UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

Biodegradação de madeira por *Ceriporiopsis subvermispora*:
caracterização dos polímeros residuais

Anderson de Almeida Guerra

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador: Professor Dr. André L. Ferraz

São Paulo
2002

Anderson de Almeida Guerra

Biodegradação de madeira por *Ceriporiopsis subvermispora*:
caracterização dos polímeros residuais.

Comissão julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Professor Dr. André Luiz Ferraz
Orientador/presidente

Prof. Dr. Flávio Teixeira da Silva

1º examinador

Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos

2º examinador

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Jr.

3º examinador

Prof. Dr. Sunao Sato

4º examinador

São Paulo, 27 de maio de 2002

**"De tanto ver triunfar as nulidades,
de tanto ver prosperar a desonra, de
tanto ver crescer as injustiças, de
tanto ver agigantarem-se os poderes
nas mãos dos maus, o homem chega
a desanimar da virtude, a rir-se da
honra e a ter vergonha de ser
honesto"**

RUY BARBOSA

**Dedico esta tese a minha esposa
Daniela, que, com a imensidão de
seu amor e sua paciência sem
limites, tornou possível a realização
deste trabalho.**

Ao meu pai, Paulo Guerra, o
homem mais honesto que já vi,
de quem hei de herdar a
humildade e a filosofia de vida; e
a minha mãe, Ana Maria, por
seu amor infinito, dedicação
integral e, principalmente, por
estar ao meu lado sempre.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. André Ferraz pela orientação, apoio e paciência desde a iniciação científica.

Ao Dr. John Ralph (Universidade de Wisconsin- EUA) pela orientação durante a etapa de caracterização por ressonância magnética nuclear.

Aos Drs George Jackson de Moraes Rocha, Adilson Gonçalves e Flávio T. da Silva pelas sugestões e atenção durante a realização deste trabalho.

Aos amigos Zé Cobrinha, Zé Gambira e Jú pela assistência técnica, companheirismo e paciência durante todo o desenvolvimento dos experimentos.

Aos alunos do Departamento de Biotecnologia da FAENQUIL pela amizade e momentos de descontração durante a "redefinição de parâmetros".

Aos demais funcionários do Departamento de Biotecnologia.

À FAPESP pela bolsa e demais apoios financeiros.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
II.1. MADEIRA: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ULTRAESTRUTURA.....	3
II.2. BIOPOLPAÇÃO.....	7
II.3. BIODEGRADAÇÃO DE MADEIRA – ASPECTOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS.....	9
II.4. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DOS COMPONENTES DA MADEIRA.....	19
II.4.1. Análise da lignina.....	19
II.4.1.1. DFRC.....	19
II.4.1.2. RMN (Ressonância Magnética Nuclear).....	20
II.4.1.2.1. Correlações Heteronucleares.....	21
II.4.1.2.2. Correlações Homonucleares.....	24
II.4.2. Análise dos polissacarídeos.....	25
II.5. Considerações finais.....	27
III. OBJETIVOS.....	28
VI. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
IV.1. FUNGO.....	29

IV.2. PREPARO DAS MADEIRAS PARA OS EXPERIMENTOS DE BIODEGRADAÇÃO.....	29
IV.3. BIODEGRADAÇÃO EM BIORREATOR.....	29
IV.3.1. Inoculação a partir de cavacos cultivados com <i>C. subvermispora</i>	29
IV.4. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS AMOSTRAS DE MADEIRA.....	31
IV.5. DETERMINAÇÃO DA PERDA DE COMPONENTES DURANTE A BIODEGRADAÇÃO.....	31
IV.6. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	32
IV.6.1. Atividades enzimáticas relacionadas à degradação de celulose.....	32
IV.6.2. Atividades enzimáticas relacionadas à degradação de hemicelulose...	33
IV.6.3. Atividades enzimáticas relacionadas à degradação de lignina.....	33
IV.7. ANÁLISE DOS POLISSACARÍDEOS RESIDUAIS.....	33
IV.7.1. Obtenção de Holocelulose-clorito.....	33
IV.7.2. Obtenção de α -celulose	34
IV.7.3. Distribuição de massas molares da α -celulose.....	35
IV.8. ANÁLISE DA LIGNINA RESIDUAL	35
IV.8.1. Oxidação da madeira.....	35
IV.8.1.1. Análise dos Produtos de Oxidação por CG/MS.....	36
IV.8.2. DFRC (do inglês “Derivatization Followed by Reductive Cleavage”) .	36
IV.8.2.1. Análise dos produtos de DFRC por cromatografia gasosa	37
IV.8.3. Extração de lignina de madeira moída (LMM)	38
IV.8.4. Obtenção da lignina liberada enzimaticamente (LLE).....	38
IV.8.4.1. Determinação da quantidade de glicose hidrolisada.....	39
IV.8.4.2. Determinação da atividade da celulase.....	39
IV.8.5. Análise da distribuição de massas molares de LMM e LLEs.....	39
IV.8.5.1. Cálculo dos valores de M_w , M_n e dispersibilidade.....	40
IV.8.6. Determinação do perfil de eluição dos carboidratos contidos nas LMM e LLEs.....	41
IV.8.7. Análise espectroscópica das lignina na região do UV/visível:.....	41
IV.8.8. Análise espectroscópica das lignina na região do infravermelho:.....	41
IV.8.9. Determinação de carbonilas (estruturas tipo coniferaldeído e Acetoguaiacona).....	42
IV.8.10. Determinação de hidroxilas fenólicas.....	43
IV.8.11. Análise elementar.....	44
IV.8.12. DFRC	44

IV.8.12.1. Análise dos monômeros liberados pela reação de DFRC	44
IV.8.12.2 Análise dos dímeros liberados pela reação de DFRC.....	44
IV.8.13. Acetilação e espectroscopia de ressonância magnética nuclear	45
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
V.1. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO <i>IN SITU</i>	46
V.1.1. Perda de massa e de componentes em <i>P. taeda</i> biodegradado por <i>C. subvermispora</i>	46
V.1.2. Oxidação com óxido de cobre.....	48
V.1.3. DFRC.....	51
V.2. CARACTERIZAÇÃO DA LIGNINA RESIDUAL.....	56
V.2.1. Composição química.....	59
V.2.2. Distribuição de massas molares das preparações de ligninas	62
V.2.3 Análise dos monômeros liberados pela reação de DFRC	71
V.2.4. Análise dos dímeros liberados pela reação de DFRC	73
V.2.5. Ressonância magnética nuclear.....	78
V.2.6. UV/Visível.....	104
V.2.7 Infravermelho.....	108
V.2.8. Análise elementar, determinação de grupos funcionais e cálculo da fórmula C ₉	112
V.3. CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS RESIDUAIS.....	115
V.4. PRODUÇÃO DE ENZIMAS DURANTE A DEGRADAÇÃO DE <i>P. TAEDA</i> POR <i>C. SUBVERMISPORA</i>	121
V.5. RELAÇÃO ENTRE PADRÃO DE DEGRADAÇÃO E A PRODUÇÃO DE ENZIMAS.....	125
V. 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	127
VI. CONCLUSÕES.....	129
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	130
APÊNDICES	

LISTA DE ABREVIATURAS

BSTFA – N, O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida;
COSY – do inglês “Correlation Spectroscopy”;
D – Dispersibilidade;
DEPT – do inglês “Distortionless Enhancement by Polarization Transfer”;
DFRC - do inglês “Derivatization Followed by Reductive Cleavage”;
DNS – ácido dinitrosalicílico;
FTIR – infravermelho com transformada de Fourier;
GC/MS – cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas;
GPC – cromatografia de permeação em gel;
HMBC - do inglês “Heteronuclear Multiple Bond Coherence”;
HMQC - do inglês “Heteronuclear Multiple Quantum Coherence”;
LLE – Lignina Liberada Enzimaticamente;
LMM – Lignina de Madeira Moída;
LiP – Lignina Peroxidase;
MnP – Manganês peroxidase;
Mw – Massa molar média em massa aparente;
Mn – Massa molar média em número aparente;
pNPG – *p*-nitrofenil- β -D-glicosídeo;
RMN – Ressonância Magnética Nuclear;
THF – tetra- hidrofurano; e
TOCSY - do inglês “Total Correlation Spectroscopy”

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proteínas utilizadas na calibração da coluna cromatográfica e suas respectivas massas molares.....	40
Tabela 2. Perdas de massa e de componentes durante a biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>C. subvermispora</i>	47
Tabela 3. Monômeros identificados nos produtos de oxidação de <i>P. taeda</i> controle e biodegradado por <i>C. subvermispora</i>	49
Tabela 4. Rendimentos de oxidação e quantificação dos monômeros identificados nos produtos de oxidação de <i>P. taeda</i> controle e biodegradado por <i>C. subvermispora</i>	50
Tabela 5. Identificação dos compostos presentes no produto da reação de DFRC de <i>P. taeda</i>	53
Tabela 6. Rendimento dos principais produtos liberados durante a degradação por DFRC de <i>P. taeda</i> controle e biodegradado por <i>C. subvermispora</i>	55
Tabela 7. Rendimentos de extração de LMM de <i>P. taeda</i> biodegradado por <i>C. subvermispora</i>	57
Tabela 8. Rendimentos de extração de LLE96 e LLE50 de <i>P. taeda</i> biodegradado por <i>C. subvermispora</i>	59
Tabela 9. Composição química das ligninas (LMM, LLE96 e LLE50) isoladas de <i>P. taeda</i> biodegradado por <i>C. subvermispora</i>	61
Tabela 10. Massas molares médias (Mw e Mn), polidispersidade (D) e porcentagem de área excluída (%Ae) nas LMM isoladas de <i>P. taeda</i> biodegradado por <i>C. subvermispora</i>	63
Tabela 11. Massas molares médias (Mw e Mn), polidispersidade (D) e porcentagem de área excluída (%Ae) nas LLE96 isoladas de <i>P. taeda</i> biodegradado por <i>C. subvermispora</i>	65
Tabela 12. Rendimento dos monômeros Gc e Gt formados durante a degradação por DFRC de LMM, LLE96 e LLE50 isolada de <i>P. taeda</i> controle e degradado por <i>C. subverispora</i>	72
Tabela 13. Dados de GC/MS dos dímeros liberados pela reação de DFRC.....	74

Tabela 14. Atribuição e integração dos sinais de RMN- ¹ H das LMM de <i>P. taeda</i> controle e biodegradado por <i>C. subvermispora</i>	80
Tabela 15. Atribuição dos sinais de RMN- ¹³ C das LMM de <i>P. taeda</i> biodegradado por <i>C. subvermispora</i> . As lignina foram previamente acetiladas e dissolvidas em acetona-d ₆	82
Tabela 16. Atribuição dos sinais de HMQC das LMM de <i>P. taeda</i> biodegradado por <i>C. subvermispora</i>	88
Tabela 17. Atribuição dos sinais COSY das LMM de <i>P. taeda</i> biodegradado por <i>C. subvermispora</i>	88
Tabela 18. Atribuição e integração dos sinais de RMN- ¹ H das LLE96 de <i>P. taeda</i> controle e biodegradado por <i>C. subvermispora</i>	97
Tabela 19. Absortividades na região de UV/Visível das ligninas de <i>P. taeda</i> biodegradado por <i>C. subvermispora</i>	108
Tabela 20. Atribuição das bandas observadas no espectros de infravermelho. das ligninas isoladas de <i>P. taeda</i> biodegradado por <i>C. subvermispora</i> (Faix, 1991).....	109
Tabela 21. Relações de intensidades entre as bandas em determinados comprimento de onda e a banda de referência para lignina, em 1510 cm ⁻¹	112
Tabela 22. Fórmulas C ₉ das ligninas de <i>P. taeda</i> controle e biodegradado por <i>C. subvermispora</i>	113
Tabela 23. Rendimento de holocelulose-clorito livre de lignina e lignina total presentes em <i>P.taeda</i> controle e degradado por <i>C. subvermispora</i>	116
Tabela 24. Composição química da holocelulose-clorito presente em <i>P. taeda</i> controle e biodegradado por <i>C. subvermispora</i>	117
Tabela 25. Rendimento de α-celulose livre de lignina presente em <i>P. taeda</i> controle e biodegradado por <i>C. subvermispora</i>	118
Tabela 26. Composição química da α-celulose presente em <i>P. taeda</i> controle e degradado por <i>C. subvermispora</i>	120
Tabela 27. Atividades enzimáticas* recuperadas na biodegradação de <i>P.taeda</i> por <i>C. subvermispora</i> em condições de fermentação sólida.....	124

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura de um fragmento de celulose.....	3
Figura 2. Estrutura-modelo da lignina proposta por Adler (reproduzido com modificações de Fengel e Wegener, 1989).....	5
Figura 3. (a) Corte ilustrativo do sistema de camadas na parede das células de madeira (Fengel e Wegener, 1989). (b) Microscopia eletrônica de transmissão das células de madeira mostrando as camadas da parede celular: ML= lamela média, P= parede primária, S ₁ = parede secundária, S ₂ = parede secundária e T= parede terciária. (Fengel e Wegener 1989).....	5
Figura 4. Formação de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) via oxidação de ácido oxálico pelo sistema MnP/Mn (III).....	13
Figura 5. Vias de degradação de um substrato modelo de lignina (não fenólico) por lignina peroxidase de <i>P. chrysosporium</i> /H ₂ O ₂ (Kirk e Cullen, 1998). Os modelos acima explicariam as vias de oxidação iniciadas pela abstração de 1 elétron quer do anel A (rota A ₁) ou B (rota A ₂) com conseqüente ruptura de ligações Cα-Cβ, β-O-4 e oxidação no Cα.....	14
Figura 6. Formação de radicais livres via peroxidação de lipídeos induzida por MnP (Watanabe et al., 2000).....	17
Figura 7. Degradação de um substrato modelo de lignina (não fenólico) pelo sistema MnP, ácido linoleico e H ₂ O ₂ . O modelo explicaria a via de oxidação Cα (A) e a clivagem β-O-4 (B). Ambas as reações seriam iniciadas pela abstração de um hidrogênio benzílico do composto modelo através da ação de um radical peroxila gerado pelo sistema MnP/ácido linoleico/H ₂ O ₂ (Kapich <i>et al.</i> , 1999).....	18
Figura 8. Quebra seletiva de ligações β-O-4 durante a degradação por DFRC (Lu e Ralph, 1998).....	20
Figura 9. HMQC de uma lignina sintética (Marita <i>et al.</i> , 1999). Os padrões de cores no espectro referem-se às estruturas de mesma cor mostradas na parte inferior da figura. As estruturas são: A , β-aril éter (β-O-4); B , fenilcoumaranas (β-5); C , resinol (β-β); D , dibenzodioxocinas (5-5 e β-O-4/α-O-4); E , α,β-diaril éter; F , α-ceto-β-aril éter; X , (E)-álcool cinâmico e M , metoxila.....	22
Figura 10. Ampliação de um HMBC mostrando as correlações do Hα em estruturas do tipo β-O-4. (A) lignina do tipo S e (B) lignina do tipo G.....	23
Figura 11. HMQC-TOCSY de uma lignina isolada por Marita <i>et al.</i> (1999). Os padrões de cores são os mesmos utilizados na figura 6.....	25
Figura 12. Representação esquemática da reação de derivatização de celulose	

à celulose tricarbanilado (CTC).....	27
Figura 13. Biorreator de 20 L com cavacos inoculados e sistema de aeração.....	30
Figura 14. Espectro UV diferencial utilizado para a determinação de carbonilas nas ligninas isoladas de <i>P. taeda</i> biodegradado por <i>C. subvermispora</i>	43
Figura 15. Exemplo de um espectro UV diferencial utilizado na determinação de OH-fenólico nas ligninas isoladas de <i>P. taeda</i> biodegradado por <i>C. subvermispora</i>	44
Figura 16. Cromatograma reconstituído de íons totais dos produtos de oxidação por CuO em meio alcalino de <i>P. taeda</i> controle.....	48
Figura 17. Mecanismo proposto para a degradação de lignina por oxidação com óxido de cobre em meio alcalino (Chang e Allan, 1971).....	49
Figura 18. Cromatograma reconstituído de íons totais dos produtos liberados durante a degradação de <i>P. taeda</i> controle por DFRC.....	52
Figura 19 Perda de lignina (●) e de ligações β-O-4 (▲) em função do tempo de biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>C. subvermispora</i>	56
Figura 20. Monitoramento da formação de glicose durante a extração de LLE (Enzymatic Liberated Lignin) de <i>P. taeda</i>	58
Figura 21. Cromatograma típico dos produtos da hidrólise ácida da lignina (exemplo de LMM controle) isolada de <i>P. taeda</i> biodegradado por <i>C. subvermispora</i> . HGluc= ácido metilglucurônico; G = glicose; P= manose + xilose; A =arabinose, HAc= ácido acético e X = composto não identificado.....	60
Figura 22. Cromatogramas de permeação em gel, medidos para lignina, nas LMM isoladas de <i>P. taeda</i> biodegradado por <i>C. subvermispora</i> . Controle (♦), e biodegradado por 15 dias (Δ), 30 dias (●), 60 dias (□) e 90 dias (X).....	63
Figura 23. Cromatogramas de permeação em gel das LLE96 isoladas de <i>P. taeda</i> biodegradado por <i>C. subvermispora</i> . Controle (♦), 15 dias (Δ), 30 dias (●), 60 dias (□) e 90 dias (x).....	65
Figura 24- Cromatogramas de permeação em gel das LLE50 isoladas de <i>P. taeda</i> biodegradado por <i>C. subvermispora</i> . Controle (♦), e biodegradada por 15 dias (Δ), 30 dias (●), 60 dias (□) e 90 dias (x).....	66
Figura 25. Cromatogramas de permeação em gel das LMM, medidos para lignina (♦) e carboidratos (□), isoladas de <i>P. taeda</i> biodegradado por <i>C. subvermispora</i> . (a) controle; biodegradado por 15 dias (B); 30 dias (C); 60 dias (□) e 90 dias (e).....	68

Figura 26. Cromatogramas de permeação em gel das LLE96 , medidos para lignina (♦) e carboidratos (□), isoladas de <i>P. taeda</i> biodegradado por <i>C. subvermispora</i> . (a) controle; (b) 15 dias; (c) 30 dias; (d) 60 dias; e (e) 90 dias....	69
Figura 27. Cromatogramas de permeação em gel das LLE50 , medidos para lignina (♦) e carboidratos (□), isoladas de <i>P. taeda</i> biodegradado por <i>C. subvermispora</i> . (a) controle; biodegradado por 15 dias (B); 30 dias (C); 60 dias (□) e 90 dias (e).....	70
Figura 28. Cromatogramas reconstituído de íons totais (TIC) da região de eluição dos dímeros liberados pela reação de DFRC nas amostras de LMM	74
Figura 29. Estrutura dos dímeros de lignina presentes nos produtos de DFRC de LMM de <i>P. taeda</i> controle e biodegradado por <i>C. subvrnispora</i>	75
Figura 30. Acúmulo de dímeros 19 (barras com linhas horizontais), 20 (barras com linhas diagonais), 21 (barras escuras) e 22 (barras claras) na estrutura das LMM provenientes de <i>P. taeda</i> biodegradado por <i>C. subvermispora</i> . No gráfico, Hd e Hp são as alturas dos sinais de cada dímero e do padrão interno, respectivamente, e M é a massa, em gramas, de lignina usadas na reação de DFRC.....	76
Figura 31. Redução da porcentagem de monômeros ligados por ligações β -O-4 (◇) e acúmulo dos dímeros ligados por ligações Carbono-Carbono (■) em função do tempo de biodegradação.	76
Figura 32. Vias de degradação de um substrato modelo de lignina (não fenólico) por lignina peroxidase de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> /H ₂ O ₂ (Kirk e Cullen, 1998) (rota A) e pelo sistema MnP, ácido linoleico e H ₂ O ₂ (rota B) (Kapich <i>et al.</i> , 1999). Os modelos acima explicariam as vias de oxidação iniciadas pela abstração de 1-elétron quer do anel A (rota A ₁) ou B (rota A ₂) ou do carbono alfa (rotas B ₁ e B ₂).....	78
Figura 33. Espectro de RMN-H ¹ da LMM de <i>P. taeda</i> não degradada (controle).....	82
Figura 34. Espectro de RMN-C ¹³ da LMM de <i>P. taeda</i> não degradado (controle). As letras de A-C correspondem às estruturas A-C da figura 35. Ar = anel aromático; G = anel aromático do tipo guaiacil, a = carbono α ; b = carbono β ; g = carbono γ ; 2/3/4/5/6/ = posições no anel aromático e S= solvente (acetona).....	82
Figura 35. Esquema dos diferentes tipos de ligações presentes na estrutura da lignina (Kilpelainen <i>et al.</i> , 1994; Marita <i>et al.</i> , 1999; Ralph <i>et al.</i> , 2001).....	85
Figura 36. Ampliação da região oxigenada da cadeia lateral dos HMQC de LMM de <i>P.taeda</i> não degradado (controle). As cores dos sinais correspondem às estruturas de mesma cor na figura 35 e os números 1-20 correspondem aos números da tabela 16.....	87
Figura 37. Ampliação do COSY da LMM de <i>P. taeda</i> não degradado	

(controle). As cores dos sinais correspondem às estruturas de mesma cor na figura 35 e as letras A-G correspondem às estruturas A-G da tabela 17.....	87
Figura 38. Ampliação da região de cadeia lateral do espectro HMQC-TOCSY de LMM de <i>P.tarda</i> controle.....	91
Figura 39. Ampliação da região de alto-campo do HMQC da LMM de <i>P. taeda</i> não degradada (controle) Os números 21-23 correspondem aos números da tabela 16.....	94
Figura 40. DEPT-135 de LMM de <i>P. taeda</i> biodegradado por 90 dias.....	95
Figura 41. Ampliação do HMBC de LMM de <i>P. taeda</i> biodegradado por 90 dias.....	95
Figura 42. Espectro de RMN- ¹³ C de LLE96 de <i>P. taeda</i> não degradado (controle).....	98
Figura 43. Espectro HMQC de LLE96 de <i>P. taeda</i> não degradado (controle)...	100
Figura 44. Espectro COSY de LLE96 de <i>P. taeda</i> não degradado (controle)....	100
Figura 45. Espectro DEPT-135de LLE96 de <i>P. taeda</i> controle.	101
Figura 46. Espectro HMQC-TOCSY de LLE96 de <i>P. taeda</i> controle.	101
Figura 47. Ampliação do espectro HMBC de LLE96 de <i>P. taeda</i> não degradado (controle).	102
Figura 48. Espectros UV (a) e visível (b) das LMMs isoladas de <i>P. taeda</i> biodegradado por <i>C. subvermispora</i> . Controle (♦), 15 dias (Δ), 30 dias (●), 60 dias (□) e 90 dias de biodegradação (x).....	105
Figura 49. Espectros UV (a) e visível (b) das LLE96 isoladas de <i>P. taeda</i> biodegradado por <i>C. subvermispora</i> . Controle (♦), 15 dias (Δ), 30 dias (●), 60 dias (□) e 90 dias de biodegradação (x).....	106
Figura 50. Espectros UV (a) e visível (a) das LLE50 isoladas de <i>P. taeda</i> biodegradado por <i>C. subvermispora</i> . Controle (♦), 15 dias (Δ), 30 dias (●), 60 dias (□) e 90 dias de biodegradação (x).....	107
Figura 51. Espectros de infravermelho das LMMs de <i>P. taeda</i> biodegradado por <i>C. subvermispora</i>	110
Figura 52. Espectros de infravermelho das LLE96 de <i>P. taeda</i> biodegradado por <i>C. subvermispora</i>	110

Figura 53. Espectros de infravermelho das LLE50 de <i>P. taeda</i> biodegradado por <i>C. subvermispota</i>	111
Figura 54. Rota proposta para a oxidação de ligações β -O-4 em culturas sólidas de <i>Ceriporiopsis subvermispota</i> degradando madeira de <i>P. taeda</i> . Lig representa ligações com a estrutura da lignina e R= H ou OH.....	116
Figura 55. Perda de α -celulose ($\square$) e glucana ($\bullet$) na madeira de <i>P. taeda</i> biodegradada por <i>C. subvermispota</i>	119
Figura 56. Cromatogramas de exclusão de α -celulose tricarbanilado extraídas de <i>P. taeda</i> controle e biodegradadas por <i>C. subvermispota</i>	121
Figura 57. Padrão de extração da atividade de xilanase (a), β -glicosidase (b) e celulase (c) recuperadas de <i>P. taeda</i> biodegradado por 15 (barras clara), 30 (barras escuras), 60 (barras em cinza) e 90 (barras com linhas horizontais) dias.	123
Figura 58. Padrão de extração da atividade de peroxidase recuperada de <i>P. taeda</i> biodegradado por <i>C. subvermispota</i> por 15 (barras claras), 30 (barras escuras) e 60 (barras quadriculadas) e 90 dias (barras com linhas horizontais)....	124

RESUMO

A Biopolpação é definida como o pré-tratamento de cavacos de madeira, designado como um processo de fermentação em estado sólido, para a produção de polpas mecânicas e químicas. Apesar dos resultados promissores obtidos pelo pré-tratamento com fungos seguido de reações de polpação, não há correlação entre o padrão de biodegradação dos componentes da madeira e o aumento na eficiência dos métodos de polpação subsequentemente utilizados. Esta falta de correlação sugere que os benefícios do biotratamento dependem mais do tipo de modificação induzida na madeira do que da extensão da mineralização de seus componentes. Dentro deste contexto, este estudo visa o entendimento dos mecanismos químicos e bioquímicos, que poderiam explicar as alterações estruturais ocorridas nos componentes principais da madeira durante a etapa de biopolpação.

Pinus taeda foi degradado por *Ceriporiopsis subvermispora* por períodos de 15 a 90 dias em condições de fermentação sólida. O fungo degradou lignina e extrativos extensivamente, sem remover grandes quantidades de glucana. As polioses foram significativamente removidas após 60 dias de degradação (7%), chegando a 31% após 90 dias. A lignina e os polissacarídeos residuais, provenientes dos cavacos de madeira degradados e não degradados, foram caracterizados. A fração de lignina residual foi avaliada por técnicas de degradação *in situ* e por análises efetuadas na lignina de madeira moída e lignina liberada enzimaticamente, que foram isoladas das madeiras biodegradadas. A compilação dos resultados mostrou que a principal reação ocorrida na estrutura da lignina durante a biodegradação foi a quebra de ligações β -O-4. Esta reação de oxidação gerou despolimerização da macromolécula e foi seguida do aumento nos teores de dímeros conectados por ligações C-C e 4-O-5 e pelo aparecimento de novos carbonos saturados não-oxigenados nas cadeias laterais. Após longos períodos de biodegradação, reações de abertura de anéis aromáticos também puderam ser sugeridas.

A despolimerização de celulose foi avaliada através da preparação de amostras de α -celulose provenientes dos cavacos de madeira biodegradados. O perfil de eluição dos derivados tricarbanilados das preparações de α -celuloses foi determinado por cromatografia de exclusão. Os rendimentos de α -celulose e os perfis de eluição indicaram alguma despolimerização da fração de celulose após trinta dias de biodegradação. Este resultado mostrou que reações de degradação da cadeia de celulose começaram a ocorrer antes que a mineralização fosse detectada como perda de glicose.

As enzimas hidrolíticas e ligninolíticas relacionadas à degradação de madeira foram extraídas e quantificadas. Durante os primeiros trinta dias de biodegradação, os altos valores de atividades xilanolítica não produziram degradação extensiva da fração de polioses, indicando que o processo de biodegradação foi limitado pela baixa porosidade das paredes celulares da madeira. Por outro lado, algumas reações mediadas enzimaticamente parecem ter sido responsáveis pela despolimerização de lignina e celulose nos estágios iniciais de degradação.

ABSTRACT

Biopulping is the fungal pretreatment of wood chips designed as a solid-state fermentation process for production of mechanical or chemical pulps. Although promising results have been obtained by combining fungal pretreatment with chemical pulping methods, there is no relationship between the pattern of biodegradation of the wood components and the increase in efficiency of pulp methods subsequently adopted. This study presents some efforts to elucidate changes in the structure of residual components and enzymes produced during the wood biotreatment. Softwood *Pinus taeda* was degraded by *Ceriporiopsis subvermispora* for periods from 15 to 90 days under solid-state fermentation. The fungus degraded lignin and extractives extensively without removing large amounts of glucan. Polyoses were significantly removed (7%) only after 60 days of degradation, reaching 31% after 90 days. Decayed and undecayed wood chips were characterized as to their residual lignin and polysaccharides. Residual lignin fraction was evaluated by using *in situ* techniques and analysis performed on milled wood lignin and enzymatically-liberated lignin isolated from biodegraded wood. Compiled data suggested that the main reaction taking place on the lignin moiety during biodegradation was the cleavage of β -O-4 linkages. This oxidation reaction generates lignin depolymerization, which is followed by an increase in the amount of dimmers connected by C-C and 4-O-5 linkages and the appearance of new saturated-carbons at the side chain. After longer biodegradation periods, ring-opening reactions can also occur. Depolymerization of cellulose was evaluated by preparing α -cellulose samples from biotreated wood chips. High performance size exclusion chromatography of tricarbonyl derivatives of these α -cellulose samples was also evaluated. Both, α -cellulose yield and elution profiles indicated some depolymerization of the cellulose fraction starting from the 30th day of biodegradation. This result suggests that degradation reactions started at the cellulose backbone before mineralization has been detected as glucan loss. Hydrolytic and ligninolytic enzymes were extracted from the cultures and quantified. During the first 30 days of biodegradation, high xylanolytic activities did not produce an extensive degradation of the polyoses fractions indicating that the biodegradation process was limited by the low porosity of the wood cell walls. On the other hand, some enzymatically-mediated reactions are suggested to be responsible for cellulose and lignin depolymerization at an early decay stage.

I. Introdução

A produção de celulose e papel representa um importante segmento industrial tanto no Brasil como em todo o mundo. Na década de 1990, o consumo mundial de papel e seus derivados apresentou uma taxa de crescimento anual da ordem de 3,2 % e no ano de 1999, atingiu um total de 314 milhões de toneladas (Macedo *et al.*, 2001). No caso do Brasil, no ano 2000, a produção de polpa celulósica foi de 7,6 milhões de toneladas (7º produtor mundial) e a de papel foi de 7,2 milhões de toneladas (12º produtor mundial). Parte expressiva da produção brasileira tem sido exportada e em 2000, representou 4,5% do total de recursos exportados (Tabacof, 2002- www.bracelpa.com.br)

Apesar da grande importância econômica da indústria de celulose e papel, algumas críticas ainda podem ser feitas quanto aos processos de fabricação por ela utilizados. Sem dúvida, os principais problemas associados à produção de papel e celulose estão relacionados à poluição ambiental e, no caso da produção de polpas mecânicas, ao alto consumo de energia. Dessa forma, as disposições legais na área ambiental e as demandas de mercado têm forçado os produtores a um contínuo melhoramento de seus processos.

Entre as alternativas para a redução de energia na produção de polpas mecânicas, a biopolpação tem se mostrado como uma tecnologia bastante promissora. A aplicação da biodegradação de madeira como um pré-tratamento aos processos de polpação, sob condições controladas e com fungos pré-selecionados, é conhecida como “biopolpação”. Essa tecnologia tem demonstrado grande êxito, principalmente quando utilizada previamente à polpação mecânica e termomecânica. Essas combinações têm sido denominadas de polpação biomecânica e biotermomecânica, respectivamente, e a aplicação desses bioprocessos permite considerável redução no consumo de energia durante o refinamento mecânico da madeira. Adicionalmente, as “biopolpas” apresentam propriedades mecânicas superiores às polpas mecânicas convencionais, o que permite a preparação de papéis de melhor qualidade (Leatham *et al.*, 1990; Akhtar *et al.*, 1993; Kohler *et al.*, 1997; Akhtar *et al.*, 1998; Myers *et al.*, 1988).

Os resultados obtidos com a polpação biomecânica são tão promissores que o processo já está sendo testado em escala ampliada em várias indústrias. No entanto, apesar do alto grau de conhecimento tecnológico, as bases químicas e bioquímicas relacionadas à biopolpação ainda não estão completamente elucidadas. Por exemplo, os efeitos benéficos da biopolpação são obtidos nas etapas iniciais do processo biodegradativo, quando a extensão da degradação ainda é bastante baixa (perdas de massa inferiores a 5%). Adicionalmente, vários trabalhos encontrados na literatura mostram que não há uma correlação direta entre os benefícios da

biopolpação e a extensão do processo biodegradativo (quantificado como perdas de massa e/ou de componentes específicos da madeira). Essa falta de correlação sugere que os benefícios do biotratamento dependem mais do tipo de modificação induzida na madeira (alterações estruturais e ultra-estruturais) do que da extensão da mineralização de seus componentes.

Dentro desse contexto, esse trabalho tem como objetivo principal o entendimento dos mecanismos químicos e bioquímicos, que poderiam explicar as alterações estruturais ocorridas nos principais componentes da madeira durante a etapa de biodegradação. O entendimento desses aspectos poderá direcionar a otimização do processo de biopolpação.

II. Revisão bibliográfica

II.1. Madeira: composição química e ultraestrutura

Em termos de composição química, a madeira pode ser dividida em frações de baixa e elevada (macromoléculas) massas molares (Fengel e Wegener, 1989).

A fração de baixa massa molar é formada por substâncias orgânicas, geralmente denominadas de extrativos, e substâncias inorgânicas, tratadas como cinzas (Sjöström e Westermarck, 1999). Os extrativos compreendem um grande número de compostos químicos, que podem ser extraídos com solventes orgânicos, embora alguns deles também sejam solúveis em água (Fengel e Wegener, 1989). Estes compostos são responsáveis por características como odor, cor e sabor dos lignocelulósicos e estão presentes em pequenas quantidades (de 2 a 8%) (Sjöström e Westermarck, 1999). Como principais exemplos de extrativos podemos citar: ceras, flavonóides, terpenos, lignanas e ácidos graxos, que são encontrados livres ou esterificados. Os compostos inorgânicos estão presentes em quantidades ainda menores na madeira (cerca de 1%) (Fengel e Wegener, 1989), desempenham funções relacionadas ao metabolismo das plantas e são constituídos principalmente por sulfatos, silicatos, oxalatos e carbonatos, tendo como contra-íons cálcio, potássio, magnésio e manganês (Sjöström e Westermarck, 1999).

As macromoléculas representam a quase totalidade dos tecidos vegetais e compreendem apenas três classes de compostos: celulose, polioses (hemiceluloses) e lignina (Fengel e Wegener, 1989).

A celulose é o componente mais abundante na madeira (cerca de 50%), sendo um polímero linear, parte amorfo e parte cristalino, formado exclusivamente por moléculas de anidro-glicose, que se associam por ligações β -(1-4)-glicosídicas. Estritamente, a celulose é composta por unidades monoméricas de celobiose que se repetem, apresentando sempre o oxigênio que liga os anéis glicosídicos na posição equatorial, conforme mostrado na figura 1.

Figura 1 - Estrutura de um fragmento de celulose

A massa molar da celulose varia consideravelmente ($50.000\text{--}2,5$ milhões g.mol^{-1}), dependendo da origem da amostra. Por tratar-se de um polímero linear com unidades e ligações uniformes, o tamanho das cadeias é, usualmente, especificado como grau de polimeirização, que é a razão entre a massa molar média da celulose e a massa molar de uma unidade de glicose (Fengel e Wegener, 1989). Da mesma forma que a massa molar, o grau de polimerização varia com a origem da amostra, assumindo valores altos como no algodão (15.300) e chegando a menos de 305 no Rayon (Fengel e Wegener, 1989). Deve-se ressaltar ainda que as cadeias de celulose organizam-se através de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, formando as microfibrilas. Na parede celular dos materiais lignocelulósicos, as microfibrilas de celulose estão paralelamente organizadas e encaixadas numa matriz de hemicelulose e lignina (Fengel e Wegener, 1989; Sjöström e Westermarck, 1999).

As polioses (ou hemicelulose) são compostas pelos açúcares glicose, manose e galactose (hexoses) e xilose e arabinose (pentoses), podendo ainda apresentar quantidades variáveis de ácidos urônicos e desoxi-hexoses em alguns tipos de madeira. Estes açúcares apresentam-se na forma de polímeros ramificados, de menor massa molecular que a celulose e podem ser homopolímeros (exemplo: xilana, formado por xilose) ou heteropolímeros (exemplo: glicomanana, formado por glicose e manose). O teor de polioses em diferentes tipos de madeira é bastante variável, mas pode-se admitir um valor médio de cerca de 20% (Fengel e Wegener, 1989; Sjöström e Westermarck, 1999).

A lignina é o segundo componente em maior quantidade nos lignocelulósicos e a sua presença origina toda a complexidade existente nos processos de polpação. A lignina é uma macromolécula tridimensional formada pela polimerização desidrogenativa de álcoois hidroxicinâmicos (*p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico). Devido ao processo de polimerização ser aleatório, a macromolécula de lignina possui estrutura bastante complexa, como mostra o modelo da figura 2 (Fengel e Wegener, 1989).

É importante ressaltar que os três polímeros encontram-se intimamente associados, para assim constituir o complexo celular da biomassa vegetal. Na parede celular vegetal, celulose, hemicelulose e lignina se organizam formando diferentes camadas. Desde a lamela média (ML) até o lúmen da célula, encontram-se as paredes primária (P), secundária, formada pelas camadas S_1 , S_2 , e terciária S_3 (ou T). A lignina ocorre, em maior quantidade, na parede S_2 e apresenta concentração elevada na lamela média. A hemicelulose dispõe-se rodeando as microfibrilas de celulose (Fengel e Wegener, 1989; Sjöström e Westermarck, 1999). As figuras 3a e 3b mostram as várias camadas da parede celular e ilustram como a lamela média envolve as células, funcionando como sustentador para a estrutura de uma árvore.

Figura 2. Estrutura-modelo da lignina proposta por Adler (reproduzido com modificações de Fengel e Wegener, 1989).

Figura 3. (a) Corte ilustrativo do sistema de camadas na parede das células de madeira (Fengel e Wegener, 1989). (b) Microscopia eletrônica de transmissão das células de madeira mostrando as camadas da parede celular: ML= lamela média, P= parede primária, S₁= parede secundária, S₂= parede secundária e T= parede terciária (Fengel e Wegener 1989).

Para tornar a madeira susceptível à produção de polpa celulósica e papel é necessário que se efetue a separação das fibras presentes na madeira, o que é realizado com o emprego dos processos de polpação.

Os processos de polpação podem ser divididos em duas grandes classes: os químicos e os mecânicos, que produzem fibras com características substancialmente diferentes (Akhtar *et al.*, 1997).

A polpação química envolve o uso de compostos químicos para degradar e dissolver a lignina das células de madeira, liberando assim as fibras. Os processos de polpação por via química mais utilizados nos dias de hoje são o kraft e o processo sulfito, sendo que o último encontra-se, relativamente, em desuso. As vantagens dos processos químicos são: eles toleram a presença de cascas nos cavacos, pode-se utilizar qualquer tipo de madeira e as polpas produzidas têm boa resistência mecânica; entretanto, as polpações químicas são de baixo rendimento (40-50%) e necessitam de processos de branqueamento, que empregam altas cargas de reagentes químicos, de operações de reciclagem dos licores e do tratamento de seus efluentes (Biermann, 1993).

Os processos mecânicos envolvem o uso de uma superfície abrasiva, que ocasiona o desfibramento do material lignocelulósico por atrito. Os processos mecânicos são de alto rendimento (acima de 95%), proporcionam o uso quase integral da madeira e não ocasionam a geração de efluentes de difícil tratamento. Entre as principais desvantagens desses processos estão o alto consumo de energia e a produção de papel com baixa resistência mecânica e de difícil branqueamento (Fengel e Wegener, 1989; Biermann, 1993; Sykes, 1993; Akhtar *et al.*, 1997).

