Silva Lusitana ***11****(2): 217 - 225, 2003*
© EFN, Lisboa. Portugal

Proposta de Modificação da Biossíntese da Lignina como Estratégia para Correcção de Defeitos em Madeiras

Heber Abreu*, Jorge Maêda*, João Latorraca*, Regina Pereira, Mª Beatriz Monteiro**, Fábio Abreu*** e Jair Carmo****

* Professor Adjunto
** Engenheira Florestal
*** Académico de Engenharia Florestal
Departamento de Produtos Florestais, Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, CEP 23851-070 BRASIL
** Engenheiro Florestal
SENAI – Departamento Regional de Mato Grosso, BRASIL

Sumário. A lignina corresponde a cerca de 15 a 35% do peso seco da madeira e assume papel importante na estrutura da parede celular, e pode ser modificada facilmente através da engenharia genética, ou por outra técnica que confira modificações sobre as actividades das enzimas PAL, 4CL, C4H, C3H, OMT, F5H, CCR, CAD, que regulam as reacções da etapa que antecede a polimerização da lignina. Através destas, as plantas transformam lignina siringílica que é mais frágil estruturalmente (IFM maior), em lignina guaiacílica, a qual se mostra estruturalmente muito mais ramificada e rígida (IFM menor). A interferência no controle biossintético da lignina a nível da organização estrutural via técnicas biomoleculares pode resolver possivelmente alguns problemas congénitos de algumas espécies madeireiras de interesse comercial, como é o caso do Eucalipto que apresenta rachaduras após a colheita. Considerando que a resistência da parede celular depende da natureza estrutural da lignina, a biossíntese de ligninas modificadas em termos da definição da arquitectura molecular dentro da parede celular abre novas perspectivas em busca de soluções para maior aplicabilidade da madeira na indústria. Desta forma, o objectivo deste artigo foi propor soluções para alguns defeitos naturais da madeira modificando a rota biossintética da lignina Guaiacílica/Siringílica à lignina Cumarílica/Guaiacílica, com base em técnicas de bioquímica e engenharia genética.
Palavras-chave: lignina; biossíntese; biotecnologia; enzimas

Abstract. Lignin, which corresponds to approximately 15 to 35% of the dry weight of the wood, works as a binding agent for cell wall, and could easily be modified by genetic engineering or by other experimental techniques, affecting the activity of the PAL, 4CL, C4H, C3H, OMT, F5H, CCR, CAD enzymes, which mediate reactions before lignin polymerization. Such techniques will allow plants to change syringyl lignin, which is more fragile (IMF higher), into guaiacyl lignin, which is much more rigid (IMF lower). This opens new perspectives for the control of cracks as observed in *Eucalyptus* wood after harvest. Considering that the strength of the cell wall depends on the structural lignin organization, the biosynthesis of modified lignin in terms of molecular architecture within the cell wall opens up new possibilities in the search for solutions for greater applications of wood in industry. In this way, the scope of this article is to propose solution to solve some natural wood defects, suggesting changes in the biochemical lignin pathway which transforms Guaiacyl/Syringyl lignin into Coumaryl/Guaiacyl lignin.
Key words: lignin; biosynthesis; biotechnology; enzymes

1º Autor E-mail: abreu@ufrrj.br

Résumé. La lignine représente environ 15 à 35% du poids sec du bois et est très importante dans la structure de la paroi cellulaire. Elle pourrait être facilement modifiée grâce à la génétique ou par d'autres techniques expérimentales, affectant l'activité de PAL, 4CL, C4H, C3H, OMT, F5H, CCR, DAO, qui règlent les réactions avant polymérisation de la lignine. Grâce à celles-ci la plante transforme la lignine de syringil, qui est plus fragile (IFM plus élevé), lignine de guayacil, qui est beaucoup plus rigide (IFM plus bas). Ce travail peut résoudre le problème de quelques espèces à bois d'intérêt commercial, comme c'est le cas pour l'eucalyptus qui présente des fentes après récolte. Considérant que la résistance de la paroi cellulaire dépend de la nature structurale des lignines, la biosynthèse de lignines modifiées ouvre de nouvelles perspectives pour obtenir des solutions de meilleure applicabilité dans l'industrie du bois, basée sur la définition structurale de l'architecture de la paroi cellulaire. De cette façon, l'objectif de cet article est de proposer des solutions pour quelques défauts naturels du bois en transformant le chemin biosynthétique de la lignine, avec comme base des techniques de biochimie et du génie génétique, transformant le Guayacil/Syringil en lignine de Coumaril/Guayacil.
Mots clés: lignine; biosynthèse; biotechnologie; enzymes

