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

GINA GABRIELA SEABRA CUNHA

**Atividade peroxidativa de extratos enzimáticos obtidos a partir de
cultivos de *Ceriporiopsis subvermispora* e sua relação com a
degradação de lignina**

**LORENA
2008**

GINA GABRIELA SEABRA CUNHA

**Atividade peroxidativa de extratos enzimáticos obtidos a partir de
cultivos de *Ceriporiopsis subvermispota* e sua relação com a
degradação de lignina**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia
de Lorena da Universidade de São Paulo para
obtenção de título de mestre em Biotecnologia
Industrial

Área de concentração: Conversão de Biomassa
Orientador: Dr. André Luis Ferraz

**LORENA
2008**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, 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

Cunha, Gina Gabriela Seabra

Atividade peroxidativa de extratos enzimáticos obtidos a partir de cultivos de *Ceriporiopsis subvermispota* e sua relação com a degradação de lignina / Gina Gabriela Seabra Cunha ; orientador André Luis Ferraz. -- 2008

66 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. Peroxidação lipídica 2. *Ceriporiopsis subvermispota* 3. Manganês Peroxidase 4. Enzimas. I. Título.

577.15 - CDU

Aos meus pais, Gino e Angélica, e meus
irmãos Feliciano e Bruna, pelo amor e
incentivo constante

AGRADECIMENTOS

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

Aos amigos do laboratório de Ciências da madeira da EEL/USP pelo companheirismo, ensinamentos e bons momentos de descontração.

Aos técnicos do laboratório “Zé Gambira” e “Zé Cobrinha” pela amizade e assistência técnica.

Às grandes e inesquecíveis amizades conquistadas durante todo este tempo.

Aos amigos especiais Sandra e Eduardo pela companhia, apoio e incentivo.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Biotecnologia.

À CAPES pela bolsa e auxílio financeiro concedido.

RESUMO

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

Os fungos de decomposição branca são organismos capazes de degradar os materiais lignocelulósicos de maneira eficiente através de reações catalisadas por enzimas hidrolíticas e oxidativas ou ainda por meio de metabólitos de baixa massa molar que iniciam o processo degradativo. *Ceriporiopsis subvermispora* é um fungo de decomposição branca que se destaca como um dos mais seletivos na degradação da lignina, possuindo grande potencial de aplicação tecnológica. Este fungo é capaz de iniciar reações de peroxidação de lipídeos a partir da formação de íons Mn^{3+} oriundos da ação da enzima manganês peroxidase (MnP) sobre Mn^{2+} . No presente estudo avaliou-se a secreção de enzimas oxidativas por *C. subvermispora* agindo sobre madeira de *Eucalyptus grandis* em cultivos suplementados ou não com milhocina e milhocina e glicose. Os extratos enzimáticos obtidos a partir desses cultivos apresentaram elevada atividade de MnP, principalmente quando o meio foi suplementado com milhocina. Os mesmos extratos foram capazes de peroxidar ácido linoleico *in vitro*. Nessas reações ocorreu um acúmulo de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS) que foi proporcional ao nível de MnP existente nos extratos. A taxa de consumo de oxigênio nessas reações também foi proporcional aos teores de MnP presente nos extratos. A caracterização da madeira biotratada indicou que as maiores perdas de massa e de lignina ocorreram nos cultivos suplementados, sendo que aparentemente há uma correlação entre a extensão da degradação de madeira e lignina com a atividade peroxidativa dos extratos. Lacases foram detectadas somente em baixos níveis nos extratos enzimáticos oriundos da madeira. Por outro lado, cultivos em meio líquido composto de 2% de extrato de malte e 0,2% de extrato de levedura induziram a produção de lacases e nenhuma secreção de MnP. Também as lacases foram capazes de peroxidar ácido linoleico, desde que na presença de um mediador, o ácido p-hidróxi-benzóico. De qualquer forma, durante a biodegradação de *E. grandis* por *C. subvermispora*, lacase foi detectada somente no início dos cultivos e mesmo assim em níveis bastante baixos o que significa que a participação de lacase na peroxidação de lipídeos durante a biodegradação de *E. grandis* por *C. subvermispora* deve ser pouco significativa.

PALAVRAS-CHAVE: *Ceriporiopsis subvermispora*. Manganês Peroxidase. Peroxidação de lipídeos.

ABSTRACT

CUNHA, G.G.S. **Peroxidative activity of enzymatic extracts from *Ceriporiopsis subvermispora* and its correlation with lignin degradation**. 2008. 66 f. Dissertation (Master of Science in Industrial Biotechnology) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2008.

The white-rot fungi are able to degrade lignocellulosic materials in an efficient way through reactions catalyzed by hydrolytic and oxidative enzymes or still by means of low molar mass metabolites that begin the degradative process. *Ceriporiopsis subvermispora* is a white-rot fungus that stands out as one of the most selective in lignin degradation, possessing great potential for technological applications. This fungus is able to initiate lipid peroxidation reactions based on the Mn^{3+} produced by the catalytic action of the enzyme manganese peroxidase (MnP) on Mn^{2+} ions. In the present study, the secretion of oxidative enzymes by *C. subvermispora* was evaluated in cultures containing *Eucalyptus grandis* wood chips and some supplements such as corn steep liquor and corn steep liquor plus glucose. The enzymatic extracts obtained from these cultures contained high MnP activity, mainly when corn steep liquor was used as a culture supplement. The same extracts were able to peroxidize linoleic acid *in vitro*. In these reactions, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) accumulated over reaction time and the TBARS levels were proportional to the MnP present in the extracts. The rate of oxygen consumption in these reactions was also proportional to the level of MnP present in the extracts. The characterization of the biotreated wood indicated that the largest lignin and wood mass losses were observed in supplemented cultures, with an apparent correlation between the peroxidative activity in the extracts and the extension of the wood and lignin degradation. Laccase was detected only in low levels in the enzymatic extracts originating from the wood-containing cultures. On the other hand, submerged cultures in which the liquid medium was composed of 2% malt-extract and 0,2% yeast extract induced laccase production without simultaneous secretion of MnP. The laccase active extract was also able to peroxidize linoleic acid, since in the presence of a mediator (p-hydroxy-benzoic acid). Anyway, during *E. grandis* biodegradation by *C. subvermispora*, laccase was only detected in the beginning of the cultivations and even so at low levels suggesting that laccase were not involved in lipid peroxidation during the *E. grandis* wood biodegradation by *C. subvermispora*.

KEY WORDS: *Ceriporiopsis subvermispora*. Manganese Peroxidase. Lipid peroxidation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura-modelo da lignina proposta por Adler.....	13
Figura 2: Sistema de camadas na parede das células de madeira.....	14
Figura 3: Ciclo catalítico simplificado de peroxidase dependente de Manganês (MnP)	18
Figura 4: Ciclo catalítico de lacase.....	18
Figura 5: Peroxidação de lipídeos insaturados iniciada por Mn^{3+} ou radical hidroxila.....	21
Figura 6: Degradação de um composto modelo de lignina (não fenólico) pelo sistema MnP, ácido linoleico e H_2O_2	24
Figura 7: Produção de lacases por <i>C. subvermispora</i> durante a biodegradação de <i>E.</i> <i>grandis</i>	44
Figura 8: Produção de MnP por <i>C. subvermispora</i> durante a biodegradação de <i>E. grandis</i> ..	45
Figura 9: Consumo de O_2 em reações de peroxidação de lipídeos catalisadas por extratos enzimáticos obtidos de <i>E. grandis</i> biotratado por <i>C. subvermispora</i>	46
Figura 10: Relação entre os níveis de MnP em extratos de cultivos de <i>C. subvermispora</i> sobre <i>E. grandis</i> e as taxas de consumo de O_2 em reações de peroxidação de ácido linoleico catalisadas por esses mesmos extratos.....	48
Figura 11: TBARS acumulados após 1 h de reação catalisada por extratos obtidos de cultivos de <i>C. subvermispora</i> sobre <i>E. grandis</i>	49
Figura 12: Relação entre o consumo de oxigênio e o acúmulo de TBARS em reações de peroxidação de ácido linoleico catalisadas por extratos de cultivos de <i>C.</i> <i>subvermispora</i> sobre <i>E. grandis</i>	50
Figura 13: Quantidade residual de ácido linoleico e hexanal formado em função do tempo de reação de ácido linoleico com um extrato contendo elevada atividade de MnP	52
Figura 14: Concentração de TBARS na madeira e variação de pH dos cultivos de <i>C.</i> <i>subvermispora</i> sobre <i>E. grandis</i>	53
Figura 15: Perfil metabólico de <i>C. subvermispora</i> ao longo de 14 dias de cultivo em meio líquido composto de 2% de extrato de malte e 0,2% de extrato de levedura	55
Figura 16: Consumo de O_2 em reações de peroxidação de lipídeos catalisadas por extratos enzimáticos com alta atividade de lacase obtidos em cultivos líquidos de <i>E.</i> <i>grandis</i> biotratado por <i>C. subvermispora</i>	57
Figura 17: Relação entre o consumo de oxigênio e o tempo de biodegradação em cultivos líquidos de <i>C. subvermispora</i> em meio líquido composto de extrato de malte (2,4%) e extrato de levedura (0,7%).....	57
Figura 18: Relação entre os níveis de Lacase em filtrados de cultivos de <i>C.</i> <i>subvermispora</i> em meio líquido e as taxas de consumo de O_2 em reações de peroxidação de ácido linoleico.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições de cultivo de <i>C. subvermispora</i> SS-3 sobre madeira <i>E. grandis</i> utilizando um sistema de fermentação em meio sólido.....	32
Tabela 2: Perda de massa e componentes da madeira <i>E. grandis</i> biotratado por 28 dias com <i>C. subvermispora</i> em diferentes condições de cultivo	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ULTRA-ESTRUTURA DA MADEIRA.....	12
2.2 ASPECTOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS DA BIODEGRADAÇÃO DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	14
2.2.1 Modo de ação das enzimas hidrolíticas e oxidativas	16
2.2.2 Peroxidação de lipídeos por enzimas oxidativas e sua participação na degradação de lignina	20
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE A REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
4 OBJETIVOS	28
5 METODOLOGIA	29
5.1 FUNGO	29
5.2 MADEIRA UTILIZADA.....	29
5.3 PREPARAÇÃO DO INÓCULO FÚNGICO	30
5.4 EXPERIMENTOS DE BIODEGRADAÇÃO.....	30
5.4.1 Extração da madeira biotratada com solução tampão suplementada com Tween 60 para recuperação de enzimas.....	32
5.4.1.1 Manganês-Peroxidase (MnP)	33
5.4.1.2 Lacases	33
5.4.2 Reações de peroxidação de ácido linoleico iniciadas pelos extratos enzimáticos ...	34
5.4.2.1 Determinação do consumo de oxigênio	34
5.4.2.2 Determinação do acúmulo de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	34
5.4.3 Análise dos produtos de peroxidação de ácido linoleico por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS)	35
5.4.3.1 Obtenção de um cultivo com extratos de alta atividade enzimática de MnP	35
5.4.3.2 Detecção de intermediários provenientes da peroxidação de lipídeos.....	35
5.4.3.3 Quantificação de ácido linoleico residual no meio reacional.....	36
5.4.4 Extração da madeira biotratada com água para determinação de pH e TBARS na madeira residual	37
5.5 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS AMOSTRAS DE MADEIRA BIODEGRADADA	38
5.6 DETERMINAÇÃO DA PERDA DE MASSA E COMPONENTES.....	39

