

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

ANDRÉ AGUIAR MENDES

**Importância dos mediadores de baixa massa molar na
biodegradação de madeira por *Ceriporiopsis*
*subvermispora***

LORENA
2008

ANDRÉ AGUIAR MENDES

**Importância dos mediadores de baixa massa molar na
biodegradação de madeira por *Ceriporiopsis*
*subvermispora***

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

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

**LORENA
2008**

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

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

Mendes, André Aguiar

Importância dos mediadores de baixa massa molar na biodegradação de madeira por *Ceriporiopsis subvermispota* / André Aguiar Mendes ; orientador André Luis Ferraz. -- 2008

121 f. : fig.

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

1. Peroxidação de lipídeos 2. *Ceriporiopsis subvermispota* 3. Manganês Peroxidase 4. Ácido oxálico 5. Biopolpação . I. Título.

577.15 - CDU

A minha mãe Maura e aos meus irmãos
Adriano, Jaqueline e Aldo Henrique por
tudo do bom e do melhor que eles têm me
proporcionado

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. André Luis Ferraz pela confiança, paciência e orientação desde a iniciação científica.

À Melhoramentos Celulose e Papel pela disponibilidade de espaço para realização dos ensaios de polpação.

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

Aos técnicos de laboratório Jussara, 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, especialmente Sirlene, Régis, Héllen Cristiane, Xis, Daniel, Lili, Aline, Larissa, Baby, Giovani, Taís, Regina, Laís, Gisele, Daniela Gavioli, Gina Gabriela, Priscila, Marcos Paulo, Vanessa, Marcelão, Guta, Karla, Lucinha, Bárbara, Fabrício.

Ao grande amigo e brincalhão Brexola, que muito me ajudou e que permanecerá para sempre na minha memória.

Aos amigos de fora do Debiq Fernanda, Cássio, Andréia, Aneliza, Larissa, Rita, Soninha.

À Fapesp pelo auxílio financeiro concedido desde a iniciação científica.

RESUMO

MENDES, A.A. **Importância dos mediadores de baixa massa molar na biodegradação de madeira por *Ceriporiopsis subvermispora***. 2008. 121f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2008.

O fungo de podridão branca *Ceriporiopsis subvermispora* é seletivo na degradação de lignina em estágios curtos de colonização de madeira e dessa forma tem sido uma das espécies mais estudadas em biopolpação, que consiste em um tratamento biológico de cavacos de madeira que antecede etapas convencionais de polpação. Para degradar a lignina na parede celular vegetal esse fungo secreta a enzima manganês-peroxidase (MnP), a qual necessita de ácido oxálico para transportar o íon Mn^{3+} oriundo do seu ciclo catalítico. O complexo quelante- Mn^{3+} gerado degrada apenas porções fenólicas da lignina. Porém, por meio da peroxidação de lipídeos por Mn^{3+} , radicais livres são gerados e apresentam potencial de oxidação suficiente para degradar estruturas não-fenólicas da lignina. Com base nesses aspectos, o presente trabalho avaliou a importância desses mediadores da MnP, ácido oxálico e lipídeos, no processo degradativo quanto à adição ou à supressão dessas substâncias nos cultivos. Em cultivos com madeira *in natura* ou extraídas com etanol (provavelmente isento de lipídeos) não ocorreu diferença significativa quanto à produção de metabólitos extracelulares (enzimas, ácido oxálico), à degradação de lignina e à atividade redutora de Fe^{3+} (envolvida na geração de radicais OH pela reação de Fenton). A formação de TBARS (substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico), que serve como indicio de reações de peroxidação de lipídeos, também foi semelhante, demonstrando que mesmo a partir de madeira livre de extrativos essas reações ocorrem. Com o avanço do biotratamento, a lignina foi despolimerizada por meio da diminuição de ligações β -O-4, os teores de OH alifáticas e fenólicas foram diminuídos, enquanto o teor de grupos carboxila aumentou. Embora a degradação de celulose em madeira tenha sido baixa, cartões de holocelulose (livres de lignina) adicionados nesses cultivos foram despolimerizados. Nos cultivos em que houve a adição de uma fonte extra de lipídeos (óleo de soja), a produção de enzimas e degradação de lignina foram similares, enquanto a produção de ácido oxálico e TBARS foi estimulada por esse co-substrato. A maior concentração de óleo de soja adicionado (10,4 g/kg de madeira) fez com que a lignina presente na madeira residual apresentasse o mesmo teor de ligações β -O-4 que o controle, enquanto maior degradação de OH alifáticas e menor formação de grupos carboxila foram observadas nessas ligninas. Em outro ciclo de cultivos, íons Ca^{2+} foram adicionados para precipitar o ácido oxálico produzido pelo fungo. Nos cultivos com a mais alta carga de cálcio (1400 mg/kg) houve diminuição na formação de ácido oxálico e conseqüentemente uma inibição na degradação de todos os componentes da madeira. Ao serem realizados cultivos com ácido oxálico exógeno, o fungo atuou de forma a igualar a concentração de ácido oxálico livre em relação a um cultivo sem esse suplemento, tanto por catabolismo quanto por precipitação desse ácido. Para as máximas cargas de cálcio, ácido oxálico e óleo de soja foram realizados outros cultivos sobre madeira em biorreatores para realização de ensaios de polpação. A polpação quimiotermomecânica sulfito alcalino dessas amostras de madeira biodegradada mostrou que os cultivos adicionados de Ca^{2+} e os não suplementados foram os que proporcionaram os maiores benefícios atribuídos ao biotratamento. Por outro lado, a adição de ácido oxálico anulou o benefício oriundo do biotratamento. A busca de correlações entre os níveis de metabólitos extracelulares com os benefícios do biotratamento para a polpação quimiotermomecânica não apresentaram tendências claras que indiquem a relevância de um metabólito em especial. Pelo contrário, aparentemente deve haver um compromisso entre todas as atividades extracelulares para que um determinado benefício seja obtido.

PALAVRAS-CHAVE: *Ceriporiopsis subvermispora*. Manganês-peroxidase. Peroxidação de lipídeos. Ácido Oxálico. Biopolpação.

ABSTRACT

MENDES, A.A. **Importance of the low molecular mass mediators in the wood biodegradation by *Ceriporiopsis subvermispora***. 2008. 121f. Thesis (Doctoral in Industrial Biotechnology) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2008.

The white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora* degrades lignin selectively during the initial stages of wood colonization and in this way it has been one of the most studied species in biopulping. This process consists of a biological treatment of wood chips that precedes conventional pulping stages. To degrade lignin in the plant cell wall this fungus secretes the enzyme manganese-peroxidase (MnP), which needs oxalic acid to transport the Mn^{3+} ion formed in the catalytic cycle of the enzyme. The oxalate- Mn^{3+} complex degrades only lignin phenolic portions. However, through lipid peroxidation initiated by Mn^{3+} , free radicals are generated and they present enough oxidation potential to degrade nonphenolic lignin structures. With basis in these aspects, the present work evaluated the importance of these mediators of MnP, oxalic acid and lipids, in the degradative process either by their addition or suppression in wood-containing cultures. In cultivations with *in natura* wood or ethanol extracted wood (probably free of lipids) there was no significant difference in the production of extracellular metabolites (enzymes, oxalic acid), or in the lignin degradation and the Fe^{3+} -reducing activity (involved in the OH radicals generation by the Fenton's reaction). The formation of TBARS (thiobarbituric acid reactive substances), that is indicative of lipid peroxidation reactions, was also similar in both cultivations systems, demonstrating that even starting from extractives-free wood, these reactions can occur. With the progress of the biotreatment, the lignin was depolymerized through the decrease of β -O-4 bonds, the contents of aliphatic and phenolic OH decreased, while carboxyl groups content increased. Although the cellulose degradation in wood has been low, holocellulose cards (free from lignin) added in these cultures were depolymerized. In the cultures where lipids were added (soy-bean oil), the enzyme production and lignin degradation were similar, while the oxalic acid and TBARS productions were stimulated by this co-substrate. With the highest concentration of soy-bean oil added (10,4 g/kg wood), the lignin in the residual wood presented the same content of β -O-4 bonds as compared to the control, while higher degradation of aliphatic OH and lower formation of carboxyl groups were observed in these lignins. In another cycle of cultivations, Ca^{2+} ions were added to precipitate oxalic acid produced by the fungus. In the cultivations with the highest load of calcium (1400 mg/kg) there was a decrease in the oxalic acid formation and consequently an inhibition in the degradation of all the wood components. To the cultivations accomplished with exogenous oxalic acid, the fungus acted to equalize the concentration of free oxalic acid either by catabolism or by precipitation of this acid. For the highest loads of calcium, oxalic acid and soy-bean oil, other cultivations were accomplished on 20 L-bioreactors to produce biotreated wood samples suitable for pulping experiments.

The alkaline-sulfite chemithermomechanical pulping of these samples showed that the biotreated wood in Ca^{2+} -amended and nonsupplemented cultures were the ones that provided the highest benefits. On the other hand, the oxalic acid addition annulled the benefit originated from the biotreatment. The search for correlations among the levels of extracellular metabolites with the benefits of the biotreatment for the chemithermomechanical pulping did not present clear tendencies to indicate the relevance of a metabolite in special. On the contrary, probably there is a commitment among all of the extracellular activities, so that a certain benefit would be obtained.

KEY-WORDS: *Ceriporiopsis subvermispora*. Manganese-peroxidase. Lipids Peroxidation. Oxalic Acid. Biopulping.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura de um fragmento de celulose.....	14
Figura 2. Estrutura parcial de polioses: a - O-acetil-4-O-metilglicuronoxilana; b - O-acetil-galactoglicomanana; R = H ou grupos acetila.....	14
Figura 3. Modelo estrutural de lignina de madeiras moles (reproduzido com modificações).....	15
Figura 4. Modo de ação das enzimas hidrolíticas sobre a celulose. No modelo apresentado, as linhas longas representam a parte cristalina da celulose, enquanto as linhas em zig-zag representam a celulose amorfa.....	19
Figura 5. Ciclos catalíticos simplificados de LiP (A) e MnP (B); S e PhOH representam estruturas aromáticas não fenólica e fenólica, respectivamente.....	21
Figura 6. Ciclo catalítico de lacase; PhOH representa uma estrutura fenólica.....	21
Figura 7. Mecanismo proposto para redução extracelular de Fe ³⁺ e produção de H ₂ O ₂ pelo fungo <i>G. trabeum</i>	25
Figura 8. Peroxidação de lipídeos insaturados iniciada por Mn ³⁺ ou •OH (reproduzido com modificações).....	26
Figura 9. Estrutura química de ácidos alqu(en)il-itacônicos produzidos por <i>C. subvermispora</i>	30
Figura 10. Perdas de massa e de componentes provenientes da biodegradação de cavacos de <i>P. taeda in natura</i> (A) e extraídos com etanol (B) por <i>C. subvermispora</i> : massa (□), glicana (△), polioses (○) e lignina (◇).....	50
Figura 11. Perdas de massa (círculo) e viscosidade (quadrado) dos cartões de holocelulose incluídos nas culturas de <i>C. subvermispora</i> sobre cavacos de <i>P. taeda in natura</i> (símbolo cheio) e extraídos com etanol (símbolo vazio).....	51
Figura 12. Valores de pH determinados nos extratos aquosos provenientes da biodegradação de <i>P. taeda in natura</i> (●) e extraídos com etanol (○) por <i>C. subvermispora</i>	54
Figura 13. Teor de ácido oxálico solúvel (◇), extraído com HCl 0,1 M (○), extraído com NaOH 0,1 M (△) e o total (□) proveniente da biodegradação de cavacos de <i>P. taeda in natura</i> (A) e extraídos com etanol (B) por <i>C. subvermispora</i>	54
Figura 14. Produção de TBARS provenientes da biodegradação de cavacos de <i>P. taeda in natura</i> (●) e extraídos com etanol (○) por <i>C. subvermispora</i>	55
Figura 15. Atividade redutora de Fe ³⁺ (A) e teor de catecóis totais (B) determinados a partir dos extratos aquosos provenientes da biodegradação de cavacos de <i>P. taeda in natura</i> (●) e extraídos com etanol (○) por <i>C. subvermispora</i>	57
Figura 16. Cromatogramas dos extratos aquosos fracionados em uma coluna de permeação em gel monitorados em 280 nm (○) e atividade redutora de Fe ³⁺ em 562 nm (●); A - madeira <i>in natura</i> não biodegradada, B - madeira extraída com etanol não biodegradada, C - madeira <i>in natura</i> biodegradada por 1 semana, D - madeira extraída com etanol biodegradada por 1 semana, E - madeira <i>in natura</i> biodegradada por 2 semanas, F - madeira extraída com etanol biodegradada por 2 semanas, G - madeira <i>in natura</i> biodegradada por 4 semanas, H - madeira extraída com etanol biodegradada por 4 semanas.....	58
Figura 17. Cromatograma do extrato aquoso de madeira <i>in natura</i> não biodegradada fracionado na coluna de permeação em gel: atividade redutora de Fe ³⁺ (562 nm; ●) e açúcares totais (490 nm; ◇).....	59
Figura 18. Efeito de ácido oxálico exógeno na atividade redutora de Fe ³⁺ promovida pelo extrato aquoso de madeira <i>in natura</i> biodegradada por 4 semanas.....	60
Figura 19. Solubilidade em NaOH 1 % dos cavacos de <i>P. taeda in natura</i> biodegradados por <i>C. subvermispora</i>	62
Figura 20. Mecanismo de tioacidólise de lignina.....	63
Figura 21. Cromatograma referente aos produtos da tioacidólise de <i>P. taeda</i> não biodegradado (controle); PI - padrão interno (tetracosano), G - monômeros de	

unidade guaiacil-propano tritioetilados: os dois picos mais intensos correspondem aos monômeros eritro e treo (mostrados na Figura 20), enquanto o terceiro e menos intenso corresponde ao monômero com dois enxofres no carbono y (ROLANDO, MONTIES; LAPIERRE, 1992).....	63
Figura 22. Perda de lignina (□) e rendimento de monômeros da tioacidólise (△) provenientes da biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>C. subvermispota</i>	65
Figura 23. Mecanismo de fosfitilação de grupos OH presentes na lignina por 2-cloro-1,3,2-dioxafosfolano (reagente 1) ou por 2-cloro-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxafosfolano (reagente 2).....	65
Figura 24. Espectros de RMN- ³¹ P recuperados de ligninas isoladas de cavacos de <i>P. taeda</i> não biodegradado (controle) e biodegradado por <i>C. subvermispota</i> por 4 semanas.....	66
Figura 25. Perdas de massa e de componentes provenientes da biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>G. trabeum</i> (A) e <i>T. versicolor</i> (B): massa (□), glicana (△), polioses (○) e lignina (◇).....	72
Figura 26. Viscosidade (quadrados) e perdas de massa (triângulos) dos cartões de holocelulose incluídos nas culturas de <i>G. trabeum</i> (símbolos cheios) e <i>T. versicolor</i> (símbolos vazios) sobre cavacos de <i>P. taeda</i>	72
Figura 27. Teor de ácido oxálico solúvel (◇), extraído com HCl 0,1 M (○), extraído com NaOH 0,1 M (△) e o total (□) proveniente da biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>G. trabeum</i> (A) e <i>T. versicolor</i> (B).....	73
Figura 28. Valores de pH dos extratos aquosos (A) e solubilidade em NaOH 1% (B) provenientes da biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>G. trabeum</i> (□) e <i>T. versicolor</i> (△).....	74
Figura 29. Atividade redutora de Fe ³⁺ (A) e teor de catecóis totais (B) presentes nos extratos aquosos provenientes da biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>G. trabeum</i> (□) e <i>T. versicolor</i> (△).....	75
Figura 30. Efeito de ácido oxálico (A) e cálcio (B) nas atividades da MnP: 0 (◇), 1,5 (□), 3 (△) e 4,5 (○) mM de cálcio.....	77
Figura 31. Produção de ácido oxálico proveniente da biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>C. subvermispota</i> após 2 semanas na presença de cálcio exógeno.....	79
Figura 32. Teor de ácido oxálico (AO) proveniente da biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>C. subvermispota</i> após 2 semanas na presença de ácido oxálico exógeno.....	86
Figura 33. Teor de ácido oxálico proveniente da biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>C. subvermispota</i> após 2 semanas na presença de óleo de soja nos cultivos.....	92
Figura 34. Perda de lignina (◇) e produção de TBARS (△) provenientes da biodegradação µde <i>P. taeda</i> por <i>C. subvermispota</i> após 2 semanas na presença de óleo de soja nos cultivos.....	93
Figura 35. Produção de ácido oxálico proveniente da biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>C. subvermispota</i> após 2 semanas em biorreatores de 20 L.....	99
Figura 36. Oxigrama referente ao consumo de O ₂ causado pela peroxidação de ácido linoléico por Mn ²⁺ , H ₂ O ₂ e o caldo enzimático proveniente da biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>C. subvermispota</i> após 2 semanas em biorreator na presença de 1660 mg de ácido oxálico/kg de madeira.....	100
Figura 37. Atividade pro-oxidante e MnP (A), formação de TBARS e MnP (B) e formação de TBARS e atividade pro-oxidante (C) provenientes da biodegradacao de <i>P. taeda</i> por <i>C. subvermispota</i> em biorreatores de 20 L.....	102
Figura 38. Graus de refino de polpas quimiotermomecânicas sulfito alcalino de <i>P. taeda</i> : A - controle (□); biodegradado por <i>C. subvermispota</i> por 2 semanas sem aditivo (■); com 1660 mg de ácido oxálico/kg de madeira (●); B - controle (□); com 1400 mg de Ca ²⁺ /kg de madeira (▲); e com 10,4 g de óleo de soja/kg de madeira (◆).....	105
Figura 39. Graus de refino de polpas quimiotermomecânicas sulfito alcalino de <i>P. taeda</i> após 120 min de refino.....	106

- Figura 40.** Resistência à tração em função do tempo (A) e do grau de refino (B) das folhas provenientes da polpação quimiotermomecânica de *P. taeda*: controle (□); biodegradado por *C. subvermispora* por 2 semanas sem aditivo (■); com 1400 mg de Ca^{2+} /kg de madeira (▲); com 1660 mg de ácido oxálico/kg de madeira (●) e; com 10,4 g de óleo de soja/kg de madeira (◆).....108
- Figura 41.** Resistência ao rasgo em função do tempo (A) e do grau de refino (B) das folhas provenientes da polpação quimiotermomecânica de *P. taeda*: controle (□); biodegradado por *C. subvermispora* por 2 semanas sem aditivo (■); com 1400 mg de Ca^{2+} /kg de madeira (▲); com 1660 mg de ácido oxálico/kg de madeira (●) e; com 10,4 g de óleo de soja/kg de madeira (◆).....108
- Figura 42.** Contraposição dos índices de resistência ao rasgo e à tração das folhas provenientes da polpação quimiotermomecânica de *P. taeda*: controle (□); biodegradado por *C. subvermispora* por 2 semanas sem aditivo (■); com 1400 mg de Ca^{2+} /kg de madeira (▲); com 1660 mg de ácido oxálico/kg de madeira (●) e; com 10,4 g de óleo de soja/kg de madeira (◆).....109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Região de integração dos grupos OH nos espectros de RMN- ³¹ P	44
Tabela 2. Atividades enzimáticas e H ₂ O ₂ provenientes da biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>C. subvermispota</i>	53
Tabela 3. Rendimento de monômeros da tioacidólise provenientes da biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>C. subvermispota</i>	64
Tabela 4. Conteúdo de grupos funcionais determinados por espectroscopia de RMN- ³¹ P quantitativa de ligninas-dioxano provenientes da biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>C. subvermispota</i> e rendimento de isolamento das ligninas (baseado no teor de lignina Klason)	67
Tabela 5. Atividades enzimáticas hidrolíticas provenientes da biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>G. trabeum</i> (<i>Gt</i>) e <i>T. versicolor</i> (<i>Tv</i>).....	70
Tabela 6. Atividades enzimáticas provenientes da biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>C. subvermispota</i> após 2 semanas na presença de cálcio exógeno	78
Tabela 7. Perdas de massa e componentes provenientes da biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>C. subvermispota</i> após 2 semanas na presença de cálcio exógeno	80
Tabela 8. Atividade redutora de Fe ³⁺ (medida após 30 min de reação) e pH dos extratos aquosos; e solubilidade em NaOH 1% dos cavacos provenientes da biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>C. subvermispota</i> após 2 semanas na presença de cálcio exógeno	81
Tabela 9. Rendimento de monômeros da tioacidólise provenientes da biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>C. subvermispota</i> após 2 semanas na presença de cálcio exógeno	82
Tabela 10. Conteúdo de grupos funcionais determinados por espectroscopia de RMN- ³¹ P quantitativa de ligninas-dioxano provenientes da biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>C. subvermispota</i> após 2 semanas na presença de cálcio exógeno e rendimento do isolamento (% m/m).....	83
Tabela 11. Atividades enzimáticas provenientes da biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>C. subvermispota</i> após 2 semanas na presença de ácido oxálico exógeno.....	84
Tabela 12. Perdas de massa e componentes provenientes da biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>C. subvermispota</i> após 2 semanas na presença de ácido oxálico exógeno	84
Tabela 13. Atividade redutora de Fe ³⁺ (medida após 30 min de reação) e pH dos extratos aquosos; e solubilidade em NaOH provenientes da biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>C. subvermispota</i> após 2 semanas na presença de ácido oxálico exógeno	88
Tabela 14. Rendimento de monômeros da tioacidólise de <i>P. taeda</i> biodegradado por <i>C. subvermispota</i> após 2 semanas na presença de ácido oxálico exógeno.....	89
Tabela 15. Conteúdo de grupos funcionais determinados por espectroscopia de RMN- ³¹ P quantitativa de ligninas-dioxano provenientes da biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>C. subvermispota</i> após 2 semanas na presença de ácido oxálico exógeno e rendimento do isolamento (% m/m).....	89
Tabela 16. Atividades enzimáticas provenientes da biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>C. subvermispota</i> após 2 semanas na presença de óleo de soja nos cultivos	91
Tabela 17. Perda de massa e dos principais componentes de <i>P. taeda</i> biodegradado por <i>C. subvermispota</i> após 2 semanas na presença de óleo de soja nos cultivos	91
Tabela 18. Atividade redutora de Fe ³⁺ (medida após 30 min de reação) e pH dos extratos aquosos; e solubilidade em NaOH 1% provenientes da biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>C. subvermispota</i> após 2 semanas na presença de óleo de soja.....	93
Tabela 19. Rendimento de monômeros da tioacidólise de <i>P. taeda</i> biodegradado por <i>C. subvermispota</i> após 2 semanas na presença de óleo de soja nos cultivos	94
Tabela 20. Conteúdo de grupos funcionais determinados por espectroscopia de RMN- ³¹ P quantitativa de ligninas-dioxano provenientes da biodegradação de <i>P. taeda</i>	

por <i>C. subvermispota</i> após 2 semanas na presença de óleo de soja nos cultivos e rendimento do isolamento (% m/m).....	95
Tabela 21. Atividades enzimáticas (UI/kg de madeira) recuperadas dos cultivos de <i>C. subvermispota</i> sobre <i>P. taeda</i> em biorreatores de 20 L.....	97
Tabela 22. Perda dos principais componentes e solubilidade em NaOH provenientes da biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>C. subvermispota</i> após 2 semanas em biorreatores de 20 L.....	97
Tabela 23. Valores de pH, atividade redutora de Fe ³⁺ (medida após 30 min de reação; µM) e catecóis totais (mg/kg) analisados nos extratos aquosos e detecção de TBARS extraídos diretamente dos cavacos (µg/kg) provenientes da biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>C. subvermispota</i> após 2 semanas em biorreatores de 20 L.....	98
Tabela 24. Atividade pro-oxidante (UI/kg de madeira) baseada no consumo de O ₂ e produção de TBARS (nmols/mL de caldo) por meio da peroxidação de ácido linoléico <i>in vitro</i> pelos caldos enzimáticos provenientes da biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>C. subvermispota</i> após 2 semanas em biorreatores de 20 L.....	101
Tabela 25. Efeito de reagentes na formação de TBARS <i>in vitro</i> decorrente da peroxidação de ácido linoléico pelo caldo enzimático do cultivo sem aditivo.....	102
Tabela 26. Rejeitos e rendimento (% , g/100 g de cavacos iniciais) de polpa das etapas de polpação quimiotermomecânica.....	104

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Composição química da madeira.....	14
2.2 Polpação.....	15
2.3 Biopolpação.....	16
2.4 Aspectos químicos e bioquímicos da biodegradação de madeira.....	18
2.4.1 Enzimas atuantes na biodegradação de madeira.....	19
2.4.2 Compostos de baixa massa molar.....	22
2.5 <i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	28
2.6 Considerações finais sobre a revisão bibliográfica e embasamento experimental da tese.....	31
3 OBJETIVOS.....	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1 Fungo e preparo de inóculo.....	33
4.2 Experimentos de biodegradação de madeira.....	33
4.3 Extração e quantificação das enzimas.....	34
4.4 Determinação de atividades enzimáticas.....	34
4.5 Determinação de H ₂ O ₂ nos caldos enzimáticos.....	37
4.6 Extração dos cavacos biotratados com água e determinação de pH.....	37
4.7 Determinação de catecóis totais.....	38
4.8 Determinação de atividade redutora de íons Fe ³⁺	38
4.9 Distribuição de massa molar dos extratos aquosos.....	38
4.10 Determinação de ácido oxálico.....	39
4.11 Determinação da perda de massa dos cavacos e dos cartões de holocelulose.....	39
4.12 Determinação de viscosidade dos cartões de holocelulose.....	40
4.13 Análise química das madeiras.....	40
4.14 Determinação de solubilidade em NaOH 1% de madeiras biotratadas.....	41
4.15 Determinação de TBARS.....	41
4.16 Determinação do teor de ligações β-O-4 das ligninas por tioacidólise <i>in situ</i>	42
4.17 Isolamento de ligninas por acidólise branda.....	42
4.18 Quantificação de grupos funcionais das ligninas isoladas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de fósforo (RMN- ³¹ P).....	43
4.19 Biodegradação simultânea de <i>P. taeda</i> e cartões de holocelulose por outros basidiomicetos.....	44
4.20 Determinação da influência de ácido oxálico e cálcio nas atividades da MnP.....	44
4.21 Uso de aditivos nos cultivos de <i>C. subvermispora</i> sobre madeira.....	45
4.22 Experimentos de biodegradação de madeira em biorreatores de 20 L.....	46
4.23 Determinação do consumo de O ₂ proveniente da peroxidação enzimática de ácido linoléico <i>in vitro</i>	46
4.24 Determinação de TBARS provenientes da peroxidação enzimática de ácido linoléico <i>in vitro</i>	47
4.25 Polpação quimiotermodinâmica sulfito alcalino.....	47
4.26 Determinação do grau de refino das polpas.....	48
4.27 Formação de folhas e análise de suas propriedades mecânicas.....	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1 Cultivos sobre madeira <i>in natura</i> e extraída com etanol.....	49
5.1.1 Relevância dos extrativos na biodegradação de madeira.....	49

5.1.2 Envolvimento dos produtos de transformação da madeira no processo de biodegradação	56
5.1.3 Caracterização de <i>P. taeda</i> biodegradado quanto a solubilidade em NaOH, rendimento de tioacidólise e características estruturais das ligninas residuais.....	61
5.2 Comparação entre <i>C. subvermispota</i> e os fungos <i>G. trabeum</i> e <i>T. versicolor</i> na biodegradação de madeira e de cartões de holocelulose	69
5.3 Efeito de cálcio exógeno na biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>C. subvermispota</i>	76
5.4 Efeito de ácido oxálico exógeno na biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>C. subvermispota</i>	83
5.5 Efeito da adição de óleo de soja na biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>C. subvermispota</i>	90
5.6 Biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>C. subvermispota</i> em biorreatores de 20 L.....	96
5.6.1 Análise dos metabólitos extracelulares e alterações na composição química da madeira.....	96
5.6.2 Determinação de atividade pro-oxidante dos caldos enzimáticos.....	99
5.6.3 Polpação quimiotermomecânica sulfito alcalino	103
6 CONCLUSÕES.....	110
REFERÊNCIAS	113

1 Introdução

O estudo da biodegradação de madeira é um tópico bastante importante, principalmente quando aplicado à biopolpação, que consiste em um tratamento biológico de cavacos prévio aos processos convencionais de polpação. Esse processo biotecnológico proporciona muitos benefícios em comparação aos convencionais, como economia de energia elétrica em processos mecânicos e menor demanda de insumos químicos em processos químicos de polpação. Além disso, as biopolpas podem possuir melhores propriedades mecânicas. Este processo já está sendo testado em escala ampliada (biodegradação de pilha de 50 ton de cavacos) para possível implementação industrial, aqui mesmo no Brasil.

Dentre as espécies estudadas em biopolpação, o fungo de podridão branca *Ceriporiopsis subvermispora* tem se destacado por colonizar tanto madeiras duras quanto madeiras moles e ter proporcionado benefícios principalmente em processos mecânicos de polpação. Esse fungo promove degradação seletiva de lignina e extrativos em estágios curtos de colonização, mantendo a celulose preservada. A principal enzima produzida por esse fungo e responsável na degradação de lignina é a manganês-peroxidase. Para que essa enzima ataque a lignina presente na parede celular, é necessária a participação de mediadores de baixa massa molar suficiente para penetrar os poros da parede celular de madeiras intactas. Um dos mediadores é o ácido oxálico, que quelata o Mn^{3+} proveniente do ciclo catalítico dessa enzima fomentando a oxidação de porções fenólicas da lignina. Outros mediadores importantes são lipídeos, especificamente ácidos graxos insaturados que são convertidos a radicais livres (pelo complexo quelante- Mn^{3+}) que possuem potencial de oxidação suficiente para degradar as estruturas mais recalcitrantes da lignina.

Com base nesses aspectos, esse trabalho teve como objetivo avaliar a importância desses mediadores (ácido oxálico e lipídeos insaturados) na biodegradação de madeira por *C. subvermispora*. Foram realizados experimentos de adição e supressão dessas substâncias na madeira de *Pinus taeda*, que posteriormente foi submetida à [biodegradação](#). A partir dos cultivos foram avaliados o metabolismo fúngico, as alterações físico-químicas da madeira e alguns ensaios de polpação mecânica com essas madeiras.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Composição química da madeira

Os materiais lignocelulósicos são a principal fonte de matéria-prima para as indústrias de celulose e papel. Destes materiais o mais utilizado para esse fim é a madeira, que é composta principalmente pelos polissacarídeos celulose e hemicelulose e pela lignina, além de pequenas quantidades de extrativos e sais minerais (FENGEL; WEGENER, 1989).

A celulose é o componente mais abundante nos lignocelulósicos, cerca de 50%. É um polímero linear, possuindo porções amorfas e cristalinas, formado exclusivamente por moléculas de anidro-glicose unidas por ligações β -(1,4)-glicosídicas (Figura 1; FENGEL; WEGENER, 1989).

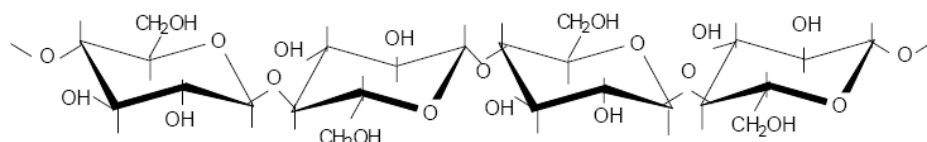


Figura 1. Estrutura de um fragmento de celulose.

As hemiceluloses ou polioses apresentam-se na forma de polímeros ramificados e de menor massa molar que a celulose. São compostas por vários açúcares como a glicose, manose, galactose, xilose e arabinose e pequenas quantidades de ácidos urônicos e grupos acetila (Figura 2). O teor de polioses em diferentes tipos de madeira varia de 20 a 25%. A poliose predominante em madeiras duras (angiospermas) é a glicuronoxilana, enquanto para madeiras moles ou macias (gimnospermas) é a glicomanana (FENGEL; WEGENER, 1989).

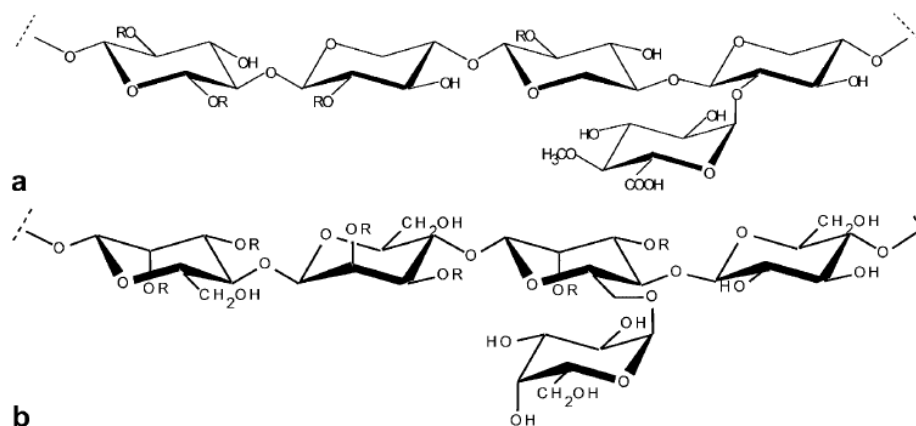


Figura 2. Estrutura parcial de polioses: **a** - O-acetil-4-O-metilglicuronoxilana; **b** - O-acetil-galactoglicomanana; R = H ou grupos acetila.

A lignina é composta basicamente de unidades fenilpropano formando uma macromolécula tridimensional e amorfa e compreende cerca de 20 a 30% do total da madeira. Os diferentes tipos de acoplamento entre os precursores da lignina (álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico) dão origem a vários tipos de ligações entre as unidades fenilpropano, sendo as mais frequentes β -O-4 e α -O-4 (50-65%), β -1 (9-15%), β -5 (6-15%), 5-5 (2-9%) e β - β (2-5%) (Figura 3; FENDEL; WEGENER, 1989).

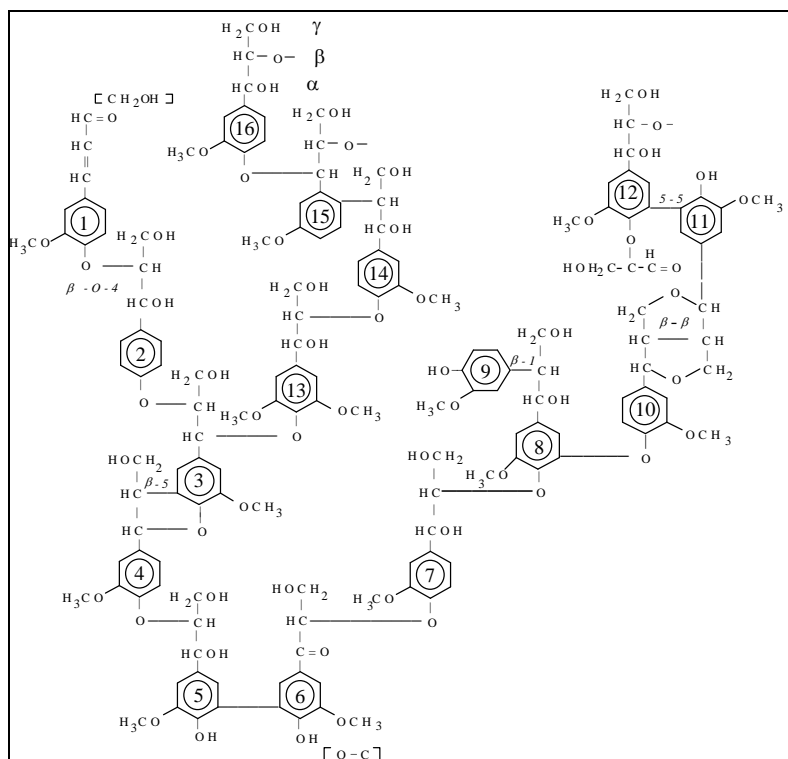


Figura 3. Modelo estrutural de lignina de madeiras moles (reproduzido com modificações).
Fonte: Fengel e Wegener (1989).

Uma menor fração dos materiais lignocelulósicos (2-4%) corresponde aos extrativos solúveis em água e em solventes orgânicos. Eles podem ser compostos fenólicos (taninos, flavonóides, lignanas), resinas (ácidos graxos, esteróis) ou terpenos (FENDEL; WEGENER, 1989).

2.2 Polpação

A polpação é a técnica mais importante na conversão de madeira para a obtenção de celulose destinada à fabricação de papel. A separação das fibras celulósicas para obtenção da polpa é realizada por processos químicos e/ou mecânicos.

Nos processos mecânicos o desfibramento da madeira é causado pelo atrito de troncos contra uma superfície abrasiva em rotação ou pelo desfibramento de cavacos em

refinadores de disco que também giram a altas velocidades. Isso causa uma desestruturação da lignina e rompimento da estrutura lamelar, liberando as fibras celulósicas. Como grande parte da lignina permanece retida na polpa, o rendimento desses processos se situa em torno de 95%. Apesar da relativa simplicidade de instalação de uma planta industrial, os processos mecânicos de polpação consomem grande quantidade de energia elétrica durante o desfibramento dos cavacos de madeira e também na etapa posterior de refino, para que as polpas atinjam propriedades específicas para fabricação de papel. São considerados como processos mecânicos de polpação a moagem com pedra, moagem com pedra sob pressão, polpação mecânica por refinamento, polpação termomecânica, quimiomecânica e quimiotermomecânica (BIERMANN, 1993).

Nos processos químicos de polpação, a liberação das fibras celulósicas ocorre por meio da fragmentação e solubilização da lignina e parte das polioses no licor de cozimento. Os processos kraft e sulfito são os mais desenvolvidos na produção de polpas químicas, pois promovem maior remoção de lignina, gerando polpas com qualidade superior às polpas mecânicas. O processo kraft é o mais empregado mundialmente. Neste processo alcalino, os principais agentes de deslignificação da madeira são o hidróxido de sódio (NaOH) e o sulfeto de sódio (Na₂S). Apesar de proporcionar polpas de boa resistência mecânica, estas são difíceis de serem branqueadas, o processo apresenta baixo rendimento devido à degradação dos polissacarídeos, e ocorre a emissão indesejada de mercaptanas na atmosfera (BIERMANN, 1993).

No processo sulfito os agentes de deslignificação da madeira são soluções de ácido sulfuroso e/ou seus sais que geram íons sulfito (SO₃²⁻) ou bissulfito (HSO₃⁻) durante o cozimento. Os processos sulfito diferem entre si em função dos sais utilizados e do pH do licor de cozimento. As polpas sulfito apresentam maior alvura em relação às polpas kraft, são refinadas mais rapidamente, portanto há menor consumo de energia elétrica, e o rendimento é maior. Entretanto, elas apresentam menor resistência mecânica que as polpas kraft (BIERMANN, 1993).

2.3 Biopolpação

A biopolpação é um pré-tratamento biológico de cavacos de madeira para produção de polpas químicas e/ou mecânicas. Esse tratamento biológico tem sido bastante estudado nos últimos anos devido aos benefícios que ele proporciona. No processo mecânico pode-se obter economia no consumo de energia durante o desfibramento e o refinamento dos cavacos, enquanto menores demandas de insumos químicos e/ou tempo de cozimento e melhores propriedades mecânicas podem ser obtidas em processos químicos ao se utilizar cavacos biotratados. A biopolpação consiste na habilidade de alguns fungos de podridão

branca em degradar os extrativos, a lignina e as polioses seletivamente nos estágios iniciais de colonização, mantendo a celulose praticamente intacta. Esse pré-tratamento causa certo amolecimento da madeira facilitando o desfibramento mecânico; facilita a penetração dos reagentes químicos devido ao aumento da porosidade da parede celular vegetal; e a lignina presente na madeira biodegradada é mais solúvel no licor de polpação. O processo que tem proporcionado melhores resultados quanto à aplicação de pré-tratamento biológico é a polpação mecânica por refinamento, e dentre as várias espécies estudadas até o momento, uma tem se destacado, o basidiomiceto *C. subvermispora* (AKHTAR *et al.*, 1998).

A biopolpação tem sido realizada principalmente em escala de bancada, mas ensaios em biorreatores e também em escala ampliada, especificamente em pilhas de 50 ton de cavacos, têm sido efetuados apresentando resultados satisfatórios. Ferraz *et al.* (2008) observaram uma economia de 18% e 27% de energia nos processos termomecânico e quimiotermodomecânico sulfito alcalino de polpação em escala industrial. Apesar desses resultados promissores, vários parâmetros devem ser controlados para que haja os benefícios decorrentes do biotratamento da madeira. A umidade dos cavacos é um quesito muito importante para o crescimento fúngico, pois facilita a penetração das hifas e permite a difusão dos metabólitos extracelulares produzidos. A assepsia deve ser mantida para possibilitar que apenas o fungo de interesse se desenvolva, restringindo a colonização de outros microorganismos oportunistas que competem pelo substrato. Além disso, alguns fungos competidores podem produzir toxinas que impedem o desenvolvimento do fungo de interesse (FERRAZ *et al.*, 2008; MASARIN, 2006). A temperatura também deve ser controlada, pois alguns fungos se desenvolvem melhor em faixas estreitas de temperatura (AKHTAR *et al.*, 1998).

A utilização de co-substratos para acelerar o crescimento fúngico tem sido bastante estudada e até o momento a milhocina tem proporcionado resultados satisfatórios (AKHTAR *et al.*, 1998; FERRAZ *et al.*, 2008; MASARIN, 2006; VICENTIM, 2007). Esse nutriente é gerado nas indústrias de beneficiamento do milho e possui açúcares, sais minerais e aminoácidos que servem como promotores de crescimento, porém sua utilização sobre cavacos não esterilizados propaga maior contaminação (MASARIN, 2006). Uma alternativa adotada por Ferraz *et al.* (2008) demonstrou que cavacos pré-cultivados por *C. subvermispora* que serviram de inóculo (semente), ao invés de uma suspensão de micélio, colonizaram eficientemente uma pilha de cavacos de 50 ton sem necessitar de esterilização a vapor.

A biodegradação de madeira por fungos pode facilitar a remoção de lignina em processos de polpação, entretanto, esse efeito não é diretamente proporcional à economia de energia em polpação biomecânica ou ao aumento da taxa de deslignificação no processo

kraft (MENDONÇA; GUERRA; FERRAZ, 2002). Ou seja, não existe uma correlação entre benefícios da biopolpação com a perda de massa ou de componentes durante o biotratamento (FERRAZ *et al.*, 2008). Resultados recentes apontaram uma correlação entre benefícios no processo kraft com a despolimerização de lignina observada durante os estágios iniciais de biodegradação da madeira pelo fungo *C. subvermispora* (MENDONÇA; GUERRA; FERRAZ, 2002). De acordo com Hunt *et al.* (2004), a esterificação de ácido oxálico nos polissacarídeos ou mesmo a oxidação dos componentes da madeira gerando novos grupos carboxílicos na parede celular poderia causar um aumento do ponto de saturação das fibras, o que diminuiria a energia requerida em processos mecânicos de polpação.