Introdução

A utilização da madeira confunde-se com a própria história da humanidade. Desde eras remotas o homem utiliza a madeira para fabricar ferramentas, utensílios domésticos, armas e instrumentos de trabalho (ALBUQUERQUE, 1999). Das árvores também se extraem materiais resinosos que se aplicam a diversas finalidades (HILLIS, 1987). Durante a evolução do homem, concomitante ao desenvolvimento científico e tecnológico associado à utilização da madeira, inúmeros produtos tornaram-se disponíveis aos mais variados sectores da vida moderna (indústria química, de celulose e papel, de cosméticos, farmacêutica, construção civil, entre outras).

A utilização da madeira na construção civil, residencial ou comercial, é considerada sinónimo de conforto, bem estar e praticidade, devido às suas propriedades estética-físico-químicas atenuantes. Algumas espécies, principalmente de crescimento rápido como eucalipto e pinus, apresentam determinados obstáculos quanto as suas utilizações, o que justifica investimentos em busca de soluções capazes de optimizar tecnologicamente a utilização no mais amplo espectro do mercado consumidor.

A produção vegetal vem sofrendo desde o início do século passado, uma transformação revolucionária, iniciada com os trabalhos de Haberlandt em 1902 (TORRES *at al.*, 1998), com a cultura de células somáticas de diferentes espécies vegetais, em meios de cultura. A partir de então, inúmeros trabalhos, em diferentes frentes da biotecnologia vegetal, vêm ampliando as possibilidades de obtenção de resultados altamente tecnificados, tais como o cultivo de plantas transgênicas, inoculadas, sementes artificiais de origem somática, dentre outros, com significativas vantagens para o produtor, uma vez que uma das metas das pesquisas é a diminuição de consumo de insumos nos sistemas produtivos.

Toda base para a implementação dos avanços almejados desta tecnologia emergente se baseia na identificação dos genes, contidos na molécula de DNA, que servem para ordenar a fabricação das proteínas, que podem ser metaforizados como "tijolos da vida", denominados

como os aminoácidos. As sequências dos genes em número de apenas 20, combinados em sequências diferentes, formam todas as proteínas usadas pelos seres vivos, da bactéria ao ser humano, para executar tarefas vitais. Entre os quais a lignina exerce papel importante na vida das árvores.

Numa visão simplista, nos cromossomas das células, cada gene codifica uma proteína particular, a qual contribui para a organização da própria estrutura celular e do indivíduo como um todo (HIGUCHI, 1997). Neste contexto, o sistema de lignificação estrategicamente estabelece fenotipicamente as características morfológicas de uma árvore, sob interferência de vários factores externos de indução controlada ou por engenharia genética (BOUDET e GRIMA-PETTENATI, 1996).

O sector florestal, especialmente o madeireiro, por não estar envolvido directamente na produção de alimentos, não deverá estar sujeito à reacção popular que se opõe à transformação genética. Por esta razão, espera-se que, o que ainda hoje é incipiente em termos de aplicação de técnicas modernas de biotecnologia, passe a ser incorporado em escala na produção de madeira.

