'-hydroxylase is a cytochrome P450 monooxygenase. **Plant Physiology**, v. 118, n. 3, p. 849-860, 1998.

LIMA, Marisa A.; GOMEZ, Leonardo D.; STEELE-KING, Clare G.; SIMISTER, Rachael; BERNARDINELLI, Oigres D.; CARVALHO, Marcelo A.; REZENDE, Camila A.; LABATE, Carlos A.; de AZEVEDO, Eduardo R.; MCQUEEN-MASON, Simon J.; POLIKARPOV, Igor. Evaluating the composition and processing potential of novel sources of Brazilian biomass for sustainable biorenewables production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1, 2014.

LIMA, Rogério Barbosa de. **Biossíntese de monolignóis em raízes de soja (*Glycine Max L. Merr.*) tratadas com ácido cinâmico e derivados fenilpropenoides**. 2009. Dissertação de mestrado – Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas. Departamento de Biologia, Maringá: Universidade Estadual de Maringá.

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

MORRISON, I. M. A semi-micro method for the determination of lignin and its use in predicting the digestibility of forage crops. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 23, p. 455-463, 1972.

MYTON, Kathryn E.; FRY, Stephen C. Dithiothreitol and cobalt effects on membrane-associated peroxidases oxidizing feruloyl-CoA. **Phytochemistry**, v. 38, n. 3, p. 573-577, 1995.

OLIVEIRA, Karina Bora de. **Determinação do ácido rosmarínico em *Salvia officinalis* L., lamiaceae, e avaliação de sua toxicidade e influência na melanogênese.** 2010. 134 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

RALPH, John. Hydroxycinnamates in lignification. **Phytochemical Reviews**, v. 9, p. 65–83, 2010.

SIQUEIRA, Germano Andrade. **Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar deslignificado e distribuição topoquímica da lignina e dos ácidos hidroxicinâmicos na parede celular.** 2011. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena.

TOBIMATSU, Yuki; ELUMALAI, Sasikumar; GRABBER, John H.; DAVIDSON, Christy L.; PAN, Xuejun; RALPH, John. Hydroxycinnamate Conjugates as Potential Monolignol Replacements: In vitro Lignification and Cell Wall Studies with Rosmarinic Acid. **ChemSusChem**, v. 5, p. 676-686, 2012.

VANHOLME, Ruben; MORREEL, Kris; RALPH, John; BOERJAN, Wout. Lignin engineering. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, p. 278 –285, 2008.

VEGA-SÁNCHEZ, Miguel E.; RONALD, Pamela C. Genetic and biotechnological approaches for biofuel crop improvement. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 218–224, 2010.

WAGNER, Armin; TOBIMATSU, Yuki; PHILLIPS, Lorelle; FLINT, Heather; TORR, Kirk; DONALDSON, Lloyd; PEARS, Lana; RALPH, John. CCoAOMT suppression modifies lignin composition in *Pinus radiata*. **The Plant Journal**, v. 67, n. 1, p. 119–129, 2011.

ZANARDO, Daniele Iara Lucca; LIMA, Rogério Barbosa; FERRARESE, Maria de Lourdes Lucio; BUBNA, Gisele Adriana; FERRARESE-FILHO, Osvaldo. Soybean root growth inhibition and lignification induced by *p*-coumaric acid. **Environmental and Experimental Botany**, v. 66, p. 25-30, 2009.

Fig. 1. Os principais segmentos do metabolismo da via dos fenilpropanoides em plantas vasculares são: a) fenilalanina amônia liase (**PAL**); b) tirosina amônia liase (**TAL**); c) cinamato 4-hidroxilase (**C4H**); d) 4-hidroxicinamoil-CoA ligase (**4CL**); e) hidroxicinamoil-CoA redutase (**CCR**); f) hidroxicinamil álcool desidrogenase (**CAD**); g) cinamato 3-hidroxilase (**C3H**); h) cafeoil-CoA O-metiltransferase (**CCOMT**); i) cafeato O-metiltransferase (**COMT**); j) ferulato 5-hidroxilase (**F5H**); k) *p*-hidroxicinamoil-CoA transferase (**HCT**).

Fig. 2. Estrutura química do ácido rosmarínico.

Fig. 3. Via biossintética do ácido rosmarínico. **PAL**: fenilalanina amônia liase; **C4H**: cinamato 4-hidroxilase; **4CL**: 4-hidroxicinamoil-CoA ligase; **TAT**: tirosina aminotransferase; **HPPR**: hidroxifenilpiruvato redutase; **HPPD**: hidroxifenilpiruvato dioxidase; **RAS**: hidroxicinamoil-CoA:hidroxifenillactato hidroxicinamoil transferase; **3-H, 3'-H**: hidroxicinamoil-hidroxifenillactato 3- e 3'-hidroxilases.

Fig. 4. Depleção do ácido rosmarínico (1,5 mM) da solução nutritiva. Valores médios \pm erro padrão da média (n = 4), seguidos por * são significativamente diferentes do tempo zero de acordo com o teste de Dunnett ($p \leq 0,05$).

Fig. 5. Efeitos do ácido rosmarínico no crescimento das raízes (**A**), atividades enzimáticas (**B**) e conteúdos de lignina e composição monomérica (**C**) de plântulas de milho. Valores médios \pm erro padrão da média (n = 3 a 5), seguidos por * são significativamente diferentes do controle de acordo com o teste de Dunnett ($p \leq 0,05$).

Fig. 6. Cromatograma da reação da COMT, utilizando ácido rosmarínico 100 μ M como substrato (**A**) e cromatograma do ácido rosmarínico 100 μ M de reações conduzidas sem SAM (**B**).

Fig. 7. Efeitos do ácido rosmarínico (AR) na atividade da COMT de raízes de plântulas de milho. Atividade da COMT utilizando ácido cafeico 50 μM e ácido rosmarínico 300 μM como substratos (**A**). Área do pico de ácido cafeico nas reações da COMT utilizando ácido cafeico e ácido rosmarínico como substratos (**B**). Valores médios \pm erro padrão da média ($n = 3$), seguidos por * são significativamente diferentes da reação padrão que só contém ácido cafeico de acordo com o teste t ($p \leq 0,05$).

Fig. 8. Conteúdo de ácidos fenólicos livres em raízes de plântulas de milho: ácido *p*-cumárico (**A**) e ferúlico (**B**). Valores médios \pm erro padrão da média ($n = 4$), seguidos por * são significativamente diferentes do controle de acordo com o teste de Dunnett ($p \leq 0,05$).

Fig. 9. Digestibilidade de raízes de plântulas de milho, avaliada pela ação da xilanase. Valores médios \pm erro padrão da média ($n = 4$), seguidos por * são significativamente diferentes do controle de acordo com o teste de Dunnett ($p \leq 0,05$).