A principal crítica aos processos de produção de polpa celulósica branqueada está relacionada à poluição ambiental. As disposições legais na área ambiental e as demandas de mercado têm forçado os produtores de papel e celulose a um contínuo melhoramento de seus processos, bem como a busca de tecnologias alternativas que minimizem os danos gerados ao meio ambiente. Algumas modificações no processo kraft têm levado à produção de polpas com menor teor de lignina residual, o que possibilitou o desenvolvimento de técnicas de branqueamento livre de cloro elementar (ECF) e totalmente livre de cloro (TCF) (Ferraz *et al.*, 1998). Essas tecnologias reduziram a emissão de compostos organoclorados nos efluentes de branqueamento. Entretanto, ainda há emissão de compostos voláteis de enxofre e necessidade de tratar efluentes que apresentam altas cargas de matéria orgânica. Também já foi reportado que a toxicidade crônica de efluentes de branqueamento TCF é tão alta quanto a de efluentes provenientes de processos de branqueamento convencionais com cloro

(O'Connor *et al.*, 1993). Dessa forma, o conceito de processos totalmente livres de efluentes (TEF) tem aumentado em importância e parece ser uma solução para problemas ambientais relacionados à produção de polpa e papel (Ferraz *et al.*, 1998). Outra possibilidade para reduzir o impacto ambiental causado pelos processos de polpação é a utilização de tecnologias que usam solventes orgânicos para prover a separação das fibras (processos organosolv) (Patt *et al.*, 1998; Paszner, 1998; Ferraz *et al.*, 1998, 2000b; Mendonça *et al.*, 1999).

Assim, dentro do conceito de buscar tecnologias alternativas para a indústria papelreira é que a biotecnologia tem provido contribuições importantes há muitos anos. As aplicações biotecnológicas vão do melhoramento genético de árvores até a degradação seletiva, biológica ou enzimática, das madeiras, passando pela biorremediação de efluentes e pelo biobranqueamento de polpas (Ferraz, 2001). Entre as tecnologias alternativas desenvolvidas para a indústria de celulose, a biopolpação vem mostrando resultados muito promissores. Trabalhos recentes mostram que a aplicação da biodegradação da madeira como um pré-tratamento para processos de polpação (biopolpação) pode ser acompanhada pela diminuição no consumo de energia, utilização de menores cargas químicas, aumento na velocidade de deslignificação e melhorias em algumas das propriedades do papel. (Akhtar *et al.*, 1998; Messner *et al.*, 1998; Ferraz *et al.*, 1998; 2000a; Mendonça *et al.*, 1999; 2001; 2002).

II.2. Biopolpação

Na natureza há uma grande quantidade de espécies de fungos com capacidades variadas para degradar lignina, celulose e hemicelulose. O principal critério utilizado na seleção de microrganismos para processos de biopolpação é a relação entre a perda de lignina e a perda de massa da madeira durante a biodegradação. Ou seja, quanto maior for a degradação de lignina em relação à perda de massa da madeira, maior é a seletividade do processo. Outro critério importante na seleção é a mínima degradação de celulose e hemicelulose. A primeira deve ser tão baixa quanto possível, enquanto a segunda pode variar dependendo das propriedades da polpa que se necessite (Joseleau *et al.*, 1994; Daniel, 1994).

Muitos dos trabalhos realizados sobre biopolpação tiveram base em um consórcio entre várias companhias de papel e celulose e seus fornecedores, o Laboratório de Produtos Florestais (Forest Products Laboratory) e as Universidades de Wisconsin e Minnesota, nos Estados Unidos (Akhtar *et al.*, 1998), além de estudos isolados em diversas universidades e centros de pesquisa em todo o mundo (Messner *et al.*, 1998; Ferraz *et al.*, 1998).

Os melhores resultados obtidos no uso da biodegradação de madeira para a produção de polpa celulósica e papel têm sido observados quando o pré-tratamento fúngico é aplicado

antes de uma polpação mecânica ou termomecânica (Leatham *et al.*, 1990; Akhtar *et al.*, 1993; Kohler *et al.*, 1997; Akhtar *et al.*, 1998; Myers *et al.*, 1988). Todavia, resultados bastante animadores foram obtidos quando cavacos pré-tratados biologicamente foram submetidos ao processo kraft (Oriaran *et al.*, 1996; Wolfaardt *et al.*, 1996; Ferraz *et al.*, 2000a; Mendonça *et al.*, 2001; 2002) ou organosolv (Ferraz *et al.*, 2000a; Mendonça *et al.*, 1999).

De uma maneira geral, pode-se dizer que, na polpação biomecânica (pré-tratamento de cavacos de madeira antes de um processo de polpação mecânica), os cavacos tratados biologicamente apresentam decréscimo acentuado na quantidade de energia requerida para o desfibramento e refino. Além disso, as polpas obtidas apresentam melhorias significativas em algumas de suas propriedades mecânicas. No entanto, algumas desvantagens, como a redução no rendimento e nas propriedades ópticas das polpas, devem ser mencionadas. Outro fato interessante é que a maioria dos trabalhos encontrados na literatura mostra que não há correlação direta entre a economia de energia e a melhoria das propriedades físicas das polpas com a perda de massa ou componentes ocorridos durante a etapa de biodegradação. Pelo contrário, alguns dos melhores resultados em relação à economia de energia corresponderam a madeiras provenientes de ensaios de biodegradação onde as perdas de massa foram menores que 5% (Leatham *et al.*, 1990; Akhtar *et al.*, 1993; 1997; 1998; Kohler *et al.*, 1996; Scott *et al.*, 1998).

Após o processo de biodegradação ter sido amplamente estudado como um pré-tratamento para polpações mecânicas, sua eficiência começou a ser testada em etapas anteriores a processos químicos (Oriaran *et al.*, 1990; Messner *et al.*, 1998; Mendonça *et al.*, 2001; 2002). Entretanto, pode-se dizer que, para polpas químicas obtidas a partir de madeiras biodegradadas, os maiores benefícios são observados quando a polpação é feita em condições amenas, que geram polpas de alto rendimento não susceptíveis ao branqueamento e, portanto, de baixo valor agregado.

Várias espécies de fungos foram avaliadas tendo como objetivo sua utilização em uma etapa de biodegradação seguida de deslignificação organosolv (entre elas *Ceriporiopsis subvermispora*). Os resultados obtidos até a momento indicam que a velocidade de deslignificação organosolv aumenta quando a biodegradação é aplicada como pré-tratamento. Porém, de forma semelhante à polpação biomecânica, os resultados indicam que não há correlação entre a extensão da degradação de cada polímero e o aumento da velocidade de deslignificação organosolv (Mendonça, 1997; Ferraz *et al.*, 1996; 1998).

A maioria dos trabalhos encontrados sobre biopolpação demonstra que, de uma maneira geral, o pré-tratamento biológico com fungos, tanto para processos mecânicos como químicos, traz benefícios que podem ser traduzidos como economia de energia, melhora em determinadas propriedades físicas da polpa e/ou obtenção de polpas com menor teor de lignina residual. No entanto, deve-se destacar que esses trabalhos de biodegradação com diferentes fungos de decomposição branca mostraram que não há correlação direta entre a remoção de lignina e a economia de energia e melhoria nas propriedades de resistência mecânica. Estas observações sugerem que modificações causadas na estrutura das macromoléculas da madeira, principalmente na lignina, devem ser mais importantes que a extensão da degradação (Leathan *et al.*, 1990; Akhtar *et al.* 1998; Ferraz *et. al.*, 1998; Guerra *et al.*, 2002).

Assim sendo, estudos relacionados à biodegradação da madeira e aos agentes bioquímicos responsáveis pelas reações de degradação são de grande valia para o melhor entendimento e possível otimização da biopolpação.

II.3. Biodegradação de madeira – aspectos químicos e bioquímicos

Os organismos, encontrados na natureza, mais eficientes na biodegradação de madeira são os fungos (Fengel e Wegener, 1989). Entre os fungos com capacidade de degradar madeira, os mais efetivos são: os fungos de decomposição branca ("white-rot fungi"), que degradam todos os componentes da madeira, e os fungos de decomposição parda ("brown-rot fungi"), que degradam principalmente os polissacarídeos. Podemos citar também os fungos de decomposição branca ("soft-rot fungi"), que degradam todos os componentes, porém em velocidades muito reduzidas (Kirk e Cullen, 1998). A biodegradação de madeira por esses microrganismos vem sendo atribuída a um conjunto de complexos enzimáticos e à participação de compostos de baixa massa molar - todos extracelulares. A atuação desses sistemas teria a função de transformar as macromoléculas da madeira em compostos com tamanhos reduzidos o suficiente para serem susceptíveis ao metabolismo intracelular dos fungos.

Os fungos de decomposição branca possuem, em comum, a capacidade de degradar lignina tão bem quanto os polissacarídeos da madeira. Todavia, a quantidade relativa de lignina e celulose degradadas e utilizadas por esses fungos varia de acordo com o tipo preferencial de ataque (Eriksson, 1981). Segundo Kirk e Cullen (1998), esse grupo de fungos exhibe dois tipos possíveis de ataque à madeira: o ataque simultâneo, no qual celulose,

hemicelulose e lignina são removidas; e a deslignificação, processo pelo qual o fungo degrada hemicelulose e lignina, mantendo a celulose relativamente intacta.

O sistema para **biodegradação de celulose**, típico de um fungo de decomposição branca, é formado por várias enzimas, que atuam de forma cooperativa. A hidrólise de celulose à glicose requer a presença de três tipos de enzimas: as endoglucanases (ou endo-1,4- β -glucanases), que rompem a molécula de celulose ao acaso gerando fragmentos menores; as exoglucanases (ou exo-1,4- β -glucanases), que degradam os fragmentos de menor massa molar pelas extremidades não redutoras; e as β -glicosidases (ou 1,4- β -glicosidases), que degradam a celobiose à glicose. Os diferentes grupos de enzimas atuam de forma sinérgica, causando a hidrólise completa da celulose à glicose (Higuchi, 1985; Eriksson *et al.*, 1990; Evans *et al.*, 1994).

Alguns estudos reportados sobre o modo de atuação desses complexos enzimáticos apontam para a existência de dois tipos principais de sinergismo entre as três enzimas. No primeiro estágio de reação, as endoglucanases produzem novas terminações de cadeias, o que possibilita a atuação das exoglucanases. Em um segundo estágio, as β -glicosidases removem a celobiose para evitar a inibição da atividade das exoglucanases (Wood e Wood, 1992; Eriksson *et al.*, 1990).

Em adição aos sistemas hidrolíticos descritos, alguns caminhos de degradação de celulose por oxidação têm sido reportados (Kirk e Cullen, 1998). Essas vias oxidativas estão relacionadas à produção de uma enzima, a celobiose desidrogenase (CDH), que pode sofrer um processo de proteólise e formar celobiose quinona-óxido redutase. Essas enzimas são capazes de oxidar celobiose e reduzir quinonas e/ou radicais fenoxila e parecem integrar a oxidação de celulose com a degradação de lignina (Henriksson *et al.*, 2000).

Observações ultraestruturais (Ruel e Barnoud, 1985) e dados de análises químicas (Kirk e Highley, 1973) vêm mostrando que a hemicelulose é a primeira fração de polissacarídeos a ser degradada por fungos de decomposição branca. Contudo, devido à natureza mais complexa desta fração de polissacarídeos, um conjunto de enzimas hidrolíticas bem mais amplo é requerido para a completa **biodegradação das hemiceluloses**. As enzimas que participam da degradação de hemicelulose são chamadas de hemicelulases e são classificadas de acordo com o substrato sobre o qual elas atuam. As xilanases rompem ligações glicosídicas entre unidades monoméricas de xilose; as mananases atuam sobre ligações entre moléculas de manose e as glucuronidases sobre ligações de ácidos urônicos com moléculas de açúcares. As hemicelulases são divididas em grupos: as endo-hemicelulases, que hidrolisam o polímero ao acaso liberando fragmentos de menores massas

molares; as exo-hemicelulases, que hidrolisam os fragmentos gerados pelas endo-hemicelulases; e as β -xilosidases, que hidrolisam dímeros a açúcares monoméricos (Higuchi, 1985; Eriksson *et al.*, 1990).

Um vasto grupo de enzimas parece estar associado à **biodegradação de lignina**. Entretanto, até os dias de hoje, existem inúmeras dúvidas sobre a real participação de cada grupo e a função que cada um deles exerce no processo global de oxidação, que transforma lignina em dióxido de carbono e água.

O envolvimento de fenoloxidasas, como lacases e peroxidases, na biodegradação de lignina tem sido descrito há vários anos (Ander e Marzullo, 1997). Em 1978, Kent Kirk e seus colaboradores sugeriram que a degradação de lignina seria regulada pela quantidade de nitrogênio presente e que altas concentrações deste elemento causavam inibição da degradação na maioria dos fungos de degradação branca. Usando esta descoberta, duas peroxidases ligninolíticas, batizadas de lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP), foram detectadas em culturas de *Phanerochaete chrysosporium* em concentrações limitantes de nitrogênio. Essas enzimas foram posteriormente isoladas e caracterizadas (Tien e Kirk, 1983; Kuwahara *et al.*, 1984). Hoje em dia, acredita-se que entre essas três enzimas, LiP, MnP e lacase, ao menos uma deve estar presente para efetuar a degradação de lignina (Ander e Marzullo, 1997).

LiP (EC 1.11.1.14) e MnP (EC 1.11.1.13) são glicoproteínas, que contêm ferro protoporfirínico como grupo prostético, com capacidade de oxidar compostos fenólicos em presença de peróxido de hidrogênio (Ander e Marzullo, 1997). As lacases também são glicoproteínas; contudo, seu sítio ativo contém cobre e elas oxidam substratos fenólicos com conseqüente redução de O_2 para água (Agostinelli *et al.*, 1995). Todas essas enzimas catalisam a formação de radicais através da oxidação de um substrato fenólico. Depois de formados, esses radicais podem sofrer uma série de reações não enzimáticas, que poderiam justificar as alterações químicas observadas na lignina durante a degradação em várias culturas de fungos (Ander e Marzullo, 1997). Entretanto, entre essas enzimas, somente a LiP é capaz de oxidar, de forma direta, anéis aromáticos não-fenólicos. Essa oxidação produz radicais-cátion do tipo arila, que são estabilizados através da clivagem de ligações $C\alpha-C\beta$ e/ou pela ruptura de ligações arilglicerol- β -aril éter (β -O-4) (Hammel *et al.*, 1993).

Em presença de peróxido de hidrogênio, MnP oxida Mn (II) a Mn (III), e o último oxida compostos fenólicos (Ander e Marzullo, 1997). Em presença de agentes quelantes de metais, como os ácidos oxálico e malônico, produzidos por fungos de decomposição branca durante a atividade ligninolítica, o Mn (III) é estabilizado em seu estado de alto potencial

redox (Warishi *et al.*, 1992). Quando liberado do sítio ativo, o Mn (III) quelado pode se difundir e mediar a oxidação de lignina à distância. Sabe-se também que os íons manganês regulam a expressão de ambas, LiP e MnP, e que o aumento na concentração de manganês é acompanhado de aumento na relação MnP/LiP (Bao *et al.*, 1994). Estudos recentes têm mostrado ainda que a MnP, em presença de lipídeos insaturados, Mn (II) e peróxido de hidrogênio, é capaz de degradar lignina sintética (Bao *et al.*, 1994). Esse tipo de degradação é muito importante para justificar a degradação de estruturas não fenólicas por fungos que não produzem LiP, como o *C. subvermispora*.

Apesar do considerável conhecimento adquirido a respeito das enzimas com capacidade de oxidar lignina, resultados obtidos por Hammel *et al.* (1993) mostram que a aplicação dessas enzimas na degradação de lignina e no branqueamento de polpas não é um processo simples. A relativa complexidade envolvida deve-se a dois fatores: exceto a lacase, as enzimas oxidativas envolvidas na degradação de lignina são dependentes de peróxido de hidrogênio e, além disso, todas as fenoloxidasas citadas formam, *in vitro*, radicais ou quinonas, os quais sofrem, em seguida, reações de acoplamento. Essas reações de acoplamento levam a polimerização dos compostos fenólicos presentes, ao invés de degradá-los (Sarkanen, 1991). Portanto, esses dados sugerem que, durante a degradação de lignina *in vivo*, as reações de polimerização/degradação sejam dependentes da presença de enzimas com capacidade de gerar peróxido e reguladas pela presença de outras enzimas com capacidade de reduzir radicais fenoxila e quinonas.

Uma grande variedade de enzimas tem sido proposta para suprir a necessidade de peróxido de hidrogênio durante a degradação de lignina. Uma das mais importantes candidatas é a glioxal oxidase (Kersten e Kirk, 1987), que é capaz de oxidar metabólitos extracelulares de alguns fungos de decomposição branca, como glioxal e metilglioxal, e transferir elétrons para o O₂, gerando H₂O₂. O glioxal pode ser produzido pela ação da LiP em subestruturas β-O-4 de lignina (Hatakka, 1994).

Segundo Urzúa *et al.* (1998), outra rota de formação de H₂O₂ seria através da atuação de MnP sobre o ácido oxálico, conforme mostrado na figura 4. De acordo com esses autores, pequenas quantidades de H₂O₂ em contato com a enzima MnP seriam suficientes para oxidar Mn (II) à Mn (III). O Mn (III) formado tem potencial de oxidação alto o suficiente para oxidar ácido oxálico a dióxido de carbono e radical formiato. Esse radical perde um elétron para o oxigênio, formando mais dióxido de carbono e ânion superóxido. Finalmente, em meio reacional levemente ácido, o superóxido pode se combinar com prótons, gerando H₂O₂. Esse tipo de rota de formação de H₂O₂, via oxidação de ácido oxálico, é importante para explicar a

formação de H_2O_2 por microrganismos que não são capazes de produzir a enzima “glioxal oxidase”, como o *C. subvermispota*.

Figura 4. Formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) via oxidação de ácido oxálico pelo sistema MnP/Mn (III).

Outra grande candidata à produção de H_2O_2 é a arila álcool oxidase (AAO). Esta enzima oxida álcoois benzílicos a aldeídos, transferindo elétrons ao O_2 e produzindo H_2O_2 (Kirk e Cullen, 1998). Algumas enzimas intracelulares tais como piranose-2-oxidase, metanol oxidase e acetil-CoA oxidase também podem participar da geração de H_2O_2 (de Jong *et al.*, 1994).

A biodegradação de lignina a CO_2 e H_2O é um processo complexo e dependente da extensiva despolimerização da macromolécula em compostos de baixa massa molar, susceptíveis ao metabolismo intracelular dos microrganismos. Considerando que a lignina é formada por um processo de polimerização aleatório, com formação de uma macromolécula rica em ligações arilglicerol β -O-aril éter e com poucos grupos fenólicos livres, via-se, a princípio, como bastante remota a possibilidade de sua degradação por organismos deficientes em LiP. Por isso, grande parte dos estudos efetuados com o objetivo de esclarecer os mecanismos de biodegradação de lignina fez uso de fungos capazes de produzir essa enzima.

A compilação destes estudos, que utilizaram principalmente *P. chrysosporium* e *Trametes versicolor*, levou à conclusão de pelo menos três modos principais de degradação

(Higuchi, 1985, 1990; Robert e Chen, 1989; Camarero *et al.*, 1994; Gamble *et al.*, 1994; Kirk e Cullen, 1998):

- 1) ruptura oxidativa de cadeias laterais envolvendo os carbonos α e β com a formação de ácidos carboxílicos;
- 2) ruptura de ligações β -O-aril-éter e conseqüente modificação das cadeias laterais; e
- 3) degradação de núcleos aromáticos através da abertura dos anéis.

A figura 5 mostra os principais mecanismos propostos para a degradação de lignina por fungos de decomposição branca. Essas reações baseiam-se na oxidação do anel aromático com formação de radicais catiônicos, os quais induzem a ruptura de ligações β -O-4, $C\alpha$ - $C\beta$ e oxidação do $C\alpha$, com a conseqüente degradação química que leva à formação dos intermediários mostrados na figura.

Figura 5. Vias de degradação de um substrato modelo de lignina (não fenólico) por lignina peroxidase de *P. chrysosporium*/ H_2O_2 (Kirk e Cullen, 1998). Os modelos acima explicariam as vias de oxidação iniciadas pela abstração de 1 elétron quer do anel A (rota A₁) ou B (rota A₂) com conseqüente ruptura de ligações $C\alpha$ - $C\beta$, β -O-4 e oxidação no $C\alpha$.

Por outro lado, muito pouco se pode inferir sobre o mecanismo de degradação de lignina utilizado por microrganismos deficientes em LiP. A existência de vários fungos degradadores de lignina que não produzem LiP, como *C. subvermispora*, *Panus tigrinus*, *Rigidoporus lignosus*, *Picnoporus cinnabarinus* e *Dichomitus squalens* (Kuhad *et al.*, 1997), lançou dúvidas quanto à forma com que esses microrganismos oxidam estruturas não fenólicas, uma vez que os complexos enzimáticos oxidativos produzidos nestes casos não apresentam potencial de oxidação elevados o suficiente para abstrair elétrons de anéis aromáticos. Adicionalmente, trabalhos recentes vêm apresentando dúvidas quanto à real participação das enzimas ligninocelulolíticas no processo de degradação de substratos complexos como a madeira, principalmente nas etapas iniciais de biodegradação. Esses

estudos têm mostrado que enzimas são compostos demasiadamente grandes para penetrar na parede de células de madeiras intactas em tempos curtos de degradação (Blanchette *et al.*, 1997). Por exemplo, Blanchette e seus colaboradores (1997) mostraram que durante a degradação de *Pinus sp* por *C. subvermispora* as células vão se tornando gradualmente permeáveis à insulina (5.700 g.mol^{-1}) e a mioglobina ($17.600 \text{ g.mol}^{-1}$). Contudo, a ovalbumina ($44.300 \text{ g.mol}^{-1}$), que possui tamanho similar às enzimas LiP, MnP e muitas polissacaridasas, foi permeável somente em estágios relativamente avançados de degradação (8 semanas). Por outro lado, durante a degradação seletiva de lignina, alguns estudos feitos por microscopia eletrônica têm mostrado que os fungos são capazes de remover lignina da parede celular em tempos curtos de degradação, quando os sistemas enzimáticos ainda não teriam acesso aos componentes da parede (Ruel e Barnoud, 1985; Ruel *et al.*, 1994; Blanchette *et al.*, 1997). Para justificar estas observações, alguns autores vêm propondo teorias sobre a participação de compostos de baixa massa molar, que poderiam agir nos estágios iniciais da degradação, abrindo espaço para a penetração dos complexos enzimáticos (Godell *et al.*, 1997).

Uma possibilidade para explicar a degradação de lignina efetuada por agentes de baixa massa molar, em culturas de fungos que não produzem LiP, é através do sistema lacase/mediador. Essa hipótese tem como base a capacidade das lacases associadas a mediadores atuarem sobre estruturas não fenólicas. Neste caso, a degradação seria efetuada longe da hifa por um mediador ativado pela enzima, que poderia se difundir para o interior da parede celular da madeira. Todavia, um aspecto que parece limitar esta hipótese é que, embora se possa atribuir a degradação de lignina ao mediador, esse composto seria inicialmente convertido em um radical, que não deve ser estável o suficiente para penetrar na parede celular da madeira e, portanto, permitir a degradação à distância sem a erosão da parede, como se observa em fungos seletivos para a degradação de lignina. Outra questão relacionada a biodegradação induzida por lacase é a detecção de um mediador natural, uma vez que a maior parte dos trabalhos relacionados a essa enzima utiliza mediadores sintéticos (Thurston, 1994).

No caso específico do basidiomiceto *C. subvermispora*, alguns trabalhos indicam que a peroxidação de lipídeos poderia ser um processo mediador que permitisse as MnPs degradar estruturas não fenólicas à distância (Kapich *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 2000). Neste caso, os ácidos graxos insaturados produzidos durante o crescimento do fungo seriam peroxidados através de uma reação induzida por MnP, como mostrado na figura 6. Essa hipótese nasceu da compilação dos esforços de alguns grupos de pesquisa americanos e japoneses. Inicialmente, o grupo de Hammel (Jenssen *et al.*, 1996 ; Srebotnik *et al.*, 1997; Kapitch *et al.*, 1999)

comprovou que os produtos de degradação de modelos de lignina biodegradados por *C. subvermispora* e *P. chrysosporium* eram bastante semelhantes. Em outras palavras, esses trabalhos demonstraram, de forma inequívoca, que o fungo *C. subvermispora*, que não produz LiP, poderia degradar lignina através de um mecanismo de abstração de um elétron proveniente de unidades não fenólicas. Nesse trabalho, os autores propõem duas alternativas para explicar os mecanismos de degradação observados: em condições de fermentação sólida, o fungo em questão seria capaz de produzir LiP, cuja detecção seria inviável devido a inúmeras possibilidades de interferência entre compostos derivados da madeira e presentes nos extratos com o álcool veratrílico, usado para medir LiP; e a degradação estaria associada com a peroxidação de lipídeos iniciada por Mn^{3+} oriundo da ação da MnP.

Quase de maneira simultânea, o grupo de Enoki (Enoki *et al.*, 1999; 2000) conseguiu demonstrar a produção de diversos ácidos graxos em culturas de *C. subvermispora*. Nesses trabalhos, os autores observaram que os ácidos eram produzidos, principalmente, em estágios iniciais de cultivo (2 semanas) e que, após esse período, suas concentrações decresciam com o aumento do tempo de biodegradação. Os dados reportados nesses trabalhos mostraram também que a diminuição dos teores de ácidos graxos é seguida pelo aparecimento de hidroperóxidos orgânicos. Esses dados levaram os autores a relacionar a formação de hidroperóxidos orgânicos com a ação de Mn^{3+} (oriundo da oxidação de Mn^{2+} por MnP) sobre ácidos graxos, seguido da adição de oxigênio aos radicais alila formados (figura 6). Posteriormente, o mesmo grupo (Watanabe *et al.*, 2000) demonstrou que há formação de diversos radicais, incluindo o radical acila, por ação de MnP sobre ácido linoleico. A formação desses radicais poderia ocorrer, longe da hifa, pela decomposição dos hidroperóxidos formados, justificando a biodegradação longe de onde estariam localizados os complexos enzimáticos impermeáveis à parede celular.

Figura 6. Formação de radicais livres via peroxidação de lipídeos induzida por MnP (Watanabe *et al.*, 2000)

Finalmente, Kapich *et al.* (1999) demonstraram que os radicais peroxila oriundos da peroxidação de ácido linoleico por MnP de *C. subvermispora* podem oxidar modelos não fenólicos de lignina pela abstração de um elétron (e um próton) do carbono alfa, levando à decomposição do modelo (Figura 7).

Figura 7. Degradação de um substrato modelo de lignina (não fenólico) pelo sistema MnP, ácido linoleico e H_2O_2 . O modelo explica a via de oxidação $\text{C}\alpha$ (A) e a clivagem $\beta\text{-O-4}$ (B). Ambas as reações seriam iniciadas pela abstração de um hidrogênio benzílico do composto modelo através da ação de um radical peroxila ($\text{ROO}\cdot$) gerado pelo sistema MnP/ácido linoleico/ H_2O_2 (Kapich *et al.*, 1999).

Portanto, pode-se concluir que o processo de degradação dos componentes da madeira por fungos de decomposição branca e os agentes responsáveis pela degradação ainda não estão completamente esclarecidos. Adicionalmente, a maioria dos experimentos com o objetivo de esclarecer as bases químicas e bioquímicas da biodegradação são realizados com compostos modelo de lignina, embora alguns trabalhos reportando a caracterização de substratos lignocelulósicos biodegradados também possam ser encontrados. No entanto, nestes casos, os experimentos são conduzidos em condições de fermentação submersa, com co-substrato e utilizando longos períodos de tratamento. Obviamente, essas condições são demasiadamente distintas das condições utilizadas nos experimentos de biopolpação e as respostas obtidas não são, necessariamente, extrapoláveis.

Assim sendo, o estudo das alterações estruturais ocorridas nos componentes da madeira durante a biodegradação, principalmente nos estágios iniciais de tratamento, pode contribuir de maneira significativa para a elucidação das bases químicas da biopolpação. Todavia, poucos métodos de análises têm mostrado eficiência dentro destes propósitos, devido, principalmente, à natureza aleatória e a diversidade de ligações químicas existentes entre as unidades que compõem a estrutura da lignina (Ede e Brunow, 1992; Guerra *et al.*, 2001; 2002). Por isso, a utilização de técnicas mais sofisticadas e informativas se faz necessária. (Ede e Brunow, 1992; Kilpeläinen *et al.*, 1994; Ede *et al.*, 1996; Marita *et al.*, 1999; Ralph *et al.*, 2000).

Abaixo, apresentar-se-á uma revisão das principais informações fornecidas pela aplicação de diferentes técnicas de caracterização dos componentes da madeira.

II.4. Técnicas de caracterização dos componentes da madeira

II.4.1. Análise da lignina

A grande complexidade estrutural da lignina faz dela uma das macromoléculas naturais mais difíceis de se caracterizar quimicamente. A maior parte da lignina não pode ser removida da matriz lignocelulósica sem que haja alterações estruturais durante a etapa de extração. Além disso, nenhum método de caracterização *in situ* é informativo o suficiente para ser empregado de forma conclusiva sem o auxílio de outras metodologias. Portanto, a melhor maneira de estudar a estrutura dessa macromolécula parece ser através do emprego de várias metodologias complementares, que forneçam resultados corroborativos. A seguir, discutir-se-á alguns dos métodos desenvolvidos recentemente para a caracterização de lignina.

II.4.1.1. DFRC

O método denominado de DFRC (do inglês “Derivatization Followed by Reductive Cleavage”) tem sido descrito na literatura como um método novo e altamente seletivo para a degradação das ligações β -O-4 presentes na estrutura da lignina (Lu e Ralph, 1997a, Lu e Ralph 1997b; Lu e Ralph 1998a; Lu e Ralph, 1998b).

O método de degradação em questão requer dois passos distintos (figura 8). Inicialmente, a lignina é solubilizada por bromação e acetilação com brometo de acetila (AcBr) e em seguida há quebra das ligações β -O-4 através da redução catalisada por zinco em pó (Lu e Ralph, 1998 a). Finalmente, uma acetilação adicional é utilizada para acetilar os grupos fenólicos livres produzidos pela quebra das ligações β -O-4. Assim, a reação de lignina e compostos modelo de lignina com AcBr em ácido acético resulta, inicialmente, na completa dissolução da macromolécula com formação de α -bromo derivados de lignina, que possuem um esqueleto do tipo β -éter-Br (composto 1 na figura 8). O próximo passo é a eliminação catalisada por Zn (em solução de dioxano/ácido acético/água), que origina pares de isômeros do acetato de 4-hidroxicinamila (composto 2 na figura 8). Esses monômeros podem ser identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa (CG/MS) e quantificados por um detetor de ionização de chama (CG/FID) (Lu e Ralph, 1998a).

Recentemente, Peng *et al.* (1998) reportaram a detecção dos principais dímeros liberados pela reação de DFRC. Nesse trabalho, os autores isolaram e identificaram dímeros provenientes das estruturas β -1, β - β , β -5, 5-5 e 4-O-5. Isso significa que a aplicação de reações de DFRC permite a determinação das quantidades de monômeros e dímeros contidos nas ligninas de madeiras biodegradadas. Portanto, com o emprego desta metodologia pode-se

avaliar se a biodegradação é acompanhada da degradação de ligações β -O-4 ou clivagem de ligações C α -C β e, conseqüente, do aumento no teor de estruturas condensadas.

Figura8. Quebra seletiva de ligações β -O-4 durante a degradação por DFRC (Lu e Ralph, 1998a)

Uma vantagem adicional da técnica de DFRC é a possibilidade de aplicação direta na madeira ou em ligninas isoladas. Isso origina dados complementares, uma vez que a aplicação *in situ* não requer etapas de isolamento da lignina.

II.4.1.2. RMN (Ressonância Magnética Nuclear)

Apesar da natureza randômica e heterogênea das amostras de lignina isoladas, muitos de seus detalhes estruturais podem ser revelados por experimentos de ressonância magnética nuclear (Ede *et al.*, 1996). RMN- ^{13}C é, reconhecidamente, um método de alta resolução e uma poderosa ferramenta para a caracterização estrutural de oligômeros e polímeros (Ralph *et al.*, 1998). Sem dúvida, parte dos benefícios da técnica de RMN- ^{13}C deve-se à quase exata concordância entre os deslocamentos químicos observados em compostos modelos de baixas massas molares e em polímeros (Marita *et al.*, 1999). Embora essa correspondência não seja, geralmente, extrapolável para experimentos de prótons (RMN- ^1H), muitas unidades estruturais presentes em dímeros de lignina apresentam deslocamentos químicos aproximados aos observados em oligômeros e ligninas isoladas (Ralph *et al.*, 2000). Além disso, o emprego de trímeros e oligômeros de lignina vem auxiliando no refinamento dos dados de RMN e revelando maiores detalhes da inacreditável complexidade conformacional da lignina (Marita *et al.*, 1999).

Não obstante a grande utilidade das técnicas de RMN- ^{13}C e ^1H , esses métodos apresentam algumas limitações como a grande sobreposição de sinais e a necessidade de utilização de compostos modelos para a atribuição dos deslocamentos (Kilpeläinen *et al.*, 1994). Adicionalmente, a largura dos sinais nos espectros de prótons é maior que as

constantes de acoplamentos, o que impede o uso das informações a respeito dos acoplamentos ^1H - ^1H . A presença de carboidratos contaminantes, que quase sempre estão associados às amostras de lignina, dificulta ainda mais a interpretação dos espectros. Essas limitações têm aumentado a utilização das técnicas de RMN bidimensionais (2D-RMN) no estudo de amostras de lignina isoladas de diferentes origens (Kilpeläinen *et al.*, 1994; Ede *et al.*, 1996, Marita *et al.*, 1999; Ralph *et al.*, 2000). Com isso, espera-se que o uso de diferentes seqüências de pulsos possa aumentar a confiança nas conclusões a respeito da presença ou ausência de determinadas unidades na estrutura da lignina.

Entre as centenas de experimentos de RMN disponíveis em duas dimensões, alguns vêm se destacando como mais informativos e úteis nos estudos de materiais lignocelulósicos. De uma maneira geral, as técnicas de 2D-RMN podem ser divididas em hetero- e homonucleares.

II.4.1.2.1. Correlações Heteronucleares

Os experimentos de 2D-RMN heteronucleares caracterizam-se por prover informações a respeito dos acoplamentos entre prótons e carbonos. Entre as técnicas heteronucleares utilizadas para caracterização de lignina, podemos destacar as seguintes:

HMQC (“Heteronuclear Multiple Quantum Coherence”). É, de longe, o tipo de experimento em duas dimensões mais informativo a respeito dos detalhes estruturais da lignina. A técnica de HMQC possibilita a obtenção de informações a respeito das correlações ^1H - ^{13}C , via constante de acoplamento $^1J(\text{C},\text{H})$. Esta técnica apresenta alta resolução para separar sinais sobrepostos nos espectros RMN- ^1H e ^{13}C e é, por isso, uma importante ferramenta para a observação de alterações estruturais (Capanema *et al.*, 2001).

Os experimentos HMQC têm sido muito importantes para a detecção conclusiva das principais estruturas presentes na lignina e indispensáveis para a identificação de estruturas novas ou presentes em menores proporções (Ralph *et al.*, 2000). Uma vez que essa técnica permite a observação de sinais provenientes de acoplamentos entre prótons e carbonos diretamente ligados, o espectro torna-se bastante claro e informativo, como pode ser observado no espectro apresentado na figura 9.

Com o HMQC da figura 9 pode-se concluir, por exemplo, que o $\text{H}\alpha$ da estrutura C, em ressonância a aproximadamente 4,75 ppm, está correlacionado com o $\text{C}\alpha$, a 86,2 ppm; o $\text{H}\beta$, em 3,1 ppm, correlaciona-se com o $\text{C}\beta$, em 55,2 ppm; e o $\text{C}\gamma$, em 72,4 ppm, correlaciona-se com dois $\text{H}\gamma$ quimicamente diferentes em 3,9 e 4,27 ppm. Esse tipo de informação permite

a atribuição inequívoca de vários sinais, como os referentes aos acoplamentos em ligações β -O-4, β - β , β -5, resíduos de álcool cinâmico e metoxilas, entre outros. Essa técnica ainda permite a clara observação dos sinais referentes às estruturas dibenzodioxocinas. Entretanto, apesar das grandes vantagens observadas, o espectro da figura 9 mostra que, mesmo utilizando-se técnicas em duas dimensões, algumas sobreposições de sinais ainda são evidentes, tais como as observadas na região δ_H/δ_C 3,5-4,5/60-70 ppm.

Figura 9. HMQC de uma ligninia sintética (Marita *et al.*, 1999). Os padrões de cores no espectro referem-se às estruturas mostradas na parte inferior da figura. As estruturas são: **A**, β -aril éter (β -O-4); **B**, fenilcumaranas (β -5); **C**, resinol (β - β); **D**, dibenzodioxocinas (5-5 e β -O-4/ α -O-4); **E**, α,β -diaril éter, **F**, α -ceto- β -aril éter; **X**, (*E*)-álcool cinâmico, e sinais em amarelo, metoxila.

HMBC (“Heteronuclear Multiple Bond Coherence”). Enquanto os experimentos do tipo HMQC são importantes para a obtenção de informações a respeito das correlações de núcleos diretamente acoplados, o HMBC é extremamente útil por permitir a obtenção de informações das conectividades em longas distâncias. Segundo Ralph *et al.* (2000), as constantes de acoplamentos C-H entre 2 e 3 ligações covalentes estão na faixa de 2-15 Hz e os experimentos HMBC são, tipicamente, realizados com tempos de evolução da ordem de 80-

120 ms, o que corresponde a constantes de acoplamentos da ordem de 4-6 Hz. Isso significa que, se o espectro for adquirido com vários tempos de evolução, pode-se fazer com que todas as correlações C-H dentro de uma rede de até 3 ligações sejam visíveis. Em algumas circunstâncias, isso é bastante útil pois a redundância dos resultados torna-se um diagnóstico conclusivo de certas estruturas, como pode ser observado no exemplo da figura 10.

Figura 10. Ampliação de um HMBC mostrando as correlações do H α em estruturas do tipo β -O-4. (A) lignina do tipo siringil e (B) lignina do tipo guaiacil.

Como esperado, a ampliação da região de conectividade de um H α em estrutura β -O-4 mostra que esse próton se correlaciona com os carbonos β e γ da cadeia lateral e com os carbonos 1, 2 e 6 do anel aromático, uma vez que todos esses carbonos estão dentro da mesma rede de ligações do H α (Ralph *et al.*, 2000). Esse tipo de informação é bastante útil e pode ser utilizado para a caracterização de alterações estruturais nas ligninas degradadas. No exemplo da figura 10, os experimentos HMBC foram utilizados para diferenciar ligninas do tipo G e S (G e S representam ligninas do tipo guaiacil e siringil, respectivamente, onde lignina guaiacil possui uma metoxila por anel aromático, enquanto a tipo siringil apresenta duas metoxilas por anel aromático). Isso é possível porque os carbonos C2 e C6 apresentam equivalência em anéis do tipo S (ressonância em 105 ppm) e, por isso, entram em ressonância em posição diferente da observada em estruturas do tipo guaiacil, como pode ser visto na figura 10 (Marita *et al.*, 1999).

