**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA**

MARIA AUGUSTA CRIVELANTE HORTA

**Estudo sobre a redução de Fe^{3+} por extratos aquosos de cultivos de
Ceriporiopsis subvermispota sobre madeira e sua relação com a
peroxidação de lipídeos**

**LORENA SP
2008**

MARIA AUGUSTA CRIVELANTE HORTA

**Estudo sobre a redução de Fe^{3+} por extratos aquosos de cultivos de
Ceriporiopsis subvermispota sobre madeira e sua relação com a peroxidação
de lipídeos**

Dissertação apresentada à Escola
de Engenharia de Lorena da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia Industrial.

Área de Concentração: Conversão
de biomassa

Orientador: Prof. Dr. André Ferraz

Lorena – SP
2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação
Biblioteca Universitária
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Horta, Maria Augusta Crivelente

Estudo sobre a redução de Fe^{3+} por extratos aquosos de cultivos de *Ceriporiopsis subvermispota* sobre madeira e sua relação com a peroxidação de lipídeos / Maria Augusta Crivelente Horta ; orientador André Luis Ferraz. – Lorena: 2008.

98 f. : fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Conversão de biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

1. Biodegradação de madeira 2. Peroxidação de lipídeos 3. *Ceriporiopsis subvermispota* 4. Ácido linoleico 5. Biopolpação. 6. Reação de Fenton. I. Título.

630.84 - CDU

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. André Luis Ferraz pela grande oportunidade, orientação, confiança, e ensinamentos.

Aos amigos do laboratório de Ciências da madeira da EEL/USP pela ajuda, companheirismo e Ensinamentos..

Aos meus pais, Celso e Rosa pelo apoio e incentivo constantes.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Biotecnologia.

À CAPES pela bolsa e auxílio financeiro concedido.

Mais uma gota no oceano do conhecimento...

RESUMO

HORTA, M.A.C. **Estudo sobre a redução de Fe^{3+} por extratos aquosos de cultivos de *Ceriporiopsis subvermispora* sobre madeira e sua relação com a peroxidação de lipídeos.** 2008. 98f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2008.

O presente trabalho está inserido dentro de um estudo que pretende entender os mecanismos químicos e bioquímicos envolvidos na biodegradação da madeira por *Ceriporiopsis subvermispora*. Particularmente avaliou-se a relação entre a atividade redutora de Fe^{3+} presente em extratos aquosos de cultivos de *Ceriporiopsis subvermispora* sobre madeira com a iniciação de reações de peroxidação de ácido linoleico. A madeira foi biotratada por períodos de 7, 14 e 28 dias. Após a biodegradação, os cavacos foram extraídos com água e os extratos gerados foram caracterizados quanto a atividade redutora de Fe^{3+} e a capacidade de peroxidar ácido linoleico *in vitro*. As reações de peroxidação foram avaliadas a partir do monitoramento do consumo de O_2 em um oxímetro. A partir desses ensaios foi possível determinar que tanto a oxidação de íons Fe^{2+} adicionados diretamente ao meio reacional ou a adição de íons Fe^{3+} e extratos com atividade redutora foram capazes de gerar radicais hidroperoxila que podem iniciar a peroxidação de ácido linoleico. As reações controle indicaram que a peroxidação não ocorre na presença de Fe^{3+} . A adição de metanol às reações contendo Fe^{2+} não proporcionou menor capacidade de peroxidação de lipídeos, indicando que a reação não deve ser iniciada por OH radical. Tanto a atividade redutora de Fe^{3+} como a capacidade de iniciar a peroxidação de ácido linoleico dos extratos aumentaram em função do tempo de cultivo. A ultrafiltração dos extratos através de membranas seletivas associada com estudos de cromatografia de permeação em gel (CPG) indicaram que a maior parte da atividade redutora e da capacidade peroxidativa pode ser atribuída a compostos menores que 5kDa. Entre os compostos orgânicos identificados nas frações menores que 5 kDa, foram identificados, por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), alguns ácidos graxos como o palmítico e o ácido esteárico, além de glicerol e ácido oxálico e compostos aromáticos como a vanilina, e os ácidos vanílico, siríngico e gálico. A vanilina, detectada em todas as amostras em estudo, foi usada como padrão para um estudo comparativo das atividades redutoras de Fe^{3+} detectadas nos extratos. As concentrações estimadas de vanilina nos extratos foram de 5 a 22 $\mu\text{moles/L}$ de extrato ultrafiltrado. Soluções padrão de vanilina foram então preparadas em concentrações de 5 a 30 μM e avaliadas quanto a capacidade de reduzir Fe^{3+} na presença de ferrozina. Essas misturas levaram à formação de Fe^{2+} nas concentrações de 0,5 a 0,7 μM de Fe^{2+} , após 10 min de reação. A comparação desses dados com a capacidade redutora de Fe^{3+} encontrada nos ultrafiltrados da amostra de madeira biotratada por 14 dias, 43 μM de Fe^{2+} em 10 min, sugeriu que a maior parte da capacidade redutora dos extratos não pode ser atribuída aos compostos detectados por CG/EM e sim deve ser atribuída a compostos que apresentam massa molar próxima àquela obtida pela calibração do sistema de CPG, entre 3 e 5 kDa. Isso sugere que a atividade redutora não estaria presente em compostos de baixa massa molar compatíveis com estruturas contendo 1 ou, no máximo, 2 anéis aromáticos e sim em derivados fenólicos maiores, oriundos da biodegradação da lignina.

Palavras-chave: Biodegradação de madeira. *Ceriporiopsis subvermispora*. Peroxidação de Lipídeos. Ácido Linoleico. Biopolpação. Ferro. Reação de Fenton.

ABSTRACT

HORTA, M.A.C. **Studies on Fe^{3+} reduction by aqueous extracts recovered from cultures of *Ceriporiopsis subvermispora* on wood and its correlation with lipid peroxidation.** 2008. 98p. Dissertation (Master of Science in Industrial Biotechnology) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2008.

The present work is inserted in a broad study aiming to understand the chemical and biochemical mechanisms involved in wood biodegradation by *Ceriporiopsis subvermispora*. Particularly, the relationship between the Fe^{3+} -reducing activity present in aqueous extracts recovered from *Ceriporiopsis subvermispora* cultures on wood with the initiation of linoleic acid peroxidation reactions was evaluated. Wood chips were biotreated for periods varying from 7 to 28 days. After biotreatment, the wood chips were extracted with water and the resulting extracts were characterized according to their Fe^{3+} -reducing activity, as well as their capacity to initiate linoleic acid peroxidation reactions *in vitro*. The peroxidation reactions were monitored through O_2 consumption by using an appropriated Oximeter. Based on these assays, it was possible to show that Fe^{2+} ions added directly to the reaction media or the addition of Fe^{3+} ions plus aqueous extracts were able to generate hidroperoxil radicals that initiated linoleic acid peroxidation. The control reactions indicated that the peroxidation did not occur in the presence of Fe^{3+} ions alone. Addition of methanol to the reaction media containing Fe^{2+} did not diminish the lipid peroxidation extent, suggesting that the reaction should not depend on the formation of hydroxyl radical. The Fe^{3+} -reducing activity and the capacity to initiate linoleic acid peroxidation increased in the aqueous wood extracts as a function of culturing time. The ultrafiltration of the extracts associated with gel permeation chromatography (GPC) studies indicated that most of the reducing activity and the peroxidation capacity present in the extracts were assigned to compounds presenting molecular mass lower than 5 kDa. In the fraction lower than 5 kDa some organic compounds were identified by using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS). Palmitic and estearic acids, glycerol, oxalic acid and some aromatic compounds such as vanillin, vanillic, gallic and syringic acids were identified. Vanillin, detected in all the studied samples, was used as a standard for comparative evaluation of the Fe^{3+} -reducing activities detected in the extracts. The estimated concentrations of vanillin in the extracts varied from 5 to 22 $\mu\text{mol/L}$ of ultrafiltrated extract. Therefore, 5 to 30 μM standard solutions of vanillin were assayed for their Fe^{3+} -reducing activity. These solutions reduced 0.5 to 0.7 ?M of Fe^{3+} after 10 min reaction. The comparison of these data with the Fe^{3+} -reducing capacity found in the ultrafiltrated aqueous extract from the 14-day biotreated sample, 43 ?M of Fe^{3+} reduced after 10 min reaction, suggested that most of the reducing capacity in the extracts could not be attributed to compounds detect by GC/MS. Conversely, the Fe^{3+} -reducing capacity could be assigned to compounds with higher molar mass as already observed in the GPC studies (3 to 5 kDa). These data suggest that the reducing activity detected in the aqueous extracts would not be compatible with low molar mass compounds containing 1 or, at least 2, aromatic rings. Instead, the Fe^{3+} -reducing capacity should be assigned to high molar mass phenolic derivatives produced during the lignin biodegradation.

Keywords: Wood biodegradation. *Ceriporiopsis subvermispora*. Lipid Peroxidation. Linoleic acid. Biopulping. Iron. Fenton reaction.

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura-modelo da lignina proposta por Adler	15
Figura 2: Sistema de camadas na parede das células de madeira. (a) corte ilustrativo do sistema de camadas na parede das células de madeira e (b e c) microscopias eletrônicas de transmissão mostrando as camadas da parede celular de 3 fragmentos de células. Lamela média (ML), parede primária (P), parede secundária (S1), parede secundária (S2), parede terciária (T).	16
Figura 3 - Microscopia eletrônica de varredura mostrando hifas de <i>Ganoderma australe</i> colonizando o lúmen de células de madeira. A magnitude do aumento nesta microscopia é de 800 vezes.....	18
Figura 4 - Microscopia ótica mostrando o ataque progressivo (erosão) da parede celular de <i>Picea abies</i> por <i>Heterobasidium annosum</i> . A escala no canto superior esquerdo da foto indica a magnitude do aumento	18
Figura 5 – Micrografia – UV de <i>Pinus</i> sp. Em (A) madeira controle, em (B) madeira tratada com <i>C. subvermispora</i> por 30 dias. As cores representam valores de absorbância em 280 nm na parede celular e os números para cada cor indicam o valor da absorbância definido entre zero no lúmen ("underflow") e 1.0 no canto das células ("overflow")	19
Figura 6: Peroxidação de lipídeos insaturados iniciada por Mn^{3+} ou radical hidroxila	23
Figura 7: Degradação de um composto modelo de lignina (não fenólico) pelo sistema MnP, ácido linoleico e H_2O_2 . O modelo proposto explicaria a via de oxidação C-alfa (A) e a clivagem beta-O-4 (B). Ambas 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_2O_2	26
Figura 8 : Mecanismo proposto para redução extracelular de Fe^{3+} e produção de H_2O_2 pelo fungo <i>G. trabeum</i>	29
Figura 9: Estrutura dos ácidos alquil-itacônicos produzidos em cultivos de <i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	31
Figura 10: Concentração de TBARS na madeira e variação de pH dos cultivos de <i>C. subvermispora</i> sobre <i>E. grandis</i> . pH (linha contínua), TBARS (linha tracejada).....	44
Figura 11: Concentração de O_2 (nmoles/mL.min) em reações de peroxidação de ácido linoleico 170 μ M catalisadas por 188 μ M de íons ferro Fe^{2+} (linha azul), 188 μ M de íons Fe^{3+} (linha verde) e 10% de metanol seguido da adição de 188 μ M de Fe^{2+} (linha vermelha)..	47
Figura 12: Cinética da formação de Fe^{2+} por extrato controle de <i>E.grandis</i> diluído 20 vezes em ensaios onde se adiciona a ferrozina dentro da mistura desde o início da reação (linha contínua) e após a reação de redução (?).	49
Figura 13: Cinéticas da formação de Fe^{2+} pelo extrato controle não diluído (□), diluído 3 vezes (◊) e diluído 20 vezes (◐). As concentrações de Fe^{2+} formadas representam os valores	

detectados em solução (para ensaio com extrato não diluído) ou calculados considerando a respectiva diluição (para extrato diluído 3 e 20 vezes).....50

Figura 14: Ilustração dos diversos quelantes presentes numa mistura de $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ em solução aquosa contendo extrato de madeira.51

Figura 15: (A) Cinética da formação de Fe^{2+} em reações iniciadas por extratos aquosos de *E. grandis* controle e biotratado por *C. subvermispota*: controle (☞), 7(?), 14(?) e 28(⌋) dias de biotratamento.(B) Concentração de íons Fe^{2+} acumulado após 60 minutos reação, conforme avaliação cinética mostrada na figura 15 (A)52

Figura 16: : Relação entre a formação de Fe^{2+} induzida pelos extratos aquosos de *E. grandis* biotratado por *C. subvermispota* e as taxas de consumo de oxigênio em reações de peroxidação de ácido linoleico iniciadas pelo sistema Fe^{3+} /extrato aquoso.....55

Figura 17 : Cromatografia de permeação em gel dos extratos aquosos obtidos a partir de *E. grandis* biotratado por *C. subvermispota*.Escala da esquerda corresponde a unidades relativas de absorção para derivados aromáticos e açúcares totais.Escala da direita corresponde a unidades relativas de absorção para compostos redutores de Fe^{3+} (linha contínua) detecção de derivados aromáticos em 280 nm;(-? -) detecção de açúcares totais após reação com fenol-ácido sulfúrico e leitura em 490 nm; (-o-) detecção de compostos redutores de Fe^{3+} após reação 90 min de redução e reação ferrozina seguido de leitura em 562.....57

Figura 18 : Curva de calibração da coluna Superose 12/300. Os pontos cujos símbolos são um círculo e um triângulo correspondem ao volume de eluição do “blue-dextran” e da acetona, respectivamente. Os demais pontos são de proteínas de massa molar conhecida.58

Figura 19: (A) Concentração de Fe^{2+} formado após 10 minutos de reação em meio reacional contendo o extrato bruto (⌋ linha preta) e frações que passaram na ultrafiltração por membranas de 5 (? , linha vermelha), 10 (? , linha azul) e 30 kDa (? , linha verde).(B) Taxa de consumo de O_2 em reações de peroxidação de ácido linoleico iniciadas pelos mesmos extrato descrito na figura 19 (A).....61

Figura 20 : Relação entre as taxas de consumo de oxigênio e a formação de Fe^{2+} em 10 minutos de reação de redução em extratos de *E. grandis* biotratado por *C. subvermispota* e extrato controle ultrafiltrados com membrana de 5(?), 10(?) e 30 kDa (?) e no extrato sem ultrafiltração (⌋)......62

Figura 21 - Cromatografia de permeação em gel dos extratos ultrafiltrados. Formação de Fe^{2+} em 60 minutos de reação no filtrado com membrana de 30 kDa (?) 10 kDa (⌋), 5 kDa(?), e extrato bruto(⌋).....63

Lista de Tabelas

Tabela 1: Taxa de consumo de O₂ em reações de peroxidação de ácido linoleico catalizadas por extratos de cultivos de *C. subermispora* sobre *E. grandis* na presença de íons Fe³⁺.55

Tabela 2: Compostos identificados por CG/EM nos extratos aquosos das amostras controle e biotratada por 7, 14 e 28 dias.64

Lista de Abreviações

CDH : Celobiose Desidrogenase

LiP : Lignina Peroxidase

MnP : Manganês Peroxidase

$\text{HO}^\bullet$: radical hidroxila

$\text{O}_2^{\bullet -}$: radical superóxi-ânion

$\text{HOO}^\bullet$: radical hidroperoxila

SUMÁRIO

1. Introdução	13
2. Revisão Bibliográfica.....	14
2.1 Composição química e ultra-estrutura da madeira.....	14
2.2 Modo de ação dos fungos degradadores de materiais lignocelulósicos.....	16
2.3 <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> : enzimas extracelulares e seu modo de ação.	20
2.4 Fundamentos sobre a peroxidação de lipídeos.....	22
2.5 Relação da ação enzimática com a peroxidação de lipídeos.....	23
2.6 Participação da reação de Fenton no processo de biodegradação de madeira e na peroxidação de lipídeos.....	27
2.7 Considerações finais sobre a Revisão Bibliográfica	32
3. Objetivos	34
4. Matérias e Métodos	34
4.1 Preparo do inóculo fúngico	34
4.2 Experimentos de biodegradação	35
4.3 Extração da madeira biotratada com água em pH 7	36
4.4 Determinação de TBARS na madeira residual	36
4.5 Caracterização do extrato aquoso	37
4.5.1 Determinação da atividade redutora de Fe^{3+}	37
4.5.2 Cromatografia de permeação em gel:	38
4.5.3 Reações de peroxidação de ácido linoleico <i>in vitro</i>	39
4.6 Ultrafiltração dos extratos aquosos	40
4.7 Caracterização dos extratos aquosos ultrafiltrados.....	40
4.7.1 Determinação da atividade redutora de Fe^{3+} dos extratos ultrafiltrados	40
4.7.2 Peroxidação de ácido linoleico iniciada pelos extratos ultrafiltrados.....	40
4.7.3 Cromatografia de permeação em gel dos extratos ultrafiltrados	40
4.7.4 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS) :.....	41
5. Resultados e Discussão	41
5.1 Biodegradação da madeira de <i>Eucalyptus grandis</i> por <i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	41
5.2 Peroxidação de ácidos graxos iniciada por Fe^{2+}	45
5.3 Redução de Fe^{3+} pelos extratos aquosos de madeira	48
5.3.1 Efeito adição de ferrozina ao meio reacional.....	48
5.3.2 Efeito da diluição do extrato	49
5.4 Redução de Fe^{3+} pelos extratos aquosos de madeira biotratada	51
5.5 Peroxidação de ácido linoleico catalisada por extratos aquosos de <i>E. grandis</i> biotratado por <i>C. subvermispora</i>	55
5.6 Origem da atividade redutora de Fe^{3+}	55
5.6.1 Distribuição de massas molares dos compostos presentes nos extratos aquosos de <i>E. grandis</i>	56
5.6.2 Atividade redutora de Fe^{3+} em frações dos extratos aquosos submetidos a ultrafiltração.....	61
5.6.3 Identificação de compostos orgânicos nos extratos aquosos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).....	63
6. Conclusões.....	66
Referências.....	68
Anexo.....	74

1. Introdução

O estudo da biodegradação da madeira se justifica com base na importância tanto acadêmica quanto tecnológica do tema. A biodegradação dos materiais lignocelulósicos constitui um dos mais importantes ciclos do carbono na natureza, e o entendimento do processo, por si, representa contribuição significativa às ciências naturais.

