

Aspectos tecnológicos e bases mecánísticas do processo de biopolpação

André Luis Ferraz

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Livre Docente do Departamento de Biotecnologia na área de conhecimento “Química de Biomassa”, conjunto de disciplinas “Química de Biomassa e Caracterização de Materiais Lignocelulósicos”

Lorena
São Paulo - Brasil
Fevereiro 2010

Dedico essa tese a um ex-aluno e grande amigo, Anderson Guerra, que nos deixou prematuramente no início de uma carreira acadêmica extremamente promissora.

SUMÁRIO

	Página
Resumo	i
Abstract	ii
1 Introdução	1
2 Revisão bibliográfica	2
2.1 Biodegradação da madeira	3
2.1.1 Fundamentos sobre a peroxidação de lipídeos	12
2.1.2 <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> e a contribuição da reação de peroxidação de lipídeos para o processo de biodegradação da lignina	14
2.2 Biopolpação	19
2.2.1 Alvura de polpas mecânicas preparadas a partir de madeiras biodegradadas	23
2.3 Considerações finais sobre a revisão bibliográfica	24
3 Objetivos	25
4 Parte experimental	26
4.1 Polpação TMP e CTMP de <i>Eucalyptus grandis</i> biotratado em uma planta piloto	26
4.2 Branqueamento e estabilidade de alvura da polpa bio-TMP	27
4.3 Polpação quimiomecânica em escala de laboratório de cavacos de <i>E. grandis</i> biotratados por <i>C. subvermispora</i>	28
4.4 Avaliação da degradação dos componentes da madeira e a secreção da enzima MnP durante o biotratamento de madeira por <i>C. subvermispora</i>	29
4.4.1 Etapa de biotratamento e extração de enzimas	29
4.4.2 Caracterização química da madeira biotratada	31
4.4.3 Caracterização da lignina <i>in situ</i> por oxidação com CuO e por derivatização seguida de clivagem redutiva (DFRC)	32
4.4.4 Caracterização da lignina <i>in situ</i> por tioacidólise	35
4.4.5 Extração da lignina de madeira moída (LMM) e sua caracterização	36
4.4.6 Extração da lignin por acidólise branda e sua caracterização	39
4.4.6.1 Quantificação de grupos funcionais das ligninas isoladas por espectroscopia de ressonância magnética de fósforo (RMN- ³¹ P)	40
4.4.7 Determinação de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS)	41

e reações de peroxidação de ácido linoleico <i>in vitro</i>	
4.4.8 Extração e caracterização da α -celulose residuais	42
5 Resultados e discussão	44
5.1 Aspectos tecnológicos do processo de biopolpação	44
5.1.1 Polpação TMP e CTMP de <i>E. grandis</i> biotratado em uma planta piloto	44
5.1.2 Branqueabilidade e estabilidade de alvura em biopolpas TMP preparadas em escala industrial	54
5.1.3. Polpação quimiomecânica em escala de laboratório de cavacos de <i>E. grandis</i> biotratados por <i>C. subvermispota</i>	57
5.2 Mecanismos de biodegradação da madeira que explicam os benefícios obtidos no processo de biopolpação	63
5.2.1 Degradação de lignina	66
5.2.2 Participação de enzimas oxidativas na degradação de lignina	78
5.2.3 Peroxidação de ácido linoleico <i>in vitro</i> iniciada por MnP produzida por <i>C. subvermispota</i>	83
5.2.4 Degradação de celulose e hemicelulose	86
6 Conclusões	90
7 Referências	92

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Microscopia ótica mostrando o ataque progressivo (erosão) da parede celular de <i>Picea abies</i> por <i>Heterobasidium annosum</i>	5
Figura 2. Microscopia eletrônica de transmissão mostrando o ataque não erosivo da parede celular de madeira. <i>Notophagus dombeyi</i> degradado por <i>Ganoderma australe</i>	5
Figura 3. Ciclo catalítico simplificado da LiP	9
Figura 4. Ciclo catalítico simplificado da MnP	9
Figura 5. Ciclo catalítico da lacase	10
Figura 6. Peroxidação de um ácido graxo di-insaturado iniciada por Mn^{3+} ou radical hidroxila	13
Figura 7. Degradação de um composto modelo de lignina (não fenólico) pelo sistema MnP, ácido linoleico e H_2O_2	18
Figura 8. Esquema ilustrativo da planta piloto de biopolpação instalada na empresa Melhoramentos Papéis, Caieiras, SP	26
Figura 9. Consumo bruto de energia elétrica durante o desfibramento e refino de madeira de <i>E. grandis</i> em diferentes regimes de alimentação	45
Figura 10. Redução dos custos de produção a partir do uso do processo de biopolpação em função do nível de economia e dos custos de mercado da energia elétrica	49
Figura 11. Simulação do benefício econômico devido a aplicação do processo de biopolpação considerando diferentes níveis de economia de energia e custos variáveis para o processo de biotratamento dos cavacos	51
Figura 12. Placa de Petri cultivada por 7 dias contendo meio batata-dextrose/extrato de levedura, 4 ppm de benomil e um cavaco de <i>E. grandis</i> proveniente de um cultivo (28 dias) contaminado que recebeu inóculo de <i>C. subvermispora</i> na carga de 500 mg de micélio/kg de madeira	54
Figura 13. Branqueamento com peróxido de hidrogênio de polpas TMP de <i>E. grandis</i>	55
Figura 14. Reversão de alvura induzida pela exposição à luz de polpas TMP de <i>E. grandis</i> branqueadas com peróxido de hidrogênio	56
Figura 15. Foto-reversão de alvura em polpas TMP de <i>E. grandis</i> em função de	57

níveis variados de alvura inicial	
Figura 16. Perfil de refinamento em laboratório de polpas CTMP de <i>E. grandis</i> .	59
Figura 17. Distribuição do comprimento das fibras de polpa CTMP <i>E. grandis</i> refinada por 90 min	60
Figura 18. Resistência à tração de polpas CTMP de <i>E. grandis</i>	61
Figura 19. Índice de resistência ao rasgo de polpas CTMP de <i>E. grandis</i>	61
Figura 20. Contraposição dos índices de resistência ao rasgo e à tração de polpas CTMP de <i>E. grandis</i>	62
Figura 21. Reações da lignina durante a derivatização com brometo de acetila seguida de clivagem redutiva com Zn e acetilação com anidrido acético (DFRC)	67
Figura 22. Cromatografia de permeação em gel de amostras de lignina isoladas de <i>Pinus taeda</i> biotratado por <i>C. subvermispota</i>	68
Figura 23. Estruturas diméricas geradas durante a degradação de lignina isolada de <i>P. taeda</i> submetida a reações de DFRC	70
Figura 24. Rendimento de dímeros e monômeros após reação DFRC de ligninas isoladas de <i>P. taeda</i> biotratado por <i>C. subvermispota</i>	70
Figura 25. Possíveis rotas de degradação da lignina durante o biotratamento de <i>P. taeda</i> por <i>C. subvermispota</i> .	72
Figura 26. Rendimento de monômeros na tioacidólise e perda de lignina durante a biodegradação de <i>P. taeda</i> por <i>C. subvermispota</i> .	74
Figura 27. Espectros RMN- ³¹ P de derivados fostitilados de lignina de <i>P. taeda</i> controle (B) e biotratado por <i>C. subvermispota</i> por 4 semanas (A).	75
Figura 28. Teor de grupos funcionais em ligninas de <i>P. taeda</i> biotratado por <i>C. subvermispota</i> .	76
Figura 29. Relação entre os níveis de MnP detectados em cultivos de <i>C. subvermispota</i> sobre <i>E. grandis</i> e as perdas de lignina e os rendimentos de monômeros DFRC na madeira biotratada	80
Figura 30. Relação entre a quantidade de TBARS e a degradação de lignina, estimada pela clivagem de ligações aril-éter (rendimento DFRC)	81
Figura 31. Rendimento de DFRC em função da perda de lignina em cultivos de <i>C. subvermispota</i> sobre <i>E. grandis</i>	82
Figura 32. Relação entre os níveis de MnP detectados em cultivos de <i>C. subvermispota</i> sobre <i>E. grandis</i> e eficiência do processo de polpação CTMP	83

aplicado sobre a madeira biotratada

Figura 33. Consumo de O₂ em reações de peroxidação de lipídeos catalisadas por extratos enzimáticos obtidos de *E. grandis* biotratado por *C. subvermispora* 84

Figura 34. Relação entre os níveis de MnP em extratos de cultivos de *C. subvermispora* sobre *E. grandis* e as taxas de consumo de O₂ em reações de peroxidação de ácido linoleico catalisadas por esses mesmos extratos 86

Figura 35. Perda de glucana e teor de α -cellulose em madeira biotratadas por *C. subvermispora*. Símbolos cheios representam os dados de *E. grandis* e símbolos vazios *P. taeda* 87

Figura 36. Distribuição de massas molares de amostras de tricarbnilatos de α -celulose isoladas de *P. taeda* biotratado por *C. subvermispora* 88

Lista de Tabelas

	Página
Tabela 1. Índices de resistência à tração de polpas de <i>E. grandis</i> preparadas em 2 estágios de polpação mecânica (desfibramento e refino) em escala de laboratório e industrial	46
Tabela 2. Tarifas médias de energia elétrica praticadas e Junho de 2007 para o setor industrial em diferentes regiões do Brasil	48
Tabela 3. Exemplo de cálculo referente ao benefício econômico do uso do processo de biopolpação	48
Tabela 4. Rendimento da etapa química e teor de palitos na polpação CTMP de <i>E. grandis</i> em escala de laboratório	58
Tabela 5. Rendimento de monômeros derivados da lignina após reação de oxidação com CuO aplicada à madeira de <i>P. taeda</i> degradada por <i>C. subvermispota</i>	67
Tabela 6. Rendimento de monômeros recuperados após a reação de DFRC aplicada à madeira de <i>P. taeda</i> degradada por <i>C. subvermispota</i>	68
Tabela 7. Massa molar média em massa (Mw), massa molar média em número (Mn), polidispersibilidade (D) e frações excluídas pela coluna de permeação em gel de amostras de ligninas isoladas de <i>P. taeda</i> biotratado por <i>C. subvermispota</i>	69
Tabela 8. Dados obtidos a partir de espectros RMN- ¹ H de ligninas isoladas de <i>P. taeda</i> biotratado por <i>C. subvermispota</i>	71
Tabela 10. Perda de massa, lignina e rendimentos de monômeros na reação de DFRC durante a biodegradação da madeira de <i>E. grandis</i> por <i>C. subvermispota</i> sob diferentes condições de cultivo	78
Tabela 11. Grau de polimerização e dispersibilidade de amostras de tricarbnilatos de α -celulose isoladas de <i>P. taeda</i> biotratado por <i>C. subvermispota</i>	89

RESUMO

FERRAZ, A. **Aspectos tecnológicos e bases mecánísticas do processo de biopolpação**. 2010. 109 f. Tese de Livre-docência, Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2010.

O tema da presente tese é a biodegradação da madeira e sua aplicação no processo tecnológico da biopolpação. A vasta literatura disponível dentro desse tema indica que a biopolpação é uma tecnologia promissora, pois permite a economia de energia em processos industriais destinados à produção de celulose e papel. Por outro lado, os estudos que visem entender os mecanismos químicos e bioquímicos envolvidos na biopolpação se mostram fundamentais para direcionar os esforços de seleção de fungos mais apropriados para o processo, ou mesmo levar a proposição de sistemas biomiméticos que simulem a etapa de pré-tratamento biológico. Nesse contexto, a presente tese relata uma série de trabalhos que tem como objetivo principal avançar no desenvolvimento tecnológico e na geração de conhecimento associados ao processo de biopolpação. Os dados apresentados se referem ao uso do fungo de decomposição branca *Ceriporiopsis subvermispora* em ensaios de biodegradação da madeira que cobrem desde a escala de bancada até a escala pré-industrial, onde pilhas de 50 ton de cavacos foram biotratadas. A madeira biotratada foi submetida a processos subsequentes de polpação termomecânica ou quimiotermomecânica, além de ter sido caracterizada por uma série de técnicas analíticas visando determinar a composição química e as características estruturais dos componentes da madeira biotratada. A secreção de enzimas e outros metabólitos extracelulares foi monitorada durante o biotratamento a fim de verificar os mecanismos bioquímicos envolvidos no processo degradativo. Os dados indicaram que a biopolpação é factível em escala industrial e os benefícios obtidos a partir do biotratamento da madeira podem ser economicamente atraentes dependendo dos custos operacionais e dos custos de energia elétrica envolvidos nas etapas de biotratamento e polpação. Nos estudos envolvendo os mecanismos químicos que poderiam explicar a biodegradação da madeira pelo fungo em questão foi demonstrado que a lignina é preferencialmente degradada enquanto a celulose é mantida praticamente intacta nos estágios iniciais da biodegradação. A lignina residual presente na madeira biotratada sofre despolimerização intensiva o que se mostrou uma consequência de degradação da macromolécula a partir da quebra de ligações aril-éter e $C\alpha-C\beta$. A principal enzima oxidativa responsável por essa via de degradação foi a Manganês peroxidase que para atuar mostrou dependência pela presença de ácidos graxos insaturados que são peroxidados pela enzima. A peroxidação dos ácidos graxos deve levar a formação de radicais organo-peroxila ou mesmo radicais acila que por sua vez são os efetivos agentes de degradação da lignina. Por outro lado a celulose residual da madeira biotratada mostra-se com mesmas características de massa molar até cerca de 30 dias de biotratamento. Em períodos mais longos de biodegradação, esse polissacarídeo passa a apresentar massa molar progressivamente menor, porém não foi eficientemente assimilado pelo fungo, uma vez que predomina o acúmulo de oligômeros de celulose na madeira biotratada. Esse perfil de degradação de celulose se mostrou compatível com a secreção de endo-celulases e a inexistência de celobiohidrolases no complexo celulolítico do fungo.

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

ABSTRACT

FERRAZ, A. **Technological and mechanistic basis of fungal biopulping**. 2010. 109 p. Tese de Livre-docência, Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2010.

The subject of the present thesis is the wood biodegradation and its application in the technological process named biopulping. The current literature related to this subject indicates that biopulping is a promising technology, since energy savings are obtained in the industrial process used to produce pulp and paper. On the other hand, the studies related to the chemical and biochemical mechanisms explaining biopulping benefits are relevant, since they could help on further fungal screening projects or even could be the basis for the proposal of new biomimetic systems used to simulate the wood biodegradation step. Taking this context, the present thesis describes a series of articles focused on the development of the biopulping technology as well as on their fundamentals. Data presented were restricted to the action of the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora* used in biodegradation assays performed from laboratory scale up to a pre-industrial level, where 50 ton chip piles were biotreated. Biotreated wood as used in subsequent pulping experiments based on themomechanical and chemithermomechanical processes. Biotreated wood was also characterized by a series of analytical techniques aiming to determine their chemical composition as well as the structural characteristics of the residual wood components. Enzyme secretion during the biotreatment was also evaluated in order to study the biochemical mechanisms involved in the biodegradation step. The data obtained indicated that the biopulping process is feasible on an industrial scale and the economical benefits of the process would depend on the wood biotreatment costs and the costs of electrical energy. The studies performed to evaluate the chemical mechanisms explaining wood transformations during biopulping showed that lignin is selectively degraded, while cellulose is maintained almost intact during the initial stages of wood biotreatment. The residual lignin in wood was heavily depolymerized. The main reaction routes involved aryl-ether and C α -C β cleavage. The main oxidative enzyme secreted by the fungus during wood biotreatment was manganese peroxidase. The enzyme was responsible for the lignin degradation but the reactions seem to depend on the presence of unsaturated fatty acids that were peroxidized by the enzyme. Unsaturated fatty acids peroxidation gives rise to the formation of organoperoxy or even acyl radicals that are efficient lignin degraders. On the other hand, residual cellulose showed to maintain its macromolecular characteristics up to 30 days of wood biotreatment. Longer biotreatment periods caused a progressive decrease in the molar mass of this polymer. However, released cellulose oligomers accumulated in the system resulting in low glucan loss values up to 90 days of biodegradation. This cellulose degradation mechanism was compatible with the secretion of a cellulolytic complex by the fungus that contained endocellulases but was poor in cellobiohydrolases.

KEYWORDS: Biopulping. *Ceriporiopsis subvermispora*. Manganese Peroxidase. Lipid peroxidation. Mechanical pulping.

1 Introdução

O tema da presente tese é a biodegradação da madeira e sua aplicação no processo tecnológico da biopolpação. Trata-se de um tema com significativa relevância acadêmica e tecnológica. Do ponto de vista acadêmico, é relevante entender os mecanismos de biodegradação da madeira e dos lignocelulósicos em geral, uma vez que esse processo constitui um importante ciclo do carbono na natureza. Já do ponto de vista tecnológico, a biodegradação da madeira, sob condições controladas e com fungos pré-selecionados, tem demonstrado grande êxito como um pré-tratamento aos processos de polpação. Essa combinação de processos tem sido denominada de biopolpação. De forma geral, pode-se afirmar que o uso de cavacos biotratados permite reduzir significativamente o consumo de energia elétrica nos processos de polpação mecânica. No caso da polpação química, os cavacos biotratados demandam condições mais amenas de cozimento que aquelas usualmente empregadas nos processos tradicionais.

Um grande esforço de pesquisa e desenvolvimento envolvendo o processo de biopolpação tem sido realizado em vários países do mundo, culminando na avaliação industrial dessa tecnologia nos últimos anos. No entanto, as bases químicas e bioquímicas do processo ainda não são completamente conhecidas. Em geral, os benefícios do pré-tratamento da madeira com fungos de decomposição branca são obtidos já nos estágios iniciais de biodegradação, quando as perdas de massa da madeira ainda não ultrapassaram 5%. Com biotratamentos tão curtos quanto uma semana, os cavacos de madeira já se apresentam mais frágeis e podem ser rompidos facilmente no sentido das fibras. Esse efeito de amolecimento foi, de fato, a base para as propostas iniciais do processo de biopolpação. Por outro lado, muitas questões sobre os fundamentos moleculares desse “amolecimento” dos cavacos ainda permanecem sem resposta. Entre essas questões podemos listar as que seguem:

- Quais são as modificações químicas sofridas pela madeira que explicariam o efeito de “amolecimento”?
- Quais são os agentes bioquímicos envolvidos?
- Existiria um único fator responsável pelos benefícios da biopolpação?

As respostas a essas questões podem levar ao entendimento e, por consequência, ao melhor desenvolvimento e otimização desse processo biotecnológico. Nesse contexto, a tese de livre-docência aqui apresentada envolve uma série de estudos abrangendo os aspectos tecnológicos e as bases mecánísticas da biopolpação. O texto foi organizado a partir de uma revisão bibliográfica sobre o tema, seguida de uma análise crítica de trabalhos previamente publicados pelo autor. A seleção dos trabalhos em questão buscou mostrar a contribuição do grupo de pesquisas coordenado pelo autor na obtenção de respostas às questões anteriormente apresentadas.

2 Revisão bibliográfica

A vasta literatura relativa à biodegradação da madeira e suas aplicações tecnológicas pode ser dividida em 2 tópicos. Um relativo ao que está estabelecido quanto à aplicabilidade do processo de biodegradação como auxiliar em processos tecnológicos de polpação mecânica ou química. O outro tópico refere-se ao modo de ação dos fungos decompositores de madeira. De fato, hoje há modelos que podem explicar a decomposição da madeira como resultado da ação de enzimas extracelulares e de metabólitos de baixa massa molar, também extracelulares. No entanto, pouco se sabe sobre quais alterações provocadas pelos fungos são importantes para o benefício máximo na biopolpação e também quais são exatamente os agentes causadores dessas alterações. Essas questões têm origem na difícil abordagem experimental necessária para o estudo da biodegradação da madeira. Muito do que está estabelecido atualmente sobre a biodegradação da lignina tem origem em resultados obtidos em sistemas

modelos, muitos deles referentes ao cultivo de fungos em meio líquido atuando sobre compostos modelos de lignina. Também, boa parte do que está estabelecido quanto à decomposição de polissacarídeos provém de resultados experimentais obtidos com Ascomicetos que não são os principais organismos envolvidos na decomposição natural da madeira, nem os que têm encontrado aplicação tecnológica para o processo.

Com o intuito de rever o atual "estado da arte" relativo à biodegradação da madeira e sua aplicação em processos de biopolpação, apresenta-se a seguir uma descrição dos modelos atualmente utilizados para descrever a ação de fungos decompositores da madeira, suas limitações e as aplicações da biodegradação como um processo auxiliar aos processos de polpação. A revisão bibliográfica apresentada é concomitantemente comentada a fim de diagnosticar os pontos que merecem esforço experimental adicional, podendo assim contribuir com o entendimento da biodegradação da madeira e conseqüentemente com sua aplicação no processo de biopolpação.

2.1 Biodegradação da madeira

Os organismos mais efetivos na biodegradação de madeira na natureza são os fungos de decomposição branca, que degradam todos os componentes da madeira e os de decomposição parda, que degradam principalmente os polissacarídeos. Há ainda um grupo de fungos classificados como de decomposição branda que degradam lignina e polissacarídeos, porém em velocidades muito baixas (Kirk e Cullen, 1998). Os fungos de decomposição branca são aqueles que encontram aplicação nos processos de biopolpação, pois são os únicos a degradar lignina de forma eficiente (Akhtar et al., 1998; Ferraz et al., 2008). A biodegradação de madeira por esses fungos é atribuída à ação de uma série de enzimas e compostos de baixa massa molar extracelulares. A degradação ocorre necessariamente de forma extracelular, uma vez que os componentes da madeira devem ser inicialmente

despolimerizados até compostos menores que são susceptíveis ao metabolismo intracelular dos fungos envolvidos.

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 atuam degradando a parede celular vegetal. É possível ainda diferenciar dois modos principais de degradação da célula vegetal por fungos de decomposição branca. O primeiro envolve uma “escamação” progressiva da parede celular no sentido lúmen-lamela média, levando a diminuição progressiva e irregular da espessura da parede celular (Fig. 1). O outro modo de degradação, que tem sido observado em fungos seletivos para a degradação de lignina, envolve a remoção de lignina e polioses sem a simultânea erosão da parede celular vegetal. Nesses casos, a parede celular, apesar de degradada, mantém sua forma original (Fig. 2). Os mecanismos distintos de degradação envolvidos em cada caso têm sido objeto de muitos estudos e um aspecto a ser considerado é o modo de ação das enzimas extracelulares sobre o complexo lignocelulósico.

Vários trabalhos têm demonstrado que enzimas lignocelulolíticas não penetram na parede celular vegetal intacta (Srebotnik et al., 1988; Flounoy et al., 1993; Blanchette et al., 1997). Com isso, a degradação enzimática dos componentes da parede celular não poderia justificar o modelo de ataque não erosivo que descrevemos anteriormente (Fig. 2). Ou seja, se as enzimas responsáveis pela decomposição dos componentes da madeira não podem penetrar na parede celular vegetal, somente um processo de “escamação” da parede celular pode ser efetivo na biodegradação. No entanto, para os fungos de decomposição branca que degradam lignina seletivamente, esse modelo não é adequado. Em trabalho bastante esclarecedor, Blanchette et al. (1997) demonstraram que *Ceriporiopsis subvermispora* (um dos fungos mais seletivos já descritos para a degradação de lignina) causa alterações estruturais significativas na lignina presente na parede celular e na lamela média, mesmo antes da parede celular

vegetal ser permeável a proteínas do tamanho da insulina (5730 Da). Dessa forma, vários trabalhos têm proposto que alguns compostos de baixa massa molar poderiam atuar nos estágios iniciais da biodegradação da madeira. Esses compostos deveriam apresentar atividade degradativa, mas serem pequenos o suficiente para penetrar no complexo celular vegetal, degradar os componentes aí existentes e com isso desestruturar a parede celular a ponto de permitir a penetração de enzimas oxidativas e hidrolíticas. O modo de ação dessas enzimas é apresentado a seguir.

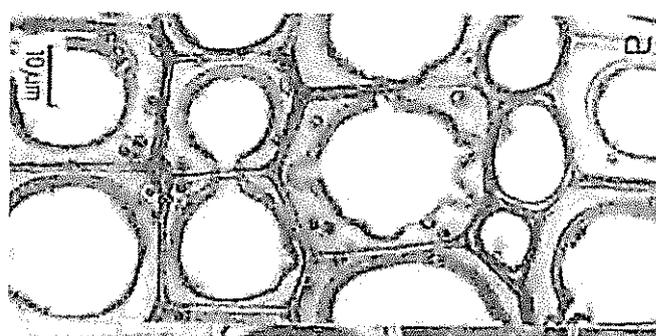


Figura 1. Microscopia ótica mostrando o ataque progressivo (erosão) da parede celular de *Picea abies* por *Heterobasidium annosum*. Note que a célula ao centro apresenta erosões irregulares na parede celular. A escala no canto superior esquerdo da foto indica a magnitude do aumento (Reproduzido com modificações de Fengel e Wegener, 1989).

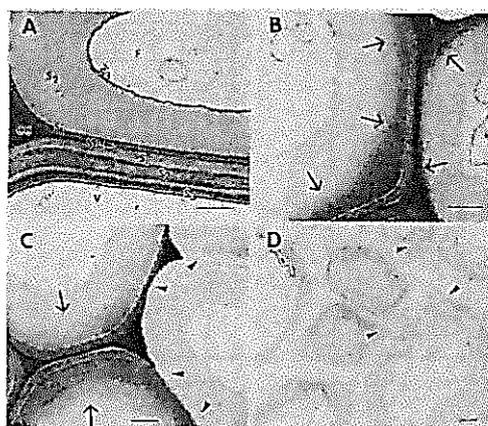


Figura 2. Microscopia eletrônica de transmissão mostrando o ataque não erosivo da parede celular de *Notophagus dombeyi* por *Ganoderma australe*. Corte fixado com KMnO_4 para contraste da lignina. (A) células intactas, (B) e (C) as setas indicam o avanço do ataque onde as áreas de menor contraste estão livres de lignina. (D) células completamente livres de lamela média (Reproduzido com modificações de Agosin et al., 1990).

A biodegradação de celulose é um tópico relativamente bem elucidado do ponto de vista bioquímico. A degradação do polímero ocorre pela ação de três grupos de enzimas que atuam cooperativamente. Estes grupos de enzimas compreendem as endo-1,4- β -glucanases, as exo-1,4- β -glucanases (ou celobiohidrolases) e as 1,4- β -glucosidases que, quando atuam em conjunto, levam à hidrólise completa da celulose até glicose. Esse modelo de biodegradação de celulose tem sido estabelecido com base em estudos realizados, principalmente, com o complexo celulolítico produzido por fungos do gênero *Trichoderma*. Entre os fungos de decomposição branca, *Phanerochaete chrysosporium* figura entre os poucos cujo complexo celulolítico foi extensivamente estudado (Uzcategui et al., 1991). Nesse caso, também se observa o complexo celulolítico completo e um modelo similar para a biodegradação de celulose pode ser assumido (Kuhad et al., 1997). Por outro lado, os fungos de decomposição parda, em geral, são deficientes na produção de exo-celulases e a biodegradação completa do polímero pela via enzimática parece limitada. Nesse caso, há várias evidências indicando que esse grupo de fungos produz uma série de compostos de baixa massa molar que permitem a redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} e a posterior reação de Fenton (Fe^{2+}/H_2O_2), gerando radicais hidroxila que, pela elevada capacidade oxidativa, permitem uma extensiva oxidação e degradação da celulose (Goodell et al., 1997; Hammel et al., 2002).

Uma quarta enzima, aparentemente ligada ao complexo celulolítico, também tem sido descrita. A celobiose desidrogenase (CDH) atua sobre celobiose, oligômeros de glicose e mesmo celulose, oxidando o terminal redutor. Essa enzima é capaz de utilizar quinonas como acceptor de elétrons e, dessa forma, aparentemente interliga os complexos celulolítico e ligninolítico (Henriksson et al., 2000). Outra atividade interessante descrita para CDH é sua capacidade de reduzir Fe^{3+} e dessa forma, na presença de H_2O_2 , gerar radicais hidroxila que podem atuar diretamente na degradação de celulose como descrito anteriormente (Kuhad et al., 1997). Dumonceaux et al. (2001) demonstraram que a expressão desta enzima é crítica nas

etapas iniciais de colonização da madeira por *Trametes versicolor*, porém não foi necessária para uma efetiva deslignificação da madeira.

A biodegradação das polioses (ou hemicelulose) ocorre de forma semelhante à da celulose. No entanto, há uma maior diversidade de enzimas envolvidas na hidrólise do polímero, pois há enzimas específicas para cada tipo de ligação existente no polímero principal e nas respectivas ramificações. Assim, as xilanases hidrolisam a cadeia principal de xilanas, enquanto mananases atuam nas cadeias que contém manose. Existem ainda enzimas acessórias como as acetil-esterases e arabinofuranosidases que hidrolisam ramificações específicas (Kuhad et al., 1997).

Um vasto grupo de enzimas está relacionado à biodegradação da lignina. No entanto, até os dias de hoje, existem inúmeras dúvidas sobre a real participação de cada grupo e a função que cada um deles exerce no processo global de oxidação que leva a lignina até dióxido de carbono e água (Hammel e Cullen, 2008). Desde a descoberta das lignina-peroxidases (LiP) em 1983 (Glenn et al., 1983; Tien e Kirk, 1983), e posteriormente das Manganês peroxidases (MnP) (Kuwahara et al., 1984), boa parte do que foi estabelecido sobre a biodegradação da lignina provém de experimentos realizados com o basidiomiceto *P. chrysosporium*. Em menor extensão, outros estudos têm sido realizados com outros basidiomicetos como *T. versicolor*, *C. subvermispora*, *Phebia radiata*, *Phebia* (ou *Merulius*) *tremellosus*, *Phebia subserialis*, *Phanerochaete sordida*, *Pleorotus ostreatu*, *Pleorotus eryngii* e *Bjerkandera adusta* (Kuhad et al, 1997; Hammel e Cullen, 2008). A descrição do genoma de *P. chrysosporium* nos últimos anos (Martinez et al., 2004; Wymelenberg et al., 2006), certamente abriu uma nova janela para estudos sobre essas espécies, incluindo estudos da proteômica extracelular (Wymelenberg et al., 2005; Ravalason et al., 2008).