HMQC-TOCSY (“Heteronuclear Multiple Quantum Coherence - Total Correlation Spectroscopy”).

Outro tipo de experimento, que está sendo cada vez mais difundido nos estudos estruturais de lignina, é o espectro em 2D conhecido como HMQC-TOCSY (Ralph *et al.*, 2000). Embora menos sensível que o HMQC, a redundância de informações e a clara identificação das redes de acoplamentos tornam esse tipo de experimento bastante útil. Nos espectros do tipo HMQC (figura 9), as atribuições de sinais só podem ser feitas com o amplo conhecimento dos deslocamentos químicos de carbonos e hidrogênios em cada tipo de estrutura. Em contraste, em um experimento HMQC-TOCSY (figura 11), o pequeno conhecimento do deslocamento químico de determinado próton já permite, devido à redundância dos resultados, a rápida identificação de diferentes estruturas (Ralph *et al.*, 2000). Por exemplo, sabendo-se que unidades do tipo β -éter acetiladas possuem $H\alpha$ em ressonância em aproximadamente 6 ppm, $H\beta$ em 5 ppm, e dois $H\gamma$ entre 4 e 4,6 ppm, conclui-se rapidamente que os contornos em azul, figura 11, são provenientes de unidades do tipo β -O-4.

II.4.1.2.2. Correlações Homonucleares

A utilização de experimentos homonucleares também vem sendo descrita como importante ferramenta para a elucidação estrutural de ligninas de diferentes procedências. Esse tipo de experimento permite a observação das conectividades 1H - 1H e, devido às limitações dos espectros de prótons em 1D, é muito valioso para aqueles que estudam química de ligninas (Ede *et al.*, 1996).

A exemplo dos experimentos heteronucleares, a mais importante técnica homonuclear permite a análise das correlações entre um determinado próton em ressonância e todos os prótons diretamente conectados aos átomos de carbono vizinhos. Esse tipo de experimento é chamado de COSY (CORelation SpectroscopY) (Ede *et al.*, 1996). Em adição aos COSY, os experimentos chamados de TOCSY (ou HOHOHA), também apresentam grande utilidade. Nesse tipo de espectro, pode-se observar a presença das correlações em longas distâncias. Em outras palavras, em um experimento TOCSY, um determinado próton em ressonância pode “ver” todos os prótons presentes numa mesma rede de ligações (distantes até 3 ligações covalentes). Neste caso, a redundância dos contornos permite uma fácil identificação dos sinais, apesar da maior complexidade do espectro.

Figura 11. HMQC-TOCSY de uma lignina isolada por Marita *et al.* (1999). Os padrões de cores são os mesmo utilizados na figura 9.

Em resumo, enquanto a combinação das novas técnicas de 2D-RMN (hetero- e homonucleares) permite a identificação das principais unidades estruturais (β -O-4, β -1, β - β , 5-5, α -O-4, α -carbonilas, etc) (Kilpeläinen *et al.*, 1994; Ede *et al.*, 1996), a técnica de DFRC permite a quebra seletiva das ligações β -O-aril éter com liberação de quantidades quantificáveis de monômeros e dímeros provenientes da lignina (Lu e Ralph, 1997a; 1997b; 1998a; 1998b). Dessa forma, o uso combinado dessas técnicas recentes com outras técnicas já bem estabelecidas de análises estruturais como FTIR, UV/visível, permeação em gel (GPC), oxidação com CuO e análise de grupos funcionais, poderia gerar um diagnóstico preciso das alterações estruturais ocorridas durante um processo de biodegradação da madeira.

II.4.2. Análise dos polissacarídeos

Devido a sua relativa simplicidade química, restringe-se a análise dos polissacarídeos à hidrólise ácida e à determinação da distribuição de massas molares das holo- e α -celulose, que são isoladas a partir do material de origem. Segundo Browning (1967), dá-se o nome de holocelulose ao produto da reação de cloração de células de madeira, seguida de extração com soluções alcalinas, ou ao resíduo de deslignificação por clorito. Ainda segundo esse autor, o nome holocelulose é utilizado para indicar a presença das frações de celulose e hemicelulose contidas no material de partida. Por outro lado, Cross e Bevan (1921), em seus estudos pioneiros sobre celulose, utilizaram soluções concentradas de hidróxido de sódio para isolar

aquilo que eles inicialmente denominaram de “celulose normal”. Posteriormente, esses autores definiram como α -celulose a porção da holocelulose insolúvel em hidróxido de sódio 17,5 %.

O maior problema associado à determinação da distribuição das massas molares dos polissacarídeos é a sua conversão em derivados susceptíveis à análise por cromatografia de exclusão (Schroeder e Haigh, 1979). Os processos utilizados para a conversão dos polissacarídeos em derivados podem ser divididos em dois tipos: aqueles em que a reação de derivatização ocorre na presença de lignina; e aqueles em que a maior parte da lignina é removida em uma etapa prévia (preparação da holocelulose). Entre os processos desenvolvidos na presença de lignina, a nitração apresenta o maior potencial de utilização. Entretanto, a baixa estabilidade dos nitratos, a considerável insolubilidade das xilanas, a dificuldade de uma reação de nitração completa e as reações de despolimerização ocorridas durante a reação têm contribuído consideravelmente para a seleção de métodos de derivatização a partir do preparo de holocelulose (Schroeder e Haigh, 1979).

O método de derivatização empregado neste trabalho está representado na figura 12. Este método consiste na derivatização dos polissacarídeos com isocianato de fenila, para formar o derivado tricarbanilado (Schroeder e Haigh, 1979). Entre os métodos de derivatização a partir da holocelulose, este é o que tem tido maior destaque, uma vez que seu uso permite a completa derivatização sem gerar reações de despolimerização (Wood *et al.*, 1986). Logo, a distribuição de massas molares (MWD) do derivado tricarbanilado é representativa daquela que seria observada no polissacarídeo original (Wood *et al.*, 1986).

A determinação da distribuição de massas molares ou do grau de polimerização envolve a separação dos polissacarídeos de acordo com o seu raio hidrodinâmico. Na cromatografia por exclusão, os polissacarídeos são separados através da passagem por uma coluna cromatográfica, que é empacotada com um material poroso, no qual a capacidade de penetração dos polissacarídeos é inversamente proporcional ao seu raio hidrodinâmico (Forss *et al.*, 1988). Assim, as moléculas maiores são eluídas em tempos mais curtos que as moléculas menores, pois as primeiras possuem menor capacidade de penetração nos poros da fase estacionária.

Figura 12. Representação da reação de derivatização de celulose à celulose tricarbanilado (CTC)

II. 5. Considerações finais

Considerando aquilo que foi dito até o momento, pode-se observar que, apesar do nível de desenvolvimento tecnológico da biopolpação, muitas questões ainda permanecem abertas sobre o tema. Por exemplo, as bases químicas e bioquímicas da biopolpação ainda não estão completamente elucidadas, isto é, as alterações estruturais causadas na madeira pela etapa de biodegradação, bem como os agentes bioquímicos envolvidos, ainda não são totalmente conhecidos. Por isso, o estudo das alterações estruturais e das enzimas envolvidas durante a etapa de biodegradação é de grande importância para o conhecimento e otimização da biopolpação.

III. Objetivos

O objetivo principal desse trabalho foi caracterizar os polímeros residuais presentes em madeiras biodegradadas pelo fungo de decomposição branca *Ceriporiopsis subvermispora*. Para atingirmos esse objetivo, foram realizadas as seguintes etapas:

- Biodegradação de cavacos de *P. taeda* pelo fungo de decomposição branca *C. subvermispora* pelos períodos de 15 a 90 dias;
- Determinação da perda de massa decorrente do tratamento biológico e quantificação dos principais componentes da madeira;
- Extração e quantificação das principais enzimas relacionadas ao processo de biodegradação da madeira (celulases, β -glicosidase, xilanases, lacases e peroxidases);
- Preparação e determinação da composição química da holo- e α -celulose proveniente das madeiras biodegradadas;
- Determinação da distribuição de massas molares da holo- e da α -celulose;
- Caracterização das amostras biodegradadas por técnicas degradativas realizadas *in situ* (DFRC e oxidação com óxido de cobre); e
- Obtenção e caracterização química e espectroscópica das ligninas extraídas das madeiras antes e após a biodegradação.

IV. Materiais e métodos

IV.1. Fungo

O fungo utilizado neste estudo foi o basidiomiceto de decomposição branca *C. subvermispora* que foi repicado e mantido em placas de Petri com meio contendo 2% de extrato de malte e 2% de ágar e cultivado a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$. A partir destas placas foi obtido o inóculo para o tratamento da madeira.

IV.2. Preparo das madeiras para os experimentos de biodegradação

A madeira utilizada nos experimentos de biodegradação foi *P. taeda* (com cerca de 30 anos), que foi gentilmente doada pelo Parque Estadual de Campos do Jordão, SP. O tronco de *P. taeda* foi manualmente transformado em cavacos com aproximadamente $2,5 \times 1,5 \times 0,2$ cm. Os cavacos foram secos ao ar e estocados em ambiente seco à temperatura ambiente.

Previamente aos experimentos, os cavacos, utilizados para a preparação de inóculo e para os ensaios de biodegradação em biorreator, foram mantidos em água por um período de 16 horas. O excesso de água foi drenado e os cavacos esterilizados a 121°C por 15 minutos.

IV.3. Biodegradação em biorreator

Os biorreatores utilizados nos experimentos de biodegradação foram recipientes de polipropileno de alta densidade com capacidade para 20 L (Figura 13). A injeção de ar no sistema foi feita através de um compressor convencional a um fluxo de $0,23 \text{ m}^3/\text{h}$. O ar foi pré-esterilizado e umidificado por passagem em solução aquosa de KMnO_4 e água esterilizada, respectivamente, e, posteriormente, filtrado em filtro de $0,2 \mu\text{m}$.

Os experimentos de biodegradação foram realizados utilizando-se cavacos pré-colonizados com o fungo como inóculo.

IV.3.1. Inoculação a partir de cavacos cultivados com *C. subvermispora*

a) Preparo do inóculo: 200 mL de meio contendo 2% de extrato de malte foram adicionados em Erlenmeyers de 2 L. Em seguida, 4 g (2%) de ágar foram adicionados e o meio esterilizado, a 121°C , por 15 minutos. Ao meio solidificado foram inoculados 3 fragmentos de ágar com micélio fúngico ($1 \times 1 \text{ cm}$) provenientes de placas de petri previamente cultivadas. Após a inoculação, os frascos foram mantidos a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$. O crescimento do micélio foi observado e, após completa cobertura da superfície do ágar (cerca de 7 dias), foram

adicionados 50 g de cavacos previamente esterilizados. Essa cultura foi mantida a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 30 dias.

Figura 13. Biorreator de 20 L com cavacos inoculados e sistema de aeração.

b) Inoculação do biorreator: A operação foi feita em câmara estéril de fluxo laminar. O biorreator foi carregado com um total de 2,0 kg (base seca) de madeira previamente esterilizada (item IV.2). Para a determinação da perda de massa e detecção das atividades enzimáticas, 5 cilindros especiais (sondas), com cerca de 50 g de madeira em cada, foram colocados em diferentes pontos do biorreator. Esses cilindros (5 cm de diâmetro x 9 cm de altura) foram confeccionados com tela de aço inox de malha de 0,84 mm. A carga foi feita adicionando-se um terço do total da madeira seguido da adição de 50 g de inóculo, mais um terço da madeira seguido da adição de outros 50 g de inóculo. Finalmente, foi adicionado o terço final da madeira e o reator fechado. O biorreator carregado foi agitado manualmente para homogeneização do inóculo e conectado ao sistema de injeção de ar. A injeção de ar foi permanente ao longo do tempo de biodegradação. Os experimentos foram mantidos em sala termostaticada a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ até o final de cada período de biodegradação.

Após períodos definidos de biodegradação, os biorreatores foram abertos e descarregados. Os cavacos foram lavados manualmente com água, para remoção do micélio superficial, e secos ao ar. Para a determinação da perda de massa ocorrida durante a

biodegradação, 2 das 5 sondas inseridas em cada biorreator foram abertas e lavadas com água. A perda de massa foi calculada como a massa seca inicial menos a massa seca final dividido pela massa seca inicial.

IV.4. Determinação da composição química das amostras de madeira

As amostras de madeira foram moídas em um moinho de facas até passarem por uma malha com perfurações de 0,75 mm e, em seguida, extraídas, por 6 horas, em aparelho Soxhlet com etanol 95%. A determinação do teor de extrativos foi feita pela diferença entre a massa de madeira antes e após a extração.

O teor de cada componente (lignina, glucana e polioses) foi determinado a partir da hidrólise do material com ácido sulfúrico 72% (Mendonça *et al.*, 1997). Cerca de 300 mg de amostra, seca ao ar, foram tratados com 3 mL de ácido sulfúrico 72% (peso/peso) por uma hora a 30°C. Em seguida, o conteúdo do tubo de ensaio foi transferido, quantitativamente, para um erlenmeyer de 250 mL com o auxílio de 79 mL de água. A mistura foi autoclavada, a 121°C, resfriada e filtrada em filtros de vidro sinterizado de porosidade número 3, que haviam sido previamente secos, a 105°C, e pesados. O material retido foi lavado, com 2 porções de 5 mL de água, e seco até massa constante. Esse resíduo seco corresponde a lignina insolúvel em ácido (lignina Klason). O filtrado foi avolumado, a 100 mL, e analisado, quanto aos teores de açúcares, em um sistema de cromatografia líquida (CLAE). A análise cromatográfica foi feita, em um cromatógrafo líquido de alta eficiência, utilizando-se uma coluna BIORAD AMINEX HPX-87H, com H₂SO₄ 5 mM a 0,6 mL/min como eluente e detecção por índice de refração (Shimadzu, modelo C-R7A).

A concentração de açúcares foi determinada através de curva de calibração preparada com padrões, de grau analítico, secos sobre sílica e vácuo.

O teor de lignina solúvel em ácido foi determinado através da leitura da absorbância em 205 nm (GBC - Cintra 20) de uma diluição (usualmente 1:5) do hidrolisado, tomando-se como padrão uma absorvidade de 105 L/g.cm (Mendonça *et al.*, 1997).

IV.5. Determinação da perda de componentes durante a biodegradação

O cálculo da perda de componentes (glucana, polioses e lignina) foi feito de acordo com a equação 1:

$$Pc(\%) = \left(\frac{mci - mcf}{mci} \right) \times 100 \quad (\text{equação 1})$$

onde:

Pc : perda de componentes

mci : % componente na madeira controle x massa madeira inicial

mcf : % componente na madeira biodegradada x massa madeira final

Os cavacos contidos em duas sondas diferentes por reator foram utilizados para o cálculo da composição das madeiras e os resultados apresentados são as médias com seus respectivos desvios da média.

IV.6. Determinação das atividades enzimáticas

Para determinar as atividades enzimáticas produzidas pelo fungo, a madeira biodegradada, contida em 3 das 5 sondas, foi removida do biorreator e extraída com 100 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5 contendo 0,01% de Tween 80. As extrações foram realizadas sob agitação (120 rpm), a 12 °C, por períodos de 3 horas. Extrações sucessivas foram feitas até que o último extrato apresentasse menos que 10% da atividade total extraída nas etapas anteriores. Posteriormente, os cavacos foram separados do meio de extração por filtração em cadinhos de vidro sinterizado. Os controles foram extraídos da mesma forma e utilizados na preparação de brancos enzimáticos.

As atividades enzimáticas relacionadas à degradação dos principais componentes da madeira foram determinadas no extrato enzimático filtrado. Neste caso, cavacos provenientes de três sondas foram utilizados e os dados reportados são as médias com seus respectivos desvios padrão.

IV.6.1. Atividades enzimáticas relacionadas à degradação de celulose.

Celulase : a atividade celulolítica total do extrato enzimático foi determinada, utilizando-se papel filtro Whatman N° 1 como substrato, de acordo com o método padrão descrito por Mandels *et al.* (1976). Os açúcares liberados do papel de filtro pela ação do complexo celulolítico foram determinados como açúcares redutores pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). Uma unidade de atividade celulolítica é definida como a quantidade, em μ moles, de açúcares redutores liberados por minuto (UI). Os açúcares redutores foram informados como glicose por comparação dos valores de absorbância com uma curva padrão deste açúcar.

β -glicosidase : esta atividade foi determinada, utilizando-se o substrato *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (pNPG), de acordo com o método padrão descrito por Tan *et al.* (1987). O *p*-nitrofenol liberado do pNPG após a ação da β -glicosidase foi determinado pela absorbância em 410 nm e a atividade expressa em μ moles de *p*-nitrofenol liberado por minuto (UI).

IV.6.2. Atividades enzimáticas relacionadas à degradação de hemicelulose

Xilanase : a atividade de xilanase foi determinada pela liberação de açúcares redutores a partir de xilana de “birch”, seguindo-se o método padrão descrito por Bailey *et al.* (1992). Os açúcares foram determinados pelo método do DNS e a atividade informada como μ moles de xilose liberados por minuto.

IV.6.3. Atividades enzimáticas relacionadas à degradação de lignina

Lacase : a atividade de lacase foi determinada utilizando-se uma solução etanólica de siringaldazina (em concentração final no meio reacional de 0,1 mM) como substrato. A reação de oxidação foi feita em tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 5, a temperatura ambiente (25-30° C). A reação foi seguida pela formação do produto de oxidação da siringaldazina a 525 nm ($\epsilon_{525} = 65.000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) (Szklař et al., 1989).

Fenoloxidase total: a atividade fenoloxidase total foi determinada pela mesma metodologia da lacase, com adição de H_2O_2 (em concentração final de 0,2 mM no meio reacional) de. A atividade das peroxidases foi calculada como a diferença entre fenoloxidase total e a lacase.

As atividades dessas enzimas foram determinadas pela velocidade de oxidação do substrato, monitorado espectrofotometricamente durante 5-10 min em 525 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como 1 μ mol de produto formado por min (UI).

As atividades de todas as enzimas foram reportadas como a somatória das UI totais de cada extração por quilograma de madeira originalmente adicionada nas sondas dos biorreatores.

IV.7. Análise dos polissacarídeos residuais

IV.7.1. Obtenção de Holocelulose-clorito

A holocelulose foi preparada segundo metodologia descrita para holocelulose-clorito (Browning, 1967). O método baseia-se na solubilização da lignina por soluções ácidas de clorito de sódio.

Aproximadamente 5 g de madeira moída (0,295 mm) foram extraídas com etanol 95%, por 6 horas, em extrator Soxhlet. Para a preparação de holocelulose, 2 g de madeira, previamente extraída, foram adicionados a 64 mL de água destilada, 0,2 mL de ácido acético glacial e 0,6 g de clorito de sódio e o frasco colocado em um banho a 70-80°C. A cada uma hora de reação, foram adicionados mais 0,2 mL de ácido acético e 0,6 g de clorito de sódio. Após 4 horas de reação, a amostra foi resfriada em banho de água e gelo, até 10°C, filtrada, em filtro de vidro sinterizado Schott-Duran N° 2 e lavada com acetona. O resíduo assim obtido foi seco até massa constante a 105°C. Após secagem, o resíduo foi analisado quanto aos teores de glucana, polioses e lignina (item IV.4.3). O rendimento de holocelulose foi corrigido com base no teor de lignina residual e expresso como a porcentagem de holocelulose-clorito livre de lignina.

IV.7.2. Obtenção de α -celulose

A α -celulose é definida como a fração de polissacarídeos insolúvel em solução de hidróxido de sódio 17,5% (Browning, 1967). A α -celulose foi preparada, a partir de holocelulose, seguindo-se a mesma metodologia descrita no item IV.7.1. No entanto, antes da secagem a 105°C, a holocelulose lavada com acetona (1 g) foi colocada em banho a $20 \pm 0,2^\circ\text{C}$ e macerada, durante 1 minuto, com 5 mL de hidróxido de sódio 17,5%. Ainda sob maceração, novas alíquotas de 3,4 mL de hidróxido de sódio 17,5 % foram adicionadas ao final do primeiro minuto e ao final de 1 minuto e 45 segundos. Após esse procedimento, a mistura foi mantida estacionária por mais 3 min. Posteriormente, adicionaram-se 3,3 mL de NaOH 17,5% a essa mistura e agitou-se por 10 min. Mais 10 mL de hidróxido de sódio 17,5% foram adicionados em porções de 3,3 mL após 2,5, 5 e 7,5 min. Deixou-se então a mistura reagir por mais 30 min e adicionaram-se 33,3 mL de água destilada, a 20°C, e deixou-se reagir novamente por 30 min. A mistura foi filtrada em filtro de vidro Schott-Duran N° 2 previamente seco e tarado. O resíduo insolúvel (α -celulose) foi lavado com 25 mL de hidróxido de sódio 8,3% a 20° C. A α -celulose foi então lavada 5 vezes com porções de 50 mL de água destilada, a 20°C, e o filtrado foi separado e armazenado. O resíduo sólido foi lavado com mais 400 mL de água destilada e depois com ácido acético 2 M, sem sucção, por 5 min. Após esse tempo, removeu-se o ácido com água destilada e a α -celulose assim preparada foi seca ao ar. Uma porção da α -celulose foi utilizada para a determinação da composição química (item IV.4.3), outra para a determinação de umidade e outra para a determinação da distribuição de massa molar. A quantidade de α -celulose foi expressa em porcentagem da madeira inicial, após correção para o teor de lignina residual.

IV.7.3. Distribuição de massas molares da α -celulose

A distribuição de massas molares da α -celulose foi feita pelo método descrito por Wood *et al.* (1986). Cerca de 0,2 g de α -celulose (seca a temperatura ambiente) foram colocados em balão de fundo redondo contendo 50 mL de piridina anidra. A essa mistura foram adicionados 0,4 mL de isocianato de fenila e o balão fechado e mantido em banho termostatzado, a 80 °C, por 48 horas, com agitação ocasional. Ao final do período de reação, o balão foi removido do banho e 4 mL de metanol foram adicionados para destruição do excesso de isocianato de fenila. Cerca de 5 mL da solução amarelo-claro resultante foram transferidos para um balão de 50 mL e a piridina foi evaporada, a 40 °C, sob pressão reduzida. O produto assim obtido foi dissolvido em 15 mL de acetona; uma alíquota de 2 mL da solução em acetona foi transferida para um tubo de ensaio e a acetona evaporada por um fluxo de nitrogênio. O material residual foi redissolvido em 10 mL de tetraidrofurano (THF) e essa solução foi analisada por cromatografia de exclusão em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu, modelo C-R7A), utilizando-se um sistema de 4 colunas com tamanhos de poro de 100, 500, 1000, e 10000 Å (Alltech- GPC polar de 250 mm x 10 mm), acopladas em série, tendo THF, a um fluxo de 1 mL/min, como eluente. O material eluído foi detectado e um detector de UV/visível, ajustado para a leitura em 235 nm.

IV.8. Análise da lignina residual

IV.8.1. Oxidação da madeira

As amostras de madeira, controle e biodegradadas, foram oxidadas com CuO, utilizando-se o método descrito por Chen (1989). A madeira moída (0,295 mm), extraída por 6 horas com etanol 95%, foi seca a vácuo sobre pentóxido de fósforo. O reator foi carregado com 400 mg de madeira (controle ou biodegradada), 2 g de óxido de cobre, 15 mL de hidróxido de sódio aquoso 2M e 100 mg de sulfato férrico amoniacal ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (utilizado como trapeador de oxigênio) e borbilhado com nitrogênio. A reação foi conduzida a 170 °C por 3 horas. Terminado o tempo de reação, o reator foi resfriado em banho de água e gelo e seu conteúdo lavado, com uma solução de hidróxido de sódio 1M, e filtrado em papel de filtro Whatman n ° 42. O filtrado recolhido foi acidificado, a pH 1, com ácido clorídrico 6M. A mistura ácida foi extraída três vezes com 40 mL de éter etílico previamente tratado com solução saturada de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ para remoção de peróxidos. Os extratos etéreos foram combinados e secados com sulfato de sódio anidro. O volume de éter etílico foi reduzido a 5 mL por evaporação a vácuo. Nesta etapa, a amostra foi tratada novamente com sulfato de sódio para retirada da água residual. A amostra concentrada foi transferida para um

vial, previamente seco e pesado, com ajuda de éter etílico tratado com $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e sulfato de sódio. O éter foi removido por um fluxo de nitrogênio; o resíduo pesado e o rendimento de oxidação calculado como a massa do material extraído com éter etílico dividido pela massa de lignina presente na amostra de madeira.

IV.8.1.1. Análise dos Produtos de Oxidação por GC/MS

Os produtos de oxidação, secos sob atmosfera de nitrogênio, foram dissolvidos em 3 mL de piridina e uma alíquota de 0,2 mL dessa solução foi transferida para um vial contendo 0,77 mL de padrão interno (fluoranteno dissolvido em piridina na concentração de 1000 ppm). A mistura foi derivatizada com 0,5 mL de N,O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) durante 1 hora a 60°C e, em seguida, resfriada até temperatura ambiente (Guerra *et al.*, 2000). Um μL da mistura reacional foi analisado por cromatografia gasosa acoplada a um detector de massas Finnigan, modelo MAT GCQTM, calibrado com perfluorotributilamina (PFTBA) na faixa de varredura de m/z de 20 a 900. Os espectros foram medidos após ionização das moléculas por impacto de elétrons (70 eV). Uma coluna cromatográfica DB-5 (de 30 m x 0,25 mm) foi utilizada para a análise; a pressão de hélio na entrada da coluna foi mantida constante e correspondeu a um deslocamento linear de 33,0 cm/s (aproximadamente 1 mL/min). A fonte de ionização, a interface e a linha de transferência foram aquecidas a 170°C, 220°C e 275°C, respectivamente.

Para melhor separação dos compostos presentes na amostra, otimizou-se uma rampa de temperatura na coluna cromatográfica. O forno foi mantido a 60°C por 0,5 min e, posteriormente, aquecido, a uma taxa de 30°C/min, até 130°C. Esta temperatura foi mantida por 1 min e o forno aquecido novamente, a 3,5°C/min, até a temperatura final de 210°C, que foi mantida por 10 min.

A quantificação dos produtos de oxidação foi feita em um equipamento Varian, modelo 3400 CX, equipado com um detector de ionização de chama (GC/FID), que foi mantido à temperatura constante de 300°C. As condições de análise foram as mesmas descritas acima para GC/MS, exceto que N_2 , a uma velocidade linear de 70 cm/s, foi utilizado como gás de arraste. A quantidade de cada monômero foi determinada usando uma curva de calibração onde a razão entre área do padrão autêntico e do padrão interno foi plotada como uma função da concentração do respectivo monômero.

IV.8.2. DFRC (do inglês “Derivatization Followed by Reductive Cleavage”)

O método de clivagem seletiva de ligações β -O-4 (DFRC) foi realizado conforme descrito por Lu e Ralph (1997a). A um balão de fundo redondo, contendo 0,1 g de madeira,

previamente moída, a 0,295 mm, e extraída, por 6 horas, em aparelho Soxhlet com etanol 95%, foram adicionados 15 mL de uma solução-estoque de brometo de acetila:ácido acético (20:80). O balão foi fechado e colocado em banho termostatzado, a 50°C, por 3 horas. Ao final deste período, o solvente foi completamente evaporado, a 35°C, sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi misturado com 15 mL de uma solução-estoque de dioxano:ácido acético:água (15:12:3) e, após completa dissolução, adicionaram-se 0,25 g de zinco em pó. A mistura foi agitada, a temperatura ambiente, por 16 horas e, em seguida, transferida, quantitativamente, para um funil de separação com 50 mL de diclorometano e 50 mL de cloreto de amônio saturado. O pH da fração aquosa foi ajustado, para menor que 3, pela adição de ácido clorídrico 3% e a amostra vigorosamente misturada. A fração orgânica foi separada e armazenada, enquanto a fração aquosa foi extraída, duas vezes, com diclorometano (2 x 50 mL de diclorometano). As frações orgânicas separadas foram combinadas e secas com sulfato de sódio anidro. O filtrado foi concentrado, até aproximadamente 5 mL, a 35 °C, sob pressão reduzida. A solução concentrada foi acetilada, por 3 horas, com 10 mL de anidrido acético:piridina (1:1). A acetilação foi interrompida pela adição de metanol e os componentes voláteis evaporados, a 35 °C, sob pressão reduzida. Imediatamente após a evaporação, o padrão interno (1 mL de uma solução 1000 ppm de fluoranteno em diclorometano) foi adicionado e a mistura analisada por cromatografia gasosa, utilizando-se detectores de massa (GC/MS) e ionização de chama (GC/FID).

IV.8.2.1. Análise dos produtos de DFRC por cromatografia gasosa

Os produtos da reação de DFRC (item IV.8.2) foram analisados no mesmo sistema cromatográfico descrito no item (IV.8.1.1). Para melhor separação dos compostos presentes na amostra, utilizou-se a rampa de temperatura descrita por Lu e Ralph (1997a). O forno foi mantido a 140°C por 60 segundos e, posteriormente, aquecido a uma taxa de 3° C/min até 240°C. Esta temperatura foi mantida por 1 min e o forno foi novamente aquecido, a 30°C/min, até a temperatura de 290°C, a qual foi mantida por 12 minutos.

Para a quantificação dos produtos de DFRC, utilizou-se um cromatografo Varian, modelo 3400 CX, com detector de ionização de chama (GC/FID), que foi mantido à temperatura constante de 300°C. As condições de análise foram as mesmas descritas acima para GC/MS, exceto que o He foi substituído por N₂ (velocidade linear de 70 cm/s). A quantidade de cada monômero foi determinada usando uma curva de calibração onde a razão entre área do padrão autêntico e do padrão interno (fluoranteno 1000 ppm) foi plotada como uma função da concentração do respectivo álcool.

IV.8.3. Extração de lignina de madeira moída (LMM)

A LMM de *P. taeda* foi preparada de acordo com o procedimento descrito por Lawther *et al.* (1996). As amostras de madeira foram moídas em um moinho de facas (0,833 mm), extraídas, por 6 horas, em aparelho Soxhlet com etanol 95% e secas a vácuo sobre P_2O_5 . Após a secagem, cerca de 92 g de madeira extraída foram umedecidas com tolueno e colocadas em um moinho de bolas, mantendo-se a razão entre a massa de bolas e a massa de madeira em aproximadamente 20. A moagem foi feita durante 130h a temperatura ambiente (não ultrapassou 35°C) em um moinho com 96 rpm. Para compensar perdas de tolueno, o moinho foi aberto para adição do solvente a cada 24h. Após o tempo de moagem, o moinho foi descarregado e a madeira moída foi seca ao ar.

A madeira moída e seca foi extraída com dioxano 96% (cerca de 10 mL de dioxano 96% por 1g de madeira moída) em agitador, a 120 rpm, por 24h, a temperatura ambiente e na ausência de luz. As soluções foram filtradas em papel de filtro Whatman 42 e o filtrado foi separado e guardado a 4°C. O processo de extração foi repetido mais uma vez com o resíduo da primeira filtração. Os filtrados foram misturados e evaporados sob pressão reduzida, a 35°C, e, posteriormente, secos a vácuo sobre hidróxido de potássio e pentóxido de fósforo. As preparações foram realizadas em duplicatas e os resultados são apresentados como as médias dos rendimentos junto com seus respectivos desvios da média.

IV.8.4. Obtenção da lignina liberada enzimaticamente (LLE)

A extração de LLE foi feita adicionando-se, aos frascos que continham o resíduo da obtenção de LMM, previamente lavados com água para remover o dioxano, um volume conhecido de uma solução de celulase (1,4-[1,3;1,4]- β -D-glucan-4-glucanohidrolase - Sigma tipo 1) em tampão acetato pH 4,5. A concentração e o volume da solução enzimática adicionados foram calculados de forma a manter as razões entre o número de unidades enzimáticas/massa de madeira, massa de madeira/volume de solução e número de unidades enzimáticas/volume de solução constantes em 38,3 UI/g, 0,1 g/mL e 3,83 UI/mL, respectivamente. Em intervalos de tempo aleatórios, a agitação era interrompida e uma amostra coletada para determinação da quantidade de glicose liberada (item IV.8.4.1). O procedimento foi repetido até não haver mais liberação de glicose no meio. Após a estabilização da liberação de glicose, o hidrolisado foi filtrado em papel de filtro Whatman 42, e o filtrado descartado. O material retido no filtro foi lavado exaustivamente com água destilada e o procedimento repetido usando-se nova solução enzimática. Na segunda etapa, as razões utilizadas foram: 21,75 UI/g, 0,1 g/mL e 2,17 UI/mL. Ao final da segunda etapa, o

hidrolisado foi novamente filtrado e o resíduo da hidrólise enzimática foi lavado por 2 vezes com água destilada em agitador, por 15 minutos, e filtrado novamente. Após a lavagem, o material foi extraído com dioxano/H₂O 96%, durante 15 horas, sob agitação (120 rpm) e temperatura ambiente, mantendo-se a proporção de 10 mL de dioxano por grama de madeira. Após esse período, houve nova filtração e o filtrado foi separado e armazenado a 4°C. O procedimento foi repetido com nova solução de dioxano/H₂O 96%. Os filtrados das duas etapas foram combinados e evaporados, a 35°C, a pressão reduzida e, posteriormente, secos a vácuo sobre pentóxido de fósforo até peso constante, para dar origem ao que chamamos de “Lignina Liberada Enzimaticamente extraída com dioxano 96%” (LLE96).

O resíduo da extração de LLE96 foi então submetido à nova extração com uma solução de dioxano/H₂O 50% (2 vezes). O procedimento utilizado foi idêntico ao descrito acima e deu origem ao que chamamos de LLE50.

IV.8.4.1. Determinação da quantidade de glicose hidrolisada

A determinação da quantidade de glicose liberada enzimaticamente foi realizada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). Aliquotas de 50 µL foram retiradas da amostra durante a hidrólise por celulasas, diluídas com 5 mL de água destilada e filtradas em papel de filtro Whatman 42. Cerca de 500 µL do filtrado foram combinados com 1 mL de tampão acetato 50 mM pH 4,5 e 3 mL de DNS. A mistura foi fervida por 5 minutos, resfriada e lida, em 540 nm, contra um branco contendo água destilada no lugar da amostra. A quantidade de glicose foi calculada contra curva de calibração de glicose.

IV.8.4.2. Determinação da atividade da celulase

A atividade celulolítica total da celulase comercial (Sigma tipo 1) foi determinada utilizando-se papel de filtro Whatman N° 1 como substrato (Mandels *et al.*, 1976), seguindo-se a metodologia descrita no item IV.6.1.

IV.8.5. Análise da distribuição de massas molares de LMM e LLEs

A distribuição de massas molares foi determinada utilizando-se um sistema cromatográfico com uma coluna de 57cm x 1,8cm preenchida com uma suspensão de Sephadex G-50 em hidróxido de sódio 0,5 M. A fase móvel foi hidróxido de sódio 0,5 M, com fluxo de 0,4 mL/min. Injetaram-se 400 µL de amostra, a uma concentração final de 2 g/L, conforme descrito por (Forss *et al.*, 1988). Frações de 4,0 mL foram coletadas e a absorbância de cada uma foi lida em 280 nm.

A coluna cromatográfica foi previamente calibrada com proteínas de massas molares conhecidas (tabela 1). Além dessas proteínas, foram usados, para a determinação dos volumes de exclusão (V_0) e permeação total (V_t), Blue Dextran (2.000.000 Da) e acetona (58 g.mol⁻¹), respectivamente. As proteínas foram aplicadas na coluna nas mesmas condições da amostra e seus volumes médios de eluição transformados em um valor que independe do tamanho da coluna (K_d), conforme a equação 2:

$$K_d = (V_{el} - V_0) / (V_{ac} - V_0) \quad (2)$$

onde:

V_{el} = volume de eluição

V_0 = volume de exclusão total

V_{ac} = volume de permeação total

Tabela 1. Proteínas utilizadas na calibração da coluna cromatográfica e suas respectivas massas molares.

Proteínas e outros marcadores	Massa molar (g. mol ⁻¹)	volume de eluição (mL)
Blue dextran	2.000.000	58,3
Albumina	66.000	58,9
Anidrase Carbônica	29.000	61,9
Citocromo C	12.400	78,9
Aprotinina	6.500	84,3
Acetona	58	164

IV.8.5.1. Cálculo dos valores de M_w , M_n e dispersibilidade

Os cromatogramas obtidos foram integrados em frações de 4 mL, utilizando-se uma planilha de cálculo feita no programa Microsoft - EXCEL 5.0. Os valores de M_w (massa molar média em massa aparente), M_n (massa molar média em número aparente) e M_w/M_n (dispersibilidade) foram calculados pelas equações 3, 4, e 5, respectivamente (Guerra, 1998).

$$M_w = \frac{\sum a_i \times M_i}{\sum a_i} \quad (3)$$

$$M_n = \frac{\sum a_i}{\sum a_i / M_i} \quad (4)$$

$$D = M_w / M_n \quad (5)$$

onde:

a_i = área do cromatograma sob uma fração "i". (os valores de cada fração foram de 4 mL)

M_i = massa molar da fração "i" obtido por interpolação na curva de calibração (item IV.8.5).

IV.8.6. Determinação do perfil de eluição dos carboidratos contidos nas LMM e LLEs

A eluição de carboidratos contaminantes das ligninas isoladas foi feita conforme descrito por Dubois *et al.* (1976). Após a determinação da absorbância em 280 nm (item IV.8.5), 2,0 mL de cada fração eluída da coluna cromatográfica foram transferidos para tubos de ensaio, 50 µL de fenol 80% foram inseridos e, em seguida, adicionou-se, vagarosamente, 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Os tubos de ensaio foram agitados e resfriados, à temperatura ambiente, por cerca de 30 minutos. A absorbância foi lida em 490 nm, contra uma solução contendo 2,0 mL de hidróxido de sódio 0,5 M no lugar da amostra.

IV.8.7. Análise espectroscópica das ligninas na região do UV/visível

Prepararam-se soluções-estoque de LMM e LLE96 em dioxano 96% (aproximadamente 0,5 mg/mL). Para as LLE50 foi utilizado dioxano 50% nas mesmas concentrações das outras ligninas. Estas soluções foram sucessivamente diluídas com dioxano 50% e seus espectros UV/visível foram registrados em um espectrofotômetro GBC-Cintra 20. Foram calculadas as absortividades das ligninas, a cada 5 nm, na região de 240-450 nm e os valores obtidos foram graficados em função do comprimento de onda.

IV.8.8. Análise espectroscópica das ligninas na região do infravermelho

Foram preparadas pastilhas, através da compactação (a 10-12 kgf/cm² sob vácuo) de KBr contendo 0,5% de lignina e, a seguir, foram registrados os espectros na região de 4.000 a 800 cm⁻¹ em um espectrofotômetro FTIR Nicolet 520.

IV.8.9. Determinação de carbonilas (estruturas tipo coniferaldeído e acetoguaiacona).

Misturaram-se 2,0 mL de uma solução de lignina (soluções-estoque do item IV.8.7) e 1,0 mL de uma solução 0,05M de boroidreto de sódio (190 mg de boroidreto em 100 mL de hidróxido de sódio 0,03M). A mistura foi deixada no escuro, por 45 horas, a temperatura ambiente e, em seguida, os espectros diferenciais foram registrados na região de 200-400 nm, contra uma solução não reduzida da amostra nas mesmas concentrações (Adler e Marton, 1959).