5.7 CULTIVOS EM MEIO LÍQUIDO	40
5.7.1 Determinação da peroxidação de ácido linoleico por lacases	40
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
6.1 ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO DA MADEIRA DE <i>EUCALYPTUS GRANDIS</i>	41
6.1.1 Crescimento do fungo e perdas de massa e componentes da madeira	41
6.1.2 Produção de enzimas oxidativas ao longo de 28 dias de biodegradação	43
6.2 PEROXIDAÇÃO DE LIPÍDEOS INDUZIDA POR EXTRATOS ENZIMÁTICOS.....	45
6.2.1 Análise dos produtos de peroxidação de ácido linoleico por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas	51
6.2.2 Concentração de TBARS na madeira e variação de pH dos cultivos de <i>C.</i> <i>subvermispora</i> sobre <i>E. grandis</i>	52
6.2.3 Participação de lacases na peroxidação de lipídeos	54
7 CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS.....	62

1 INTRODUÇÃO

O estudo da biodegradação de madeira se justifica com base na importância tanto acadêmica quanto tecnológica do tema. A biodegradação de madeira (e dos lignocelulósicos em geral) constitui um dos mais importantes ciclos do carbono na natureza e o entendimento desse processo, por si, representa uma 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 tem sido denominada de polpação biomecânica e a aplicação desse bioprocessos 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, WI, 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 conhece 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 ser um fungo 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. O estudo dessa reação iniciada por extratos enzimáticos obtidos de cultivos de *C. subvermispora* é

essencialmente a base desta dissertação, onde as atividades pró-oxidantes desses extratos foram determinadas a partir de reações com o ácido linoleico. 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 eventualmente 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 dos aspectos químicos e bioquímicos envolvidos no processo biodegradativo, apresentando uma importância acadêmica e tecnológica. Com o objetivo de revisar a vasta literatura envolvida nesses tópicos, apresentamos a seguir algumas informações básicas sobre a 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 enzimas oxidativas, 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 cinâmílicos 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 ASPECTOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS DA BIODEGRADAÇÃO DOS 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, que 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. Os ascomicetos e fungos mitospóricos normalmente são classificados como fungos de decomposição branda (soft-rot fungi), pois podem degradar lignina e polissacarídeos, porém em velocidades muito baixas (HIGUCHI, 1985; FENGEL; WEGENER, 1989; RODRÍGUEZ *et al.*, 1997; KIRK; CULLEN, 1998; FERRAZ; DURÁN, 1995).

O início da 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 por meio da penetração das hifas fúngicas na célula vegetal através do lúmen, onde secretam uma grande diversidade de metabólitos extracelulares que, então, atuam degradando os componentes lignocelulósicos. A degradação da célula vegetal por fungos ocorre de duas maneiras distintas. A primeira envolve uma “escamação” progressiva da parede no sentido lúmen-lamela média, diminuindo a espessura da parede celular de forma irregular. A outra maneira envolve a remoção de lignina e polioses sem simultânea erosão da parede celular vegetal, e tem sido observada em fungos seletivos para a degradação da lignina (FERRAZ, 2004).

Entre os fungos mais seletivos para a degradação da lignina destaca-se o *Ceriporiopsis subvermispora*. Esta espécie causa alterações estruturais significativas na lignina presente na parede celular e na lamela média, mesmo antes do início da penetração de enzimas extracelulares nessa parede celular (BLANCHETTE *et al.*, 1997). A degradação da lignina nestas regiões deve ocorrer pela atuação de compostos de baixa massa molar produzidos pelo fungo. Esses compostos agem como mediadores das enzimas e seriam 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 hidroperóxidos e radicais peroxilas (KAPICH; JENSEN; HAMMEL, 1999; ENOKI *et al.*, 1999; HAMMEL *et al.*, 2002; AGUIAR; SOUZA-CRUZ; FERRAZ, 2006).

2.2.1 Modo de ação das enzimas hidrolíticas e oxidativas

Os mecanismos que explicam a degradação dos componentes dos materiais lignocelulósicos estão baseados modo de ação das enzimas extracelulares e dos metabólitos de baixa massa molar, como mencionado anteriormente.

A biodegradação da celulose ocorre pela ação de celulasas que atuam sinergicamente, causando a hidrólise completa do polímero. As enzimas envolvidas são representadas por:

Endo-1,4- β -glicanases: são capazes de romper a molécula de celulose ao acaso e liberar fragmentos menores que servem de substrato para as exo-glucanases;

Exo-1,4- β -glicanases: hidrolisam os fragmentos de menor massa molar pelas extremidades gerando dímeros de glicose (celobiose);

1,4- β -glicosidades: este último grupo de enzimas é responsável por hidrolisar a celobiose até glicose (ERIKSSON; BLANCHETTE; ANDER, 1990; KUHAD; SINGH; ERIKSSON, 1997).

A biodegradação das polioses ocorre de forma semelhante à da celulose, porém envolve uma diversidade maior de enzimas devido à ocorrência de diferentes monômeros e também de ramificações no polímero. Dessa forma, a degradação das polioses envolve a ação

de xilanases, mananases, acetil-estearases e de diversas outras enzimas específicas para clivar ligações entre as ramificações e a cadeia principal do polímero (KUHAD; SINGH; ERIKSSON, 1997).

Na biodegradação da lignina diversas enzimas estão envolvidas. Elas podem ser agrupadas em fenoloxidasas e enzimas que produzem peróxido de hidrogênio. As fenoloxidasas são enzimas que pertencem às metaloproteínas, e podem ser divididas em dois subgrupos. Um grupo contém as enzimas dependentes de peróxido ou peroxidases, que incluem a lignina peroxidase (LiP) e a peroxidase dependente de manganês (MnP). O outro subgrupo contém as lacases que são cuproproteínas e não dependem de peróxido para atuar. Existem ainda enzimas que não podem ser classificadas exatamente em nenhum desses dois grupos como as peroxidases versáteis e a celobiose desidrogenase. Todas estas enzimas são comumente produzidas por fungos de decomposição branca. Entretanto, existem espécies fúngicas que são eficientes degradadores de lignina que produzem somente um ou outro subgrupo dessas enzimas (FERRAZ, 2004).

A atuação destas enzimas sobre a lignina ocasiona reações de oxidação que, de forma progressiva, decompõem esta macromolécula em compostos de baixa massa molar. Estes compostos vão se acumulando no meio reacional e se tornam susceptíveis ao metabolismo intracelular dos fungos (FERRAZ, 2004).

As LiPs são heme-proteínas que apresentam potencial de oxidação suficientemente elevado para abstrair elétrons de estruturas aromáticas não fenólicas, dando origem a radicais cátions. As MnPs também são heme-proteínas, porém, são enzimas dependentes de Mn^{2+} e apresentam potencial de oxidação suficiente somente para abstrair elétrons de estruturas fenólicas. O ciclo catalítico desta enzima é mostrado na figura 3. Primeiramente, a MnP é ativada pela oxidação por H_2O_2 , levando à formação do composto I (C_1). A redução de C_1 a C_0 ocorre em duas etapas. Na primeira etapa, o composto I pode ser reduzido a composto II à

custa da oxidação de uma estrutura fenólica ou de Mn^{2+} . Na segunda etapa, o composto II é reduzido ao seu estado nativo (C_0), exclusivamente à custa de um elétron proveniente de um íon Mn^{2+} . Por outro lado, o Mn^{3+} formado é bastante reativo e normalmente é estabilizado por quelantes produzidos pelo próprio fungo, como o ácido oxálico. O complexo Mn^{3+} -oxalato, por sua vez, pode ser reduzido à custa da oxidação de outra estrutura fenólica (FERRAZ, 2004).

Figura 3: Ciclo catalítico simplificado de peroxidase dependente de Manganês (MnP). PhOH representa um substrato fenólico. Ver texto para detalhes sobre o ciclo.

Fonte: Ferraz, (2004).

As lacases atuam diretamente sobre as estruturas fenólicas através da oxidação dos fenóis pela abstração de um elétron mediada pela redução de Cu^{2+} a Cu^{1+} , que, por sua vez, reduz O_2 a H_2O , permitindo que a enzima atue de forma cíclica (Figura 4) (FERRAZ, 2004).

Figura 4: Ciclo catalítico de lacase. PhOH representa um substrato fenólico. A estequiometria do ciclo envolve 4 Cu^{2+} (normalmente ligados a uma única proteína ou a duas cadeias proteicas acopladas), quatro substratos fenólicos, quatro prótons e uma molécula de O_2 .

Fonte: Ferraz, (2004).

As enzimas que produzem peróxido de hidrogênio são acessórias às peroxidases. As principais enzimas produtoras de peróxido envolvidas na biodegradação de lignina incluem a glicose oxidase e a metanol oxidase que são intracelulares (KIRK; CULLEN, 1998; KUHAD; SINGH; ERIKSSON, 1997), além da glioxal oxidase (KERSTEN; KIRK, 1987), a aril-álcool oxidase e a própria MnP que são extracelulares (ANDER; MARZULLO, 1997; DE JONG; FIELD; DE BOND, 1994; FERRAZ, 2004).

No caso específico do fungo em estudo nessa dissertação, *C. subvermispora*, o sistema enzimático extracelular tem sido estudado em detalhes ao longo dos últimos 15 anos. Sabe-se, por exemplo, que existem diferenças significativas quanto à secreção de enzimas em cultivos em meios sólidos ou líquidos (MACHUCA; FERRAZ, 2001; VICUÑA *et al.*, 1996; URZÚA *et al.*, 1995; AGUIAR; SOUZA-CRUZ; FERRAZ, 2006; VICENTIM, 2007). Sabe-se também que entre as enzimas oxidativas, essa espécie produz lacases e MnPs. A produção de LiP não têm sido detectada em cultivos desse fungo mesmo em diversos meios e formas de cultivo (LOBOS *et al.*, 1994). Um fato importante a ser considerado é a não detecção de lacase em quantidades significativas quando o único substrato orgânico é o próprio composto lignocelulósico (FERRAZ *et al.*, 2002; SOUZA-CRUZ, 2002). Desta forma, a degradação da lignina por este fungo seria atribuída principalmente à ação de MnP. Entre as enzimas hidrolíticas, esse fungo produz um complexo celulolítico pobre em exo-celulases (SETHURAMAN; AKIN; ERIKSSON, 1998; SOUZA-CRUZ *et al.*, 2004; MILAGRES *et al.*, 2006) e quantidades expressivas de xilanases (LEAL, 1999; MILAGRES; MAGALHÃES; FERRAZ, 2005).