De forma geral, é possível classificar as enzimas envolvidas na degradação de lignina em pelo menos duas classes distintas: a) fenoloxidasas; b) enzimas que produzem peróxido de hidrogênio.

As fenoloxidasas compreendem um grupo de enzimas característico por pertencerem as metaloproteínas. Entre as fenoloxidasas, ainda podemos descrever dois subgrupos. Um contém as enzimas dependentes de peróxido ou peroxidases. As peroxidases que estão envolvidas na biodegradação da lignina são a LiP e a MnP. Ambas são comumente produzidas por fungos de decomposição branca. No entanto, existem espécies de fungos que são eficientes degradadores de lignina que produzem somente um ou outro subgrupo dessas enzimas. O outro subgrupo contém as lacases. Essas enzimas são cuproproteínas que não dependem de peróxido para atuarem.

Em termos gerais, as enzimas do complexo ligninolítico podem ser ordenadas segundo suas capacidades oxidativas como segue: LiPs > MnPs > Lacases (Kirk e Cullen, 1998; Hammel e Cullen, 2008). As LiPs podem abstrair elétrons de estruturas aromáticas não fenólicas, dando origem a radicais cátion. As MnPs são dependentes de Mn^{2+} e são capazes de abstrair elétrons de estruturas fenólicas. As Figuras 3 e 4 mostram os ciclos catalíticos simplificados dessas duas enzimas. Nos dois casos, a enzima é ativada pela oxidação por H_2O_2 , levando a formação do composto I (C_I) que é um oxo-complexo deficiente em 2 elétrons. A redução do C_I até a enzima nativa ocorre através de duas etapas com a abstração de 1 elétron de cada vez. No caso das LiPs, a redução de C_I a C_{II} e também de C_{II} a C_0 pode ocorrer através da oxidação de substratos não fenólicos levando a formação de radicais cátion. Nas LiPs há um resíduo de triptofano na cadeia protéica (trp171) que ocorre invariavelmente em várias das isoenzimas conhecidas. Supõe-se que esse triptofano atua como elo de transferência de elétrons com substratos aromáticos que não podem ter um contato direto com o grupo heme oxidado da enzima (Hammel e Cullen, 2008). Por outro lado, as MnPs

dependem de Mn^{2+} para a redução de C_{II} a C_0 (Fig. 4). O composto I pode ser reduzido a composto II à custa da oxidação direta de uma estrutura fenólica ou de um átomo de Mn^{2+} , mas o íon Mn^{2+} parece o elo preferencial de transferência de elétrons, visto que as MnPs não possuem o resíduo de triptofano comumente encontrado nas LiPs. De fato, nas MnPs há um sítio de ligação de Manganês e não o resíduo de triptofano, sendo essa a principal diferença entre os dois grupos de enzimas (Hammel e Cullen, 2008). O Mn^{3+} formado é bastante reativo e pode atuar como um mediador da MnP, pois normalmente é estabilizado por quelantes produzidos pelo próprio fungo, como o ácido oxálico. O complexo Mn^{3+} -oxalato, por sua vez, pode ser reduzido à custa da oxidação de outra estrutura fenólica (Hammel e Cullen, 2008).

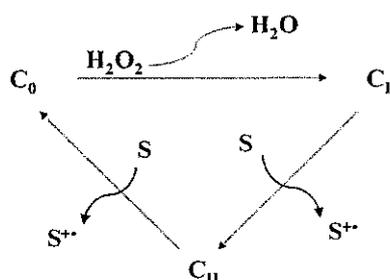


Figura 3. Ciclo catalítico simplificado da LiP. S representa um substrato aromático não fenólico.

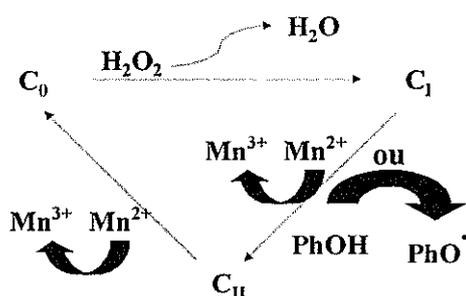


Figura 4. Ciclo catalítico simplificado da MnP. PhOH representa um substrato fenólico.

Estudos envolvendo a mutagênese dirigida permitiram a preparação de LiP contendo um sítio de ligação de Manganês e isso conferiu atividade de MnP à LiP em questão (Mester e Tien, 2001). O inverso também já foi realizado, ou seja, a introdução de um resíduo de triptofano 171 numa MnP proporcionou a atividade de LiP na MnP transformada (Timofeevski et al., 1999). Algumas enzimas com a dupla atividade também foram encontradas em espécies fúngicas selvagens do gênero *Pleurotus* e *Bjerkandera* (Camarero et al., 1999; Mester e Field, 1998). Essas enzimas foram denominadas como Peroxidases versáteis (VPs).

As lacases atuam pela abstração de 1 elétron de fenóis, em função da redução de Cu^{2+} a Cu^{1+} , que por sua vez, reduz O_2 a H_2O , permitindo que a enzima atue de forma cíclica (Fig. 5). As lacases podem, inclusive, degradar estruturas aromáticas não fenólicas através da oxidação de alguns mediadores sintéticos como o hidroxibenzotriazol (HBT) (Kawai et al., 1999) ou mesmo naturais como derivados do ácido benzóico e íons Mn^{2+} (Srebotnik et al., 2005).

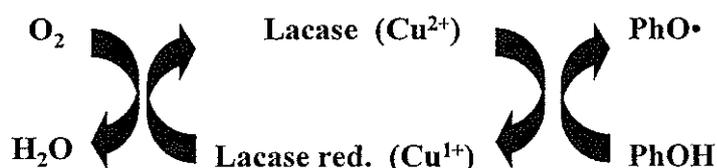


Figura 5. Ciclo catalítico da lacase. PhOH representa um substrato fenólico. A estequiometria do ciclo envolve 4 Cu^{2+} (normalmente ligados a uma única proteína ou a 2 cadeias proteicas acopladas), 4 substratos fenólicos, 4 prótons e 1 molécula de O_2 .

As enzimas que produzem peróxido são acessórias às peroxidases. Essas enzimas geram peróxido de hidrogênio *in situ* e possibilitam que as peroxidases atuem. As principais enzimas produtoras de peróxido envolvidas na biodegradação de lignina são glicose oxidase e metanol oxidase (intracelulares) que utilizam glicose e metanol como substratos,

respectivamente (Kirk e Cullen, 1998; Kuhad et al., 1997). A glicose é originária da biodegradação da celulose e das polioses que contém glicose. O metanol é produzido durante a biodegradação da própria lignina através da remoção de metoxilas ligadas aos anéis aromáticos. A produção de H_2O_2 por enzimas extracelulares também tem sido descrita em alguns fungos de decomposição branca. Entre elas está a glioxal oxidase (Kersten e Kirk, 1987; Wymelenberg et al., 2005; 2006) e a aril-álcool oxidase (De Jong et al., 1994; Ander e Marzullo, 1997; Munteanu et al., 2008). Também MnP pode gerar H_2O_2 a partir da oxidação de ácidos orgânicos como o malônico e o oxálico (Urzúa et al., 1998). Nesse caso, o ácido dicarboxílico se decompõe dando origem a CO_2 e radical formato que ao reagir com O_2 gera superóxiânion que pode então gerar H_2O_2 .

A biodegradação de lignina a CO_2 e H_2O depende de um processo efetivo de despolimerização dessa macromolécula que dê origem a compostos de baixa massa molar susceptíveis ao metabolismo intracelular dos fungos. Grande parte da abordagem experimental realizada até o presente, visando elucidar os mecanismos de biodegradação da lignina, toma como base que o polímero é constituído de ligações etéreas aril-alquil e que poucos grupos fenólicos estão disponíveis. Nesse contexto, via-se, a princípio, como bastante limitada a possibilidade de fungos LiP-deficientes em iniciar a reação de biodegradação, pois somente essa enzima seria capaz de degradar estruturas não fenólicas.

Vários estudos desenvolvidos, principalmente com *P. chrysosporium* e *T. versicolor*, ambos produtores de LiPs, levam a conclusão de pelo menos três modos de degradação da lignina: ruptura oxidativa de cadeias laterais envolvendo os carbonos α e β , levando à formação de ácidos carboxílicos; ruptura de ligações beta-aril-éter e consequente modificação das cadeias laterais e; degradação de núcleos aromáticos através da abertura oxidativa dos anéis (Kirk e Cullen, 1998; Hammel e Cullen, 2008).

As reações mencionadas anteriormente ocorrem através da formação inicial de um radical catiônico nos núcleos aromáticos, intermediada pela ação das LiPs. Este mecanismo foi primeiramente demonstrado para a degradação de 1,2,4,5-tetrametoxi benzeno por LiP de *P. chrysosporium* (Kersten et al., 1985). A formação do radical catiônico induz à ruptura de ligações, principalmente entre os carbonos α e β e a consequente degradação química (pela ação do oxigênio e da água) dos intermediários formados (Kirk e Cullen, 1998; Hammel e Cullen, 2008).

A descrição de vários fungos eficientes em degradar lignina, mas que não produzem LiP, como *C. subvermipora*, *Dichomitus squalens*, *Ganoderma lucidum*, *Panus tigrinus*, *Perenniporia medulla-panis* e *Rigidoporus lignosus* (Orth et al., 1993; Kuhad et al., 1997; Hammel e Cullen, 2008), lançou a dúvida quanto à forma que esses organismos utilizam para degradar estruturas não fenólicas de lignina. Uma possibilidade tem como base a capacidade das lacases associadas a mediadores atuarem também sobre estruturas não fenólicas da lignina conforme discutido anteriormente. No caso da ação das MnPs, alguns trabalhos indicam que a peroxidação de ácidos graxos poderia ser um processo mediador que permitisse às enzimas degradar estruturas não fenólicas de lignina. Essa teoria está discutida a seguir em maiores detalhes juntamente com as características do fungo *C. subvermisporea*.

2.1.1 Fundamentos sobre a peroxidação de lipídeos

A peroxidação de lipídeos é uma reação muito estudada pela sua importância biológica, visto que as membranas celulares apresentam camadas lipídicas que podem ser degradadas pela ação de radicais livres (Southorn e Powis, 1988). Os ácidos graxos di- e poli-insaturados possuem grupos CH_2 alílicos que podem ser facilmente oxidados por agentes oxidantes, principalmente as espécies ativas de oxigênio, que incluem o radical hidroxila (HO^\bullet), o radical superóxi-ânion ($\text{O}_2^{\bullet -}$) e o radical hidroperoxila (HOO^\bullet), que resulta da

protonação do radical superóxi-ânion em pHs ácidos (pKa 4,7). Vários metais de transição também podem ser reduzidos à custa da oxidação de ácidos graxos di e poli-insaturados. A oxidação do grupo CH₂ alílico gera um radical centrado no carbono que rapidamente reage com oxigênio dando origem a um radical organo-peroxila em uma estrutura de dieno conjugado (Fig. 6). O radical organo-peroxila pode oxidar um novo grupo CH₂ propagando a reação de peroxidação ou abstrair um Hidrogênio de algum doador, gerando um peróxido orgânico (que ainda é instável e irá se decompor) ou ainda dar origem a reações de terminação que envolvem o acoplamento de radicais (Southorn e Powis, 1988). Como os peróxidos orgânicos formados não são estáveis, um número variado de aldeídos se forma durante a reação de peroxidação, sendo os principais o malondialdeído, o pentanal, o hexanal e o glioxal (Masaphy et al., 1996; Watanabe et al., 2001). Esses aldeídos apresentam uma reação característica com o ácido tiobarbitúrico, gerando compostos que absorvem na região de 532 nm e são comumente utilizados como compostos diagnósticos da ocorrência de reações de peroxidação de lipídeos (TBARS ou substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico) (Masaphy et al., 1996).

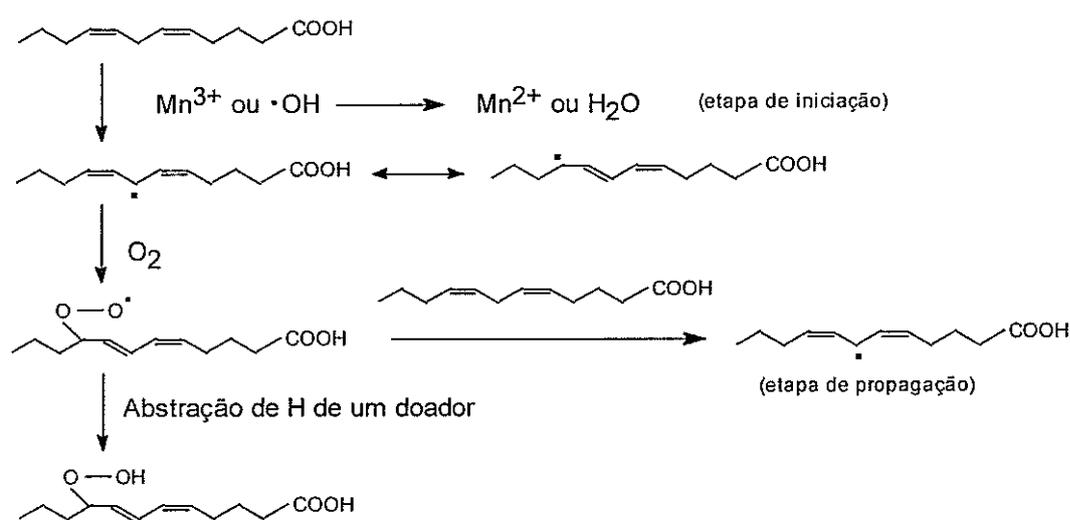


Figura 6. Peroxidação de um ácido graxo di-insaturado iniciada por Mn^{3+} ou radical hidroxila (Reproduzido de Southorn e Powis, 1988 com modificações).

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

2.1.2 C. *subvermispora* e a contribuição da reação de peroxidação de lipídeos para o processo de biodegradação da lignina

Vários fungos de decomposição branca pertencem a um grupo que não secreta LiP durante a biodegradação de madeira (Kirk e Cullen, 1998; Hammel e Cullen, 2008). A ação do grupo de fungos LiP-deficientes sobre a lignina é atribuída às enzimas MnP e Lacase. Como as duas enzimas podem oxidar somente estruturas fenólicas, que não são as mais abundantes em ligninas nativas, muitos mediadores que potencializam a ação dessas enzimas têm sido estudados e descritos (Messner et al., 2003). Esses antecedentes têm levado à busca de um modelo bioquímico que permita explicar a ação de MnP ou lacase como os principais

agentes de degradação da lignina mediada pela ação de alguns compostos de baixa massa molar.

Um dos fungos mais estudados dentro do grupo LiP-deficientes tem sido *C. subvermispora*. Esse fungo foi selecionado entre um grande número de espécies como um dos mais eficientes para os processos de biopolpação (Akhtar et al., 1998). O gênero *Ceriporiopsis* Dom. é um gênero poróide de fungo causador de decomposição branca que pertence à família Polyporaceae (Burdall Jr., 1998). Uma das espécies desse gênero, *C. subvermispora*, é conhecida por sua grande seletividade para a degradação de lignina quer em madeiras de folhosas ou de coníferas (Akhtar et al., 1998). A espécie também apresenta elevada velocidade inicial de colonização da madeira e grande eficiência para causar o efeito de "amolecimento" da matriz lignocelulósica que é a base da biopolpação (Akhtar et al., 1998; Scott et al., 2002; Hunt et al., 2004; Ferraz et al., 2008).

A ocorrência de *C. subvermispora* aparentemente está restrita às regiões temperadas do hemisfério norte (Akhtar et al., 1992), embora outras espécies do gênero estejam distribuídas no mundo e, inclusive, duas já foram coletadas em ambientes naturais do Brasil, *C. panocincta* e *C. cistidiata* (Gerber e Loguércio-Leite, 2000; Loguércio-Leite et al., 2001). No mesmo histórico evolutivo do gênero *Ceriporiopsis*, encontram-se ainda as espécies do gênero *Phebia* (Burdall Jr., 1998).

As enzimas extracelulares produzidas por *C. subvermispora* compreendem as lacases e as MnPs, várias enzimas do complexo xilanolítico e, do complexo celulolítico, as exocelulases são produzidas em pequenas quantidades, embora endo-celulases e beta-glicosidases são produzidas em quantidades comparáveis às reportadas para outros basidiomicetos de decomposição branca (Lobos et al., 1994; Sethuraman et al., 1998; Souza-Cruz et al., 2004; Milagres et al., 2005; Magalhães e Milgares, 2009). A atividade de LiP não tem sido detectada em cultivos desse fungo mesmo em diversos meios e formas de cultivo

(Lobos et al., 1994; Souza-Cruz et al., 2004; Aguiar et al., 2006; Vicentim e Ferraz, 2007). Foram identificadas cópias dos genes *lip* no seu genoma, porém a expressão desses genes não foi comprovada em nenhuma condição de cultivo testada (Rajakumar et al., 1996). Como em vários basidiomicetos, a expressão dessas enzimas é dependente do substrato (Orth et al., 1993; Sethuraman *et al.* 1998; Machuca e Ferraz, 2001; Hammel e Cullen, 2008). Um fato intrigante nesse aspecto é a detecção de níveis muito baixos de lacases em condições de cultivo onde o único substrato orgânico é o próprio lignocelulósico (Vicuna et al., 1996; Souza-Cruz et al., 2004; Vicentim e Ferraz, 2007). Com isso, a degradação de lignina por esse fungo deveria, a princípio, ser atribuída exclusivamente à ação de MnP. Outro dado a ressaltar é que a degradação de lignina por esse fungo ocorre notoriamente em pontos distantes da hifa fúngica (Blanchette et al., 1997; Mendonça et al., 2004), ou seja, o modelo de degradação operante é classificado como não erosivo. Esse conjunto de dados tem levado a busca de um modelo bioquímico que permita explicar a ação de MnP como o principal agente de degradação da lignina mediada pela ação de alguns compostos de baixa massa molar.

Em uma série de trabalhos esclarecedores, o grupo de K.E. Hammel (Jenssen et al., 1996; Srebotnik et al., 1997) demonstrou que o mecanismo químico envolvido na decomposição de lignina por *C. subvermispora* deve passar necessariamente por um modelo onde um elétron é abstraído diretamente de estruturas não fenólicas. Ou seja, a abstração de elétron é induzida por espécie ativa com elevada capacidade oxidativa. Isso foi demonstrado pela determinação dos produtos de degradação de um composto modelo de lignina, marcado com carbono 13, ligado a uma cadeia polimérica de polietilenoglicol.

Uma hipótese para explicar a abstração de elétrons de estruturas não fenólicas em um fungo LiP-deficiente estaria relacionada com a peroxidação de ácidos graxos iniciada por Mn³⁺ oriundo da ação da MnP. Enoki et al. (1999; 2000) demonstraram que *C. subvermispora* produz vários ácidos graxos (ácidos linoleico, oleico, valérico, palmítico e esteárico) quando

cultivado em meio sólido contendo madeira moída pré-extraída para a remoção da fração lipídica. Esses ácidos foram produzidos principalmente nos estágios iniciais da biodegradação tendo suas concentrações diminuídas significativamente após 2 semanas de cultivo, o que foi seguido pelo aparecimento de peróxidos orgânicos. Esses dados levaram os autores a relacionar a formação dos peróxidos orgânicos com a ação de Mn^{3+} (oriundo da oxidação de Mn^{2+} por MnP) sobre os ácidos graxos, seguido da adição de oxigênio aos radicais alila inicialmente formados, exatamente como já bastante estudado para a peroxidação de lipídeos. O mesmo grupo (Watanabe et al., 2000) demonstrou posteriormente que há a formação de diversos radicais, incluindo o radical acila por ação de MnP sobre ácido linoleico *in vitro*. A formação desses radicais poderia ocorrer longe do ponto onde a enzima é produzida. O grupo de Watanabe (Watanabe et al., 2001) estudou ainda em detalhes a peroxidação de ácido linoleico por MnP purificada a partir de cultivos de *C. subvermispora*. Nesse estudo foi determinado que a peroxidação de ácido linoleico pelo sistema MnP/ Mn^{2+} / H_2O_2 gerou n-pentanal, n-hexanal e glioxal como principais produtos de reação. O glioxal formado continua a sofrer reações de oxidação levando a formação inicial de um radical acila por abstração de Hidrogênio do Carbono aldeídico. Essa reação produz quimioluminescência com um espectro de emissão que não corresponde a espécies excitadas bem documentas como carbonila triplete ($\lambda_{m\acute{a}x}$ 400-500 nm), bi-acila (acoplamento de 2 radicais acila) triplete ($\lambda_{m\acute{a}x}$ 500-600 nm) e oxigênio singlete ($\lambda_{m\acute{a}x}$ 634 nm e 703 nm) (Watanabe et al., 2001). Os autores concluem que a emissão de luz na reação de glioxal com MnP é um evento químico novo e de difícil explicação baseada na ocorrência de espécies excitadas oriundas de radicais acila anteriormente descritas.

Kapich et al. (1999) demonstraram que os radicais peroxila oriundos da peroxidação de ácido linoleico iniciada por MnP recombinante de *P. chrysosporium* expressa em *Aspergillus oryzae* foi capaz de atuar em modelos de lignina não fenólicos, abstraindo um

elétron (e um próton) do carbono α , levando a posterior degradação do composto modelo (Fig. 7).

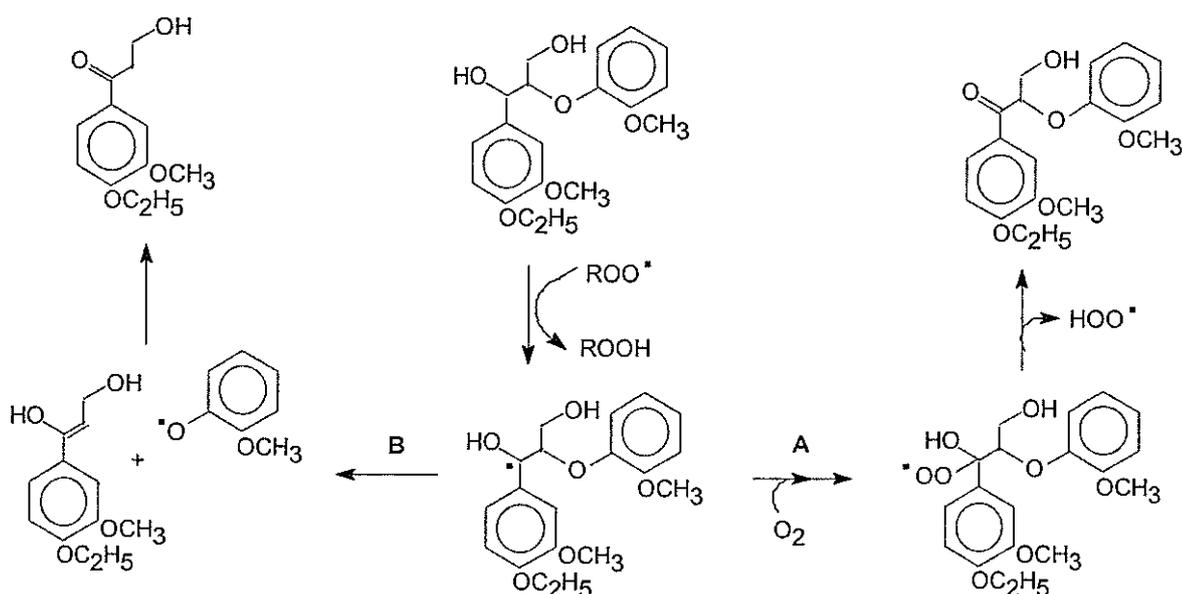


Figura 7. Degradação de um composto modelo de lignina (não fenólico) pelo sistema MnP, ácido linoleico e H_2O_2 . O modelo proposto explicaria a via de oxidação C- α (A) e a clivagem β -O-4 (B). As duas reações seriam iniciadas pela abstração de um hidrogênio benzílico do composto modelo através da ação de um radical peroxila gerado pelo sistema MnP/ácido linoleico/ H_2O_2 (Reproduzido de Kapich et al., 1999 com modificações).

Até o momento, o modelo que envolve a peroxidação de ácidos graxos iniciada pela ação de MnP parece ser o mais adequado para explicar a ação dos fungos que degradam a madeira de forma não erosiva e que também não produzem LiP (Hammel e Cullen, 2008).

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

reações que continham mediadores não fenólicos como o ácido 4-metoxi-benzóico, uma lignina sintética exaustivamente metilada ou mesmo somente lacase, não induziram peroxidação significativa do ácido linoleico.

2.2 Biopolpação

Partindo do princípio de que várias espécies de fungo podem degradar lignina, surgiu a idéia inicial da biopolpação. A princípio, os fungos que degradam lignina seletivamente, isto é, removem lignina preservando a celulose, podem ser aplicados sobre cavacos de madeira e depois de um determinado tempo de biodegradação dar origem a um resíduo biodegradado rico em celulose e com baixo teor de lignina. Esse processo é realmente possível e a ocorrência de amostras de madeiras naturalmente biodegradadas com teores de polissacarídeos superiores a 95% demonstra que a biopolpação é realmente factível (Agosin et al., 1990). Além de madeiras degradadas na natureza, a biodeslignificação *in vitro* também é possível, porém se restringe a formação de pequenos pontos de intensa deslignificação detectados nas superfícies de cavacos biotratados com fungos selecionados como *G. australe* e *C. subvermispora* (Ferraz et al., 2000a). No entanto, a biodegradação extensiva de lignina é um processo extremamente demorado e sua aplicação dentro de uma indústria de celulose e papel é inviável.

Uma reformulação no conceito inicial de biopolpação foi necessária para que o processo obtivesse êxito em escala ampliada e com tempos de biodegradação compatíveis à produção industrial. Na reformulação desse conceito foi considerada a possibilidade de aplicar a biodegradação de madeira como uma etapa prévia à polpação química ou mecânica (Akhtar et al., 1998 e referências ali citadas).

Mesmo com períodos mais curtos de biodegradação (7 a 15 dias), a madeira biodegradada já apresenta um “amolecimento” característico que permite maior facilidade de

desfibramento mecânico ou no caso de polpação química, maior facilidade de penetração dos reagentes, bem como maior susceptibilidade da lignina parcialmente degradada à solubilização pelos licores de polpação. Esse pré-tratamento biológico permite então uma redução no consumo de energia para o desfibramento e refino mecânico ou, no caso da polpação química, diminuição no tempo, na temperatura de reação ou mesmo na carga de reagentes químicos utilizados. Essa “amenização” nas condições necessárias para a produção de polpas celulósicas também pode proporcionar a obtenção de polpas com melhor resistência mecânica (Akhtar et al., 1998; Ferraz et al., 2008).

Atualmente, a biopolpação associada aos processos de produção de polpas mecânicas atingiu um grau de desenvolvimento que permitiu a ampliação de escala para o nível piloto e semi-industrial (Scott et al., 1998; Scott et al., 2002; Guerra et al., 2006; Ferraz et al., 2008; Masarin et al., 2009). Os processos de polpação mecânica respondem por aproximadamente 20% da produção de polpa celulósica mundial e são caracterizados pelo alto rendimento (90-98%) e pelos baixos custos de instalação (Biermann, 1993). Apesar da relativa simplicidade da instalação, os processos mecânicos caracterizam-se por demandar um grande consumo de energia elétrica, além de produzir polpas de baixa resistência, o que limita sua aplicação à produção de jornais, catálogos, papelão e, em misturas com polpas de melhor qualidade, para papéis sanitários e absorventes (Biermann, 1993; Klinga et al., 2008).

A polpação biomecânica tem apresentado resultados promissores com relação à diminuição no consumo de energia durante o processo mecânico, bem como quanto à melhoria da resistência mecânica das polpas obtidas em escala de laboratório. A redução no consumo de energia elétrica observada depende do grau de refino realizado no processo mecânico e ocorre porque a madeira biodegradada apresenta menor coesão entre as fibras, permitindo que os discos dos refinadores operem mais distanciados, exigindo menor torque para o processo de desfibramento inicial e posterior refinamento. Uma consequência do

desfibramento mais “ameno” da madeira biotratada é a menor degradação das fibras o que pode proporcionar a obtenção de polpas de melhor qualidade (Leatham et al., 1990a; Akhtar et al., 1998; Ferraz et al., 2008; Masarin et al., 2009).

A eficiência do bioprocesso depende do fungo utilizado. Leatham et al. (1990a, b) avaliaram 9 espécies diferentes de fungos de decomposição branca e um fungo de decomposição parda na polpação biomecânica. As economias de energia proporcionadas pelo pré-tratamento com os fungos de decomposição branca variaram entre 1 e 47% para *T. versicolor* e *Phlebia brevispora*, respectivamente. Entre as melhores espécies, além de *P. brevispora*, se destacaram *P. subserialis* (42% de economia de energia), *Pholiota mutabilis* (37%) e *P. tremellosa* (35%). Uma correlação direta entre economia de energia e melhoria das propriedades físicas das polpas com a perda de massa ou extensão da degradação de lignina durante o biotratamento não foi observada. Pelo contrário, alguns dos melhores resultados em economia de energia corresponderam a madeiras levemente degradadas que apresentaram perdas de massa menores do que 5%. Na década de 90, vários trabalhos buscaram espécies adequadas para o processo de biopolpação. Boa parte dos estudos foi desenvolvida por pesquisadores do Forest Products Laboratory, Madison, EUA com base num projeto financiado na forma de consórcio com várias indústrias. Uma revisão dos avanços obtidos por esse grupo foi publicada por Akhtar et al (1998) e apontou *C. subvermispora* e *P. brevispora* como as espécies mais indicadas para biopolpação tanto de madeira de folhosas como de coníferas. *P. chryso sporium* RP-78 também foi indicado como muito eficiente para o tratamento de madeiras de folhosas. Mais recentemente, *Physisporinus rivulosus* foi selecionado como outra espécie eficiente para a biopolpação preferencial de madeiras de coníferas (Hakkala et al., 2004; Maijala et al., 2008).