Contribuição do sistema enzimático na via dos fenilpropanóides

Em termos de qualidade da madeira para celulose, o maior obstáculo para a obtenção da polpa celulósica é a separação da lignina nela presente, que requer grande quantidade de produtos químicos para a sua remoção. PILATE *et al*. (2002) demonstra que, em ambientes geográficos diferentes, espécies do género *Populus*, com as enzimas cinamil álcool desidrogenase (CAD) (EC 1.1.1.195), ou cafeato/5-hidroxiferulato O-metiltransferase (OMT), com actividades atenuadas por técnica de transgenia antisense, mantiveram-se saudáveis, sem alterar a microbiologia do solo e a fauna, com indicadores de crescimentos normais, portanto apresentando todos parâmetros ambientais inalterados. As respostas esperadas para as ligninas foram alcançadas, permitindo a obtenção mais fácil de uma polpa celulósica de alta qualidade e usando menor quantidade de produtos químicos. Por estes resultados, os autores concluem que a engenharia genética apresenta potencial para a melhoria da qualidade de madeira sem afectar o meio ambiente. Neste sentido, se a lignina assume papel relevante nos estudos de engenharia genética, estes poderiam fornecer grande contribuição à tecnologia da madeira, seja por desactivação ou activação de sistemas enzimáticos envolvidos no processo biossintético que leva a sua formação (RALPH *et al*., 1999 e 1998; RALPH e HATFIEL, 1997; BOUDET *et al*., 1995; BRETT e HILLMAN, 1985; BEVAN *et al*., 1989). A biossíntese modificada da lignina assumida pela manipulação genética abre assim, novas perspectivas dentro do sector florestal mundial.

As enzimas PAL, 4CL, C4H, C3H, OMT, F5H, CCR e também CAD (Figura 1) participam da formação dos precursores de lignina dentro dos compartimentos citoplasmáticos (LIEWS e SARKANEN, 1998; PREISS, 1987). A enzima CAD, por exemplo, regula a composição das ligninas G:S detectada em uma ampla variedade de plantas, cujo o polimorfismo sugere que a CAD apresenta especificidade diferenciada na composição da lignina de Gimnospermas e Angiospermas. Em *Eucalyptus*, a CAD2

mRNA tem sido detectada em tecidos de xilema e folhas e, em outros casos, CAD afectou a composição da lignina. A introdução de hidroxicinamaldeido em ligninas com actividade atenuada de CAD alterou a cor do xilema de algumas plantas antisense (JEON, 1997; BOUDET, 1998). Adicionalmente HIGUCHI *et al.* (1994) observaram a ocorrência de polimerização desidrogenativa através do precursor coniferaldeído, também associado a mudança na cor original da madeira, podendo isto ser usado como ferramenta para melhorar a aceitação no mercado consumidor, principalmente de certas madeiras com pouco atractivos em função da cor original e das propriedades físicas e mecânicas indesejáveis. A enzima CAD, que regula a reacção de redução do aldeído a álcool, está também associada aos mecanismos de defesa da planta (HALBROCK e SHEEL, 1989).

A redução da actividade reguladora do pt4CL1, codificada como 4-cumarato coenzima A ligase (4CL), promove uma redução de lignina entorno de 45% ao mesmo tempo em que vislumbra um aumento de 15% nos níveis de celulose (SEDEROFF, 1999; HU *et al.*, 1999). A exemplo da lignina produzida por *Pinus* mutante com deficiência de CAD, unidades estruturais de DHCA (Álcool diidroconiferílico) e APD (1,3-arilpropano-diol) são introduzidas na composição, até então não encontradas em ligninas normais (RALPH *et al.*, 1999). A significante redução da actividade de CCoAOMT Caffeoil CoA 3-O-metiltrans-ferase reduziu a relação entre monomeros guaiacilicos e siringílicos baixando o conteúdo de lignina, mostrando a não obrigatoriedade do ácido hidroxicinâmico na rota biossíntetica da lignina.

