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

FERNANDO MASARIN

**Estudo da degradação de lignina iniciada por metabólitos
extracelulares extraídos de cultivos de *Ceriporiopsis*
*subvermispora***

**LORENA
2010**

FERNANDO MASARIN

**Estudo da degradação de lignina iniciada por metabólitos
extracelulares extraídos de cultivos de *Ceriporiopsis*
*subvermispora***

Tese apresentada à Escola de Engenharia
de Lorena da Universidade de São Paulo
para obtenção de título de doutor em
Ciências do Programa de Pós Graduação em
Biotecnologia Industrial na área de
concentração: Conversão de Biomassa

Orientador: Dr. André Luis Ferraz

**LORENA
2010**

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

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO
Assessoria de Documentação e Informação
Escola de Engenharia de Lorena – EEL/USP

Masarin, Fernando

Estudo da degradação de lignina iniciada por metabólitos extracelulares extraídos de cultivos de *Ceriporiopsis subvermispota*/ Fernando Masarin; orientador André Luis Ferraz. — Lorena, 2010.

107p.: fig..

Tese (Doutorado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

1. *Ceriporiopsis subvermispota* 2. Manganês-peroxidase 3. Lipídeos -Peroxidação 4. Lignina – Degradação I.Título. II Ferraz, André Luis , Orient.

CDU -577.15

AGRADECIMENTOS

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

Ao Centro de Biotecnología da Universidad de Concepción (Chile) pela oportunidade de realização de alguns experimentos.

Aos técnicos de laboratório, Zé Gambira e Zé Cobrinha pela assistência técnica, mas acima de tudo pela amizade e companheirismo.

Aos professores e demais funcionários do Debiq que me auxiliaram.

Às grandes e inesquecíveis amizades conquistadas durante todo este tempo no Debiq.

A CAPES pelo auxílio financeiro concedido desde o mestrado.

RESUMO

FERNANDO, F. **Estudo da degradação de lignina iniciada por metabólitos extracelulares extraídos de cultivos de *Ceriporiopsis subvermispota***. 2010. 107f. Tese (doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2010.

Ceriporiopsis subvermispota é um fungo filamentosos, muito seletivo na degradação de lignina e, por isso, tem sido uma das espécies mais estudadas no processo de biopolpação. A biopolpação consiste em um tratamento biológico da madeira que antecede etapas convencionais de polpação, proporcionando níveis de economia de energia elétrica no processo que podem atingir valores de 30 a 40%. Para degradar a lignina, esse fungo secreta a enzima manganês-peroxidase (MnP), a qual requer um ácido carboxílico para quelar e transportar íons Mn^{3+} oriundos do seu ciclo catalítico. O complexo quelante- Mn^{3+} degrada apenas frações fenólicas da lignina, porém pode também iniciar a peroxidação de lipídeos e com isso gerar radicais peroxila que apresentam capacidade oxidativa suficiente para degradar estruturas não-fenólicas da lignina. Com base nesses aspectos, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar a degradação de lignina por reações que envolvem a peroxidação de ácido linoléico iniciadas por metabólitos extracelulares extraídos de cultivos de *C. subvermispota*. Também foram avaliados sistemas miméticos baseados nos íons Fe^{2+} e Mn^{3+} como iniciadores das mesmas reações. Essencialmente, foi estudada a degradação de lignina *in vitro* em reações iniciadas por sistemas compostos que incluíram, $MnP/Mn^{+2}/H_2O_2$, Fe^{3+} /agentes redutores de Fe^{3+} produzidos durante a biodegradação da madeira, íons Mn^{+3} ou íons Fe^{+2} , todos adicionados ao ácido linoléico. Para realizar esse estudo foi necessário preparar, tanto MnP, quanto compostos redutores de Fe^{3+} , em cultivos de *C. subvermispota*. Também foram preparados e caracterizados dois substratos para as reações em estudo. Esses substratos compreenderam um complexo lignina-carboidrato (CLC) e um modelo de um material lignocelulósico completo, porém moído e livrado de toda a fração de extrativos. Nos dois casos, o material de partida foi à madeira de *Eucalyptus grandis*. A caracterização química desses substratos indicou um teor de lignina de 44,8% e 29,0%, respectivamente. Reações de peroxidação de ácido linoléico iniciadas pelos sistemas em estudo mostraram que todos foram efetivos para esse propósito, sendo que as maiores taxas de consumo de oxigênio durante essas reações foram observadas nos meios reacionais que continham Fe^{2+} em solução. O CLC inibiu as reações de peroxidação quando adicionado ao meio reacional em concentrações maiores do que 0,3 mg/mL. Entretanto, reações prolongadas por 72 h com o CLC numa concentração inicial de 1 mg/mL indicaram que ele sofreu despolimerização. As vias de degradação da lignina contida no CLC ou na madeira de *E. grandis* moída envolveram a despolimerização da molécula, ou simplesmente a oxidação das cadeias laterais e das estruturas fenólicas livres. Quando o sistema foi baseado na ação de $MnP/Mn^{+2}/H_2O_2$ /ácido linoléico, foram comprovadas vias de degradação da lignina que envolveram desde a simples oxidação do carbono- α até a quebra de ligações do tipo β -O-4 e/ou entre os carbonos α e β . Os resultados obtidos corroboraram dados anteriormente publicados para a ação de *C. subvermispota in vivo*. Uma exceção foi à observação da reação de simples oxidação do C α nos sistemas *in vitro*, que havia sido descartada em trabalhos anteriores que se basearam na caracterização de lignina contida em madeira biotratada por *C. subvermispota* (sistema *in vivo*). Os resultados permitiram concluir que vários sistemas miméticos podem iniciar a peroxidação de ácido linoléico *in vitro*. Quando essas reações foram conduzidas na presença de lignina (CLC ou *E. grandis* moído) foi possível observar transformações importantes na estrutura da lignina que eventualmente poderiam ser exploradas, por exemplo, em etapas de processos de branqueamento de polpas kraft.

PALAVRAS-CHAVE: *Ceriporiopsis subvermispota*. Manganês-peroxidase. Lipídeos - Peroxidação. Lignina - Degradação. Biopolpação

ABSTRACT

MASARIN, F. **Evaluation of lignin degradation initiated by extracellular metabolites recovered from *Ceriporiopsis subvermispota* cultures.** 2010. 107f. Thesis (Doctoral of Sciences) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2010.

The white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispota* degrades lignin selectively, being one of the most studied species in biopulping. Biopulping consists of a biological treatment of wood that precedes conventional pulping stages. The process can provide up to 30-40% of energy savings in mechanical pulping. To degrade lignin, this fungus secretes the enzyme manganese-peroxidase (MnP), which needs carboxylic acids to chelate and transport Mn^{3+} ions formed in the catalytic cycle of the enzyme. The chelate- Mn^{3+} complex is able to degrade phenolic structures of lignin; however, can also initiate lipid peroxidation reactions generating peroxy radicals that are able to degrade nonphenolic lignin structures. Based on this background, the aim of this work was to evaluate lignin degradation through linoleic acid peroxidation reactions initiated by extracellular metabolites recovered from *C. subvermispota* cultures. Some biomimetic systems based on Fe^{2+} and Mn^{3+} ions were also evaluated as initiators of such reactions. The lignin degradation was studied in reaction systems composed of MnP/ Mn^{+2}/H_2O_2 , Fe^{3+} -reducing compounds produced during wood biodegradation by *C. subvermispota*, Mn^{+3} or Fe^{+2} ions, all of them in the presence of linoleic acid. To perform this study, MnP and Fe^{3+} -reducing compounds were initially produced in *C. subvermispota* cultures. Two different reaction substrates were also prepared. One was a lignin-carbohydrate complex (LCC) and, the other, was a complete lignocellulosic material that was milled and extracted to remove the extractive fraction. Both substrates were prepared from *Eucalyptus grandis* wood. The chemical characterization of the substrates showed 44.8 % and 29.0 % of total lignin, respectively. Linoleic acid peroxidation reactions initiated by the studied systems showed that all of them were efficient on this purpose. The highest oxygen consumption rates during these reactions were observed in the Fe^{2+} initiated reactions. The LCC inhibited the peroxidation reactions when added to the reaction medium at concentrations higher than 0.3 mg/mL. However, prolonging the reactions up to 72h with LCC at 1 mg/mL showed that it was depolymerized. The lignin degradation routes involved depolymerization or simple side chain and free-phenolic structure oxidations. When the reactive system was based on the use of MnP/ Mn^{+2}/H_2O_2 /linoleic acid, some lignin degradation routes were demonstrated and they included C α -oxidation, as well as β -O-4 and/or C α -C β cleavages. These results corroborate previous findings published for the action of *C. subvermispota* *in vivo*. One exception was the simple C α oxidation that was observed for the *in vitro* reactions, but was ruled out by previous works that were based on the characterization of residual lignins extracted from wood samples biotreated by *C. subvermispota* (*in vivo* system). The current results permitted to conclude that several mimetic systems were able to initiate linoleic acid peroxidation *in vitro*. When these reactions were performed in the presence of lignin (LCC or milled *E. grandis*) it was possible to show the occurrence of several lignin transformation reactions that could be exploited, for example, in pulp bleaching processes.

Key words: *Ceriporiopsis subvermispota*. Manganese-peroxidase. Lipid peroxidation. Lignin degradation. Biopulping

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1 Madeira: Composição química e ultraestrutura.	11
2.2 Os processos de polpação e a biopolpação	14
2.3 Biodegradação da madeira – aspectos químicos e bioquímicos	15
2.4 Fundamentos sobre a peroxidação de lipídeos	21
2.5 Peroxidação de lipídeos e a biodegradação da madeira por fungos de decomposição branca	22
2.6 Supressão parcial da formação de radicais hidroxilas por <i>C. subvermispora</i>	27
3 OBJETIVOS	31
4 METODOLOGIA	32
4.1 Madeira utilizada	32
4.2 Obtenção de madeira moída livre de extrativos.....	32
4.3 Obtenção de um complexo-lignina carboidrato solúvel em água (CLC).....	33
4.4 Cromatografia de permeação em gel do CLC	33
4.5 Fungo	35
4.6 Preparação do inóculo fúngico.....	36
4.7 Experimentos de biodegradação da madeira	36
4.8 Extração da madeira biotratada com solução tampão suplementada com Tween 60 para recuperação e posterior purificação da MnP	37
4.9 Extração da madeira biotratada com água em pH 7.....	38
4.10 Reações de peroxidação do ácido linoléico monitoradas em um oxímetro	39
4.11 Reações de degradação do CLC	40
4.11.1 Misturas reacionais	40
4.11.2 Condução das reações e tratamento dos produtos finais	40
4.11.3 Aumento de escala das reações de degradação do CLC	41
4.12 Reações de degradação de <i>E. grandis</i>	42
4.13 Aumento de escala das reações com <i>E. grandis</i>	43
4.14 Isolamento de ligninas das madeiras de <i>E. grandis</i> por acidólise branda	44
4.15 Caracterização química de <i>E. grandis</i> , CLC e ligninas isoladas.....	44
4.15.1 Análise espectrofotométrica das ligninas na região do UV-visível.....	44
4.15.2 Determinação de carbonilas (estruturas tipo coniferaldeído e acetoguaiacona)	45
4.15.3 Determinação de hidroxílicas fenólicas.....	46
4.15.4 Análise espectroscópica das na região do infravermelho médio	46
4.15.5 Determinação da distribuição de massas molares	47
4.15.6 Caracterização por tioacidólise	47
4.15.7 Quantificação de grupos funcionais por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de fósforo (RMN- P^{31})	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 Preparação e purificação parcial de MnP produzida por <i>C. subvermispora</i> em cultivos sobre madeira	50
5.2 Obtenção de agentes redutores de Fe^{3+} presentes em extratos aquosos de <i>E. grandis</i> biotratado por <i>C. subvermispora</i>	52
5.3 Obtenção, caracterização e degradação de um complexo lignina-carboidrato (CLC)	54
5.3.1 Obtenção e caracterização do CLC	54
5.3.2 Peroxidação de ácido linoléico e degradação do CLC por íons Mn^{+3} ou MnP	57
5.3.3 Peroxidação de ácido linoléico e degradação do CLC por íons Fe^{+2} ou Fe^{+3} /agente redutores	63
5.4 Aumento de escala das reações de degradação do CLC.....	68

5.4.1 Caracterização do CLC degradado em reações iniciadas pelo sistema Mn^{+3} /ácido linoléico	70
5.4.2 Caracterização do CLC degradado em reações iniciadas pelo sistema Fe^{+2} /ácido linoléico	72
5.5 Degradação de madeira moída de <i>E. grandis</i> iniciada por MnP e sistemas miméticos ..	73
5.5.1 Degradação de <i>E. grandis</i> iniciada pelo sistema $MnP/Mn^{+2}/H_2O_2$ /ácido linoléico ou por Mn^{+3} /ácido linoléico	74
5.5.2 Degradação de <i>E. grandis</i> iniciada pelo sistema Fe^{+2} /ácido linoléico ou por Fe^{+3} /extrato redutor ácido linoléico	77
5.6 Aumento de escala das reações de degradação de <i>E. grandis</i> iniciada por MnP e sistemas miméticos	80
5.7 Recuperação e caracterização da madeira de <i>E. grandis</i> tratada por íons Fe^{+2} , Mn^{+3} ou $MnP/Mn^{+2}/H_2O_2$, todos adicionados ao ácido linoléico	83
5.7.1 Caracterização das ligninas de <i>E. grandis in situ</i>	84
5.7.2 Extração e caracterização das ligninas residuais das madeiras de <i>E. grandis</i>	88
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS	99

1 – INTRODUÇÃO

A produção de celulose e papel é um importante segmento industrial tanto no Brasil como em todo o planeta. Apesar da indústria de celulose e papel se encontrar em um nível de desenvolvimento bastante avançado, alguns problemas associados aos processos produtivos ainda persistem. A geração de efluentes de difícil tratamento, o elevado consumo de energia (principalmente na polpação mecânica) e o alto consumo de reagentes químicos estão entre os problemas que têm merecido mais atenção.

Uma alternativa para a redução no consumo de energia na produção de polpas mecânicas é a aplicação do processo de biopolpação. Esse processo tem como base a biodegradação da madeira sob condições controladas e com fungos pré-selecionados. A aplicação do biotratamento da madeira prévio à polpação mecânica permite considerável redução no consumo de energia (até 40 %) durante o refinamento mecânico da madeira. Além disso, as “biopolpas” obtidas em condições específicas de polpação apresentam propriedades mecânicas superiores às polpas mecânicas convencionais (AKHTAR et al., 1998; FERRAZ et al., 2008; MASARIN et al., 2009). Os resultados obtidos com a biopolpação são promissores e têm levado algumas empresas a avaliar o processo em escala piloto. Um exemplo no Brasil é dado pela empresa Melhoramentos Papéis Ltda que desenvolve estudos com o tratamento de cavacos numa escala de 50 toneladas por batelada experimental. O desenvolvimento de estudos em escala piloto tem permitido avaliar as limitações do processo, bem como direcionar estudos subsequentes no sentido de maximizar os benefícios do biotratamento da madeira (FERRAZ et al., 2008).

Do ponto de vista do entendimento dos mecanismos químicos e bioquímicos relacionados à biopolpação, trabalhos recentes indicam que a secreção da enzima Manganês peroxidase pelo fungo é fundamental para a obtenção dos benefícios nos processos subsequentes de polpação (HAKALA et al., 2004; VICENTIM; FERRAZ, 2008). O fungo mais utilizado nesses estudos tem sido *Ceriporiopsis subvermispota* e é notório que os efeitos benéficos da biopolpação são obtidos quando a extensão da degradação ainda é muito baixa (perdas de massa inferiores a 5 %). Adicionalmente, vários trabalhos encontrados na literatura mostram que não há uma correlação direta entre os benefícios da biopolpação e a extensão do processo biodegradativo (quantificado com base nas perdas de massa e/ou de componentes específicos da madeira) (FERRAZ et al., 2008; LEATHAN; MYERS; WEGNER, 1990; MENDONÇA et al., 2002). Essa falta de correlação sugere que os benefícios do biotratamento dependam mais do tipo de modificação induzida na madeira (alterações estruturais e ultra-estruturais) do que a extensão da mineralização de seus componentes.

O entendimento das causas dos benefícios na biopolpação e dos mecanismos envolvidos na biodegradação de lignina pode direcionar novos esforços no sentido de selecionar fungos mais apropriados, desenhar características desejáveis em organismos geneticamente modificados ou ainda propor sistemas miméticos que permitam simplificar as operações industriais propostas para o processo. Obviamente, esses avanços podem levar ao melhor desenvolvimento e otimização desse processo biotecnológico.

Dentro do contexto mencionado anteriormente, a presente tese pretende contribuir com o entendimento dos mecanismos envolvidos na degradação de lignina por *C. subvermispota*. Isso foi abordado a partir do emprego da uma enzima relevante no processo de biopolpação, a MnP, bem como na avaliação de sistemas miméticos correlacionados com a degradação de lignina. Em todas as situações, a hipótese de trabalho foi que a degradação de lignina por *C. subvermispota* deve depender de sistemas que iniciem a peroxidação de ácidos graxos (KAPICH et al., 1999).

Os estudos realizados nessa tese se fundamentaram em reações conduzidas *in vitro*, sob condições controladas e visaram contrapor as reações *in vitro* com as vias de degradação *in vivo* já descritas para a ação de *C. subvermispota*. Em termos experimentais, o estudo abordou a degradação de um modelo correspondente a um complexo lignina-carboidrato e de madeira de *Eucalyptus grandis* moída. As reações foram iniciadas por metabólitos extracelulares extraídos de cultivos de *C. subvermispota*, além de sistemas miméticos baseados nos íons Fe^{2+} e Mn^{3+} .

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Madeira: composição química e ultraestrutura

A composição química da madeira pode ser dividida em frações de baixa e elevada massas molares (FENGEL; WEGENER, 1989). A fração de baixa massa molar é composta por substâncias orgânicas, geralmente denominadas de extrativos, e substâncias inorgânicas, que são sais de íons metálicos (SJÖSTRÖM; WETERMARK, 1999). Os extrativos compreendem vários compostos químicos, que podem ser extraídos com solventes orgânicos, embora alguns deles também sejam solúveis em água (FENGEL; WEGENER, 1989). Estes compostos são responsáveis por características como odor, cor e sabor dos lignocelulósicos e estão presentes em pequenas quantidades (de 2 a 8%) (SJÖSTRÖM; WETERMARK, 1999). Como exemplos de extrativos, podemos citar: ceras, flavanóides, terpenos, lignanas e ácidos graxos, que são encontrados livres ou esterificados. Os compostos inorgânicos estão presentes em quantidades ainda menores na madeira (cerca de 1%) (FENGEL; WEGENER, 1989).

As macromoléculas representam a quase totalidade dos tecidos vegetais e compreendem apenas três classes de compostos: celulose, polioses (hemicelulose) e lignina (FENGEL; WEGENER, 1989).

A celulose é o componente mais abundante na madeira (cerca de 50%), sendo um polímero linear, com regiões amorfas e cristalinas, formado exclusivamente por moléculas de anidro-glicose, que se associam por ligações β -(1-4) glicosídicas (figura 1).

Figura 1 – Estrutura de um fragmento de celulose.

A massa molar da celulose varia consideravelmente ($50.000 - 2,5$ milhões g.mol^{-1}), dependendo da origem da amostra. Por tratar-se de um polímero autêntico, o tamanho das cadeias é usualmente especificado como grau de polimerização, que é a razão entre a massa molar média da celulose e a massa molar de uma unidade de anidro-glicose (FENGEL; WEGENER, 1989). Da mesma forma que a massa molar, o grau de polimerização varia com a origem da amostra, assumindo valores altos como no algodão (15.300) e chegando a menos de 305 no Rayon (FENGEL; WEGENER, 1989). Outra

característica da celulose é a possibilidade de formar ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, dando origem às microfibrilas. Na parede celular dos materiais lignocelulósicos, as microfibrilas de celulose estão paralelamente organizadas e encaixadas em uma matriz de hemicelulose e lignina (FENGEL; WEGENER, 1989; SJÖSTRÖM; WETERMARK, 1999).

As polioses são compostas pelos açúcares glicose, manose e galactose (hexoses) além de xilose e arabinose (pentoses), podendo ainda apresentar quantidades variáveis de ácidos urônicos e desoxi-hexoses em alguns tipos de madeira. Estes açúcares apresentam-se na forma de polímeros ramificados, de menor massa molar que a celulose e podem ser homopolímeros (por exemplo, xilana, formado por anidro-xilose na cadeia principal) ou heteropolímeros (por exemplo, glicomanana, formado por anidro-glicose e anidro-manose na cadeia principal). O teor de polioses em diferentes tipos de madeira é bastante variável, podendo-se admitir um valor médio de cerca de 20% (FENGEL; WEGENER, 1989; SJÖSTRÖM; WETERMARK, 1999).

A lignina é o segundo componente em maior quantidade nos lignocelulósicos e sua presença proporciona toda a complexidade existente nos processos de polpação. A lignina é uma macromolécula formada pela polimerização desidrogenativa de álcoois hidroxicinâmicos (p-cumarílico, coniferílico e sinapílico). Devido ao processo de polimerização ser aleatório, a macromolécula de lignina possui estrutura bastante complexa, como mostra o modelo da figura 2 (RALPH et al., 2004).

Uma parte das moléculas de lignina está ligada quimicamente com as polioses, ou seja, existe um complexo lignina-carboidrato na estrutura química da parede celular do vegetal. Algumas ligações já descritas para as pontes entre lignina e carboidratos em madeiras são mostradas na figura 3 (BALAKSHIN et al., 2007). A ocorrência dessas ligações foi confirmada em complexos lignina-carboidrato isolados de pinho moído, a partir da caracterização por ressonância magnética nuclear em duas dimensões. Na figura 3A nota-se uma ligação do tipo fenol glicosídeo; em 3B uma ligação do tipo éster e; em 3C uma ligação do tipo éter benzílico. No caso da ligação fenol glicosídica, a área correspondente no espectro foi integrada e indicou que essa ligação está presente em aproximadamente 8 unidades para cada 100 unidades C₉ da lignina.

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

Figura 2 – Estrutura – modelo da lignina (RALPH et al., 2004)

Figura 3 - Principais tipos de ligações entre carboidratos e lignina em complexos lignina-carboidrato: (A) fenol glicosídeo, (B) éster e (C) éter benzílico. Reproduzido de BALAKSHIN et al. (2007).

É importante ressaltar que os componentes da madeira encontram-se intimamente associados, para assim constituir o complexo celular da biomassa vegetal. Na parede celular do vegetal, tais compostos se organizam formando diferentes camadas. Desde a lamela média (ML) até o lúmen da célula, encontram-se as paredes primária (P), secundária, formada pelas camadas S_1 , S_2 e terciária T (ou S_3). A lignina ocorre, em maior quantidade, na parede S_2 e apresenta concentração elevada na lamela média. As polioses dispõem-se rodeando as microfibrilas de celulose (FENGEL; WEGENER, 1989; SJÖSTRÖM; WETERMARK, 1999). As figuras 4 A-B mostram as várias camadas da parede celular e ilustram como a lamela média envolve as células, funcionando como sustentador do complexo celular que forma uma árvore.

Figura 4 – (A) Corte ilustrativo do sistema de camadas na parede das células de madeira (FENGEL; WENEGER, 1989). (B) Microscopia eletrônica de transmissão das células de madeira mostrando as camadas da parede celular: ML = lamela média, P = parede primária, S_1 = parede secundária, S_2 = parede secundária e T = parede terciária (FENGEL; WENEGER, 1989).

2.2 – Os processos de polpação e a biopolpação

A indústria de papel e celulose tradicionalmente emprega os métodos de polpação química ou mecânica, ou a combinação desses, para a produção de polpas de várias características. A polpação química envolve o uso de reagentes químicos para degradar e dissolver a lignina, liberando as fibras. Esse processo produz polpa com um rendimento de cerca de 40-50%, baixo teor de lignina residual (da ordem de 1-2%), susceptibilidade ao branqueamento até alvuras maiores que 90% e resistência mecânica elevada. Apesar de produzir polpa de excelente qualidade, estes processos demandam um alto investimento

financeiro inicial para a construção de uma planta industrial. A polpação mecânica envolve o uso de força mecânica para separar as fibras. Esse processo produz polpa com um rendimento elevado (de 75-95%), além de fibras que geram papéis de boa opacidade. Os custos de instalação de uma planta industrial de polpação mecânica são muito menores que aqueles requeridos por uma indústria de polpação química. Entretanto, esse processo envolve um elevado consumo de energia elétrica, o papel produzido apresenta alta reversão de alvura (tendência de a cor amarela retornar com o tempo), baixa resistência mecânica e é difícil de ser branqueado, servindo apenas para a produção de jornais, catálogos, papelão e, em misturas com polpas de melhor qualidade, para papéis sanitários e absorventes (BIERMANN, 1993; FENGEL; WEGENER, 1989).

A biopolpação é um pré-tratamento dos cavacos de madeira com fungos selecionados que degradam preferencialmente a lignina. Mesmo com períodos curtos de biodegradação (15 a 30 dias), a madeira biotratada já apresenta um “amolecimento” característico que permite maior facilidade de desfibramento mecânico ou no caso da polpação química, maior facilidade de penetração dos reagentes, bem como maior susceptibilidade da lignina parcialmente degradada à solubilização pelos licores de polpação. Este pré-tratamento biológico permite uma redução de até 40% no consumo de energia para o desfibramento e refino mecânico posterior, ou no caso da polpação química, diminuição no tempo, na temperatura de reação ou mesmo na carga de reagentes químicos utilizados. Esta “amenização” nas condições necessárias para a produção de polpas celulósicas ainda proporciona a obtenção de polpas com melhor resistência mecânica, o que propicia um consumo menor de polpas químicas na fabricação de papéis a partir de polpas mecânicas (AKHTAR et al., 1998; FERRAZ et al., 2008; MASARIN et al., 2009; MESSNER, 1998).

2.3 - Biodegradação de madeira – aspectos químicos e bioquímicos

Os organismos encontrados na natureza mais eficientes na biodegradação de madeira são os fungos (FENGEL; WEGENER, 1989). Entre os fungos com capacidade de degradar madeira, os mais efetivos são os fungos de decomposição branca (“white-rot fungi”), que degradam todos os componentes da madeira, e os fungos de decomposição parda (“brown-rot fungi”), que degradam principalmente os polissacarídeos. Podemos citar também os fungos de decomposição branda (“soft-rot fungi”), que degradam todos os componentes, porém em velocidades muito reduzidas (KIRK; CULLEN, 1998). A biodegradação de madeira por esses organismos vem sendo atribuída a um conjunto de complexos enzimáticos e à participação de compostos de baixa massa molar, todos extracelulares.