O cálculo do teor de grupos carbonila (estruturas do tipo acetoguaiacona e coniferaldeído) foi realizado através da resolução das duas equações abaixo (Adler e Marton, 1959; Ferraz, 1991):

$$\Delta E_{310 \text{ nm}} = 10500X + 9400Y \quad (6)$$

$$\Delta E_{342 \text{ nm}} = 19800X + 2020Y \quad (7)$$

onde:

$\Delta E_{310 \text{ nm}} = A_{310} \times \text{massa molar da fórmula } C_9 \text{ da lignina em questão} / C_{\text{lig}}$;

$\Delta E_{342 \text{ nm}} = A_{342} \times \text{massa molar da fórmula } C_9 \text{ da lignina em questão} / C_{\text{lig}}$;

$X = \text{n}^\circ \text{ de } \gamma\text{-carbonilas } \alpha\text{-}\beta \text{ insaturadas} / C_9 \text{ e}$

$Y = \text{n}^\circ \text{ de } \alpha\text{-carbonilas} / C_9$

A_{310} e A_{342} = absorbâncias, nos respectivos comprimentos de onda, no espectro da solução sem redução contra a solução reduzida (ambas em mesma concentração), como mostrado na figura 14; e

C_{lig} = concentração de lignina, em g/L.

Os índices numéricos das equações são valores obtidos a partir da determinação de carbonilas em compostos modelos de lignina (acetoguaiacona e coniferaldeído) (Adler e Marton, 1959).

Figura 14. Espectro UV diferencial utilizado para a determinação de carbonilas nas ligninas isoladas de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispota*.

IV.8.10. Determinação de hidroxilas fenólicas.

Utilizou-se o método da espectroscopia UV diferencial, que consiste na varredura, em um espectrofotômetro de duplo feixe, de uma solução de lignina em meio básico contra a mesma solução em meio ácido. A determinação de OH fenólico é feita com base na absortividade média de compostos modelos de lignina, conforme descrito por Wexler (1964).

Uma solução de lignina foi preparada através da diluição de 1,0 mL das soluções estoque do item IV.8.7 em 10 mL de dioxano 50%. O pH das soluções foi ajustado, a 13, com hidróxido de sódio 1,0 M. Um branco de cada amostra foi feito na mesma diluição, porém em pH 1, ajustado pela adição de ácido clorídrico 1,0 M. A varredura foi realizada utilizando-se um espectrofotômetro GBC - Cintra 20. O teor de hidroxilas fenólicas foi calculado pela equação 8:

$$\% \text{ OH fenólico} = (\Delta_{\text{Abs } 250 \text{ nm}} \times 0,192) / C_{\text{lig}} \quad (8)$$

onde:

% OH fenólico = porcentagem de hidroxilas fenólicas;

$\Delta_{\text{Abs } 250 \text{ nm}}$ = absorbância da solução em 250 nm, subtraída da absorbância relativa à linha de base do espectro, como mostrado na figura 15;

0,192 = relação de porcentagem de OH fenólico por absortividade em 250 nm (L/g.cm), determinada para vários compostos modelos de lignina (Wexler, 1964); e

C_{lig} = concentração da solução de lignina, em g/L.

Figura 15.Exemplo de um espectro UV diferencial utilizado na determinação de OH-fenólico nas ligninas isoladas de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora*.

IV.8.11. Análise elementar

A análise elementar das ligninas isoladas de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora* foi realizada em um equipamento Parkin Elmer (CHN analyser) no Laboratório de Recursos Renováveis da Faculdade de Ciências Químicas da Universidade de Concepción, Chile.

IV.8.12. DFRC

O método de clivagem seletiva de ligações β -O-4 (DFRC) foi realizado conforme descrito no item IV.8.2. A única diferença foi a utilização de 10 mg de amostra (LMM ou LLE) no lugar da madeira moída. Os volumes dos reagentes foram estequiometricamente corrigidos e a reação com zinco feita por apenas 1 hora.

IV.8.12.1. Análise dos monômeros liberados pela reação de DFRC

A análise dos monômeros liberados pela reação de DFRC foi realizada no “Dairy Forage Research Center”, sob a coordenação do professor Dr. John Ralph. As condições empregadas foram idênticas às descritas por Lu e Ralph (1997a).

IV.8.12.2 Análise dos dímeros liberados pela reação de DFRC

A análise dos dímeros liberados pela reação de DFRC foi realizada conforme descrito anteriormente (item IV.8.2.1). No entanto, devido à baixa quantidade de dímeros, as amostras foram injetadas sem fracionamento com hélio na entrada da coluna (modo splitless) e o filamento foi ligado após 12 minutos. A temperatura inicial da coluna (150°C) foi mantida por 1 minuto e, após esse período, utilizou-se uma rampa de aquecimento (10°C/min) até a

temperatura final de 300°C. A identificação dos produtos foi feita de acordo com os dados reportados por Peng *et al.* (1998).

IV.8.13. Acetilação e espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN-¹H e RMN-¹³C foram obtidos de amostras de lignina acetiladas. A acetilação foi feita com cerca de 100 mg de lignina (LMM ou LLE) dissolvidas em 2 mL de anidrido acético e 2 mL de piridina (Lenz *et al.*, 1968; Ferraz e Durán, 1995). A mistura foi borbulhada por 15 minutos com nitrogênio e o frasco selado. O sistema foi deixado à temperatura ambiente, por 12h, no escuro, com agitação magnética. Após esse período, adicionou-se etanol para degradar o excesso de anidrido e a mistura foi evaporada, sob pressão reduzida, com sucessivas coevaporações com etanol 95%.

Os espectros de ressonância magnética foram obtidos com as amostras acetiladas e redissolvidas em acetona-d₆. Empregou-se, como referência interna, o sinal central do solvente (δ_H 2.04 ppm, δ_C 29,80 ppm) (Marita *et al.*, 1999). Os experimentos de RMN bidimensionais foram obtidos por sequências de pulsos padrões (Bruker) das versões HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence), HMQC-TOCSY (HMQC- total correlation spectroscopy) and HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence). Os espectros COSY foram adquiridos com 30 ms de “mixing time” e os DEPT-135 com sequências ajustadas para se observar sinais positivos para CH e CH₃ e negativos para CH₂.

V. Resultados e Discussão

O presente trabalho abordou a caracterização dos polímeros residuais presentes em amostras de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora* em condições de fermentação no estado sólido. Para facilitar o entendimento, os resultados das etapas de caracterização estão separados em seções. A primeira delas traz os resultados obtidos pelo uso de técnicas de caracterização *in situ*. A segunda seção trata da extração e caracterização da lignina residual. A terceira etapa de resultados aborda a extração e a caracterização dos polissacarídeos residuais presentes nas amostras e, por fim, a quarta e última etapa trata da extração e quantificação dos complexos enzimáticos relacionados à biodegradação dos componentes da madeira produzidos durante a biodegradação.

V.1. Técnicas de caracterização *in situ*

A primeira seção de resultados, que aborda as técnicas de caracterização efetuadas diretamente sobre a madeira, apresenta a grande vantagem de não envolver etapas prévias de isolamento dos componentes. Por isso, nesta seção, descarta-se a possibilidade de haver degradação das macromoléculas residuais devido ao emprego de etapas de remoção dos componentes presentes após o processo de biodegradação.

V.1.1. Perda de massa e de componentes em *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora*

A biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispora* foi monitorada por períodos que variaram de 15 a 90 dias. Na tabela 2 são apresentados os resultados das perdas de massa e de componentes da madeira em função do tempo de biodegradação. As composições químicas do controle e das amostras biodegradadas encontram-se no apêndice 1.

A tabela 2 mostra que a perda de massa das madeiras aumentou em função do tempo de biodegradação, indicando uma atividade metabólica continuada do fungo. As perdas variaram de 2,2% a 13,8% no período compreendido entre 15 e 90 dias de degradação. A remoção de extrativos por *C. subvermispora* foi intensa, alcançando cerca de 50 % aos 60 dias de biodegradação, o que está de acordo com dados descritos na literatura. Córdova (1999) estudou a degradação de *Eucalyptus grandis* por *C. subvermispora* e reportou perdas de 33 e 42% de extrativos aos 60 e 90 dias de biodegradação, respectivamente. Fischer *et al.* (1996) também observaram uma diminuição de 27% no teor de extrativos de *P. taeda* degradado por *C. subvermispora* após duas semanas de tratamento. Estes autores sugeriram uma possível relação entre a extensa remoção de extrativos com alguns benefícios encontrados na utilização deste fungo em um pré-tratamento para a obtenção de polpa kraft.

Tabela 2 – Perdas de massa e de componentes durante a biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispora*.

perda de massa e de componentes (%)	tempo de biodegradação (dias)			
	15	30	60	90
massa	2,2 ± 0,5	3,0 ± 0,4	9 ± 2	13,8 ± 0,7
glucana	< 2*	< 2*	< 2*	< 2*
polioses	1,4 ± 0,3	1,6 ± 0,1	7 ± 3	32 ± 3
lignina	9,6 ± 0,6	10,7 ± 0,3	16,6 ± 0,1	21 ± 1
extrativos	28,4 ± 2	32 ± 2	48 ± 1	65 ± 4

* menor que 2%.

A degradação dos principais componentes da madeira em função do tempo de biodegradação mostrou um perfil característico de degradação induzido por fungos de decomposição branca seletivos para lignina. Pode-se observar que a perda de lignina foi intensa e crescente, partindo de 9,6% nos primeiros 15 dias para 10,7% e 16,6% aos 30 e 60 dias, respectivamente, atingindo 21% aos 90 dias. Por outro lado, a perda de glucana foi baixa e permaneceu praticamente constante durante os 90 dias de biodegradação. A perda de polioses também foi aproximadamente constante até os primeiros 30 dias de biodegradação, sofrendo um aumento acentuado de 1,6 % aos 30 dias, para 7 % aos 60 e chegou a 32% aos 90 dias de biodegradação. Mineralização elevada de polioses em períodos longos de degradação também foi reportada por Aktar *et al.* (1998), que avaliaram a degradação de *Pinus* por *C. subvermispora* e encontraram cerca de 48% de perda de hemicelulose após 90 dias de tratamento. Ferraz *et al.* (2000 b) também estudaram a degradação de *Pinus radiata* por *C. subvermispora* (mesma cepa utilizada neste trabalho) e reportaram a perda de 22% de polioses após 90 dias de degradação. A análise conjunta destes resultados de perdas de polioses reportados em diferentes estudos evidencia a grande habilidade para degradação de polioses em tempos longos de biodegradação apresentado por *C. subvermispora*.

A comparação entre as perdas de lignina e extrativos (tabela 2) mostra que ambos os componentes apresentaram um padrão semelhante de degradação. Este resultado sugere que a grande capacidade de degradar extrativos apresentada por *C. subvermispora* possa estar relacionada à capacidade do fungo em degradar polifenóis, o que, provavelmente, estaria associado a atuação dos mesmos agentes bioquímicos que degradam lignina.

V.1.2. Oxidação com óxido de cobre

A oxidação da madeira de *P. taeda*, controle e degradada por *C.subvermispora*, com óxido de cobre foi realizada em meio alcalino, conforme descrito por Chen (1989). A identificação dos monômeros liberados como produtos das reações de oxidação foi feita através da comparação dos espectros de massa obtidos com aqueles contidos na biblioteca NIST (Finningan GCQ) e na literatura (Lapierre *et al.*, 1988). A figura 16 mostra um cromatograma reconstituído de íons totais obtido para os produtos da oxidação de *P. taeda* controle.

Figura 16. Cromatograma reconstituído de íons totais dos produtos de oxidação por CuO em meio alcalino de *P. taeda* controle.

A tabela 3 apresenta os monômeros identificados nos produtos de oxidação da madeira por CuO. O monômero responsável pelo sinal mais intenso encontrado no cromatograma de *P. taeda* foi identificado como vanilina (composto 1). Segundo Chen (1989), este é o principal produto de degradação de uma madeira de conífera por CuO em meio alcalino. O mecanismo de degradação de estruturas aril-propano pelo CuO ainda não foi completamente esclarecido. No entanto, alguns trabalhos encontrados na literatura mostram que o CuO, assim como outros óxidos metálicos, é um oxidante que retira um elétron, gerando radicais fenoxila (figura 17). Os radicais fenoxila assim formados reagiriam com outra molécula de CuO para formar uma metileno-quinona, que se rearranjaría, formando a vanilina (Chang e Allan, 1971).

Tabela 3. Monômeros identificados nos produtos de oxidação de *P. taeda* controle e biodegradado por *C. subvermispora*

pico N ^o	íon molar ^a	estrutura
1	224	
2	238	
3	312	
4	282	
5	222	padrão interno

a = massa molar do derivado trimetilsililado

Além de vanilina, outros monômeros foram identificados nos produtos de oxidação obtidos. Os compostos 2, 3 e 4 foram identificados como acetovanilona, ácido vanílico e ácido *p*-hidroxibenzoico, respectivamente. O baixo sinal encontrado para o ácido *p*-hidroxibenzoico (no detector FID) (composto 4) pode ser atribuído às baixas quantidades de estruturas derivadas de unidades do tipo H (*p*-hidroxicumaril) em ligninas de coníferas. Adicionalmente, deve-se enfatizar que produtos derivados de unidades do tipo siringil (unidade S) não foram detectados em nenhum dos produtos de oxidação. O composto 3 é um derivado minoritário de oxidação completa de vanilina até ácido vanílico, assim como a acetovanilona (composto 2) é um composto oriundo da oxidação incompleta da cadeia propânica (Chen, 1989).

Figura 17. Mecanismo proposto para a degradação de lignina por oxidação com óxido de cobre em meio alcalino (Chang e Allan, 1971).

As madeiras biodegradadas durante diferentes períodos de tempo apresentaram cromatogramas qualitativamente idênticos ao do controle.

A quantificação dos compostos identificados por espectrometria de massa é mostrada na tabela 4, juntamente com os rendimentos totais de oxidação obtidos por gravimetria, conforme descrito no item IV.8.1.

Tabela 4. Rendimentos de oxidação e quantificação dos monômeros identificados nos produtos de oxidação de *P. taeda* controle e biodegradado por *C. subvermispora*.

resposta (%) $\pm$ DP*	controle	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
rend.total	36 $\pm$ 1 (a)	37 $\pm$ 2 (a)	35 $\pm$ 2 (a)	35 $\pm$ 1 (a)	35 $\pm$ 1 (a)
vanilina	9,5 $\pm$ 0,6 (b)	9,3 $\pm$ 0,6 (b)	8,9 $\pm$ 0,8 (b)	8,1 $\pm$ 0,6 (c)	5,6 $\pm$ 0,3 (d)
acetovanilina	2,1 $\pm$ 0,4 (e)	2,4 $\pm$ 0,4 (e)	2,0 $\pm$ 0,1 (e)	2,0 $\pm$ 0,1 (e)	2,1 $\pm$ 0,3 (e)
ácido vanílico	2,8 $\pm$ 0,4 (f)	2,1 $\pm$ 0,5 (f)	2,4 $\pm$ 0,2 (f)	2,8 $\pm$ 0,5 (f)	3,6 $\pm$ 0,3 (f)
ácido <i>p</i> - hidroxibenzóico	0,8 $\pm$ 0,1 (g)	0,9 $\pm$ 0,1 (g)	0,8 $\pm$ 0,3 (g)	0,8 $\pm$ 0,1 (g)	0,8 $\pm$ 0,1 (g)

* Para cada período de biodegradação, as médias reportadas com letras iguais, entre parênteses, nas mesmas linhas não apresentaram diferenças significativas ao nível de 0,05 de confiança (teste de Dunnet).

Pode-se observar que os rendimentos totais de produtos de oxidação permaneceram aproximadamente constantes durante todos os períodos de biodegradação estudados. De uma maneira geral, estes valores de rendimento estão de acordo com os rendimentos descritos por Chen (1989) para a degradação de madeiras de coníferas por CuO. Todavia, observa-se também na tabela 4 que o rendimento de vanilina tendeu a decrescer com o aumento do período de biodegradação e que, após 60 dias de biodegradação, o rendimento deste monômero já foi, ao nível de 0,05 de confiança, menor que do controle. Com o prosseguimento da biodegradação, o rendimento de vanilina decresceu ainda mais e atingiu o valor de 5,6% após 90 dias. Os demais monômeros detectados não apresentaram alterações em seus rendimentos em função do tempo de biodegradação.

O decréscimo no rendimento de vanilina em função do tempo de biodegradação indica que parte da lignina residual pode ter sido convertida a subestruturas não aromáticas. A formação de subestruturas não aromáticas durante a degradação de lignina por fungos de decomposição branca tem sido vastamente descrita na literatura (Robert e Chen, 1989; Higuchi, 1990; Higuchi, 1993; Ferraz e Duran, 1995). Outra alteração estrutural que poderia justificar a diminuição no rendimento dos monômeros seria o acúmulo de estruturas

condensadas na lignina residual. Sabe-se que certos tipos de ligações carbono-carbono, como ligações 5-5 bifenílicas, não são clivadas durante a oxidação com CuO. Dessa forma, a oxidação de madeira contendo lignina residual mais condensada (madeira biodegradada) levaria à formação de dímeros e ou trímeros ligados por ligações C-C, os quais não estariam sendo detectados durante as análises dos produtos de oxidação.

V.1.3. DFRC

Na figura 18 apresenta-se o cromatograma reconstituído de íons totais para a madeira de *P. taeda* controle submetida à reação de DFRC, conforme descrito por Lu e Ralph (1997a).

A identificação dos compostos foi feita por comparação dos espectros de massas obtidos com aqueles de bibliotecas de espectros instaladas no equipamento de GC/MS (NIST), bem como por proposições de fragmentações lógicas e comparação com espectros encontrados na literatura (Lu e Ralph, 1998b). A tabela 5 apresenta os resultados da análise dos espectros de massas dos compostos presentes no produto final da reação de DFRC, cujos derivados acetilados foram volatilizados nas condições experimentais.

Segundo Lu e Ralph (1998a), os principais produtos da degradação de madeiras de coníferas por DFRC são os isômeros cis/trans do 4-acetoxi-3-metoxicinamil peracetato (coniferil acetato-Gc) e do 4-acetoxicinamil acetato (*p*-cumaril peracetato-Gt). Estes monômeros são o resultado da ruptura das ligações β -aril-éter, cuja rota de formação está representada na figura 8. No cromatograma da figura 18, observa-se que, no caso da madeira de *P. taeda*, os sinais relativos aos isômeros do coniferil acetato (Gt e Gc) predominam sobre os do *p*-coumaril peracetato (Pt), o que pode ser justificado pela maior quantidade de unidades do tipo guaiacil nesta madeira (Fengel e Wegener, 1989). Em adição a esses monômeros principais, outros compostos monoméricos também foram detectados nos produtos de DFRC mostrados na figura 18. Basicamente, estes compostos podem ser divididos em três grupos, de acordo com sua possível origem:

Figura 18. Cromatograma reconstituído de íons totais dos produtos liberados durante a degradação de *P. taeda* controle por DFRC.

Compostos provenientes de grupos terminais – os compostos responsáveis pelos picos 2, 3 e 7 foram identificados como 4-acetoxi-3-metoxi-benzaldeído, 1-(4-acetoxibenzil)-propan-2-ona e 4-acetoxi-3-metoxibenzil acetato, respectivamente. Segundo Lu e Ralph (1998 a), estes compostos são provenientes da liberação de grupos terminais, como *p*-hidroxibenzaldeído e vanilina, conectados à molécula de lignina por ligações β -O-4. Durante a degradação por DFRC, este tipo de ligação é clivado, liberando vanilina e *p*-hidroxibenzaldeído para o meio reacional. Uma vez liberados, estes compostos podem ser acetilados, formando acetato de vanilina (composto 2) e *p*-acetoxibenzaldeído (composto não detectado), ou reduzidos a álcoois benzílicos. Durante a etapa de acetilação, estes álcoois benzílicos são derivatizados, formando 4-acetoxibenzil acetato (composto 3) e 4-acetoxi-3-metoxibenzil acetato (composto 7). A não detecção do *p*-acetoxibenzaldeído sugere que este composto tenha sido preferencialmente reduzido e detectado como composto 3.

Tabela 5. Identificação dos compostos presentes no produto da reação de DFRC de *P. taeda*.

Pico N°	Ion molar	Estrutura
1	206
2	194
3	208
4	208
6	222
7	238
8	222
Pt	234
10	264
11	288
12	280
Gc e Gt	264
13	264
15	302
16	292
17	382

Onde: Pt, Gt e Gc = monômeros *trans* e *cis* formados a partir de unidades *p*-hidroxycumaril e guaiacil, respectivamente. Ac = acetil, Br = bromo e cPr = ciclo propil.

Os compostos 10 e 13 apresentaram os mesmos padrões de fragmentação e foram identificados como isômeros *cis/trans* do 1-(4-acetoxi-3-metoxifenil)-2-acetoxiciclopropano. Os compostos 1 e 18 foram identificados como o eugenol acetato guaiacilglicerol peracetato, respectivamente. Estudos realizados com compostos modelo submetidos a DFRC sugerem que os isômeros 10 e 13 e os compostos 1 e 18 sejam oriundos de unidades terminais de coniferaldeído e álcool coniferílico, respectivamente (Lu e Ralph, 1998a). O composto 17, proveniente de unidades terminais de glicerol conectadas à lignina por ligações β -O-4, apresentou fragmentação idêntica ao 18 e foi identificado como isômero do guaiacilglicerol peracetato. Vale ressaltar que unidades terminais de glicerol em ligninas não são comuns, mas têm sido encontradas em vários tipos de lignina (Ede *et al.*, 1996).

Compostos provenientes de unidades contendo α -carbonilas- Estudos realizados com compostos modelos de lignina contendo α carbonilas têm mostrado que as ligações β O-4 destas unidades também são clivadas durante a reação de DFRC (Lu e Ralph, 1997a e Lu e Ralph 1998a). Este tipo de reação justifica a presença dos compostos 6, 8 e 12, identificados como, 1-(4-acetoxi-3-metoxifenil)-propan-2-ona, 1-(4-acetoxi-3-metoxifenil)-propan-1-ona e 1-acetoxi-1-(4-acetoxi-3-metoxifenil)-propan-2-ona, respectivamente. Estes compostos são originados através da quebra de ligações β -O-4 em unidades do tipo guaiacil- α CO- β -éter. Ainda segundo Lu e Ralph (1998a), o composto identificado como 1-(4-acetoxi-3-metoxifenil)-3-bromo-propan-1-ona (pico 15), que ainda apresenta Br em sua estrutura, também tem sua origem neste tipo de ligação. O composto 4, identificado como 1-(4-acetoxi-3-metoxifenil) acetofenona, ainda não teve sua origem completamente elucidada.

Outras estruturas – O composto 16 foi identificado como 3,4-diacetoxicinamil acetato. Apesar de alguns derivados desmetilados terem sido reportados na estrutura de alguns materiais lignocelulósicos (Lapierre *et al.*, 1988), a origem deste composto tem sido atribuída à existência de reações de desmetilação durante as reações de DFRC (Lu e Ralph, 1998 b).

Em adição aos compostos descritos acima, alguns outros picos também apareceram no cromatograma da figura 18. Os picos reportados pelo símbolo (#) foram identificados como

derivados de carboidratos e os demais compostos presentes no cromatograma (5, 9 e 14) ainda não tiveram sua estrutura identificada.

A quantificação dos compostos identificados por GC/MS foi feita por GC/FID, utilizando-se fluoranteno como padrão interno. Os sinais obtidos para os monômeros numerados na tabela 5 foram demasiadamente fracos no detector de ionização de chama (GC/FID), em comparação com os monômeros principais (G e P). Por isso, a quantificação dos produtos de DFRC foi realizada somente para os produtos principais da degradação. Segundo Lu e Ralph (1998a), a análise quantitativa dos produtos secundários da reação é de difícil execução e desnecessária, uma vez que a quantificação dos produtos principais fornece resultados comparáveis aos obtidos por métodos consagrados de caracterização, como a tioacidólise.

A tabela 6 apresenta os rendimentos totais de acetato de guaiacila (Gc e Gt), oriundos das reações de DFRC, e os teores de lignina residual nas madeiras em função do tempo de biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispora*. Também no DFRC, os mesmos produtos de degradação foram encontrados em todas as amostras analisadas (controle e biodegradadas entre 15 e 90 dias).

Tabela 6. Rendimento dos principais produtos liberados durante a degradação por DFRC de *P. taeda* controle e biodegradado por *C. subvermispora*.

tempo de biodegradação (dias)	teor de lignina (%)	rendimento de DFRC
controle	28,2 ± 0,4 (a)	26 ± 3 (a)*
15	26,1 ± 0,6 (b)	21 ± 2 (b)*
30	25,9 ± 0,1 (b)	13,8 ± 0,6 (c)*
60	25,8 ± 0,5 (b)	15,6 ± 0,8 (c)*
90	25,8 ± 0,4 (b)	14,6 ± 0,7 (c)*

* Para cada período de degradação, as médias reportadas com letras iguais, entre parênteses, nas mesmas colunas não apresentaram diferenças significativas ao nível de 0,05 de confiança (teste de Dunnet).

Os dados reportados na tabela 6 mostram que o rendimento dos monômeros provenientes de ligações β -O-4 decresceu consideravelmente nos estágios iniciais de biodegradação (15% e 48% após 15 e 30 dias, respectivamente), enquanto a perda de lignina foi de 9,6% e 10,6%, respectivamente, durante o mesmo período. Este resultado indica que houve extensiva despolimerização da lignina antes que sua mineralização fosse significativa. É importante ressaltar que a degradação de ligações aril-éter por *C. subvermispora* também foi demonstrada por Srebotinik *et al.* (1997), através da degradação de compostos modelo de

lignina ligados ao polietilenoglicol (PEG). De acordo com este artigo, compostos modelo de lignina, do tipo *p*-hidroxifenil, marcados com C¹⁴ no C β e ligados ao PEG por ligações do tipo β -O-4, foram degradados por *C. subvermispora*. Após 7 dias de biodegradação, em condições de fermentação no estado sólido, utilizando-se blocos de celulose como substrato principal, 61% dos carbonos marcados permaneceram ligados ao PEG como produtos da degradação de ligações β -O-4, enquanto houve apenas 8% de mineralização.

A figura 19 ilustra melhor a idéia de haver despolimerização antes de mineralização significativa. Nesta figura, observa-se claramente que uma inflexão na curva de perda de lignina é precedida por significativa redução na quantidade de ligações aril-éter.

Figura 19. Perda de lignina (●) e de ligações β -O-4 (▲) em função do tempo de biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispora*.

A compilação dos resultados de DFRC e oxidação com CuO indicou que a estrutura da lignina presente na madeira de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora* está alterada. A combinação das duas técnicas sugere que, além de despolimerizada, a lignina residual está enriquecida de ligações carbono-carbono e, em períodos longos de biodegradação (após 60 dias), apresenta menor aromaticidade.

V.2. Caracterização da lignina residual

Uma das maneiras de se corroborar os resultados obtidos pela caracterização da lignina *in situ*, reportada no item V.1, é através da extração e posterior caracterização da lignina residual. Contudo, o processo de extração é moroso e pode gerar alterações na

estrutura das ligninas. Entre as diferentes técnicas conhecidas para o isolamento de lignina a partir de materiais lignocelulósicos, a que vem sendo reportada como mais eficiente é a moagem em moinho de bolas, seguida de extração com solução de dioxano/água 96% (Lundquist, 1992). Ao produto assim obtido convencionou-se chamar de **LMM** (de "Lignina de Madeira Moída") e esse tipo de preparação tem sido amplamente empregada na caracterização de ligninas de diferentes origens (Islam e Sarkanen, 1993; Lawther *et al.* 1996; Galkin *et al.* 1997).

No presente trabalho, a obtenção de **LMM** foi realizada conforme o procedimento descrito por Lawther *et al.* (1996) (IV.8.3). Os experimentos foram realizados em duplicata e as médias dos rendimentos de **LMM** obtidas (Tabela 7) foram da ordem de 5,0% do total de lignina Klason presente nas amostras de *P. taeda*.

Tabela 7. Rendimentos de extração de **LMM** de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora*.

tempo de biodegradação (dias)	rendimento de LMM (%)*
controle	4,4 ± 0,4
15	5,7 ± 0,7
30	5,2 ± 0,2
60	5,0 ± 0,2
90	4,8 ± 0,2

* expresso em gramas de **LMM** por 100 gramas de lignina na madeira x 100. Os desvios referem-se aos desvios da média entre duplicatas.

Esses rendimentos foram baixos, quando comparados aos 25-30% reportados na literatura (Lundquist, 1992; Lawther *et al.* 1996). Segundo Maurer e Fengel (1992), rendimentos abaixo de 5% do total de lignina Klason ocorrem devido a moagens ineficientes, que não são efetivas para destruir as interações químicas e/ou físicas existentes entre a lignina e os carboidratos. A não destruição dessas interações limita a extração da lignina pelo solvente, fazendo com que rendimentos tão baixos sejam obtidos. Segundo Lundquist (1992), o aumento do rendimento de **LMM**, apesar de possível, necessariamente envolveria a utilização de tempos prolongados de moagem. Entretanto, trabalhos recentes vêm mostrando que tempos de moagem muito extensos, em adição ao aumento no rendimento de lignina extraída, podem gerar modificações, na estrutura da lignina, que seriam indesejáveis para os propósitos do presente trabalho, como diminuição da massa molar média e aumento nos teores de hidroxilas fenólicas e de alfa-carbonilas (Lawther *et al.*, 1996). Como a despolimerização da lignina induzida por moagens prolongadas poderia "mascarar" as alterações estruturais causadas durante a biodegradação, optou-se por preparar as **LMMs** com

tempos curtos de moagem (e conseqüentemente baixo rendimento) e, numa segunda etapa, buscar a extração de uma maior quantidade de lignina residual através da digestão do resíduo de extração de **LMM** com celulasas comerciais. Dessa forma, a madeira resultante da extração de **LMM** foi misturada a uma solução de celulase e submetida à hidrólise conforme descrito por Lundquist (1992) (IV.8.4). Após a hidrólise com celulase, o resíduo insolúvel foi re-extraído com uma mistura de dioxano-água e deu origem a uma fração de lignina denominada de **LLE** (de "Lignina Liberada Enzimaticamente"). A hidrólise foi monitorada pelo aparecimento de glicose no meio reacional utilizando-se o método do DNS (Miller, 1959). A figura 20 mostra o aparecimento de glicose no meio em função do tempo de tratamento com celulase comercial.

Figura 20. Monitoramento da formação de glicose durante a extração de **LLE** (Enzymatically Liberated Lignin) de *P. taeda*.

Como pode ser visto na figura 20, após 70 horas de reação, a porcentagem de celulose hidrolisada atingiu o patamar de aproximadamente 35 %. Essa perda de eficiência da hidrólise poderia estar ocorrendo devido a efeitos de inibição da celulase por excesso de glicose. Neste ponto, a solução foi filtrada e lavada exaustivamente com água, para completa remoção da glicose. O procedimento foi então repetido com a adição de nova solução de celulase e o sólido resultante das duas hidrólises foi submetido à extração de lignina. A lignina liberada enzimaticamente foi extraída em duas etapas sucessivas com dioxano/H₂O 96% e dioxano/H₂O 50%, dando origem a amostras que foram chamadas de **LLE96** e **LLE50**, respectivamente. A tabela 8 apresenta os rendimentos obtidos nas extrações das **LLE96** e **LLE50**. Pode-se observar que, de forma geral, os rendimentos de extração foram da ordem de

2,5% do total de lignina Klason para **LLE96** e de 5,0% para **LLE50**. A extração adicional de lignina após a hidrólise pode ser justificada pela desagregação do complexo lignocelulósico resultante da remoção parcial de celulose pelas celulasas (Chang *et al* ,1975). Pode-se notar ainda nos rendimentos reportados na tabela 8 que a utilização de dioxano 50% tornou possível a extração de uma parte da lignina que foi inicialmente insolúvel em dioxano 96%. Segundo Chang *et al.* (1975), a insolubilidade dessa fração de lignina em dioxano 96% deve-se, provavelmente, a sua maior massa molar e à presença de maior quantidade de carboidratos contaminantes. Assim, o uso de uma mistura de maior polaridade (dioxano/água 1:1) facilita a extração de uma maior quantidade de lignina (**LLE50**), que deve conter maiores teores de carboidratos que as outras preparações de lignina obtidas anteriormente. Observa-se ainda que o tempo de biodegradação também não afetou os rendimentos das **LLEs**, reforçando a idéia de que o tipo de alteração ocorrido na madeira devido a biodegradação não afetou a extratabilidade da lignina residual.

Tabela 8. Rendimentos de extração de **LLE96** e **LLE50** de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora*.

tempo de biodegradação (dias)	rendimentos de LLE96 (%)*	rendimentos de LLE50 (%)*
controle	2,6 ± 0,5	5,5 ± 0,7
15	2,3 ± 0,1	4,2 ± 0,4
30	2,0 ± 0,8	4,6 ± 0,4
60	2,4 ± 0,5	4,4 ± 0,5
90	2,7 ± 0,2	5,9 ± 0,8

* expresso em gramas de **LLE** por 100 gramas de lignina na madeira x 100. Os desvios se referem aos desvios da média entre duplicatas.

Após a extração, as **LMM**, as **LLE96** e as **LLE50** foram submetidas a uma etapa prévia de caracterização por UV/visível, na qual foram calculados os valores de absortividade para cada uma das ligninas em 280 e 310 nm. Os espectros e as absortividades calculadas para as ligninas oriundas das duplicatas foram muito similares. Com isso, optou-se por misturar as ligninas de cada duplicata e então proceder a caracterização química e espectroscópica das amostras compostas.

V.2.1. Composição química

A determinação da composição química das amostras de lignina isoladas de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora* foi realizada conforme descrito anteriormente (Guerra *et al.*, 1999; Mendonça *et al.*, 1999) (IV.4). A figura 21 mostra um cromatograma típico dos

produtos da hidrólise ácida de **LMM** e a tabela 9 apresenta a composição das diferentes preparações de lignina.

Figura 21. Cromatograma típico dos produtos da hidrólise ácida da lignina (exemplo de **LMM** controle) isolada de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora*. HGluc= ácido 4-O-metil-glucurônico; G = glicose; P= manose + xilose; A =arabinose, HAc= ácido acético e X = composto não identificado.

Observa-se no cromatograma da figura 21 que, em adição aos picos provenientes de ácido 4-O-metil-glucurônico, glicose, xilose mais manose, arabinose e ácido acético, as preparações de lignina apresentaram um sinal bastante intenso com o tempo de retenção de 11,4 minutos (sinal X na figura 21). A comparação dos cromatogramas das amostras biodegradadas com o controle sugere que a intensidade relativa desse sinal foi variável em função do tempo de biodegradação. Considerando-se que o sinal desconhecido seja proveniente de algum açúcar ou produto da oxidação de um açúcar (vale lembrar que as amostras foram hidrolisadas com ácido sulfúrico 72% e posteriormente filtradas em cartuchos "C-18" para remoção de lignina solúvel e fenóis, e que a resposta do detetor de índice de refração é semelhante para diferentes sacarídeos), utilizou-se a curva de calibração de glicose para a obtenção de uma estimativa da quantidade do composto desconhecido. Utilizando-se essa aproximação, observou-se que a porcentagem relativa desse composto variou em função do tempo de biodegradação nas diferentes preparações de lignina. Por exemplo, nas amostras de **LMM** a porcentagem do composto desconhecido aumentou de aproximadamente 2,0% no controle para 4,5 % após 90 dias de degradação. Por outro lado, nas **LLE96** e **LLE50**, os teores desse composto decresceram de 3,1% e 1,0% no controle para menos que 0,6% e 0,3%, após 90 dias de biodegradação, respectivamente. A variação na quantidade do composto

desconhecido em função do tempo de biodegradação é um primeiro indício de que as preparações contendo ligninas residuais apresentam diferenças em suas composições.

Tabela 9. Composição química das ligninas (**LMM**, **LLE96** e **LLE50**) isoladas de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora*.

tempo de degradação (dias)	% de componentes $\pm$ DP					
	glicose	polioses	arabinose	acetil	Hgluc	Lignina total
LMM						
controle	1,2 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	81,7 $\pm$ 0,1
15	2,0 $\pm$ 0,2	2,3 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,3	2,2 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1	75,3 $\pm$ 1,9
30	2,1 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	77,1 $\pm$ 1,5
60	2,1 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,3	2,2 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1	78,3 $\pm$ 0,5
90	2,6 $\pm$ 0,4	1,7 $\pm$ 0,4	0,4 $\pm$ 0,3	3,1 $\pm$ 0,7	0,4 $\pm$ 0,1	72,8 $\pm$ 0,9
LLE96						
controle	2,7 $\pm$ 0,1	4,6 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	3,1 $\pm$ 0,2	nd	78,1 $\pm$ 0,2
15	6,1 $\pm$ 0,2	6,9 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 0,2	nd	75,9 $\pm$ 0,8
30	6,2 $\pm$ 0,5	5,4 $\pm$ 0,4	0,5 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1	nd	76,3 $\pm$ 1,1
60	5,6 $\pm$ 0,7	5,7 $\pm$ 0,7	0,3 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,2	nd	76,2 $\pm$ 0,5
90	6,0 $\pm$ 0,1	7,0 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1	nd	71,9 $\pm$ 0,8
LLE50						
controle	5,4 $\pm$ 0,3	8,4 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1	nd	67,2 $\pm$ 0,8
15	5,5 $\pm$ 0,4	9,2 $\pm$ 0,7	0,6 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1	nd	66,5 $\pm$ 0,3
30	4,4 $\pm$ 0,1	8,2 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	nd	65,5 $\pm$ 0,2
60	4,6 $\pm$ 0,3	8,3 $\pm$ 0,6	1,0 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	nd	65,4 $\pm$ 0,5
90	3,6 $\pm$ 1,1	7,3 $\pm$ 1,1	1,6 $\pm$ 1,1	0,3 $\pm$ 0,1	nd	64,9 $\pm$ 0,2

nd = não detectado

Os dados da tabela 9 mostram que as frações de **LMM** controle e biodegradadas apresentaram quantidades apreciáveis de materiais distintos da lignina, variando de 7,1 no controle, a 13,2% na amostra biodegradada por 90 dias. Pode-se observar na mesma tabela que, como esperado, as **LLE96** e **LLE50** apresentaram maiores teores de açúcares contaminantes em suas estruturas. Esses resultados estão de acordo com alguns estudos sobre o isolamento de lignina e complexos lignina-carboidratos. Chang *et al.* (1975) reportaram a existência de 3 a 9% de polissacarídeos em preparações de **LMM** de “Sweetgum” e “Spruce”. Atsushi *et al.* (1984) mostraram que **LMM** e **LLE** extraídas de bagaço de cana com dioxano 80% contêm cerca 90 e 78 % de lignina Klason, respectivamente. Scalbert *et al.* (1986) estudaram a extração de lignina liberada enzimaticamente e reportaram a existência de 15 a 26% de produtos não relacionados à lignina nas amostras, sendo que a maior parte era constituída de carboidratos. Devido a essas elevadas quantidades de carboidratos e seus

derivados presentes nas preparações de lignina, alguns autores têm sugerido a existência de complexos lignina-carboidratos nas frações de lignina isoladas (Lawther *et al.*, 1996; Atsushi *et al.* 1984; Balakshin *et al.*, 2001).

