

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUIMICA - DEPARTAMENTO DE QUIMICA ORGANICA

Este exemplar corresponde a redação final da  
tese defendida por André Luis Ferraz e aprovada  
pela comissão julgadora.

30 de Maio de 1991

Nelson Durán

Dr. Nelson Durán

Presidente da banca

CONTRIBUICAO AO ESTUDO DO ASCOMICETO  
*Chrysonilia sitophila*: BIODEGRADACAO  
DE MADEIRA E SEUS COMPONENTES

TESE DE DOUTORADO

André Luis Ferraz <sup>™</sup>

Orientador: Dr. Nelson Durán <sup>†</sup>

9107  
6/30

## AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. Nelson Durán pela orientação e o constante apoio ao desenvolvimento de novas idéias.

- Ao Jaime pela amizade e discussão constante no desenvolvimento de experimentos.

- Aos Dr. Gerd Wegener (Universidade de Munich - Alemanha), Dr. Jaime Baeza (Universidade de Concepción - Chile) e Dra. Sonia Erazo (Universidade Católica de Val Paraíso - Chile) pelas colaborações em algumas partes do desenvolvimento experimental.

- Aos companheiros do laboratório do IQ-UNICAMP.

- Ao Instituto de Química - UNICAMP e seus funcionários pelo auxílio no desenvolvimento desta tese

- Aos amigos do CEBIQ-FTI/Lorena.

- A FAPESP, CAPES-PICD e a FTI pelo apoio financeiro.

A Elaine, Marcelo  
meus pais e irmãos

## LISTA DE ABREVIACÕES

FAO-WHO: Food and Agricultural Organization - World Health  
Organization

MM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: Meio mínimo com nitrato

MM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: Meio mínimo com amônio

ARN: cido ribonucleico

ADN: cido desoxiribonucleico

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

DNS: cido dinitrosalicílico

MWL: Milled wood lignin

LFA: Lignina fortemente alterada

$\bar{M}_w$ : Massa molecular média

$\bar{M}_n$ : Massa molecular média em número

CG/EM: Cromatografia gasosa/espectrometria de massa

DTG: Termograma diferencial

## INDICE

I - Resumo .....	i
I.1 - Abstract .....	ii
II - Introdução .....	1
II.1 - O Ascomiceto <i>Chrysonilia sitophila</i> .....	2
II.2 - Madeira .....	3
II.2.1 - Celulose .....	3
II.2.2 - Hemicelulose .....	4
II.2.3 - Lignina .....	4
II.3 - Biodegradação de madeira e seus componentes..	6
II.3.1 - Biodegradação natural .....	7
II.3.2 - Biodegradação induzida .....	8
II.3.2.1 - Mecanismos da degradação de lignina ....	11
II.4 - Produção de proteínas unicelulares .....	17
II.5 - Objetivo .....	20
III - Parte Experimental .....	21
III.1 - Otimização das condições de cultivo de <i>Chrysonilia sitophila</i> .....	21
III.1.1 - Quantificação do crescimento fúngico ....	21
III.1.2 - Composição química dos meios de cultivo .	22
III.1.3 - Efeito da temperatura .....	23
III.1.4 - Efeito do pH .....	23
III.1.5 - Efeito do íon tartarato .....	23
III.1.6 - Efeito da concentração e fonte de nitrogênio .....	23
III.1.7 - Efeito da biotina .....	23
III.1.8 - Efeito do tipo de tampão .....	24
III.1.9 - Efeito da agitação .....	24

III.2. - Estudo da composição química do micélio de <i>Chrysonilia sitophila</i> .....	25
III.2.1 - Obtenção de micélio para análise química	25
III.2.2 - Determinação da porcentagem de água .....	25
III.2.3 - Extração com NaOH 1,0 M .....	25
III.2.4 - Extração com HCl 0,1 M .....	25
III.2.5 - Extração com éter etílico .....	25
III.2.6 - Determinação de fibras .....	26
III.2.7 - Determinação de cinzas .....	26
III.2.8 - Análise de ácidos nucleicos totais .....	26
III.2.9 - Determinação de proteínas .....	27
III.2.10 - Determinação de carboidratos .....	27
III.2.11 - Determinação de tiamina .....	27
III.2.12 - Análise de aminoácidos .....	28
III.2.13 - Análise da distribuição dos carboidratos .....	28
III.2.14 - Análise de ácidos graxos .....	28
III.2.15 - Estudo dos carotenóides presentes no micélio .....	28
III.2.15.1 - Extração com acetona/água .....	28
III.2.15.2 - Obtenção de extratos para análise por cromatografia líquida de alta eficiência	29
III.2.15.3 - Obtenção preparativa de carotenóides ..	29
III.2.16 - Conversão de diferentes substratos a massa fúngica .....	30
III.2.17 - Determinação de digestibilidade em madeiras biodegradadas .....	30
III.2.18 - Determinação de açúcares redutores totais - método do DNS .....	31