Os fungos de decomposição branca possuem, em comum, a capacidade de degradar lignina e os polissacarídeos da madeira. Todavia, a quantidade relativa de lignina e celulose degradada e utilizada por esses fungos varia de acordo com o tipo preferencial de ataque. Segundo Kirk e Cullen (1998), esse grupo de fungos exibe dois tipos possíveis de ataque à madeira: o ataque simultâneo, no qual celulose, polioses e lignina são removidas (processo erosivo, figura 5); e a deslignificação, processo pelo qual o fungo degrada polioses e lignina, mantendo a celulose relativamente intacta (processo não erosivo, figura 6).

Figura 5 - Microscopia ótica mostrando o ataque progressivo (erosão) da parede celular de *Picea abies* por *Heterobasidium annosum*. Note que a célula ao centro apresenta erosões irregulares na parede celular. A escala no canto superior esquerdo da foto indica a magnitude do aumento. Reproduzido com modificações de Fengel e Wegener (1989).

Figura 6 – Micrografia – UV de *Pinus* sp. (A) madeira controle; (B) madeira tratada com *C. subvermispora* por 30 dias. As cores representam valores de absorbância em 280 nm na parede celular e os números para cada cor indicam o valor da absorbância definido entre zero no lúmen ("underflow") e 1.0 no canto das células ("overflow") (MENDONÇA et al., 2004).

A biodegradação da celulose é um tópico bem elucidado do ponto de vista bioquímico. A degradação do polímero é feita pela ação de três grupos de enzimas que atuam de forma seqüencial e sinergicamente. Estes grupos de enzimas compreendem as endo-1,4-β-

glicanases (rompem a molécula de celulose nas regiões amorfas ao acaso gerando fragmentos menores), as exo-1,4-β-glicanases ou celobiohidrolases (hidrolisam as moléculas de celulose pelas pontas, gerando dímeros de glicose) e as 1,4-β-glicosidases (hidrolisam a celobiose até glicose). Os diferentes grupos de enzimas atuam de forma cooperativa, causando a hidrólise completa de celulose até glicose (ERIKSSON; BLANCHETTE; ANDER, 1990; EVANS et al., 1994; HIGUCHI, 1985).

Observações ultraestruturais (RUEL; BARNOUD, 1985) e dados de análise química (KIRK; HIGHLEY, 1973) mostraram que as polioses são os primeiros polissacarídeos a ser degradados por fungos de decomposição branca. A biodegradação das polioses requer um conjunto de enzimas extracelulares mais complexo devido a sua estrutura de heteropolissacarídeo ramificado. A biodegradação das polioses ocorre de forma semelhante à da celulose. As enzimas envolvidas na biodegradação são hidrolases específicas que clivam determinados tipos de ligações existentes no polímero. Assim, por exemplo, as xilanases rompem ligações glicosídicas entre moléculas de xilose, enquanto as glucuronidases atuam sobre ramificações de ácidos glucurônicos ou as acetilesterases sobre as ramificações dos grupos acetila.

Um vasto grupo de enzimas tem sido relacionado à biodegradação da lignina. No entanto, até os dias de hoje, existem inúmeras dúvidas sobre a real participação de cada grupo e a função que cada um deles exerce no processo global de oxidação que leva a lignina até dióxido de carbono e água.

Desde a descoberta da lignina-peroxidase (LiP) (GLENN et al., 1983; TIEN; KIRK, 1983), e das peroxidases dependentes de Manganês (MnP) (KUWAHARA et al., 1984), as enzimas envolvidas na degradação de lignina têm sido agrupadas em duas classes distintas:

- Fenoloxidases e;
- Enzimas que produzem peróxido de hidrogênio.

As fenoloxidases compreendem um grupo de enzimas pertencentes às metaloproteínas. Entre elas, pode-se ainda identificar dois subgrupos:

- enzimas dependentes de peróxido ou peroxidases e;
- enzimas que não dependem de peróxido para atuar ou lacases.

É possível ordenar as enzimas do complexo ligninolítico segundo suas capacidades de oxidação: LiPs > MnPs > Lacases (KIRK; CULLEN, 1998). As LiPs são heme-proteínas que apresentam capacidade oxidativa suficientemente elevada para abstrair elétrons de estruturas aromáticas não fenólicas, dando origem a radicais catiônicos. As MnPs também são heme-proteínas, porém diferem das LiPs por dependerem de Mn^{2+} e apresentarem capacidade oxidativa suficiente apenas para abstrair elétrons de estruturas fenólicas. As Figuras 7 e 8 mostram os ciclos catalíticos destas duas enzimas, respectivamente

(FERRAZ, 2004). Nos dois casos, a enzima é ativada através de oxidação por H_2O_2 , levando a formação do composto " C_I " que é um oxo-complexo deficiente em 2 elétrons. A redução do C_I até a enzima nativa se dá através de duas etapas de abstração de 1 elétron de cada vez. No caso das LiPs, a redução de C_I a C_{II} e também de C_{II} a C_0 pode ocorrer através da oxidação de substratos não fenólicos levando a formação de radicais cátion.

Figura 7 – Ciclo catalítico simplificado de lignina-peroxidase (LiP). S representa um substrato aromático não fenólico (FERRAZ, 2004).

As MnPs dependem exclusivamente de Mn^{2+} para a redução de C_{II} a C_0 (Figura 8). O composto C_I pode ser reduzido ao composto C_{II} à custa da oxidação direta de uma estrutura fenólica ou de um átomo de Mn^{2+} . Por outro lado, o Mn^{3+} formado é bastante reativo e pode atuar como um mediador da MnP, pois normalmente é estabilizado por quelantes produzidos pelo próprio fungo, como o ácido oxálico (KIRK; CULLEN, 1998). O complexo organometálico Mn^{3+} -oxalato, por sua vez, pode ser reduzido à custa da oxidação de outra estrutura fenólica.

Figura 8 – Ciclo catalítico da peroxidase dependente de manganês (MnP). RH representa um substrato fenólico. Reproduzido de Hofrichter (2002), com modificações.

As lacases são cupro-proteínas e atuam diretamente sobre estruturas fenólicas através da oxidação dos fenóis pela abstração de 1 elétron mediada pela redução de Cu^{2+} a Cu^+ , que por sua vez, reduz O_2 a H_2O , permitindo que a enzima atue de forma cíclica (Figura 9).

Figura 9 – 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 2 cadeias protéicas acopladas), 4 substratos fenólicos, 4 prótons e 1 molécula de O_2 (FERRAZ, 2004).

As enzimas que produzem peróxido de hidrogênio são acessórias as peroxidases. Estas enzimas geram peróxido de hidrogênio *in situ* e possibilitam que as peroxidases atuem. As principais enzimas produtoras de peróxido envolvidas na biodegradação de lignina são glicose oxidase e metanol oxidase (intracelulares) que utilizam glicose e metanol como substratos, respectivamente (KIRK; CULLEN, 1998; KUHAD; SINGH; ERIKSSON, 1997). A glicose é originária da biodegradação da celulose e das polioses que contêm glicose. O metanol é produzido durante a biodegradação da própria lignina através da remoção de metoxilas ligadas aos anéis aromáticos. A produção de H_2O_2 por enzimas extracelulares também tem sido descrita em alguns fungos de decomposição branca. Entre

elas estão a glioxal oxidase (KERSTEN; KIRK, 1987) e a aril-álcool oxidase (ANDER; MARZULLO, 1997; DE JONG *et al.*, 1994). Também foi demonstrado que MnP pode gerar H_2O_2 a partir da oxidação de ácidos orgânicos como o malônico e o oxálico (URZÚA; KERSTEN; VICUÑA, 1998).

A existência de vários fungos degradadores de lignina que não produzem LiP, como *C. subvermispora*, *Panus tigrinus*, *Rigidoporus lignosus*, *Picnoporus cinnabarinus* e *Dichomitus squalens* (KUHAD; SINGH; ERIKSSON, 1997), lançou dúvidas quanto à forma com que esses organismos oxidam estruturas não fenólicas, uma vez que os complexos enzimáticos oxidativos produzidos nestes casos não apresentam capacidade oxidativa elevada o suficiente para abstrair elétrons de anéis aromáticos (FERRAZ, 2004). Adicionalmente, alguns trabalhos vêm apresentando dúvidas quanto a real participação das enzimas ligninocelulolíticas no processo de degradação de substratos complexos como a madeira, principalmente nas etapas iniciais de biodegradação. Esses estudos têm mostrado que enzimas são compostos demasiadamente grandes para penetrar na parede de células de madeiras intactas em tempos curtos de degradação. Por exemplo, Blanchette e seus colaboradores (1997) mostraram que durante a degradação de *Pinus sp* por *C. subvermispora* as células vão se tornando gradualmente permeáveis à insulina (5.700 g.mol^{-1}) e a mioglobina ($17.600 \text{ g.mol}^{-1}$). Contudo, a ovalbumina ($44.300 \text{ g.mol}^{-1}$), que possui tamanho similar às enzimas LiP, MnP e muitas polissacaridases, foi permeável somente em estágios relativamente avançados de degradação (8 semanas). Porém, durante a degradação seletiva de lignina por *C. subvermispora*, estudos feitos por microscopia UV (figura 6) (MENDONÇA *et al.*, 2004) tem mostrado a remoção de lignina da parede celular em tempos curtos de degradação (30 dias), quando os sistemas enzimáticos ainda não teriam acesso aos componentes da parede celular.

Para justificar estas observações, alguns autores vêm propondo teorias sobre a participação de compostos de baixa massa molar, que poderiam agir nos estágios iniciais de degradação, abrindo espaço para a penetração dos complexos enzimáticos (GOODELL *et al.*, 1997). No caso específico do basidiomiceto *C. subvermispora*, alguns trabalhos indicam que a peroxidação de lipídeos poderia ser um processo mediador que permitiria as MnPs degradar estruturas não fenólicas à distância (KAPICH *et al.*, 1999; WATANABE *et al.*, 2000). Neste caso, os ácidos graxos insaturados produzidos durante o crescimento do fungo seriam peroxidados através de uma reação induzida por MnP. Outra hipótese seria a peroxidação de lipídeos a partir da reação de Fenton (AGUIAR; SOUZA-CRUZ; FERRAZ, 2006). Maiores detalhes sobre a peroxidação de lipídeos serão discutidos nos itens seguintes, 2.4 e 2.5.

2.4 - Fundamentos sobre a peroxidação de lipídeos

A peroxidação de lipídeos é uma reação muito estudada pela sua importância biológica, visto que muitas membranas celulares apresentam camadas lipídicas que podem ser degradadas pela ação de radicais livres (SOUTHORN; POWIS, 1988). Os lipídeos di- e poli-insaturados possuem grupos CH_2 alílicos que podem ser facilmente oxidados por agentes oxidantes, principalmente as espécies ativas de oxigênio, que incluem o radical $\text{OH}^\bullet$ ($\text{HO}^\bullet$), o radical superóxi-ânion ($\text{O}_2^{\cdot -}$) e o radical hidroperoxila ($\text{HOO}^\bullet$), que resulta da protonação em pHs ácidos do radical superóxi-ânion. Vários metais de transição também podem ser reduzidos à custa da oxidação de lipídeos di e poli-insaturados. A oxidação do grupo CH_2 alílico gera um radical centrado no carbono que rapidamente reage com oxigênio dando origem a um radical organo-peroxila em uma estrutura de dieno conjugado (Figura 10). O radical organo-peroxila tem uma capacidade oxidativa maior que o radical centrado no carbono. Esse radical pode: a) oxidar um novo grupo CH_2 , propagando a reação de peroxidação; b) abstrair um hidrogênio de algum doador, gerando um hidroperóxido lipídico que ainda é instável e irá se decompor; ou c) dar origem a reações de terminação que envolvem o acoplamento de radicais (SOUTHORN; POWIS, 1988). Como os hidroperóxidos lipídicos formados não são estáveis, um número variado de aldeídos se forma durante a reação de peroxidação, sendo os principais o malondialdeído, o pentanal, o hexanal e o glioxal (WATANABE et al., 2001).

Figura 10 - Peroxidação de lipídeos insaturados iniciada por Mn^{3+} ou radical hidroxila. Reproduzido de Southorn e Powis, 1988 com modificações.

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) iniciadas por MnP. Vários compostos recalcitrantes podem ser decompostos em um meio reacional que contenha MnP/Mn²⁺/H₂O₂ e ácido linoléico emulsionado em algum surfactante como o Tween 20 (mistura de ácidos graxos saturados) (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 linoléico iniciada pela oxidação por Mn³⁺, gerado no ciclo catalítico da MnP. Em um estudo sobre a degradação de fluoreno, foi demonstrado claramente que a reação de degradação era inibida pela adição de seqüestradores de radicais livres como o butil-hidroxitolueno (BOGAN; LAMAR; HAMMEL, 1996).

2.5 - Peroxidação de lipídeos e a biodegradação de madeira por fungos de decomposição branca

Em uma série de trabalhos esclarecedores, o grupo de Hammel (JENSEN et al., 1996; KAPICH et al., 1999; SREBOTNIK et al., 1997) demonstrou que o mecanismo químico envolvido na decomposição de lignina por *C. subvermispora* deve passar necessariamente por um modelo onde um elétron é abstraído diretamente de estruturas não fenólicas. Ou seja, a abstração de elétron é induzida por espécie ativa com elevada capacidade de oxidação. Isso foi demonstrado pela determinação dos produtos de degradação de um composto modelo de lignina, marcado com carbono 13, 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 Mn³⁺ oriundo da ação de MnP. Enoki et al. (1999), demonstraram que *C. subvermispora* produz vários ácidos graxos quando cultivado em meio sólido contendo madeira moída pré-extraída para a remoção da fração lipídica (ácidos linoléico, oléico, valérico, palmítico e esteárico). Esses ácidos foram produzidos principalmente nos estágios iniciais da biodegradação tendo suas concentrações diminuídas significativamente após 2 semanas de cultivo, o que foi seguido pelo aparecimento de hidroperóxidos orgânicos. Esses dados levaram os autores a relacionar a formação dos hidroperóxidos orgânicos com a ação de Mn³⁺ (oriundo da oxidação de Mn²⁺ por MnP) sobre os ácidos graxos, seguido da adição de oxigênio aos

radicais alila inicialmente formados, exatamente como já bastante estudado para a peroxidação de lipídeos. O mesmo grupo (WATANABE et al., 2000) demonstrou posteriormente que há a formação de diversos radicais, incluindo o radical acila por ação de MnP sobre ácido linoléico. 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 linoléico por MnP purificada a partir de cultivos de *C. subvermispora*. Nesse estudo foi determinado que a peroxidação de ácido linoléico pelo sistema MnP/Mn²⁺/H₂O₂ 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. Essa reação produz quimiluminescência com um espectro com λ máximo entre 700 e 710 nm sem nenhum ombro na região de 630 nm. Esse espectro de emissão não corresponde a espécies excitadas bem documentas como carbonila triplete (λ máx 400-500 nm), bi-acila (acoplamento de 2 radicais acila) triplete (λ máx 500-600 nm) e oxigênio singlete (λ máx 634 nm e 703 nm) (WATANABE et al., 2001). Os autores concluem que a emissão de luz na reação de glioxal com MnP é um evento químico novo e de difícil explicação baseada na ocorrência de espécies excitadas oriundas de radicais acila anteriormente descritas.

Kapich et al. (1999), demonstraram que os radicais peroxila oriundos da peroxidação de ácido linoléico por MnP de *P. chrysosporium* 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 11). A degradação leva a formação principalmente do composto (2). Porém, a clivagem da ligação β -O-4 do modelo (1), também gera o produto secundário (3). Outra possibilidade é a oxidação C α -C β do modelo (1). Neste caso, radicais peroxilas oxidam o modelo (1) pela transferência de um elétron (e um próton) do anel aromático, levando também a posterior degradação do composto modelo. Esse mecanismo leva a formação do produto (5) que ainda pode ser oxidado pelos radicais peroxilas gerando o produto (4).

Figura 11 - Degradação de um composto modelo de lignina (não fenólico) pelo sistema MnP, ácido linoléico e H $_2$ O $_2$. O modelo proposto explicaria as vias de oxidação da lignina. A C α -oxidação seria iniciada pela abstração de um hidrogênio benzílico e a C α -C β -oxidação seria iniciada pela transferência de um elétron do anel aromático, ambas através da ação de um radical peroxila gerado pelo sistema MnP/ácido linoléico/H $_2$ O $_2$. Reproduzido de Kapich et al., 1999.

O mesmo grupo (KAPICH et al., 2005b) demonstrou a influência de tipos diferentes de quelantes (ácidos orgânicos) de metais de transição na geração de radicais peroxila oriundos da atividade pro-oxidante de ácido linoléico por MnP de *Stropharia coronilla*. O meio reacional com tampão acetato de sódio mostrou uma atividade pro-oxidante do ácido linoléico muito maior que o malonato e tartarato. Além disso, a peroxidação de ácido linoléico foi iniciada sem a presença de H $_2$ O $_2$, porém na sua presença aumentou ainda mais a atividade pro-oxidante do meio reacional. A degradação do modelo de lignina (figura 11) foi proporcional às atividades pro-oxidantes citadas, sendo que a maior degradação foi a peroxidação de ácido linoléico com tampão acetato. No entanto, a adição de H $_2$ O $_2$ proporcionou menor degradação do modelo, ao contrário da atividade pro-oxidante observada para a mesma reação. Para explicar esse fato, os autores sugerem uma possível inibição da enzima por H $_2$ O $_2$ nesta condição.

Outros estudos demonstraram a degradação de um modelo de lignina fenólico (1) e não fenólico (2) por extratos obtidos de *C.subvermispora in vitro* (figura 12). A presença de manganês e peróxido de hidrogênio também mostrou aumento na degradação, pois experimentos com Tween 80 sem adição de sulfato de manganês e/ou peróxido de hidrogênio não demonstraram degradação do composto modelo não fenólico. Experimentos *in vivo* em meio líquido com micélio de *C. subvermispora* mostraram a degradação do composto fenólico e também a do composto não fenólico em 21 dias de incubação. A

degradação foi muito maior para o modelo fenólico (80%) em comparação com o modelo não fenólico (1,5%) (DAINA et al., 2002).

Figura 12 – Composto modelo de lignina (ligação trans-β-5) fenólico (1) e não fenólico (2) (DAINA et al., 2002).

Kapich, Galkin e Hatakka (2007) também demonstraram que a peroxidação de lipídeos iniciada através do sistema $\text{MnP}/\text{Mn}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{ácido linoléico}$ pode ser inibida por diversos compostos aromáticos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonóides, taninos e outros compostos encontrados na madeira). Os principais inibidores foram os ácidos 3,4-dihidróxido benzóico, ferúlico e caféico. A inibição da peroxidação de lipídeos foi afetada principalmente por compostos com hidroxilas fenólicas livres e parece ser proporcional a quantidade dessas hidroxilas. Por exemplo, o ácido 3,4-dihidróxido benzóico, um dos maiores inibidores, apresenta duas hidroxilas fenólicas livres. Esses compostos são conhecidos como antioxidantes, atuando de forma que impedem ou/e inibem a reação de peroxidação de ácido linoléico. O mecanismo da inibição da peroxidação de lipídeos por esses compostos não é totalmente conhecido, porém existe a possibilidade das hidroxilas fenólicas atuarem como quelantes de íons metálicos de transição, ou ainda como doadores de hidrogênio (KAPICH; GALKIN; HATAKKA, 2007). A degradação de um modelo de lignina não fenólico também foi inibida quando as reações foram realizadas com a adição desses antioxidantes. No entanto, a maioria dos compostos aromáticos fenólicos testados apenas inibiu parcialmente a degradação do modelo de lignina.

Os dados mencionados anteriormente indicam que a peroxidação de lipídeos é uma reação importante em cultivos de fungos de decomposição branca, especialmente os que degradam seletivamente a lignina. 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 (KAPICH; GALKIN; HATAKKA, 2007).

O grupo de Hammel (BAO et al., 1994) também demonstrou a degradação de uma lignina sintética fenólica (contendo cerca de 10% de unidades fenólicas) pelo sistema $\text{MnP}/\text{ácidos graxos insaturados}$. As reações foram realizadas em um meio reacional

contendo MnP de *P. chrysosporium*, tween 80 e íons Mn^{+2} e monitoradas através de cromatografia de permeação em gel (CPG). Nesse ensaio foi observado uma diminuição na massa molar média aparente (Mw) da lignina fenólica após 72 h de reação (de 6 kDa no controle para 4,2 kDa na reação completa), o que indica a despolimerização da lignina. No entanto, em 24 h de reação houve aumento da Mw da lignina, o que sugere a polimerização da mesma. Também foram realizados ensaios com a lignina sintética exaustivamente metilada (não fenólica) no mesmo meio reacional. Neste caso também foi observada uma diminuição na Mw da lignina após 72 h de reação.

Srebotnik e Boisson (2005) demonstraram recentemente que também lacases podem iniciar reações de peroxidação de lipídeos desde que na presença de mediadores como o ácido 4-hidroxi-benzóico (AHB) ou lignina sintética (DHP). A peroxidação de ácido linoléico 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 linoléico 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 linoléico.

A reação de Fenton também pode funcionar como um processo iniciador da peroxidação de lipídeos. Na reação de Fenton, um metal de transição como o Fe^{2+} ou o Cu^{1+} decompõe H_2O_2 em radical hidroxila e íon hidróxido. Se a reação ocorre em meio ácido, tipicamente encontrado em cultivos de fungos de decomposição branca, a reação gera radical hidroxila e água (Esquema 1)

Essa reação é especialmente importante em cultivos de fungos degradadores de madeira, pois a maioria dos fungos de decomposição parda e também alguns fungos de decomposição branca produzem compostos di-hidroxi-aromáticos e/ou hidroxi-metoxi-aromáticos que possuem capacidade de reduzir Fe^{3+} e Cu^{2+} (AGUIAR; SOUZA-CRUZ; FERRAZ, 2006; FERRAZ et al., 2001; GOODELL et al., 1997; GOODELL, 2003; HAMMEL et al., 2002; MESSNER, 2003). Como nos mesmos cultivos há a produção de H_2O_2 (URZÚA; KERSTEN; VICUÑA, 1998; KIRK, CULLEN, 1998), os ingredientes da reação de Fenton estão simultaneamente presentes. De fato, muito da atividade agressiva para a decomposição de polissacarídeos de fungos de decomposição parda tem sido atribuída à oxidação iniciada por radicais hidroxila (GOODELL, 2003). Além de metabólitos fúngicos com atividade redutora de Fe^{3+} e Cu^{2+} , os cultivos de basidiomicetos sobre madeira geram

inúmeros produtos de degradação da lignina que também apresentam capacidade redutora de íons metálicos, além de a própria madeira conter alguns extrativos solúveis em água com a mesma capacidade (AGUIAR; SOUZA-CRUZ; FERRAZ, 2006).

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

Os radicais hidroxila oriundos da reação de Fenton também podem oxidar ácido linoléico e dessa forma atuar como iniciadores da peroxidação de lipídeos (SOUTHORN; POWIS, 1988). Kapich et al. (1999) demonstraram que os radicais peroxila oriundos da peroxidação de ácido araquidônico (ácido graxo insaturado) por Fe^{+2} podem atuar em modelos de lignina não fenólicos, abstraindo um elétron (e um próton) do carbono alfa, levando a posterior degradação do composto modelo, conforme já ilustrado na figura 11 para a ação da MnP. Dessa forma, além da atividade das enzimas MnP e lacase nos cultivos de fungos degradadores de madeira, também a atividade redutora de íons metálicos e obviamente a atividade geradora de H_2O_2 são eventos críticos dentro do processo de peroxidação de lipídeos.

2.6 - Supressão parcial da formação de radicais hidroxila por *C. subvermispora*

Com base no exposto no item anterior é de se supor que a reação de Fenton ocorra com frequência em cultivos de basidiomicetos sobre madeira. Recentemente, Gutiérrez et al. (2002) analisaram cultivos de 4 espécies de basidiomicetos na biodegradação de *Eucalyptus*, incluindo *Phlebia radiata*, *Pleurotus pulmonarius*, *Bjerkandera adusta* e *C. subvermispora*. Nesses cultivos, foi identificada uma nova classe de lipídeos dicarboxílicos de cadeia longa, sendo alguns deles insaturados, os quais se acumularam principalmente nos meios cultivados com *C. subvermispora* (24 mg / 100 g de madeira). No decorrer dos períodos de biodegradação estudados (1, 2, 4 e 7 semanas), ocorreu hidrólise de ésteres presentes originalmente na madeira, aumentando a concentração de ácidos linoléico, palmítico, oléico e esteárico na forma livre. Supõe-se que os fungos efetuaram reações de condensação envolvendo estes ácidos graxos, sintetizando ácidos alquilítacônicos, principalmente os ácidos tetradecil, *cis*-7-hexadecenil- e hexadecil-itacônico.

Um isômero do ácido *cis*-7-hexadecenil-itacônico, 1,7-nonadecadieno-2,3-dicarboxílico, e os ácidos 1-heptadeceno-2,3-dicarboxílico e 1-nonadeceno-2,3-dicarboxílico também foram identificados em cultivos de *C. subvermispora* por um grupo de pesquisadores japoneses (AMIRTA et al., 2003; ENOKI et al., 2000) (Figura 13). Esse grupo propõe que os ácidos alquil-itacônicos podem participar na supressão da reação de Fenton através da interação e indisponibilização de íons Fe^{+2} e Fe^{+3} , além de evitar também a repolimerização de fenóis derivados de lignina, oxidados pela ação enzimática (ENOKI et al., 2002; WATANABE et al., 2002).

Figura 13 - Estrutura dos ácidos alquil-itacônicos produzidos em cultivos de *C. subvermispora*. Adaptado de Amirta et al. (2003).

As hipóteses postuladas pelo grupo de Watanabe encontram certa corroboração em dados de nosso grupo de pesquisa quando da abordagem da degradação de celulose por *C. subvermispora* em cultivos sobre *E. grandis*, *E. globulus*, *P. radiata* e *P. taeda*. Esse fungo é capaz de decompor lignina sem ocasionar grandes perdas de glucana (FERRAZ et al., 2000a, b, c; FERRAZ et al., 2001; MENDONÇA; GUERRA; FERRAZ, 2002), indicando que o fungo deve apresentar algum sistema que possa inibir a geração de radicais hidroxila. Por exemplo, durante a biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispora*, somente uma pequena perda de glucana (2%) pôde ser observada, mesmo em estágios avançados de biodegradação (90 dias) (MENDONÇA; GUERRA; FERRAZ, 2002). No entanto, parte da celulose residual é despolimerizada a partir de 30 dias de biodegradação, indicando que ao menos algum nível de degradação deve ocorrer (GUERRA; MENDONÇA; FERRAZ, 2003). Essa despolimerização de celulose poderia ser induzida tanto por radicais hidroxila oriundos da reação de Fenton como pela ação de endoglucanases que são produzidas pelo fungo (AGUIAR; SOUZA-CRUZ; FERRAZ, 2006; HEIDORNE et al. 2005; SETHURAMAN; AKIN; ERIKSSON, 1998; SOUZA-CRUZ et al. 2004;). Em um trabalho recente, Goodell et al.