A aplicação da biodegradação de madeira, sob condições controladas e com fungos pré-selecionados, como pré-tratamento aos processos de polpação tem demonstrado grande êxito, principalmente quando utilizada previamente à polpação mecânica. Essa combinação (polpação biomecânica) permite reduzir em até 40% o consumo de energia no desfibramento/refino mecânico posterior. Além disso, as biopolpas apresentam maior resistência mecânica do que as polpas convencionais. Esse processo já foi testado em escala ampliada e sua implementação industrial depende atualmente do desenvolvimento que está sendo realizado em 2 plantas piloto já instaladas (uma em Madison, USA e outra em Caieiras, SP, Brasil) e do subsequente licenciamento da tecnologia.

Embora o processo de biopolpação já se encontre bastante desenvolvido, ainda não se conhecem em detalhes os mecanismos químicos e bioquímicos que permitam explicar os benefícios observados para o pré-tratamento da madeira com os fungos ligninolíticos. Grande parte dos estudos com biopolpação está centralizada no basidiomiceto *Ceriporiopsis subvermispora* que, apesar de muito eficiente para os propósitos da biodegradação seletiva de lignina, foi selecionado de forma empírica. A forma pela qual esse fungo degrada lignina ainda não está elucidada completamente, mas tem sido sugerido que as reações de peroxidação de lipídeos têm participação no sistema degradativo (KAPICH et al., 1999). O estudo dessa reação iniciada por extratos aquosos obtidos de cultivos de *C. subvermispora* é essencialmente a base desta dissertação, onde a atividade pró-oxidante, a capacidade redutora de Fe^{3+} e a presença de compostos de baixa massa molar nestes extratos foram determinadas.

Em última análise, supõe-se que o entendimento das reações de peroxidação de lipídeos causadas por *C. subvermispora* pode auxiliar no desenvolvimento e na otimização dos processos de biopolpação, visto que, uma vez entendido os mecanismos usados por esse fungo para degradar a madeira, seria possível direcionar novos estudos de seleção de fungos e agentes químicos mais apropriados para o processo.

2. Revisão Bibliográfica

O estudo da biodegradação de madeira envolve temas relacionados à química e ultraestrutura dos materiais lignocelulósicos, bem como aspectos químicos e bioquímicos envolvidos no processo biodegradativo. Com o objetivo de revisar a vasta literatura envolvida nesses tópicos, são apresentadas a seguir algumas informações básicas sobre a estrutura química dos materiais lignocelulósicos e posteriormente uma revisão da literatura corrente relacionada à biodegradação de madeira, com ênfase nas reações de peroxidação de lipídeos iniciadas por compostos de baixa massa molar, que é o tema principal de estudo dessa dissertação.

2.1 Composição química e ultra-estrutura da madeira

Os materiais lignocelulósicos são constituídos por celulose, polioses, lignina, pequenas quantidades de extrativos e sais minerais, e devem ser estudados considerando-se suas propriedades químicas e morfológicas (FERRAZ, 2004).

A celulose é o polímero mais abundante nos lignocelulósicos sendo uma estrutura linear de anidro-glicose (parte amorfa e parte cristalina) unidas por meio de ligações β -(1-4)-glicosídicas. As polioses (ou hemiceluloses) são compostas de açúcares que incluem glicose, manose e galactose (hexoses) e xilose e arabinose (pentoses), podendo ainda apresentar em sua estrutura compostos como os ácidos urônicos e desoxi-hexoses em alguns tipos de

madeira. As polioses apresentam-se na forma de polímeros ramificados e podem ser homopolímeros (por exemplo, xilana) ou heteropolímeros (por exemplo, glicomanana) (FERRAZ, 2004).

A lignina é uma macromolécula tridimensional e amorfa, composta basicamente por unidades de fenilpropano. Estas unidades estão acopladas de forma irregular, o que é atribuído ao mecanismo de biossíntese da lignina que se processa por via radicalar a partir da reação de três diferentes álcoois cinâmicos precursores. Os diferentes tipos de acoplamento entre os precursores dão origem a diferentes tipos de ligações entre as unidades de fenilpropano como β -O-4 e α -O-4 (50-65%), β -1 (9-15%), β -5 (6-15%), 5-5 (2-9%) e β - β (2-5%) (FENGEL; WEGENER, 1989; FERRAZ, 2004). Uma estrutura modelo para a lignina com suas ligações mais importantes é mostrada na figura 1.

Figura 1: Estrutura-modelo da lignina proposta por Adler (reproduzido com modificações)
Fonte: Fengel e Wegener, (1989).

Existe ainda uma fração menor na composição química da madeira formada basicamente por compostos fenólicos e resinas, que comumente é chamada de “extrativos” (compostos solúveis em solventes orgânicos e água) (FERRAZ, 2004).

Todos esses constituintes da madeira estão ligados química e/ou fisicamente formando um complexo celular vegetal como mostra a figura 2. A lignina ocorre na parede celular e na lamela média, sendo que sua presença na lamela média funciona como uma “cola” que envolve as células e confere coesão à supra-estrutura dos lignocelulósicos (FERRAZ, 2004).

Figura 2: Sistema de camadas na parede das células de madeira. (a) corte ilustrativo do sistema de camadas na parede das células de madeira e (b e c) microscopias eletrônicas de transmissão mostrando as camadas da parede celular de 3 fragmentos de células. Lamela média (ML), parede primária (P), parede secundária (S1), parede secundária (S2), parede terciária (T).

Fonte: Fengel e Wegener (1989). Reproduzido com modificações.

2.2 Modo de ação dos fungos degradadores de materiais lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos podem ser degradados por muitos organismos, sendo os fungos os mais eficientes na biodegradação natural dos materiais lignocelulósicos. Os fungos são capazes de produzir vários metabólitos extracelulares que causam a decomposição dos componentes dos lignocelulósicos. Este processo se difere entre os grupos de fungos, proporcionando diferentes tipos de biodegradação (AKHTAR; KIRK; BLANCHETTE, 1997). A grande maioria desses organismos pertence à classe Basidiomycetes, e podem ser classificados como fungos de decomposição branca (white-rot fungi) que são capazes de degradar todos os componentes da madeira e fungos de decomposição parda ou castanha

(brown-rot fungi) que degradam principalmente polissacarídeos. Há um terceiro grupo de fungos classificados como fungos de decomposição branca (soft-rot fungi) que degradam lignina e polissacarídeos, porém em velocidades muito baixas (KIRK; CULLEN, 1998).

Os materiais lignocelulósicos (especialmente a madeira) decompostos por fungos de decomposição branca adquirem uma aparência esbranquiçada e se rompem facilmente no sentido das fibras. Já a aparência de um lignocelulósico decomposto por fungos de decomposição parda é de um material marrom que quebra facilmente em cubos, no sentido transversal ao das fibras dos vegetais.

Em geral, é possível distinguir três modos para o balanço de massas envolvidos na degradação de cada componente dos materiais lignocelulósicos. Os fungos de decomposição parda, por degradarem principalmente os polissacarídeos, geram um resíduo enriquecido com lignina. Os fungos de decomposição branca podem degradar os lignocelulósicos de duas formas distintas: uma delas, a mais típica, envolve a remoção simultânea de todos os componentes; a outra, menos freqüente, envolve a remoção seletiva de lignina e polioses, mantendo a celulose praticamente intacta (AGOSIN et al., 1990; KIRK; CULLEN, 1998; FERRAZ, 2004).

A biodegradação da madeira por fungos ocorre de forma extracelular e é atribuída a ação de uma série de enzimas e compostos de baixa massa molar (KIRK; CULLEN, 1998). Durante a decomposição, os componentes da madeira são despolimerizados e convertidos em moléculas menores que são então transportadas pela membrana celular, favorecendo o metabolismo intracelular dos fungos envolvidos. A biodegradação ocorre através da penetração das hifas pelo lúmen das células (Figura 3). As hifas aí instaladas produzem uma série de agentes extracelulares que então atuam degradando a parede celular vegetal.

Do ponto de vista microscópico, podem-se identificar dois modos principais de degradação da célula vegetal por fungos de decomposição branca: o primeiro envolve uma

“escamação” progressiva da parede celular no sentido lúmen-lamela média, levando à diminuição progressiva e irregular da espessura da parede celular (Figura 4); o outro modo, que tem sido observado em fungos seletivos para a degradação de lignina, envolve a remoção de lignina e polioses sem a simultânea erosão da parede celular vegetal. Nestes casos, a parede celular, apesar de degradada, mantém sua forma original (Figura 5). Ambos os modos de degradação têm sido estudados, e um aspecto a ser considerado é o modo de ação das enzimas extracelulares sobre o complexo lignocelulósico (KIRK; CULLEN, 1998; FERRAZ, 2004).

Figura 3 - Microscopia eletrônica de varredura mostrando hifas de *Ganoderma australe* colonizando o lúmen de células de madeira. A magnitude do aumento nesta microscopia é de 800 vezes. Foto de A. Ferraz.

Figura 4 - Microscopia ótica mostrando o ataque progressivo (erosão) da parede celular de *Picea abies* por *Heterobasidium annosum*. Note que a célula ao centro apresenta erosões irregulares na parede celular. A escala no canto superior esquerdo da foto indica a magnitude do aumento (Reproduzido com modificações de FENGEL; WEGENER, 1989).

Figura 5—Micrografia UV de *Pinus* sp. Em (A) madeira controle, em (B) madeira tratada com *C. subvermispora* por 30 dias. As cores representam valores de absorvância em 280 nm na parede celular e os números para cada cor indicam o valor da absorvância definido entre zero no lúmen ("underflow") e 1.0 no canto das células ("overflow") (MENDONÇA *et al.*, 2004).

Vários trabalhos têm demonstrado que enzimas ligninocelulolíticas não penetram na parede celular vegetal intacta (SREBOTNIK; MESSNER; FOISNER, 1988; FLOUNOY *et al.*, 1993; GOODELL *et al.*, 1997; BLANCHETTE *et al.*, 1997). Com isto, a degradação enzimática dos componentes da parede celular não poderia justificar o modelo de ataque não erosivo apresentado anteriormente na Figura 5. Ou seja, se as enzimas responsáveis pela decomposição dos componentes da madeira não podem penetrar na parede celular vegetal, somente um processo de “escamação” da parede celular pode ser efetivo na biodegradação. Existem teorias sugerindo que os iniciadores do processo de degradação da parede celular seriam pequenas moléculas que poderiam difundir-se facilmente desde a hifa e penetrar nos poros da matriz lignocelulósica. Esses compostos de baixa massa molar provocariam, nos estágios iniciais de degradação, a desorganização da estrutura da parede celular, abrindo novos poros ou aumentando o tamanho dos poros já existentes (GOODELL *et al.*, 1997). O modo de ação desses agentes de baixa massa molar até agora identificados consiste em atuar diretamente sobre a parede celular vegetal ou mediar as enzimas oxidativas na degradação de lignina, enquanto a degradação de polissacarídeos por enzimas hidrolíticas não tem a participação de mediadores. Em suma, estes compostos deveriam apresentar atividade

degradativa, mas serem pequenos o suficiente para penetrar no complexo celular vegetal, degradar os componentes ali existentes e com isto desestruturar a parede celular a ponto de permitir a penetração de enzimas oxidativas e hidrolíticas.

2.3 *Ceriporiopsis subvermispora*: enzimas extracelulares e seu modo de ação.

Há um grande número de estudos de avaliação de fungos agindo sobre madeira buscando a seleção dos mais eficientes em degradar lignina. Dentre eles, *C. subvermispora* tem sido reportado como um dos mais seletivos à degradação de lignina tendo ainda apresentado os melhores resultados quanto à biopolpação (AKHTAR et al., 1998).

Os fungos do gênero *Ceriporiopsis* Dom. são causadores de decomposição branca à madeira, pertencentes à família Polyporaceae (HAROLD, 1998) e conhecidos por sua grande seletividade para a degradação de lignina, seja em madeiras de folhosas ou em madeira de coníferas (AKHTAR et al., 1998).

Apesar da importância de *C. subvermispora* na aplicação industrial, o sistema extracelular que esse organismo utiliza para decompor a madeira necessita esclarecimentos.

Especialmente na última década, muitos estudos avaliaram os sistemas enzimáticos produzidos por essa espécie, quer em cultivos em meio líquido ou agindo diretamente sobre madeira. Atualmente está claro que as enzimas extracelulares produzidas por esse fungo compreendem as lacases, manganês peroxidases (MnP), xilanases, mananases e do complexo celulolítico as endoglicanases e β -glicosidases, enquanto as celobioidrolases são produzidas em pequenas quantidades (RÜTTIMANN-JOHNSON et al., 1993; LOBOS et al., 1994; SETHURAMAN; AKIN; ERIKSSON, 1998; FERRAZ; CÓRDOVA; MACHUCA, 2003; GUERRA; MENDONÇA; FERRAZ, 2003; SOUZA-CRUZ et al., 2004; HEIDORNE et al., 2006; FERRAZ et al., 2008). A atividade de lignina peroxidase (LiP) não tem sido detectada a partir de diversos meios e formas de cultivo desse fungo (LOBOS et al., 1994; JENSEN et al.,

1996; ENOKI M. et al., 1999; SOUZA-CRUZ et al., 2004). Embora cópias dos genes lip tenham sido identificados no seu genoma, a expressão destes genes também não foi comprovada em nenhuma condição de cultivo testada (RAJAKUMAR et al., 1996). Com isto, a degradação de lignina por este fungo deveria, a princípio, ser atribuída à ação de MnP, lacase e seus sistemas mediadores.

Em trabalho bastante esclarecedor, Blanchette et al. (1997) demonstraram que *C. subvermispora* causa alterações estruturais significativas na lignina presente na parede celular e na lamela média, mesmo antes da parede celular vegetal ser permeável a proteínas do tamanho da insulina (5730 Da). Esses estudos mostraram que durante a biodegradação de *Pinus taeda* por *C. subvermispora*, as células vão se tornando gradual e lentamente permeáveis às enzimas (BLANCHETTE et al., 1997). Na figura 5 pode ser observado o efeito do biotratamento por *C. subvermispora*. As cores nessa figura estão de acordo com a concentração de lignina na parede celular. Baixas concentrações de lignina apresentam cores azul e marrom. Essas frações são mais significativas na madeira biodegradada (Figura 5B) do que na madeira controle (Figura 5A). Isso indica menos lignina na madeira biotratada, mesmo em regiões onde não poderiam atuar enzimas (MENDONÇA et al., 2004). Desta forma, vários trabalhos têm proposto que alguns compostos de baixa massa molar poderiam atuar nos estágios iniciais da biodegradação da madeira. Esses compostos agem como mediadores das enzimas e são capazes de penetrar no complexo celular vegetal e degradar os componentes da madeira, favorecendo uma desestruturação da parede celular, o que permite a penetração posterior de enzimas oxidativas e hidrolíticas (KIRK; CULLEN, 1998). Entre os mediadores mencionados, já foram descritos alguns sistemas de moléculas e metais associados que incluem o oxalato e íons Mn^{2+} e Mn^{3+} , além dos ácidos graxos insaturados e seus respectivos radicais peroxilas (KAPICH; JENSEN; HAMMEL, 1999; ENOKI et al., 1999; HAMMEL et al., 2002; AGUIAR; SOUZA-CRUZ; FERRAZ, 2006).

2.4 Fundamentos sobre a peroxidação de lipídeos

A peroxidação de lipídeos é uma reação muito estudada pela sua importância biológica, visto que muitas membranas celulares apresentam camadas lipídicas que podem ser degradadas pela ação de radicais livres (SOUTHORN; POWIS, 1988). Os lipídeos di e poli-insaturados possuem grupos CH_2 alílicos que podem ser facilmente oxidados por agentes oxidantes, principalmente as espécies ativas de oxigênio, que incluem o radical hidroxila ($\text{HO}^\bullet$), o radical superóxi-ânion ($\text{O}_2^{\bullet -}$) e o radical hidroperoxila ($\text{HOO}^\bullet$), que resulta da protonação em pHs ácidos do radical superóxi-ânion. Vários metais de transição também podem ser reduzidos à custa da oxidação de lipídeos di e poli-insaturados. A oxidação do grupo CH_2 alílico gera um radical centrado no carbono que rapidamente reage com oxigênio dando origem a um radical organo-peroxila em uma estrutura de dieno conjugado (Figura 6). O radical organo-peroxila pode oxidar um novo grupo CH_2 propagando a reação de peroxidação ou abstrair um hidrogênio de algum doador, gerando um hidroperóxido lipídico (que ainda é instável e irá se decompor) ou ainda dar origem a reações de terminação que envolvem o acoplamento de radicais (SOUTHORN; POWIS, 1988). Como os hidroperóxidos lipídicos formados não são estáveis, um número variado de aldeídos se forma durante a reação de peroxidação, sendo os principais o malondialdeído, o pentanal, o hexanal e o glioxal (WATANABE et al., 2001). Esses aldeídos apresentam uma reação característica com o ácido tiobarbitúrico, gerando compostos que absorvem na região de 532 nm e são comumente utilizados como compostos diagnósticos da ocorrência de reações de peroxidação de lipídeos (TBARS ou substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico) (MASAPHY et al., 1996).