III.3 - Biodegradação de madeira por <i>Chrysonilia</i> <i>sitophila</i> .....	32
III.3.1 - Preparação da madeira .....	32
III.3.2 - Degradação seletiva de lignina - Influência da concentração de glicose e nitrogênio .....	32
III.3.2.1 - Determinação de lignina Klason .....	33
III.3.2.2 - Determinação de celulose e hemicelulose	33
III.3.2.3 - Determinação do índice de degradação ..	34
III.3.2.4 - Análise termogravimétrica .....	34
III.3.3 - Biodegradação de cavacos .....	34
III.3.3.1 - Determinação de fenol-oxidases .....	35
III.3.3.2 - Análise espectroscópica dos cavacos biodegradados .....	35
III.3.4 - Estudo do mecanismo de degradação da lignina durante a biodegradação da madeira .....	35
III.3.4.1 - Obtenção da lignina MWL .....	36
III.3.4.2 - Obtenção das ligninas fortemente alteradas (LFA) .....	38
III.3.4.3 - Estudo dos sub-produtos do processo de biodegradação .....	38
III.3.4.4 - Determinação da distribuição de pesos moleculares - permeação em gel Sephadex LH-20 e LH-60 .....	39
III.3.4.5 - Análise espectroscópica das ligninas na região do U.V/Visível .....	40
III.3.4.6 - Análise espectroscópica das ligninas na região do I.V. ....	40

III.3.4.7 - Acetilação e espectroscopia RMN das ligninas .....	40
III.3.4.8 - Determinação de carbonilas .....	41
III.3.4.9 - Determinação de hidroxilas fenólicas ..	41
III.3.4.10 - Determinação de metoxilas nas MWL .....	42
III.3.4.11 - Análise elementar .....	42
IV - Resultados e discussão .....	43
IV.1 - Otimização das condições de crescimento de <i>Chrysonilia sitophila</i> .....	43
IV.1.1 - Quantificação do crescimento fúngico .....	43
IV.1.2 - Efeito da temperatura .....	44
IV.1.3 - Efeito do pH .....	45
IV.1.4 - Efeito do ion tartarato e da fonte e concentração de nitrogênio .....	45
IV.1.5 - Efeito da concentração de biotina .....	47
IV.1.6 - Efeito do tipo de tampão e da agitação ...	49
IV.2 - Estudo da composição química do micélio de <i>Chrysonilia sitophila</i> .....	52
IV.2.1 - Composição química .....	52
IV.2.2 - Composição em aminoácidos .....	54
IV.2.3 - Composição em açúcares .....	56
IV.2.4 - Composição em ácidos graxos .....	56
IV.2.5 - Estudo dos carotenóides .....	57
IV.2.6 - Avaliação da conversão de diferentes substratos à massa fúngica .....	62
IV.2.7 - Avaliação da digestibilidade de madeira biodegradada .....	62
IV.3 - Biodegradação de madeira por <i>Chrysonilia sitophila</i> .....	63