Dentro de uma mesma espécie de fungo, diferentes linhagens também apresentam eficiência diferenciada. Por exemplo, Akhtar et al. (1992) avaliaram 5 cepas diferentes de *C.*

subvermispora no pré-tratamento de *Pinus taeda*. A economia de energia variou entre 21% e 37% para os pré-tratamentos com as diferentes cepas e, em geral, as características físicas das polpas melhoraram em relação a um controle não biodegradado. Também nesse caso não foram observadas correlações diretas entre a extensão da biodegradação com a economia de energia ou a melhoria das características físicas das polpas.

O pré-tratamento de cavacos de madeira com fungos ligninolíticos seguido de polpação química tem recebido menos atenção quando comparado aos processos de polpação biomecânica. A maioria dos trabalhos publicados está relacionada ao uso de processos bioquímicos desenhados para a preparação de polpas de baixo número kappa e susceptíveis ao branqueamento. Nestes casos, sempre é necessário o emprego de um processo de polpação severo, realizado a altas temperaturas e com elevadas cargas de reagentes. Em tais condições, o pré-tratamento fúngico pode levar a uma diminuição na carga de álcali requerida no cozimento da ordem de 1-2% (processo kraft), gerando polpas de propriedades similares às obtidas a partir de controles não biodegradados, ou ainda pode levar a obtenção de polpas com teores de lignina residual levemente menores (Oriaran et al., 1990; Bajpai et al., 2001; Kang et al., 2003; Mendonça et al., 2008). Por outro lado, alguns trabalhos mostraram que o máximo benefício do pré-tratamento fúngico somente é obtido quando o processo posterior de polpação química é realizado em condições mais amenas de reação (Ferraz et al. 2000; Mendonça et al., 2002; 2004). Nestas condições, as polpas preparadas apresentam teor de lignina residual elevado e por isso possuem uma aplicação mais restrita na preparação de papéis. Estas polpas, denominadas de polpas de alto rendimento, geralmente são utilizadas na preparação de papéis de recobrimento de embalagens e usualmente não são branqueadas (Bierman, 1993).

2.2.1 Alvura de polpas mecânicas preparadas a partir de madeiras biodegradadas

Um limitante para a aplicação do pré-tratamento biológico combinado com a produção de polpas mecânicas é que as polpas obtidas apresentam valores inferiores de alvura. Um fato intrigante é que cavacos biodegradados geram polpas mais escuras independentemente da cor inicial dos cavacos. Por exemplo, o tratamento com o fungo *C. subvermispora* escurece a madeira de *Pinus* sp. e descolore Eucalipto. No entanto, as polpas de ambas as madeiras biodegradadas são mais escuras do que um controle não degradado (Guerra et al., 2006). Com isso, pode-se inferir que a estrutura da lignina dos cavacos biotratados facilita a formação de cromóforos durante as etapas de polpação mecânica. No entanto, a natureza e as variáveis que afetam a produção desses cromóforos em biopolpas, bem como as reações de formação, ainda não foram elucidadas.

Segundo Sykes (1993), a redução de até 15 pontos percentuais na alvura é bastante comum em polpas biomecânicas de Aspen bitratado com *P. chrysosporium*. Akhtar et al. (1998) também reportaram uma redução significativa de alvura em polpas termomecânicas e quimiotermomecânicas de Aspen e *Pinus* sp. biotratados com *C. subvermispora*.

Outra questão a ser avaliada nos estudos relativos à implementação da polpação biomecânica diz respeito à branqueabilidade das polpas nos casos onde há a intenção de preparar papéis absorventes. Apesar da baixa alvura inicial, estudos preliminares de branqueabilidade de polpas de *P. taeda* biodegradado por *C. subvermispora* sugerem que polpas biomecânicas podem ser branqueadas aos mesmos níveis de alvura que as polpas controle. No entanto, para mesmas cargas de reagentes de branqueamento, os valores de alvura para as biopolpas são menores do que os observados para o controle (Akhtar et al., 1998). Sykes (1993) também estudou a branqueabilidade de polpas biomecânicas de Aspen previamente tratado com *P. chrysosporium* ou *C. subvermispora* e mostrou que os valores finais de alvura das biopolpas dependem da otimização da carga de agente de branqueamento

utilizado. A comparação dos resultados apresentados por Akhtar et al. (1998) e Sykes (1993) sugere que a otimização do branqueamento dependa do processo de polpação, da espécie de madeira e do fungo utilizado para degradar a madeira.

Por fim, outro problema associado à utilização das biopolpas é a falta de informação a respeito da estabilidade da alvura dessas polpas após serem branqueadas. Sykes (1993) avaliou a estabilidade da alvura de polpas mecânicas de Aspen preparadas a partir de cavacos biodegradados por *P. chrysosporium* e *C. subvermispora*. Nesse estudo, o autor submeteu biopolpas branqueadas por peróxido de hidrogênio a testes de foto- e termo-amarelamento induzido e mostrou que as polpas provenientes de Aspen biodegradado escureceram mais rápido do que as polpas controle. No entanto, esta avaliação foi restrita às polpas mecânicas de Aspen e as causas que levaram ao amarelamento precoce das biopolpas não foram avaliadas.

Uma vez que a reversão da cor é um dos fatores que podem limitar a difusão da utilização das biopolpas de alto rendimento, parece claro que o estudo relacionado à caracterização das estruturas responsáveis pelo início das reações de amarelamento, induzido por luz ou calor, é uma etapa essencial para o desenvolvimento da biopolpação.

2.3 Considerações finais sobre a revisão bibliográfica

O conjunto de trabalhos apresentados e discutidos anteriormente indica que a biopolpação é uma tecnologia promissora. O desenvolvimento dessa tecnologia em escala ampliada poderá fornecer informações que permitam confirmar seus efeitos benéficos em condições de operação industrial, além de gerar dados que permitam planejar um desenho industrial adequado para utilizar o biotratamento como uma etapa de pré-tratamento dos cavacos de madeira. Por outro lado, os estudos que visem entender os mecanismos químicos e bioquímicos envolvidos na biopolpação poderão direcionar os esforços de seleção de fungos

mais apropriados para o processo, ou mesmo levar a proposição de sistemas biomiméticos para a etapa de pré-tratamento. É nesse contexto que a presente tese relata uma série de trabalhos desenvolvidos recentemente com o objetivo essencial de avançar no desenvolvimento tecnológico e na geração de conhecimento associados ao processo de biopolpação.

3 Objetivos

O objetivo principal desse grupo de trabalhos foi avaliar a viabilidade tecnológica da biopolpação e estudar os mecanismos químicos e bioquímicos envolvidos nesse processo.

Para atingir esse objetivo, o trabalho foi dividido nas seguintes etapas:

- Construir e operacionalizar uma planta piloto destinada ao biotratamento de até 50 ton de cavacos de *Eucalyptus grandis*. Etapa desenvolvida em conjunto com a empresa Melhoramentos Papéis, Caieiras, SP.
- Conduzir experimentos de biodegradação de *E. grandis* e *Pinus taeda* por *Ceriporiopsis subvermispota* em escala de laboratório
- Caracterizar as enzimas secretadas durante a biodegradação da madeira
- Determinar a perda de massa e o teor de componentes nas madeiras biotratadas
- Avaliar as características estruturais e macromoleculares dos componentes residuais presentes na madeira biotratada

4 Parte experimental

4.1 Polpação TMP e CTMP de *Eucalyptus grandis* biotratado em uma planta piloto

Cavacos de *E. grandis* foram biotratados em uma planta piloto de biopolpação desenhada para tratar até 50 ton de cavacos por batelada. Essa planta piloto está instalada na empresa Melhoramentos Papéis, Caieiras, SP e foi desenvolvida em conjunto pela empresa Melhoramentos, a empresa Biopulping International (Madison, WI, EUA) e pelo Laboratório de Ciências da Madeira (USP-Lorena). Um desenho esquemático da planta piloto está ilustrado na Figura 8. Os cavacos submetidos ao processo de inoculação foram previamente descontaminados por injeção de vapor com tempo de residência de aproximadamente 1 min a 95°C, seguido de resfriamento até 40°C em fluxo contínuo contra corrente de ar filtrado através uma linha de filtros do tipo Allergen- 1000 seguido de mais duas linhas de filtros do tipo Ultra-Allergen 1250 (Filtrete 3M). Os cavacos foram então misturados com cavacos pré-cultivados com *C. subvermispora*. O processo de inoculação compreendeu a construção de uma pilha de 50 toneladas de cavacos que demandou quatro etapas de ampliação de escala que partiu com 40 kg de cavacos cultivados em laboratório (Mendonça et al., 2002; Guerra et al., 2006).

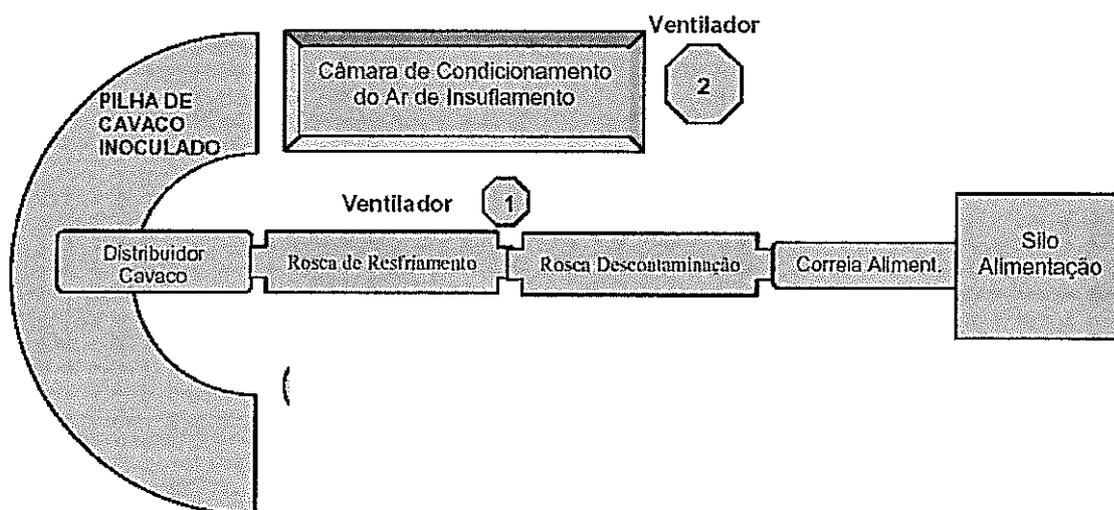


Figura 8. Esquema ilustrativo da planta piloto de biopolpação instalada na empresa Melhoramentos Papéis, Caieiras, SP.

Após 60 dias de biotratamento, os cavacos da última pilha foram desfibrados e refinados utilizando uma planta industrial que opera com 2 estágios de refinamento visando produzir polpas termomecânicas ou quimiotermomecânicas com aproximadamente 400 mL de drenabilidade CSF (Canadian Standard Freeness). A planta industrial em questão (empresa Melhoramentos Papéis, Caieiras, SP) conta com controle automatizado que permite integrar o consumo de energia bruto em cada um dos dois discos refinadores, além de controle da produção mássica do período, o que permite calcular os consumos específicos de energia consumida em cada etapa avaliada (Pavan, 2008).

As polpas preparadas nesse estudo foram avaliadas em laboratório quanto ao grau de refino (TAPPI standard T227om-85) e quanto a resistência mecânica ao esforço de tração (TAPPI standards T 494 om-01).

A avaliação de fungos contaminantes na pilha de madeira inoculada foi feita a partir de cavacos que apresentaram nível elevado de contaminação. Os fungos em questão foram isolados a partir da superfície dos cavacos contaminados e cultivados em placas de Petri contendo meio com 2,0% de extrato de malte, 0,2% de extrato de levedura e 2% de ágar. O crescimento fúngico nessas placas foi monitorado diariamente e micélio ou esporos presentes nas bordas da placa foram re-cultivados em meio contendo ágar-dextrose/extrato de batata até que uma cultura pura fosse obtida. A identificação dos fungos em questão foi feita a partir de características morfológicas dos esporos avaliadas de acordo com Barnett e Hunter (1987).

4.2 Branqueamento e estabilidade de alvura da polpa bio-TMP

Amostras de polpa não branqueada produzidas em escala industrial a partir da madeira biotratada foram submetidas a reações de branqueamento conforme descrito por Sykes (1993). Antes do branqueamento, as polpas (a 0,3% de consistência) foram pré-tratadas com 0,4% de DTPA (ácido dietilenotriamina pentacético) por 30 minutos a 60 °C, com pH inicial

de 6,3. Após tratamento com DTPA, as amostras foram colocadas em recipientes de polietileno, juntamente com $MgSO_4$ (0,05g/100g de polpa), e branqueadas com peróxido de hidrogênio em concentrações variáveis entre 2 e 12%. A consistência foi de 10%, e o tratamento conduzido a 60°C por 30 min (Guerra et al., 2006).

A reversão da alvura das polpas branqueadas foi avaliada através de foto-amarelamento induzido, conforme descrito por Pan e Ragauskas (1995). A avaliação do escurecimento induzido foi feito com polpas com alvuras iniciais variáveis entre 45% e 75%. As folhas foram colocadas em um ambiente fechado e exposto à irradiação de luz na região do UV/visível (330-400 nm). As polpas foram colocadas a aproximadamente 10 cm de distância da fonte de irradiação por períodos que variaram de 1 a 8 horas de exposição (Guerra et al., 2006). Após cada período, a alvura das polpas foi determinada (TAPPI standard T452 om-98).

4.3 Polpação quimiomecânica em escala de laboratório de cavacos de *E. grandis* biotratados por *C. subvermispora*

Cavacos de *E. grandis* controle ou biotratado em escala de laboratório foram digeridos a 121°C por 2 h em licor contendo 10% de Na_2SO_3 e 5% de NaOH, ambos em base m/m de madeira seca. Quatro frascos contendo, cada um, 50 g de cavacos (base seca) e 300 ml de licor foram tratados simultaneamente. Após a digestão, o conteúdo de um dos frascos foi lavado várias vezes com água corrente até a água de lavagem apresentar pH neutro. Os cavacos lavados foram então secos ao ar, pesados, e tiveram a umidade determinada em termo-balança OHAUS. As massas secas iniciais e finais desses cavacos foram usadas para calcular o rendimento da etapa de cozimento. Os cavacos cozidos dos outros 3 frascos foram desfibrados por 1 h em um liquidificador comercial de 3,5 l a baixa consistência (1,7% w/v). O material desfibrado foi lavado e selecionado em um classificador com malha de 0,15 mm.

A polpa classificada foi centrifugada até uma consistência aproximada de 30%. Os rejeitos retidos na malha foram pesados e defibrados por 1 h adicional em um moinho Jokro (Regmed) a 11 % de consistência (20 g de rejeitos e 180 ml de licor em cada recipiente do moinho Jokro). As fibras resultantes dessa etapa foram lavadas e selecionadas em um classificador com malha de 0,15 mm. A polpa que passou na malha foi centrifugada e misturada com a polpa obtida na etapa anterior. A polpa misturada foi então refinada por períodos variáveis entre 30 e 90 min em um moinho Jokro nas mesmas condições previamente descritas. As polpas refinadas foram suspensas em água e usadas para a determinação do grau de fibrilação (determinação do grau Schopper-Riegler em aparelho Regmed) bem como para a preparação de folhas teste com gramatura de 150 g/m². As folhas foram ensaiadas quanto à resistência à tração e ao rasgo de acordo com as normas TAPPI, T 494 om-01 e T 414 om-04, respectivamente. As fibras de cada etapa foram ainda avaliadas quanto à distribuição de tamanho usando um equipamento Galai Cis-100 (Ankersmid-Israel) (Vicentim e Ferraz, 2008).

4.4 Avaliação da degradação dos componentes da madeira e a secreção da enzima MnP durante o biotratamento de madeira por *C. subvermispora*

4.4.1 Etapa de biotratamento e extração de enzimas

Tanto madeira de *E. grandis* como de *P. taeda* foram biotratadas em escala de laboratório e avaliadas quanto à composição química e quanto às características estruturais dos polímeros residuais. Os processos de biotratamento em escala de laboratório foram conduzidos em Erlenmeyers de 2L (Vicentim e Ferraz, 2007; Aguiar et al., 2008) e/ou biorreatores de 20L (Mendonça et al., 2002; Vicentim e Ferraz, 2008). Nos dois casos o fungo utilizado no biotratamento foi *C. subvermispora*.

Para a preparação do inóculo, o fungo foi repicado em 200 ml de meio líquido composto de glicose/extrato de batata (24 g l⁻¹) e extrato de levedura (7 g l⁻¹). O repique foi feito a partir de 20 discos com 8 mm de diâmetro obtidos de placas de Petri pré-cultivadas com o fungo. As culturas em meio líquido foram mantidas sem agitação por 12 dias a 27 °C. O micélio crescido foi filtrado e lavado com água autoclavada. O micélio proveniente de vários cultivos foi macerado em um liquidificador de 500 ml com 100 ml de água autoclavada em 3 ciclos de 15 s. A suspensão de micélio foi então usada para inocular os cavacos de madeira.

Os cavacos de *E. grandis* (2.5 cm × 1.5 cm × 0.2 cm) foram obtidos junto à empresa Melhoramentos Papéis, Caieiras, SP, sendo provenientes de árvores com aproximadamente 8 anos. No caso de *P. taeda*, os cavacos foram preparados por corte manual (3,0 x 2,5 x 0,2 cm) a partir de uma única tora proveniente de uma árvore com aproximadamente 28 anos cedida pelo parque estadual de Campos do Jordão, SP. Antes da inoculação, os cavacos foram imersos em água por 16 h. Após esse período, o excedente de água foi drenado e os cavacos umedecidos foram autoclavados a 121 °C por 15 min. O teor de umidade dos cavacos autoclavados após esse procedimento era de 55%.

Os cavacos mencionados anteriormente foram inoculados com suspensão de micélio de *C. subvermispora* na proporção de 100 mg/kg no caso de *P. taeda* e 500 mg/kg no caso de *E. grandis*. Em alguns experimentos, os cultivos receberam ainda nutrientes adicionais conforme mencionado no capítulo de resultados e discussão. Em todos os estudos os cultivos foram realizados em triplicata.

Alguns cultivos foram submetidos à extração de enzimas após tempos definidos de biotratamento (Vicentim e Ferraz, 2007). As enzimas foram extraídas com tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,5) contendo Tween 60 (0.1 g l⁻¹). Para a extração, 50 g (base seca) de cavacos foram extraídos com 200 ml de solução extratante por 5 h a 10 ± 1 °C (Souza-Cruz et

al. 2004). Os extratos obtidos foram filtrados através de filtro de vidro poroso e em seguida através de membranas com poros de 0,45 µm. A atividade da enzima MnP foi determinada pela oxidação de vermelho de fenol (Souza-Cruz et al., 2004).

4.4.2 Caracterização química da madeira biotratada

Os cavacos foram previamente moídos em um moinho de facas até passarem por uma malha com perfurações de 0,75 mm e extraídos por 6 h em Soxhlet com etanol 95 %. O teor de componentes (lignina, glucana e polioses) foi determinado a partir da hidrólise ácida do material pré-extraído (Ferraz et al., 2000b). Cerca de 300 mg de amostra seca ao ar foram tratados com 3 mL de H₂SO₄ 72% (peso/peso) por uma hora a 30°C. Em seguida o conteúdo do tubo de ensaio foi transferido quantitativamente para um Erlenmeyer de 250 mL com o auxílio de 79 mL de água. A mistura foi autoclavada a 121°C por 30 minutos, resfriada e filtrada em filtros de vidro sinterizado de porosidade número 3, previamente secos a 105°C e pesados. O material retido foi lavado com 2 porções de 5 mL de água e seco até massa constante. Esse resíduo corresponde a lignina insolúvel em ácido (Klason). O filtrado foi avolumado a 100 ml e analisado quanto aos teores de açúcares em um sistema de cromatografia líquida. A análise cromatográfica foi feita em um cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizando uma coluna BIORAD HPX-87H e H₂SO₄ 5 mM a 0,6 mL/min como eluente e um detector de índice de refração (Shimadzu). A concentração de açúcares foi determinada através de curvas de calibração preparadas com padrões de grau analítico secos sob sílica e vácuo. O teor de lignina solúvel em ácido foi determinado através da leitura em 205 nm de uma diluição (usualmente 2:10) do hidrolisado, tomando-se como padrão uma absortividade de 105 L/g.cm neste comprimento de onda.

O cálculo da perda centesimal de componentes (glucana, polioses e lignina) foi feito como segue: $Pc (\%) = [(mci-mcf)/mci] \times 100$

Onde:

Pc : perda centesimal de componentes

mci : % de componente na madeira controle x massa de madeira inicial

mcf : % de componente na madeira biodegradada x massa de madeira final

4.4.3 Caracterização da lignina *in situ* por oxidação com CuO e por derivatização seguida de clivagem redutiva (DFRC)

As amostras de madeira, controle e biodegradadas, foram oxidadas com CuO utilizando-se o método descrito por Chen (1992). A madeira moída, extraída por 6 horas com etanol 95%, foi seca a vácuo sobre pentóxido de fósforo. O reator foi carregado com 400 mg de madeira, 2 g de óxido de cobre, 15 mL de hidróxido de sódio aquoso 2 mol.L⁻¹ e 100 mg de sulfato férrico amoniacal (Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O) e finalmente borbulhado com nitrogênio. A reação foi conduzida a 170 °C por 3 horas. Terminado o tempo de reação, o reator foi resfriado em banho de água e gelo e seu conteúdo lavado com uma solução de hidróxido de sódio 1 mol.L⁻¹ e filtrado em papel de filtro. O filtrado recolhido foi acidificado, a pH 1, com ácido clorídrico 6 mol.L⁻¹. A mistura ácida foi extraída três vezes com 40 mL de éter etílico previamente tratado com solução saturada de Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O para remoção de peróxidos. Os extratos etéreos foram combinados e secados com sulfato de sódio anidro. O volume de éter etílico foi reduzido a 5 mL por evaporação a vácuo. Nesta etapa, a amostra foi tratada novamente com sulfato de sódio para retirada da água residual. A amostra concentrada foi transferida para um tubo, previamente seco e pesado. O éter foi removido por um fluxo de nitrogênio; o resíduo pesado e o rendimento de oxidação calculado como a massa do material

extraído com éter etílico dividido pela massa de lignina presente na amostra de madeira (Guerra et al., 2002).

Os produtos de oxidação, secos sob atmosfera de nitrogênio, foram dissolvidos em 3 mL de piridina e uma alíquota de 0,2 mL dessa solução foi transferida para um tubo contendo 0,77 mL de padrão interno (fluoranteno dissolvido em piridina na concentração de 1000 mg.L⁻¹). A mistura foi derivatizada com 0,5 mL de N,O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) durante 1 hora a 60°C e, em seguida, resfriada até temperatura ambiente. Um µL da mistura reacional foi analisado por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de massas (CG/EM) Finnigan, modelo MAT GCQTM, calibrado com perfluorotributilamina (PFTBA) na faixa de varredura de m/z de 20 a 900. Os espectros foram medidos após ionização das moléculas por impacto de elétrons (70 eV). Uma coluna cromatográfica DB-5 (de 30 m x 0,25 mm) foi utilizada para a análise; a pressão de hélio na entrada da coluna foi mantida constante e correspondeu a um deslocamento linear de 33,0 cm/s (aproximadamente 1 mL/min). O injetor, a linha de transferência e a fonte de íons foram aquecidos a 220°C, 275°C e 170°C, respectivamente. O forno foi mantido a 60°C por 0,5 min e, posteriormente, aquecido, a uma taxa de 30°/min, até 130°C. Esta temperatura foi mantida por 1 min e o forno aquecido novamente, a 3,5°C/min, até a temperatura final de 210°C, que foi mantida por 10 min (Guerra et al., 2002).

A quantificação dos produtos de oxidação foi feita em um equipamento Varian, modelo 3400 CX, equipado com um detetor de ionização de chama, que foi mantido à temperatura constante de 300°C. As condições de análise foram as mesmas descritas anteriormente para CG/EM, exceto que N₂, a uma velocidade linear de 70 cm/s, foi utilizado como gás de arraste. A quantidade de cada monômero foi determinada usando uma curva de calibração onde a razão entre área do padrão autêntico e do padrão interno foi graficada em função da concentração do respectivo monômero.

O método de derivatização seguido de clivagem reductiva (do inglês, DFRC) foi realizado conforme descrito por Lu e Ralph (1997). A um balão de fundo redondo, contendo 0,1 g de madeira, previamente moída e extraída, por 6 horas, em aparelho Soxhlet com etanol 95%, foram adicionados 15 mL de uma solução-estoque de brometo de acetila:ácido acético (20:80). O balão foi fechado e colocado em banho termostaticado, a 50°C, por 3 horas. Ao final deste período, o solvente foi completamente evaporado, a 35°C, sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi misturado com 15 mL de uma solução-estoque de dioxano:ácido acético:água (15:12:3) e, após completa dissolução, adicionaram-se 0,25 g de zinco em pó. A mistura foi agitada, a temperatura ambiente, por 16 horas e, em seguida, transferida, quantitativamente, para um funil de separação com 50 mL de diclorometano e 50 mL de cloreto de amônio saturado. O pH da fração aquosa foi ajustado, para menor que 3, pela adição de ácido clorídrico 3% e a amostra vigorosamente misturada. A fração orgânica foi separada e armazenada, enquanto a fração aquosa foi extraída mais duas vezes com diclorometano (2 x 50 mL de diclorometano). As frações orgânicas separadas foram combinadas e secas com sulfato de sódio anidro e então concentradas até aproximadamente 5 mL, a 35 °C, sob pressão reduzida. A solução concentrada foi acetilada por 3 horas com 10 mL de anidrido acético:piridina (1:1). A acetilação foi interrompida pela adição de metanol e os componentes voláteis evaporados, a 35 °C, sob pressão reduzida. Imediatamente após a evaporação, o padrão interno (1 mL de uma solução 1000 mg.L⁻¹ de fluoranteno em diclorometano) foi adicionado e a mistura analisada por cromatografia gasosa, utilizando-se detectores de massa (CG/EM) e ionização de chama (CG/IC) (Guerra et al., 2002).

Os produtos da reação de DFRC foram analisados no mesmo sistema cromatográfico descrito anteriormente. Utilizou-se um programa de aquecimento da coluna descrito por Lu e Ralph (1997). O forno foi mantido a 140°C por 60 segundos e, posteriormente, aquecido a uma taxa de 3° C/min até 240°C. Esta temperatura foi mantida por 1 min e o forno foi

novamente aquecido, a 30°C/min, até a temperatura de 290°C, a qual foi mantida por 12 minutos.

Para a quantificação dos produtos de DFRC, utilizou-se o mesmo sistema CG/IC descrito anteriormente onde as condições de análise foram as mesmas descritas para o sistema CG/EM, exceto que o He foi substituído por N₂ (velocidade linear de 70 cm/s). A quantidade de cada monômero foi determinada usando uma curva de calibração onde a razão entre área do padrão autêntico e do padrão interno (fluoranteno 1000 mg.L⁻¹) foi graficada como uma função da concentração do respectivo álcool (Guerra et al., 2002).

4.4.4 Caracterização da lignina *in situ* por tioacidólise

As amostras de madeira, controle e biodegradadas, foram oxidadas com CuO utilizando-se o método descrito por Rolando et al. (1992). 20 mg de madeira moída livre de extrativos (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 dicloro-metano como padrão interno. A tioacidólise foi realizada a 100°C por 4 h em um banho de silicone termostatizado. Após esfriar-se, a mistura reacional foi transferida para um Erlenmeyer com o auxílio de 15 mL de água destilada e ajustou-se o pH em torno de 3 com 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 µL desta solução foram derivatizados por sililação com 50 µL de N,O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) por 1 h a 60°C na presença de 5 µL de piridina como catalisador. Foi injetado 1 µL da mistura reacional no cromatógrafo de fase gasosa.

Os produtos da sililação foram analisados em um cromatógrafo de fase gasosa HP 5890 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 et al., 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 e Gellerstedt, 2003).

4.4.5 Extração da lignina de madeira moída (LMM) e sua caracterização

A LMM de *P. taeda* foi preparada a partir de amostras previamente moídas em um moinho de facas, extraídas por 6 horas em aparelho Soxhlet com etanol 95% e secas a vácuo sobre P₂O₅ (Guerra et al., 2003). Cerca de 92 g de amostra foram impregnadas com tolueno e colocadas em um moinho de bolas, mantendo-se a razão entre a massa de bolas e a massa de madeira em aproximadamente 20. A moagem foi feita durante 130h à temperatura ambiente (não ultrapassou 35°C) em um moinho com 96 rpm. Para compensar perdas de tolueno, o moinho foi aberto para adição do solvente a cada 24h. Após o tempo de moagem, o moinho foi descarregado e a madeira moída foi seca ao ar.