A principal diferença a ser observada nos dados da tabela 9 é que as ligninas liberadas enzimaticamente apresentaram maiores porcentagens de glicose e açúcares de polioses que as **LMM**. No entanto, pela análise da composição das ligninas isoladas não é possível afirmar se há interações físicas e/ou químicas entre as frações de lignina e carboidratos nessas preparações. Assim, como vários trabalhos vêm reportando a presença de complexos lignina-carboidratos em preparações de ligninas obtidas de maneira semelhante à utilizada nesse trabalho (Atsushi *et al.*, 1984; Lawther *et al.*, 1996; Fengel e Wegener, 1989; Balakshin *et al.*, 2001), resolveu-se analisar as preparações de lignina por cromatografia de permeação em gel seguida de detecção simultânea para lignina e carboidratos. Dessa forma, segundo Atsushi *et al.* (1984), a co-eluição das frações seria indicativo da possível presença de interações químicas, enquanto a eluição em volumes diferentes indicaria a presença de interações do tipo física entre esses dois componentes nas preparações estudadas.

V.2.2. Distribuição de massas molares das preparações de ligninas

A figura 22 compila os cromatogramas de permeação em gel, medidos para lignina, nas amostras de **LMM** biodegradadas por diferentes períodos de tempo e a tabela 10 mostra os resultados calculados para massa molar média em massa aparente (M_w), massa molar média em número aparente (M_n), e dispersibilidade ($D=M_w/M_n$). Também foram incluídos na tabela 10 os valores da porcentagem de área excluída (%Ae), uma vez que todas as amostras de **LMM** apresentaram uma pequena fração de lignina eluída no volume de exclusão da coluna ($K_d < 0$). Os valores de M_w e M_n foram calculados com base na calibração da coluna com proteínas de massas molares conhecidas.

O valor de M_w encontrado para a **LMM** controle (7.790 g/mol) está na faixa descrita para outras LMMs (Faix *et al.*, 1980), mas é inferior aos valores reportados na literatura para *P. taeda* (11.000-15.000 g/mol) (Fengel e Wegener, 1989) e *P. radiata* (13.175 g/mol) (Ferraz, 1991). Todavia, o M_w aqui reportado refere-se somente à fração permeada pela coluna, sendo que a fração excluída (11%) possui massa molar superior a 30.000 g/mol, que é o limite de exclusão da coluna.

Os valores de dispersibilidade encontrados para **LMM** também foram bastante elevados. Segundo Gellerstedt (1989), valores de D elevados são comuns em preparações de ligninas não purificadas e ocorrem devido à presença de fragmentos de massas molares

heterogêneos, como observado nos cromatogramas da figura 22. A homogeneização dos fragmentos das **LMM** poderia ser obtida com o emprego de processos de purificação que, segundo Gellerstedt (1994), removeriam as frações de alta e baixa massa molar. Contudo, os valores de Mw do produto da purificação refletiriam somente a distribuição de massas molares da fração isolada e não a distribuição total da amostra, o que não seria aconselhável para os nossos propósitos.

Figura 22. Cromatogramas de permeação em gel, medidos para lignina, nas **LMM** isoladas de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispota*. Controle (♦), e biodegradado por 15 dias (Δ), 30 dias (●), 60 dias (□) e 90 dias (X).

Tabela 10. Massas molares médias aparentes (Mw e Mn), dispersibilidade (D) e porcentagem de área excluída (%Ae) nas **LMM** isoladas de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispota*.

tempo de biodegradação (dias)	Mw	Mn	D	%A _e
controle	7.790	989	7,9	11,0
15	6.330	746	8,5	9,4
30	5.300	743	7,1	5,3
60	5.245	743	7,0	4,0
90	5.147	770	6,7	4,0

Observa-se ainda nos cromatogramas da figura 22 e nos valores reportados na tabela 10 que o processo de despolimerização da lignina, recuperada da madeira biodegradada na fração **LMM**, ocorreu preferencialmente nos estágios iniciais de biodegradação (até 30 dias). Pode-se observar, a princípio, a despolimerização da fração excluída, cuja área diminuiu de

11,0 para 9,4% após 15 dias de biodegradação. No mesmo período, a fração permeada teve o Mw diminuído de 7.790 g/mol, no controle, para 6.330 g/mol. Após 30 dias, observa-se a diminuição extensiva das frações excluídas pela coluna cromatográfica e o conseqüente acúmulo de frações de menores massas molares. A tabela 10 mostra que a porcentagem de área excluída (%Ae) diminuiu de 11,0 %, no controle, para cerca de 5,3% após 30 dias e chegou ao mínimo de 4,0% após 90 dias de biodegradação. Da mesma forma, o Mw das frações eluídas variou de 6.330 g/mol, observados aos 15 dias, para cerca de 5.300 g/mol aos 30 dias e permaneceu aproximadamente constante até 90 dias de biodegradação. Entretanto, as modificações geradas pelo fungo devem ter continuado a ocorrer após 30 dias de biodegradação, visto que a dispersibilidade diminuiu de 7,1 (aos 30 dias de biodegradação) para aproximadamente 6,7 (após 90 dias de tratamento).

As frações de lignina denominadas de **LLE96** e **LLE50** também foram analisadas por GPC. Os cromatogramas obtidos estão mostrados nas figuras 23 e 24 e os valores de Mw, Mn e D na tabela 11.

De forma geral, as ligninas liberadas após hidrólise enzimática apresentaram maior massa molar média aparente que as **LMMs**. Observa-se ainda que as ligninas extraídas com dioxano 50% apresentaram uma maior porcentagem de área excluída pela coluna cromatográfica, indicando a presença de fragmentos de massas molares elevadas nestas preparações de lignina.

Os valores de Mw, Mn, D e %Ae para as **LLE96** (Tabela 11) confirmaram que, também nessas frações de lignina, houve despolimerização eficiente logo nos estágios iniciais de biodegradação. Observa-se na figura 23 que, já aos 15 dias de biodegradação, houve uma sensível diminuição na fração excluída pela coluna. Nesta preparação de lignina, a %Ae, que inicialmente representava cerca de 14,6% do total, foi reduzida para 9,7 % já aos 15 dias, enquanto o Mw da fração eluída diminuiu de 9.300 g/mol para 7.350 g/mol. Com o prosseguimento da biodegradação, a fração de alta massa molar praticamente desapareceu aos 30 dias (apenas 4,0 %Ae) e houve acúmulo de moléculas com tamanho reduzido, fazendo com que o Mw chegasse a 6.565 g/mol após 30 dias. Após este período, a despolimerização observada foi bem menos pronunciada e o valor de %Ae pareceu estabilizar, enquanto o Mw apresentou uma tendência muito pequena de redução, diminuindo de 6.565 g/mol aos 30 dias para o mínimo observado de 6.112 g/mol após 90 dias de biodegradação.

Figura 23. Cromatogramas de permeação em gel das **LLE96** isoladas de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora*. Controle (♦), 15 dias (Δ), 30 dias (●), 60 dias (□) e 90 dias (x).

Tabela 11. Massas molares médias aparentes (M_w e M_n), dispersibilidade (D) e porcentagem de área excluída ($\%A_e$) nas **LLE96** isoladas de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora*.

tempo de biodegradação (dias)	M_w	M_n	D	$\%A_e$
controle	9.300	1431	6,5	14,6
15	7.350	1087	6,8	9,7
30	6.565	930	7,0	4,0
60	6.230	938	6,6	3,6
90	6.112	670	9,1	3,6

As **LLE50** controle e biodegradadas apresentaram uma maior porcentagem de área excluída pela coluna cromatográfica (figura 24), confirmando que o solvente utilizado neste caso possuiu capacidade de tornar solúvel frações de lignina e carboidratos de maior massa molar. Neste tipo de lignina, o controle não degradado apresentou cerca de 47,2% de área excluída pela coluna cromatográfica e um M_w estimado de 17.590 g/mol para a fração eluída no volume de permeação. No entanto, a determinação de M_w , M_n , e D dessas frações seria pouco exata, pois a fração excluída foi muito expressiva. A partir das eluições, pôde-se observar que houve um acúmulo de fragmentos de menores massas molares entre 15 e 60 dias

de biodegradação, o que levaria a valores de D progressivamente maiores. Aos 90 dias de biodegradação, houve, aparentemente, um consumo (mineralização) desses fragmentos e a macromolécula voltou a apresentar menor dispersibilidade.

Os resultados de GPC descritos permitem a conclusão, inequívoca, de que o processo de biodegradação por *C. subvermispora* levou à redução da massa molar aparente da lignina presente na madeira biodegradada. Todavia, para determinar se a redução nos valores de Mw da lignina residual seria o resultado de reações de degradação na estrutura da lignina ou apenas o reflexo da despolimerização da fração de polissacarídeos contidos nos complexos lignina-carboidratos, foi feito um estudo da eluição dos fragmentos de carboidratos contidos nas preparações de **LMM** e de **LLE**.

Figura 24. Cromatogramas de permeação em gel das **LLE50** isoladas de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora*. (♦) controle e biodegradada por 15 dias (Δ), 30 dias (●), 60 dias (□) e 90 dias (x).

O perfil de eluição em gel dos carboidratos contidos nessas preparações de lignina foi estudado utilizando-se o método do fenol-ácido sulfúrico (Browning, 1967) (IV.8.6). A aplicação deste método juntamente com o monitoramento da absorbância em 280 nm permitiu a determinação simultânea da eluição da lignina e dos carboidratos. Para maior facilidade de visualização, as figuras 25, 26 e 27 mostram os cromatogramas de permeação em gel, medidos tanto para lignina como para carboidratos, das preparações **LMM**, **LLE96** e **LLE50**,

respectivamente. A intensidade máxima de absorção foi normalizada em todos os cromatogramas para melhor visualização das alterações ocorridas durante a biodegradação.

Como pode ser observado na figura 25a, a **LMM** controle apresentou duas frações de lignina e carboidratos com perfil de eluição bastante semelhantes. A primeira correspondeu a frações de altas massas molares, que foram excluídas pela coluna cromatográfica; e a segunda foi formada por fragmentos de massas molares bastante heterogêneos, que foram eluídos dentro do volume de permeação da coluna. Pôde-se observar ainda a presença de uma outra fração de carboidratos, que apareceu em uma região onde não houve detecção de lignina nas amostras (região com K_d próximo a 1). Esse perfil de eluição foi consistente com a presença de interações químicas (co-eluição de lignina e carboidratos) e físicas (eluição separada de lignina e carboidratos) entre carboidratos e lignina na **LMM** controle, indicando que ambas poderiam estar presentes nestas preparações. A figura 25 mostra também que o tratamento da madeira com *C. subvermispora*, além de ter levado à recuperação de **LMMs** com massas molares progressivamente menores, pareceu ter levado também à ruptura de parte das interações químicas entre a lignina e os carboidratos. Esse fato ficou evidente após 30 dias de degradação (figura 25c), onde se observou o desaparecimento de parte da fração de lignina excluída pela coluna sem que houvesse a degradação da fração de altas massas molares dos carboidratos (área marcada com a elipse). Somente após 60 dias de degradação notou-se o desaparecimento da fração de maior massa molar dos carboidratos. Após 90 dias de biodegradação, observou-se novamente a degradação mais extensiva na lignina, fazendo com que o perfil de eluição se deslocasse no sentido de menores massas molares, independentemente de alterações no perfil dos carboidratos (parte marcada com a elipse).

Os cromatogramas de eluição das **LLE96** apresentaram algumas diferenças significativas em relação aos reportados para as **LMMs**. Inicialmente, os cromatogramas do controle (figura 26a) mostraram a possibilidade de presença de interações químicas e físicas nessas amostras. Entretanto, neste caso, com o prosseguimento da biodegradação, a degradação dos polissacarídeos levou ao acúmulo de frações de carboidratos de baixas massas molares, que já puderam ser vistos após 15 dias de degradação. Esses resultados foram consistentes com a hipótese de que o tratamento com o fungo proporcionou a degradação preferencial de polissacarídeos presentes nos complexos lignina-carboidratos das **LLE96**. A degradação das cadeias de polissacarídeos levaria à redução da massa molar média aparente do complexo como um todo, formaria frações de carboidratos de baixas massas molares e não levaria à ruptura das interações químicas entre lignina e carboidratos, o que justificaria os perfis de eluição observados nas **LLE96**.

Figura 25. Cromatogramas de permeação em gel das LMM, medidos para lignina (♦) e carboidratos (□), isoladas de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora*. (a) controle; biodegradado por 15 dias (b); 30 dias (c); 60 dias(d); e 90 dias (e).

Figura 26. Cromatogramas de permeação em gel das LLE96, medidos para lignina (◆) e carboidratos (□), isoladas de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora*. (a) controle; biodegradado por 15 dias (b); 30 dias (c); 60 dias (d); e 90 dias (e).

Figura 27. Cromatogramas de permeação em gel das LLE50, medidos para lignina (♦) e carboidratos (□), isoladas de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispota*. (a) controle; biodegradado por 15 dias (b); 30 dias (c); 60 dias(d); e 90 dias (e).

Com as **LLE50** pôde-se observar basicamente os mesmos efeitos vistos com as **LLE96**, sugerindo que o processo degradativo nessas frações também ocorreu nas cadeias de polissacarídeos, levando à redução das massas molares médias aparentes do complexo **LLE50** como um todo.

A compilação dos resultados obtidos por GPC das frações de lignina extraídas de *P. taeda* biodegradado indica que na fração recuperada como **LMM** houve clara despolimerização da lignina, que deve ter ocorrido através da clivagem de ligações específicas dentro da macromolécula. Já nas frações recuperadas como **LLE96** e **LLE50** parece que a despolimerização ocorreu preferencialmente na fração de polissacarídeos, levando à diminuição da massa molar do complexo lignina-carboidrato como um todo.

V.2.3 Análise dos monômeros liberados pela reação de DFRC

A técnica de degradação por DFRC foi aplicada para a caracterização das frações de lignina isoladas, que foram anteriormente caracterizadas por GPC. O emprego dessa técnica poderia corroborar as conclusões obtidas a partir do estudo de GPC, uma vez que a redução no rendimento de obtenção dos monômeros **Gt** e **Gc** seria indicativo de reações de despolimerização na lignina residual. Por outro lado, a obtenção de rendimentos semelhantes, independentemente do período de biodegradação, mostraria que as reações de despolimerização seriam um reflexo da degradação dos polissacarídeos contidos nos complexos.

As preparações de **LMM**, **LLE96** e **LLE50** foram submetidas a reações de DFRC nas mesmas condições descritas por Lu e Ralph (1998) (IV.8.2). A análise qualitativa dos produtos obtidos mostrou que, como era de se esperar, os monômeros liberados foram exatamente os mesmos descritos anteriormente na análise da madeira submetida ao DFRC *in situ* (item IV.8.2.1 e tabela 5).

A quantificação dos monômeros identificados por GC/MS foi feita utilizando-se 4, 4'-ethylidenobisphenol como padrão interno. A tabela 12 apresenta os rendimentos totais de **Gc** e **Gt** em função do tempo de degradação de *P. taeda* por *C. subvermispora*.

Os dados reportados na tabela 12 mostraram que o rendimento dos monômeros liberados pela reação de DFRC decresceu somente nas amostras de **LMM**. A aplicação do teste de Dunnet aos dados da tabela 12 indicou que as diferenças na porcentagem de rendimento, apesar de pequenas, foram significativas após 30 dias de biodegradação. Isso significa que houve redução na porcentagem de rendimento dos monômeros formados pela reação de DFRC, em relação ao controle, de 12,2% após 30 dias de biodegradação. Com a continuação do processo degradativo, essa redução de rendimento tendeu a aumentar,

chegando a 21,1% após 90 dias de degradação. A diminuição no rendimento dos monômeros liberados por DFRC indicou que a quantidade de monômeros ligados por ligações β -O-4 decresceu em função do tempo de biodegradação. Por outro lado, observou-se também na tabela 12 que as **LLE96** e **LLE50** não apresentaram redução no rendimento dos monômeros gerados pela reação de DFRC. Esse resultado mostrou que a lignina residual contida nessas preparações não apresentou redução nos teores de monômeros conectados por ligações β -O-4.

Tabela 12. Rendimento dos monômeros Gc e Gi formados durante a degradação por DFRC de madeira de *P. taeda* (DFRC *in situ*) e **LMM**, **LLE96** e **LLE50** isolada de *P. taeda* controle e degradado por *C. subverispora*.

tempo de biodegradação (dias)	% de lignina Klason**	% LMM *	% LLE96 *	% LLE50 *
controle	26 $\pm$ 3 (a)	14,7 $\pm$ 0,6 (a)	14,8 $\pm$ 0,4 (a)	16 $\pm$ 2 (a)
15	21 $\pm$ 2 (b)	13,6 $\pm$ 0,6 (a)	15 $\pm$ 1 (a)	17 $\pm$ 1 (a)
30	13,8 $\pm$ 0,6 (c)	12,9 $\pm$ 0,4 (b)	15,3 $\pm$ 0,6 (a)	16 $\pm$ 1 (a)
60	15,6 $\pm$ 0,8 (c)	12,1 $\pm$ 0,4 (b)	14,6 $\pm$ 0,4 (a)	17 $\pm$ 2 (a)
90	14,6 $\pm$ 0,7 (c)	11,6 $\pm$ 0,3 (c)	15,7 $\pm$ 0,8 (a)	14 $\pm$ 2 (a)

* Os dados apresentados foram calculados com base no teor de lignina total de cada preparação; e para cada período de degradação, as médias reportadas com letras iguais, entre parênteses, nas mesmas colunas não apresentaram diferenças significativas ao nível de 0,05 de confiança (teste de Dunnet).

** Os resultados de degradação *in situ* são os mesmos apresentados na tabela 6 e foram incluídos aqui para facilitar a comparação com os rendimentos de DFRC nas ligninas isoladas.

A compilação dos resultados de DFRC e GPC mostra que somente a fração de lignina recuperada como **LMM** foi degradada durante o tratamento de *P. taeda* por *C. subvermispora*. A combinação desses dados sugere que a degradação da lignina tenha ocorrido através da clivagem de ligações β -O-4 e/ou das ligações C α -C β , gerando fragmentos de baixa massa molar. É interessante destacar que as reações que levam à ruptura das ligações acima mencionadas são de caráter oxidativo e que poderiam também levar à ruptura das interações químicas entre lignina e carboidratos, como sugerido pela análise de GPC. Já no caso das **LLEs**, a estrutura das ligninas residuais permaneceu aparentemente intacta, houve diminuição das massas molares médias aparentes e acúmulo de oligômeros de carboidratos de baixas massas molares. Estes resultados são consistentes com a degradação da porção de polissacarídeos presentes nos complexos lignina-carboidratos. Assim, a redução do grau de polimerização dos polissacarídeos ligados quimicamente à lignina levaria à redução dos Mws desses complexos lignina-carboidratos. Como, neste caso, as interações entre os dois

componentes não estariam sendo rompidas, eles continuariam co-eluinto, como observado nos GPCs. Além disso, a degradação nas cadeias de polissacarídeos preservaria a estrutura da lignina, como observado no DFRC.

Outro resultado marcante na tabela 12 é que a redução nos rendimentos dos monômeros gerados pela reação de DFRC nas **LMM** foi bem inferior àqueles observados para a mesma reação efetuada na lignina *in situ*. Além disso, as ligninas residuais presentes nas frações de **LLE96** e **LLE50** não apresentaram diferenças nas quantidades de monômeros formados pelo DFRC. Essa diferença nos resultados obtidos através da utilização da reação de DFRC sugere que as preparações de ligninas obtidas nesse trabalho tenham tido sua origem em regiões diferentes da parede celular. Assim, pode-se dizer que as reações de DFRC *in situ* apresentaram uma média das alterações ocorridas em diferentes regiões da parede. Já as **LMM** parecem ter sido originadas em partes da célula um pouco menos afetadas pelo fungo e as **LLE**, provavelmente, vêm de regiões mais distantes do lumen e que ainda não haviam sido afetadas pelo sistema degradativo do fungo.

V.2.4. Análise dos dímeros liberados pela reação de DFRC

Para se obter maiores informações a respeito da estrutura das **LMM** isoladas de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora*, as análises dos produtos das reações de DFRC foram estendidas para a detecção dos dímeros reportados para madeiras de *Pinus*. Contudo, devido a quantidade limitada desses compostos, que segundo Lu e Ralph (1998b) devem responder por menos de 4,0 % da massa inicial de lignina, as amostras foram analisadas em condições especiais para detecção de dímeros. A estimativa da alteração das quantidades dos diferentes dímeros, identificados em função do tempo de degradação, foi feita utilizando-se somente o detector de massas, uma vez que este é muito mais sensível que o detector por ionização de chama.

A figura 28 apresenta um cromatograma reconstituído de ions totais típico da região de eluição dos dímeros de lignina. Os números apresentados no cromatograma correspondem às estruturas ilustradas na figura 29 e os dados dos GC/MS são apresentados na tabela 13.

A identificação das estruturas apresentadas na figura 29 foi feita com base nos padrões de fragmentação mostrados na tabela 13 e por comparação com os dados de GC/MS de dímeros de lignina reportados por Peng *et al.* (1998). Como pode ser visto no cromatograma da figura 28, as reações de DFRC aplicadas nas **LMM** liberaram quantidades detectáveis de dímeros provenientes de unidades β -1, β - β , β -5 e 5-O-4, que são os tipos mais importantes de interações carbono-carbono e diaril-éter presente em ligninas de *Pinus* (Peng *et al.*, 1998). No

entanto, não foi possível encontrar sinais de dímeros 5-5, provavelmente devido a baixa quantidade desse tipo de ligação na estrutura de ligninas de coníferas

Tabela 13. Dados de GC/MS dos dímeros liberados pela reação de DFRC

Dímero	m/z (% abundância)
19	370 (9), 328 (34), 311 (1), 286 (100), 255 (18)
20	400 (2), 358 (10), 298 (31), 209 (100), 167 (20), 107 (90)
21	544 (2), 484 (29), 424 (10), 382 (33), 248 (52), 195 (50), 137 (100)
22	530 (1), 488 (14), 446 (11), 386 (6), 326 (3), 189 (10), 137 (100)
23	484 (11), 382 (14), 322 (100), 289 (20), 207 (17), 146 (12)

Figura 28. Cromatograma reconstituído de íons totais da região de eluição dos dímeros liberados pela reação de DFRC nas amostras de **LMM**.

Além dos compostos identificados, a região de eluição dos dímeros nos cromatogramas de DFRC das **LMM** apresentou outros sinais que ainda não tiveram suas origens completamente elucidadas. Todavia, os padrões de fragmentação desses compostos não foram parecidos àqueles esperados para acetatos com dois anéis aromáticos. Assim, estes sinais não foram considerados neste trabalho.

Figura 29. Estrutura dos dímeros de lignina presentes nos produtos de DFRC de **LMM** de *P. taeda* controle e biodegradado por *C. subvermispora*.

Como mencionado anteriormente, a quantificação dos dímeros detectados por GC/MS não pôde ser efetuada por GC/FID devido as baixas quantidades desses compostos na estrutura das **LMM** isoladas. Por isso, visando obter evidências do acúmulo desses dímeros em função do tempo de biodegradação, utilizou-se a integração dos sinais nos GC/MS das **LMM** controle e biodegradadas. Para comparação das amostras, foram plotadas as razões entre as alturas dos sinais de cada dímero (H_d) e a altura do sinal do padrão interno (H_p) em função do tempo de biodegradação (figura 30). Como as reações foram realizadas com a mesma concentração de padrão interno, qualquer aumento na intensidade dos sinais proveniente dos dímeros seria refletido no aumento da razão entre suas alturas e a altura do sinal do padrão.

Pode-se concluir com o gráfico da figura 30 que os diferentes dímeros detectados nos produtos de DFRC acumularam na estrutura das **LMM**. Esse acúmulo tornou-se evidente após 30 dias de biodegradação e tendeu a aumentar até 60 dias de tratamento da madeira com o fungo. Após 60 dias de biodegradação, pareceu haver uma diminuição no teor de dímeros, o que sugere a ocorrência de reações de abertura de anéis aromáticos em períodos longos de biodegradação.

Figura 30. Acúmulo de dímeros 19 (barras com linhas horizontais), 20 (barras com linhas diagonais), 21 (barras escuras) e 22 (barras claras) na estrutura das LMM provenientes de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora*. No gráfico, Hd e Hp são as alturas dos sinais de cada dímero e do padrão interno, respectivamente, e M é a massa, em gramas, de lignina usada na reação de DFRC.

A figura 31 reúne todos os resultados obtidos com as reações de DFRC sobre LMM extraídas de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora*. Observa-se claramente que, com o aumento do tempo de biodegradação, houve redução na porcentagem de monômeros ligados por ligações β -O-4. Conseqüentemente, com a diminuição no teor de ligações β -O-4 ocorreu um acúmulo em unidades ligadas através de ligações carbono-carbono, que não foram clivadas pela reação de DFRC.

Figura 31. Redução da porcentagem de monômeros ligados por ligações β -O-4 ($\diamond$) e acúmulo dos dímeros ligados por ligações carbono-carbono ($\blacksquare$) em função do tempo de biodegradação.

A compilação dos resultados obtidos durante a etapa de caracterização das **LMM** confirma que a principal reação na estrutura da lignina residual foi a quebra das ligações β -O-4 e/ou entre os carbonos $C\alpha$ - $C\beta$. Esse tipo de reação foi importante mesmo em períodos curtos de biodegradação e foi acompanhada da redução da massa molar média aparente da macromolécula e do acúmulo de estruturas condensadas ligadas por ligações carbono-carbono, que não foram degradadas pelos microrganismos. Entretanto, a rota de degradação dessas ligações, bem como seus possíveis agentes causadores, não poderia ser sugerida sem uma análise pormenorizada da estrutura química da lignina residual. Por exemplo, vários estudos desenvolvidos, principalmente com *P. chrysosporium* e *T. versicolor*, levam à conclusão de que a degradação de lignina ocorra via formação inicial de radicais catiônicos nos núcleos aromáticos (figura 32 – rota A) (Kersten *et al.*, 1985; Kirk e Cullen, 1998). A formação do radical catiônico induz à ruptura de ligações, principalmente entre os carbonos α e β e ligações β -O-4, com a conseqüente degradação química, levando à formação dos intermediários I e II, e III e IV pelas rotas A_1 e A_2 , respectivamente. Estas rotas de fragmentação têm sido descritas para fungos de decomposição branca com capacidade de produzir LiP (lignina peroxidase), o que parece não ser o caso do fungo em estudo (Ürsua *et al.*, 1998). Contudo, alguns dos produtos de oxidação descritos por essas vias já foram detectados durante a degradação de compostos modelos de lignina por *C. subvermispora* (Srebotnik *et al.*, 1997). A detecção desses produtos de degradação e a demonstração da ocorrência de genes homólogos aos que expressam a produção de LiP (em *P. chrysosporium*) em *C. subvermispora* levaram alguns autores a questionar a possibilidade de o fungo *C. subvermispora* produzir LiP em condições de fermentação sólida sobre madeira, onde experimentalmente é difícil a detecção dessa enzima. Por outro lado, modelos mais recentes, que também visam explicar a degradação de substratos não-fenólicos por *C. subvermispora*, consideram a degradação de lignina via peroxidação de lipídeos (Kapich *et al.*, 1999) (figura 32 – rota B). Neste caso, a oxidação ocorreria inicialmente no hidrogênio alfa e levaria à produção dos compostos V e/ou VI pelas rotas B_1 e B_2 , respectivamente. No entanto, como pode ser observado na figura 32, tanto a oxidação no anel aromático quanto no carbono alfa, levando à clivagem das ligações $C\alpha$ - $C\beta$ (rota A_1) ou β -O-4 (rotas A_2 ou B_1), dariam origem a estruturas residuais que liberariam menos monômeros do tipo G nas reações de DFRC. Além disso, qualquer das rotas também levaria à redução da massa molar média aparente da lignina residual, o que foi demonstrado em nosso trabalho. Desse modo, o emprego de técnicas de caracterização estrutural mais informativas se faz necessário para o completo entendimento da

rota de degradação da lignina. Por esta razão, algumas análises espectroscópicas e de grupos funcionais foram realizadas e serão descritas a seguir:

Figura 32. Vias de degradação de um substrato modelo de lignina (não fenólico) por lignina peroxidase de *Phanerochaete chrysosporium*/ H_2O_2 (Kirk e Cullen, 1998) (rota A) e pelo sistema MnP, ácido linoleico e H_2O_2 (Kapich *et al.*, 1999). Os modelos acima explicariam as vias de oxidação iniciadas pela abstração de um elétron quer do anel A (rota A₁) ou B (rota A₂) ou do carbono alfa (rotas B₁ e B₂)

V.2.5. Ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN- ^1H das LMM estudadas são apresentados na figura 33 e no apêndice 2. As atribuições e análise quantitativa dos sinais aparecem na tabela 14. A

atribuição de cada região foi determinada com base em espectros de compostos modelos reportados por Ralph *et al.* (1998) e Ralph *et al.* (2000).

Figura 33. Espectro de RMN- ^1H da LMM de *P. taeda* não degradado (controle).

A comparação dos teores de prótons por C_9 em função do tempo de biodegradação mostrou que as LMM de madeira biodegradada apresentaram algumas alterações em relação ao controle. A modificação mais evidente foi o aumento no número de prótons em carbonos saturados não-oxigenados, que aparecem na região de 1,10–1,50 ppm. Já o número de hidroxilas aromáticas (2,2–2,5 ppm) e de grupos metoxila (3,55–3,95 ppm) por C_9 não sofreram alterações significativas com a biodegradação. Os dados da tabela 14 mostraram ainda o aumento do teor de $\text{H}\beta$ e $\text{H}\gamma$ em estruturas do tipo β -1 e β - β (2,5–3,55 e 3,95–4,5 ppm, respectivamente) e uma pequena tendência de redução no teor de $\text{H}\beta$ em estruturas β -O-4 (4,5–5,2 ppm).

As alterações observadas nos números de prótons por C_9 das LMM corroboram a redução de monômeros de lignina unidos por ligações β -O-4 durante a degradação, que foram evidenciadas pelo aumento no teor relativo de prótons em estruturas β -1, β - β e na diminuição dos $\text{H}\beta$ em estrutura β -O-4. Além dessas modificações, o aumento no teor de prótons em carbonos saturados não-oxigenados sugere a presença de subestruturas do tipo $\text{G-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ e/ou $\text{G-CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$. Esses tipos de subestrutura têm sido reportadas como produtos de biodegradação de lignina por diferentes autores (Chua *et al.*, 1982; Tai *et al.*, 1990; Ferraz e Durán, 1995) e seriam o resultado de reações de natureza redutiva em produtos da quebra de ligações do tipo β -O-aril-éter. No entanto, uma discussão mais

detalhada a respeito do aparecimento dessas subestruturas, bem como de outras alterações observadas, será abordada após a análise dos outros espectros obtidos nesse estudo.

Tabela 14. Atribuição e integração relativa dos sinais de RMN-¹H das LMM de *P. taeda* controle e biodegradado por *C. subvermispora*.

deslocamento químico (ppm)	controle*	15 dias*	30 dias*	60 dias*	90 dias*	atribuição
7,2 – 7,9	0,9	0,8	0,8	0,8	0,8	Ar-H em Ar-COR
6,25 – 7,2	1,3	1,1	1,1	1,3	1,2	Ar-H em Ar-R; H α em Ar-CH=CH-CHO; H β em Ar-CH=CH-CHO e H α em Ar-CH=CH-CH ₂ OAc
5,75 – 6,25	0,50	0,49	0,49	0,50	0,50	H α com α OAc em estruturas β -O-4 e β -1 e H β em Ar-CH=CHCH ₂ OAc
5,20 – 5,75	0,38	0,33	0,33	0,33	0,33	H α com α OAc em estruturas β -5, β -O-4 e β -1
4,50 – 5,20	1,10	0,82	0,66	0,83	0,83	H β em β -O-4; H γ em Ar-CH=CH-CH ₂ OAc e H α em estruturas β - β
3,95 – 4,50	1,50	1,97	1,97	1,80	1,82	H γ em β -O-4, β -5, β -1 e estruturas β - β
3,55 – 3,95	2,2	2,2	2,3	2,3	2,3	Ar-OCH ₃ (principal); H β em β -5 e H γ em estruturas β - β
2,50 – 3,55	0,5	0,7	0,7	0,7	0,50	H β em estruturas β -1, β - β e outras
2,20 – 2,50	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	H em Ar-OAc exceto unidades 5-5
1,50 – 2,20	1,05	0,98	0,99	1,05	0,99	H em alifático-OAc e Ar-OAc em unidades 5-5
1,10 – 1,50	0,55	0,82	0,99	1,16	1,08	H em carbonos saturados não-oxigenados
0,00 – 1,10	0,37	0,33	0,16	0,33	0,17	H em carbonos saturados não-oxigenados

* os números reportados na tabela representam a quantidade de hidrogênios por C₉ após a correção para o teor de carboidratos das amostras. A integração dos hidrogênios em grupos OAc foi dividida por 3 para manter a proporção existente na lignina não acetilada.

Os espectros de RMN- ^{13}C qualitativos obtidos em acetona das **LMM** são apresentados na figura 34 e no apêndice 2. A atribuição dos sinais (tabela 15) foi feita de acordo com Marita *et al.* (1999) e Ralph *et al.* (1998). Para facilitar o entendimento, as atribuições de sinais utilizadas nos RMN- C^{13} , HMQC, HMBC, COSY e HMQC-TOCSY foram feitas de acordo com os principais tipos de ligação entre monômeros reportados para a estrutura de ligninas, conforme ilustrados na figura 35.

Os espectros da figura 34 e do apêndice 2 mostraram características típicas de lignina do tipo guaiacil. Nos espectros desse tipo de lignina observa-se a proeminência dos sinais entre 127–110 ppm (atribuídos aos carbonos C_2 , C_5 e C_6 em unidades do tipo guaiacil) em relação ao sinal de unidades do tipo siringil (105 ppm), que nem apareceram nos espectros da figura 35 e apêndice 2. Pode-se ver ainda a presença de sinais atribuídos as principais unidades presentes em estrutura de ligninas, como unidades β -O-4, β - β , β -5 além dos sinais provenientes de anéis aromáticos, carbonilas e hidroxilas alifáticas e aromáticas.

A comparação dos espectros das ligninas controle e biodegradadas mostrou bastante similaridade entre as amostras. Todavia, pôde-se observar nos espectros das ligninas oriundos de madeiras biodegradadas a presença de sinais novos (marcados com *) em 58 ppm (60 e 90 dias) e abaixo da região de 20 ppm. Essa última região corresponde a absorção de carbonos saturados não-oxigenados e o aparecimento desses sinais corroborou o aumento do teor de prótons ligados a carbonos saturados não-oxigenados, que foram observados nos RMN- ^1H . É importante ressaltar ainda que parte da região de carbonos saturados não-oxigenados ficou encoberta pelo sinal do solvente (região entre 25-35 ppm). Uma vez que os dados obtidos até o momento apontaram para alterações nos teores desse tipo de carbonos, seria interessante ter acesso a essa região do espectro, o que foi feito utilizando-se a região de alto campo nos espectros bidimensionais.

Vale lembrar também que os espectros mencionados são qualitativos e as alterações observadas não incluem mudanças em teores de grupos químicos já existentes no controle. Para isso, as amostras deveriam ser analisadas com técnicas especiais de aquisição de espectros que permitissem a análise quantitativa dos sinais.

Figura 34. Espectro de RMN- C^{13} da 5MM de *P. taeda* não degradado (controle). As letras de A-C correspondem às estruturas A-C da figura 35. Ar = anel aromático; G = anel aromático do tipo guaiacil, a = carbono α ; b = carbono β ; g = carbono γ ; 2/3/4/5/6/ = posições no anel aromático e S= solvente (acetona).

Tabela 15. Atribuição dos sinais de RMN- ^{13}C das LMM de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora*. As ligninas foram previamente acetiladas e dissolvidas em acetona- d_6 .

Região (ppm)	Atribuição do carbono
20,6-20,7	γ - em unidades acetiladas contendo OH primário
20,8-20,9	MeAc em estruturas fenólicas do tipo G e em OH benzílico (α)
29,8	sinal central da acetona (solvente)
50,7-50,1	β - em EG-b1-GF
51,1-51,4	β - em G-c-G
55,3-55,5	β - em G-r-G, G-r-S
56,3-56,5	OCH ₃ em anéis aromáticos
62,8-63,3	γ - em G-b-G (<i>eritro</i>), S-b-G (<i>eritro</i>),
63,2-63,6	γ - em G-b-S (<i>eritro</i>), G-a-G
63,4-63,8	γ - em G-b-G(<i>treo</i>), S-b-G(<i>treo</i>)
64,2-64,5	γ - em G-b-S(<i>treo</i>)
65,0-65,2	γ - em EG-b1-GF
65,2-65,5	γ - em terminações G-alc
65,9-66,1	γ - em G-c-G
72,4-72,7	γ - em G-r-G, G-r-S

72,9-73,4	β - em G-c-G -glicerol
74,4-74,7	α - em G-b-G (<i>eritro</i>)
74,9-75,4	α - em G-b-S (<i>eritro</i>)
75,2-75,7	α - em G-b-G (<i>treo</i>)
75,7-75,8	α - em EG-b1-GF
76,3-76,7	α - em G-b-S (<i>treo</i>)
79,9-80,4	β - em G-b-G (<i>eritro</i>), S-b-G (<i>eritro</i>)
80,3-80,7	β - em G-b-G (<i>treo</i>), S-b-G (<i>treo</i>)
80,6-81,0	α - em G-a-G
81,0-81,4	β - em G-b-S (<i>eritro</i>)
81,4-81,8	β - em G-b-S (<i>treo</i>), G-a-G
83,3-83,6	β - em D
85,3-85,5	α - em D
86,1-86,3	α - em G-r-G
88,3-88,6	α - em G-c-G
88,6-88,9	α - em S-c-G
103,4-103,6	2,6 em FG-r-S
103,6-103,9	2,6 em S-c-G
111,0-111,3	2 em FG-c-G , G-r-G , G-r-S
111,3-111,7	2 em EG-c-G , G-r-G , C-alc , V-ald
111,7-112,0	2 em FG-55-G
112,2-112,4	2 em FG-b-S , 2 em G-c-C-alc
112,4-112,5	2 em EG-b1-GF
112,5-113,1	2 em E,FG-b-G , G-c-G ; 2 em EG-b-S , C-ald ; 2 em FG-a-G
114,2-114,4	2 em EG-b1-GF
115,7-115,9	5 em EV-ald
116,2-116,4	6 em G-c-C-alc
118,2-118,4	5 em EC-ald
118,5-118,6	6 em FG-r-G , G-r-S
118,6-118,7	6 em FG-c-G
118,5-119,1	5 em EG-b-G , G-b-S , G-r-G , EG-b1-GF
119,3-119,5	5 em EG-c-G , 6 em EG-r-G , G-r-G
119,9-120,1	6 em FG-b-S
120,1-120,7	6 em E,FG-b-G ; 6 em EG-b-S , EG-b1-GF , C-alc ; 6 em FG-a-G
121,5-121,7	6 em FG-55-G
122,1-122,3	β - em EC-alc ; 6 em EG-b1-GF
122,4-122,6	5 em FG-r-S , e D
122,7-122,9	3,5 em Ep-OH-benzoato
123,0-123,2	5 em EG-b1-GF
123,2-123,4	5 em FG-b-G , G-b-S , G-a-G ; β em EC-alc
123,6-123,8	5 em FG-c-G , G-r-G ; 6 em EC-ald
124,0-124,2	β - em ES-alc
125,9-126,1	6- em EV-ald
127,8-128,0	1- em F p-OH-benzoato
128,2-128,4	β - em EC-ald
128,9-129,3	5- em G-c-G
129,9-130,1	E em C-ald
131,0-131,2	1- em G-c-G -glicerol

131,5-131,7	5- em FD ; 1- em G-c-C-alc ; 2,6 em F <i>p</i> -OH-benzoato
131,7-132,0	5- em FG-55-G
132,0-132,2	1- em EV-ald
132,2-132,6	1- em EC-ald
132,6-133,0	1- em G-b-G
133,0-133,3	5- em D
133,8-134,4	1-E em S-b-S
134,0-134,2	α -E em C-alc
134,5-134,7	α - em G-c-C-alc
134,7-134,9	1- em EG-b1-GF
135,8-136,0	1- em FG-55-G
136,0-136,6	1- em FG-b-G ; 4 em ES-c-G
136,6-136,8	1- em EG-r-G
137,0-137,3	1- em FG-b-S ; 1- em EG-c-G
137,5-137,7	1- em FG-a-G
137,7-137,9	1- em EG-b1-GF
138,0-138,2	1F em D
138,3-138,5	4- em FG-55-G
140,0-140,2	4- em FG-r-G ; EG-b1-GF
140,5-140,7	4- em FG-b-GS ; G-a-G
140,7-141,0	4- em FG-b-G , D ; 1,4 em FG-c-G
141,7-142,0	1- em FG-r-G
145,0-145,4	3- em G-c-G
147,0-147,6	4- em EG-r-G
147,8-148,0	4- em EG-b1-GF
148,0-148,5	4E em G-b-G , C-alc
149,2-149,4	4- em G-c-C-alc , S-c-C-alc
150,9-151,0	4E em C-ald
151,4-151,7	3- em EG-b-G , G-b-S , V-ald , EG-b1-GF
151,8-152,2	3- em EC-alc , C-ald , G-r-G , G-c-G ; 3- em FG-b-G , G-b-S ; G-a-G , EG-b1-GF , D ; 4- em EG-b-S
152,3-152,7	3- em FG-r-G , G-c-G , G-55-G
153,4-153,6	4- em EV-ald
155,6-155,8	4- em Fp -OH-benzoato
165,5-166,5	Benzoato C=O em <i>p</i> -OH-benzoato
168,9-169,0	C=O de acetil em unidades fenólicas do tipo G
169,2-169,4	C=O de acetil em unidades fenólicas do tipo <i>p</i> -OH-benzoato
169,9-170,0	α C=O benzílico em unidades do tipo G
170,2-170,4	β - ligado à grupo acetil em G-c-G -glicerol
170,6-170,8	γ - ligado à grupo acetil em G-b-G , G-b-S , G-a-G , G-c-G -glicerol
170,9-171,0	γ - ligado à grupo acetil em G-c-G
180,5-180,9	C=O de <i>p</i> -quinona em unidades do tipo G
191,1-191,5	C=O em V-ald
193,8-194,2	C=O em C-ald

Legenda: **G**= guaiacil; **S**= siringil, **C**=coniferil, **D**= dibenzodioxocina, **V**= vanilil, **E**= OH fenólico eterificado, **F**=OH fenólico livre, **a**= α -O-4, **b**= β -O-4, **r**= resinol (β - β), **c**=cumaranas (β -5), **b1**= β -1, **55**= 5-5 (bifenil), **alc**= álcool, **ald**= aldeído, **MeAc**= CH₃ em CH₃COO- (proveniente da reação de acetilação).

