



## RECALCITRÂNCIA DA PAREDE CELULAR DE ESPÉCIES DE BAMBU GIGANTE COMO POSSÍVEIS FONTES DE BIOCOMBUSTÍVEIS

Vitor da Rosa Vellini<sup>1</sup>, Gabriela Ellen Barreto<sup>2</sup>, Thatiane Rodrigues Mota<sup>2</sup>, Wanderley Dantas dos Santos<sup>3</sup>, Graciene Souza Bido<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico do Curso de Agronomia, UNICESUMAR, Maringá-Pr. Programa de Iniciação Científica UniCesumar (PIC)

<sup>2</sup>Doutoranda de Pós Praduação em Ciências Biológicas-PBC/UEM-Universidade Estadual de Maringá

<sup>3</sup>Co-Orientador, Doutor e Docente da UEM

<sup>4</sup>Orientadora, Doutora e Docente da UNICESUMAR

### RESUMO

Algumas espécies de bambu têm se destacado como um significativo recurso natural renovável, principalmente em países do oriente médio e africanos. Podem ser utilizados como matéria-prima para usos domésticos, rurais e industriais. Devido ao aumento da demanda energética no mundo, pesquisas por fontes renováveis de energia, principalmente etanol, têm atraído a atenção de todos. Por esse motivo, os materiais de origem lignocelulolítica tem sido aproveitados visando a utilização nos processos para a renovação energética. Esses materiais são ricos em sacarídeos, alguns muito complexos. A conversão dessas moléculas é vista como uma alternativa viável na substituição dos combustíveis fósseis. No entanto, existem fatores que limitam a extração dos carboidratos que vão dar origem aos biocombustíveis, dentre eles destaca-se a lignina, um constituinte da parede celular secundária. Assim, este estudo visa analisar duas espécies de bambu gigante - *Dendrocalamus asper* e *Bambusa vulgaris* - indicando quais delas podem ser destinadas à produção bioenergética. A metodologia empregada baseou-se no fracionamento da parede celular com sucessivas extrações de compostos interferentes, seguida da quantificação do teor de lignina pelo método de brometo de acetila. Os resultados obtidos indicam que a espécie *Bambusa vulgaris* com 1 ano de cultivo apresentou menor recalctrância da parede celular avaliada pelo seu menor conteúdo de lignina. Isso sugere um possível potencial para a produção de fontes renováveis de energia, entre elas o etanol.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bioenergia; Gramíneas; Lignina.

### 1. INTRODUÇÃO

O bambu pertence à família Poaceae, um grupo bem sucedido de monocotiledôneas que responde a ¼ da cobertura verde do planeta. (Carpita, 1996). Tem sido destacado a importância do Bambu como um recurso natural renovável, principalmente em países africanos e do oriente médio. É notável a utilização de seus colmos para a geração de bioenergia, carvão, na alimentação humana e de animais, briquetes, além de outros (Brito, 1987).

O Brasil utiliza larga escala da biomassa para o atendimento de suas necessidades energéticas. Os materiais de origem lignocelulósica provenientes de atividades agrícolas como o bagaço da cana-de-açúcar, palha, bambu, restos de culturas de grãos e frutíferas, tem sido aproveitados visando à utilização nos processos para a renovação energética. Esses materiais são ricos em sacarídeos, alguns destes muito complexos. A conversão dessas moléculas é vista como uma alternativa viável na substituição dos combustíveis fósseis. Devido a isso, intensos estudos estão sendo realizados para entender o



complexo processo de degradação desses compostos a fim de serem utilizados para fins práticos. (Aguiar-filho, 2008).

A literatura relata os diversos fatores que limitam a extração dos carboidratos que dão origem aos biocombustíveis. A parede celular das plantas consiste em uma malha lignocelulósica que varia quanto a sua composição em polímeros de acordo com a espécie analisada, a idade e fase de crescimento (Jeffries, 1994). Quando observa-se a maior deposição da lignina na parede celular, nota-se maior dificuldade na extração e obtenção dos carboidratos de interesse, afetando diretamente a produção do biocombustível (Deetz, 1993).