Fig. 1

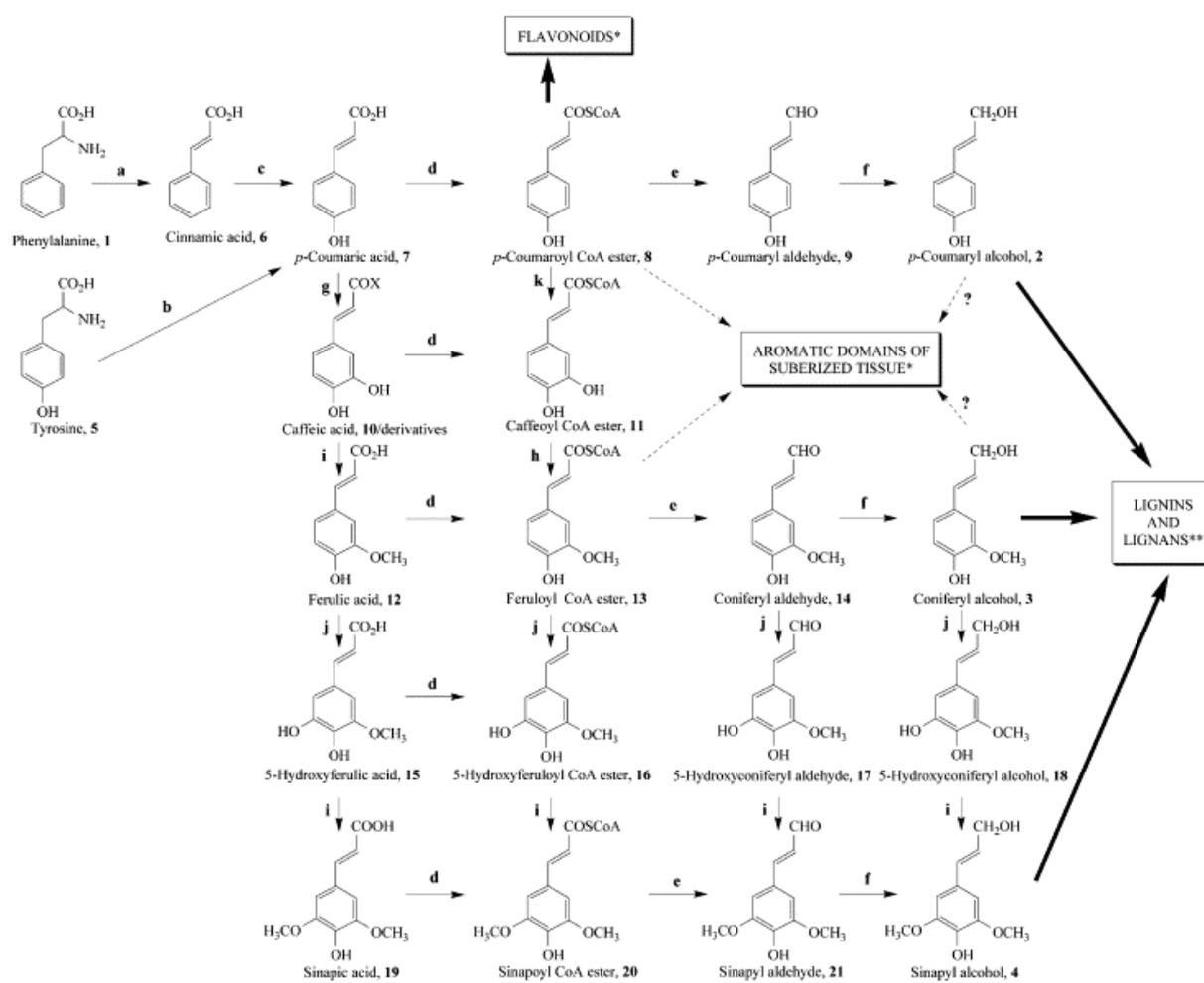


Fig. 2

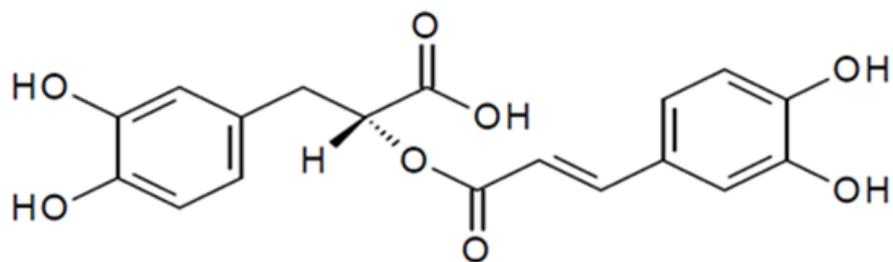


Fig. 3

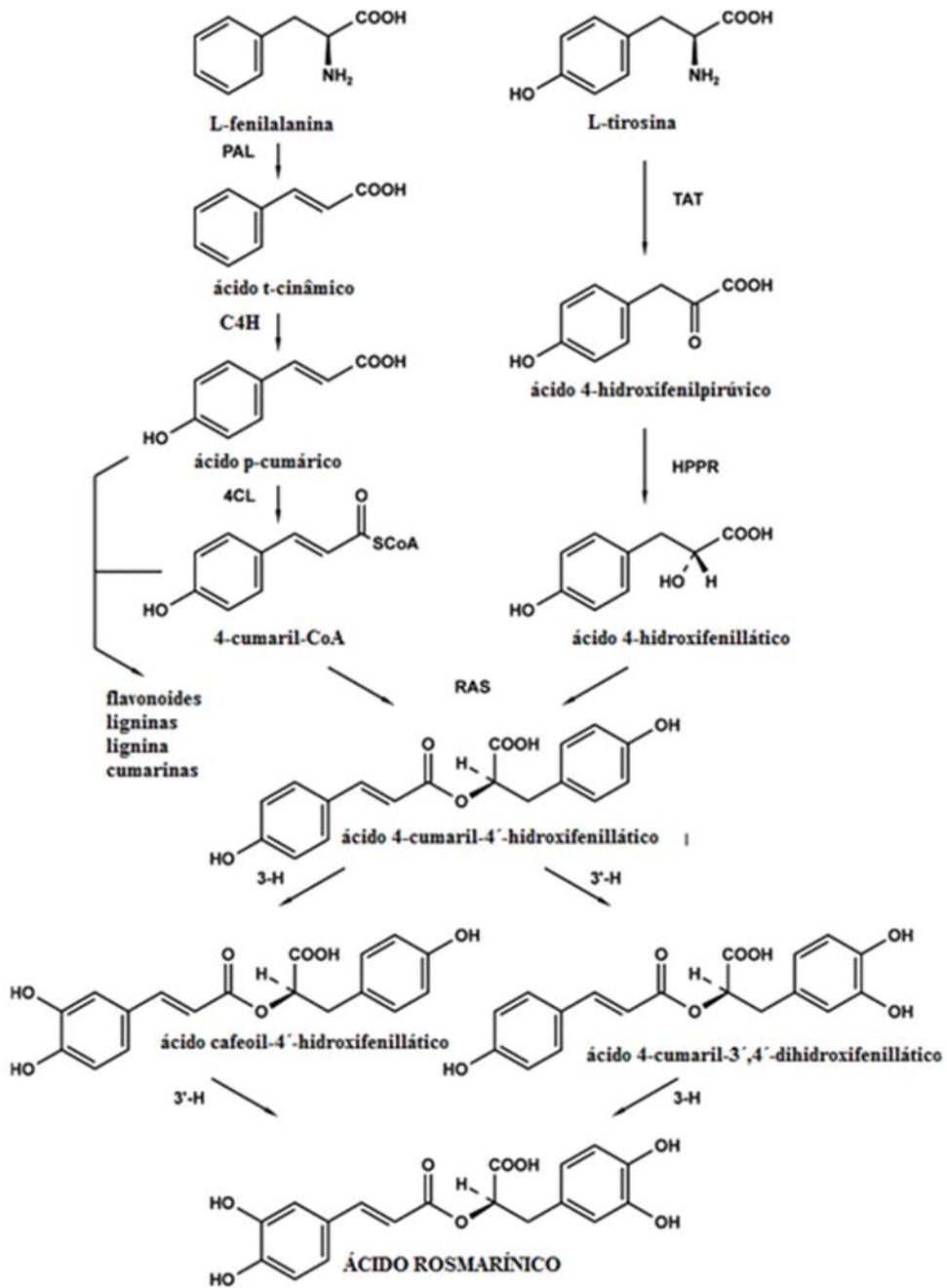


Fig. 4

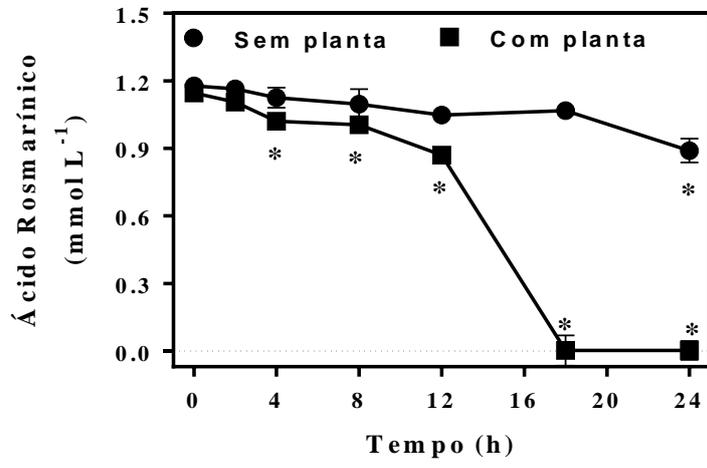


Fig. 5

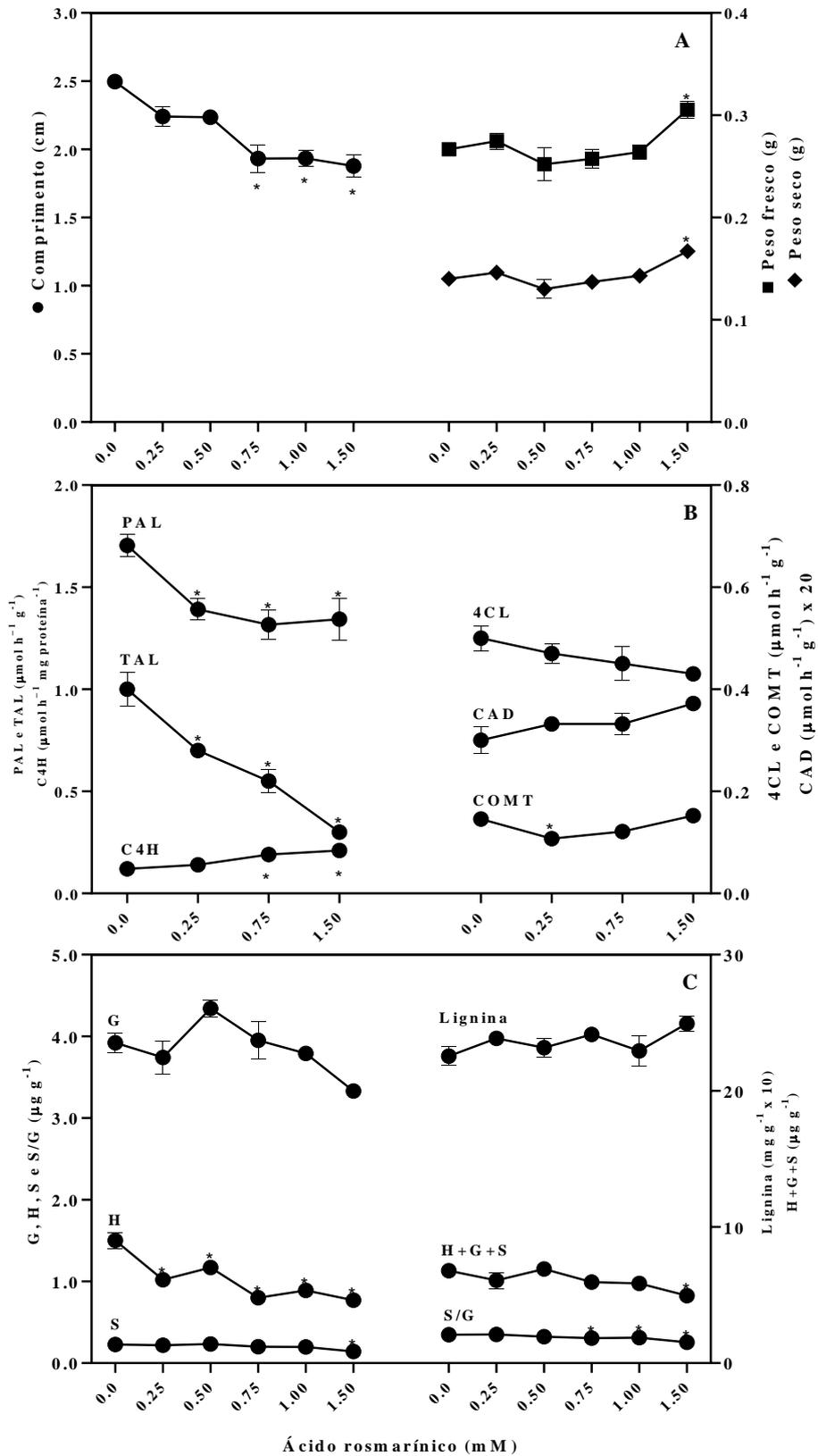


Fig. 6

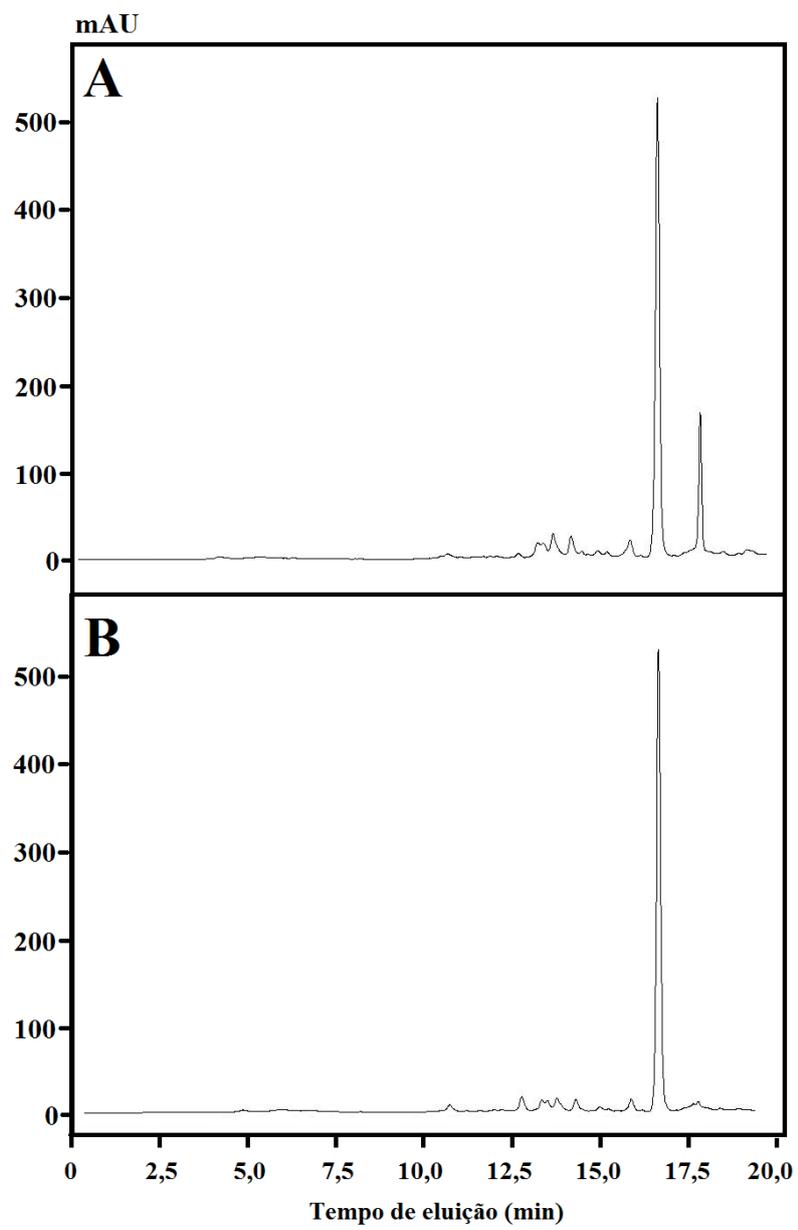


Fig. 7

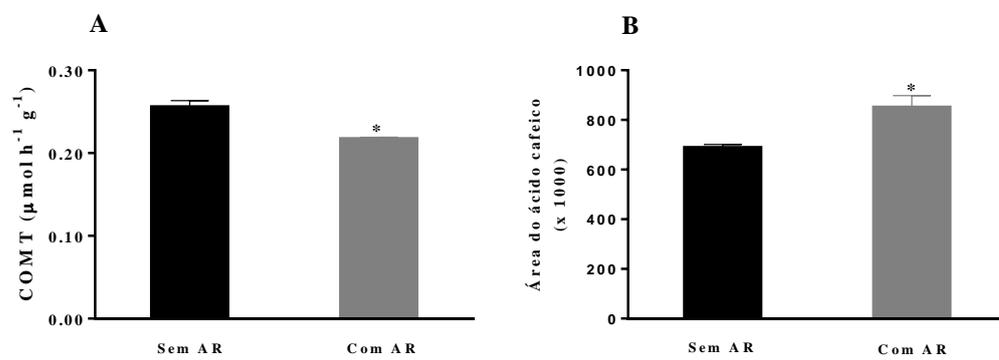


Fig. 8

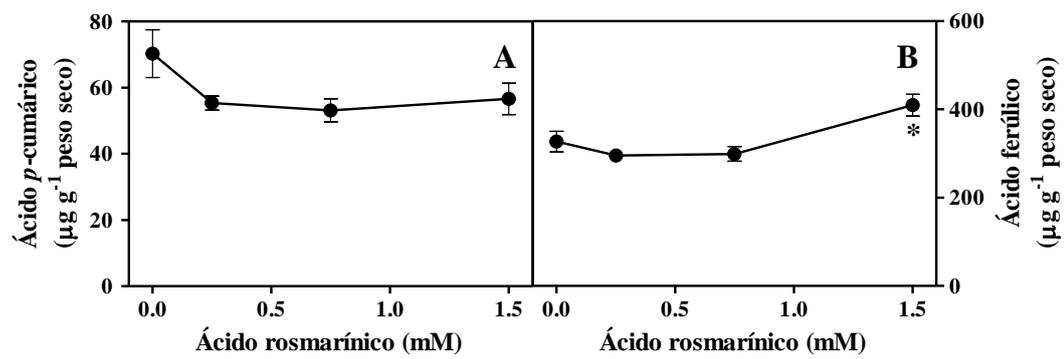
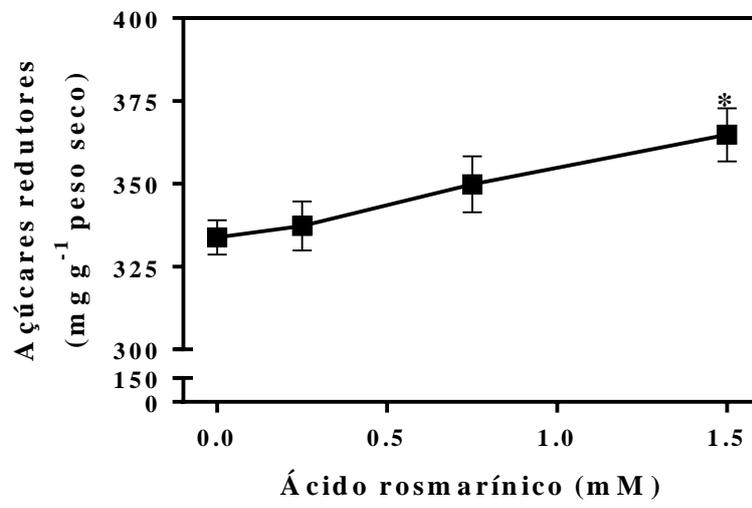


Fig. 9



ÁCIDO ROSMARÍNICO: UM INDUTOR DA DIGESTIBILIDADE DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA EM MILHO

J.M. Bevilaqua, A. Finger-Teixeira, O. Ferrarese-Filho*

Laboratório de Bioquímica de Plantas, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil

Autor para correspondência:

Oswaldo Ferrarese-Filho (✉)

Laboratório de Bioquímica de Plantas

Departamento de Bioquímica

Universidade Estadual de Maringá

Av. Colombo, 5790

CEP 87020-900, Maringá, PR, Brasil

Tel.: +55 44 3011 4717

E-mail: osferrarese@gmail.com

Resumo

Lignina é uma das mais abundantes biomoléculas presentes na parede celular das plantas, e a sua síntese ocorre por meio da via de fenilpropanoides. A recalcitrância da parede celular à digestibilidade enzimática é decorrente das características estruturais e composicionais da lignina, e isso tem significativa influência na conversão da biomassa vegetal lignocelulósica em biocombustíveis líquidos. Alguns estudos sugerem que o ácido rosmarínico pode ser copolimerizado na estrutura da lignina, alterando sua composição e, possivelmente, reduzindo a recalcitrância da parede celular. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos do ácido rosmarínico sobre o crescimento e a lignificação de plantas de milho de 7 e 14 dias de crescimento e avaliar a digestibilidade da biomassa vegetal. Os resultados demonstraram não haver influência do ácido rosmarínico sobre o crescimento, conteúdo de lignina e sua composição monomérica, e atividades das enzimas PAL e TAL em milho. No entanto, o ácido rosmarínico exerceu expressivo aumento sobre a digestibilidade do caule e folha de plantas de milho. Isso indica que o ácido rosmarínico poderá ser utilizado como indutor da digestibilidade da biomassa lignocelulósica na produção de biocombustíveis.