Figura 6: Peroxidação de lipídeos insaturados iniciada por Mn^{3+} ou radical hidroxila (Reproduzido de SOUTHORN e POWIS, 1988 com modificações).

2.5 Relação da ação enzimática com a peroxidação de lipídeos

Vários fungos de decomposição branca pertencem a um grupo que não secreta a enzima LiP durante a biodegradação de madeira. A ação do grupo de fungos LiP deficientes sobre a lignina é atribuída às enzimas MnP e Lacase. Como as duas enzimas podem oxidar somente estruturas fenólicas, que não são as mais abundantes em ligninas nativas, muitos mediadores que potencializam a ação dessas enzimas têm sido estudados e descritos (MESSNER, et al., 2003).

Em uma série de trabalhos esclarecedores, o grupo de Hammel (JENSSEN et al., 1996; SREBOTNIK et al., 1997; KAPICH et al., 1999) demonstrou que o mecanismo químico envolvido na decomposição de lignina por *C. subvermispora* deve passar necessariamente por um modelo onde um elétron é abstraído diretamente de estruturas não fenólicas. Ou seja, a abstração de elétron é induzida por espécie ativa com elevada capacidade oxidativa. A hipótese mais provável para a degradação de lignina estaria relacionada com a peroxidação de lipídeos iniciada por Mn^{3+} oriundo da ação de MnP (JENSEN et al., 1996; SREBOTNIK et al.,

1997; KAPICH; JENSEN; HAMMEL, 1999; HAMMEL et al., 2002; HOFRICHTER, 2002).

As reações de peroxidação de lipídeos induzidas por enzimas ligninolíticas foram estudadas inicialmente em ensaios que buscavam explicar a degradação de compostos xenobióticos (compostos recalcitrantes de origem normalmente sintética) iniciadas por MnP. Vários compostos recalcitrantes podem ser decompostos em um meio reacional que contenha MnP/Mn²⁺/H₂O₂ e ácido linoleico emulsionado em algum surfactante como o Tween 20 (mistura de ácidos graxos saturados) (MOEN; HAMMEL, 1994, BOGAN et al., 1996; BOGAN; LAMAR, 1996). Evidências experimentais foram obtidas no sentido de justificar essas reações de degradação como decorrentes da ação de radicais peroxila sobre os compostos xenobióticos. Os radicais peroxila seriam formados a partir da peroxidação do ácido linoleico iniciada pela oxidação por Mn³⁺, gerado no ciclo catalítico da MnP. Em um estudo sobre a degradação de fluoreno, foi demonstrado claramente que a reação de degradação era inibida pela adição de trapeadores de radicais livres como o butil-hidroxi-tolueno (BOGAN et al., 1996).

Enoki et al. (1999; 2000) demonstraram que *C. subvermispora* produz vários ácidos graxos quando cultivado em meio sólido contendo madeira moída pré-extraída para a remoção da fração lipídica (ácidos linoleico, oleico, valérico, palmítico e esteárico). Esses ácidos foram produzidos principalmente nos estágios iniciais da biodegradação tendo suas concentrações diminuídas significativamente após 2 semanas de cultivo o que foi seguido pelo aparecimento de hidroperóxidos orgânicos. Esses dados levaram os autores a relacionar a formação dos hidroperóxidos orgânicos com a ação de Mn³⁺ (oriundo da oxidação de Mn²⁺ por MnP) sobre os ácidos graxos, seguido da adição de oxigênio aos radicais alila inicialmente formados, exatamente como já bastante estudado para a peroxidação de lipídeos. O mesmo grupo (WATANABE et al., 2000) demonstrou posteriormente que há a formação de diversos radicais, incluindo o radical acila por ação de MnP sobre ácido linoleico. A formação

desses radicais poderia ocorrer pela decomposição dos hidroperóxidos gerados, longe do ponto onde a enzima é produzida. O grupo de Watanabe (WATANABE et al., 2001) estudou ainda em detalhes a peroxidação de ácido linoleico por MnP purificada a partir de cultivos de *C. subvermispora*. Nesse estudo foi determinado que a peroxidação de ácido linoleico pelo sistema $\text{MnP/Mn}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ gerou n-pentanal, n-hexanal e glioxal como principais produtos de reação. O glioxal formado continua a sofrer reações de oxidação levando a formação inicial de um radical acila por abstração de hidrogênio do carbono aldeídico.

Um trabalho recente realizado em nosso próprio grupo de pesquisa mostrou que a adição de uma fonte extra de triglicerídeos (óleo de soja) a um cultivo de *C. subvermispora* sobre madeira de *Pinus taeda* resultou num maior acúmulo de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico, corroborando que *C. subvermispora* promove a peroxidação de lipídeos *in vivo* (AGUIAR, 2008).

Kapich et al. (1999) demonstraram que os radicais peroxila oriundos da peroxidação de ácido linoleico por MnP de *C. subvermispora* podem atuar em modelos de lignina não fenólicos, abstraindo um elétron (e um próton) do carbono alfa, levando a posterior degradação do composto modelo (Figura 7).

Até o momento, o modelo que envolve a peroxidação de lipídeos iniciada pela ação de MnP parece ser o mais adequado para explicar a ação dos fungos que degradam a madeira de forma não erosiva e que também não produzem LiP, como *Ceriporiopsis subvermispora*.

Srebotnik e Boisson (2005) demonstraram recentemente que também lacases podem iniciar reações de peroxidação de lipídeos desde que na presença de mediadores como o ácido 4-hidroxi-benzóico (AHB) ou lignina sintética (DHP). A peroxidação de ácido linoleico foi extremamente incrementada quando o meio reacional continha Mn^{2+} . Os autores demonstraram que os radicais fenoxila gerados no AHB podem oxidar Mn^{2+} a Mn^{3+} e esse inicia a peroxidação do ácido linoleico como já descrito para as reações catalisadas por MnP.

A presença de um mediador fenólico foi determinante para a eficácia da reação, visto que reações que continham mediadores não fenólicos como o ácido 4-metoxi-benzóico, uma lignina sintética exaustivamente metilada ou mesmo somente lacase, não induziram a peroxidação de ácido linoleico.

Figura 7: Degradação de um composto modelo de lignina (não fenólico) pelo sistema MnP, ácido linoleico e H₂O₂. O modelo proposto explicaria a via de oxidação C-alfa (A) e a clivagem beta-O-4 (B). Ambas 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/H₂O₂ (Reproduzido de KAPICH et al., 1999).

Em um trabalho recente, Kapich et al. (2005a) propuseram um método rápido e eficiente de determinar a atividade pró-oxidante em extratos de cultivos de fungos de decomposição branca sobre materiais lignocelulósicos. O trabalho está baseado na capacidade desses extratos em peroxidar o ácido linoleico. Como a reação consome oxigênio molecular, o método proposto se baseia na taxa de consumo de oxigênio dissolvido durante uma reação monitorada em um oxímetro. O uso deste método para a determinação da atividade pró-oxidante de cultivos de *Stropharia coronilla* (um fungo envolvido na formação de húmus) mostrou que também esse grupo de fungos apresenta capacidade de peroxidar lipídeos e que essa atividade é dependente da produção de MnP pelo fungo. Nesse caso, o acoplamento da

reação de peroxidação de ácido linoleico com a degradação de um composto modelo de lignina não fenólica mostrou que o composto é oxidado no carbono alfa, porém não sofre ruptura de uma ligação beta-O-4 (KAPICH et al., 2005b).

Como já discutido na sessão 2.3, estudos demonstraram que enzimas são demasiadamente grandes para penetrar na parede celular de madeiras intactas e/ou em tempos curtos de biodegradação (BLANCHETTE et al., 1997). Existem teorias sugerindo que os iniciadores do processo de degradação da parede celular seriam pequenas moléculas que poderiam difundir-se facilmente desde a hifa e penetrar nos poros da matriz lignocelulósica. Esses compostos de baixa massa molar provocariam, nos estágios iniciais de degradação, a desorganização da estrutura da parede celular, abrindo novos poros ou aumentando o tamanho dos poros já existentes (GOODELL et al., 1997). Até agora já foram identificados alguns mecanismos de ação de compostos de baixa massa molar que se baseiam na oxidação de um mediador, formando radicais que possuem capacidade de oxidar diretamente porções não fenólicas de lignina. O presente trabalho investiga especificamente um desses mecanismos de produção de radicais, via redução de íons Fe^{3+} por agentes presentes em extratos aquosos de madeira biotratada por *C. subvermispora*.

2.6 Participação da reação de Fenton no processo de biodegradação de madeira e na peroxidação de lipídeos

O ferro é um elemento essencial para os fungos de decomposição branca, pois faz parte do sítio ativo das peroxidases (HOFRICHTER, 2002; MARTÍNEZ, 2002). Esse elemento também está envolvido na geração de radicais hidroxila, via reação de Fenton (Esquema 1), tanto em sistemas de decomposição branca como de decomposição parda (GOODELL et al., 1997; HAMMEL et al., 2002 AGUIAR; FERRAZ, 2007). Na reação de Fenton, o Fe^{2+} decompõe H_2O_2 em radical hidroxila e íon hidróxido. Se a reação ocorre em meio ácido,

tipicamente encontrado em cultivos de fungos degradadores de madeira, gera radical hidroxila e água (Esquema 1).

Como o ferro é encontrado predominantemente na madeira em sua forma oxidada e insolúvel (Fe^{3+}), a produção de agentes quelantes capazes de solubilizá-lo e eventualmente reduzi-lo é de extrema importância para todo o metabolismo dependente desse elemento (GOODELL et al, 1997). Nos fungos degradadores de madeira, o ácido oxálico tem sido descrito como um agente extracelular que pode cumprir parte dessas funções. No entanto, esse quelante somente reduz Fe^{3+} se a reação ocorre na presença de luz (GOODELL et al., 1997; SHIMADA et al, 1997), o que não existe no interior do lúmen das células de vegetais colonizadas por fungos. Além do ácido oxálico, outros compostos de baixa massa molar também são produzidos por alguns fungos e também bactérias com a finalidade de quelar e solubilizar Fe^{3+} . Entre eles se destaca uma classe de compostos genericamente denominados de sideróforos (NEILANDS, 1995). Existe ainda um grupo de derivados oxigenados do benzeno, como o di-hidroxi, di-metoxi benzeno, que podem quelar e ainda reduzir íons Fe^{3+} . Esses compostos são produzidos por fungos de decomposição parda como *G. trabeum*, e aparentemente apresentam um papel fundamental nas vias iniciais de degradação da matriz lignocelulósica, pois proporcionam a formação do radical hidroxila via reação de Fenton (GOODELL et al, 1997, HAMMEL et al, 2002, GOODELL, 2003, MESSNER et al, 2003). Nos mesmos cultivos pode haver a produção de H_2O_2 quer por via enzimática ou pela própria redução da semiquinona radical gerada no composto aromático após a redução de um átomo de Fe^{2+} (figura 8) (KIRK; CULLEN, 1998; GOODELL, 2003).

Figura 8. Mecanismo proposto para redução extracelular de Fe^{3+} e produção de H_2O_2 pelo fungo *G. trabeum*.
Fonte: Kerem, Jensen e Hammel (1999).

Além de metabólitos fúngicos com atividade redutora de Fe^{3+} , os cultivos de basidiomicetos sobre madeira geram inúmeros produtos de degradação da lignina que também apresentam capacidade redutora de íons metálicos, além de a própria madeira conter alguns extrativos solúveis em água com a mesma capacidade (AGUIAR et al., 2006).

Além de vias não enzimáticas para a disponibilização de íons Fe^{2+} em solução durante a biodegradação de madeira, há uma enzima pertencente ao complexo celulolítico, a celobiose-desidrogenase (CDH), que oxida açúcares como a celobiose, oligômeros de glicose, lactose, manobiose e até mesmo a celulose utilizando quinonas, radicais orgânicos, O_2 molecular, íons Fe^{3+} e Cu^{2+} como aceptores de elétrons. A mesma enzima pode gerar H_2O_2 ao reduzir O_2 a superóxido-ânion (KUHAD et al, 1997; HYDE; WOOD, 1997; HENRIKSSON et al, 2000).

Os radicais hidroxila oriundos da reação de Fenton podem oxidar ácidos graxos insaturados e atuar como iniciadores da peroxidação de lipídeos (SOUTHORN; POWIS, 1988). Dessa forma, além da atividade das enzimas MnP nos cultivos de fungos degradadores de madeira, também a atividade redutora de íons metálicos e obviamente a atividade geradora de H_2O_2 são eventos críticos dentro do processo de peroxidação de lipídeos.

Para demonstrar a participação de radicais livres produzidos em culturas de *C. subvermispora*, Hammel et al. (2002) verificaram nos cultivos desse fungo sobre madeira a mineralização de poli-etileno-glicol (utilizado como um co-substrato). Como esse polímero não é degradado enzimaticamente, concluiu-se que os agentes responsáveis por sua degradação seriam radicais livres, como $\bullet\text{OH}$ e principalmente radicais peroxila e organoperoxila.

A ocorrência de ácidos graxos no extrato aquoso da *P. taeda* biotratado por *C. subvermispora*, apesar de sua baixa solubilidade, indica que ao menos baixas concentrações estão disponíveis no meio para as reações de peroxidação de lipídeos (AGUIAR et al., 2006).

Se todos os compostos necessários à reação de Fenton encontram-se presentes durante a biodegradação supõe-se que esta reação ocorra com frequência em cultivos de basidiomicetos sobre madeira. No entanto, alguns estudos realizados recentemente mostraram que, nestes cultivos, formaram-se alguns compostos capazes de suprimir a reação citada. GUTIÉRREZ et al. (2002) analisaram cultivos de 4 espécies de basidiomicetos na biodegradação de eucalipto, incluindo *Phlebia radiata*, *Pleurotus pulmonarius*, *Bjerkandera adusta* e *C. subvermispora*. Nesses cultivos, foi identificado, por CG/EM, uma nova classe de lipídeos dicarboxílicos de cadeia longa, sendo alguns deles insaturados, os quais acumularam-se principalmente nos meios cultivados com *C. subvermispora* (24 mg/ 100 g de madeira). No decorrer dos períodos de biodegradação estudados (1, 2, 4 e 7 semanas), ocorreu hidrólise de ésteres presentes originalmente na madeira, aumentando a concentração dos ácidos linoleico, palmítico, oléico e esteárico na forma livre. Supõe-se que os fungos efetuaram reações de condensação envolvendo estes ácidos graxos, sintetizando ácidos alquilítacônicos (Figura 9)

Os ácidos alquilítacônicos também foram identificados em cultivos de *C. subvermispora* realizados por um grupo de pesquisadores japoneses (ENOKI et al. 2000; 2002; AMIRTA et al., 2003). Esse grupo propõe que os ácidos alquilítacônicos podem participar na

supressão da reação de Fenton através da interação e indisponibilização de íons Fe^{2+} e Fe^{3+} , além de evitar também a repolimerização de fenóis derivados de lignina, oxidados pela ação enzimática (WATANABE et al., 2002; ENOKI et al., 2002).

Figura 9: Estrutura dos ácidos alquil-itacônicos produzidos em cultivos de *C. subvermispora* (adaptado de AMIRTA et al, 2003).

As hipóteses postuladas pelo grupo de Watanabe encontram certa corroboração em dados de nosso grupo de pesquisa quando da abordagem da degradação de celulose por *C. subvermispora* em cultivos sobre *E. grandis*, *E. globulus*, *P. radiata* e *P. taeda*. Esse fungo é capaz de decompor lignina sem ocasionar grandes perdas de glucana (FERRAZ et al, 2000a, b, c; FERRAZ et al., 2001a, MENDONÇA et al., 2002), indicando que o fungo deve apresentar algum sistema que possa inibir a geração de radicais hidroxila. Por exemplo, durante a biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispora*, somente uma pequena perda de glucana (2%) pôde ser observada, mesmo em estágios avançados de biodegradação (90 dias) (MENDONÇA et al., 2002). No entanto, parte da celulose residual é despolimerizada a partir de 30 dias de biodegradação, indicando que ao menos algum nível de degradação deve ocorrer (GUERRA et al., 2003). Essa despolimerização de celulose poderia ser induzida tanto por radicais hidroxila oriundos da reação de Fenton como pela ação de endoglucanases que são

produzidas pelo fungo (SETHURAMAN et al., 1998). Em um trabalho recente, Aguiar et al. (2006) demonstraram que extratos de *P. taeda* controle (não biotratado) apresentam elevada capacidade redutora de íons Fe^{3+} atribuída a compostos di-hidroxi-aromáticos ou metoxi-hidroxi-amotáticos presentes nos extrativos da madeira. Essa atividade redutora praticamente desaparece aos 7 dias de cultivo com *C. subvermispora*, porém volta a ser detectável de forma crescente ao longo dos próximos 90 dias de biodegradação. A supressão da atividade redutora no início dos cultivos pode ser atribuída ao simples consumo de extrativos pelo fungo (MENDONÇA et al., 2002), mas também poderia ser atribuída a biossíntese dos ácidos alquil-itacônicos como postulado pelo grupo de Watanabe (WATANABE et al. 2002; RAHMAWATI et al., 2005), ou ainda pela secreção de elevadas quantidades de ácido oxálico no meio (AGUIAR et al., 2006) que também pode quelar e indisponibilizar Fe^{3+} para as reações de redução por derivados fenólicos e a posterior reação de Fenton.