A tecnologia atualmente estabelecida da biopolpação resultou de um desenvolvimento de cerca de 20 anos, basicamente estruturado em um consórcio que envolveu o Forest Products Laboratory, em Madison (Wisconsin, EUA) e várias empresas do setor de celulose e papel. Como parte desse desenvolvimento, o fungo *C. subvermispora* foi selecionado como o mais eficiente para o processo de biopolpação mecânica da madeira (AKHTAR *et al.*, 1998). No entanto, até os dias de hoje, não se sabe exatamente os mecanismos químicos e bioquímicos envolvidos na biodegradação de madeira por esse fungo e também por outros basidiomicetos de podridão branca. O entendimento destes mecanismos certamente poderá contribuir para a otimização do processo de biopolpação.

2.4 Aspectos químicos e bioquímicos da biodegradação de madeira

Dentre os organismos que decompõem a madeira, os principais são os fungos. Estes se classificam em fungos de podridão branca, que degradam todos os componentes da madeira e os fungos de podridão parda que degradam principalmente os polissacarídeos. Esses microorganismos pertencem à classe dos basidiomicetos, sendo que os ascomicetos e os fungos imperfeitos são classificados como fungos de podridão branca, que também são capazes de degradar lignina e polissacarídeos, porém em velocidades muito baixas comparados aos basidiomicetos (FENGEL; WEGENER, 1989).

Em termos microscópicos, observa-se que os fungos invadem a madeira através do lúmen das células. As hifas aí instaladas produzem uma grande diversidade de metabólitos extracelulares que então agem na degradação da parede celular vegetal. Desde o ponto de vista microscópico podem ser diferenciados dois modos principais de degradação da célula vegetal por fungos de podridão branca. O primeiro envolve uma “escamação” progressiva da parede celular no sentido lúmen-lamela média, levando a diminuição progressiva e irregular da espessura da parede celular. O outro modo de degradação envolve a remoção de lignina e polioses em estágios iniciais de colonização, sem causar a simultânea erosão da parede

celular vegetal, mantendo sua forma original (DANIEL, 2003). Este segundo modo de degradação da parede celular é característico de fungos de podridão branca seletivos, sendo os mais promissores para a biopolpação (AKHTAR *et al.*, 1998).

Os fungos degradam os componentes macromoleculares da parede celular vegetal a moléculas menores e solúveis, tornando-as susceptíveis ao metabolismo intracelular para obtenção de energia. A lignina é o componente mais resistente devido à sua estrutura e serve como uma barreira contra o ataque de microorganismos aos polissacarídeos (KIRK; CULLEN, 1998). Os distintos mecanismos de biodegradação dos componentes da madeira têm sido objetos de muitos estudos e um aspecto a ser considerado é o modo de ação das enzimas e de compostos de baixa massa molar extracelulares, principalmente radicais livres, produzidos pelos fungos sobre o complexo lignocelulósico, que serão comentados a seguir.

2.4.1 Enzimas atuantes na biodegradação de madeira

A biodegradação da celulose envolve várias enzimas que agem cooperativamente hidrolisando o polímero até glicose (Figura 4). As celulasas podem ser endocelulasas ou endo-1,4- β -glicanases, que rompem a molécula de celulose ao acaso gerando fragmentos menores (oligômeros); celobioidrolases ou exo-1,4- β -glicanases que hidrolisam pelas pontas redutoras e não redutoras os fragmentos de menor massa molar; e 1,4- β -glicosidases ou celobiasas que hidrolisam a celobiose a glicose (KIRK; CULLEN, 1998; KUHAD; SINGH; ERIKSSON, 1997).

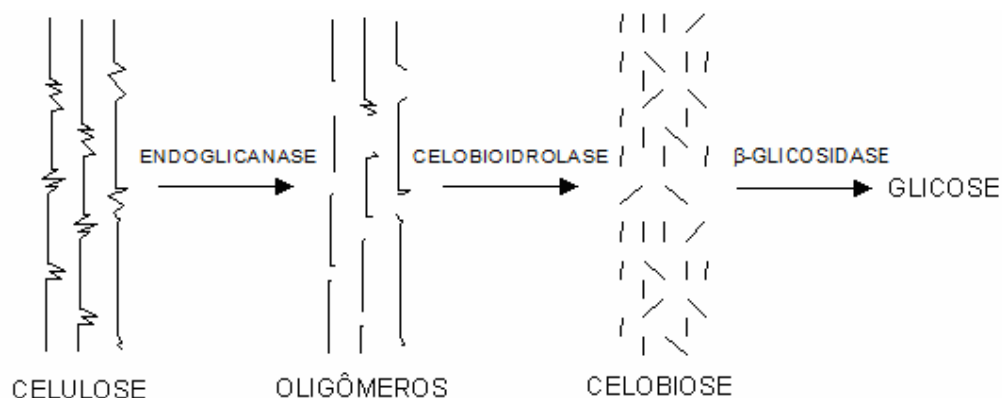


Figura 4. Modo de ação das enzimas hidrolíticas sobre a celulose. No modelo apresentado, as linhas longas representam a parte cristalina da celulose, enquanto as linhas em zig-zag representam a celulose amorfa.

Outra enzima pertencente ao complexo celulolítico tem atividade oxidativa e não hidrolítica. A celobiose-desidrogenase (CDH) oxida vários açúcares como a celobiose, oligômeros de glicose, lactose e até mesmo a celulose. Como aceptores de elétrons, essa

enzima reduz quinonas, citocromos, radicais orgânicos, O₂ molecular, íons Fe³⁺ e Cu²⁺. Ao reduzir Fe³⁺ a Fe²⁺, a CDH pode gerar radicais hidroxila via reação de Fenton (Fe²⁺ + H₂O₂ + H⁺ → Fe³⁺ + H₂O + HO•), que podem atuar na despolimerização de polissacarídeos e modificação estrutural da lignina. O H₂O₂ pode ser gerado pela redução de O₂ por meio da própria CDH ou por outras enzimas oxidativas (HAMMEL *et al.*, 2002; HENRIKSSON; JOHANSSON; PETTERSSON, 2000; KUHAD; SINGH; ERIKSSON, 1997; LI, 2003).

A biodegradação de polioses envolve a ação de enzimas frequentemente classificadas de acordo com os distintos substratos. As xilanases rompem ligações entre unidades monoméricas de xilose, enquanto as mananases e galactanases atuam sobre ligações entre moléculas de manose e galactose, respectivamente. A β-xilosidase e a β-manosidase hidrolisam dímeros de xilose e manose, respectivamente. Outras enzimas que também atuam na hidrólise de polioses são as α-glicuronidasas e acetil-esterases, rompendo ligações de ácidos urônicos e grupos acetila com moléculas de açúcares, respectivamente (KIRK; CULLEN, 1998; KUHAD; SINGH; ERIKSSON, 1997).

A biodegradação da lignina é realizada por um grupo de enzimas oxidativas que compreendem as peroxidases e lacases, além da cooperação de enzimas que produzem H₂O₂ (KIRK; CULLEN, 1998; KUHAD; SINGH; ERIKSSON, 1997; LI, 2003).

As peroxidases envolvidas na biodegradação da lignina são lignina-peroxidase (LiP) e manganês-peroxidase (MnP). Estas glicoproteínas contêm ferro protoporfirínico como grupo prostético, com capacidade de oxidar subestruturas da lignina na presença de H₂O₂ (MARTÍNEZ, 2002).

As LiPs apresentam potencial de oxidação suficientemente elevado para abstrair elétrons de estruturas aromáticas não fenólicas como o álcool veratrílico (álcool 3,4-dimetoxi-benzílico), dando origem a radicais cátion. As MnPs são dependentes de Mn²⁺ e apresentam potencial de oxidação suficiente somente para abstrair elétrons de estruturas fenólicas. A Figura 5 mostra os ciclos catalíticos dessas duas peroxidases. Nos dois casos, as enzimas são ativadas pela oxidação por H₂O₂, levando a formação do composto intermediário I (C_I) que é um oxo-complexo deficiente em 2 elétrons. A redução do C_I até a enzima nativa pode dar-se por doadores de elétrons como a lignina, 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 C₀ pode ocorrer através da oxidação de substratos não fenólicos levando a formação de radicais cátion (Figura 5A). Ambas peroxidases podem ser inativadas pela presença de peróxido em excesso (HOFRICHTER, 2002; KUHAD; SINGH; ERIKSSON, 1997).

As MnPs dependem exclusivamente de Mn²⁺ para a redução de C_{II} a C₀ (Figura 5B). C_I pode ser reduzido a C_{II} as custas da oxidação direta de uma estrutura fenólica ou de um íon Mn²⁺. A oxidação de Mn²⁺ por MnP e a subsequente oxidação de substratos secundários

necessita da presença de ácidos dicarboxílicos ou α -hidroxicarboxílicos que atuam como quelantes de Mn^{2+} e Mn^{3+} (HOFRICHTER, 2002; KIRK; CULLEN, 1998; URZÚA; KERSTEN; VICUÑA, 1998). Alguns fungos ligninolíticos excretam o ácido oxálico, um forte quelante que remove e estabiliza Mn^{3+} do sítio ativo da enzima, permitindo que ela atue novamente (AGUIAR; SOUZA-CRUZ; FERRAZ, 2006; HOFRICHTER, 2002; KISHI *et al.*, 1994; URZÚA; KERSTEN; VICUÑA, 1998). O complexo Mn^{3+} -quelante gerado pode ser reduzido às custas da oxidação de outra estrutura fenólica (HOFRICHTER, 2002).

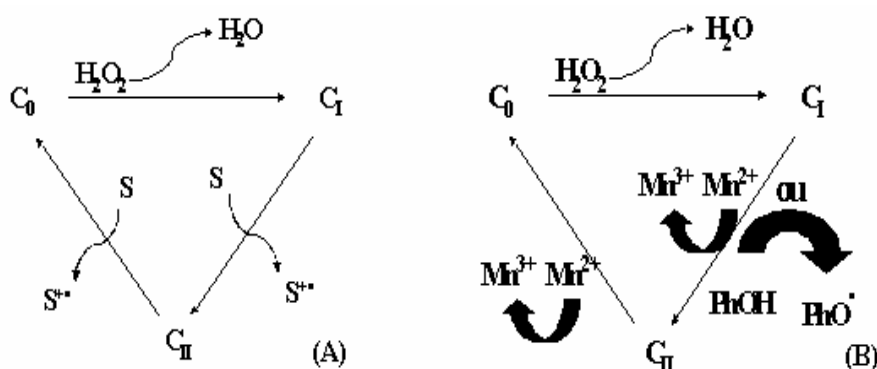


Figura 5. Ciclos catalíticos simplificados de LiP (A) e MnP (B); S e PhOH representam estruturas aromáticas não fenólica e fenólica, respectivamente.

Recentemente tem sido detectada a produção de peroxidases versáteis (VP) por alguns fungos de podridão branca do gênero *Bjerkandera* e *Pleurotus*, que oxidam ambos substratos da MnP (fenóis, Mn^{2+}) e da LiP (álcool veratrílico) sem a participação de mediadores (HOFRICHTER, 2002; MARTÍNEZ, 2002).

As lacases atuam pela abstração de um elétron de estruturas fenólicas, mediada pela redução de Cu^{2+} a Cu^{1+} presente no seu sítio ativo, que por sua vez, reduz O_2 a H_2O , permitindo que a enzima atue de forma cíclica (Figura 6).

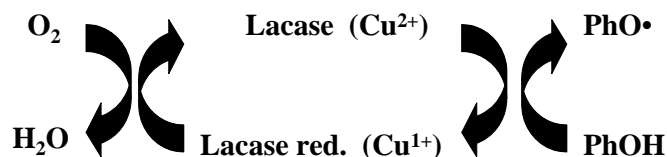


Figura 6. Ciclo catalítico de lacase; PhOH representa uma estrutura fenólica.

Em termos gerais, as enzimas do complexo ligninolítico podem ser ordenadas segundo seus potenciais de oxidação: LiP > MnP > lacase (KIRK; CULLEN, 1998; LI, 2003). Estas enzimas são comumente produzidas por fungos de podridão branca, no entanto, existem algumas espécies que são eficientes na degradação de lignina que produzem

somente uma, duas ou as três enzimas simultaneamente (KUHAD; SINGH; ERIKSSON, 1997; LI, 2003).

As enzimas que produzem H_2O_2 agem acessoriamente às peroxidases. Destas enzimas, as principais envolvidas na biodegradação de lignina são as que utilizam glicose (glicose-oxidase), glioxal (glioxal-oxidase) e metanol (metanol-oxidase) como substratos (KIRK; CULLEN, 1998; KUHAD; SINGH; ERIKSSON, 1997). Urzúa, Kersten e Vicuña (1998) demonstraram que a MnP de *C. subvermispota* produz H_2O_2 através da oxidação dos ácidos oxálico e glioxílico produzidos pelo próprio fungo. Schlosser e Höfer (2002) também observaram formação de H_2O_2 através da oxidação dos ácidos oxálico e malônico por Mn^{3+} , oriundo da oxidação de Mn^{2+} por lacase do fungo *Stropharia rugosoannulata*.

2.4.2 Compostos de baixa massa molar

Durante os estágios iniciais de colonização da madeira por fungos de podridão branca, pequenas quantidades de lignina são removidas, porém ocorrem alterações substanciais dentro da parede celular. Mudanças nas características e porosidade da parede celular aparecem nos estágios iniciais do processo de colonização, embora não ocorram grandes perdas de massa seca da madeira, nem erosões (AKHTAR *et al.*, 1998; BLANCHETTE *et al.*, 1997).

Alguns estudos demonstraram que enzimas são demasiadamente grandes para penetrar na parede celular de madeiras intactas e/ou em tempos curtos de biodegradação. Esses estudos mostraram que durante a biodegradação de *Pinus taeda* por *C. subvermispota*, as células vão se tornando gradual e lentamente permeáveis às enzimas (BLANCHETTE *et al.*, 1997).

Existem teorias sugerindo que os iniciadores do processo de degradação da parede celular seriam pequenas moléculas que poderiam difundir-se facilmente desde a hifa e penetrar nos poros da matriz lignocelulósica. Esses compostos de baixa massa molar provocariam, nos estágios iniciais de degradação, a desorganização da estrutura da parede celular, abrindo novos poros ou aumentando o tamanho dos poros já existentes (GOODELL *et al.*, 1997).

O modo de ação desses agentes de baixa massa molar até agora identificados consiste em atuar diretamente sobre a parede celular vegetal ou mediar as enzimas oxidativas na degradação de lignina, enquanto a degradação de polissacarídeos por enzimas hidrolíticas não tem a participação de mediadores. A seguir são descritos os principais mecanismos até agora identificados.

- Álcool veratrílico e LiP

O álcool veratrílico é um metabólito do fungo de podridão branca *Phanerochaete chrysosporium* e ao ser oxidado pela LiP é supostamente convertido em um radical cátion com alto potencial de oxidação. Embora o tempo de vida desse radical seja bastante curto para penetrar na parede celular vegetal, a degradação e a mineralização *in vitro* de lignina por LiP foi estimulada na presença desse mediador (LI, 2003). O fungo de podridão branca *Trametes versicolor* produz o composto aromático 2-cloro-1,4-dimetoxi-benzeno, que também pode servir como mediador da LiP (TEUNISSEN; FIELD, 1998).

- Ácido oxálico e MnP

O ácido oxálico é produzido por vários fungos de podridão branca e parda e serve como um quelante de Mn^{3+} gerado no ciclo catalítico da MnP. O Mn^{3+} quelado é então transportado através da parede celular vegetal degradando as porções fenólicas da lignina. Outros ácidos orgânicos (málico, malônico, fumárico, succínico) também têm sido encontrados em culturas de fungos de podridão branca, mas apenas o ácido oxálico é produzido em concentrações fisiológicas suficientes para quelar o Mn^{3+} (AGUIAR; SOUZA-CRUZ; FERRAZ, 2006; HOFRICHTER, 2002; KISHI *et al.*, 1994).

Além de atuar como um mediador natural de MnP, ao ser oxidado por Mn^{3+} o ácido oxálico é convertido em CO_2 e um radical $CO_2^{\bullet-}$ (ou $HCO_2^{\bullet-}$) que pode reduzir O_2 , gerando superoxiânion ($O_2^{\bullet-}$) (HOFRICHTER, 2002; KHINDARIA; GROVER; AUST, 1994; URZÚA; KERSTEN; VICUÑA, 1998). Os dois radicais em questão podem iniciar reações de degradação da lignina. Khindaria, Grover e Aust (1994) demonstraram que esses radicais também apresentam atividade redutora de Fe^{3+} , o que poderia favorecer a reação de Fenton.

- Lacase e ácido 3-hidroxi-antranílico

A lacase também pode degradar porções não fenólicas de lignina por meio da oxidação de um mediador, formando radicais que possuem potencial de oxidação mais elevado que o da própria enzima (BOURBONNAIS; LEECH; PAICE, 1998; LI, 2003). Eggert *et al.* (1996) mostraram que o fungo de podridão branca *Pycnoporus cinnabarinus* produz um suposto mediador natural, o ácido 3-hidroxi-antranílico. Esse ácido é oxidado pela lacase com a formação de um radical capaz de degradar porções não fenólicas da lignina. Entretanto, Li *et al.* (2001) demonstraram que o mutante de *P. cinnabarinus* deficiente na produção desse metabólito degradou eficientemente lignina, mostrando que esse fungo pode ter usado outro mecanismo de degradação ou ter produzido outro mediador. Muitos mediadores sintéticos como o ABTS (ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolína-6)-sulfônico) e o

HBT (hidroxi-benzo-triazol) tem proporcionado resultados satisfatórios no branqueamento de polpas com lacase (LI, 2003). Recentemente, Camarero *et al.* (2007) mostraram que compostos modelo de lignina foram eficientes mediadores de lacase na degradação de corantes recalitrantes e no branqueamento de polpas kraft. Dessa forma, produtos de degradação da lignina e extrativos solúveis de baixa massa molar, encontrados normalmente na madeira, poderiam atuar como mediadores naturais de lacase no início da degradação da parede celular vegetal por fungos de podridão branca.

- Sistema Fenton

O ferro é um elemento essencial para os fungos de podridão branca, pois faz parte do sítio ativo das peroxidases (HOFRICHTER, 2002; MARTÍNEZ, 2002) e é utilizado por fungos de podridão parda na geração de radicais hidroxila pela reação de Fenton (AGUIAR *et al.*, 2007; GOODELL *et al.*, 1997; HAMMEL *et al.*, 2002). Na madeira, a quantidade de ferro presente é suficiente para gerar esses radicais, os quais são propostos como os principais oxidantes de baixa massa molar que atuam na degradação de materiais lignocelulósicos, principalmente os polissacarídeos, por fungos de podridão parda (GOODELL *et al.*, 1997; HAMMEL *et al.*, 2002; KEREM; JENSEN; HAMMEL, 1999).

Como o ferro é encontrado predominantemente na madeira em sua forma oxidada (Fe^{3+}), a produção de agentes quelantes para solubilizá-lo e reduzi-lo é de extrema importância, como o ácido oxálico. No entanto, esse quelante necessita de luz para reduzir Fe^{3+} (GOODELL *et al.*, 1997; SHIMADA *et al.*, 1997). Alguns fungos e também bactérias produzem outros compostos de baixa massa molar quelantes de íons metálicos chamados de sideróforos (NEILANDS, 1995).

Goodell *et al.* (1997) mostraram que um extrato de baixa massa molar (menor que 1 kg/mol) de um cultivo do fungo *Gloeophyllum trabeum* possuía compostos do tipo catecol com atividade redutora de Fe^{3+} . Esses compostos exibiram atividade pró-oxidante, devido à maior formação de radicais OH entre o metal e H_2O_2 . Esses estudos permitiram concluir que esse fungo utiliza um ciclo extracelular de oxi-redução de quinonas para gerar os dois reagentes de Fenton (Figura 7). Dois anos depois, foram identificados dois agentes redutores em cultivos desse mesmo fungo: 2,5-dimetoxi-hidroquinona e 4,5-dimetoxi-catecol e suas respectivas formas oxidadas (KEREM; JENSEN; HAMMEL, 1999; PASZCZYNSKI *et al.*, 1999). Na presença de micélio fúngico, 2,5-dimetóxi-benzoquinona foi capaz de reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} . Esse resultado foi atribuído à ação de uma enzima (quinona-redutase) presente no micélio que catalisou a conversão de quinonas em suas respectivas formas reduzidas (JENSEN *et al.*, 2002). Também nesses estudos (KEREM; JENSEN; HAMMEL, 1999) foi observada a formação de H_2O_2 a partir da reação entre 2,5-dimetoxi-hidroquinona e Fe^{3+}

formando um radical semiquinona que utiliza O_2 (ou Fe^{+3}) como aceptor de elétrons, gerando uma benzoquinona e H_2O_2 (Figura 7).

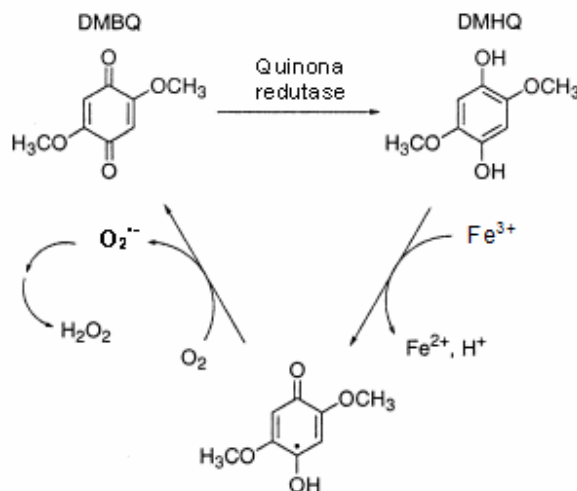


Figura 7. Mecanismo proposto para redução extracelular de Fe^{3+} e produção de H_2O_2 pelo fungo *G. trabeum*.
Fonte: Kerem, Jensen e Hammel (1999).

Alguns compostos com atividade redutora de íons Fe^{3+} são encontrados naturalmente na madeira (extrativos) ou produzidos durante sua biodegradação (principalmente produtos derivados da lignina) (AGUIAR; SOUZA-CRUZ; FERRAZ, 2006; FERRAZ *et al.*, 2001; GOODELL *et al.*, 2006). Recentemente, Aguiar e Ferraz (2007) avaliaram a atividade redutora de Fe^{3+} e Cu^{2+} promovida por vários compostos fenólicos com estruturas semelhantes aos extrativos e produtos de degradação da lignina. O íon Cu^{2+} ao ser reduzido também decompõe H_2O_2 a radical hidroxila (AGUIAR *et al.*, 2007). Esses compostos poderiam promover a reação de Fenton mesmo em cultivos de fungos causadores de podridão branca, pois se acreditava até então que a reação de Fenton seria um mecanismo de degradação da madeira realizado apenas por fungos de podridão parda.

Além da CDH e de compostos fenólicos, a redução de Fe^{3+} durante a biodegradação de madeira pode ser causada por glicopeptídeos. Enoki A., Tanaka e Itakura (2003) revisaram a produção de glicopeptídeos de baixa massa molar ligados ao íon Fe^{2+} por fungos de podridão branca, parda e branda. Supõe-se que esses compostos realizam reações de oxi-redução entre O_2 e um doador de elétrons, como o NADH (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzido), gerando radicais hidroxila via reação de Fenton.

- Peroxidação de lipídeos pela MnP

Lipídeos são encontrados na fração de extrativos da madeira (FENGEL; WEGENER, 1989), mas podem também ser produzidos durante sua biodegradação (ENOKI M. *et al.*,

1999; 2002; GUTIÉRREZ, *et al.*, 2002). Os lipídeos poliinsaturados possuem grupos CH₂ alílicos que podem ser facilmente atacados por agentes oxidantes, como Mn³⁺ e principalmente as espécies ativas de oxigênio, que incluem os radicais hidroxila, superóxido e hidroperoxila (HO₂•), o qual resulta da protonação do radical superóxido em valores de pH abaixo de 4,7. Vários metais de transição também podem ser reduzidos à custa da oxidação de lipídeos poliinsaturados. A oxidação do grupo CH₂ alílico gera um radical centrado no carbono que rapidamente reage com oxigênio originando um radical organo-peroxila em uma estrutura de dieno conjugado (Figura 8). Este radical pode oxidar um novo grupo CH₂ alílico propagando a reação de peroxidação ou abstrair um Hidrogênio de algum doador, gerando um hidroperoxido lipídico (que ainda é instável e irá se decompor) ou ainda dar origem a reações de terminação que envolvam o acoplamento de radicais (SOUTHORN; POWIS, 1988). Como os hidroperoxídeos lipídicos formados não são estáveis, um número variado de aldeídos se forma, sendo os principais o malondialdeído, o pentanal, o hexanal e o glicoxal (WATANABE *et al.*, 2001). Esses aldeídos apresentam uma reação característica com o ácido tiobarbitúrico com absorção máxima na região de 532 nm, diagnosticando a ocorrência de reações de peroxidação de lipídeos por meio da formação de TBARS (substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico; MASAPHY; HENIS; LEVANON, 1996).

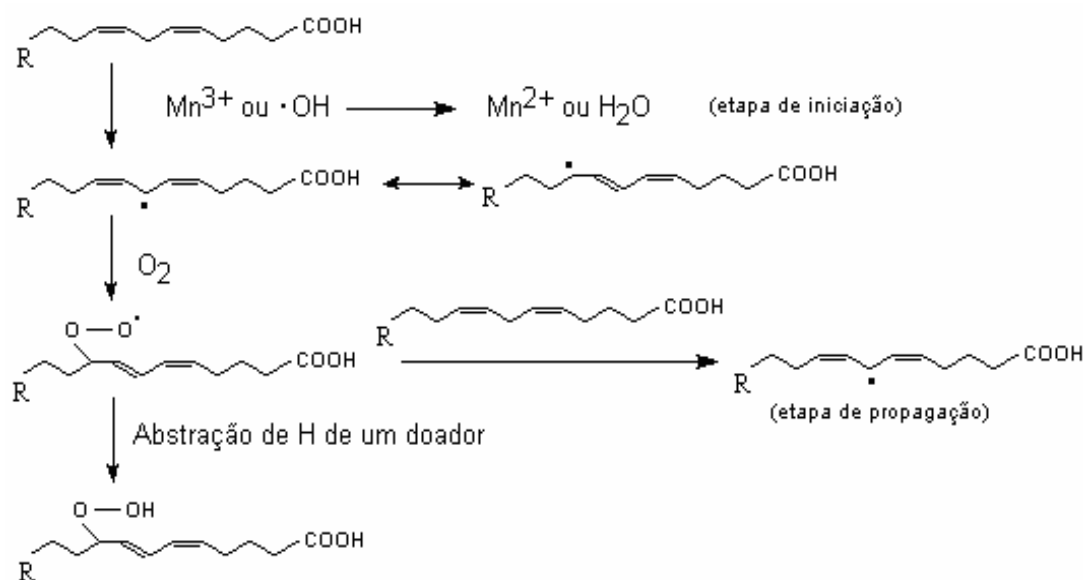


Figura 8. Peroxidação de lipídeos insaturados iniciada por Mn³⁺ ou •OH (reproduzido com modificações).
Fonte: Southorn e Powis (1988).

Os radicais livres gerados na peroxidação de ácidos graxos insaturados por Mn³⁺, principalmente o radical peroxila, possuem potencial de oxidação elevado o suficiente para

degradar porções não fenólicas da lignina. Esse mecanismo tem sido proposto como forma de explicar a degradação eficiente de lignina por fungos de podridão branca que não produzem LiP, como é o caso de *C. subvermispora* (HAMMEL *et al.*, 2002; HOFRICHTER, 2002; JENSEN *et al.*, 1996; KAPICH; JENSEN; HAMMEL, 1999; SREBOTNIK *et al.*, 1997).

- Peroxidação de lipídeos por lacase

Com relação à peroxidação de lipídeos por lacase, Zhang *et al.* (2002) verificaram a degradação do lipídeo trilinoleína, enquanto Srebotnik e Boisson (2005) observaram que a degradação de ácido linoléico por lacase é dependente de mediadores fenólicos (ácido *p*-hidroxi-benzóico ou uma preparação de lignina fenólica). Esses fenóis foram oxidados e o radical fenoxi gerado foi o responsável pela peroxidação do ácido graxo. A adição de Mn^{2+} no sistema estimulou a peroxidação, pois o radical fenoxi gerado pela lacase oxidou Mn^{2+} a Mn^{3+} , que também peroxidou o ácido graxo. Cunha (2008) também observou a peroxidação de ácido linoléico por lacase de *C. subvermispora* na presença de um mediador fenólico (ácido *p*-hidroxi-benzóico). Embora esses trabalhos tenham mostrado a peroxidação de lipídeos por lacase, até o momento não tem sido descrita a degradação de porções não fenólicas de lignina por esse sistema oxidativo.

- Ácido oxálico

O ácido oxálico desempenha funções importantes na biodegradação de madeira por fungos de podridão parda e de podridão branca. Além de atuar como quelante de íons Mn^{n+} e Fe^{n+} , o ácido oxálico por si só atua diretamente na parede celular vegetal (SHIMADA *et al.*, 1997). Esse quelante seqüestra cálcio da parede celular, o que poderia provocar o aumento de sua porosidade e a desestruturação entre microfibrilas (MEYER-PINSON *et al.*, 2004). A presença de cristais de oxalato de cálcio em madeiras biodegradadas confirma esse fato (AGUIAR; SOUZA-CRUZ; FERRAZ, 2006; AKHTAR *et al.*, 1998; VICENTIM, 2007). A formação de oxalato de cálcio também é considerada uma forma de proteção do fungo quanto à toxicidade do ácido oxálico em excesso (JELLISON *et al.*, 1997). No entanto, essa precipitação poderia interferir na disponibilidade desse quelante livre para complexar os íons Mn^{3+} gerados pela MnP por fungos de podridão branca.

O tratamento de madeira com ácido oxálico pode causar remoção de açúcares provenientes de polioses como xilose e arabinose por hidrólise ácida desde que as concentrações e/ou temperaturas sejam elevadas (KENEALY *et al.*, 2007; MEYER-PINSON *et al.*, 2004). Recentemente, Hunt *et al.* (2004) verificaram que esse quelante sofre esterificação nos polissacarídeos da madeira durante sua biodegradação, causando um aumento do ponto de saturação das fibras e conseqüentemente proporcionou maior

facilidade de desfibramento da madeira por um refinador mecânico, além de ter proporcionado a obtenção de polpas com melhores propriedades mecânicas.

Lequart *et al.* (1998) demonstraram que o ácido oxálico pode atuar na redução de MnO_2 presente na madeira em Mn^{2+} , Mn^{3+} e outras espécies oxidantes que foram responsáveis na quebra de ligações β -O-4 em lignina de palha de trigo.

2.5 *Ceriporiopsis subvermispora*

Ceriporiopsis Dom. é um gênero poróide de fungo causador de podridão branca que pertence à família *Polyporaceae* (BURDSALL Jr., 1998). Esse fungo é conhecido por sua grande seletividade na degradação de lignina, seja em madeiras duras ou em madeiras moles (AKHTAR *et al.*, 1998; FERRAZ *et al.*, 2008).

Apesar da importância de *C. subvermispora* na aplicação industrial, o sistema extracelular que esse organismo utiliza para decompor a madeira necessita esclarecimentos. Especialmente na última década, muitos estudos avaliaram os sistemas enzimáticos produzidos por essa espécie, quer em cultivos em meio líquido ou agindo diretamente sobre madeira. Atualmente está claro que as enzimas extracelulares produzidas por esse fungo compreendem as lacases, MnP, xilanases, mananases e do complexo celololítico as endoglicanases e β -glicosidases, enquanto as celobiohidrolases são produzidas em pequenas quantidades (FERRAZ; CÓRDOVA; MACHUCA, 2003; FERRAZ *et al.*, 2008; GUERRA; MENDONÇA; FERRAZ, 2003; HEIDORNE *et al.*, 2006; LOBOS *et al.*, 1994; RÜTTIMANN-JOHNSON *et al.*, 1993; SETHURAMAN; AKIN; ERIKSSON, 1998; SOUZA-CRUZ *et al.*, 2004). A atividade de LiP não tem sido detectada a partir de diversos meios e formas de cultivo desse fungo (ENOKI M. *et al.*, 1999; JENSEN *et al.*, 1996; LOBOS *et al.*, 1994; RÜTTIMANN-JOHNSON *et al.*, 1993; SOUZA-CRUZ *et al.*, 2004). Cópias dos genes *lip* foram identificadas no seu genoma, porém a expressão desses genes também não foi comprovada em nenhuma condição de cultivo testada (RAJAKUMAR *et al.*, 1996). A detecção de lacases durante o biotratamento de materiais lignocelulósicos foi estabelecida somente na presença de co-substratos de fácil assimilação (glicose, milhocina) e/ou em curtos tempos de cultivo (CUNHA, 2008; ENOKI M. *et al.*, 1999; FERRAZ; CÓRDOVA; MACHUCA, 2003; MASARIN, 2006; VICENTIM, 2007; VICUÑA *et al.*, 1996). Com isso, a degradação de lignina por esse fungo deveria, a princípio, ser atribuída exclusivamente à ação de MnP. Outro dado importante no modo de ação desse organismo é o fato que a degradação de lignina ocorre notoriamente em pontos distantes da hifa fúngica, ou seja, o modelo erosivo de degradação da parede celular vegetal não se aplica. De fato, Blanchette *et al.* (1997) mostraram que a lignina da lamela média sofreu alterações estruturais por esse fungo (reveladas por microscopia acoplada a espectroscopia UV) mesmo quando proteínas

de somente 5,73 kg/mol ainda não penetraram a parede celular vegetal. Esse conjunto de dados tem levado a busca de um modelo bioquímico que permita explicar a ação de MnP como principal agente de degradação da lignina, mas mediada pela ação de alguns compostos de baixa massa molar.

Apesar de não produzir LiP, o mecanismo químico envolvido na degradação de lignina por esse fungo consiste na abstração de um elétron de estruturas não fenólicas por uma espécie ativa com elevado potencial de oxidação. A hipótese mais provável para a degradação de lignina estaria relacionada com a peroxidação de lipídeos iniciada por Mn^{3+} oriundo da ação de MnP (HAMMEL *et al.*, 2002; HOFRICHTER, 2002; JENSEN *et al.*, 1996; KAPICH; JENSEN; HAMMEL, 1999; SREBOTNIK *et al.*, 1997).

Enoki M. *et al.* (1999) demonstraram que *C. subvermispora* produziu alguns ácidos graxos principalmente nos estágios iniciais de biodegradação de madeira moída livre de extrativos. Após duas semanas de cultivo, o teor de ácidos graxos diminuiu consideravelmente seguido do aparecimento de hidroperóxidos orgânicos e TBARS. Esses dados levaram os autores a relacionar a formação dos hidroperóxidos e TBARS com a ação de Mn^{3+} (proveniente da oxidação de Mn^{2+} por MnP) sobre os ácidos graxos, principalmente o ácido linoléico.

Esses hidroperóxidos podem dar origem a diversos radicais que podem atuar na degradação de estruturas não-fenólicas de lignina. Kapich, Jensen e Hammel (1999) e Watanabe *et al.* (2000) demonstraram que principalmente ocorre a formação dos radicais peroxila e acila por ação de MnP sobre o ácido linoléico. Para demonstrar a participação de radicais livres produzidos em culturas de *C. subvermispora*, Hammel *et al.* (2002) verificaram nos cultivos desse fungo sobre madeira a mineralização de poli-etileno-glicol (utilizado como um co-substrato). Como esse polímero não é degradado enzimaticamente, acreditou-se que os agentes responsáveis por sua degradação seriam radicais livres, como $\bullet OH$ e principalmente $RO_2\bullet$.

Enquanto os ácidos graxos mais comuns, como o ácido linoléico, são importantes na degradação de porções não-fenólicas de lignina por *C. subvermispora*, outros ácidos de cadeia longa recentemente identificados são considerados inibidores na degradação de polissacarídeos por esse fungo. Gutiérrez *et al.* (2002) ao analisarem os cultivos de 4 espécies de basidiomicetos cultivados sobre *Eucalyptus globulus*, detectaram uma nova classe de lipídeos dicarboxílicos de cadeia longa, sendo alguns deles insaturados, os quais acumularam-se principalmente nas amostras colonizadas por *C. subvermispora* (240 mg/kg de madeira). Com o avanço do biotratamento, os ésteres presentes originalmente na madeira foram hidrolisados, aumentando o teor 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 alqu(en)il-itacônicos, principalmente os ácidos tetradecil, *cis*-7-hexadecenil e hexadecil-itacônico (Figura 9).

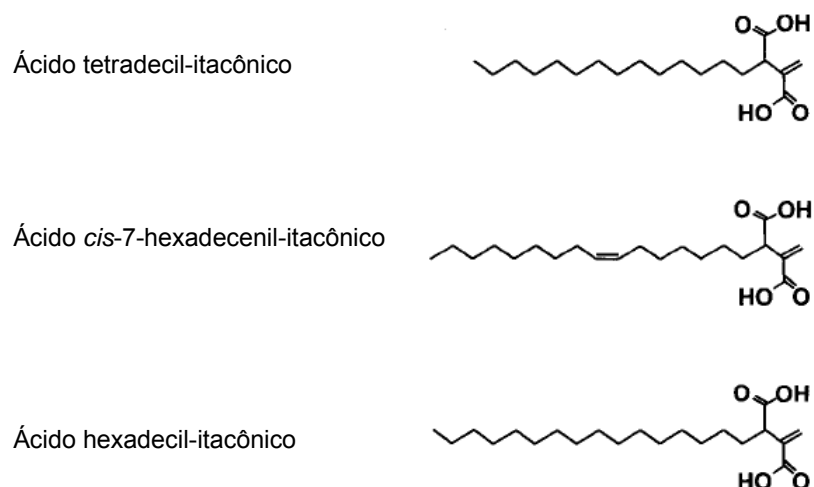


Figura 9. Estrutura química de ácidos alqu(en)il-itacônicos produzidos por *C. subvermispota*.

Esses ácidos alqu(en)il-itacônicos também foram produzidos a partir de madeira livre de extrativos biodegradada por *C. subvermispota*. Sugeriu-se que a produção desses novos ácidos graxos não é usada como uma fonte de radicais livres, mas como agentes repressores da reação de Fenton, interagindo diretamente com íons Fe^{2+} e Fe^{3+} (AMIRTA *et al.*, 2003; ENOKI M. *et al.*, 2002). A despolimerização de holocelulose foi inibida por reagentes Fenton na presença do ácido hexadecil-itacônico (RAHMAWATI *et al.*, 2005).

Vários trabalhos publicados por nosso próprio grupo de pesquisa têm estudado, além do metabolismo, as alterações químicas e físicas de madeira biodegradada por *C. subvermispota*, principalmente com relação à degradação de lignina. Além de avaliar sua mineralização, determinada pela perda de massa, outras técnicas analíticas têm mostrado que a lignina de madeira biodegradada sofre diminuição de massa molar média e despolimerização, determinada pela redução de ligações β -O-4 (GUERRA *et al.*, 2004; GUERRA; MENDONÇA; FERRAZ, 2002; VICENTIM, 2007). Outras ligações importantes como β - β , β -5, β -1, 4-O-5 apresentaram maior resistência ao ataque fúngico, sendo somente degradadas após 90 dias de cultivo (GUERRA *et al.*, 2004). Com relação aos polissacarídeos, apesar das perdas de massa serem mínimas, preparações de α -celulose provenientes de madeiras biodegradadas apresentaram reduções de rendimento e no grau de polimerização a partir de 30 dias de cultivo (GUERRA; MENDONÇA; FERRAZ, 2003).

2.6 Considerações finais sobre a revisão bibliográfica e embasamento experimental da tese

Devido à importância dos ácidos graxos na biodegradação de madeira por *C. subvermispora*, a primeira abordagem desse trabalho consistiu em avaliar a biodegradação de cavacos de *P. taeda in natura* e extraídos com etanol. A extração dos cavacos com esse solvente teve a intenção de remover os extrativos presentes na madeira, principalmente ácidos graxos insaturados que poderiam servir para estimular a deslignificação de madeira por meio da peroxidação de lipídeos. Um outro propósito de se extrair os cavacos com solvente seria a eliminação de extrativos fenólicos que apresentam atividade redutora de Fe^{3+} , propriedade essa de grande relevância nos estágios iniciais de biodegradação da madeira. Para esse estudo também foi avaliada a ação direta do fungo sobre fibras de celulose livres de lignina (holocelulose), a fim de verificar se *C. subvermispora* causaria a despolimerização de polissacarídeos, mesmo sem gerar perda expressiva de massa dessa classe de componentes da madeira.

Em vista dos resultados de biodegradação de madeira e holocelulose por esse fungo, outros dois fungos de comportamentos de colonização e degradação distintos, *G. trabeum* (fungo de podridão parda) e *T. versicolor* (fungo de podridão branca não-seletivo), também foram cultivados sobre esses substratos por 4 semanas e comparados com *C. subvermispora*.

Devido a importância de ácido oxálico no ciclo catalítico da MnP, uma terceira abordagem desse estudo consistiu em avaliar os efeitos da adição de cálcio exógeno durante a biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispora*. Esse metal forma cristais insolúveis de ácido oxálico, indisponibilizando-o. Ainda nessa abordagem, foi verificado também o efeito de ácido oxálico exógeno em uma outra batelada de cultivos (sem adição de cálcio). Em um terceiro ciclo de experimentos, óleo de soja foi adicionado nos cultivos desse fungo com o intuito de estimular as reações de peroxidação de lipídeos.

Finalmente, ensaios de biodegradação de 2 kg de cavacos de *P. taeda* com os aditivos (cálcio, ácido oxálico ou óleo de soja) foram realizados em biorreatores com o fungo *C. subvermispora* com o propósito de se obter massa de cavacos suficiente para ensaios de polpação quimiotermodinâmica sulfito alcalino. Para esses ensaios, foram avaliados os possíveis benefícios do pré-tratamento biológico quanto à economia de energia nas etapas de refino e às propriedades mecânicas das polpas assim obtidas.

3 Objetivos

Este trabalho tem como objetivo avaliar a importância de compostos de baixa massa molar (extrativos, compostos fenólicos redutores de Fe^{3+} , ácido oxálico e lipídeos) nos estágios iniciais da biodegradação de madeira pelo fungo de podridão branca *C. subvermispora*.