Palavras-chave: bioenergia, digestibilidade, lignificação, parede celular, *Zea mays*

1. Introdução

Depois da celulose, o composto orgânico mais abundante nas plantas é a lignina, um polímero de grupos fenilpropanoides altamente ramificado. A estrutura precisa da lignina não é conhecida devido sua dificuldade de extração, pois está covalentemente ligada a celulose e outros polissacarídeos da parede celular (TAIZ e ZEIGER, 2013).

O polímero de lignina é formado, principalmente, por três álcoois hidroxicinâmílicos: *p*-cumaril (H), coniferil (G) e sinapil (S), também chamados de monolignóis, tendo como precursores os ácidos hidroxicinâmicos correspondentes (LI et al., 2008). A via diretamente implicada na síntese de lignina é a dos fenilpropanoides, que inicia com a desaminação do aminoácido L-fenilalanina, derivado da via do ácido chiquímico.

A lignina possui alto impacto na indústria de papel e na digestibilidade de plantas forrageiras. Por isso, há mais de um século o estudo da bioquímica da produção de lignina tem atraído a atenção de inúmeros pesquisadores. O estudo atual da lignina está envolvido na busca da redução de seu conteúdo, com o intuito de melhorar a produção de biocombustíveis a partir da celulose (LI et al., 2008).

Sabe-se que fatores internos e externos podem afetar a síntese de lignina. Estudos que determinem inibidores da síntese da lignina têm recebido destaque, pois a utilização da biomassa das plantas como fonte de carboidratos para obtenção de combustíveis e produtos químicos de alto valor agregado tem sido severamente dificultada pela recalcitrância da lignina (SANTOS et al., 2012).

Com base em estudos anteriores, realizados *in vitro*, o ácido rosmarínico tem sido considerado de aplicação promissora no campo da bioengenharia. Isso se deve ao fato de possuir uma ligação éster facilmente clivável, a qual une duas metades fenólicas, o que pode contribuir com o processo de despolimerização da lignina (RALPH, 2010). Investigações *in vivo*, como descritos anteriormente, corroboram a hipótese de copolimerização do ácido rosmarínico com o polímero de lignina, já que ele exerceu influência sobre a via dos fenilpropanoides e a composição monomérica da lignina.