2.7 Considerações finais sobre a revisão bibliográfica

O conjunto de trabalhos apresentados e discutidos anteriormente indica que o mecanismo químico envolvido na decomposição de lignina por *C. subvermispora* deve passar necessariamente por um modelo onde um elétron é abstraído diretamente de estruturas não fenólicas. Ou seja, a abstração de elétron é induzida por espécie ativa com elevada capacidade oxidativa. Uma espécie ativa postulada para mediar essa reação é o radical peroxila que seria gerado por um ácido graxo insaturado que sofre oxidação iniciada por Mn^{3+} (do ciclo catalítico da MnP) ou por um radical hidroxila, gerado em uma reação de Fenton. Considerando que Fe^{2+} e H_2O_2 podem estar presentes nos extratos, a degradação da lignina poderia também ser iniciada pela reação de Fenton, desde que existam ácidos graxos insaturados disponíveis no meio reacional. Dessa forma, além da atividade das enzimas MnP e lacase nos cultivos de fungos degradadores de madeira, também a atividade redutora de íons

metálicos e obviamente a atividade geradora de H_2O_2 são eventos críticos dentro do processo de peroxidação de lipídeos.

Concluindo-se o assunto abordado, é certo que a reação de Fenton pode atuar como um iniciador da peroxidação de lipídeos. No entanto, o que não está claro até o momento é qual a extensão e a relevância desse processo de peroxidação de lipídeos dentro de um processo global de biodegradação de lignina durante a degradação de madeira *in vivo*. A baixa solubilidade em água de ácidos graxos como o ácido linoleico coloca em dúvida se a extensão da peroxidação de lipídeos seria grande o suficiente para explicar a degradação da lignina *in vivo* onde eventualmente não existem sistemas surfactantes aumentando a disponibilidade do ácido graxo para as reações de peroxidação. Neste contexto, a abordagem prevista nesse trabalho visa colaborar com o entendimento das reações de peroxidação de lipídeos iniciadas por extratos aquosos oriundos da biodegradação de madeira por *C. subvermispora*.

3. Objetivos

O objetivo principal desse trabalho é estudar a redução de Fe^{3+} induzida por extratos aquosos de cultivos de *Ceriporiopsis subvermispota* sobre madeira e avaliar a relação da atividade redutora com o início das reações de peroxidação de ácido linoleico.

Para alcançar esse objetivo, as seguintes etapas foram realizadas:

- Cultivos do fungo *C. subvermispota* sobre madeira de *E. grandis* foram extraídos com água a fim de recuperar compostos com capacidade redutora de Fe^{3+}
- A capacidade redutora de Fe^{3+} desses extratos foi avaliada e discriminada de acordo com a massa molar.
- A capacidade de reduzir Fe^{3+} dos extratos foi associada com a reação de peroxidação do ácido linoleico.
- Os compostos de baixa massa molar presentes nos extratos foram analisados por cromatografia de permeação em gel e por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

4. Matérias e Métodos

4.1 Preparo do inóculo fúngico

O fungo em estudo foi o basidiomiceto de decomposição branca *Ceriporiopsis subvermispota* (Pil.) Gilbn. & Ryv., cepa SS-3, cedida pelo Prof. M. Akhtar da empresa Biopulping International, Madison-WI, USA. A cepa foi mantida através de repiques sucessivos sobre meio composto por extrato de malte (2%) e extrato de levedura (0,2%). Em tubos de ensaio com o fungo em fase de crescimento foram adicionados pequenos cavacos de madeira de *Pinus taeda* com aproximadamente 0,2 x 2,4 x 0,2 cm. Após colonização desses

cavacos, os tubos foram estocados em refrigerador a 4°C por períodos de até 6 meses. Cada procedimento de repique de manutenção foi realizado pela transferência dos cavacos colonizados para placas de Petri com o mesmo meio de manutenção e, após o crescimento, novos tubos foram preparados a partir de micélio oriundo das bordas da placa em fase de crescimento.

Para preparo do inóculo fúngico, o fungo foi repicado em Erlenmeyer de 2 L contendo 200 mL de meio líquido composto por 2,4% de extrato de batata/dextrose e 0,7% de extrato de levedura. Após 12 dias de incubação estática a 27°C, o micélio crescido em meio líquido foi filtrado, lavado com água esterilizada e macerado em 100 mL de água, usando um liquidificador de alumínio para a maceração. Da suspensão obtida foi retirada uma alíquota de 20 mL que foi filtrada sobre papel de filtro. O micélio retido mais o papel de filtro foram então secos até massa constante para a determinação da quantidade de micélio (base seca) contido na suspensão recém preparada. Com base nessa determinação foi então definido o volume de suspensão necessário para adicionar uma proporção de 500 mg de micélio por kg de madeira em cada Erlenmeyer.

4.2 Experimentos de biodegradação

A madeira utilizada nesse trabalho foi *Eucalyptus grandis*. Os cavacos (2,5 x 1,0 x 0,2 cm) foram obtidos de torras de árvores de aproximadamente 8 anos, cedidos pela empresa Melhoramentos Papéis, Caieiras, SP.

Prévio a etapa de inoculação, 53 g de cavacos de madeira (com aproximadamente 7% de umidade, apresentando, portanto, cerca de 50 g em base seca) foram introduzidos em Erlenmeyers de 2 L, onde foi colocada água em quantidade suficiente para total imersão dos cavacos, que permaneceram assim por um período de 16 horas. O excesso de água foi então drenado e os cavacos autoclavados a 121°C por 15 minutos.

Os biorreatores foram inoculados no interior de uma câmara asséptica de fluxo laminar com uma suspensão de micélio fúngico correspondente a 500 mg de micélio/kg de madeira (ambos em base seca). Três erlenmeyers foram inoculados para cada período de biodegradação, além de três que não foram inoculados para controle do experimento. Foram acrescidos aos biorreatores 10 mL de água destilada esterilizada e os cultivos foram agitados manualmente para homogeneização e então mantidos sem agitação a 27°C por períodos de 7, 14 e 28 dias. Todo o conteúdo de cada biorreator foi extraído com água dando origem aos extratos aquosos que foram objeto de estudo do presente trabalho (item 4.3).

4.3 Extração da madeira biotratada com água em pH 7

Todo o conteúdo de cada Erlenmeyer (madeira mais fungo crescido) foi extraído com 300 mL de água. A água de extração teve seu pH previamente ajustado em 7,0. A extração foi feita por imersão sob agitação de 120 rpm por 24 horas a 10°C, seguida de centrifugação a 3500 g a 4°C por 15 min. Do sobrenadante foi determinado o pH (pHmetro QUIMIS Q 400A) e na madeira residual foi determinada a concentração de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS) (item 4.4). Cada extrato obtido foi borbulhado com um fluxo de N₂ por cerca de 10 min e então congelado até o momento da caracterização.

4.4 Determinação de TBARS na madeira residual

A determinação de TBARS foi realizada de acordo com Enoki et al. (1999), com algumas adaptações. Porções de 5 g de cavacos que restaram da madeira extraída com água foram lavadas com 60 mL de água destilada em 5 ciclos de 1 hora a 120 rpm a 25 °C. A cada ciclo, a água de lavagem foi desprezada e substituída por água destilada. Após secagem dos cavacos ao ar, estes foram extraídos com 60 mL de clorofórmio/metanol (2:1) durante 1 hora a 120 rpm a 25 °C. Em seguida, o extrato orgânico foi concentrado em evaporador rotativo

(Fisaton) e redissolvido com 200 μL do mesmo solvente. A este volume foram adicionados 3 mL de solução 0,335% (m/v) de ácido tiobarbitúrico em 10% (m/v) de ácido tricloroacético que permaneceu por 15 min em banho-maria em ebulição. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3500g a 10°C por 15 min, e analisadas espectrofotometricamente em 532 nm (coeficiente de absorção molar = $156.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). As concentrações foram reportadas como μg de TBARS por kg de madeira (base seca) e analisadas em duplicata.

4.5 Caracterização do extrato aquoso

4.5.1 Determinação da atividade redutora de Fe^{3+} :

A atividade redutora de Fe^{3+} foi determinada no extrato aquoso através de dois métodos diferentes, a saber:

a) ensaio contendo ferrozina desde o início da reação (STOOKEY, 1970): em tubos de ensaio foram adicionados 400 μL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5), 375 μL de extrato aquoso, 200 μL de ferrozina 1% (m/v) e 25 μL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 8 mM, recentemente preparado. Após a mistura dos reagentes, o conteúdo de cada tubo foi transferido para uma cubeta de 1 mL e a absorbância lida em um espectrofotômetro (GBC-Cintra20) em 562nm. Em geral, foram feitas reações com tempos variando entre 1 e 60 min.

b) ensaio com adição de ferrozina após a reação de redução (CHEN; PIGNATELLO, 1997): nesse caso, para cada tempo de reação avaliado a mistura reacional foi alterada da seguinte forma: a mistura continha 350 μL tampão acetato de sódio, 375 μL de extrato, 25 μL de solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 8 mM. Passado o tempo de reação foi adicionado, 200 μL de ferrozina 1% (m/v) e 50 μL de NaF 1% (m/v). A absorbância da mistura foi medida imediatamente em 562 nm.

Nos dois casos as concentrações de íons Fe^{2+} formadas foram determinadas pela conversão das absorbâncias medidas para o complexo ferrozina- Fe^{2+} cuja absorvidade é de

$27900 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (Ferraz et al., 2001b). Para o branco, substituiu-se os extratos aquosos por água destilada. Um experimento controle com FeCl_3 e ferrozina foi realizado para descontar a quantidade de íons Fe^{2+} formados durante o equilíbrio natural $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ em água.

4.5.2 Cromatografia de permeação em gel

O extrato aquoso foi ainda fracionado em uma coluna de permeação em gel Superose 12 10/300 GL de 50 x 1,2 cm eluída com tampão ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50mM, NaCl 150 mM, pH=12) a um fluxo de 0,7 mL/min. O eluente da coluna foi monitorado em linha com um detector de UV fixado em 280 nm e foram coletadas frações de 0,5 mL que foram analisadas quanto a atividade redutora de Fe^{3+} (cromatógrafo GE Akta 10). A atividade redutora de Fe^{3+} foi determinada pelo método com adição de ferrozina após a reação de redução e o tempo de reação foi fixado em 90 minutos. Antes das reações de redução de Fe^{3+} , o pH das frações foi ajustado para 4,5 com a adição de 20 μl de ácido clorídrico 1,6 M. Uma segunda corrida cromatográfica foi realizada para cada amostra e as frações coletadas foram utilizadas para a determinação de carboidratos. Para isso, 0,5 ml de cada fração eluída da coluna cromatográfica foi transferida para tubos de ensaio e 25 μL de fenol 40% foram inseridos e, em seguida, foi adicionado, vagarosamente 1,2 ml de ácido sulfúrico concentrado. Os tubos de ensaio foram agitados e resfriados, à temperatura ambiente, por 30 minutos. A absorbância foi lida em 490 nm, contra uma solução contendo 0,5 ml de água destilada no lugar da amostra (DUBOIS et al., 1956).

Para possibilitar o cálculo de massas molares, foi feita uma calibração da coluna cromatográfica com proteínas de massa molar conhecida. Também foram injetados “blue dextran” e acetona para determinar o volume morto e volume total da coluna. As proteínas analisadas foram albumina, anidrase carbônica, aprotinina, e Citocromo C (Aldrich). Cada um desses compostos foram dissolvidos em água na concentração de 1 mg/mL. Em cada corrida,

1 mL da solução filtrada foi analisada por cromatografia de exclusão. A análise cromatográfica foi realizada a um fluxo de 1,0 mL/min em sistema GE AKTA Basic 10, com uma coluna Superose 12 10/300 GL conforme técnica otimizada anteriormente, utilizando como eluente $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50 mM, NaCl 0,15 M, pH 12. A detecção das proteínas foi feita a 280nm e da acetona a 230 nm. A partir dos cromatogramas obtidos foi possível montar uma curva de calibração para determinação das massas molares (Figura 18).

4.5.3 Reações de peroxidação de ácido linoleico *in vitro*

Reações de peroxidação de ácido linoleico foram monitoradas a partir da taxa de consumo de oxigênio utilizando um oxímetro Hansatech. Na cela do oxímetro foram adicionados 1130 μL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5) que permaneceu sob agitação magnética de 100 rpm por 3 min a fim de garantir a saturação da solução com oxigênio.

Algumas reações de peroxidação de ácido linoleico foram iniciadas por uma solução de Fe^{2+} recém preparada. Nesse caso à cela do oxímetro contendo tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5) foram adicionados 500 μL de água, 40 μL de solução de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8 mM e 40 μL de emulsão de ácido linoleico 0,2% em Tween 60 (1% p/v). Em alguns desses ensaios as reações receberam a adição de 4 μL de peróxido de hidrogênio 20mM através de um tubo capilar. As taxas de consumo de oxigênio, expressas em nmol/mLmin, foram obtidas imediatamente após a adição de cada reagente em intervalo de 1 minuto.

Também foram realizadas reações onde se substituiu a solução de Fe^{2+} por Fe^{3+} , nas quais foi ainda adicionado o extrato aquoso em estudo. Nesse caso, aos 1130 μL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5) foram adicionados 500 μL do extrato, 40 μL de solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 8 mM e 40 μL de emulsão de ácido linoleico 0,2% em Tween 60 (1% p/v).

4.6 Ultrafiltração dos extratos aquosos

Os extratos aquosos (item 4.3) foram ultrafiltrados através de membranas Amicon Ultra (Millipore) de corte de 5, 10 e 30 kDa, em centrífuga a 3500 g por 15 minutos a 10°C. A fração que passou através da membrana foi coletada e caracterizada. Em um dos experimentos, a fração retida pelo filtro de 30 kDa do extrato aquoso de madeira biotratada por 14 dias foi analisada quanto a presença da enzima MnP. A determinação da atividade de MnP foi medida através da oxidação de vermelho de fenol. A reação foi realizada em tubo de ensaio contendo 1,5 mL de tampão succinato de sódio 50 mM e pH 4,5, 1,5 mL de lactato de sódio 50 mM, 0,5 mL de MnSO_4 1,0 mM, 0,5 mL de vermelho de fenol 1 g.L^{-1} , 0,25 mL de albumina bovina 10 g.L^{-1} , 0,5 mL do sobrenadante e 0,25 mL de H_2O_2 2,0 mM. Em intervalos de 1 min, 1 mL desta mistura reacional foi adicionada sobre 30 μL de NaOH 6.5 M e a absorbância foi medida a 610 nm em um espectrofotômetro GBC Cintra 20 (absortividade do vermelho de fenol oxidado = $22.000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) (KHINDARIA; GROVER; AUST, 1994).

4.7 Caracterização dos extratos aquosos ultrafiltrados

4.7.1 Determinação da atividade redutora de Fe^{3+} dos extratos ultrafiltrados: A atividade redutora de Fe^{3+} foi determinada no extrato aquoso ultrafiltrado através do ensaio com adição de ferrozina após a reação de redução (item 4.5.1).

4.7.2 Peroxidação de ácido linoleico iniciada pelos extratos ultrafiltrados: Reações de peroxidação de ácido linoleico pelos extratos ultrafiltrados foram monitoradas a partir da taxa de consumo de oxigênio (item 4.5.3).

4.7.3 Cromatografia de permeação em gel dos extratos ultrafiltrados: Os extratos aquosos

ultrafiltrados foram fracionados (cromatógrafo GE Akta 10) em uma coluna de permeação em gel Superose 12 10/300 GL de 50 x 1,2 cm (item 4.5.2).

4.7.4 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

Os ultrafiltrados que passaram pela membrana de 5 kDa foram secos em evaporador rotativo e mantidos em dessecador com Pentóxido de fósforo por 3 dias. Após a secagem obteve-se o peso da massa seca, que foi redissolvida na concentração de 1 mg/mL em piridina. Essa solução foi mantida em atmosfera de nitrogênio pela passagem de um fluxo de N₂ sobre o tubo que as continha. 100µL da solução foi tratada com 100µL de BSTFA (Bis-(Trimetil-silil)-trifluoracetamina) a 60°C por 1 hora. A amostra sililada foi analisada em cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (Finningan GCQ-Mat) em busca de compostos de baixa massa molar, equipado com coluna Restek RTX 5MS de 30m x 0,25mm DI. A temperatura inicial da coluna foi de 60°C que foi mantido por 1 min. A seguir a temperatura foi elevada até 100°C a 20°C/min e mantida a 100°C por mais 1 min. Depois a coluna foi aquecida a 5°C/min até 290°C e mantida nessa temperatura por mais 8 min. Gás hélio a 33 m/s foi usado como gás de arraste. A temperatura do injetor e da linha de transferência foi 250°C e 275°C respectivamente. 1 µL da amostra foi injetada com seringa de 5 µL e uma taxa de “split” de 1:30. O tempo de retenção e o espectro de massa dos picos das amostras foram comparados com padrões autênticos (anexo).