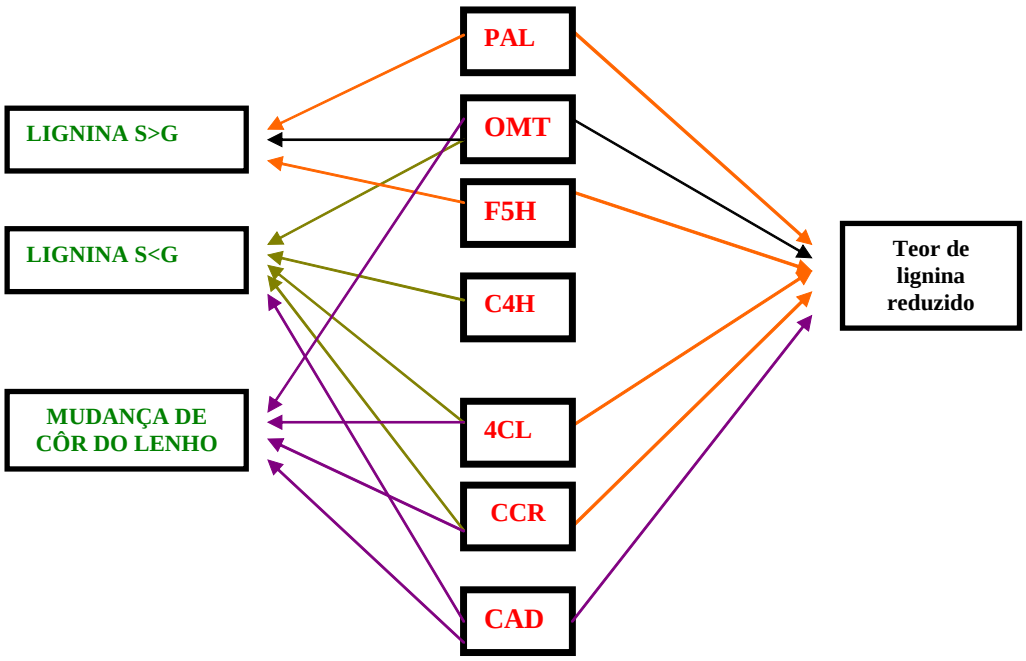


Figura 1 - Expressões gênicas de sistemas enzimáticos sobre algumas propriedades do xilema

Em Angiospermas a enzima ferulato 5-hidroxilase (F5H) (citocromo-P450-dependente da monoxigenase (P450)) é requerida para a formação da lignina siringílica (HUMPHREYS e CHAPPLE, 2002). O gene Pt4CL2 que se expressa na epiderme do caule, regula a composição da lignina e promove uma redução entorno de 45% do total originalmente encontrado em plantas (SEDEROFF, 1999). CCR(hidroxicinamoil-CoA:NADPH) (EC 1.2.1.44) regula as reacções de redução do tio-éster do ac. fenilpropanóico com importante papel no controle composicional das ligninas, e, exerce efeito, sobre a morfologia dos elementos anatômicos. Esta enzima, quando geneticamente alterada, pode provocar colapso nos vasos e também aumentar a relação composicional entre S e G (Quadro 1). Pesquisas já realizadas través da engenharia genética, com árvores de faia revelaram efeitos sobre a cor do lenho (HUMPHREYS e CHAPPLE 2002; ELLIS *et al*., 1993; KUTSUKI *et al*., 1982). O processo de lignificação modificado proporciona nova performance morfológica que pode beneficiar a indústria florestal assim como a silvicultura (COLEY, 1988).

A transferência de genes que codifica a OMT pode ser feita de uma espécie de Gimnospermas para uma de Angiospermas. Experiência por técnica antisense em choupo, levou a diminuição do teor de lignina e dos níveis de unidade siringílica. Contribuindo com este facto, ou melhor, na produção de ligninas guaiacílicas mostra que a enzima F5H, com baixa actividades produz uma disfunção que leva à formação de lignina guaiacílica, fato que as Angiospermas exigem esta enzima para a produção de lignina siringílica (JEON, 1997).

Perspectiva de utilização da transgenia na solução dos problemas congénitos expressados em madeira

A indústria madeireira pode, sem dúvida, beneficiar com a engenharia genética e bioquímica, minimizando, ou até mesmo definitivamente afastando, os problemas congénitos de uma essência florestal. A combinação de técnicas de biologia molecular, cultura de tecidos, transferência de genes e estrutura de proteoma são ferramentas poderosas para corrigir defeitos, introduzir novas propriedades e características em uma determinada espécie florestal.

Quadro 1 - Valores estimados de IFM para ligninas de Björkman de Gimnospermas e Angiospermas (ABREU *et al*., 1999)

Grupo Botânico	% Média de β-O-4	Valor Médio de IFM	Tipo de lignina
Gimnospermas (árvores)	40,20	0,67	HG
Angiospermas (árvores)	71,04	2,45	GS
Angiospermas (arbustos)	74,07	2,85	GS

NTLI- Número Teórico de Ligações Intermonoméricas, IFM- Índice de Flexibilidade Molecular

O problema da tensão de crescimento, por exemplo, tem sido objecto de inúmeras pesquisas (LIMA *et al.*, 2000; LATORRACA e ALBUQUERQUE, 2000), especialmente com o *Eucalyptus* spp que na maioria das vezes é tratado na óptica da física, enquanto ABREU *et al.* (1999) consideram este assunto sob o contexto molecular.