IV.3.1 - Degradação seletiva de lignina - Avaliação das condições de cultivo .....	63
IV.3.1.1 - Índice de degradação e análise termogravimétrica .....	66
IV.3.2 - Biodegradação de madeira em cavacos .....	68
IV.3.3 - Estudo do mecanismo de degradação da lignina durante a biodegradação de madeira	69
IV.3.3.1 - Rendimentos de extração das ligninas de <i>P. radiata</i> e <i>P. radiata</i> biodegradado durante 3 meses .....	70
IV.3.3.2 - Distribuição de pesos moleculares das ligninas estudadas .....	71
IV.3.3.3 - Característica espectrais das ligninas estudadas .....	74
IV.3.3.4 - Análise de grupos Carbonilas, Hidroxilas, Metoxilas e Análise elementar das ligninas estudadas .....	82
IV.3.3.5 - Estudo dos sub-produtos da biodegradação de <i>P. radiata</i> por <i>C. sitophila</i> durante 3 meses .....	87
V - Conclusões .....	96
VI - Referências .....	97
APENDICE I .....	103
Cálculo da energia de ativação para a pirólise da madeira/Gráficos .....	103
Curva de calibração da coluna Sephadex LH-60 .....	106
Curva de calibração da coluna Sephadex LH-20 .....	107
Cálculo do teor de grupos carbonilas/Espectros ...	108
Cálculo do teor de hidroxilas fenólicas/Espectros	113

Cálculo da determinação de metoxilas.....	118
Espectros Infra-vermelho .....	119
Espectros RMN- <sup>1</sup> H .....	123
Espectros RMN- <sup>13</sup> C .....	127
APENDICE II .....	131
Estruturas de fragmentos de lignina mencionados no texto .....	131

Foram estudados diversos aspectos relacionados à biodegradação de madeira e seus componentes pelo Ascomiceto *Chrysonilia sitophila*.

A otimização das condições de cultivo indicou máxima velocidade de crescimento em pH 6,0, 28°C e concentração de nitrogênio  $\geq 50$  mEq N/l. Foi observado crescimento em níveis constitutivos de nitrogênio e assimilação indistinta de  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ . A presença de íons tartarato e biotina não interferiram significativamente no crescimento. O tampão mais indicado para a manutenção de pH 6,0 foi biftalato de potássio/ácido ftálico 0,05 M. Culturas em meio semi-sólido e agitadas proporcionaram maiores crescimentos em relação a culturas estacionárias.

A composição química do micélio mostrou teores de proteínas (39,2%), carboidratos (29,3%), extrato etéreo (12,1%), fibras (5,6%), cinzas (3,3%) e ácidos nucleicos (3,3%) comparáveis a alguns microorganismos utilizados para a produção de proteínas unicelulares. As proteínas apresentaram níveis de aminoácidos semelhantes aos sugeridos pela FAO-WHO.

A degradação seletiva de lignina durante a biodegradação de madeira foi avaliada e a máxima deslignificação (18%) foi obtida após 15 dias de biodegradação em meio contendo 10 mEq N/l e 1,0% de glicose.

O estudo do mecanismo de degradação da lignina durante a biodegradação de madeira indicou que ligninas fortemente alteradas sofreram reações características de quebra de ligações  $\text{C}\alpha-\text{C}\beta$ , formação de ácidos carboxílicos e novos carbonos saturados nas cadeias laterais e abertura oxidativa de anéis aromáticos, tipicamente observadas para a degradação de lignina por fungos de decomposição branca.

Biodegradation of wood and its components by the Ascomycete *Chrysonilia sitophila* were studied.

Optimal growth conditions at pH 6.0, 28°C and nitrogen concentration  $\geq 50$  mEq N/l were observed. Growth in the constitutive nitrogen level and a negligible change in the biotin and tartrate ions presence were found. Nitrogen as either  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NH}_4^+$  was indistinctly assimilated. Semi-solid and agitated cultures induced better growth than stationary cultures.

The mycelial chemical composition shows protein (39,2%), carbohydrate (29,3%), ether extract (12,1%), fiber (5,6%), ash (3,3%) and nucleic acids (3,3%) levels similar to some microorganisms used in the single cell protein production. Proteins showed aminoacid levels similar to FAO-WHO requirements.

Selective lignin degradation during wood decay was studied. Maximal delignification (18%) after 15 days of biodegradation in a 10 mEq N/l and 1.0% glucose supplemented medium was obtained.

Mechanism of lignin biodegradation during wood decay by this Ascomycete was studied. Characteristic reactions of  $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$  cleavage, carboxylic acid and new saturated carbons formation in the side chain of lignin and oxidative cleavage of aromatic rings were observed in heavily degraded lignins, as demonstrated to typical degradation caused by white-rot fungi.