O ácido rosmarínico é um éster dos ácidos cafeico e 3,4-diidroxifenilático, encontrado como um metabólito secundário de várias espécies vegetais, como é o caso da sálvia e outras espécies de uso culinário e terapêutico. Vega-Sánchez e Ronald (2010), em sua recente revisão, destaca o importante papel do ácido rosmarínico na bioengenharia, tendo como alvo a lignina no melhoramento de plantas para obtenção de biocombustível (TOBIMATSU et al., 2012).

Estudos sobre as paredes celulares auxiliam na afirmação de que alguns monolignóis substituintes, dentre eles o ácido rosmarínico, podem ser eficientemente incorporados na lignina da parede celular e, assim, afetar suas propriedades estruturais e composicionais. Neste contexto, o ácido rosmarínico se destaca como possível substituinte estrutural, o que pode contribuir com o aumento da digestibilidade da biomassa lignocelulósica e consequentemente com a produção de biocombustíveis.

A atual expansão da bioenergia justifica um investimento maciço nos estudos sobre a parede celular e as implicações bioquímicas relativas à sua digestibilidade, para fins de aumento no fornecimento de biocombustíveis. Assim, o objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos do ácido rosmarínico no crescimento, na lignificação e na digestibilidade da biomassa de plantas de milho.

2. Material e métodos

2.1 Procedimentos gerais

Sementes de milho (*Zea mays* cv. IPR-164), obtidas juntas ao IAPAR (Instituto Agrônômico do Paraná) e previamente sanitizadas em solução de NaClO a 2% foram germinadas em câmara escura, a 25 °C, e as plântulas foram obtidas após dois dias. Três plântulas homogêneas foram selecionadas e transferidas para vasos plásticos (capacidade de 0,5 L; cor preta) contendo 400 g de vermiculita. Os vasos foram regados com 220 mL de água, caracterizando este dia como o primeiro. No terceiro dia os sistemas foram regados com 90 mL de solução nutritiva de Hogland e a partir do quinto dia receberam solução nutritiva contendo ou não ácido rosmarínico (0,25; 0,75 e 1,5 mM). No quinto dia, a planta de menor crescimento foi excluída, permanecendo duas até o final dos experimentos, isto é, 7 ou 14 dias. Os vasos foram regados no 1°, 3°, 5°, 7°, 9°, 11° e 13° dias e mantidos sob fotoperíodo de 12 horas a 25 °C.