A energia necessária para romper o conjunto de ligações das estruturas moleculares das ligninas HG (Cumarílica/ Guaiacílica), vai de encontro com os valores de energia das ligações C-C (347 $kj.mol^{-1}$) e C-O (356 $kj.mol^{-1}$), do que as ligações totais das ligninas GS (Guaiacílica/Siringílica) de folhosas. O valor da NTLI (Número Teórico de Ligações Intermonoméricas) que varia segundo a composição da lignina revela ser maior nas ligninas guaiacílicas do que nas siringílicas. Estes fatos levam a formação de ligninas mais ou menos resistentes o que caracteriza a sua estabilidade perante os agentes bióticos e abióticos de degradação da madeira (HIGUCHI, 1985). A Figura 2 mostra a variação do NTLI de acordo com a hipótese teórica das combinações possíveis entre precursores, simbolizando os tipos de ligninas.

A proposta que define o Índice de Flexibilidade Molecular (IFM), por exemplo, pode contribuir para os estudos de engenharia genética. Este índice, que é maior em lignina siringílica, está directamente relacionado à concentração da ligação β-O-4, o que se coaduna com a existência variável de complexidade molecular do bloco polimérico formado. As ligninas de baixo IFM são geralmente encontradas em madeiras de coníferas, que se apresentam com maior número de ligações cruzadas, reforçando e assegurando às células uma maior resistência às forças de retracção (menor grau de rachadura). Por outro lado, as ligninas de folhosas possuem menor número de ligações intermonoméricas e, portanto, menor número de ligações cruzadas com a parede celular. Este fato está condicionado ao perfil estrutural em face da maior linearidade adquirida das ligninas siringílicas, o que poderia favorecer o descolamento entre paredes das células (Quadro 1).

Nestes termos, a indução para a modificação da rota biossintética que leva ao álcool coniferílico em folhosas seja por transgenia, mutações ou outras formas de indução, acarretaria a formação de um bloco polimérico de baixo IFM (maior NTLI e maior número de ligações cruzadas), aumentando, portanto, a resistência da parede celular.

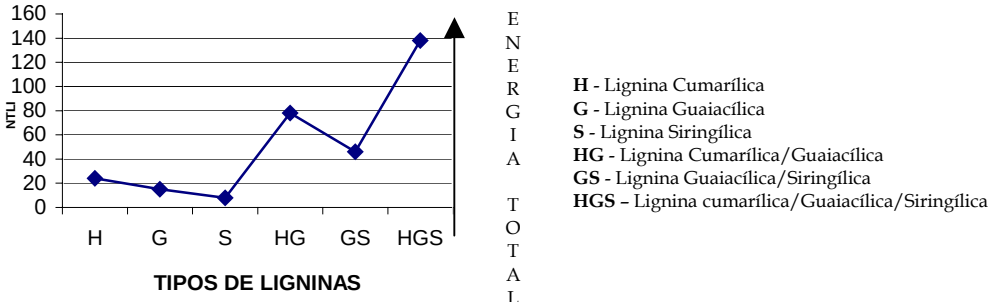
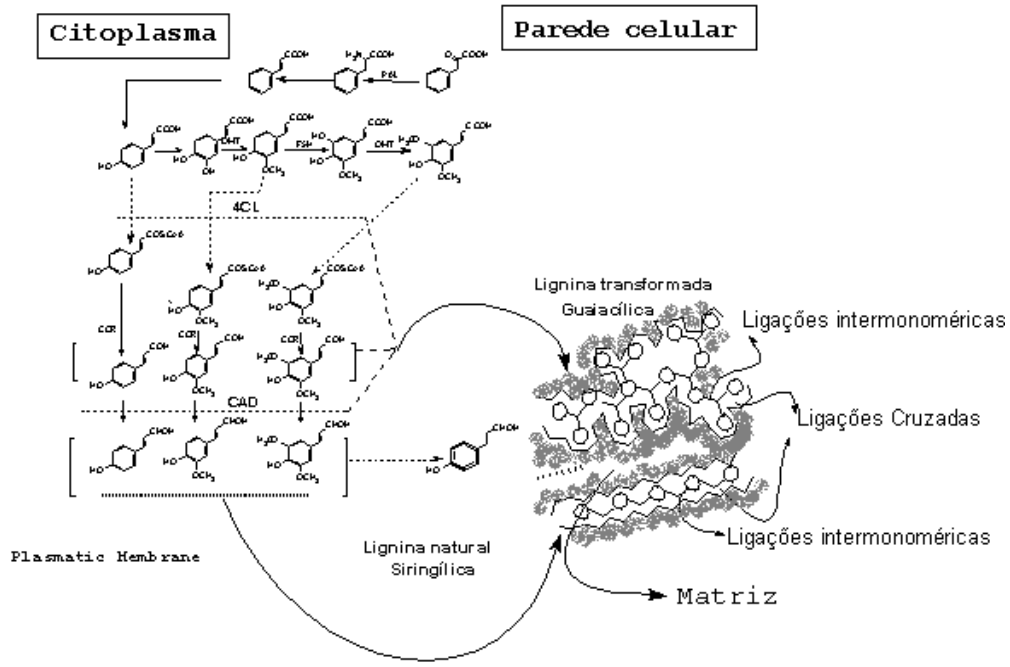