(2006) demonstraram a capacidade redutora de Fe^{+3} de diversos fungos de decomposição parda e branca. Em geral, a capacidade redutora de Fe^{3+} dos fungos de decomposição parda foi 5 vezes maior do que aquela observada nos fungos de decomposição branca, incluindo *C. subvermispora*. Essa diferença pode ser atribuída à supressão da atividade redutora como postulado pelo grupo de Watanabe (RAHMAWATI et al., 2005; WATANABE et al., 2002), ou ainda pela secreção de elevadas quantidades de ácido oxálico no meio que também pode quelar e indisponibilizar Fe^{3+} para as reações de redução por derivados fenólicos e a posterior reação de Fenton (AGUIAR; SOUZA-CRUZ; FERRAZ, 2006; AGUIAR; FERRAZ, 2008).

Alguns trabalhos recentes do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a peroxidação de ácido linoléico pode ser iniciada através da adição de íons Fe^{+2} ao meio reacional sem a necessidade da adição de H_2O_2 (HORTA, 2008). Além disso, a adição de metanol (um conhecido supressor de radicais hidroxila) na reação não muda a velocidade de peroxidação de ácido linoléico, sugerindo que provavelmente não há a formação de radicais hidroxila no meio reacional. Nesta reação, o ácido linoléico possivelmente é oxidado através do radical hidroperoxila formado pela redução do oxigênio por Fe^{+2} em meio ácido.

Também recentemente, se avaliou a capacidade redutora de Fe^{+3} por extratos de *E. grandis* cultivados com *C. subvermispora* (HORTA, 2008). Os dados mostraram que a capacidade redutora aumenta ao longo do tempo de biotratamento até tempos de cultivo de 28 dias. Apesar de haver atividade redutora de Fe^{3+} nos cultivos de *C. subvermispora*, Aguiar e Ferraz (2008) mostraram que a concentração de H_2O_2 em cultivos de *C. subvermispora* sobre madeira é relativamente baixa (entre 7 a 24 μM). Um contraponto a esses valores pode ser obtido por dados publicados por Kerem, Jensen e Hammel (1999) que encontraram concentrações de H_2O_2 de 50 a 300 μM em cultivos de *Gloeophyllum trabeum*, um fungo de decomposição parda. Todos esses dados em conjunto sugerem que a reação de Fenton pode ser limitada não somente por agentes quelantes, mas também pela baixa concentração de H_2O_2 nos cultivos de *C. subvermispora*.

A ocorrência de ácidos alquilítacônicos no meio extracelular de cultivos de *C. subvermispora* sobre madeira certamente previne a degradação de celulose pela reação de Fenton conforme demonstrado recentemente (RAHMAWATI et al., 2005). No entanto, do ponto de vista evolutivo, o fungo não deve ter desenvolvido um sistema que lhe limitasse em capacidade de metabolizar fontes de carbono energéticas como a celulose. De fato, *C. subvermispora* apresenta distribuição geográfica restrita a regiões do Norte dos Estados Unidos e Sul do Canadá e, aparentemente, é pouco apto a competir com outros fungos degradadores de madeira justamente por sua limitada capacidade de consumir celulose. É provável que os ácidos alquilítacônicos também sejam substratos para processos de peroxidação e conseqüente geração de radicais peroxila e acila que teriam como função

principal a degradação de lignina. A elevada capacidade quelante desses ácidos para íons Fe^{3+} e Fe^{2+} implicaria, portanto, somente em um efeito secundário que culmina na supressão das reações de Fenton e a conseqüente limitação da degradação de celulose.

3 – OBJETIVOS

O objetivo principal desse trabalho foi avaliar a degradação de lignina por reações que envolvem a peroxidação de ácido linoléico iniciadas por metabólitos extracelulares extraídos de cultivos de *Ceriporiopsis subvermispota*, além de sistemas miméticos baseados nos íons Fe^{2+} e Mn^{3+}

Para alcançar esse objetivo, foram propostas as seguintes etapas experimentais:

- Preparação e caracterização de um complexo lignina-carboidrato a partir da madeira de *E. grandis*;
- Preparação e caracterização de um substrato lignocelulósico completo, moído e livre de extrativos;
- Preparação e purificação parcial de MnP produzida por *C. subvermispota* em cultivos sobre madeira;
- Extração e recuperação dos metabólitos de baixa massa molar relacionados ao processo de biodegradação de madeira (extrato aquoso);
- Avaliação da peroxidação de ácido linoléico *in vitro* iniciada por íons Mn^{+3} , Fe^{+2} , $\text{MnP}/\text{Mn}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ ou ainda Fe^{3+} e agentes redutores oriundos dos extratos aquosos de madeira biotratada;
- Avaliação da degradação *in vitro* do complexo lignina-carboidrato e do modelo lignocelulósico completo em meios reacionais que continham ácido linoléico e íons Mn^{+3} , Fe^{+2} , $\text{MnP}/\text{Mn}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ ou ainda Fe^{3+} e agentes redutores oriundos dos extratos aquosos de madeira biotratada;
- Caracterização química e estrutural dos produtos de degradação gerados nos estudos anteriores

4 – METODOLOGIA

4.1 - Madeira utilizada

A madeira utilizada nesse trabalho foi *Eucalyptus grandis*. Os cavacos (2,5 x 1,0 x 0,2 cm) da espécie citada anteriormente foram obtidos a partir de toras de árvores com cerca de 8 anos e cedidos gentilmente pela empresa Melhoramentos Papéis Ltda, planta industrial de Caieiras, SP.

4.2 - Obtenção de madeira moída livre de extrativos

O material foi preparado seguindo metodologia descrita por Hofrichter, Lundell e Hatakka (2001), com algumas modificações. Cerca de 200 g de madeira (*E. grandis*) seca ao ar foram moídas em um moinho de facas, cuja tela de retenção apresentava perfurações de 0,5 mm de diâmetro. O material foi então moído em um moinho de bolas de aço por 160 h, sendo que a razão entre a massa de bolas e a massa de madeira seca foi igual a 20. Após a moagem, esse material foi sequencialmente extraído por diversos solventes orgânicos e água como segue: diclorometano, etanol 95%, acetona e água destilada. Cada etapa de extração foi feita em extrator de Soxhlet por 8 horas. Os teores de lignina e polissacarídeos nesses materiais foram determinados a partir da hidrólise do material com ácido sulfúrico 72 % segundo Ferraz et al. (2000 b). Os teores de lignina total, glucana, xilana e grupos acetila da madeira moída livre de extrativos foram de $29 \pm 0,1$, $45,7 \pm 1,2$, $13,6 \pm 0,3$ e $2,7 \pm 0,1$, respectivamente.

Após a extração com solventes orgânicos e água, o material sólido foi processado de duas formas distintas. Na primeira situação, 5 g de material sólido foi transferido para um Erlenmeyer de 2 L onde foi adicionado 510 mL de tampão succinato 50 mM pH 4,5, 147 mL de lactato de sódio 50 mM e 343 mL de água destilada. A mistura foi agitada a 120 rpm por 72 horas a 25-30 °C. Na segunda situação, 5 g de material sólido foi igualmente tratado em um Erlenmeyer de 2L com 870 mL de tampão acetato 50 mM pH 4,5 e 130 mL de água destilada. A proporção de sólido/líquido em ambos os tratamentos foi de 5 g de madeira (em base seca) /L de solução. Após essas lavagens com sistemas tampão, os materiais foram centrifugados a 3400 x G por 15 min, separando-se a fração solúvel do resíduo insolúvel. Os materiais insolúveis em tampão succinato e tampão acetato foram lavados com água

destilada para remover resíduos de tampão. Os materiais foram então secos ao ar e estocados. O material extraído com succinato foi utilizado nas reações iniciadas por MnP ou Mn^{3+} e aquele extraído com acetato foi usado nas reações iniciadas por Fe^{2+} ou Fe^{3+} /agente redutor (todas descritas nos itens subsequentes).

4.3 – Obtenção de uma complexo lignina-carboidrato solúvel em água (CLC)

Cerca de 200 g de madeira (*E. grandis*) seca ao ar foram moídas em um moinho de facas, cuja tela de retenção apresentava perfurações de 0,5 mm de diâmetro. Esse material foi extraído com etanol 95% por 8 horas em um extrator de Soxhlet. O material extraído foi seco ao ar, suspenso em tolueno e moído em um moinho de bolas de aço por 160 h, sendo que a razão entre a massa de bolas e a massa de madeira seca foi igual a 20. Após a moagem, o tolueno foi removido por evaporação e a madeira de *E. grandis* moída foi extraída com dioxano/água 50 %. Foram realizadas 3 extrações sucessivas a 120 rpm por 24 h usando uma proporção de 1 g de sólido (peso seco)/10 mL de solução de dioxano/água. Os extratos obtidos foram misturados e concentrados até eliminação completa dos solventes sob pressão reduzida. O complexo bruto obtido foi então suspenso em água, usando uma proporção de 1 g de sólido (em base seca) /8 mL de água, a fim de recuperar somente a fração solúvel nesse solvente. Após a dissolução parcial, o material foi centrifugado a 3400 x G por 15 min, separando-se a fração solúvel em água (CLC) do resíduo insolúvel. Após a centrifugação, a fração solúvel em água foi concentrada até secar sob pressão reduzida. A fração solúvel em água foi finalmente seca em um dessecador, inicialmente com sílica, e depois com pentóxido de fósforo, a vácuo. O complexo obtido foi então pesado e armazenado, ficando constantemente dentro do dessecador com sílica para não absorver umidade. Os teores de lignina e polissacarídeos do CLC foram determinados a partir da hidrólise do material com ácido sulfúrico 72 % segundo Ferraz et al. (2000 b).

4.4 - Cromatografia de permeação em gel do CLC

Cerca de 1 mg do complexo CLC foi agitado com 1 mL de água e dissolvido pela adição de 20 μ L de NaOH 1M. A solução formada foi ainda filtrada por membranas de disco de 0,45 μ m e 1 mL foi injetado no sistema cromatográfico, sendo eluído em uma coluna de

cromatografia de permeação em gel (CPG). A análise cromatográfica foi realizada a um fluxo de 0,7 mL/min em um sistema GE AKTA Basic 10, com uma coluna Superose 12 10/300 GL utilizando-se como eluente Na₂HPO₄ 50 mM/NaCl 150 mM, pH igual a 12. O cromatógrafo permitiu a detecção do eluato diretamente num comprimento de onda fixado em 280 nm. O eluato também foi analisado quanto à presença de carboidratos totais. Para isso, após a determinação da absorbância em 280 nm, indicativo da presença de lignina, 1,0 ml de cada fração eluída da coluna cromatográfica foram transferidas para tubos de ensaio onde foram adicionados 25 µL de fenol 80 % e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Os tubos de ensaio foram agitados e resfriados, à temperatura ambiente. A absorbância foi lida em 490 nm, contra uma solução contendo 1,0 mL do tampão fosfato no lugar da amostra.

Para possibilitar o cálculo de massas molares, foi feita uma calibração da coluna cromatográfica com proteínas de massa molar conhecida. Também foram injetados blue dextran (2000 kDa) e acetona (58 Da) para determinar o volume morto e o volume total da coluna, respectivamente. As proteínas analisadas foram albumina (66 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), citocromo C (12,4 kDa) e aprotinina (6,5 kDa) (Aldrich - Sigma) (figura 14). Cada um desses compostos foram dissolvidos em água na concentração de 1 mg/mL. Em cada análise cromatográfica, 1 mL da solução filtrada foi analisada por CPG usando o mesmo sistema descrito anteriormente. A detecção das proteínas foi feita em 280 nm e da acetona em 230 nm.

Os CPGs foram exportados para uma planilha de cálculo no programa Microsoft – Excel 2003. Os valores de M_w (massa molar média em massa aparente), M_n (massa molar média em número aparente) e M_w/M_n (dispersibilidade = D) foram calculados a partir das seguintes equações.

$$M_w = \frac{\sum a_i \times M_i}{\sum a_i} \quad M_n = \frac{\sum a_i}{\sum a_i / M_i}$$

$$D = M_w / M_n$$

Onde:

a_i = área do cromatograma sob uma fração “i”. (os valores de cada fração foram de 0,03 ml no caso de lignina e 1 ml para os açúcares totais)

M_i = massa molar da fração “i” obtido por interpolação na curva de calibração

O CLC ainda foi dissolvido na concentração de 1mg/ml em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5. Um 1ml da suspensão foi adicionada de 20 µL de NaOH 1M, filtrada em membranas de 0,45µm e injetada em uma coluna de CPG nas condições mencionadas

acima. O procedimento foi repetido em uma triplicata de análise. O M_w obtido foi de 19,3 kDa com um desvio padrão de $\pm 0,7$. O desvio padrão foi de aproximadamente $\pm 4 \%$.

Figura 14 – Curva de calibração da coluna cromatográfica Superose 12 10/300 GL em tampão Na_2HPO_4 50 mM NaCl 150 mM pH 12.

4.5 – Fungo

O fungo em estudo foi o basidiomiceto 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 mantida através de repiques sucessivos sobre meio composto por extrato de malte (2 %) e extrato de levedura (0,2 %). Em tubos de ensaio com o fungo em fase de crescimento foram adicionados pequenos cavacos de madeira de *Pinus taeda* com aproximadamente 0,2 x 2,4 x 0,2 cm. Após colonização desses cavacos, os tubos foram estocados em refrigerador a 4°C por períodos de até 6 meses. Cada procedimento de repique de manutenção foi realizado pela transferência dos cavacos colonizados para placas de Petri com o mesmo meio de manutenção e, após o crescimento, novos tubos foram preparados a partir de micélio oriundo das bordas da placa em fase de crescimento.

4.6 - 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 e 0,7 % de extrato de levedura. Após 12 dias de incubação estática a 27°C, o micélio crescido em meio líquido foi filtrado, lavado com água autoclavada e macerado em 100 mL de água, usando um liquidificador de alumínio para a maceração. Da suspensão obtida foi retirada uma alíquota de 20 mL que foi filtrada sobre papel de filtro previamente seco e pesado para a determinação da quantidade de micélio presente no inóculo, expressa como mg (base seca)/mL.

4.7 - Experimentos de biodegradação da madeira

Prévio aos experimentos, os cavacos de madeira foram mantidos em água por um período de 16 horas. O excesso de água foi então drenado e os cavacos autoclavados a 121°C por 15 minutos.

Os biorreatores usados foram Erlenmeyers de 2 L carregados com 50 g (em base seca) de madeira previamente autoclavada. Os biorreatores foram inoculados no interior de uma câmara asséptica de fluxo laminar com uma suspensão de micélio fúngico correspondente a 3000 mg e 500 mg de micélio/kg de madeira (ambos em base seca) para cultivos extraídos com tampão acetato suplementado com tween 60 e extraídos com água, respectivamente. Os cultivos utilizados para a preparação de MnP (extraídos com tampão acetato suplementado com tween 60) foram suplementados com 0,5 % de milhocina e glicose (ambos em base seca) para induzir a máxima secreção de MnP (MASARIN; FERRAZ, 2008). No caso dos cultivos extraídos com água não houve suplementação. Os cavacos inoculados foram agitados manualmente para homogeneização e então mantidos sem agitação a 27°C por um período de 15 dias. Para cada condição de cultivo foram inoculados 3 biorreatores.

4.8 – Extração da madeira biotratada com solução tampão suplementada com Tween 60 para recuperação e posterior purificação da MnP

A madeira biodegradada por 15 dias em cultivos suplementados com milhocina e glicose 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). Os extratos enzimáticos foram recuperados por centrifugação a $3400 \times G$ a 10°C por 15 min (Centrífuga refrigerada Jouan CR4i). Uma pequena parte do extrato enzimático obtido foi utilizado para a determinação da atividade de MnP, xilanases totais e índice de absorbância relativa a 280 nm. O restante do extrato enzimático foi tratado com carvão ativo na proporção de 2 g de carvão ativo/100 ml de extrato por 30 minutos a 25°C e então determinada novamente a atividade enzimática de MnP, xilanases totais e índice de absorbância relativa a 280 nm no sobrenadante.

O pH do extrato tratado com carvão foi ajustado para 4,8 com ácido acético 0,1 M e então aplicado em uma coluna de troca iônica DEAE Sepharose CL 6B (*GE Healthcare*) medindo 1,5 cm de diâmetro x 10 cm de comprimento (coluna previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,8). O fluxo de adição do extrato na coluna foi de 0,5-0,75 mL/min e a aplicação de extrato na coluna foi interrompida quando o eluato começou a apresentar atividade de MnP. A recuperação da MnP adsorvida na coluna foi feita por eluição com NaCl 0,5 M também num fluxo de 0,5 mL/min (CARVALHO; FERRAZ; MILAGRES, 2008). O extrato eluído da coluna contendo a MnP foi então submetido à ultrafiltração em tubo de centrífuga dotado de membrana seletiva com corte de 30 kDa (Amicon-Ultra, Millipore) a $3400 \times G$ a 10°C por 15 min (Centrífuga refrigerada Jouan CR4i). O filtrado da membrana de corte foi monitorado em um condutivímetro (Micronal B 331) e o extrato foi ultrafiltrado por 4 vezes, retirando todo o resíduo de NaCl da solução. Do último sobrenadante recuperado, foi determinada a atividade enzimática de MnP, xilanases totais e índice de absorbância relativa a 280 nm. O volume total obtido foi separado em frações, congelado em ultrafreezer a -25°C e liofilizado (Edwards Super Modulo) por 12 horas.

A atividade de MnP foi medida pela oxidação de vermelho de fenol. As reações foram conduzidas em tubos de 30 mL contendo 1,5 mL de tampão succinato de sódio 50 mM (pH 4,5), 1,5 mL de lactato de sódio 50 mM, 0,5 mL de MnSO_4 1 mM, 0,5 mL de vermelho de fenol 0,1 %, 0,5 mL de caldo enzimático, 0,25 mL de albumina 1 % e 0,25 mL de H_2O_2 1,76 mM. Para o branco, substituiu-se o extrato enzimático por tampão de extração enzimática. Em intervalos de 1 min, 1 mL dessa mistura reacional foi misturada com 30 μL de NaOH 6,5

M para interromper a reação e a absorbância foi lida em 610 nm ($\epsilon = 22000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (LUNDELL et al, 1990; KUWAHARA et al, 1984).

A atividade de xilanase foi determinada pela hidrólise de xilana de bétula (BAILEY; BIELY; POUTANEN, 1992). A reação foi conduzida em tubos de ensaios de 10 mL contendo 900 μL de xilana 1% (m/v) em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,5) e 100 μL de extrato enzimático. A reação foi mantida em banho-maria à 50°C. Após 5 min, a reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de reagente DNS. A mistura reacional foi aquecida em banho-maria a 100°C por 5 min e depois de esfriar foi medida a absorbância em 540 nm (MILLER, 1959). Para o branco, o extrato enzimático foi substituído por tampão de extração enzimática e o tampão acetato de sódio sem xilana. Para descontar o teor de açúcares redutores presentes no caldo e na solução contendo o substrato, foi realizado outro procedimento (controle) onde foi adicionado inicialmente o reagente DNS ao substrato e em seguida o extrato enzimático. Xilose (seca em P_2O_5 a vácuo) foi utilizada para construção da curva de calibração.

O índice relativo de absorção em 280 nm do extrato contendo MnP foi calculado através da medida de absorção em 280 nm dos extratos apropriadamente diluídos para permitir leituras de absorbância inferiores a 2,5. O valor reportado se refere à absorbância lida multiplicada pelo fator de diluição.

4.9 – Extração da madeira biotratada com água em pH 7

Essa etapa do trabalho foi realizada em conjunto com outro estudante de nosso próprio grupo de pesquisas, Maria Augusta Horta, e fez parte das atividades de sua dissertação de mestrado (HORTA, 2008). Nesse grupo de experimentos, todo o conteúdo de cada Erlenmeyer (material biotratado e controle não biotratado) foi extraído com 300 mL de água e não solução extratante usada para a recuperação de enzimas. A água de extração teve seu pH previamente ajustado em 7,0. A extração foi feita por imersão sob agitação de 120 rpm por 24 horas a 10°C, seguida de centrifugação a 3400 x G a 4°C por 15 min.

Os extratos aquosos foram submetidos à ultrafiltração em tubos de centrifuga dotados de membrana seletiva com corte de 5 kDa (Amicon-Ultra, Millipore).

4.10 Reações de peroxidação do ácido linoléico monitoradas em um oxímetro

Reações de peroxidação de ácido linoléico foram monitoradas a partir da taxa de consumo de oxigênio utilizando um oxímetro Hansatech (Kapich et al., 2005 a). Em todos os experimentos, as taxas de consumo de oxigênio foram calculadas na região de velocidade máxima (inicial) dos gráficos gerados pelo software Hansatech instalado no oxímetro.

No caso da peroxidação iniciada por MnP, foram adicionados 700 μL de tampão succinato sódio 50 mM (pH 4,5) e 340 μL de lactato de sódio 50 mM na cela do oxímetro. A mistura permaneceu sob agitação magnética de 100 rpm por 3 min a fim de garantir a saturação da solução com oxigênio. Em seguida foram adicionados 80 μL de solução aquosa do CLC em concentrações que variaram de 21,2 a 0,21 mg/mL (sendo as concentrações finais de 1 a 0,01 mg/mL), 40 μL de MnSO_4 5 mM, 500 μL de extrato enzimático pré-purificado (item 4.8), que correspondeu a 0,5 UI de MnP, 40 μL de emulsão de ácido linoléico 7,2 mM em Tween 60 (1% p/v) e 4 μL de H_2O_2 20 mM. O volume final da reação foi de 1700 μL . Uma reação controle foi conduzida adicionando-se 80 μL de água no lugar da solução aquosa do CLC.

Nas reações iniciadas por íons Mn^{3+} foram adicionados 700 μL de tampão succinato sódio 50 mM (pH 4,5) e 340 μL de lactato de sódio 50 mM, 80 μL de solução do CLC variando de 21,2 a 0,21 mg/mL (sendo as concentrações finais de 1 a 0,01 mg/mL), 40 μL de suspensão de acetato de Mn^{3+} 10,7 g/L (o acetato de Mn^{3+} foi pesado e dissolvido em lactato de sódio 50 mM sob atmosfera de nitrogênio), 500 μL de água destilada e 40 μL de emulsão de ácido linoléico 7,2 mM em Tween 60 (1 % p/v). O volume final da reação foi de 1700 μL . Uma reação controle foi conduzida adicionando-se 80 μL de água no lugar da solução aquosa do CLC.

Nas reações iniciadas por íons Fe^{2+} ou íons Fe^{3+} /agentes redutores foram adicionados 1130 μL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5) na cela do oxímetro que permaneceu sob agitação magnética de 100 rpm por 3 min a fim de garantir a saturação da solução com oxigênio. Em seguida foram adicionados 420 μL do extrato redutor (item 4.9) ou água destilada, 80 μL de suspensão do CLC variando de 21,2 a 0,21 mg/mL (sendo as concentrações finais de 1 a 0,01 mg/mL), 40 μL de solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ambas 8 mM e 40 μL de emulsão de ácido linoléico 7,2 mM em Tween 60 (1 % p/v). O volume final da reação foi de 1670 μL .

4.11 – Reações de degradação do CLC

4.11.1 - Misturas reacionais

No caso das reações iniciadas por MnP foram misturados 2 mg do CLC em um tubo de ensaio com 1200 μ L de tampão 50 mM succinato de sódio pH 4,5, 400 μ L de lactato de sódio 50 mM, 47 μ L de emulsão de ácido linoléico 42,3 mM em Tween 60 (1 % p/v), 47 μ L de solução de MnSO_4 5 mM, 170 μ L de extrato enzimático pré-purificado (item 4.8), que correspondeu a 0,5 UI de MnP, 100 μ L de glicose 0,2 M e 34 μ L de solução de glicose oxidase purificada de *Aspergillus niger* (EC. 232-601-0 - Sigma), que correspondeu a 0,2 UI de atividade.

Nas reações iniciadas por íons Mn^{3+} foram misturados em um tubo de ensaio 2 mg de CLC, 910 μ L de tampão 50 mM succinato de sódio pH 4,5, 70 μ L de tampão 50 mM lactato de sódio, 597 μ L de água destilada, 376 μ L de uma suspensão de acetato de Mn^{3+} 10,7 g/L e 47 μ L de emulsão de ácido linoléico 42,8 mM em Tween 60 (1 % p/v). O volume final dessas reações foi de 2000 μ L.

No caso das reações iniciadas por íons Fe^{2+} foram misturados em um tubo de ensaio 2 mg de CLC, 1300 μ L de tampão 50 mM acetato de sódio pH 4,5, 47 μ L de $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 8 mM, 600 μ L de água destilada e 47 μ L de emulsão de ácido linoléico 42,3 mM em Tween 60 (1 % p/v).

No caso das reações iniciadas por íons Fe^{+3} /agentes redutores foram misturados 2 mg da fração do CLC em um tubo de ensaio com 1300 μ L de tampão 50mM acetato de sódio pH 4,5, 600 μ L de extrato redutor, 47 μ L de solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 8 mM e 47 μ L de emulsão de ácido linoléico 42,3 mM em Tween 60 (1 % p/v).

4.11.2 - Condução das reações e tratamento dos produtos finais

O volume final de todas as reações descritas no item 4.12.1 foi de 2000 μ L. Em todos os casos, as reações foram interrompidas após 72 h de agitação a 120 rpm, 27°C. A reação foi interrompida pela adição de 10 % do volume total da reação (200 μ L) de uma solução de NaOH 1 M. Em seguida, a solução foi filtrada em membrana de 0,45 μ m e 1 mL foi aplicado numa coluna de CPG (item 4.4). Os CPGs obtidos nas reações de degradação por

MnP/Mn²⁺/H₂O₂/ácido linoléico foram corrigidos para o cálculo da massa molar média aparente (Mw) do pico de maior intensidade, como demonstrando na figura 15.

Figura 15 – Exemplo de cromatograma obtido nos experimentos com MnP/Mn²⁺/H₂O₂/linoléico. Em A cromatograma obtido e em B cromatograma corrigido para o cálculo do Mw.

4.11.3 - Aumento de escala das reações de degradação do CLC

As reações iniciadas por íons Fe²⁺ e Mn³⁺ foram repetidas numa escala ampliada em 35 vezes. A massa de CLC empregada no meio reacional foi de 70 mg e a carga dos demais reagentes foi ampliada. Após 72 h de reação, as misturas reacionais foram divididas em dois volumes iguais. Na primeira porção foi adicionado 10 % do volume total da amostra em hidróxido de sódio 1 M. O material obtido foi filtrado através de membrana de 0,45 µm previamente secas em dessecador a vácuo com pentóxido de fósforo e pesadas. Após a filtração as membranas foram novamente secas em dessecador a vácuo com pentóxido de fósforo e pesadas. A segunda porção do meio reacional foi submetida à ultrafiltração em tubos de centrifuga dotados de membrana seletiva com corte de 3 kDa (Amicon Ultra, Millipore) a 3400 G, 25°C por 15 min (Centrifuga refrigerada Jouan CR4i). O sobrenadante foi recuperado e liofilizado (Edwards Super Modulo) por 12 horas. Após a liofilização, os CLC tratados e controle foram secos a vácuo em dessecador com pentóxido de fósforo e posteriormente mantidos com sílica em dessecador.