No término dos experimentos de cultivo, e com auxílio de régua milimetrada, foram medidos os comprimentos (raíz, caule e folha) de todas as plantas, para cada repetição. Os resultados foram expressos em centímetros. Os diferentes órgãos das plantas foram separados por excisão e imediatamente determinados suas biomassas frescas. A seguir, as raízes, caules e folhas foram acondicionados em estufa, a 60 °C, até a obtenção de massa constante e, posteriormente, pesada em balança analítica. Os valores médios das repetições foram obtidos e os resultados expressos em gramas.

2.2 Determinação da atividade da fenilalanina amônia liase (PAL)

A extração da enzima fundamentou-se na metodologia descrita por Ferrarese et al. (2000) com o seguinte procedimento: A biomassa fresca (2,0 g) de caule (14 dias de crescimento) tratados ou não com ácido rosmarínico, foram maceradas em 5,0 mL de tampão borato 0,1 M (pH 8,8). Após maceração, a suspensão foi centrifugada (12.000 g, 15 minutos, 4 °C) e o sobrenadante utilizado para análise da atividade enzimática. A reação desenvolvida na determinação da atividade da enzima seguiu o descrito por Ferrarese et al. (2000), utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC Shimadzu[®], Japão). A fase móvel utilizada foi metanol: água (70%:30%) com fluxo de 0,5 mL min⁻¹. O produto da reação, *t*-cinamato, foi detectado e identificado por

comparação com padrão de ácido *t*-cinâmico (Sigma Chemical Co, Missouri, USA). A atividade da fenilalanina amônia liase foi expressa em μmol de *t*-cinamato formado $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ de matéria fresca.

2.3 Determinação da atividade da tirosina amônia liase (TAL)

A enzima foi extraída como descrito por Khan et al. (2003). Após o período de incubação, 1,0 g de material fresco de caule (14 dias de crescimento) foi macerada em 50 mM de tampão Tris- HCl (pH 8,5). Os homogeneizados foram centrifugados (2.200 g, 10 minutos, 4°C) e o sobrenadante usado como preparação enzimática. A mistura de reação (100 μmoles de tampão Tris-HCl pH 8,0 e uma apropriada amostra de extrato enzimático em um volume final de 0,95 mL) foi incubada a 40 °C por 5 minutos para o ensaio da atividade da TAL. L-Tirosina (5,5 μmoles) foi adicionado para iniciar a reação, que foi interrompida após uma hora com 50 μl de 5 M HCl. Todas as amostras foram filtradas em filtro de 0,45 μm e analisadas por HPLC, como descrito anteriormente. A fase móvel foi metanol/ácido acético 4% em água (30/70, v/v), com fluxo de 1,0 mL min^{-1} para uma corrida isocrática de 15 minutos. O produto da reação, *p*-cumarato, foi analisado em 320 nm e identificado por comparação com seu respectivo padrão. A atividade da TAL foi expressa em μmol ácido *p*-cumárico $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ de matéria fresca.

2.4 Quantificação de lignina

As biomassas secas (0,3 g) de caule de 14 dias, obtidos após crescimento em vermiculita, foram homogeneizadas em 50 mM de tampão fosfato pH 7,0 (7,0 mL) e transferidas para um tubo de centrífuga (FERRARESE et al., 2002). O precipitado foi centrifugado (1.400 g, 6 minutos), lavado e centrifugado sucessivamente como segue: mais duas vezes com 50 mM tampão fosfato pH 7,0 (7,0 mL); três vezes com 1% (v/v) Triton[®] X-100 em tampão pH 7,0 (7,0 mL); duas vezes com 1 M NaCl em tampão pH 7,0 (7,0 mL); duas vezes com água destilada (7,0 mL) e duas vezes com acetona (5,0 mL). O material foi seco em estufa (80 °C, 24 horas) e a massa definida como a fração da parede celular livre de proteínas. Esse material foi usado para determinar o teor total de lignina pelo método do brometo de acetila (MORRISON, 1972). Uma porção (20 mg) do material foi acondicionada em tubo de centrífuga e 0,5 mL de brometo de acetila

25% foram acrescentados. As amostras foram aquecidas por 30 minutos a 70°C, transferidas para banho de gelo e a reação interrompida com adição de 0,9 mL de NaOH 2 M. A seguir, foram adicionados 0,1 mL de hidroxilamina-HCl 7,5 M e 2,0 mL de ácido acético gelado. Após centrifugação (1.000 g, 5 minutos), o sobrenadante foi diluído e usado para as leituras em 280 nm. Uma curva padrão a partir do padrão de lignina (Aldrich 37,096-7) foi gerada para determinação da concentração de lignina. Os resultados foram expressos mg lignina g⁻¹ de parede celular.

2.5 Determinação da composição monomérica de lignina

A oxidação com nitrobenzeno foi usada para determinar a composição monomérica da lignina de caule de 14 dias (ZANARDO et al., 2009). Fração da parede celular livre de proteínas (50 mg) foi selada em uma ampola Pyrex[®] contendo 1,0 mL de NaOH 2,0 M mais 0,1 mL de nitrobenzeno e aquecida a 170 °C por 2,5 horas, com agitação ocasional da amostra. Após oxidação, a amostra foi resfriada em banho de gelo, lavadas duas vezes com clorofórmio, acidificada para pH 3-4 com HCl 5,0 M, e extraída duas vezes com clorofórmio. Os extratos orgânicos foram combinados, secos e ressuspensos em metanol. Todas as amostras foram filtradas em filtro de seringa descartável 0,45 µm e analisada por HPLC. A fase móvel foi metanol/ácido acético 4% em água (20/80, v/v) com fluxo de 1,2 mL min⁻¹ para corrida isocrática de 20 minutos. As quantificações de *p*-hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído foram realizadas a 290 nm utilizando os padrões correspondentes. Os resultados foram expressos como µg monômero mg⁻¹ de parede celular.

2.6 Extração dos açúcares solúveis

Antes da avaliação da digestibilidade enzimática foi realizada a remoção dos açúcares solúveis, por meio de sucessivas lavagens com álcool 80%. Para isto, a biomassa seca da raiz, caule e folha foi moída e transferida separadamente para tubos falcon e então adicionado 9 mL de etanol 80%. Posteriormente, os tubos foram acondicionados em um shaker a 55 °C, sob agitação de 200 rpm por 4 horas. Após este período, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em etanol 80%, sendo novamente incubado a 55 °C por mais 4 horas, sob agitação. Este procedimento foi realizado por cerca de seis vezes, até que todo o açúcar solúvel tivesse sido extraído.

Para avaliar a eficiência da extração, foi retirada uma alíquota do sobrenadante para detectar a presença de açúcares pelo método do fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). Após 15 minutos de reação foi realizada a leitura espectrofotométrica em 490 nm. Após a retirada total de açúcares solúveis, os extratos de parede celular foram centrifugados (3200 rpm, 5 min.) e o precipitado insolúvel secado em estufa, a 60 °C.

2.7 Procedimento de pré-tratamento alcalino

Após a completa retirada dos açúcares solúveis, as amostras foram submetidas a um pré-tratamento alcalino, adaptado de Lima et al. (2014). Depois de seco, 200 mg de biomassa de cada órgão da planta foi pesado em tubos de vidro e adicionados 8 mL de NaOH 0,25M e acondicionados em banho seco a 130 °C por 40 minutos. Depois deste período reacional, as amostras foram colocadas em banho de gelo e, em seguida, centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e para total remoção da base foram realizadas quatro lavagens com álcool 80%. Em cada lavagem, o pH do sobrenadante foi medido até que estivesse entre 6-7. Por fim, as amostras foram centrifugadas (3200 rpm, 5 min.) e descartado o sobrenadante. O precipitado foi secado em estufa a 60 °C, para posterior determinação da digestibilidade enzimática.