A madeira moída e seca foi então extraída com dioxano 96% (cerca de 10 mL de dioxano 96% por 1g de madeira moída) em agitador a 120 rpm por 24h sob temperatura ambiente e na ausência de luz. A suspensão foi filtrada em papel de filtro e o filtrado foi armazenado a 4°C. O processo de extração foi repetido mais uma vez com o resíduo sólido da primeira extração. Os filtrados foram então misturados e evaporados sob pressão reduzida a 35°C e, posteriormente, secos à vácuo sobre pentóxido de fósforo.

A distribuição de massas molares das amostras LMM foi determinada utilizando-se um sistema cromatográfico com uma coluna de 57cm x 1,8cm preenchida com uma suspensão de Sephadex G-50 em hidróxido de sódio 0,5 mol.L⁻¹. A fase móvel foi hidróxido de sódio 0,5 mol.L⁻¹, com vazão de 0,4 mL.min⁻¹. Injetaram-se 400 µL de amostra a uma concentração final de 2 g/L, conforme descrito por (Forss et al., 1989). Frações de 4,0 mL foram coletadas e a absorbância de cada uma foi lida em 280 nm (Guerra et al., 2003).

A coluna cromatográfica foi previamente calibrada com proteínas de massas molares conhecidas. Além dessas proteínas, foram usados, para a determinação dos volumes de exclusão (V₀) e permeação total (V_t), Blue Dextran (2.000.000 g.mol⁻¹) e acetona (58 g.mol⁻¹), respectivamente. As proteínas foram aplicadas na coluna nas mesmas condições da amostra e seus volumes médios de eluição transformados em um valor que independe do tamanho da coluna (K_d), conforme a equação 2.

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

onde:

V_{el} = volume de eluição

V₀ = volume de exclusão total

V_{ac} = volume de permeação total

Os cromatogramas obtidos foram integrados em frações de 4 mL e os valores de Mw (massa molar média em massa), Mn (massa molar média em número) e Mw/Mn (dispersibilidade) foram calculados pelas equações 3, 4, e 5, respectivamente (Guerra et al., 2003).

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

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

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

onde:

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

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

A caracterização por espectroscopia UV-Visível foi feita a partir de soluções estoque da LMM em dioxano 96%. As soluções foram analisadas em um espectrofotômetro GBC-Cintra 20 e as absorvidades das ligninas calculadas a cada 5 nm na região de 240-450 nm (Guerra et al., 2004).

Os espectros de RMN-¹H foram obtidos de amostras de lignina acetiladas. A acetilação foi feita com cerca de 100 mg de amostra dissolvida em 2 mL de anidrido acético e 2 mL de piridina (Guerra et al., 2003). A mistura foi borbulhada por 15 minutos com nitrogênio e o frasco selado. O sistema foi deixado à temperatura ambiente por 12h e no escuro sob agitação magnética. Após esse período, adicionou-se etanol para degradar o excesso de anidrido e a mistura foi evaporada, sob pressão reduzida, com sucessivas co- evaporações com etanol 95%.

A análise elementar das ligninas foi realizada em um equipamento Perkin Elmer no Laboratório de Recursos Renováveis da Faculdade de Ciências Químicas da Universidade de Concepción, Chile.

A caracterização da LMM por DFRC foi idêntica à descrita para a caracterização da madeira, exceto que a massa de amostra usada foi de 10 mg e não 100 mg como no caso da madeira. Os volumes dos reagentes foram estequiometricamente corrigidos (Guerra et al., 2004). Nesse caso foi ainda possível quantificar, por CG/EM, os dímeros formados após a reação de DFRC. Esses dímeros foram analisados com uma programação de temperatura da coluna no sistema CG/EM diferenciado. Para isso, a temperatura inicial da coluna foi de 150°C (mantida por 1 minuto) e então o aquecimento seguiu uma rampa de 10°C/min até que a temperatura do forno atingisse 300°C. A identificação dos dímeros a partir de seus espectros de massa foi feita de acordo com os dados reportados por Peng et al. (1998).

4.4.6 Extração da lignina por acidólise branda e sua caracterização

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 de três bocas 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.

4.4.6.1 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 (Granata e 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*-hidroxi-naftalimida 11,4 g/L (padrão interno) preparados em piridina e clorofórmio deuterado (1,6:1 v/v). Por fim, 200 µL de reagente de fosfitilação 2-cloro-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxafosfolano foram adicionados ao *vial*. Usou-se ainda 100 µL de colesterol 40 g/L (também preparado em piridina e clorofórmio deuterado 1,6:1 v/v) como um padrão interno. As amostras foram homogeneizadas e transferidas para um tubo de RMN de 0,5 mm de diâmetro. Os espectros de RMN foram adquiridos em um espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker de 250 MHz. Os teores de grupos OH alifáticos, OH fenólicos de unidade guaiacila, *p*-hidroxifenila e de estruturas condensadas e grupos carboxila foram quantificados como descrito por Granata e Argyropoulos (1995) de acordo com as integrais de distintas regiões dos espectros como mencionado a seguir. Carboxilas: 134,5 – 135,5 ppm, OH em unidade *p*-hidroxifenila: 137,4 - 138 ppm, OH em unidade guaiacila eterificada: 138,2 – 140,4 ppm, OH em unidade guaiacila condensada: 140,5 – 144,5 ppm; colesterol: 144,7 - 145 ppm e hidroxilas alifáticas: 146 – 149,2 ppm.

4.4.7 Determinação de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS) e reações de peroxidação de ácido linoleico *in vitro*

Os cavacos de madeira biotratada foram inicialmente lavados com água na proporção de 6 mL/g. A lavagem foi feita sob agitação de 120 rpm por 24 horas a 10°C. A água de extração teve seu pH previamente ajustado em 7,0. Na madeira lavada foi determinada a concentração de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS). A determinação de TBARS foi realizada de acordo com Enoki et al., (1999), com algumas adaptações. Porções de 5 g de cavacos foram novamente lavadas 5 vezes com 60 mL de água destilada por 1 hora a 120 rpm a 25 °C. Após secagem dos cavacos ao ar, estes foram extraídos com 60 mL de clorofórmio/metanol (2:1) durante 1 hora a 120 rpm a 25 °C. Em seguida, as amostras foram concentradas em evaporador rotativo e avolumadas a 200 µL. A este volume foram adicionados 3 mL de solução 0,335% (m/v) de ácido tiobarbitúrico em 10% (m/v) de ácido tricloroacético. A mistura foi mantida por 15 min em banho-maria sob ebulição. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2000 G a 10 °C por 15 min e o sobrenadante analisado num espectrofotometro a 532 nm (coeficiente de absorção molar =156.000 M⁻¹. cm⁻¹). As concentrações foram reportadas como µg de TBARS por kg de madeira (base seca) (Vicentim e Ferraz, 2008).

A avaliação da peroxidação de ácido linoleico *in vitro* foi feita a partir de reações conduzidas numa cela de um oxímetro (Kapich et al., 2005). Em uma cela de reação foram adicionados 870 µL de tampão 50 mM succinato de sódio, pH 4,5 e 250 µL de lactato de sódio 50 mM que foram deixados sob agitação magnética por aproximadamente 5 min a 27°C para saturação com oxigênio. Posteriormente, mantendo a agitação magnética constante, foi adicionado 500 µL de extrato enzimático, 40 µL de solução de MnSO₄ 5 mM e 40 µL de emulsão de ácido linoleico 0,2% em Tween 60 1% (p/v). A cela foi lacrada com o êmbolo superior e através de um tubo capilar foi injetado 4 µL de H₂O₂ 20 mM. O volume final da

reação foi de 1.700 μL . Uma reação controle foi realizada com extrato enzimático tratado em banho sob ebulição por um período de 15 minutos. A taxa inicial de consumo de oxigênio (em $\text{nmol/mL}\cdot\text{min.}$) foi determinada a partir de leituras contínuas proporcionadas pelo eletrodo que mede a concentração de oxigênio dissolvido.

4.4.8 Extração e caracterização das α -celuloses residuais

A α -celulose foi preparada a partir da holocelulose-clorito. Aproximadamente 5 g de madeira moída foram extraídas com etanol 95% por 6 horas em extrator Soxhlet. Para a preparação de holocelulose, 2 g de madeira foram tratados com 64 mL de água destilada, 0,2 mL de ácido acético glacial e 0,6 g de clorito de sódio. A reação foi conduzida a 70-80°C, sendo que a cada uma hora de reação foi realizada nova adição de 0,2 mL de ácido acético e 0,6 g de clorito de sódio. Após 4 horas de reação o frasco foi resfriado em banho de água e gelo e o produto final filtrado em filtro de vidro sinterizado número 2. O resíduo sólido foi lavado com acetona e usado para a preparação da α -celulose que é definida como a fração de holocelulose insolúvel em solução de hidróxido de sódio 17,5%. A α -celulose foi preparada macerando cerca de 1 g de holocelulose com 5 mL de hidróxido de sódio 17,5%, conforme procedimento detalhado por Guerra et al (2003). O resíduo insolúvel dessa etapa foi ainda lavado com 25 mL de hidróxido de sódio 8,3% a 20° C. A α -celulose obtida foi então lavada 5 vezes com porções de 50 mL de água destilada a 20°C. O resíduo sólido foi então lavado com mais 400 mL de água destilada, depois com ácido acético 2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e finalmente água destilada. A α -celulose assim preparada foi seca ao ar e pesada. Uma porção da α -celulose foi utilizada para a determinação de umidade e outra para a determinação da distribuição de massa molar. A quantidade de α -celulose foi expressa em porcentagem da madeira inicial, após correção para o teor de lignina residual.

A distribuição de massas molares da α -celulose foi feita pelo método descrito por Wood et al. (1986). Cerca de 0,2 g de α -celulose (seca ao ar) foram colocados em balão de fundo redondo contendo 50 mL de piridina anidra. A essa mistura foram adicionados 0,4 mL de isocianato de fenila e o balão fechado e mantido em banho termostaticado a 80 °C por 48 horas, com agitação ocasional. Ao final do período de reação, o balão foi removido do banho e 4 mL de metanol foram adicionados para a destruição do excesso de isocianato de fenila. Cerca de 5 mL da solução resultante foram transferidos para um balão de 50 mL e a piridina foi evaporada a 40 °C sob pressão reduzida. O produto assim obtido foi dissolvido em 15 mL de acetona; uma alíquota de 2 mL da solução em acetona foi transferida para um tubo de ensaio e a acetona evaporada por um fluxo de nitrogênio. O material residual foi redissolvido em 10 mL de tetraidrofurano (THF) e essa solução foi analisada por cromatografia de exclusão em um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (Shimadzu, modelo C-R7A), utilizando-se um sistema de 4 colunas com tamanhos de poro de 100, 500, 1000, e 10000 Å (Alltech- GPC polar de 250 mm x 10 mm), acopladas em série, tendo THF, a uma vazão de 1 mL/min, como eluente. O material eluído foi detectado por um detector de UV/visível, ajustado para a leitura em 235 nm. O sistema de colunas foi calibrado com poliestirenos de massa molar conhecida e as massas molares da α -celulose foram determinadas como descrito por Guerra et al (2003).

5 Resultados e discussão

Os resultados apresentados nessa tese estão baseados em uma série de trabalhos abrangendo os aspectos tecnológicos e as bases mecanísticas da biopolpação. Esse tema tem sido abordado de forma sistemática em nosso grupo de pesquisas e envolve desde estudos ligados à tecnologia de produção de biopolpas até a avaliação dos mecanismos químicos e bioquímicos envolvidos no processo de biodegradação da madeira que configura a base do processo de biopolpação.

5.1 Aspectos tecnológicos do processo de biopolpação

5.1.1 Polpação TMP e CTMP de *Eucalyptus grandis* biotratado em uma planta piloto

Cavacos de *E. grandis* biotratados por *Ceriporiopsis subvermispora* em uma pilha de 50 ton foram avaliados em escala industrial frente aos processos de polpação termomecânico (TMP) e quimiotermomecânico (CTMP) (Fig. 9). Os refinadores industriais operaram por um período total de 14 h de forma experimental e produziram polpas com grau de refino entre 450 e 470 mL CSF. No 1º segmento na Figura 9 está ilustrado o consumo de energia para o refino da madeira controle sob o regime de polpação TMP; no 2º segmento está o consumo de energia registrado para a madeira biotratada sob polpação TMP; no 3º segmento para a madeira biotratada sob polpação CTMP e; no quarto segmento para a madeira controle sob polpação CTMP.

O consumo de energia total já computada a produção de polpa no período foi de 913 kWh/ton e 745 kWh/ton para a madeira controle e biotratada sob o regime TMP, o que representa 18% de economia de energia ao se utilizar a madeira biotratada. No caso das polpas CTMP com níveis similares de refino, o consumo de energia foi de 1038 kWh/ton e 756 kWh/ton para madeira controle e biotratada, respectivamente, representando uma economia de energia de 27%.

A redução no consumo de energia durante a polpação TMP e CTMP de madeira biotratada por *C. subvermispora* tem sido amplamente divulgada na literatura (Akthar et al., 1998; Ferraz et al., 2008). No entanto, a maior parte dos resultados obtidos anteriormente é oriunda de processos realizados em escala de laboratório ou com outras espécies de madeira. Os resultados aqui apresentados, obtidos para a polpação em escala industrial, confirmaram que os dados anteriormente descritos para a escala de laboratório também podem ser reproduzidos em grande escala. Isso demonstra que a biopolpação é um processo tecnicamente viável, ou seja, dadas as condições ideais de biotratamento dos cavacos, é possível obter uma economia significativa de energia elétrica durante o refino tanto para a produção de polpas TMP como CTMP de *E. grandis*.

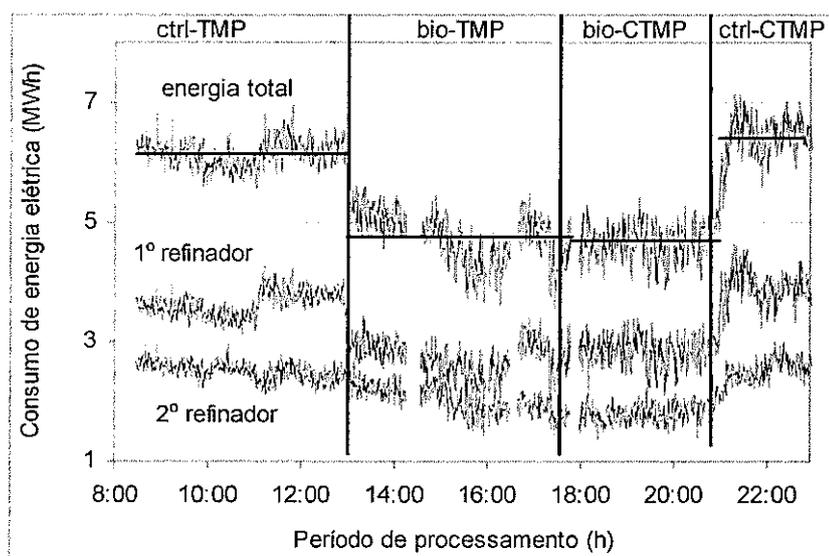


Figura 9. Consumo bruto de energia elétrica durante o desfibramento e refino de madeira de *E. grandis* em diferentes regimes de alimentação. (ctrl-TMP) madeira controle sob regime TMP; (bio-TMP) madeira biotratada sob regime TMP; (bio-CTMP) madeira biotratada sob regime CTMP e; (ctrl-CTMP) madeira controle sob regime CTMP.

Um aspecto que mereceu atenção especial nos ensaios de biopolpação em escala industrial foi a melhoria ou não das propriedades mecânicas das biopolpas produzidas. A Tabela 1 ilustra a resistência ao esforço de tração de folhas teste preparadas a partir de várias

polpas TMP de *E. grandis*. Numa análise inicial, os dados mostram que as polpas TMP controle preparadas em escala de laboratório são muito pouco resistentes quando comparadas com as polpas obtidas em escala industrial. Esse resultado sugere que em escala de laboratório, a madeira controle sofre algum tipo de dano como moagem parcial, em adição ao efeito de desfibramento e fibrilação esperado para os refinadores de disco. Por outro lado, como as madeiras biotratadas sofrem ruptura facilitada ao longo das fibras, elas refinam facilmente mesmo em refinadores de laboratório dando origem a polpas de boa qualidade. Quando o refino é realizado em refinadores industriais otimizados, fibras de boa qualidade são obtidas mesmo a partir da madeira controle. Esses dados analisados em conjunto sugerem que uma área que ainda demanda pesquisa intensiva está relacionada ao desenho de discos refinadores apropriados para obter o máximo benefício das madeiras biotratadas em escala industrial.

Tabela 1. Índices de resistência à tração de polpas de *E. grandis* preparadas em 2 estágios de polpação mecânica (desfibramento e refino) em escala de laboratório e industrial.

Tipos de polpa de <i>E. grandis</i>	Resistência à tração (Nm/g)	Drenabilidade CSF (mL)
TMP/RMP controle preparada em laboratório*	5,2	402
BioTMP/RMP preparada em laboratório*	11,3	390
TMP/RMP controle preparada em escala industrial	12 ± 2	472 ± 31
BioTMP/RMP preparada em escala industrial	11 ± 2	455 ± 26
CTMP controle preparada em escala industrial	16 ± 3	485 ± 16
BioCTMP preparada em escala industrial	16 ± 2	409 ± 23

(*) dados relatados por Scott et al. (2002).

Os ensaios de bipolpação em escala industrial apresentaram resultados promissores quanto a economia de energia no processo. Tomando como base somente a redução no consumo de energia elétrica, foram feitas algumas simulações de benefícios econômicos que poderiam ser obtidos com a implementação do bioprocessamento. A premissa inicial dessa análise

foi de que a economia de energia obtida deveria ser, no mínimo, suficiente para custear os gastos da etapa de biotratamento que inclui a produção do inóculo, o uso de aditivos para o rápido crescimento do fungo (milhocina, por exemplo), a mão-de-obra para construção e manutenção da pilha, as utilidades necessárias na construção e manutenção da pilha (água, vapor, energia elétrica) e, a perda de massa de madeira (aproximadamente 5%).

Na análise que apresentamos a seguir, as principais variáveis consideradas foram a produtividade da planta de polpação, o consumo específico e o custo da energia elétrica usada no refino, e, por fim, a economia esperada com o processo de biopolpação. A produtividade de uma planta industrial de polpação TMP, com opção de funcionamento no regime CTMP, com a configuração usada nos ensaios anteriormente descritos pode ser admitida como sendo de 220 ton/dia. O consumo específico médio de energia elétrica de uma planta industrial com essa configuração (avaliado com base em dados obtidos diretamente na indústria de polpa mecânica em estudo) pode ser assumido como 816 ± 45 kWh/ton.

O preço da energia elétrica a ser considerado pode ser encarado sob dois diferentes aspectos. O primeiro deles é o preço efetivamente pago em contratos que negociam expressiva demanda em longo prazo no mercado livre, conseguindo assim condições mais ou menos vantajosas em função da oferta/demanda existente no período da negociação. Nesse caso, um exemplo de custo de energia praticado no ano de 2007 no mercado nacional era da ordem de R\$ 134,00/MWh. A outra possibilidade para computar o custo da energia elétrica seria considerar o preço normal de mercado apresentado na Tabela 2, que se refere aos dados praticados em Junho de 2007 no Brasil. Nesse contexto, o custo de energia elétrica para uso industrial na região sudeste seria da ordem de R\$ 225,00/MWh.

Tabela 2. Tarifas médias de energia elétrica praticadas e Junho de 2007 para o setor industrial em diferentes regiões do Brasil.

Região do Brasil	Valor da tarifa (R\$/MWh)
Norte	215,88
Nordeste	207,98
Sudeste	224,66
Sul	204,44
Centro-Oeste	220,58

Fonte: Aneel (<http://www.aneel.gov.br/area.cfm?idArea=98&idPerfil=2>)

Na Tabela 3 está mostrado um exemplo de cálculo da redução no custo de produção de polpas mecânicas considerando uma economia de energia de 18% no refino industrial dos cavacos biotratados. Nesse exemplo, a economia no consumo específico de energia elétrica proporcionada pelo biotratamento dos cavacos foi considerada como 18%, pois esse seria um valor plausível de se obter com base nos dados dos ensaios piloto descritos anteriormente.

Tabela 3. Exemplo de cálculo referente ao benefício econômico do uso do processo de biopolpação.

Variável ou Propriedade estimada	Unidade	Energia elétrica ao custo de R\$ 134/MWh	Energia elétrica ao custo de R\$ 225/MWh
Produtividade da planta	tsa/dia	220	220
Consumo específico de energia elétrica	kWh/ton	816	816
Preço da energia elétrica	R\$/MWh	134	225
Economia de energia elétrica = 18%	kWh/ton	$0,18 \cdot 816 = 147$	$0,18 \cdot 816 = 147$
Economia Estimada	R\$/ton	$147 \cdot 134 / 1000 = 19$	$147 \cdot 225 / 1000 = 33$
Economia Estimada	R\$/ano	$19 \cdot 220 \cdot 350 = 1.463.000$	$33 \cdot 220 \cdot 350 = 2.541.000$

Em decorrência das avaliações financeiras apresentados anteriormente, podemos chegar aos valores máximos aceitáveis para o custo operacional do processo de biopolpação. Como já foi mencionado, os custos do processo de biopolpação envolvem desde os gastos com o inóculo fúngico até os custos de processamento e manutenção da pilha de cavacos durante o biotratamento (vapor, energia elétrica e mão de obra). Uma estimativa aproximada para os custos do biotratamento foi descrita por Scott et al. (2002) e indica um valor de US\$ 14,76/ton de polpa produzida, dos quais US\$ 2,00/ton representariam o custo do inóculo e de nutrientes como a milhocina e o restante compreenderiam custos de vapor, energia elétrica e mão-de-obra. Com base nesses dados e num valor do dólar americano de R\$ 1,80/US\$, poderíamos estimar um custo para o processo de biopolpação da ordem de R\$ 26,00/ton de polpa. De fato, o custo da etapa de biotratamento é de difícil estimativa, principalmente porque não há até o momento a produção em escala industrial de inóculo de *C. subvermispora* ou outro fungo de decomposição branca. A obtenção de estimativas de custo para o consumo de vapor, energia elétrica e mão de obra, é factível, porém os dados se limitam a realidade da escala piloto de biotratamento, que certamente seria alterada em função da ampliação de escala do processo para o nível industrial. Nesse sentido, uma abordagem alternativa de avaliação econômica pode ser feita para definir valores limite de custo para a etapa de biotratamento em face dos benefícios oriundos da economia de energia decorrentes do uso de madeira biotratada.

As Figuras 11, a e b, mostram a simulação dos valores de ganho real no processo de biopolpação em função da economia de energia e do custo do bioprocessamento. Essa simulação tomou como base o valor originalmente proposto por Scott et al. (2002) para a etapa de biotratamento, além de variações para mais e para menos nas proporções de 1,5 e 2 vezes.

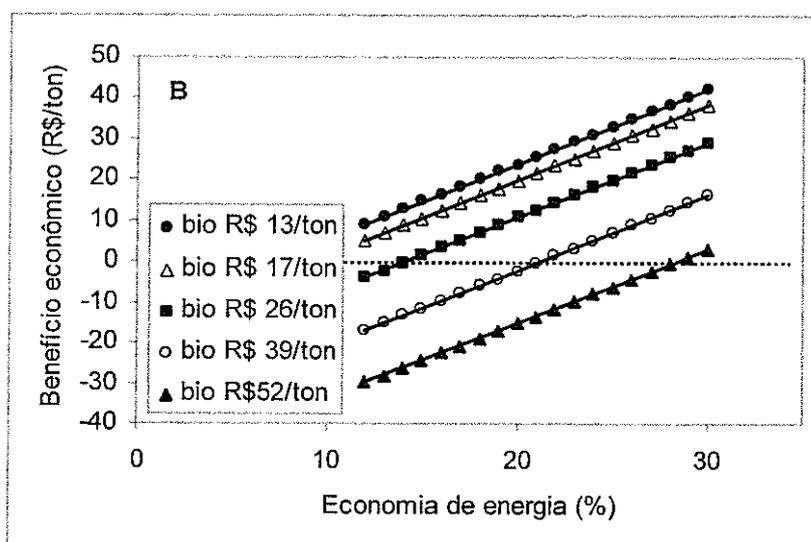
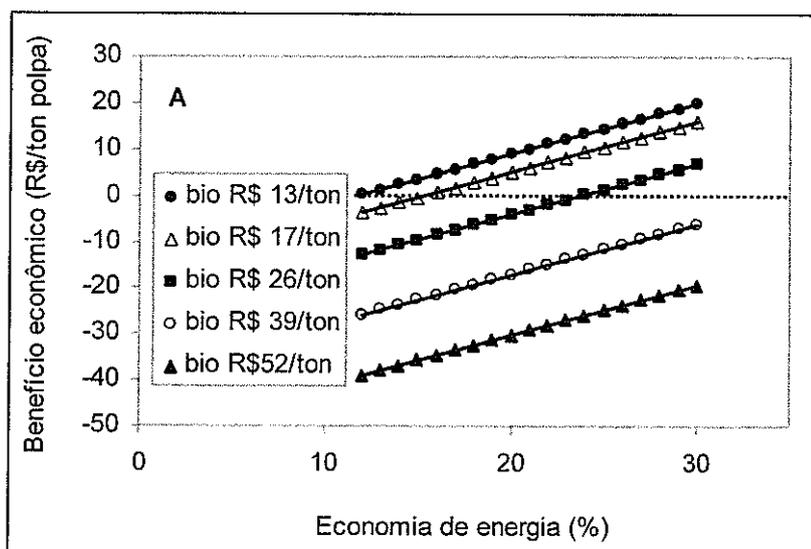


Figura 11. Simulação do benefício econômico devido a aplicação do processo de biopolpação considerando diferentes níveis de economia de energia e custos variáveis para o processo de biotratamento dos cavacos. (A) dados simulados considerando o custo da energia elétrica a R\$ 134,00/MWh; (B) dados simulados considerando o custo da energia elétrica a R\$ 225,00/MWh.

Na Figura 11a, que parte da premissa da tarifa de energia elétrica no valor de R\$ 134,00/MWh, pode-se verificar que os benefícios econômicos da biopolpação passariam a ser obtidos quando a economia de energia devido ao uso de madeira biotratada superasse cerca de 24% quando se considera o custo do biotratamento sugerido por Scott et al. (2002),

ou seja, R\$ 26,00/ton. No cenário que considera a tarifa de energia elétrica como R\$ 225,00/MWh (Figura 11b), os benefícios econômicos oriundos da aplicação da biopolpação já poderiam ser obtidos a partir de cerca de 14% de economia de energia, quando o custo do biotratamento é aquele proposto por Scott et al. (2002). Obviamente, custos menores para a etapa de biotratamento permitiriam que os benefícios fossem obtidos mesmo com níveis menores de economia de energia nos dois cenários avaliados.

O custo da etapa de biotratamento pode variar de acordo com a complexidade do sistema de inoculação e manutenção da pilha de cavacos inoculada. Em termos conceituais, essa etapa do bioprocessamento poderia ser simplificada ao extremo se a inoculação fosse feita diretamente sobre cavacos frescos, não descontaminados com vapor. Nesse caso, o fungo inoculado deveria ser agressivo o suficiente para competir com a biota naturalmente encontrada na madeira e nos pátios de cavaco das indústrias de celulose e papel. O desenvolvimento da planta piloto mencionada anteriormente mostrou que uma limitação do sistema de inoculação com micélio suspenso em água está relacionada com a contaminação das pilhas de cavacos com fungos oportunistas. Esse problema tem se mostrado especialmente grave quando a inoculação inclui o uso de milhocina como co-substrato para o processo de colonização da madeira.

Considerando os problemas de contaminação mencionados anteriormente, alguns estudos foram desenvolvidos com o objetivo de avaliar a capacidade de *C. subvermispora* para competir com fungos naturalmente encontrados na madeira de *E. grandis* ou no ambiente de um pátio de cavacos da indústria de celulose (Masarin et al., 2008; 2009). Os resultados mostraram que cultivos de *C. subvermispora* sobre madeira autoclavadas permanecem livres de contaminantes, como era esperado, e o micélio de *C. subvermispora* rapidamente coloniza os cavacos inoculados. Por outro lado, quando madeira recentemente cortada, mas não autoclavada, foi inoculada com *C. subvermispora*, bolores primários cresceram rapidamente

resultando em culturas fortemente contaminadas, independentemente da carga de inóculo aplicada (5, 50 e 3000 mg de micélio/kg de madeira). Os contaminantes observados pertencem principalmente aos gêneros *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp (Masarin et al., 2009).

A partir de cavacos inoculados com *C. subvermispora*, porém contaminados com fungos indesejáveis foi possível avaliar se as espécies em questão competem por meio de antibiose ou simplesmente por capacidade diferenciada de colonizar o substrato. Isso foi determinado em cultivos suplementados com fungicidas específicos como o benomil (2-benzimidazolecarbamato de 1-metil-1-butilcarbamil, Aldrich) que é ativo contra os bolores primários, porém é inócuo aos basidiomicetos (Masarin et al., 2008). Cavacos contaminados foram inseridos em placas de Petri contendo meio suplementado com benomil e o crescimento fúngico foi observado ao longo de 2 semanas (Figura 12). Foi possível observar que o micélio de *C. subvermispora* volta a crescer nesse meio sugerindo que os fungos envolvidos competem pelas fontes de carbono de fácil assimilação (tanto milhocina como resinas da madeira) e não por antibiose, o que levaria à morte do fungo de decomposição branca. No entanto, na competição pelo substrato, *C. subvermispora* é claramente menos eficiente do que os bolores primários e não consegue colonizar efetivamente o substrato.