4.12 Reações de degradação de *E. grandis*

Em um tubo de ensaio de 10 mL foram misturados 2 mg de *E. grandis* moído (item 4.2), 1200 µL de tampão 50 mM succinato de sódio pH 4,5, 400 µL de lactato de sódio 50 mM, 47 µL de emulsão de ácido linoléico 42,8 mM em Tween 60 (1 % p/v), 47 µL de solução de MnSO₄ 5 mM, 170 µL de extrato purificado contendo MnP de *C. subvermispora* (correspondendo a 0,5 UI), 34 µL de glicose oxidase (correspondendo a 0,2 UI) e 100 µL de glicose 0,2 M.

Em outro conjunto de experimentos foram misturados 2 mg de *E. grandis* moído (item 4.2), 1550 µL de tampão 50 mM succinato de sódio pH 4,5, 350 µL de lactato de sódio 50 mM, 47 µL de emulsão de ácido linoléico 42,8 mM em Tween 60 (1 % p/v) e 47 µL de acetato de Mn⁺³ (1,3 e 5,4 g/L) dissolvidos em lactato de sódio 50 mM.

Em um terceiro grupo de experimentos, em um tubo de ensaio de 10 mL foram misturados 2 mg de *E. grandis* moído (item 4.2), 1300 µL de tampão 50 mM acetato de sódio pH 4,5, 600 µL de extrato aquoso ultrafiltrado em membrana de corte de 5 kDa obtido de cultivos de *C. subvermispora* sobre *E. grandis* após 15 dias de biotratamento, 47 µL de emulsão de ácido linoléico 42,8 mM em Tween 60 (1 % p/v) e 47 µL de solução de FeCl₃.6H₂O 8 mM.

Em um quarto grupo de experimentos foram misturados 2 mg de *E. grandis* moído, 1300 µL de tampão 50 mM acetato de sódio pH 4,5, 600 µL de água destilada, 47 µL de emulsão de ácido linoléico 42,8 mM em Tween 60 (1 % p/v) e 47 µL de solução de FeSO₄.7H₂O 8 mM.

Em todos os casos, o volume final dessas reações foi de 2000 µL. As reações foram mantidas em tubos de ensaio de 10 ml lacrados por parafilme sob agitação de 120 rpm durante 72 h a 27°C. A suspensão obtida foi filtrada em membrana de 0,45 µm. Os compostos solúveis foram analisados por espectroscopia UV-Visível (após diluição em água na proporção 1:4) em espectrofotômetro GBC – Cintra 20 e CPG. Para a análise cromatográfica, 800 µL dos compostos solúveis foram misturados com 200 µL de hidróxido de sódio 1 M e eluídos através de uma coluna Sephadex G-50 (3 cm de diâmetro x 50 cm de comprimento) a um fluxo de 2 mL/min em sistema GE AKTA Basic 10, com o detector fixado em um comprimento de onda de 280 nm. O eluente utilizado foi hidróxido de sódio 0,5 M. Para o cálculo da massa molar média aparente Mw (item 4.4) foi realizada uma curva de calibração com proteínas e moléculas de tamanhos conhecidos. Também foram injetados blue dextran e acetona para determinar o volume morto e o volume total da coluna. As

moléculas analisadas foram aprotinina (Aldrich), lignina Kraft de Eucalyptus (FERRAZ et al., 1997) e a vanilina.

Figura 16 – Curva de calibração da coluna cromatográfica Sefhadex G-50 em NaOH 0,5M.

4.13 - Aumento de escala das reações com *E. grandis*

Para as reações realizadas com íons Fe^{2+} , Mn^{3+} ou MnP , todos adicionadas ao ácido linoléico, foram realizados aumentos de escala em torno de 400 vezes. As reações foram mantidas em Erlenmeyer de 1L lacrados por parafilme em agitação a 120 rpm durante 72 h a 27°C. A atividade enzimática de MnP foi monitorada ao longo do tempo de reação (item 4.8). Ao final das reações, a suspensão foi centrifugada a 3400 x G a 25°C e recuperada a madeira e o sobrenadante. O sobrenadante obtido foi ainda filtrado em membrana de 0,45 μm . Os compostos solúveis foram analisados por espectrofotometria UV-Visível (diluído 1:4) em espectrofotômetro GBC – Cintra 20 e CPG (item 4.12). A madeira foi lavada mais duas vezes por centrifugação a 3400 x G a 25°C com água destilada pH 2. A madeira tratada com íons Fe^{2+} foi ainda tratada com solução de EDTA. Para isso a madeira foi suspensa a 0,3 % de consistência, com pH 6,0 por 2 horas a 25 °C com EDTA (0,4 g de EDTA/100 g de madeira, em base seca). Ao final a madeira foi centrifugada a 3400 x G por 15 min a 25 °C. A madeira recuperada foi ainda lavada com água destilada pH 2 por duas vezes por centrifugação. As madeiras foram secas ao ar e armazenadas a temperatura ambiente.

4.14 Isolamento de ligninas das madeiras de *E. grandis* por acidólise branda

O isolamento das ligninas foi realizado por acidólise branda de acordo com Wu e Argyropoulos (2003), com algumas modificações. Foram utilizadas cerca de 1 g de madeira livre de extrativos controle e tratadas (MnP, íons Fe^{2+} ou Mn^{3+}). As madeiras foram adicionadas em Erlenmeyers de 250 mL e tratadas com celulases (EC 3.2.1.4, Sigma) na proporção de 400 UI/g de madeira. A hidrólise enzimática foi realizada a 40°C por 48 h em pH 4,5 (tampão fosfato de sódio 50 mM) a uma consistência de 5 % em agitador a 120 rpm. Após a hidrólise enzimática as suspensões foram centrifugadas a 3400 x G por 15 min a 25 °C. O resíduo obtido foi ainda lavado mais 2 vezes por centrifugação com água deionizada pH 2. Após a lavagem, o resíduo foi recuperado e seco a temperatura ambiente. A extração da lignina dos resíduos foi realizada em um balão de 50 mL com 20 mL de dioxano/água na proporção de 85:15 (v/v) contendo 0,1 M de HCl. A extração foi realizada em refluxo (aproximadamente 90°C) sob atmosfera de N_2 . Após 30 min, a reação foi resfriada até 50°C, o sobrenadante recuperado e o resíduo sólido foi extraído mais duas vezes sob condições idênticas. Uma quarta extração foi realizada com dioxano/água na proporção de 85:15 (v/v) sem HCl. As quatro frações orgânicas foram combinadas e centrifugadas a 3400 x G por 15 min a 25°C. A solução resultante foi neutralizada com hidróxido de sódio 0,1 M e concentrada em roto-evaporador até cerca de 5 mL sob pressão reduzida a 40°C. A solução concentrada foi gotejada sobre 5 mL de água destilada a 5°C para precipitação total da lignina. A suspensão contendo a lignina foi centrifugada a 3400 x G por 15 min a 25°C. A lignina foi ainda lavada mais 2 vezes por centrifugação com água deionizada pH 2. A lignina obtida foi resuspendida e adicionada em Ependorfs de 1 mL. A suspensão foi liofilizada em equipamento Edwards Super Modulyo por 12 horas. Após a liofilização, as ligninas foram secas a vácuo em dessecador com pentóxido de fósforo, pesadas e mantidas em dessecador com sílica para não absorver água.

4.15 – Caracterização química de *E. grandis*, CLC e ligninas isoladas

4.15.1 - Análise espectrofotométrica na região do UV/visível

As amostras do CLC e da lignina isolada da madeira de *E. grandis* moída (controles e tratadas) foram dissolvidas em dioxano 85 % na concentração de 20 mg/L. Essas soluções

foram sucessivamente diluídas com dioxano 85 % e seus espectros UV/visível foram registrados em um espectrofotômetro GBC – Cintra 20. Foram calculadas as absorvidades das ligninas na região de 280 nm.

4.15.2 - Determinação de carbonilas (estruturas tipo coniferaldeído e acetoguaiacona)

As amostras do CLC e da lignina isolada da madeira de *E. grandis* moída (controles e tratadas) foram dissolvidas em dioxano 85 % na concentração de 20 mg/L. Foram misturados 2,0 mL de uma solução de lignina e 1,0 mL de uma solução 0,05 M de boroidreto de sódio (190 mg de boroidreto em 100 mL de hidróxido de sódio 0,03 M). A mistura foi deixada no escuro por 45 horas, a temperatura ambiente e, em seguida, os espectros diferenciais foram registrados na região de 200-400 nm, contra uma solução não reduzida da amostra nas mesmas concentrações (ADLER; MARTON, 1959).

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

$$\Delta E_{310 \text{ nm}} = 10500X + 9400Y \quad (1)$$

$$\Delta E_{342 \text{ nm}} = 19800X + 2020Y \quad (2)$$

Onde:

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

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

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

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

A_{310} e A_{342} = Absorbâncias, nos respectivos comprimentos de onda, no espectro da solução sem redução contra a solução reduzida (ambas em mesma concentração).

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

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

4.15.3 - Determinação de hidroxílicas fenólicas

Foi utilizado o método da espectroscopia UV diferencial que consiste na varredura, em um espectrofotômetro de duplo feixe, de uma solução de lignina em meio básico contra a mesma solução em meio ácido. A determinação de OH fenólico foi feita com base na absorvidade média de compostos modelos de lignina (WEXLER, 1964).

As amostras do CLC e da lignina isolada da madeira de *E. grandis* moída (controles e tratadas) foram dissolvidas em dioxano 85 % na concentração de 20 mg/L. O pH das soluções foi ajustado em 13, com hidróxido de sódio 1,0 M. Um branco de cada amostra foi feito na mesma diluição, porém em pH 1, ajustado pela adição de ácido clorídrico 1,0 M. A varredura da solução alcalina contra a solução ácida foi realizada utilizando-se um espectrofotômetro GBC – Cintra 20. O teor de hidroxilas fenólicas foi calculado pela equação 3:

$$\% \text{ OH}_{\text{fenólico}} = (\Delta_{\text{Abs } 250 \text{ nm}} \times 0,192) / C_{\text{Lig}} \quad (3)$$

Onde:

$\% \text{ OH}_{\text{fenólico}}$ = porcentagem de hidroxilas fenólicas

$\Delta_{\text{Abs } 250 \text{ nm}}$ = Absorbância da solução em 250 nm, subtraída da absorbância relativa à linha de base do espectro.

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

4.15.4 Análise espectroscópica na região do infravermelho médio

As amostras de *E. grandis* moída, suas respectivas ligninas isoladas (controles e tratadas) e o CLC controle foram macerados com 200 mg de KBr adicionado-se aproximadamente 1 mg de amostra. Após o material ficar totalmente homogêneo foi seco com pentóxido de fósforo em dessecador com vácuo. Com o material seco foram preparadas pastilhas, através da compactação (a 10-12 kgf/cm² sob vácuo, com purga) e, a seguir, foram registrados os espectros na região de 4.000 a 800 cm⁻¹ em um espectrofotômetro Perkin Elmer, modelo - Spectrum GX. Quando utilizados para comparação entre amostras, os espectros foram corrigidos no software do equipamento de

infravermelho. Primeiramente os espectros tiveram corrigidas suas linhas bases e na seqüência foram normalizados na região de 1510 cm^{-1} (banda característica de lignina).

4.15.5 - Determinação da distribuição de massas molares

As amostras de ligninas isoladas da madeira de *E. grandis* moída (controle e tratadas) foram submetidas à CPG. A análise cromatográfica foi realizada a um fluxo de 1 mL/min em sistema GE AKTA Basic 10, com uma coluna Sephadex G-75 (3 cm de diâmetro x 50 cm de comprimento) utilizando-se como eluente hidróxido de sódio $0,5\text{ M}$. Para o cálculo da massa molar média aparente M_w (item 4.4) foi realizada uma curva de calibração com proteínas e moléculas de tamanhos conhecidos. Também foram injetados blue dextran e acetona para determinar o volume morto e o volume total da coluna, respectivamente. As moléculas analisadas foram anidrase carbônica (Aldrich), aprotinina (Aldrich) e o citocromo c (Aldrich).

Figura 17 – Curva de calibração da coluna cromatográfica Sephadex G-75 em NaOH $0,5\text{M}$.

4.15.6 – Caracterização por tioacidólise

Estas análises foram feitas em colaboração com pesquisadores do Centro de Biotecnologia da Universidad de Concepción, Chile. As amostras de madeira de *E. grandis* moída (controle e tratadas) foram submetidas à técnica de tioacidólise. Cerca de 20 mg de madeira (base seca) foram tratadas com 15 mL de mistura dioxano/etanotiol 9:1 contendo

0,2 M de eteriato trifluoreto de boro em tubos com vedação. Adicionou-se à mistura reacional 1 mL de tetracosano 0,6 g/L em dicloro-metano como padrão interno. A tioacidólise foi realizada a 100°C por 4 h em um banho de silicone termostatizado. Após esfriar-se, a mistura reacional foi transferida para um Erlenmeyer com o auxílio de 15 mL de água destilada e ajustou-se o pH em torno de 3 com bicarbonato de sódio 0,4 M. Foram feitas três extrações sucessivas dos produtos da tioacidólise com 20 mL de diclorometano cada. Os resquícios de água nos extratos orgânicos foram eliminados com Na₂SO₄ anidro. Os extratos orgânicos foram evaporados sob pressão reduzida a 40°C e o material final foi redissolvido em 1 mL de diclorometano, sendo derivatizados por sililação 10 µL desta solução com 50 µL de N,O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) por 1 h a 60 °C na presença de 5 µL de piridina como catalisador. Foi injetado 1 µL da mistura reacional no cromatógrafo de fase gasosa.

Os produtos da sililação foram analisados em um cromatógrafo de fase gasosa HP 5890 series com detecção por ionização de chama, utilizando uma coluna DB-5 de 30 m x 0,53 mm. O fluxo de nitrogênio utilizado foi de 33,0 cm/s e a temperatura do injetor foi mantida a 240°C. Para melhor separação dos compostos foram utilizadas duas rampas de temperatura na coluna cromatográfica consistindo da seguinte programação: o forno foi mantido inicialmente a 140°C por 1 min e em seguida aquecido a uma taxa de 3 °C/min até 240°C. Após 1 min nesta temperatura, o forno foi reaquecido a uma taxa de 30°C/min até 290°C. A temperatura final foi mantida por 7 minutos. Para diminuir a quantidade de amostra injetada foi utilizado um fracionamento mecânico (split) na razão de 1:30 utilizando o próprio gás de arraste (N₂) como diluente.

4.15.7 - Quantificação de grupos funcionais por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de fósforo (RMN-³¹P)

Estas análises foram feitas em colaboração com pesquisadores do Centro de Biotecnologia da Universidad de Concepción, Chile. As ligninas isoladas das madeiras de *E. grandis* moída (controle e tratada com MnP/Mn⁺²/H₂O₂/ácido linoléico) foram analisadas quantitativamente com relação ao teor de grupos funcionais (hidroxilas alifáticas e fenólicas, carboxila) por RMN-³¹P (ARGYROPOULOS, 1994; GRANATA; ARGYROPOULOS, 1995). Aproximadamente 15 mg de lignina isolada foram dissolvidos em um *vial* contendo 0,4 mL de uma mistura de piridina e clorofórmio deuterado (1,6:1 v/v). Em seguida, foram adicionados 50 µL de acetil-acetonato de cromo (III) 11,4 g/L (reagente de relaxamento) e 200 µL de hidroxilamina 11,4 g/L (padrão interno) preparados em piridina e clorofórmio

deuterado (1,6:1 v/v). Por fim, 200 µL de reagente de fosfitilação 2-cloro-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxafosfolano (reagente fosfitilante) foi adicionado ao *vial*. Também foi utilizado 100 µL de colesterol 40 g/L (também preparado em piridina e clorofórmio deuterado 1,6:1 v/v) como um segundo padrão interno. As amostras foram homogeneizadas e transferidas para um tubo de RMN de 0,5 mm de diâmetro. Os espectros de RMN foram adquiridos em um espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker de 250 MHz. Os grupos OH alifáticos, OH fenólicos de unidade guaiacila, siringila e grupos carboxila foram quantificados com o reagente fosfitilante (GRANATA; ARGYROPOULOS, 1995). Para quantificação dos grupos OH foram integradas as regiões dos espectros de acordo com a Tabela 1 (ARGYROPOULOS, 1994; GRANATA; ARGYROPOULOS, 1995).

Tabela 1 - Região de integração dos grupos OH nos espectros de RMN-³¹P.

Reagente fosfitilante	
Carboxila	134,5 – 135,5
OH fenólica em unidade siringila eterificada e guaiacila condensada	140,5 – 144,5
OH fenólica em unidade guaiacila eterificada	138,2 – 140,4
Colesterol	144,7 - 145
OH alifática	146 – 149,2
Hiroxilamina	154,0 – 154,5

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no desenvolvimento dessa tese serão apresentados em quatro tópicos principais. Essencialmente, foi estudada a degradação de lignina *in vitro* em reações iniciadas por MnP ou por agentes redutores de Fe^{3+} produzidos durante a biodegradação da madeira. Para realizar esse estudo foi necessário preparar, tanto MnP, quanto compostos redutores de Fe^{3+} em cultivos com *C. subvermispota*. Isso foi abordado nos dois primeiros tópicos. O terceiro tópico abordou a preparação, a caracterização e a degradação de um complexo lignina-carboidrato (CLC) e o quarto e último tópico avaliou a degradação de madeira moída que foi utilizada como modelo de um lignocelulósico completo e insolúvel no meio reacional utilizado.

5.1 Preparação e purificação parcial de MnP produzida por *C. subvermispota* em cultivos sobre madeira

Cultivos de *C. subvermispota* sobre *E. grandis* foram utilizados para produzir MnP. Foram usados cultivos suplementados com 0,5% de glicose e milhocina, além de uma carga elevada de inóculo (3000 mg/kg de madeira) (MASARIN; FERRAZ, 2008; VICENTIM; FERRAZ, 2007). Nessas condições, a atividade de MnP recuperada foi de 501 ± 25 UI/kg de madeira após 15 dias de cultivo. Os extratos obtidos foram submetidos a algumas etapas sequenciais de purificação. A tabela 2 apresenta os resultados para as atividades enzimáticas dos extratos e também os índices de absorção relativa na região do UV (280 nm) dos mesmos. Os extratos obtidos a partir dos cultivos sobre madeira continham elevada quantidade de substâncias aromáticas que absorvem no UV e por isso interferem no monitoramento das reações em estudo (quer por espectrofotometria UV ou por cromatografia de permeação em gel (CPG), detectada por UV). Além disso, as substâncias aromáticas presentes nos extratos podem atuar como antioxidantes nas reações que estão sendo avaliadas (KAPICH; GALKIN; HATAKKA, 2007). Dessa forma, optou-se por realizar uma pré-purificação dos extratos que permitisse diminuir a presença de substâncias aromáticas. A base para esse procedimento de purificação foi à adsorção seletiva das substâncias aromáticas em carvão ativo, conforme recentemente publicado por Carvalho, Ferraz e Milagres (2008).

O volume inicial de extrato utilizado nesses experimentos foi de 280 mL. Nesse volume estavam contidos 33,6 UI e 84 UI de atividade de MnP e xilanases, respectivamente,

além de um índice relativo de absorção em 280 nm de 4,4. Embora se tenha obtido extratos com elevada atividade de MnP, os mesmos apresentam atividade de xilanases e alto índice de absorção relativa em 280 nm. Após o tratamento do extrato com carvão ativo, a atividade de MnP se manteve elevada (25,2 UI) o que representou 25 % de perda de atividade enzimática, enquanto que a atividade de xilanases diminuiu para 44,8 UI, representando 47 % de perda. Além disso, 86 % das substâncias aromáticas foram removidas, como pode ser verificado pela diminuição expressiva do índice de absorção em 280 nm, que foi de 0,6 após o tratamento com carvão ativo (tabela 2).

Tabela 2 – Atividade de MnP, xilanases totais e índice de absorção relativa em 280 nm contidos em 280 mL de extrato oriundo de um cultivo de *C. subvermispora* sobre *E. grandis*.

Característica do extrato	Etapa de purificação			
	Extrato bruto	Carvão ativo	Troca iônica	Ultracentrifugação
MnP (UI)	33,6	25,2	49,2	39,8
Xilanases (UI)	84	44,8	39,5	11,1
Abs relativa em 280 nm	4,4	0,6	0,47	0,05

(*) cultivo conduzido por 15 dias em meio suplementado com 0,5% de glicose e milhocina, inoculado com 3000 mg de micélio/kg de madeira

O extrato tratado com carvão foi submetido à cromatografia de troca iônica. Os dados da tabela 2 mostram um aumento de 95 % na atividade enzimática de MnP sugerindo que compostos inibidores da atividade de MnP que estavam presentes no extrato foram separados pela cromatografia de troca iônica (CARVALHO; FERRAZ; MILAGRES, 2008). No caso das xilanases foi observada uma perda de 12 % da atividade enzimática. O índice relativo de absorção em 280 nm após a cromatografia de troca iônica diminuiu 22 % comparado ao extrato tratado com carvão ativo. O extrato obtido da cromatografia de troca iônica foi ainda submetido à ultracentrifugação em membranas dotadas de cortes seletivos de 30 kDa. O sobrenadante foi recuperado, congelado em e liofilizado. Essa etapa proporcionou uma perda de 19 % de atividade enzimática de MnP e 72 % de xilanases, o que indica que parte das enzimas passaram pela membrana. O índice relativo de absorção em 280 nm após a ultracentrifugação diminuiu 89 % comparado ao extrato após a cromatografia de troca iônica, indicando que a maioria dos compostos fenólicos oriundos da madeira presentes no extrato tem massa molar menor que 30 kDa.

Essa etapa de purificação dos extratos foi fundamental para poder monitorar as reações de degradação de complexos lignina-carboidrato por CPG, pois quando o extrato bruto era misturado a uma solução aquosa contendo modelos de lignina, na proporção usualmente usada no meio reacional, o cromatograma resultante apresentava

essencialmente um pico decorrente das substâncias aromáticas presentes no extrato e não dos complexos lignina-carboidratos solúveis em água (dados não mostrados). Por outro lado, o extrato tratado com carvão, cromatografia de troca iônica e ultracentrifugação foi suficientemente purificado para permitir o monitoramento das reações por CPG, visto que apesar das substâncias aromáticas remanescentes no extrato co-eluírem junto aos complexos lignina-carboidratos, elas representaram uma parcela muito pequena. Vale ressaltar ainda que os extratos de madeira biotratada por *C. subvermispota* não contêm lacases em quantidades expressivas (MASARIN; FERRAZ, 2008; SOUZA-CRUZ et al., 2004; VICENTIM; FERRAZ, 2007).

Em síntese, consideramos que os tratamentos proporcionaram a preparação de um extrato com elevada atividade de MnP e com um baixo teor de substâncias aromáticas provenientes da madeira e com isso o monitoramento da degradação de complexos lignina-carboidratos por CPG pode ser factível.

5.2 Obtenção de agentes redutores de Fe^{3+} presentes em extratos aquosos de *E. grandis* biotratado por *C. subvermispota*

O presente trabalho também aborda se agentes redutores de Fe^{3+} , presentes em extratos aquosos de madeira biotratada, poderiam atuar como iniciadores de reações de peroxidação de ácido linoléico. A princípio, esses agentes redutores de Fe^{3+} podem gerar íons Fe^{2+} em solução que, combinados com H_2O_2 produzido pelo fungo, poderiam gerar radicais OH através da reação de Fenton (GOODELL et al., 1997). Esses radicais OH poderiam claramente atuar como iniciadores da peroxidação de ácido linoléico, de maneira semelhante ao observado pela ação dos íons Mn^{3+} (KAPICH et al, 1999). Além dessa via de reação relativamente conhecida (conforme já mencionamos na introdução), nosso próprio grupo de pesquisas tem observado que íons Fe^{2+} em solução podem atuar diretamente como iniciadores da peroxidação de ácido linoléico, pois a oxidação de íons Fe^{2+} leva a formação de radicais hidroperoxila que também podem atuar sobre os ácidos graxos di-insaturados (HORTA, 2008).

Neste contexto, extratos aquosos obtidos a partir de madeira biotratada foram caracterizados quanto à capacidade de reduzir íons Fe^{3+} e de iniciar reações de peroxidação do ácido linoléico. Esses estudos foram realizados como o tema principal de uma dissertação de mestrado desenvolvida em nosso grupo de pesquisa (HORTA, 2008). A partir dos resultados desse trabalho, propusemos os protocolos de reação de degradação dos modelos de lignina em avaliação na presente tese.

Em síntese, o trabalho anterior de Horta (2008) mostrou que os extratos aquosos apresentam capacidade de reduzir íons Fe^{3+} e que essa capacidade aumenta em função do tempo de biotratamento da madeira de *E. grandis*. Quando num meio reacional contendo o extrato aquoso se adiciona íons Fe^{3+} e ácido linoléico, o Fe^{2+} gerado pode iniciar as reações de peroxidação. De fato, a taxa de consumo de O_2 nas reações de peroxidação de ácido linoléico foi proporcional à capacidade redutora dos extratos brutos como mostra a figura 18. Os extratos aquosos brutos também foram submetidos à ultrafiltração em membranas com cortes seletivos de 5, 10 e 30 kDa. Os filtrados das membranas mostram capacidades redutoras e atividades pro-oxidantes do ácido linoléico semelhantes ao extrato aquoso bruto. Na presente tese, o extrato aquoso obtido após 15 dias de biodegradação de *E. grandis* por *C. subvermispora* foi ultrafiltrado contra membrana com corte de 5 kDa e a solução que passou pela membrana foi avaliada como iniciador nas reações de degradação de lignina.

Figura 18 - Correlação entre a eficiência da redução de Fe^{+3} versus taxa de consumo de O_2 em reações de peroxidação de ácido linoléico iniciadas por extratos aquosos recuperados de *E. grandis* biodegradado por *C. subvermispora* (HORTA, 2008).

5.3 Obtenção, caracterização e degradação de um complexo lignina-carboidrato (CLC)

5.3.1 Obtenção e caracterização do CLC

Um complexo lignina-carboidrato solúvel em água foi obtido a partir de adaptações de metodologias inicialmente desenvolvidas para a recuperação de lignina de madeira moída (LUNDQUIST, 1992). Inicialmente se postulou que a utilização desse tipo de modelo simplificaria os estudos subsequentes de degradação *in vitro*, visto que se trabalharia com a enzima e o substrato dissolvido, em vez de um substrato insolúvel em meio aquoso. Esse tipo de substrato modelo também permitiria avaliar se os sistemas degradativos em estudo poderiam clivar ligações covalentes existentes entre a lignina e os carboidratos. Para a obtenção do complexo lignina-carboidrato, madeira moída em moinho de bolas foi extraída com dioxano/água 1:1. O extrato foi seco e então suspenso em água destilada para recuperar somente a fração solúvel em água. Os rendimentos da extração dos complexos lignina-carboidratos em questão estão mostrados na tabela 3.