Para a produção do bioetanol de segunda geração, o processo inicia com a biomassa sendo submetida a um pré-tratamento para desestruturar o complexo lignina-carboidratos. Em seguida, são utilizados coquetéis enzimáticos para hidrolisar a biomassa lignocelulósica. Esses coquetéis são constituídos de hemicelulases, celulases e enzimas acessórias, que degradam e desestruturam o complexo. Com base no papel estrutural exercido pela lignina na parede celular, acredita-se que a presença deste composto é um dos fatores limitantes para a obtenção dos carboidratos destinados para a produção do bioetanol de segunda geração (Chen; Dixon, 2007).

Portanto, neste trabalho foi investigado o conteúdo de lignina na parede celular de duas espécies de bambu gigante *Dendrocalamus asper* e *Bambusa vulgaris*, sua recalcitrância da parede celular, visando compará-las e definir quais delas podem ser utilizadas em melhor excelência para a geração de bioenergia, na construção civil, e até mesmo na produção de carvão.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Colmos das espécies *Dendrocalamus asper* e *Bambusa vulgaris* com um e três anos de idade foram fornecidos por um produtor de Bambu da região de Maringá.

O material biológico foi dividido em partes menores e mantido em estufa a 60°C para obtenção de massa seca. Após a secagem, os colmos foram triturados e macerados através de um moinho faca e bola respectivamente, presentes no Laboratório de Bioquímica Vegetal – BIOPLAN, na Universidade Estadual de Maringá – UEM.

### 2.1 LAVAGEM DA PAREDE CELULAR PARA A OBTENÇÃO DA BIOMASSA ISENTA DE PROTEÍNAS E RETIRADA DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Amostras de 0,3g de biomassa seca foram lavadas exaustivamente para a retirada de interferentes como proteínas solúveis, compostos fenólicos e proteínas hidrofóbicas. A lavagem da parede celular foi realizada 3 vezes com Triton x-100 em tampão sódio e potássio 50 mM pH 7,0 por um minuto, sendo centrifugadas a 3300 RPM por 7 min a cada lavagem e o sobrenadante foi desprezado.

Sequencialmente realizou-se a extração com NaCl 1M em tampão sódio potássio 50 mM pH 7,0 (7mL) e o homegeinizado foi centrifugada a 3300 RPM por 7 min sendo o sobrenadante descartado. Esse procedimento foi repetido por mais 3 vezes. Após a lavagem com NaCl, 7 mL de água deionizada foi adicionada na biomassa, homegeinizada e centrifugada a 3300 RPM por 7 min e o sobrenadante descartado, esse procedimento foi realizado por mais uma vez.

Por fim, adicionou-se 5 mL da acetona PA nas amostras, homegeinizou-se e realizou a centrifugação por 3300 RPM por 7 min e o sobrenadante foi descartado. Esse procedimento foi realizado por mais uma vez. Por fim, as amostras foram



descompactadas a vácuo. Após esse procedimento as amostras foram colocadas em estufa a 60 °C por no mínimo 24 horas. A biomassa seca obtida foi definida como a fração da parede celular livre de proteínas (Ferrarese *et al.*, 2002).

Da parede celular isenta de proteínas pesou-se 100 mg em tubos de centrífuga e adicionou-se 4 ml de metanol 50 % para a homogeneização. As amostras foram incubadas em banho seco a 80 °C por 90 min. Após esse período as amostras foram inseridas em banho de gelo para interromper a extração. Posteriormente, foram centrifugadas a 3300 RPM por 7 min e o sobrenadante contendo compostos fenólicos solúveis foi descartado. Adicionou-se mais 2 ml de metanol 50 %, homogeneizou-se e as amostras foram centrifugadas novamente a 3300 RPM por 7min, sendo o sobrenadante descartado. As amostras foram colocadas em estufa a 60 °C por 24 horas. Após esse período adicionou-se 5 ml de NaOH 0,5 M e incubou-se as amostras em banho seco a 96 °C por 2 horas (saponificação – hidrólise alcalina). Após esse período as amostras foram inseridas em banho de gelo, centrifugadas a 3300 RPM por 7 min e o sobrenadante contendo os compostos fenólicos esterificados na parede celular foi descartado (Ascensão *et al.*, 2003).