Ao longo do desenvolvimento experimental de operação da planta piloto em estudo foi possível demonstrar que uma alternativa aos problemas de contaminação mencionados anteriormente é o uso de cavacos pré-cultivados como inóculo no lugar de micélio mais milhocina. Esse tipo de inoculação tem sido usado em nossos estudos em escala piloto e permitiu a obtenção de economias significativas de energia conforme anteriormente mencionado. Com esse tipo de inoculação, até mesmo cavacos frescos não descontaminados podem ser efetivamente colonizados por *C. subvermispora*. Em virtude do avanço incremental obtido na tecnologia de biopolpação decorrente desse tipo de inoculação, apresentamos

recentemente um pedido de patente frente ao INPI visando proteger os processos industriais que permitem a aplicação dessa via de inoculação (pedido depositado em 20/03/2008).

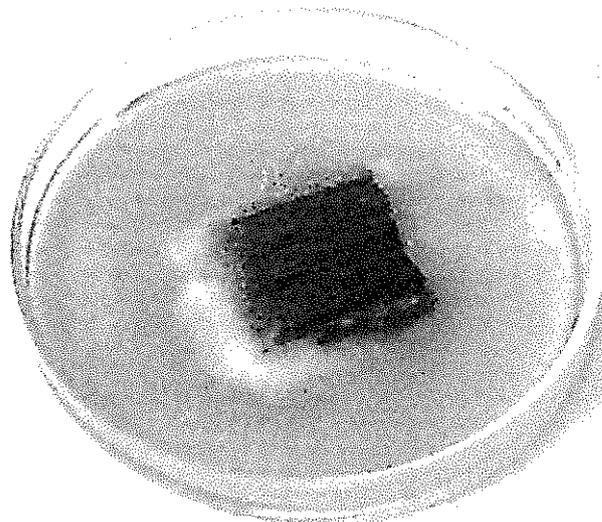


Figura 12. Placa de Petri cultivada por 7 dias contendo meio batata-dextrose/extrato de levedura, 4 mg.L^{-1} de benomil e um cavaco de *E. grandis* proveniente de um cultivo (28 dias) contaminado que recebeu inóculo de *C. subvermispora* na carga de 500 mg de micélio/kg de madeira. O micélio branco crescendo a partir do cavaco apresenta as características típicas de *C. subvermispora*.

5.1.2 Branqueabilidade e estabilidade de alvura em biopolpas TMP preparadas em escala industrial

As polpas bio-TMP produzidas em escala industrial apresentaram menor alvura do que as polpas TMP controle: 44% na biopolpa contra 60% na polpa TMP controle. Sykes (1993), usando madeira de Aspen e biotratamento com *Phanerochaete chrysosporium* seguido de polpação mecânica por refinamento (RMP) também observaram o mesmo efeito de escurecimento das biopolpas. Entretanto, as causas desse escurecimento ainda não estão completamente elucidadas. No caso das polpas TMP de *E. grandis*, avaliamos a branqueabilidade em um processo tradicional de branqueamento com peróxido de hidrogênio (Fig. 13) (Guerra et al., 2006). É bastante interessante notar que quando as polpas bio-TMP

foram submetidas ao branqueamento, a reação controle, na qual uma polpa pré-tratada com DTPA foi impregnada com solução alcalina a pH 11 e depois lavada com água, houve um aumento na alvura de 44% para 55 %. Por outro lado, o mesmo tratamento não causou aumento significativo de alvura na polpa controle. Este resultado indica que uma fração importante dos cromóforos contidos nas biopolpas pode ser facilmente removida com uma etapa de lavagem alcalina. Durante o branqueamento com peróxido de hidrogênio, a polpa bio-TMP sofreu um aumento de alvura mais pronunciado do que a polpa controle nas cargas baixas de peróxido (Fig. 13). Entretanto, a alvura final da biopolpa foi sempre levemente inferior à alvura da polpa controle. Por exemplo, para um branqueamento de laboratório de um único estágio com 5% de peróxido de hidrogênio, a alvura final obtida foi de 70% e 72% para as polpas bio-TMP e TMP controle, respectivamente. Cargas mais elevadas de peróxido de hidrogênio tiveram um efeito pouco efetivo para aumentar a alvura final das polpas (Fig. 13).

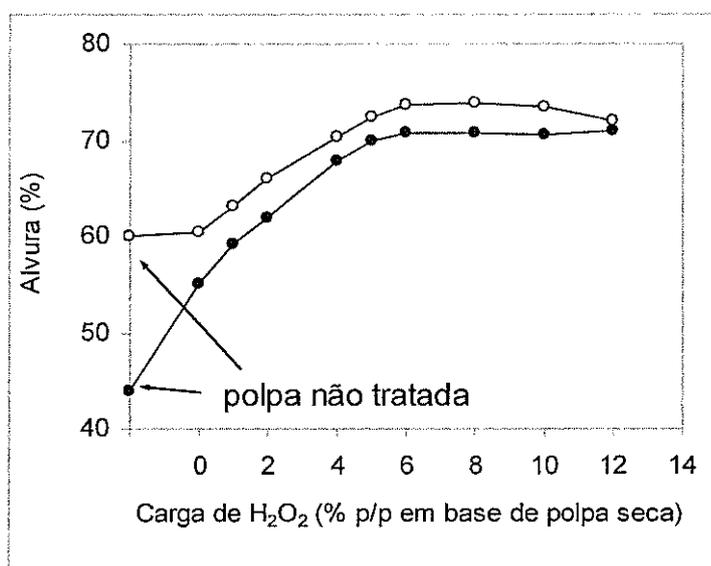


Figura 13. Branqueamento com peróxido de hidrogênio de polpas TMP de *E. grandis*. (○) polpa TMP controle; (●) polpa bio-TMP.

Ensaio de foto-reversão da alvura aplicados às polpas TMP em estudo mostraram que as polpas bio-TMP foram mais estáveis durante as primeiras horas de foto-reversão quando comparadas com as polpas controle (Fig. 14). Por exemplo, polpas bio-TMP com 63% de alvura inicial perderam 18 pontos de alvura após 1 hora de foto-reversão, enquanto as polpas TMP controle com a mesma alvura inicial perderam 24 pontos no mesmo período. Entretanto, uma foto-reversão prolongada resultou em níveis similares de alvura final nas duas polpas.

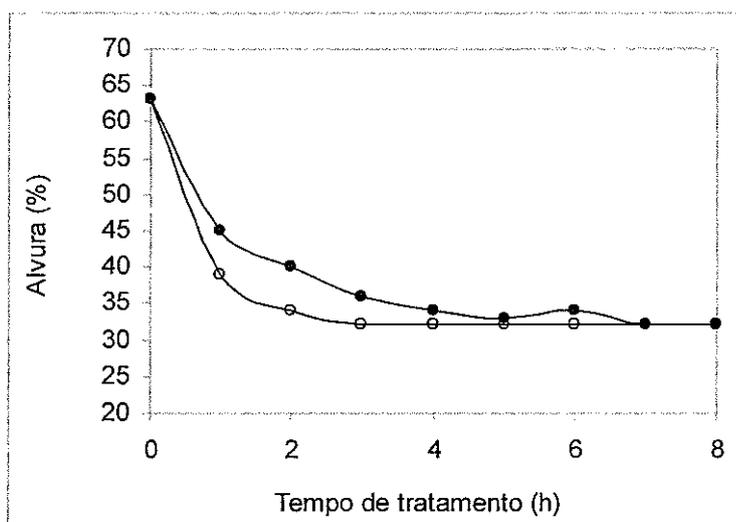


Figura 14. Reversão de alvura induzida pela exposição à luz de polpas TMP de *E. grandis* branqueadas com peróxido de hidrogênio. (o) polpa TMP controle; (●) polpa bio-TMP.

Gráficos que relacionam o escurecimento de polpas com vários níveis de alvura inicial em função da alvura final após um determinado tempo de foto-tratamento permitem uma visão mais ampla sobre a estabilidade de alvura dessas polpas (Fig. 15). Com base nesses gráficos fica claro que as polpas bio-TMP e TMP controle foram muito similares quanto a foto-reversão de alvura.

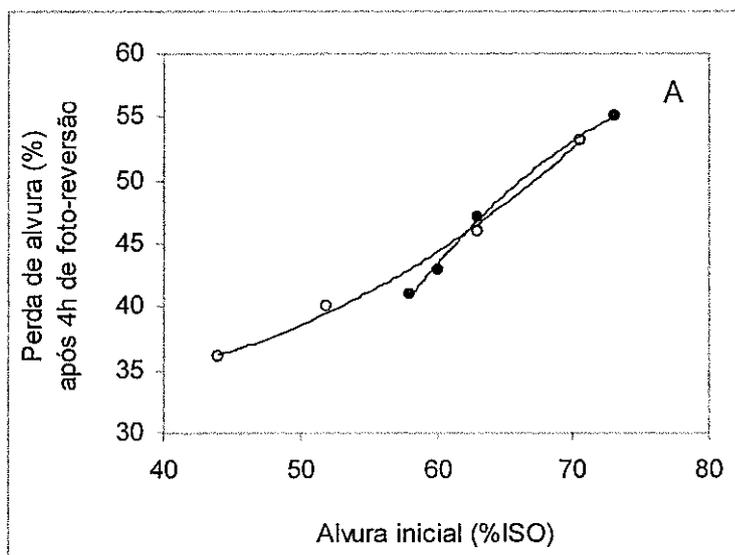


Figura 15. Foto-reversão de alvura em polpas TMP de *E. grandis* em função de níveis variados de alvura inicial. (o) polpa TMP controle; (●) polpa bio-TMP.

5.1.3. Polpação quimiomecânica em escala de laboratório de cavacos de *E. grandis* biotratados por *C. subvermispora*

Os processos de polpação mecânica, termomecânica e quimiotermomecânica são utilizados industrialmente e se baseiam no emprego de refinadores de disco de grande porte que operam com consistências normalmente elevadas (até 30% de massa de madeira/volume de água) (Biermann, 1993). Esse processo é de difícil simulação em pequena escala devido à escassez de refinadores de laboratório com capacidade de simular as condições industriais. Uma abordagem factível em escala de laboratório é a mimetização de condições experimentais que permitam desfibrar e refinar cavacos de madeira com equipamentos usualmente empregados na caracterização de fibras oriundas de polpas kraft (livres de lignina). Nesse sentido, desenvolvemos um processo de polpação CTMP em laboratório para avaliar a resposta diferenciada de madeiras biotratadas sob diferentes condições de cultivo frente ao processo de polpação (Vicentim e Ferraz, 2008). Os cavacos passaram por um pré-tratamento com sulfito alcalino sob alta temperatura (120°C) e em seguida foram desfibrados e refinados mecanicamente. O pré-tratamento químico promove a sulfonação e uma dissolução parcial da

lignina, além de remover parte expressiva dos extrativos e de pequena fração de hemicelulose, tornando a madeira mais susceptível ao desfibramento. Com base nesse procedimento, um conjunto de cavacos foi processado e avaliado quanto aos efeitos da biodegradação sobre a produção das polpas CTMP. Após a etapa de digestão em sulfito alcalino e desfibramento mecânico, o material desfibrado foi submetido a uma etapa de refino em refinador Jokro. O rendimento da etapa química e o teor de rejeitos (palitos) determinado após as etapas de desfibramento estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Rendimento da etapa química e teor de palitos na polpação CTMP de *E. grandis* em escala de laboratório.

Amostra	Rendimento (%)	Rejeitos 1 ^a (%)	Rejeitos 2 ^b (%)
Controle	88	41	2,5
Biotratada em meio contendo milhocina	90	22	2,8

^a Quantidade de palitos após a etapa de desfibramento em liquidificador;

^b Quantidade de palitos residuais após o desfibramento da fração "rejeitos 1" em moinho Jokro.

O rendimento de polpação, avaliado após a etapa de cozimento em sulfito alcalino, foi praticamente igual nas duas amostras estudadas (88 a 90%). Já o teor de palitos obtidos após a primeira etapa de desfibramento diminuiu significativamente quando cavacos biotratados foram utilizados. Os rejeitos da primeira etapa de desfibramento em liquidificador foram submetidos a uma segunda etapa de desfibramento, realizada em moinho Jokro, com adição de licor sulfito alcalino. Essa etapa adicional praticamente transformou todos os aglomerados (palitos) em fibras livres, já que o teor de rejeitos dessa segunda etapa foi inferior a 3%. As fibras classificadas de ambas as etapas de desfibramento foram combinadas e refinadas por intervalos de tempo entre 30 e 90 minutos. A Figura 16 mostra a curva de drenabilidade em

função do tempo de refinamento. Nota-se claramente que as amostras biotratadas fibrilaram mais rapidamente do que a controle. Por exemplo, para a produção de polpa com 23 °SR a amostra controle necessitou de 90 minutos de processamento, enquanto a amostra biotratada já apresentava o mesmo grau de refino aos 70 min de tratamento no refinador Jokro.

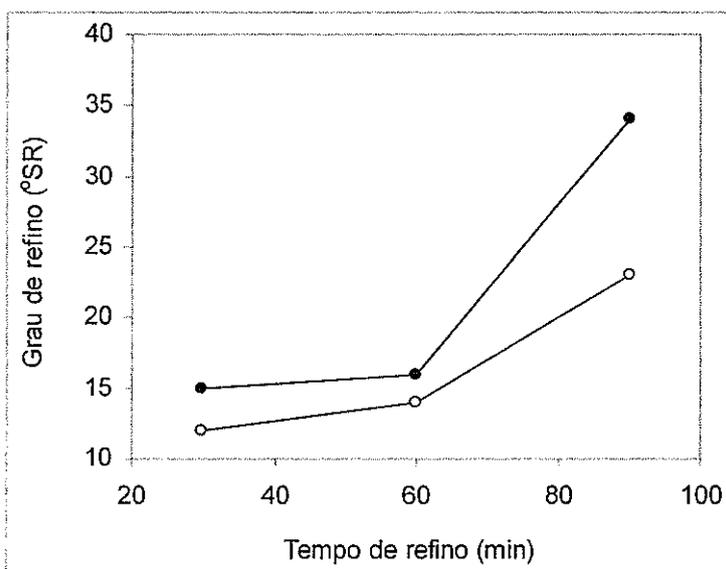


Figura 16. Perfil de refinamento em laboratório de polpas CTMP de *E. grandis*. (○) polpa CTMP controle; (●) polpa bio-CTMP.

As polpas refinadas foram ainda avaliadas quanto à resistência à tração e ao rasgo, além de uma avaliação da distribuição do tamanho de fibras. O comprimento médio das fibras de polpas CTMP obtidas em escala de laboratório a partir da madeira controle (Fig. 17) foi de magnitude similar ao reportado para várias espécies de eucalipto (Mardones et al. 2006). Além disso, a distribuição do tamanho de fibras se manteve praticamente inalterada ao longo das etapas de refino avaliadas. Por exemplo, as polpas de madeira controle apresentaram um comprimento médio (em número) das fibras de 606 μ m e 623 μ m para as polpas refinadas por 30 e 90 min, respectivamente. A Figura 17 ilustra a distribuição de tamanho de fibras para a polpa refinada por 90 min. A biopolpa em estudo apresentou essencialmente o mesmo comportamento quanto a distribuição do tamanho de fibras.

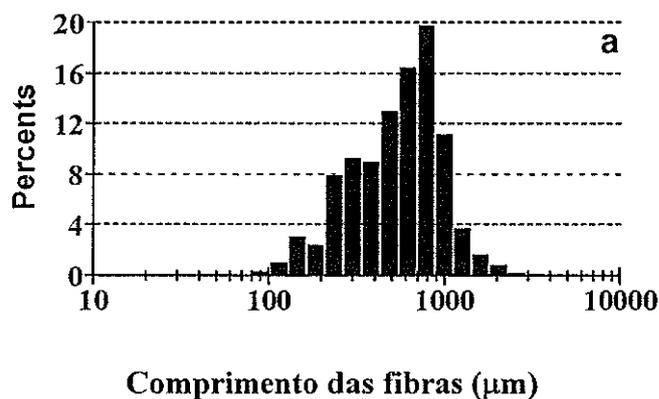


Figura 17. Distribuição do comprimento das fibras de polpa CTMP de *E. grandis* refinada por 90 min.

A evolução da resistência à tração e ao rasgo das polpas em estudo está mostrada nas Figuras 18 e 19. Como era esperado para polpas mecânicas, a resistência à tração aumenta durante o refino, enquanto a resistência ao rasgo apresenta um comportamento oposto. Na amostra controle, a resistência à tração foi diretamente proporcional ao nível de fibrilação. Por outro lado, a biopolpa mostrou um aumento intenso na resistência à tração mesmo com pequenos incrementos no nível de fibrilação (dados na faixa de 13 a 18 °SR). Uma comparação dos índices de resistência à tração das polpas em função dos tempos de refino mostra que as biopolpas atingem maiores valores de resistência à tração em tempos mais curtos de refino. Em outras palavras, pode-se supor que uma menor energia de refino seria necessária para se obter um determinado nível de resistência à tração (Fig. 18b). Os índices de resistência ao rasgo dessas polpas estão mostrados na Figura 19. Pode-se notar que as biopolpas apresentaram resistências ao rasgo levemente maiores do que as observadas nas polpas controle. Uma forma frequentemente usada para comparar qualidade mecânica de polpas celulósicas é avaliar simultaneamente as resistências à tração e ao rasgo, como ilustrado na Figura 20 para as polpas em questão.

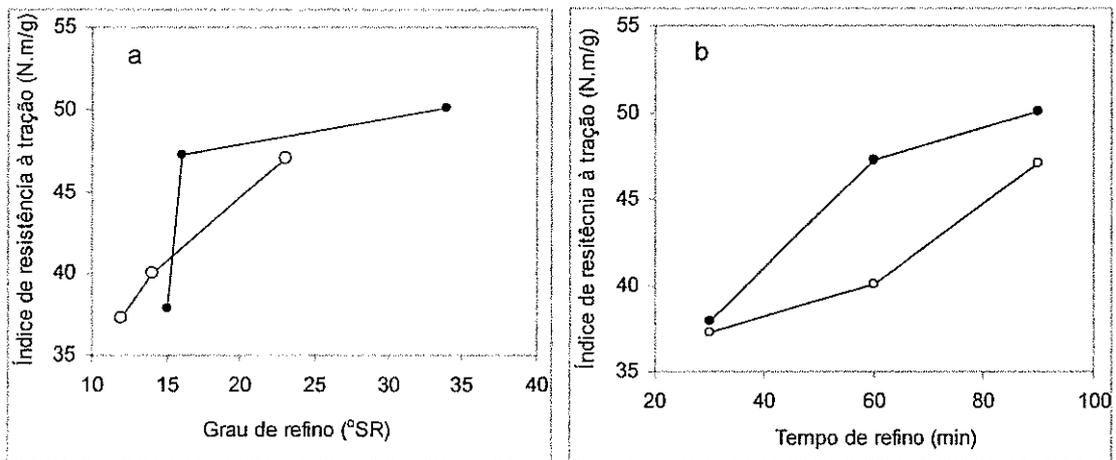


Figura 18. Resistência à tração de polpas CTMP de *E. grandis*. (a) resistência em função do grau de fibrilação e (b) em função do tempo de refino. (o) polpa CTMP controle; (●) polpa bio-CTMP.

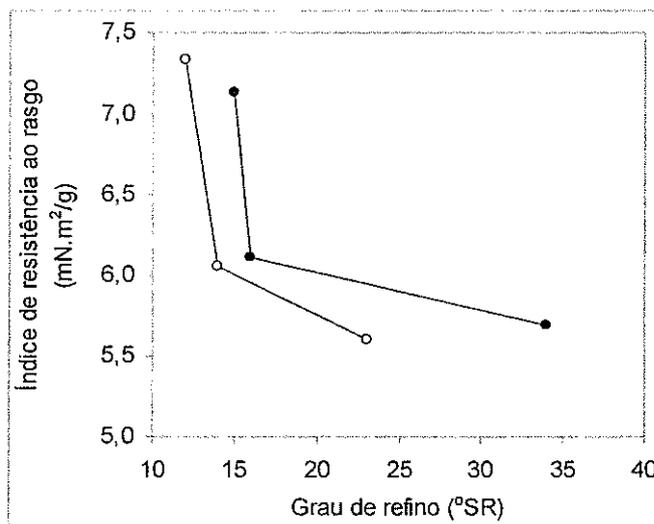


Figura 19. Índice de resistência ao rasgo de polpas CTMP de *E. grandis*. (o) polpa CTMP controle; (●) polpa bio-CTMP.

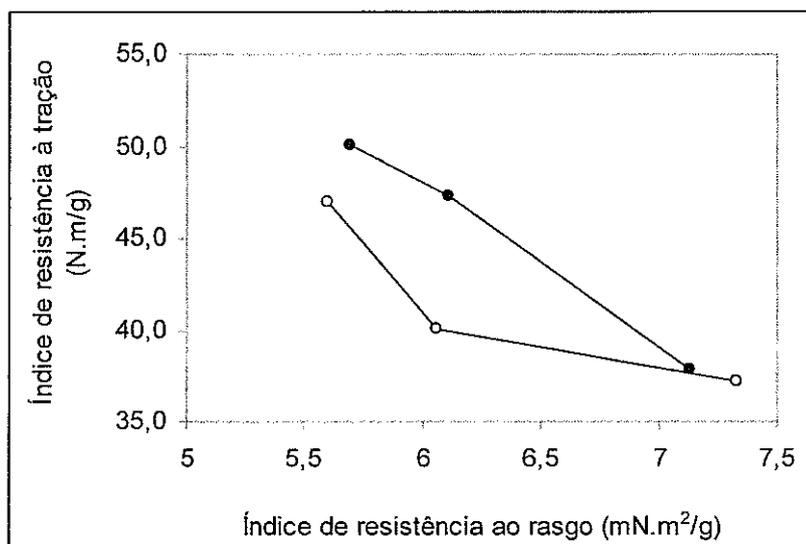


Figura 20. Contraposição dos índices de resistência ao rasgo e à tração de polpas CTMP de *E. grandis*. (o) polpa CTMP controle; (●) polpa bio-CTMP.

A contraposição dos dados aqui apresentados com alguns estudos anteriormente descritos na literatura leva a conclusões importantes. Em geral, nos processos de polpação RMP desenvolvidos em laboratório (Leatham et al. 1990; Akhtar et al. 1993; Akhtar et al., 1998), as amostras de madeira biotratada permitiram melhorias significativas das propriedades mecânicas, além de proporcionar economia de energia durante o desfibramento e refino. No caso específico da biopolpação de *E. grandis*, um estudo desenhado para avaliar a polpação TMP/RMP (2 estágios subsequentes) de cavacos biotratados por *C. subvermispora* em um cultivo suplementado com milhocina foi observado uma economia de energia de 17% quando as amostras biotratadas foram usadas para preparar polpas com 32 °SR (Scott et al. 2002). Essas biopolpas apresentaram índices de resistência à tração e ao rasgo 2 vezes maiores do que os observados nas polpas de madeira controle. Por outro lado, os dados referentes à polpação CTMP de *E. grandis* biotratado por *C. subvermispora* aqui apresentados indicam que não houve uma melhora tão expressiva na resistência das biopolpas como tem sido reportado para os processos TMP e RMP. Essa observação sugere que o uso de sulfito alcalino no processo de polpação diminui o nível de benefício oriundo do biotratamento dos

cavacos, o que faz sentido, visto que as polpas CTMP são, em geral, naturalmente mais resistentes do que as polpas TMP e RMP (Bierman, 1993). A mesma observação ganha respaldo quando se avalia as propriedades mecânicas de biopolpas obtidas a partir do processo kraft que tem no processo de deslignificação química o maior responsável pelo colapso do sistema fibrilar da madeira. Nesse caso, o biotratamento dos cavacos com *C. subvermispora* praticamente não altera as propriedades mecânicas das polpas obtidas (Bajpai et al. 2001; Kang et al. 2003; Mardones et al. 2006).

5.2 Mecanismos de biodegradação da madeira que explicam os benefícios obtidos no processo de biopolpação

Apesar da tecnologia da biopolpação ter sido avaliada em escala industrial, conforme discussão anterior, as bases químicas e bioquímicas do processo ainda não são completamente conhecidas. Em geral, os benefícios do pré-tratamento da madeira com fungos de decomposição branca são obtidos já nos estágios iniciais de biodegradação, quando as perdas de massa da madeira ainda não ultrapassaram 5% (Akhtar et al., 1998; Ferraz et al. 2008). Com biotratamentos tão curtos quanto uma semana, os cavacos de madeira biotratada já se apresentam mais frágeis e podem ser rompidos facilmente no sentido das fibras (Hunt et al., 2004). Esse efeito de amolecimento foi, de fato, a base para as propostas iniciais do processo de biopolpação (Akhtar et al., 1998).

Apesar de intensa atividade de pesquisa nessa área nos últimos 15 anos, muitas questões sobre os fundamentos moleculares da biopolpação ainda permanecem sem resposta. Entre essas questões podemos listar as que seguem: Quais são as modificações químicas sofridas pela madeira que explicariam o efeito de amolecimento anteriormente mencionado? Quais são os agentes bioquímicos envolvidos? Existiria um único fator responsável pelos benefícios da biopolpação?

Considerando as alterações químicas sofridas pela madeira durante o biotratamento, os estudos recentes têm apontado para dois diferentes tipos de transformação. Um deles, discutido em maiores detalhes a seguir, envolve uma intensa despolimerização da lignina mesmo em tempos curtos de biotratamento (Guerra et al., 2002; 2003; 2004; Vicentim e Ferraz, 2007). O outro indica que ocorre a formação de novos grupos carboxílicos na madeira biotratada, quer por esterificação de uma das carboxilas do ácido oxálico produzido pelo fungo ou pela oxidação das cadeias laterais da lignina (Hunt et al., 2004). A formação desses novos grupos carboxílicos resulta no aumento no ponto de saturação das fibras com água, o que facilitaria o desfibramento em refinadores de discos. Os dois tipos de biotransformação poderiam afetar a intensidade de interação fibra-fibra e, conseqüentemente, diminuir a resistência física da madeira. Obviamente, estas modificações na estrutura dos componentes da madeira não são efeitos isolados e a alteração geral da estrutura e ultra-estrutura da madeira devem afetar o comportamento do material biotratado frente aos processos posteriores de polpação.

Um fato que requer atenção especial é que não há uma correlação direta entre a extensão da perda de componentes da madeira com os benefícios da biopolpação. Por exemplo, a extensão da remoção de lignina durante o pré-tratamento fúngico não está correlacionada com a economia de energia no processo de polpação bio-mecânica (Leathan et al., 1990; Hunt et al., 2004) ou com o aumento na velocidade de deslignificação observado em processos de polpação química como o organosolv (Ferraz et al., 2000) ou o kraft (Mendonça et al., 2002).

Cabe ainda mencionar que as mudanças induzidas na madeira que proporcionam os benefícios para a polpação mecânica, não são necessariamente as mesmas que as requeridas para a polpação química. Por exemplo, apesar de a esterificação de oxalato às fibras e a oxidação das cadeias laterais da lignina correlacionarem com os benefícios observados na

polpação biomecânica (Hunt et al., 2004), essas transformações não devem proporcionar benefícios à polpação kraft, uma vez que tanto os ésteres de ácido oxálico quanto os novos grupos carboxílicos irão consumir parte do alcali ativo usado no processo de polpação.

Em outra frente de pesquisa, alguns trabalhos mostram que algumas bandas de espectros de madeira na região do infravermelho próximo (NIR) são fortemente afetadas desde estágios de biodegradação tão curtos quanto 4 dias (Schwanninger et al., 2004). Estas modificações nas bandas de NIR indicam que mudanças estruturais importantes ocorrem na madeira já nos estágios iniciais de biodegradação. Mais relevante ainda é que essas bandas NIR podem refletir não somente mudanças em ligações covalentes, mas também mudanças em interações fibra-fibra, tais como as pontes de hidrogênio. É possível que mudanças mínimas nas pontes de hidrogênio entre as superfícies das fibras sejam responsáveis pelo efeito de amolecimento observado durante o biotratamento por fungos de decomposição branca que facilitariam a ruptura da madeira ao longo das fibras em refinadores de discos.

Todas essas observações experimentais enfatizam que as transformações da madeira ocorridas durante a biodegradação necessitam ser exploradas se nós desejamos obter uma compreensão efetiva da química envolvida no processo de biopolpação. Dentro desse tema de intensa pesquisa em vários países do mundo, temos desenvolvido uma série de estudos que visam estabelecer quais são as modificações químicas induzidas nos componentes da madeira por uma das espécies de fungo mais usadas nos processos de biopolpação, *C. subvermispora*. Todos esses estudos têm se caracterizado por avaliar a degradação de cada componente em ensaios realizados diretamente sobre a madeira em condições que simulam a biopolpação. Por outro lado, estudos *in vitro* envolvendo a degradação de compostos modelo reportados na literatura têm sido fundamentais para o estabelecimento dos mecanismos que poderiam explicar a degradação dos componentes da madeira. Parte desses estudos é abordada a seguir, com ênfase para a ação de *C. subvermispora* sobre os componentes da madeira.