5. Resultados e Discussão

5.1 Biodegradação da madeira de *Eucalyptus grandis* por *Ceriporiopsis subvermispora*

Os ensaios de biodegradação de *E. grandis* foram monitorados quanto ao crescimento microbiano e quanto à secreção de enzimas, além de terem sido avaliados em detalhes quanto à presença de atividade redutora de Fe³⁺ no meio extracelular de cada cultivo. A avaliação das

enzimas extracelulares presentes nesses cultivos foi realizada em um trabalho desenvolvido simultaneamente com as atividades experimentais da presente dissertação e foi publicado recentemente (CUNHA, 2008). Quando relevante, alguns dados obtidos no trabalho anteriormente mencionado serão retomados para uma discussão conjunta com os resultados descritos na presente dissertação.

Nos cultivos de *C. subvermispora* sobre *E. grandis* houve uma produção discreta de micélio após a primeira semana de biodegradação. A presença de micélio nas superfícies externas dos cavacos passou a ser mais notória a partir de 14 dias e, ao final de 28 dias de biodegradação, os cultivos apresentaram um crescimento intenso do fungo. Quando um grupo de cultivos semelhantes a esse foi extraído com solução tampão de acetato de sódio suplementada com tween 60 (CUNHA, 2008), foi possível recuperar as enzimas oxidativas e hidrolíticas produzidas pelo fungo. Os extratos enzimáticos em questão apresentaram predominância de MnP no conjunto das enzimas oxidativas. Esses extratos apresentaram ainda capacidade de peroxidar ácido linoleico *in vitro* quando o meio reacional continha íons Mn^{2+} e H_2O_2 . Nessas reações ocorreu consumo de O_2 e acúmulo de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS) que foi proporcional ao nível de MnP existente nos extratos. A caracterização da madeira biotratada indicou um padrão típico de degradação preferencial de lignina sendo que aparentemente há uma correlação entre a extensão da degradação de madeira e lignina com a atividade peroxidativa dos extratos (CUNHA, 2008).

Uma forma de verificar se houve peroxidação de ácidos graxos também *in vivo*, ou seja, durante o crescimento do fungo sobre a madeira, é determinar o acúmulo de aldeídos derivados da reação de peroxidação (LIU et al., 1997). Está bem estabelecido na literatura que durante a peroxidação de lipídeos formam-se vários aldeídos, sendo os principais o malondialdeído, o pentanal, o hexanal e o glioxal (MASAPHY; HENIS; LEVANON, 1996; LIU et al., 1997). Todos esses aldeídos proporcionam uma reação característica com o ácido

tiobarbitúrico, gerando compostos que absorvem na região de 532 nm e são comumente utilizados como compostos diagnósticos da ocorrência de reações de peroxidação de lipídeos denominados TBARS (MASAPHY; HENIS; LEVANON, 1996).

Desta forma, a madeira biotratada foi analisada quanto ao acúmulo de TBARS (Figura 10). Pode-se observar que a concentração de TBARS na madeira biotratada foi crescente ao longo da biodegradação, sugerindo que as reações de peroxidação ocorrem efetivamente durante o metabolismo fúngico. Simultâneo ao acúmulo de TBARS na madeira biotratada houve um decréscimo do pH, provavelmente devido à secreção de ácidos orgânicos pelo fungo e também pela formação de derivados ácidos dos produtos de degradação oxidativa da lignina. Sabe-se que os fungos causadores de decomposição branca secretam ácidos orgânicos, tais como oxálico, malônico, málico, tartárico e lático, sendo que o principal secretado por *C. subvermispora* é o ácido oxálico (GALKIN et al., 1998; HOFRICHTER, 2002; AGUIAR; SOUZA-CRUZ; FERRAZ, 2006).

Nota-se na figura 10 que o acúmulo de TBARS segue uma tendência proporcional à diminuição de pH da madeira biotratada, sugerindo que a secreção de ácido oxálico (responsável pela diminuição do pH) é relevante para a ocorrência das reações de peroxidação de lipídeos *in vivo*. De fato, é sabido que o ácido oxálico é o principal “transportador” de Manganês durante a oxidação desse metal por MnP (HOFRICHTER, 2002). Como foi demonstrado que a MnP pode ser um dos agentes mais importantes para a iniciação das reações de peroxidação de lipídeos, pode-se considerar que a secreção de ácido oxálico tem uma participação indireta no processo, uma vez que fomenta o ciclo catalítico da enzima MnP (CUNHA, 2008).

Figura 10: Concentração de TBARS na madeira e variação de pH dos cultivos de *C. subvermispora* sobre *E. grandis*. pH (linha contínua), TBARS (linha tracejada).

Cabe ainda notar que, mesmo no tempo zero de biodegradação, ou seja, na madeira controle, já havia reação positiva e quantificável para TBARS. Isso sugere que na madeira controle já existem alguns aldeídos ou mesmo outros compostos que também dariam reação positiva com o ácido tiobarbitúrico e por isso interfeririam na resposta do método analítico usado. Esse fato é relevante, pois a quantificação de TBARS na madeira biotratada pode ser tomada somente como uma estimativa da ocorrência de reações de peroxidação de lipídeos, mas os valores absolutos de TBARS detectados podem não refletir somente os aldeídos formados nessas reações de peroxidação. De fato, a seletividade da reação com ácido tiobarbitúrico dos aldeídos provenientes da peroxidação de lipídeos tem sido questionada na literatura (LIU et al., 1997).

Dando continuidade ao estudo que pretende entender os mecanismos químicos e bioquímicos envolvidos na biodegradação da madeira por *C. subvermispora*, o presente trabalho avaliou se extratos aquosos oriundos de cultivos similares aos avaliados por Cunha (2008) apresentavam atividade redutora de Fe^{3+} e se as reações de redução de Fe^{3+} também poderiam promover a peroxidação de ácido linoleico *in vitro*.

Num primeiro grupo de experimentos foi verificado se os extratos aquosos continham atividade de MnP que poderia interferir nos estudos de peroxidação iniciados a partir das reações com $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$. Mesmo que a extração com água não favoreça a extração das enzimas e que para a MnP atuar seja necessário a adição de “co-substratos” como o Mn^{2+} e o H_2O_2 , os extratos de madeira podem conter traços desses compostos e fomentar a ação de MnP eventualmente presente. Para confirmar a inexistência de atividade enzimática de MnP nos extratos aquosos investigou-se a atividade do extrato obtido a partir de madeira biotratada por 14 dias, quando observa-se um pico de secreção de MnP (CUNHA, 2008). No extrato aquoso em questão não foi detectada atividade enzimática para MnP. Após uma ultrafiltração desse extrato contra membrana com corte de 30 kDa, o sobrenadante retido pela membrana (concentrado 10 vezes) foi analisado quanto a atividade de MnP e, neste caso, foi observado uma atividade de MnP de 9,7 UI/L que corresponde a 38,9 UI/Kg de madeira (base seca), o que indica a existência de alguma atividade de MnP no extrato concentrado que não foi detectável no extrato bruto. No entanto, mesmo concentrado 10 vezes o extrato contém um nível desprezível de MnP para iniciar a peroxidação de ácido linoleico *in vitro* (Cunha, 2008)

Uma outra enzima que também poderia ser relevante nos estudos de redução de Fe^{3+} realizados no presente trabalho seria a celobiose-desidrogenase (CDH), que pode oxidar celobiose ou outros glicosídeos com a concomitante redução de Fe^{3+} (HENRIKSSON; JOHANSSON; PETTERSSON, 2000). Estudos anteriores realizados pelo nosso próprio grupo de pesquisas mostraram que não se detecta atividade dessa enzima em extratos de *C. subvermispota* crescido tanto em *P. taeda* como em *E. grandis* (AGUIAR et al, 2006).

5.2 Peroxidação de ácidos graxos iniciada por Fe^{2+}

Conforme discutido anteriormente (ilustração na Figura 6), o ácido linoleico pode ser oxidado por uma série de agentes oxidantes. Um dos oxidantes em questão é o radical

hidroxila ($\cdot\text{OH}$) que pode ser gerado numa reação de Fenton. Essa reação tem sido considerada uma via importante na degradação de madeira por fungos de decomposição parda (HAMMEL *et al*, 2002). Por outro lado, ainda não está claro qual seria a importância dessa reação nos cultivos de fungos de decomposição branca. Com base nessas informações, realizamos uma série de experimentos avaliando a peroxidação de ácido linoleico iniciada por íons Fe^{2+} provenientes de uma solução de sulfato ferroso recém-preparada. Esse estudo é relevante, pois a ocorrência eventual da reação de Fenton depende da atividade redutora de Fe^{3+} para Fe^{2+} presente nos extratos de cultivo, já que a espécie predominante de íons Ferro em ambientes oxigenados é o Fe^{3+} .

Uma reação envolvendo somente a presença de solução tampão saturada com O_2 , íons Fe^{2+} e ácido linoleico foi monitorada em um oxímetro (figura 11). Nesse experimento foi possível observar que a peroxidação do ácido linoleico necessita somente da presença de íons Fe^{2+} , mesmo na ausência de H_2O_2 . É importante notar que um meio reacional controle, onde havia tampão acetato de sódio saturado com O_2 , solução de Fe^{3+} recém preparada e emulsão de ácido linoleico, não proporcionou consumo significativo de O_2 ($0,9 \text{ nmoles/mL.min}$), indicando a ausência de reações de peroxidação. Quando a solução contendo íons Fe^{3+} foi substituída por uma solução de íons Fe^{2+} , há um pequeno consumo de O_2 devido à oxidação de Fe^{2+} a Fe^{3+} . Imediatamente após a adição do ácido linoleico há um consumo intenso de O_2 ($140 \pm 30 \text{ nmoles/mL.min}$), mostrando que as reações de peroxidação tiveram início. Isso ocorre porque o Fe^{2+} é rapidamente oxidado a Fe^{3+} à custa da redução do oxigênio dissolvido, gerando o radical superóxi-ânion ($\text{O-O}^\cdot$) que prontamente é protonado em meio ácido ($\text{pKa } 4,7$), gerando o radical hidroperoxila ($\text{HOO}^\cdot$). O radical hidroperoxila pode ainda reagir com um outro átomo de Fe^{2+} em meio ácido e gerar H_2O_2 , que por sua vez pode reagir novamente com Fe^{2+} e gerar OH radical através da reação de Fenton. Os dois radicais ($\text{HOO}^\cdot$ e $^\cdot\text{OH}$) podem prontamente oxidar o ácido linoleico. Assim, as reações possíveis de Fe^{2+} em solução

aquosa ácida, saturada de O_2 podem ser ilustradas conforme mostra o esquema 2 (RODRIGUEZ et al, 2003):

Um experimento realizado separadamente foi feito com a adição de metanol (concentração final de 10%) ao meio reacional antes da adição de Fe^{2+} . O metanol é conhecido como um seqüestrador eficiente de $^{\cdot}OH$ (SOUTHORN; GARTH, 1988, AGUIAR; FERRAZ, 2006). Nessa reação não se observou diferença significativa na taxa de consumo de O_2 (115 ± 13 nmoles/mL.min) nas reações de peroxidação (figura 11). Esse resultado sugere que os radicais peroxila formados durante a oxidação de Fe^{2+} reagem preferencialmente com o ácido linoleico e não com outro átomo de Fe^{2+} gerando H_2O_2 que seria essencial para formar radicais OH a partir da reação de Fenton.

Figura 11: Concentração de O_2 em reações de peroxidação de ácido linoleico $170\mu M$ catalisadas por $188\mu M$ de íons ferro Fe^{2+} (linha azul), $188\mu M$ de íons Fe^{3+} (linha verde) e 10% de metanol seguido da adição de $188\mu M$ de Fe^{2+} (linha vermelha).

Esse conjunto de resultados indica que a peroxidação do ácido linoleico no sistema reacional em estudo não depende necessariamente da formação de radicais OH por intermédio da reação de Fenton. De fato, observa-se que a simples redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} poderá gerar uma espécie ativa (o Fe^{2+}), que na presença de O_2 , pode gerar radicais hidroperoxila capazes de peroxidar lipídeos.

5.3 Redução de Fe^{3+} pelos extratos aquosos de madeira

5.3.1 Efeito da adição de ferrozina ao meio reacional

O extrato aquoso controle de *E. grandis* (de madeira não biotratada) foi capaz de reduzir íons Fe^{3+} de uma solução recém preparada (figura 12). A capacidade redutora do extrato aquoso foi avaliada segundo dois métodos baseados na formação do complexo ferrozina- Fe^{2+} . Um dos métodos envolve a adição de ferrozina diretamente no meio reacional desde o início da reação de redução. Trata-se do método utilizado há mais tempo e o mais encontrado na literatura (STOOKEY, 1970). Por outro lado, trabalhos mais recentes (CHEN; PIGNATELLO, 1997; RODRIGUEZ et al, 2001) têm proposto outro método, onde o procedimento é muito semelhante, porém a ferrozina é adicionada após tempos pré-definidos de reação e a absorbância do complexo formado é medida imediatamente.

A figura 12 mostra a quantidade de Fe^{2+} formado nos dois sistemas reacionais em estudo. Nas reações conduzidas com ferrozina desde o início da reação, o acúmulo do complexo ferrozina- Fe^{2+} é muito intenso e as determinações de absorbância são possíveis somente quando a reação emprega extrato aquoso diluído em magnitudes da ordem de 20 vezes. Por outro lado, a adição de ferrozina ao meio reacional após tempos pré-definidos de reação indica uma menor intensidade de formação de íons Fe^{2+} . Esses resultados sugerem que quando a ferrozina está presente desde o início da reação deve haver uma alteração no potencial de redução $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ devido a elevada constante de quelação de Fe^{2+} por ferrozina.

A alteração mencionada implicaria no aumento do potencial de redução $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ que em água é da ordem de 0,77 V (BRADY et al, 2000). Isso significa que a presença de ferrozina no meio reacional desloca rapidamente o equilíbrio $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ para a direita levando a um maior acúmulo de Fe^{2+} gerado pelos compostos redutores de Fe^{3+} presentes no extrato aquoso da madeira. No caso em estudo, esse aumento na quantidade de Fe^{2+} acumulada é da ordem de 8 vezes.

Figura 12: Cinética da formação de Fe^{2+} por extrato controle de *E. grandis* diluído 20 vezes em ensaios onde se adiciona a ferrozina dentro da mistura desde o início da reação (linha contínua) e após a reação de redução (∇). Os teores de Fe^{2+} foram devidamente corrigidos de acordo com a diluição do extrato.

5.3.2 Efeito da diluição do extrato

A capacidade redutora de Fe^{3+} dos extratos aquosos de madeira também foi analisada em função da magnitude de diluição do extrato. Esse ensaio foi realizado empregando o método de adição de ferrozina após tempos pré-definidos de reação, visto que nos ensaios contendo ferrozina desde o início da reação e extrato não diluído, os valores de absorbância obtidos eram superiores aos limites de detecção do espectrofotômetro (absorbâncias superiores a 4,0). A figura 13 mostra as concentrações calculadas de Fe^{2+} após a devida correção para as diluições empregadas. Pode-se observar que os extratos diluídos apresentam maior capacidade redutora do que os extratos brutos.

Figura 13: Cinéticas da formação de Fe^{2+} pelo extrato controle não diluído (□), diluído 3 vezes (●) e diluído 20 vezes (▲). As concentrações de Fe^{2+} formadas representam os valores detectados em solução (para ensaio com extrato não diluído) ou calculados considerando a respectiva diluição (para extrato diluído 3 e 20 vezes).

O efeito de diluição do extrato na capacidade redutora de Fe^{3+} também poderia ser explicado em função da diversidade de quelantes existentes no meio reacional e do efeito desses quelantes no potencial de redução $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$. A diluição dos extratos pode aumentar a proporção dos aquo-complexos de ferro e diminuir a ocorrência de íons quelados pelos compostos presentes no extrato da madeira (RODRÍGUEZ et al., 2003). A Figura 14 ilustra um modelo hipotético envolvendo todas as possibilidades de quelação dos íons Fe^{3+} e Fe^{2+} em uma solução contendo um extrato aquoso de madeira. Nessa figura se inclui a presença de íons oxalato, visto que eles sempre estarão presentes nos extratos aquosos de madeira, principalmente quando se trata de madeira biotratada (AGUIAR et al., 2006). De acordo com a ilustração, poderia haver uma competição para a quelação de íons Fe^{3+} e Fe^{2+} por água, “quelantes inertes” (Qi) e “quelantes redutores de Fe^{3+} ” (Qr) presentes no extrato. Os “quelantes inertes” e os “redutores” devem corresponder a polifenóis e fragmentos de lignina de baixa massa molar solúveis em água (AGUIAR et al., 2006). No caso de amostras de madeira biotratada, os quelantes podem incluir também os produtos de biodegradação da lignina que são progressivamente solubilizados em água, além de metabólitos produzidos e

secretados pelo fungo. Pode-se inferir a partir da situação hipotética ilustrada na Figura 14, que os “quelantes inertes” presentes no extrato aquoso de madeira poderiam inibir a redução de Fe^{3+} , pois haveria diminuição no potencial de redução em relação ao potencial do sistema $\text{Fe}^{3+}/\text{água}$. Com a diluição do extrato, os aquo-complexos dos íons Ferro passariam a predominar o que aumentaria o potencial de redução.

Figura 14: Ilustração dos diversos quelantes presentes numa mistura de $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ em solução aquosa contendo extrato de madeira.