2.8 Digestibilidade enzimática

Primeiramente foi determinada a atividade enzimática a fim de calcular a quantidade de enzima a ser aplicada. Para isso, foi adicionado em um tubo de ensaio 50 µL de xilano 1% e 50 µL do extrato enzimático de *Aspergillus niveus*, diluída 100 vezes, sendo incubado a 50 °C por 30 minutos. Após este período, a reação foi interrompida com 100 µL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) 1%, e imediatamente fervida a 100 °C por 5 minutos, acondicionado em banho de gelo, e adicionado 800 µL de água. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm.

Posteriormente, foi realizada a digestibilidade da biomassa através de adaptações do método proposto por Delabona et al. (2013) e Gonçalves et al. (2012). Para isso, foi pesado 0,015 g de biomassa seca em tubos eppendorf, e efetuada a ressuspensão em tampão acetato 50 mM pH 5,0. A seguir, foi adicionado 20 U/mL do extrato enzimático e a mistura incubada a 50 °C por 24 horas. Após este período, a suspensão foi homogeneizada. Então, 100 µL do sobrenadante foram retirados e analisados os

açúcares redutores liberados pelo método do ácido dinitrossalicílico (MILLER, 1959). A leitura foi realizada no espectrofotômetro a 540 nm. O teor de açúcares redutores liberados foi expresso por mg g^{-1} de resíduo insolúvel em etanol.

2.9 Análises estatísticas

Para testar a significância das diferenças observadas foi utilizado o programa estatística Prism[®] (GraphPad 6.0, USA). Os dados foram expressos como as médias dos experimentos \pm erro padrão das médias. As diferenças entre os parâmetros foram avaliadas pelo teste de comparação múltipla de Dunnett, e os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. Resultados e Discussão

3.1 Efeitos do ácido rosmarínico no crescimento das plantas, nos teores de lignina e sua composição monomérica

Das plantas crescidas em vasos foram escolhidos dois períodos de tempo (7 e 14 dias) para determinação das medidas de crescimento. Em relação às plantas de 7 dias (**Fig. 1**) houve um decréscimo de 47% no valor da biomassa seca do caule tratados com 1,5 mM de AR, enquanto os outros parâmetros de crescimento (comprimento e biomassa fresca) não foram afetados pelo tratamento. Já em relação às plantas de 14 dias os parâmetros biométricos - comprimentos, biomassas frescas e secas - (**Fig. 2**) dos diferentes órgãos (raiz, caule e folha) das plantas tratadas com 0,25; 0,75 e 1,5 mM de ácido rosmarínico não apresentaram mudança significativa em relação às plantas controle.

Para determinação do teor de lignina e composição monomérica foi utilizado somente o caule de plantas de 14 dias. É plausível que os dados de crescimento obtidos, tanto para plantas de 7 e de 14 dias, sejam resultantes da ausência de efeitos sobre o conteúdo de lignina (**Fig. 3**) das plantas tratadas com ácido rosmarínico (0,25 a 1,5 mM), já que este parâmetro também não apresentou diferença em relação às plantas controle. Sendo assim, é possível que o crescimento não tenha sido afetado com o tratamento devido à ausência de efeito do ácido rosmarínico sobre o conteúdo de lignina das plantas, haja vista que o processo de lignificação está intimamente relacionado com

o crescimento celular. E, conseqüentemente, a composição monomérica (H/G/S) do caule das plantas de milho de 14 dias não foi afetada pelo tratamento com ácido rosmarínico.

3.2 Efeitos do ácido rosmarínico na via de fenilpropanoides

As análises enzimáticas também foram realizadas utilizando o caule das plantas de 14 dias de crescimento. As duas enzimas analisadas (**Fig. 4**), PAL e TAL, não foram afetadas pelo tratamento com ácido rosmarínico, diferentemente do que aconteceu com as raízes tratadas por 24 horas em hidroponia, o que indica a diferença na sensibilidade de plantas cultivadas. Portanto, pode-se perceber que há grande diferença nos efeitos observados sob as plantas de milho quando estas são expostas a condições diferentes, como o tipo de órgão analisado, idade da planta e o tipo de sistema em que ela se desenvolveu. Assim, a via de fenilpropanoides não tendo sido afetada culminou na ausência de efeitos também sobre o processo de lignificação da planta.

3.3 Efeitos do ácido rosmarínico na digestibilidade enzimática

Nos ensaios de digestibilidade foram utilizadas plantas de 7 e 14 dias de idade, nos quais o caule e folhas foram utilizados para realização das análises. As amostras de cada órgão e em cada idade das plantas aqui utilizadas foram submetidas a incubação com extratos de xilanase por 24 horas.

Os resultados da digestibilidade do caule e folhas das plantas de 7 dias estão mostrados na **Fig. 5**. Como se nota, não houve efeito aparente sobre a digestibilidade do caule das plantas tratadas com ácido rosmarínico, quando comparadas com as plantas controle (**Fig. 5A**). No entanto, houve significativo aumento na hidrólise enzimática das amostras de folhas das plantas tratadas (**Fig. 5B**). Os tratamentos com ácido rosmarínico aumentaram de 99% (com 0,25 mM) a 113% (com 1,5 mM) a digestibilidade das folhas (**Fig. 5B**, interna).

Apesar de o tratamento com ácido rosmarínico não ter exercido efeito significativo sobre os parâmetros anteriormente descritos, houve um expressivo aumento na digestibilidade das plantas de milho com 14 dias, em comparação com plantas controle (**Fig. 5**). Todas as concentrações de ácido rosmarínico aplicadas culminaram em expressivo aumento da digestibilidade, no caule das plantas, em relação às plantas

controles (**Fig. 5C**). A menor concentração (0,25 mM) foi a que revelou maior aumento de digestibilidade, alcançando 82% em comparação com o controle. As plantas tratadas com ácido rosmarínico 0,75 e 1,5 mM revelaram aumentos de 76 e 56%, respectivamente, na digestibilidade (**Fig. 5C**, interna). Já, as folhas (**Fig. 5D**) não sofreram alterações significativas nas quantidades de açúcar liberado, quando comparadas às plantas controle.

De um modo geral, pode-se constatar um efeito positivo no que tange aos dados de digestibilidade de caule e folhas das plantas tratadas com ácido rosmarínico. Segundo Perera et al. (2012), a lignina tem sido relacionada com o rendimento de sacarificação, provocando, assim, as tentativas para modificar o conteúdo/ composição de lignina para melhorar a eficiência da digestibilidade da biomassa lignocelulósica. Sendo assim, apesar da ausência de efeitos sobre o conteúdo de lignina e monômeros das plantas analisadas no presente trabalho, o ácido rosmarínico influenciou positivamente no rendimento da sacarificação.

De acordo com Zhang et al. (2011) o conteúdo de lignina é o primeiro fator negativamente correlacionado com a degradabilidade da parede celular. No entanto, não é possível, até o momento, modificar geneticamente plantas com teores de lignina drasticamente reduzidos, haja vista a necessidade de se manter um grau mínimo de lignificação para garantir resistência à planta, transporte de seiva nos vasos, e proteção contra ataques de parasitas. Por isso, é necessário recorrer abordagens técnicas que permitam aumentar o potencial de melhoria da degradabilidade das gramíneas preservando performances agrônômicas aceitáveis. Por conseguinte, e no que tange aos dados obtidos neste trabalho, é de significativa importância o aumento da digestibilidade acompanhado da não interferência no crescimento e lignificação das plantas de milho. Desta forma, o presente trabalho demonstrou que as plantas tratadas com ácido rosmarínico não apresentaram desarranjos no seu crescimento e no conteúdo de lignina revelando, porém, um grande aumento na quantidade de açúcares liberados.

4. Conclusão

Como notado, o ácido rosmarínico não influenciou o crescimento e a lignificação das plantas de milho. Porém, exerceu efeito expressivo e positivo sobre a digestibilidade enzimática. Sendo assim, o ácido rosmarínico poderá ser utilizado como indutor da

digestibilidade da biomassa lignocelulósica na produção de biocombustíveis sem comprometer as performances agronômicas aceitáveis.