Com relação à degradação de lignina, uma série de trabalhos (JENSEN *et al.*, 1996; SREBOTNIK *et al.* 1997; KAPICH; JENSEN; HAMMEL, 1999) demonstrou que a degradação da macromolécula por *C. subvermispora* estaria relacionada com a peroxidação de lipídeos iniciada por Mn^{3+} oriundo da ação de MnP. Esta hipótese explicaria a degradação

de lignina no interior da parede celular da madeira através de um processo não erosivo, uma vez que está baseado na ação de um mediador de baixa massa molar (item 2.2.2).

2.2.2 Peroxidação de lipídeos por enzimas oxidativas e sua participação na degradação de lignina

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; GARTH, 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 OH ($\text{HO}^\bullet$), o radical superóxi-ânion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e o radical hidroperoxila ($\text{HOO}^\bullet$), que resulta da protonação do radical superóxi-ânion em pHs baixos (pKa 4,7). 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 5). 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; GARTH, 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 (MASAPHY; HENIS; LEVANON, 1996; LIU *et al.*, 1997; 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; HENIS; LEVANON, 1996).

Figura 5. Peroxidação de lipídeos insaturados iniciada por Mn^{3+} ou radical hidroxila (Reproduzido com modificações).

Fonte: Soutohorn e Garth, (1988).

As reações de peroxidação de lipídeos induzidas por enzimas ligninolíticas foram estudadas inicialmente em experimentos que buscavam explicar a degradação de compostos xenobióticos (compostos recalcitrantes de origem normalmente sintética). Vários compostos recalcitrantes podem ser decompostos em um meio reacional que contenha $MnP/Mn^{2+}/H_2O_2$ e ácido linoleico emulsionado em algum surfactante como o Tween 20 (mistura de ácidos graxos saturados) ou n-duodecil-maltosídeo (MOEN; HAMMEL, 1994; BOGAN; LAMAR; HAMMEL, 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 Mn^{3+} , 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 sequestradores de radicais livres como o butil-hidroxi-tolueno (BOGAN; LAMAR; HAMMEL, 1996).

Em uma série de trabalhos esclarecedores, o grupo de Hammel (JENSSEN *et al.*, 1996; SREBOTNIK *et al.*, 1997; KAPICH; JENSEN; HAMMEL, 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 elevado potencial de oxidação. Isso foi demonstrado pela determinação dos produtos de degradação de um composto modelo de lignina, marcado com ^{14}C , ligado a uma cadeia polimérica de polietilenoglicol (PEG).

Uma hipótese para explicar a abstração de elétrons de estruturas não fenólicas em um fungo LiP-deficiente estaria relacionada com a peroxidação de lipídeos iniciada por Mn^{3+} oriundo da ação de MnP. Enoki *et al.*, (1999; 2000) demonstraram que *C. subvermispora* produz vários ácidos graxos (ácidos linoleico, oleico, valérico, palmítico e esteárico) quando cultivado em meio sólido contendo madeira moída pré-extraída para a remoção da fração lipídica. 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 Mn^{3+} (oriundo da oxidação de Mn^{2+} 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 pesquisas 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 ; FERRAZ, 2006).

Kapich, Jensen e Hammel (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 6).

Figura 6. 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 .

Fonte: Kapich, Jensen e Hammel, (1999).

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.

Srebotnik e Boisson (2005) demonstraram recentemente e de forma inequívoca 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.

Em um trabalho recente, Kapich *et al.*, (2005) 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, promovendo o consumo de O_2 nas reações. 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.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE A REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O conjunto de trabalhos apresentados e discutidos anteriormente indica que a enzima MnP apresenta um papel fundamental na degradação de lignina por vários fungos de decomposição branca, principalmente *C. subvermispora*. A ação dessa enzima sobre ácidos graxos di-insaturados acarreta a formação de radicais peroxila e acila que atuam como iniciadores de reações de degradação de lignina e outros compostos recalcitrantes, agindo assim como "mediadores" do processo degradativo. 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*. Numa revisão recente sobre a relevância de espécies ativas de oxigênio durante a biodegradação de madeira, Hammel *et al.*, 2002 enfatizaram que mais esforços devem ser direcionados ao entendimento da função dessas espécies dentro de todo o processo de biodegradação de madeira, principalmente nos casos de fungos que degradam lignina seletivamente e com isso devem apresentar sistemas supressores da ação de espécies de oxidação indistinta dos componentes da madeira como os radicais hidroxila. 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 de lignina nos sistemas *in vivo* onde eventualmente não existam sistemas "surfactantes" aumentando a disponibilidade do ácido graxo para as reações de peroxidação. Nesse sentido, o trabalho do grupo de Watanabe é chave (WATANABE *et al.*, 2001), pois foi demonstrado que a degradação do ácido linoleico por MnP/Mn²⁺/H₂O₂ gera quantidades apreciáveis de glioxal (mais solúvel em água) que posteriormente é degradado pela abstração de 1 elétron da função aldeído, gerando novos radicais acila que podem propagar tanto a peroxidação do lipídeo, como a eventual degradação de lignina. Neste contexto, a abordagem inédita prevista nesse

projeto visa colaborar com o entendimento da degradação de lignina baseada em reações de peroxidação de lipídeos em um sistema *in vivo* e tentativamente determinar quão importante é essa via degradativa dentro de um processo global de biodegradação da madeira. Nos experimentos realizados no presente trabalho, buscamos verificar se níveis diferenciados de atividade enzimática oxidativa presente em cultivos de *C. subvermispora* também acarretam em atividade peroxidativa variável.

4 OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi avaliar a peroxidação de ácido linoleico iniciada por enzimas oxidativas produzidas por *C. subvermispora*. Para atingir esse objetivo foram executadas as seguintes etapas:

- Cultivo de *C. subvermispora* sobre madeira de *Eucalyptus grandis* ou em meio líquido em condições previamente determinadas como indutoras ou repressoras da secreção de MnP e lacase;
- Avaliação da atividade de enzimas oxidativas nos extratos obtidos a partir dos cultivos anteriores;
- Determinação da atividade peroxidativa dos extratos enzimáticos frente ao ácido linoleico;
- Determinação dos produtos da degradação do ácido linoleico em uma reação de peroxidação iniciada pela enzima Manganês peroxidase;
- Determinação da perda de massa total e de componentes químicos da madeira causada em função da biodegradação nas diferentes condições de cultivo;

5 METODOLOGIA

5.1 FUNGO

O fungo em estudo é o basidiomiceto causador de decomposição branca *Ceriporiopsis subvermispora* (Pil.) Gilbn. & Ryv., cepa SS-3, cedida pelo Prof. M. Akhtar da empresa Biopulping International, Madison-WI, USA. A cepa foi periodicamente repicada e mantida em placas de Petri sobre meio composto por extrato de malte (2%), extrato de levedura (0,2%) e ágar (0,2%). Os cultivos foram realizados a 27 °C. 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.

5.2 MADEIRA UTILIZADA

A madeira utilizada nesse trabalho foi *Eucalyptus grandis* (representativa do conjunto da madeira de folhosas). Os cavacos (2,5 x 1,0 x 0,2 cm) foram obtidos a partir de toras de árvores com cerca de 6 a 8 anos. Esses cavacos foram gentilmente cedidos pela empresa Melhoramentos Papéis Ltda e correspondem à matéria prima utilizada na planta industrial de Caieiras, SP, para a fabricação de polpa quimiotermomecânica de *E. grandis*.

5.3 PREPARAÇÃO 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 (DIFCO) e 0,7% de extrato de levedura (OXOID). O meio foi esterilizado a 121 °C/15 min e após resfriamento foi inoculado com 20 discos de 8 mm de diâmetro provenientes de placas de Petri recém cultivadas. Após 12 dias de incubação estática a 27°C, o micélio crescido em meio líquido foi filtrado, lavado com água esterilizada e macerado em 150 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 previamente seco e pesado para a determinação da quantidade de micélio presente no inóculo, expressa como mg (base seca)/mL. 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 concentração de 500 mg de micélio por kg de madeira em cada Erlenmeyer.

5.4 EXPERIMENTOS DE BIODEGRADAÇÃO

Prévio a etapa de inoculação, 53 g de cavacos de madeira (com aproximadamente 7% de umidade, apresentando, portanto, 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 esterilizados a 121° C por 15 minutos. Este mesmo procedimento foi utilizado para cavacos que não foram inoculados com o fungo e que serviram de controle para o processo de biodegradação da madeira. Após a autoclavagem, a madeira sofreu uma perda de massa de 1,1% que foi descontada da perda de massa devida ao processo de biodegradação.

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) (item 5.3).

Os experimentos de biodegradação foram realizados em 3 diferentes condições de cultivo definidas com base em um trabalho anterior que avaliou os efeitos de alguns nutrientes no crescimento do fungo e na secreção de enzimas (VICENTIM; FERRAZ, 2007). As condições utilizadas estão listadas na tabela 1.

Para a adição de co-substratos ao cultivo, o biorreator foi carregado com madeira previamente esterilizada, o(s) devido(s) co-substrato(s) e inóculo. Os cultivos foram agitados manualmente para homogeneização e então mantidos sem agitação a 27°C por períodos de 7, 14 e 28 dias. A inoculação e a adição dos co-substratos foram feitas de forma simultânea. Cada Erlenmeyer recebeu quantidade suficiente de suspensão fúngica (aproximadamente 6 mL) e de co-substratos (previamente esterilizados a 121 °C por 15 min), como segue:

- Suplementação com milhocina: 5 mL de uma solução estoque contendo 100 g/L de suspensão de milhocina (o que é equivalente a 50 g/L de milhocina em base seca, já que o teor de sólidos na milhocina comercial é de 50%) e 5 mL de água destilada;
- Suplementação com glicose e milhocina: 10 mL de solução estoque que continha glicose e milhocina previamente misturadas (5 mL de solução contendo 50 g de glicose anidra/L e 5 mL de uma solução 50 g (base seca)/L de milhocina);
- Cultivo não suplementado: 10 mL de água destilada.