Para atingir esse objetivo foram realizadas as seguintes etapas:

- Estudo da biodegradação de *P. taeda* (*in natura* e extraído com etanol) por *C. subvermispora* em cultivos contendo holocelulose como indicador de reações de despolimerização de polissacarídeos;
- Estudo comparativo da biodegradação de *P. taeda in natura* e holocelulose por um organismo representativo dos fungos de podridão parda (*G. trabeum*) e outro representativo dos fungos de podridão branca não seletivos para lignina (*T. versicolor*);
- Estudo da biodegradação de *P. taeda in natura* por *C. subvermispora* em cultivos contendo cálcio, ácido oxálico ou óleo de soja exógenos;
- Isolamento de ligninas provenientes da biodegradação de madeira por *C. subvermispora* e caracterização de derivados dessas ligninas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de fósforo (RMN- ^{31}P);
- Estudo da polpação quimiotermomecânica de *P. taeda* biotratado por *C. subvermispora* em cultivos contendo cálcio, ácido oxálico ou óleo de soja exógenos.

4 Materiais e métodos

4.1 Fungo e preparo de inóculo

O principal fungo utilizado nesses estudos foi o basidiomiceto causador de podridão branca *Ceriporiopsis subvermispora*, cepa L14807-SS3, gentilmente cedida pelo Prof. M. Akhtar (Biopulping International, INC, USA). A cepa foi periodicamente repicada e mantida em placas de Petri em meio contendo 2% de extrato de malte, 0,2% de extrato de levedura e 2% de ágar a $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Para a produção de inóculo, o fungo foi repicado em Erlenmeyers 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. O meio líquido foi esterilizado por autoclavagem a 121°C por 15 minutos e após o resfriamento foi inoculado com 20 discos de 8 mm de diâmetro provenientes de placas de Petri recém cultivadas. Após 13 dias de incubação estática em uma estufa a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, o micélio crescido em meio líquido foi filtrado, lavado com água esterilizada e macerado em 100 mL de água esterilizada, utilizando um liquidificador de alumínio para a maceração. Da suspensão obtida foi retirada uma alíquota que foi filtrada sobre papel de filtro Whatman N°1 previamente seco e pesado para a determinação da relação micélio seco/volume de suspensão.

4.2 Experimentos de biodegradação de madeira

A madeira utilizada nesses estudos foi *Pinus taeda* com aproximadamente 28 anos, obtida junto ao Parque Estadual de Campos do Jordão-SP. Os cavacos foram preparados manualmente (aproximadamente 2,5 x 1,8 x 0,2 cm), deixados secar ao ar e estocados em condições isentas de umidade. Para um determinado conjunto de cavacos, foi feita uma remoção de extrativos com etanol 95% por 8 h em um extrator Soxhlet. Para os experimentos de biodegradação, os cavacos de madeira *in natura* ou extraídos com etanol foram mantidos em água. Depois de 15 horas, o excesso de água foi drenado e os cavacos esterilizados a 121°C por 15 min. Em Erlenmeyers de 2 L, cerca de 45 g de cavacos de madeira esterilizados (base seca) foram inoculados com a suspensão de micélio (100 mg de micélio/kg de madeira) no interior de uma câmara asséptica de fluxo laminar. Os cultivos foram mantidos por 1, 2 e 4 semanas em uma sala termostatizada a $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Em alguns Erlenmeyers foram adicionados 6 cartões (aproximadamente 2,5 x 1,8 x 0,1 cm) de polpa kraft de *P. taeda* branqueada (holocelulose), pesando cerca de 5,5 g no total (base seca). Destes recipientes foram apenas aproveitados os cartões de holocelulose para caracterização, enquanto os cavacos foram descartados.

4.3 Extração e quantificação das enzimas

A extração das enzimas produzidas durante a biodegradação dos cavacos foi conduzida em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,5), adicionado de 0,01% de Tween 60 (SOUZA-CRUZ *et al.*, 2004). Foram adicionados aos cultivos 200 mL de solução para extração, sendo conduzida sob agitação (120 rpm) durante 5 h a $12 \pm 1^\circ$ C. Os caldos enzimáticos foram recuperados por duas filtrações sucessivas: por meio de filtro de vidro sinterizado N°3 e em seguida por membrana Millipore 0,45 μ m.

Dos caldos enzimáticos obtidos, foram determinadas as atividades enzimáticas relacionadas à degradação de celulose, polioses e lignina. Uma unidade de atividade foi definida como 1 μ mol de produto de reação produzido por min (Unidades Internacionais - UI). A atividade presente nos cultivos foi expressa em UI por quilograma de madeira inicial (base seca). As atividades foram medidas a partir de triplicatas de cultivos, e foram baseadas em métodos colorimétricos para os quais se utilizou um espectrofotômetro UV/Visível GBC-Cintra 20, conforme detalhado a seguir.

4.4 Determinação de atividades enzimáticas

- Manganês-peroxidase

As atividades de MnP foram medidas pela oxidação de vermelho de fenol. As reações foram conduzidas em tubos de 30 mL contendo 3 mL de tampão succinato de sódio 50 mM (pH 4,5), 3 mL de lactato de sódio 50 mM, 1 mL de MnSO_4 1 mM, 1 mL de vermelho de fenol 0,1% (m/v), 1 mL de caldo enzimático, 500 μ L de albumina 1% (m/v) e 500 μ L de H_2O_2 2 mM. Para o branco, substituiu-se o caldo enzimático por tampão de extração das enzimas. Em intervalos de 2 min, 2 mL dessa mistura reacional foram reagidos com 60 μ L de NaOH 6,5 M para interromper a reação e a absorbância foi monitorada em 610 nm ($\epsilon = 22000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; KUWAHARA *et al.*, 1984).

- Lacase

As atividades de lacase foram determinadas pela oxidação de ABTS. A reação foi acompanhada em cubeta de quartzo de 3 mL contendo 600 μ L de tampão citrato-fosfato de sódio 50 mM (pH 5,0), 200 μ L de água destilada, 200 μ L de ABTS 1 mM e 1 mL de caldo enzimático. Para o branco, substituiu-se o caldo enzimático por tampão de extração de enzimas. Para descontar a absorção dos extratos, foi feita uma reação na ausência de ABTS (controle). A cinética enzimática foi acompanhada em intervalos de 10 s a 5 min em 420 nm ($\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; BOURBONNAIS; LEECH; PAICE, 1998).

- Lignina-peroxidase

Para determinação de atividades de LiP, utilizou-se o corante Azure B como substrato. A reação foi conduzida em cubetas de quartzo de 3 mL contendo 1,25 mL de tampão succinato de sódio 50 mM (pH 4,5), 250 μ L de Azure B 320 μ M, 500 μ L de caldo enzimático e 500 μ L de H₂O₂ 2 mM. Para o branco, substituiu-se o corante por água destilada. A degradação ou não do corante foi monitorada durante 10 min a partir do decréscimo da absorção em 651 nm ($\epsilon = 48800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; ARCHIBALD, 1992).

- Celulases totais

As atividades de celulases totais foram determinadas pela hidrólise de papel de filtro Whatman N°1 (MANDELS; ANDREOTTI; ROCHE, 1976). A reação foi conduzida em tubos de ensaios de 10 mL contendo 1,2 mL de tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8), uma tira de papel de filtro Whatman N°1 com aproximadamente 50 mg e 300 μ L de caldo enzimático. A reação foi mantida em banho-maria à 50°C. Após 1 h, a reação foi interrompida pela adição de 3 mL de reagente DNS (ácido 3,5-dinitro-salicílico). A mistura reacional foi aquecida em banho-maria a 100°C por 5 min e depois de esfriar mediu-se a absorbância em 540 nm (MILLER, 1959). Para o branco, substituiu-se o caldo enzimático por tampão de extração enzimática e excluiu-se o papel de filtro. Para descontar o teor de açúcares redutores presentes no caldo e no substrato, um outro procedimento (controle) foi realizado adicionando inicialmente o reagente DNS ao substrato e em seguida o caldo enzimático. Glicose (seca em P₂O₅ a vácuo) foi utilizada para construção da curva de calibração.

O reagente DNS foi preparado por meio da dissolução de 10,6 g de ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS) e 19,8 g de NaOH em 1,4 L de água destilada. Em seguida, foram dissolvidos nessa solução 306 g de tartarato de sódio e potássio, 7,6 mL de fenol (levemente aquecido) e 8,3 g de NaHSO₃ (WOOD; BHAT, 1988).

- Endoglicanase

As atividades de endoglicanase foram determinadas pela hidrólise de carboximetilcelulose (CMC, WOOD; BHAT, 1988). A reação foi conduzida em tubos de ensaios de 10 mL contendo 900 μ L de CMC 0,44% (m/v) em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5) e 100 μ L de caldo enzimático. A reação foi mantida em banho-maria à 50°C. Após 1 h, 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 mediu-se a absorbância em 540 nm (MILLER, 1959). Para o branco, substituiu-se o caldo enzimático por tampão de extração enzimática e o tampão acetato de sódio não continha CMC. Para descontar o teor de açúcares redutores presentes no caldo e na solução contendo o

substrato (controle), foi feito um procedimento semelhante ao descrito na determinação de celulases totais. Glicose (seca em P₂O₅ a vácuo) foi utilizada para construção da curva de calibração.

- Celobioidrolase

As atividades de celobioidrolase foram determinadas utilizando uma suspensão de celulose Avicel (PH-101) 0,5% (m/v) em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5) como substrato (WOOD; BHAT, 1988). Para determinação dessas atividades, foi realizado um procedimento semelhante ao descrito para a endoglicanase, porém, o tempo de reação de hidrólise foi de 2 h.

- β -glicosidase

As atividades de β -glicosidase foram determinadas utilizando *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranisídeo (*p*-NFG) como substrato (WOOD; BHAT, 1988). As reações foram realizadas em tubos de ensaio de 10 mL contendo 800 μ L de *p*-NFG 0,1% (m/v) em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5) e 200 μ L de caldo enzimático. A reação foi mantida em banho-maria a 50°C. Após 30 min, 2 mL de NaHCO₃ 10% (m/v) foram adicionados para interromper a reação, e após esfriar a temperatura ambiente a absorbância foi lida em 410 nm ($\epsilon = 15000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; MONGKOLTHANARUK; DHARMSTHITI, 2002). Para o branco, substituiu-se o caldo enzimático por tampão de extração enzimática. Para descontar a coloração do extrato no comprimento de onda utilizado, este foi misturado com o tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5) sem *p*-NFG (controle).

- Celobiose-desidrogenase

Para determinação das atividades de CDH utilizou-se como substrato a lactose e o 2,6-diclorofenol-indofenol (DCFIF). Na presença de CDH, a lactose é oxidada simultaneamente à redução do DCFIF (BAMINGER *et al.*, 1999). A reação foi conduzida em cubetas de 3 mL contendo 1 mL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 4), 400 μ L de caldo enzimático, 200 μ L de NaF (inibidor de lacase) 40 mM, 200 μ L de lactose 300 mM e 200 μ L de DCFIF 3 mM. Para o branco, substituiu-se o DCFIF por água destilada. A redução de DCFIF foi monitorada a partir da diminuição da absorbância em 520 nm ($\epsilon=6800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; BAMINGER *et al.*, 1999).

- Xilanases totais

As atividades de xilanases foram determinadas 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 caldo 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 mediu-se a absorbância em 540 nm (MILLER, 1959). Para o branco, substituiu-se o caldo enzimático por tampão de extração enzimática e o tampão acetato de sódio não continha xilana. Para descontar o teor de açúcares redutores presentes no caldo e na solução contendo o substrato, fez-se o mesmo procedimento descrito para as celulasas totais. Xilose (seca em P_2O_5 a vácuo) foi utilizada para construção da curva de calibração.

- Galactanases totais

As atividades de galactanases foram determinadas utilizando goma arábica (arabinogalactana) 0,5% (m/v) como substrato em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,5). Para determinação dessas atividades, foi realizado um procedimento semelhante ao descrito para as xilanases, porém o tempo de reação de hidrólise foi de 1 h. Galactose (seca em P_2O_5 a vácuo) foi utilizada para construção da curva de calibração.

4.5 Determinação de H_2O_2 nos caldos enzimáticos

A presença de H_2O_2 nos caldos enzimáticos foi determinada em triplicata de culturas utilizando peroxidase vegetal (horseradish peroxidase - HRP) e vermelho de fenol (KEREM; JENSEN; HAMMEL, 1999). As reações foram conduzidas em cubetas de quartzo de 3 mL contendo 1,2 mL de tampão succinato de sódio 50 mM (pH 4,5), 400 μL de caldo enzimático, 200 μL de vermelho de fenol 0,1% (m/v) e 200 μL de HRP 0,1 g/L. A reação foi mantida por 5 min e depois paralisada com a adição de 30 μL de NaOH 6,5 M. A absorbância foi lida em 610 nm. H_2O_2 comercial teve sua concentração determinada em 230 nm ($\epsilon = 81 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) e foi usado para a construção da curva de calibração.

4.6 Extração dos cavacos biotratados com água e determinação de pH

O conteúdo de madeira biodegradada nos Erlenmeyers foi extraído com água bidestilada em KMnO_4 , com pH previamente ajustado em 7,0. A extração foi feita por imersão sob agitação a 120 rpm por 48 horas, seguida de duas filtrações sucessivas: por meio de filtro de vidro sinterizado N°3 e em seguida por membrana Millipore 0,45 μm . Este procedimento também foi feito para as madeiras não biotratadas. Os filtrados tiveram o pH determinado em um pHmetro Quimis Q-400A, previamente calibrado, e então foram borbulhados com nitrogênio por 15 min, sendo então estocados à -18°C. Além do pH, esses extratos foram utilizados para a determinação de catecóis totais, atividade redutora de íons

Fe³⁺ e determinação de ácido oxálico livre (solúvel).

4.7 Determinação de catecóis totais

Para determinação de compostos do tipo catecol, realizou-se o teste de Arnow (1937). Para 0,5 mL de extrato aquoso, foram adicionados na seguinte ordem 0,5 mL de HCl 0,5 M, 0,5 mL de molibdato de sódio 10% (m/v) e nitrito de sódio 10% (m/v) e 0,5 mL de NaOH 1 M. A reação foi realizada em duplicata e a absorbância da solução foi lida em 510 nm. A concentração de catecóis foi determinada através de uma curva de calibração preparada com o próprio catecol (1,2-benzenodiol).

4.8 Determinação de atividade redutora de íons Fe³⁺

A habilidade de alguns compostos presentes nos extratos aquosos em reduzir íons Fe³⁺ foi analisada em cubetas de quartzo de 1 mL contendo 330 µL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5), 375 µL de extrato aquoso e 25 µL de FeCl₃.6H₂O 8 mM recentemente preparado. Após 30 min, foram adicionados 70 µL de NaF 1% (m/v) para paralisar a reação e 200 µL de ferrozina 1% (m/v) para complexar os íons Fe²⁺ gerados ($\epsilon_{562\text{nm}}=27900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; STOOKEY, 1970). As reações foram realizadas em duplicata. Para o branco, os agentes complexantes e os extratos aquosos foram substituídos por água destilada. Um ensaio que serviu como um controle contendo FeCl₃ e ferrozina foi realizado para descontar a quantidade de íons Fe²⁺ formados durante o equilíbrio natural Fe²⁺/Fe³⁺ em água.

Para avaliar o efeito de ácido oxálico exógeno na atividade redutora de Fe³⁺ foram reagidos 275 µL de extrato aquoso proveniente de madeira *in natura* biodegradada por 4 semanas com 25 µL de FeCl₃ x 6H₂O 8 mM (recentemente preparado) na presença de 100 µL de solução contendo concentrações variadas de ácido oxálico e 330 µL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5). Após 30 min, foram adicionados 70 µL de NaF 1% (m/v) e 200 µL de ferrozina 1% (m/v).

4.9 Distribuição de massa molar dos extratos aquosos

A distribuição de massa molar dos extratos aquosos provenientes dos cultivos sobre madeira *in natura* e extraídos com etanol foi analisada em coluna de permeação em gel Sephadex G-25 (50 x 1,2 cm). A coluna foi eluída com fluxo de 0,4 mL de água destilada/min, injetando-se 2 mL de amostra. Os extratos provenientes de madeira não biodegradada também foram analisados. O volume morto e o volume de permeação total foram determinados pela injeção de dextrana azul e acetona, respectivamente. As frações eluídas foram monitoradas em 280 nm e avaliadas para atividade redutora de Fe³⁺ por meio da formação do complexo ferrozina-Fe²⁺ em 562 nm. Para o extrato controle de madeira *in*

natura foram analisados os açúcares totais nas frações pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). 2 mL de cada fração foi reagido com 50 µL de fenol 80% (m/v) e 5 mL de H₂SO₄ concentrado. A mistura reacional foi lida em 490 nm.

4.10 Determinação de ácido oxálico

O ácido oxálico presente nos extratos aquosos foi determinado de acordo com Aguiar, Souza-Cruz e Ferraz (2006), com algumas modificações. Cerca de 20 mL de extrato foram tratados com 200 mg de carvão ativo a 110 rpm e 25 °C por 2 h e em seguida, foram centrifugados a 4500 rpm, 10°C por 15 min (Centrifuga Jouan CR 4i). O sobrenadante foi filtrado em membrana 0,45 µm e injetado em um cromatógrafo de fase líquida Shimadzu CTO-6A, utilizando um detector UV/Visível Shimadzu SPD-10AV, fixado em 210 nm. As amostras foram injetadas numa coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories Ltda) acoplada a uma pré-coluna trocadora de cátions (Bio-Rad Laboratories Ltda). Foi usado H₂SO₄ 8 mM como fase móvel, a uma vazão de 0,6 mL/min e temperatura de 45°C. Foram injetados 20 µL de cada amostra. A curva de calibração foi preparada na presença de um extrato aquoso de *P. taeda* controle (não biotratado), pois os fenóis presentes nos extratos interferem na adsorção do ácido oxálico (VICENTIM, 2007).

O oxalato insolúvel contido na madeira biotratada já extraída com água bidestilada (pH 7) foi determinado com cerca de 20 g de cavacos (base seca) que foram re-extraídos com 100 mL de HCl 0,1 M a 25°C e 120 rpm por 48 h (AGUIAR; SOUZA-CRUZ; FERRAZ, 2006). Os extratos ácidos foram centrifugados a 4500 rpm, 10°C por 15 min.

Os cavacos foram ainda re-extraídos em uma terceira etapa com NaOH para determinação de ácido oxálico esterificado, conforme Hunt *et al.* (2004). 20 g de cavacos já extraídos com água e com HCl 0,1 M foram extraídos com 100 mL de NaOH 0,1 M entre 60 e 65°C por 1 h (sem agitação) e em seguida a 120 rpm, 25°C por 48 h. Fez-se ajustes de pH entre 2 e 3 com H₂SO₄ 72% (m/m) e em seguida os extratos foram centrifugados (4500 rpm, 10°C, 15 min).

Para essas duas etapas de extração também foi feito o tratamento de limpeza com 10 g/L de carvão ativo. Os sobrenadantes foram filtrados em membrana de 0,45 µm e analisados por cromatografia. O teor de ácido oxálico foi avaliado em duplicata e calculado em mg/kg de madeira e expresso como ácido oxálico extraído em cada etapa e o total.

4.11 Determinação da perda de massa dos cavacos e dos cartões de holocelulose

Após extração dos cavacos com tampão de extração enzimática, os mesmos foram lavados com água destilada e deixados secar ao ar. Os cartões de holocelulose foram retirados dos Erlenmeyers e também deixados secar ao ar. A umidade dos cavacos e dos

cartões de holocelulose foi determinada em balança de Infravermelho OHAUS e a perda de massa foi calculada (a partir de triplicata de culturas) de acordo com a equação 1:

$$P_m = (m_i - m_f / m_i) \times 100 \quad (\text{equação 1})$$

P_m = perda de massa (%);

m_i = massa de madeira (ou holocelulose) inicial seca;

m_f = massa de madeira seca (ou holocelulose) após biotratamento.

4.12 Determinação de viscosidade dos cartões de holocelulose

Os cartões de holocelulose foram desagregados conforme norma TAPPI (T236-om04) e os valores de viscosidade foram determinados através de dissoluções de 0,12 g de amostra (base seca). Essa massa de holocelulose foi totalmente dissolvida em um Erlenmeyer de 125 mL que continha 12,5 mL de água destilada e 12,5 mL de etilenodiamina cúprica 1,0 M. A solução foi transferida para um viscosímetro de vidro Cannon-Fenske, previamente calibrado com um óleo de viscosidade 29 cP e densidade 0,8539 g/cm³ a 25°C. A viscosidade da solução foi avaliada a partir de duplicata de culturas e calculada a partir do tempo de escoamento através do viscosímetro, segundo a equação mostrada a seguir:

$$\eta = k \times t \times \rho \quad (\text{equação 2})$$

η = viscosidade (cP);

k = constante do viscosímetro (0,155743 cP.cm³.s⁻¹.g⁻¹);

t = tempo de escoamento em segundos;

ρ = densidade da solução (1,052 g.cm⁻³).

4.13 Análise química das madeiras

As amostras de madeiras controle e biodegradadas foram previamente moídas em um moinho de facas até passarem por uma malha com perfurações de 0,5 mm. Após moagem, as amostras foram extraídas por 6 horas em um extrator Soxhlet com etanol 95% para remoção dos extrativos.

Os teores de lignina, glicana e polioses (xilana e manana) foram determinados a partir da hidrólise da madeira moída em H₂SO₄ (FERRAZ *et al.*, 2000). Cerca de 300 mg de amostra foram tratados com 3 mL de H₂SO₄ 72% (m/m) por uma hora a 30°C em triplicata. Em seguida foram adicionados 79 mL de água destilada. A mistura foi autoclavada a 121°C por 1 h, resfriada e filtrada em filtros de vidro sinterizado N°3, previamente pesados. O material retido foi lavado com 2 porções de 5 mL de água e deixado secar em estufa a 105°C até atingir massa constante. Esse resíduo corresponde à lignina Klason insolúvel em

ácido. O filtrado foi avolumado a 100 mL e o teor de lignina Klason solúvel em ácido foi determinado por meio da leitura do hidrolisado em 205 nm, tomando-se como padrão uma absorvidade de 105 L/g.cm neste comprimento de onda (FERRAZ *et al.*, 2000). Para determinação dos teores de açúcares do hidrolisado, estes foram filtrados em cartuchos de extração sólida Sep-Pack C-18 e analisados num cromatógrafo de fase líquida Shimadzu CTO-6A, utilizando um detector de índice de refração RID-10A. As amostras foram injetadas numa coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories Ltda) acoplada a uma pré-coluna trocadora de cátions (Bio-Rad Laboratories Ltda). Foi usado H₂SO₄ 5 mM como fase móvel, a uma vazão de 0,6 mL/min e temperatura de 45°C. Foram injetados 20 µL de cada amostra. A concentração de açúcares foi determinada por meio de curvas de calibração preparadas com padrões de grau analítico (secos em P₂O₅ a vácuo).

4.14 Determinação de solubilidade em NaOH 1% de madeiras biotratadas

Amostras de madeira moída foram analisadas quanto a solubilidade em NaOH 1% (TAPPI standard T212 om-02). Cerca de 300 mg de amostra (base seca) foram tratados com 15 mL de NaOH 1% (m/v) por 1 h em banho-maria a 100°C. A reação foi realizada em tubos de ensaio com tampas de rosca para evitar a evaporação do solvente. Os resíduos foram filtrados a vácuo em filtro de vidro sinterizado N°3 e lavados com 50 mL de NaOH 1% (m/v) e posteriormente com 100 mL de água destilada. Os resíduos retidos no filtro foram deixados em estufa a 60°C e posteriormente a 105°C até atingir massa constante. A determinação da solubilidade em NaOH foi realizada em triplicata e calculada de acordo com a diferença de massa seca antes e após o tratamento com NaOH.

4.15 Determinação de TBARS

A determinação de TBARS foi realizada de acordo com Enoki M. *et al.* (1999) com algumas modificações. 5 g de cavacos foram lavados por 5 ciclos consecutivos, sendo que cada lavagem foi realizada com 60 mL de água destilada por 1 h a 120 rpm. Após secagem dos cavacos ao ar, estes foram extraídos com 60 mL de clorofórmio/metanol (2:1) durante 1 hora a 120 rpm. Em seguida, as amostras foram concentradas até 200 µL. Esse volume foi reagido com 3 mL de solução 0,335% (m/v) de ácido tiobarbitúrico e 10% (m/v) de ácido tricloroacético por 15 min em banho-maria a 100°C. Após esfriar, a mistura reacional foi centrifugada (4500 rpm, 10°C, 15 min) e o sobrenadante foi analisado no espectrofotômetro em 530 nm ($\epsilon = 156000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; BUEGE; AUST, 1978). Esses ensaios foram realizados em duplicata.

4.16 Determinação do teor de ligações β -O-4 das ligninas por tioacidólise *in situ*

Amostras de madeira moída livre de extrativos foram tratadas diretamente, sem a necessidade de isolamento da lignina, de acordo com Rolando, Monties e Lapiere (1992). 20 mg de madeira moída (base seca) foram tratados com 15 mL de mistura dioxano/etanotiol 9:1 contendo 0,2 M de eteriato-trifluoreto de boro em tubos com vedação, em duplicata. Adicionou-se à mistura reacional 1 mL de tetracosano 0,6 g/L em diclorometano 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 NaHCO₃ 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 por tratamento 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. 10 μ L desta solução foram derivatizados por sililação com 50 μ L de N,O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) por 1 h a 60°C na presença de 5 μ L de piridina como catalisador. Foi injetado 1 μ L da mistura reacional no cromatógrafo de fase gasosa.

Os produtos da sililação foram analisados em um cromatógrafo de fase gasosa HP 5890 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 min. 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.

Para quantificar os monômeros da tioacidólise utilizou-se o fator de resposta de 1,5 em função do padrão interno (relativo às áreas dos picos) (ROLANDO; MONTIES; LAPIERRE, 1992). Para calcular o rendimento, a massa molar de uma unidade fenilpropano adotada foi de 187 g/mol e utilizou-se um fator de correção de 0,76, baseado no rendimento de 76% de tioacidólise de um composto modelo de lignina guaiacil com ligação β -O-4 (ONNERUD; GELLERSTEDT, 2003).

4.17 Isolamento de ligninas por acidólise branda

O isolamento das ligninas foi realizado por acidólise branda de acordo com Evtuguim *et al.* (2001), com algumas modificações. Foram extraídos cerca de 10 g de madeira livre de

extrativos (pré-extraída com etanol) em um balão com 100 mL de dioxano/água 9:1 contendo 0,2 M de HCl. A extração foi realizada com agitação magnética constante a 90°C com o auxílio de um banho de silicone e sob atmosfera de N₂. Após 30 min, a reação foi resfriada até 50°C e filtrou-se a mistura reacional em filtro de vidro sinterizado N°3. O material insolúvel foi transferido de volta ao balão e extraído mais duas vezes sob condições idênticas. Uma quarta extração foi realizada com dioxano/água 9:1 sem HCl. As quatro frações orgânicas foram combinadas e concentradas até cerca de 20 a 30 mL sob pressão reduzida a 40°C. A solução resultante foi gotejada sobre 600 mL de água destilada com agitação constante para precipitação da lignina. A solução foi mantida por uma noite em geladeira e filtrada no dia seguinte em filtro de vidro sinterizado N°3, previamente pesado para determinação do rendimento de extração. As ligninas foram mantidas em estufa a 55°C por uma noite antes das pesagens. O isolamento foi quantificado de acordo com o teor de lignina Klason de cada amostra de madeira.

4.18 Quantificação de grupos funcionais das ligninas isoladas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de fósforo (RMN-³¹P)

As ligninas isoladas foram analisadas quantitativamente com relação ao teor de grupos funcionais (hidroxilas alifáticas e fenólicas, carboxila) por RMN-³¹P (ARGYROPOULOS, 1994; GRANATA; ARGYROPOULOS, 1995). Aproximadamente 40 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 *N*-hidroxinaftalimida 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-1,3,2-dioxafosfolano (reagente 1) ou 2-cloro-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxafosfolano (reagente 2) foram adicionados ao *vial*. Quando foi utilizado o reagente 2, usou-se 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. A relação de diastereoisômeros eritro/treo em ligações β-O-4 da lignina foi determinada com o reagente 1 (ARGYROPOULOS, 1994) enquanto os grupos OH alifáticas, OH fenólicas de unidade guaiacila, *p*-hidroxifenila e de estruturas condensadas e grupos carboxila foram quantificados com o reagente 2 (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 1	Região de integração (ppm)
OH em C α vizinho à ligação β -O-4 treo	133,4 – 134,1
OH em C α vizinho à ligação β -O-4 eritro	134,2 - 135
<i>N</i> -hidroxi-naftalimida	138 – 138,5
Reagente 2	
Carboxila	134,5 – 135,5
OH fenólica em unidade <i>p</i> -hidroxifenila	137,4 - 138
OH fenólica em unidade guaiacila eterificada	138,2 – 140,4
OH fenólica em unidade guaiacila condensada	140,5 – 144,5
Colesterol	144,7 - 145
OH alifática	146 – 149,2
<i>N</i> -hidroxi-naftalimida	153,5 – 153,9

4.19 Biodegradação simultânea de *P. taeda* e cartões de holocelulose por outros basidiomicetos

O fungo de podridão parda *Gloeophyllum trabeum* e o de podridão branca não-seletiva *Trametes (Coriolus) versicolor* foram cultivados sobre cavacos de *P. taeda in natura* e cartões de holocelulose assim como foi feito para *C. subvermispora*. A manutenção dessas cepas (procedência do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena - USP) foi realizada da mesma forma que a cepa L14807-SS3 de *C. subvermispora*.

Para os cultivos desses dois fungos foram realizadas a extração e determinação de enzimas hidrolíticas (celulases totais, endoglicanase, celobioidrolase, β -glicosidase, xilanases) e oxidativas (MnP, LiP e lacases), extração aquosa com H₂O bidestilada para determinação de catecóis, pH, atividade redutora de íons Fe³⁺, ácido oxálico (também extraído com HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M), determinações de perdas de massa dos cavacos e dos cartões de holocelulose, solubilidade em NaOH 1% e perda dos principais componentes da madeira (celulose, polioses e lignina) e a viscosidade dos cartões de holocelulose.

4.20 Determinação da influência de ácido oxálico e cálcio nas atividades da MnP

Um caldo enzimático proveniente da biodegradação de *P. taeda in natura* por *C. subvermispora* após 2 semanas foi ensaiado numa condição onde os compostos succinato e lactato foram substituídos pelo ácido oxálico nas medidas de atividade de MnP. As reações foram conduzidas em tubos de 30 mL contendo 1 mL de MnSO₄ 1 mM, 1 mL de vermelho de fenol 0,1%, 1 mL de caldo enzimático, 500 μ L de albumina 1% e 500 μ L de H₂O₂ 2 mM. Para completar os 10 mL do volume final de reação, foi adicionado o ácido oxálico em

concentrações finais de 0,5, 1, 1,25, 1,5, 2, 3, 5 e 10 mM. Definido o pico de atividade da enzima mediada por esse quelante (1,5 mM), foram feitos outros ensaios com a adição de íons Ca^{2+} em concentrações finais de 1,5, 3 e 4,5 mM.

4.21 Uso de aditivos nos cultivos de *C. subvermispora* sobre madeira

Em outros experimentos de biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispora* foram avaliados alguns aditivos (cálcio, ácido oxálico, óleo de soja) para alterar a característica do substrato e conseqüentemente o comportamento do fungo. O sistema de cultivo foi similar ao descrito nos itens 4.1 e 4.2. Em Erlenmeyers que continham 43 g de cavacos (base seca) foram adicionados 55, 110 e 220 mg de $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, que correspondeu a 350, 700 e 1400 mg de Ca^{2+} /kg de madeira. A adição de 25, 50 e 100 mg de ácido oxálico $\times 2\text{H}_2\text{O}$ correspondeu a 415, 830 e 1660 mg de ácido oxálico/kg de madeira. Nesses dois casos, foram preparadas inicialmente soluções de partida contendo 44 g/L de $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ e 28 g/L de ácido oxálico $\times 2\text{H}_2\text{O}$. Um volume definido dessas soluções foi diluído ou não apropriadamente a um volume final de 5 mL e então adicionados em cada Erlenmeyer para proporcionar as relações aditivo/madeira descritas anteriormente. No experimento em que houve adição de óleo de soja (comercial de marca Liza), uma alíquota do óleo foi emulsionada em água por tratamento em banho de ultra-som por 20 min na proporção de 90 g/L. Alíquotas dessa emulsão também foram diluídas ou não com água para um volume final de 5 mL e adicionadas aos Erlenmeyers para proporcionar relações de 2,6, 5,2 e 10,4 g de óleo/kg de madeira. Foram inoculados 100 mg de micélio/kg de madeira e os cultivos foram mantidos por 2 semanas a 27°C.

Para esses cultivos foram feitas extração e determinação de atividades enzimáticas (endoglicanase, xilanases, MnP, LiP e lacase), extração aquosa com H_2O bidestilada para determinação de catecóis, pH, atividade redutora de íons Fe^{3+} , ácido oxálico (também extraído com HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M), tioacidólise, solubilidade em NaOH 1% (m/v), perda de massa e dos principais componentes da madeira (celulose, polioses e lignina), isolamento de lignina e sua caracterização por espectroscopia de RMN- ^{31}P , conforme já descrito nesta sessão.

Para verificar se os aditivos (cálcio, ácido oxálico, óleo de soja) causaram efeito significativo nas atividades enzimáticas, solubilidade em NaOH 1% e na perda de massa e de componentes, os dados obtidos foram avaliados a partir do teste de Tukey para 95% de significância por meio do programa GraphPad InStat.

4.22 Experimentos de biodegradação de madeira em biorreatores de 20 L

As condições de cultivo anteriormente descritas com as máximas concentrações de aditivos cálcio (1400 mg/kg), ácido oxálico (1660 mg/kg) ou óleo de soja (10,4 g/kg de madeira) foram adotadas para a biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispora* em biorreatores de polipropileno de 20 L. O inóculo foi preparado e aplicado da mesma forma que foi feito nos experimentos em Erlenmeyers (100 mg de micélio/kg de madeira). Foi aplicada injeção de ar nos biorreatores por meio de um compressor convencional com fluxo de 2,3 L/h. O ar foi pré-esterilizado por passagem em solução aquosa de KMnO_4 e posteriormente filtrado em membrana de 0,22 μm . Para esses cultivos, foi utilizado outro tronco de *P. taeda* de mesma origem e idade que o anterior. Além dos experimentos de polpação, foram monitoradas as atividades enzimáticas (MnP, LiP, lacases, xilanases e endoglicanase), extração aquosa com H_2O bidestilada para determinação de catecóis, pH, atividade redutora de íons Fe^{3+} , ácido oxálico (também extraído com HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M), hidrólise ácida para determinação de perdas dos principais componentes da madeira (celulose, polioses e lignina), solubilidade em NaOH 1% e extração de TBARS. Apesar de nesses cultivos não ter sido analisada a perda de massa dos cavacos após o biotratamento, foram utilizados os valores observados nos cultivos em Erlenmeyers para calcular as perdas de massa dos constituintes da madeira nos cultivos em biorreatores.

Para esses cultivos, foram ainda realizados alguns experimentos para avaliar a peroxidação de ácido linoléico *in vitro* pelos caldos enzimáticos. A peroxidação foi monitorada pelo consumo de O_2 durante a reação e pelo acúmulo de TBARS, conforme descrito nos itens 4.23 e 4.24, respectivamente.

4.23 Determinação do consumo de O_2 proveniente da peroxidação enzimática de ácido linoléico *in vitro*

Para determinação de atividade pro-oxidante baseada no consumo de O_2 pelos caldos enzimáticos (KAPICH *et al.*, 2005a) foi utilizado um oxímetro Hansatech previamente calibrado com água saturada em O_2 e também livre de O_2 . Primeiramente foi colocado na cela do oxímetro 870 μL de tampão succinato de sódio 50 mM (pH 4,5), 34 μL de ácido oxálico 50 mM (pH 4,5) e 216 μL de água destilada. Iniciou-se a agitação magnética da solução na cela até a saturação de O_2 a 27°C. Em seguida foram adicionados 500 μL de caldo enzimático, 40 μL de MnSO_4 5 mM e 40 μL de emulsão de ácido linoléico 0,2% (m/v) em Tween 60 1% (m/v). A cela foi lacrada com o êmbolo superior e através de um tubo capilar injetou-se 4 μL de H_2O_2 20 mM. A taxa máxima de consumo de oxigênio foi determinada por leituras contínuas do eletrodo de oxigênio e expressa como atividade pró-oxidante do caldo em UI/kg de madeira. Como controle, fez-se a mesma reação na ausência

da emulsão de ácido linoléico em Tween 60. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e a concentração final de ácido oxálico foi de 1 mM.

4.24 Determinação de TBARS provenientes da peroxidação enzimática de ácido linoléico *in vitro*

Foram misturados 1,07 mL de tampão succinato de sódio 50 mM (pH 4,5) e 56 µL de ácido oxálico 50 mM (pH 4,5) por 5 min, 120 rpm e 27°C no escuro para oxigenação do meio reacional. Em seguida foram adicionados 50 µL de MnSO₄ 50 mM, 500 µL de emulsão de ácido linoléico 0,2% (m/v) em Tween 60 1% (m/v) e 1 mL de caldo enzimático. A reação foi iniciada pela adição de 125 µL de H₂O₂ 2 mM. Os frascos foram vedados e a reação foi mantida sob agitação a 120 rpm a 27°C. Após 1 h, 1 mL da mistura reacional foi reagido com 3 mL de solução 0,335% (m/v) de ácido tiobarbitúrico e 10% (m/v) de ácido tricloroacético em tubos de ensaios vedados. Após ficar 15 min em água em ebulição e esfriar-se, o conteúdo de cada tubo foi centrifugado a 4500 rpm, 10°C por 15 min. Em seguida fez-se a leitura do sobrenadante em 532 nm ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; BUEGE; AUST, 1978) para determinação de TBARS. Como controle, fez-se a mesma reação na ausência da emulsão de ácido linoléico em Tween 60. Esses ensaios foram realizados em triplicata e a concentração final de ácido oxálico também foi de 1 mM.

4.25 Polpação quimiotermodinâmica sulfito alcalino

Os ensaios de polpação quimiotermodinâmica foram adaptados de BIERMANN (1993) e MASARIN (2006) com algumas modificações. O processo foi iniciado por uma pré-digestão de 50 g de cavacos (base seca) com 300 mL de NaOH 6% (m/m) e Na₂SO₃ 12% (m/m, em relação a madeira) em Erlenmeyers de 2 L. A reação foi realizada em autoclave por 2 h, 1 atm e a 121°C. Para cada condição, três Erlenmeyers foram utilizados para os ensaios de polpação e um Erlenmeyer para determinação do rendimento. Todos os cavacos de madeira, inclusive os que foram usados para determinação de rendimento, foram lavados com água corrente para análises posteriores. Os cavacos tratados termiquimicamente foram transferidos para um liquidificador Sire e foram adicionados 3 L de água destilada (relação sólido:líquido de 1:60 m/v) para o primeiro desfibramento, que foi realizado por 1 h (RUZINSKI; KOKTA, 1990).

O material fibroso foi classificado (Classificador Noram CA-328) para separação de fibras e rejeitos (palitos) por aproximadamente 1 h e meia. Para remover o excesso de água, as fibras e os palitos separados foram transferidos para uma centrífuga Arno por um tempo aproximado de 15 min. Posteriormente, cerca de 20 g de rejeitos foram desfibrados numa segunda etapa em um moinho Jokro com 180 mL da mesma solução usada no cozimento

em autoclave (NaOH 6% m/m e Na₂SO₃ 12% m/m em base seca de palitos) por 1 h. Esse material foi também classificado para remoção de rejeitos residuais. As fibras dessa segunda etapa foram misturadas às da primeira uniformemente para realização dos refinamentos.

Para os ensaios de refinamento, 20 g de fibras (base seca) foram tratadas com 180 mL da mesma solução usada nos cozimentos anteriores (NaOH 6% m/m e Na₂SO₃ 12% m/m em base seca de fibras) por 3 tempos distintos (90, 120 e 180 min). Parte do material refinado (2 g) foi utilizada para a determinação do grau de fibrilação e o restante foi dividido em 3 partes (5-6 g) para formação de folhas de teste.

4.26 Determinação do grau de refino das polpas

2 g de fibras refinadas foram utilizadas para determinação do grau de refino em um aparelho Regmed tipo Schopper-Riegler SRIP, de acordo com a norma ISO 5627/1. Após medição, a massa de polpa residual foi transferida para um papel de filtro previamente tarado, e levado a uma estufa a 100°C por 2 h para obter a massa exata para calcular o grau de refino.

4.27 Formação de folhas e análise de suas propriedades mecânicas

As fibras refinadas foram desagregadas em água destilada e transferidas para um formador de folha Regmed tipo FF/S2. Foram formadas 3 folhas de 20 cm de diâmetro e gramatura de aproximadamente 150 g/m² para cada amostra com um mesmo tempo de refino. As folhas foram prensadas no mesmo aparelho formador de folhas até atingir uma umidade de aproximadamente 10% e depois mantidas em sala termostaticada (50-60% de umidade) para realização dos testes de resistência mecânica de tração (TAPPI standard T494 om-01) e de rasgo (T414 om-98).

5 Resultados e discussão

Os resultados obtidos no desenvolvimento dessa tese serão apresentados em tópicos que abordam experimentos de biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispora* em cultivos que sofreram a adição de agentes exógenos ou a supressão de alguns componentes da madeira. As alterações na composição dos meios de cultivo tiveram o objetivo de afetar algumas vias metabólicas específicas a fim de verificar a relevância de cada uma delas na biodegradação dos componentes da madeira.

Um estudo comparativo também foi desenvolvido avaliando a degradação de *P. taeda in natura* por fungos tipicamente classificados como de podridão branca não seletivo para a degradação de lignina (*T. versicolor*) ou como de podridão parda (*G. trabeum*).

Alguns dos cultivos mencionados foram repetidos em biorreatores de maior escala para a obtenção de massa de cavacos suficiente para a realização de ensaios de polpação quimiotermomecânica sulfito alcalino.

5.1 Cultivos sobre madeira *in natura* e extraída com etanol

5.1.1 Relevância dos extrativos na biodegradação de madeira

Anteriormente às análises de metabólitos e alterações físico-químicas decorrentes da biodegradação de madeira, será comentado o efeito da extração dos cavacos de *P. taeda* com etanol 95%. A pré-extração de cavacos de madeira com esse solvente removeu 1,4% de massa total dos cavacos. Esta quantidade representa uma fração significativa dos extrativos presentes em *P. taeda* (MENDONÇA; GUERRA; FERRAZ, 2002). Os cavacos extraídos com etanol, além de apresentar menor teor de extrativos, também apresentaram diferença em relação ao teor de ácido oxálico solúvel em água. O teor de ácido oxálico foi ausente nos cavacos extraídos com etanol e detectados na concentração de $21,6 \pm 0,1$ mg/kg nos cavacos *in natura*. Por outro lado, parte dos compostos com estruturas do tipo catecol permaneceram adsorvidos depois da extração etanólica, uma vez que cavacos *in natura* e extraídos com etanol apresentaram $27,7 \pm 0,8$ e $16,7 \pm 0,8$ mg de catecóis/kg de madeira, respectivamente.