5.2.1 Degradação de lignina

A lignina residual presente na madeira de *P. taeda* biotratada por *C. subvermispora* foi inicialmente caracterizada por técnicas de análise *in situ* (Guerra et al., 2002). A madeira biotratada foi analisada por oxidação com óxido de cobre e por derivatização seguida de clivagem redutiva (DFRC), que é um método seletivo para a ruptura de ligações aril-éter na lignina (Lu e Ralph, 1997). No caso das reações de DFRC, os principais monômeros gerados foram o *cis*- e o *trans*-acetato de 4-acetoxicinamila, como ilustra a Figura 21. O rendimento de monômeros na reação DFRC diminuiu significativamente já nos estágios iniciais de biodegradação (27% e 53% após 15 e 30 dias, respectivamente) enquanto que a perda de massa e de lignina atingiu, respectivamente, somente 2,3% e 3%, e 9,6% e 10,9%, para os mesmos períodos de biodegradação (Tab. 5). Os principais monômeros da oxidação com óxido de cobre foram, vanilina, acetoguaiacona, ácido vanílico e ácido *p*-hidroxibenzoico (Tab. 6). O rendimento de vanilina decresceu de 9,5% na madeira controle para 8,1% e 5,6% nas amostras biotratadas por 60 e 90 dias, respectivamente. Essa perda de rendimento em vanilina deve refletir um acúmulo de ligações em estruturas condensadas da lignina ou mesmo a reações de biodegradação que levaram a abertura dos anéis aromáticos da lignina. Os dados mencionados, avaliados em conjunto, indicaram que houve uma extensiva despolimerização da lignina em tempos curtos de biodegradação, mesmo antes de uma mineralização efetiva (perda de lignina) ter ocorrido nos cultivos.

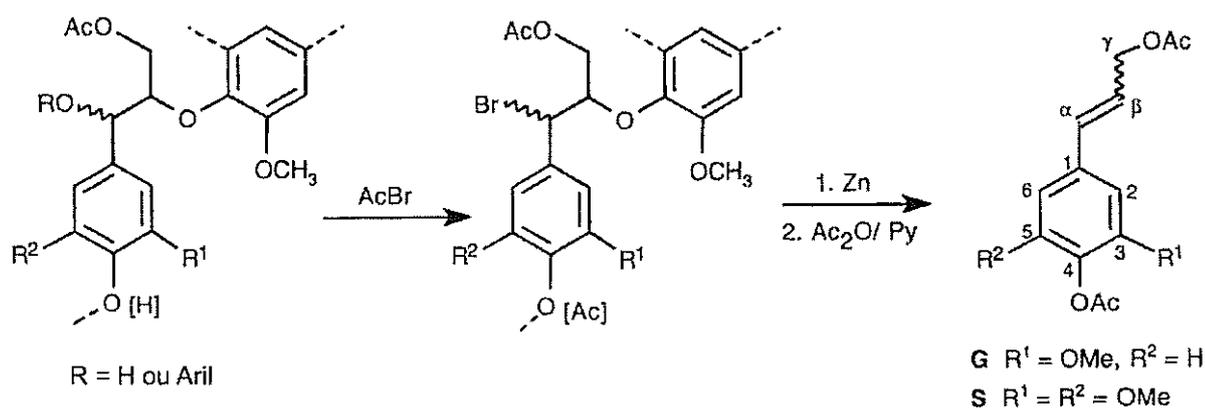


Figura 21. Reações da lignina durante a derivatização com brometo de acetila seguida de clivagem redutiva com Zn e acetilação com anidrido acético (DFRC). Nota-se que as ligações éter (β -O-4) são clivadas gerando “monômeros” de diacetato de coniferila (G) e de sinapila (S) que podem ser quantificados por cromatografia gasosa (reproduzido com modificações de Lu e Ralph, 1997).

Tabela 5. Rendimento de monômeros recuperados após a reação de DFRC aplicada à madeira de *P. taeda* degradada por *C. subvermispota*.

Tempo de biotratamento (dias)	Perda de massa (%)	Perda de lignina (%)	Teor de lignina (%)	Rendimento de monômeros após reação de DFRC (% g/100g de lignina)
0	0	0	28,2 ± 0,4	26 ± 3
15	2,2 ± 0,5	9,6 ± 0,6	26,1 ± 0,6	21 ± 2
30	3,0 ± 0,4	10,7 ± 0,3	25,9 ± 0,1	13,8 ± 0,6
60	9 ± 2	16,6 ± 0,1	25,8 ± 0,5	15,6 ± 0,8
90	12,8 ± 0,7	21 ± 1	25,8 ± 0,3	14,6 ± 0,7

Tabela 6. Rendimento de monômeros derivados da lignina após reação de oxidação com CuO aplicada à madeira de *P. taeda* degradada por *C. subvermispora*.

Tempo de biotratamento (dias)	Rendimento (% g/100 g de lignina)				
	Total	Vanilina	Acetoguaiacona	Ácido Vanílico	Ácido p-Hidroxibenzoico
0	36 ± 1	9,5 ± 0,6	2,1 ± 0,4	2,8 ± 0,4	0,8 ± 0,1
15	37 ± 2	9,3 ± 0,6	2,4 ± 0,4	2,1 ± 0,5	1,0 ± 0,1
30	35 ± 2	8,9 ± 0,8	2,0 ± 0,1	2,4 ± 0,2	0,8 ± 0,3
60	35 ± 1	8,1 ± 0,6	2,0 ± 0,1	2,8 ± 0,5	0,8 ± 0,1
90	44 ± 1	5,6 ± 0,3	2,1 ± 0,1	3,6 ± 0,3	0,9 ± 0,1

Estudos posteriores foram realizados a partir das ligninas de madeira moída (LMM) extraídas das mesmas amostras de madeira biotratada mencionadas anteriormente (Guerra et al., 2003; 2004). Estudos de cromatografia de exclusão das LMMs confirmaram que a despolimerização de lignina foi intensa nos estágios iniciais de biodegradação como mostrado nas Figura 22 e Tabela 7.

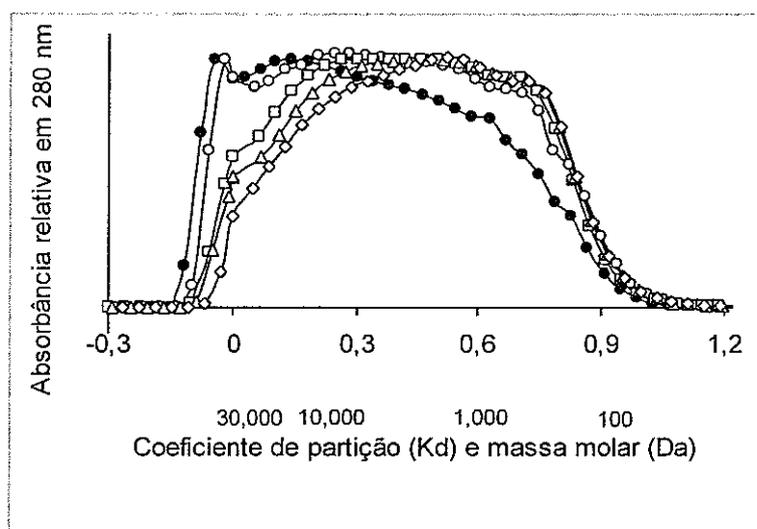


Figura 22. Cromatografia de exclusão de amostras de LMM isoladas de *P. taeda* biotratado por *C. subvermispora*. (●) madeira controle; (○), (□), (Δ) e (◇) madeira biotratada por 15, 30, 60 e 90 dias respectivamente.

Tabela 7. Massa molar média em massa (Mw), massa molar média em número (Mn), polidispersibilidade (D) e frações excluídas pela coluna de permeação em gel de amostras de ligninas isoladas de *P. taeda* biotratado por *C. subvermispora*.

Tempo de biotratamento (dias)	Mw (Da)	Mn (Da)	D	Fração excluída pela coluna (%)
Controle	7.790	989	7,9	11,0
15	6.330	746	8,5	9,4
30	5.300	743	7,1	5,3
60	5.245	743	7,0	4,0
90	5.147	770	6,7	4,0

As mesmas ligninas foram ainda caracterizadas por métodos de análise por via úmida e por técnicas espectroscópicas. O tratamento dessas ligninas por DFRC tornou possível diagnosticar, além dos monômeros de DFRC, também os produtos diméricos (ilustrados na Figura 23) que são diagnósticos da ocorrência de ligações do tipo β - β , β -5, β -1 e 4-O-5 na estrutura da lignina. A quantificação desses produtos de DFRC indicou novamente uma clivagem significativa de ligações β -O-4 enquanto que as ligações β - β , β -5, β -1 e 4-O-5 foram mais resistentes ao ataque biológico (Fig. 24). A quantidade de hidroxilas aromáticas nessas ligninas, estimada por RMN-¹H (Tab. 8), não aumentou (de fato, apresentou leve diminuição) simultaneamente ao desaparecimento das ligações β -O-4 o que sugere que os produtos da clivagem β -O-4 permaneceram na forma de quinonas como foi evidenciado pelo aumento da absorvidade em 420 nm das ligninas oriundas das madeiras biodegradadas (Tab. 9).

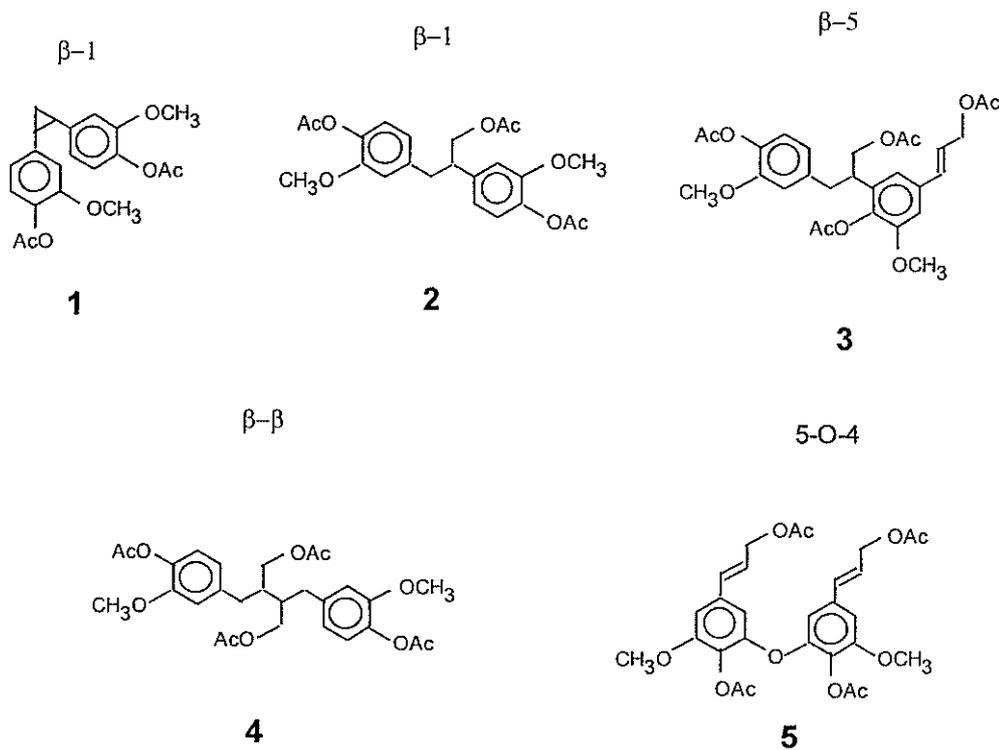


Figura 23. Estruturas diméricas geradas durante a degradação de lignina isolada de *P. taeda* submetida a reações de DFRC. As denominações mostradas acima de cada estrutura representam as subestruturas originais na lignina.

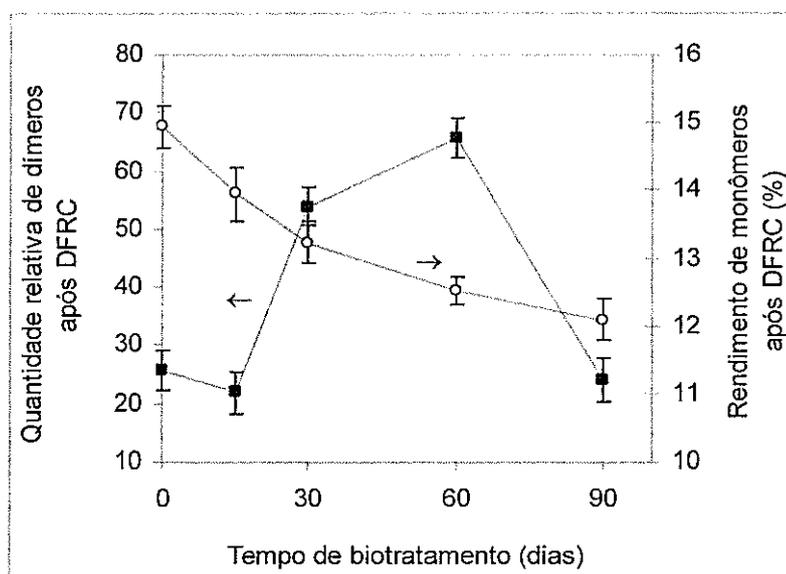


Figura 24. Rendimento total de dímeros e monômeros após reação DFRC de ligninas isoladas de *P. taeda* biotratado por *C. subvermispora*.

Tabela 8. Dados obtidos a partir de espectros RMN-¹H de ligninas isoladas de *P. taeda* biotratado por *C. subvermispota*. Os valores estão expressos como número de prótons por unidade C₉ da lignina e derivam de espectros originais obtidos a partir de ligninas acetiladas.

Deslocamento químico (ppm)	Grupo funcional	Número de H/C ₉ para amostras biotratadas por vários períodos (dias)				
		Controle	15	30	60	90
6,2 – 7,9	H aromático	2,4	2,2	2,1	2,2	2,2
4,5 – 5,2	H β em unidades β -O-4	1,2	1,0	0,7	0,8	0,8
3,5 – 3,9	H em grupos metoxila*	2,7	2,5	2,7	2,5	2,5
2,2 – 2,5	H fenólicos	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2
1,5 – 2,2	H em hidroxilas alifáticas	1,6	1,1	1,1	1,0	1,0
0,0 – 1,5	H em carbonos saturados e não oxigenados	0,6	0,9	1,1	1,2	1,3

* O teor de grupos metoxila determinado por via úmida apresentaram dados na faixa de 0,9 - 1,0/C₉, correspondendo a 2,7 - 3,0 prótons/C₉.

Tabela 9. Absortividades na região do UV/visível de amostras de ligninas isoladas de *P. taeda* biotratado por *C. subvermispota*.

Tempo de biodegradação (dias)	Absortividade (L.g ⁻¹ .cm ⁻¹)			Relação de absortividades	
	280 (nm)	310 (nm)	420 (nm)	280/310	280/420
Controle	15,4	6,9	0,1	2,2	154
15	15,6	5,9	0,1	2,4	156
30	17,8	8,4	0,2	2,1	89
60	18,4	8,2	0,2	2,2	88
90	14,7	6,1	0,2	2,4	73

A diminuição no rendimento de monômeros do DFRC pode ser, a princípio, uma decorrência direta da quebra de ligações aril-éter induzidas pela ação do fungo. No entanto, a ruptura de ligações C α -C β na lignina, levaria à formação de derivados do benzaldeído e do ácido benzílico na lignina residual que também poderiam causar a diminuição no rendimento

de monômeros durante a reação de DFRC. Isso ocorre, pois esses derivados não gerariam os monômeros tipicamente quantificados na reação de DFRC (Fig. 21). De forma similar, a simples oxidação do carbono alfa em estruturas β -O-4 resultaria na formação de novas subestruturas contendo α -carbonilas que renderiam metoxifenil-1-propanonas e metoxifenil-1-acetoxi-2-propanonas no DFRC no lugar dos tradicionais acetatos de 4-acetoxicinamila (Lu e Ralph, 1997). As três possíveis vias de degradação mencionadas anteriormente estão ilustradas na Figura 25.

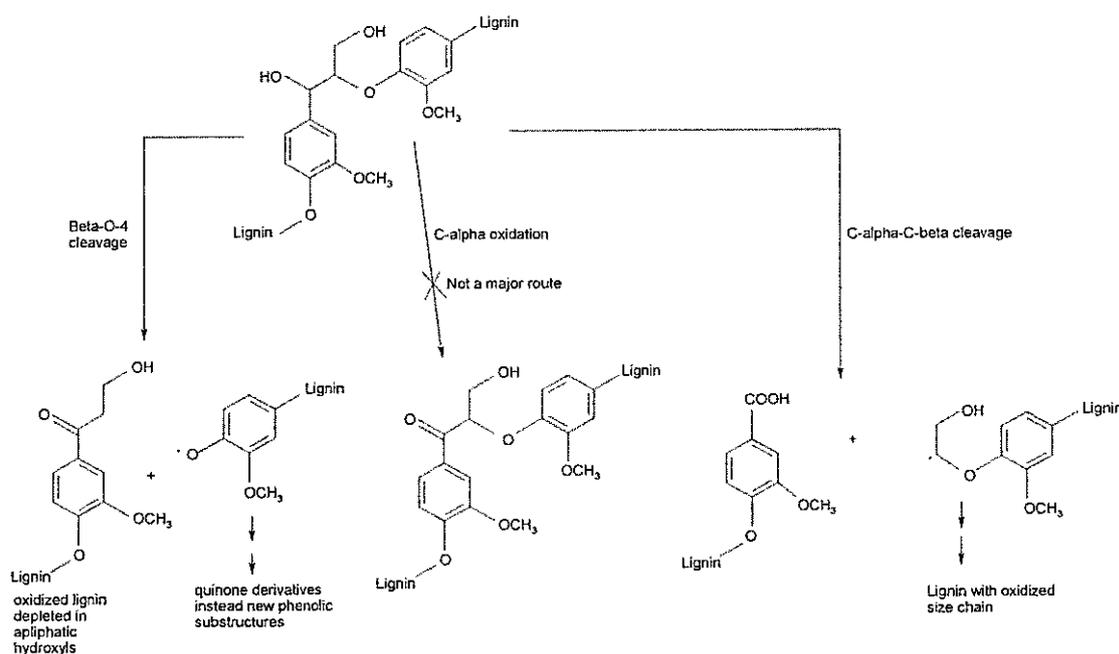


Figura 25. Possíveis rotas de degradação da lignina durante o biotratamento de *P. taeda* por *C. subvermispora*.

A fim de melhorar o diagnóstico sobre as possíveis rotas de degradação da lignina durante o biotratamento de *P. taeda* por *C. subvermispora*, as LMMs foram ainda caracterizadas por RMN- ^{13}C e RMN-2D (HMQC ^{13}C - ^1H) (Guerra et al., 2004). O estudo baseado no RMN- ^{13}C revelou que a região de α -carbonilas e carboxilas do espectro (acima de 180 ppm), apesar de apresentar sinais, não teve as intensidades significativamente alteradas em função do tempo de biotratamento. Os espectros de RMN-2D mostraram a ausência de

sinais atribuíveis a α -carbonilas em estruturas aril-éter. Ou seja, o sinal $\delta C/H$ 82-84/5.4-5.6 ppm que é característico de β -CH em α -ceto- β -aril-éter (Ralph et al., 2004) não foi observado. Esses dados sugeriram que a simples oxidação $C\alpha$ de ligações β -O-4 e a ruptura $C\alpha$ - $C\beta$ (que levaria a formação de novos grupos aldeído ou carboxílicos) não representariam rotas importantes de biodegradação. No entanto, a técnica de RMN- ^{13}C operada no sistema de rotina (sem desacoplamento de prótons) apresenta baixa sensibilidade para a detecção de carbonilas e carboxilas (Robert e Chen, 1989). Dessa forma, um estudo subsequente avaliou a degradação da lignina de *P. taeda* durante o tratamento com *C. subvermispora* usando duas novas técnicas analíticas (Aguiar, 2008). Tioacidólise foi utilizada para confirmar os níveis de ruptura de ligações aril-éter (Rolando et al., 1992) e as ligninas residuais da madeira biotratada foram caracterizadas por RMN- ^{31}P , a partir de derivados fosfítilados (Granata e Argyropoulos, 1995). Essa última técnica é bastante útil, pois permite quantificar carboxilas em lignocelulósicos biodegradados de forma inequívoca (Crestini et al., 1998).

O rendimento de monômeros recuperados após a tioacidólise das madeiras biotratadas diminuiu significativamente após a primeira semana de degradação, enquanto a perda de lignina permaneceu em níveis inferiores a 1% (Fig. 26). Após 2 semanas de tratamento, a perda de lignina permaneceu baixa (3%) e o rendimento de monômeros recuperados da tioacidólise diminuiu 29%. Esses dados confirmaram que a despolimerização da lignina (demonstrada pela diminuição contínua do rendimento de monômeros da tioacidólise) não foi seguida de intensa mineralização. Após 4 semanas de degradação, a perda de lignina atingiu um valor elevado (12%) enquanto o rendimento de monômeros da tioacidólise já correspondia a somente metade do valor inicial. Esses dados corroboraram os estudos anteriores monitorados pela técnica de DFRC.

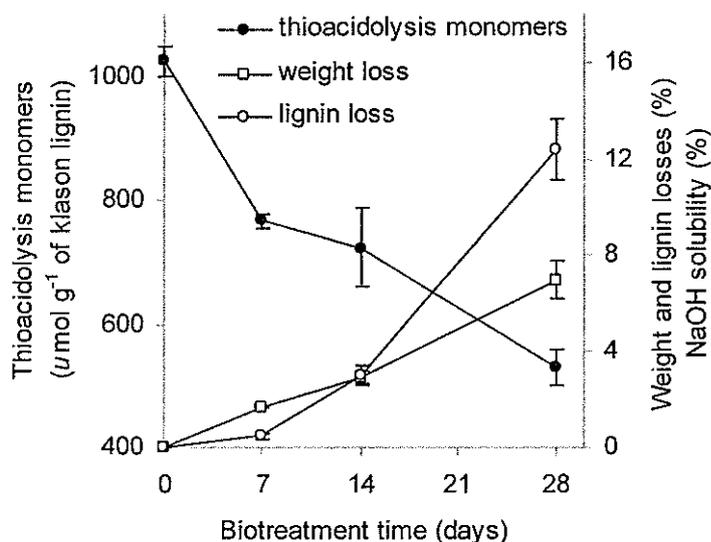


Figura 26. Rendimento de monômeros na tioacidólise e perda de lignina durante a biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispora*.

A lignina residual dessas amostras foi extraída por acidólise branda (Evtuguin et al., 2001) e caracterizada pela técnica de RMN-³¹P aplicada a amostras de lignina previamente fosfitiladas (Granata e Argyropoulos, 1995) (Fig. 27). Os teores de hidroxilas aromáticas e alifáticas diminuíram em função do tempo de biotratamento (Fig. 28), corroborando dados anteriores obtidos a partir de RMH-¹H (Tab. 8). Por outro lado, o teor de carboxilas aumentou significativamente ao longo das 4 semanas de biotratamento (Fig. 28), o que não havia sido detectado nos estudos anteriores realizados a partir da técnica de RMN-¹³C.

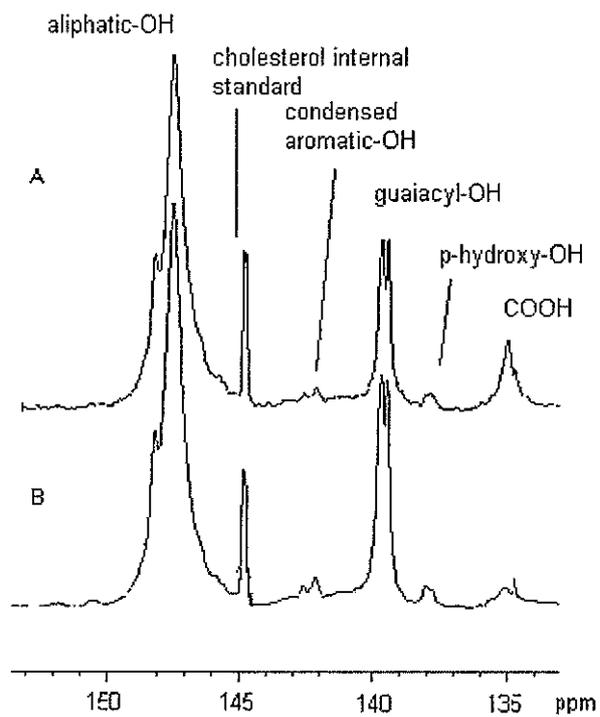


Figura 27. Espectros RMN-³¹P de derivados fostilizados de lignina de *P. taeda* controle (B) e biotratado por *C. subvermispora* por 4 semanas (A).

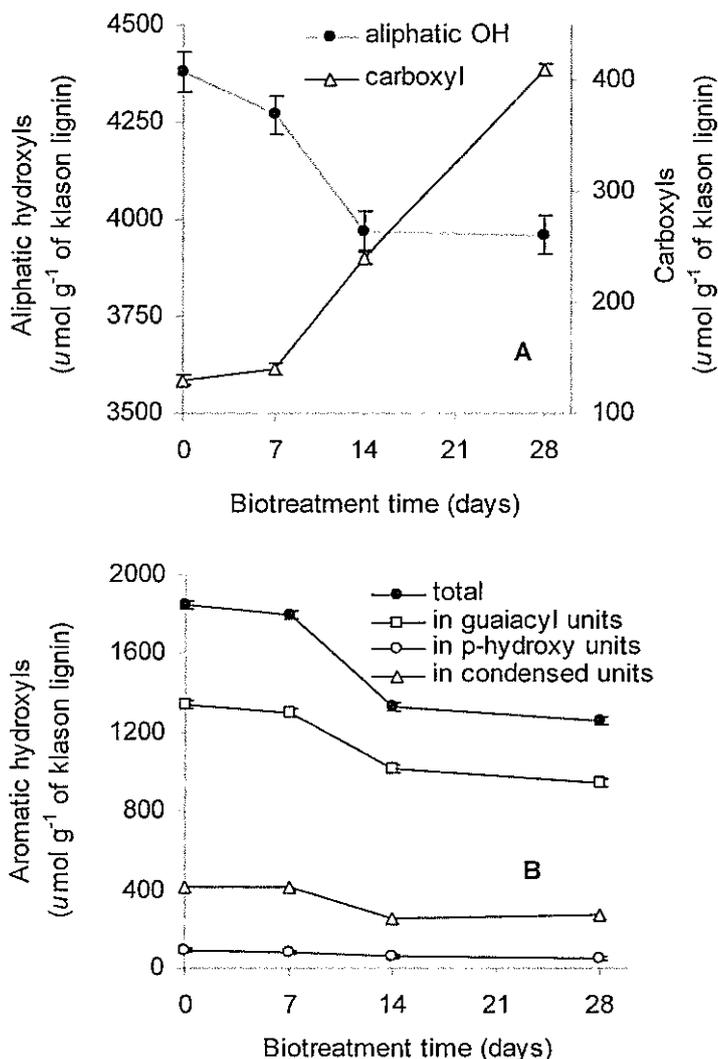


Figura 28. Teor de grupos funcionais em ligninas de *P. taeda* biotratado por *C. subvermispora* determinados a partir da técnica de RMN- ^{31}P aplicada a derivados fosfitilados da lignina.

De uma forma geral, os dados obtidos a partir da tioacidólise e de RMN- ^{31}P confirmaram que a lignina residual sofreu modificações estruturais significativas. Também foi possível demonstrar que a lignina residual das madeiras biotratadas apresenta novos grupos carboxílicos, o que pode ser uma evidência da ruptura de ligações $\text{C}\alpha\text{-C}\beta$ ainda não detectada nos estudos anteriores. Por outro lado, um resultado que merece atenção é que o aumento no teor de carboxilas não foi proporcional à diminuição no teor de hidroxilas alifáticas. Por exemplo, o teor de carboxilas aumentou $10 \mu\text{mol g}^{-1}$ de lignina após uma semana de

biotratamento, equanto o teor de hidroxilas alifáticas diminuiu $110 \mu\text{mol g}^{-1}$ de lignina no mesmo período. Quando o tempo de biotratamento atingiu 4 semanas, o teor de carboxilas correspondeu a $280 \mu\text{mol g}^{-1}$ e o de hidroxilas alifáticas foi de $420 \mu\text{mol g}^{-1}$ de lignina. A formação de novos grupos carbonilas após a quebra de ligações aril-éter poderia, a princípio, justificar a diminuição excessiva de hidroxilas alifáticas.

A compilação dos dados mencionados anteriormente é bastante relevante, pois a partir deles é possível fazer um contraponto entre as reações ocorridas durante a biodegradação de madeira em cultivos em meio sólido que simulam a biopolpação (Fig. 25) com aquelas obtidas a partir do estudo da degradação de compostos modelo. Por exemplo, Srebotnik et al. (1997), estudando a degradação de compostos modelos de lignina por *C. subvermispora* em culturas submersas, obtiveram evidências de reações que envolvem a quebra de ligações aril-éter, a ruptura $\text{C}\alpha\text{-C}\beta$ e também a simples oxidação $\text{C}\alpha$ em estruturas $\beta\text{-O-4}$. Essa última, inclusive, foi uma das principais vias de degradação.

A partir das informações discutidas anteriormente pode-se concluir que durante a biodegradação de madeira por *C. subvermispora* devem ocorrer 2 rotas principais de degradação da lignina (Fig. 25): a) ruptura de ligações $\beta\text{-O-4}$ levando a formação de novos grupos carbonílicos nas cadeias laterais e de quinonas nos anéis aromáticos; b) ruptura de ligações $\text{C}\alpha\text{-C}\beta$ levando a formação de novas carboxilas na cadeia lateral.

A degradação de lignina também foi avaliada durante a biodegradação de *E. grandis*. Nesse caso, várias condições de cultivo foram avaliadas com o objetivo de determinar quais fatores seriam relevantes para a degradação da lignina. As condições de cultivo avaliadas foram escolhidas com o objetivo de alterar o metabolismo fúngico buscando maximizar a degradação de lignina (Vicentim e Ferraz, 2007). A diminuição nos rendimentos de DFRC das madeiras biotratadas nessas condições foi ainda mais pronunciada do que aquela

observada durante a degradação de *P. taeda* (Tab. 10). Em determinadas condições de cultivo, o rendimento dos acetatos de 4-acetoxicinamila diminuiu de 48% na amostra controle para valores tão baixos quanto 8% em amostras biotratadas por 15 dias em cultivos suplementados com milhocina e Mn^{2+} . Estes resultados sugerem que, além da ruptura de ligações β -O-4 e $C\alpha$ - $C\beta$, a simples oxidação $C\alpha$ não deve ser descartada como um possível mecanismo da degradação de lignina por *C. subvermispora* em folhosas (*E. grandis*).