## II - INTRODUÇÃO

Os processos de biodegradação de materiais lignocelulósicos representam um dos mais importantes ciclos do carbono na natureza. O estudo destes processos tem sido desenvolvido a muito tempo, porém a possibilidade de sua aplicação como tecnologia alternativa para a produção de polpa celulósica na indústria papeleira, incrementou fortemente as pesquisas nesta área nos últimos 15 anos.

Recentemente, em um artigo de revisão, Eriksson [1990] enfatizou que a concretização das aplicações tecnológicas dos processos de biodegradação de madeira e seus derivados, necessitam de uma sólida base científica relacionada ao tema.

A grande maioria dos trabalhos desenvolvidos nesta área têm utilizado poucos microorganismos e principalmente aqueles pertencentes a classe dos Basidiomicetos. O conhecimento acumulado sobre a ação destes microorganismos tem levado a proposição de algumas aplicações tecnológicas, tais como: tratamento de efluentes da indústria papeleira, pré-tratamento biológico de cavacos de madeira e bagaço de cana para posterior produção de polpas celulósicas e branqueamento biológico destas polpas.

Apesar de alguns resultados promissores, a viabilidade econômica destes processos tem sido colocada em dúvida, devido as necessidades específicas de cultivo requeridas pelos microorganismos da classe dos Basidiomicetos.

Dentro deste contexto, o estudo de novos microorganismos capazes de degradar lignocelulósicos é um dos mais importantes aspectos relacionados ao conhecimento científico e às aplicações biotecnológicas dos processos de biodegradação de madeira e seus derivados.

## II.1 - O ASCOMICETO *Chrysonilia sitophila*

*Chrysonilia sitophila* foi isolado a partir de um inseto xilófago (*Tribolium ferrugineum*) e inicialmente caracterizado como *Monilia sitophila* [Campos e col., 1986]. Este Ascomiceto corresponde a uma fase anamórfica (fase assexuada com células + ou -) do bem estudado *Neurospora sitophila* (teleomorfo com células + e -) [Von Arx, 1981], o qual tem sido utilizado na fermentação de farelo de amendoim para a produção de "ONTJON", um alimento típico na Indonésia [Quinn e col., 1975; Beuchat, L.R., 1976; Fardiaz e Markakis, 1981].

Relatos de infestação de florestas Japonesas, queimadas durante a II Guerra Mundial, por espécies de *Neurosporas* foram publicados e indicam o potencial deste microorganismo para a degradação de lignocelulósicos [Nakazawa e Yamazaki, 1951].

Berry e Dekker [1986] estudaram enzimas celulolíticas de *M. sitophila* (= *N. sitophila*) e a produção de tirosinase (uma fenol oxidase) foi descrita por Horowitz e Shen [1952].

O Ascomiceto *C. sitophila* tem demonstrado capacidade em degradar celulose [Durán e col., 1988a; Ferraz e Durán, 1989], casca de arroz [Durán e col., 1988b], casca de madeira e seus sub-produtos [Freer e col. 1990], lignina dioxano, lignossulfonatos e álcool veratrílico [Rodríguez, 1987; 1990; Rodríguez e Durán, 1991] bem como compostos modelo de lignina [Nogueira, 1990]. Enzimas celulolíticas e ligninolíticas foram detectadas em caldos de cultivo de *C. sitophila* [Durán e col., 1987a] e as ligninases isoladas e caracterizadas [Durán e col., 1987c]. A utilização deste Ascomiceto para a produção de proteínas unicelulares também tem sido avaliada [O'Reilly e col., 1991; Freer e col., 1990].

## II.2 - MADEIRA

A grande disponibilidade de madeira no mundo e principalmente sua renovabilidade, fazem deste material um interessante foco de estudos. Perspectivas de aplicações tecnológicas além de intrincados problemas acadêmicos ligados à química e biologia de sua estruturação e degradação têm levado inúmeros grupos de pesquisa a estudá-la. Constituída por celulose, hemicelulose, lignina, pequenas quantidades de extrativos e sais minerais, a madeira apresenta-se como um material complexo que deve ser estudado considerando-se suas propriedades químicas e morfológicas.