Os cavacos de madeira *in natura* e extraídos com etanol foram biotratados por *C. subvermispora* por 1, 2 e 4 semanas. O fungo cresceu indistintamente sobre os dois tipos de madeira. A biomassa micelial foi observada a partir da segunda semana e um crescimento abundante foi observado ao final de 4 semanas de cultivo.

A perda de massa e dos principais componentes da madeira está mostrada na Figura 10. Essas perdas representam os componentes transformados em CO_2 , H_2O e moléculas de baixa massa molar solúveis em água. A perda de celulose foi contabilizada

dentro da determinação de glicanas totais, pois glicose presente em *P. taeda* não é proveniente apenas de celulose, mas também de galactoglicomananas (FENGEL; WEGENER, 1989). Devido à co-eluição dos açúcares xilose, galactose e manose no sistema de separação por cromatografia, a perda de massa dos polímeros respectivos foi atribuída como perda total de polioses. A composição química determinada para *P. taeda* não tratado (controle autoclavado) foi de $42,0 \pm 0,2$ % de glicana, $21,1 \pm 0,1$ % de polioses e $28,5 \pm 0,2$ % de lignina total, valores esses semelhantes aos da literatura (MENDONÇA; GUERRA; FERRAZ, 2002).

As perdas de massa dos cavacos, de polioses e de lignina foram progressivas com o tempo de biodegradação (Figura 10). As perdas de glicana atingiram apenas 4%, enquanto a lignina foi preferencialmente degradada, atingindo 12,2% e 15,8% para os cavacos de madeira *in natura* e extraídos com etanol, respectivamente. Enquanto a perda de polioses foi de apenas 4% para o cultivo sobre cavacos *in natura*, no cultivo sobre cavacos extraídos com etanol foi observado o dobro após 4 semanas. Os resultados de perdas de componentes corroboram estudos anteriores sobre a biodegradação de *P. taeda* por esse mesmo fungo (GUERRA; MENDONÇA; FERRAZ, 2002; 2003; MENDONÇA; GUERRA; FERRAZ, 2002).

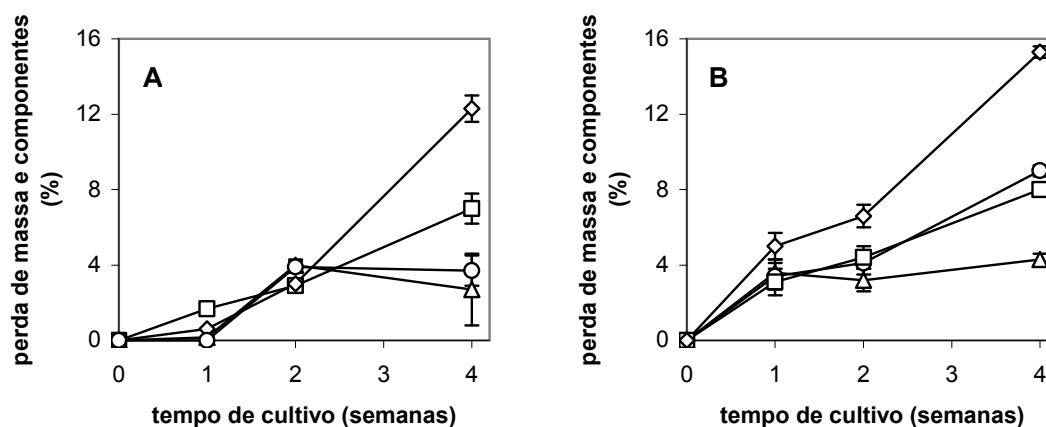


Figura 10. Perdas de massa e de componentes provenientes da biodegradação de cavacos de *P. taeda in natura* (A) e extraídos com etanol (B) por *C. subvermispota*: massa (□), glicana (△), polioses (○) e lignina (◇).

Em estudos anteriores realizados por nosso próprio grupo de pesquisa, a perda de glicana para *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispota* também foi baixa, 2% após 90 dias de biodegradação (MENDONÇA; GUERRA; FERRAZ, 2002). Porém, preparações de α -celulose dessas amostras mostraram que o polímero é degradado já a partir de 30 dias de cultivo, levando a diminuição no grau de polimerização e no rendimento da fração insolúvel recuperada (GUERRA; MENDONÇA; FERRAZ, 2003). Devido a essas observações, alguns

cartões de holocelulose foram incluídos nos cultivos sobre cavacos no presente trabalho. Esse ensaio teve como principal objetivo avaliar a ação direta de *C. subvermispota* sobre fibras de celulose livres de lignina, pois essa macromolécula serve como uma barreira contra os microorganismos (KIRK; CULLEN, 1998). Os valores de viscosidade e perdas de massa dos cartões são mostrados na Figura 11. As perdas de massa foram progressivas com o tempo, mas atingiram apenas 4% após 4 semanas. As culturas com cavacos extraídos apresentaram valores um pouco menores de perda de massa dos cartões comparada à condição com cavacos *in natura*. As viscosidades dos cartões para ambas as condições de cultura foram reduzidas, principalmente na primeira semana de cultivo, indicando que a despolimerização dos polissacarídeos ocorreu predominantemente nesse curto período.

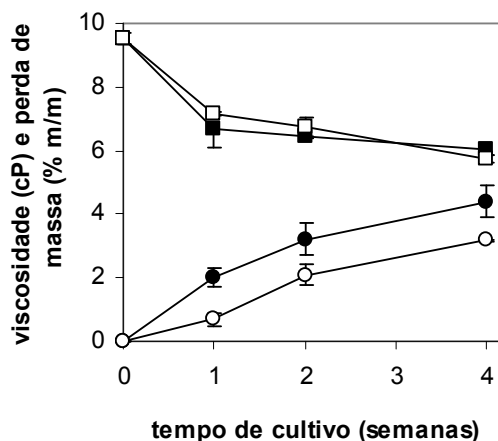


Figura 11. Perdas de massa (círculo) e viscosidade (quadrado) dos cartões de holocelulose incluídos nas culturas de *C. subvermispota* sobre cavacos de *P. taeda* *in natura* (símbolo cheio) e extraídos com etanol (símbolo vazio).

Ambas as condições de cultura apresentaram perfil semelhante na produção de enzimas extracelulares (Tabela 2). As xilanases foram as enzimas predominantes dentre as hidrolases. As atividades desse complexo xilanolítico devem ser referentes às endoxilanases, pois a secreção de β -xilosidases é baixa em culturas desse fungo (HEIDORNE *et al.*, 2006; SETHURAMAN; AKIN; ERIKSSON, 1998). Além disso, Souza-Cruz *et al.* (2004) ao avaliar a hidrólise de xilana de bétula por um caldo enzimático proveniente da biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispota*, observaram a formação de dímeros a oligômeros de 6 unidades de xilose, enquanto xilose monomérica não foi detectada. Uma endoxilanase purificada desse mesmo fungo hidrolisou 3 diferentes preparações de xilana a oligômeros de 3 a 5 unidades de açúcar (MILAGRES;

MAGALHÃES; FERRAZ, 2005). Esses resultados confirmam que o complexo xilanolítico de *C. subvermispora* é deficiente na hidrólise completa de xilana a xilose.

Atividades de celulasas totais (baseadas na hidrólise de papel de filtro) e de celobiohidrolases foram baixas. Atividades de endoglicanase e β -glicosidases predominaram no complexo celulolítico e foram progressivas ao longo de 4 semanas. As celulasas responsáveis pela hidrólise do papel de filtro (utilizado no método de determinação de celulasas totais) devem ser predominantemente as endoglicanases, pois apesar de terem sido observadas atividades significativas de β -glicosidases, estas enzimas dependem das celobiohidrolases que hidrolisam os oligômeros liberados pelas endoglicanases em celobiose (KIRK; CULLEN, 1998). Atividades de CDH não foram detectadas. O perfil de produção de enzimas hidrolíticas corrobora estudos anteriores (HEIDORNE *et al.*, 2006; SOUZA-CRUZ *et al.*, 2004).

A MnP foi a principal enzima oxidativa presente nos cultivos, enquanto a LiP não foi encontrada. Lacase foi detectada em baixas quantidades e apenas na primeira semana de cultivo. Essa enzima tem sido detectada apenas nos estágios iniciais de biodegradação de madeira ou na presença de co-substratos de fácil assimilação por esse fungo, enquanto a LiP não tem sido encontrada sob nenhuma forma de cultivo (CUNHA, 2008; ENOKI M. *et al.*, 1999; FERRAZ; CÓRDOVA; MACHUCA, 2003; LOBOS *et al.*, 1994; MASARIN, 2006; SOUZA-CRUZ *et al.*, 2004; VICENTIM, 2007; VICUÑA *et al.*, 1996). A baixa concentração de cobre em *P. taeda* deve também afetar a expressão dessas enzimas (SOUZA-CRUZ *et al.*, 2004). A ausência de VP foi observada por Souza-Cruz *et al.* (2004) após verificar que um caldo enzimático dialisado de *C. subvermispora* não apresentava mais oxidação de vermelho de fenol. Ao adicionar Mn^{2+} na reação, a atividade do caldo foi recuperada, demonstrando que havia somente a presença de MnP. Dessa forma, a perda de massa de lignina nesses cultivos deve ser atribuída exclusivamente à MnP e de mediadores de baixa massa molar eventualmente presentes.

Pequenas quantidades de H_2O_2 foram detectadas nos caldos enzimáticos, principalmente na primeira semana de cultivo (Tabela 2). A fonte de H_2O_2 descrita para *C. subvermispora* consiste na oxidação dos ácidos oxálico e glioxílico pela MnP (URZÚA; KERSTEN; VICUÑA, 1998) ou na oxidação de ácido oxálico pela oxalato-oxidase (WATANABE *et al.*, 2005).

Em ambas as condições de cultivo, altas quantidades de xilanase e moderadas quantidades de endoglicanase não foram suficientes para remover quantidades expressivas de polissacarídeos da parede celular vegetal. Esses resultados corroboram estudos anteriores que mostraram que é necessária uma remoção expressiva de lignina para que as enzimas hidrolíticas consigam degradar os polissacarídeos da parede celular vegetal

(MACHUCA; FERRAZ, 2001). Mesmo nas fibras de cartões de holocelulose, que são praticamente isentas de lignina, a perda de massa foi de apenas 4%, o que indica que o sistema enzimático hidrolítico não foi suficiente para converter porções significativas dos polissacarídeos em CO₂ e/ou oligossacarídeos solúveis em água até 4 semanas de biodegradação.

Tabela 2. Atividades enzimáticas e H₂O₂ provenientes da biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispora*.

Atividades enzimáticas (UI/kg de madeira)	Condição dos cavacos	Tempo de cultivo (semanas)		
		1	2	4
Celulases totais	<i>in natura</i>	15 ± 6	12 ± 4	17 ± 2
	extraído	7 ± 4	13,8 ± 0,7	19 ± 6
Endoglicanase	<i>in natura</i>	0	46 ± 6	137 ± 26
	extraído	0	72 ± 29	99 ± 24
Celobioidrolase	<i>in natura</i>	7 ± 6	9 ± 15	0
	extraído	0	6 ± 7	3 ± 5
β-glicosidase	<i>in natura</i>	17 ± 2	33 ± 3	151 ± 14
	extraído	16 ± 2	40 ± 8	119 ± 24
Xilanases	<i>in natura</i>	184 ± 47	553 ± 28	501 ± 89
	extraído	170 ± 44	751 ± 172	466 ± 87
Galactanases	<i>in natura</i>	0	2 ± 1	5 ± 3
	extraído	0	0	13 ± 12
MnP	<i>in natura</i>	93 ± 12	186 ± 39	170 ± 12
	extraído	119 ± 27	227 ± 6	183 ± 2
Lacases	<i>in natura</i>	4 ± 2	0	0
	extraído	1 ± 1	0	0
H ₂ O ₂ (mg/kg de madeira)	<i>in natura</i>	5,2 ± 3,8	1,4 ± 0,3	1,3 ± 0,4
	extraído	2,2 ± 1,3	0,3 ± 0,3	1,3 ± 0,7

Para analisar a produção de ácido oxálico e compostos redutores de Fe³⁺ nos cultivos de *C. subvermispora*, fez-se necessária a extração aquosa das madeiras biotratadas e também dos controles, pois alguns desses compostos encontram-se naturalmente na madeira (AGUIAR; SOUZA-CRUZ; FERRAZ, 2006). Foi constatada uma diminuição no valor inicial do pH ao longo de 4 semanas (Figura 12), indicando a produção de ácidos orgânicos pelo fungo, como o ácido oxálico (AGUIAR, SOUZA-CRUZ; FERRAZ, 2006; GALKIN *et al.*, 1998; URZÚA; KERSTEN; VICUÑA, 1998; VICENTIM, 2007;

WATANABE *et al.*, 2005). Ácidos carboxílicos decorrentes da degradação de lignina e o ácido acético proveniente dos grupos acetila das polioses poderiam contribuir também nessa diminuição do pH da madeira. Devido a possível eliminação de ácidos resinosos e de ácido oxálico por etanol, o pH do extrato controle apresentou um valor maior em relação à amostra proveniente de madeira *in natura*. A partir da primeira semana, os valores de pH foram decrescentes e similares nas duas formas de cultivo.

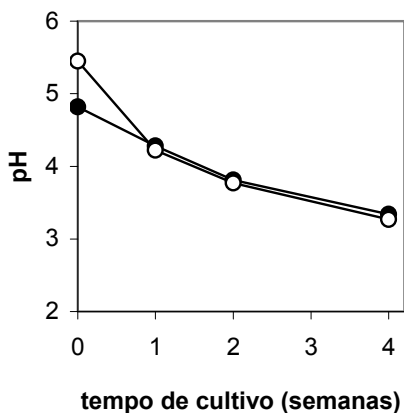


Figura 12. Valores de pH determinados nos extratos aquosos provenientes da biodegradação de *P. taeda in natura* (●) e extraídos com etanol (○) por *C. subvermispora*.

O ácido oxálico foi identificado em todos os cultivos avaliados (Figura 13), enquanto o ácido glioxílico, um outro metabólito produzido por esse fungo em meio sintético (URZÚA; KERSTEN; VICUÑA, 1998) não foi identificado em nenhuma amostra. Galkin *et al.* (1998) também detectaram apenas o ácido oxálico a partir da biodegradação de palha de trigo por *C. subvermispora*.

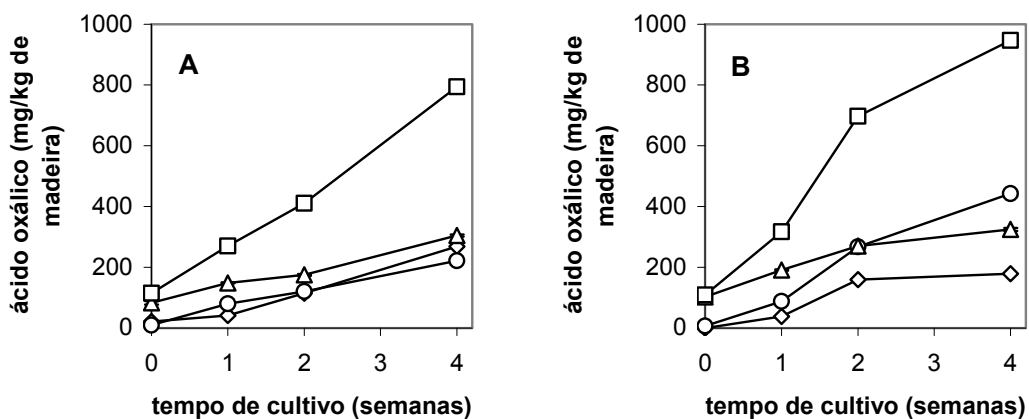


Figura 13. Teor de ácido oxálico solúvel (◇), extraído com HCl 0,1 M (○), extraído com NaOH 0,1 M (Δ) e o total (□) proveniente da biodegradação de cavacos de *P. taeda in natura* (A) e extraídos com etanol (B) por *C. subvermispora*.

Nas extrações ácidas e alcalinas foi identificado também o ácido acético, resultante da hidrólise dos grupos acetila presentes nas poliose. A secreção de ácido oxálico foi similar entre as condições de cultivo (Figura 13). O teor de ácido oxálico extraído na forma solúvel (com água pH 7) foi crescente com o tempo de cultivo, causando diminuição progressiva do pH, conforme mostrado na Figura 12. Ácido oxálico extraído com HCl e NaOH também foi encontrado em quantidades significativas e progressivas ao longo de 4 semanas. Estas formas de ácido têm sido associadas com oxalato de cálcio insolúvel e ésteres ligados aos polissacarídeos, respectivamente (AKHTAR *et al.*, 1998; HUNT *et al.*, 2004). A partir da segunda semana de cultivo, a produção total de ácido oxálico foi um pouco mais alta nos cultivos sobre cavacos extraídos com etanol. O perfil de produção de ácido oxálico foi simultâneo ao aumento de atividade da MnP até a segunda semana de cultivo. Após 4 semanas, as atividades dessa enzima apresentaram uma pequena redução, enquanto a produção de ácido oxálico ainda aumentou.

A produção de TBARS foi progressiva com o tempo e praticamente semelhante para as duas condições de cultivo (Figura 14). Enoki M. *et al.* (1999) e Elissetche *et al.* (2006) também observaram acúmulo de TBARS com o avanço da biodegradação de madeira livre de extrativos por *C. subvermispora* e pelo fungo de podridão branca *Ganoderma australe*, respectivamente. Além da peroxidação de lipídeos, a produção de ácidos graxos foi também observada por eles. A peroxidação de lipídeos iniciada por Mn^{3+} tem sido considerada a principal rota de degradação de estruturas não fenólicas de lignina em culturas de *C. subvermispora* (DAINA *et al.*, 2002; HAMMEL *et al.*, 2002; KAPICH; JENSEN; HAMMEL, 1999; JENSEN *et al.*, 1996; SREBOTNIK *et al.*, 1997).

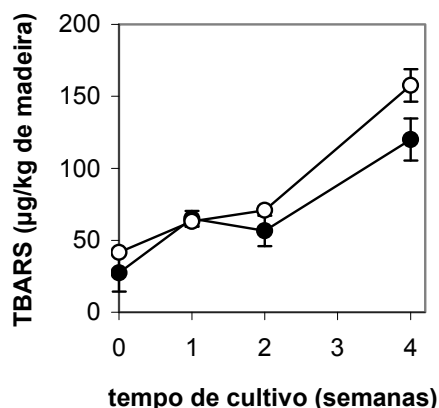


Figura 14. Produção de TBARS provenientes da biodegradação de cavacos de *P. taeda in natura* (●) e extraídos com etanol (○) por *C. subvermispora*.

5.1.2 Envolvimento dos produtos de transformação da madeira no processo de biodegradação

Os extratos aquosos recuperados de madeira biodegradada apresentaram atividade redutora de Fe^{3+} (Figura 15A). Essa atividade diminuiu na primeira semana de cultivo para o extrato de madeira *in natura*. Para o extrato de madeira não biodegradada e extraída com etanol a atividade redutora foi menor devido à remoção de alguns compostos que apresentam essa propriedade, como taninos, flavonóides e lignanas. A partir da primeira semana, as duas condições de cultivo apresentaram atividade redutora de Fe^{3+} similar e crescente. De acordo com Aguiar, Souza-Cruz e Ferraz (2006) a atividade redutora de Fe^{3+} por extratos de madeira não biodegradada pode ser atribuída a extrativos fenólicos presentes na madeira, enquanto para extratos de madeira biodegradada é atribuída principalmente aos produtos de degradação de lignina. Recentemente, Aguiar e Ferraz (2007) analisaram atividade redutora de Fe^{3+} e Cu^{2+} por vários compostos fenólicos representativos de extrativos e produtos de degradação de lignina. De um modo geral, os derivados do catecol demonstraram maior atividade redutora comparados aos derivados do siringol (2,6-dimetoxi-fenol) e do guaiacol (2-metoxi-fenol), sendo que esses dois tipos de estruturas são comumente encontrados em ligninas.

Na Figura 15B estão os dados do teor de catecóis totais extraídos dos cavacos de madeira. O extrato de madeira não biodegradada *in natura* apresentou maior atividade redutora, provavelmente por possuir mais catecóis que o extrato de madeira extraída com etanol. A partir da primeira semana de cultivo, quando os catecóis foram totalmente degradados, ainda assim foi observada atividade redutora, proveniente da degradação e solubilização de fragmentos da lignina. Essa atividade redutora foi crescente após 4 semanas, quando os catecóis foram novamente detectados. Uma enzima que também apresenta atividade redutora de Fe^{3+} , a CDH (HENRIKSSON; JOHANSSON; PETTERSSON, 2000), não foi detectada em nenhum cultivo, mostrando que essa propriedade observada nos extratos é promovida apenas por compostos fenólicos.

A atividade redutora de Fe^{3+} foi crescente juntamente com o acúmulo de TBARS, corroborando os cultivos com *G. australe* (ELISSETCHE *et al.*, 2006). A peroxidação de lipídeos tem sido atribuída principalmente a MnP, porém a atividade redutora de Fe^{3+} poderia também estar envolvida. Horta (2007) também observou que a atividade redutora de Fe^{3+} de extratos aquosos provenientes da biodegradação de *Eucalyptus grandis* por *C. subvermispora* aumenta ao longo do tempo de cultivo. Nesse caso, o ensaio dos extratos frente a reações de peroxidação de ácido linoléico mostrou que quanto maior a atividade redutora de Fe^{3+} , maior a capacidade do extrato para peroxidar ácido linoléico na presença de Fe^{3+} . Sugeriu-se que os extratos ao reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} , este se oxida rapidamente,

reduzindo O_2 e gerando superoxiânion e radical hidroperoxila (HO_2^\bullet), o qual foi o responsável pela iniciação das reações de degradação do ácido graxo.

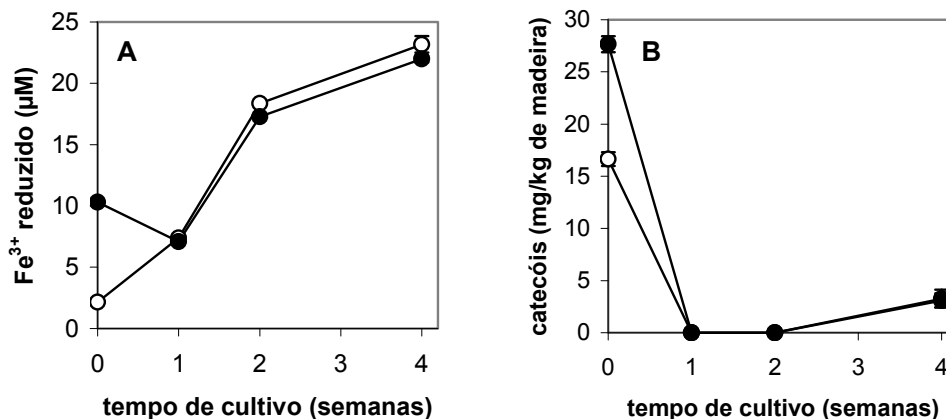


Figura 15. Atividade redutora de Fe^{3+} (A, medida após 30 min de reação) e teor de catecóis totais (B) determinados a partir dos extratos aquosos provenientes da biodegradação de cavacos de *P. taeda in natura* (●) e extraídos com etanol (○) por *C. subvermispota*.

A fim de melhor caracterizar os agentes redutores de Fe^{3+} observados nos cultivos sobre *P. taeda*, foi estudada a distribuição das massas molares dos compostos presentes nos extratos aquosos. Os cromatogramas de permeação em gel dos extratos mostraram que compostos aromáticos com oxigênio ligado ao anel (absorvem em 280 nm) e a atividade redutora de Fe^{3+} apresentaram coincidência de picos (Figura 16). Um perfil similar de eluição foi observado para as duas condições de cultivo. Nos extratos provenientes de madeiras não biodegradadas, a atividade redutora de Fe^{3+} foi principalmente relacionada às frações que eluíram entre 95-110 mL e entre 130-180 mL, enquanto que para a fração que eluiu no volume morto da coluna, entre 50-55 mL, foi observada uma baixa atividade redutora. Com o extrato de madeira biodegradada por 1 semana, a diminuição da atividade redutora de Fe^{3+} parece estar relacionada ao consumo total da fração que eluiu entre 130-180 mL e ao consumo parcial da fração que eluiu entre 95-110 mL.

Com o avanço da biodegradação, as intensidades do sinal em 280 nm para as frações que eluíram entre 50-55 mL e entre 95-110 mL aumentaram significativamente (notar-se a alteração nas escalas da Figura 16). Esses resultados mostram que fragmentos de lignina solúveis em água foram liberados depois de 2 e 4 semanas. Estes derivados de lignina devem conter grupos redutores de Fe^{3+} , pois a atividade redutora de Fe^{3+} também aumentou nessas frações.

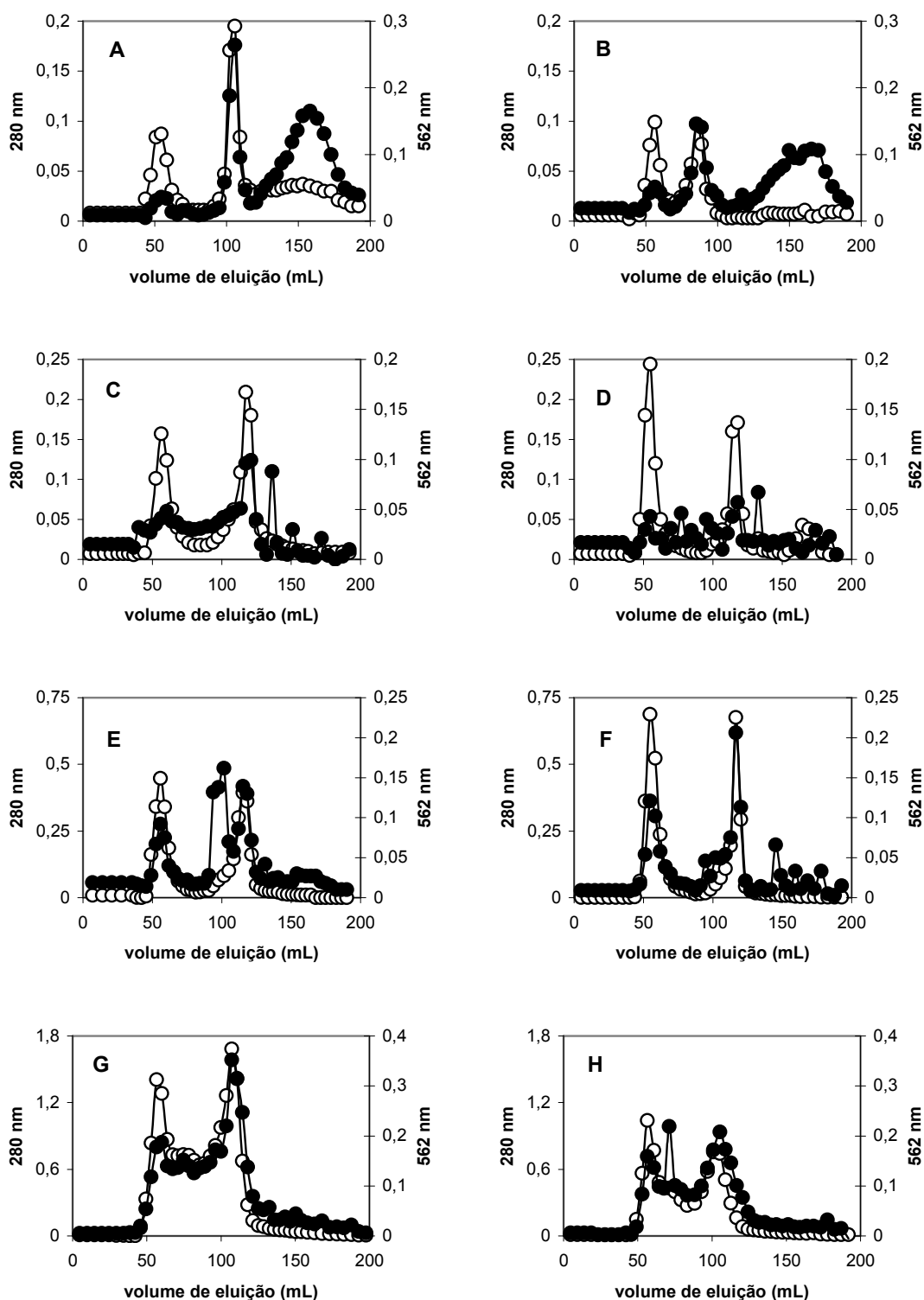


Figura 16. Cromatogramas dos extratos aquosos fracionados em uma coluna de permeação em gel monitorados em 280 nm (○) e atividade redutora de Fe^{3+} em 562 nm (●); A - madeira *in natura* não biodegradada, B - madeira extraída com etanol não biodegradada, C - madeira *in natura* biodegradada por 1 semana, D - madeira extraída com etanol biodegradada por 1 semana, E - madeira *in natura* biodegradada por 2 semanas, F - madeira extraída com etanol biodegradada por 2 semanas, G - madeira *in natura* biodegradada por 4 semanas, H - madeira extraída com etanol biodegradada por 4 semanas.

Para o extrato de madeira *in natura* não biodegradada foi realizada a determinação de carboidratos nas frações que eluíram da coluna cromatográfica. Como não foi observado nenhum pico de carboidratos coincidindo com a atividade redutora de Fe^{3+} (Figura 17), constatou-se que essa propriedade não é atribuída a polissacarídeos solúveis ou seus produtos de degradação. A relação sinal/ruído foi muito baixa indicando que o teor de açúcares no extrato deve ser muito baixo.

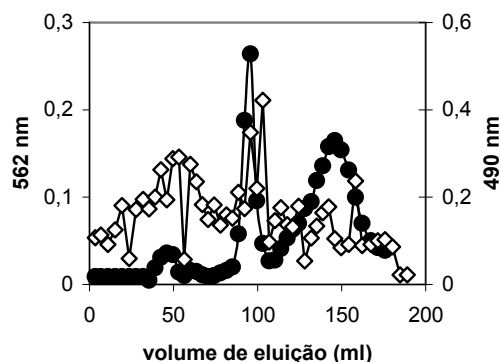


Figura 17. Cromatograma do extrato aquoso de madeira *in natura* não biodegradada fracionado na coluna de permeação em gel: atividade redutora de Fe^{3+} (562 nm; ●) e açúcares totais (490 nm; ◇).

A atividade redutora de Fe^{3+} pode providenciar Fe^{2+} para as culturas. A presença de Fe^{2+} nos cultivos ligada à produção de H_2O_2 pelo fungo pode resultar na ocorrência da reação de Fenton (AGUIAR *et al.*, 2007; GOODELL *et al.*, 1997; HAMMEL *et al.*, 2002). Os radicais OH gerados por essa reação reagem com os polissacarídeos promovendo sua despolimerização oxidativa ou hidroxilam os anéis aromáticos da lignina. O outro agente necessário na reação de Fenton, o H_2O_2 , é produzido extracelularmente por *C. subvermispora* baseado na oxidação de ácido oxálico pela MnP (URZÚA; KERSTEN; VICUÑA, 1998) ou pela oxalato-oxidase (WATANABE *et al.*, 2005). Como foram extraídas das culturas quantidades consideráveis de ácido oxálico, independente da condição de cultivo, isso demonstra que este composto não foi o limitante para a produção de H_2O_2 pela MnP. De fato, H_2O_2 foi detectado nos cultivos em níveis que variaram entre 0,3 e 5,2 mg/kg de madeira. Entretanto, o ácido oxálico pode afetar a disponibilidade de Fe^{3+} em solução e também sua redução (AGUIAR *et al.*, 2007; GOODELL *et al.*, 1997; HAMMEL *et al.*, 2002; SHIMADA *et al.*, 1997). Para avaliar tal efeito nesse trabalho, o extrato aquoso proveniente de madeira *in natura* biodegradada por 4 semanas foi analisado quanto à atividade redutora de Fe^{3+} na presença de quantidades crescentes de ácido oxálico em pH 4,5 (Figura 18). Pode-se notar que 500 μM de ácido oxálico foi suficiente para inibir 65% da atividade

redutora de Fe^{3+} promovida pelo extrato, enquanto que 1 mM desse quelante inibiu totalmente a redução de Fe^{3+} .

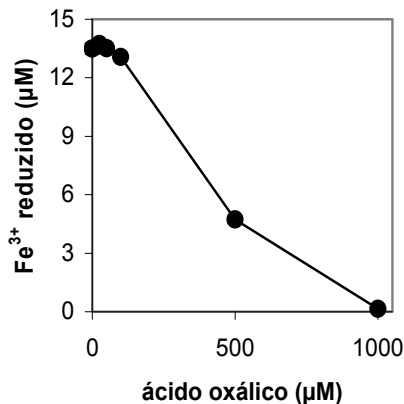


Figura 18. Efeito de ácido oxálico exógeno na atividade redutora de Fe^{3+} promovida pelo extrato aquoso de madeira *in natura* biodegradada por 4 semanas.

Considerando que a despolimerização de polissacarídeos e a hidroxilação de lignina por fungos de podridão parda têm sido observadas em vários cultivos sobre madeira (FILLEY *et al.*, 2002; HAMMEL *et al.*, 2002), é relevante notar que em culturas de *C. subvermispora* a disponibilidade de íons Fe^{2+} para a reação de Fenton deve primeiramente depender da presença de compostos redutores de Fe^{3+} presentes naturalmente na madeira ou de produtos de degradação da lignina. Entretanto, no início dos cultivos, os compostos presentes naturalmente na madeira são parcialmente consumidos pelo fungo diminuindo a atividade redutora de Fe^{3+} . Esses resultados são de grande importância, pois durante os estágios iniciais de colonização da madeira por *C. subvermispora*, a degradação fúngica dos compostos redutores de Fe^{3+} e a secreção de ácido oxálico devem ser suficientes para minimizar a reação de Fenton, explicando a degradação limitada de polissacarídeos promovida pelo fungo que também possui um sistema enzimático hidrolítico incompleto.

Embora tenham sido pequenas, as perdas de massa dos cartões de holocelulose e a diminuição de suas viscosidades coincidiram com a secreção progressiva de endoglicanases e com o aumento da atividade redutora de Fe^{3+} nos meios de cultivo. Dessa forma, é difícil definir quais foram os principais agentes envolvidos na degradação da holocelulose presente nos cultivos, sejam as enzimas hidrolíticas e/ou os radicais livres, ou ainda a ação combinada dos dois.

Apesar da perda de glicana em cultivos de *C. subvermispora* ser muito baixa, outros trabalhos realizados por nosso grupo extraíram e caracterizaram os polissacarídeos de madeiras biodegradadas. Ferraz, Córdova e Machuca (2003) isolaram a fração de

polissacarídeos de *E. grandis* biodegradado por *C. subvermispota* e observaram que o rendimento de holocelulose extraída foi semelhante entre os períodos de cultivo analisados. Entretanto, foi observada uma redução de 25 % na viscosidade de holocelulose proveniente de madeiras biotratadas por 30 dias e o rendimento de α -celulose apresentou uma queda em função do tempo de cultivo. Guerra, Mendonça e Ferraz (2003) também observaram redução de rendimento e grau de polimerização de α -celulose extraída de *P. taeda* biodegradado por esse fungo. A diminuição do rendimento de holocelulose nesse estudo foi muito baixa. Esses dados permitiram a conclusão de que esse fungo, mesmo sendo deficiente na produção de celobiohidrolases pode causar certo grau de despolimerização dos polissacarídeos presentes na parede celular de madeiras duras ou moles sem perda de massa significativa. No trabalho aqui apresentado, a maior acessibilidade das cadeias de celulose (cartões de holocelulose) às hifas permitiu a ação direta do fungo, causando queda da viscosidade e uma discreta perda de massa, mesmo em tempos de cultivo mais curtos (7-15 dias).

A extração com etanol não alterou de maneira expressiva a colonização da madeira por *C. subvermispota*. Um outro fungo de podridão branca, *G. australe*, colonizou a madeira *Drimys winteri in natura* (ELISSETCHE *et al.*, 2001) e pré-extraída com acetona (ELISSETCHE *et al.*, 2006) sem apresentar diferenças entre os dois cultivos. A partir desse estudo, pode-se concluir que os ácidos graxos presentes na madeira não são relevantes para sua colonização e para as reações de peroxidação de lipídeos, sendo que tanto *C. subvermispota* (ENOKI M. *et al.*, 1999) quanto *G. australe* (ELISSETCHE *et al.*, 2006) produzem ácidos graxos a partir de madeira livre de extrativos.

5.1.3 Caracterização de *P. taeda* biodegradado quanto a solubilidade em NaOH, rendimento de tioacidólise e características estruturais das ligninas residuais

As análises mostradas anteriormente serviram para avaliar o efeito de extrativos solúveis em etanol na biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispota*. Dando continuidade ao trabalho, outras análises importantes como a solubilidade em NaOH 1% e tioacidólise foram realizadas para as amostras de madeira *in natura*. As ligninas provenientes dessas amostras foram isoladas e caracterizadas por espectroscopia de RMN-³¹P.

Um índice comumente utilizado na indústria de celulose e papel para avaliar a qualidade de cavacos de madeira quanto à podridão é a determinação da solubilidade em NaOH 1% (TAPPI standard T212 om-02). Esse tratamento alcalino solubiliza os extrativos, a lignina e as polioses parcialmente degradados. Os valores de solubilidade em NaOH das amostras de *P. taeda* biotratadas por *C. subvermispota* estão mostrados na Figura 19. Pode ser observado que essa propriedade aumenta com o avanço do biotratamento, de 8% no

controle para 15% após 4 semanas. Esses resultados são consistentes com a degradação de lignina e polioses (Figura 10), componentes da madeira que sofreram perdas de massa mais expressivas.

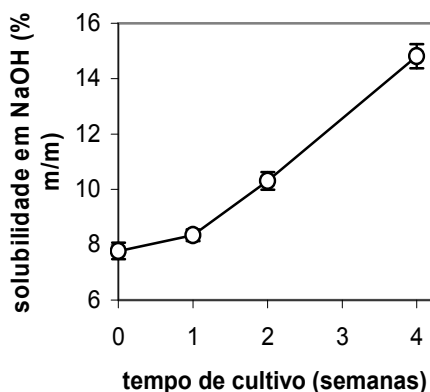


Figura 19. Solubilidade em NaOH 1 % dos cavacos de *P. taeda in natura* biodegradados por *C. subvermispora*.

Ao avaliar o efeito de autoclavagem em cultivos de *C. subvermispora* sobre *E. grandis*, Masarin (2006) observou que apenas as amostras biodegradadas por 4 semanas apresentaram maior solubilidade em NaOH 1% em relação ao controle. Choi *et al.* (2006) também observaram aumento da solubilidade em NaOH 1 M de *Populus tremuloides* biodegradado por *C. subvermispora* até 4 semanas de cultivo. Esses autores atribuíram o aumento dessa propriedade em decorrência da despolimerização de lignina, que foi comprovada por tioacidólise.

Reações de tioacidólise para madeiras de *P. taeda* biodegradadas por *C. subvermispora* foram aplicadas no presente trabalho como um método de verificação da despolimerização de lignina. Essa técnica permite quantificar as ligações do tipo β -O-4, as mais frequentes nessa macromolécula. A diminuição de rendimento de monômeros da tioacidólise pode servir de indício da despolimerização da lignina (CHOI *et al.*, 2006). A ruptura da ligação α -C β e a oxidação do carbono α também diminuem seu rendimento (ROLANDO; MONTIES; LAPIERRE, 1992). Na Figura 20 está mostrado o mecanismo de tioacidólise da lignina com a formação dos monômeros tritioetilados.

Na Figura 21 é mostrado o cromatograma dos principais produtos da tioacidólise de *P. taeda* não biodegradado (controle). O primeiro pico corresponde ao tetracosano, que foi usado como padrão interno, e o segundo corresponde aos isômeros de unidade guaiacil-propano tritioetilados. Monômeros de unidade *p*-hidroxi-fenil-propano não foram detectados, devido a sua baixa incidência em *P. taeda* (GUERRA; MENDONÇA; FERRAZ, 2002), enquanto os monômeros de unidade siringil-propano são típicos apenas de madeiras duras

e gramíneas (CHOI *et al.*, 2006; ROLANDO; MONTIES; LAPIERRE, 1992). Para todas as análises, os cromatogramas foram semelhantes quanto à presença dos produtos da tioacidólise.

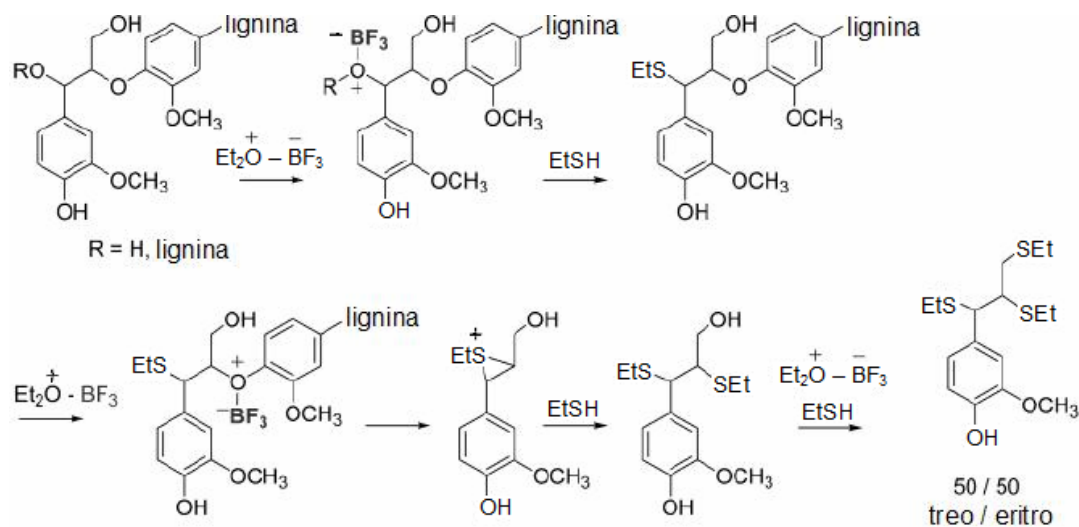


Figura 20. Mecanismo de tioacidólise de lignina.
Fonte: Holtman *et al.* (2003).