Qi = quelante “inerte”, ou seja, que não pode reduzir Fe^{3+}

Qr = quelante “redutor”, ou seja, que pode reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+}

Qox = quelante “oxidado”, ou seja, que reagiu com Fe^{3+}

Oxal = oxalato

O fato de a diluição do extrato e a presença ou não de ferrozina durante a reação de redução alterarem a capacidade redutora do extrato indica que o controle dessas variáveis é fundamental nos estudos da capacidade redutora de extratos oriundos de madeira biotratada. Dessa forma, pode-se concluir que as condições experimentais que permitem melhor simulação do sistema biológico seria utilizar todos os extratos sem diluição e adicionar a ferrozina ao final da reação.

5.4 Redução de Fe^{3+} pelos extratos aquosos de madeira biotratada

A partir da avaliação preliminar dos extratos aquosos de madeira controle, estudamos também a capacidade redutora de íons Fe^{3+} presente nos extratos de *E. grandis* biotratado por

7, 14 e 28 dias (Figura 15). Os ensaios foram feitos com o extrato não diluído, adicionando-se ferrozina após tempos pré-determinados de reação. A redução de Fe^{3+} foi detectada tanto no extrato controle (não biotratado) quanto nos extratos de madeira biotratada. Os dados indicam que a capacidade redutora de Fe^{3+} nos extratos aumenta com o tempo de biotratamento, principalmente de 7 para 14 dias e depois permanece praticamente constante até 28 dias de cultivo (Figura 15A).

Figura 15: (A) Cinética da formação de Fe^{2+} em reações iniciadas por extratos aquosos de *E. grandis* controle e biotratado por *C. subvermispora*: controle (○), 7(◇), 14(△) e 28(◻) dias de biotratamento. (B) Concentração de íons Fe^{2+} acumulado após 60 minutos de reação, conforme avaliação cinética mostrada na figura 15 A.

De acordo com Aguiar, Souza-Cruz e Ferraz (2006) a redução de Fe^{3+} por extratos de madeira não biodegradada (controle) pode ser atribuída a extrativos fenólicos presentes na madeira, enquanto para extratos de madeira biodegradada é atribuída principalmente aos produtos de degradação de lignina. Recentemente, Aguiar e Ferraz (2007) analisaram a redução de Fe^{3+} e Cu^{2+} por vários compostos fenólicos representativos de extrativos e produtos de degradação da lignina. De um modo geral, os derivados do catecol (2-hidroxifenol ou 1,2-dihidroxibenzeno) demonstraram maior capacidade redutora comparados aos derivados do siringol (2,6-dimetoxifenol) e do guaiacol (2-metoxifenol), sendo que as duas últimas subestruturas são comumente encontradas na lignina (FENGEL; WEGENER, 1989).

Como os extrativos da madeira são sabidamente consumidos pelo fungo nos primeiros estágios de biodegradação (GUTIERREZ, 2001; MENDONÇA et al., 2002), é provável que na primeira semana de cultivo exista um compromisso entre o consumo de compostos redutores de Fe^{3+} pelo fungo e o início da formação de novos compostos redutores oriundos da degradação de lignina ou ainda secretados pelo fungo no meio extracelular; por isso, a atividade redutora do extrato controle e do biotratado por 7 dias se assemelham. A partir de 7 dias de cultivo, foi observado o aumento da atividade redutora, proveniente da degradação e solubilização de fragmentos da lignina, que aumenta até 14 dias. Após 14 dias, a atividade redutora do extrato se manteve praticamente constante. Nesse ponto, aparentemente, há um compromisso entre a liberação de fragmentos de lignina com atividade redutora e a secreção de metabólitos pelo fungo que podem agir como inibidores da redução de Fe^{3+} . A secreção pelo fungo de algum agente quelante de íons ferro pode afetar significativamente a atividade redutora de Fe^{3+} dos extratos sendo avaliados. Um exemplo é a secreção de ácido oxálico ou ácidos alquil-itacônicos, frequentemente reportados como metabólitos extracelulares importantes de *C. subvermispora* (GUTIERREZ et al., 2002; WATANABE et al., 2002; AGUIAR et al., 2006). Os dois ácidos são quelantes eficientes de Fe^{3+} e também Fe^{2+} dependendo do pH. De fato, recentemente Aguiar e Ferraz (2007) mostraram que a adição de 0.5 mM de oxalato em ensaios de redução de Fe^{3+} por extratos aquosos de *Pinus taeda* in natura inibiu em 92,7% a atividade redutora do extrato. O grupo de Watanabe et. al. (2002) também tem demonstrado que os ácidos alquil-itacônicos comumente produzidos por *C. subvermispora* são eficientes quelantes de Fe^{2+} e com isso minimizam a extensão da reação de Fenton.

5.5 Peroxidação de ácido linoleico catalisada por extratos aquosos de *E. grandis* biotratado por *C. subvermispota*

Considerando que os extratos aquosos obtidos da madeira biotratada são capazes de reduzir Fe^{3+} e que íons Fe^{2+} formados podem iniciar as reações de peroxidação do ácido linoleico, os extratos aquosos em questão foram avaliados quanto à capacidade de peroxidar ácido linoleico na presença de íons Fe^{3+} . A Tabela 1 sumariza as taxas de consumo de O_2 observadas em cada reação.

Tabela 1. Taxa de consumo de O_2 em reações de peroxidação de ácido linoleico catalisadas por extratos de cultivos de *C. subvermispota* sobre *E. grandis* na presença de íons Fe^{3+} .

Extrato de <i>E. grandis</i>	Taxa de consumo de O_2 após a adição do ácido linoleico (nmoles/mL.min)
Sem extrato	$0,9 \pm 1,2$ *
Extrato controle	$4,6 \pm 0,7$
Biotratado por 7 dias	$5,7 \pm 1,3$
Biotratado por 14 dias	$11,2 \pm 2,1$
Biotratado por 28 dias	$8,1 \pm 0,8$

(*desvio estimado a partir da média dos desvios obtidos nos demais experimentos).

A reação considerada como referência para esse sistema é exatamente aquela já discutida no item 5.2, onde todo o ferro disponível se encontra na forma de Fe^{2+} (Figura 11). Nas reações iniciadas pela presença do extrato e Fe^{3+} , se supõe que a peroxidação do ácido linoleico dependa da capacidade do extrato em reduzir os íons Fe^{3+} a Fe^{2+} . Se o extrato apresentasse uma atividade de redução de Fe^{3+} suficientemente elevada para reduzir todo Fe^{3+} imediatamente, os níveis de peroxidação do ácido linoleico deveriam se assemelhar aos observados nessa reação de referência (140 ± 30 nmoles/mL.min). Pode-se notar na Tabela 1 que a peroxidação do ácido linoleico iniciada por um sistema reacional que continha Fe^{3+} e os

extratos de madeira apresentou taxas de consumo de O_2 mais baixas, variando de $4,6 \pm 0,7$ nmoles/mL.min no extrato controle para $11,2 \pm 2,1$ nmoles/mL.min no extrato de madeira biodegradada por 14 dias.

O aumento da capacidade peroxidativa dos extratos na presença de Fe^{3+} em função do tempo de biodegradação parece estar diretamente relacionado com o aumento da atividade redutora de Fe^{3+} observado para os mesmos extratos. A Figura 16 correlaciona essas duas variáveis e é possível notar que quanto maior a capacidade redutora do extrato, maior foi a taxa de consumo de O_2 nos ensaios de peroxidação.

Figura 16: Relação entre a formação de Fe^{2+} induzida pelos extratos aquosos de *E. grandis* biotratado por *C. subvermispota* e as taxas de consumo de oxigênio em reações de peroxidação de ácido linoleico iniciadas pelo sistema Fe^{3+} /extrato aquoso.

5.6 Origem da atividade redutora de Fe^{3+}

Entre os possíveis agentes redutores de Fe^{3+} também aparecem algumas enzimas como a CDH, normalmente não detectada em cultivos de *C. subvermispota* sobre madeira (SOUZA-CRUZ et al., 2004; AGUIAR et al., 2006), além de a própria MnP usualmente produzida por *C. subvermispota* (KHINDARIA et al., 1994). Os agentes redutores de Fe^{3+} ainda podem ser discriminados entre compostos orgânicos de baixa, média ou elevada massa molar. Conforme já discutido anteriormente, os extratos aquosos obtidos de madeira biotratada não contêm quantidades significativas de enzimas. Dessa forma, desenvolvemos

um estudo detalhado a fim de determinar as características dos compostos orgânicos que apresentam a capacidade de reduzir Fe^{3+} já discutida.

5.6.1 Distribuição de massas molares dos compostos presentes nos extratos aquosos de *E. grandis*

A distribuição das massas molares dos compostos presentes nos extratos aquosos foi determinada por cromatografia de permeação em gel e está mostrada na Figura 17. O efluente da coluna foi detectado em uma cela de fluxo com detector UV fixado em 280 nm e as frações foram ainda coletadas e analisadas quanto a atividade redutora de Fe^{3+} e ao teor de açúcares totais. Como se observa na Figura 17, na maioria dos experimentos o extrato não eluiu como uma macromolécula polidispersa e sim apresentou picos relativamente bem resolvidos que correspondem a moléculas cujas massas molares estão dentro da região de permeação da coluna e correspondem a massas molares entre 20 e 2 kDa segundo a calibração da coluna com proteínas conhecidas (Figura 18).

Figura 17: Cromatografia de permeação em gel dos extratos aquosos obtidos a partir de *E. grandis* biotratado por *C. subvermispora*. Escala da esquerda corresponde a unidades relativas de absorção para derivados aromáticos e açúcares totais. Escala da direita corresponde a unidades relativas de absorção para compostos redutores de Fe^{3+} (linha contínua) detecção de derivados aromáticos em 280 nm; (Δ) detecção de açúcares totais após reação com fenol-ácido sulfúrico e leitura em 490 nm; (o) detecção de compostos redutores de Fe^{3+} após reação 90 min de redução e reação ferrozina seguido de leitura em 562 nm.

Figura 18: Curva de calibração da coluna Superose 12/300. Os pontos cujos símbolos são um círculo e um triângulo correspondem ao volume de eluição do “blue-dextran” e da acetona, respectivamente. Os demais pontos são de proteínas de massa molar conhecida.

O cromatograma da amostra de madeira controle com detecção em 280 nm (compostos aromáticos com oxigênio ligado ao anel) apresentou 2 picos bem definidos correspondentes a compostos que eluíram entre 13-19 mL e 19-20 mL. As massas molares aparentes desses compostos foram da ordem de 5-6 kDa e menor que 2 kDa, respectivamente, de acordo com a calibração da coluna. A atividade redutora de Fe^{3+} foi predominante na fração eluída entre 16-19 mL que corresponde a compostos com massa molar média da ordem de 3-5 kDa (Mw calculado 4,02 kDa). Os açúcares presentes no extrato podem corresponder a oligômeros polidispersos, complexos lignina-carboidrato, ou ainda a taninos condensados com açúcares, cujas massas molares variaram entre cerca de 7,5 e 2 kDa. A atividade redutora presente no extrato controle não coincidiu exatamente com nenhum pico detectado em 280nm ou detectado para açúcares, indicando que os compostos que reduzem Fe^{3+} na amostra controle pertencem a uma pequena fração dos compostos aromáticos ou mesmo a alguns açúcares presentes na amostra. Para o extrato obtido após 7 dias de cultivo, o cromatograma detectado em 280 nm apresentou uma alteração significativa, pois a fração de baixa massa molar (pico entre 19 e 20 mL) não esteve presente (os compostos devem ter sido degradados

pelo fungo), enquanto surgiu uma nova fração de massa molar elevada o suficiente para ser excluída pela coluna (pico entre 7 e 9 mL). Essa fração de elevada massa molar deve corresponder à formação de agregados de fragmentos de lignina que eluíram próximo ao volume morto da coluna. O fenômeno de agregação da lignina é relativamente comum e se deve a associação de vários fragmentos por interações eletrostáticas intermoleculares, causando a eluição da molécula na forma de um agregado de elevada massa molar (CHUN et al., 1987). O pico correspondente aos compostos redutores de Fe^{3+} permaneceu na fração de 3-5 kDa, porém sua intensidade aumentou, e o Mw calculado foi de 5,82 kDa. Por outro lado, a fração de açúcares totais diminuiu em intensidade, sugerindo que essa classe de compostos foi rapidamente consumida pelo fungo e apenas uma pequena fração dela, que se sobrepõe ao pico de redução de Fe^{3+} , deve estar envolvida na atividade redutora de Fe^{3+} . Com a continuidade do biotratamento (14 dias), os compostos detectados em 280 nm novamente apresentam eluição diferenciada, sendo que a fração excluída pela coluna diminuiu significativamente, enquanto que a fração eluída entre 13 e 19 mL continuou a aumentar, mostrando que fragmentos de lignina foram produzidos e solubilizados depois de 14 dias. Estes derivados de lignina devem conter grupos redutores de Fe^{3+} , pois a atividade redutora de Fe^{3+} aumentou significativamente de intensidade (note-se a escala da direita aumentada em 4 vezes) e permaneceu na fração correspondente a compostos de 3-5 kDa, com Mw calculado de 4,98 kDa. Nota-se que para 14 dias de biotratamento há maior sobreposição dos picos de redução de Fe^{3+} e compostos aromáticos, indicando que os compostos produzidos ou solubilizados pelo fungo tem capacidade redutora. Os compostos contendo açúcares permanecem com um sinal de baixa intensidade. Esses açúcares podem corresponder a carboidratos ligados quimicamente a lignina que formam complexos carboidrato-lignina. Aos 28 dias de cultivo, novamente há aumento expressivo dos compostos aromáticos e da fração que apresenta atividade redutora de Fe^{3+} , que permanece na região de 3 a 5 kDa e tem Mw

calculado de 3,74 kDa. Novamente a sobreposição dos picos indica que uma fração dos compostos aromáticos apresenta atividade redutora. Muitos derivados contendo açúcares voltam a aparecer nos extratos, pois o longo tempo de biotratamento deve proporcionar a despolimerização das frações polissacarídicas e a conseqüente solubilização. Observa-se a sobreposição dos picos de redução de Fe^{3+} e açúcares, indicando que uma fração desses compostos contendo açúcares também pode estar relacionada com a atividade redutora.

O aumento da intensidade dos picos correspondentes a atividade redutora de Fe^{3+} observado entre 14 e 28 dias de cultivo não apresentou um aumento semelhante nos extratos brutos (Figura 15A). Esse dado sugere que no extrato bruto deve haver algum composto que atua como limitador da atividade redutora, provavelmente por quelação do Fe^{3+} , indisponibilizando-o para a reação de redução. Durante a eluição na coluna, esse suposto limitador da atividade redutora seria separado dos agentes redutores e por isso as frações coletadas na saída da coluna apresentam elevada atividade redutora enquanto o extrato bruto não. Um composto com essa característica é o ácido oxálico usualmente secretado por *C. subvermispora* (AGUIAR et al., 2006; AGUIAR; FERRAZ, 2007). No pH utilizado para o ensaio, o ácido oxálico se encontra com os dois prótons ionizados, portanto sob a forma de oxalato di-ânion. Um padrão de oxalato injetado na coluna usada em nossos experimentos eluiu em 16,5 mL, volume menor que o volume total da coluna (19,5 mL), indicando que o oxalato provavelmente forma agregados de maior massa molar no sistema solvente em uso. Dessa forma, o oxalato, eventualmente presente nas amostras de extrato bruto, co-eluiria com a fração que apresenta atividade redutora de Fe^{3+} . Essa avaliação indica que os compostos presentes no extrato bruto que eventualmente limitam a atividade redutora de Fe^{3+} não correspondem unicamente ao oxalato. Sabe-se, por exemplo, que os ácidos alquil-itacônicos podem inibir a redução de Fe^{3+} e são compostos secretados por *C. subvermispora* (GUTIERREZ et al, 2002, WATANABE et al , 2002; AGUIAR et al., 2006).

5.6.2 Atividade redutora de Fe^{3+} em frações dos extratos aquosos submetidos a ultrafiltração

Os extratos aquosos foram submetidos a ultrafiltração por membranas com cortes nominais de 5, 10 e 30 kDa. Os ultrafiltrados foram avaliados quanto a capacidade de reduzir Fe^{3+} e de peroxidar ácido linoleico (Figura 19A e 19B).

Figura 19: (A) Concentração de Fe^{2+} formado após 10 minutos de reação em meio reacional contendo o extrato bruto (—, linha preta) e frações que passaram na ultrafiltração por membranas de 5 (—, linha vermelha), 10 (—, linha azul) e 30 kDa (—, linha verde). (B) Taxa de consumo de O_2 em reações de peroxidação de ácido linoleico iniciadas pelos mesmos extratos descritos na figura 19A.

Pode-se notar que tanto a capacidade redutora como a indução da peroxidação de ácido linoleico foi mantida em todos os ultrafiltrados, indicando que os compostos envolvidos devem apresentar efetivamente massa molar média inferior a 5kDa, corroborando os dados obtidos por cromatografia de permeação em gel. A relação entre a capacidade peroxidativa e atividade redutora dos ultrafiltrados se mantém crescente durante o biotratamento e segue tendência semelhante àquela encontrada para os extratos brutos (Figura 20).

Figura 20: Relação entre as taxas de consumo de oxigênio e a formação de Fe^{2+} em 10 minutos de reação de redução em extratos de *E. grandis* biotratado por *C. subvermispura* e extrato controle ultrafiltrados com membrana de 5 (?), 10 (▽) e 30 kDa (?) e sem ultrafiltração. (⇒).