## 2.2 QUANTIFICAÇÃO DA LIGNINA PELO MÉTODO DE BROMETO DE ACETILA

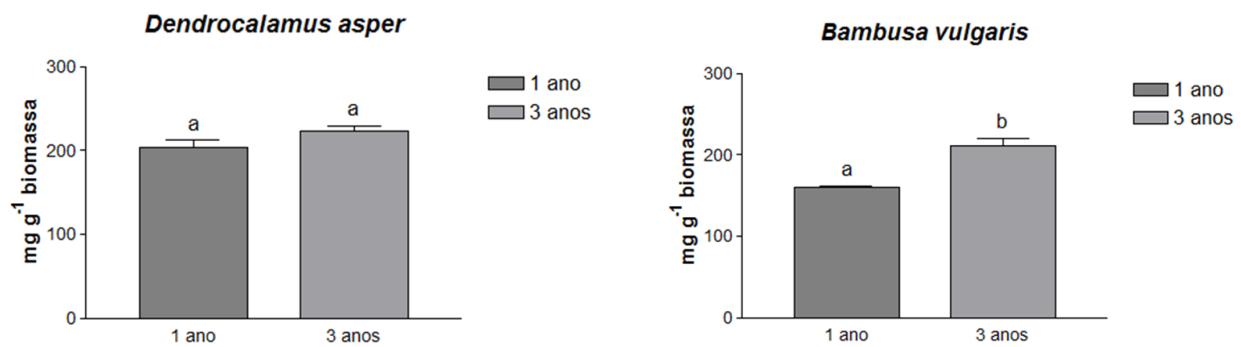
Foi pesado 20 mg da fração da parede celular livre de proteínas em tubo de vidro com rosca contendo 0,5 mL de brometo de acetila 25% (v/v em ácido acético) e incubado a 70 °C e banho maria por 30 min. Após completa digestão, as amostras foram transferidas para banho de gelo e a reação foi interrompida com adição de 0,9 mL de NaOH 2 M. A seguir, foram adicionados 0,1 mL de hidroxilamina-HCl 7,5 M e 6 mL de ácido acético gelado para a solubilização da lignina. As amostras foram então centrifugadas (3300 RPM por 5 min) e o sobrenadante diluído foi utilizado para as leituras em espectrofotômetro (280 nm). A concentração de lignina foi por fim determinada de acordo com uma curva padrão e os resultados expressos em mg lignina g<sup>-1</sup> de parede celular isenta de proteínas (Moreira-Vilar *et al.*, 2014).

## 2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram feitas 4 repetições de cada variável e os dados foram avaliados por análise de variância e as médias entre tratamentos comparadas pelo teste t a 5% de significância, utilizando o software Prisma 6.07.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na espécie *Dendrocalamus asper* não mostraram diferenças estatisticamente significativas quando comparados os teores de lignina entre os colmos de bambus da mesma espécie com diferentes idades. Em contrapartida, houve diferenças estatisticamente significativas na espécie de *Bambusa vulgaris* entre colmos de bambu com diferentes idades (gráfico 1). Em outra visão, correlacionando esses dados com a produção bioenergética, e tendo de informação que o resultado obtido foi em miligramas de lignina, por grama de biomassa, pode-se dizer que a espécie de *Bambusa vulgaris* com idade de 1 ano pode apresentar potencial para a produção de etanol, visto seu menor conteúdo de lignina quando comparada com a mesma espécie com 3 anos.



**Gráfico 1.** Teor de lignina em colmos de 1 e 3 anos das espécies *Dendrocalamus asper* e *Bambusa vulgaris* de bambu gigante. Os dados foram comparados pelo teste t. Letras diferentes indicam diferença significativa.

A lignina envolve as microfibrilas celulósicas, conferindo proteção à degradação química e/ou biológica, e pode formar ligações covalentes com hemiceluloses (Chiang, 2006). Portanto, altos teores de lignina podem dificultar a obtenção de polissacarídeos presentes na parede celular, indicando que, a recalcitrância desse material lignocelulósico é grande, impedindo bons rendimentos na obtenção de carboidratos, que são a matéria prima para a síntese do etanol (Costa; 2012).