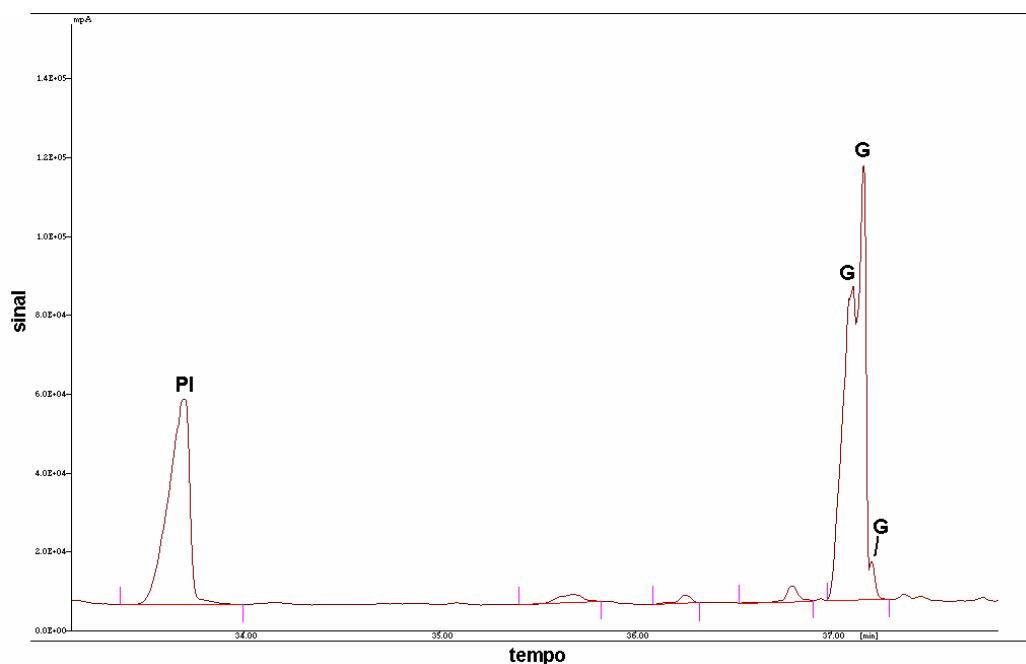


Figura 21. Cromatograma referente aos produtos da tioacidólise de *P. taeda* não biodegradado (controle); **PI** - padrão interno (tetracosano), **G** - monômeros de unidade guaiacil-propano trioetilados: os dois picos mais intensos correspondem aos monômeros eritro e treo (mostrados na Figura 20), enquanto o terceiro e menos intenso corresponde ao monômero com dois enxofres no carbono γ (ROLANDO; MONTIES; LAPIERRE, 1992).

Na Tabela 3 são mostradas as concentrações de monômeros da tioacidólise com os respectivos rendimentos em função do teor de lignina Klason para as amostras biodegradadas por 0, 1, 2 e 4 semanas. A concentração de monômeros detectada para *P. taeda* não biodegradado (controle) foi de 1024 ± 24 $\mu\text{mol/g}$ de lignina, valor próximo ao da literatura (1198 $\mu\text{mol/g}$; HOLTMAN *et al.*, 2003).

Tabela 3. Rendimento de monômeros da tioacidólise provenientes da biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispora*.

Tempo de cultivo (semanas)	Monômeros guaiacil-propano ($\mu\text{mol/g}$ de lignina Klason)*	Rendimento (% de lignina Klason)*
0	1024 ± 24	$19,2 \pm 0,5$
1	767 ± 11	$14,3 \pm 0,2$
2	723 ± 63	$13,5 \pm 1,2$
4	530 ± 28	$9,9 \pm 0,5$

* As incertezas indicadas correspondem ao desvio da média para determinações em duplicata.

O rendimento de monômeros tritioetilados diminuiu com o tempo de cultivo (Figura 22), corroborando trabalhos prévios que mostraram a quebra de ligações β -O-4 em ligninas provenientes de madeiras biodegradadas por *C. subvermispora* (GUERRA *et al.* 2004; GUERRA; MENDONÇA; FERRAZ, 2002; VICENTIM, 2007). Esses autores verificaram diminuição do rendimento de monômeros provenientes do DFRC (“derivatization followed reductive cleavage”), outra técnica que verifica o teor de ligações β -O-4 em ligninas.

A diminuição do rendimento de monômeros da tioacidólise foi bastante expressiva na primeira semana de cultivo. Ao final de 4 semanas, metade do rendimento em relação ao controle foi detectado. As perdas de lignina observadas para essas amostras também aumentaram com o tempo de cultivo. Em apenas 1 semana de cultivo houve perda de lignina menor que 1% enquanto o teor de ligações β -O-4 caiu de 19,2 para 14,3%. Com 2 semanas, a perda de lignina ainda se manteve baixa (3%), demonstrando que a despolimerização de lignina nesse período não é seguida de sua mineralização. Após 4 semanas, a perda de lignina atingiu em torno de 12% quando metade das ligações β -O-4 haviam sido clivadas (Figura 22).

Guerra, Mendonça e Ferraz (2002), também observaram metade do rendimento de monômeros de DFRC de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora* após 4 semanas. Após 60 e 90 dias de biodegradação o rendimento de DFRC manteve-se constante, devido à maior condensação da lignina residual. Para as ligninas isoladas dos mesmos cultivos (ligninas de madeira moída), foi observada redução de 15% para 12% no rendimento de DFRC (GUERRA *et al.*, 2004). Por RMN de próton (RMN-H) esses mesmos autores

observaram diminuição do sinal de H β em unidades β -O-4, o que mostrou também ser uma evidência de quebra de ligação β -O-4. Por RMN- ^{13}C não foram encontradas evidências de ruptura de ligação C α -C β e oxidação do carbono α .

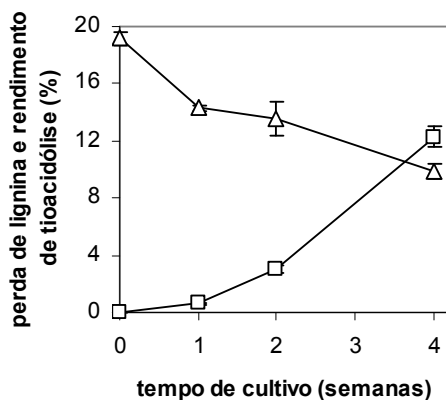


Figura 22. Perda de lignina (□) e rendimento de monômeros da tioacidólise (Δ) provenientes da biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispota*.

Além de determinar a despolimerização por tioacidólise, outros grupos funcionais presentes na lignina foram quantificados a partir da caracterização de ligninas isoladas por espectroscopia de RMN- ^{31}P . Essa técnica permite quantificar o teor de OH alifáticas, OH fenólicas condensadas e não condensadas e carboxilas. Em todos os casos, as hidroxilas em questão são derivatizadas pela ação de um reagente fosfitilante (reagente 2; GRANATA; ARGYROPOULOS, 1995). A relação eritro/treo de ligações β -O-4 também pode ser determinada por essa técnica ao se derivatizar as ligninas com um outro reagente fosfitilante (reagente 1; ARGYROPOULOS, 1994). Na Figura 23 está esquematizado o mecanismo de derivatização dos grupos OH presentes na lignina pelos reagentes de fosfitilação.

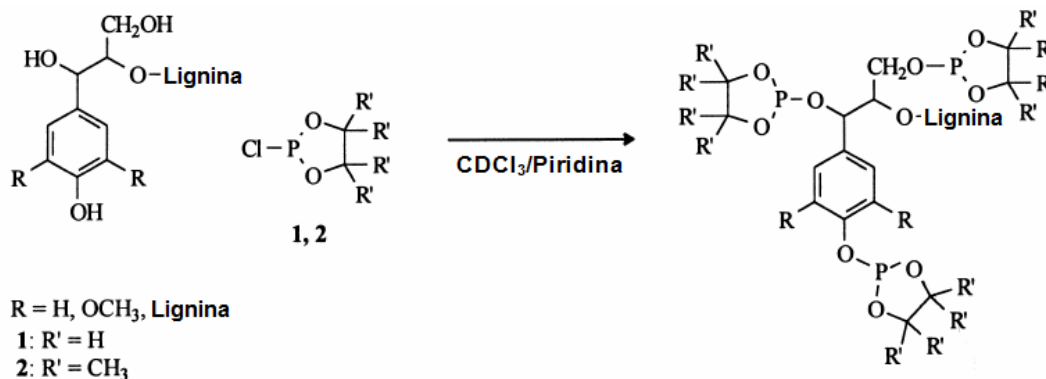


Figura 23. Mecanismo de fosfitilação de grupos OH presentes na lignina por 2-cloro-1,3,2-dioxafosfolano (reagente 1) ou por 2-cloro-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxafosfolano (reagente 2).

Fonte: Crestini, Sermanni e Argyropoulos (1998).

Na Figura 24 estão mostrados os espectros de RMN-³¹P das ligninas derivatizadas com o reagente 2 provenientes de *P. taeda* não biodegradado (controle) e biodegradado por 4 semanas. Os picos referentes aos grupos OH da lignina apresentaram boa resolução, inclusive o padrão interno. Todos os espectros foram semelhantes quanto à presença dos grupos funcionais a serem quantificados.

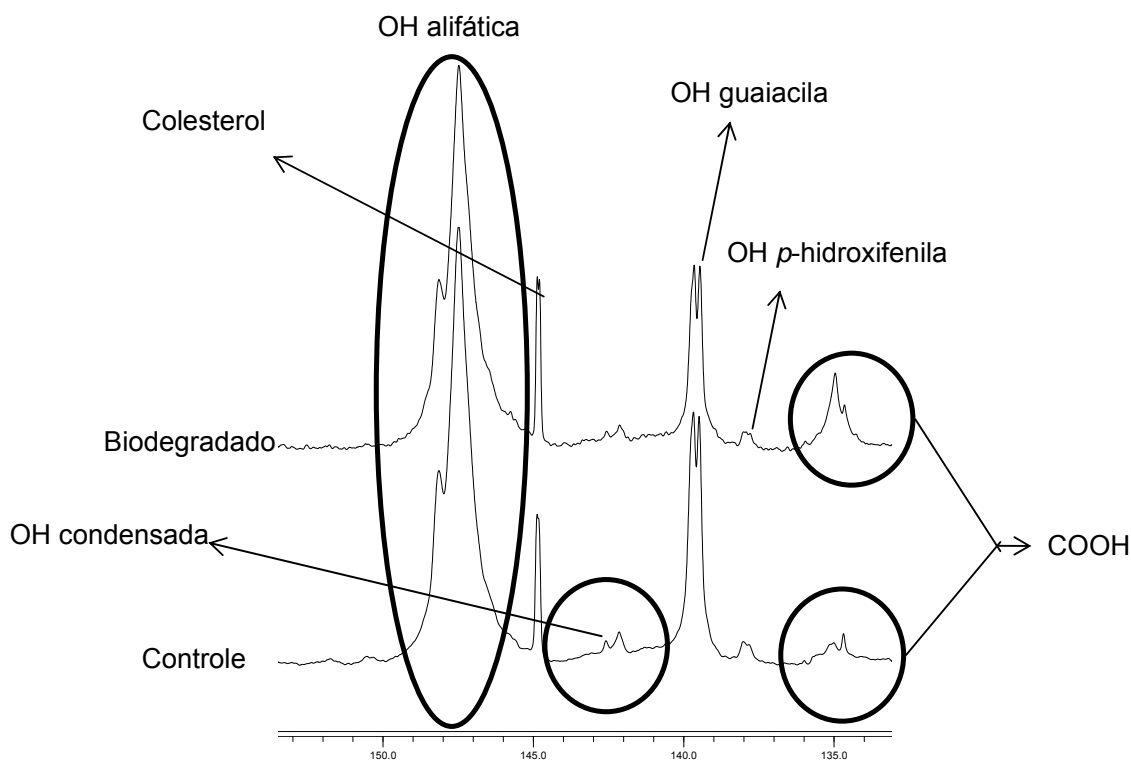


Figura 24. Espectros de RMN-³¹P recuperados de ligninas isoladas de cavacos de *P. taeda* não biodegradado (controle) e biodegradado por *C. subvermispora* após 4 semanas.

Na Tabela 4 estão mostrados os teores dos grupos funcionais das ligninas quantificados por RMN-³¹P com o reagente de fosfitilação 2, além do rendimento de isolamento por acidólise branda. O rendimento de lignina da madeira não biodegradada (controle) foi de 14,5% aumentando muito pouco nas madeiras biodegradadas por 1 e 2 semanas. A lignina proveniente de madeira biodegradada por 4 semanas apresentou o mais alto rendimento, 20,3%. Esse maior rendimento pode ser devido ao menor grau de polimerização dessa amostra, conforme constatado pelo menor rendimento de tioacidólise (Tabela 3).

Os teores de OH alifáticas e OH fenólicas condensadas e não condensadas mantiveram-se constantes até 1 semana, mas diminuíram após 2 semanas. Ao final de 4 semanas os valores permaneceram similares em relação as amostras de 2 semanas, ou

seja, as principais alterações na lignina ocorreram entre a primeira e a segunda semana de fermentação. Ao contrário desses grupos funcionais, o teor de carboxilas aumentou continuamente ao longo do biotratamento (Tabela 4).

Tabela 4. Conteúdo de grupos funcionais determinados por espectroscopia de RMN-³¹P quantitativa de ligninas-dioxano provenientes da biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispora* e rendimento de isolamento das ligninas (baseado no teor de lignina Klason).

Grupos funcionais (µmol/g)*	Tempo de cultivo (semanas)			
	0	1	2	4
OH alifática	4380 ± 50	4270 ± 50	3970 ± 50	3960 ± 50
OH fenólica em unidade guaiacila não condensada	1340 ± 20	1300 ± 20	1020 ± 20	940 ± 20
OH fenólica em unidade <i>p</i> -hidroxifenila não condensada	90 ± 5	80 ± 5	60 ± 5	50 ± 5
total de OH fenólicas não condensadas	1430 ± 20	1380 ± 20	1080 ± 20	990 ± 20
OH fenólica condensada	420 ± 10	420 ± 10	250 ± 10	270 ± 10
total de OH fenólicas	1850 ± 20	1800 ± 20	1330 ± 20	1260 ± 20
carboxila	130 ± 5	140 ± 5	240 ± 5	410 ± 5
rendimento de lignina isolada (% m/m)	14,5	15,5	15,7	20,3

* As incertezas indicadas correspondem ao desvio-padrão para determinações em triplicata com uma amostra de eucalipto.

Geng e Ling (2002) também observaram aumento do teor de grupos carboxilas por espectroscopia de RMN-³¹P a partir de ligninas biodegradadas pelo fungo de podridão branca *P. cinnabarinus*. Tanto lignina fenólica quanto uma preparação da mesma lignina metilada (não fenólica) apresentaram aumento no teor de grupos carboxilas depois de 3 meses de cultivo. De acordo com esses autores, os grupos carboxilas são intermediários da biodegradação de lignina por fungos de podridão branca, o que foi corroborado com os dados obtidos na presente tese. Guerra *et al.* (2004) não detectaram carboxilas e carbonilas em ligninas de madeira moída provenientes de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora*. Nesse caso as ligninas foram caracterizadas por RMN-¹³C de rotina e por espectroscopia de infravermelho que não correspondem às técnicas mais sensíveis para a detecção inequívoca dessas subestruturas em lignina.

Nas ligninas fenólicas biodegradadas por *P. cinnabarinus* também foi observada diminuição das OH fenólicas (GENG; LI, 2002), conforme também observado no presente trabalho para *C. subvermispora* (Tabela 4). Entretanto, OH alifáticas não se alteraram

significativamente para a preparação de lignina fenólica, enquanto para lignina metilada o teor desses grupos aumentou (GENG; LI, 2002), diferente dos resultados observados para *C. subvermispota* (Tabela 4).

Crestini, Sermanni e Argyropoulos (1998) também utilizaram RMN-³¹P para caracterização de lignina de palha de trigo biodegradada pelo fungo de podridão branca *Lentinula edodes*. A diminuição de OH fenólicas guaiacila e *p*-hidroxifenila e aumento de grupos carboxila foram atribuídos pelos autores à abertura de anel aromático. Esses autores atribuíram à diminuição de OH alifáticas e aumento de carboxilas como decorrentes da oxidação da cadeia lateral. Nesse caso, os teores de OH condensadas e OH fenólicas de unidades siringila não sofreram alteração.

As ligninas provenientes do controle e também da amostra biodegradada por *C. subvermispota* após 4 semanas foram analisadas por RMN-³¹P com o reagente 1 para verificar se esse fungo degrada seletivamente estruturas β -O-4 eritro ou treo na lignina. Entretanto, as ligninas isoladas apresentaram a mesma proporção de tais isômeros após 4 semanas de fermentação. Crestini, Sermanni e Argyropoulos (1998) observaram que o fungo *L. edodes* preferencialmente degradou estruturas β -O-4 eritro. Bohlin *et al.* (2007) avaliaram recentemente a degradação enzimática e não enzimática de compostos diastereoisômeros modelo de lignina β -O-4. Reagentes Fenton ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$) degradaram na mesma proporção os diastereoisômeros, enquanto a LiP oxidou preferencialmente a forma treo. Lacase/ABTS foi o único sistema oxidativo que atacou preferencialmente a forma eritro, enquanto os outros mediadores dessa enzima utilizados degradaram preferencialmente a forma treo. Nesse trabalho não foi verificado o tratamento com a MnP.

A degradação de OH fenólicas na lignina por *C. subvermispota* pode ser causada por Mn^{3+} -oxalato proveniente do ciclo catalítico da MnP. Esse complexo tem potencial de oxidação suficiente para degradar apenas estruturas fenólicas, enquanto para as porções não fenólicas, o mecanismo de oxidação deve consistir da formação de radicais livres oriundos da peroxidação de lipídeos. Kapich, Jensen e Hammel (1999) mostraram que a formação de radicais peroxila proveniente da peroxidação de ácido linoléico por $\text{Mn}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{MnP}$ de *C. subvermispota* foi capaz de promover a oxidação de C α , ruptura de ligações β -O-4 e C α -C β e a conseqüente formação de ácidos benzóicos a partir de um composto modelo de lignina β -O-4. Daina *et al.* (2002) estudaram a degradação de um composto modelo β -5 por esse mesmo fungo, identificando a formação de ácidos benzóicos que serve como indicio de ruptura de ligações C α -C β . Essas alterações com compostos modelo também foram observadas nas ligninas provenientes da biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispota* no presente trabalho.

5.2 Comparação entre *C. subvermispora* e os fungos *G. trabeum* e *T. versicolor* na biodegradação de madeira e de cartões de holocelulose

Nos cultivos mostrados anteriormente, mesmo sobre fibras de celulose livres de lignina (holocelulose), o fungo de podridão branca *C. subvermispora* causou uma perda de massa insignificante após 4 semanas (4% m/m - Figura 11). Entretanto, houve perda de viscosidade da holocelulose indicando que a mesma sofreu despolimerização, principalmente na primeira semana de cultivo, quando foram detectadas baixas atividade redutora de Fe^{3+} e produção de enzimas hidrolíticas. Em vista desses resultados, outros dois fungos decompositores de madeira, *G. trabeum* e *T. versicolor*, foram cultivados sobre cavacos de *P. taeda* por 4 semanas na presença de cartões de holocelulose. Esses fungos apresentam comportamentos degradativos da madeira bastante distintos de *C. subvermispora*, sendo então estudados para efeito de comparação. O primeiro é um fungo de podridão parda que degrada preferencialmente polissacarídeos (FILLEY *et al.*, 2002; GOODELL *et al.*, 1997; HAMMEL *et al.*, 2002) enquanto o segundo é um fungo de podridão branca que degrada simultaneamente todos os constituintes da madeira (FERRAZ *et al.*, 2000; MACHUCA; FERRAZ, 2001).

Visualmente, foi observado o crescimento fúngico de *G. trabeum* a partir da segunda semana de cultivo, enquanto para *T. versicolor* o crescimento foi discreto, mesmo após 4 semanas. *C. subvermispora* apresentou maior crescimento comparado a esses dois outros basidiomicetos.

As principais enzimas produzidas por *G. trabeum* e *T. versicolor* foram as xilanases. Do complexo celulolítico, as endoglicanases e β -glicosidases foram produzidas em maior quantidade por *T. versicolor*. Atividades de celobiohidrolases foram muito baixas em todas as culturas, da mesma forma que ocorreu com *C. subvermispora*. Atividades de celulases totais foram bem baixas e sem diferenças entre os dois fungos (Tabela 5). De um modo geral, a produção de enzimas hidrolíticas por *C. subvermispora* foi maior (Tabela 2). A produção de lacases e peroxidases (MnP e LiP) por *T. versicolor* inesperadamente não foi constatada. Tanaka, Itakura e Enoki A. (1999) detectaram atividades de LiP, MnP, lacase e endoglicanase durante a biodegradação de *Fagus crenata* por esse fungo, enquanto as atividades de celobiohidrolases foram bem baixas. Lekounougou *et al.* (2008) observaram produção de lacase por *T. versicolor* cultivado sobre madeira de *Fagus sylvatica* com extrato de malte como co-substrato, o que estimulou a produção dessa enzima e reprimiu a produção de peroxidases, conforme sugerido pelos autores. Machuca e Ferraz (2001) detectaram a produção de lacases e peroxidases durante a biodegradação de *E. grandis* na presença de extrato de malte pela mesma cepa de *T. versicolor* utilizada no presente trabalho. Mäkelä *et al.* (2002) também detectaram produção de MnP, mas não LiP, durante

a biodegradação de *Picea abies* por esse fungo. A presença de lacase só foi confirmada após 30 dias de fermentação.

Tabela 5. Atividades enzimáticas hidrolíticas provenientes da biodegradação de *P. taeda* por *G. trabeum* (Gt) e *T. versicolor* (Tv).

Atividades enzimáticas (UI/kg de madeira)	Fungo	Tempo de cultivo (semanas)		
		1	2	4
Celulases totais	Gt	13 ± 12	37 ± 21	7 ± 4
	Tv	29 ± 22	17 ± 14	29 ± 17
Endoglicanase	Gt	0	10 ± 12	30 ± 5
	Tv	60 ± 10	98 ± 23	93 ± 7
Celobioidrolase	Gt	4 ± 2	13 ± 4	0
	Tv	2 ± 1	0	0
β-glicosidase	Gt	14 ± 2	37 ± 8	30 ± 4
	Tv	11 ± 1	54 ± 10	49 ± 8
Xilanases	Gt	146 ± 35	322 ± 11	1203 ± 647
	Tv	94 ± 64	300 ± 199	231 ± 174

Lacase é produzida por *C. subvermispora* apenas nos estágios iniciais de colonização (Lobos *et al.*, 1994; Tabela 2 - esse trabalho), mas na presença de extrato de malte (co-substrato) em cultivos sobre madeira, Ferraz, Córdova e Machuca (2003) observaram produção dessa enzima em estágios mais avançados. Para *T. versicolor*, a produção dessa enzima pode ser também estimulada por co-substratos de fácil assimilação (LEKOUNOUGOU *et al.*, 2008; MACHUCA; FERRAZ, 2001). A não detecção de lacases nas culturas de *T. versicolor* poderia ser afetada pelo pH do meio durante o ensaio. Schlosser, Grey e Fritsche (1997) ao estudar o efeito do pH e do substrato para medir atividade de lacase produzida por esse fungo, observaram maior atividade em pH 3,5 e menor em pH 5 utilizando ABTS como substrato, o qual foi aplicado no presente trabalho. Com relação à LiP, a presença de compostos fenólicos nos caldos enzimáticos poderia interferir no ensaio de detecção dessa enzima. Nos caldos enzimáticos provenientes da biodegradação de *E. grandis* por *P. chrysosporium*, a detecção dessa enzima foi negativa (MASARIN, 2006). Silva, Martins e Milagres (2007) demonstraram que a atividade de LiP purificada de *P. chrysosporium* é anulada na presença de fenóis oriundos da madeira.

Embora a produção de fenoloxidasas por *T. versicolor* não ter sido observada durante a biodegradação de *P. taeda*, Arantes e Milagres (2007) detectaram lacase e MnP em culturas líquidas com essa mesma cepa de *T. versicolor* a partir de extrato de malte e

dextrose de batata como substratos. LiP e CDH não foram encontradas. Dessa forma, assim como para tantos outros fungos, o substrato deve regular a secreção de enzimas por esse fungo.

Para *G. trabeum* também não foi observada produção de fenoloxidasas, conforme já se esperaria, pois fungos de podridão parda não as produzem (HAMMEL *et al.*, 2002; MACHUCA; FERRAZ, 2001). A produção de endoglicanase, β -glicosidase e xilanase por esse fungo foi reportada recentemente por Cohen, Suzuki e Hammel (2005). Esses autores e também Kaneko *et al.* (2005) não observaram produção de celobioidrolase.

A perda de massa da madeira observada após 1 semana foi de 5% para os dois fungos, mantendo-se constante até 2 semanas e alcançando 7% ao final de 4 semanas de fermentação (Figuras 25A e B). Apesar de não se detectar atividades de fenoloxidasas nos cultivos desses dois basidiomicetos, foi observada perda de lignina, atingindo 7-8%. O componente que sofreu maior perda de massa foram as polioses, principalmente nos cultivos com *G. trabeum*. Esse fungo também degradou eficientemente celulose, demonstrando ser um típico fungo de podridão parda, que degrada preferencialmente os polissacarídeos. Após 2 semanas de cultivo, houve aumento apenas na degradação de lignina por *G. trabeum*, enquanto a perda de polissacarídeos manteve-se constante (Figura 25A). A degradação de lignina por *G. trabeum* foi observada por Filley *et al.* (2002) consistindo na desmetoxilação e hidroxilação de anéis aromáticos. Além dessas alterações, radicais OH produzidos por fungos de podridão parda também causam oxidação do carbono α e clivagem de ligações β -O-4 em lignina (HAMMEL *et al.*, 2002). A degradação de um composto modelo de lignina β -O-4 por *G. trabeum* foi observada recentemente (KANEKO *et al.*, 2005). Embora o ensaio de detecção de CDH nos cultivos de *T. versicolor* não ter sido realizado, a degradação de lignina observada no presente trabalho poderia ser atribuída a essa enzima (HENRIKSSON; JOHANSSON; PETTERSSON, 2000), a LiP (caso ocorra interferência de fenóis durante o ensaio de detecção) ou aos radicais OH, encontrados anteriormente em culturas desse fungo (TANAKA; ITAKURA; ENOKI A., 1999).

Embora a perda de polissacarídeos da madeira tenha sido mais intensa nos cultivos com *G. trabeum*, *T. versicolor* foi mais eficiente na mineralização dos cartões de holocelulose (Figura 26). Ao final de 4 semanas, a diminuição de viscosidade dos cartões tratados por *G. trabeum* e *T. versicolor* foi similar (Figura 26) e mais intensa em comparação a *C. subvermispota* (Figura 11).

Espejo e Agosin (1991) também observaram efetiva despolimerização de holocelulose em culturas semi-sólidas de fungos de podridão parda, principalmente por *G. trabeum*. Apesar de ter causado perda de massa significativa, a despolimerização de

holocelulose por *T. versicolor* foi bem baixa (ESPEJO; AGOSIN, 1991) resultado diferente do observado no presente trabalho (Figura 26).

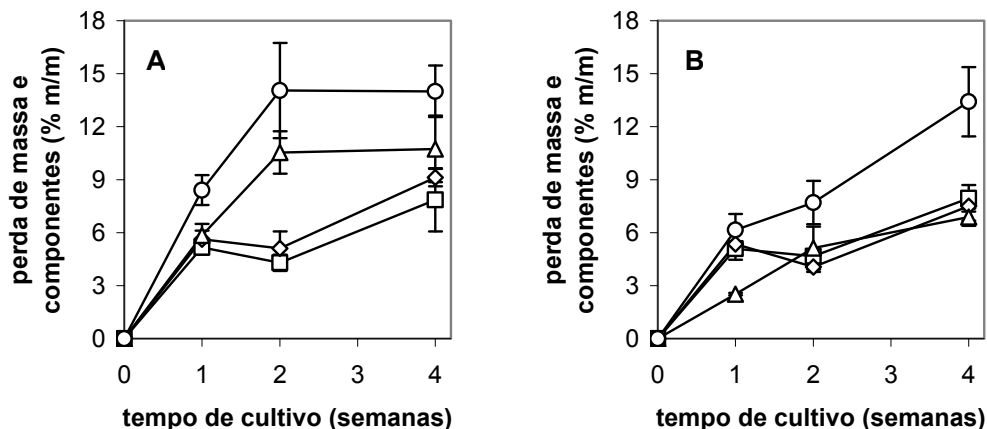


Figura 25. Perdas de massa e de componentes provenientes da biodegradação de *P. taeda* por *G. trabeum* (A) e *T. versicolor* (B): massa (□), glicana (△), polioses (○) e lignina (◇).

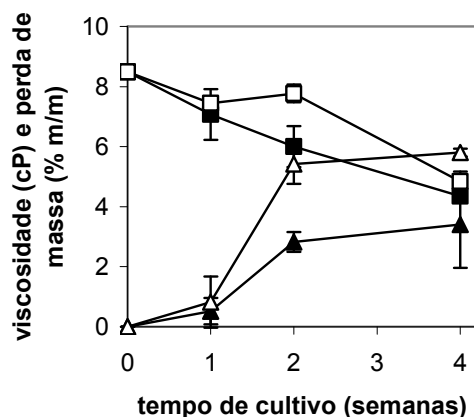


Figura 26. Viscosidade (quadrados) e perdas de massa (triângulos) dos cartões de holocelulose incluídos nas culturas de *G. trabeum* (símbolos cheios) e *T. versicolor* (símbolos vazios) sobre cavacos de *P. taeda*.

A produção de ácido oxálico também foi verificada nos cultivos desses dois fungos, mas apenas na extração alcalina foram constatados teores significativos. Para *G. trabeum*, o teor máximo de ácido oxálico foi observado na primeira semana de cultivo, enquanto para *T. versicolor* a produção desse composto foi crescente ao longo do tempo de cultivo (Figura 27). Comparando com *C. subvermispora*, esses dois fungos produziram quantidades significativamente inferiores de ácido oxálico. Fungos de podridão parda são conhecidos por produzir quantidades expressivas de ácido oxálico para quelação e solubilização de ferro para fomentar a reação de Fenton (GOODELL *et al.*, 1997; HAMMEL *et al.*, 2002).

Entretanto, Espejo e Agosin (1991) mostraram que *G. trabeum* produziu as mais baixas quantidades de ácido oxálico dentre os fungos de podridão parda avaliados na ocasião. Esses autores sugeriram que quanto maior a produção de ácido oxálico, menor a habilidade do fungo em degradar polissacarídeos. No presente trabalho, os resultados não foram diferentes, pois esse fungo produziu ácido oxálico em quantidades mínimas e eficientemente despolimerizou a holocelulose. Kaneko *et al.* (2005) também não observaram produção significativa de ácido oxálico por *G. trabeum* em culturas contendo glicose ou madeira como fontes de carbono. Esses autores e também Espejo e Agosin (1991) sugeriram que a baixa produção de ácido oxálico detectada em culturas de fungos de podridão parda é decorrente de sua oxidação por radicais OH.

Espejo e Agosin (1991) verificaram baixíssima produção de ácido oxálico solúvel por *T. versicolor*, enquanto em outros trabalhos da literatura, a produção desse composto por esse fungo em culturas líquidas foi significativa (GALKIN *et al.*, 1998; MÄKELÄ *et al.*, 2002). O baixo teor de ácido oxálico livre observado no presente trabalho (Figura 27B) poderia resultar da ação da enzima extracelular oxalato-descarboxilase (MÄKELÄ *et al.*, 2002) ou por radicais OH (TANAKA; ITAKURA; ENOKI A., 1999) presentes em culturas desse fungo.

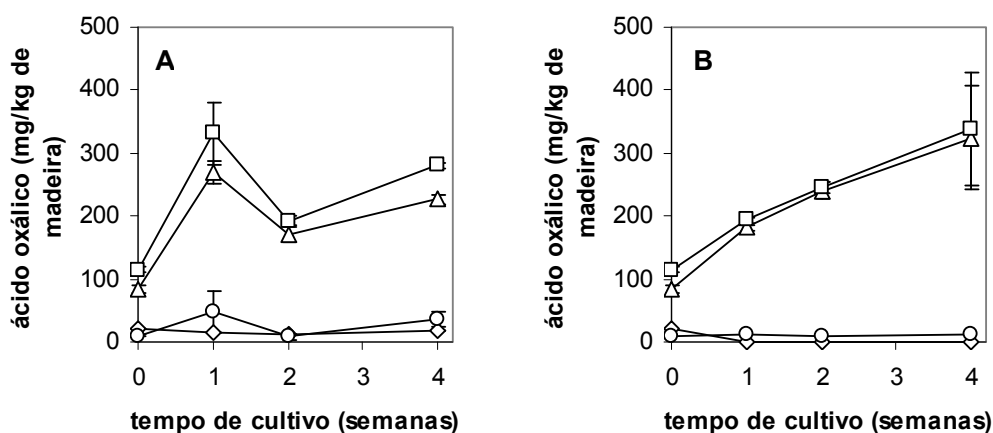


Figura 27. Teor de ácido oxálico solúvel (◇), extraído com HCl 0,1 M (○), extraído com NaOH 0,1 M (△) e o total (□) proveniente da biodegradação de *P. taeda* por *G. trabeum* (A) e *T. versicolor* (B).

Em virtude da baixa produção de ácido oxálico livre por esses dois fungos, uma diminuição de pH muito discreta foi observada a partir da segunda semana de cultivo para *T. versicolor*, enquanto para *G. trabeum* não houve alteração (Figura 28A).

A solubilidade em NaOH 1% dos cavacos biodegradados por esses dois fungos aumentou a partir da primeira semana de biotratamento, porém não ultrapassou o valor de 10% após 4 semanas de cultivo (Figura 28B). Por outro lado, nos cultivos com *C.*

subvermispora, a solubilidade em NaOH foi crescente a partir de 2 semanas de biotratamento e atingiu cerca de 15% após 4 semanas (Figura 19).

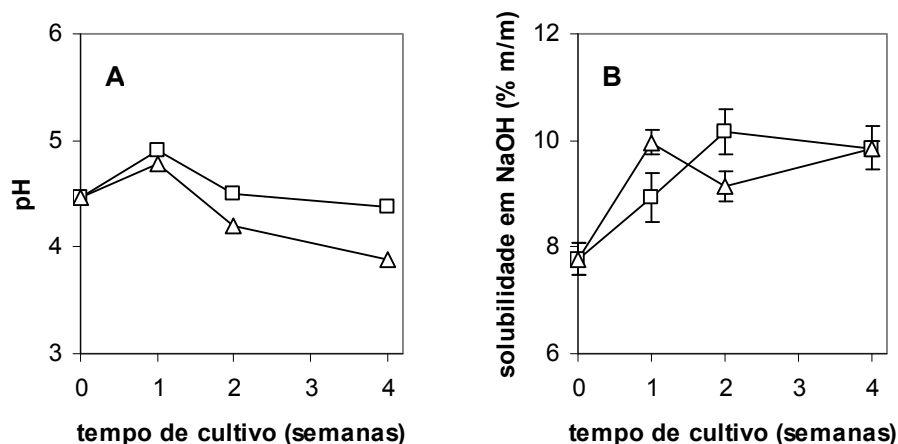


Figura 28. Valores de pH dos extratos aquosos (A) e solubilidade em NaOH 1% (B) provenientes da biodegradação de *P. taeda* por *G. trabeum* (□) e *T. versicolor* (△).

A atividade redutora de Fe^{3+} nos cultivos de *G. trabeum* aumentou na primeira semana para logo diminuir ao longo das 4 semanas subsequentes (Figura 29A). O teor de catecóis totais diminuiu em relação ao controle, mas quantidades ainda significativas foram detectadas nas amostras biodegradadas (Figura 29B). Dessa forma, não existiu uma correlação entre atividade redutora de Fe^{3+} e catecóis totais nos cultivos com *G. trabeum*. É sabido que *G. trabeum* produz dois compostos redutores de Fe^{3+} , 2,5-dimetóxi-hidroquinona e 4,5-dimetóxi-catecol (HAMMEL *et al.*, 2002; KEREM; JENSEN; HAMMEL, 1999; PASZCZYNSKI *et al.*, 1999), sendo que esse último pode ser detectado pelo ensaio de determinação de catecóis totais (ARNOW, 1937). A diminuição da atividade redutora de Fe^{3+} nos cultivos com *G. trabeum* (após 2 semanas) não poderia ser atribuída ao ácido oxálico livre, cujo teor foi inexpressivo, mas talvez a outros compostos quelantes que não foram identificados.

O perfil de atividade redutora de Fe^{3+} por *T. versicolor* foi mais parecido com o perfil desenvolvido por *C. subvermispora*, que consistiu numa diminuição na primeira semana seguida de um aumento ao longo do cultivo (Figura 29A). Porém, as amostras biotratadas por *T. versicolor* apresentaram menor atividade redutora que o controle. O teor de catecóis totais diminuiu com o tempo (Figura 29B), sem apresentar correlação com a atividade redutora de Fe^{3+} . Dessa forma, o aumento discreto de atividade redutora dos extratos aquosos pode ser devido aos produtos de degradação da lignina, conforme atribuído para *C. subvermispora*. Tanaka, Itakura e Enoki A. (1999) demonstraram que *T. versicolor* produz

uma substância de baixa massa molar (1-5 kg/mol), provavelmente um glicopeptídeo com atividade redutora de Fe^{3+} (ENOKI A.; TANAKA; ITAKURA, 2003). Arantes e Milagres (2007) conseguiram detectar derivados do catecol, mas não peptídeos de baixa massa molar em culturas líquidas desse fungo. A atividade redutora de Fe^{3+} avaliada nessas culturas foi muito baixa (ARANTES; MILAGRES, 2007).

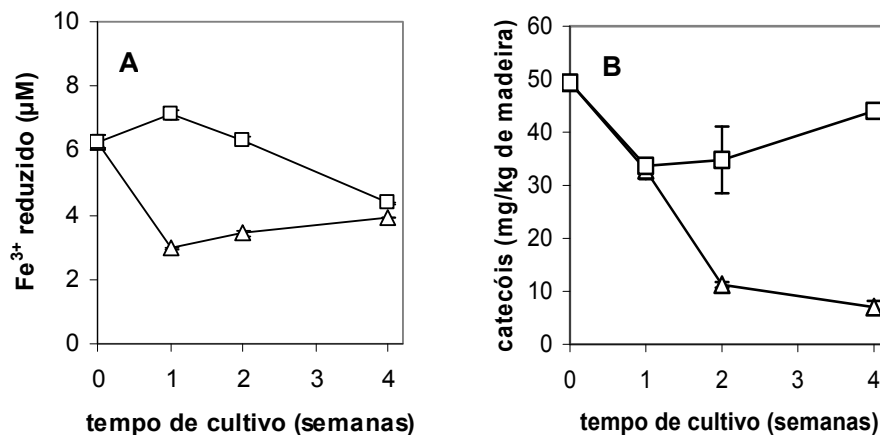


Figura 29. Atividade redutora de Fe^{3+} (A) e teor de catecóis totais (B) presentes nos extratos aquosos provenientes da biodegradação de *P. taeda* por *G. trabeum* (□) e *T. versicolor* (△).

Recentemente, Goodell *et al.* (2006) avaliaram a atividade redutora de Fe^{3+} de extratos aquosos (filtrados com membrana de corte de 5 kg/mol) provenientes da biodegradação de *Betula verrucosa* e *Pinus sylvestris* por várias espécies de fungos após 4 meses. A maioria dos fungos de podridão parda, incluindo *G. trabeum*, foi mais eficiente na atividade redutora que os fungos de podridão branca. *T. versicolor* apresentou atividade redutora significativa em relação aos outros fungos de podridão branca estudados. Para *C. subvermispora*, foi observada baixa atividade redutora de Fe^{3+} , diferentemente dos resultados mostrados no presente trabalho, que mostrou que esse fungo gerou a maior atividade redutora após 4 semanas de cultivo sobre *P. taeda*. Essa alta atividade redutora de Fe^{3+} provavelmente está associada a maior degradação de lignina, que libera derivados aromáticos solúveis nos extratos aquosos. A degradação desse constituinte da madeira resulta em alguns produtos de unidade guaiacila que possuem caráter redutor, como a vanilina e o ácido vanílico (AGUIAR; SOUZA-CRUZ; FERRAZ, 2006). Deve ser ressaltado que as cepas utilizadas por Goodell *et al.* (2006) foram outras e durante os ensaios realizados por eles, a ferrozina foi adicionada no início das reações de redução de ferro e não depois, conforme foi realizado no presente trabalho. De acordo com Horta (2007), os valores de atividade redutora de Fe^{3+} promovida por extratos aquosos de madeiras

biodegradadas são diferentes quanto à adição de ferrozina no início ou após a reação. Ao adicionar ferrozina no início das reações, ocorre deslocamento do equilíbrio $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ para a direita, devido aos compostos fenólicos redutores presentes nos extratos aquosos. Esses extratos aquosos possuem diversos quelantes que aumentam o potencial de redução de $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$.

A partir do estudo comparativo entre *C. subvermispota* e as duas espécies avaliadas nesse tópico, pode-se constatar que o ácido oxálico livre não foi essencial para a degradação de holocelulose e madeira, tanto para *G. trabeum* quanto para *T. versicolor*. Para *C. subvermispota*, pode ser considerada uma correlação entre a produção de ácido oxálico e a perda de massa e a diminuição da viscosidade da holocelulose com o avanço do biotratamento. *C. subvermispota* foi mais agressivo na biodegradação de *P. taeda*, mas não dos cartões de holocelulose. Esse fungo produziu mais metabólitos e conseqüentemente causou maior degradação dos constituintes da madeira.

5.3 Efeito de cálcio exógeno na biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispota*

Durante a biodegradação de madeira, *C. subvermispota* produz uma série de enzimas e compostos de baixa massa molar responsáveis pelo processo degradativo. Esse metabolismo está sujeito à influência do meio externo e os íons Ca^{2+} apresentam um papel relevante, uma vez que eles podem precipitar o ácido oxálico secretado pelo fungo (AKHTAR *et al.*, 1998). Esse ácido orgânico é considerado o quelante fisiológico de Mn^{3+} , oriundo do ciclo catalítico da MnP (HOFRICHTER, 2002).