A composição química do CLC e da madeira de *E. grandis* moída no moinho de bolas está apresentada na tabela 4. O CLC mostrou um teor elevado de lignina e proporcionalmente menos glicose e xilose do que *E. grandis* moído. O cromatograma do hidrolisado ácido do CLC apresentou os picos tradicionais de glicose, xilose, arabinose e ácido acético (figura 19). No entanto, também foram detectados picos de compostos que não foram identificados. Provavelmente esses picos correspondem a açúcares oxidados ou frações da lignina que, por não terem sido quantificados, não permitiram que o balanço de massas para os componentes da amostra se aproximasse de 100 %. De fato, os componentes quantificados do CLC totalizaram 76% da massa inicial analisada.

Tabela 3 - Rendimento de recuperação das frações de *E. grandis* extraídas com dioxano 50 % e da fração solúvel em água (CLC).

Material	Massa (g)	Rendimento %
Inicial (madeira moída seca)	200	-
Complexo extraído com dioxano/água (1:1)	6,3429	3,17
Fração do complexo anterior solúvel em água (CLC)	4,5572	2,28

Tabela 4 – Lignina total, glucana, xilana, grupo arabinosil e grupo acetil contidos no CLC e em madeira de *E. grandis* moída.

Amostra	Lignina total (%)	Glucana (%)	Xilana (%)	Grupo Arabinosil (%)	Grupo Acetil (%)
<i>E. grandis</i>	29,0 ± 0,1	46 ± 1	13,6 ± 0,3	nd	2,7 ± 0,1
CLC	44,8 ± 0,5	12,3 ± 0,1	11,3 ± 0,1	1,90 ± 0,03	5,7 ± 0,1

nd = não detectado

Figura 19 - Cromatograma típico dos produtos da hidrólise ácida do complexo lignina-carboidrato (CLC) isolado de *E. grandis*. G = glicose, X = xilose, A = arabinose, HAc = ácido acético, R e T = compostos não identificados.

O espectro UV/visível do CLC foi característico de lignina, com uma banda com máximo em 280 nm (Figura 20) (FENGEL; WEGENER, 1989). A absorvidade em 280 nm foi de 18 L.g⁻¹cm⁻¹ (gramas de lignina) sendo semelhante a ligninas isoladas (FENGEL; WEGENER, 1989). O CLC mostrou 3,2 ± 0,06 % de hidroxílicas fenólicas. Além disso, o espectro de infravermelho (figura 21) mostrou bandas características de lignina (FAIX, 1991), porém a banda em 1510 cm⁻¹ (banda característica de lignina) mostrou uma intensidade baixa comparado a ligninas isoladas em dioxano (FENGEL; WENEGER, 1989; GUERRA et al., 2006). A abundância de monômeros obtidos após a reação de tioacidólise do CLC foi de 500 µmoles de monômeros/g de lignina. Esse teor de monômeros é bastante inferior àquele observado na madeira de *E. grandis* (GUERRA; LUCIA; ARGYROPOULOS, 2008).

Figura 20 - Espectros UV/visível do CLC isolado de *E. grandis*.

Figura 21 – Espectro de infravermelho da fração CLC obtida de *E. grandis*. As bandas indicadas por número correspondem aos grupos funcionais listados (FAIX, 1991).

1. (3460 cm^{-1}) grupos O-H (estiramento)
2. (2950 cm^{-1}) grupos C-H (estiramento)
3. (1740 cm^{-1}) grupos carbonila não conjugados
4. (1605 cm^{-1}) anéis aromáticos (vibração) e provável interferência de traços de água contida na amostra
5. (1505 cm^{-1}) grupos C-H em anel aromático (característica de lignina)
6. (1300 cm^{-1} a 1470 cm^{-1}) região de grupos C-H variados
7. (1250 cm^{-1}) grupos C-C, C-O e C=O (estiramento)
8. (1000 cm^{-1} a 1125 cm^{-1}) grupo C-O (deformação)

A caracterização por CPG do CLC está apresentada na figura 22. O CPG monitorado em 280 nm (comprimento de onda característico de absorção da lignina) mostrou uma molécula polidispersa com uma massa molar média aparente, M_w , de $18,7 \pm 0,7$ kDa e uma área total de 4,7 UAbs x mL, sendo que 6 % dessa área apareceu na região de exclusão da coluna. O sinal detectado em 280 nm se sobrepôs ao detectado em 490nm (relativo aos carboidratos) indicando que deve haver ligações covalentes entre a lignina e a hemicelulose. No caso dos carboidratos, foi observada uma massa molar média aparente de $25 \pm 0,7$ kDa e uma área total de 6,1 UAbs x mL, sendo que 5 % dessa área apareceu na região de exclusão da coluna.

Figura 22 – Cromatografia de permeação em gel do CLC monitorada em 280 nm (comprimento característico de absorção da lignina) e 490 nm (açúcares totais). (PE) região de exclusão da coluna e (P1) região de permeação da coluna.

Apesar do baixo rendimento de monômeros na tioacidólise, o CLC apresentou uma molécula que continha as ligações do tipo aril-éter (ligações mais abundantes em lignina), além de indicativo de ligações entre a lignina e os carboidratos, sendo um modelo útil para os estudos propostos nessa tese que envolvem a degradação *in vitro* de materiais lignocelulósicos baseadas na peroxidação de ácido linoléico iniciada pelos sistemas MnP/Mn²⁺/H₂O₂ ou Fe⁺³/agentes redutores.

5.3.2 Peroxidação de ácido linoléico e degradação do CLC por íons Mn⁺³ ou MnP

Estudos recentes realizados por Kapich et al. (2005 a) mostraram que o ácido linoléico pode ser peroxidado *in vitro* na presença de MnP de *Phanerochaete chrysosporium*. Os

autores mostraram que íons Mn^{+3} oriundos do ciclo catalítico de MnP podem ser estabilizados por quelantes. Os íons Mn^{+3} na forma de complexo organometálico (Mn^{+3} -quelante) têm capacidade oxidativa suficiente para iniciar a oxidação do ácido linoléico. O grupo utilizou um oxímetro para medir o consumo de oxigênio oriundo da peroxidação de ácido linoléico. Conduzimos experimentos semelhantes os reportados por Kapich et al. (2005) e na figura 23 A está apresentado o consumo de oxigênio oriundo da peroxidação de ácido linoléico iniciada por MnP purificada de *C. subvermispota* na ausência e presença do CLC. A peroxidação iniciada por MnP ativa ou MnP desnaturada pelo calor, ambas na ausência do CLC, indicou taxas de consumo de oxigênio de 24,7 e 8 nmoles/mL.min, respectivamente (tabela 5). A adição do CLC ao meio reacional proporcionou taxas progressivamente menores de consumo de O_2 em função da presença de concentrações crescentes do CLC. Somente quando as concentrações do CLC foram da ordem de 0,01 mg/mL é que as taxas de consumo de oxigênio voltaram a ser similares às observadas para a reação conduzida na ausência do CLC (Fig. 23 A e tabela 5). Um efeito similar de inibição da reação de peroxidação de ácido linoléico iniciada por MnP foi descrito para reações conduzidas na presença de compostos aromáticos fenólicos de baixa massa molar (KAPICH, GALKIN; HATAKKA, 2007).

Íons Mn^{+3} quelados por lactato também foram capazes de peroxidar o ácido linoléico *in vitro* mostrando uma taxa de consumo de oxigênio de 25,7 nmoles/mL.min, em meio reacional na ausência do CLC. As inibições nas taxas de consumo de oxigênio devido a presença do CLC foram semelhantes ao observado para as reações iniciadas por MnP (Fig. 23 B e tabela 5).

Figura 23 – Consumo de oxigênio em reações de peroxidação de ácido linoléico *in vitro* na presença do CLC. (A) Reações com MnP: (preto) completa* sem CLC; (verde) completa sem CLC com MnP desnaturada; (lilás) completa com CLC 1mg/mL; (vermelho) completa com CLC 0,3mg/mL; (azul) completa com CLC 0,01mg/mL. (B) com íons Mn^{+3} : (preto) completa** sem CLC; (lilás) completa com CLC 1mg/mL; (vermelho) completa com CLC 0,3mg/mL; (azul) completa com CLC 0,01mg/mL. * Completa significa meio reacional com MnP ativa + Mn^{+2} + ácido linoléico + H_2O_2 ; ** Completa significa meio reacional com Mn^{+3} + ácido linoléico.

Tabela 5 – Taxa de consumo de oxigênio em reações de peroxidação de ácido linoléico *in vitro* iniciadas por MnP ou Mn^{3+} na presença ou ausência do CLC.

Meio de reação com MnP	Taxa (nmol/mL.min)	Meio de reação com íons Mn^{+3}	Taxa (nmol/mL.min)
Sem CLC completa*	24,7	Sem CLC completa**	25,7
Sem CLC com MnP desnaturada pelo calor	8,0	-----	---
Completa com CLC 1 mg/mL	4,0	Completa com CLC 1 mg/mL	0,2
Completa com CLC 0,3 mg/mL	3,0	Completa com CLC 0,3 mg/mL	4,0
Completa com CLC 0,01 mg/mL	24,8	Completa com CLC 0,01 mg/mL	23,9

* Completa significa meio reacional com MnP ativa + Mn^{+2} + ácido linoléico + H_2O_2

** Completa significa meio reacional com Mn^{+3} + ácido linoléico

Estudos realizados por Kapich et al. (1999) mostraram que radicais peroxilas oriundos da oxidação de ácido linoléico iniciada por MnP foram capazes de degradar modelos de lignina não fenólicos. Considerando este fato, e os dados da figura 23 e da tabela 5, realizamos reações de peroxidação de ácido linoléico iniciadas por MnP na presença do

CLC, visando verificar se o CLC apresentava indicativos de degradação. Ao término dessas reações, o CLC apresentou-se na forma de uma suspensão, ou seja, tornou-se menos solúvel. De fato, o CLC mostrou-se solúvel em pH 7, porém em pH 4,5 foi parcialmente solúvel, principalmente nos meios reacionais dos ensaios contendo MnP ou íons Mn^{+3} , ambos contendo o ácido linoléico. Considerando esse problema, o pH final das amostras foi elevado para 12 ao término das reações com o objetivo de solubilizar totalmente o CLC e viabilizar a caracterização por CPG. Apesar de maior solubilização do CLC degradado em pH 12, ainda havia uma pequena fração insolúvel que foi eliminada por filtração, antes da injeção no sistema cromatográfico.

Na figura 24 A estão mostrados os dados de CPG do CLC degradado nas reações iniciadas por MnP. Os CPGs mostram 3 regiões distintas, um pico excluído pela coluna (PE) e, na região permeada, dois picos pouco resolvidos: (P1) cuja massa molar média aparente foi de cerca de 60 kDa e; P2, mais intenso, cujas massas molares estão mostradas na tabela 6. O ácido linoléico parece ser responsável pelo aparecimento do pico P1, pois o mesmo (P1) apareceu somente nos casos onde houve a adição de ácido linoléico. É possível sugerir que esse pico (P1) corresponda ao produto da adição do radical peroxila ao CLC, sem posterior degradação do composto formado. Desta forma, o pico 2 foi utilizado como um indicador dos produtos de degradação do CLC, pois apresentou diminuição da massa molar em função do tratamento e, mais importante, representou mais de 85 % da área total do cromatograma (tabela 6).

A mistura reacional controle (com MnP inativada por calor) mostrou um pico P2 com massa molar aparente de 17,8 kDa (figura 24 A e tabela 6). O produto obtido após a reação completa (com MnP ativa na presença de ácido linoléico) apresentou uma massa molar média aparente de 13 kDa (tabela 6). O menor Mw do CLC degradado indica a clivagem das ligações covalentes do modelo que podem ter sido quebras de ligações do tipo β -O-4 e/ou entre os carbonos α e β do CLC. Um maior detalhamento sobre as possíveis reações envolvidas foi obtido nos experimentos realizados em escala ampliada que estão apresentados e discutidos no item 5.4.1

Uma observação importante nas reações iniciadas por MnP foi que, mesmo sem a adição de ácido linoléico, a massa molar média aparente do CLC degradado foi baixa (12,4 kDa). Isso indicou que o CLC foi um substrato passível de degradação por MnP mesmo na ausência do ácido linoléico. A princípio, isso pode ser explicado pelo elevado teor de hidroxilas fenólicas encontrado no CLC (3,2 %), pois as estruturas fenólicas da lignina são passíveis de oxidação direta pela MnP (Bao et al., 1994). Também o ensaio conduzido sem a adição de íons Mn^{2+} levou a formação de um produto com massa molar diminuída (13,8 kDa). Nesse caso, é possível inferir que o CLC preparado continha metais oriundos da madeira, incluindo Mn^{2+} . Por outro lado, a reação conduzida sem o sistema gerador de H_2O_2

(glicose oxidase/glicose) proporcionou a formação de um resíduo com massa molar similar à observada na reação controle com MnP inativada por calor, indicando que a reação efetivamente depende da presença da enzima MnP realizando seu ciclo catalítico conhecido, que depende de H_2O_2 (tabela 6).

Na figura 24B estão mostrados os CPGs dos produtos das reações de degradação do CLC iniciadas diretamente por íons Mn^{+3} quelados com lactato. Inicialmente, é importante mencionar que a massa molar média aparente do CLC da reação controle desse caso (13,5 kDa, tabela 7) difere do valor observado no controle das reações descritas anteriormente com MnP (17,8 kDa, tabela 6). Isso ocorre, pois, nas reações com MnP, o produto analisado na mistura reacional contém a própria enzima e seus contaminantes aromáticos (tabela 2) que co-eluem com o CLC, ou ainda se acoplam a ele, ocasionando a formação de um composto com massa molar aparente maior do que a do CLC puro. Analisando os dados da tabela 7, pode-se notar que a massa molar média aparente do CLC degradado na reação completa contendo íons Mn^{+3} foi similar à observada para o CLC controle. Por outro lado, a massa molar média aparente do CLC degradado por íons Mn^{3+} na ausência de ácido linoléico foi significativamente menor (8,3 kDa) do que a observada para o CLC controle. Esse dado confirma que o CLC pode ser degradado diretamente por íons Mn^{3+} sem a dependência da presença de ácido linoléico.

Figura 24 – Cromatografia de permeação em gel monitorada em 280 nm dos compostos solúveis oriundos das reações de degradação em meio aquoso do CLC iniciada a partir da peroxidação de ácido linoléico *in vitro*. (A) reações com MnP: (preto) reação completa; (verde) MnP desnaturada pelo calor; (lilás) sem ácido linoléico; (vermelho) sem glicose oxidase; (azul) sem Mn^{+2} ; (PE) região de exclusão da coluna; (P1) região de permeação de alta massa molar; (P2) região de permeação mais intensa. (B) reações com íons Mn^{+3} : (vermelho) reação completa; (preto) somente tampão; (azul) sem ácido linoléico; (verde) com ácido linoléico sem Mn^{+3} ; (PE) região de exclusão da coluna.

Tabela 6 – Massas molares médias (Mw), áreas excluídas (APE) e áreas de permeação (AP) do CLC em meios reacionais contendo MnP, Mn^{2+} , glicose oxidase e ácido linoléico.

Meio de reação	APE (%)	AP (%)	Mw (P) (kDa)*
MnP/ Mn^{2+} /H ₂ O ₂ /ácido linoléico (reação completa)	2,2	97,8	13,0
Idem reação completa sem linoléico	1,2	98,8	12,4
Idem reação completa sem Mn^{2+}	2,8	97,2	13,8
Idem reação completa sem H ₂ O ₂ **	4,4	95,6	18,4
Idem reação completa com MnP desnaturada pelo calor	4,5	95,5	17,8

* Os valores de Mw variaram em 4 % numa análise do CLC em triplicata (item 4.4)

** Sem o sistema gerador de H₂O₂ (glicose oxidase e glicose)

Tabela 7 – Massas molares médias (Mw), áreas excluídas (APE) e áreas de permeação (AP) do CLC em meios reacionais contendo íons Mn^{3+} e ácido linoléico.

Meio de reação	APE (%)	AP (%)	Mw (P) (kDa)*
Mn^{3+} /ácido linoléico (reação completa)	2,7	97,3	13,1
Idem reação completa sem Mn^{3+}	1,5	98,5	14,1
Idem reação completa sem ácido linoléico	0,5	99,5	8,3
Controle**	1,4	98,6	13,5

* Os valores de Mw variaram em 4 % numa análise do CLC em triplicata (item 4.4)

** Tampão succinato-lactato de sódio

No caso das reações iniciadas por Mn^{3+} , os CPGs também foram detectados em 490 nm (após reação dos carboidratos presentes com fenol/ácido sulfúrico) (figura 25). A mistura reacional controle (com apenas tampão succinato-lactato de sódio) mostrou uma massa molar média aparente de 26,8 kDa. O produto obtido após a reação completa (com íons Mn^{3+} na presença de ácido linoléico) apresentou uma massa molar média aparente de 22,4 kDa. A mistura reacional com Mn^{3+} , porém sem a presença de ácido linoléico mostrou uma massa molar média aparente de 21,0 kDa (tabela 8). As menores massas molares médias dos CLCs tratados indicam que íons Mn^{3+} e/ou radicais peroxila foram suficientes para romper ligações entre os carboidratos e a lignina (possíveis ligações do tipo fenol glicosídeo, éter benzílico ou éster, Fig. 3 - item 2.1).

Uma comparação entre os dois sistemas oxidativos indica que os dados de MnP corroboram com os de íons Mn^{3+} mostrando que o CLC pode ser degradado através de radicais peroxilas e/ou Mn^{3+} . Os dados sugerem que o CLC possui OH fenólicos suficientes para dar início a quebras de ligações do tipo β -O-4 e/ou entre os carbonos α e β , bem como quebra de ligações que unem a fração de lignina com os carboidratos.

Figura 25 – Cromatografia de permeação em gel dos compostos solúveis oriundos das reações de degradação do CLC em meio aquoso a partir da peroxidação de ácido linoléico *in vitro* iniciada por íons Mn^{+3} . Monitoramento em 490 nm (açúcares totais): (quadrado) somente tampão; (triângulo) sem linoléico; (círculo) reação completa. (PE) região de exclusão da coluna.

Tabela 8 – Massas molares médias (Mw), áreas excluídas (APE) e áreas de permeação (AP) do CLC detectado em 490 nm após reação em meios contendo íons Mn^{3+} e ácido linoléico.

Meio de reação	APE (%)	AP (%)	Mw (P) (kDa)*
Mn^{+3} /ácido linoléico	3,5	96,5	22,4
Idem anterior sem ácido linoléico	4,7	95,3	21,0
Controle **	3,9	96,1	26,8

* Os valores de Mw variaram em 4 % numa análise do CLC em triplicata (item 4.4)

** Tampão succinato-lactato de sódio

5.3.3 Peroxidação de ácido linoléico e degradação do CLC por íons Fe^{+2} ou Fe^{+3} /agentes redutores

Estudos prévios mostraram que a peroxidação de ácido linoléico pode ser iniciada pela simples adição de íons Fe^{+2} a um meio reacional saturado de oxigênio que contenha o ácido linoléico emulsionado (HORTA, 2008). Nesta reação, os íons Fe^{+2} são inicialmente oxidados a íons Fe^{3+} a custa da redução do oxigênio dissolvido, gerando o radical superóxi-ânion que é prontamente protonado em meio ácido formando o radical hidroperoxila. Os radicais hidroperoxila podem oxidar o ácido linoléico (HORTA, 2008; SPITELLER, 2006). O mesmo tipo de reação pode ser iniciado por íons Fe^{3+} , desde que na presença de um agente redutor, como é o caso dos extratos aquosos obtidos dos cultivos de *C. subvermispora*

sobre madeira (HORTA, 2008). Na tese aqui apresentada, essa característica foi explorada para avaliar como a peroxidação do ácido linoléico iniciada pelos sistemas baseados em Fe^{2+} ou Fe^{3+} /extratos de cultivos de *C. subvermispora* poderiam dar início à degradação do CLC, de forma similar ao já discutido para as reações iniciadas por MnP.

A figura 26 A mostra o consumo de oxigênio durante a peroxidação de ácido linoléico iniciada por íons Fe^{+2} adicionados diretamente ao meio reacional que continha também o CLC. As taxas de consumo de oxigênio foram de 221,8 nmoles/mL.min em meio reacional que continha somente ácido linoléico e íons Fe^{2+} . De forma similar ao observado nas reações iniciadas por MnP, a adição de 1 mg/mL de CLC ao meio levou a diminuição na taxa de consumo de oxigênio₂ para 161,7 nmoles/mL.min, confirmando o caráter anti-oxidante do CLC. Neste caso a inibição foi menos intensa do que o observado nas reações iniciadas por MnP, pois já a partir de concentrações de 0,3 mg/mL do CLC não se observou inibição expressiva na taxa de consumo de oxigênio, enquanto que nas reações iniciadas por MnP isso só foi observado em concentrações mais baixas do CLC (0,01 mg/mL). Uma explicação seria que a alta concentração de íons Fe^{+2} presente na solução gerou uma concentração expressiva de radicais peroxila e por isso, maior capacidade oxidativa do meio (Fig. 26 A e tabela 9).

A figura 26 B mostra os resultados da peroxidação do ácido linoléico iniciada por íons Fe^{+3} (em mesma concentração inicial que a usada de Fe^{2+} nos experimentos anteriores) combinados com um extrato aquoso de um cultivo de *C. subvermispora*. Trata-se de um extrato obtido após 15 dias de cultivo que foi livrado de substâncias de elevada massa molar por meio de ultrafiltração através de uma membrana com corte de 5 kDa. Na presença de Fe^{3+} , extrato aquoso e ácido linoléico, a taxa de consumo de oxigênio foi de 42,7 nmoles/mL.min (tabela 9). Esse dado foi significativamente menor do que aquele observado pela reação iniciada por íons Fe^{2+} , o que é coerente, pois o sistema Fe^{3+} /extrato aquoso gera íons Fe^{2+} lentamente para o meio reacional. Ainda considerando o sistema baseado em Fe^{3+} /extrato aquoso, podemos observar que o extrato aquoso, mesmo sem a presença de íons Fe^{+3} , foi capaz de iniciar a oxidação do ácido linoléico promovendo uma pequena taxa de consumo de oxigênio que foi de 7,5 nmoles/mL.min. Algo similar ocorreu na reação controle que continha somente íons Fe^{+3} que proporcionou uma taxa de consumo de oxigênio de 12,5 nmoles/mL.min. Essas reações controle mostram que o ácido linoléico é instável e que mesmo traços de Fe^{2+} oriundos do equilíbrio $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ ou alguns compostos presentes no extrato aquoso podem oxidar parcialmente essa molécula. A adição do CLC a esse meio reacional causou o mesmo efeito inibidor já discutido anteriormente, ou seja, quanto maior a concentração de CLC maior a inibição (Fig. 26 B e tabela 9).

Figura 26 – Consumo de oxigênio em reações de peroxidação de ácido linoléico *in vitro* na presença do CLC. (A) reações com Fe^{+2} como agente de iniciação: (preto) sem CLC; (azul) com CLC 1 mg/mL; (lilás) com CLC 0,3 mg/mL; (vermelho) com CLC 0,01 mg/mL. (B) reações com Fe^{+3} /extrato redutor: (preto) sem CLC; (amarelo) sem CLC e Fe^{+3} ; (vermelho) sem CLC e extrato; (azul) completa com CLC 1 mg/mL; (verde) completa com CLC 0,3 mg/mL; (lilás) completa com CLC 0,01 mg/mL.

Tabela 9 – Taxa de consumo de oxigênio em reações de peroxidação de ácido linoléico *in vitro* iniciadas por Fe^{2+} ou Fe^{3+} /agente redutor na ausência ou presença do CLC.

Meio de reação com íons Fe^{+2}	Taxa (nmoles/mL.min)	Meio de reação com íons Fe^{+3} / agente redutor	Taxa (nmoles/mL.min)
Sem CLC completa*	221,8	Sem CLC completa**	42,7
---	---	Sem CLC e Fe^{+3}	7,5
---	---	Sem CLC e extrato	12,5
Completa com CLC 1 mg/mL	161,7	Completa com CLC 1 mg/mL	10,7
Completa com CLC 0,3 mg/mL	183,0	Completa com CLC 0,3 mg/mL	35,7
Completa c/ CLC 0,01 mg/mL	223,7	Completa c/ CLC 0,01 mg/mL	42,8

* Completa = Fe^{+2} + ácido linoléico

** Completa = extrato redutor + Fe^{+3} + ácido linoléico

Reações de degradação do CLC também foram realizadas a partir da peroxidação de ácido linoléico iniciada por Fe^{+2} ou Fe^{+3} /extrato aquoso redutor. Neste caso, também ocorreu o problema da dissolução apenas parcial do CLC no meio reacional, conforme já discutido para as reações iniciadas por MnP ou Mn^{+3} . Os CPGs das reações de degradação do CLC a partir da peroxidação de ácido linoléico iniciada por Fe^{+2} ou Fe^{+3} /extrato redutor estão apresentados na figura 27.

Inicialmente, é importante mencionar que a massa molar média aparente do CLC da reação controle desse caso (18,1 kDa, tabela 10) difere do valor observado no controle das

reações descritas anteriormente com íons Mn^{+3} (13,5 kDa, tabela 7). Não ha uma explicação clara para essas diferenças nos controles, visto que a única variação é o sistema tampão utilizado em cada reação que é diferente. A princípio, parece que as diferenças residem na não dissolução completa do CLC nos meios reacionais. Com isso a fração solúvel analisada na CPG pode ter variado quando o meio reacional continha tampões diferentes. De qualquer forma, os dados em estudo são comparativos dentro do próprio grupo de experimentos, sendo que os valores absolutos de massa molar aparente não são os resultados mais relevantes.

Na figura 27 A temos os CPGs dos meios reacionais contendo íons Fe^{+2} adicionados ao ácido linoléico. Novamente temos um pico na região de exclusão da coluna (PE). Na região de permeação, o CPG permitiu calcular a massa molar média aparente de 18,1 kDa para o sistema controle (Fig. 27 A e tabela 10). Essa massa molar diminuiu para 7,8 kDa quando o meio reacional continha Fe^{+2} /ácido linoléico (tabela 10). O menor Mw do CLC degradado também indica a clivagem das ligações covalentes do modelo que podem ter sido quebras de ligações do tipo β -O-4 e/ou entre os carbonos α e β do CLC. A mistura do meio reacional contendo apenas ácido linoléico, porém sem adição de íons Fe^{+2} , levou a um CLC com massa molar média aparente de 13,5 kDa, indicando que o CLC foi parcialmente degradado, provavelmente por iniciação da degradação do ácido linoléico simplesmente pelo meio inicialmente saturado de oxigênio (tabela 10). Um maior detalhamento sobre as possíveis reações envolvidas foi obtido nos experimentos realizados em escala ampliada que estão apresentados e discutidos no item 5.4.2.