5. Referências

DELABONA, P.S.; COTA, J.; HOFFMAM, Z.B.; PAIXÃO, D.A.; FARINAS, C.S.; CAIRO, J.P.; LIMA, D.J.; SQUINA, F.M.; RULLER, R.; PRADELLA, J.G. Understanding the cellulolytic system of *Trichoderma harzianum* P49P11 and enhancing saccharification of pretreated sugarcane bagasse by supplementation with pectinase and α -L-arabinofuranosidase. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 500–507, 2013.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugar and Related Substances. **Analytic Chemistry**, 28(3), p. 350-356, 1956.

FERRARESE, Maria de Lourdes Lucio; FERRARESE-FILHO, Osvaldo; RODRIGUES, João Domingos. Ferulic acid uptake by soybean root in nutrient culture. **Acta Physiology Plantarum**, v. 22, p. 121-124, 2000.

FERRARESE, Maria de Lourdes Lucio; ZOTTIS, Anderson; FERRARESE-FILHO, Osvaldo. Protein-free lignin quantification in soybean (*Glycine max*) roots. **Biologia**, v. 57, n. 4, p. 541-543, 2002.

GONÇALVES, T.A.; DAMÁSIO, A.R.L.; SEGATO, F.; ALVAREZ, T.M.; BRAGATTO, J.; BRENELLI, L.B.; CITADINI, A.P.S.; MURAKAMI, M.T.; RULLER, R.; LEME, A.F.P.; PRADE, R.A.; SQUINA, F.M. Functional characterization and synergic action of fungal xylanase and arabinofuranosidase for production of xylooligosaccharides. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 293–299, 2012.

KHAN, Wajahatullah; PRITHIVIRAJ, Balakrishnan; SMITH, Donald L. Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. **Journal of Plant Physiology**, v. 160, p. 859-863, 2003.

LIMA, Marisa A.; GOMEZ, Leonardo D.; STEELE-KING, Clare G.; SIMISTER, Rachael; BERNARDINELLI, Oigres D.; CARVALHO, Marcelo A.; REZENDE, Camila A.; LABATE, Carlos A.; de AZEVEDO, Eduardo R.; MCQUEEN-MASON, Simon J.; POLIKARPOV, Igor. Evaluating the composition and processing potential of novel sources of Brazilian biomass for sustainable biorenewables production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1, 2014.

LI, Xu; WENG, Jing-Ke; CHAPPLE, Clint. Improvement of biomass through lignin modification. **The Plant Journal**, v. 54, p. 569-581, 2008.

MORRISON, I. M. A semi-micro method for the determination of lignin and its use in predicting the digestibility of forage crops. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 23, p. 455-463, 1972.

PERERA, Pradeep N.; SCHMIDT, Martin; CHIANG, Vincent L.; SCHUCK, P. James; ADAMS, Paul D. Raman-spectroscopy-based noninvasive microanalysis of native lignin structure. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 2, p. 983-987, 2012.

TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. Fisiologia vegetal 5ªed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2013.

TOBIMATSU, Yuki; ELUMALAI, Sasikumar; GRABBER, John H.; DAVIDSON, Christy L.; PAN, Xuejun; RALPH, John. Hydroxycinnamate Conjugates as Potential Monolignol Replacements: In vitro Lignification and Cell Wall Studies with Rosmarinic Acid. **ChemSusChem**, v. 5, p. 676-686, 2012.

RALPH, John. Hydroxycinnamates in lignification. **Phytochemical Reviews**, v. 9, p. 65-83, 2010.

SANTOS, Fernando A.; QUEIRÓZ, José H. de; COLODETTE, Jorge L.; FERNANDES, Sergio A.; GUIMARÃES, Valéria M.; REZENDE, Sebastião T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

VEGA-SÁNCHEZ, Miguel E.; RONALD, Pamela C. Genetic and biotechnological approaches for biofuel crop improvement. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 218–224, 2010.

ZANARDO, Daniele Iara Lucca; LIMA, Rogério Barbosa; FERRARESE, Maria de Lourdes Lucio; BUBNA, Gisele Adriana; FERRARESE-FILHO, Osvaldo. Soybean root growth inhibition and lignification induced by *p*-coumaric acid. **Environmental and Experimental Botany**, v. 66, p. 25-30, 2009.

ZHANG, Yu; CULHAOGLU, Tanya; POLLET, Brigitte; MELIN, Corinne; DENOUE, Dominique; BARRIÈRE, Yves; BAUMBERGER, Stéphanie; MÉCHIN, Valérie. Impact of Lignin Structure and Cell Wall Reticulation on Maize Cell Wall Degradability. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 59, p. 10129–10135, 2011.

Fig. 1. Efeitos do ácido rosmarínico no crescimento de plantas de milho de 7 dias. Comprimento do caule (**A**) e folha (**D**); Biomassa fresca do caule (**B**) e folha (**E**); Biomassa seca do caule (**C**) e folha (**F**). Valores médios \pm erro padrão da média (n = 3 a 4), seguidos por * são significativamente diferentes do controle de acordo com o teste de Dunnett ($p \leq 0,05$).

Fig. 2. Efeitos do ácido rosmarínico no crescimento de plantas de milho de 14 dias. Comprimento de raiz (**A**), caule (**D**) e folha (**G**); Biomassa fresca de raiz (**B**), caule (**E**) e folha (**H**); Biomassa seca de raiz (**C**), caule (**F**) e folha (**I**). Valores médios \pm erro padrão da média (n = 5), seguidos por * são significativamente diferentes do controle de acordo com o teste de Dunnett ($p \leq 0,05$).

Fig. 3. Efeitos do ácido rosmarínico no conteúdo de lignina (**A**) e composição monomérica (**B**, **C** e **D**) do caule de plantas de milho de 14 dias. Lignina referida como a soma de H+G+S (**E**) e razão S/G (**F**). Valores médios \pm erro padrão da média (n = 5), seguidos por * são significativamente diferentes do controle de acordo com o teste de Dunnett ($p \leq 0,05$).

Fig. 4. Atividades da fenilalanina amônia liase (**A**) e tirosina amônia liase (**B**) de caule de plantas de milho de 14 dias. Valores médios \pm erro padrão da média (n = 4), seguidos por * são significativamente diferentes do controle de acordo com o teste de Dunnett ($p \leq 0,05$).

Fig. 5. Digestibilidade do caule e folha de plantas de milho, avaliada pela ação da xilanase. Caule (**A**) e folha (**B**) de 7 dias (n = 3); caule (**C**) e folha (**D**) de 14 dias (n = 5). Valores médios \pm erro padrão da média seguidos por * são significativamente diferentes do controle de acordo com o teste de Dunnett ($p \leq 0,05$). Gráficos inseridos em **5B** e **5C** representam percentuais de aumentos da digestibilidade em relação ao controle (0 mM).