Tabela 1 - Condições de cultivo de *C. subvermispora* SS-3 sobre madeira de *E. grandis* utilizando um sistema de fermentação em meio sólido.

Condição	Variáveis de cultivo	
	Glicose (% base madeira seca)	Milhocina * (% base madeira seca)
1	0	0
2	0	0,5
3	0,5	0,5

*A milhocina é um sub-produto da produção de amido de milho e é composta (p/p, base seca) por cerca de 40% de proteína parcialmente hidrolisada, 15% de açúcares e 15% de ácido lático, além de outros componentes minoritários (AKHTAR *et al.*, 1998).

Para cada condição de cultivo e tempo de biodegradação foram inoculados 6 biorreatores. Todo o conteúdo de cada biorreator foi extraído com uma solução tampão ou com água dando origem aos extratos que foram utilizados para a determinação de atividades enzimáticas (item 5.4.1) e atividade de peroxidação de lipídeos (item 5.4.2) ou determinação de pH (item 5.4.4), respectivamente. As amostras de madeira foram avaliadas quanto à perda de massa (item 5.6) e composição química da madeira (item 5.5).

5.4.1 Extração da madeira biotratada com solução tampão suplementada com Tween 60 para recuperação de enzimas

A madeira biodegradada (e um controle não biotratado) foi extraída com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5, adicionado de 0,01% de Tween 60. Todo o conteúdo de cada Erlenmeyer foi extraído com 200 mL da solução mencionada anteriormente sob agitação de 120 rpm durante 5 h a $10 \pm 1^\circ \text{C}$ (Agitador New Brunswick C25KC). Este procedimento, segundo Souza-Cruz *et al.*, (2004), é suficiente para a extração de aproximadamente 50% da atividade enzimática total do meio. Os extratos enzimáticos foram recuperados por centrifugação a 2000 G a 4°C por 15 min (Centrífuga refrigerada Jouan CR4i). Dos extratos enzimáticos obtidos foram determinadas as atividades enzimáticas relacionadas à degradação

da lignina. A atividade enzimática foi determinada como descrito a seguir e expressa em unidades internacionais (UI) por kg de madeira inicial.

5.4.1.1 Manganês-Peroxidase (MnP)

A atividade de MnP foi medida através da oxidação de vermelho de fenol. As reações foram realizadas em tubos de ensaio de 15 mL 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 de extrato enzimático 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).

5.4.1.2 Lacases

A atividade de lacase foi medida através da oxidação de ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico) (BOURBONNAIS; LEECH; PAICE, 1998). As reações foram realizadas diretamente em cubetas de 3 mL contendo 0,6 mL de tampão fosfato 200 mM/citrato 100 mM de sódio a pH 5,0, 0,2 mL de água, 1,0 mL de extrato enzimático e 0,2 mL de ABTS 1,0 mM. A reação foi monitorada entre 10 s e 5 min através da leitura da absorbância em um aparelho de UV-visível (GBC-Cintra 20) no comprimento de onda de 420 nm (absortividade do ABTS oxidado = $36.000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

5.4.2 Reações de peroxidação de ácido linoleico iniciadas pelos extratos enzimáticos

5.4.2.1 Determinação do consumo de oxigênio

O procedimento experimental adotado foi baseado no trabalho recentemente desenvolvido por Kapich *et al.*, (2005). Em uma cela de reação de um medidor de oxigênio dissolvido (HANSATECH) foram adicionados 870 μL de tampão 50 mM succinato de sódio, pH 4,5 e 250 μL de lactato de sódio 50 mM que foram deixados sob agitação magnética por aproximadamente 5 min a 27°C para saturação com oxigênio. Posteriormente, mantendo a agitação magnética constante, foi adicionado 500 μL de extrato enzimático, 40 μL de solução de MnSO_4 5 mM e 40 μL de emulsão de ácido linoleico 0,2% em Tween 60 1% (p/v). A cela foi lacrada com o êmbolo superior e através de um tubo capilar foi injetado 4 μL de H_2O_2 20 mM. O volume final da reação foi de 1.700 μL . Uma reação controle foi realizada com extrato enzimático tratado em banho com água fervendo por um período de 15 minutos. A taxa inicial de consumo de oxigênio (em nmol/mL.min.) foi determinada a partir de leituras contínuas proporcionadas pelo eletrodo que mede a concentração de oxigênio dissolvido.

5.4.2.2 Determinação do acúmulo de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Reações similares às descritas para a determinação do consumo de oxigênio foram realizadas também em tubos de ensaio de 30 mL, onde foram adicionados 1.250 μL de 50 mM de tampão succinato de sódio pH 4,5 que foram deixados em agitação de 120 rpm durante 5 min a $25 \pm 1^\circ \text{C}$ (Aagitador New Brunswick C25KC). Em seguida, foi adicionado ao meio de reação 1,0 mL de emulsão de ácido linoleico 0,2% em Tween 60 1% (p/v), 100 μL de solução de MnSO_4 50 mM, 2,0 mL de extrato aquoso filtrado, 1,0 mL de lactato de sódio 50 mM e 250 μL de H_2O_2 2 mM. Após 1 hora, toda a mistura reacional foi adicionada sobre 3,0

mL de uma solução de ácido tiobarbitúrico 0,335% (p/v) contendo ácido tricloroacético 10% (p/v). Essa mistura final foi aquecida em banho com água em ebulição durante 15 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 2000 G a 10°C por 15 min (Centrífuga refrigerada Jouan CR4i) e o sobrenadante foi analisado em um aparelho UV-visível (GBC-Cintra 20) no comprimento de onda de 532 nm, para a determinação do teor de substâncias reativas em ácido tiobarbitúrico (TBARS) a partir de um coeficiente de absorção molar de $156.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (ENOKI *et al.*, 1999). Misturas reacionais que continham extrato enzimático fervido por 15 min foram usadas como controle.

5.4.3 Análise dos produtos de peroxidação de ácido linoleico por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS)

5.4.3.1 Obtenção de um cultivo com extratos de alta atividade enzimática de MnP

Para obtenção de extratos enzimáticos com elevada atividade de MnP foram repetidos alguns experimentos em meio suplementado com milhocina e glicose, porém inoculados com maior carga de micélio. Nesse caso a carga de inóculo utilizada foi de 3000 mg de micélio/kg de madeira (ambos em base seca) (procedimento similar ao item 5.3). Os biorreatores foram carregados através do mesmo procedimento do item 5.4 e mantidos incubados por 17 dias.

5.4.3.2 Detecção de intermediários provenientes da peroxidação de lipídeos

Para a detecção de intermediários provenientes da peroxidação de lipídeos, a reação foi realizada em tampão de acetato de sódio 20 mM (pH 4,5) porque foram verificadas maiores concentrações dos aldeídos pentanal e hexanal formados quando aplicado esse tampão (WATANABE *et al.*, 2001). As reações foram realizadas em tubos de ensaio de 20 mL, com adição sequencial de 1040 μL de tampão acetato de sódio 20 mM (pH 4,5), 500 μL

de extrato de alta atividade enzimática de MnP, 40 μL de solução de MnSO_4 5 mM, 500 μL de emulsão de ácido linoleico 0,2% em Tween 60 1% (p/v), e, finalmente, 4 μL de H_2O_2 20 mM. Essas reações foram mantidas em agitação de 120 rpm a 25 °C (Agitador New Brunswick G24), por períodos de 0,5, 1, 3, 6 e 24 horas. Em seguida, cada meio racional foi filtrado através de cartuchos de Sep-Pak C18 (Waters) para adsorção dos possíveis aldeídos na fase sólida C18. Os compostos adsorvidos na fase sólida foram dessorvidos com 1 mL de diclorometano. Esse conteúdo foi tratado com Na_2SO_4 anidro para remoção de trações de água e transferido para balão volumétrico de 1 mL que foi avolumado com diclorometano quando necessário.

Para cada análise cromatográfica preparou-se uma amostra contendo 450 μL da solução em diclorometano e 50 μL de padrão interno (pentanol a 400 mg/L). Amostras de 3 μL foram injetadas e analisadas em um cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (Finnigan GCQ-Mat). A temperatura inicial da coluna foi de 40°C, mantida por 10 min e posteriormente aquecido a uma taxa de 30°C/min até 280°C. Essa temperatura foi mantida por um tempo de 12 minutos adicionais. O fluxo de hélio foi equivalente a 33 cm/s e as temperaturas do injetor e da linha de transferência foram de 220 e 275°C, respectivamente. Os compostos em estudo foram analisados por interpretação do espectro de massas e comparação com padrões autênticos.

5.4.3.3 Quantificação de ácido linoleico residual no meio reacional

Para cada reação catalisada pelo extrato de alta atividade de MnP, extraída em Sep-Pak C18 conforme descrito anteriormente, foram preparadas amostras com 450 μL da solução em diclorometano e 50 μL de padrão interno (tetracosano a 400 mg/L). Essas amostras foram injetadas no cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (Finnigan GCQ-Mat).

A temperatura inicial da coluna foi de 60°C, mantida por 1 minuto, e posteriormente aquecido 20°C/min até 200°C. Esta temperatura foi mantida por 1 min e, finalmente, aquecida a uma taxa de 5°C/min até 280°C e mantida nessa temperatura por 2 min adicionais. O fluxo de hélio foi equivalente a 33 cm/s e as temperaturas do injetor e da linha de transferência foram de 220 e 275°C, respectivamente. O ácido linoleico foi analisado por interpretação do espectro de massas e comparação com padrões autênticos.

Tanto para os aldeídos pentanal e hexanal como para o ácido linoleico foram preparadas curvas de calibração com padrões autênticos para a determinação das concentrações nas amostras dos meios reacionais.

5.4.4 Extração da madeira biotratada com água para determinação de pH e TBARS na madeira residual

Todo o conteúdo de cada Erlenmeyer 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 ± 1°C (Agitador New Brunswick C25KC), seguida de centrifugação a 3500 G a 4°C por 15 min (Centrífuga refrigerada Jouan CR4i). Do sobrenadante foram avaliados o pH (pHmetro QUIMIS Q 400A) e na madeira residual foi determinada a concentração de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS).

A determinação de TBARS foi realizada de acordo com Enoki *et al.*, (1999), com algumas adaptações. Porções de 5 g de cavacos foram lavadas 5 vezes com 60 mL de água destilada por 1 hora a 120 rpm a 25 °C. 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, as amostras foram concentradas em evaporador rotativo (Fisaton) e avolumadas a 200 µL. A este volume foram adicionados 3 mL de solução 0,335% (m/v) de ácido

tiobarbitúrico em 10% (m/v) de ácido tricloroacético que permaneceram por 15 min em banho-maria em ebulição. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3800 G a 10 °C por 15 min, e analisadas espectrofotometricamente em 532 nm (coeficiente de absorção molar =156.000 M⁻¹. cm⁻¹). As concentrações foram reportadas como µg de TBARS por kg de madeira (base seca) e analisadas em duplicata.