Na figura 27 B temos os CPGs das reações com íons Fe^{+3} /extrato redutor/ácido linoléico. Neste caso também temos um pico na região de exclusão da coluna (PE). Na região permeada a mistura do meio reacional controle (tampão acetato de sódio e extrato redutor) mostrou uma massa molar média aparente de 16,2 kDa (Fig. 27 B e tabela 11). O ensaio controle continha o extrato redutor adicionado ao CLC o que culminou em decréscimo de sua massa molar média aparente (18,1 para 16,2 kDa, tabela 10 e 11, respectivamente). O meio reacional contendo Fe^{+3} /extrato redutor/ácido linoléico apresentou uma massa molar média aparente de 13,2 kDa (tabela 11). O menor Mw do CLC degradado novamente indica quebras de ligações do tipo β -O-4 e/ou entre os carbonos α e β do CLC.

Figura 27 – Cromatografia de permeação em gel monitorada em 280nm dos compostos solúveis oriundos das reações de degradação em meio aquoso do CLC a partir da peroxidação de ácido linoléico *in vitro*. (A) reações iniciadas por íons Fe^{+2} : (preto) somente tampão; (azul) reação completa; (vermelho) com linoléico sem Fe^{+2} . (B) reações iniciadas por Fe^{+3} /extrato redutor: (preto) tampão e extrato; (azul) reação completa; (vermelho) sem Fe^{+3} . (PE) região de exclusão da coluna

Tabela 10 – Massas molares médias (Mw), áreas excluídas (APE) e áreas de permeação (AP) do CLC em meios reacionais contendo Fe^{+2} e ácido linoléico.

Meio de reação	APE (%)	AP (%)	Mw (P) (kDa)*
Fe^{+2} /ácido linoléico	0,4	99,5	7,8
Idem anterior sem Fe^{+2}	5,3	94,7	13,5
Controle**	9,0	91,0	18,1

* Os valores de Mw variaram em 4 % numa análise do CLC em triplicata (item 4.4)

** Tampão acetato de sódio

Tabela 11 – Massas molares médias (Mw), áreas excluídas (APE) e áreas de permeação (AP) do CLC em meios reacionais contendo Fe^{+3} /extrato redutor e ácido linoléico.

Meio de reação	APE (%)	AP (%)	Mw (P) (kDa)*
Fe^{+3} /extrato redutor/ácido linoléico	9,5	89,5	13,2
Idem anterior sem Fe^{+3}	10	90,0	15,6
Controle **	9,5	89,5	16,2

* Os valores de Mw variaram em 4 % numa análise do CLC em triplicata (item 4.4)

** Tampão acetato de sódio + extrato redutor

A figura 28 apresenta os CPGs detectados em 490 (carboidratos) das reações com íons Fe^{+2} . A mistura reacional controle (com apenas tampão acetato de sódio) mostrou uma massa molar média aparente de 26,4 kDa. O produto obtido após a reação completa (com

íons Fe^{+2} na presença de ácido linoléico) apresentou uma massa molar média aparente de 27,3 kDa (tabela 12). Os dados indicam que íons Fe^{+2} /ácido linoléico não foram capazes de romper as ligações entre os carboidratos e a lignina do CLC, pois as massas molares médias aparentes do meio reacional controle e contendo Fe^{+2} /ácido linoléico foram semelhantes. Entretanto, a área excluída do meio reacional contendo Fe^{+2} /ácido linoléico foi relativamente menor que a do controle (6,0 e 14,4 %, respectivamente) (tabela 12).

Figura 28 – Cromatografia de permeação em gel dos compostos solúveis oriundos das reações de degradação do CLC em meio aquoso a partir da peroxidação de ácido linoléico *in vitro* iniciada por íons Fe^{+2} . Monitoramento em 490 nm (açúcares totais): (quadrado) somente tampão; (círculo) reação completa. (PE) região de exclusão da coluna.

Tabela 12 - Relações de massas molares médias (Mw) em kDa, áreas excluídas (APE) e áreas de permeação (AP1) do CLC (Abs 490 nm, açúcares totais) em meios reacionais contendo íons Mn^{3+} e ácido linoléico (B).

Meio de reação	APE (%)	AP1 (%)	Mw (P1) (kDa)*
Fe^{+2} /linoléico	6,0	94,0	27,3
Controle **	14,4	85,6	26,4

* Os valores de Mw variaram em 4 % numa análise do CLC em triplicata (item 4.4)

** Tampão acetato de sódio

5.4 Aumento de escala das reações de degradação do CLC

Alguns experimentos foram conduzidos em escala ampliada somente com os sistemas miméticos como agentes iniciadores da degradação do CLC. A ampliação de escala teve o objetivo de gerar uma massa de CLC degradado que permitisse conduzir ensaios de

caracterização estrutural, adicionais aos estudos de CPG já descritos para todos os sistemas iniciadores em estudo. Vale lembrar que a caracterização estrutural do CLC degradado em sistemas que continham MnP ou os extratos aquosos não seria possível, pois o CLC encontrava-se misturado a compostos fenólicos estruturalmente similares ao próprio CLC, que eram oriundos, ou dos extratos contendo MnP, ou dos agentes redutores extraídos da madeira biotratada.

A escala das reações foi ampliada numa proporção de 35 vezes. O meio reacional obtido após 72 h de reação foi dividido em 2 partes. Uma delas foi alcalinizada a pH 12 de forma similar ao descrito nos estudos anteriores em pequena escala. A outra foi submetida diretamente à ultrafiltração contra membrana de corte de 3 kDa para eliminar íons metálicos, tampões e ácido linoléico, restando todo o CLC de alta massa molar, solúvel e insolúvel, numa mesma fração. A amostra alcalinizada a pH 12 foi utilizada para quantificar (gravimetricamente) a fração do CLC degradado que não dissolveu em pH 12 e ficou retida numa membrana de 0,45 μm (tabela 10). A amostra retida pela membrana de ultrafiltração foi recuperada, liofilizada e estocada para a posterior caracterização química.

A tabela 13 apresenta as porcentagens dos CLCs degradados que não solubilizaram mesmo em pH 12. No caso das reações controle, ou seja, conduzidas sem a presença do agente iniciador, somente 17,3 % e 5,0 % do CLC não dissolveram após a alcalinização a pH 12, nos meios que continham tampões succinato-lactato de sódio ou acetato de sódio, respectivamente. Por outro lado, uma fração expressiva do CLC degradado não dissolveu em pH 12, após as reações iniciadas por Fe^{2+} ou por Mn^{3+} (tabela 13). O decréscimo de solubilidade do CLC nessas amostras deve estar relacionado com reações de polimerização da lignina (via radicalar), o que propiciou aumento parcial da massa molar média do CLC e a consequente diminuição da solubilidade. Os dados da tabela 13 mostram ainda que a interpretação dos dados de CPG discutidos anteriormente são válidos, porém restritos à fração do CLC tratado que solubilizou em pH 12. Essa menção é relevante, pois em alguns sistemas reacionais estudados (como no que continha íons Mn^{3+} e ácido linoléico, por exemplo), os CPGs avaliaram somente a metade do CLC inicialmente presente no meio reacional (tabela 13). Outra confirmação obtida com os dados da tabela 13 é a de que o CLC, tido inicialmente como um modelo de complexo lignina-carboidrato que facilitaria os estudos de degradação por permitir estudos em solução aquosa, se mostrou um modelo com possibilidades limitadas para permitir uma avaliação plena das reações de degradação de lignina iniciadas pelos sistemas em estudo.

Uma forma de contornar as limitações mencionadas anteriormente foi realizar a caracterização de toda a fração residual do CLC obtida após 72 h de reação, incluindo matéria solúvel e insolúvel no meio reacional (descrita nos itens 5.3.1 e 5.3.2). Outra forma de contornar essas limitações foi à execução de uma nova série de experimentos baseados

na degradação de madeira moída, que foi usada como um substrato representativo de um modelo totalmente insolúvel no meio reacional (item 5.5).

Tabela 13 – Porcentagem do CLC insolúvel em pH 12, após 72 h de tratamento nos meios reacionais que continham Mn^{3+} ou Fe^{2+} e ácido linoléico

Meio de reação com íons Mn^{3+}	CLC Insolúvel (%)	Meio de reação com íons Fe^{2+}	CLC Insolúvel (%)
Controle *	17,3	Controle **	5,0
Mn^{3+} /ácido linoléico	48,8	Fe^{2+} /ácido linoléico	29,4
Idem anterior sem ácido linoléico	32,3	Idem anterior sem ácido linoléico	20,7

* Tampão succinato-lactato de sódio

** Tampão acetato de sódio

5.4.1 Caracterização do CLC degradado em reações iniciadas pelo sistema Mn^{3+} /ácido linoléico

O CLC degradado por íons Mn^{3+} /ácido linoléico em escala ampliada (mistura solúvel + insolúvel) foi caracterizado por espectroscopia UV/visível e determinação de alguns grupos funcionais. Os espectros na região do UV/visível (Figura 29) foram característicos de lignina, com uma banda com máximo em 280 nm que é atribuído a absorção de anéis aromáticos substituídos com grupos oxigenados como metoxilas, hidroxilas fenólicas ou outros grupos oxigenados em ligação simples (GOLDHSMID, 1977). Os espectros em questão podem ainda ser avaliados quanto à presença de bandas, ou mesmo intensidade de absorção, em 405-420 nm, que correspondem à presença de quinonas nas amostras (GOLDHSMID, 1977).

Os espectros UV mostrados na figura 29 A e os cálculos de relação de intensidade de bandas (tabela 14) indicam que o CLC tratado por Mn^{3+} /ácido linoléico mostrou uma intensidade de absorbância menor em 280 nm quando comparado ao controle. Isso indica que houve perda de absortividade em 280 nm do CLC tratado, o que sugere a ocorrência de reações de abertura do anel aromático. Esse tipo de reação já foi descrito para processos de degradação *in vivo* de lignina por fungos de decomposição branca, incluindo o próprio *C. subvermispora* (HIGUCHI, 1993; GUERRA et al., 2002). Já os espectros na região do visível (figura 29 B), indicam que o CLC tratado com íons Mn^{3+} /ácido linoléico não deve ter sofrido reações que levassem a formação de quinonas, visto que ele foi semelhante ao espectro do CLC controle. Por outro lado, o CLC tratado somente com íons Mn^{3+} sem a presença de

ácido linoléico foi similar ao controle na região do UV e mais intenso na região do visível, sugerindo a formação de cromóforos como quinonas e seus derivados. A tabela 14 também apresenta os teores de OH fenólicos e α -carbonilas no CLC tratado nos sistemas baseados no íon Mn^{3+} . No caso da reação com Mn^{3+} /ácido linoléico, o CLC tratado apresentou um menor teor de OH fenólicos em relação ao controle. O menor teor de OH fenólicos indica que o sistema contendo Mn^{3+} /ácido linoléico foi capaz de oxidar estruturas fenólicas do CLC. O mais provável é que essa oxidação tenha levado a formação de radicais fenoxi que deram origem a reações de acoplamento (polimerização). Isso justificaria a elevada porcentagem de CLC insolúvel em pH 12 observado para essas reações (tabela 13). O teor de alfa-carbonilas também diminuiu nas amostras de CLC tratadas, especialmente no sistema reacional com Mn^{3+} /ácido linoléico. Isso é um indicativo de que essas estruturas (existentes em pequenas proporções na lignina) foram degradadas, quer por simples redução a álcool, ou por ruptura de toda a cadeia fenil propano que continha essas subestruturas.

Figura 29 – Espectro UV-Visível em dioxano 50% do CLC tratado por íons Mn^{3+} adicionados ao ácido linoléico. (A) espectro UV: (preto) controle sem tratamento; (vermelho) sem ácido linoléico; (azul) reação completa. (B) espectro Visível: (preto) controle sem tratamento; (vermelho) sem ácido linoléico; (azul) reação completa. Concentração de lignina de 0,04 mg/mL para o espectro UV e 0,4 mg/mL para o espectro visível.

Tabela 14 – Relações de absorvâncias dos espectros UV-Visível, teor de OH fenólicos e α -carbonilas do CLC tratado por íons Mn^{3+} e ácido linoléico.

Meio de reação	280/405	OH fenólico/ C_9	α -carbonilas/ C_9
Mn^{3+} /ácido linoléico	5,7	$0,11 \pm 0,01$	$0,017 \pm 0,005$
Idem anterior sem ác. linoléico	5,4	$0,19 \pm 0,01$	$0,025 \pm 0,003$
Controle *	11,6	$0,19 \pm 0,01$	$0,046 \pm 0,005$

* Tampão succinato-lactato de sódio

5.4.2 Reações de degradação do CLC por íons Fe^{2+} /ácido linoléico

De forma similar aos estudos de degradação com íons Mn^{3+} /ácido linoléico, o CLC também foi degradado por íons Fe^{2+} /ácido linoléico em escala ampliada.

Os espectros UV mostrados na figura 30 A e os cálculos de relação de intensidade de bandas (tabela 15) indicam que o CLC tratado por Fe^{2+} /ácido linoléico mostrou intensidade de absorção em 280 nm muito semelhante em todas as situações avaliadas, sugerindo que, nesse caso, não houve grande alteração das estruturas aromáticas do CLC. Por outro lado, o espectro visível das amostras tratadas com Fe^{2+} sem ácido linoléico e com Fe^{2+} /ácido linoléico apresentaram absorção significativamente maior do que a do controle (figura 30 B). Num primeiro momento essa alteração poderia sugerir a formação de quinonas no CLC tratado nas duas condições, porém pode-se notar que também os espectros na região do UV mostraram menor resolução da banda em 280 nm, sugerindo que deve ter havido a formação de um complexo CLC-íons Ferro que levou a uma alteração significativa no espectro.

A tabela 16 apresenta os teores de OH fenólicos e α -carbonilas no CLC tratado nos sistemas baseados no íon Fe^{2+} . As alterações no teor de OH fenólicos foram similares às descritas para o tratamento com íons Mn^{3+} , ou seja, diminuíram em função do tratamento. Já o teor de α -carbonilas aumentou na amostra tratada com Fe^{2+} /ácido linoléico, sugerindo a ocorrência de reações de oxidação $\text{C}\alpha$ simples (sem subsequente degradação de ligações da cadeia lateral fenil propânica), como a via ilustrada na Figura 11 (item 2.5).

Figura 30 – Espectro UV-Visível em dioxano 50% do CLC tratado por íons Fe^{+2} adicionados ao ácido linoléico. (A) espectro UV: (preto) controle sem tratamento; (azul) reação completa. (B) espectro Visível: (preto) controle sem tratamento; (azul) reação completa. Concentração de lignina de 0,04 mg/mL para o espectro UV e 0,4 mg/mL para o espectro visível.

Tabela 16 – Relações de absorbâncias dos espectros UV-Visível, OH fenólicos e α -carbonilas (unidades por C_9) do CLC em meios reacionais contendo íons Fe^{+2} adicionados ao ácido linoléico.

Meio de reação	280/405	OH fenólico/ C_9	α -carbonilas/ C_9
Fe^{+2} /linoléico	3,2	$0,11 \pm 0,02$	$0,0612 \pm 0,0003$
Idem anterior sem ac. linoléico	3,4	$0,17 \pm 0,03$	$0,0222 \pm 0,0005$
Controle *	14,9	$0,24 \pm 0,01$	$0,0242 \pm 0,0007$

* Tampão acetato de sódio

5.5 Degradação de madeira moída de *E. grandis* iniciada por MnP e sistemas miméticos

O estudo envolvendo a ação de MnP e sistemas miméticos sobre lignina foi expandido para avaliar também a degradação de um material lignocelulósico autêntico, em um meio reacional de duas fases, onde o lignocelulósico se apresenta inicialmente na forma insolúvel. Para esse estudo, foi seguida uma metodologia inicialmente proposta por Hofrichter, Lundell e Hatakka (2001). Nesse método, a madeira de *E. grandis* foi moída em moinho de bolas para desestruturar todo o complexo celular e posteriormente extraída com solventes de polaridade crescente, visando preparar um material totalmente livre de extrativos. O tratamento *in vitro* desse material com os sistemas oxidativos em estudo permitiu que uma reação inicialmente em 2 fases gerasse uma fração solúvel

correspondente aos produtos de degradação da madeira que puderam ser caracterizados diretamente por espectroscopia UV-Visível e por CPG, além de um resíduo insolúvel que foi posteriormente caracterizado quanto as alterações estruturais induzidas na lignina que permaneceu ligada ao complexo lignocelulósico.

5.5.1 Degradação de *E. grandis* iniciada pelo sistema MnP/Mn⁺²/H₂O₂/ácido linoléico ou por Mn⁺³/ácido linoléico

Os CPGs e os espectros na região do UV-Visível dos compostos solúveis, gerados a partir da degradação de *E. grandis* pelo sistema MnP/Mn⁺²/H₂O₂/ácido linoléico estão apresentados na figura 31. A figura 31 A mostra os CPGs dos produtos de reação onde é possível observar a eluição de um primeiro pico de pequena área, que corresponde a compostos excluídos pela coluna, e um segundo pico que representa a maioria dos produtos solubilizados na reação. A área total abaixo dos picos observados foi considerada como um indicativo da quantidade de produtos derivados da lignina solubilizados durante as reações em estudo (tabela 17). Os produtos da reação que continha MnP/Mn⁺²/H₂O₂/ácido linoléico, além de *E. grandis* moído, mostrou um pico excluído pela coluna que correspondeu a 3,5 % da área total. A área total nesse caso foi de 4300 mAbs x mL (tabela 17). O pico principal do CPG em questão aparentemente corresponde a compostos aromáticos de baixa massa molar, indicando a despolimerização da lignina contida no *E. grandis* moído usado como substrato. O CPG mostrou ainda que os compostos aromáticos oriundos da degradação de *E. grandis* sofreram adsorção na coluna, pois o volume de eluição desses compostos se estendeu para volumes maiores do que os da vanilina e do ácido vanílico, usados como referência de compostos de baixa massa molar. As reações correspondentes aos controles do sistema oxidativo composto por MnP/Mn⁺²/H₂O₂/ácido linoléico (meios reacionais onde cada um dos reagentes foi removido separadamente: a) sem Mn⁺²; b) sem o sistema gerador de H₂O₂ - glicose/glicose oxidase; e c) sem ácido linoléico), levaram a solubilização insignificante de compostos aromáticos, como mostrado na tabela 17. Os resultados obtidos estão de acordo com estudos similares realizados por Hofrichter, Lundell e Hatakka (2001) que avaliaram a degradação de madeira moída de *Pinus* por MnP purificada de cultivos de *Phlebia radiata*.

A figura 31 B apresenta os espectros na região do UV-Visível dos mesmos compostos eluídos no GPC. Os espectros obtidos se assemelham aos espectros de lignina, com um máximo característico em 280 nm (GOLDHSMID, 1977). A intensidade de absorção em 280 nm seguiu a mesma ordem observada para as áreas totais dos GPCs, como era esperado,

visto que ambos os sinais são determinados pela capacidade dos produtos dissolvidos de absorver em 280 nm.

Figura 31 - Reações de degradação de *E. grandis* moído em meio aquoso contendo MnP, Mn^{2+} , H_2O_2 e ácido linoléico. (A) Cromatografia de permeação em gel monitorada em 280nm e; (B) espectro UV-Visível dos compostos solúveis. (Abs extrato) = ensaio contendo apenas o extrato com MnP; (Abs tampão) = ensaio contendo apenas madeira e tampão; (PE) = região de exclusão da coluna.

Tabela 17 – Áreas totais dos cromatogramas dos compostos solúveis liberados de *E. grandis* moído após tratamento com o sistema MnP/ Mn^{2+} / H_2O_2 /ácido linoléico.

Meio de reação	Área total no GPC (mAbs x mL)
MnP/ Mn^{2+} / H_2O_2 /ácido linoléico (reação completa)	4300
Idem reação completa sem H_2O_2	820
Idem reação completa sem Mn^{2+}	930
Idem reação completa sem ácido linoléico	670
Controle *	20
Controle **	120

* Apenas madeira e tampão succinato-lactato de sódio

** Apenas extrato contendo MnP

A fim de verificar se íons Mn^{3+} poderiam mimetizar a ação do sistema MnP/ Mn^{2+} / H_2O_2 , foram avaliadas reações *in vitro* contendo apenas íons Mn^{3+} e ácido linoléico. A figura 32 apresenta os espectros na região do UV-Visível e os CPGs desses ensaios. A figura 32 A mostra os CPGs dos produtos solubilizados após 72 h de reação quando se utilizou duas concentrações iniciais de íons Mn^{3+} (1,3 e 5,4 g/ $Mn(OAc)_3/L$). As áreas totais dos cromatogramas corresponderam a 370 e 450 mAbs x mL para as concentrações iniciais de 1,3 e 5,4 g/L de Mn^{3+} , respectivamente (tabela 18). Os CPGs mostraram ainda um pico

excluído pela coluna que correspondeu a 6 % da área total nos dois casos. O pico principal do CPG mostrou a ocorrência de derivados aromáticos de baixa massa molar, compatíveis com os compostos de referência, vanilina e ácido vanílico. Diferindo das reações iniciadas pelo sistema $\text{MnP}/\text{Mn}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{ácido linoléico}$, os CPGs em questão não indicaram a formação de compostos que adsorvem à coluna, já que o volume de eluição do pico principal não se estendeu para volumes maiores do que aqueles observados para os compostos de referência (vanilina e ácido vanílico).

A figura 32 B apresenta os espectros na região do UV-Visível dos mesmos compostos eluídos no CPG. Os espectros obtidos se assemelham aos espectros de lignina, com um máximo característico em 280 nm e a intensidade de absorção em 280 nm seguiu a mesma ordem observada para as áreas totais dos CPGs.

Figura 32 - Reações de degradação de *E. grandis* moído em meio aquoso contendo Mn^{+3} e ácido linoléico. (A) Cromatografia de permeação em gel monitorada em 280nm e; (B) espectro UV-Visível dos compostos solúveis. (Abs tampão) = ensaio apenas contendo madeira e tampão; (completa* = Madeira + Mn^{+3} 1,3 g/L + ácido linoléico + tampão) completa** = Madeira + Mn^{+3} 5,4 g/L + ácido linoléico + tampão); (PE) região de exclusão da coluna.

Tabela 18 – Áreas totais dos cromatogramas dos compostos solúveis liberados de *E. grandis* moído após tratamento com o sistema Mn^{+3} /ácido linoléico.

Meio de reação	Área total no GPC (mAbs x mL)
Mn^{+3} /ácido linoléico (reação completa) **	450
Mn^{+3} /ácido linoléico (reação completa) *	370
Idem reação completa sem Mn^{+3}	250
Idem reação completa** sem ácido linoléico	60
Controle	20

Controle: Apenas madeira e tampão succinato-lactato de sódio

* Madeira + Mn^{+3} 1,3 g de $Mn(OAc)_3/L$ + ácido linoléico + tampão

** Madeira + Mn^{+3} 5,4 g/ de $Mn(OAc)_3/L$ + ácido linoléico + tampão

5.5.2 Degradação de *E. grandis* iniciada por íons Fe^{+2} /ácido linoléico ou Fe^{+3} /extrato redutor/ácido linoléico

Os CPGs e os espectros na região do UV-Visível dos compostos solúveis, gerados a partir da degradação de *E. grandis* pelo sistema Fe^{+2} /ácido linoléico estão apresentados na figura 33. Os produtos da reação que continha Fe^{+2} /ácido linoléico, além de *E. grandis* moído, mostrou um pico excluído pela coluna que correspondeu a 5 % da área total (figura 33 A). A área total nesse caso foi de 640 mAbs x mL (tabela 19). O pico principal do CPG em questão aparentemente corresponde a compostos aromáticos de baixa massa molar, indicando a despolimerização da lignina contida no *E. grandis* moído usado como substrato. A figura 33 B apresenta os espectros na região do UV-Visível dos mesmos compostos eluídos no CPG. Os espectros obtidos se assemelham aos espectros de lignina, com um máximo característico em 280 nm.

Figura 33 – Reações de degradação de *E. grandis* moído em meio aquoso contendo Fe^{+2} e ácido linoléico. (A) Cromatografia de permeação em gel monitorada em 280nm e; (B) espectro UV-Visível dos compostos solúveis. (Abs tampão) = ensaio contendo apenas madeira e tampão; (PE) região de exclusão da coluna.

Tabela 19 – Áreas totais dos cromatogramas dos compostos solúveis liberados de *E. grandis* moído após tratamento com o sistema contendo Fe^{+2} /ácido linoléico.

Meio de reação	Área total no GPC (mAbs x mL)
Fe^{+2} /ácido linoléico (reação completa)	640
Idem reação completa sem Fe^{+2}	240
Idem reação completa sem ácido linoléico	100
Controle *	100

* Apenas madeira e tampão acetato de sódio

O sistema Fe^{+3} /extrato redutor/ácido linoléico também foi utilizado para iniciar a degradação *in vitro* de *E. grandis* moído. Os CPGs e os espectros na região do UV-Visível dos compostos solúveis, gerados nestas reações estão apresentados na figura 34. Os produtos da reação que continha Fe^{+3} /extrato redutor/ácido linoléico, além de *E. grandis* moído, mostrou um pico excluído pela coluna que correspondeu a 8 % da área total (figura 34 A). A área total nesse caso foi de 470 mAbs x mL (tabela 20). O pico principal do GPC em questão aparentemente corresponde a compostos aromáticos de baixa massa molar, indicando a despolimerização da lignina contida no *E. grandis* moído usado como substrato. A figura 34 B apresenta os espectros na região do UV-Visível dos mesmos compostos eluídos no GPC. Os espectros obtidos também se assemelham aos espectros de lignina, com um máximo característico em 280 nm.

Figura 34 - Reações de degradação de *E. grandis* moído em meio aquoso contendo Fe^{+3} /extrato redutor e ácido linoléico. (A) cromatografia de permeação em gel monitorada em 280nm e; (B) espectro UV-Visível dos compostos solúveis. (Abs tampão) = ensaio apenas contendo madeira e tampão; (PE) = região de exclusão da coluna.

Tabela 20 – Áreas totais dos cromatogramas dos compostos solúveis liberados de *E. grandis* moído após tratamento com o sistema contendo Fe^{+3} /extrato redutor e ácido linoléico.