Um agravante para a recalcitrância dos materiais lignocelulósicos está relacionado à diversidade dos tipos de células existentes nestes materiais. A espessura da parede celular e as dimensões das células variam significativamente dependendo se são células de vasos, fibras ou células do parênquima. (Sanjuan *et al.*; 2001; Siqueira *et al.*; 2011). Com isso, é possível deduzir que além da idade dos colmos, a região tecidual de retirada dos mesmos pode ter contribuído com os resultados obtidos.

#### 4 CONCLUSÃO

Os resultados indicam que a espécie *Dendrocalamus asper* apresenta alta recalcitrância mesmo quando em estádios iniciais de desenvolvimento, pois o teor de lignina possui relação direta com a recalcitrância da parede celular. No entanto, a espécie *Bambusa vulgaris* apresentou resultados interessantes quanto à idade. Estes sugerem que a cultivar mais jovem possui menor recalcitrância por ter menor deposição de lignina.

Portanto, os dados obtidos apontam que a espécie *Bambusa vulgaris* pode apresentar potencial para a produção de bioenergia. Todavia, para afirmar o real potencial da espécie estudada, análises laboratoriais futuras serão realizadas, como por exemplo, separação e quantificação de hemiceluloses por cromatografia de troca iônica, e digestibilidade enzimática.

#### REFERÊNCIAS

AGUIAR-FILHO, J.M.M. **Análise Enzimática de Fungos Lignocelulolíticos Cultivados em Vinhaça e Bagaço de Cana-de-Açúcar.** p.16, 2008.

ASCENSÃO, Ana R. F. D. DUBERY, A. **Soluble and wall-bound phenolics and phenolic polymers in *Musa acuminata* roots exposed to elicitors from *Fusarium axyporum* f.sp. cubense.** Phytochemistry, v. 63, p. 679-686, 2003.



BRITO, J.O.; Salgado, A.L.B. **Produção e Caracterização do Carvão vegetal de Espécies e Variedades de Bambu.** IPEF. n36, p.13-17, ago 1987.

CARPITA, N. C. **Structure and biogenesis of the cell walls of grasses.** Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology, Palo Alto, v. 47, p. 455-176, 1996.

CHEN, F.; Dixon, R.A. **Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production.** Nature Biotechnology, New York, v.25, p.759-761, 2007.

CHIANG, V.L. **Monolignol biosynthesis and genetic engineering of ligninin trees, a review.** Environmental Chemistry Letters. 4, 143–146s, 2006.

DEETZ, S. **Describing differences in approaches to organization science: Rethinking Burrell and Morgan and their legacy**". Organization Science, (7:2), 1993, pp. 191–207.

FERRARESE, M.L.L.; Zottis, A.; Ferrarese-Filho, O. **Protein-free lignin quantification in soybean (*Glycine max (L.)* roots.** Biologia (Section Botany) 57: 541-543, 2002.

JEFFRIES, M. **Invertebrate communities and turnover in wetland ponds affected by drought.** Freshwater Biology, 32(3):603–612, 1994.

MOREIRA-VILAR F.L.; Siqueira-Soares R.C.; Finger-Teixeira A.; Oliveira D.M.; Ferro A.P.; Rocha G.J.; Ferrarese M.L.; Santos W.D.; Ferrarese-Filho O. **The Acetyl Bromide Method Is Faster, Simpler and Presents Best Recovery of Lignin in Different Herbaceous Tissues than Klason and Thioglycolic Acid Methods.** 2014.

SANJÚAN, R.; Anzaldo, J.; Turrado, J.; Patt, R. **Morphological and chemical composition of pith and fibers from mexican sugar cane bagasse.** Holz Roh Werkst, v59, p.447-450, 2001.

SIQUEIRA, G.; Milagre, A. M. F.; Carvalho, W.; Koch, G.; Ferraz, A. **Topochemical distribution of lignin and hydroxycinnamic acids in sugar-cane cell walls and its correlation with the enzymatic hydrolysis of polysaccharides.** Biotechnol Biofuels, v.4, n.7, 2011.