Figura 2 - Correlação entre valores do NTLI e o tipo de lignina (ABREU *et al.*, 1999)

Com isso seria minimizada ou impedida a possibilidade de rachaduras, o que beneficiaria directamente o uso da madeira em diversos ramos da indústria madeireira, se bem que não se aplicasse a indústria de polpa celulósica. A Figura 3 mostra a via biossintética (pré-polimerização) da lignina e posterior deposição na parede celular constituindo uma rede de ligações cruzadas diferenciadas entre as ligninas siringílicas naturais e guaiacílicas transformadas como suporte a proposta em questão.

Considerações finais

A aplicação dos conhecimentos da fisiologia, anatomia e morfologia, em plantas transgênicas, entre outras formas, estimula novos campos da ciência florestal em busca de explicações aos desafios que a ela será impingida pela força da evolução da sociedade.



PAL- Fenilalanina amônia-liase
C3H- 4-Hidroxicinamato-3-hidroxilase
F5H- Ferulato-5-hidroxilase
OMT-5-Adenosil-metionina:cafeato/5-Hidroxiferulato-O-metiltransferase
4CL-Hidroxicinamoil: CoA ligase
CCR-Hidroxicinamoil: CoA redutase
CAD-Cinamil álcool desidrogenase
C4H-Cinamato-4-hidroxilase

Figura 3 - Formação da lignina natural e transformada com participação protéica na definição da organização molecular estrutural

Todas as questões que se relacionam com as propriedades da madeira, envolvem principalmente CCR, CAD, F5H e OMTs, que podem ter suas actividades atenuadas através de técnicas de biotecnologia, para que espécies de folhosas produzam ligninas mais estáveis, (Cumarílica/Guaiacílica) para aumentar os efeitos da rede de ligações inter e intra moleculares na parede celular.

As alterações adquiridas por modificações genéticas poderão, por exemplo, reforçar a região de fronteira entre paredes de células xilemáticas, o que resultaria em maior resistência às forças de tensões de crescimento.

Bibliografia

ABREU, H. S., MIGUEL, A.M., MARIA, M.A., 1999. Lignin and structure. *Wood and Fiber* **31**(4) : 426-433.

ALBUQUERQUE, C.E.C., MENDES, L.M., 1999. Da madeira dos sarcófagos à moderna indústria. *Revista da Madeira* **45** : 26-28.

BEVAN, M., SHUFFLEBOTTOM, D., EDWARDS, K., JEFFERSON, R., SHUCH W., 1989. Tissue and cell-specific activity of a phenylalanine ammonia-lyase promoter in transgenic plants. *The Embo Journal* **8**(7) : 1899-1906.

BOUDET, A.M., 1998. A new view of lignification. *Elsevier Science* **3**(2) : 67-71.

BOUDET, A.M., GRIMA-PETTENATI, J., 1996. Lignin genetic engineering. *Mol. Breed* **2** : 25-39.

BOUDET, A.M., LAPIERRE, C., GRIMA-PETTENATI, J., 1995. Biochemistry and molecular biology of lignification. *New Phytol* **129** : 203-236.