II.2.1 - Celulose: É o maior componente da madeira (cerca de 50%), sendo um polímero linear (parte amorfa e parte cristalina) formado exclusivamente por moléculas de glicose unidas através de ligações  $\beta$ -(1-4) glicosídicas. Estritamente a celulose é composta por unidades monoméricas de celobiose, a qual é formada pela junção de 2 moléculas de glicose seguida da eliminação de água através das hidroxilas ligadas aos carbonos 1 e 4. Este dímero se repete constantemente, apresentando o oxigênio que liga os anéis, na posição equatorial (figura 1) [Fengel e Wegener, 1984a].

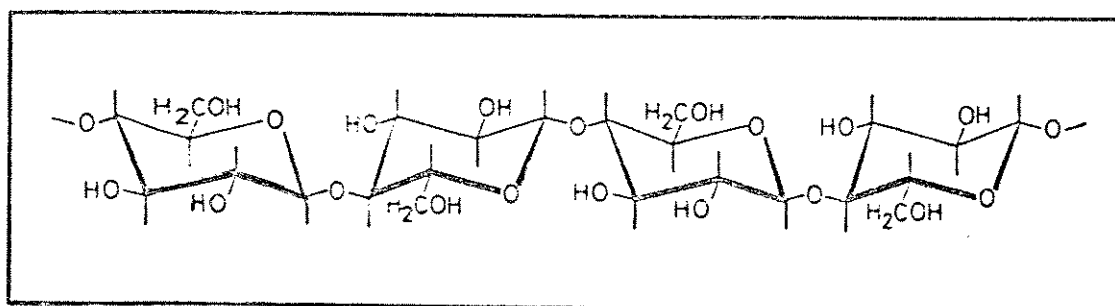


FIG. 1 - Estrutura genérica de um fragmento de celulose.

II.2.2 - Hemicelulose: É composta dos açúcares glicose, manose e galactose (hexoses) e xilose, arabinose (pentoses), podendo ainda apresentar pequenas quantidades de ácidos urônicos e desoxi-hexoses em alguns tipos de madeira. Estes açúcares apresentam-se na forma de polímeros de baixo peso molecular (com relação à celulose), intimamente associados à celulose e podem ser homopolímeros (exemplo: xilano, formado por xilose) e heteropolímeros (exemplo: glicomanano, formado por glicose e manose). O teor de hemicelulose em diferentes tipos de madeira é bastante variável, mas pode-se assumir que cerca de 20% da madeira é composta por estes açúcares [Fengel e Wegener, 1984a].

II.2.3 - Lignina: É composta basicamente de unidades fenil propano formando um polímero tridimensional totalmente amorfo, representando 20-30% do total da madeira. A natureza "caótica" da lignina é atribuída ao seu mecanismo de biossíntese, que se processa por via radicalar a partir de precursores como os álcoois sinapílico, coniferílico e para-cumarílico (figura 2). Vários tipos de ligações formadas entre as unidades fenil-propano ocorrem no polímero, sendo as mais abundantes:  $\beta$ -0-4 e  $\alpha$ -0-4 (50-65%);  $\beta$ -5 (6-15%);  $\beta$ -1 (9-15%); 5-5 (8-9%) e  $\beta$ - $\beta$  (2-5%) (figura 3). Baseado nestas informações estruturas hipotéticas para a lignina têm sido propostas, como a mostrada na figura 3 [Fengel e Wegener, 1984a].

Existe ainda uma fração menor da madeira formada basicamente por compostos fenólicos e resinas que comumente são chamados de extrativos (são extraídos com solventes orgânicos e água) e compreendem cerca de 2-4%.

A divisão mais frequente entre madeiras é feita em dois tipos gerais: madeiras duras e moles ("hardwood e softwood").



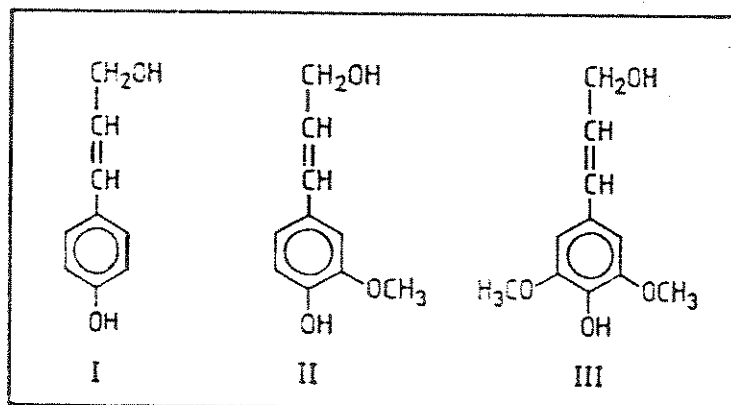


FIG. 2 - Estrutura dos precursores da biossíntese de lignina.