5.5 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS AMOSTRAS DE MADEIRA BIODERADADA

Os cavacos de madeira provenientes do processo de biodegradação (e um controle não biotratado) que foram previamente extraídos com a solução tampão, foram lavados com água e secos ao ar. Uma fração desses cavacos foi moída em moinhos de facas até passar por uma malha com perfurações de 0,75 mm. O material moído proveniente dos três Erlenmeyers foi misturado em uma única amostra composta, e analisado em triplicata. As amostras foram extraídas com etanol 95% em um extrator de Soxhlet por 6 horas.

O teor de componentes da madeira (glucana, polioses e lignina) foi determinado a partir da hidrólise do material previamente extraído, com H₂SO₄ 72% (FERRAZ *et al.*, 2000). Cerca de 300 mg (base seca) de amostra seca ao ar foram tratados com 3 mL de H₂SO₄ 72% (m/m) em um tudo de ensaio a 30 °C por 1 hora. Em seguida, o conteúdo de cada tudo foi transferido quantitativamente para um Erlenmeyer de 250 mL com o auxílio de 79 mL de água destilada (ácido diluído a 3%). Essa mistura foi então autoclavada a 121 °C por 1 hora. Após o resfriamento, o conteúdo de Erlenmeyer foi filtrado em filtro de placa porosa número 4 previamente seco a 105 °C e pesado. Foi usado aproximadamente 10 mL de água destilada para remover o material residual ainda retido no Erlenmeyer e a fração solúvel filtrada foi avolumada a 100 mL em balão volumétrico. Posteriormente, o material sólido retido nas

placas foi seco em estufa a 105 °C até massa constante para determinação gravimétrica da lignina insolúvel (Klason).

Parte a fração solúvel foi filtrada em filtro Sep-Pak C₁₈ (Waters) e utilizada para a determinação dos teores de glucana (glicose) e das polioses (xilose) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo Shimadzu, utilizando um, detector de índice de refração e coluna BIORAD HPX-87H aquecida a 45 °C e eluída com H₂SO₄ 0,005 mol/L a 0,6 mL/min. A concentração dos açúcares foi determinada através de curvas de calibração preparadas com padrões de grau analítico dos compostos analisados.

O teor de lignina solúvel em ácido foi determinado por medida de absorbância em 205 nm em uma diluição de 1:25 do filtrado do procedimento de hidrólise. A concentração da lignina foi calculada com base na absorvidade de 105 L/g.cm (FERRAZ *et al.*, 2000).

As composições químicas da madeira foram expressas em % (g de componentes por 100g madeira, base seca) e as análises foram realizadas em triplicata.

5.6 DETERMINAÇÃO DA PERDA DE MASSA E COMPONENTES

A perda de massa e dos componentes (glucana, polioses e lignina) dos cavacos pré-tratados foram calculados como mostrado abaixo:

Perda de massa(%) = (mi-mf)/mi x 100, onde

mi = massa inicial de madeira (base seca)

mf = massa final da madeira (base seca)

Perda de componentes (%) = (mci-mcf)/mci x 100, onde

mci = % componente inicial x massa madeira inicial

mcf = % componente final x massa madeira final

5.7 CULTIVOS EM MEIO LÍQUIDO

O crescimento e a produção de enzimas oxidativas por *Ceriporiopsis subvermispora* também foi avaliado em cultivos estáticos em meio líquido. Em Erlenmeyers de 250 mL, foram inseridos 20 mL de solução contendo 2% de extrato de malte e 0,2% de extrato de levedura, inoculados com 2 discos de pré-culturas do fungo em estudo (item 5.1) (VICENTIM, 2007). Foram avaliadas a produção de MnP e lacases (item 5.4.1, sem necessidade da etapa de extração enzimática), biomassa crescida (micélio filtrado e seco a peso constante) e atividade de peroxidação de lipídeos (item 5.7.1). Para cada período de cultivo (2,4,6,9 e 14 dias), foram preparados 3 Erlenmeyers para determinações em triplicata.

5.7.1 Determinação da peroxidação de ácido linoleico por lacases

Em uma cela de reação de um medidor de oxigênio dissolvido (HANSATECH) foram adicionados 450 µL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5 deixados sob agitação magnética por aproximadamente 5 min a 27 °C para saturação com oxigênio. Posteriormente foi adicionado 170 µL de ácido p-hidroxi-benzóico 10 mM, 1000 µL de extrato enzimático, 40 µL de solução de MnSO₄ 5 mM e 40 µL de emulsão de ácido linoleico 0,2% em Tween 60 1% (p/v). A cela foi lacrada com o êmbolo superior e o meio reacional permaneceu em agitação por 3 horas. O volume final da reação foi de 1.700 µL. Uma reação controle foi realizada com extrato enzimático tratado em banho com água fervendo em um período de 15 minutos. A taxa inicial de consumo de oxigênio foi determinada por leituras contínuas do eletrodo de oxigênio em nmol/mL.min.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO DA MADEIRA DE *EUCALYPTUS GRANDIS*

6.1.1 Crescimento do fungo e perdas de massa e componentes da madeira

Foram realizados ensaios de biodegradação de *E. grandis* por *C. subvermispora* em três diferentes condições de cultivo (item 5.4, tabela 1). A adição de suplementos aos cultivos foi utilizada com a intenção de obter níveis diferenciados de metabólitos extracelulares (VICENTIM; FERRAZ, 2007) e avaliar a ação de extratos desses cultivos como iniciadores de reações de peroxidação de lipídeos.

Nas 3 condições de cultivo avaliadas, houve uma produção discreta de micélio após a primeira semana de biodegradação. Após 14 dias, os cultivos suplementados com milhocina e milhocina + glicose produziram grandes quantidades de micélio nos cavacos de madeira, indicando um maior desenvolvimento do fungo nessas condições. Ao final de 28 dias de biodegradação, mesmo os cultivos não suplementados apresentaram um crescimento intenso do fungo.

A madeira biotratada por 28 dias foi avaliada quanto à perda de massa e componentes. As perdas de massa e componentes em tempos mais curtos de biodegradação, em geral são baixas quando o fungo em estudo é *C. subvermispora* (MENDONÇA, 2002; MENDONÇA; GUERRA; FERRAZ, 2002; GUERRA; MENDONÇA; FERRAZ, 2003). Segundo Mendonça (2002), as perdas de massa e de componentes após os 15 primeiros dias de biodegradação apresentam-se relativamente baixas e normalmente estão associadas à degradação de extrativos e algumas frações de açúcares livres presentes em células de parênquima da madeira.

A perda de massa da madeira representa a mineralização completa (até dióxido de carbono e água) dos seus componentes, ou a conversão desses componentes a produtos solúveis em água. As perdas de massa da madeira e a perda de componentes causadas pela ação biodegradativa de *C. subvermispora* estão apresentadas na tabela 2. Comparando os cultivos após 28 dias de biodegradação, pode-se notar que a perda de massa foi bastante elevada em cultivos suplementados com milhocina e milhocina + glicose, atingindo 12,2% e 11,3% (m/m), respectivamente, enquanto que nos cultivos com madeira não suplementada a perda de massa foi de 8,7% (m/m).

Tabela 2 - Perda de massa e componentes da madeira *E. grandis* biotratado por 28 dias com *C. subvermispora* em diferentes condições de cultivo

Condições de Cultivo	Perda de Massa e Componentes (%)			
	Massa	Lignina	Glucana	Xilana
Sem Suplemento	8,7 ± 0,3	14,5 ± 0,3	4,6 ± 0,3	5,9 ± 0,3
Milhocina	12,2 ± 0,4	20,4 ± 0,3	7,9 ± 0,4	12,0 ± 0,4
Milhocina e Glicose	11,3 ± 0,5	18,4 ± 0,4	7,2 ± 0,5	9,1 ± 0,5

A degradação dos componentes da madeira ocorre inicialmente através da atuação dos complexos enzimáticos e de outros metabólitos de baixa massa molar que promovem a despolimerização de glucanas, xilanas e lignina, sendo que os produtos desta despolimerização são posteriormente mineralizados (SOUZA-CRUZ, 2005). As perdas de glucana e xilana foram baixas no período de cultivo avaliado. Os cultivos suplementados com milhocina foram os que promoveram a maior perda destes componentes, apresentando 7,9% de perda para glucana e 12% para xilanas (Tabela 2). Já para a perda de lignina, os valores foram expressivamente maiores quando comparado aos demais componentes. Nos cultivos suplementados apenas com milhocina e milhocina + glicose, as perdas de lignina foram mais significativas, enquanto que nos cultivos não suplementados, a perda de lignina chegou a 14,5%. A intensa degradação de lignina é uma etapa fundamental no processo biodegradativo,

pois a remoção desse componente aumenta a permeabilidade da parede das células de madeira, facilitando a difusão e ação das enzimas hidrolíticas que atuam sobre os polissacarídeos (MACHUCA; FERRAZ, 2001).

Nos experimentos desenvolvidos no presente trabalho foi possível observar que a adição de milhocina aos cultivos proporcionou maiores perdas de massa e componentes, confirmando um trabalho prévio que mostrou a milhocina como um suplemento indutor do crescimento e da ação degradativa em *C. subvermispora* (VICENTIM, 2007; VICENTIM; FERRAZ, 2007). A adição de glicose, embora estimule o crescimento do fungo, leva a uma repressão da atividade degradativa de lignina o que também foi corroborado pelos menores valores de perda desse componente nos cultivos avaliados aos 28 dias de biodegradação. As alterações no metabolismo fúngico decorrentes da suplementação também foram avaliadas a partir da produção de enzimas oxidativas nos extratos obtidos (item 6.1.2).

6.1.2 Produção de enzimas oxidativas ao longo de 28 dias de biodegradação

As atividades de MnP e lacase produzidas nos cultivos (suplementados ou não) foi avaliada em extratos obtidos de cultivos realizados por períodos de 7 a 28 dias (Figura 7 e 8).

A atividade de lacase foi avaliada usando solução de ABTS como substrato. As atividades dessa enzima foram muito baixas em todos os cultivos. Na figura 7 é possível observar que o pico de atividade enzimática de lacase ocorre no 7º dia, não ultrapassando 36 UI/kg de madeira. Nos cultivos com a adição de milhocina, as atividades foram 4 vezes maiores quando comparadas às atividades encontradas nos cultivos não suplementados e suplementados com milhocina e glicose. Vários trabalhos prévios têm mostrado que *C. subvermispora* produz lacases somente nos estágios iniciais de biodegradação da madeira e geralmente isso ocorre quando o cultivo recebe a adição de um co-substrato como milhocina

ou glicose (VICUÑA *et al.*, 1996; ENOKI *et al.*, 1999; SOUZA-CRUZ *et al.*, 2004; HAKALA *et al.*, 2005).

