



COMPARAÇÃO ENTRE DOIS MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE LIGNINA EM BAGAÇO DE CANA E TEGUMENTO DE SOJA

Flavia Carolina Moreira¹; Adriana Gremes Ita¹, Hingrid Ariane da Silva¹; Wanderley Dantas dos Santos²

RESUMO: A lignina é o segundo polímero mais abundante na natureza. Entre outras características, proporciona ao tecido vegetal rigidez e resistência contra o ataque de enzimas hidrolíticas de fungos e patógenos. Graças a esta propriedade, a determinação do conteúdo de lignina tem se tornado progressivamente relevante para a agroindústria, onde a lignina determina desde a resistência de grãos ao dano mecânico até a viabilidade de biocombustíveis como o etanol celulósico. Para testar a acurácia das técnicas de determinação de lignina, comparamos os dois métodos mais comumente empregados de quantificação, a reação com ácido tioglicólico (TGA) e a reação com acetilbromida (AB). Os dois métodos foram utilizados para determinar o conteúdo de lignina no bagaço da cana-de-açúcar e no tegumento de soja. A composição monomérica da lignina nestas amostras foi determinada a fim de investigar se a composição dos monômeros pode interferir nos resultados. Os teores de lignina pelo método ácido tioglicólico são menores que o pelo método acetilbromida. A composição monomérica da lignina não explica as diferenças apresentadas pelos diferentes métodos.

PALAVRAS-CHAVE: acetilbromida; ácido tioglicólico; lignificação, monolignóis.

INTRODUÇÃO

A lignina é o segundo polímero mais abundante na natureza, depois apenas da celulose. Presente na parede secundária de tecidos especializados, a lignina fornece rigidez estrutural e resistência aos tecidos das plantas (Polle et al., 1994), dificultando a entrada de fitopatógenos e contribuindo para o controle do crescimento das células (Buchanan et al., 2000).

A lignina é formada pela ligação covalente entre monolignóis, álcoois fenilpropanílicos formados na via dos fenilpropanóides. Os monolignóis se polimerizam em reações promovidas por radicais livres produzidos por oxidases. Os principais monolignóis são os álcoois coniferílico, sinapílico e *p*-cumárico que após a polimerização são denominados resíduos guaiacil (G), siringil (S) e *p*-hidroxifenil (H) monolignóis.

A elevada heterogeneidade das ligações entre as subunidades de lignina e com os polissacarídeos da parede celular, dificulta sua purificação e caracterização (Carpita et al., 1993). Além disso, proteínas e outros compostos fenólicos podem interferir na determinação da lignina super ou sub-estimando os valores (Brinkmann et al., 2002).

¹ Mestrandas do curso de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná. Bolsistas CAPES. flacmoreira@gmail.com, hingrid_ariane@hotmail.com, dri_gremes@hotmail.com

² Co-Orientador, Professor Doutor do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá – UEM. wandsantos2@uem.br

A determinação química da lignina tem sérios percalços, e muitas vezes, os resultados são mascarados por artefatos de técnica (Fukushima & Haltfield, 2005). Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi comparar dois métodos de determinação de lignina: o ácido tioglicólico e o acetilbromida e a composição monomérica deste polímero em bagaço de cana-de-açúcar e em tegumento de soja. A fim de verificar eventuais discrepâncias nos resultados examinar se a composição dos monômeros pode interferir nos resultados.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no laboratório de Bioquímica Vegetal da Universidade Estadual de Maringá. O bagaço de cana-de-açúcar, proveniente da Usina da Pedra (SP), foi seco e moído em peneira de 2mm e o cultivar de soja utilizado foi BRS 202. Para separar o tegumento dos cotilédones, as sementes foram imersas em água destilada por aproximadamente 12 horas. Logo após, os tegumentos foram secos e triturados em moinho de esferas.

A determinação da lignina foi efetuada pelos dois métodos espectrofotométricos: acetilbromida (AB) e ácido tioglicólico (TGA), que constituíram os tratamentos. Para tais análises, inicialmente foram obtidas as paredes celulares isentas de proteínas, conforme a metodologia proposta por Ferrarese et al., 2002.