O efeito do ácido oxálico e dos íons cálcio na atividade da MnP de *C. subvermispota* foi inicialmente avaliado a partir de um caldo enzimático proveniente da biodegradação de *P. taeda* por 2 semanas. Esse caldo possuía atividade de MnP que foi ensaiada pelo método tradicional (KUWAHARA *et al.*, 1984) e também por métodos modificados que tomaram como base a substituição das substâncias quelantes do método tradicional (lactato e succinato) por ácido oxálico em concentrações variadas (Figura 30A). Na ausência de quelantes, não foi observada atividade enzimática. Com a adição de ácido oxálico aos ensaios, a atividade de MnP voltou a ser detectável e atingiu um valor máximo quando a concentração desse quelante foi de 1,5 mM. MnP purificada de *P. chrysosporium* também apresenta uma atividade máxima com ácido oxálico na faixa de concentrações entre 1 e 2 mM (KISHI *et al.*, 1994). Acima de 2 mM, o ácido oxálico inibiu totalmente a atividade da enzima (Figura 30A), provavelmente devido a complexação intensa de Mn^{2+} (KISHI *et al.*, 1994). A faixa de concentração de ácido oxálico (1-2 mM) que levou a máxima atividade de MnP nos ensaios *in vitro* com o caldo enzimático, coincide com os valores de oxalato total

(solúvel e extraído com ácido) usualmente encontrados em cultivos de *C. subvermispora* sobre madeira (AGUIAR, SOUZA-CRUZ; FERRAZ; 2006).

A atividade da MnP foi ainda verificada na presença de 1,5 mM de ácido oxálico e concentrações variadas de Ca^{2+} (Figura 30B). A adição desse cátion promoveu a precipitação de oxalato de cálcio e conseqüentemente causou à turbidez do meio reacional, interferindo nos valores absolutos de absorbância medidos. Dessa forma, a determinação exata das atividades de MnP não foi possível, mas a Figura 30B ilustra o aumento de absorbância em 610 nm que corresponde ao produto de oxidação do vermelho de fenol em meio fortemente alcalino, em função do tempo de reação em cada caso. Pode-se notar claramente que em concentrações de Ca^{2+} de até 1,5 mM ainda era possível detectar atividade de MnP (curvas com valores de absorbância crescentes em função do tempo de reação). Porém, com concentrações mais elevadas (3 e 4,5 mM) houve inibição completa da reação, confirmando que os íons Ca^{2+} em excesso podem indisponibilizar o ácido oxálico e com isso inibir a ação da MnP *in vitro*.

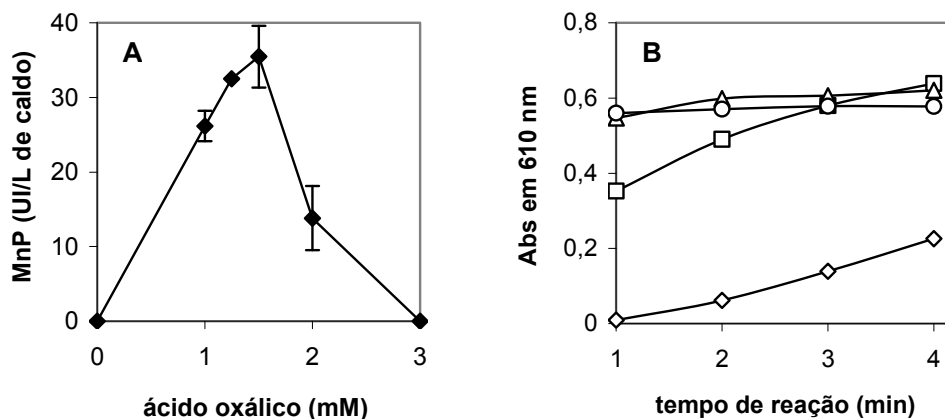


Figura 30. Efeito de ácido oxálico (A) e cálcio (B) nas atividades da MnP: 0 (◇), 1,5 (□), 3 (△) e 4,5 (○) mM de cálcio.

Com base nesses resultados, alguns cultivos de *C. subvermispora* sobre *P. taeda* foram suplementados com soluções de cloreto de cálcio a fim de proporcionar cargas equivalentes a 350, 700 e 1400 mg de Ca^{2+} /kg de madeira, que corresponderiam a concentrações finais de Ca^{2+} de 6,5-26 mM com base na água contida nos cultivos. Essas concentrações de Ca^{2+} foram equivalentes a aproximadamente 3, 6 e 12 vezes as concentrações fisiológicas de oxalato total (solúvel e extraído com ácido) encontrado em cultivos desse fungo sobre madeira (AGUIAR, SOUZA-CRUZ; FERRAZ; 2006).

A observação visual do crescimento fúngico em cada cultivo indicou que a adição de cálcio inibiu a colonização de *P. taeda* por *C. subvermispora*, principalmente no cultivo com

1400 mg de Ca^{2+} /kg de madeira. Palfreyman, Phillips e Staines (1996) também observaram inibição no crescimento do fungo de podridão parda *Coniophora puteana* por esse metal, enquanto para o fungo de podridão parda *Serpula lacrymans*, íons Ca^{2+} e NO^{3-} estimularam seu desenvolvimento, independente da presença de cavacos de madeira no meio de cultura. Hastrup *et al.* (2006) também não observaram inibição de CaCl_2 na biodegradação de madeira por *S. lacrymans* e *Serpula himantioides*.

As atividades enzimáticas detectadas nesses cultivos estão mostradas na Tabela 6. A secreção de lacases foi muito baixa em relação às outras enzimas, enquanto a LiP não foi detectada, corroborando a literatura (JENSEN *et al.*, 1996; LOBOS *et al.*, 1994; SOUZA-CRUZ *et al.*, 2004; VICENTIM, 2007). A adição de cálcio não afetou de forma significativa a produção de enzimas hidrolíticas (endoglicanase e xilanases), mas por outro lado, a produção de MnP foi maior nos cultivos com 350 mg de Ca^{2+} /kg de madeira e nos demais, manteve níveis comparáveis aos observados no cultivo sem adição de Ca^{2+} .

Tabela 6. Atividades enzimáticas provenientes da biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispora* após 2 semanas na presença de cálcio exógeno.

Cálcio (mg/kg de madeira)	Atividades enzimáticas (UI/kg de madeira)			
	xilanase	endoglicanase	lacase	MnP
0	565 ± 188 (a)*	58 ± 31 (a)	0,3 ± 0,4 (a)	142 ± 51 (a)
350	834 ± 99 (a)	73 ± 14 (a)	0,3 ± 0,2 (a)	218 ± 32 (b)
700	840 ± 287 (a)	46 ± 4 (a)	1,3 ± 0,3 (b)	164 ± 14 (a)
1400	493 ± 92 (a)	44 ± 21 (a)	2,0 ± 0,5 (b)	91 ± 6 (a)

* Em cada coluna, letras iguais indicam que os valores não diferem com 95% de confiança, letras diferentes indicam valores significativamente diferentes (teste de Dunnet - software GraphPad Instat).

A contraposição das observações visuais relativas à colonização da madeira com os níveis de enzimas extracelulares secretadas, indica que embora tenha havido aparente inibição do crescimento de *C. subvermispora* na presença de concentrações elevadas de Ca^{2+} , o fungo manteve níveis de atividade enzimática comparáveis àqueles observados nos cultivos sem a adição desse cátion.

Ainda avaliando os metabólitos extracelulares nesses cultivos, a produção de ácido oxálico foi inibida em função do aumento da concentração de Ca^{2+} adicionado, independente da forma de extração aplicada (Figura 31). O oxalato solúvel em água foi significativamente afetado pela adição de cálcio, diminuindo de 61 mg/kg de madeira nos cultivos sem Ca^{2+} exógeno para 23 mg/kg nos cultivos com 350 mg de Ca^{2+} /kg e para 0,6 mg/kg nos cultivos com a maior concentração de Ca^{2+} . Esse resultado era esperado, já que a presença do cátion deveria proporcionar a precipitação de oxalato de cálcio. Schiling e Jellison (2004) ao avaliar o efeito da adição de cálcio (0,35-5 mM) em culturas líquidas dos fungos de podridão

para *Fomitopsis pinicola* e *Meruliporia incrassata*, observaram que esse cátion apenas diminuiu a solubilidade do ácido oxálico secretado, enquanto íons Mg^{2+} (1,35 e 2,7 mM) não apresentaram nenhum efeito significativo.

A manutenção de níveis enzimáticos elevados nos cultivos, independentemente da adição de Ca^{2+} exógeno, associada à repressão significativa dos níveis de oxalato solúvel proporcionaram uma situação metabólica relevante para o entendimento do modo de ação desse fungo sobre os componentes da madeira. De fato, os cultivos com a maior concentração de Ca^{2+} impuseram ao fungo uma condição em que, mesmo havendo MnP suficiente nos cultivos, não havia oxalato disponível para a estabilização e “transporte” do Mn^{3+} eventualmente formado. Para gerar dados comparáveis com os estudos de atividade de MnP *in vitro*, os níveis de oxalato livre foram expressos também em concentrações molares baseadas na água contida nos cultivos (aproximadamente 58 g de água e 43 g de madeira em base seca em cada Erlenmeyer). Essas concentrações correspondem a 0,5, 0,19, 0,06 e 0,005 mM para os cultivos contendo Ca^{2+} exógeno nos níveis de 0, 350, 700 e 1400 mg/kg de madeira, respectivamente.

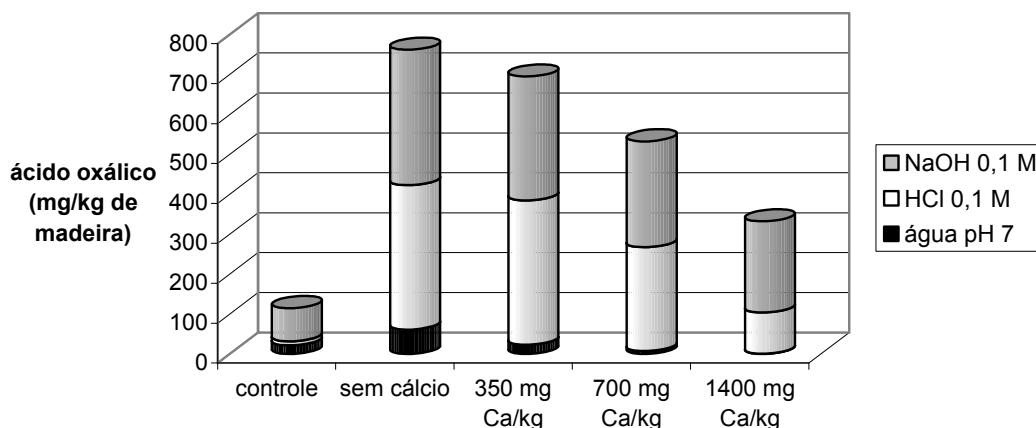


Figura 31. Produção de ácido oxálico proveniente da biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispora* após 2 semanas na presença de cálcio exógeno.

As perdas de massa, lignina e polioses observadas nos experimentos em questão indicam que a capacidade degradativa do fungo foi significativamente menor no cultivo com a maior concentração de Ca^{2+} (Tabela 7). Nesse cultivo, mesmo havendo níveis consideráveis de MnP, não havia ácido oxálico livre suficiente para fomentar a ação da enzima e conseqüentemente houve uma diminuição da capacidade do fungo em degradar lignina. A menor degradação deste componente aparentemente afetou o processo degradativo como um todo, pois as perdas de massa e de polioses também foram menores.

Esses resultados corroboram trabalhos já publicados por nosso grupo que sugerem que durante a biodegradação de madeira é necessária uma remoção considerável de lignina para que as enzimas hidrolíticas consigam penetrar a parede celular vegetal e então degradar os polissacarídeos (MACHUCA; FERRAZ, 2001; GUERRA; MENDONÇA; FERRAZ, 2003). Ainda com relação aos níveis de oxalato livre nos cultivos e seu efeito sobre a degradação dos componentes da madeira, é interessante notar que nos cultivos que continham 350 mg de Ca^{2+} exógeno/kg de madeira, os níveis de oxalato solúvel foram reduzidos a um terço dos valores detectados nos cultivos sem adição de Ca^{2+} ; mesmo assim, as perdas de lignina e componentes foram da mesma magnitude que aquelas observadas nos cultivos com madeira *in natura*. Isso sugere que os níveis de oxalato livre nos cultivos não necessitam ser muito elevados para fomentar o ciclo catalítico da MnP e a consequente ação sobre a lignina. De fato, a contraposição dos dados *in vivo* com os dados *in vitro* mostram que para a máxima atividade da MnP *in vitro* são necessários 1,5 mM de oxalato solúvel (Figura 30A), enquanto que nos cultivos sobre madeira, mesmo concentrações tão baixas quanto 0,19 mM (cultivos com 350 mg de Ca^{2+} /kg de madeira) ainda proporcionam a plena mineralização de lignina. Talvez ainda mais relevante seja observar que nos cultivos com máxima adição de Ca^{2+} exógeno, praticamente não havia oxalato livre (0,005 mM), mas mesmo assim houve 5,2% de perda de lignina. Esses dados sugerem que no sistema *in vivo*, além do ácido oxálico, outros compostos presentes na madeira ou secretados pelo fungo poderiam atuar como quelantes e transportadores de Mn^{3+} para fomentar o ciclo catalítico da MnP. Todavia, um trabalho recente mostrou que um corante fenólico pôde atuar como promotor da ação de MnP *in vitro* ao estabilizar Mn^{3+} , mesmo na ausência de ácidos alifáticos dicarboxílicos (LÓPEZ *et al.*, 2007).

Tabela 7. Perdas de massa e componentes provenientes da biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispora* após 2 semanas na presença de cálcio exógeno.

Cálcio (mg/kg de madeira)	Perdas (% m/m)			
	massa	lignina	polioses	glicana
0	3,3 ± 0,9 (a)*	8,3 ± 0,9 (a)	5,1 ± 0,9 (a)	4,7 ± 0,9 (a)
350	3,8 ± 0,7 (a)	8,8 ± 0,7 (a)	5,8 ± 0,7 (a)	6,7 ± 0,7 (b)
700	2,5 ± 0,6 (a)	6,9 ± 0,5 (a)	4,8 ± 0,4 (a)	6,1 ± 0,5 (a)
1400	1,5 ± 0,7 (b)	5,2 ± 0,7 (b)	3,0 ± 0,7 (b)	4,3 ± 0,7 (a)

* Em cada coluna, letras iguais indicam que os valores não diferem com 95% de confiança, letras diferentes indicam valores significativamente diferentes (teste de Dunnet).

A Tabela 8 mostra os dados de atividade redutora de Fe^{3+} e o pH dos extratos aquosos e também a solubilidade em NaOH das amostras de madeira provenientes dos cultivos em que foi avaliado o efeito de cálcio exógeno. Em todos os cultivos, o pH da

madeira biotratada variou entre 3,7 e 4, contra um pH de 4,8 da madeira não biodegradada. Essa diminuição de pH consiste na produção de ácidos orgânicos pelo fungo. A presença de catecóis nesses extratos foi inexpressiva, abaixo de 2 mg/kg de madeira para todas as condições. No cultivo anterior, quando foi verificado o efeito dos extrativos no processo biodegradativo, também não foi observada a presença de compostos do tipo catecol em extratos de madeira biodegradada por 1 e 2 semanas, mas apenas nos controles e na madeira biodegradada por 4 semanas (Figura 15B). Apesar disso, foi observada atividade redutora de íons Fe^{3+} (Tabela 8), que pode ser atribuída aos compostos derivados da biodegradação de lignina (AGUIAR; SOUZA-CRUZ; FERRAZ, 2006; AGUIAR; FERRAZ, 2007; FERRAZ *et al.*, 2001). Corroborando esses resultados, pode-se notar que nos cultivos com a máxima concentração de cálcio foram observadas as menores atividades redutoras de Fe^{3+} , o que aparentemente seria uma decorrência da menor perda de lignina observada nessa condição (Tabela 7).

A solubilidade em NaOH 1% de *P. taeda* não biodegradado foi de $7,8 \pm 0,3\%$, aumentando para 10,7% nas amostras biodegradadas por 2 semanas nos cultivos sem adição de Ca^{2+} . Com a adição desse cátion, houve diminuição da solubilidade em NaOH da madeira biotratada, principalmente na condição suplementada com 700 mg de Ca^{2+} /kg de madeira (Tabela 8).

Tabela 8. Atividade redutora de Fe^{3+} (medida após 30 min de reação) e pH dos extratos aquosos; e solubilidade em NaOH 1% dos cavacos provenientes da biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispora* após 2 semanas na presença de cálcio exógeno.

Cálcio (mg/kg de madeira)	Fe^{3+} reduzido (μM)*	pH	Solubilidade em NaOH 1% (% m/m)**
controle	$10,3 \pm 0,1$	4,8	$7,8 \pm 0,3$ (a)
0	$14,7 \pm 0,1$	3,8	$10,7 \pm 0,2$ (b)
350	$15,4 \pm 0,1$	3,7	$9,5 \pm 0,2$ (c)
700	$13,3 \pm 0,1$	4,0	$8,4 \pm 0,1$ (a)
1400	$9,3 \pm 0,5$	3,9	$9,3 \pm 0,1$ (c)

* As incertezas indicadas correspondem ao desvio da média para determinações em duplicata.

** Em cada coluna, letras iguais indicam que os valores não diferem com 95% de confiança, letras diferentes indicam valores significativamente diferentes (teste de Dunnet).

A despolimerização da lignina residual contida nas madeiras biotratadas também foi avaliada nesse grupo de experimentos. Assim como nos experimentos anteriores, a despolimerização foi estimada com base na determinação do rendimento de monômeros em reações de tioacidólise (Tabela 9). Em todos os cultivos avaliados, o rendimento de monômeros resultantes da tioacidólise foi menor para a madeira biotratada quando comparado com o controle. Na condição de cultivo com 1400 mg de Ca^{2+} /kg de madeira, o

rendimento de monômeros foi levemente superior ao observado nos demais cultivos, coincidindo com a observação de menor intensidade de degradação de lignina expressa como perda de sua massa nesses cultivos (Tabela 7). Para as outras condições em que foi adicionado Ca^{2+} , não existiu diferença quanto ao rendimento da tioacidólise em relação à condição sem cálcio.

Tabela 9. Rendimento de monômeros da tioacidólise provenientes da biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispora* após 2 semanas na presença de cálcio exógeno.

Cálcio (mg/kg de madeira)	Monômeros guaiacil-propano ($\mu\text{mol/g}$ de lignina Klason)*	Rendimento (% de lignina Klason)*
controle	1024 \pm 24	19,2 \pm 0,5
0	827 \pm 40	15,5 \pm 0,7
350	860 \pm 7	16,1 \pm 0,1
700	842 \pm 3	15,7 \pm 0,1
1400	906 \pm 16	16,9 \pm 0,3

* As incertezas indicadas correspondem ao desvio da média para determinações em duplicata.

As ligninas residuais presentes nas madeiras biotratadas nos cultivos em questão foram ainda extraídas e caracterizadas por espectroscopia de RMN- ^{31}P (Tabela 10). Conforme já demonstrado na Tabela 4, o padrão de transformação da lignina residual nas amostras biotratadas envolveu a diminuição no teor de OH alifáticas e fenólicas e o aumento no teor de carboxilas. Nos cultivos com a adição de Ca^{2+} exógeno, pode-se observar que essas transformações da lignina foram inibidas, já que a diminuição nos teores de OH e o aumento de grupos carboxila foram menos expressivos nos cultivos com as maiores concentrações de cálcio. Por outro lado, pode-se notar que para todas as ligninas de madeira biodegradada, o teor de grupos carboxila aumentou significativamente, inclusive no cultivo em que houve maior inibição por cálcio. Isso sugere que mesmo tendo inibido a despolimerização e a mineralização da lignina, a adição de Ca^{2+} não afetou de forma tão intensa a formação de grupos carboxila na lignina residual, que poderia ser uma consequência da oxidação da cadeia lateral, ou ainda da abertura oxidativa dos anéis aromáticos (CRESTINI; SERMANI; ARGYROPOULOS; 1998; GENG; LI, 2002).

O rendimento de isolamento das ligninas provenientes desse grupo de experimentos foi similar para todas as amostras (Tabela 10).

Tabela 10. Conteúdo de grupos funcionais determinados por espectroscopia de RMN-³¹P quantitativa de ligninas-dioxano provenientes da biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispota* após 2 semanas na presença de cálcio exógeno e rendimento do isolamento (% m/m).

Grupos funcionais ($\mu\text{mol/g}$)*	Cálcio (mg/kg de madeira)				
	controle	0	350	700	1400
OH alifática	4380 \pm 50	3970 \pm 50	4050 \pm 50	4390 \pm 50	4400 \pm 50
OH fenólica em unidade guaiacila não condensada	1340 \pm 20	1080 \pm 20	1180 \pm 20	1320 \pm 20	1290 \pm 20
OH fenólica em unidade <i>p</i> -hidroxifenila não condensada	90 \pm 5	60 \pm 5	60 \pm 5	80 \pm 5	90 \pm 5
total de OH fenólicas não condensadas	1430 \pm 20	1140 \pm 20	1240 \pm 20	1400 \pm 20	1380 \pm 20
OH fenólica condensada	420 \pm 10	310 \pm 10	350 \pm 10	350 \pm 10	360 \pm 10
total de OH fenólicas carboxila	1850 \pm 20	1450 \pm 20	1590 \pm 20	1750 \pm 20	1740 \pm 20
rendimento de extração da lignina (%)	14,5	15,0	15,3	15,4	14,3

* As incertezas indicadas correspondem ao desvio-padrão para determinações em triplicata com uma amostra de eucalipto.

5.4 Efeito de ácido oxálico exógeno na biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispota*

Na etapa anterior desse trabalho foi avaliado como os íons Ca^{2+} afetam o metabolismo de *C. subvermispota* degradando madeira. Como era esperado, o Ca^{2+} indisponibilizou parte expressiva do ácido oxálico produzido pelo fungo, gerando precipitados de oxalato de cálcio. Isso afetou significativamente a ação da enzima MnP que depende desse ácido para o transporte de íons Mn^{3+} . No presente grupo de experimentos, foi avaliada a importância de ácido oxálico no metabolismo de *C. subvermispota* a partir de cultivos que sofreram a adição exógena desse ácido orgânico. Conforme mencionado anteriormente, a maior disponibilidade de ácido oxálico poderia promover o metabolismo extracelular ao fomentar o ciclo da MnP, seja por proporcionar o transporte de íons Mn^{3+} ou pela formação extracelular de H_2O_2 (HOFRICHTER, 2002; URZÚA; KERSTEN; VICUÑA, 1998). Foram adicionadas cargas de 415, 830 e 1660 mg de ácido oxálico/kg de madeira, que corresponderiam a concentrações finais de oxalato de 3,4 - 13,6 mM baseadas na água contida nos cultivos. Essas concentrações foram equivalentes a aproximadamente 2, 4 e 8

vezes as concentrações fisiológicas de oxalato total encontrado em cultivos desse fungo sobre madeira (AGUIAR; SOUZA-CRUZ; FERRAZ, 2006).

A observação visual da colonização dos cavacos de *P. taeda* em cada cultivo indicou que a adição de ácido oxálico não afetou significativamente o crescimento fúngico. As atividades de xilanases e endoglicanase foram similares entre os cultivos, enquanto as atividades de LiP e lacases não foram detectadas (Tabela 11).

Tabela 11. Atividades enzimáticas provenientes da biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispora* após 2 semanas na presença de ácido oxálico exógeno.

Ácido oxálico (mg/kg de madeira)	Atividades enzimáticas (UI/kg de madeira)		
	xilanases	endoglicanase	MnP
0	565 ± 188 (a)*	58 ± 31 (a)	142 ± 51 (a)
415	664 ± 158 (a)	97 ± 11 (a)	221 ± 20 (a)
830	826 ± 218 (a)	100 ± 15 (a)	232 ± 42 (a)
1660	794 ± 109 (a)	103 ± 4 (a)	413 ± 83 (b)

* Em cada coluna, letras iguais indicam que os valores não diferem com 95% de confiança, letras diferentes indicam valores significativamente diferentes (teste de Dunnet).

A atividade de MnP foi a única a ser afetada significativamente e foi maior no cultivo com 1660 mg de ácido oxálico/kg de madeira (Tabela 11). Entretanto, não ocorreu maior remoção de lignina ou perda de massa nessa condição de cultivo. As perdas de massa, polioses e lignina foram semelhantes entre os cultivos, enquanto uma menor perda de glicana foi observada no cultivo suplementado com a máxima carga de ácido oxálico exógeno. A lignina foi o constituinte mais degradado da madeira, seguida das polioses (Tabela 12). Esse comportamento é típico de *C. subvermispora* como fungo de podridão branca seletivo na deslignificação da madeira, independente da condição de cultivo (AKHTAR *et al.*, 1998; FERRAZ *et al.*, 2008).

Tabela 12. Perdas de massa e componentes provenientes da biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispora* após 2 semanas na presença de ácido oxálico exógeno.

Ácido oxálico (mg/kg de madeira)	Perdas (% m/m)			
	massa	lignina	polioses	glicana
0	3,3 ± 0,9 (a)*	8,3 ± 0,9 (a)	5,1 ± 0,9 (a)	4,7 ± 0,9 (a)
415	3,2 ± 0,9 (a)	9,6 ± 0,8 (a)	6,2 ± 0,8 (a)	4,2 ± 0,9 (a)
830	4,0 ± 0,7 (a)	9,5 ± 0,7 (a)	7,0 ± 0,7 (a)	4,3 ± 0,7 (a)
1660	3,5 ± 0,7 (a)	9,4 ± 0,6 (a)	4,9 ± 0,7 (a)	2,1 ± 0,7 (b)

* Em cada coluna, letras iguais indicam que os valores não diferem com 95% de confiança, letras diferentes indicam valores significativamente diferentes (teste de Dunnet).

A determinação das concentrações de ácido oxálico residual nesses cultivos proporcionou resultados bastante relevantes (Figura 32). Essas determinações permitiram avaliar se o fungo atua no sentido de regular a concentração extracelular desse ácido, conforme já reportado para fungos de podridão parda (SCHILLING; JELLISON, 2005).

O teor de cálcio na madeira de *P. taeda* é de 262 mg/kg (SOUZA-CRUZ *et al.*, 2004), o que corresponde a cerca de 5 mM de Ca^{2+} (com base no volume de água presente nos cultivos - 58 mL). O ácido oxálico adicionado aos cultivos correspondeu a 3,4, 6,8 e 13,6 mM. Considerando uma relação molar de 1:1 para a precipitação de oxalato de cálcio, pode-se inferir que no cultivo com a menor adição de ácido oxálico haveria precipitação total do ácido, enquanto que nos outros dois cultivos, parte do ácido adicionado permaneceria disponível em solução. Essa inferência é uma aproximação, visto que nem todo cálcio presente na madeira pode estar disponível para a formação de oxalato de cálcio. Os dados da Figura 32 mostram que no cultivo em que não foi adicionado ácido oxálico exógeno, havia cerca de 360 mg de oxalato solúvel em HCl 0,1M/kg de madeira (supostamente oxalato de cálcio). Essa fração foi significativamente maior nos 3 cultivos que sofreram adição de ácido oxálico, chegando a cerca de 800 a 900 mg/kg de madeira, confirmando que parte expressiva do ácido adicionado precipitou. A concentração total de oxalato nos cultivos que sofreram a adição de 415 mg de oxálico/kg de madeira foi de cerca de 1200 mg/kg, sugerindo que o fungo ainda secretou quantidades significativas de oxalato durante as 2 semanas de biodegradação, já que o valor total detectado correspondeu a aproximadamente a soma do oxalato adicionado por fonte exógena (415 mg/kg) e o oxalato produzido pelo fungo nos cultivos em que esse ácido não foi adicionado (800 mg/kg). Na condição com 830 mg de ácido oxálico exógeno/kg de madeira, aparentemente houve inibição de secreção de oxalato pelo fungo, ou ainda houve ação catabólica degradando parte do ácido adicionado, pois o oxalato total recuperado após 2 semanas de cultivo não superou os 1200 mg/kg. Na condição em que foram adicionados 1660 mg de ácido oxálico/kg de madeira foi detectado 1440 mg/kg após as 2 semanas de biodegradação, indicando que esse ácido orgânico realmente foi catabolizado pelo fungo (Figura 32).

Avaliando os teores totais de oxalato detectados nos cultivos em questão, pode-se supor que o fungo atuou no sentido de equilibrar a concentração de oxalato presente, tanto pela síntese, quando esse composto não está presente em quantidades suficientes para seu metabolismo, quanto pela degradação ou precipitação, quando ele está em excesso. Como os teores de ácido oxálico extraído com álcali foram similares (Figura 32), as reações de esterificação de oxalato nos polissacarídeos não foram realizadas pelo fungo como forma de indisponibilizá-lo quando em excesso. As enzimas responsáveis pela síntese de ácido oxálico são a glioxilato-oxidase e a oxalo-acetase e as que atuam na sua degradação são a

oxalato-oxidase e a oxalato-descarboxilase, todas elas presentes intracelularmente em *C. subvermispora* (Watanabe *et al.*, 2005). Esses mesmos autores propuseram que esse fungo consome o ácido oxálico durante sua fase exponencial de crescimento pela oxalato-descarboxilase, produzindo CO₂ e o radical formato (HCO₂[•]). Esse radical é convertido em CO₂ pela ação da enzima formato-desidrogenase com a produção simultânea de NADH como fonte de energia. Durante a fase estacionária de crescimento microbiano, foi observada maior atividade da oxalato-oxidase, enzima essa importante para a conversão do ácido oxálico em H₂O₂ necessário no ciclo catalítico da MnP (WATANABE *et al.*, 2005). A degradação de ácido oxálico também pode ser causada por Mn³⁺ (KHINDARIA; GROVER; AUST, 1994; URZÚA; KERSTEN; VICUÑA, 1998) e ela é importante para manter o controle da acidez do meio, pois a MnP tem atividade máxima em pH 4,5 (KISHI *et al.*, 1994).

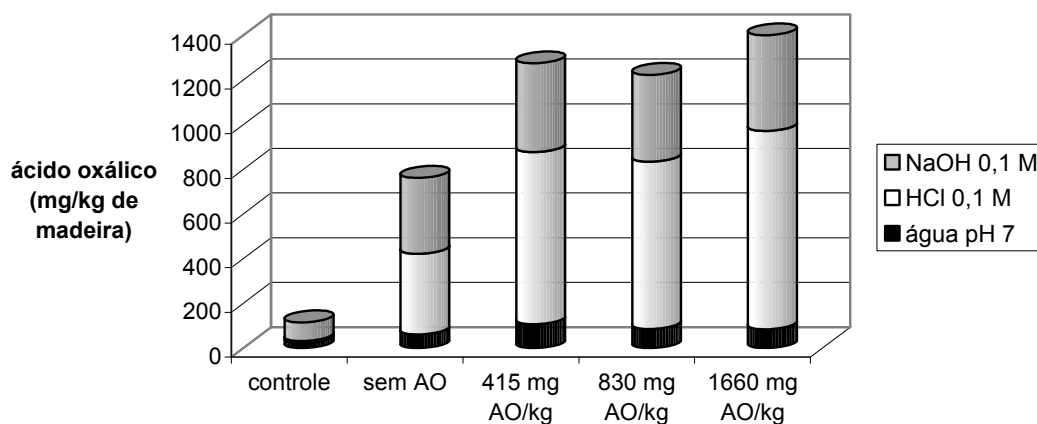


Figura 32. Teor de ácido oxálico (AO) proveniente da biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispora* após 2 semanas na presença de ácido oxálico exógeno.

Ao avaliar o efeito de ácido oxálico exógeno em cultivos dos fungos de podridão parda *F. pinicola* e *M. incrassata*, Schilling e Jellison (2005) também notaram que esse quelante foi degradado até uma concentração similar àquela encontrada em cultivos não suplementados, sem afetar o crescimento fúngico e a biodegradação de madeira. Esses mesmos autores observaram anteriormente a degradação de ácido oxálico exógeno a partir de filtrados de culturas líquidas desses dois fungos (SCHILLING; JELLISON, 2004). Espejo e Agosin (1991) também observaram degradação de ácido oxálico exógeno por basidiomicetos em culturas semi-sólidas.

Apesar da atividade biológica nos cultivos de *C. subvermispora* ter ocorrido no sentido de “equilibrar” a concentração de oxalato total, o ácido oxálico livre (extraído em água pH 7) poderia interferir diretamente na atividade da enzima MnP secretada pelo fungo.

Os teores de oxalato livre nesses cultivos foram de 61, 106, 85, 84 mg/kg de madeira para os cultivos sem adição de ácido oxálico e adicionados de 415, 830 e 1660 mg/kg de madeira, respectivamente. Esses teores correspondem a concentrações molares na água contida nos cultivos da ordem de 0,5 a 0,9 mM. Ou seja, em nenhuma situação a concentração de oxalato livre atingiu níveis superiores a 2,0 mM que poderiam diminuir a ação da MnP. Por outro lado, os níveis de oxalato livre nos cultivos que sofreram a adição de ácido oxálico exógeno foram mais altos em relação aos cultivos sem a adição desse ácido. No cultivo que sofreu adição de 1660 mg de ácido oxálico/kg de madeira, havia maior teor de MnP e 0,7 mM de oxalato livre. Mesmo nessa situação metabólica, as perdas de lignina observadas na madeira biotratada foram da mesma magnitude daquelas observadas nos cultivos sem a adição exógena do ácido. Esses dados avaliados em conjunto sugerem que a mineralização da lignina não depende somente da capacidade do sistema extracelular em gerar íons Mn^{3+} , que supostamente foi maior nos cultivos com a maior suplementação de ácido oxálico. Uma observação semelhante também foi feita em um trabalho paralelo a esse, que avaliou condições de cultivo que induziam a secreção de MnP em níveis tão elevados quanto 1200 UI/kg de madeira (VICENTIM, 2007). Nesse caso, também não houve uma correlação direta entre nível de MnP extracelular e perda de lignina em cultivos de *C. subvermispora*. De fato, pode-se supor que o componente limitante para a degradação de lignina nesses cultivos sejam ácidos graxos poliinsaturados, já que o mecanismo de degradação de lignina mais aceito até o momento para *C. subvermispora* envolve a ação de radicais peroxila oriundos da ação da MnP sobre os ácidos graxos insaturados (DAINA, *et al.*, 2002; HAMMEL *et al.*, 2002; HOFRICHTER, 2002; JENSEN *et al.*, 1996; KAPICH; JENSEN; HAMMEL, 1999; SREBOTNIK *et al.*, 1997).

A presença de ácido oxálico exógeno resultou na maior diminuição de pH dos extratos aquosos de madeiras biodegradadas em relação ao cultivo sem aditivo, porém, não foi observada diferença significativa entre as condições suplementadas (Tabela 13).

A adição de ácido oxálico exógeno também resultou em maior atividade redutora de Fe^{3+} nos extratos aquosos dos cultivos em questão (Tabela 13). Vale ressaltar que apesar de esse ácido ser um forte agente quelante, ele não atua como redutor de Fe^{3+} nas condições fisiológicas dos cultivos e na ausência de luz (AGUIAR *et al.*, 2007; GOODELL *et al.*, 1997; SHIMADA *et al.*, 1997). Apesar de apresentar maior atividade redutora, os extratos em discussão sempre apresentaram baixa concentração de catecóis totais (valores menores que 2 mg/kg de madeira para todas as amostras), sugerindo que a atividade redutora foi proveniente de compostos derivados da biodegradação de lignina do tipo metoxi-hidroxibenzenos (AGUIAR; FERRAZ, 2007; AGUIAR *et al.*, 2007). Embora as perdas de lignina tenham sido semelhantes nesses cultivos (Tabela 12), é possível que a adição de

ácido oxálico exógeno tenha proporcionado a formação e/ou solubilização de fragmentos com maior teor de estruturas fenólicas que apresentam maior atividade redutora.

Da mesma forma que as perdas de massa, lignina e polioses (Tabela 12), a solubilidade em NaOH 1% das madeiras biotratadas não foi afetada pela adição de ácido oxálico exógeno aos cultivos (Tabela 13).

Tabela 13. Atividade redutora de Fe³⁺ (medida após 30 min de reação) e pH dos extratos aquosos; e solubilidade em NaOH provenientes da biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispota* após 2 semanas na presença de ácido oxálico exógeno.

Ácido oxálico (mg/kg de madeira)	Fe³⁺ reduzido (µM)*	pH	Solubilidade em NaOH 1% (% m/m)**
controle	10,30 ± 0,02	4,8	7,8 ± 0,3 (a)
0	14,7 ± 0,1	3,8	10,7 ± 0,2 (b)
415	18,96 ± 0,04	3,4	11,5 ± 0,1 (b)
830	17,72 ± 0,05	3,5	11,4 ± 0,5 (b)
1660	20,9 ± 0,2	3,5	11,8 ± 0,5 (b)

* As incertezas indicadas correspondem ao desvio da média para determinações em duplicata.

** Em cada coluna, letras iguais indicam que os valores não diferem com 95% de confiança, letras diferentes indicam valores significativamente diferentes (teste de Dunnet).

As madeiras biodegradadas foram ainda caracterizadas por tioacidólise (Tabela 14) e as ligninas residuais foram extraídas e caracterizadas por RMN-¹³P (Tabela 15). Nos cultivos anteriores (sobre cavacos *in natura* ou com a adição de cálcio) existiu uma tendência de correlação entre as perdas de lignina e a diminuição no rendimento de tioacidólise na madeira biotratada. Ou seja, elevadas perdas de lignina resultaram em baixos rendimentos de monômeros de tioacidólise, indicando que o nível de despolimerização da lignina residual acompanha a taxa de mineralização da lignina. No caso dos cultivos suplementados com ácido oxálico, essa correlação não se confirmou. Nos cultivos suplementados com a mais alta concentração desse ácido, apesar de ter havido elevada perda de lignina, não houve diminuição no rendimento de monômeros na tioacidólise (Tabela 14). Para os outros cultivos suplementados, a diminuição do rendimento de tioacidólise foi pouco expressiva. Supostamente a adição de ácido oxálico pode ter promovido a degradação apenas de uma porção da lignina, a qual foi despolimerizada e mineralizada, enquanto a maior parte (acima de 90%) não foi atacada, possuindo quantidade de ligações β-O-4 semelhante à madeira *in natura*.

O rendimento de isolamento das ligninas foi maior na condição em que foram adicionados 415 mg de ácido oxálico/kg de madeira, seguido do cultivo com 1660 mg/kg de madeira. As outras amostras apresentaram rendimentos de lignina similares entre si (Tabela 15).

Tabela 14. Rendimento de monômeros da tioacidólise de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispota* após 2 semanas na presença de ácido oxálico exógeno.

Ácido oxálico (mg/kg de madeira)	Monômeros guaiacil-propano ($\mu\text{mol/g}$ de lignina Klason)*	Rendimento (% de lignina Klason)*
controle	1024 \pm 24	19,2 \pm 0,5
0	827 \pm 40	15,5 \pm 0,7
415	935 \pm 62	17,5 \pm 1,2
830	998 \pm 16	18,7 \pm 0,3
1660	1086 \pm 16	20,3 \pm 0,3

* As incertezas indicadas correspondem ao desvio da média para determinações em duplicata.

As características estruturais das ligninas residuais em madeira biodegradada em cultivos não suplementados compreendem a diminuição no teor de hidroxilas alifáticas e fenólicas, bem como o aparecimento de novos grupos carboxilas. No caso das ligninas residuais das madeiras biotratadas nos cultivos suplementados com ácido oxálico, pode-se observar que essa tendência foi mantida, porém os teores dos grupos funcionais mencionados não sofreram alteração expressiva em função de teores crescentes de ácido oxálico exógeno nos cultivos (Tabela 15).

Tabela 15. Conteúdo de grupos funcionais determinados por espectroscopia de RMN-³¹P quantitativa de ligninas-dioxano provenientes da biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispota* após 2 semanas na presença de ácido oxálico exógeno e rendimento do isolamento (% m/m).

Grupos funcionais ($\mu\text{mol/g}$)*	Ácido oxálico (mg/kg de madeira)				
	controle	0	415	830	1660
OH alifática	4380 \pm 50	3970 \pm 50	3900 \pm 50	3950 \pm 50	3920 \pm 50
OH fenólica em unidade guaiacila não condensada	1340 \pm 20	1080 \pm 20	1000 \pm 20	1100 \pm 20	1080 \pm 20
OH fenólica em unidade <i>p</i> -hidroxifenila não condensada	90 \pm 5	60 \pm 5	65 \pm 5	60 \pm 5	70 \pm 5
total de OH fenólicas não condensadas	1430 \pm 20	1140 \pm 20	1140 \pm 20	1160 \pm 20	1150 \pm 20
OH fenólica condensada	420 \pm 10	310 \pm 10	310 \pm 10	300 \pm 10	320 \pm 10
total de OH fenólicas carboxila	1850 \pm 20	1450 \pm 20	1450 \pm 20	1460 \pm 20	1470 \pm 20
rendimento de extração da lignina (%)	14,5	15,0	16,4	14,7	15,7

* As incertezas correspondem ao desvio-padrão para determinações em triplicata com uma amostra de eucalipto.

5.5 Efeito da adição de óleo de soja na biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispora*

Os estudos descritos anteriormente mostraram que a suplementação de cultivos com ácido oxálico não proporciona maiores degradações de lignina por *C. subvermispora*, pois aparentemente o fungo atua no sentido de equilibrar as concentrações extracelulares desse composto. Além disso, uma condição de cultivo que continha elevada atividade de MnP e simultaneamente grande disponibilidade de ácido oxálico livre (cultivo suplementado com 1660 mg de ácido oxálico/kg madeira) não ocasionou numa maior perda de lignina, corroborando dados da literatura que indicam não haver uma correlação direta entre nível de MnP extracelular e perda de lignina em cultivos de *C. subvermispora* (VICENTIM, 2007; RUTTIMANN-JOHNSON *et al.*, 1993). De fato, pode-se supor que o componente limitante para a degradação de lignina nesses cultivos sejam ácidos graxos poliinsaturados, pois o mecanismo de degradação de lignina mais aceito até o momento para *C. subvermispora* envolve a ação de radicais peroxila oriundos da ação da MnP sobre os ácidos graxos insaturados. Ainda nesse sentido, vários trabalhos na literatura têm mostrado que a adição de ácidos graxos insaturados em um sistema contendo MnP, Mn^{2+} e H_2O_2 estimula a degradação de compostos modelo de lignina ou mesmo lignina natural *in vitro* (DAINA *et al.*, 2002; JENSEN *et al.*, 1996; KAPICH; JENSEN; HAMMEL, 1999). No entanto, até o momento não foi verificado o efeito da adição dessas substâncias na biodegradação de madeira (sistema *in vivo*). Harazono e Nakamura (2005) mostraram recentemente que a degradação de uma mistura de corantes em culturas líquidas do fungo de podridão branca *Phanerochaete sordida* foi dependente de MnP, Mn^{2+} e Tween 80, um surfactante que contém um ácido graxo insaturado (ácido oléico).