Figura 7: Produção de lacases por *C. subvermispora* durante a biodegradação de *E. grandis*. Cultivos não suplementados (●-); cultivos suplementados com milhocina (-■-); e cultivos suplementados com milhocina e glicose (-▲-).

A figura 8 mostra as atividades de MnP detectadas nesses cultivos. É possível observar que a condição onde não houve suplementação dos cultivos, a atividade de MnP foi mais baixa que aquela observada nos cultivos suplementados. Nos cultivos suplementados com milhocina e glicose, foi detectada a maior quantidade de MnP, corroborando estudos anteriores que indicaram que estes co-substratos induzem o crescimento fúngico e a produção de MnP (VICENTIM; FERRAZ, 2007). O pico de atividade enzimática para todas as condições avaliadas ocorreu no 14º dia de cultivo. Nos cultivos onde houve apenas a suplementação com milhocina a atividade de MnP foi semelhante à observada nos cultivos suplementados com milhocina e glicose.

Embora o efeito da adição de suplementos aos cultivos tenha seguido a mesma tendência já observada para a produção de MnP em cultivos anteriores (VICENTIM; FERRAZ, 2007), os níveis absolutos de MnP observados aos 14 dias de cultivo foram inferiores aos obtidos no trabalho anteriormente mencionado. De forma geral, as atividades

obtidas no presente trabalho foram até 2 vezes menores que aquelas reportadas anteriormente. A diferença mencionada, provavelmente está associada ao descontrole da etapa de inoculação que é feito somente em função da quantidade de micélio por quantidade de madeira. Esse micélio é rompido em um liquidificador e inoculado na razão de 500 mg/kg de madeira nos estudos em questão. Porém, não há um controle de viabilidade celular e/ou do nível de clamidosporos presentes no inóculo. Recentemente, foi demonstrado que a produção de MnP é extremamente dependente da carga de micélio empregado na etapa de inoculação (MASARIN; FERRAZ, 2008).

Figura 8: Produção de MnP por *C. subvermispora* durante a biodegradação de *E. grandis*. Cultivos não suplementados (●-); cultivos suplementados com milhocina (-■-); e cultivos suplementados com milhocina e glicose (-▲-).

6.2 PEROXIDAÇÃO DE LIPÍDEOS INDUZIDA POR EXTRATOS ENZIMÁTICOS

Os extratos obtidos nos cultivos citados anteriormente foram avaliados quanto à atividade pró-oxidante. Para isso, reações de peroxidação de lipídeos induzidas pelos extratos foram caracterizadas quanto ao consumo de O_2 e quanto ao acúmulo de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Inicialmente, alíquotas com um extrato enzimático contendo elevada atividade de MnP, foram usadas para desenvolver um método para determinação da atividade pró-oxidante, a partir do consumo de O_2 num meio reacional contendo o extrato e ácido linoleico. Um exemplo de uma reação monitorada no oxímetro é mostrado na figura 9.

Figura 9: Consumo de O_2 em reações de peroxidação de lipídeos catalisadas por extratos enzimáticos obtidos de *E. grandis* biotratado por *C. subvermispota*.

A adição do extrato enzimático, íons Mn^{2+} e emulsão de ácido linoleico dentro da solução contendo tampão succinato de sódio e lactato de sódio saturada com O_2 , não causaram consumo significativo de O_2 , indicando a ausência de reações de oxidação. Imediatamente após a adição de H_2O_2 ao meio reacional, houve um pequeno acúmulo de O_2 dissolvido que é seguido de intenso consumo, indicando que as reações de peroxidação tiveram início. A mesma reação foi conduzida com extrato enzimático previamente fervido por 15 min para desnaturar a MnP presente. Nesse caso, o consumo de O_2 foi muito baixo, comprovando que a atividade peroxidativa observada se deve a ação da MnP. A taxa máxima

de consumo de O_2 foi calculada para cada extrato nos tempos iniciais de reação como mostram as duas barras delimitadoras indicadas na figura 9. A taxa de consumo de O_2 observada em reações controle realizadas com o extrato fervido, quando quantificável, foi descontada da taxa total observada nos extratos com a enzima ativa. Os resultados aqui mostrados concordam com aqueles publicados por Kapich *et al.*, (2005) em reações catalisadas por extratos contendo LiP e também MnP.

A Figura 10 apresenta as taxas de consumo de O_2 em função dos níveis de MnP observados em extratos obtidos a partir de diferentes cultivos. Pode-se observar que elevadas taxas de consumo de O_2 , correspondem aos extratos que também apresentaram elevadas atividades de MnP. Houve uma correlação direta e positiva entre os níveis de MnP nos cultivos e a atividade pró-oxidante estimada a partir da peroxidação de lipídeos. No entanto, nota-se que as taxas de consumo de O_2 crescem numa menor proporção a partir de níveis de MnP maiores que 150 UI/kg. Esse fato está de acordo com o mecanismo reacional proposto para a peroxidação de lipídeos iniciada por MnP (Figura 5), já que trata-se de uma reação radicalar em cadeia, onde os radicais peroxila formados podem propagar a reação independentemente da presença de MnP. Ou seja, havendo uma certa quantidade mínima de iniciador (MnP) em solução, já se obtém quantidade suficiente de radicais peroxila que então propagam a reação. Outro fator que pode limitar a atividade pró-oxidante de extratos com elevada atividade de MnP é a presença de compostos fenólicos com capacidade antioxidante (reagem com os radicais formados durante a peroxidação de lipídeos evitando a propagação da reação). Recentemente, Kapich, Galkin e Hatakka, (2007) mostraram que vários compostos fenólicos podem inibir a peroxidação de lipídeos iniciada por MnP purificada a partir de cultivos de *Phanerochaete chrysosporium*. É provável que à medida que a biodegradação progride e os níveis de MnP aumentam, os compostos fenólicos derivados da biodegradação de lignina comecem a acumular no meio de cultivo e sejam extraídos juntamente com a

enzima, conforme já demonstrado para cultivos semelhantes aos desenvolvidos em nosso trabalho monitorados a partir da absorbância dos extratos em 280 nm (CARVALHO; FERRAZ; MILAGRES, 2008). Esses compostos fenólicos poderiam atuar como antioxidantes e limitar a capacidade peroxidativa dos extratos como observado na figura 10 para níveis de MnP maiores que cerca de 100 UI/kg.

Figura 10. Relação entre os níveis de MnP em extratos de cultivos de *C. subvermispora* sobre *E. grandis* e as taxas de consumo de O₂ em reações de peroxidação de ácido linoleico catalisadas por esses mesmos extratos. (●-) meio não suplementado; (■-) meio suplementado com milhocina; (▲-) meio suplementado com milhocina e glicose.

O acúmulo de TBARS também foi monitorado nas reações que continham o extrato enzimático e os demais reagentes do sistema (H₂O₂, Mn²⁺ e ácido linoleico). 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). No caso da peroxidação de ácido linoleico iniciada por MnP, Watanabe *et al.*, (2001), demonstraram que os principais aldeídos formados são o glioxal, o pentanal e o hexanal. A proporção em que esses aldeídos são formados depende, inclusive, do tipo de tampão utilizado no meio reacional. 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 (TBARS ou substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico) (MASAPHY; HENIS; LEVANON, 1996). Desta forma, o total destes aldeídos formados durante a reação foi determinado s como TBARS. A figura 11 mostra os níveis de TBARS acumulados após 1 h de reação catalisada pelos extratos obtidos dos cultivos em estudo. Houve um acúmulo significativo de TBARS nas reações catalisadas por extratos oriundos de cultivos de 2 semanas. A concentração de TBARS foi maior nos cultivos suplementados com milhocina e glicose, atingindo 8,3 nmol/mL de extrato, como mostra a figura 11. A quantidade de TBARS diminuiu levemente nas reações catalisadas pelos extratos obtidos dos cultivos de 28 dias, indicando um perfil semelhante e proporcional às atividades de MnP, mostrado na figura 8. Na reação controle onde o extrato enzimático foi fervido por 15 minutos não houve acúmulo significante de TBARS.

Figura 11: TBARS acumulados após 1 h de reação catalisada por extratos obtidos de cultivos de *C. subvermispura* sobre *E. grandis*. (●) meio não suplementado; (■) meio suplementado com milhocina; (▲) meio suplementado com milhocina e glicose.

A figura 12 mostra a proporcionalidade entre as duas formas de medir a atividade pró-oxidante avaliadas: o consumo de oxigênio e a quantidade de TBARS acumulados na reação. Os resultados demonstram efetivamente que há uma correlação direta entre as taxas de consumo de O₂ determinadas no oxímetro com o acúmulo de TBARS nas mesmas reações, indicando que os dois métodos avaliados podem fornecer um indicativo da capacidade pró-oxidante dos extratos contendo MnP. No entanto, a determinação de TBARS é inespecífica conforme mencionado anteriormente, ou seja, ela reflete o somatório de aldeídos eventualmente formados na reação. Dessa forma, um estudo paralelo que desenvolvemos foi a tentativa de quantificar os aldeídos formados na reação diretamente por cromatografia gasosa e não somente como TBARS. Esse estudo foi desenvolvido com o apoio de uma estudante de iniciação científica de nosso próprio grupo de pesquisas (Karla de Melo das Dores, bolsista FAPESP 06/57669-6) e está descrito no item 5.4.3.

Figura 12: Relação entre o consumo de oxigênio e o acúmulo de TBARS em reações de peroxidação de ácido linoleico catalisadas por extratos de cultivos de *C. subvermispota* sobre *E. grandis*. (-●-) meio não suplementado; (-■-) meio suplementado com milhocina; (-▲-) meio suplementado com milhocina e glicose.

6.2.1 Análise dos produtos de peroxidação de ácido linoleico por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

Após o primeiro grupo de experimentos, um novo cultivo de *C. subvermispora* sobre *E. grandis* suplementado com milhocina e glicose foi realizado a fim de se obter um novo extrato com elevado nível de atividade de MnP. Neste cultivo foi utilizado um inóculo na proporção de 3000 mg de micélio/kg de madeira. A atividade de MnP nesses cultivos foi bastante elevada, sendo de 2301 ± 110 IU/kg de madeira em decorrência da elevada carga de inóculo usada (MASARIN; FERRAZ, 2008).