Figura 35. Esquema dos diferentes tipos de ligações presentes na estrutura da lignina (Kilpelainen *et al.*, 1994; Marita *et al.*, 1999; Ralph *et al.*, 2001). As estruturas são: **A**, β -aril éter (β -O-4); **B**, fenilcumaranas (β -5); **C**, resinol (β - β); **D**, dibenzodioxocinas (5-5 e β -O-4/ α -O-4); **E**, α,β -diaril éter; **F**, (*E*)-álcool cinamílico; **G**, coniferaldeído; sinais em amarelo, metoxila; e sinais em cinza, provavelmente carboidratos.

Como pode ser observado na figura 34 e no apêndice 2, os RMN- ^{13}C das ligninas apresentaram grande sobreposição de sinais, o que atrapalhou a atribuição e análise dos espectros. Assim, para aumentar o conhecimento das estruturas das ligninas biodegradadas, utilizaram-se também técnicas de ressonância magnética nuclear bidimensionais. Entre os métodos de correlação bidimensionais homo- e heteronucleares conhecidos, segundo Ralph *et al.* (2000) e Kilpelainen *et al.* (1994), os que permitem a obtenção de maiores informações são os experimentos conhecidos como COSY e HMQC. No presente trabalho, foram utilizados, além dessas duas técnicas, outros tipos de experimentos, relativamente mais recentes, como os HMQC-TOCSY. Abaixo, apresenta-se um sumário das principais informações obtidas com os estudos de RMN em 2D.

De uma maneira geral, os experimentos HMQC (figura 36, apêndice 2 e tabela 16) foram bastante úteis para o estudo da estrutura das LMM controle e biodegradadas por *C. subvermispora*. A sensibilidade dos experimentos empregados nesse trabalho foi alta o suficiente para permitir a definição das principais estruturas presentes nas cadeias laterais das ligninas. Entretanto, não obstante a alta sensibilidade empregada, algumas regiões dos espectros ainda apresentaram sinais sobrepostos, como a região entre 3,5–4,7 ppm (δ_{H}) e 60–68 ppm (δ_{C}). Pôde-se observar ainda que as ampliações da região de cadeia lateral nos

espectros da figura 36 e do apêndice 2 apresentaram alguns sinais que vêm sendo atribuídos à presença de carboidratos e/ou não tiveram sua origem completamente elucidada (sinais em cinza) (Ralph *et al.*, 1998; Marita *et al.*, 1999).

Da mesma forma, observou-se que os espectros COSY (figura 37, apêndice 2 e tabela 17) foram obtidos com sensibilidade suficiente para resolver os principais sinais referentes à estrutura da cadeia lateral das **LMM**. No entanto, os espectros COSY também apresentaram sobreposição de sinais. Assim, para se ter maior segurança na atribuição dos sinais, a melhor opção seria utilizar ambas técnicas de maneira complementar. Procedendo dessa forma, a presença de determinada estrutura, cuja correlação C-H aparecesse no espectro HMQC, poderia ser validada pela correlação H-H no espectro COSY. Em alguns casos, algumas estruturas foram ainda corroboradas pelos dados dos espectros DEPT-135, HMBC e HMQC-TOCSY. Utilizando-se essa metodologia, as seguintes estruturas foram detectadas nas **LMM**, **LLE96** e **LLE50**:

estruturas do tipo arilglicerol- β -O-aril éter (unidades β -O-4)

Esse tipo de estrutura apresentou sinais intensos nos espectros HMQC (figura 36 e apêndice 2). Pôde-se observar os sinais relativamente bem resolvidos entre δ_H/δ_C 5,9-6,4/73-76 ppm (sinal 1), e entre δ_H/δ_C 4,2-5,2/79-82 ppm (sinal 2), atribuídos às correlações entre C α -H α e C β -H β , respectivamente. Contudo, os dois prótons metilênicos não equivalentes presentes em posição γ não foram resolvidos na dimensão F2. Esses prótons, δ_H/δ_C 4,0-4,6/62-65 ppm (sinal 3), apareceram sobrepostos com outros sinais referentes a outros tipos de estruturas, bem como com sinais devido a carboidratos.

Nos espectros COSY (figura 37 e apêndice 2), apesar da maior sobreposição de sinais, pôde-se observar ainda sinais referentes à presença de estruturas do tipo arilglicerol- β -O-aril éter. Os sinais A e B, atribuídos aos acoplamentos entre os prótons H α -H β e H β -H γ , respectivamente, puderam ser observados com relativa intensidade nos espectros da figura 37.

Tabela 16. Atribuição dos sinais de HMQC das LMM de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora*.

deslocamento químico (ppm)			
sinal	δ_H	δ_C	atribuição
1	5,9-6,4	73-76	arilglicerol- β -O-aril; C α -H α
2	4,2-5,2	79-82	arilglicerol- β -O-aril; C β -H β
3	4,0-4,6	62-65	arilglicerol- β -O-aril; C γ -H γ
4	5,4-5,7	88-90	fenilcumarana ; C α -H α
5	3,6-4,0	50-53	fenilcumarana ; C β -H β
6	4,2-4,5	65-67	fenilcumarana ; C γ -H γ
7	4,7-4,8	85-86	pinorresinol; C α -H α
8	3,0-3,3	55-57	pinorresinol; C β -H β
9	4,0-4,3	72-73	pinorresinol; C γ -H γ _(axial)
10	3,8-4,0	72-73	pinorresinol; C γ -H γ _(equal)
11	4,8-5,0	85-86	dibenzodioxocina; C α -H α
12	4,2-4,4	83-84	dibenzodioxocina; C β -H β
13	4,6-4,8	64-66	álcool cinâmico; C γ -H γ
14	3,4-4,2	55-58	metoxilas
15	5,3-5,5	72-74	arilglicerol; C β -H β
16	3,4-4,9	66-72	carboidratos
17	3,9-4,3	68-70	carboidratos
18	5,0-5,4	68-72	carboidratos
19	3,8-4,2	62-65	carboidratos
20	3,5-3,7	57-59	etanol; C β -H β
21	2,5-2,7	32-33	3-aril-1-propanol; C α -H α
22	1,8-2,0	31-32	3-aril-1-propanol; C α -H α
23	1,5-3,0	19-21	Me em grupos acetil

Tabela 17. Atribuição dos sinais COSY das LMM de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora*.

sinal	F2	F1	atribuição
A	6,0	4,8	arilglicerol- β -O-aril; H α -H β
B	4,8	4,2	arilglicerol- β -O-aril; H β -H γ
C	5,6	3,8	fenilcumarana ; H α -H β
D	4,4	3,2	fenilcumarana ; H β -H γ
E	5,9	5,4	arilglicerol; H α -H β
F	5,4	4,1	arilglicerol; H β -H γ
G	5,3	4,1	dibenzodioxocina; H α -H β
H	9,7	6,6	coniferaldeído; H γ -H β
I	7,6	6,6	coniferaldeído; H α -H β

estruturas do tipo fenilcumaranas (unidades β -5)

Estruturas do tipo fenilcumaranas apresentaram sinais menos intensos que aqueles observados para estruturas do tipo β -O-4 nos espectros HMQC (figura 36 e apêndice 2). Observou-se nos espectros que os sinais atribuídos a correlações entre $C\alpha$ - $H\alpha$ (sinal 4, δ_H/δ_C 5,4-5,7/88-90 ppm) e $C\beta$ - $H\beta$ (sinal 5, δ_H/δ_C 3,6-4,0/50-53 ppm) apresentaram-se bem resolvidos. Já o sinal 6, atribuído à correlação $C\gamma$ - $H\gamma$ (δ_H/δ_C 4,2-4,5/65-67 ppm) apareceu sobreposto aos sinais referentes a estruturas β -O-4, álcool cumarílico e carboidratos.

Os sinais devido à presença de estruturas do tipo fenilcumaranas apareceram também com relativa intensidade nos espectros COSY (figura 37 e apêndice 2). Pôde-se observar claramente os sinais C (5,6-3,8 ppm) e D (4,4-3,2 ppm), atribuídos às correlações entre $H\alpha$ - $H\beta$ e $H\beta$ - $H\gamma$, respectivamente.

estruturas do tipo pinorresinol (unidades β - β)

Nos HMQCs da figura 36 e apêndice 2 observou-se a presença de dois sinais (sinais 9 e 10) atribuídos aos dois prótons metilênicos não equivalentes em posição γ , em δ_H 4,0-4,3 (axial) e 3,8-4,0 ppm (equatorial), com o mesmo deslocamento químico na dimensão δ_C (72-73 ppm), em estruturas do tipo pinorresinol. Os outros sinais referentes a esse tipo de estrutura, como os sinais 7 e 8, atribuídos aos acoplamentos $C\alpha$ - $H\alpha$ e $C\beta$ - $H\beta$, também puderam ser observados nas regiões δ_H/δ_C 4,7-4,8/85-86 e δ_H/δ_C 3,0-3,3/55-57, respectivamente.

A análise dos espectros COSY mostrou que, interessante, os acoplamentos de prótons esperados para unidades do tipo pinorresinol não apareceram. Para esse tipo de estrutura, seria esperado o aparecimento de sinais em δ_H/δ_C 4,7-3,3 e 3,3 – 4,0 ppm (nas dimensões F1 e F2) devido aos acoplamentos $H\alpha$ - $H\beta$ e $H\beta$ - $H\gamma$. O não aparecimento desses sinais sugere que o tempo de relaxação das estruturas do tipo pinorresinol seja bastante diferente das outras estruturas observadas.

estruturas do tipo dibenzodioxocinas (unidades 5-5/ β -O-4, α -O-4)

Dibenzodioxocinas foram recentemente reportadas na literatura (Marita *et al.*, 1999; Ralph *et al.*, 1998). Essas unidades seriam o resultado do acoplamento 5-5 de unidades guaiacil com monolignols (Ralph *et al.*, 1998) e sua presença tem sido, desde então, observada em diferentes tipos de lignina (Marita *et al.*, 1999). Nos espectros HMQC da figura 36 e apêndice 2 pôde-se observar claramente a presença dos sinais 11 (δ_H/δ_C 4,8-5,0/85-86) e

12 (δ_H/δ_C 4,2-4,4/83-84), atribuídos às correlações $C\alpha-H\alpha$ e $C\beta-H\beta$, respectivamente, em estruturas do tipo dibenzodioxocinas.

A presença de estruturas do tipo dibenzodioxocinas nas **LMM** estudadas foi confirmada pela presença do sinal G (em 5,3-4,1 ppm), atribuído à correlação $H\alpha-H\beta$ nessas estruturas. No entanto, a correlação entre os $H\beta-H\gamma$, esperados em 4,2 – 4,4 (F2-F1) ppm, ocorreria numa região não muito bem definida do espectro e, portanto, não pôde ser detectada.

Outras estruturas laterais detectadas

Além das principais estruturas laterais reportadas anteriormente, os espectros HMQC e COSY ainda indicaram a presença de outras estruturas laterais presentes nas **LMMs**. O sinal 13, em HMQC, ($^1H/^13C$ 4,6-4,8/54-66), atribuído ao acoplamento $C\gamma-H\gamma$, nos HMQCs indicaram a presença de resíduos de álcool cinamílico nas ligninas. Esse tipo de estrutura também tem sido reportada por Ralph *et al.* (2000) em seus estudos de ligninas de diferentes origens.

Os espectros da figura 36 e do apêndice 2 ainda apresentaram outros sinais, como por exemplo os sinais 16, 17, 18 e 19, que ainda não tiveram suas origens completamente elucidadas. Todavia, vários autores têm reportado a presença de carboidratos contaminantes nas regiões próximas aos sinais mencionados (Fukagawa *et al.*, 1991; Ralph *et al.*, 1998; Marita *et al.*, 1999).

As atribuições de algumas estruturas puderam ainda ser validadas pelos dados de HMQC-TOCSY (figura 38). Nesse tipo de experimento, um determinado átomo de carbono se correlaciona com os prótons diretamente ligados a ele e também com todos os outros prótons que estão dentro de uma mesma rede de ligações. Em geral, segundo Marita *et al.* (1999), todos os prótons da cadeia lateral encontram-se dentro de uma mesma rede de ligações para qualquer tipo estrutural de lignina. Esse tipo de espectro, apesar de não ser quantitativamente apurado, permite a fácil identificação de algumas ligações devido à repetição de informações. Assim, sabendo-se que estruturas do tipo arilglicerol- β -O-aril éteres têm prótons alfa absorvendo na região de 6 ppm, deve-se esperar o aparecimento de sinais em 6,0-80, 6,0-74 e 6,0-64 ppm, devido aos acoplamentos com os carbonos alfa, beta e gama, respectivamente. Na figura 38, observou-se também os acoplamentos referentes as ligações β -5 e β - β em resíduos de álcool cinamílico. Cabe ainda ressaltar que, segundo Marita *et al.* (1999), como as intensidades dos sinais nos espectros HMQC-TOCSY dependem das constantes de acoplamento prótons-prótons entre outros fatores, nem todas as correlações

podem ser vistas e as intensidades entre elas nem sempre variam como função da quantidade de cada estrutura presente.

Figura 38. Ampliação do espectro HMQC-TOCSY de **LMM** de *P.taeda* controle.

Em adição aos sinais provenientes dos principais tipos de acoplamentos existentes nas cadeias laterais, os espectros COSY (figura 37 e apêndice 2) mostraram também um sinal bastante intenso na região de 9,7-6,7 e 7,6-6,6 (F1-F2). Esse sinal ainda não foi completamente identificado por estudos com compostos modelos, mas a posição seria a esperada para acoplamentos $H\gamma$ - $H\beta$ e $H\beta$ - $H\alpha$ em estruturas do tipo coniferaldeído. Estruturas deste tipo são esperadas nos produtos de oxidação de lignina e seriam formadas pela oxidação de terminais de álcool coniferílico.

O sinal 15 nos espectros HMQCs (figura 36 e apêndice 2) sugeriu a presença de estruturas do tipo arilglicerol (estrutura IV, figura 32). Pôde-se observar nos espectros somente o sinal na região δ_H/δ_C 5,3-5,5/72-74, atribuídos ao acoplamento $C\beta$ - $H\beta$. Todavia, os sinais devido aos acoplamentos $C\alpha$ - $H\alpha$ e $C\gamma$ - $H\gamma$, esperados entre δ_H/δ_C 5,9-6,4/73-76 (C^{13}) e entre δ_H/δ_C 4,2-5,2/79-82, respectivamente, provavelmente estariam sobrepostos aos sinais devido aos mesmos acoplamentos em estruturas do tipo β -O-4.

Tal suposição foi corroborada pela presença dos sinais E e F nos espectros COSY (figura 37 e apêndice 2). Esses sinais, entre 5,9-5,4 e 5,4-4,1 (dimensões F1-F2), podem ser atribuídos aos acoplamentos $H\alpha$ - $H\beta$ e $H\beta$ - $H\gamma$, respectivamente, em estruturas do tipo arilglicerol. Kilpelainen *et al.* (1994) também detectaram a presença desse tipo de estrutura em HMQC de lignina de “birch”. Outros trabalhos também têm sugerido a presença de tais unidades em **LMM** de diferentes materiais lignocelulósicos (Fukagawa *et al.*, 1991).

Contudo, a origem das unidades arilglicerol, se proveniente da lignina *in natura* ou o resultado de reações de degradação ocorrido durante o processo de moagem, ainda não foi completamente esclarecida.

A presença de unidades arilglicerol é muito relevante para os propósitos desse trabalho. Esse tipo de unidade é esperada na estrutura das ligninas proveniente da madeira biodegradada, uma vez que dados reportados no presente trabalho e outros estudos com fungos de decomposição branca têm apontado na direção da clivagem de ligações β -O-aril éter (figura 32 –rota A₂). Por isso, espera-se esse tipo de estrutura como um dos possíveis produtos de degradação da lignina por *C. subvermispora*. No entanto, os sinais referentes às estruturas do tipo arilglicerol apareceram também nos espectros da **LMM** controle. Por isso, para determinar se houve aumento na quantidade dessas estruturas em função do tempo de biodegradação seria necessário a utilização de uma abordagem quantitativa, o que será comentado mais adiante. Por outro lado, os sinais esperados para os acoplamentos das subestruturas do tipo I e II (figura 32), produtos de degradação formados pela mesma rota, se presentes, não poderiam ser distinguidos dos sinais provenientes dos carbonos β e γ de estruturas β -O-4 utilizando-se essa sequência de pulsos.

Ainda mais contundente nos espectros da figura 36 e apêndice 2 foi a ausência do sinal esperado para a subestrutura do tipo composto VI (figura 32), devido ao acoplamento C β -H β esperado na região de δ_H/δ_C 5,5/85 ppm. Segundo Marita *et al.* (1999), esse sinal seria bastante intenso e resolvido nas condições experimentais utilizadas e sua ausência indicou que subestruturas do tipo VI não foram formadas. Da mesma forma, o sinal esperado em δ_H/δ_C 3,3/37,2 ppm, proveniente do acoplamento C β -H β em estrutura tipo V (figura 32), também não apareceu nos espectros HMQC. Esses resultados indicaram que, se a degradação seguiu a rota B (figura 32), os produtos formados não foram estabilizados nas formas de subestruturas do tipo V e VI.

A comparação entre os espectros HMQC das **LMM** mostrou ainda que o único sinal presente somente nas ligninas provenientes de madeiras biodegradadas (sinal 20) ocorreu na região δ_H/δ_C 3,5-3,7/57-59 ppm. No entanto, conforme discutido mais adiante, esse sinal foi atribuído a, provável, presença de resíduos de etanol, que foi adicionado às amostras durante a etapa de acetilação. A similaridade observada entre os espectros das **LMM** controle e biodegradadas sugeriu que as reações de degradação ocorridas durante o tratamento de *P. taeda* com *C. subvermispora* formaram grupos funcionais já existentes nas cadeias laterais da lignina controle. Por outro lado, os resultados dos RMN- ¹³C mostraram o aparecimento de sinais novos somente na região de alto campo (0-50ppm), que não apareceram nas ampliações

da região oxigenada das cadeias laterais apresentadas anteriormente. Com isso, as alterações ocorridas na estrutura das **LMM** seriam de natureza quantitativa e/ou apareceriam na região de alto campo dos espectros HMQC e, portanto, não estariam sendo detectadas pelas metodologias aplicadas até o momento. Por essa razão, resolveu-se ampliar os estudos dos HMQC para a região de alto campo, como descrito abaixo, bem como fazer uma abordagem quantitativa das espécies envolvidas na biodegradação, como pode ser visto nos itens V.2.6-V.2.8.

Como mencionado anteriormente, a análise da região entre 20-40 ppm nos RMN- C^{13} não foi possível devido à sobreposição dos sinais dessa região com o sinal proveniente do solvente utilizado. Para avaliar possíveis alterações nessa região, utilizou-se, então, a ampliação da região de alto-campo dos espectros HMQC (figura 39 e apêndice 2). O emprego da sequência de pulsos utilizada para gerar os espectros HMQC permitiu a maior separação dos sinais nessa região e, conseqüentemente, a avaliação dos sinais encobertos pela acetona nos espectros de RMN- C^{13} . Todavia, essa região do espectro HMQC tem sido pouco utilizada e apenas alguns autores fazem referência aos sinais aí encontrados. Com isso, na região de alto campo dos espectros da figura 39 e apêndice 2, somente os sinais 21, 22 e 23 tiveram, até o momento, suas origens reportadas na literatura (Fukagawa *et al.*, 1991). Os sinais 21 e 22 têm sido atribuídos aos acoplamentos $C\alpha-H\alpha$ e $C\beta-H\beta$, respectivamente, em estruturas do tipo $Ar-CH_2-CH_2-CH_2OH$. Já o intenso sinal observado entre δ_H/δ_C 1,5-3,0/19-21 ppm (sinal 23) tem sido atribuído ao acoplamento C-H de CH_3 em grupos acetil (Fukagawa *et al.*, 1991).

Mesmo com o pouco conhecimento a respeito da região de alto campo dos HMQC, pôde-se observar o aparecimento de três sinais bastante intensos nos espectros das **LMM** biodegradadas, denominados aqui de X (δ_H/δ_C 1,9/32 ppm), Y (δ_H/δ_C 1,1/18,7 ppm) e Z (δ_H/δ_C 1,2/14,3 ppm) (apêndice 2). Para se obter maiores informações a respeito das subestruturas responsáveis por tais sinais, as amostras foram analisadas por DEPT-135 (“Distorsionless Enhanced Polarization Transference”. A figura 40 mostra um exemplo de DEPT-135 obtido para as amostras de **LMM**, onde os sinais de CH_3 e CH apareceram no sentido positivo e os CH_2 no negativo.

O espectro da figura 40 mostrou os sinais Y e Z no sentido positivo do DEPT, o que significa que eles tiveram origem em grupos CH_3 ou CH, enquanto o sinal X pareceu ter origem em grupos CH_2 . Pôde-se observar ainda no espectro DEPT que o sinal em 58 ppm (sinal 20 nos HMQC) foi negativo, indicando a presença do grupo CH_2 . Como dito anteriormente, o sinal 20 foi identificado como etanol e a presença do sinal referente ao grupo CH_2 no DEPT corroborou a presença desse álcool nas amostras.

Figura 39. Ampliação da região de alto-campo do HMQC da **LMM** de *P. taeda* não degradado (controle). Os números 21-23 correspondem aos números da tabela 16.

Outra metodologia utilizada para aumentar o conhecimento sobre as subestruturas que deram origem aos sinais X, Y e Z foi a técnica bidimensional conhecida como HMBC. Nesse tipo de espectro pode-se observar as correlações entre um determinado próton com os carbonos vizinhos (até três ligações) ao átomo de carbono que esse próton está ligado. A figura 41 apresenta a ampliação da região onde apareceram os sinais X, Y e Z presentes nas **LMM** biodegradadas. No espectro da figura 41, o sinal na região δ_H/δ_C 1,1/58 ppm indicou que o próton absorvendo a 1,1 ppm (sinal Y no HMQC) estava correlacionado somente com um átomo de carbono, que absorvia em 58 ppm e que, como já observado anteriormente (DEPT-135, figura 40), era provavelmente um CH_2 . Observou-se também que o carbono absorvendo em 58 ppm (sinal 20) só apresentou correlação com o próton absorvendo em 1,1 ppm. A compilação desses resultados mostrou que os sinais 20 e Y nos HMQC eram, respectivamente, provenientes de grupos CH_2 e CH_3 do etanol, que apareceu como resíduo do procedimento de acetilação das amostras. Essa estrutura justificaria a correlação observada no HMBC, os sinais observados no DEPT e também as posições observadas nos HMQC (figuras 41, 40 e apêndice 2, respectivamente).

Figura 40. DEPT-135 de **LMM** de *P. taeda* biodegradado por 90 dias.

Figura 41. Ampliação do HMBC de **LMM** de *P. taeda* biodegradado por 90 dias.

O espectro da figura 41 mostrou também que o próton em 1,2 ppm (sinal Z) pareceu estar correlacionado com carbonos em 60 e 30 ppm. Como foram observadas duas correlações e o sinal do DEPT foi positivo, concluiu-se que o sinal Z foi, provavelmente, proveniente de um CH₃ em posição γ acoplado a dois outros carbonos em 30 e 60 ppm (carbonos β e α de cadeias propânicas).

Como o sinal X apareceu em região onde havia outros sinais de prótons, nenhuma informação adicional pôde ser obtida do HMBC em relação a este sinal. Dessa forma, para a completa elucidação das estruturas responsáveis pelos sinais Z e X seria necessário a síntese de compostos modelos contendo carbonos saturados não-oxigenados, o que foge dos propósitos desse trabalho. No entanto, é importante ressaltar que a presença desses sinais confirmou o aparecimento de compostos com carbonos não-oxigenados na estrutura das ligninas degradadas, corroborando os dados de RMN-¹H e ¹³C observados anteriormente, que indicaram a ocorrência de reações de redução durante a biodegradação de lignina.

Da mesma forma que a **LMM**, as preparações de **LLE96** e **LLE50** também foram analisadas por RMN. O apêndice 3 apresenta os RMN-¹H das **LLE96**, a atribuição dos sinais, feitas de acordo com Ralph *et al.* (2000), e os resultados das integrações podem ser vistos na tabela 18.

Neste caso, ao contrário das **LMM**, a comparação do número de prótons por C₉ nas **LLE96** não evidenciou a ocorrência de alterações significativas em nenhum tipo de próton. Esse resultado confirmou os dados anteriores, indicando que não houve alteração na estrutura das ligninas presentes nestas preparações.

As **LLE96** foram analisadas por RMN-C¹³ (figura 42 e apêndice 3) e os espectros também apresentaram os sinais característicos de ligninas de madeira mole. Contudo, observou-se uma maior sobreposição de sinais na região de 60 – 70 ppm. De acordo com Seca *et al.* (2000), sinais sobrepostos nessa região indicam a presença de quantidades significativas de carboidratos nas amostras, o que estaria de acordo com as análises de polissacarídeos e os dados de GPC (itens V.2.1 e V.2.2), mostrando que as **LLE96** continham elevado teor de carboidratos.

Tabela 18. Atribuição e integração dos sinais de RMN-¹H das **LLE96** de *P. taeda* controle e biodegradado por *C. subvermispora*.

Deslocamento químico (ppm)	Controle	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias	Atribuição
7,2 – 7,9	0,9	0,8	0,8	0,8	0,8	Ar-H em Ar-COR
6,25 – 7,2	1,3	1,1	1,1	1,3	1,2	Ar-H em Ar-R; H α em Ar-CH=CH-CHO H β em Ar-CH=CH-CHO e H α em Ar-CH=CH-CH ₂ OAc
5,75 – 6,25	0,50	0,49	0,49	0,50	0,50	H α com α Oac em estruturas β -O-4 e β -1 e H β em Ar-CH=CHCH ₂ OAc
5,20 – 5,75	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	H α com α Oac em estruturas β -5, β -O-4 e β -1
4,50 – 5,20	0,82	0,82	0,86	0,83	0,83	H β em β -O-4; H γ em Ar-CH=CH-CH ₂ OAc e H α em estruturas β - β
3,95 – 4,50	1,90	1,97	1,97	1,90	1,82	H γ em β -O-4, β -5, β -1 e estruturas β - β
3,55 – 3,95	2,2	2,2	2,3	2,5	2,5	Ar-O-CH ₃ (principal); H β em β -5 e H γ em estruturas β - β
2,50 – 3,55	0,65	0,66	0,66	0,66	0,60	H β em estruturas β -1, β - β e outras
2,20 – 2,50	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	H em Ar-OAc exceto unidades 5-5
1,50 – 2,20	1,05	0,98	0,99	1,05	0,99	H em alifático-OAc e Ar-OAc em unidades 5-5
1,10 – 1,50	0,55	0,52	0,56	0,53	0,58	H em carbonos saturados não-oxigenados
0,00 – 1,10	0,37	0,33	0,36	0,33	0,37	H em carbonos saturados não-oxigenados

* os números reportados na tabela representam a quantidade de prótons por C₉ após a correção para o teor de carboidratos das amostras. A integração dos hidrogênios em grupos OAc foi dividida por 3 para manter a proporção existente na lignina não acetilada.

Figura 42. Espectro de RMN- ^{13}C de **LLE96** de *P. taeda* não degradado (controle).

A comparação dos RMN- ^{13}C das ligninas da figura 42 e do apêndice 3 evidenciou o aparecimento dos sinais entre 85–95 ppm (marcados com *). No entanto, os deslocamentos químicos desses sinais estavam fora das regiões de absorção atribuídas às diferentes unidades presentes na estrutura da lignina (tabela 15). Segundo a “Base de Dados de Ressonância Magnética Nuclear de Lignina e Outros Compostos Presentes nas Paredes de Celulas Vegetais” reportado por Ralph *et al.* (1998), tais sinais poderiam ser provenientes da absorção de carbonos anoméricos em resíduos de xilose. Portanto, a posição dos referidos sinais indicou, inicialmente, serem eles referentes à absorção de carboidratos. Assim, da mesma forma descrita anteriormente, utilizaram-se outras técnicas de RMN para se aumentar o conhecimento da estrutura das **LLE96**.

Os espectros HMQC e COSY das **LLE96** podem ser vistos nas figuras 43 e 44, e no apêndice 3. Também nesses espectros pôde-se observar a presença dos principais tipos de estruturas reportados anteriormente para **LMM**. Entretanto, nesse caso, os espectros apresentaram maior sobreposição de sinais que os anteriores (figuras 36 e 37). A maior sobreposição de sinais nos HMQCs (figuras 43 e apêndice 3), principalmente nas regiões entre 4,0-3,4 ppm (H^1) e 60-70 ppm (^{13}C) e 5,5-5,0 ppm (H^1) e 65-75 ppm (^{13}C), confirmou os resultados anteriores, mostrando que as **LLE96** continham maiores teores de carboidratos na sua estrutura que as **LMM**. Segundo Fukagawa *et al.* (1991), as regiões descritas acima são características da presença de resíduos de anidroxilose e confirmam dados da literatura, uma

vez que alguns autores já reportaram a impossibilidade de se remover completamente a hemicelulose sem gerar modificações estruturais na lignina (Fukagawa *et al.*, 1991).

Em adição aos sinais reportados anteriormente, pôde-se observar ainda a presença de outros sinais bem resolvidos acima de 85 ppm nos HMQC das **LLE96**. Os três sinais acima de 5,5/90 ppm ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) apresentaram deslocamentos químicos próximos aos esperados para acoplamentos C-H de carbonos anoméricos de resíduos de carboidratos (Ralph *et al.*, 1998). Carbonos anoméricos são esperados com deslocamentos químicos entre 89-93 ppm (Ralph *et al.*, 1998) e o grande deslocamento observado no canal de prótons seria o esperado para prótons altamente desacoplados, como aqueles ligados à carbonos anoméricos. Segundo Fukagawa *et al.* (1991), a presença de vários sinais nessa região indica o envolvimento de diferentes tipos de carbonos anoméricos nas **LLE96**. O espectro DEPT-135 (figura 45) mostrou sinal positivo para os carbonos absorvendo entre 80-90 ppm. Como dito anteriormente, o sinal positivo no DEPT significa que o carbono está ligado a um ou três átomos de hidrogênio, reforçando a possibilidade dos sinais serem provenientes de carbonos anoméricos. Ainda mais informativo a respeito desses sinais foi o espectro HMQC-TOCSY (figura 46). A figura 46 mostrou que a sequência de pulsos do HMQC-TOCSY permitiu separar 5 sinais na região entre 5,7-6,4 ppm (^1H) e 80-90 ppm (^{13}C). Observou-se ainda que todos os cinco sinais nessa região apresentaram correlações em aproximadamente 71, 69 e 61 ppm. Esses sinais seriam os esperados para as correlações entre prótons ligados em carbonos anoméricos e os carbonos C₂, C₃ e C₅, respectivamente, na estrutura de resíduos de hemicelulose. As correlações entre os carbonos anoméricos e os prótons ligados nos carbonos C₂, C₃ e C₅, que apareceram nas regiões próximas a 5,5, 5,3 e 4,1 ppm foram bem definidas no espectro. Portanto, a compilação das diferentes técnicas empregadas permite suportar a idéia de que os sinais observados acima de 5,5/90 ppm sejam provenientes de carbonos anoméricos de resíduos de polioses presentes nas **LLE96**. Entretanto, os outros sinais referentes às correlações entre prótons e os carbonos C₂, C₃, C₄ e C₅ nos HMQCs estariam exatamente nas regiões que apresentaram sobreposições de sinais e por isso não poderiam ser claramente observados.

Figura 43. Espectro HMQC de LLE96 de *P. taeda* não degradado (controle).

Figura 44. Espectro COSY de LLE96 de *P. taeda* não degradado (controle)

Figura 45. Espectro DEPT-135 de **LLE96** de *P. taeda* controle.

Figura 46. Espectro HMQC-TOCSY de **LLE96** de *P. taeda* controle.

O sinal em 96 ppm nos espectros de RMN- C^{13} da **LLE96** controle desapareceu nas ligninas biodegradadas (figura 42 e apêndice 3). Observou-se no HMQC da **LLE96** controle (figura 43) que esse carbono estava acoplado a um próton que apresentava ressonância em 4,6 ppm. Da mesma forma que nos RMN- ^{13}C , o sinal devido ao acoplamento C-H desapareceu nas ligninas degradadas. Contudo, os dados de RMN para estruturas presentes em células vegetais não apresentam nenhum composto modelo com ressonância na região de 85-95 ppm (Ralph *et al.*, 1998). O espectro DEPT-135 (figura 45) mostrou sinal positivo na região de 96 ppm, indicando a presença de CH ou CH₃. A ampliação da região de 96 ppm do HMBC da **LLE96** controle (figura 47) mostrou que o carbono em ressonância em 96 ppm apresentava acoplamentos com prótons em ressonância a 4,9, 4,4 e 3,7 ppm. O espectro COSY (figura 44) mostrou que o próton em 4,6 ppm estava acoplado a dois prótons em ressonância em 3,7 e 4,4 ppm e que o próton em 4,9 ppm estava acoplado ao próton em 4,4 ppm. O alto deslocamento químico dos prótons em 4,9, 4,6, 4,4 e 3,7 ppm sugeriu que esses prótons estariam ligados a átomos de carbonos oxigenados. A combinação dos resultados sugere que o sinal em 4,6/98 ppm seja também proveniente de um carbono anomérico. Entretanto, a ressonância desse carbono está fora da região esperada para carbonos anoméricos (89-93 ppm) de resíduos de carboidratos.

Figura 47. Ampliação do espectro HMBC da **LLE96** de *P. taeda* não degradado (controle).

Os outros dois sinais observados em 5/98 e 4.8/101 ppm nos HMQCs não foram observados nos HMBC e HMBC-TOCSY. Todavia, os deslocamentos químicos observados foram os esperados para carbonos de polissacarídeos (C1) em ligação éter com anéis aromáticos (Ralph *et al.*, 1998). Este tipo de estrutura estaria de acordo com os dados de GPC, mostrando que as **LLE96** continham resíduos de carboidratos ligados física e quimicamente a sua estrutura. No

entanto, é importante ressaltar que mais estudos seriam necessários para a confirmação das estruturas mencionadas.

O apêndice 3 apresenta a ampliação da região de alto campo dos HMQCs das **LLE96**. Ao contrário do observado nas **LMM**, os espectros das **LLE96** não apresentaram nenhuma modificação marcante na região sobreposta pela acetona. Esses resultados estão de acordo com as análises dos RMN- ^1H e ^{13}C , que não evidenciaram nenhuma alteração nas regiões de carbonos-saturados não-oxigenados nesta preparação de lignina.

As preparações de **LLE50** também foram analisadas por RMN. Neste caso, devido a grande quantidade de carboidratos contaminantes, as amostras não foram solúveis em acetona. Por isso, essas amostras foram analisadas utilizando-se DMSO como solvente.

De uma maneira geral, pôde-se dizer que as características espectrais das **LLE50** (apêndice 4) foram muito similares às das **LLE96**. Também neste caso, nenhuma modificação estrutural pôde ser observada com as diferentes técnicas de ressonância empregadas, indicando que não houve alteração significativa na estrutura da lignina residual nestas amostras.

A compilação dos resultados de RMN com aqueles obtidos por DFRC e GPC mostra que as alterações induzidas pelo fungo na lignina residual da madeira biodegradada foram detectadas somente nas preparações de **LMM**. Porém, cabe aqui enfatizar que, segundo Capanema *et al.* (2001), apesar de não serem quantitativos, os sinais nos espectros HMQC e COSY podem ser utilizados como uma medida relativa da abundância dos diferentes tipos de estruturas nas **LMM**. No entanto, para serem utilizados para estimativas quantitativas, as análises devem ser feitas exatamente nas mesmas condições, como por exemplo a concentração de lignina e os parâmetros de aquisição e processamento dos resultados (Capanema *et al.*, 2001). Contudo, neste trabalho, o número de varreduras efetuadas em cada amostra respeitou a demanda do aparelho de RMN e não foi constante para todas as ligninas isoladas, impossibilitando assim abordagens quantitativas dos experimentos de ressonância magnética. Por isso, para avaliar a possibilidade de formação ou diminuição da quantidade de grupos funcionais específicos, as diferentes preparações de lignina foram caracterizadas por UV/visível, infravermelho, análise elementar e teor dos principais grupos funcionais, conforme descrito a seguir.