Meio de reação	Área total no GPC (mAbs x mL)
Fe^{+3} /extrato redutor/ácido linoléico (reação completa)	470
Idem reação completa sem Fe^{+3}	200
Idem reação completa sem ácido linoléico	100
Controle *	100

* Madeira + extrato redutor + tampão acetato de sódio

Uma comparação entre todos os sistemas avaliados na degradação de *E. grandis* moído mostra que as áreas dos cromatogramas foram semelhantes quando as reações foram iniciadas por íons Fe^{+2} , Mn^{+3} ou ainda, Fe^{+3} /extrato redutor, todos adicionados ao ácido linoléico (tabela 21). Por outro lado, a degradação iniciada pelo sistema $\text{MnP}/\text{Mn}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ /ácido linoléico levou a formação de uma área muito maior (em torno de 8 vezes superior), além de um espectro UV-Visível com uma banda em 280 nm mais intensa. A maior área do cromatograma do meio reacional contendo $\text{MnP}/\text{Mn}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ /ácido linoléico sugere que para uma degradação mais eficiente da lignina em *E. grandis* moído é necessário a geração lenta de íons Mn^{3+} e, por consequência radicais peroxila, o que só pode ser obtido no sistema enzimático devido aos ciclos de catálise da MnP (tabela 21).

Também fica claro que os sistemas miméticos avaliados induzem a degradação de lignina em extensão significativamente menor do que à observada no sistema enzimático completo.

Tabela 21 – Comparativo entre as áreas totais dos cromatogramas dos compostos solúveis liberados de *E. grandis* moído após tratamento com os sistemas MnP/Mn⁺²/H₂O₂/, Mn³⁺, Fe⁺² e Fe⁺³/extrato redutor, todos adicionados ao ácido linoléico.

Meio de reação	Área total no GPC (mAbs x mL)
MnP/Mn ⁺² /H ₂ O ₂ /ácido linoléico	4300
Fe ⁺² /ácido linoléico	640
Fe ⁺³ /extrato redutor/ácido linoléico	470
Mn ⁺³ /ácido linoléico *	450
Mn ⁺³ /ácido linoléico **	370
Controle ***	100
Controle ****	20

* Mn⁺³ 5,4 g de Mn(OAc)₃/L

** Mn⁺³ 1,3 g de Mn(OAc)₃/L

*** Madeira + tampão acetato de sódio

**** Madeira + tampão succinato-lactato de sódio

5.6 Aumento de escala das reações de degradação de *E. grandis* iniciada por MnP e sistemas miméticos

Os tratamentos de *E. grandis* por MnP/Mn⁺²/H₂O₂, Mn⁺³ ou Fe⁺², todos adicionados ao ácido linoléico, foram repetidos em uma escala cerca de 500 vezes maior do que as reações descritas anteriormente. O objetivo básico dessa ampliação de escala foi gerar madeira moída tratada em quantidade suficiente para viabilizar a extração da lignina residual e a posterior caracterização dessa lignina por via química e espectroscópica. Os tratamentos de *E. grandis* com Fe⁺³/extrato redutor/ácido linoléico ou Fe⁺²/ácido linoléico se mostraram semelhantes na degradação da lignina, e por isso a ampliação de escala nesse caso se restringiu ao sistema baseado no uso de íons Fe⁺². A ampliação de escala para as reações iniciadas pelo sistema Fe⁺³/extrato redutor/linoléico também exigiria um volume muito grande de extrato ultrafiltrado de *C. subvermispora*, o que tornaria inviável o estudo seguindo as rotinas de cultivo já estabelecidas. De forma similar aos estudos anteriores, as frações solúveis obtidas após as reações foram caracterizadas por UV-Visível e CPG. Adicionalmente, as madeiras tratadas foram recuperadas, lavadas e secas ao ar para posterior extração da lignina residual.

Outra avaliação que se fez possível na escala ampliada foi o monitoramento da atividade de MnP nos ensaios onde a enzima era o iniciador da reação. A figura 35 mostra o perfil de atividade enzimática de MnP ao longo do tratamento de *E. grandis* pelo sistema MnP/Mn²⁺/H₂O₂/ácido linoléico. A atividade no tempo zero de reação foi de 0,25 UI/mg de madeira. Porém, após 20 horas de tratamento a atividade diminuiu para 0,07 UI/mg de madeira, permanecendo nesse patamar até o término da reação. A queda de atividade pode estar relacionada à adsorção de MnP nos componentes da madeira, o que é comum em catálises enzimáticas realizadas com materiais lignocelulósicos (LU et al., 2002). O perfil do pH ao longo do tratamento de *E. grandis* pelo sistema MnP/Mn²⁺/H₂O₂/ácido linoléico permaneceu constante.

Figura 35 – Atividade enzimática de MnP ao longo do tratamento de *E. grandis* por MnP/Mn²⁺/H₂O₂/linoléico em meio aquoso pH 4,5.

O espectro UV-Visível e o CPG dos compostos solúveis da reação de degradação de *E. grandis* por MnP/Mn²⁺/H₂O₂/ácido linoléico em escala ampliada está apresentado na figura 36. O cromatograma foi semelhante ao ensaio em escala menor (figura 36A). Entretanto, a área total do cromatograma do ensaio em escala ampliada foi um pouco inferior àquela observada na reação em escala menor (3300 e 4300 mAbs x mL, respectivamente). A reação em escala ampliada também mostrou um pequeno ombro no CPG que corresponde a uma fração de alta massa molar (6500 Da). Os espectros na região do UV-Visível mostraram as mesmas tendências já discutidas nos experimentos realizados em menor escala (figura 36 B).

Figura 36 - Reações de degradação de *E. grandis* moído em meio aquoso contendo MnP, Mn^{2+} , H_2O_2 e ácido linoléico. (A) Cromatografia de permeação em gel monitorada em 280nm e; (B) espectro UV-Visível dos compostos solúveis. (PE) região de exclusão da coluna.

Os sistemas reacionais iniciados por Mn^{3+} /ácido linoléico e Fe^{+2} /linoléico também foram conduzidos em escala ampliada. Os dados obtidos são mostrados figuras 37 e 38. Também nesses casos, o pH ao longo do tratamento de *E. grandis* permaneceu constante. Em geral, dados semelhantes foram obtidos para as duas escalas de reação, com pequenas alterações visualizadas nas figuras em questão.

Figura 37 – Reações de degradação de *E. grandis* moído em meio aquoso contendo Mn^{3+} e ácido linoléico. (A) Cromatografia de permeação em gel monitorada em 280nm e; (B) espectro UV-Visível dos compostos solúveis. (PE) região de exclusão da coluna.

Figura 38 – Reações de degradação de *E. grandis* moído em meio aquoso contendo Fe^{+2} e ácido linoléico. (A) Cromatografia de permeação em gel monitorada em 280nm e; (B) espectro UV-Visível dos compostos solúveis. (PE) região de exclusão da coluna.

5.7 Recuperação e caracterização da madeira de *E. grandis* tratada por íons Fe^{+2} , Mn^{+3} ou $\text{MnP}/\text{Mn}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$, todos adicionados ao ácido linoléico

Ao término das reações de degradação de *E. grandis* em escala ampliada a madeira residual destas reações foi recuperada e fotografias desses resíduos estão apresentadas na figura 39. O aspecto visual da madeira de *E. grandis* tratada por íons Fe^{+2} /ácido linoléico se mostrou mais escuro que o do controle sem tratamento. Entretanto, a madeira de *E. grandis* tratada por íons Mn^{+3} ou $\text{MnP}/\text{Mn}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$, ambos adicionados ao ácido linoléico apresentaram-se com uma coloração mais clara em relação ao controle. Pode-se perceber ainda que a madeira tratada com MnP apresentou uma coloração clara mais evidente do que a madeira tratada com íons Mn^{+3} . Esse aspecto visual foi semelhante ao que ocorre com cavacos de *E. grandis* biotratados por *C. subvermispora* (MASARIN e FERRAZ, 2008). Amostras dessas madeiras foram caracterizadas por espectroscopia de infravermelho médio e por técnicas de caracterização *in situ*. O restante das madeiras foi utilizado para a extração da lignina e sua posterior caracterização química e espectroscópica.

(a) Controle não tratado

(b) Tratado com Fe^{+2} /ácido linoléico

(c) Tratado $\text{MnP}/\text{Mn}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ /ácido linoléico

(d) Tratado com Mn^{+3} /ácido linoléico

Figura 39 - Aspecto visual das madeiras de *E. grandis* tratadas por íons Mn^{+3} , Fe^{+2} ou $\text{MnP}/\text{Mn}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$, todos adicionados ao ácido linoléico e o controle sem tratamento.

5.7.1 Caracterização das ligninas de *E. grandis in situ*

A primeira seção de resultados, que aborda as técnicas de caracterização efetuadas diretamente sobre a madeira, apresenta a grande vantagem de não envolver etapas prévias de isolamentos dos componentes. Desta forma, nesta seção, descarta-se a possibilidade de haver degradação das macromoléculas residuais devido ao emprego de etapas de remoção dos componentes presentes após os processos de degradação *in vitro*. As madeiras

residuais tratadas por íons Fe^{+2} , Mn^{+3} ou $\text{MnP/Mn}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$, todas adicionadas de ácido linoléico e o controle foram caracterizadas por infravermelho médio e tioacidólise.

Reações de tioacidólise foram aplicadas no presente trabalho como um método de verificação da despolimerização da lignina. Essa técnica permite quantificar as ligações do tipo $\beta\text{-O-4}$, as mais frequentes nessa macromolécula (ROLANDO; MONTIES; LAPIERRE, 1992). Na Figura 40 está mostrado o mecanismo de tioacidólise da lignina com a formação dos monômeros tritioetilados.

Figura 40 - Mecanismo de tioacidólise de lignina (HOLTMAN et al. 2003).

Na Figura 41 é mostrado um exemplo de um cromatograma dos principais produtos obtidos após a tioacidólise de madeiras duras. Os picos 1 e 2 correspondem ao decosano e ao tetracosano, respectivamente, que são usados como padrões internos. Os picos 3 e 4 são correspondentes aos isômeros de unidade guaiacil-propano e siringil-propano tritioetilados, respectivamente. Esses isômeros são os principais produtos obtidos após as reações de tioacidólise de madeira de *E. grandis*.

Figura 41 – Cromatograma referente aos produtos de tioacidólise em uma amostra de Eucalipto. **1** - padrão interno (Decosano), **2**- padrão interno (tetracosano), **G** - monômeros de unidade guaiacil-propano tritioetilados, **S** - monômeros de unidade siringil-propano tritioetilados: em **G** e **S** os dois picos mais intensos correspondem aos monômeros eritro e treó, enquanto o terceiro e menos intenso corresponde ao monômero com dois enxofres no carbono γ (ROLANDO; MONTIES; LAPIERRE, 1992).

Na tabela 22 estão apresentadas as concentrações de monômeros de tioacidólise para as amostras tratadas por íons Fe^{+2} , Mn^{+3} ou $\text{MnP}/\text{Mn}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$, todas adicionadas ao ácido linoléico e o controle sem tratamento. O teor de monômeros obtidos de unidades guaiacil da amostra tratada por $\text{MnP}/\text{Mn}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ decresceu 33 % e os de unidades siringil 20 % em relação ao controle. No caso da amostra tratada por íons Mn^{+3} /linoléico o teor de monômeros recuperados de unidades guaiacil decresceu 16,5% enquanto os de unidades siringil 13,5 % em relação ao controle. Nos dois casos, a ruptura das ligações do tipo aril-éter nas porções da lignina contendo unidades siringil foram mais difíceis de ocorrer. O teor de monômeros totais de tioacidólise da madeira tratada por $\text{MnP}/\text{Mn}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ /ácido linoléico ou Mn^{+3} /ácido linoléico decresceu 24 e 14,5 %, respectivamente em relação ao controle. Entretanto, a madeira tratada por íons Fe^{+2} /ácido linoléico mostrou um rendimento

de tioacidólise igual ao controle. O decréscimo do rendimento de monômeros de tioacidólise nas amostras citadas acima está associado a transformações na lignina induzido pelo sistema $\text{MnP}/\text{Mn}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{ácido linoléico}$ ou $\text{Mn}^{+3}/\text{ácido linoléico}$. Uma das possibilidades é a clivagem direta das ligações do tipo arilglicerol- β -aril éter (quebra de ligações do tipo β -O-4). Entretanto, a clivagem $\text{C}\alpha$ - $\text{C}\beta$ também pode decrescer o rendimento de tioacidólise, pois derivados como benzaldeído e ácido benzóico oriundos da clivagem $\text{C}\alpha$ - $\text{C}\beta$ não geram os monômeros fenolpropanóides típicos quantificados nessa técnica (ROLANDO; MONTIES; LAPIERRE, 1992). Similarmente, a $\text{C}\alpha$ -oxidação também pode formar uma subestrutura denominada α -ceto- β -aril éter que após a técnica de tioacidólise forma o fenil-1,2-ditiletil-etenno no lugar dos monômeros comuns quantificados (ROLANDO; MONTIES; LAPIERRE, 1992). A diminuição no rendimento de monômeros tritioetilados observado nas reações *in vitro* foi similar às reações detectadas durante os cultivos de *C. subvermispora* sobre madeira (sistema *in vivo*) (GUERRA; MENDONÇA; FERRAZ, 2002; GUERRA et al. 2004; VICENTIM; FERRAZ, 2007). Esses autores verificaram a diminuição do rendimento de monômeros provenientes do DFRC (“derivatization followed by reductive cleavage”), outra técnica que verifica o teor de ligações β -O-4 em ligninas (LU; RALPH, 1997 a, b). Os dados também corroboram com estudos realizados por Choi et al. (2006). Esses autores mostraram que a madeira de *Populus tremuloides* biotratada por *C. subvermispora* de 1 a 6 semanas apresentou decréscimo no rendimento de tioacidólise. Outros estudos realizados por Aguiar (2008) com madeira de *Pinus taeda* biotratada por *C. subvermispora* de 1 a 4 semanas também mostraram o decréscimo de rendimento de tioacidólise indicando a despolimerização da lignina.

Tabela 22 - Rendimento de monômeros da tioacidólise provenientes das madeiras de *E. grandis* tratadas por íons Fe^{+2} , Mn^{+3} ou $\text{MnP}/\text{Mn}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$, todos adicionados ao ácido linoléico e o controle sem tratamento.

Amostras de <i>E. grandis</i>	Rendimento de monômeros de tioacidólise ($\mu\text{mol.g}^{-1}$ de <i>E. grandis</i>)		
	Guaiacil	Siringil	Total
Controle	121 $\pm$ 2	344 $\pm$ 3	465 $\pm$ 5
MnP	81 $\pm$ 3	275 $\pm$ 13	356 $\pm$ 17
Mn^{+3}	101 $\pm$ 3	298 $\pm$ 8	398 $\pm$ 14
Fe^{+2}	123 $\pm$ 0,5	343 $\pm$ 6	466 $\pm$ 7

Na figura 42 está apresentado o infravermelho das madeiras de *E. grandis* controle e tratadas por íons Fe^{+2} , Mn^{+3} ou $\text{MnP}/\text{Mn}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$, todas adicionados ao ácido linoléico. As amostras tratadas, principalmente por íons $\text{Mn}^{+3}/\text{ácido linoléico}$ mostraram bandas com maiores intensidades na região de 1650 em relação ao controle. Essas bandas têm sido atribuídas a estiramentos de carbonilas e ácidos carboxílicos conjugadas com anéis

aromáticos (FAIX, 1991). Desta forma, as amostras tratadas mostraram aumento de carbonilas e carboxilas indicando a oxidação da lignina. Tanto carbonilas como carboxilas conjugadas ao anel aromático podem ser formadas por vias de degradação similares às observadas em estudos com compostos modelo degradados por MnP de *P. chrysosporium* como já mostrado na figura 11 (item 2.5).

Figura 42 – Infravermelho médio de madeira de *E. grandis* tratadas por íons Fe^{+2} , Mn^{+3} ou MnP/ Mn^{+2} / H_2O_2 , todos adicionados ao ácido linoléico e o controle sem tratamento.

5.7.2 Extração e caracterização das ligninas residuais das madeiras de *E. grandis*

Uma das maneiras de se corroborar os resultados obtidos pela caracterização da lignina *in situ*, reportada no item 5.7.1, é através da extração e posterior caracterização da lignina residual. Contudo, o processo de extração é moroso e pode gerar alterações na estrutura das ligninas. Entre as diferentes técnicas conhecidas para o isolamento de lignina a partir de materiais lignocelulósicos, uma que é considerada como amena e que preserva a estrutura da lignina extraída é a moagem em moinho de bolas, seguida de extração com solução de dioxano/água 96 % (LUNDQUIST, 1992). Ao produto assim obtido convencionou-se chamar-se de LMM (de “Lignina de Madeira Moída”) e esse tipo de preparação tem sido amplamente empregada na caracterização de ligninas de diferentes origens (ISLAM; SARKANEM, 1993; LAWOTHER; SUN; BANKS, 1996). Alterações nesses procedimentos de extração têm sido introduzidas, visando aumentar o rendimento de lignina extraída sem afetar a integridade estrutural da macromolécula obtida. Uma das alterações corresponde ao método desenvolvido por Wu e Argyropoulos (2003), onde a extração da lignina é realizada da seguinte maneira. Primeiramente, a madeira moída em moinho de

facas e bolas é submetida à hidrólise por celulases e o resíduo insolúvel obtido é extraído por dioxano/água 85 % adicionado de ácido clorídrico 0,01M. Esse método tem a vantagem de aumentar o rendimento de extração sem provocar alterações químicas e estruturais significativas na lignina (GUERRA *et al.*, 2006; GUERRA; LUCIA; ARGYROPOULOS, 2008).

As madeiras de *E. grandis* controle e tratadas foram submetidas ao processo de extração de lignina descrito por Wu e Argyropoulos (2003) com algumas modificações. Os rendimentos de extração da lignina na madeira de *E. grandis* tratadas e do controle estão apresentados na tabela 23. Os rendimentos apresentados foram baixos quando comparado aos encontrados na literatura (GUERRA; LUCIA; ARGYROPOULOS, 2008). A amostra tratada por íons Mn^{+3} /ácido linoléico mostrou um rendimento maior comparado as outras amostras (tabela 23). Uma possível explicação seria que íons Mn^{+3} quelados por lactato degradaram os carboidratos presentes na madeira de *E. grandis* o que possibilitou uma extração da lignina mais eficiente. Reações de degradação do CLC por íons Mn^{+3} quelados por lactato mostraram a despolimerização dos carboidratos o que corrobora com a hipótese mencionada acima.

Tabela 23 – Rendimentos de extração das ligninas de madeira de *E. grandis* tratadas por íons Fe^{+2} , Mn^{+3} ou $MnP/Mn^{+2}/H_2O_2$, todos adicionados ao ácido linoléico e o controle sem tratamento.

Madeira de <i>E. grandis</i>	Rendimento de extração da lignina (%)
Controle sem tratamento	16,4
Tratada por MnP	11,5
Tratada por Mn^{+3}	26,6
Tratada por Fe^{+2}	10,6

As ligninas isoladas foram caracterizadas por UV-visível, infravermelho médio, RMN- ^{31}P e determinação do teor de alguns grupos funcionais.

A figura 43 A apresenta os espectros na região do UV-Visível das ligninas tratadas e do controle. Os espectros na região do UV-visível foram característicos de lignina, com uma banda com máximo em 280 nm (FENGEL; WEGENER, 1989). As absorvidades das ligninas tratadas por íons Fe^{+2} /ácido linoléico e o controle mostraram valores de 17 e 16 $L.g^{-1}.cm^{-1}$, respectivamente. Esses valores corroboram com dados da literatura (FENGEL; WEGENER, 1989). Entretanto, as amostras tratadas por íons Mn^{+3} /ácido linoléico ou $MnP/Mn^{+2}/H_2O_2$ /ácido linoléico mostraram absorvidades de 9 e 10 $L.g^{-1}.cm^{-1}$, respectivamente, sugerindo que essas lignina perderam aromaticidade por eventual abertura oxidativa dos anéis aromáticos, ou simplesmente se apresentaram mais contaminadas com carboidratos. A tabela 24 apresenta as intensidades de relações de absorbâncias em A_{280}/A_{310} e A_{280}/A_{405} dos respectivos espectros. As intensidades das relações de

A280/A310 nas amostras tratadas foram menores do que as observadas na lignina controle, sugerindo acúmulo de α -carbonilas e/ou α - β instaurações, respectivamente (GOLDHSMID, 1977). As intensidades das relações de A280/A405 nas amostras tratadas por MnP/Mn⁺²/H₂O₂ ou Mn⁺³, ambas adicionadas ao ácido linoléico foram menores que a amostra controle. Entretanto, os espectros na região do visível (figura 43 B), indicam que o as amostras tratadas por MnP/Mn⁺²/H₂O₂ ou Mn⁺³, ambas adicionadas ao ácido linoléico não devem ter sofrido reações que levassem a formação de quinonas, visto que foram semelhantes ao espectro da amostra controle. Por outro lado, o espectro visível da amostra tratada com Fe²⁺/ácido linoléico apresentou absorção significativamente maior do que a do controle (figura 43 B e tabela 24). Num primeiro momento essa alteração poderia sugerir a formação de quinonas na amostra tratada. Outra possibilidade seria a formação de um complexo CLC-íons Ferro que levou a uma alteração significativa no espectro.

Figura 43 - (A) espectro UV e; (B) espectro visível das ligninas isoladas de *E. grandis* tratadas por íons Fe⁺², Mn⁺³ ou MnP/Mn⁺²/H₂O₂, todos adicionados ao ácido linoléico e o controle sem tratamento (CTR). Concentração da lignina no espectro UV = 0,02 mg/mL e no espectro visível = 0,2 mg/mL.

Tabela 24 - Relações das absorvâncias nos espectros das ligninas isoladas de *E. grandis* tratadas por MnP/Mn⁺²/H₂O₂, Mn⁺³ ou Fe⁺², todos adicionados ao ácido linoléico e o controle sem tratamento.

Lignina isolada	280/310	280/405
Controle sem tratamento	2,1	38,5
Tratada por MnP	1,6	19,7
Tratada por Mn ⁺³	1,7	13,1
Tratada por Fe ⁺²	1,8	13,0

A figura 44 apresenta os espectros de infravermelho das ligninas tratadas e do controle. As amostras tratadas, principalmente por íons Fe⁺²/ácido linoléico mostraram bandas com maiores intensidades na região de 1650 a 1710 cm⁻¹ em relação ao controle.

Essas bandas têm sido atribuídas a estiramentos de carbonilas e ácidos carboxílicos conjugados com anéis aromáticos (1655 a 1670) e estiramentos de carbonilas não-conjugadas e ácidos carboxílicos (1710 a 1740) (FAIX, 1991). As mudanças de intensidade dos espectros das ligninas isoladas foram semelhantes às obtidas diretamente da madeira de *E. grandis*. Desta forma, as amostras tratadas mostraram aumento de carbonilas e carboxilas indicando a oxidação da lignina.

Figura 44 – Infravermelho médio das ligninas isoladas de *E. grandis* tratadas por íons Fe^{+2} , Mn^{+3} ou $\text{MnP}/\text{Mn}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$, todos adicionados ao ácido linoléico e o controle sem tratamento.

Os CPGs das ligninas isoladas tratadas e do controle estão apresentados na figura 45. Os cromatogramas foram característicos de macromoléculas polidispersas e apresentaram pequenos picos na região de exclusão da coluna. A amostra tratada por $\text{MnP}/\text{Mn}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{ácido linoléico}$ apresentou adsorção na coluna, pois o volume de eluição da lignina foi maior do que o observado para a acetona. Esse fato também foi observado no CPG dos compostos solúveis oriundos do tratamento da madeira de *E. grandis* por $\text{MnP}/\text{Mn}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{ácido linoléico}$ (item 5.5.1- Fig. 31 A). A tabela 25 apresenta as massas molares médias aparentes, áreas totais e áreas excluídas oriundas dos respectivos cromatogramas. O controle mostrou uma massa molar média aparente de 5,2 kDa e uma área excluída de 5,8 % corroborando com trabalhos prévios (GUERRA; MENDONÇA; FERRAZ, 2003). A amostra tratada por íons $\text{Mn}^{+3}/\text{ácido linoléico}$ ou $\text{Fe}^{+2}/\text{ácido linoléico}$ mostraram massas molares médias aparentes de 5,8 e 7,2 kDa e áreas excluídas de 4,2 e 14,2 %, respectivamente. A amostra tratada com $\text{Fe}^{+2}/\text{ácido linoléico}$ mostrou um aumento expressivo na massa molar média aparente da lignina. Possivelmente a lignina sofreu reações de condensação e/ou formação de complexos organometálicos com íons Fe^{+2} e/ou Fe^{+3} o que culminou em aumento da massa molar média aparente. Devido ao fato de a

amostra tratada por $\text{MnP}/\text{Mn}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{ácido linoléico}$ mostrar adsorção na coluna não foi factível o cálculo de sua massa molar média aparente.

Figura 45 – Cromatografia de permeação em gel das ligninas isoladas de *E. grandis* tratadas por íons Fe^{+2} , Mn^{+3} ou $\text{MnP}/\text{Mn}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$, todos adicionados ao ácido linoléico e o controle sem tratamento. (PE) região de exclusão da coluna.

Tabela 25 – Massas molares médias aparentes (M_w), áreas excluídas (APE) e áreas totais das ligninas isoladas tratadas por íons Mn^{+3} , Fe^{+2} ou MnP , todas adicionadas ao ácido linoléico e o controle sem tratamento.

Lignina isolada	APE (%)	Área total (mAbs x mL)	M_w (kDa)
Controle	5,8	95	5,3
Mn^{+3}	4,2	100	5,8
Fe^{+2}	14,2	114	7,8
MnP	6,5	135	nd

nd = não determinado

A tabela 26 apresenta a quantificação de OH fenólicos e α -carbonilas através dos métodos de espectrofotometria UV-visível diferencial aplicados às ligninas extraídas do *E. grandis* tratado. As amostras tratadas por íons Mn^{+3} , Fe^{+2} ou $\text{MnP}/\text{Mn}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$, todas adicionadas ao ácido linoléico mostraram um decréscimo de 72, 36 e 44 % no teor de OH fenólicos em relação ao controle, respectivamente. A principal via para explicar a diminuição no teor de OH fenólicos nas ligninas tratadas envolve a oxidação direta levando à formação de radicais fenoxi. Esses radicais podem gerar quinonas como na reação ilustrada figura 46. A formação de quinonas foi corroborada com o decréscimo das relações A_{280}/A_{405} dos espectros na região do UV-visível (tabela 24), porém não deve ser a única via de reação ocorrendo. As amostras tratadas com Mn^{3+} e Fe^{2+} mostraram massas molares maiores do

que as observadas no controle (tabela 25) e a polimerização, tanto dos radicais fenoxi como das quinonas, pode ser uma segunda possibilidade para explicar a diminuição no teor de OH fenólicos.