Com esse extrato contendo elevada atividade de MnP foram realizadas algumas reações de peroxidação do ácido linoleico em sistemas similares aos utilizados nas reações já descritas. As reações foram monitoradas em tempos pré-definidos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (item 5.4.3).

Nas condições de análise empregadas, somente pentanal e hexanal podem ser quantificados, visto que o glioxal forma trímeros em solução aquosa que não são adsorvidos na fase C18 usada na recuperação dos aldeídos. Pentanal não foi detectado em nenhuma das reações realizadas, enquanto que a maior quantidade de hexanal foi detectada em reações desenvolvidas por um período de 6 horas. O ácido linoleico residual também foi analisado e os dados quantitativos estão mostrados na figura 13. Pode-se notar que à medida que o ácido linoleico foi consumido (peroxidado), formou-se hexanal. No entanto, a quantidade formada de hexanal foi significativamente baixa, principalmente quando comparada à quantidade consumida de ácido linoleico (notar a diferença entre as escalas para os dois compostos - figura 13). Isso indica que outros produtos provavelmente devem estar sendo formados e não são quantificados ou detectáveis pelo método analítico desenvolvido. Também se observa que o hexanal passa a diminuir em concentração após 6 h de reação indicando que efetivamente

esse composto deve ser um intermediário da reação e também sujeito a degradação pelo sistema degradativo em estudo.

Figura 13. Quantidade residual de ácido linoleico e hexanal formado em função do tempo de reação de ácido linoleico com um extrato contendo elevada atividade de MnP. (-□-) Hexanal formado e (-■-) ácido linoleico residual.

6.2.2 Concentração de TBARS na madeira e variação de pH dos cultivos de *C. subvermispora* sobre *E. grandis*

A concentração de TBARS na madeira biotratada também foi avaliada a fim de estimar o nível de reações de peroxidação de lipídeos ocorridas *in vivo*, ou seja, durante a biodegradação da madeira por *C. subvermispora* (Figura 14). O acúmulo de TBARS na madeira biotratada foi progressivo durante a biodegradação, sendo que nos cultivos suplementados foram observados os maiores níveis de TBARS, coincidindo com a tendência da produção de MnP nos mesmos cultivos (Figura 8).

O pH da madeira biotratada diminuiu ao longo da biodegradação como mostra a figura 14. O pH diminuiu nesses cultivos provavelmente devido à secreção de ácidos orgânicos pelo

fungo e também pela formação de derivados ácidos nos produtos de degradação oxidativa da lignina. Os fungos causadores de decomposição branca secretam ácidos orgânicos, tais como malônico, málico, tartárico e lático, sendo que o principal secretado por *C. subvermispora* é o ácido oxálico (AGUIAR; SOUZA-CRUZ; FERRAZ, 2006; GALKIN *et al.*, 1998; HOFRICHTER, 2002).

É interessante notar na figura 14 que o acúmulo de TBARS segue uma tendência similar e inversa aos valores 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 estamos demonstrando 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.

Figura 14: Concentração de TBARS na madeira e variação de pH dos cultivos de *C. subvermispora* sobre *E. grandis*. Símbolos cheios representam pH, e símbolos vazios quantidade de TBARS. (-●-○-) meio não suplementado; (-■-□-) meio suplementado com milhocina; (-▲-△-) meio suplementado com milhocina e glicose.

Cabe ainda notar na figura 14, 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 há alguns aldeídos ou mesmo outros compostos que também dariam reação positiva com o ácido tiobarbitúrico e por isso interfeririam no 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 com os aldeídos provenientes da peroxidação de lipídeos tem sido questionada na literatura (LIU *et al.*, 1997).

6.2.3 Participação de lacases na peroxidação de lipídeos

Um cultivo de *C. subvermispora* em meio líquido que sabidamente proporcionava a secreção de lacases (VICENTIM, 2007) também foi analisado nesse trabalho a fim de verificar qual seria o papel das lacases na peroxidação de lipídeos (item 5.7.1). Nestes experimentos não se detectou atividades de MnP em nenhum dos períodos avaliados. As atividades de lacase foram detectadas a partir do 6º dia de cultivo, como mostra a figura 15. A atividade enzimática observada foi de aproximadamente 13 UI/L de cultivo, e estes valores permaneceram aproximadamente constantes até o 14º dia. O crescimento fúngico foi intenso a partir do 4º dia de cultivo, atingindo 146 mg/Erlenmeyer.

Figura 15: Perfil metabólico de *C. subvermispora* ao longo de 14 dias de cultivo em meio líquido composto de 2% de extrato de malte e 0,2% de extrato de levedura. Atividade enzimática (UI/L) (-□-) e Biomassa (mg/por cultivo) (-●-).

Os meios cultivados também foram avaliados quanto à atividade pró-oxidante, após uma etapa de filtração para a remoção de micélio. Inicialmente, alíquotas com um filtrado enzimático contendo elevada atividade de lacase foram usadas para desenvolver um método para determinação da peroxidação de lipídeos num meio reacional contendo o extrato enzimático, ácido *p*-hidroxi-benzóico e ácido linoleico. Assim como a MnP, as lacases também podem iniciar peroxidação de lipídeos promovendo a degradação da lignina. A atividade pró-oxidante somente ocorre quando há a presença de um mediador fenólico como o ácido *p*-hidróxi-benzóico, conforme demonstrado por Srebotnik e Boisson (2005). Um exemplo de uma reação monitorada no oxímetro é mostrado na figura 16.

A adição de ácido *p*-hidroxi-benzóico, extrato enzimático e íons Mn^{2+} dentro da solução contendo tampão acetato de sódio saturada com O_2 , não causaram consumo significativo de O_2 , indicando a ausência de reações de oxidação. Após a adição de ácido linoléico ao meio reacional, houve um pequeno acúmulo de O_2 dissolvido que é seguido de intenso consumo, devido ao início das reações de peroxidação. A mesma reação foi conduzida com extrato enzimático previamente fervido por 15 min para desnaturar a lacase presente. As

taxas de consumo de O_2 observada nessas reações controle foram baixas, porém quantificáveis e foram então devidamente descontadas da taxa total observada nos extratos com a enzima ativa. A taxa máxima de consumo de O_2 foi calculada para cada extrato nos tempos iniciais de reação.

A figura 17 mostra as taxas de consumo de oxigênio em reações iniciadas pelos filtrados dos meios cultivados provenientes de diferentes tempos de cultivo. O consumo de O_2 foi detectado em maior intensidade a partir do 6º dia, se mantendo constante até o 14º dia de cultivo, coincidindo com os níveis de lacases detectados nos mesmos cultivos (Figura 15). Desta maneira, é possível buscar uma relação direta entre a atividade de lacase e o consumo de oxigênio observado nas reações de peroxidação, o que está mostrado na figura 18. Apesar de poucos pontos experimentais, nota-se que elevadas taxas de consumo de O_2 correspondem aos extratos que também apresentaram elevadas atividades de lacase e que existe uma relação direta entre os dados.

Figura 16: Consumo de O_2 em reações de peroxidação de lipídeos catalisadas por extratos enzimáticos com alta atividade de lacase obtidos em cultivos líquidos de *E. grandis* biotratado por *C. subvermispota*.

Figura 17: Relação entre o consumo de oxigênio e o tempo de biodegradação em cultivos líquidos de *C. subvermispota* em meio líquido composto de extrato de malte (2,4%) e extrato de levedura (0,7%).

Figura 18: Relação entre os níveis de Lacase em filtrados de cultivos de *C. subvermispora* em meio líquido e as taxas de consumo de O_2 em reações de peroxidação de ácido linoléico.

É importante notar que as taxas de consumo de O_2 em reações iniciadas por lacases foram significativamente menores (cerca de 5 vezes) que as taxas observadas nas peroxidações iniciadas por MnP (Figura 10). Obviamente, a taxa de peroxidação é dependente da quantidade de enzima presente na reação.

Nos ensaios com MnP, as maiores atividades foram observadas nos extratos de cultivos suplementados e correspondiam a cerca de 500 UI/kg de madeira. Os cultivos em questão continham 50 g de madeira e foram extraídos com 200 mL de solução tampão o que significa atividades da ordem de 0,12 UI/mL de extrato. Nas reações de peroxidação com MnP, havia 0,5 mL de extrato enzimático em um volume final de 1,7 mL, correspondendo a atividades de MnP no meio reacional da ordem de 0,04 UI/mL de meio reacional. Já no caso das reações de peroxidação iniciadas por lacases, as maiores atividades da enzima produzida em cultivos submersos foram da ordem de 12 UI/L. Nas reações de peroxidação com lacase, havia 1,0 mL de filtrado enzimático em um volume final de 1,7 mL, correspondendo a atividades de lacase no meio reacional da ordem de 0,007 UI/mL de meio reacional.

A comparação entre as taxas máximas de consumo de O_2 nas reações de peroxidação iniciadas por MnP e por lacase indica valores da ordem de 15 nmol/min.mL e 3,5 nmol/min.mL, respectivamente. Nessas reações havia cerca de 0,04 UI/mL e 0,007 UI/mL de enzima, respectivamente. Ou seja, enquanto havia 5,7 vezes mais MnP, as taxas de peroxidação de ácido linoleico foram cerca de 4,3 vezes maior, o que sugere que a lacase e a MnP apresentam capacidade semelhante de peroxidar ácido linoleico. De qualquer forma, durante a biodegradação de *E. grandis* por *C. subvermispora*, lacase foi detectada somente no início dos cultivos e mesmo assim em níveis bastante baixos o que significa que a participação de lacase na peroxidação de lipídeos durante a biodegradação de *E. grandis* por *C. subvermispora* deve ser desprezível.

7 CONCLUSÕES

As diferentes condições de biodegradação da madeira de *E. grandis* por *C. subvermispora*, induziram diferentes níveis metabólicos e degradativos. A milhocina se mostrou um suplemento que estimula o crescimento fúngico e a produção de MnP. Na condição adicionada de glicose e milhocina foram detectados os mais elevados níveis metabólicos e a maior perda de massa total de madeira.

Os extratos enzimáticos obtidos a partir de cultivos de *C. subvermispora* sobre *E. grandis* contém MnP como a principal enzima oxidativa. Esses extratos promoveram a peroxidação de ácido linoleico e os níveis de peroxidação foram proporcionais aos níveis de atividade enzimática observada. No entanto, notou-se que as taxas de consumo de O₂ crescem numa menor proporção a partir de níveis de MnP maiores que 150 UI/kg o que corrobora com o mecanismo reacional proposto para a peroxidação de lipídeos iniciada por MnP. A determinação do acúmulo de TBARS durante a reação de peroxidação de ácido linoleico *in vitro* foi proporcional as taxas de consumo de O₂, indicando que os dois métodos podem indicar a ocorrência de reações de peroxidação de lipídeos iniciadas por MnP. Durante a reação de peroxidação, somente o aldeído hexanal foi detectado adequadamente pelo sistema analítico empregando (cromatografia gasosa). No entanto, a quantidade de hexanal formada não ultrapassa 4% da quantidade de ácido linoleico degradado na reação. Nos cultivos em meio líquido contendo extrato de malte e de levedura foi observada a secreção de lacases e a ausência de MnP até 14 dias de cultivo. As lacases produzidas nesse meio também foram capazes de iniciar a peroxidação de ácido linoleico, desde que na presença de ácido p-hidrobenzóico.