Os ultrafiltrados dos extratos aquosos foram ainda analisados por cromatografia de permeação em gel a fim de confirmar suas distribuições de massa molar. Os dados obtidos para atividade redutora de Fe^{3+} estão mostrados na figura 21, juntamente com os resultados do extrato aquoso bruto (sem ultrafiltração). Pode-se observar que a atividade redutora aparece na fração entre 16 e 19 mL e que a maior parte da atividade redutora continua presente nos extratos ultrafiltrados por membranas de 5 kDa e 10 kDa (Mw calculado de 3,62 e 3,72 kDa respectivamente), confirmando que a maior parte dos compostos com atividade redutora são menores que 5 kDa. Os picos de redução de ferro do extrato bruto e do ultrafiltrado com membrana de 30 kDa se assemelharam muito (Mw calculado de 4,48 e 3,62 respectivamente), indicando que compostos com massa molar acima de 30 kDa não são relevantes para a atividade redutora do extrato, corroborando mais uma vez que são os compostos de baixa massa molar, mais especificamente os compostos menores que 5 kDa, que conferem a maior parte da atividade redutora ao extrato.

Figura 21: Cromatografia de permeação em gel dos extratos ultrafiltrados. Formação de Fe^{2+} em 60 minutos de reação no filtrado com membrana de 30 kDa (▲) 10 kDa (■), 5 kDa (◆), e extrato bruto (■)

5.6.3. Identificação de compostos orgânicos nos extratos aquosos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)

Sabendo que os compostos responsáveis pela atividade redutora de Fe^{3+} são menores que 5 kDa, essa fração do ultrafiltrado oriunda dos extratos aquosos foi analisada por CG/EM. Os cromatogramas obtidos para as amostras provenientes da madeira controle e biodegradada por 7, 14 e 28 dias são mostrados no anexo “Cromatogramas dos extratos aquosos e espectros de massa de compostos orgânicos detectados”.

A identificação dos compostos detectados foi feita inicialmente pela comparação dos espectros obtidos com aqueles da biblioteca NIST e/ou por avaliação dos padrões de fragmentação no detector de massas. A partir de avaliação prévia foram injetados padrões autênticos no mesmo sistema cromatográfico, permitindo a confirmação da detecção dos compostos também com base nos tempos de retenção na coluna de CG. Com base nesse estudo comparativo, foi possível identificar em todas as amostras a presença de ácido oxálico, glicerol, vanilina, ácido palmítico e ácido esteárico. O ácido oléico apareceu em todas as amostras biotratadas, enquanto que o ácido vanílico e o ácido siríngico foi identificado apenas na amostra de madeira biotratada por 28 dias. Na amostra controle foi possível identificar

também o ácido gálico que não esteve presente nas amostras biotratadas. A tabela 2 ilustra a ocorrência desses compostos nas amostras em estudo, bem como a capacidade de cada composto para reduzir Fe^{3+} em solução.

Tabela 2 : Compostos identificados por CG/EM nos extratos aquosos das amostras controle e biotratadas por 7, 14 e 28 dias.

Compostos	Reduz Fe^{3+} (*)	controle	Amostra		
			7	14	28
Ácido Oxálico	não	+	+	+	+
Glicerol	não	+	+	+	+
Vanilina	sim	+	+	+	+
Ác. Palmítico	não	+	+	+	+
Ác. Oleico	não	-	+	+	+
Ác. Esteárico	não	+	+	+	+
Ác. Gálico	sim	+	-	-	-
Ác. Vanílico	sim	-	-	-	+
Ác. Sirínico	sim	-	-	-	+

(*) Segundo estudos *in vitro* reportados por Aguiar e Ferraz (2007)

(+) significa que o composto foi identificado na amostra

(-) significa que o composto não foi identificado na amostra

Entre os compostos detectados, alguns são conhecidos por apresentar capacidade de reduzir Fe^{3+} . Em geral, os compostos aromáticos que apresentam duas hidroxilas ou hidroxilas e metoxilas vicinais são capazes de reduzir Fe^{3+} se oxidando a quinonas (AGUIAR; FERRAZ, 2007). Dos compostos detectados, pode-se destacar que tanto o ácido sirínico como o vanílico somente apareceram nos extratos da madeira biodegradada por períodos mais longos (28 dias), sugerindo que eles devem ser oriundos do processo de degradação da lignina. O ácido gálico foi detectado somente na madeira controle e deve fazer parte da fração denominada como extrativos que são prontamente degradados pelo fungo (MENDONÇA et al., 2002).

A vanilina, detectada em todas as amostras em estudo, foi usada como padrão para um estudo comparativo das atividades redutoras de Fe^{3+} detectadas nos extratos. As áreas correspondentes aos picos da vanilina detectados nos cromatogramas correspondem a

concentrações estimadas de 5 a 22 microM de extrato ultrafiltrado. Soluções padrão de vanilina foram então preparadas em concentrações de 5 a 30 microM e avaliadas quanto a capacidade de reduzir Fe^{3+} na presença de ferrozina. Essas misturas levaram a formação de Fe^{2+} nas concentrações de 0,5 a 0,7 microM de Fe^{2+} após 10 min de reação. A comparação desses dados com a capacidade redutora de Fe^{3+} encontrada nos ultrafiltrados (menor que 5kDa) da amostra de madeira biotratada por 14 dias, 43 microM de Fe^{2+} em 10 min, indica que a maior parte da capacidade redutora dos extratos não pode ser atribuída aos compostos detectados por CG/EM e sim deve ser atribuída a compostos que apresentam massa molar próxima àquela obtida pela calibração do sistema de CPG, entre 3 e 5 kDa. Isso sugere que a atividade redutora não estaria presente em compostos de baixa massa molar compatíveis com estruturas contendo 1 ou, no máximo, 2 anéis aromáticos e sim em derivados fenólicos maiores, oriundos da biodegradação da lignina.

A análise por GC/EM permitiu ainda detectar a presença de ácido oxálico que tem sido amplamente descrito como um metabólito importante em fungos de decomposição da madeira, pois, pode atuar como um quelante de Mn^{3+} gerado no ciclo catalítico da MnP ou ainda como um quelante e transportador de Fe^{3+} presente na madeira (AGUIAR et al, 2006).

O glicerol é um álcool que pode ser proveniente da hidrólise de triacilglicerídeos presentes na madeira o que justificaria, inclusive, a detecção de alguns ácidos graxos nos mesmos extratos. É importante notar que nenhum ácido graxo poli-insaturado foi detectado nos extratos aquosos. Pode-se supor que esses ácidos teriam sido oxidados durante a ação fúngica sobre a madeira, visto que, como temos demonstrado no presente trabalho, existem inúmeras vias oxidativas que podem iniciar a peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados.

6 . Conclusões

O presente trabalho permitiu diagnosticar com clareza a origem da atividade redutora de íons Fe^{3+} presentes em extratos aquosos oriundos de *E. grandis* biotratado por *C. subvermispora*. Em síntese, pode-se concluir:

- Foi possível determinar que a oxidação de Fe^{2+} em meio ácido deve gerar radicais hidroperoxila que podem iniciar a peroxidação de ácido linoleico. As reações de peroxidação não ocorrem na presença de Fe^{3+} . A adição de H_2O_2 ao meio reacional contendo Fe^{2+} não aumentou a capacidade peroxidativa do sistema. Além disso, a adição de metanol às reações contendo Fe^{2+} não proporcionou menor capacidade de peroxidação de lipídeos, sugerindo que não deve haver formação expressiva de radical $\cdot\text{OH}$ no meio reacional que contém Fe^{2+} .
- Os ensaios de atividade redutora de Fe^{3+} e a capacidade de peroxidação de lipídeos dos extratos mostraram aumento das duas atividades em função do tempo de cultivo. Os dados indicam que há uma correlação entre a capacidade de peroxidação de ácido linoleico e atividade redutora de Fe^{3+} .
- A ultrafiltração dos extratos indicou que a maior parte da atividade redutora e da capacidade peroxidativa permanece na fração correspondente a compostos menores do que 5kDa.
- Os dados obtidos sugeriram que a atividade redutora não estaria presente em compostos de baixa massa molar compatíveis com estruturas contendo 1 ou, no máximo, 2 anéis aromáticos e sim em derivados fenólicos maiores com cerca de 3 a 5 kDa, oriundos da biodegradação da lignina.

Por fim, o desenvolvimento do presente trabalho permitiu ainda indicar que a peroxidação de ácido linoleico pode ser iniciada por reações simples, iniciadas por Fe^{2+} , ou por Fe^{3+} na presença de compostos redutores de Fe^{3+} . Como a reação em questão gera radicais organoperoxila aptos a degradar estruturas não fenólicas da lignina, pode-se concluir que o sistema estudado tem potencial para ser aplicado na degradação de lignina em sistemas biomiméticos baseados na peroxidação de lipídeos.

Referências

- AGOSIN, E.; BLANCHETTE, R.A.; SILVA, H., LAPIERRE, C.; CEASE, K.R., IBACH, R.E.; ABAD, A.R.; MUGA, P. Characterization of palo poderido, a natural process of delignification in wood. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p. 65-74, 1990.
- AGUIAR A.. **Importância dos mediadores de baixa massa molar na biodegradação de madeira por Ceriporiopsis subvermispota**. 2008.121p. Tese de Doutorado em Biotecnologia Industrial, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo,2008.
- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Relevance of extractives and wood transformation products on the biodegradation of *Pinus taeda* by *Ceriporiopsis subvermispota*. **Int. Biodet. Biodeg.**, v. 61, p. 182-188. 2008
- AGUIAR, A.; SOUZA-CRUZ, P.B.; FERRAZ, A. Oxalic acid, Fe^{3+} -reduction activity and oxidative enzymes detected in culture extracts recovered from *Pinus taeda* wood chips biotreated by *Ceriporiopsis subvermispota*. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 38, p.873-878, 2006.
- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Fe^{3+} and Cu^{2+} reduction by phenol derivatives associated with Azure B degradation in Fenton-like reactions. **Chemosphere**, v.66: p.947-954. 2003.
- AKHTAR, M.; BLANCHETTE, R.A.; MYERS, G.; KIRK, K. 1998. An overview of biomechanical pulping research. In: **Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**. ed Young, R. e Akhtar, M. New York, John Wiley Sons, 1988 p. 309-383.
- AKTHAR, M.; KIRK, T.K.; BLANCHETTE, R.A. Fungal delignification and biomechanical pulping of wood. In: ERIKSSON, K.E.L. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. New York: Springer-Verlag; 1997. v.57, p. 159-195.
- AMIRTA, R.A.; FUJIMORI, K., SHIRAI, N.; HONDA, Y.; WATANABE, T. Ceriporic acid C, a hexadecenylitaconate produced by a lignin-degrading fungus, *Ceriporiopsis subvermispota*. **Chem. Phys. Lipids**, v.126, p.121-131. 2003.
- BLANCHETTE, R.A.; KRUEGER, E.W.; HAIGHT, J. E.; AKHTAR, M.; AKIN, D.E. Cell wall alterations in loblolly pine wood decayed by the white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispota*. **J. Biotechnol.**, v.53, p.203-213. 1997.
- BOGAN, B.W., LAMAR, R.T.; HAMMEL, K.E. Fluorene oxidation in vivo by *Phanerochaete chrysosporium* and in vitro during manganese peroxidase-dependent lipid peroxidation. **Appl.Environ. Microbiol.**, v.62, p.1788-1792. 1996.
- BOGAN, B.W.; LAMAR, R.T. Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading capabilities of *Phanerochaete laevis* HHB-1625 and its extracellular ligninolytic enzymes. **Appl.Environ. Microbiol.**, v.62, p.1597-1603. 1996.
- BRADY, J.E., RUSSELL, J.W., HOLUM, J.R. **Química – a matéria e suas transformações**. 3ª ed., New York; John Wiley Sons,2000. v 2., p.193.

CHEN, R.; PIGNATELLO, J. Role of quinone intermediates as electron shuttles in Fenton and photoassisted Fenton oxidations of aromatic compounds. **Environ.Sci.Technol.**, v.31, p.2399-2406, 1997.

CHUN, H. L. et al. Some Aspects of Lignin Characterization by High Performance Size Exclusion Chromatography Using Styrene Divinylbenzene Copolymer Gels. **Holzforschung**, v.41, p.97-108. 1987.

CUNHA, G. G. S. 2008. **Atividade peroxidativa de extratos enzimáticos obtidos a partir de cultivos de *Ceriporiopsis subvermispota* e sua relação com a degradação de lignina**. 66f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) -Departamento de Biotecnologia Industrial, Escola de Engenharia Química de Lorena da Universidade de São Paulo – São Paulo.

DUBOIS, M.; MCDONALD, C.; ROBERT, C.R. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v.28, p.350-356, 1956.

ENOKI, M.; HONDA, Y.; KUWAHARA, M.; WATANABE, T. Chemical synthesis, iron redox interactions and charge transfer complex formation of alkylitaconic acids from *Ceriporiopsis subvermispota*. **Chem. Phys. Lipids**, v.120, p.9-20. 2002.

ENOKI, M.; WATANABE, T.; HONDA, Y.; KUWAHARA, M. A novel fluorescent dicarboxylic acid, (Z)-1-7-nonadecadiene-2,3-dicarboxylic acid, produced by the fungus *Ceriporiopsis subvermispota*. **Chem. Lett.**, p.54-55. 2000.

ENOKI, M.; WATANABE, T.; NAKAGAME, S.; KOLLER, K.; MESSNER, K.; HONDA, Y.; KUWAHARA, M. Extracellular lipid peroxidation of selective white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispota*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.180, p.205-211. 1999.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry, Ultrastructure and Reactions**. Berlin:Walter de Gruyter, 1989.

FERRAZ, A.; GUERRA, A.; MENDONÇA, R.; MASARIN, F.; VINCENTIN, M.P.; AGUIAR, A.; PAVAN, P.C. Technological advances and mechanistic basis for fungal biopulping. **Enzyme and Microbial Technology**, v.43, p.178-185, 2008.

FERRAZ, A. 2004. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos, in: Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia, Eds. Elisa Esposito & João L. Azevedo, Caxias do Sul: EDUCS, 2004. cap.6, p. 215-242.

FERRAZ, A.; CORDOVA, A.M.; MACHUCA, A. Wood biodegradation and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispota* during solid-state fermentation of *Eucalyptus grandis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 59-65, 2003.

FERRAZ, A.; J. RODRÍGUEZ, J.; FREER, J.; BAEZA, J. Biodegradation of *Pinus radiata* softwood by white- and brown-rot fungi. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.17, p.31-34. 2001a.

FERRAZ, A.; PARRA, C.; FREER, J.; BAEZA, J.; RODRÍGUEZ, J. Occurrence of iron-reducing compounds in biodelignified "palo podrido" wood samples. **Int. Biodet. Biodeg.**, v.47, p.203-208, 2001b.

FERRAZ, A.; PARRA, C.; FREER, J.; BAEZA, J.; E RODRÍGUEZ, J. Characterization of white zones produced on *Pinus radiata* wood chips by *Ganoderma australe* and *Ceriporiopsis subvermispora*. **World. J. Microbiol. Biotechnol.**, v.16, p.641-645, 2000a.

FERRAZ, A.; RODRÍGUEZ, J.; FREER, J.; BAEZA, J. Estimating chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. **Bioresource Technol.**, v.74, p.201-212, 2000b.

FERRAZ, A.; RODRÍGUEZ, J.; FREER, J.; BAEZA, J. Formic acid/acetone-organosolv pulping of white-rotted *Pinus radiata* softwood. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v.75, p.1190-1196, 2000c.

FLOUNOY, D.S. *et al.* Changes in the size and volume of pores in sweet gum wood during simultaneous rot by *Phanerochaete chrysosporium*. **Holzforschung**, v. 47, p. 297-301, 1993.

GALKIN, S.; VARES, T.; KALSI, M.; HATAKKA, A. Production of organics acids by different white-rot fungi as detected using capillary zone electrophoresis. **Biotechnol. Tech.**, v. 12, p. 267-271, 1998.

GOODELL B. Brown-rot fungal degradation of wood: our evolving view. In: GOODELL B, NICHOLAS DD, SCHULTZ TP, editors. **Wood Deterioration and Preservation – Advances in our Changing World**. ACS Symposium Ser 845, Washington, DC; American Chemical Society, 2003. p. 97-118.

GOODELL, B.; JELLISON, J.; LIU, J.; DANIEL, G.; PASZCZYNSKY, A.; FEKETE, F.; KRISHNAMURTHY, S.; JUN, L.; 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.**, v.53, p.133-152. 1997.

GUERRA, A.; MENDONÇA, R.; FERRAZ, A. Molecular weight distribution of wood components extracted from *Pinus taeda* biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora*. **Enzyme Microb. Technol.**, v.33, p.12-18. 2003.

GUTIÉRREZ, A.; DEL RIO, J.C.; MARTINEZ-INIGO, M.J.; MARTINEZ, M.J.; MARTINEZ, A.T. Production of new unsaturated lipids during wood decay by ligninolytic basidiomycetes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.68, p.1344-1350, 2002.

GUTIÉRREZ, A.; ROMERO, J.; DEL RIO, J.C. Lipophilic extractives from *Eucalyptus globulus* pulp during kraft cooking followed by TCF and ECF bleaching. **Holzforschung**, v.55, p.260-264, 2001.

HAMMEL, K.E.; KAPICH, A.N.; JENSEN, K.A.; RYAN Z.C. Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. **Enzyme Microb. Technol.**, v.30, p.445-453, 2002

HAROLD JR., S. B. Taxonomy of industrially important white-rot fungi. In: YOUNG, R.; AKHTAR, M. **Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**. New York: John Wiley, 1998. p. 259-272.