No presente trabalho, foi feita a adição de óleo de soja comercial sobre os cavacos de madeira a serem colonizados por *C. subvermispora* para servir como uma fonte rica em ácidos graxos insaturados propícios de sofrerem reações de peroxidação. O óleo de soja foi escolhido como fonte de lipídeos por possuir mais de 50% (m/m) de ácido linoléico na sua composição em ácidos graxos totais (ALCÂNTARA *et al.*, 2000). A composição especificada no rótulo do óleo de soja utilizado foi de 14,5% (m/m) de gorduras saturadas, 28,5% de monoinsaturadas e 57% de poliinsaturadas. *P. taeda* possui aproximadamente 0,3% de triglicérides e 0,33% de ácidos graxos livres (FISCHER *et al.*, 1996). Com base nesses teores, as adições de 2,6, 5,2 e 10,4 g de óleo/kg de madeira corresponderam a aproximadamente 0,4, 0,8 e 1,6 vezes a mais de lipídeos presentes nos cultivos.

A observação visual da colonização dos cavacos de *P. taeda* em cada cultivo indicou que o aumento da concentração de óleo estimulou o crescimento do fungo, mostrando que esse aditivo provavelmente foi assimilado por *C. subvermispora*. O óleo de soja serviu como

uma fonte extra de carbono de fácil assimilação, conforme já demonstrado para o rápido consumo de matéria graxa em cultivos desse fungo sobre madeira (FISCHER *et al.*, 1996; GUTIÉRREZ *et al.*, 2002; MENDONÇA; GUERRA; FERRAZ, 2002). As atividades de xilanase e endoglicanase foram semelhantes em todos os cultivos, enquanto atividades de LiP e lacases não foram detectadas (Tabela 16). O cultivo suplementado com a menor concentração de óleo (2,6 g de óleo/kg de madeira) proporcionou uma atividade de MnP levemente superior às observadas nos demais cultivos. A perda de lignina não foi diferente entre as condições analisadas, inclusive na condição sem aditivo (Tabela 17). Nesses cultivos, assim como nos anteriores, ocorreu a degradação preferencial de lignina. As perdas de massa e de polioses também foram similares em todos os cultivos, enquanto nos cultivos com 10,4 g de óleo/kg de madeira houve menor perda de glicana.

Tabela 16. Atividades enzimáticas provenientes da biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispora* após 2 semanas na presença de óleo de soja nos cultivos.

Óleo de soja (g/kg de madeira)	Atividades enzimáticas (UI/kg de madeira)		
	xilanases	endoglicanase	MnP
0	565 ± 188 (a)*	58 ± 31 (a)	142 ± 51 (a)
2,6	760 ± 40 (a)	59 ± 11 (a)	254 ± 49 (b)
5,2	699 ± 153 (a)	44 ± 13 (a)	230 ± 24 (a)
10,4	600 ± 245 (a)	30 ± 13 (a)	154 ± 35 (a)

* Em cada coluna, letras iguais indicam que os valores não diferem com 95% de confiança, letras diferentes indicam valores significativamente diferentes (teste de Dunnet).

Tabela 17. Perda de massa e dos principais componentes de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora* após 2 semanas na presença de óleo de soja nos cultivos.

Óleo de soja (g/kg de madeira)	Perdas (% m/m)			
	massa	lignina	polioses	glicana
0	3,3 ± 0,9 (a)*	8,3 ± 0,9 (a)	5,1 ± 0,9 (a)	4,7 ± 0,9 (a)
2,6	2,5 ± 0,7 (a)	8,3 ± 0,7 (a)	5,1 ± 0,7 (a)	2,8 ± 0,7 (b)
5,2	2,9 ± 0,8 (a)	9,2 ± 0,8 (a)	5,9 ± 0,8 (a)	4,0 ± 0,8 (a)
10,4	2,1 ± 0,7 (a)	8,0 ± 0,7 (a)	5,1 ± 0,7 (a)	1,9 ± 0,7 (c)

* Em cada coluna, letras iguais indicam que os valores não diferem com 95% de confiança, letras diferentes indicam valores significativamente diferentes (teste de Dunnet).

A adição de óleo de soja nos cultivos promoveu maior produção de ácido oxálico, com máximo de 1200 mg/kg de madeira na condição com 10,4 g de óleo/kg de madeira (Figura 33). Maior teor de ácido oxálico foi extraído com HCl 0,1 M, seguido dos tratamentos com NaOH 0,1 M e água pH 7. Dessa forma, o ácido oxálico produzido pelo fungo se encontra predominantemente na forma de cristais de oxalato insolúveis, conforme também

observado nos cultivos em que foi adicionado ácido oxálico exógeno. Na extração alcalina, o teor de ácido oxálico foi praticamente similar entre os cultivos, enquanto na forma livre o teor foi estimulado pela presença do co-substrato. Assim como nos cultivos com ácido oxálico exógeno, maior concentração desse ácido na forma livre nos cultivos com óleo de soja não causou maior degradação de lignina.

A concentração de catecóis totais nos extratos aquosos apresentou valores abaixo de 2 mg/kg de madeira, mas apesar disso, foi observada atividade redutora de íons Fe^{3+} , assim como nos cultivos anteriores, com cálcio e ácido oxálico exógenos. Na presença de 2,6 e 5,2 g de óleo/kg de madeira, as atividades redutoras foram mais altas, mas com excesso deste co-substrato (10,4 g/kg de madeira) a atividade foi menor (Tabela 18). Gutiérrez *et al.* (2002) demonstraram que esse fungo sintetiza ácidos do tipo alqu(en)ilitacônico (Figura 9) a partir de ácidos graxos presentes na madeira. Os ácidos alqu(en)ilitacônicos interagem com os íons Fe^{3+} e Fe^{2+} reprimindo a propagação da reação de Fenton e conseqüentemente a despolimerização de polissacarídeos (RAHMAWATI *et al.* 2005). Dessa forma, a diminuição da redução de Fe^{3+} no cultivo com 10,4 g/kg de madeira poderia estar relacionada à maior síntese desses compostos, corroborando os dados de perda de glicana desses cultivos que foram menores que os demais.

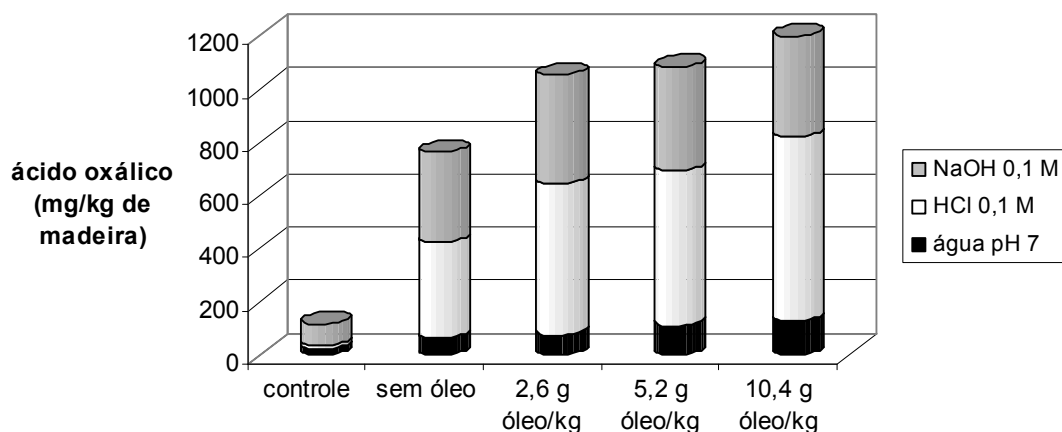


Figura 33. Teor de ácido oxálico proveniente da biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispora* após 2 semanas na presença de óleo de soja nos cultivos.

O pH dos extratos aquosos diminuiu após os 14 dias de cultivo e essa diminuição foi ainda maior com a adição de óleo de soja, provavelmente devido aos ácidos graxos oriundos da hidrólise das triglicérides presentes nesse co-substrato. As solubilidades em NaOH 1% das madeiras biotratadas foram similares em todos os cultivos, suplementados ou não com óleo, porém foram sempre maiores que a solubilidade da madeira oriunda do controle (Tabela 18).

Tabela 18. Atividade redutora de Fe^{3+} (medida após 30 min de reação) e pH dos extratos aquosos; e solubilidade em NaOH 1% provenientes da biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispota* após 2 semanas na presença de óleo de soja.

Óleo de soja (g/kg de madeira)	Fe^{3+} reduzido (μM)*	pH	Solubilidade em NaOH 1% (% m/m)**
controle	10,3 ± 0,1	4,8	7,8 ± 0,3 (a)
0	14,7 ± 0,1	3,8	10,7 ± 0,2 (b)
2,6	17,1 ± 0,1	3,6	11,2 ± 0,2 (b)
5,2	16,9 ± 0,4	3,4	11,6 ± 0,4 (b)
10,4	15,1 ± 0,3	3,4	11,6 ± 0,3 (b)

* As incertezas indicadas correspondem ao desvio da média para determinações em duplicata.

** Em cada coluna, letras iguais indicam que os valores não diferem com 95% de confiança, letras diferentes indicam valores significativamente diferentes (teste de Dunnet).

Os produtos da peroxidação de lipídios (TBARS) também foram quantificados nesses cultivos. O teor de TBARS foi diretamente proporcional à quantidade de óleo de soja adicionado (Figura 34). Nos cultivos sobre cavacos de madeira *in natura* ou extraídos com etanol (provavelmente sem lipídeos) não existiu diferença quanto à formação de TBARS (Figura 14), baseando-se que esse fungo produz ácidos graxos a partir de madeira moída livre de extrativos passíveis de serem peroxidados (ENOKI M. *et al.*, 1999). Apesar de o teor de TBARS ter sido diretamente proporcional à quantidade de óleo de soja adicionado nos cultivos, as perdas de lignina foram as mesmas para as amostras biodegradadas, demonstrando que a maior ocorrência das reações de peroxidação de lipídeos não causou maior deslignificação da madeira (Figura 34).

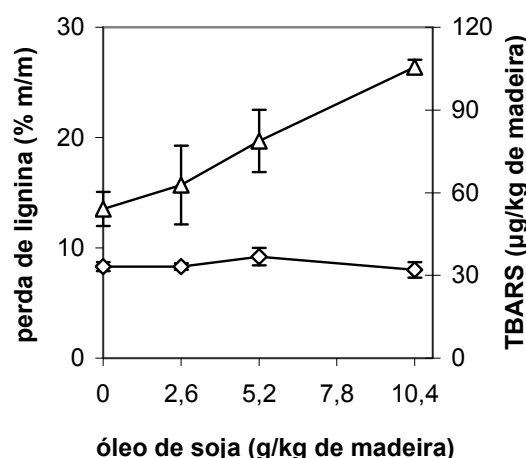


Figura 34. Perda de lignina (\diamond) e produção de TBARS (\triangle) provenientes da biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispota* após 2 semanas na presença de óleo de soja nos cultivos.

Os resultados mostrados na Figura 34 são bastante relevantes, pois, a princípio, poderiam indicar que a peroxidação dos lipídeos não estaria diretamente relacionada com a mineralização de lignina. Embora essa conclusão possa ser traçada com base nesses resultados, outras ponderações devem ser feitas sobre esses experimentos. Por exemplo, os rendimentos de monômeros na tioacidólise das madeiras biotradadas (Tabela 19) indicam que a adição de óleo de soja diminuiu o nível de despolimerização das ligninas residuais. Esse resultado sugere que apesar de ter promovido maior crescimento fúngico e maiores acúmulos de TBARS e ácido oxálico livre, a adição de óleo aparentemente inibiu a degradação de lignina. Uma explicação possível seria a de que o metabolismo fúngico foi alterado no sentido de utilizar a matéria graxa como fonte de carbono de fácil assimilação, o que justificaria o maior crescimento fúngico e a menor despolimerização de lignina. Em um estudo recente de Vicentim (2007), um efeito semelhante foi observado em cultivos suplementados com glicose. Nesse caso, também houve maior crescimento fúngico, porém a glicose apresentou efeito negativo sobre a mineralização de lignina, além de ter minimizado a despolimerização da lignina residual.

O efeito da adição de óleo na maior concentração avaliada (10,4 g de óleo/kg de madeira) foi tão intenso sobre o rendimento de tioacidólise que nessa condição os valores observados para a madeira controle e biotratada foram praticamente iguais (Tabela 19). Resultados parecidos foram observados nos cultivos com ácido oxálico (Tabela 14). Nos dois casos, as perdas de lignina para essas amostras foram tão elevadas quanto às observadas nos cultivos não-suplementados (8 a 9%) sugerindo que a adição dos suplementos pode ter promovido a degradação apenas de uma fração da lignina, enquanto a sua maioria (acima de 90%) não foi atacada, possuindo quantidade de ligações β -O-4 semelhante à madeira *in natura*.

Tabela 19. Rendimento de monômeros da tioacidólise de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora* após 2 semanas na presença de óleo de soja nos cultivos.

Óleo de soja (g/kg de madeira)	Monômeros guaiacil-propano ($\mu\text{mol/g}$ de lignina Klason)*	Rendimento (% de lignina Klason)*
controle	1024 \pm 24	19,2 \pm 0,5
0	827 \pm 40	15,5 \pm 0,7
2,6	941 \pm 20	17,6 \pm 0,4
5,2	913 \pm 15	17,1 \pm 0,3
10,4	1073,0 \pm 0,5	20,1 \pm 0,1

* As incertezas indicadas correspondem ao desvio da média para determinações em duplicata.

Os rendimentos de isolamento das ligninas residuais provenientes das madeiras biotratadas nos cultivos adicionados de óleo de soja variaram entre 15 e 16%. Essas ligninas apresentaram teores similares e menores de OH guaiacila, OH *p*-hidroxifenila e OH condensada em relação ao controle. Interessantemente, os teores de OH alifáticas diminuíram mais com a adição de óleo de soja nos cultivos em relação ao cultivo sem esse aditivo. Essa diminuição deve consistir na maior oxidação de C α por radicais livres oriundos da peroxidação de lipídeos. Nos cultivos com 5,2 e 10,4 g óleo/kg de madeira ocorreu uma certa inibição na formação de grupos carboxila (Tabela 20), os quais acumularam nas ligninas dos cultivos realizados anteriormente. Esse fato pode ser atribuído a menor degradação de ligação C α -C β , ou seja, a presença de óleo de soja fez com que houvesse preferencialmente a oxidação do C α ao invés da ruptura de ligação C α -C β ou mesmo β -O-4, conforme mostram os dados de tioacidólise. Kapich, Jensen e Hammel (1999) também observaram oxidação preferencial do C α de um composto modelo de lignina com ligação β -O-4 por Mn²⁺ e MnP de *C. subvermispora* (*in vitro*).

Tabela 20. Conteúdo de grupos funcionais determinados por espectroscopia de RMN-³¹P quantitativa de ligninas-dioxano provenientes da biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispora* após 2 semanas na presença de óleo de soja nos cultivos e rendimento do isolamento (% m/m).

Grupos funcionais ($\mu\text{mol/g}$)*	Óleo de soja (g/kg de madeira)				
	controle	0	2,6	5,2	10,4
OH alifática	4380 \pm 50	3970 \pm 50	3580 \pm 50	3520 \pm 50	3540 \pm 50
OH fenólica em unidade guaiacila não condensada	1340 \pm 20	1080 \pm 20	1060 \pm 20	1040 \pm 20	1020 \pm 20
OH fenólica em unidade <i>p</i> -hidroxifenila não condensada	90 \pm 5	60 \pm 5	60 \pm 5	70 \pm 5	60 \pm 5
total de OH fenólicas não condensadas	1430 \pm 20	1140 \pm 20	1120 \pm 20	1110 \pm 20	1080 \pm 20
OH fenólica condensada	420 \pm 10	310 \pm 10	280 \pm 10	290 \pm 10	300 \pm 10
total de OH fenólicas carboxila	1850 \pm 20	1450 \pm 20	1400 \pm 20	1400 \pm 20	1380 \pm 20
rendimento de extração da lignina (%)	14,5	15,0	15,1	16,1	16

* As incertezas indicadas correspondem ao desvio-padrão para determinações em triplicata com uma amostra de eucalipto.

5.6 Biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispora* em biorreatores de 20 L

5.6.1 Análise dos metabólitos extracelulares e alterações na composição química da madeira

A biodegradação de madeira em biorreatores teve o propósito de obter massa de cavacos suficientes para a realização de ensaios de polpação. Para esses experimentos foram utilizadas 4 condições de cultivo, sendo um cultivo sem nenhum aditivo e outros com as quantidades máximas de aditivos (cálcio, ácido oxálico e óleo de soja) já avaliadas nos experimentos realizados em Erlenmeyers de 2L.

Ao completar 2 semanas de fermentação, observou-se que o cultivo suplementado com óleo de soja foi o mais colonizado pelas hifas, seguido do cultivo com ácido oxálico e depois o cultivo sem aditivo. No cultivo em que foram adicionados 1400 mg de cálcio/kg de madeira não foi possível detectar micélio superficial nos cavacos biotratados. Esses aspectos de colonização foram semelhantes àqueles observados nos cultivos realizados em Erlenmeyers de 2L.

Assim como nos cultivos em Erlenmeyers, as atividades xilanolíticas predominaram nos biorreatores, enquanto lacases apresentaram valores muito baixos em relação às outras enzimas. Atividades de endoglicanase foram máximas no cultivo com óleo de soja, enquanto a produção de MnP foi menor apenas no cultivo com 1400 mg de Ca/kg de madeira. LiP não foi detectada em nenhuma condição (Tabela 21).

Para esse grupo de experimentos, as atividades de MnP foram avaliadas da forma tradicional e também utilizando ácido oxálico em substituição ao lactato usado como quelante de Manganês (KUWAHARA *et al.*, 1984). Os níveis de MnP, determinados com lactato, foram semelhantes aos observados nos experimentos realizados em menor escala. Porém, no cultivo adicionado de Ca^{2+} em biorreatores houve uma inibição significativa da MnP, o que não havia sido confirmado dentro de um nível de 95% de confiança nos cultivos em Erlenmeyers de 2L (item 5.3, Tabela 6). Ao utilizar oxalato como quelante nos ensaios de MnP, observa-se que os níveis de atividade seguiram a mesma tendência observada nos experimentos com lactato (Tabela 21).

Com relação à degradação dos principais constituintes da madeira, menor perda de lignina foi observada no cultivo com cálcio (Tabela 22), condição essa em que houve diminuição do crescimento fúngico e menor atividade da MnP. Os outros cultivos apresentaram perdas de lignina semelhantes entre si. As perdas de glicana foram bem baixas e similares entre as condições de cultivo, enquanto as perdas de polioses foram maiores nos cultivos suplementados com ácido oxálico ou óleo de soja e menor no cultivo com cálcio (Tabela 22). As perdas de componentes observadas nos cultivos em biorreatores foram menores em relação aos cultivos em Erlenmeyers.

Tabela 21. Atividades enzimáticas (UI/kg de madeira) recuperadas dos cultivos de *C. subvermispora* sobre *P. taeda* em biorreatores de 20 L.

Cultivo	Xilanases	Endoglicanase	Lacase	MnP (láctico)	MnP (oxálico)
sem aditivo	622 ± 131 (a)**	37 ± 3 (a)	2,4 ± 1,7 (a)	174 ± 6 (a)	198 ± 39 (a)
1400 mg Ca ²⁺ /kg	566 ± 477 (a)	37 ± 6 (a)	4,5 ± 1,6 (a)	40 ± 11 (b)	14 ± 11 (b)
1660 mg AO*/kg	894 ± 300 (a)	48 ± 17 (a)	0,5 ± 0,9 (a)	212 ± 28 (a)	281 ± 28 (c)
10,4 g óleo/kg	691 ± 138 (a)	75 ± 10 (b)	0 (a)	206 ± 25 (a)	227 ± 13 (a)

* AO - ácido oxálico;

** Em cada coluna, letras iguais indicam que os valores não diferem com 95% de confiança, letras diferentes indicam valores significativamente diferentes (teste de Dunnet).

Maiores índices de solubilidade em NaOH 1% foram observados para o cultivo com 1660 mg de oxálico/kg e principalmente para o cultivo com 10,4 g de óleo de soja/kg de madeira (Tabela 22). Para as outras condições não foram observadas diferenças em relação ao controle. No caso da madeira controle, não houve diferença significativa desse lote de cavacos quanto a solubilidade em NaOH (8,3 ± 0,1%) em relação ao lote utilizado nos cultivos em Erlenmeyers (7,8 ± 0,3%).

Tabela 22. Perda dos principais componentes e solubilidade em NaOH provenientes da biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispora* após 2 semanas em biorreatores de 20 L.

Cultivo	Perdas (% m/m)			Solubilidade em NaOH (% m/m)**
	lignina	glicana	polioses	
sem aditivo	4,0 ± 0,6 (a)*	2,1 ± 0,2 (a)	1,3 ± 0,2 (a)	8,6 ± 0,3 (a)
1400 mg de Ca ²⁺ /kg	1,2 ± 0,6 (b)	1,6 ± 0,6 (a)	0,2 ± 0,3 (b)	8,6 ± 0,1 (a)
1660 mg de AO/kg	4,6 ± 0,9 (a)	1,2 ± 0,4 (a)	2,7 ± 0,4 (c)	9,8 ± 0,4 (b)
10,4 g de óleo soja/kg	3,4 ± 1,0 (a)	0,9 ± 0,7 (a)	3,3 ± 0,3 (c)	13,0 ± 0,3 (c)

* Em cada coluna, letras iguais indicam que os valores não diferem com 95% de confiança, letras diferentes indicam valores significativamente diferentes (teste de Dunnet).

** Solubilidade em NaOH 1% para madeira não biodegradada foi de 8,3 ± 0,1 % (m/m).

Nos cultivos em biorreatores também foi realizada a extração aquosa dos cavacos para determinação de ácido oxálico, pH, catecóis totais e atividade redutora de Fe³⁺ (Tabela 23). Os valores de pH dos extratos aquosos provenientes de cavacos biodegradados foram menores que o controle, conforme já esperado e discutido nas sessões anteriores. Por outro lado, a atividade redutora de Fe³⁺ foi menor nos extratos de madeiras biotratadas quando se compara os dados provenientes dos cultivos em biorreatores e Erlenmeyers de 2L. Como o teor de catecóis foi baixo nas madeiras biotratadas nos dois sistemas, pode-se assumir que

a menor atividade redutora de Fe^{3+} nos cultivos em biorreator pode ter sido uma consequência da menor perda de lignina observada nesses cultivos, ou ainda ter sido um efeito da oxigenação permanente feita nos biorreatores que poderia oxidar os compostos fenólicos eventualmente presentes.

Os produtos de peroxidação de lipídeos, quantificados como TBARS, confirmaram os dados obtidos em menor escala, predominando no cultivo com óleo de soja. Para o cultivo com cálcio o teor de TBARS extraído foi semelhante ao controle (não biotratado), enquanto para os cultivos sem aditivo ou contendo ácido oxálico exógeno foi maior.

Tabela 23. Valores de pH, atividade redutora de Fe^{3+} (medida após 30 min de reação; μM) e catecóis totais (mg/kg) analisados nos extratos aquosos e detecção de TBARS extraídos diretamente dos cavacos ($\mu\text{g}/\text{kg}$) provenientes da biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispota* após 2 semanas em biorreatores de 20 L.

Cultivo	pH*	Fe^{3+} reduzido*	catecóis totais*	TBARS*
controle	4,5 \pm 0,1	13,8 \pm 0,3	46,8 \pm 0,7	41 \pm 1
sem aditivo	4,1 \pm 0,1	2,1 \pm 0,3	2,2 \pm 0,3	73 \pm 4
1400 mg Ca^{2+}/kg	3,6 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1	2,2 \pm 0,5	39 \pm 3
1660 mg AO/kg	3,7 \pm 0,2	3,0 \pm 0,1	4,7 \pm 0,9	69 \pm 2
10,4 g óleo/kg	3,5 \pm 0,1	2,2 \pm 0,1	6 \pm 1	92 \pm 12

* As incertezas indicadas correspondem ao desvio da média para determinações em duplicata.

Os teores de ácido oxálico extraído dos cultivos em biorreatores estão mostrados na Figura 35. De forma geral, os cultivos suplementados com óleo de soja e com ácido oxálico apresentaram os maiores teores de oxalato total, como já observado nos cultivos em Erlenmeyers. Por outro lado, o cultivo adicionado de cálcio diferiu daqueles realizados em menor escala. Nos biorreatores, o teor total de oxalato foi maior que aquele observado nos cultivos em Erlenmeyers, atingindo valores similares aos observados nos cultivos sem aditivos. No presente cultivo com ácido oxálico exógeno também foi verificado o catabolismo desse ácido orgânico pelo fungo.

O fato de haver algumas diferenças entre as duas formas de cultivo, em Erlenmeyers ou em biorreatores, pode estar relacionado a vários fatores e um deles deve consistir na aeração contínua com ar úmido no segundo caso, o que poderia alterar de certa forma o metabolismo microbiano. Não deve ser descartada também a dificuldade de reprodutibilidade em sistemas biológicos, principalmente quanto à viabilidade do inóculo, pois o micélio foi rompido em um liquidificador e aplicado sem que houvesse um controle de viabilidade celular e/ou do nível de clamidósporos presentes.

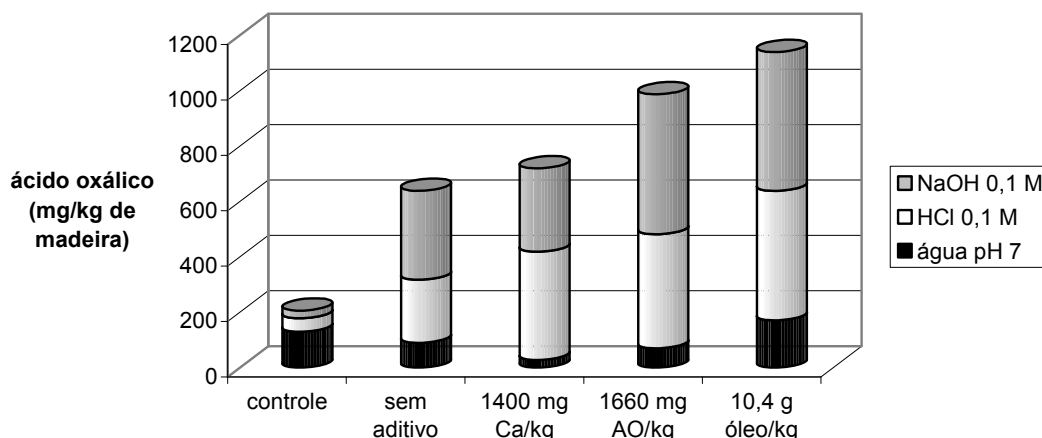


Figura 35. Produção de ácido oxálico proveniente da biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispora* após 2 semanas em biorreatores de 20 L.

5.6.2 Determinação de atividade pro-oxidante dos caldos enzimáticos

Recentemente, foi desenvolvido um método analítico que avalia a peroxidação de lipídeos por caldos de culturas fúngicas baseado no consumo de O_2 dissolvido, denominado de atividade pro-oxidante (KAPICH *et al.*, 2005a). Ao ser atacado por um agente oxidante, a molécula de um ácido graxo insaturado, como o ácido linoléico, é convertida a um radical centrado no carbono que consome O_2 , formando o radical peroxila (SOUTHORN; POWIS, 1988). Com base no recente trabalho de Kapich *et al.* (2005a), a peroxidação de ácido linoléico pelos caldos enzimáticos provenientes dos cultivos em biorreatores foi avaliada por meio da determinação do consumo de O_2 e também pela formação de TBARS *in vitro*, além das medidas já realizadas envolvendo o acúmulo de TBARS na madeira biotratada.

Na Figura 36 é mostrado um oxigrama referente à peroxidação de ácido linoléico pelo caldo enzimático proveniente do cultivo suplementado com 1660 mg de ácido oxálico/kg de madeira. Quando foram adicionados caldo enzimático, Mn^{2+} e emulsão de ácido linoléico em Tween 60 não foi observado consumo significativo de O_2 . Com a adição de H_2O_2 , houve um pequeno aumento no teor de O_2 dissolvido, seguido de uma queda progressiva, decorrente da peroxidação do ácido graxo. Para as outras amostras foi observado um oxigrama similar, porém com taxas de consumo de O_2 variadas.

Todos os caldos enzimáticos provenientes dos cultivos em biorreatores promoveram consumo de O_2 . Quando foi excluída a emulsão de ácido linoléico em Tween 60, ainda houve um pequeno consumo de O_2 , que pode ser atribuído à oxidação de ácido oxálico por Mn^{3+} (URZÚA; KERSTEN; VICUÑA, 1998) ou ainda a outros compostos presentes no caldo enzimático, principalmente fenóis, que podem ser atacados por esse forte oxidante. Os valores mostrados na Tabela 24 representam o consumo de O_2 causado apenas pela

peroxidação do ácido linoléico, descontando a interferência da oxidação de outros compostos presentes nos caldos. O pH escolhido para esses ensaios foi 4,5, pois esse é o valor ótimo para medir atividade pro-oxidante da MnP (KAPICH *et al.*, 2005a).

Para certificar que a atividade pro-oxidante era de origem enzimática, ao realizar o ensaio com caldo fervido não foi observado consumo de O_2 , corroborando Cunha (2008) e Kapich *et al.* (2005a; b). Em culturas líquidas suplementadas com palha de trigo do fungo *P. chrysosporium* observou-se que o agente pro-oxidante foi a MnP. A atividade pro-oxidante global dessas culturas consistiu na presença da MnP, mas também na inibição de compostos fenólicos com propriedades anti-oxidantes presentes nos caldos (KAPICH *et al.*, 2005a). Apesar de essas culturas apresentarem também atividade de LiP, apenas preparações purificadas de MnP apresentaram atividade pro-oxidante. Um dado intrigante observado por Kapich *et al.* (2005a; b) consistiu-se na necessidade de Mn^{2+} e H_2O_2 pelos caldos enzimáticos para promover atividade pro-oxidante, enquanto preparações de MnP purificada requereram apenas Mn^{2+} .

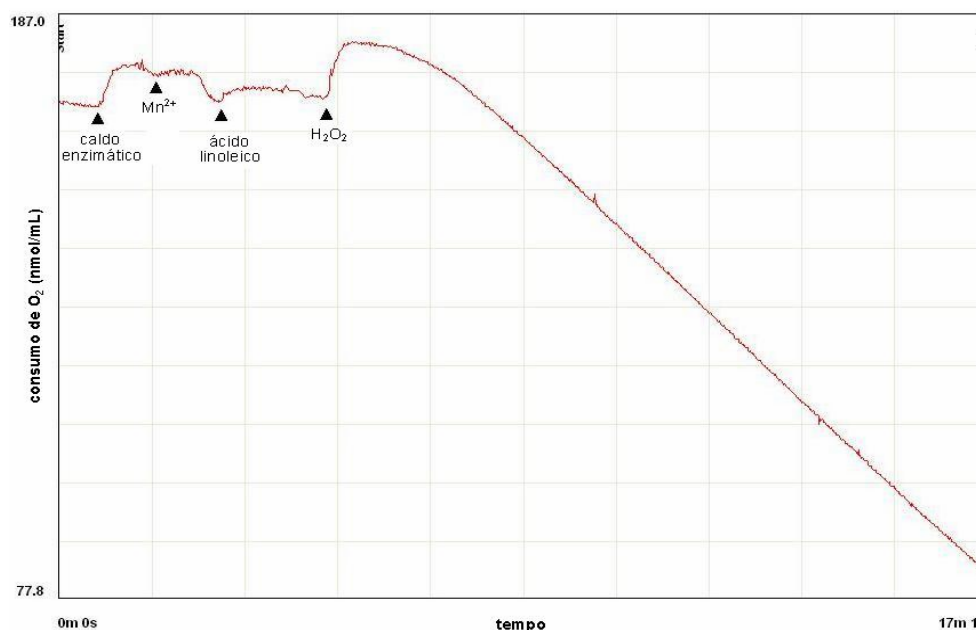


Figura 36. Oxigrama referente ao consumo de O_2 causado pela peroxidação de ácido linoléico por Mn^{2+} , H_2O_2 e o caldo enzimático proveniente da biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispora* após 2 semanas em biorreator na presença de 1660 mg de ácido oxálico/kg de madeira.

Os valores de atividade pro-oxidante observados nos caldos enzimáticos de *C. subvermispora* cultivado em biorreatores devem ser atribuídos exclusivamente à presença de MnP, pois as atividades de lacase foram muito baixas. Cunha (2008) observou atividade pro-oxidante por lacase produzida em culturas líquidas de *C. subvermispora* dependente de Mn^{2+} e de um mediador fenólico (ácido *p*-hidroxi-benzóico), assim como Srebotnik e Boisson (2005).

A Tabela 24 mostra que as taxas de consumo de O₂ nos caldos provenientes dos cultivos sem suplementação e aqueles adicionados de óleo de soja ou ácido oxálico não foram significativamente diferentes. Por outro lado, não houve consumo de O₂ pelo caldo do cultivo com cálcio. Nesse caso houve precipitação de oxalato de cálcio no interior da cela do oxímetro. Ao substituir o oxalato do ensaio por lactato, não houve precipitação, mas o consumo de O₂ continuou baixo, porém detectável.

A detecção de TBARS ao final das reações anteriores foi realizada como outra forma de verificar a peroxidação de ácido linoléico *in vitro*. A formação dessas substâncias foi um pouco mais expressiva no cultivo com ácido oxálico, enquanto no cultivo com cálcio foi bem baixa. A menor formação dessas substâncias no cultivo com cálcio deve ter ocorrido também pela precipitação do ácido oxálico usado no ensaio. Os valores de TBARS mostrados na Tabela 24 também foram descontados de reações realizadas na ausência de emulsão de ácido linoléico em Tween 60.

Tabela 24. Atividade pro-oxidante (UI/kg de madeira) baseada no consumo de O₂ e produção de TBARS (nmols/mL de caldo) por meio da peroxidação de ácido linoléico *in vitro* pelos caldos enzimáticos provenientes da biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispota* após 2 semanas em biorreatores de 20 L.

Cultivo	Atividade pro-oxidante	TBARS
sem aditivo	172 ± 19 (a)*	6,5 ± 1,0 (a)
1400 mg Ca ²⁺ /kg	**	1,6 ± 0,7 (b)
1660 mg ácido oxálico/kg	167 ± 15 (a)	8,1 ± 0,6 (a)
10,4 g óleo de soja/kg	163 ± 13 (a)	7,1 ± 0,7 (a)

* Em cada coluna, letras iguais indicam que os valores não diferem com 95% de confiança, letras diferentes indicam valores significativamente diferentes (teste de Dunnet).

** O consumo de O₂ foi inexpressivo.

Na determinação de TBARS foram realizados ensaios na ausência de Mn²⁺, H₂O₂ ou ácido linoléico em Tween 60 para um caldo enzimático proveniente do cultivo sem aditivo. Na reação contendo todos os reagentes foi observada maior formação de TBARS, enquanto nos ensaios sem Mn²⁺ ou H₂O₂ também houve reação (Tabela 25). Para esses ensaios, os caldos enzimáticos podem conter quantidades mínimas desses dois reagentes provenientes da biodegradação de madeira que são suficientes para causar peroxidação do ácido linoléico. Nos cultivos de *C. subvermispota* sobre cavacos de madeira *in natura* ou extraídos com etanol foi detectado H₂O₂ residual (0,5-5,2 mg/kg de madeira, Tabela 2). Cunha (2008) também observou formação de TBARS sem Mn²⁺ ou H₂O₂. Nos ensaios realizados por Kapich *et al.* (2005a) a formação de TBARS na ausência de ácido linoléico, Mn²⁺ ou caldo enzimático foi praticamente nula em relação ao ensaio realizado com todos os reagentes.

Os valores de atividade de MnP (com ácido oxálico como quelante), atividade pro-oxidante (consumo de O₂) e formação de TBARS provenientes dos cultivos em biorreatores

apresentaram correlações entre si (Figura 37). De acordo com os pontos próximos de zero nos gráficos (dados do cultivo com cálcio) fica claro de que é necessária atividade significativa de MnP para promover atividade pro-oxidante e formação de TBARS. Cunha (2008) também observou correlações entre MnP, consumo de O₂, e formação de TBARS a partir de caldos enzimáticos provenientes da biodegradação de *E. grandis* por *C. subvermispora*. Por outro lado, Kapich *et al.* (2005a) não observaram correlações entre produção de MnP e atividade pro-oxidante de culturas de outros fungos de podridão branca.

Tabela 25. Efeito de reagentes na formação de TBARS *in vitro* decorrente da peroxidação de ácido linoléico pelo caldo enzimático do cultivo sem aditivo.

Condição	TBARS (nmols/mL de caldo enzimático)
todos os reagentes	7,2 ± 1,0 (a)*
sem Mn ²⁺	4,1 ± 0,8 (b)
sem H ₂ O ₂	4,8 ± 0,5 (b)
sem ácido linoléico e sem Tween 60	0,7 ± 0,1 (c)

* Em cada coluna, letras iguais indicam que os valores não diferem com 95% de confiança, letras diferentes indicam valores significativamente diferentes (teste de Dunnet).

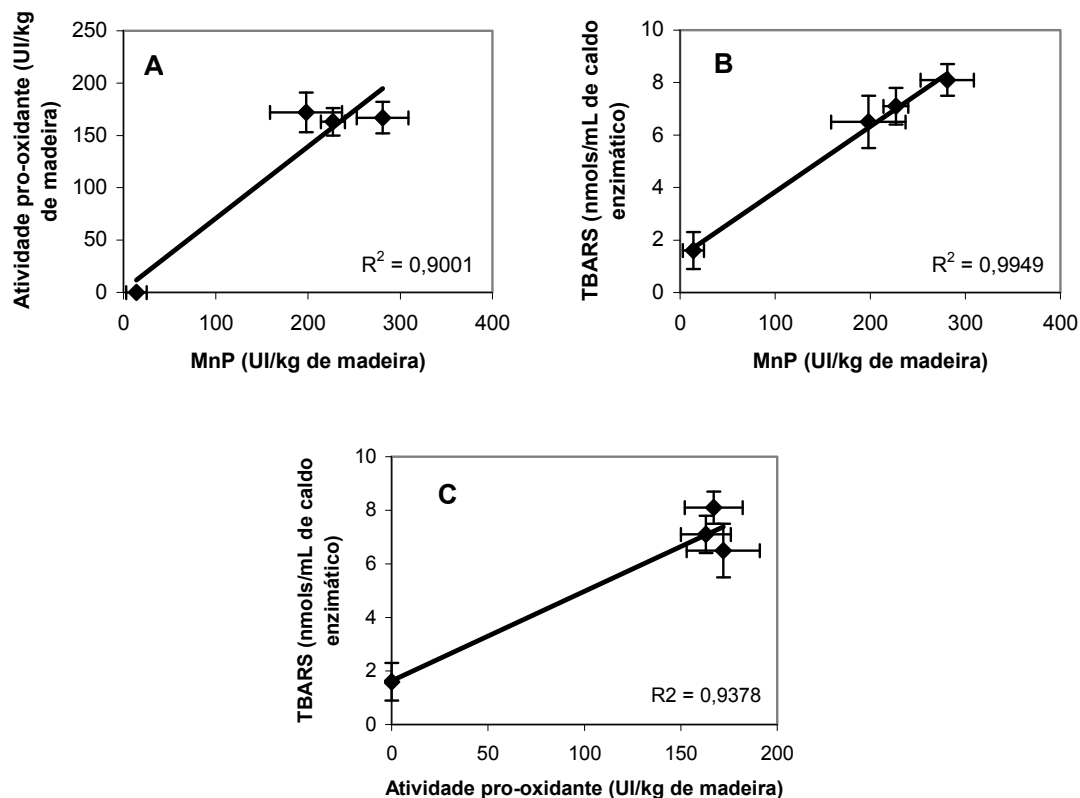


Figura 37. Atividade pro-oxidante e MnP (A), formação de TBARS e MnP (B) e formação de TBARS e atividade pro-oxidante (C) provenientes da biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispora* em biorreatores de 20 L.

5.6.3 Polpação quimiotermomecânica

Após a etapa de caracterização de metabólitos e alterações dos principais componentes da madeira foram realizados ensaios de polpação para as amostras de madeira biotratada e também para o controle. A polpação mecânica foi adotada nesse estudo por apresentar maiores benefícios que a polpação química ao se utilizar cavacos biodegradados (FERRAZ *et al.*, 2008). O processo quimiotermomecânico sulfito alcalino foi adotado por ser o mais adequado para estudos de bancada (GUERRA; MENDONÇA; FERRAZ, 2005; MASARIN, 2006; VICENTIM, 2007; VICENTIM; FERRAZ, 2008).

Primeiramente os cavacos sofreram um cozimento em meio sulfito alcalino para causar certo amolecimento, o que facilita o desfibramento mecânico. Nessa etapa ocorreu a solubilização de cerca de 10% do material original para todas as amostras avaliadas (Tabela 26). Essa fração solúvel deve corresponder aos extrativos, à uma pequena fração de lignina e também à uma fração de polioses solúveis em meio alcalino. Vicentim (2007) também observou solubilização similar no pré-cozimento com 5% de NaOH e 10% de Na₂SO₃ de cavacos de *E. grandis* biodegradado por *C. subvermispora*.

Na etapa seguinte, os cavacos foram desfibrados em um liquidificador e posteriormente classificados (RUZINSKI; KOKTA, 2000). Essa etapa de desfibramento busca simular o primeiro estágio de polpação quimiomecânica utilizado industrialmente, que faz uso de um refinador de disco específico para o desfibramento. Nesse processo mecânico, parte dos cavacos permaneceu na forma de palitos e aglomerado de fibras (rejeitos; Tabela 26). Estudos recentes realizados com *E. grandis* biotratado mostraram que há uma correlação entre a eficiência do biotratamento e a minimização da fração de palitos dessa etapa (VICENTIM; FERRAZ, 2008). Isso é bastante relevante, pois o rendimento de palitos da etapa de desfibramento pode ser usado como um indicador de benefício atribuído ao biotratamento dos cavacos.

Como o rendimento de palitos foi expressivo após a etapa de desfibramento em liquidificador (cerca de 30%), uma segunda etapa de desfibramento foi aplicada, agora utilizando um moinho Jokro. Após essa etapa, o teor final de rejeitos variou entre 11 e 23% (Tabela 26). Essa fração de rejeitos foi elevada quando comparada com polpações semelhantes feitas com *E. grandis*, que gera um teor de rejeitos finais da ordem de 2,5% (VICENTIM, 2007; VICENTIM; FERRAZ, 2008). Isso sugere que, independentemente do biotratamento, a madeira de *P. taeda* resiste mais ao desfibramento, provavelmente porque apresenta um maior teor de lignina ou ainda porque possui um complexo celular mais coeso composto essencialmente por fibras longitudinais (traqueídeos), enquanto *E. grandis* contém um complexo celular que inclui vasos e fibras transversais (FENGEL; WEGENER, 1989).