Para a determinação da lignina pelo método acetilbromida, 20mg da parede celular do tegumento de soja e do bagaço de cana foram colocadas em tubos de vidro com rosca. Posteriormente, foram adicionados 0,5 ml do reagente acetilbromida 25% , preparado em ácido acético. Os tubos foram tampados, agitados e levados ao banho-maria por 30 minutos a 70° C. Em seguida, as amostras foram resfriadas em banho de gelo e adicionou-se 0,9 ml de NaOH 2M, 0,1 ml de hidroxilamina -HCl 7,5M e 2 ml de ácido acético. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 2400 RPM. O sobrenadante foi diluído em ácido acético e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 280 nm. A concentração de lignina foi determinada de acordo com uma curva padrão e foi expressa em mg lignina g⁻¹ de parede celular.

Para a determinação de lignina pelo método do ácido tioglicólico, as amostras de parede celular (0,1g), do tegumento e do bagaço de cana foram acondicionadas em tubos de centrifuga, juntamente com a mistura reativa de 1,2 ml de ácido tioglicólico e 6 ml de HCl 2 M, sendo aquecido por 4 horas a 95°C, em banho maria. Após a reação, o material foi centrifugado a 1.500 g por 5 minutos. O precipitado foi lavado três vezes com água destilada e o produto da reação, o ácido lignotioglicólico, foi extraído com 7,0 ml de NaOH 0,5 M, a 30°C, por 18 horas, em banho-maria com agitação de 115 oscilações min⁻¹. A mistura resultante foi centrifugada a 1.500 g, durante 5 minutos, e o sobrenadante guardado. O precipitado obtido anteriormente foi lavado novamente com 3,0 ml de NaOH 0,5 M, centrifugado e o sobrenadante adicionado ao anterior. O sobrenadante foi acidificado com 1,8 ml de HCl concentrado e mantido em geladeira, por 12 horas, para precipitar o LTGA. Após este período, o material foi centrifugado e o precipitado lavado por duas vezes com água destilada, eliminando-se o sobrenadante. O LTGA obtido foi acondicionado em estufa, a 60°C, durante 24 horas. A determinação do LTGA foi efetuada em espectrofotômetro a 280 nm.

Para determinar a composição monomérica da lignina foi usada a oxidação com nitrobenzeno. Uma fração da parede celular, do tegumento ou do bagaço de cana, livre de proteínas (50 mg) foi colocada em uma ampola contendo 1 ml de NaOH 2 M e 100 µl de nitrobenzeno. A ampola foi selada e aquecida a 170°C por 2,5 h, com agitação na metade do tempo de reação. Após oxidação, a amostra foi resfriada, lavada duas vezes com clorofórmio, acidificada com HCl 5 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 0,45 µm e analisadas por HPLC. A fase móvel foi metanol/ácido acético 4% em água (20/80, v/v), com fluxo de 1,2 ml min⁻¹. As quantificações de *p*-hidroxibenzaldeído (monômero H) vanilina (monômero G) e siringaldeído (monômero S) foram realizadas a 290 nm utilizando os padrões correspondentes. Os resultados foram expressos como µg monômero mg⁻¹ de parede celular.

Os dados foram expressos com a média de dois experimentos independentes, com 3 repetições cada, totalizando 6 repetições por tratamento. Os dados de lignina foram avaliados pelo teste F e a composição monomérica pelo teste Tukey, ambos à 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A determinação de lignina pelo método ácido tioglicólico apresentou valores menores em relação ao método acetilbromida, tanto para o bagaço de cana-de-açúcar quanto para o tegumento de soja (Figura1).