V.2.6. UV/Visível

As figuras 48, 49 e 50 mostram os espectros de UV/visível das **LMM**, **LLE96** e **LLE50**, respectivamente, isoladas de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora* e a tabela 19 apresenta os valores de absortividade em alguns comprimentos de onda. De maneira geral, os espectros apresentaram características típicas de lignina, com um máximo de absorção em 280 nm e um ombro em 310 nm. Essas bandas são atribuídas à absorção de anéis aromáticos substituídos e α -carbonilas e/ou α - β insaturações, respectivamente (Goldshimid, 1971).

Observou-se nos espectros de todas as ligninas um pequeno aumento nas absortividades em 280 e 310 nm após 30 dias de biodegradação, com exceção das **LLE50**, cujo aumento já pôde ser observado com 15 dias de biodegradação. No entanto, os dados da tabela 19 mostraram que a relação 280/310 não apresentou modificações significativas em função do tempo de biodegradação em nenhuma das três preparações de lignina, o sugeriu que a biodegradação não alterou de forma significativa a estrutura C₉ das ligninas. Reações que levassem a desmetoxilação deveriam aumentar a absortividade em 280 nm, assim como reações que levassem ao acúmulo de α -carbonilas ou α - β insaturações deveriam aumentar a absortividade em 310 nm (Goldshimid, 1971). Ainda mais importante na tabela 19 foi a redução nas relações 280/405 e 280/420, que indicaram a formação de cromóforos (quinonas) que absorvem na região do visível em função do tempo de biodegradação. Após 90 dias de biodegradação, a **LMM** apresentou uma queda significativa das absortividades em 280 e 310 nm, sugerindo a abertura de anéis aromáticos dessa fração de lignina, conforme já havia sido observado nos ensaios com oxidação por CuO (item V.1.2) em períodos prolongados de biodegradação (Goldshimid, 1971).

(a)

(b)

Figura 48. Espectros UV (a) e visível (b) das LMMs isoladas de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora*. Controle (♦), 15 dias (Δ), 30 dias (•), 60 dias (□) e 90 dias de biodegradação (x).

(a)

(b)

Figura 49. Espectros UV (a) e visível (b) das LLE96 isoladas de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora*. Controle (♦), 15 dias (Δ), 30 dias (●), 60 dias (□) e 90 dias de biodegradação (x).

(a)

(b)

Figura 50. Espectros UV (a) e visível (b) das LLE50 isoladas de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora*. Controle (♦), 15 dias (Δ), 30 dias (•), 60 dias (□) e 90 dias de biodegradação (x).

Tabela 19. Absortividades na região de UV/Visível das ligninas de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora*.

Amostra	Absortividades (L/g.cm)				Relações de absorvidade		
	280	310	405	420	280/310	280/405	280/420
LMM							
Controle	15,4	6,9	0,14	0,10	2,2	110	154,0
15 dias	14,6	5,9	0,23	0,17	2,4	63,5	85,9
30 dias	17,8	8,4	0,28	0,21	2,1	63,6	84,8
60 dias	18,4	8,2	0,29	0,21	2,2	63,4	87,6
90 dias	14,7	6,1	0,26	0,20	2,4	56,5	73,5
LLE96							
Controle	14,3	4,6	0,10	0,07	3,1	143	204
15 dia	13,5	4,9	0,12	0,09	2,8	112,5	150
30 dias	15,4	6,2	0,16	0,11	2,5	96,2	140
60 dias	16,8	7,1	0,20	0,14	2,4	84	120
90 dias	16,0	5,6	0,30	0,28	2,8	53,3	57
LLE50							
Controle	9,3	4,6	0,20	0,16	2,0	46,5	58,1
15 dias	10,6	5,1	0,28	0,20	2,1	37,8	53,0
30 dias	12,7	5,8	0,30	0,23	2,2	42,3	55,2
60 dias	12,3	5,3	0,46	0,26	2,3	26,7	47,3
90 dias	9,1	5,9	0,60	0,48	1,5	15,2	18,9

V.2.7 Infravermelho

A atribuição de bandas de espectros de infravermelho de lignina tem sido feita através de estudos com compostos modelos. A análise comparativa das bandas de ligninas de diferentes espécies de madeira permite a classificação das diferentes ligninas em três grandes grupos: G, GS ou HGS, de acordo com suas principais características espectrais (Faix, 1991). Abaixo, apresenta-se uma compilação das atribuições das bandas para todas as ligninas isoladas de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora*, que foram feitas de acordo com Faix (1991) (Tabela 20).

Os espectros de infravermelho das LMMs (Figura 51) apresentaram características típicas de uma lignina do tipo guaiacil (tipo G). A principal característica desse tipo de lignina é apresentar o conjunto de bandas entre 1.175 e 1.065 cm^{-1} com máxima absorção em 1.140 cm^{-1} . Segundo Faix (1991), isso ocorre unicamente em ligninas do tipo G, pois a

presença de pequenas quantidades de unidades do tipo S (siringil) já seria suficiente para deslocar esse máximo para a região abaixo de 1.128 cm^{-1} . Outra característica marcante apresentada pelo espectro da figura 51 foi a presença da banda de maior intensidade do espectro em 1.268 cm^{-1} . Essa banda é atribuída a vibrações de anéis do tipo guaiacil e é, pronunciadamente, a maior do espectro somente em ligninas do tipo G. A banda na região de carbonilas não conjugadas (1.738 a 1.709 cm^{-1}) foi atipicamente intensa nos espectros apresentados e, segundo Faix (1991), isto ocorre devido à presença de carboidratos e mostram mais uma vez que as **LMM** estariam contaminadas por carboidratos.

Tabela 20. Origem das bandas observadas nos espectros de infravermelho das ligninas isoladas de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora* (Faix, 1991).

região de máxima absorção (cm^{-1})	origem da banda
3.420	estiramento de O-H,
2.930	estiramento C-H Csp ³
1.740-1.710	estiramento C=O de carbonilas não-conjugadas e ácidos carboxílicos
1.655 – 1.670	estiramento C=O de carbonilas e ácidos carboxílicos conjugados com anéis aromáticos
1.605 e 1.505	vibração de anel aromático
1.470 – 1.450	deformação assimétrica de C-H
1.430	vibração de anel aromático
1.270 – 1.220	vibração de anel tipo guaiacil com estiramento C-O
1.140	deformação fora do plano de C-H aromático do tipo guaiacil
1.090	deformação C-O de álcool secundário e éter alifático
1.035	deformação no plano de C-H aromático do tipo guaiacil e deformação C-O de álcool primário

As figuras 52 e 53 apresentam os espectros de infravermelho obtidos para **LLE96** e **LLE50**, respectivamente. Pôde-se observar nesses espectros que as bandas características de lignina do tipo G permaneceram presentes. No entanto, as bandas em 1.031 e 1.086 cm^{-1} foram atipicamente intensas nesses espectros. Essas bandas são atribuídas ao efeito conjunto de deformações de C-H em aromáticos e deformação C-O em álcoois primários (1.030 cm^{-1}) e

deformações C-O em álcoois secundários (1.086 cm^{-1}) e suas intensidades pronunciadas também indicaram a contaminação com grande quantidade de carboidratos. Pôde-se observar ainda que a absorção na região de carbonilas não-conjugadas não foi muito pronunciada no espectro de **LLE96** e chegou quase a desaparecer na **LLE50**.

Figura 51. Espectros de infravermelho das **LMMs** de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora*.

Figura 52. Espectros de infravermelho das **LLE96** de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora*.

Figura 53. Espectros de infravermelho das LLE50 de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora*.

Para evidenciar as possíveis alterações nos espectros das ligninas controle e biodegradadas, foram calculadas as relações entre as bandas atribuídas a diferentes grupos funcionais e a banda em 1.510 cm^{-1} , típica de anéis aromáticos da lignina (Tabela 21).

A compilação destes resultados indica novamente que a estrutura das ligninas residuais presentes nas preparações de lignina foi bastante semelhante em termos de grupos funcionais. Com os dados de infravermelho, pôde-se inferir que não houve ocorrência de reações envolvendo a formação ou degradação de grupos α -carbonilas em nenhuma das amostras. Porém, uma análise mais detalhada destas relações de bandas será feita juntamente com a discussão da determinação dos grupos funcionais (item V.2.8).

Tabela 21. Relações de intensidades entre as bandas em determinados comprimentos de onda e a banda de referência para lignina, em 1.510 cm^{-1} .

tempo de biodegradação (dias)	Relações de intensidade				
	1.730	1.660	1.140	1.090	1.035
LMM					
controle	0,40	0,3	0,94	0,58	0,83
15	0,52	0,3	1,03	0,63	0,86
30	0,61	0,4	1,01	0,67	0,88
60	0,63	0,4	1,03	0,67	0,89
90	0,78	0,3	1,15	0,72	0,92
LLE96					
controle	0,40	0,4	1,04	0,71	1,03
15	0,45	0,4	1,15	0,97	1,35
30	0,40	0,4	1,06	0,85	1,24
60	0,46	0,4	1,07	0,88	1,18
90	0,35	0,4	1,07	0,93	1,27
LLE50					
controle	0,24	0,5	0,94	0,85	1,2
15	0,21	0,5	1,02	0,96	1,2
30	0,24	0,5	0,96	0,82	1,2
60	0,27	0,6	0,94	0,85	1,2
90	0,33	0,6	0,95	0,90	1,2

V.2.8. Análise elementar, determinação de grupos funcionais e cálculo da fórmula

C₉

Para o cálculo da fórmula C₉ das ligninas controle e biodegradadas foram realizados experimentos para determinação dos seguintes grupos funcionais: hidroxila fenólica, metoxilas, α -carbonilas e γ -carbonilas α - β -insaturadas. Adicionalmente, as amostras também foram submetidas à análise elementar. A compilação de todas as análises mencionadas permitiu o cálculo das fórmulas C₉ das ligninas, como mostrado na tabela 22.

Tabela 22. Fórmulas C₉ das ligninas de *P. taeda* controle e biodegradado por *C. subvermispora*.

amostra	fórmula C ₉
LMM	
controle	C ₉ H _{9,1} O _{2,8} (OH-fenólico) _{0,4} (OCH ₃) _{0,9} (α-C=O) _{0,08} (γ-C=O) _{0,01}
15 dias	C ₉ H _{8,2} O _{2,9} (OH-fenólico) _{0,4} (OCH ₃) _{1,0} (α-C=O) _{0,08} (γ-C=O) _{0,01}
30 dias	C ₉ H _{8,2} O _{3,1} (OH-fenólico) _{0,4} (OCH ₃) _{1,0} (α-C=O) _{0,11} (γ-C=O) _{0,01}
60 dias	C ₉ H _{7,9} O _{3,0} (OH-fenólico) _{0,4} (OCH ₃) _{1,0} (α-C=O) _{0,11} (γ-C=O) _{0,01}
90 dias	C ₉ H _{8,8} O _{3,1} (OH-fenólico) _{0,3} (OCH ₃) _{0,9} (α-C=O) _{0,09} (γ-C=O) _{0,005}
LLE96	
controle	C ₉ H _{10,3} O _{2,5} (OH-fenólico) _{0,3} (OCH ₃) _{0,9} (α-C=O) _{0,05} (γ-C=O) _{0,03}
15 dias	C ₉ H _{10,1} O _{3,2} (OH-fenólico) _{0,3} (OCH ₃) _{0,8} (α-C=O) _{0,04} (γ-C=O) _{0,03}
30 dias	C ₉ H _{9,5} O _{2,9} (OH-fenólico) _{0,3} (OCH ₃) _{0,9} (α-C=O) _{0,04} (γ-C=O) _{0,03}
60 dias	C ₉ H _{9,3} O _{2,7} (OH-fenólico) _{0,3} (OCH ₃) _{0,8} (α-C=O) _{0,05} (γ-C=O) _{0,04}
90 dias	C ₉ H _{9,6} O _{3,3} (OH-fenólico) _{0,2} (OCH ₃) _{0,9} (α-C=O) _{0,03} (γ-C=O) _{0,02}
LLE50	
controle	C ₉ H _{9,9} O _{3,7} (OH-fenólico) _{0,1} (OCH ₃) _{1,1} (α-C=O) _{0,03} (γ-C=O) _{0,02}
15 dias	C ₉ H _{9,3} O _{3,9} (OH-fenólico) _{0,1} (OCH ₃) _{1,0} (α-C=O) _{0,03} (γ-C=O) _{0,02}
30 dias	C ₉ H _{9,1} O _{3,8} (OH-fenólico) _{0,1} (OCH ₃) _{0,9} (α-C=O) _{0,02} (γ-C=O) _{0,01}
60 dias	C ₉ H _{9,6} O _{3,5} (OH-fenólico) _{0,1} (OCH ₃) _{1,1} (α-C=O) _{0,02} (γ-C=O) _{0,01}
90 dias	C ₉ H _{9,8} O _{3,5} (OH-fenólico) _{0,1} (OCH ₃) _{0,9} (α-C=O) _{0,03} (γ-C=O) _{0,01}

Os resultados reportados na tabela 22 corroboraram os dados de UV/visível e infravermelho, mostrando que a composição das diferentes ligninas em termos de grupos funcionais foi praticamente idêntica. Pode-se observar na tabela 22 que o número de α-carbonilas por C₉ nas **LMM** biodegradadas não se modificou em relação ao controle, confirmando que não houve formação de quantidades detectáveis de α-carbonilas em função do tempo de biodegradação. A formação de α-carbonilas, se ocorresse, seria detectada pelo aumento da relação 1.660/1.510 cm⁻¹ nos espectros de infravermelho (tabela 21) e também pela redução na relação de absortividade em 280 e 310 nm nos espectros de UV (figura 48 e tabela 19), fatos que não foram observados. Além disso, produtos de degradação de ligações β-O-4 carregando α-carbonilas poderiam ser detectados nos RMN-bidimensionais, o que também não aconteceu. Portanto, os dados analisados em conjunto permitem concluir que a

degradação de **LMM** não ocorreu através do acúmulo de α -carbonilas. Observou-se ainda para esse grupo de ligninas que houve um aumento de intensidade da relação 1.730/1.510 cm^{-1} (tabela 21), sugerindo a formação de carbonilas não-conjugadas. Todavia, as diversas técnicas de RMN usadas não acusaram o aparecimento de carbonos desse tipo, o que leva a sugerir que esse aumento de absorção em 1.730 cm^{-1} possa ser atribuído ao acúmulo de carbonilas nos resíduos de polioles contaminantes. Após 90 dias de degradação, observou-se a queda intensa das absorvidades em 280 e 310 nm (tabela 19), sugerindo que a principal reação ocorrida em tempos prolongados de biodegradação estaria associada à abertura de anéis aromáticos, o que também poderia justificar o aumento na relação 1.730/1.510.

Outro resultado marcante na tabela 22 foi a não alteração do número de hidroxilas fenólicas por C_9 . Esse dado pode ser ainda corroborado pelo RMN- ^1H , que mostrou valores bastante semelhantes para aqueles obtidos na análise por via úmida. A não alteração do número de hidroxilas fenólicas, a redução da massa molar média aparente das **LMM** e a redução nos monômeros formados por DFRC indicaram que os produtos das clivagens β -O-4 foram estabilizados na forma de quinonas. A formação de estruturas tipo quinonas durante a degradação também puderam ser observados nos dados de UV/visível (figura 48), que mostraram o aumento na absorvidade das ligninas degradadas na região do visível.

A análise das **LMM** por RMN evidenciou a formação de produtos de degradação contendo prótons ligados a carbonos saturados não-oxigenados (figuras 33; 34 e tabela 14). A presença desse tipo de estrutura em ligninas biodegradadas também foi observada por Chua *et al.* (1982), Tai *et al.* (1990) e Ferraz e Durán (1995). Ainda segundo esses autores, a formação desse tipo de estrutura seria uma evidência da habilidade dos microrganismos que degradam lignina em produzir reações de redução nas cadeias laterais da lignina residual.

Todos os dados obtidos pela caracterização das **LMM** analisados em conjunto levam à suposição de que a principal reação de despolimerização ocorrida foi a ruptura das ligações β -O-4. Os dados aqui reportados também suportam a idéia de oxidação via mecanismo de um elétron, como recentemente descrito por vários trabalhos do grupo de Hammel *et al.* (Hammel *et al.*, 1993; Srebotinik *et al.*, 1997; Kapich *et al.*, 1999). Nesse caso, uma possível rota de fragmentação está representada na figura 54. A etapa de oxidação inicial da lignina levaria à oxidação de um hidrogênio alfa (anel **A** na figura 54). O radical formado seria estabilizado pela ruptura da ligação β -O-4 entre o anel **B** e o carbono-beta ligado ao anel **A**. A parte contendo o anel **B** seria estabilizada na forma de uma quinona e o radical formado no carbono β -ligado ao anel **A** poderia remover um elétron de unidades fenólicas presentes no meio,

formando como produto final estruturas contendo prótons ligados à carbonos saturados não-oxigenados (figura 54).

Da mesma forma, os dados de caracterização das **LLE96** e **LLE50**, analisados em conjunto, mostraram que essas frações de lignina não foram alteradas pela ação do fungo. Como pode ser observado em todas as análises efetuadas, essas frações não apresentaram nenhuma diferença entre ligninas degradadas e o controle. Assim, pode-se afirmar que as alterações de massas molares médias aparentes observadas estão relacionadas à degradação da fração de polissacarídeos presentes nessas amostras, como sugerido pela análise de GPC e DFRC.

Resultados recentes obtidos em um projeto paralelo de nosso grupo de pesquisa (Mendonça, 2002- dados não publicados) mostraram a degradação preferencial da lignina nas camadas mais próximas ao lúmen das células. Nesse trabalho, o autor tratou *P. taeda* com *C. subvermispora* e analisou os cavacos biodegradados por microscopia acoplada a um detector de UV. A utilização dessa técnica microscópica permitiu fazer a varredura em 280 nm de várias posições de um corte transversal de células de madeira. Os resultados foram então tratados de modo a se obter colorações diferentes em função do teor de lignina nas diferentes regiões da célula vegetal. Esse resultado, analisado em conjunto com os dados de caracterização descritos nessa seção, permite inferir que a fração de lignina isolada como LMM foi proveniente das regiões da parede mais próximas ao lúmen, que teriam sido mais afetadas pela biodegradação. Por outro lado, as ligninas liberadas enzimaticamente parecem ter tido origens em regiões da parede que ainda não haviam sido alteradas de forma significativa, o que explicaria os resultados aqui obtidos.

V.3. Caracterização dos polissacarídeos residuais

Para a caracterização dos polissacarídeos residuais foram isoladas frações de holo- e alfa-celulose presentes na madeira de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora*, conforme descrito por Browning (1967) (item IV.7.1).

A tabela 23 mostra os rendimentos de holocelulose-clorito livre de lignina e a porcentagem de lignina total encontrados na madeira controle e biodegradada por *C. subvermispora*.

Figura 54. Rota proposta para a oxidação de ligações β -O-4 em culturas sólidas de *C. subvermispora* degradando madeira de *P. taeda*. Lig representa as ligações com a estrutura da lignina e R= H ou OH.

Tabela 23. Rendimento de holocelulose-clorito livre de lignina e lignina-total presentes em *P.taeda* controle e degradado por *C. subvermispora*.

tempo de biodegradação (dias)	rendimento de holocelulose livre de lignina (%)	teor de lignina total na madeira (%)
controle	72,6 $\pm$ 0,1 (a)	28,2 $\pm$ 0,4
15	71,7 $\pm$ 0,6 (a)	26,1 $\pm$ 0,4
30	74,6 $\pm$ 0,2 (b)	25,9 $\pm$ 0,1
60	75,5 $\pm$ 0,1 (b)	25,8 $\pm$ 0,5
90	69,4 $\pm$ 0,7 (c)	25,8 $\pm$ 0,1

* Para cada período de biodegradação, as médias reportadas com letras iguais, entre parênteses, nas mesmas colunas não apresentaram diferenças significativas ao nível de 0,05 de confiança (teste de Dunnet).

O rendimento de holocelulose-clorito livre de lignina permaneceu praticamente constante durante os 15 primeiros dias de biodegradação (tabela 23). Entre 30 e 60 dias, notou-se uma leve tendência de aumento neste rendimento, refletindo a correspondente diminuição no teor de lignina. Após 90 dias, o rendimento de holocelulose diminuiu, evidenciando a degradação efetiva dos polissacarídeos em tempos longos de biodegradação.

A tabela 23 mostra ainda que a somatória dos teores de holocelulose-clorito livre de lignina e lignina total presente em todas as amostras foi de aproximadamente 100%. Este

resultado mostrou, de acordo com Browning (1967), que as perdas de hemiceluloses ocorridas durante a deslignificação puderam ser desprezadas.

A composição química das amostras de holocelulose-clorito (tabela 24) mostrou que o teor de lignina residual em todas as amostras foi da ordem de 6-10%. Estes altos valores de lignina residual ocorreram devido à baixa severidade utilizada durante a etapa de deslignificação. Segundo Browning (1967), a completa deslignificação da madeira não pode ser obtida sem que haja excessiva perda de polissacarídeos. Por isso, recomenda-se proceder ao isolamento com consecutivas adições de clorito de sódio e ácido acético até que a holocelulose-clorito contenha cerca de 2-4% de lignina insolúvel em ácidos (lignina Klason). Para diminuir o teor de lignina Klason abaixo destes valores, a severidade necessária poderia gerar degradação e perdas nas frações de polissacarídeos não celulósicos. Dessa forma, neste trabalho, a deslignificação foi feita até que o teor de lignina Klason nas amostra fosse inferior a 5%. O percentual restante entre o teor de lignina Klason e o total correspondeu a quantidade de lignina solúvel contida nas amostras, que foi da ordem de 5% para todas as amostra analisadas.

Tabela 24. Composição química da holocelulose-clorito presente em *P. taeda* controle e biodegradado por *C. subvermispora*.

tempo de degradação (dias)	% de componentes $\pm$ DP					
	glucana	polioses	arabinosil	acetil	Ac GLU	lignina total
controle	54 $\pm$ 2	22,1 $\pm$ 0,3	2,0 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,1	10,2 $\pm$ 0,1
15	55,9 $\pm$ 0,7	21,7 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0,1	3 $\pm$ 1	1,1 $\pm$ 0,1	9,3 $\pm$ 0,1
30	54 $\pm$ 2	21,8 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,2	3 $\pm$ 1	1,0 $\pm$ 0,1	9,4 $\pm$ 0,3
60	56,3 $\pm$ 0,5	23,2 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,2	4 $\pm$ 1	1,0 $\pm$ 0,1	9,2 $\pm$ 0,2
90	59,1 $\pm$ 0,6	14,8 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	6,3 $\pm$ 0,3

Os resultados apresentados na tabela 24 mostraram que as composições químicas das amostras de holocelulose-clorito isoladas de *P. taeda* controle e biodegradado até 60 dias foram muito semelhantes. Este resultado indicou que o tratamento com o fungo não alterou, de forma significativa, a composição dos polissacarídeos residuais na madeira biodegradada, o que era esperado, pois a perda de glucana e polioses foi baixa até os 60 dias de biodegradação. No entanto, após 90 dias, pôde-se observar um pequeno aumento na porcentagem de glucana nas amostras. Esse aumento na porcentagem de glucana ocorreu devido à redução dos teores de polioses, que diminuíram de cerca de 22% para 14,8%, e lignina, que diminuiu de 10,2% para 6,3%. Esse resultado também está de acordo com as

perdas de componentes e de holocelulose, que mostraram uma extensiva degradação das polioses quando períodos longos de biodegradação foram utilizados.

É importante mencionar também que trabalhos recentes envolvendo a degradação de *Eucalyptus grandis* por *C. subvermispora* mostram que, apesar do rendimento de holocelulose permanecer constante durante a biodegradação, a viscosidade dessa fração decresce em função do tempo de degradação (Córdova, 1999; Ferraz *et al.*, 2002). Neste caso, a redução da viscosidade indica que pode haver despolimerização da fração celulósica, sem a conseqüente mineralização.

A tabela 25 mostra os rendimentos de α -celulose obtidos da madeira de *P. taeda* controle e degradada por *C. subvermispora*.

Tabela 25. Rendimento de α -celulose livre de lignina presente em *P. taeda* controle e biodegradado por *C. subvermispora*.

Tempo de biodegradação (dias)	Rendimento de α -celulose livre de lignina (%)
Controle	47,8 $\pm$ 0,9 (a)
15	47,2 $\pm$ 0,7 (a)
30	42,6 $\pm$ 0,9 (b)
60	42,2 $\pm$ 0,3 (b)
90	34,2 $\pm$ 0,4 (c)

* Para cada período de degradação, as médias reportadas com letras iguais, entre parênteses, nas mesmas colunas não apresentaram diferenças significativas ao nível de 0,05 de confiança (teste de Dunnet).

O teor de α -celulose (tabela 25) decresceu significativamente nos estágios iniciais de degradação, partindo de 47,8% no controle para 42,6% aos 30 dias, e 34,2% após 90 dias. Esse resultado está de acordo com os dados das alterações físico-químicas sofridas pela celulose durante a degradação de polpas de dissolução por *Pleurotus ostreatus*, reportados por Gazdaru *et al.* (1997). Neste trabalho, os autores mostraram que a quantidade de α -celulose diminui com o aumento do tempo de biodegradação e relacionaram o aumento da solubilidade da celulose em NaOH com a diminuição do grau de polimerização, mostrando que a diminuição no rendimento de α -celulose ocorre devido à diminuição no grau de polimerização das frações de celulose degradadas pelo fungo.

A comparação entre as perdas de α -celulose e glucana (figura 55) mostrou que, no início do tratamento (15 dias), somente cerca de 0,9% da quantidade inicial de glucana foi perdida e a diminuição no rendimento de α -celulose foi inferior a 0,4 %. Segundo Gazdaru *et*

al. (1997), este fato pode ser justificado pela falta de acessibilidade do fungo em relação ao substrato durante os estágios iniciais de degradação. Neste período, o substrato ainda não foi invadido pelo sistema hidrolítico do fungo e somente as ligações altamente acessíveis da parte amorfa da celulose são quebradas, sem que haja assimilação dos produtos de hidrólise pelo microrganismo. Em períodos mais longos de degradação (30 a 60 dias), pôde-se observar uma diminuição significativa no rendimento de α -celulose. No entanto, a curva de perda de glucana manteve-se constante, mostrando que os produtos de hidrólise da α -celulose não foram assimilados. Esses resultados sugerem que a ação do fungo gerou o acúmulo de oligômeros com massas molares reduzidas e solúveis em NaOH. Esse fato justificaria a queda no rendimento de α -celulose sem o respectivo aumento na porcentagem de perda de glucana.

glucana.

Figura 55. Perda de α -celulose (○) e glucana (●) na madeira de *P. taeda* biodegradada por *C. subvermispora*.

A composição química das amostras de α -celulose (tabela 26) não mostrou alterações consideráveis na quantidade de cada componente presente. Todavia, apesar da severidade da reação de isolamento de α -celulose, não foi possível remover completamente as polioses e a lignina. Como mencionado anteriormente, para se obter uma remoção mais efetiva de lignina e dos polissacarídeos não celulósicos, seria necessário efetuar os tratamentos de isolamento de holocelulose e α -celulose por períodos mais longos e com quantidades maiores dos reagentes químicos. Entretanto, neste caso, o aumento da severidade desses processos não é aconselhável por diminuir o grau de polimerização das amostras de α -celulose (Browing, 1967).

Para a determinação da distribuição de massas molares das amostras de α -celulose, preparou-se o derivado tricarbamilado, conforme descrito no item IV.7.4. Este procedimento foi utilizado para tornar a α -celulose solúvel em THF, tornando possível a determinação de massas por cromatografia de exclusão.

Tabela 26. Composição química da α -celulose presente em *P. taeda* controle e degradado por *C. subvermispora*.

tempo de degradação (dias)	% de componentes $\pm$ DP				
	glucana	polioses	arabinosil	ácido glucurônico	lignina total
controle	67 $\pm$ 4	18,2 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1	2,8 $\pm$ 0,1
15	71,3 $\pm$ 0,5	18,3 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1	2,6 $\pm$ 0,3
30	70 $\pm$ 2	17 $\pm$ 1	0,9 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1	2,3 $\pm$ 0,3
60	69 $\pm$ 1	16,4 $\pm$ 0,7	0,9 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,1	2,6 $\pm$ 0,2
90	62,1 $\pm$ 0,9	10,8 $\pm$ 0,7	0,5 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,2

A análise dos cromatogramas de exclusão obtidos para os derivados de α -celulose extraídas de *P. taeda* controle e biodegradado por *C. subvermispora* (figura 56) mostrou um deslocamento na direção da região de menores massas molares em função do aumento no tempo de biodegradação, indicando que o fungo *C. subvermispora* degradou as moléculas de celulose presentes na madeira. Este resultado corroborou os dados de rendimento de α -celulose apresentados anteriormente, que mostraram uma diminuição no rendimento de α -celulose após o décimo quinto dia de tratamento. Estes resultados também estão de acordo com o trabalho de Gazdaru *et al.*(1997), que reportaram o decréscimo no rendimento de extração, no grau de polimerização e na cristalinidade de α -celulose durante o tratamento de polpas de dissolução com o fungo de decomposição branca *P. ostreatus*.

A compilação dos resultados das análises dos polissacarídeos residuais presentes na madeira controle e biodegradada indicou que o fungo *C. subvermispora* degradou a fração celulósica contida na madeira de *P. taeda*. Esta degradação foi evidenciada pela redução no rendimento e pelo deslocamento observado nos cromatogramas da α -celulose extraída das amostras. Todavia, a degradação nas cadeias de celulose ocorreu sem que houvesse mineralização dos oligômeros liberados. Pôde-se observar também que o processo de degradação dos polissacarídeos mostrou-se significativo mesmo em tempos curtos de degradação, o que não é desejável do ponto de vista da biopolpação. Concluiu-se também com esses resultados que a análise de perda de componentes não é um critério a ser usado para a determinação da seletividade de um microrganismo. Em se tratando de biopolpação,

pode-se inferir que o tratamento com o fungo deve ser efetuado pelo menor tempo possível para evitar a degradação nas cadeias de celulose, o que seria acompanhado de perdas nas qualidades mecânicas da polpa produzida.

Figura 56. Cromatogramas de exclusão de α -celulose tricarbanilado extraídas de *P. taeda* controle e biodegradado por *C. subvermispora*.

v.4. Produção de enzimas durante a degradação de *P. taeda* por *C. subvermispora*

Apesar dos grandes avanços ocorridos no estudo dos processos degradativos com o desenvolvimento das técnicas de microscopia eletrônica e imunocitoquímica, muitos estudos ainda são necessários para o completo entendimento dos processos de biodegradação de madeira, principalmente estudos associados às enzimas excretadas pelos fungos durante os períodos de degradação em condições de fermentação sólida (Machuca *et al.*, 1997; Machuca e Ferraz, 2001; Guerra *et al.*, 2002).

Na quarta seção desse trabalho descreve-se os padrões de produção de enzimas extracelulares observados durante a degradação de *P. taeda* pelo fungo *C. subvermispora*. As enzimas mais relevantes produzidas por fungos de degradação branca, como celulasas, xilanases, β -glicosidases, lacases e peroxidases, foram avaliadas.

As enzimas estudadas foram recuperadas da madeira biodegradada por extrações sucessivas com tampão acetato até que a última extração apresentasse menos que 10% da atividade total já extraída, conforme descrito por Córdova (1999) e Machuca e Ferraz (2001). A figura 57 apresenta os padrões de extração das enzimas hidrolíticas produzidas durante a degradação.

A enzima que apresentou maior atividade recuperada em todas as extrações foi a xilanase. A figura 57a apresenta o padrão de extração desta enzima em função no número de

extrações e mostra que a quantidade de enzima recuperada para todos os períodos de degradação permaneceu aproximadamente constante durante as três primeiras extrações. Após a terceira extração, a quantidade de enzima recuperada sofreu um ligeiro decréscimo e desapareceu por completo após a quinta extração.

O perfil de extração apresentado pela β -glicosidase (figura 57b) foi diferente do reportado para a xilanase (figura 57a). Neste caso, em todos os tempos de biodegradação avaliados, a enzima apresentou um máximo de atividade recuperada na primeira extração. Após a primeira extração, a quantidade de atividade recuperada foi decrescendo suavemente até o completo desaparecimento, após a quarta extração. As únicas exceções ocorreram com os extratos da madeira degradada por 60 e 90 dias, que apresentaram atividade ainda na quinta extração e desapareceram na sexta e última extração avaliada.

O estudo da recuperação de atividade de celulase apresentou como principal problema a baixa quantidade de enzima recuperada dos extratos durante todos os períodos de degradação estudados. A figura 57c mostra que, com exceção da atividade recuperada da madeira degradada por 15 dias, que apresentou máxima atividade na primeira extração, todos os períodos de degradação apresentaram padrões semelhantes de recuperação. As atividades recuperadas a partir das madeiras degradadas por 30 e 60 dias sofreram um ligeiro aumento até a terceira extração e a partir da quarta extração, a atividade decresceu até desaparecer completamente na sexta e última extração.

A figura 58 mostra que o máximo de recuperação para a atividade do tipo peroxidase ocorreu, independentemente do tempo de biodegradação, na primeira extração. Já na segunda e terceira extrações, somente os extratos provenientes das madeiras degradadas por 15 e 30 dias apresentaram atividade. Após a terceira extração, não houve detecção de atividade em nenhum dos extratos.

Nenhum dos extratos obtidos de *P. taeda* degradado entre 15 a 90 dias apresentou atividade de lacase.

(a)

(b)

(c)

Figura 57. Padrão de extração da atividade de xilanses (a), β -glicosidase (b) e celulase (c) recuperadas de *P. taeda* biodegradado por 15 (barras clara), 30 (barras escuras), 60 (barras em cinza) e 90 (barras com linhas horizontais) dias.

Figura 58. Padrão de extração da atividade de peroxidase recuperada de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora* por 15 (barras claras), 30 (barras escuras) e 60 (barras quadriculadas) e 90 dias (barras com linhas horizontais).

As figuras 57 e 58 mostram também que, de uma maneira geral, todas as enzimas estudadas tiveram mais de 90 % de suas atividades recuperadas com, no máximo, cinco extrações consecutivas com tampão acetato de sódio.

Os dados apresentados na tabela 27 mostram a quantidade total das diferentes enzimas recuperadas após diferentes períodos de biodegradação.

Crescendo em condições de fermentação sólida, *C. subvermispora* produziu atividades hidrolíticas durante todos os períodos de tempo avaliados. Entre as atividades detectadas, as xilanases apresentaram o maior nível em todos os períodos. Pôde-se observar na tabela 27 que o nível de atividade do tipo xilanase foi alto até nos períodos iniciais de biodegradação, atingindo o máximo de 4.257 UI.kg^{-1} após 30 dias e permanecendo aproximadamente constante até 90 dias de biodegradação.

Tabela 27. Atividades enzimáticas* recuperadas na biodegradação de *P.taeda* por *C. subvermispora* em condições de fermentação sólida.

Tempo de biodegradação (dias)	Xilanases	Atividade enzimática total (UI.kg^{-1})		
		Celulases	β -glucosidases	Peroxidases
15	1.503 ± 148	129 ± 34	67 ± 18	58 ± 3
30	4.257 ± 581	71 ± 10	239 ± 50	125 ± 7
60	4.099 ± 957	71 ± 18	347 ± 116	39 ± 2
90	4.168 ± 698	27 ± 25	145 ± 48	40 ± 2

* Atividade do tipo Lacase, determinada pela oxidação de siringaldazina em ausência de H_2O_2 , não foi detectada em nenhum período de degradação.

A atividade do tipo celulase foi baixa durante os 90 dias de fermentação avaliados e o maior nível deste tipo de atividade foi detectado nos estágios iniciais (15 dias), atingindo 129 IU.kg⁻¹, sendo seguido de um sensível decréscimo para 71 UI.kg⁻¹ após 30 dias. Após esse período, a atividade do tipo celulase permaneceu aproximadamente constante.

A atividade do tipo β -glicosidase foi detectada em todos os períodos de degradação, atingindo o máximo após 60 dias de fermentação sólida.

A avaliação das enzimas oxidativas produzidas durante a biopolpação de *P. taeda* por *C. subvermispora* mostrou que as peroxidases são produzidas em grandes quantidades, sendo o nível máximo atingido após 30 dias de biodegradação (125 UI.kg⁻¹). Essas peroxidases são dependentes de Mn²⁺, uma vez que a atividade enzimática dos extratos é significativamente aumentada pela adição desse íon (Souza-Cruz e Ferraz, 2001; Ferraz *et al.*, 2002). A produção de peroxidases do tipo LiP em culturas complexas, como as utilizadas em biopolpação, não pode ser facilmente avaliada, devido a interferências dos compostos aromáticos presentes nos extratos com o álcool veratrílico - reagente usado na detecção de LiP. Todavia, tem-se sempre assumido que esse fungo não produz LiP e que as principais enzimas oxidativas relacionadas a biodegradação de lignina seriam as MnP e as lacases. No entanto, interessantemente, atividade do tipo lacase não foi detectada em nenhum dos extratos avaliados. A não detecção de lacases nas condições de fermentação sólida usadas nesse trabalho sugere que essa enzima é produzida somente quando algum co-substrato seja adicionado ao meio (Ferraz *et al.*, 2002). Esses resultados analisados em conjunto mostram que a MnP apresenta papel fundamental na degradação de lignina durante a biopolpação.

V.5. Relação entre padrão de degradação e a produção de enzimas

A compilação das análises dos componentes residuais e das enzimas produzidas durante a biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispora* permite que algumas inferências sejam feitas sobre o processo. A princípio, pôde-se observar que durante os primeiros 30 dias de degradação, quando o nível de xilanases atingiu o máximo (Tabela 27), a perda de polioses foi mínima (Tabela 2) e o rendimento de holocelulose permaneceu constante (Tabela 23). Estes resultados analisados em conjunto indicam que os estágios iniciais de biodegradação são limitados pela porosidade da parede celular e não pelos níveis de enzimas extracelulares produzidos. Assim, considerando que *C. subvermispora* degrada a madeira através de um ataque não erosivo e que as paredes celulares não são permeáveis às enzimas nos estágios iniciais de biodegradação (Blanchette *et al.*, 1997), pode-se supor que a degradação nos estágios iniciais seja mediada por compostos de baixa massa molar. Após a remoção de uma

quantidade significativa de lignina, um grande aumento na perda de xilana foi observado, sugerindo que após longos períodos de degradação, as xilanases puderam penetrar na parede celular da madeira e foram capazes de agir sobre a fração de polioses. Resultado semelhante também foi observado por Machuca e Ferraz (2001) na avaliação das enzimas produzidas durante a degradação dos componentes da madeira por diferentes fungos de decomposição branca e parda. Neste trabalho, os autores também reportaram que baixas perdas de lignina limitam a perda de xilana, mesmo quando altos níveis de xilanases são produzidos.

Da mesma forma, a caracterização da celulose residual mostrou que, durante os primeiros 15 dias, não houve perda de glucana nem alteração no rendimento de α -celulose. Entretanto, após 30 dias de degradação o rendimento de α -celulose diminuiu, enquanto que a perda de glucana permaneceu inalterada. Esses dados indicam que reações de degradação começaram a ocorrer nas cadeias de celulose mesmo quando as células da madeira ainda não estavam permeáveis às enzimas do complexo celulolítico (Blanchete *et al.*, 1997). Estas reações de degradação devem ser controladas por algum mecanismo não enzimático, como, por exemplo, o sistema de Fenton. De acordo com essa teoria, a enzima CDH reduziria Fe^{+3} para Fe^{+2} , que em contato com H_2O_2 produziria radicais hidroxila, via reação de Fenton. Estes radicais formados são altamente inespecíficos e poderiam desencadear reações de despolimerização na celulose, mesmo em períodos curtos de fermentação. Estas reações de despolimerização poderiam gerar oligômeros insolúveis em água, que seriam pequenos o suficiente para serem solubilizados durante a preparação de α -celulose. Mecanismo semelhante tem sido descrito para fungos de decomposição parda (Godell *et al.*, 1997).