BRETT, T.C., HILLMAN J.R., 1985. *Biochemistry of plant cell walls*. Cambridge University Press, pp. 154-176.

ELLIS, B.E., KUROKI, G.W., STAFFORD, H.A., 1993. *Genetic engineering of plant secondary metabolism* **28** : 314-338.

HALBROCK, K., SHEEL D., 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Revol. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. (40) : 347-369.

HIGUCHI, T., 1985. *Biosynthesis and biodegradation of wood components*. Academic Press, New York, 667 pp.

HIGUCHI, T., 1997. Biochemistry and molecular biology of wood. *Springer Series in Wood Science***.** Berlin, 353 pp.

HIGUCHI, T., ITO, T, UMEZAWA, T., HIBINO, T., SHIBATA, D., 1994. Red-brown color of lignified tissues of transgenic plants with antisense CAD gene: Wine-red lignin from coniferyl aldehyde. *Journal of Biotechnology* (37) : 151-158.

HILLIS, W.E., 1987. *Heartwood and tree exudates***.** Spring-Verlag, Berlin, 239 pp.

HU, W-J, HARDING, S.A., LUNG, J., POPKO, J., RALPH, J., STOKKE, D.D., TSAI, C-J., CHIANG, VOL. L., 1999. Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic tree. *Nature Biotechnology* (17) : 808-812.

HUMPHREYS, J. M., CHPPLE, C., 2002. Rewriting the lignin roadmap. *Current Opinion in plant biology* **5** (3) : 224-229.

JEON, K.W., 1997. International Review of Cytology (A Survey of Cell Biology). *Academic press*, New York **172** : 243-293.

KUTSUKI, H., SHIMADA, M., HIGUCHI, T., 1982. Regulatory role of cinnamyl alcohol dehydrogenase in the formation of guaiacyl and syringyl lignins. *Phytochemistry* **21** (1) : 19-23.

LATORRACA, J.V.F., ALBUQUERQUE, C.E.C., 2000. Efeito do crescimento sobre as propriedades da madeira. *Floresta e Ambiente* **7**(1): 279-291.

LEWIS, N.G., SARKANEN, S., 1998. *Lignin and lignan biosynthesis*. American Chemical Society, Washington, DC, 436 pp.

LIMA, I.L., GARCIA, J.N., NOGUEIRA, M.C.S., 2000. Influência do desbaste nas tensões de crescimento de *Eucalyptus grandis* Hill ex-maiden. *Scientia Forestais* (58): 111-125.

PILATE G., GUINEY E., HOLT K., PETIT-CONIL M., LAPIERRE C., LEPLÉ J-C., POLLET B., MILA I., WEBSTER E. A., MARSTORP H. G., HOPKINS D. W., JOUANIN L., BOERJAN W., SCHUCH W., CORNU D., HALPIN C., 2002. Field and pulping performances of transgenic trees with altered lignification. *Nature*. **20**(6) : 607 – 612.

PREISS J., 1987. *The biochemistry of plants: a comprehensive treatise*. Academic Press, Inc. **14**.

RALPH, J., HATFIEL, R.D., 1997. A New Frontier for Plant Modification. *Plant Chemistry* pp. 28-30.

RALPH, J., HATFIEL, R.D., PIQUEMAL, J., YAHIAOUI, N., PEAN, M., LAPIERRE, C., BOUDET, A., 1998. NMR characterization of altered lignins extracted from tobacco plants dow-regulated for lignification enzymes cinnamyl-alcohol dehydrogenase and cinnamoyl-CoA reductase, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95** : 12803-12808.

RALPH, J., KIM, H., PENG, J., LU, F., 1999. Arylpropane-1,3-diols in lignins from Natural and CAD-Deficient pines. *Organic letters*. **1**(2) : 323-326.

SEDEROFF, R.R., 1999. Building better trees with antisense. *Nature Biotechnology* **17 :** 750-751.

TORRES, A.C., CALDAS, L.S., FERREIRA, A.T., 1998. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. *In*: TORRES, A.C., CALDAS, L.S. & BUSO, J.A. (Editor). *Cultura de tecidos e transformação e genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA-CNPH, pp. 11-20.

Entregue para publicação em Dezembro de 2002
Aceite para publicação em Setembro de 2003