De maneira geral, as atividades pró-oxidantes parecem estar envolvidas na degradação da madeira por *C. subvermispora*. A caracterização da madeira biotratada indicou que as

maiores perdas de massa e de lignina ocorreram nos cultivos suplementados, sendo que aparentemente há uma correlação entre a extensão da degradação de madeira e lignina com a atividade peroxidativa dos extratos. Deste modo, pode-se concluir que as reações de peroxidação de lipídeos são de grande importância no metabolismo dos fungos de degradação branca e podem até ser exploradas como forma de degradar lignina *in vitro* com MnP ou mesmo por sistemas biomiméticos capazes de iniciar a peroxidação de lipídeos.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Efeito de óleo de soja na biodegradação de *pinus taeda* por *Ceriporiopsis subvermispora*. In: **COBEQ – CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA**, 16., 2006, Santos, São Paulo, Brasil.
- 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 subvermispora*. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 38, p.873-878, 2006.
- AKHTAR, M. *et al.* 1998. An overview of biomechanical pulping research. In: YOUNG, R and AKHTAR, M. **Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**. New York: John Wiley and Sons, 1998. p. 309-383.
- AKHTAR, 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 Berlin Heidelberg, 1997. v. 57, p. 159-195.
- ANDER, P.; MARZULLO, L. Sugar oxidoreductases and veratryl alcohol oxidase as related to lignin degradation. **J. Biotechnol.**, v. 53, p. 115-131, 1997.
- BLANCHETTE, R.A. *et al.* Cell wall alterations in loblolly pine wood decayed by the white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. **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.
- BOURBONNAIS, R.; LEECH, D.; PAICE, M.G. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. **Biochem Biophys Acta – General Subjects**, v. 1379, p. 381-390, 1998.
- CARVALHO, W.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F. Clean-up and concentration of manganese peroxidases recovered during the biodegradation of *Eucalyptus grandis* by *Ceriporiopsis subvermispora*. **Enzyme Microb. Technol.** Submetido, (DOI: 10.1016/j.enzmictec.2007.10.010 no prelo), 2008.
- DE JONG, E.; FIELD, J.; DE BOND, J. Aryl Alcohols in the Physiology of Ligninolytic Fungi. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 13, p. 153-188, 1994.
- ENOKI, M. *et al.* A novel fluorescent dicarboxylic acid, (Z)-1-7-nonadecadiene-2,3-dicarboxylic acid, produced by the fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. **Chem. Letters**, p. 54-55, 2000.

- ENOKI, M. *et al.* Extracellular lipid peroxidation of selective white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispota*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 180, p. 205-211, 1999.
- ERIKSSON, K.E.L.; BLANCHETTE, R.A.; ANDER, P. **Microbiological and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components**. Germany: Spring-Verlag, 1990. p. 560.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry, Ultrastructure and Reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.
- FERRAZ, A., *et al.* Estimating chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus by DIRFT spectroscopy and multivariate analysis. **Bioresourse Technol.**, v. 74, p. 201-212, 2000.
- FERRAZ, A. *et al.* Attempts to correlate biopulping benefits with changes in the chemical structures of wood components and enzymes produced during the wood biotreatment with *Ceriporiopsis subvermispota*, In: VIIKARI, *et al.* **Progress in Biotechnology**. 2002. v. 21, p. 73-80.
- FERRAZ, A. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: ESPOSITO, E e AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul. EDUCS, 2004. cap. 6, p. 215-242.
- FERRAZ, A.; DURÁN, N. Lignin degradation during softwood decaying by ascomycete *Chrysonilia sitophila*. **Biodegradation**, v. 6, p. 265-270, 1995.
- GALKIN, S. *et al.* Production of organics acids by different white-rot fungi as detected using capillary zone electrophoresis. **Biotechnol. Tech.**, v. 12, p. 267-271, 1998.
- GUERRA, A.; MENDONÇA, R.; FERRAZ, A. Molecular weight distribution of wood components extracted from *Pinus taeda* biotreated by *Ceriporiopsis subvermispota*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p.12-18, 2003.
- HAKALA, T.K. *et al.* Manganese peroxidases, laccases and oxalic acid from the selective White rot fungus *physisporinus rivulosus* grown on spruce wood chips. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 4, p. 461-468, 2005.
- HAMMEL, K.E. *et al.* Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 30, p. 445-453, 2002.
- HIGUCHI, T. **Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components**. Orlando: Academic Press, 1985. p. 679.
- HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbiol Technology**, v. 30, p. 454-466, 2002.
- JENSEN JR. E. *et al.* Manganese-dependent cleavage of nonphenolic lignin structures by *Ceriporiopsis subvermispota* in the absence of lignin peroxidase. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 3679-3686, 1996.

- KAPICH, A.N. *et al.* A rapid method to quantify pro-oxidant activity in cultures of wood-decaying white-rot fungi. **J. Microbiol. Meth.**, v. 51, p. 261-271, 2005.
- KAPICH, A.N.; GALKIN, S.; HATAKKA, A. Effect of phenolic acids on manganese peroxidase-dependent peroxidation of linoleic acid and degradation of a non-phenolic lignin model compound. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 25, n. 2-4, p. 350-358, 2007.
- KAPICH, A.N.; JENSEN, K.A.; HAMMEL, K.E. Peroxyl radicals are potential agents of lignin biodegradation. **FEBS Lett.**, v. 461, p. 115-119, 1999.
- KERSTEN, P. J.; KIRK, T.K. Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. **J. Bacteriol.**, v. 169, p. 2195-2002, 1987.
- KHINDARIA, A.; GROVER, T.A.; AUST, S.D. Oxalate-dependent reductive activity of Manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 314, p. 301-306, 1994.
- KIRK, T.K.; CULLEN, D. Enzimology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In: YOUNG, R and AKHTAR, M. **Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**. New York: John Wiley and Sons, 1998, p. 273-308.
- KUHAD, R.C.; SINGH, A.; ERIKSSON, K.E.L. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. In: ERIKSSON, K.E.L. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 57, p. 45-126, 1997.
- LEAL, A.M.C. **Biodegradação de *Eucalyptus grandis* pelo fungo de decomposição branca *Ceriporiopsis subvermispota*: Aspectos químicos e bioquímicos**. 1999. 112f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena – Lorena.
- 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. *et al.* Isoenzymes of manganese-dependent peroxidase and laccase produced by the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispota*. **Microbiology**, v. 140, p. 2691-2698, 1994.
- MACHUCA, A; FERRAZ, A. Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white- and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid state medium. **Enzyme Microbial Technol.**, v. 29, p. 386-391, 2001.
- 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.

- MASARIN, F; FERRAZ, A. Evaluation of *Eucalyptus grandis* biopulping with *Ceriporiopsis subvermispota* under non-aseptic conditions. **Holzforschung**, submetido (DOI 10.1515/HF.2007 no prelo), v. 61, 2008.
- MENDONÇA, R.M.T. **Avaliação de um Pré-Tratamento Biológico (biolpopação) para Obtenção de Polpas Químicas de Alto Rendimento**. 2002. 147f. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Departamento de Tecnologia Bioquímico Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – São Paulo.
- 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.
- MILAGRES, A.M.F. *et al.* Characterization of hemicellulases and cellulases produced by *Ceriporiopsis subvermispota* grown on wood under biopulping conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 436–442, 2006.
- MILAGRES, A.M.F; MAGALHÃES, P.O; FERRAZ, A. Purification and properties of a xylanase from *Ceriporiopsis subvermispota* cultivated on *Pinus taeda*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 253, p. 267–272, 2005.
- 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.
- RODRIGUÉZ, J. *et al.* Lignin biodegradation by the ascomycete *Chrysonilia sitophila*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 62, p. 233-242, 1997.
- SETHURAMANN, 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. 337-47, 1998.
- 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. **Estudo das enzimas produzidas por *Ceriporiopsis subvermispota* (Pilát) Gilbn. E Ryv. durante a biodegradação de *Pinus taeda* L..** 2002. 56f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia Industrial, Faculdade de Engenharia Química de Lorena – Lorena.
- SOUZA-CRUZ, P.B. *et al.* 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.
- SOUZA-CRUZ, P.B. **Morfo-Fisiologia da Biodegradação de Madeiras por *Ceriporiopsis subvermispota* (Pil.) Gibn & Ryv. e *Phlebia tremellosa* (Schrاد.: Dr.) Nakas & Burds.** 2005. 91f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia Industrial, Faculdade de Engenharia Química de Lorena – Lorena - 2005.

- SREBOTNIK, E. *et al.* Evidence that *Ceriporiopsis subvermispora* degrades nonphenolic lignin structure by a one-electron-oxidation mechanism. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, p. 4435-4440, 1997.
- 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.
- URZÚA, U. *et al.* Oxidation reactions catalyzed by manganese peroxidase isoenzymes from *Ceriporiopsis subvermispora*. **FEBS Letters**, v. 37, p. 132-136, 1995.
- VICENTIM, M.P. **Secreção diferenciada de Enzimas Lignocelulolíticas durante a Biodegradação de Madeira por Ceriporiopsis Subvermispora e resposta da Madeira Biotratada frente a processos posteriores de Polpação.** 2007. 139f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia Industrial, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo – Lorena.
- VICENTIM, M.P; FERRAZ, A. Enzyme production and chemical alterations of *Eucalyptus grandis* wood during biodegradation by *Ceriporiopsis subvermispora* in cultures supplemented with Mn^{2+} , corn steep liquor and glucose. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 40, p. 645-652, 2007.
- VICUÑA, R. Culture conditions of *Ceriporiopsis subvermispora* determine the pattern of MnP isoenzymes. In: **Internacional conference on biotechnology in the pulp and paper industry**, 1996. Vienna: Facultas-Unversitätsverlag. v. 6, p. 345-350.
- WATANABE, T. *et al.* Formation of acyl radical in lipid peroxidation of linolenic acid by manganese-dependent peroxidase from *Ceriporiopsis subvermispora* and *Bjerkandera adusta*. **European J. Biochem.**, v. 267, p. 422-431, 2000.
- WATANABE, T. *et al.* 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.