Tabela 10. Perda de massa, lignina e rendimentos de monômeros na reação de DFRC durante a biodegradação da madeira de *E. grandis* por *C. subvermispora* sob diferentes condições de cultivo.

Exp.	Variáveis			Respostas		
	Mn^{2+} (mg/kg de madeira)	Glicose (g/kg de madeira)	Milhocina (g/kg de madeira)	Perda de massa (%)	Perda de lignina (%)	Rendimento de monômeros no DFRC (%)
1	0	0	0	0,46 ± 0,06	2,66 ± 0,08	25 ± 2
2	12,4	0	0	1,5 ± 0,5	6,2 ± 0,5	15 ± 4
3	0	5	0	1,55 ± 0,08	5,44 ± 0,08	24 ± 2
4	12,4	5	0	4,0 ± 0,2	5,8 ± 0,2	18 ± 2
5	0	0	5	4,0 ± 0,4	7,5 ± 0,3	11 ± 2
6	12,4	0	5	3,7 ± 0,4	9 ± 1	8 ± 1
7	0	5	5	4,4 ± 0,5	4,1 ± 0,5	16 ± 4
8	12,4	5	5	3,5 ± 0,2	6,2 ± 0,2	16 ± 5

5.2.2 Participação de enzimas oxidativas na degradação de lignina

Durante o cultivo de *C. subvermispora* sobre madeira, a principal enzima oxidativa produzida é a MnP (Vicuna et al., 1996; Souza-Cruz et al., 2004; Aguiar et al., 2006; Vicentim e Ferraz, 2007). A adição de fontes extras de nitrogênio e glicose aos cultivos contendo madeira resulta na produção de lacases durante os estágios iniciais da biodegradação, porém rapidamente a enzima MnP passa a predominar também nesses cultivos (Vicuna et al.,

1996; Enoki et al., 1999; Vicentim e Ferraz, 2007). Este fungo produz ainda uma série de compostos extracelulares de baixa massa molar incluindo ácido oxálico e alguns ácidos graxos (Enoki et al., 1999; Aguiar et al., 2006). Parte dos ácidos graxos insaturados é convertida em peróxidos orgânicos durante a biodegradação (Enoki et al., 1999). Com base nesses dados e com base em estudos *in vitro* com compostos modelo de lignina, tem sido proposto na literatura que o oxalato de Mn^{3+} (produzido no ciclo catalítico da MnP) inicia a peroxidação de ácidos graxos insaturados que pode degradar a lignina por meio do radical peroxila formado no ácido graxo, como ilustrado na Figura 7 para a degradação de um composto modelo de lignina não fenólico contendo uma ligação β -O-4 (Kapich et al., 1999).

Nos experimentos de biodegradação de *E. grandis* por *C. subvermispora*, a transformação ou remoção de lignina não mostrou uma correlação direta com os níveis de MnP detectados nos cultivos (Fig. 29). Nessa figura se nota uma grande dispersão dos dados quando se busca correlacionar os níveis de MnP dos cultivos com a perda de lignina ou o rendimento de monômeros no DFRC. De fato, mesmo níveis baixos de MnP nos cultivos foram suficientes para proporcionar perdas de lignina elevadas e diminuições expressivas no rendimento de monômeros do DFRC. Isso sugere que para aumentar a degradação de lignina não basta obter níveis elevados de MnP nos cultivos. Dados similares já foram descritos para estudos que envolviam a mineralização de lignina sintética por *C. subvermispora* cultivado em meio líquido (Ruttimann-Johnson et al., 1993) e mesmo para a degradação de lignina por outro fungo de decomposição branca, *T. versicolor*, em um estudo que avaliou uma grande diversidade de mutantes dessa espécie agindo sobre polpa kraft não branqueada (Adlleman et al., 1995).

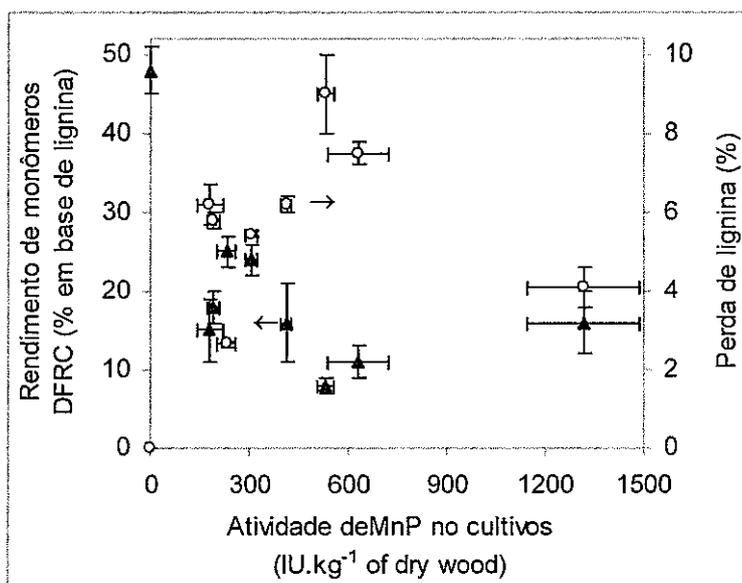


Figura 29. Relação entre os níveis de MnP detectados em cultivos de *C. subvermispora* sobre *E. grandis* e as perdas de lignina e os rendimentos de monômeros DFRC na madeira biotratada.

Conforme mencionado anteriormente, a peroxidação de ácidos graxos insaturados iniciada por MnP tem sido apontada como uma via provável de degradação de lignina por *C. subvermispora*. Essa hipótese leva a postular que a baixa solubilidade dos ácidos graxos insaturados em água poderia ser um dos fatores limitantes na degradação de lignina.

Em nossos estudos de biodegradação de *E. grandis* buscamos correlacionar a extensão da biodegradação da lignina (avaliada através da clivagem de ligações aril-éter e perda de massa da macromolécula) com o acúmulo de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos respectivos cultivos. Vale lembrar que o acúmulo de TBARS *in situ* pode ser considerado como um indicativo da ocorrência de reações de peroxidação de ácidos graxos durante a biodegradação da madeira (Masaphy et al., 1996; Enoki et al., 1999). A Figura 30 mostra uma relação direta entre a quantidade de TBARS e a degradação de lignina, pois quanto maior foi a concentração de TBARS, menor foi o rendimento de monômeros no DFRC, ou maior foi a perda de massa de lignina (que representa sua completa mineralização ou fragmentação em compostos solúveis em água). Isso sugere que a degradação da

macromolécula pode ter sido decorrente principalmente de reações de peroxidação de ácidos graxos.

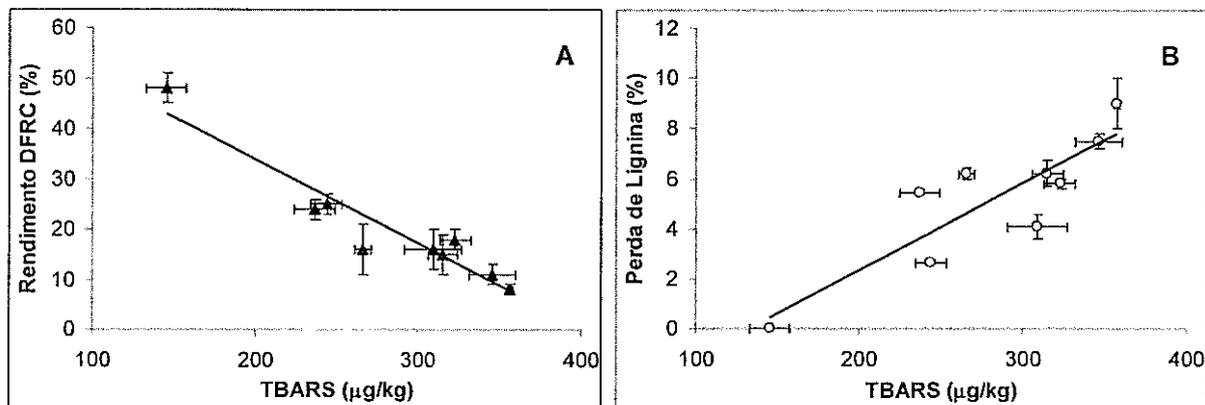


Figura 30. Relação entre a quantidade de TBARS e a degradação de lignina, estimada pela clivagem de ligações aril-éter (rendimento DFRC) (A) e pela perda de massa da macromolécula (B) durante a biodegradação de *E. grandis* por *C. subvermispora*.

A diminuição do rendimento de monômeros no DFRC é um indicativo claro do início de despolimerização da macromolécula. Já a perda de lignina representa sua completa degradação até CO_2 e H_2O (mineralização) ou degradação até compostos solúveis em água. A Figura 31 mostra que houve correlação entre a perda de lignina e a diminuição no rendimento de monômeros de DFRC. Estes resultados confirmam que a despolimerização evidenciada pelo DFRC é, de fato, o passo inicial da completa degradação da macromolécula.

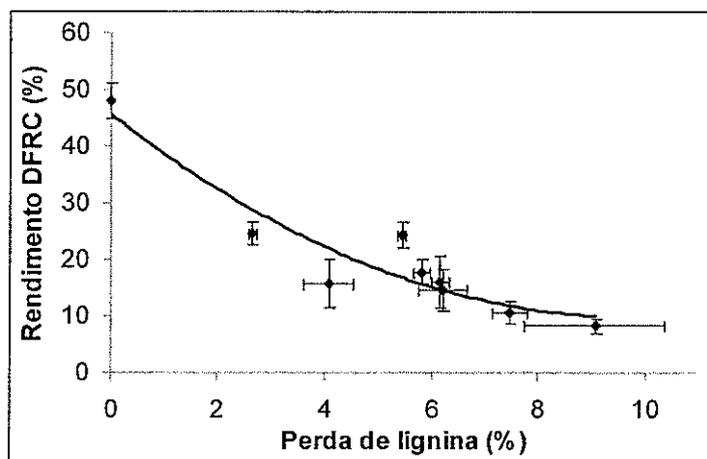


Figura 31. Rendimento de DFRC em função da perda de lignina em cultivos de *C. subvermispora* sobre *E. grandis*.

Levando-se em consideração a análise multivariada de fatores realizada na avaliação da biodegradação de *E. grandis*, torna-se evidente que, durante a biodegradação da lignina *in situ*, não há um único fator responsável pela degradação ou transformação da lignina. Por outro lado, os resultados sugerem a existência de um compromisso entre quantidades adequadas de carbono e nitrogênio no meio de cultivo para indução da secreção de MnP, bem como níveis adequados de Mn^{2+} para aumentar a eficiência da enzima e também para fomentar as reações de peroxidação de ácidos graxos insaturados, o que conseqüentemente levaria à maior degradação da macromolécula.

Ainda com o objetivo de avaliar o papel da MnP nos processos de biopolpação, a madeira biotratada em algumas das condições de cultivo mencionadas anteriormente foi avaliada quanto à resposta ao processo de polpação CTMP em escala de laboratório. A Figura 32 mostra os dados que correlacionam os níveis de MnP detectados nos cultivos com os parâmetros que evidenciam a maior facilidade de desfibramento e de refino das madeiras biotratadas submetidas à polpação CTMP. Pode-se notar que para níveis crescentes de MnP até cerca de 600 UI/kg de madeira, menor foi o teor de rejeitos na polpa gerada após a primeira etapa de desfibramento e maior foi o nível de fibrilação após a etapa de refino. No

estudo em questão, outros parâmetros de cultivo também foram avaliados, tais como os níveis de xilanase ou oxalato secretado pelo fungo (Vicentim e Ferraz, 2008). Para esses parâmetros não houve uma correlação tão adequada como às observadas com MnP. Corroborando esses dados, um trabalho recente de seleção de outros fungos aptos para a biopolpação levou a seleção do fungo *Physisporinus rivulosus* T241i que comprovadamente é um eficiente produtor de MnP (Hakala et al., 2004; 2005; 2006).

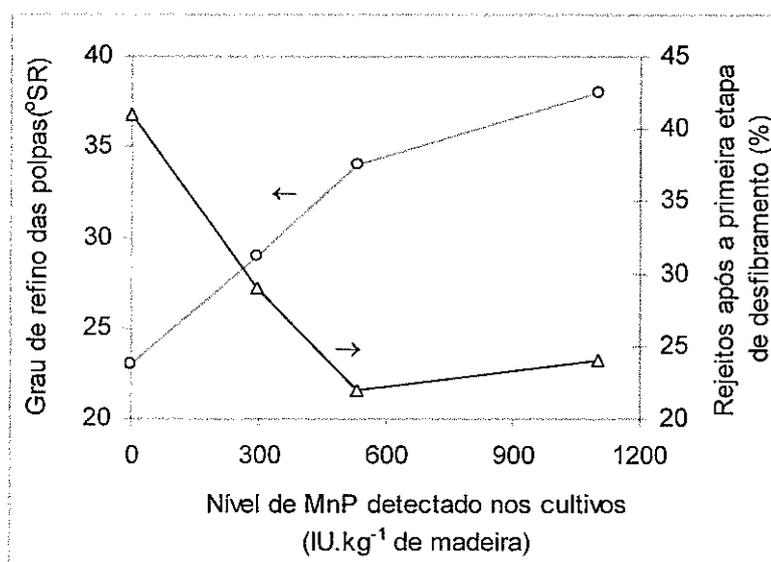


Figura 32. Relação entre os níveis de MnP detectados em cultivos de *C. subvermispora* sobre *E. grandis* e eficiência do processo de polpação CTMP aplicado sobre a madeira biotratada.

5.2.3 Peroxidação de ácido linoleico *in vitro* iniciada por MnP produzida por *C. subvermispora*

Em função dos estudos anteriores demos início a um trabalho que visou avaliar se a MnP produzida por *C. subvermispora* em cultivos sobre *E. grandis* poderia efetivamente iniciar a peroxidação, *in vitro*, de ácidos graxos insaturados. Para isso, extratos enzimáticos de cultivos do fungo sobre madeira, que continham MnP como única enzima oxidativa, foram usados para iniciar reações de peroxidação de ácido linoleico (Cunha et al., 2010). Essa reação envolve o consumo intenso de O₂ e, portanto, a sua ocorrência foi monitorada em um

oxímetro seguindo metodologia descrita por Kapich et al. (2005). Um exemplo de uma reação monitorada no oxímetro é mostrado na Figura 33.

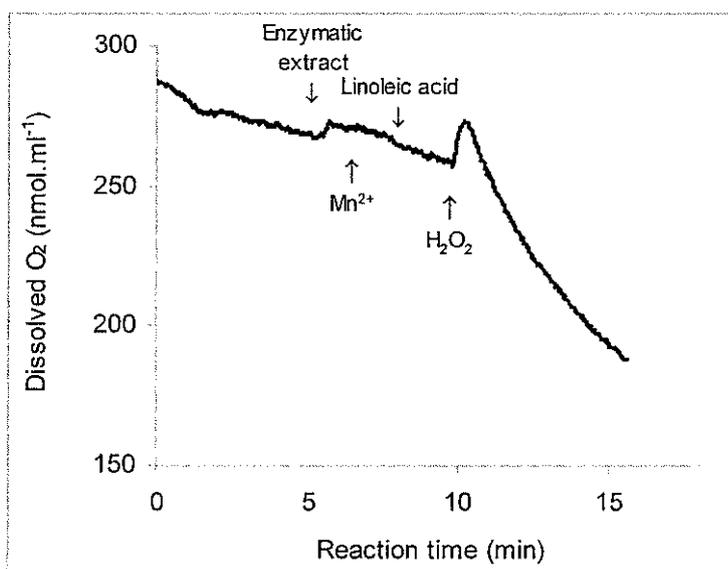


Figura 33. Consumo de O₂ em reações de peroxidação de ácido linoleico catalisadas por extratos enzimáticos obtidos de *E. grandis* biotratado por *C. subvermispora*.

A adição do extrato enzimático, íons Mn²⁺ e emulsão de ácido linoleico dentro da solução contendo tampão succinato de sódio e lactato de sódio saturada com O₂, não causaram consumo significativo de O₂, indicando a ausência de reações de oxidação. Imediatamente após a adição de H₂O₂ ao meio reacional, houve um pequeno acúmulo de O₂ dissolvido que é seguido de intenso consumo, indicando que as reações de peroxidação tiveram início. A mesma reação foi conduzida com extrato enzimático previamente fervido por 15 min para desnaturar a MnP presente. Nesse caso, o consumo de O₂ foi muito baixo, comprovando que a atividade peroxidativa observada se deve a ação da MnP. A taxa máxima de consumo de O₂ foi calculada para extratos obtidos de diversos cultivos realizados em diferentes condições (Cunha et al., 2010). A Figura 34 apresenta as taxas de consumo de O₂ em função dos níveis de MnP observados nos diferentes extratos. Pode-se observar que elevadas taxas de consumo de O₂, correspondem aos extratos que também apresentaram

elevadas atividades de MnP. No entanto, nota-se que as taxas de consumo de O₂ crescem numa menor proporção a partir de níveis de MnP maiores que 100 UI/kg. Esse fato está de acordo com o mecanismo reacional proposto para a peroxidação de ácidos graxos iniciada por MnP (Fig. 6), já que se trata de uma reação radicalar em cadeia, onde os radicais peroxila formados podem propagar a reação independentemente da presença de MnP. Ou seja, havendo certa quantidade mínima de iniciador (MnP) em solução, já se obtém quantidade suficiente de radicais peroxila que então propagam a reação. Outro fator que pode limitar a atividade oxidante de extratos com elevada atividade de MnP é a presença de compostos fenólicos com capacidade anti-oxidante (reagem com os radicais formados durante a peroxidação de lipídeos, evitando a propagação da reação). Recentemente, Kapich et al. (2007) mostraram que vários compostos fenólicos podem inibir a peroxidação de ácidos graxos insaturados iniciada por MnP purificada a partir de cultivos de *P. chrysosporium*. É provável que à medida que a biodegradação progride e os níveis de MnP aumentam, os compostos fenólicos derivados da biodegradação de lignina comecem a acumular no meio de cultivo e sejam extraídos juntamente com a enzima, conforme já demonstrado para cultivos semelhantes aos desenvolvidos em nosso trabalho monitorados a partir da absorbância dos extratos em 280 nm (Carvalho et al., 2008). Esses compostos fenólicos poderiam atuar como anti-oxidantes e limitar a capacidade peroxidativa dos extratos como observado na Figura 34 para níveis de MnP maiores do que cerca de 100 UI/kg.

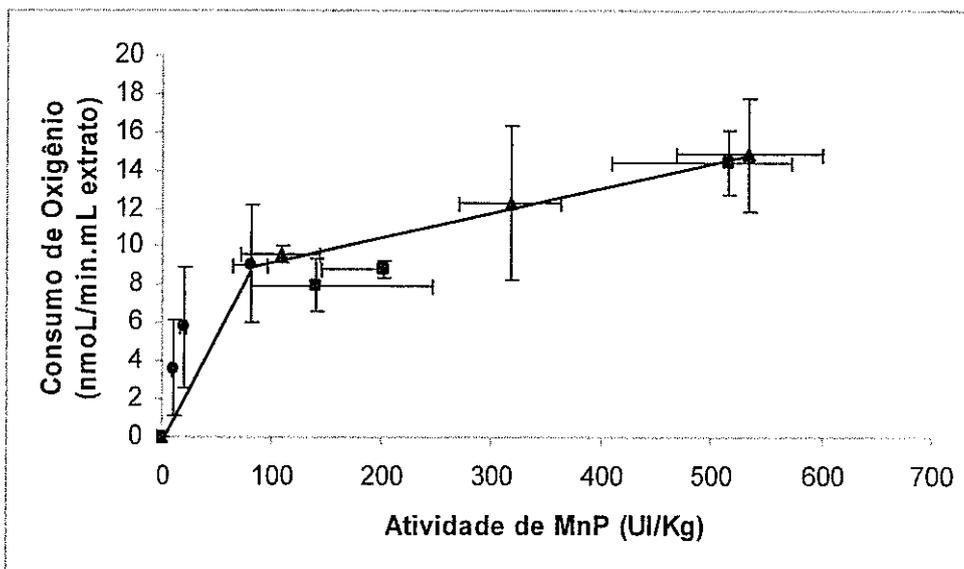


Figura 34. Relação entre os níveis de MnP em extratos de cultivos de *C. subvermispora* sobre *E. grandis* e as taxas de consumo de O₂ em reações de peroxidação de ácido linoleico catalisadas por esses mesmos extratos. (-●-) meio não suplementado; (-■-) meio suplementado com milhocina; (-▲-) meio suplementado com milhocina e glicose.

5.2.4 Degradação de celulose e hemicelulose

Em cultivos de *C. subvermispora* sobre madeiras tanto de *P. taeda* como de *E. grandis*, as perdas de glucana são bastante baixas até cerca de 90 dias de biotratamento, não ultrapassando 8% (Fig. 35). Nesse mesmo período de biodegradação (90 dias), as perdas de hemicelulose chegam a 32% em *P. taeda* e 20% em *E. grandis*, enquanto as perdas de lignina chegam a 22% em *P. taeda* e 42% em *E. grandis*. Os extrativos também são removidos rapidamente dessas duas espécies de madeira (Guerra et al., 2003; Ferraz et al., 2003). Esses dados indicam que a celulose é relativamente resistente ao ataque provocado por esse fungo. Entretanto, é sabido que a perda de componentes da madeira representa a transformação do componente em CO₂ e água ou em compostos solúveis em água. Obviamente, os polissacarídeos e a lignina são despolimerizados antes que uma mineralização expressiva ocorra. Dessa forma, uma determinação direta ou indireta da massa molar dos polissacarídeos residuais se mostrou uma maneira mais adequada de avaliar a degradação dessa fração. Por

exemplo, em alguns estudos determinamos os teores de α -cellulose em amostras preparadas a partir de madeira biotratada (Fig. 35). Em *P. taeda*, pode-se observar que o teor de α -cellulose foi de 47,8% para a madeira controle e de 47,2%, 42,6% e 34,2% para as amostras biotratadas por 15, 30 e 90 dias, respectivamente. Esses resultados sugerem que reações de degradação da celulose iniciaram já a partir dos 30 dias de biodegradação, mesmo quando as perdas de glucana ainda não são expressivas. Em *E. grandis*, o comportamento biodegradativo da celulose é semelhante, porém a diminuição significativa no teor de α -cellulose já pode ser detectada aos 15 dias de cultivo (Fig. 35).

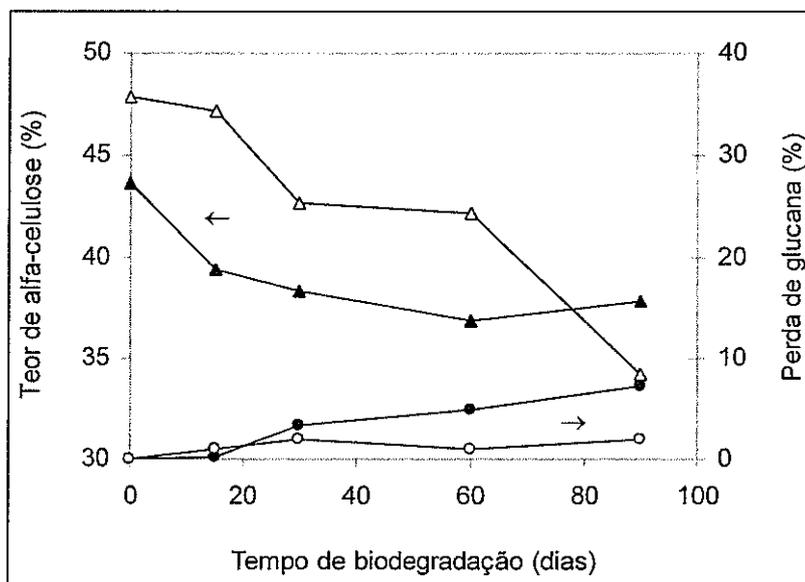


Figura 35. Perda de glucana e teor de α -cellulose em madeira biotratadas por *C. subvermispora*. Símbolos cheios representam os dados de *E. grandis* e símbolos vazios *P. taeda*.

É importante ressaltar que a α -celulose representa a porção da celulose que permanece insolúvel quando a holocelulose é tratada com uma solução com 17,5% de NaOH. Nessas condições, frações de baixa massa molar da celulose, além das hemiceluloses, são solubilizadas e não são recuperadas como α -cellulose. Por esta razão, se a celulose

despolimerizada permanece ligada fisicamente à madeira biotratada ela é solubilizada durante o tratamento alcalino, o que leva a um decréscimo no rendimento da fração de α -celulose.

A despolimerização de celulose em *P. taeda* foi ainda avaliada pelo estudo da distribuição de massas molares da α -celulose preparada (Fig. 36 e Tab. 11). O grau de polimerização da α -celulose diminuiu progressivamente e passou a ser significativamente mais baixo do que o valor observado na amostra controle a partir do 30º dia de biodegradação.

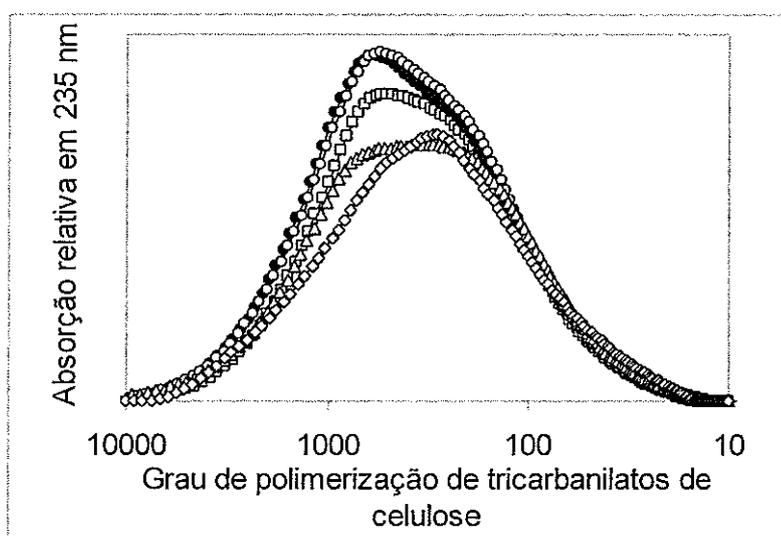


Figura 36. Distribuição de massas molares de amostras de tricarbamilatos de α -celulose isoladas de *P. taeda* biotratado por *C. subvermispora*. (●) madeira controle; (○), (□), (Δ) e (\diamond) madeira biotratada por 15, 30, 60 e 90 dias respectivamente.

Tabela 11. Grau de polimerização e dispersibilidade de amostras de tricarbamilatos de α -celulose isoladas de *P. taeda* biotratado por *C. subvermispora*.

Tempo de biodegradação (dias)	Grau de polimerização e dispersibilidade		
	DPw	DPn	DPw/DPn
Controle	506	158	3,2
15	501	167	3,0
30	463	158	2,9
60	459	136	3,4
90	453	130	3,4

O padrão de degradação da celulose apresentado por *C. subvermispora* não foi similar ao reportado para fungos com elevada capacidade de degradar esse polissacarídeo como *Trichoderma reesei* (Kleman-Leyer et al., 1996) ou *P. chrysosporium* (Uzcategui et al., 1991). Usualmente, um sistema celulolítico completo é capaz de degradar a cadeia celulósica gerando inicialmente oligômeros de menor grau de polimerização. Em função do tempo de degradação, esses oligômeros são então convertidos a celobiose e depois a glicose, antes que uma nova etapa de despolimerização tenha início nas microfibrilas de celulose. Como se nota nos resultados obtidos com a celulose residual de madeira biotratada por *C. subvermispora*, pode-se supor que houve um acúmulo significativo de oligômeros de celulose sem a subsequente degradação até celobiose e glicose. Isso pode ser inferido visto que o aparecimento dos oligômeros foi constatado pela diminuição no rendimento de α -celulose e a não conversão desses oligômeros até glicose pode ser constatada pela baixa perda de glucana detectada até os 90 dias de biodegradação. Esses resultados indicam que *C. subvermispora* não consome os oligômeros na mesma velocidade em que são gerados, sugerindo que o sistema celulolítico secretado pelo fungo não é adequado para degradar os oligômeros até monômeros. De fato, *C. subvermispora* é capaz de produzir endo-celulases responsáveis pela despolimerização da celulose (Sethuraman et al., 1998; Heidorne et al., 2006), mas não

secreta quantidades apreciáveis de celobiohidrolases que seriam responsáveis pela conversão dos oligômeros à celobiose (Heidorne et al., 2006). Além das endo-celulases que poderiam depolimerizar a celulose, alguns outros agentes não enzimáticos de baixa massa molar, tem sido descritos como aptos a despolimerizar a celulose. Nesse caso, alguns fungos são capazes de gerar *in situ* os reagentes de Fenton (H_2O_2 e Fe^{2+}) que ao reagirem dão origem a radicais hidroxila que podem despolimerizar a celulose por uma via não enzimática (Hammel et al, 2002). No caso de *C. subvermispora*, tem sido reportado que a secreção de ácidos alquil-itacônicos pelo fungo acarreta na quelação de eventuais íons Fe^{3+} e Fe^{2+} presentes nos cultivos, minimizando dessa forma a ocorrência das reações de Fenton (Watanabe et al., 2002; Rahmawati et al., 2005).