(I) álcool p-hidroxi cumarílico; (II) álcool coniferílico (unidade guaiacil) e (III) álcool sinapílico (unidade siringil).

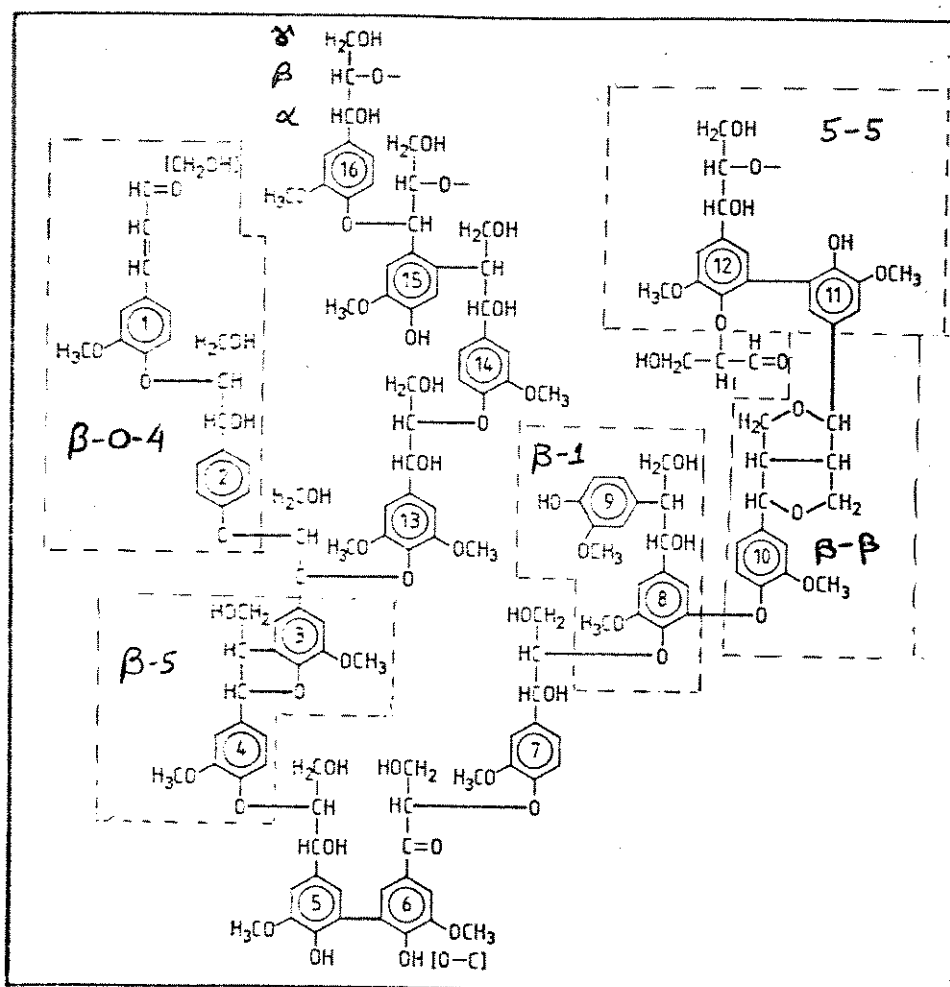


FIG. 3 - Estrutura possível para a lignina proposta por E. Adler [Fengel e Wegwerner, 1984a]. Nota: em destaque são indicados os termos utilizados para a nomenclatura de ligninas e os tipos de ligação entre fragmentos fenil-propano mais frequentes.

É interessante ressaltar que todos os constituintes da madeira estão intimamente associados e/ou ligados quimicamente construindo todo o complexo celular. As figuras 4A e 4B mostram como estes constituintes se distribuem em camadas na parede celular. A lignina envolve as células e funciona como uma "cola" que confere coesão à estrutura interna de uma árvore [Fengel e Wegener, 1984a].