HEIDORNE, F.O.; MAGALHÃES, P.O.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F. Characterization of hemicellulases and cellulases produced by *Ceriporiopsis subvermispora* grown on wood under biopulping conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 436-442, 2006.

HENRIKSSON, G.; JOHANSSON, G.; PETTERSSON, G. A critical review of cellobiose dehydrogenases. **J. Biotechnol.**, v.78,p.93-113. 2000.

HOFRICHTER, M. Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 454-466, 2002.

HYDE, S.; WOOD, P. A mechanism for production of hydroxyl radicals by the brown-rot fungus *Coniophora puteana*: Fe(III) reduction by cellobiose dehydrogenase and Fe(II) oxidation at a distance from hyphae. **Microbiology**, v.143, p.259-266, 1997.

JENSEN, K. A.; BAO, W.; KAWAI, S.; SREBOTNIK, E.; HAMMEL, K.E Manganese-dependent cleavage of nonphenolic lignin structures by *C. subvermispora* in the absence of lignin peroxidase. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.62, p.3679-3686, 1996.

KAPICH, A.N.; PRIOR, B.A.; LUNDELL, T.; HATAKKA, A. A rapid method to quantify pro-oxidant activity in cultures of wood-decaying white-rot fungi. **J. Microbiol. Meth.**, v.51, p.261-271, 2005a.

KAPICH, A.N.; JENSEN, K.A.; HAMMEL, K.E Peroxyl radicals are potential agents of lignin biodegradation. **FEBS Letters**,v.461, p.115-119, 1999.

KEREM, Z.; JENSEN, K.A.; HAMMEL, K.E. Biodegradative mechanism of the brown-rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*: evidence for an extracellular hydroquinone driven Fenton reaction. **FEBS Letters**, v. 446, p. 49-54. 1999.

KHINDARIA, A.; GROVER, T.A.; AUST, S.D. Oxalate-dependent reductive activity of Manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Arch. Biochem. Biophys.**v.314: 301-306. 1994.

KIRK, T.K.; CULLEN, D. Enzimology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In: Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry. ed Young, R. e Akhtar, M. New York: John Wiley, 1998. p. 273-308.

KUHAD, R.C.; SINGH, A. W.; ERIKSSON, K.E.L.. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. In: **ADVANCES in Biochemical Engineering/Biotechnology** Eriksson, K.E.L. ed., 199757, p. 45-126.

LIU, J. *et al.* Assay of Aldehydes from Lipid Peroxidation: Gas Chromatography-Mass Spectrometry Compared to Thiobarbituric Acid. **Analytical Biochemistry**, v. 245, p.161-166, 1997.

LOBOS, S.; SALAS, L.; CULLEN, D.; VICUNA, R. Isoenzymes of manganese-dependent peroxidase and laccase produced by the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. **Microbiology**, v. 140, p. 2691-2698, 1994.

MARTÍNEZ, A. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 425-444, 2002.

MASAPHY, S.; HENIS, Y.; LEVANON, D. Manganese-enhanced biotransformation of atrazine by the white rot fungus *Pleurotus pulmonarius* and its correlation with oxidation activity. **Appl. Environm. Microbiol.**, v.62, p. 3587-3593. 1996.

MENDONÇA, R.; FERRAZ, A.; KORDSACHIA, O.; PATT, R.. Alkaline sulfite/anthraquinone pulping of pine wood chips biotreated with *Ceriporiopsis subvermispota*. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v.79, p.584-589, 2004.

MENDONÇA, R.; GUERRA, A.; FERRAZ, A. Delignification of *Pinus taeda* wood chips treated with *Ceriporiopsis subvermispota* for preparing high-yield kraft pulps. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v.77, p.411-418, 2002

MESSNER, K.; FACKLER, K.; LAMAIPI, P.; GINDL, W.; SREBOTNIK, E.; WATANABE, T. 2003. Overview of white-rot research: where we are today. In **Wood Deterioration and Preservation. Advances in Our Changing World** (GOODELL, B., NICHOLAS, D. AND SCHULTZ, T., Eds.), Washington: American Chemical Society, 2003. ACS Symposium Series 845, p. 73-96.

MOEN, M.A.; HAMMEL, K.E. Lipid peroxidation by the manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* is the basis for phenanthrene oxidation by the intact fungus. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, p. 1956-1961, 1994.

NEILANDS, J.B. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 26723-26726, 1995.

RAHMAWATI, N.; OHASHI, Y.; WATANABE, T.; HONDA, Y.; WATANABE, T. Ceriporic acid B, an extracellular metabolite of *Ceriporiopsis subvermispota*, suppresses the depolymerization of cellulose by the Fenton reaction. **Biomacromolecules**, v.6, p.2851-2856. 2005.

RAJAKUMAR, S.; GASKELL, J.; CULLEN, D.; LOBOS, S.; KARAHANIAN, E.; VICUNA, R. LiP-like genes in *Phanerochaete sordida* and *Ceriporiopsis subvermispota*, white-rot fungi from which lignin peroxidase has not been detected. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2660-2663, 1996.

RODRIGUEZ J.; FERRAZ A.; MELLO M.P. Role of metals in wood biodegradation. In: GOODELL B, NICHOLAS D.D., SCHULTZ T.P. editors. **Wood deterioration and preservation - advances in our changing world**. Washington, DC:American Chemical Society; 2003. p. 154-174. ACS Symp. Ser. 845.

RÜTTIMANN-JOHNSON, C. *et al.* Extracellular enzyme production and synthetic lignin mineralization by *Ceriporiopsis subvermispota*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p.1792-1797, 1993.

SETHURAMAN, A.; AKIN, D.E.; ERIKSSON, K-E.L. Plant-cell-wall-degrading enzymes produced by the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispota*. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v.27, p.37-47, 1998.

SHIMADA M.; AKAMTSU, Y.; TOKIMATSU, T.; MII, K.; HATTORI, T. Possible biochemical roles of oxalic acid as a low molecular weight compound involved in brown-rot and white-rot wood decays. **Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 103-113, 1997.

SOUTHORN, P.A.; GARTH, P. Free Radicals in Medicine.1. Chemical nature and biological reactions. **Mayo Clin Proc.**, v.63, p. 381-398, 1988.

SOUZA-CRUZ, P.B.; FREER, J.; SIIKA-AHO, M.; FERRAZ, A. Extraction and determination of enzymes produced by *Ceriporiopsis subvermispota* during biopulping of *Pinus taeda* wood chips. **Enzyme Microb. Technol.**, v.34, p.228-234, 2004.

SREBOTNIK, E.; BOISSON, J.N. Peroxidation of linoleic acid during the oxidation of phenols by fungal laccase. **Enzyme Microb. Technol.**, v.36,p.785-789. 2005.

SREBOTNIK, E., JENSEN, K., KAWAI, S. E HAMMEL, K. Evidence that *Ceriporiopsis subvermispota* degrades nonphenolic lignin structure by a one-electron-oxidation mechanism. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.63,p.4435-4440. 1997.

SREBOTNIK, E.; MESSNER, K.; FOISNER, R. Penetrability of white-rot degraded pine wood by the lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 2608–2614, 1988.

STOOKEY, L.L. Ferrozine – a new spectrophotometric reagent for iron. **Anal. Chem**, v.42, p 779–781, 1970.

WATANABE, T.; TERANISHI, H.; HONDA, Y.; KUWAHARA, M. A selective lignin-degrading fungus, *Ceriporiopsis subvermispota*, produces alkylitaconates that inhibit the production of a cellulolytic active oxygen species, hydroxyl radical in the presence of iron and H₂O₂. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v.297, p.918-923, 2002.

WATANABE, T.; SHIRAI, N.; OKADA, H.; HONDA, Y.; KUWAHARA, M. Production and chemiluminescent free radical reactions of glyoxal in lipid peroxidation of linoleic acid by the ligninolytic enzyme, manganese peroxidase. **European J. Biochem.**, v.268, p.6114-6122, 2001.

WATANABE, T.; KATAYAMA, S.; ENOKI, M.; HONDA, Y.; KUWAHARA, M. Formation of acyl radical in lipid peroxidation of linolenic acid by manganese-dependent peroxidase from *Ceriporiopsis subvermispota* and *Bjerkandera adusta*. **Eur. J. Biochem.**, v.267, p.422-431, 2000.

ANEXO

Cromatogramas e espectros de massa dos Padrões (Ácido Oxálico, Glicerol, Vanilina, Ácido Palmítico, Ácido Oleico, Ácido Esteárico, Ácido Gálico, Ácido Vanílico e Ácido Siríngico) e dos extratos aquosos controle e biotratados por 7, 14 e 28 dias.

RT: 7.47 - 8.52

NL:
4.97E7
TIC MS
pad ox
palm
estear

Cromatograma Padrão de Ácido Oxálico

RT: 27.83 - 32.21

NL:
3.88E7
TIC MS
pad ox
palm
estear

Cromatograma dos Padrões de Ácido Palmítico e Ácido Estéarico

pad ox palm estear #302 RT: 7.88 AV: 1 NL: 2.01E7
T: + c Full ms [35.00-600.00]

Espectro do Padrão de Ácido Oxálico

pad ox palm estear #2386 RT: 28.18 AV: 1 NL: 7.92E6
T: + c Full ms [35.00-600.00]

Espectro do Padrão de Ácido Palmítico

pad ox palm estear #2746 RT: 31.73 AV: 1 NL: 1.51E6
T: + c Full ms [35.00-600.00]

Espectro do Padrão de Ácido Estearico

RT: 25.54 - 28.12

Cromatograma do Padrão de Ácido Gálico

RT: 28.83 - 33.35

Cromatograma do Padrão de Ácido Oleico

pad galico oleico #2229 RT: 26.85 AV: 1 NL: 3.54E7
T: + c Full ms [35.00-600.00]

Espectro do Padrão de Ácido Gálico

pad galico oleico #2678 RT: 31.30 AV: 1 NL: 5.71E5
T: + c Full ms [35.00-600.00]

Espectro do Padrão de Ácido Oleico

RT: 10.34 - 12.06

Cromatograma do Padrão de Glicerol

padglicerol #639 RT: 11.19 AV: 1 NL: 3.21E7
T: + c Full ms [35.00-600.00]

Espectro do Padrão de Glicerol

RT: 17.21 - 18.70

NL:
9.29E7
TIC MS
pad2silil

Cromatograma do Padrão de Vanilina

pad2silii #1320 RT: 17.72 AV: 1 NL: 1.83E7
T: + c Full ms [35.00-600.00]

Espectro do Padrão de Vanilina

RT: 22.67 - 25.97

RT: 22.87
MA: 374350302

Cromatograma dos Padrões de Ácido Vanílico e Ácido Siríngico

padasilil #1860 RT: 22.87 AV: 1 NL: 1.30E7
T: + c Full ms [35.00-600.00]

Espectro do Padrão de Ácido Vanílico

padasilil #2150 RT: 25.70 AV: 1 NL: 8.40E6
T: + c Full ms [35.00-600.00]

Espectro do Padrão de Ácido Siríngico

RT: 7.68 - 32.23

Cromatograma da amostra biotratada por 28 dias e sililada. Os picos identificados correspondem aos seguintes compostos sililados : A- ácido oxálico; B-Glicerol; C-Vanilina; D-Ácido Sirínico; E- Ácido Palmítico; F-Ácido Oleico; G-Ácido Esteárico.

am28dnewsilil #307 RT: 7.95 AV: 1 NL: 6.94E5
T: + c Full ms [35.00-600.00]

Espectro ácido oxálico da amostra biotratada por 28 dias e sililada

am28dnewsili #654 RT: 11.28 AV: 1 NL: 1.40E6
T: + c Full ms [35.00-600.00]

Espectro glicerol da amostra biotratada por 28 dias e sililada

am28dnewsili #1309 RT: 17.68 AV: 1 NL: 1.73E5
T: + c Full ms [35.00-600.00]

Espectro vanilina da amostra biotratada de 28 dias e sililada

am28dnewsiii #2381 RT: 28.25 AV: 1 NL: 1.64E6
T: + c Full ms [35.00-600.00]

Espectro Ácido Palmítico da amostra biotratada por 28 dias e sililada

am28dnewsiii #2696 RT: 31.39 AV: 1 NL: 1.06E5
T: + c Full ms [35.00-600.00]

Espectro Ácido Oleico da amostra biotratada por 28 dias e sililada

am28dnewsilil #2740 RT: 31.83 AV: 1 NL: 6.51E5
T: + c Full ms [35.00-600.00]

Espectro Ácido Esteárico da amostra biotratada por 28 dias e sililada

am28dnewsilil #1833 RT: 22.84 AV: 1 NL: 7.56E4
T: + c Full ms [35.00-600.00]

Espectro Ácido Vanílico da amostra biotratada por 28 dias e sililada

am28dnewsilil #2119 RT: 25.66 AV: 1 NL: 6.01E4
T: + c Full ms [35.00-600.00]

Espectro Ácido Siríngico da amostra biotratada por 28 dias e sililada

RT: 7.78 - 32.63

Cromatograma da amostra biotratada por 14 dias e sililada Os picos identificados correspondem aos seguintes compostos sililados : A- Ácido oxálico; B- Glicerol; C- Vanilina; D- Ácido Palmítico; E- Ácido Oleico; F- Ácido Esteárico.

am14dnewsill #307 RT: 7.96 AV: 1 NL: 6.64E5
T: + c Full ms [35.00-600.00]

Espectro Ácido Oxálico da amostra biotratada por 14 dias e sililada

am14dnewsill #647 RT: 11.29 AV: 1 NL: 6.12E6
T: + c Full ms [35.00-600.00]

Espectro Glicerol da amostra biotratada por 14 dias e sililada

am14dnewsil#1297 RT: 17.70 AV: 1 NL: 5.38E5
T: + c Full ms [35.00-600.00]

Espectro Vanilina da amostra biotratada por 14 dias e silada

am14dnewsil#2395 RT: 28.27 AV: 1 NL: 1.24E6
T: + c Full ms [35.00-600.00]

Espectro Ácido Palmítico da amostra biotratada por 14 dias e silada

am14dnewsilli #2712 RT: 31.38 Av: 1 NL: 9.37E4
T: + c Full ms [35.00-600.00]

Espectro Ácido Oleico da amostra biotratada por 14 dias e sililada

am14dnewsilli #2757 RT: 31.82 Av: 1 NL: 3.53E5
T: + c Full ms [35.00-600.00]

Espectro Ácido Esteárico da amostra biotratada por 14 dias e sililada

RT: 7.18 - 11.86

NL:
1.16E7
TIC MS
am7dhews
illrep

RT: 27.36 - 32.15

NL:
9.74E6
TIC MS
am7dhews
illrep

Cromatograma da amostra biotratada por 7 dias e sililada. Os picos identificados correspondem aos seguintes compostos sililados : A- Ácido oxálico; B-Glicerol; C-Ácido Palmítico; D-Ácido Esteárico.

am7dnewsilrep #306 RT: 7.95 AV: 1 NL: 270E5
T: +c Full ms [35.00-600.00]

Espectro Ácido Oxálico da amostra biotratada por 7 dias e sililada

am7dnewsilrep #651 RT: 11.28 AV: 1 NL: 180E5
T: +c Full ms [35.00-600.00]

Espectro Glicerol da amostra biotratada por 7 dias e sililada

am7dnewsilrep #1311 RT: 17.72 AV: 1 NL: 6.67E4
T: + c Full ms [35.00-600.00]

Espectro Vanilina da amostra biotratada por 7 dias e sililada

am7dnewsilrep #2400 RT: 28.23 AV: 1 NL: 9.87E5
T: + c Full ms [35.00-600.00]

Espectro Ácido Palmítico da amostra biotratada por 7 dias e sililada

am7dhewsiitrep #2719 RT: 31.35 AV: 1 NL: 8.64E4
T: +cFullms [35.00-600.00]

Espectro Ácido Oleico da amostra biotratada por 7 dias e sililada

am7dhewsiitrep #2765 RT: 31.81 AV: 1 NL: 1.30E5
T: +cFullms [35.00-600.00]

Espectro Ácido Esteárico da amostra biotratada por 7 dias e sililada

RT: 7.13 - 11.93

RT: 17.15 - 32.29

Cromatogramas da amostra controle. Os picos identificados correspondem aos seguintes compostos sililados: A-Glicerol; B- Ácido Gálico; C-Ácido Palmítico; D-Ácido Estearico.

amctrlnewsill #303 RT: 7.90 AV: 1 NL: 3.73E5
T: + c Full ms [35.00-600.00]

Espectro Ácido Oxálico da amostra controle sililada

amctrlnewsill #657 RT: 11.30 AV: 1 NL: 2.53E7
T: + c Full ms [35.00-600.00]

Espectro Glicerol da amostra controle sililada

amctrlnwslili #1304 RT: 17.61 AV: 1 NL: 8.64E4
T: + c Full ms [35.00-600.00]

Espectro Vanilina da amostra controle sililada

amctrlnwslili #2392 RT: 28.23 AV: 1 NL: 2.15E5
T: + c Full ms [35.00-600.00]

Espectro Ácido Palmítico da amostra controle sililada

amctrhnewsil #2754 RT: 31.80 AV: 1 NL: 1.04E5
T: + c Full ms [35.00-600.00]

Espectro Ácido Estearico da amostra controle sililada

amctrhnewsil #2258 RT: 26.91 AV: 1 NL: 1.44E6
T: + c Full ms [35.00-600.00]

Espectro Ácido Gálico da amostra controle sililada