As fibras classificadas provenientes das duas etapas de desfibramento foram misturadas para a realização dos ensaios de refinamento, também em moinho Jokro. Essa etapa busca simular o refino das polpas que industrialmente é feito num segundo disco refinador específico e tem o objetivo de gerar fibras com maior capacidade de compactação e por isso formar papéis mais resistentes (BIERMANN, 1993).

Tabela 26. Rejeitos e rendimento (% g/100 g de cavacos iniciais) de polpa das etapas de polpação quimiotermodinâmica.

Condições	Rejeitos da primeira	Rejeitos da segunda	Rendimento de
	etapa	etapa	cozimento
controle	30,7	11,3	89,6
sem aditivo	27,4	18,5	89,3
1400 mg Ca ²⁺ /kg	30,4	23,1	89,4
1660 mg AO/kg	24,3	16,3	89,6
10,4 g óleo/kg	31	14,2	89,8

As polpas foram refinadas por períodos de 90, 120 e 180 min e os graus de refino obtidos estão mostrados na Figura 38.

A avaliação dos resultados do processo de polpação quimiotermodinâmica das amostras em estudo mostra que, independentemente do biotratamento, o rendimento na etapa de pré-cozimento em meio sulfito alcalino não foi significativamente alterado, sugerindo que as amostras biotratadas não estão sujeitas a maior solubilização no meio reacional utilizado (Tabela 26). Esse dado é importante, pois o biotratamento não acarretou na perda de material fibroso na etapa química do processo. O teor de palitos após o desfibramento em liquidificador foi inferior na amostra de madeira biotratada nas condições sem aditivos e adicionadas de ácido oxálico, enquanto a madeira biotratada nos cultivos adicionados de cálcio ou óleo levaram à formação de um teor de palitos equivalente ao observado no controle não biotratado.

Ainda avaliando a eficiência do biotratamento sobre a polpação quimiotermodinâmica, podemos considerar que grau de fibrilação obtido num tempo fixo de refino em moinho Jokro pode ser usado como um critério de benefício do biotratamento. Na Figura 38 pode-se notar que as maiores diferenças no grau de fibrilação das amostras avaliadas são observadas em refinamentos de 120 min. Nesse ponto da curva de refino, a madeira biotratada no cultivo sem aditivos gerou polpas com 29 °SR, contra somente 22 °SR na madeira controle. Essa diferença é expressiva e reflete exatamente o benefício de se utilizar madeiras biotratadas na polpação mecânica. Esse benefício pode ainda ser avaliado segundo outra ótica que é a da economia de energia (ou redução no tempo de

desfibramento). Por exemplo, para gerar uma polpa com 29 °SR, a amostra biotratada na condição sem aditivos demandou 120 min de refino, enquanto a amostra controle demandaria cerca de 132 min para atingir a mesma fibrilação. Isso significaria uma economia de 10% no tempo necessário para o refinamento. Esse tipo de benefício tem sido amplamente reportado na literatura para o processo de biopolpação (AKHTAR *et al.*, 1998; FERRAZ *et al.*, 2008).

Em um processo de polpação semelhante ao avaliado no presente trabalho, Vicentim e Ferraz (2008) mostraram que a redução no tempo de refino chegou a 38% quando *E. grandis* foi biotratado em uma condição de cultivo que induzia a secreção de MnP. Em cultivos sem aditivos, essa economia de tempo de refino foi de 20%, sendo superior à observada em nossos experimentos. Ainda nesse trabalho, o teor de palitos após o desfibramento no liquidificador foi reduzido de 42% na madeira controle para valores tão baixos quanto 28% e 25%, respectivamente, nas madeiras biotratadas em cultivos sem aditivos e em cultivos suplementados com milhocina e glicose onde houve elevada secreção de MnP (VICENTIM; FERRAZ, 2008).

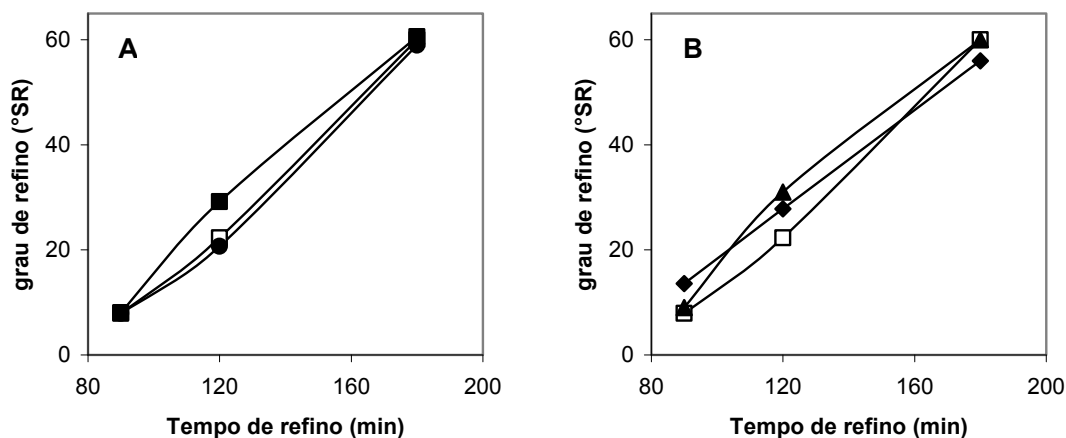


Figura 38. Graus de refino de polpas quimi-termomecânicas sulfito alcalino de *P. taeda*: **A** - controle (□); biodegradado por *C. subvermispora* por 2 semanas sem aditivo (■); com 1660 mg de ácido oxálico/kg de madeira (●); **B** - controle (□); com 1400 mg de Ca^{2+} /kg de madeira (▲); e com 10,4 g de óleo de soja/kg de madeira (◆).

Definindo o grau de fibrilação das amostras após 120 min de refino como um parâmetro comparativo de benefício para os diferentes biotratamentos avaliados no presente trabalho, temos os dados mostrados na Figura 39. Pode-se notar que o biotratamento que proporcionou o maior benefício foi aquele adicionado de Ca^{2+} , embora os valores observados tenham sido somente um pouco superiores aos observados nos cultivos sem suplementação (31 °SR e 29 °SR, respectivamente). Por outro lado, o cultivo

suplementado com ácido oxálico não proporcionou benefícios ao processo de polpação mecânica.

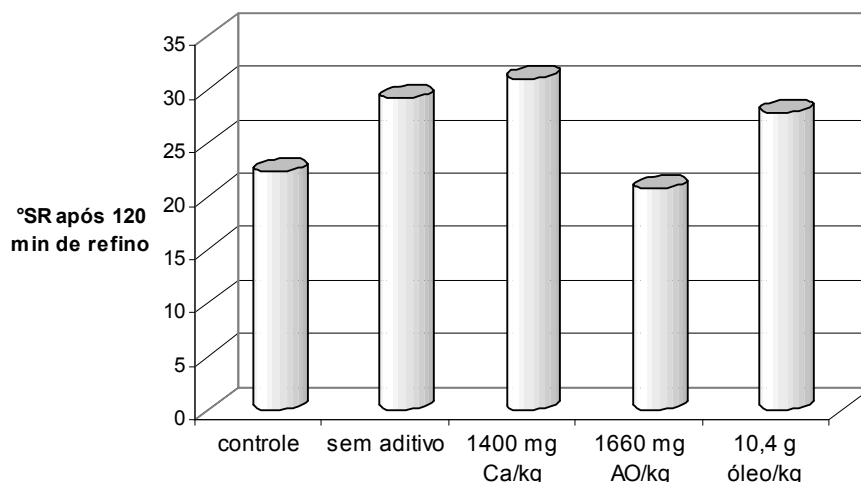


Figura 39. Graus de refino de polpas quimiotermomecânicas sulfito alcalino de *P. taeda* após 120 min de refino.

Os resultados da Figura 39 sugerem que a adição de ácido oxálico aos cultivos afeta negativamente o metabolismo que proporciona transformações benéficas para a biopolpação. Nesse cultivo, a única alteração notória em relação aos demais está no fato de o fungo degradar parte do ácido oxálico adicionado e provavelmente não atuar no sentido de produzir mais ácido oxálico a partir da síntese *de novo*. Os maiores benefícios observados nos cultivos com a adição de Ca^{2+} também apontam para alterações metabólicas relacionadas à síntese/degradação/transformação do ácido oxálico, pois a adição de Ca^{2+} indisponibiliza grande parte do ácido oxálico produzido pelo fungo devido a formação de oxalato de cálcio. Com base nesses dados, seria possível propor que a síntese contínua de ácido oxálico pelo fungo proporciona alguma alteração na madeira que é benéfica para a biopolpação. No caso do cultivo adicionado de Ca^{2+} , o ácido oxálico produzido fica indisponível (note-se que o teor de oxalato livre nesse cultivo foi de 28 mg/kg de madeira contra 90 mg/kg de madeira no cultivo não suplementado - Figura 35), o que estimula o fungo a produzir mais ácido oxálico. Por outro lado, no cultivo com a adição exógena de ácido oxálico, a atividade metabólica do fungo é inversa e ocorre no sentido de degradar o excesso do ácido presente.

Outras atividades metabólicas detectadas nos cultivos em estudo foram tentativamente correlacionadas com os benefícios da biopolpação. No entanto, nenhuma das atividades medidas mostra correlação direta univariada com o aumento do grau de fibrilação das polpas. Um exemplo é a atividade de MnP, que embora tenha sido diminuída

nos cultivos com Ca^{2+} , não foi determinante, visto que exatamente nesses cultivos o benefício foi maior. Obviamente, as transformações benéficas podem resultar de uma ação sinérgica de várias vias metabólicas, porém a disponibilidade limitada de dados experimentais (somente 4 condições de cultivo) impede um tratamento multivariado dos resultados que poderiam indicar alguma correlação entre as diversas atividades metabólicas e os benefícios da biopolpação.

A contraposição dos resultados obtidos no presente trabalho com dados recentes da literatura indica que o metabolismo do ácido oxálico pode efetivamente ser relevante para as biotransformações da madeira que proporcionam os benefícios na polpação. Um trabalho de Hunt *et al.* (2004) mostrou que fungos de podridão branca esterificam ácido oxálico nos polissacarídeos da parede celular vegetal, causando um aumento no ponto de saturação das fibras e conseqüentemente facilitam o refino mecânico posterior, além de gerar polpas com melhores propriedades mecânicas. Aparentemente, a via metabólica que proporciona a esterificação do ácido oxálico está ligada ao processo de síntese e degradação *in vivo*, pois nos cultivos onde se adicionou ácido oxálico (a biossíntese não foi necessária) não se observou benefícios na biopolpação. No outro sentido, quando se adicionou Ca^{2+} aos cultivos (a biossíntese foi necessária, pois o ácido oxálico produzido permanecia indisponível para o fungo), o benefício na biopolpação foi elevado.

Meyer-Pinson *et al.* (2004) trataram madeira com concentrações elevadas de ácido oxálico e observaram a solubilização de açúcares provenientes das polioses, xilose e arabinose. A madeira tratada nessas condições proporcionou a obtenção de polpas com maior resistência mecânica. Kenealy, Horn e Houtman (2007) trataram madeira com ácido oxálico sob temperatura e concentrações elevadas e não observaram formação de ésteres de oxalato. Esses mesmos autores tentaram em seguida tratar termicamente (a vapor) madeiras com oxalato de dietila para tentar transesterificar o ácido oxálico nas fibras. Apesar de também não ter ocorrido transesterificação por esse tratamento, esse novo processo proporcionou economia de energia em um processo termomecânico de polpação com diferentes tipos de madeira. Índices de resistência ao rasgo foram aumentados para um mesmo grau de refino, enquanto os índices de resistência ao estouro e à tração foram aumentados para uma mesma densidade dos corpos-de-prova.

Para as polpas provenientes dos diferentes pontos de refino foram avaliadas as propriedades de resistência à tração (Figura 40) e ao rasgo (Figura 41). Com o aumento do grau de refino, as polpas apresentaram maior resistência à tração. A polpa proveniente dos cultivos com óleo de soja apresentou maior resistência à tração com o mesmo grau de refino em relação às outras amostras no primeiro ponto (Figura 40A). As polpas provenientes dos cultivos sem aditivo ou com cálcio ou ácido oxálico não apresentaram nenhum aumento de

resistência à tração em relação ao controle. Todas as polpas provenientes dos tempos de 120 e 180 min apresentaram índices de resistência à tração semelhantes entre si.

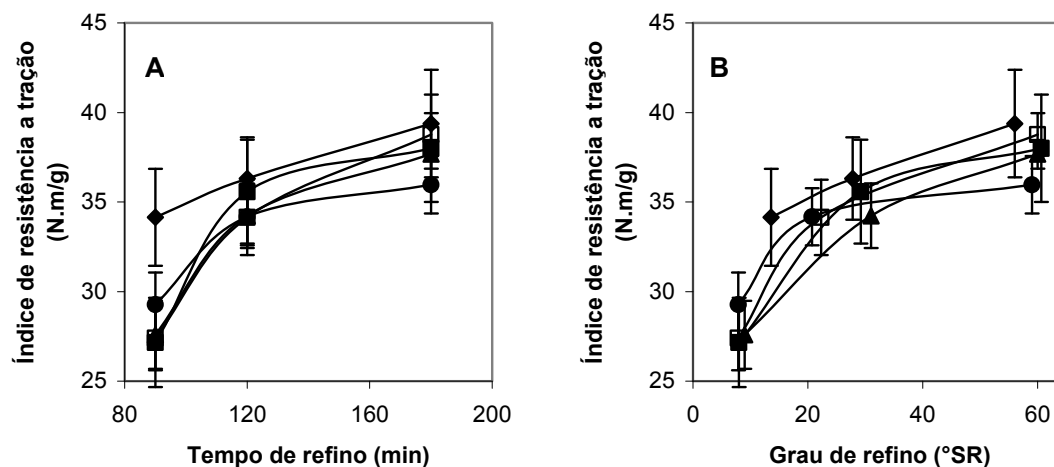


Figura 40. Resistência à tração em função do tempo (A) e do grau de refino (B) das folhas provenientes da polpação quimiotermomecânica de *P. taeda*: controle (□); biodegradado por *C. subvermispota* por 2 semanas sem aditivo (■); com 1400 mg de Ca²⁺/kg de madeira (▲); com 1660 mg de ácido oxálico/kg de madeira (●) e; com 10,4 g de óleo de soja/kg de madeira (◆).

Foi observada uma tendência de diminuição de resistência ao rasgo com o aumento do grau de refino das polpas. A polpa proveniente do cultivo com óleo de soja apresentou a mais baixa resistência ao rasgo no primeiro ponto de refino. As outras amostras apresentaram índices de resistência ao rasgo bastante similares entre os tempos e os graus de refino (Figura 41).

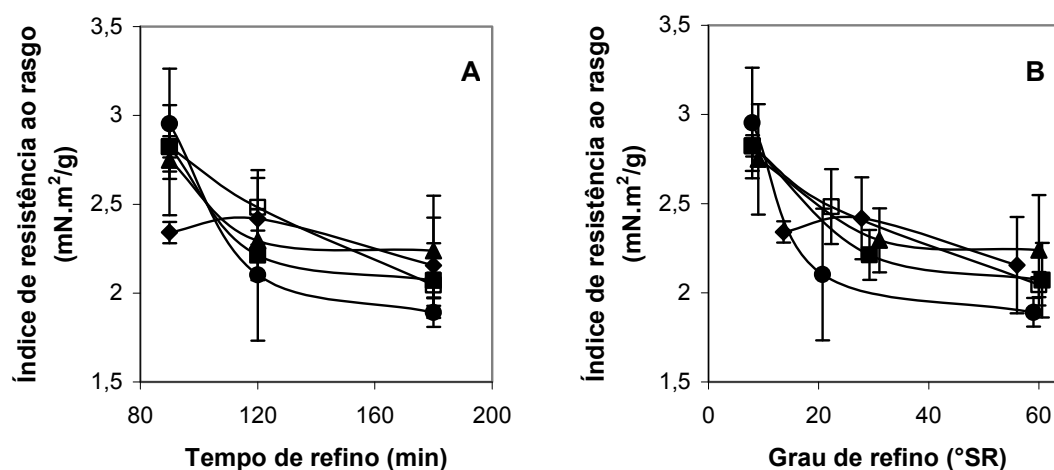


Figura 41. Resistência ao rasgo em função do tempo (A) e do grau de refino (B) das folhas provenientes da polpação quimiotermomecânica de *P. taeda*: controle (□); biodegradado por *C. subvermispota* por 2 semanas sem aditivo (■); com 1400 mg de Ca²⁺/kg de madeira (▲); com 1660 mg de ácido oxálico/kg de madeira (●) e; com 10,4 g de óleo de soja/kg de madeira (◆).

O aumento da resistência à tração foi proporcional à diminuição da resistência ao rasgo para todas as amostras, com exceção das polpas provenientes do cultivo com óleo de soja (Figura 42). Tais propriedades são conhecidas por serem inversamente proporcionais (BIERMANN, 1993). Esse comportamento também foi observado por Masarin (2006) e Vicentim (2007).

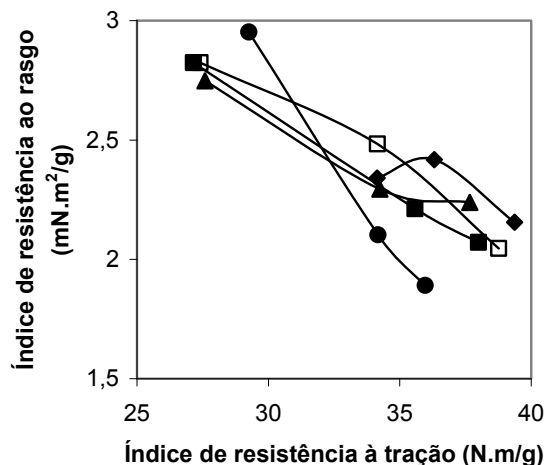


Figura 42. Contraposição dos índices de resistência ao rasgo e à tração das folhas provenientes da polpação quimiotermodinâmica de *P. taeda*: controle (□); biodegradado por *C. subvermispota* por 2 semanas sem aditivo (■); com 1400 mg de Ca^{2+} /kg de madeira (▲); com 1660 mg de ácido oxálico/kg de madeira (●) e; com 10,4 g de óleo de soja/kg de madeira (◆).

A avaliação de dados da literatura correlatos ao processo de biopolpação empregado no presente trabalho mostram que na polpação química sulfito alcalino/antraquinona, o principal benefício observado por Mendonça *et al.* (2004), ao utilizar uma mistura de cavacos de pinus biotratados por *C. subvermispota* consistiu no menor conteúdo de lignina das biopolpas, necessitando de um menor tempo de cozimento para se obter um mesmo n° Kappa. As biopolpas apresentaram maior grau de refino, os índices de resistência ao estouro e à tração foram similares em relação ao controle, porém, os índices de resistência ao rasgo foram inferiores. Resultados de polpação quimiotermodinâmica sulfito alcalino para madeiras biodegradadas por *C. subvermispota* têm mostrado que o principal benefício observado para as polpas consiste na facilitação do refino, o que gera um menor consumo de energia para atingir um mesmo grau de refino em relação a uma polpa controle (proveniente de madeira não biotratada) (GUERRA; MENDONÇA; FERRAZ, 2005; MASARIN, 2006; VICENTIM, 2007). Para os processos de polpação termomecânica e mecânica por refinamento os resultados foram satisfatórios tanto para a facilitação do refino quanto para a melhoria das propriedades mecânicas das polpas (AKHTAR *et al.*, 1998).

6. Conclusões

A produção de metabólitos extracelulares (enzimas, ácido oxálico) e a degradação dos constituintes da madeira, principalmente a lignina, foram similares nas duas condições de cultivo que utilizaram madeira *in natura* e madeira extraída com etanol. Como a formação de produtos de peroxidação de lipídeos também foi similar nesses cultivos, é provável que *C. subvermispora* sintetize ácidos graxos insaturados a partir da degradação dos constituintes da madeira. Pode-se concluir, portanto, que os ácidos graxos presentes em *P. taeda* não são imprescindíveis para a colonização da madeira e para as reações de peroxidação de lipídeos induzidas *in vivo* por *C. subvermispora*.

Por meio de caracterização das ligninas provenientes dos cultivos sobre madeira *in natura* foi constatado que esse componente é despolimerizado por *C. subvermispora* já na primeira semana de colonização. Além da despolimerização, OH alifáticas e fenólicas também são degradadas pelo fungo, enquanto o teor de grupos carboxila aumenta com o avanço do biotratamento. A diminuição de OH alifáticas nas ligninas provavelmente deve refletir na oxidação do C α , enquanto o aumento de grupos carboxila é decorrente da quebra de ligação C α -C β ou ainda à abertura de anel aromático.

Os cultivos de *C. subvermispora* que sofreram a adição de óleo de soja buscaram alterar o substrato do fungo no sentido inverso da extração com etanol, ou seja, aumentar a disponibilidade de ácidos graxos insaturados. A adição de óleo estimulou o crescimento fúngico e a produção de ácido oxálico. Com o aumento da adição desse suplemento ocorreram mais reações de peroxidação de lipídeos, porém, isso não refletiu em maior deslignificação da madeira. Esses resultados sugerem que o óleo serviu como uma fonte de carbono de fácil assimilação, o que tipicamente leva a inibição da degradação de lignina por *C. subvermispora*, conforme consta na literatura. A adição de óleo aos cultivos aparentemente alterou as vias degradativas da lignina, visto que a despolimerização da lignina residual e a formação de carboxilas foram inibidas, enquanto houve maior diminuição de hidroxilas alifáticas, sugerindo que a reação predominante foi a oxidação do C α .

Embora a degradação de glicana tenha sido baixa (menor que 4%) nos cultivos com *C. subvermispora*, o fungo causou certo grau de despolimerização em fibras de holocelulose isentas de lignina, inseridas nos cultivos com madeira *in natura* e extraída com etanol. Esse nível de despolimerização da holocelulose foi menor que aquele observado em cultivos similares utilizando um fungo de podridão parda (*G. trabeum*) ou um de podridão branca não seletivo (*T. versicolor*). Com o avanço do biotratamento por *C. subvermispora*, produtos de biodegradação da lignina com atividade redutora de Fe³⁺ (envolvida na produção de radicais hidroxila pela reação de Fenton) acumularam-se nos cultivos. O outro promotor da reação de Fenton, H₂O₂, também foi detectado nesses cultivos. Por outro lado, o ácido oxálico, que

se mostrou um inibidor da redução de Fe^{3+} catalisada pelos extratos aquosos dos cultivos, foi secretado por *C. subvermispota* em grandes quantidades. Dessa forma, é possível concluir que a presença de ácido oxálico livre nos cultivos tenha inibido a redução de Fe^{3+} *in vivo* e limitado a extensão da reação de Fenton no início da colonização da madeira. Isso poderia explicar a degradação limitada de polissacarídeos por *C. subvermispota* que é um fungo que também apresentou um sistema enzimático hidrolítico incompleto.

A adição de íons Ca^{2+} aos cultivos teve o objetivo de alterar o substrato no sentido de limitar a disponibilidade de ácido oxálico livre e, dessa forma, avaliar o papel desse metabólito na degradação de madeira por *C. subvermispota*. A adição de Ca^{2+} efetivamente indisponibilizou o ácido oxálico produzido, visto que a fração de oxalato livre nos cultivos com a maior concentração de Ca^{2+} foi muito baixa. Ensaios *in vitro* também mostraram que o Ca^{2+} inibe completamente as reações iniciadas por MnP. Efetivamente, as maiores concentrações de Ca^{2+} adicionadas aos cultivos inibiram o crescimento fúngico, porém não alteraram de forma expressiva a secreção de enzimas. Dessa forma, a adição de Ca^{2+} na maior concentração proporcionou um processo biodegradativo interessante do ponto de vista metabólico, pois embora houvesse quantidade apreciável de MnP no cultivo, não havia a disponibilidade de oxalato livre. Isso acarretou na inibição da deslignificação, porém não a suprimiu por completo, sugerindo que, além do ácido oxálico, outros compostos presentes na madeira ou secretados pelo fungo podem atuar como quelantes e transportadores de Mn^{3+} para fomentar o ciclo catalítico da MnP.

A adição de ácido oxálico nos cultivos buscou um sentido inverso da adição de Ca^{2+} , ou seja, o objetivo era alterar o substrato no sentido de haver o máximo possível de oxalato livre para fomentar a ação da MnP. Nesses cultivos, o fungo atuou claramente no sentido de equilibrar o teor de ácido oxálico livre nos cultivos, degradando o excesso de oxalato nos cultivos com a maior concentração e sintetizando o ácido quando os cultivos não dispunham de quantidade suficiente. A deslignificação não foi aumentada pela adição de ácido oxálico, embora o cultivo com a maior concentração inicial tenha proporcionado maiores níveis de MnP. Esses dados sugerem que existe uma proporção ideal desses metabólitos nos cultivos e que a adição exógena de ácido oxálico ao substrato não acarreta necessariamente na maior degradação da lignina.

Os cultivos em biorreatores com as máximas cargas dos aditivos cálcio, ácido oxálico e óleo de soja apresentaram similaridades com os cultivos em Erlenmeyers. A partir de ensaios de peroxidação de lipídeos *in vitro* foi observado que a MnP foi o principal agente pro-oxidante nessas culturas. A polpação quimiotermomecânica sulfito alcalino dessas amostras de madeira biodegradada mostraram que os cultivos adicionados de Ca^{2+} e os não suplementados foram os que proporcionaram os maiores benefícios atribuídos ao

biotratamento. Por outro lado a adição de ácido oxálico anulou o benefício oriundo do biotratamento. A busca de correlações entre os níveis de metabólitos extracelulares com os benefícios do biotratamento para a polpação quimiotermomecânica não apresentaram tendências claras que indiquem a relevância de um metabólito em especial. Pelo contrário, aparentemente deve haver um compromisso entre todas as atividades extracelulares para que um determinado benefício seja obtido.

Referências

- AGUIAR, A.; SOUZA-CRUZ, P.; FERRAZ, A. Oxalic acid, Fe³⁺-reduction activity and oxidative enzymes detected in culture extracts recovered from *Pinus taeda* wood chips biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 873-878, 2006.
- AGUIAR, A. *et al.* Mecanismo e aplicações da reação de Fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. **Química Nova**, v. 30, p. 623-628, 2007.
- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Fe³⁺- and Cu²⁺-reduction by phenol derivatives associated with Azure B degradation in Fenton-like reactions. **Chemosphere**, v. 66, p. 947-54, 2007.
- 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.
- ALCÂNTARA, R. *et al.* Catalytic production of biodiesel from soy-bean oil, used frying oil and tallow. **Biomass and Bioenergy**, v. 18, p. 515-527, 2000. AMIRTA, R. *et al.* Ceriporic acid C, a hexadecenylitaconate produced by a lignin-degrading fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 126, p. 121-131, 2003.
- ARANTES, V.; MILAGRES, A.M.F. The synergistic action of ligninolytic enzymes (MnP and Laccase) and Fe³⁺-reducing activity from white-rot fungi for degradation of Azure B. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 17-22, 2007.
- ARCHIBALD, F.S. A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye Azure B. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 3110-3116, 1992.
- 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.
- ARNOW, L.E. Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylamine-tyrosine mixtures. **Journal of Biological Chemistry**, v. 118, p. 531-537, 1937.
- BAMINGER, U. *et al.* A simple assay for measuring cellobiose dehydrogenase activity in the presence of laccase. **Journal of Microbiological Methods**, v. 35, p. 253-259, 1999.
- 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.
- 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.
- BOHLIN, C. *et al.* Differences in stereo-preference in the oxidative degradation of diastereomers of the lignin model compound 1-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-(2-methoxyphenoxy)-1,3-propanediol with enzymic and non-enzymic oxidants. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, p. 21-26, 2007.

- BOURBONNAIS, R.; LEECH, D.; PAICE, M.G. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1379, p 381-390, 1998.
- BUEGE, J.A.; S.D. AUST. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 302-310, 1978.
- BURDSALL, Jr., H.S. Taxonomy of industrially important white-rot fungi. In: Young, R. e Akhtar, M., **Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**. New York: John Wiley & Sons, 1998, p. 259-272.
- CAMARERO, S. *et al.* Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1264-1271, 2007.
- CHOI, J.W. *et al.* Characterization of thembling 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.
- COHEN, R.; SUZUKI, M.R.; HAMMEL, K.E. Processive endoglucanase active in crystalline cellulose hydrolysis by the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 2412-2417, 2005.
- 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.
- CUNHA, G.G.S. **Atividade peroxidativa de extratos obtidos a partir de cultivos de *Ceriporiopsis subvermispora* e sua relação coma degradação de lignina**. Lorena, SP: EEL, 2008. 66f. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo.
- DAINA, S. *et al.* Degradation of β -5 lignin model dimers by *Ceriporiopsis subvermispora*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 499-505. 2002.
- DANIEL, G. Microview of wood under degradation by bacteria and fungi. In: Goodell B., Nicholas D.D., Schultz T.P., **Wood Deterioration and Preservation - Advances in our Changing World**. Washington, DC: American Chemical Society, 2003, p. 34-72 (ACS Symposium Series, 845).
- DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.
- EGGERT, C. *et al.* A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. **FEBS Letters**, v. 391, p. 144-148, 1996.
- ELISSETCHE, J.P. *et al.* Biodegradation of Chilean native wood species, *Drimys winteri* and *Nothofagus dombeyi*, by *Ganoderma australe*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 577-581, 2001.
- ELISSETCHE, J.P. *et al.* Thiobarbituric acid reactive substances, Fe^{3+} reduction and enzymatic activities in cultures of *Ganoderma australe* growing on *Drimys winteri* wood. **FEMS Microbiology Letters**, v. 260, p. 112-118, 2006.

- ENOKI, M. *et al.* Extracellular lipid peroxidation of selective white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 180, p. 205-211, 1999.
- 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, A.; TANAKA, H.; ITAKURA, S. Physical and chemical characteristics of glycopeptide from wood decay fungi. In: Goodell B., Nicholas D.D., Schultz T.P., **Wood Deterioration and Preservation - Advances in our Changing World**. Washington, DC: American Chemical Society, 2003, p. 140-153 (ACS Symposium Series 845).
- ESPEJO, E.; AGOSIN E. Production and degradation of oxalic acid by brown-rot fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 1980-1986, 1991.
- 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.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood Chemistry, Ultrastructure and Reactions**, Berlin: Walter de Gruyter, 1989.
- FERRAZ, A. *et al.* Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 201-212, 2000.
- 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.; CÓRDOVA, A.M.; MACHUCA, A. Wood biodegradation and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora* during solid-state fermentation of *Eucalyptus grandis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 59-65, 2003.
- FERRAZ, A. *et al.* Technological advances and mechanistic basis for fungal biopulping. **Enzyme and Microbial Technology**, 2008, no prelo.
- FILLEY, T.R. *et al.* Lignin demethylation and polysaccharide decomposition in spruce sapwood degraded by brown rot fungi. **Organic Geochemistry**, v. 33, p. 111-124, 2002.
- FISCHER, K. *et al.* Pitch reduction with the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. In: Srebotnik, E., **Biotechnology in the Pulp and Paper Industry: Recent Advances in Applied and Fundamental Research**. Vienna: Facultas-Universitätsverlag, 1996, p. 193-198.
- GALKIN, S. *et al.* Production of organic acids by different white-rot fungi as detected using capillary zone electrophoresis. **Biotechnology Techniques**, v. 12, p. 267-271, 1998.
- GENG, X.; LING, K. Degradation of non-phenolic lignin by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 342-346, 2002.

- GOODELL, B. *et al.* Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolate from wood decay fungus and their role in the fungal biodegradation of wood. **Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 133-152, 1997.
- GOODELL, B. *et al.* Iron-reducing capacity of low-molecular-weight compounds produced in wood by fungi. **Holzforschung**, v. 60, p. 630-636, 2006.
- 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.; MENDONÇA, R.; FERRAZ, A. Characterization of the residual lignins in *Pinus taeda* biodegraded by *Ceriporiopsis subvermispora* 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 subvermispora*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 12-18, 2003.
- GUERRA, A. *et al.* Structural characterization of lignin during *Pinus taeda* wood treatment with *Ceriporiopsis subvermispora*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 4073-4078, 2004.
- GUERRA, A.; MENDONÇA, R.; FERRAZ, A. Bio-chemimechanical pulps from *Eucalyptus grandis*: strength properties, bleaching, and brightness stability. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 25, p. 203-216, 2005.
- 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.
- 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.
- HARAZONO, K.; NAKAMURA, K. Decolorization of mixtures of different reactive textile dyes by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete sordida* and inhibitory effect of polyvinyl alcohol. **Chemosphere**, v. 59, p. 63-68, 2005.
- HASTRUP, A.C.S. *et al.* The effect of CaCl₂ on growth rate, wood decay and oxalic acid accumulation in *Serpula lacrymans* and related brown-rot fungi. **Holzforschung**, v. 60, p. 339-345, 2006.
- HEIDORNE, F.O. *et al.* Characterization of hemicellulases and cellulases produced by *Ceriporiopsis subvermispora* grown on wood under biopulping conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 436-442, 2006.
- HENRIKSSON, G.; JOHANSSON, G.; PETTERSSON, G. A critical review of cellobiose dehydrogenases. **Journal of Biotechnology**, v. 78, p. 93-113, 2000.
- HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 454-466, 2002.

- 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, M.A.C. **Estudo sobre a redução de Fe³⁺ por extratos aquosos de cultivos de *Ceriporiopsis subvermispota* sobre madeira e sua relação com a peroxidação de lipídeos.** Lorena, SP: EEL, 2007. Originalmente apresentado para o exame de qualificação de mestrado. Universidade de São Paulo.
- HUNT, C. *et al.* A biopulping mechanism: creation of acid groups on fiber. **Holzforschung**, v. 58, p. 434-489, 2004.
- JELLISON, J. *et al.* The role of cations in the biodegradation of wood by the brown rot fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 39, p. 165-179, 1997.
- 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.
- JENSEN, K.A. *et al.* An NADH: quinone oxidoreductase active during biodegradation by the brown-rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2699-2703, 2002.
- KANEKO S. *et al.* Relationship between production of hydroxyl radicals and degradation of wood, crystalline cellulose, and a lignin-related compound or accumulation of oxalic acid in cultures of brown-rot fungi. **Journal of Wood Science**, v. 51, p. 262-269, 2005.
- 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.
- 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.
- KENEALY, W.; HORN, E.; HOURMAN C. Vapor-phase diethyl oxalate pretreatment of wood chips: Part 1. Energy savings and improved pulps. **Holzforschung**, v. 61, p. 223-229, 2007.
- KENEALY, W. *et al.* Vapor-phase diethyl oxalate pretreatment of wood chips: Part 2. Release of hemicellulosic carbohydrates. **Holzforschung**, v. 61, p. 230-235, 2007.
- KEREM, Z.; JENSEN, K.A.; HAMMEL, K.E. Biodegradative mechanism of the brown-rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*: evidence for an extracellular hydroquinone-driven Fenton reaction. **FEBS Letters**, v. 446, p. 49-54. 1999.
- KHINDARIA, A.; GROVER, T.; AUST, S. Oxalate-dependent reductive activity of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 314, p. 301-306, 1994.

- KIRK, T.K.; CULLEN, D. Enzymology 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.
- KISHI, K. *et al.* Mechanisms of manganese peroxidase compound II reduction. Effect of organic acid chelators and pH. **Biochemistry**, v. 33, p. 8694-8701, 1994.
- 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.
- LEKOUNOUGOU, S. *et al.* Initial stages of *Fagus sylvatica* wood colonization by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. Enzymatic characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, 2008, no prelo.
- LEQUART, C. *et al.* MnO₂ and oxalate: an abiotic route for the oxidation of aromatic components in wheat straw. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3868-3874, 1998.
- LI, K. *et al.* Investigation of the role of 3-hydroxyanthranilic acid in the degradation of lignin by white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 301-307, 2001.
- LI, K. The role of enzymes and mediators in white-rot fungal degradation of lignocellulose. In: Goodell B., Nicholas D.D., Schultz T.P., **Wood Deterioration and Preservation - Advances in our Changing World**. Washington, DC: American Chemical Society, 2003, p. 196-209 (ACS Symposium Series 845).
- LOBOS, S. *et al.* Isoenzymes of manganese-dependent peroxidase and laccase produced by the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. **Microbiology**, v. 140, p. 2691-2698, 1994.
- LÓPEZ, C. *et al.* Is the presence of dicarboxylic acid required in the MnP cycle? Study of Mn³⁺ stability by cyclic voltammetry. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 70-75, 2007.
- MACHUCA, A.; FERRAZ, A. Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white- and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 386-391, 2001.
- MÄKELÄ, M. *et al.* Production of organic acids and oxalate decarboxylase in lignin-degrading white rot fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 542-549, 2002.
- MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. Measurement of saccharifying cellulose. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 6, p. 2-34, 1976.
- MARTÍNEZ, A. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 425-444, 2002.

- MASAPHY, S.; HENIS, Y.; LEVANON, D. Manganese-enhanced biotransformation of atrazine by the white rot fungus *Pleurotus pulmonarius* and its correlation with oxidation activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3587-3593, 1996.
- MASARIN, F. **Habilidade degradativa de *Ceriporiopsis subvermispota* e *Phanerochaete chrysosporium* em cultivos sobre madeira de *Eucalyptus grandis* não autoclavada**. Lorena, SP: EEL, 2006. 89f. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo.
- 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.
- 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.
- MEYER-PINSON, V. *et al.* Oxalic acid: a microbial metabolite of interest for the pulping industry. **Comptes Rendus Biologies**, v. 327, p. 917-925, 2004.
- MILAGRES, A.M.F.; MAGALHÃES, P.O.; FERRAZ, A. Purification and properties of a xylanase from *Ceriporiopsis subvermispota* cultivated on *Pinus taeda*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 253, p. 267-272, 2005.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic reagent for the determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MONGKOLTHANARUK, W.; DHARMSTHITI, S. Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 50, p. 101-105, 2002.
- NEILANDS, J.B. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 26723-26726, 1995.
- ONNERUD, H.; GELLERSTEDT, G. Inhomogeneities in the chemical structure of spruce lignin. **Holzforschung**, v. 57, p. 165-170, 2003.
- PALFREYMAN, J.W.; PHILLIPS E.M.; STAINES H.J. The effect of calcium ion concentration on the growth and decay capacity of *Serpula lacrymans* (Schumacher ex Fr.) Gray and *Coniophora puteana* (Schumacher ex Fr.) Karst. **Holzforschung**, v. 50, p. 3-8, 1996.
- PASZCZYNSKI, A. *et al.* *De novo* synthesis of 4,5-dimethoxycatecol and 2,5-dimethoxyhydroquinone by the brown rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 674-679, 1999.
- 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.
- RAJAKUMAR, S. *et al.* LiP-like genes in *Phanerochaete sordida* and *Ceriporiopsis subvermispota*, white-rot fungi from which lignin peroxidase has not been detected. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2660-2663, 1996.

- ROLANDO, C.; MONTIES, B.; LAPIERRE, C. Thioacidolysis. In: Lin, S., Dence, C.W., **Methods in Lignin Chemistry**, Heidelberg: Springer-Verlag, 1992, p. 334-349.
- RUZINSKI, F.; KOKTA, B.V. High-yield pulping of switchgrass using the NaSO₃-NaHCO₃ system. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 34, p. 299-315, 2000.
- RÜTTIMANN-JOHNSON, C. *et al.* Extracellular enzyme production and synthetic lignin mineralization by *Ceriporiopsis subvermispota*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p.1792-1797, 1993.
- SCHILLING, J.S.; JELLISON, J. High-performance liquid chromatographic analysis of soluble and total oxalate in Ca- and Mg-amended liquid cultures of three wood decay fungi. **Holzforschung**, v. 58, p. 682-687, 2004.
- SCHILLING, J.S.; JELLISON, J. Oxalate regulation by two brown rot fungi decaying oxalate-amended and non-amended wood. **Holzforschung**, v. 59, p. 681-688, 2005.
- SCHLOSSER, D.; GREY, R.; FRITSCH, W. Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra- and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, p. 412-418, 1997.
- SCHLOSSER, D.; HÖFER, C. Laccase-catalyzed oxidation of Mn²⁺ in the presence of natural Mn³⁺ chelators as a novel source of extracellular H₂O₂ production and its impact on manganese peroxidase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 3514-3521, 2002.
- 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.
- SHIMADA M.; *et al.* Possible biochemical roles of oxalic acid as a low molecular weight compound involved in brown-rot and white-rot wood decays. **Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 103-113, 1997.
- SILVA, E.M.; MARTINS, S.F.; MILAGRES, A.M.F. Extraction of manganese peroxidase produced by *Lentinula edodes*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2471-2475, 2007.
- 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.
- 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.
- STOOKEY, L.L., Ferrozine - a new spectrophotometric reagent for iron. **Analytical Chemistry**, v. 42, p. 779-781, 1970.

- TANAKA, H.; ITAKURA, S.; ENOKI, A. Hydroxyl radical generation by an extracellular low-molecular-weight substance and phenol oxidase activity during wood degradation by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. **Journal of Biotechnology**, v. 74, p. 57-70, 1999.
- TEUNISSEN, P.J.M.; FIELD, J.A. 2-Chloro-1,4-dimethoxybenzene as a mediator of lignin peroxidase catalyzed oxidations. **FEBS Letters**, v. 439, p. 219-223, 1998.
- 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. **Secreção diferenciada de enzimas lignocelulolíticas durante a biodegradação de madeira por *Ceriporiopsis Subvermispota* e resposta da madeira biotratada frente a processos posteriores de polpação**. Lorena, SP: EEL, 2007. 139f. Originalmente apresentada como tese de doutorado. Universidade de São Paulo.
- VICENTIM, M.P.; FERRAZ, A. Alkaline-sulfite chemithermomechanical pulping of *Eucalyptus grandis* biotreated by *Ceriporiopsis subvermispota* under varied culture conditions. **Holzforchung**, 2008, no prelo.
- VICUÑA, R. *et al.* Culture conditions of *Ceriporiopsis subvermispota* determine the pattern of MnP isoenzymes. In: Srebotnik, E., **Biotechnology in the Pulp and Paper Industry: Recent Advances in Applied and Fundamental Research**. Vienna: Facultas-Universitätsverlag, 1996, p. 345-350.
- 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.
- WATANABE T. *et al.* Purification and characterization of NAD-dependent formate dehydrogenase from the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispota* and a possible role of the enzyme in oxalate metabolism. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 68-75, 2005.
- WOOD, T.M.; BHAT, K.M. Methods for measuring cellulase activities. **Methods in Enzymology**, v. 160, p. 87-113, 1988.
- ZHANG, X. *et al.* Degradation of trilinolein by laccase enzymes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 405, p. 44-54, 2002.