O teor de α -carbonilas nas amostras tratadas por íons Fe^{+2} ou $\text{MnP}/\text{Mn}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$, ambas adicionadas ao ácido linoléico, mostrou um aumento de 17 e 25 % em relação ao controle, respectivamente. Entretanto, a amostra tratada com íons Mn^{+3} /ácido linoléico mostrou um decréscimo de 33% no teor de α -carbonilas em relação ao controle. O aumento de α -carbonilas em algumas das amostras tratadas está de acordo com o decréscimo das relações de absorbância A280/310 dos espectros na região do UV-visível e com as bandas mais intensas do infravermelho (1670 a 1740 cm^{-1}) (tabela 24 e Fig. 44, respectivamente).

A formação de novas α -carbonilas em algumas amostras deve ser avaliada de forma a também contemplar a pequena frequência desse tipo de ligação na lignina. Ou seja, a lignina controle mostra um teor de α -carbonilas que significa a ocorrência de aproximadamente 12 subestruturas contendo esse grupo funcional a cada 100 estruturas C_9 . Após o tratamento com $\text{MnP}/\text{Mn}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ /ácido linoléico (condição de máximo aumento), esse número aumentou para aproximadamente 14 subestruturas com α -carbonilas a cada 100 estruturas C_9 . Ou seja, o aparecimento de 2 novas α -carbonilas a cada 100 estruturas C_9 . A oxidação de uma função álcool no C- α pode explicar essa via de reação e já foi demonstrada para reações que envolviam a degradação de um composto modelo não-fenólico por MnP de *P. chrysosporium* (KAPICH et al., 1999) (figura 11 – item 2.5). Outra via de degradação que permite explicar a ocorrência de novas α -carbonilas seria uma quebra β -O-4 seguida de oxidação do carbono α , também já demonstrada no mesmo estudo citado anteriormente (KAPICH et al., 1999).

No caso do meio reacional contendo íons Mn^{+3} /ácido linoléico em que houve diminuição no teor de α -carbonilas pode ter havido a continuação da oxidação da cadeia lateral da lignina com a eliminação de carbonos β e γ , sendo a α -carbonila oxidada até ácido carboxílico.

Figura 46 – Proposta de mecanismo de oxidação de OH fenólicos presentes em porções de lignina fenólica.

Tabela 26 – Grupos funcionais determinados por espectrofotometria UV-visível diferencial (grupos representados por unidade C₉ da lignina) das ligninas isoladas tratadas por íons Mn⁺³, Fe⁺² ou MnP, todas adicionadas ao ácido linoléico e o controle sem tratamento.

Lignina isolada	OH fenólicos/C ₉	α-carbonilas/C ₉
Controle	0,36 ± 0,02	0,117 ± 0,001
Mn ⁺³	0,10 ± 0,01	0,080 ± 0,005
Fe ⁺²	0,23 ± 0,01	0,136 ± 0,004
MnP	0,20 ± 0,02	0,145 ± 0,006

As amostras de lignina isoladas do controle e da amostra tratada por MnP/Mn⁺²/H₂O₂/ácido linoléico foram ainda caracterizadas por espectroscopia de RMN-³¹P. Essa técnica permite quantificar o teor de OH alifáticos, carboxilas e OH fenólicos oriundos de estruturas guaiacila e siringila. Em todos os casos, as hidroxilas em questão são derivatizadas pela ação de um reagente fosfitilante (GRANATA; ARGYROPOULOS, 1995). Na Figura 47 está esquematizado o mecanismo de derivatização dos grupos OH presentes na lignina pelo reagente de fosfitilação.

Figura 47 - Mecanismo de fosfitilação de grupos OH presentes na lignina por por 2-cloro-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxafosfolano (CRESTINI, SERMANI e ARGYROPOULOS 1998).

As figuras 48 e 49 apresentam os espectros de RMN-³¹P das ligninas isoladas das amostras controle e tratada por MnP/Mn⁺²/H₂O₂/linoléico, respectivamente. Os espectros foram característicos de ligninas de madeira dura (GRANATA; ARGYROPOULOS, 1995), porém apresentaram ruído excessivo devido a pequena massa de amostra disponível para a caracterização (aproximadamente 20 mg). Mesmo com uma relação sinal/ruído baixa, as áreas dos sinais de cada grupo funcional foi integrada e os dados obtidos estão mostrados na tabela 27. A amostra tratada por MnP/Mn⁺²/H₂O₂/ácido linoléico mostrou um decréscimo de 62 % no sinal referente aos OH fenólicos totais em relação ao controle, corroborando o que foi observado por espectrofotometria UV-visível diferencial (com essa técnica foi

detectado uma diminuição de 44 % no teor de OH fenólico). Vale ainda notar que os valores absolutos para os teores de OH fenólicos obtidos pelo método UV-visível diferencial foram maiores do que aqueles determinados pelo método de RMN- ^{31}P . O uso de técnicas diferentes na caracterização de lignina, com frequência, indica variação nos valores absolutos para cada tipo de grupo funcional. De qualquer forma, os valores observados a partir dos espectros de RMN- ^{31}P para a lignina foram semelhantes aos encontrados na literatura para lignina de *E. grandis* (GUERRA; LUCIA; ARGYROPOULOS, 2008). A amostra tratada por $\text{MnP}/\text{Mn}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{ácido linoléico}$ também mostrou decréscimo de 14 % no teor de OH alifáticos e o aparecimento de grupos carboxilas, que não eram detectáveis na amostra controle (tabela 27). Uma via que pode explicar a formação de carboxilas simultânea a diminuição no teor de OH alifáticos envolve a quebra $\text{C}\alpha\text{-C}\beta$ seguida da formação de derivados do ácido benzóico, como ilustrado na figura 11 (KAPICH et al, 1999). Outra possibilidade pode ser a clivagem $\beta\text{-O-4}$ da lignina que também pode levar ao decréscimo de OH alifáticos e aumento de α -carbonilas (KAPICH et al, 1999).

Figura 48 - Espectros de RMN- ^{31}P recuperados de ligninas isoladas de *E. grandis* sem tratamento (controle). OH fenólicos de estruturas siringilas eterificadas e guaiacilas condensadas (S-OH) e OH fenólicos de estruturas guaiacilas eterificadas (G-OH).

Figura 49 - Espectros de RMN- ^{31}P recuperados de ligninas isoladas de *E. grandis* tratada por MnP/Mn $^{+2}$ /H $_2$ O $_2$ /linoléico. OH fenólicos de estruturas siringilas eterificadas e guaiacilas condensadas (S-OH) e OH fenólicos de estruturas guaiacilas eterificadas (G-OH).

Tabela 27 - Grupos funcionais da lignina isolada determinados por RMN- ^{31}P (grupos representados por unidade C $_9$ da lignina) na amostra tratada por MnP/linoléico e o controle sem tratamento.

Lignina isolada	OH alifáticos/C $_9$	OH fenólicos totais/C $_9$	COOH/C $_9$
Controle	0,9	0,08	nd
MnP	0,7	0,03	0,02

nd = não detectado

6.0 Considerações finais e conclusões

As vias de degradação da lignina no CLC e na madeira de *E. grandis* iniciada por íons Mn^{+3} , Fe^{+2} ou $MnP/Mn^{+2}/H_2O_2$, todos adicionados ao ácido linoléico foram, na sua essência, semelhantes. Ou seja, são vias oxidativas que podem resultar na despolimerização da molécula, ou simplesmente na oxidação das cadeias laterais e das estruturas fenólicas livres. Entretanto, o CLC se mostrou mais susceptível à degradação do que a lignina contida no lignocelulósico. Por exemplo, íons Mn^{+3} estabilizados por lactato foram suficientes para iniciar a degradação do CLC, visto que a massa molar média aparente da lignina do CLC tratado foi menor em relação ao controle. Entretanto, íons Mn^{+3} estabilizados por lactato não foram suficientes para iniciar a degradação de madeira de *E. grandis*. O sistema químico contendo íons Fe^{+2} /ácido linoléico também foi capaz de iniciar a degradação do CLC, pois a massa molar média aparente da lignina tratada do CLC foi menor em relação ao controle. Porém, a lignina isolada da madeira de *E. grandis* após ser tratada por íons Fe^{+2} /ácido linoléico mostrou uma massa molar média aparente maior que o controle. Além disso, a madeira de *E. grandis* tratada por íons Fe^{+2} /ácido linoléico mostrou um rendimento de monômeros de tioacidólise igual ao controle.

Os dados sugerem que a maior susceptibilidade do CLC à oxidação pode estar relacionada inicialmente ao fato de as reações terem sido conduzidas em solução aquosa, enquanto que no *E. grandis* moído, o substrato se apresentava sempre insolúvel. Outro fato marcante é que o CLC mostrou uma estrutura essencialmente fenólica da lignina, enquanto se sabe que a lignina contida num lignocelulósico é essencialmente não fenólica e por isso menos susceptível à oxidação pelos sistemas avaliados nessa tese.

Em termos dos mecanismos de degradação da lignina, os resultados obtidos nesse trabalho corroboram dados anteriormente publicados para a ação de *C. subvermispora* *in vivo* (GUERRA et al., 2002; 2004; AGUIAR, 2008) e também trabalhos que avaliaram a degradação *in vitro* de modelos não fenólicos de lignina pela ação de MnP de *P. chrysosporium* (KAPICH et al, 1999). A figura 50 apresenta algumas vias prováveis para explicar a degradação da lignina nos sistemas *in vivo* com *C. subvermispora* ou nos sistemas *in vitro* desenvolvidos nessa tese. Quando o sistema *in vitro* foi baseado na ação de $MnP/Mn^{+2}/H_2O_2$ /ácido linoléico pode-se assumir que as vias de degradação são muito similares às observadas no sistema *in vivo* com *C. subvermispora*. A única via de degradação que parece se diferenciar nos sistemas *in vivo* e *in vitro* é a de simples oxidação de uma função álcool no $C\alpha$. Essa via foi considerada como uma rota secundária no sistema *in vivo* (GUERRA et al 2004), pois em estudos detalhados de RMN (tanto ^{13}C , como $2D-^1H-^{13}C$), das ligninas de madeiras biotratadas não apresentavam evidência da ocorrência de

carbonila- α , nem de um C β em subestruturas contendo carbonila- α . Por outro lado, no sistema *in vitro*, a simples oxidação do carbono- α foi detectada tanto nas reações iniciadas por MnP/Mn⁺²/H₂O₂/ácido linoléico como pelo sistema Fe²⁺/ácido linoléico.

Figura 50 – Vias prováveis de transformação da lignina por *C. subvermispota* *in vivo* ou por sistemas baseados na ação de MnP/Mn⁺²/H₂O₂/ácido linoléico.

Os resultados obtidos nessa tese permitiram ainda concluir que vários sistemas miméticos podem iniciar a peroxidação de ácido linoléico *in vitro*. Quando essas reações foram conduzidas na presença de ligninas (CLC ou *E. grandis* moído) foi possível verificar que ocorrem transformações importantes na estrutura da lignina que eventualmente poderiam ser exploradas para processos de transformação da lignina ou mesmo despolimerização e remoção, como ocorre, por exemplo, nas etapas de branqueamento de polpas kraft.

REFERENCIAS

ADLER, E.; MARTON, J. Zur Kenntnis der carbonylgruppen in lignin I. **Acta Chemica Scandinavia**, v. 13, p. 75-96, 1959.

AGUIAR, A. **Importância dos mediadores de baixa massa molar na biodegradação de madeira por *Ceriporiopsis subvermispota***. Lorena, SP: EEL, 2008. 121f. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. 2008

AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Relevance of extractives and wood transformation products on the biodegradation of *Pinus taeda* by *Ceriporiopsis subvermispota*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 61, p. 182-188, 2008.

AGUIAR, A.; SOUZA-CRUZ, P.; FERRAZ, A. Oxalic acid, Fe^{3+} -reduction activity and oxidative enzymes detected in culture extracts recovered from *Pinus taeda* wood chips biotreated by *Ceriporiopsis subvermispota*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 873-878, 2006.

AKHTAR, M. et al. 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.

AMIRTA, R. A. et al. Ceriporic acid C, a hexadecenylitaconate produced by a lignin-degrading fungus, *Ceriporiopsis subvermispota*. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 126, p. 121-131, 2003.

ANDER, P.; MARZULLO, L. Sugar oxidoreductases and veratryl alcohol oxidase as related to lignin degradation. **Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 115-131, 1997.

ARGYROPOULOS, D.S. Quantitative phosphorus-31 NMR analysis of lignins, a new tool for the lignin chemist. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 14, p. 45-63, 1994.

BAILEY, M.J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Inter-laboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 257-270, 1992.

BALAKSHIN, M. Y.; CAPANEMA, E. A.; CHANG, H. MWL fraction with a high concentration of lignin carbohydrate linkages: Isolation and 2D NMR spectroscopic analysis. **Holzforschung**, v. 61, p. 1-7, 2007.

BAO, W. et al. Oxidative degradation of non-phenolic lignin during lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase. **FEBS Letters**, v. 354, p. 297-300, 1994.

BIERMANN, C. J. **Essentials of Pulping and Papermaking**, San Diego: Academic Press, 1993, 472p.

BLANCHETTE, R. A. et al. Cell wall alterations in loblolly pine wood decayed by the white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. **Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 203-213, 1997.

BOGAN, B. W.; LAMAR, R. T. Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading capabilities of *Phanerochaete laevis* HHB-1625 and its extracellular ligninolytic enzymes. **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, p. 1597-1603, 1996.

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. **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, p. 1788-1792, 1996.

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 and Microbial Technology**, v. 43, p. 193-198, 2008.

CHOI, J.W. et al. Characterization of trembling aspen wood (*Populus tremuloides* L.) degraded with the white rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora* and MWLs isolated thereof. **Holz Roh Werkst**, v. 64, p. 415-422, 2006.

CRESTINI, C.; SERMANI, G.G.; ARGYROPOULOS D.S. Structural modifications induced during biodegradation of wheat lignin by *Lentinula edodes*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 967-973, 1998.

DAINA, S. et al. Degradation of β -5 lignin model dimers by *Ceriporiopsis subvermispora*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 499-505, 2002.

DE JONG, E.; FIELD, J.; DE BOND, J. Aryl alcohols in the physiology of ligninolytic fungi. **FEMS Microbiology**, 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*. **Chemistry Letters**, p. 54-55, 2000.

ENOKI, M. et al. Chemical synthesis, iron redox interactions and charge transfer complex formation of alkylitaconic acids from *Ceriporiopsis subvermispora*. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 120, p. 9-20, 2002.

ENOKI, M. et al. Extracellular lipid peroxidation of selective white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 180, p. 205-211, 1999.

ERIKSSON, K. E. L.; BLANCHETTE, R. A.; ANDER, P. **Microbiological and Enzymatic Degradation on Wood and Wood Components**. Alemanha: Springer-Verlag; 1990.

EVANS, C. S. et al. Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. **FEMS Microbiology Review**, v. 13, p. 235-239, 1994.

EVTUGUIM, D. V. et al. Comprehensive study on the chemical structure of dioxane lignin from plantation *Eucalyptus globulus* wood. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4252-4261, 2001.

FAIX, O. Classification of Lignins from Different Botanical Origins by FT-IR Spectroscopy. **Holzforschung**, V. 45, p. 21-27, 1991.

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

FERRAZ, A. **Contribuição ao estudo do ascomiceto *Chrisonilia sitophila*: biodegradação da madeira e seus componentes**. 1991. Tese de doutorado. Instituto de química. Universidade de Campinas: 1991.

FERRAZ, A. et al. Biodegradation of *Pinus radiata* softwood by white- and brown-rot fungi. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 17, p. 31-34, 2001.

FERRAZ, A. et al. Characterization of white zones produced on *Pinus radiata* wood chips by *Ganoderma australe* and *Ceriporiopsis subvermispota*. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 6, p. 641-645, 2000a.

FERRAZ, A. et al. Controlled release of 2,4-D from granule matrix formulations based on six lignins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.1001-1005, 1997.

FERRAZ, A. et al. Estimating chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 201-212, 2000b.

FERRAZ, A. et al. Formic acid/acetone-organosolv pulping of white-rotted *Pinus radiata* softwood. **Journal Chemistry Technology Biotechnology**, v. 75, p. 1190-1196, 2000c.

FERRAZ, A. et al. Occurrence of iron-reducing compounds in biodelignification “palo podrido” wood samples. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 47, p. 203-208, 2001.

FERRAZ, A. et al. Technological advances and mechanistic basis for fungal biopulping. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p.178-185, 2008.

FERRAZ, A. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia, In: Espósito, Azevedo. **Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos**. Caxias do Sul, EDUCS 2004, p. 215-242.

GLENN, J. K. et al. An extracellular H₂O₂ requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemical and Biophysical**, v. 114, p. 1077-1083, 1983.

GOLDSHIMD, O. Ultraviolet spectra. In: Eds. Sarkanen K. V.; Ludwig L. H. **Lignin Occurrence, formation, structure and reaction**. New York: Wiley Interscience, 1971. p. 241-266.

GOODELL B. Brown-rot fungal degradation of wood: our evolving view. In: Eds. Goodell B.; Nicholas D. D.; Schultz T. P. **Wood Deterioration and Preservation – Advances in our Changing World. ACS Symposium**. Washington, DC: American Chemical Society; 2003. p. 97-118.

GOODELL, B. et al. Iron-reducing capacity of low-molecular-weight compounds produced in wood by fungi. **Holzforschung**, v. 60, p. 630-636, 2006.

GOODELL, B. et al. Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolate from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. **Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 133-152, 1997.

GRANATA, A.; ARGYROPOULOS, D.S. 2-Chloro-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaphospholane, a reagent for the accurate determination of the uncondensed and condensed phenolic moieties in lignins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 1538-1544, 1995.

GUERRA, A. et al. Comparative Evaluation of Three Lignin Isolation Protocols for Various Wood Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 9696–9705, 2006.

GUERRA, A. et al. Structural characterization of lignin during *Pinus taeda* wood treatment with *Ceriporiopsis subvermispota*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 4073-4078, 2004.

GUERRA, A.; LUCIA, A. L.; ARGYROPOULOS, S. Isolation and characterization of lignins from *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden and *Eucalyptus globulus* Labill. By enzymatic mild acidolysis (EMAL). **Holzforschung**, v. 62, p. 24–30, 2008.

GUERRA, A.; MENDONÇA, R.; FERRAZ, A. Characterization of the residual lignins in *Pinus taeda* biodegraded by *Ceriporiopsis subvermispota* by using *in situ* CuO oxidation and DFRC methods. **Holzforschung**, v. 56, p. 157-160, 2002.

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.

GUTIÉRREZ, A. et al. Production of new unsaturated lipids during wood decay by ligninolytic basidiomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1344-1350, 2002.

HAKALA, T. K. et al. Evaluation of novel woodrotting polypores and corticioid fungi for the decay and biopulping of Norway spruce (*Picea abies*) wood. **Enzyme and Microbial technology**, v. 34, p. 63-255, 2004.

HAMMEL, K. E. et al. Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 445-453, 2002.

HEIDORNE, F. O. 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, 2005.

HIGUCHI, T. Biodegradation mechanism of lignin by white-rot basidiomycetes. **Journal Biotechnology**, v. 30, p.1-8, 1993.

HIGUCHI, T. **Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components**. Orlando: Academic Press; 1985.

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

HOFRICHTER, M.; LUNDELL, T.; HATAKKA, A. Conversion of Milled Pine Wood by Manganese Peroxidase from *Phlebia radiata*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4588-4593, 2001.

HOLTMAN, K.M. et al. Elucidation of lignin structure through degradative methods: comparison of modified DFRC and thioacidolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3535-3540, 2003.

HORTA, A. M. **Estudo sobre a redução de Fe^{+3} por extratos aquosos de cultivos de *Ceriporiopsis subvermispota* sobre madeira e sua relação com a peroxidação de lipídeos**. Escola de Engenharia de Lorena, 2008. 98f. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo. 2008.

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

ISLAM, A.; SARKANEM, K. The isolation and characterization of the lignin of Jute (*Corchorus capsularis*). **Holzforschung**, v. 47, p. 113-132, 1993.

JENSEN, K. A. et al. Manganese-dependent cleavage of nonphenolic lignin structures by *Ceriporiopsis subvermispota* in the absence of lignin peroxidase. **Applied and Environmental Microbiology**, 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. **Journal of Microbiological Methods**, v. 51, p. 261-271, 2005a.

KAPICH, A. N. et al. Involvement of lipid peroxidation in the degradation of a non phenolic lignin model compound by manganese peroxidase of the litter-decomposing fungus *Stropharia coronilla*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 330, p. 371-377, 2005b.

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, p. 350-358, 2007.

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

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

KERSTEN, P. J.; KIRK, T. K. Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal Bacteriol**, v. 169, p. 2195-2202, 1987.

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.

KIRK, T.; HIGHLEY, T. Quantitative changes in structural components of conifers during decay by white and brown-rot fungi. **Phytopathology**, v. 63, p. 1338-1342, 1973.

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., **Biotechnology in the pulp and paper industry**. Berlin: Springer-Verlag, 1997, p. 45-126 (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology).

KUWAHARA, M. et al. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, v. 169, p. 247-250, 1984.

LAWTHER, J.; SUN, R.; BANKS, W. Extraction and comparative characterization of ball-milled lignin (Im) enzyme lignin (Ie) and alkali lignin (Ia) from wheat straw. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 30, p. 395-410, 1996.

LEATHAM, G.; MYERS, G.; WEGNER, T. Biomechanical pulping of aspen chips: Energy savings resulting from different fungal treatments. **Tappi Journal**, v. 73, p. 197-200, 1990.

LU, F.; RALPH, J. Derivatization followed by reductive cleavage (DFRC method). A new method for lignin analysis: protocol for analysis of DFRC monomers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 2590-2592, 1997a.

LU, F.; RALPH, J. The DFRC method for lignin analysis 1. A new method for β -aryl ether cleavage: lignin model studies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 4655-4660, 1997b.

LU, Y. P. et al. Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98, p. 641-654, 2002.

LUNDELL, T. et al. Formation and action of lignin-modifying enzymes in cultures of *Phlebia radiata* supplemented with veratric acid. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2623-2629, 1990.

LUNDQUIST, K. Wood. In: Eds. Lin S. Y.; Dence C. W. **Methods in lignin chemistry**. New York: Springer-Verlag; 1992. pp. 65-70, 1992.

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

MASARIN, F. et al. Laboratory and mill scale evaluation of biopulping of *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden with *Phanerochaete chrysosporium* RP-78 under non-aseptic conditions. **Holzforschung**, v. 63, p. 259-263, 2009.

MASARIN, F.; FERRAZ, A. Evaluation of *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden biopulping with *Ceriporiopsis subvermispota* under non-aseptic conditions. **Holzforschung**, v. 62, p. 1-7, 2008.

MENDONÇA, R. et al. Alkaline sulfite/anthraquinone pulping of pine wood chips biotreated with *Ceriporiopsis subvermispota*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 79, p. 584-589, 2004.

MENDONÇA, R.; GUERRA, A.; FERRAZ, A. Delignification of *Pinus taeda* wood chips treated with *Ceriporiopsis subvermispota* for preparing high-yield pulps. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 77, p. 411-418, 2002.

MESSNER, K. 1998. Biopulping. In: Eds. Bruce, A.; Palfreyman, J. W. **Forest Products Biotechnology**. London: Taylor & Francis; 1998. p. 63-82.

MESSNER, K. et al. Overview of white-rot research: where we are today. In: Eds. Goodell, B.; Nicholas, D.; Schultz. **Wood Deterioration and Preservation. Advances in Our Changing World**. Washington: American Chemical Society; 2003. p. 73-96. ACS Symposium Series 845.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic reagent for the determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

RAHMAWATI, N. et al. Ceriporic acid B, an extracellular metabolite of *Ceriporiopsis subvermispota*, suppresses the depolymerization of cellulose by the Fenton reaction. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 2851-2856, 2005.

RALPH, J. et al. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. **Phytochemistry Reviews**, v. 3, p. 29-60, 2004.

ROLANDO, C.; MONTIES, B.; LAPIERRE, C. Thioacidolysis. In: Lin, S., Dence, C.W., **Methods in Lignin Chemistry**, Heidelberg: Springer-Verlag, 1992, p. 334-349.

RUEL, K.; BARNOUD, F. Degradation of Wood by Microorganisms: Ultrastructural Aspects. In: **Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components**. New York: Academic Press; 1985. p. 441-464.

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

SJÖSTROM, E.; WESTERMARK, U. Chemical composition of wood and pulps: basic constituents and their distribution. In: Eds. Sjöström E.; Alén R. **Analytical methods in wood chemistry, pulping and papermaking**. Helsinki: Springer Series in Wood Science; 1999. p. 1-20.

SOUTHORN, P. A.; POWIS, G. Free Radicals in Medicine.1. Chemical nature and biological reactions. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 63, p. 381-389, 1988.

SOUZA-CRUZ, P. B. et al. Extraction and determination of enzymes produced by *Ceriporiopsis subvermispota* during biopulping of *Pinus taeda* wood chips. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 228-234, 2004.

SPITELLER, G. Peroxyl radicals: Inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 41, p. 362–387, 2006.

SREBOTNIK, E. et al. Evidence that *Ceriporiopsis subvermispota* degrades nonphenolic lignin structure by a one-electron-oxidation mechanism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 4435-4440, 1997.

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

TIEN, M.; KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete Chrysosporium*. **Birds & Science**, v. 221, p. 661-663, 1983.

URZÚA, U.; KERSTEN, P.J.; VICUÑA, R. Manganese peroxidase-dependent oxidation of glyoxilic and oxalic acids synthesized by *Ceriporiopsis subvermispota* produces extracellular hydrogen peroxide. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 68-73, 1998.

VICENTIM, M. P.; FERRAZ, A. Alkaline-sulfite hemithermomechanical pulping of *Eucalyptus grandis* biotreated by *Ceriporiopsis subvermispota* under varied culture conditions. **Holzforschung**, v. 62, p. 375–382, 2008.

VICENTIM, M. P.; FERRAZ, A. Enzyme production and chemical alterations of *Eucalyptus grandis* wood during biodegradation by *Ceriporiopsis subvermispota* in cultures supplemented with Mn^{2+} , corn steep liquor and glucose. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 40, p. 645-652, 2007.

WATANABE, T. et al. A selective lignin-degrading fungus, *Ceriporiopsis subvermispota*, produces alkylitaconates that inhibit the production of a cellulolytic active oxygen species, hydroxyl radical in the presence of iron and H_2O_2 . **Biochemical and Biophysical**, V. 297, p. 918-923, 2002.

WATANABE, T. et al. Formation of acyl radical in lipid peroxidation of linolenic acid by manganese-dependent peroxidase from *Ceriporiopsis subvermispota* and *Bjerkandera adusta*. **European Journal of Biochemistry**, 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 Journal of Biochemistry**, v. 268, p. 6114-6122, 2001.

WEXLER, A. S. Characterization of lignosulfonates by ultraviolet spectrometry. **Analytical chemistry**, v. 36, p. 213-221, 1964.

WU, S.; ARGYROPOULOS, D. S. An improved Method for isolating Lignin in High Yield and Purity. **Journal of Pulp and Paper Science**, v. 29, p. 235-240, 2003.