Fig. 1

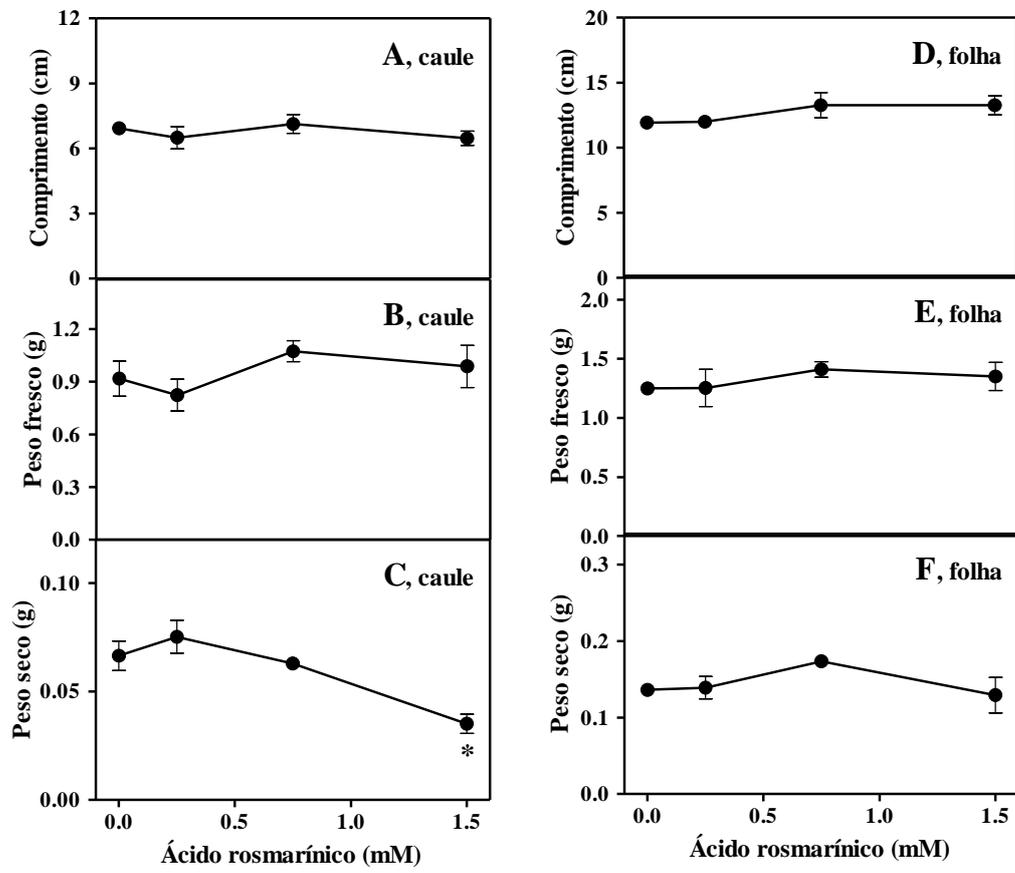


Fig. 2

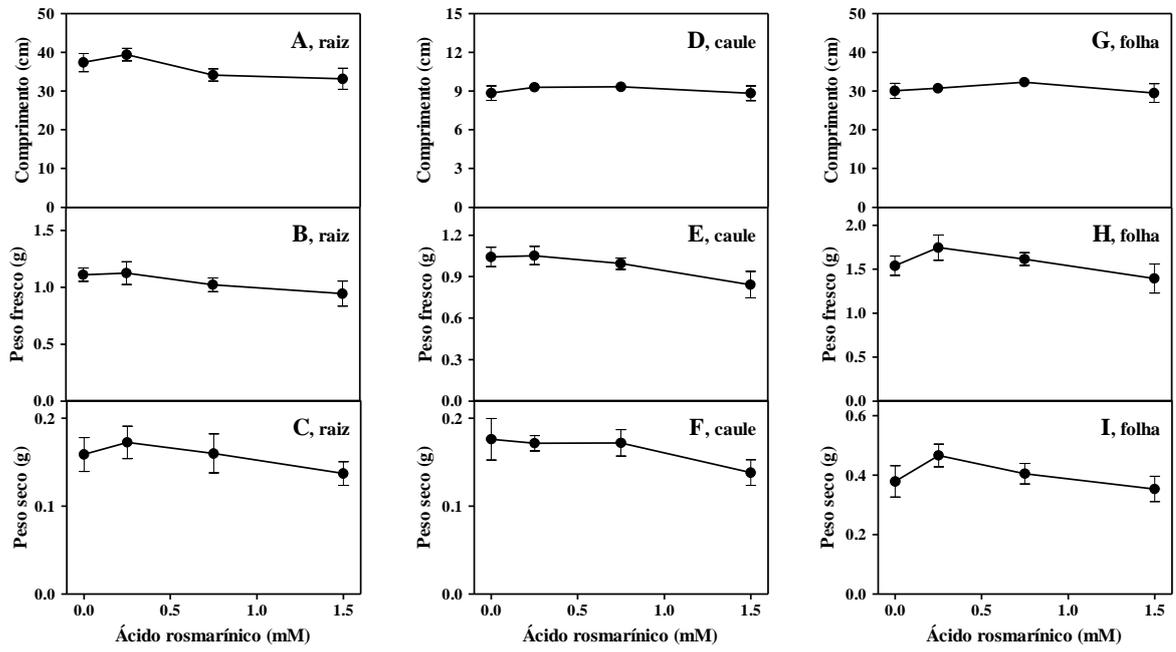


Fig. 3

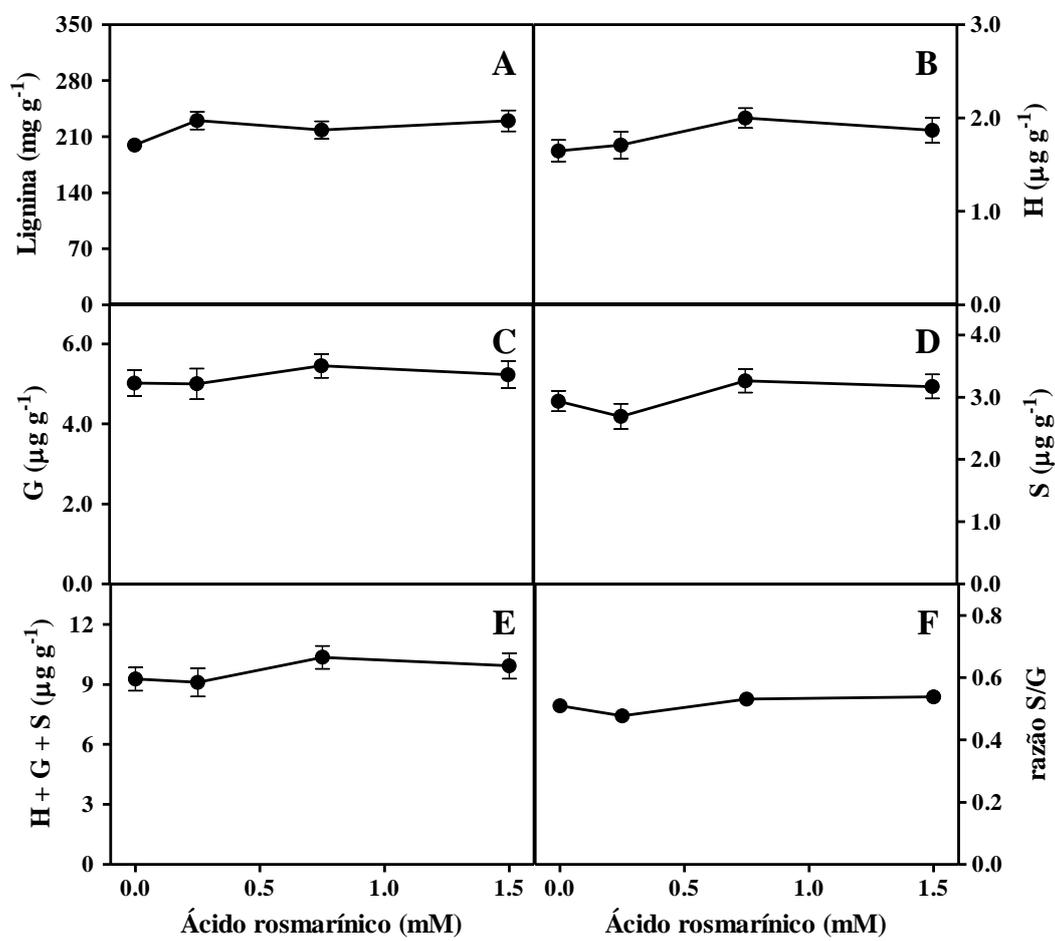


Fig. 4

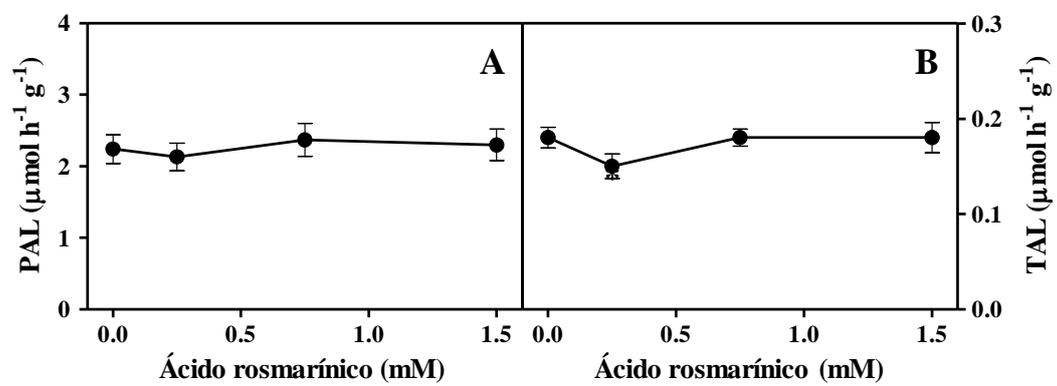


Fig. 5