6 Conclusões

O desenvolvimento da série de trabalhos descritos nessa tese permitiu concluir que o processo de biopolpação é factível em escala piloto. Os estudos envolvendo a planta piloto de biopolpação mostraram que, uma vez controlada as condições de inoculação e manutenção da pilha de cavacos inoculada, a biodegradação se desenvolve de forma compatível ao já descrito para os ensaios em escala de laboratório. Foi possível ainda demonstrar que um refinador industrial pode operar com um menor consumo de energia quando utiliza madeira biotratada como matéria prima. Essa última conclusão é de enorme relevância, pois até o momento do desenvolvimento da planta piloto avaliada nessa tese, não se sabia exatamente se refinadores industriais de grande porte responderiam de forma semelhante ao observado nos refinadores de laboratório, que dificilmente simulam perfeitamente o processo industrial. As diferenças entre os refinadores de laboratório e industrial foi inclusive apontada como a possível causa para a não melhora das qualidades físico-mecânicas das biopolpas obtidas em escala industrial,

o que se contrapõe aos ganhos significativos de resistência mecânica observados nos experimentos desenvolvidos com refinadores de discos de laboratório. Os dados sobre biopolpação em escala piloto mostraram ainda que as biopolpas são significativamente mais escuras do que as polpas controle. Porém, foi observado que a lavagem alcalina das biopolpas já re-estabelece parte importante da alvura perdida e o comportamento da biopolpa acaba sendo semelhante ao das polpas controle dentro de uma linha de branqueamento com peróxido de hidrogênio em meio alcalino.

O desenvolvimento de processos de polpação quimiomecânica em escala de laboratório foi realizado a fim de permitir dispor de uma ferramenta simples de acompanhamento da eficiência do biotratamento da madeira em processos subsequentes de polpação. Essa abordagem se mostrou fundamental para permitir a avaliação da biopolpação em condições de cultivo diferenciadas que induziram um metabolismo degradativo também diferenciado. A partir desses estudos, foi possível demonstrar que a secreção da enzima MnP é de grande relevância para se obter os máximos benefícios do biotratamento da madeira dentro de um processo de biopolpação.

Na avaliação do mecanismo degradativo que *C. subvermispora* apresenta foi possível demonstrar que as principais vias de despolimerização da lignina dependem da ruptura de ligações aril-éter e de ligações entre os carbonos α e β . Nesse tópico pode-se concluir também que o uso de procedimentos analíticos variados que diagnosticam adequadamente as características estruturais dos componentes da madeira é fundamental para a geração de dados abrangentes e conclusivos sobre as características estruturais da lignina. No mesmo sentido, a caracterização da celulose residual em madeiras biodegradadas mostrou que *C. subvermispora* efetivamente não ataca a cadeia celulósica em tempos curtos de biotratamento (até cerca de 30 dias). No entanto, também foi possível concluir que quando os períodos de biotratamento são estendidos, começa haver despolimerização relevante da celulose.

Do ponto de vista da ação de enzimas oxidativas no sistema degradativo de *C. subermispora*, foi possível concluir que MnP é a principal enzima envolvida na degradação de lignina. A ação dessa enzima se mostrou limitada à disponibilidade de moléculas ou íons de baixa massa molar como o ácido oxálico, os íons Mn^{2+} e os ácidos graxos insaturados. Esses últimos, aparentemente, atuam como os agentes limitantes do processo degradativo devido a sua baixa disponibilidade nos sistemas biodegradativos. Foi demonstrado ainda que a ação principal da MnP sobre os ácidos graxos insaturados envolve a iniciação da peroxidação dessas moléculas que podem gerar radicais reativos com capacidade para iniciar indiretamente a degradação da lignina.

Dentro do aspecto acadêmico, pode-se concluir ainda que a área de biodegradação da madeira e suas aplicações tecnológicas tem se mostrado como um excelente tema de formação de recursos humanos em biotecnologia, visto que o desenvolvimento dos trabalhos discutidos nessa tese demandaram uma formação sólida nas diversas ciências básicas que dão sustentação à biotecnologia: a biologia, a química e a engenharia.

7 Referências bibliográficas

- Addleman K, Dumonceaux T, Paice MG, Bourbonnais R, Archibald FS (1995) Production and characterization of *Trametes versicolor* mutants unable to bleach hardwood kraft pulp. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3687-3694.
- Agosin E, Blanchette RA, Silva H, Lapierre C, Cease KR, Ibach E, Rabad AR, Muga P (1990) Characterization of palo podrido, a natural process of delignification in wood. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:65-74.
- Aguiar, A (2008) Importância dos mediadores de baixa massa molar na biodegradação de madeira por *Ceriporiopsis subermispora*. Tese de doutorado, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, pp.121.
- Aguiar A, Ferraz, A (2008) Relevance of extractives and wood transformations products on the biodegradation of *Pinus taeda* by *Ceriporiopsis subermispora*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 61:182-188.
- Aguiar A, Souza-Cruz PB, Ferraz A (2006) Oxalic acid, Fe^{3+} -reduction activity and oxidative enzymes detected in culture extracts recovered from *Pinus taeda* wood chips biotreated by *Ceriporiopsis subermispora*. *Enzyme Microb Technol* 38:873-878.
- Akhtar M, Scott GM, Swaney RE, Shipley DF (2000) Biomechanical pulping: a mill-scale evaluation. *Resources Conservation Recycling*, 28:241-252.

- Akhtar M, Blanchette RA, Myers G, Kirk K (1998) An overview of biomechanical pulping research. In: Young R, Akhtar M, editors. Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. NY: John Wiley and Sons; p. 309-383.
- Akhtar M, Attridge MC, Myers GC, Blanchette RA (1993) Biomechanical pulping of loblolly pine chips with selected white-rot fungi. *Holzforschung*, 47:36-40.
- Akhtar M, Attridge MC, Myers GC, Kirk TK, Blanchette RA (1992) Biomechanical pulping of loblolly pine with different strains of the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. *Tappi J.* 75:105-109.
- Ander P, Marzullo L (1997) Sugar oxidoreductases and veratryl alcohol oxidase as related to lignin degradation. *J. Biotechnol.* 53:115-131.
- Bajpai P, Bajpai PK, Akhtar M, Jauhari MB (2001) Biokraft pulping of eucalyptus with selected lignin-degrading fungi. *J. Pulp Paper Sci.* 27:235-239.
- Barnett HL, Hunter BB (1987) Illustrated genera of Imperfect fungi. 4th ed. MacMillan, New York. 218p.
- Biermann CJ (1993) Essentials of Pulping and Papermaking. San Diego, Academic Press.
- Blanchette RA, Krueger EW, Haight JE, Akhtar M, Akin DE (1997) Cell wall alterations in loblolly pine wood decayed by the white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. *J. Biotechnol.* 53:203-213.
- Bogan BW, Lamar RT, Hammel KE (1996) Fluorene oxidation in vivo by *Phanerochaete chrysosporium* and in vitro during manganese peroxidase-dependent lipid peroxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1788-1792.
- Bogan BW, Lamar RT (1996) Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading capabilities of *Phanerochaete laevis* HHB-1625 and its extracellular ligninolytic enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1597-1603.
- Burdsall Jr, HS (1998) Taxonomy of industrially important white-rot fungi. In: Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry, ed Young, R. e Akhtar, M. New York. John Wiley & Sons, p.259-272.
- Camarero S, Sarkar S, Ruiz-Duenas FJ, Martinez MJ, Martinez AT (1999) Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. *J. Biol. Chem.* 274:10324-10330.
- Carvalho W, Ferraz A, Milagres AMF (2008) Clean-up and concentration of manganese peroxidases recovered during the biodegradation of *Eucalyptus grandis* by *Ceriporiopsis subvermispora*. *Enzyme Microb. Technol.* 43:193-198.
- Chen C. (1992) Nitrobenzene and cupric oxide oxidations. In: Methods in Lignin Chemistry. Eds. Y.L. Lin and C.W. Dence. Springer-Verlag, New York. pp. 301-321.
- Crestini C, Sermanni GG, Argyropoulos DS (1998) Structural modifications induced during biodegradation of wheat lignin by *Lentinula edodes*. *Bioorganic Med. Chem.* 6:967-73.
- Cunha, GGS, Masarin F, Norambuena M, Freer J, Ferraz A (2010) Linoleic acid peroxidation and lignin degradation by enzymes produced by *Ceriporiopsis subvermispora* grown on wood or in submerged liquid cultures. *Enzyme Microbial Technol.* 46:262-267.
- De Jong E, Field J, De Bond J (1994) Aryl alcohols in the physiology of ligninolytic fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 13:153-188.
- Dumoncaux T, Bartholomew K, Valeanu L, Charles T, Archibald F (2001) Cellobiose dehydrogenase is essential for wood invasion and nonessential for kraft pulp delignification by *Trametes versicolor*. *Enzyme Microb Technol* 29:490-493.
- Enoki M, Watanabe T, Honda Y, Kuwahara M (2000) A novel fluorescent dicarboxylic acid, (Z)-1-7-nonadecadiene-2,3-dicarboxylic acid, produced by the fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. *Chem. Lett.* 54-55.

- Enoki M, Watanabe T, Nakagame S, Koller K, Messner K, Honda Y, Kuwahara M (1999) Extracellular lipid peroxidation of selective white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. FEMS Microbiol. Lett. 180:205-211.
- Evtuguim DV, Pascoal Neto C, Silva AMS, Domingues PM, Amado FML, Robert D, Faix O (2001) Comprehensive study on the chemical structure of dioxane lignin from plantation *Eucalyptus globulus* wood. J. Agric. Food Chem. 49:4252-61.
- Fengel D, Wegener G (1989) Wood Chemistry, Ultrastructure and Reactions, Berlin, Walter de Gruyter.
- Ferraz A, Guerra A, Mendonça R, Masarin F, Vicentim MP, Aguiar A, Pavan PC (2008) Technological advances and mechanistic basis for fungal biopulping. Enzyme Microbial. Technol. 43:178-185.
- Ferraz A, Córdova AM, Machuca A (2003). Wood biodegradation and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora* during solid-state fermentation of *Eucalyptus grandis*. Enzyme Microb. Technol. 32:59-65.
- Ferraz A, Mendonça R, Silva FT (2000a) Organosolv delignification of white- and brown-rotted *Eucalyptus grandis* hardwood. J. Chem. Technol. Biotechnol. 75:18-24.
- Ferraz A, Baeza J, Rodríguez J, Freer J (2000b) Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. Bioresource Technol. 74:201-212.
- Flounoy DS, Paul JA, Kirk TK, Highley TK (1993) Changes in the size and volume of pores in sweet gum wood during simultaneous rot by *Phanerochaete chrysosporium*. Holzforschung 47:297-301.
- Forss K, Kokkonen R, Sagfors P-E (1989) Determination of molar mass distribution of lignins by gel permeation chromatography. In Glasser WG, Sarkanen S, editors. Lignin – Properties and Materials. ACS Symp. Ser. 397:124-133.
- Gerber AL, Loguercio-Leite C (2000) Polyporoid wood-rotting fungi (Basidiomycetes) II – new records from southern Brazil. Mycotaxon 76: 175-186.
- Glenn JK, Morgan MA, Mayfield MB, Kuwahara M, Gold MH (1983) An extracellular H₂O₂ requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 114:1077-1083.
- Goodell B, Jellison J, Liu J, Daniel G, Paszczyński A, Fekete F, Krishnamurthy S, Jun L, Xu G (1997) Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolate from wood decay fungus and their role in the fungal biodegradation of wood. J. Biotechnol. 53:133-52.
- Granata A, Argyropoulos DS (1995) 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. J. Agric. Food Chem. 43:1538-44.
- Guerra A, Pavan PC, Ferraz A (2006) Bleaching, brightness stability and chemical characteristics of *Eucalyptus grandis*-bio-TMP pulps prepared in a biopulping pilot plant. Appita J. 59:412-415.
- Guerra A, Ferraz A, Lu F, Ralph J (2004) Structural characterization of lignin during *Pinus taeda* wood treatment with *Ceriporiopsis subvermispora*. Appl. Environ. Microbiol. 70:4073-4078.
- Guerra A, Mendonça R, Ferraz A (2003) Molecular weight distribution of wood components extracted from *Pinus taeda* biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora*. Enzyme Microb. Technol. 33:12-18.
- Guerra A, Mendonça R, Ferraz A (2002) Characterization of the residual lignins in *Pinus taeda* biodegraded by *Ceriporiopsis subvermispora* by using in situ CuO oxidation and DFRC methods. Holzforschung 56:157-160.

- Hakala TK, Hilden K, Maijala P, Olsson C, Hatakka A (2006) Differential regulation of manganese peroxidases and characterization of two variable MnP encoding genes in the white-rot fungus *Physisporinus rivulosus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73:839-849.
- Hakala TK, Lundell T, Galkin S, Maijala P, Kalkkinen N, Hatakka A (2005) Manganese peroxidases, laccases and oxalic acid from the selective white-rot fungus *Physisporinus rivulosus* grown on spruce wood chips. *Enzyme Microbial. Technol.* 36:461-468.
- Hakala TK, Maijala P, Konn J, Hatakka A (2004) Evaluation of novel wood-rotting polypores and corticioid fungi for the decay and biopulping of Norway spruce (*Picea abies*) wood. *Enzyme Microbial. Technol.* 34:255-263.
- Hammel KE, Cullen D (2008) Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis, *Curr Opin Biotechnol.* 11:349-355.
- Hammel KE, Kapich AN, Jensen Jr. KA, Ryan ZC (2002) Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 30:445-453.
- Heidorne FO, Magalhaes PO, Ferraz A, Milagres AMF (2006) Characterization of hemicellulases and cellulases produced by *Ceriporiopsis subvermispota* grown on wood under biopulping conditions. *Enzyme Microb. Technol.* 38:436-442.
- Henriksson G, Johansson G, Pettersson G (2000) A critical review of cellobiose dehydrogenases. *J. Biotechnol.* 78:93-113.
- Hunt C, Kenealy W, Horn E, Houtman C (2004) A biopulping mechanism: creation of acid groups on fiber. *Holzforschung* 58:434-439.
- Jensen Jr K, Bao W, Kawai, S, Srebotnik E, Hammel, K (1996) Manganese-dependent cleavage of nonphenolic lignin structures by *C. subvermispota* in the absence of lignin peroxidase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3679-3686.
- Kang KY, Jo BM, Oh JS, Mansfield SD (2003) The effects of biopulping on chemical and energy consumption during kraft pulping of hybrid poplar. *Wood Fiber Sci.* 35:594-600.
- Kapich AN, Galkin S, Hatakka A (2007) Effect of phenolic acids on manganese peroxidase-dependent peroxidation of linoleic acid and degradation of a non-phenolic lignin model compound. *Biocatalysis and Biotransformation* 25:350-358.
- Kapich AN, Prior BA, Lundell T, Hatakka A (2005) A rapid method to quantify pro-oxidant activity in cultures of wood-decaying white-rot fungi. *J. Microbiol. Meth.* 51:261-271.
- Kapich AN, Jensen KA, Hammel KE (1999) Peroxyl radicals are potential agents of lignin biodegradation. *FEBS Lett.* 461:115-119.
- Kawai S, Nakagawa M, Ohashi H (1999) Aromatic ring cleavage of a non-phenolic beta-O-4 lignin model dimer by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. *FEBS Lett.* 446:355-358.
- Kersten PJ, Kirk TK (1987) Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 169:2195-2202.
- Kersten PJ, Tien M, Kalyanaraman B, Kirk TK (1985) The ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* generates cation radicals from methoxybenzenes. *J. Biol. Chem.* 260:2601-2612.
- Khindaria A, Grover TA, Aust SD (1994) Oxalate-dependent reductive activity of Manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 314:301-306.
- Kirk TK, Cullen D (1998) Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In Young RA, Akhtar M, editors, *Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry*. New York, John Wiley and Sons, p. 273-308.
- Kleman-Leyer KM, Siika-Aho M, Teeri TT, Kirk TK (1996) The cellulases endoglucanase I and cellobiohydrolase II of *Trichoderma reesei* act synergistically to solubilize native cotton cellulose but not to decrease its molecular size. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2883-2887.

- Klinga N, Hoglund H, Sandberg C (2008) Energy efficient high quality CTMP for paperboard. *J. Pulp Paper Sc.* 34(2):98-106.
- Kohler LJF, Dinus RJ, Malcolm EV, Rudie AW, Farrell RL, Brush TS (1987) Improving softwood mechanical pulp properties with *Ophiostoma piliferum*. *Tappi J.* 80:135-140.
- Kuhad RC, Singh A, Eriksson KEL (1997) Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (Eriksson, KEL ed.), 57, p. 45-126.
- Kuwahara M, Glenn JK, Morgan MA, Gold MH (1984) Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 169:247-250.
- Leatham GF, Myers GC, Wegner TH (1990a) Biomechanical pulping of aspen chips: Paper strength and optical properties resulting from different fungal treatments. *Tappi J.* 73:249-255.
- Leatham GF, Myers GC, Wegner TH (1990b) Biomechanical pulping of aspen chips: Energy savings resulting from different fungal treatments. *Tappi J.* 73:197-200.
- Lobos S, Larrain J, Salas L, Cullen D, Vicuna R (1994) Isoenzymes of manganese-dependent peroxidase and laccase produced by the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Microbiology* 140:2691-2698.
- Loguercio-Leite C, Gonçalves GVC, Ryvarden L (2001) Studies in neotropical polypores 14. *Ceriporiopsis cystidiata* nova sp. *Mycotaxon* 79:285-288.
- Lu F, Ralph J (1997) Derivatization followed by reductive cleavage (DRFC method), a new method for lignin analysis: Protocol for analysis of DRFC monomers. *J. Agric. Food Chem.* 45:2590-2592.
- Machuca A, Ferraz A (2001) Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white- and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid state medium. *Enzyme Microb. Technol.* 29:386-91.
- Magalhães PO, Milagres AMF (2009) Biochemical properties of a b-mannanase and a b-xylanase produced by *Ceriporiopsis subvermispora* during biopulping conditions. *Intern. Biodet. Biod.* 63:191-195.
- Maijala P, Kleen M, Westin C, Poppius-Levlin K, Herranen K, Lehto JH, Reponen P, Maentausta O, Mettala A, Hatakka A (2008) Biomechanical pulping of softwood with enzymes and white-rot fungus *Physisporinus rivulosus*, *Enzyme Microbial Technol.* 43:169-177.
- Mardones L, Gomide JL, Freer J, Ferraz A, Rodríguez J (2006) Kraft pulping of *Eucalyptus nitens* wood chips biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81:608-613.
- Martinez D, Larrondo LF, Putnam N, Sollewijn Gelpke MD, Huang K, Chapman J, Helfenbein KG, Ramaiya P, Detter JC, Larimer F, Coutinho PM, Henrissat B, Berka R, Cullen D, Rokhsar D (2004) Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nat. Biotechnol.* 22:695-700.
- Masaphy S, Henis Y, Levanon D (1996) Manganese-enhanced biotransformation of atrazine by the white rot fungus *Pleurotus pulmonarius* and its correlation with oxidation activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3587-3593.
- Masarin F, Pavan PC, Vicentim MP, Souza-Cruz PB, Loguercio-Leite C, Ferraz A (2009) Laboratory and mill scale evaluation of biopulping of *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden with *Phanerochaete chrysosporium* RP-78 under non-aseptic conditions. *Holzforschung* DOI 10.1515/HF.2009.057 (no prelo).
- Masarin F, Ferraz A (2008) Evaluation of *Eucalyptus grandis* biopulping with *Ceriporiopsis subvermispora* under nonaseptic conditions. *Holzforschung* 62:1-7.

- Mendonça RT, Jara JF, González V, Elissetche JP, Freer J (2008) Evaluation of the white-rot fungi *Ganoderma australe* and *Ceriporiopsis subvermispota* in biotechnological applications. *J. Ind. Microbiol Biotechnol.* 35:1323–1330.
- Mendonça R, Ferraz A, Kordsachia O, Patt R (2004). Alkaline sulfite/anthraquinone pulping of pine wood chips biotreated with *Ceriporiopsis subvermispota*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 79:584-589.
- Mendonça R, Guerra A, Ferraz, A (2002) Delignification of *Pinus taeda* wood chips treated with *Ceriporiopsis subvermispota* for preparing high-yield kraft pulps. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 77:411-418.
- Messner K, Fackler K, Lamaipis P, Gindl W, Srebotnik E, Watanabe T (2003) Overview of white-rot research: where we are today. In *Wood Deterioration and Preservation. Advances in Our Changing World* (Goodell, B., Nicholas, D. and Schultz, T., Eds.), ACS Symp. Ser. 845, pp. 73-96. American Chemical Society, Washington.
- Mester T, Tien M (2001) Engineering of a manganese-binding site in lignin peroxidase isozyme H8 from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284:723-728.
- Mester T, Field JA (1998) Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese. *J. Biol. Chem.* 273:15412-15417.
- Milagres AMF, Magalhães PO, Ferraz A (2005) Purification and properties of a xylanase from *Ceriporiopsis subvermispota* cultivated on *Pinus taeda*. *FEMS Microbiol. Lett.* 253:267–272.
- Moen, MA, Hammel KE (1994) Lipid peroxidation by the manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* is the basis for phenanthrene oxidation by the intact fungus. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1956-1961.
- Munteanu F-D, Ferreira P, Ruiz-Dueñas PJ, Martínez AT, Cavaco-Paulo A (2008) Bioelectrochemical investigations of aryl-alcohol oxidase from *Pleurotus eryngii*. *J. Electroanal. Chem.* 618:83–86
- Onnerud H, Gellerstedt G (2003) Inhomogeneities in the chemical structure of spruce lignin. *Holzforschung* 57:165-70.
- Oriaran TP, Labosky P. and Blankenhorn PR (1990) Kraft pulp and papermaking properties of *Phanerochaete chrysosporium* degraded aspen. *Tappi J.* 73(6):147-152.
- Orth AB, Royse DJ, Tien M (1993) Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:4017-4023.
- Pan X, Ragauskas J (1995) Brightness Reversion of Mechanical Pulps Part 3: Mechanistic Studies of Mercapto-Stabilizers for High Brightness Mechanical Pulps. *J. Wood Chem. Technol.* 15:135-152.
- Pavan PC (2008) Desenvolvimento do processo de biopolpação de eucalipto em escala piloto para produção de polpas termomecânicas e quimiotermomecânicas. Tese de doutorado, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, pp.150.
- Peng J, Lu F, Ralph J (1998) The DFRC method for lignin analysis 4. Lignin dimers isolated from DFRC-degraded Loblolly pine wood. *J. Agric. Food Chem.* 46:553-560.
- Rahmawati N, Ohashi Y, Watanabe T, Honda Y, Watanabe T (2005) Ceriporic acid B, an extracellular metabolite of *Ceriporiopsis subvermispota*, suppresses the depolymerization of cellulose by the Fenton reaction. *Biomacromolecules* 6:2851-2856.
- Rajakumar S, Gaskell J, Cullen D, Lobos S, Vicuña R (1996) Lip-like genes in *Phanerochaete sordida* and *Ceriporiopsis subvermispota*, white-rot fungi from which lignin peroxide has not been detected. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2660-2663.
- Ralph SA, Ralph J, Landucci LL (2004) NMR Database of Lignin and Cell Wall Model Compounds. 2004; Available at URL <http://ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=10491>

- Ravalason H, Jan G, Mollé D, Pasco M, Coutinho PM, Lapierre C, Pollet B, Bertaud F, Petit-Conil M, Grisel S, Sigoillot J-C, Asther M, Herpoël-Gimbert I (2008) Secretome analysis of *Phanerochaete chrysosporium* strain CIRM-BRFM41 grown on softwood. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80:719–733.
- Robert D, Chen C (1989) Biodegradation of lignin in spruce wood by *Phanerochaete chrysosporium*: Quantitative analysis of biodegradation spruce lignins by ¹³C-NMR spectroscopy. *Holzforschung* 43:323-33.
- Rolando C, Monties B, Lapierre C (1992) Thioacidolysis. In: Lin S, Dence CW editors. *Methods in lignin chemistry*. Heidelberg: Springer-Verlag, p. 334-49.
- Ruttimann-Johnson C, Salas L, Vicuña R, Kirk TK (1993) Extracellular enzyme production and synthetic lignin mineralization by *Ceriporiopsis subvermispota*. *Appl Environ. Microbiol.* 59:1792-1797.
- Schwanninger M, Hinterstoisser B, Gradinger C, Messner K, Fackler K (2004) Examination of spruce wood degradation by *Ceriporiopsis subvermispota* using near and mid infrared spectroscopy. *J Near Infrared Spectrosc.* 12:397-409.
- Scott GM, Akhtar M, Swaney RE, Houtman CJ (2002) Recent developments in biopulping technology at Madison, WI. In: Viikari L, Lantto R, editors. *Progress in Biotechnology* 21. Amsterdam: Elsevier; p. 61-71.
- Scott GM, Akhtar M, Lentz MJ, Swaney RE (1998) Engineering, scale-up, and economic aspects of fungal pretreatment of wood chips, In Young R. and Akhtar M (ed.) *Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry*, Wiley, NY, p.341-369.
- Sethuraman A, Akin DE, Eriksson KEL (1998) Plant-cell-wall-degrading enzymes produced by the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispota*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 27:37-47.
- Southorn PA, Garth P (1988) Free Radicals in Medicine.1. Chemical nature and biological reactions. *Mayo Clin. Proc.* 63: 381-398.
- Souza-Cruz, PB, Freer J, Siika-Aho M, Ferraz A (2004) Extraction and determination of enzymes produced by *Ceriporiopsis subvermispota* during biopulping of *Pinus taeda* wood chips. *Enzyme Microb. Technol.* 34:228-234.
- Srebotnik E, Messner K, Foisner R (1988) Ultrastructural localization of ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* by immunogold labeling. *Curr. Microbiol.* 16:221-227.
- Srebotnik E, Jensen K, Kawai S, Hammel K (1997) Evidence that *Ceriporiopsis subvermispota* degrades nonphenolic lignin structure by a one-electron-oxidation mechanism. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4435-4440.
- Srebotnik E, Boisson JN (2005) Peroxidation of linoleic acid during the oxidation of phenols by fungal laccase. *Enzyme Microb. Technol.* 36:785-789.
- Sykes M (1993) Bleaching and brightness stability of aspen biomechanical pulps. *Tappi J.* 76:121-126.
- Tien M, Kirk TK (1983) Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science* 221:661-663.
- Timofeevski SL, Nie G, Reading NS, Aust SD (1999) Addition of veratryl alcohol oxidase activity to manganese peroxidase by site directed mutagenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256:500-504.
- Urzúa U, Kersten PJ, Vicuña R (1998) Manganese peroxidase-dependent oxidation of glyoxylic and oxalic acids synthesized by *Ceriporiopsis subvermispota* produces extracellular hydrogen peroxide. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:68-73.
- Uzcategui E, Johansson G, Ek B, Pettersson G (1991) The 1,4-beta-d-glucan glucanohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium* - reassessment of their significance in cellulose degradation mechanisms. *J. Biotechnol.* 21:143-160.

- Vicentim MP, Ferraz A (2008) Alkaline-sulfite chemithermomechanical pulping of *Eucalyptus grandis* biotreated by *Ceriporiopsis subvermispota* under varied culture conditions. *Holzforschung* 62:375–382.
- Vicentim MP, Ferraz A (2007) Enzyme production and chemical alterations of *Eucalyptus grandis* wood during biodegradation by *Ceriporiopsis subvermispota* in cultures supplemented with Mn^{2+} , corn steep liquor and glucose. *Enzyme Microb. Technol.* 40:645-652.
- Vicuña R, Larraín J, Lobos S, Salas C, Salas L (1996) Culture conditions of *Ceriporiopsis subvermispota* determine the pattern of MnP isoenzymes. In: Srebotnik E, Messner K, editors. *Biotechnology in the pulp and paper industry, recent advances in applied and fundamental research*. Vienna: Facultas-Universitätsverlag; p. 345-350.
- Watanabe T, Teranishi H, Honda Y, Kuwahara M (2002) A selective lignin-degrading fungus, *Ceriporiopsis subvermispota*, produces alkylitaconates that inhibit the production of a cellulolytic active oxygen species, hydroxyl radical in the presence of iron and H_2O_2 . *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 297:918-23.
- Watanabe T, Shirai N, Okada H, Honda Y, Kuwahara M (2001) Production and chemiluminescent free radical reactions of glyoxal in lipid peroxidation of linoleic acid by the ligninolytic enzyme, manganese peroxidase. *Eur. J. Biochem.* 268:6114-6122.
- Watanabe T, Katayama S, Enoki M, Honda Y, Kuwahara, M (2000) Formation of acyl radical in lipid peroxidation of linolenic acid by manganese-dependent peroxidase from *Ceriporiopsis subvermispota* and *Bjerkandera adusta*. *Eur. J. Biochem.* 267:422-431.
- Wood BF, Conner AH, Hill CG (1986) The effect of precipitation on the molecular-weight distribution of cellulose tricarbanilate. *J. Appl. Polymer Sci.* 32:3703-3712.
- Wymelenberg AV, Minges P, Sabat G, Martinez D, Aerts A, Salamov A, Grigoriev I, Shapiro H, Putnam N, Belinky P, Dosoretz C, Gaskell J, Kersten PT, Cullen D (2006) Computational analysis of the *Phanerochaete chrysosporium* v2.0 genome database and mass spectrometry identification of peptides in ligninolytic cultures reveal complex mixtures of secreted proteins. *Fungal Gen. Biol.* 43:343–356.
- Wymelenberg AV, Sabat G, Martinez D, Rajangam AS, Teeri TT, Gaskell J, Kersten PJ, Cullen D (2005) The *Phanerochaete chrysosporium* secretome: Database predictions and initial mass spectrometry peptide identifications in cellulose-grown medium. *J. Biotechnol.* 118:17–34.