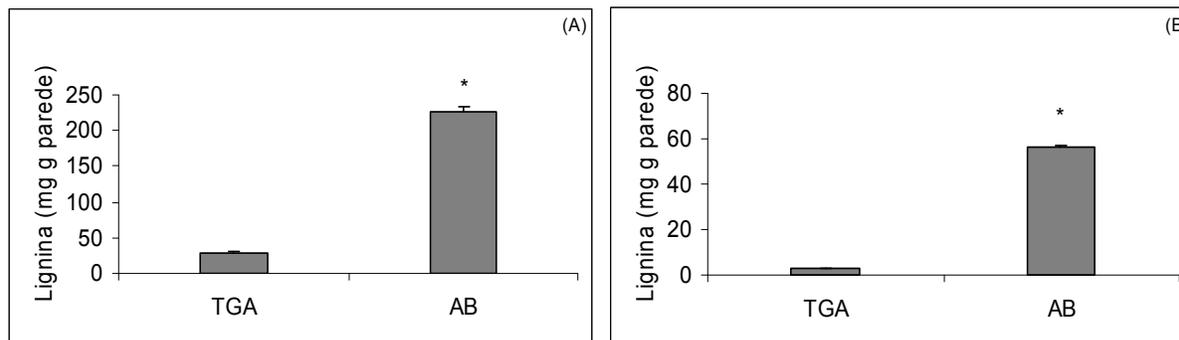


Figura1. Determinação de lignina pelo método do TGA: ácido tioglicólico e AB: acetilbromida (AB) em bagaço de cana-de-açúcar (A) e em tegumento de soja (B). *Médias diferem entre si pelo teste F à 5% de probabilidade.

A derivatização da lignina com o ácido tioglicólico desloca as ligações covalentes da lignina da parede celular permitindo que ela seja extraída por solução alcalina. A acidificação do extrato alcalino precipita o LTGA. A formação de derivados de tiolignoglicolato é considerada um critério para a lignina “genuína”. No entanto, devido a esta alta especificidade às propriedades da lignina, este método também está propenso a subestimar os teores de lignina total.

Em contraste, o método acetilbromida é mais vulnerável à superestimar a concentração de lignina, pois a incubação das paredes celulares com este composto pode levar a alguma degradação oxidativa dos polissacarídeos estruturais, especialmente as xilanas, resultando em aumento da absorvância à 280 nm.

Os monolignóis do bagaço de cana-de-açúcar apresentam valores maiores que os monolignóis do tegumento de soja (Tabela 1). Os monômeros S e G prevalecem no bagaço embora as concentrações do monômero H seja relativamente alta (c. 25%). Já nos tegumento de soja, os monômeros G e H predominam, enquanto o monômero H responde por pouco mais de 10% do total.

Levando em consideração estes resultados, é possível observar que mesmo variando a concentração dos monolignóis, o teor de lignina determinado pelo método TGA tanto para o bagaço de cana quanto para o tegumento de soja, apresenta valores inferiores aos do método AB.

Tabela 1. Valores médios da composição monomérica de lignina em bagaço de cana-de-açúcar e tegumento de soja

Amostra	Monômero (mg g ⁻¹ de parede celular)			
	H	G	S	H+G+S
Bagaço de cana	4,352 ± 0,193 b	5,748 ± 0,358 a	6,228 ± 0,272 a	16,328 ± 0,764
Tegumento	0,219 ± 0,017 a	0,236 ± 0,008 a	0,062 ± 0,002 b	0,517 ± 0,017

H: *p*-hidroxifenil; G: guaiacil; S: siringil.

Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey à 5% de probabilidade.

CONCLUSÃO

Os teores de lignina determinados pelo método baseado em reação com ácido tioglicólico são menores que os teores determinados por reação com acetil bromida. A diferença na proporção dos monômeros das ligninas oriundas dos diferentes tecidos não pode ser correlacionada com a diferença entre os métodos.

REFERÊNCIAS

BRINKMANN, K., BLASCHKE, L., POLLE, A. Comparison of different methods for lignin determination as a basis for calibration of near-infrared reflectance spectroscopy and implications of Lignoproteins. **J Chem Ecol**, 28:2483-2501, 2002.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; RUSSELL, J.L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**, p.1158-1203, 2000.

CARPITA, N.C. AND GIBEAUT, D.M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of the molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant J**. 3:1–30, 1993

FERRARESE, M.L.L., ZOTTIS, A., AND FERRARESE-FILHO, O. Protein-free lignin quantification in soybean (*Glycine max*) roots. **Biologia**. 57:541-543, 2002.

HATFIELD, R.D.; FUKUSHIMA, R.S. Can lignin be accurately measured? **Crop Science**, v.45, p.832-838, 2005.

POLLE, A.; OTTER, T.; SEIFERT, F. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). **Plant Physiology**, v.106, p.53-60, 1994.