Já os níveis de peroxidases excretadas por *C. subvermispora* pareceram correlacionar bem com a despolimerização de lignina até os 30 primeiros dias de degradação. Neste caso, ambas, produção de enzima e redução na massa molar média aparente da lignina, apresentaram o máximo em 30 dias de biodegradação. Após períodos mais longos, o nível de peroxidase decresceu e a despolimerização da lignina pareceu estabilizar. Uma vez que não há nenhuma evidência de que *C. subvermispora* produza LiP (Rüttimann-Johnson *et al.*, 1993; Srebotnick *et al.*, 1994), a atividade do tipo peroxidase descrita neste trabalho deve estar relacionada com a presença de peroxidases dependentes de manganês. Apesar da presença de LiP ter sido inicialmente considerada crítica devido a sua habilidade em degradar estruturas não fenólicas, artigos mais recentes têm sugerido que este fungo é capaz de degradar unidades de lignina não fenólicas mesmo sem produzir LiP (Srebotnick *et al.*, 1994). Resultados mais recentes têm mostrado que os estágios iniciais de biodegradação por *C. subvermispora* poderia ser governado por mecanismos de oxidação de um elétron, iniciado por algum

composto difusível de baixa massa molar. Um ótimo exemplo seria a oxidação governada pela peroxidação de lipídeos, onde um ácido graxo insaturado seria peroxidado através de uma reação induzida por MnP (Enoki *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 2000). Contudo, apesar de efetuada pelo mediador de baixa massa molar, a reação de biodegradação de lignina é dependente da presença da enzima MnP. Neste caso, a peroxidação só ocorre em presença de Mn^{+3} , que é formado pela oxidação de Mn^{+2} pela MnP. Essa dependência explicaria a boa correlação existente entre produção de peroxidases e diminuição da massa molar média aparente da lignina residual.

Atividade do tipo lacase não foi detectada em nenhum dos extratos de diferentes períodos de biodegradação. Apesar da produção deste tipo de enzima oxidativa por fungos de decomposição branca estar muito bem descrita na literatura, seu real papel na degradação de lignina ainda não está completamente elucidado. Os resultados obtidos aqui indicaram que a despolimerização e a mineralização de lignina podem ocorrer em culturas de *C. subvermispora* em que atividade do tipo lacase não esteja presente.

V.6. Considerações finais

Em termos de biopolpação, os resultados apresentados neste trabalho sugerem que a extensiva despolimerização de lignina e a redução no teor de extrativos estão relacionadas aos benefícios do biotratamento. A lignina residual extensivamente despolimerizada pode ser facilmente solubilizada no licor kraft (Mendonça *et al.*, 2002). Por exemplo, Gellerstedt e Lindfors (1984) mostraram que a fase inicial de deslignificação na polpação kraft envolve a liberação de fragmentos de lignina de baixas massas molares. Isso sugere que a lignina biodegradada é mais facilmente liberada dos cavacos durante os primeiros estágios de cozimento, resultando em uma fase inicial de deslignificação mais curta, conforme recentemente reportado por Mendonça *et al.* (2002). A grande remoção de extrativos durante a biodegradação também poderia reduzir o consumo do alcali necessário à polpação kraft. Já está bem estabelecido que os extrativos da madeira, as resinas e os grupos acetila são responsáveis pelo consumo de alcali na fase inicial da polpação kraft (Biermann, 1993; Chiang, *et al.*, 1987). Dessa forma, a remoção dos extrativos na etapa de biodegradação podeira resultar em canais de resina menos obstruídos, facilitando a penetração do licor e reduzindo o consumo de alcali por componentes diferentes da lignina.

Adicionalmente, a etapa de estudos das enzimas envolvidas foi consistente com a hipótese de que as etapas iniciais de biodegradação em sistemas sólidos sejam mediadas por agentes de baixa massa molar. Assim, pode-se sugerir no prosseguimento de estudos visando a

extração, caracterização e mimetização dos agentes mediadores do processo de biodegradação.

VI. Conclusões

Os resultados aqui apresentados permitem concluir que, em condições de biopolpação:

- O fungo *C. subvermispora* degradou *P. taeda* com baixa perda de peso e pequena mineralização de glucana;
- A principal reação de degradação ocorrida na lignina durante a biodegradação foi a quebra de ligações β -O-aril-éter;
- As reações de quebra das ligações β -O-aril-éter puderam ser observadas mesmo em tempos curtos de degradação (15 dias) e foram acompanhadas da redução da massa molar média aparente e do enriquecimento de ligações carbono-carbono na lignina residual;
- Em tempos longos de biodegradação (90 dias), a principal reação na lignina foi a abertura de anéis aromáticos;
- A rota de fragmentação das ligações β -O-aril-éter foi consistente com um mecanismo de oxidação por um elétron, seguida de reações de redução e formação de produtos contendo carbonos saturados não-oxigenados;
- A perda de glucana não é um critério aconselhável para se determinar seletividade em biodegradação, uma vez que houve degradação das cadeias de celulose sem que houvesse mineralização;
- O fungo *C. subvermispora* produziu atividades hidrolíticas durante todos os períodos de biodegradação avaliados, sendo que a enzima xilanase apresentou os maiores níveis entre as atividades hidrolíticas estudadas;
- Entre as enzimas oxidativas, as peroxidases (provavelmente as MnP) apresentaram máxima atividade após 30 dias de degradação, enquanto que atividades do tipo lacase não foram detectadas em nenhum dos extratos analisados;
- Os estágios iniciais da biodegradação (até 30 dias) foram limitados pela porosidade da parede celular da madeira e não pela quantidade de enzimas extracelulares produzidas;
- A despolimerização e mineralização de lignina em culturas de *C. subvermispora* não depende da produção de lacase.

VI. Referências Bibliográficas

- Adler, E. e Marton, J. Zur kenntnis der carbonylgruppen in lignin I. Acta Chem. Scan., **13**, 75-96, 1959.
- Agostinelli, E., Cervoni, L., Giartosio, A. e Morpurgo, L. Stability of japanese-lacquer-tree (*Rhus vernicifera*) laccase to thermal and chemical denaturation: comparison with ascorbate oxidase. Biochem. J., **306**, 697-702, 1995.
- Akhtar, M., R. Blanchette, G., Myers e Kirk, T. An overview of biomechanical pulping research. In: Environmentally friendly technologies for pulp and paper industry. R.A. Young and M. Akhtar (eds.). John Wiley and Sons, New York, pp. 309-339, 1998.
- Akhtar, M., Kirk, K. e Blanchette, R. Fungal delignification and biomechanical pulping of wood. Adv. Biochem. Eng., **57**, 159-195, 1997.
- Akhtar, M., Attridge, M., Myers, G., Blanchette, R. Biomechanical pulping of Loblolly pine chips with selected white-rot fungi. Holzforschung, **47**, 36-40, 1993.
- Albert, R. Current status of TEF bleached kraft pulp mills and future trends. In: Proc. International non-chlorine bleaching conference, Orlando, EUA, pp. 12-30, 1996.
- Ander, P. e Marzullo, L. Sugar oxidoreductases and veratryl alcohol oxidase as related to lignin degradation. J. Biotechnol., **53**, 115-131, 1997.
- Ander, P. The cellobiose-oxidizing enzymes CBQ and CBO as related to lignin and cellulose degradation - a review. FEMS Microbiol. Rev., **13**, 297-311, 1994.
- Atsushi, K., Azuma, J. e Koshijima, T. Lignin-carbohydrate complexes and phenolic acids in bagasse. Holzforschung, **38**, 141-149, 1984.
- Bailey, M., Biely, P. e Poutanen, K. Inter-laboratory testing of methods for assay of xylanases activity. J. Biotechnol., **23**, 257-270, 1992.
- Balakshin, M., Evtuguin, V., Pascoal Neto, C. e Silva, A. Lignin-carbohydrate complex in *Eucalyptus globulus* wood and kraft pulps. In: Proc. 7th Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components. Belo Horizonte, Brasil, pp. 53-60, 2001.
- Bao, W., Fukushima, Y., Jensen Jr., K., Moen, M. e Hammel, K. Oxidative degradation of non-phenolic lignin during lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase. FEBS Lett., **354**, 297-300, 1994.

- Blanchette, R., Krueger, E., Haight, J., Akhtar, M. e Akin, D. Cell wall alterations in Loblolly pine wood decayed by the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. J. Biotechnol., **53**, 203-213, 1997.
- Biermann, C. (ed). Essentials of pulping and papermaking. Academic Press, New York, 472p., 1993.
- Browning, B. Methods of wood chemistry. John Wiley and Sons, New York, 882p., 1967.
- Camarero, S., Galletti, G., Martínez, A. Preferential degradation of phenolic lignin units by two white rot fungi. Appl. Environm. Microbiol., **60**, 4509-4516, 1994.
- Capanema, E., Balakshin, M., Chen, C., Gratzl, J. e Cracz, H. Studies on kraft pulp lignins using HMQC NMR technique. In: Proc. 7th Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components. Belo Horizonte, Brazil, pp. 61-68, 2001.
- Chang, H., Cowling, E. e Brown, W. Comparative studies on cellulolytic enzyme lignin and milled lignin of sweetgum and spruce. Holzforschung, **29**, 153-159, 1975.
- Chang, H. e Allan, G. Oxidation. In: Lignins. Occurrence, formation, structure and reactions. Sarkanen, K. V. e Ludwid, L. H. (eds). John Wiley and Sons, New York, pp. 433-485, 1971.
- Chen, C. Nitrobenzene and cupric oxide oxidations. In: Methods in lignin chemistry. Lin, S.Y. e Dence, C. W. (eds). Springer-verlag, New York, pp. 301-321, 1989.
- Chiang, V., Cho, H., Puumala, R., Eckert, R. e Fuller, W. Alkali consumption during kraft pulping of Douglas-fir, western hemlock and red alder. Tappi J., **70** (2), 101-104, 1987.
- Chua M., Chen, C., Chang, H. e Kirk, T. ¹³C-NMR spectroscopy study of spruce lignin degraded by *Phanerochaete chrysosporium*. Holzforschung, **36**, 165-172, 1982.
- Costa, S., Gonçalves, A. e Esposito, E. Biodegradation of sugar cane by different strains of *Panus tigrinus* as a pretreatment for kraft pulping. In: Proc. 6th Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components. Belo Horizonte, Brazil, pp. 206-209, 2001.
- Córdova, A. Biodegradação de *Eucalyptus Grandis* pelo Fungo de Decomposição Branca *Ceriporiopsis subvermispora*: Aspectos Químicos e Bioquímicos. Departamento de

- Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 112p., 1999.
- Daniel, G. Use of electron microscopy for aiding our understanding of wood biodegradation. FEMS Microbiol. Rev., **13**, 199-233, 1994.
- De Jong, E., Field, J. e De Bond, J. Aryl alcohols in the physiology of ligninolytic fungi. FEMS Microbiol. Ver., **13**, 153-188, 1994.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P. e Smith, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal. Chem., **28**, 350-356, 1976.
- Ede, R., Ralph, J., Torr, K. e Dawson, B. A 2D-NMR investigation of heterogeneity of distribution of diarylpropane structures in extracted *Pinus radiata* lignin. Holzforschung, **50**, 61-164, 1996.
- Ede, R. e Brunow, G. Application of two-dimensional homo- and heteronuclear correlation NMR spectroscopy to wood lignins structure determination. J. Org. Chem., **57**, 1477-1480, 1992.
- Enoki, M., Watanabe, T., Honda, Y. e Kuwahara, M. A novel fluorescent dicarboxylic acid, (Z)-1-7-nonadecadiene-2,3-dicarboxylic acid, produced by the fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. Chem. Letters, 54-55, 2000.
- Enoki, M., Watanabe, T., Nakagame, S., Koller, K., Messner, K., Honda, Y. e Kuwahara, M. Extracellular lipid peroxidation of selective white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. FEMS Microbiol. Letters, **180**, 205-211, 1999.
- Eriksson, K., Blanchette, R. e Ander, P. Microbiological and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer-Verlag, Berlin, 560p., 1990.
- Eriksson, K. Fungal Degradation of Wood Components. Pure Appl. Chem., **53**, 79-101, 1981.
- Evans, C., Dutton, M., Guillén, F. e Veness, R. Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. FEMS Microbiol. Rev., **13**, 235-239, 1994.
- Faix, O. Classification of lignins from different botanical origins by FT-IR spectroscopy. Holzforschung, **45**, 21-27, 1991.
- Faix, O., Lange, W. e Beinhoff, O. Molecular-weight and molecular-weight distribution of milled wood lignins of some wood and bambusoideae species. Holzforschung, **34**, 174-176, 1980.

- Fengel, D. e Wegener, G. (eds). Wood chemistry, ultrastructure and reactions. Walter de Gruyter, Berlin, 613p., 1989.
- Ferraz, A., Guerra, A., Souza-Cruz, P. e Mendonça, R. Attempts to correlate biopulping benefits with structural characteristics of residual wood components and enzymes produced during the wood biotreatment *with C. subvermispora*. In: Biotechnology in the pulp and paper industry. Viikari, L e Lantto, R. (eds). Elsevier Science B. V., 73-80, 2002.
- Ferraz, A. Aplicações da biotecnologia na produção de papel e celulose. In: Biotecnologia Industrial. Lima U. A., Aquarone, E., Borzani, W. e Schmidell, W. (eds). Edgard Blucher Ltda, São Paulo, **1**, pp. 465-484, 2001.
- Ferraz, A., Parra, C., Freer, J., Baeza, J. Characterization of white zones produced on *Pinus radiata* wood chips by *Ganoderma australe* and *Ceriporiopsis subvermispora*. World J. Microbiol. Biotechnol., **16**, 641-645, 2000b.
- Ferraz, A., Guerra, A. e Mendonça, R. Characterization of residual wood components in samples biotreated by the fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. In: Proc. TAPPI Pulping Conference, CD, 2000a.
- Ferraz, A., Christov, L. e Akhtar, M. Fungal pretreatment for organosolv pulping and dissolving pulp production. In: Environmentally friendly technologies for pulp and paper industry. R.A.Young and M. Akhtar (eds). John Wiley and Sons, New York, pp. 421-448, 1998.
- Ferraz, A., Mendonça, R., Cotrim, A., e Silva, F. T. The use of white-rot decay as a pretreatment for organosolv delignification of *Eucalyptus grandis* wood. In: Proc. International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. Viena, Áustria, pp. 221- 224, 1996.
- Ferraz, A. e Durán, N. Lignin degradation during softwood decaying by the ascomycete *Chrysonilia sitophila*. Biodegradation, **6**, 265- 270, 1995.
- Ferraz, A. Contribuição ao estudo do ascomiceto *Chrysonilia sitophila*: biodegradação de madeira e seus componentes. Instituto de Química, Universidade de Campinas, 132p., 1991.
- Fischer, K., Akhtar, M., Messner, K., Blanchette, R. A. e Kirk, K. Pitch reduction with the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. In: Proc. International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. Viena, Áustria, pp. 193-198, 1996.

- Forss, K., Kokkonen, R. e Sagfors, P. Determination of the molar mass distribution of lignins by gel permeation chromatography. ACS Symposium Ser. **397**, 124-133, 1988.
- Fukagawa, N., Meshitsuka, G. e Ishizu, A. A two-dimensional NMR study of Birch milled wood lignin. J. Wood Chem. Technol., **11**(3), 373-396, 1991.
- Gamble, G., Sethuraman, A., Akin, D., Eriksson, K. Biodegradation of lignocellulose in Bermuda grass by white-rot fungi analyzed by solid-state ^{13}C nuclear magnetic resonance. Appl. Environ. Microbiol., **60**, 3138-3144, 1994.
- Gazdaru, V., Zagrean, V. e Serban, S. Alteration of the physico-chemical structure of cellulose during fungal degradation. Cellulose Chem. Technol., **33**, 13-19, 1997.
- Gellerstedt, G., Pranda, J. e Lindfords, E. Structural and molecular properties of residual Birch kraft lignins. J. Wood Chem. Technol., **14**, 467-482, 1994.
- Gellerstedt, G. e Lindfords, E. Structural changes in lignin during kraft pulping. Holzforschung, **38**, 151-154, 1984.
- Godell, B., Jellison, J., Liu, J., Daniel, G., Paszczynsky, A., Fekete, F., Krishnamurthy, S., Jun, L. e Xu, G. Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolate from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. J. Biotechnol., **53**, 133-152, 1997.
- Goldshimnd, O. Ultraviolet spectra. In: Lignin. Occurrence, formation, structure and reaction. K.V Sarkanen e L.H. Ludwid. (eds). Wiley/Interscience, New York, pp. 241-266, 1971.
- Goldstein, I (ed). Organic chemicals from biomass. CRC Press, Boca Raton, 450, 1981.
- Guerra, A., Mendonça, R. e Ferraz, A. Characterization of the residual lignins in *Pinus taeda* biotreated by *Ceriporiopsis subvermispota* by using *in situ* oxidation and DFRC methods. Holzsforschung, **56** (2), 157-160, 2002.
- Guerra, A., Mendonça, R. e Ferraz, A. Structural characterization of residual lignin and cellulose from *Pinus taeda* wood chips biotreated by *Ceriporiopsis Subvermispota*. In: Proc. 7th Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components. Belo Horizonte, Brazil, pp. 353-358, 2001.

- Guerra, A., Ferraz, A., Cotrim, A. e Silva, F. Polymerization of lignin fragments contained in a model effluent by polyphenoloxidases and horseradish peroxidase/hydrogen peroxide system. Enz. Microb. Technol., **26**, 315-323, 2000.
- Guerra, A. Mendonça, R. e Ferraz, A. Isolation and characterization of MWL and enzymatically - liberated lignin from Loblolly pine (*Pinus taeda*). In: Proc. 6th Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components. Guaratinguetá, Brasil, pp. 304-309, 1999.
- Hammel, K., Jensen, Jr., K., Mozuch, M., Landucci, L. e Pease, E. Ligninolysis by a purified lignin peroxidase. J. Biol. Chem., **268**, 12274-12280, 1993.
- Hatakka, A. Lignin-modifying enzymes from selective white-rot fungi: production and role in lignin degradation. FEMS Microbiol., **13**, 125-135, 1994.
- Henriksson, G., Johansson, G. e Pettersson, G. A critical review of cellobiose dehydrogenases. J. Biotechnol., **78**, 93-113, 2000.
- Hergert, L. Infrared Spectra. In: Lignin- occurrence, formation, structure and reactions. Sakanen, K.V. e Ludwig, L.H. (eds). Wiley/Interscience, New York, pp. 267-297, 1971.
- Higuchi, T. Biodegradation mechanism of lignin by white -rot basidiomycetes. J. Biotechnol., **30**, 1-8, 1993.
- Higuchi, T. Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. Wood J. Biotechnol., **24**, 1-8, 1990.
- Higuchi, T. (ed). Biosynthesis and biodegradation of wood components. Academic Press, Orlando, 679p., 1985.
- Islam, A. e Sarkanen, K. The isolation and characterization of the lignin of Jute (*Corchorus capsularis*). Holzforschung, **47**, 123-132, 1993.
- Jensen Jr., K., Bao, W., Kawai, S., Srebotnik, E. e Hammel, K. Manganese-dependent cleavage of nonphenolic lignin structures by *Ceriporiopsis subvermispora* in the absence of lignin peroxidase. Appl. Environ. Microbiol., **62**, 3679-3686, 1996.
- Joseleau, J-P., Gharibian, S., Contat, J., Lefebvre, A. e Ruel, K. Indirect involvement of ligninolytic enzyme systems in cell wall degradation. FEMS Microbiol. Rev., **13**, 255-263,

1994.

- Kapich, A., Jensen, K. e Hammel, K. Peroxyl radicals are potential agents of lignin biodegradation. FEBS Letters, **461**, 115-119, 1999.
- Kersten, P. e Kirk, K. Involvement of a new enzyme, Glyoxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. J. Bacteriol., **169**, 2195-2202, 1987.
- Kersten, P., Tien, M., Kalyanaraman, B. e Kirk, K. The ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* generates cation radicals from methoxybenzenes. J. Biol. Chem., **260**, 2601-2612, 1985.
- Kirk, T. e Highley, T. Quantitative changes in structural components of conifers during decay by white and brown-rot fungi. Phytopathology, **63**, 1338-1342, 1973.
- Kirk, K. e Chang, H. Decomposition of lignin by white-rot fungi. isolation of heavily degraded lignin from decayed spruce. Holzforschung, **28**, 217-22, 1974.
- Kirk, K. e Cullen, D. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In: Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. R.A. Yong and M. Akhtar (eds). John Wiley and Sons, New York, pp. 273-307, 1998.
- Kirk, K. e Farrell, R. Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin. Ann. Ver. Microb., **41**, 465-505, 1987.
- Kilpeläinen, I., Sipilä, J., Brunow, G.; Lundquist, K. e Ede, R. Application of two-dimensional NMR spectroscopy to wood lignin structure determination and identification of some minor structural units of hard and softwood lignins. J. Agric. Food Chem., **42**, 2790-2794, 1994.
- Kohler, L., Dinus, R., Malcom, E., Rudie, A., Farrel, R., e Brush, T. Enhancing softwood mechanical pulp properties through chip treatment with *Ophiostoma piliferum*. In: Proc. International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. Viena, Áustria, pp.225-228, 1996.
- Kondo, R. e Imamura, H. Model study on the role of the formation of glycosides in the degradation of lignin by lignin oxidizing enzymes. J. Biotechnol., **35**, 181-188, 1990.
- Kuhad, R., Singh, A. e Eriksson, K. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. In: Adv. Biochem. Eng. Biotechn. Eriksson, K.E, (ed), **57**, pp. 45-

126, 1997.

- Kumaran, S., Sastry, C. e Vikineswary, S. Laccase, cellulase and xylanase activities during growth of *Pleurotus sajor-caju* on sago hampas. World J. Microbiol. Biotechnol., **13**, 43-49, 1997.
- Kuwahara, M., Glenn, J., Morgan, M., e Gold, M. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Letters, **169**, 247-250, 1984.
- Lapierre, C., Tollier, M. e Monties, B. A new type of constitutive unit in lignins from corn bm3 mutant. C. R. Acad. Sci., **307**, 723-728, 1988.
- Lawther, J., Sun, R. e Banks, W. Extraction and comparative characterization of ball -milled lignin (lm), enzyme lignin (le) and alkali lignin (la) from wheat straw. Cellulose Chem. Technol., **30**, 395-410, 1996.
- Leatham, G., Myers, G. e Wegner, T. Biomechanical pulping of aspen chips: Energy savings resulting from different fungal treatments. Tappi J., **73**, 197-200, 1990.
- Lenz, B. Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy to characterization of lignin. TAPPI J., **51**, 511-519, 1968.
- Lu, F. e Ralph, J. Derivatization followed by reductive cleavage (DRFC method). A new method for lignin analysis: protocol for analysis of DRFC monomers. J. Agric. Food Chem., **45**, 2590-2592, 1997a.
- Lu, F. e Ralph, J. The DRFC method for lignin analysis 1. A new method for β -aryl ether cleavage: lignin model studies. J. Agric. Food Chem., **45**, 4655-4660, 1997b.
- Lu, F. e Ralph, J. The DRFC method for lignin analysis 2. Monomers from isolated lignins. J. Agric. Food Chem., **46**, 547-552, 1998a.
- Lu, F. e Ralph, J. The DRFC method for lignin analysis 3. NMR studies. J. Agric. Food Chem., **18** (2), 219-233, 1998b.
- Lundquist, K. Wood. In: Methods in lignin chemistry". Lin, S.Y e Dence, C.W. (eds). Springer-

Verlag, New York, pp. 65-70, 1992.

Macedo, A., Valença, A. e Mattos, R. O setor de celulose e papel no Brasil. Guia de compras celulose e papel, 6-17, 2001.

Machuca, A. e Ferraz, A. Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white- and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium. Enz. and Microb. Technol., **29**, 386-391, 2001.

Machuca, A., Córdova, A. e Ferraz, A. Comparative study of the lignocellulolytic enzymes produced by wood-rotting fungi during *Eucalyptus grandis* decay. In: Proc. 7th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. Vancouver, Canadá, **2**, pp. 167-169, 1997.

Mandels, M., Andreotti, R. e Roche, C. Measurement of saccharifying cellulose. Biotechnol. Bioeng. Symp., **6**, 2-34, 1976.

Maurer, A. e Fengel, D. On the origin of milled wood lignin I. The influence of ball-milling on the ultrastructure of wood cell walls and the solubility of lignin. Holzforschung, **46**, 417-423, 1992.

Marita, J., Ralph, J., Hatfield, R. e Chapple, C. NMR characterization of lignin in *Arabidopsis* altered in the activity of ferulate 5-hydroxylase. Biochemistry, **26**, 12328-12332, 1999.

Mendonça, R., Guerra, A. e Ferraz, A. Delignification of *Pinus taeda* wood chips for preparing high-yield kraft pulps from *Ceriporiopsis subvermispota*-biotreated samples. J. Chem. Technol. Biotechnol., **77** (4), 411-418, 2002.

Mendonça, R., Guerra, A. e Ferraz, A. Kinetic study of isothermal kraft delignification for *Pinus taeda* wood chips biotreated by the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispota*. In: Proc. 7th Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Others Wood Components. Belo Horizonte, Brasil, pp.353-358, 2001.

Mendonça, R., Guerra, A. e Ferraz, A. The use of wood chips precolonized with *Ceriporiopsis subvermispota* as inoculum seeds for biopulping of *Pinus taeda*. In: Proc. 6th Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components. Belo Horizonte, Brasil, pp. 423-426, 1999.

- Mendonça, R., Ferraz, A., Cotrim, A., Silva, F.T. How wood biodegradation affects organosolv delignification. In: Proc. 6th Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and others Wood Components. Curitiba, Brasil, pp. 488-494, 1997.
- Messner, K., Koller, K., Wall, M., e Scott, G. Fungal treatment of wood chip for chemical pulping. In: Environmentally friendly technologies for pulp and paper industry. R.A.Young and M. Akhtar (eds). John Wiley and Sons, New York, pp. 385-419, 1998.
- Messner, K., Srebotnik, E. Biopulping: an overview of developmenis in an environmentally safe paper-making technology. FEMS Microbiol. Rev., **13**, 351-364, 1994.
- Miller, G. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem., **31**, 426-428, 1959.
- Myers, G., Leatham, G., Wegner, T. e Blanchette, R. Fungal pretreatment of aspen chips improve strength of refiner mechanical pulping. Tappi J., **71**, 105-108, 1988.
- O'Connor, B., Kovacs, T., Voss, R., Martel, P. e Van Lierop, B. A laboratory assesment of environmental quality of alternative pulp bleaching etluents. In: Proc. International Environmental Symposium. Paris, França, **1**, pp.273-297, 1993.
- Oriaran, T., Labosky Jr. e Blakehorn, P. Kraft pulp and papermaking properties of *Phanerochaete chrysosporium* – degraded aspen. Tappi J., **73**, 147-152, 1990.
- Paszner, L. Catalyzed Alcohol Organosolv Pulping. In: Environmentally friendly technologies for pulp and paper industry. R.A.Young and M. Akhtar (eds). John Wiley and Sons, New York. pp. 69-101, 1998.
- Patt, R., Kordsachia, O. e Schubert, H. The ASAM process. In: Environmentally friendly technologies for pulp and paper industry. R.A.Young and M. Akhtar (eds). John Wiley and Sons, New York. pp. 101-132, 1998.
- Peng, J., Lu, F. e Ralph, J. The DFRC method for lignin analysis 4. Lignin dimmers isolated from DFRC-degraded *Loblolly Pine* wood. J. Agric. Food Chem., **46**, 553-560, 1998.
- Ralph, J., Marita, J., Ralph, S., Hatfield, R., Lu, F., Ede, R., Peng, J., Quideau, S., Helm, R., Grabber, J., Kim, H., Jimenez-Monteon, G., Zhang, Y., Jung, H., Landucci, L., Mackay, J., Sederoff, R., Chapple, C. e Boudet, A. Solution-state NMR of lignins. In: Advances in

- Lignocellulosic Characterization. Argyropoulos, D. and Rials, T., (eds). TAPPI Press, Atlanta, pp. 55-108, 2000.
- Ralph, S., Ralph, J. e Landucci, L. NMR Data Base Of Lignin And Cell Wall Model Compounds. Available at URL <http://www.dfrc.wisc.edu/software.html>, 1998.
- Robert, D., Chen, C. Biodegradation of lignin in spruce wood by *Phanerochaete chrysosporium*: Quantitative analysis of biodegradation spruce lignins by ^{13}C - NMR spectroscopy. Holzforschung, **43**, 323-333, 1989.
- Rodriguez, J., Ferraz, A., Nogueira, R., Freer, J., Esposito, E. e, Durán, N. Lignin biodegradation by the ascomycete *Chrysonilia sitophila*. Appl. Biochem. Biotechnol., **62**, 233-242, 1997.
- Ruel, K. e Barnoud, F. Degradation of wood by microorganisms: ultrastructural aspects. In: Biosynthesis and biodegradation of wood components. Academic Press, New York, p. 441-464, 1985.
- Ruel, K., Ambert, K. e Joseleau, J. Influence of the enzyme equipment of white-rot fungi on the patterns of wood degradation. FEMS Microbiol. Rev., **13**, 241-254, 1994.
- Ruttimann-Johnson, C., Loreto, S., Vicuña, R. e Kirk, K. Extracellular enzyme production and synthetic lignin mineralization by *Ceriporiopsis subvermispota*. Applied and Environmental Microbiology, 1792 -1797, 1993.
- Sarkanen, S. Enzymatic lignin degradation: an extracellular view. In: Enzymes in biomass conversion. ACS Symp. Ser., **20**, 247-269, 1991.
- Scalbert, A., Monties, B., Guittet, E., e Lallemant, Y. Holzforschung, **40**, 119-225, 1986.
- Schroeder, L. e Haigh, F. Cellulose and wood pulp polysaccharides. Gel permeation chromatography analysis. Tappi J., **62**, 103-105, 1979.
- Scoott, G., Akhtar, M., Lentz, M. e Swaney, R. Engineering, scale-up, and economic aspects of fungal pretreatment of wood chips. In: Environmentally friendly technologies for pulp and paper industry. R.A.Young and M. Akhtar (eds). John Wiley and Sons, New York. pp. 341-384, 1998.
- Sjöström, E. e Westermarck, U. Chemical composition of wood and pulps: basic constituents and their distribution. In: Analytical methods in wood chemistry, pulping and papermaking. Eero Sjöström e Raimo Alén (eds). Springer Series in Wood Science, Helsinki, pp. 1-20, 1999.

- Seca, A., Cavaleiro, J., Domingues, F., Silvestre, A., Evtuguin, D. e Pascoal Neto, C. Structural characterization of the lignin from the nodes and internodes of *Arundo donax* Reed. J. Agric. Food Chem., **48**, 817-824, 2000.
- Souza-Cruz, P. e Ferraz, A. Development of analytical procedures for quantitative extraction of the enzymes produced by *Ceriporiopsis subvermispora* cultured under biopulping conditions. In: Proc. 7th Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Others Wood Components. Belo Horizonte, Brasil, pp.367-372, 2001.
- Srebotnik, E., Jensen, K., Kawai, S. e Hammel, K. Evidence that *Ceriporiopsis subvermispora* degrades nonphenolic lignin structure by a one-electron-oxidation mechanism. Appl. Environ. Microbiol., **63**, 4435-4440, 1997.
- Srebotnik, E., Jensen, K. e Hammel, K. Fungal degradation of recalcitrant non-phenolic lignin structures without lignin peroxidase. In: Proc. Natl. Acad. Sci., EUA, **91**, pp. 12794-12797, 1994.
- Sykes, M. Bleaching and brightness stability of aspen biomechanical pulps. Tappi J., **76**, 121-126, 1993.
- Szkiar, G., Aníbus, R., Sinsabaugh, R. e Linkins, A. Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. Mycology, **81**, 234-240, 1989.
- Tan, L., Mayers, P. e Saddler, J. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus*. Can. J. Microbiol., **33**, 689-692, 1987.
- Tai, D., Terazawa, M., Chen, C. e Chang, H. Lignin biodegradation products from birch wood by *Phanerochaete chrysosporium*. Holzforschung, **44**, 185-190, 1990.
- Tien, M. e Kirk, K. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Burds. Science, **221**, 661-663, 1983.
- Thurston, C. The structure and function of fungal laccase. Microbiology, **140**, 19-26, 1994.
- Urzúa, U., Kersten, P. e Vicuña, R. Kinetics of Mn^{3+} -oxalate formation and decay in reactions catalyzed by manganese peroxidase of *Ceriporiopsis subvermispora*. Arch. Biochem. Biophys., **360**, 215-222, 1998.
- Warishi, H., Valli, K. e Gold, M. Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biol. Chem., **267**, 23688-23695, 1992.
- Watanabe, T., Katayama, S., Enoki, M., Honda, Y. e Kuwahara, M. Formation of acyl radical in lipid peroxidation of linoleic acid by manganese-dependent peroxidase from *Ceriporiopsis*

- subvermispora* and *Bjerkandera adusta*. FEBS, **267**, 4222-4231, 2000.
- Wolfaardt, J., Bosman, J., Jacobs, A., Male, J. e Rabie, C. Biokraft Pulping of Softwood. In: Proc. International Conference on Biotchnology in the Pulp and Paper Industry. Viena, Áustria, pp. 205-210, 1996.
- Wood, J. e Wood, P. Evidence that cellobiose:quinone oxireductase from *Phanerochaete Chrysosporium* is a breakdown product of cellobiose oxidase. Biochem. Soc. Trans., **20**, 46-52, 1992.
- Wood, F., Conner, A. e Hill, C. The effect of precipitation on the molecular weight distribution of cellulose tricarbanilate. J. Appl. Polymer Science, **32**, 3703 -3712, 1986.

Apêndices

Espectro de RMN-H1 de LMM isolada de *P. taeda* biodegradado por 15 dias.

Espectro de RMN-H1 de LMM isolada de *P. taeda* biodegradado por 30 dias.

Espectro de RMN-1H de LMM isolada de *P. taeda* biodegradado por 60 dias.

Espectro de RMN-1H de LMM isolada de *P. taeda* biodegradado por 90 dias.

Espectro de RMN-C13 da LMM isolada de *P. taeda* biodegradado por 15 dias.

Espectro de RMN-C13 da LMM isolada de *P. taeda* biodegradado por 30 dias.

Espectro de RMN-13C de LMM isolada de *P. taeda* biodegradado por 60 dias.

Espectro de RMN-13C de LMM isolada de *P. taeda* biodegradado por 90 dias.

Ampliação do espectro HMQC de LMM isolada de *P. taeda* biodegradado por 15 dias.

Ampliação do espectro HMQC de LMM isolada de *P. taeda* biodegradado por 30 dias.

Ampliação do espectro HMQC de LMM de *P. taeda* biodegradado por 60 dias.

Ampliação do espectro HMQC de LMM de *P. taeda* biodegradado por 90 dias.

Ampliação da região de alto campo do HMQC de LMM de *P. taeda* biodegradado por 15.

Ampliação da região de alto campo do HMQC de LMM de *P. taeda* biodegradado por 30 dias.

Ampliação da região de alto campo do HMQC de LMM de *P. taeda* biodegradado por 60 dias.

Ampliação da região de alto campo do HMQC de LMM de *P. taeda* biodegradado por 90 dias.

Espectro Cosy de LMM isolada de *P. taeda* biodegradado por 15 dias.

Espectro Cosy de LMM isolada de *P. taeda* biodegradado por 30 dias

Espectro Cosy de LMM isolada de *P. taeda* biodegradado por 60 dias.

Espectro Cosy de LMM isolada de *P. taeda* biodegradado por 90 dias

APÊNDICE 3

Espectro de RMN-H1 de LLE96 isolada de *P. taeda* biodegradado por 15 dias.

Espectro de RMN-H1 de LLE96 isolada de *P. taeda* biodegradado por 30 dias.

Espectro de RMN-H1 de LLE96 isolada de *P. taeda* biodegradado por 60 dias.

Espectro de RMN-H1 de LLE96 isolada de *P. taeda* biodegradado por 90 dias.

Espectro de RMN-13C de LLE96 isolada de *P. taeda* biodegradado por 15 dias.

Espectro de RMN-13C de LLE96 isolada de *P. taeda* biodegradado por 30 dias.

Espectro de RMN-13C de LLE96 isolada de *P. taeda* biodegradado por 60 dias.

Espectro de RMN-13C de LLE96 isolada de *P. taeda* biodegradado por 90 dias.

Ampliação do espectro HMQC de LLE96 isolada de *P. taeda* biodegradado por 15 dias.

Ampliação do espectro HMQC de LLE96 isolada de *P. taeda* biodegradado por 30 dias.

Ampliação do espectro HMQC de LLE96 isolada de *P. taeda* biodegradado por 60 dias.

Ampliação do espectro HMQC de LLE96 isolada de *P. taeda* biodegradado por 90 dias.

Ampliação da região de alto campo do HMQC de LLE96 isolada de *P. taeda* biodegradado por 15 dias.

Ampliação da região de alto campo do HMQC de LLE96 isolada de *P. taeda* biodegradado por 30 dias.

Ampliação da região de alto campo do HMQC de LLE96 isolada de *P. taeda* biodegradado por 60 dias.

Ampliação da região de alto campo do HMQC de LLE96 isolada de *P. taeda* biodegradado por 90 dias.

Espectro Cosy de LLE96 isolada de *P. taeda* biodegradado por 15 dias.

Espectro Cosy de LLE96 isolada de *P. taeda* biodegradado por 30 dias

Espectro Cosy de LLE96 isolada de *P. taeda* biodegradado por 60 dias.

Espectro Cosy de LLE96 isolada de *P. taeda* biodegradado por 90 dias

APÊNDICE 4

Espectro de RMN-1H de LLE50 isolada de *P. taeda* controle.

Espectro de RMN-1H de LLE50 isolada de *P. taeda* biodegradado por 15 dias.

Espectro de RMN-1H de LLE50 isolada de *P. taeda* biodegradado por 60 dias.

Espectro de RMN-1H de LLE50 isolada de *P. taeda* biodegradado por 90 dias.

Espectro de RMN-13C de LLE50 isolada de *P. taeda* controle.

Espectro de RMN-13C de LLE50 isolada de *P. taeda* biodegradado por 15 dias.

Espectro de RMN-13C de LLE50 isolada de *P. taeda* biodegradado por 30 días.

Espectro de RMN-13C de LLE50 isolada de *P. taeda* biodegradado por 60 días.

Espectro de RMN-C13 de LLE50 isolada de *P. taeda* biodegradado por 90 dias.

Ampliação do espectro HMQC de LLE50 isolada de *P. taeda* controle.

Ampliação do HMPC de LLE50 isolada de *P. taeda* biodegradado por 15 dias.

Ampliação do HMPC de LLE50 isolada de *P. taeda* biodegradado por 30 dias.

Ampliação do HMQC de LLE50 isolada de *P. taeda* biodegradado por 60 dias.

Ampliação do HMQC de LLE50 isolada de *P. taeda* biodegradado por 90 dias.

Espectro Cosy de LLE50 isolada de *P. taeda* biodegradado controle.

Espectro Cosy de LLE50 isolada de *P. taeda* biodegradado por 15 dias.

Espectro Cosy de LLE50 isolada de *P. taeda* biodegradado por 30 dias.

Espectro Cosy de LLE50 isolada de *P. taeda* biodegradado por 60 dias.