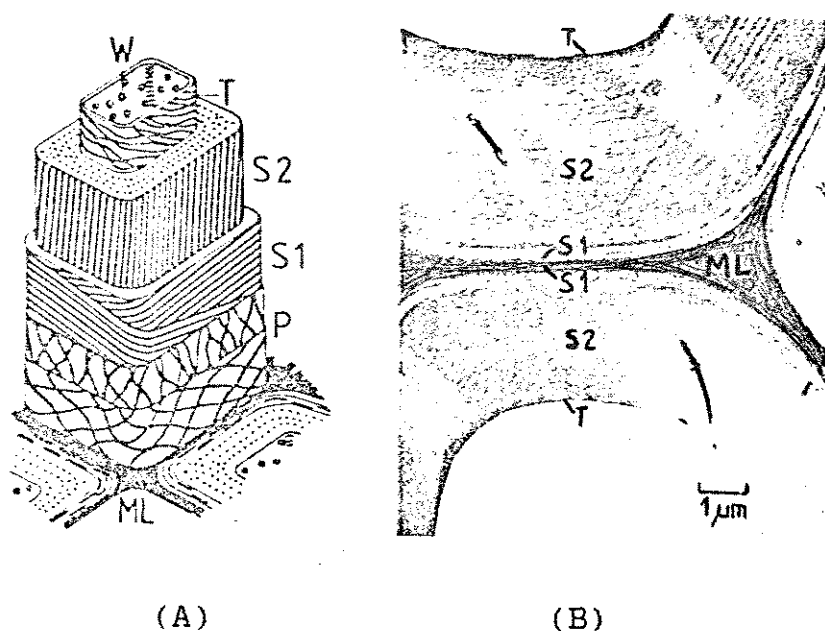


FIG. 4 - Sistema de camadas na parede das células de madeira.

(A) corte ilustrativo e (B) microscopia eletrônica de varredura [Fengel e Wegener, 1984b]

### II.3 - BIODERGRADAÇÃO DE MADEIRA E SEUS COMPONENTES

O estudo da biodegradação de madeira pode ser dividido em 2 modalidades, a primeira estuda a biodegradação natural, isto é, aquela que ocorre nos solos envolvendo muitos microorganismos; a segunda estuda a biodegradação induzida, isto é, aquela causada por um determinado microorganismo previamente inoculado sobre a madeira em condições estéreis e com controle total de contaminantes.

II.3.1 - Biodegradação Natural: O estudo da biodegradação natural tem indicado a ocorrência de muitos tipos de microorganismos atuando simultaneamente sobre a madeira. Uma sucessão de populações microbianas majoritárias ocorre, sendo que cada população exerce um tipo específico de degradação, normalmente indispensável à continuidade da biodegradação [Levy, 1987].

O processo de biodegradação natural leva à decomposição total dos lignocelulósicos, passando pela formação de humus e posterior mineralização até gas carbônico e água, representando um dos mais importantes ciclos do carbono na natureza.

Um aspecto interessante da biodegradação natural, foi a descoberta de madeiras em estado de putrefação ("palo podrido") existentes em determinadas ilhas Chilenas que apresentaram colonização exclusiva por algumas espécies de *Ganoderma*. Estes microorganismos inibem a proliferação de outras espécies e desta forma proporcionaram uma degradação natural extremamente seletiva de lignina (madeira residual com 98% de celulose) [Zadrazil e col., 1982; Agosin e col., 1990].

Entre os microorganismos mais efetivos na biodegradação de madeira na natureza e conseqüentemente os mais estudados, estão os fungos de decomposição branca ("white-rot fungi" - degradam todos os componentes da madeira) e os de decomposição parda ("brown-rot fungi" - degradam principalmente polissacarídeos e a lignina de maneira restrita). A grande maioria destes microorganismos pertencem a classe dos Basidiomicetos, sendo que os Ascomicetos e Fungos Imperfeitos normalmente são classificados como "soft-rot fungi" por proporcionarem a degradação de lignina e carboidratos, porém em velocidades muito baixas [Kaarik, 1974; Fengel e Wegener, 1984c; Ruel e Barnoud, 1985].

No entanto, recentemente Nilsson e col. [1989] avaliaram 19 fungos pertencentes a classe dos Ascomicetos na biodegradação de madeira.

Neste trabalho foi observado que alguns Ascomicetos degradam madeira na mesma intensidade que vários fungos de decomposição branca e nas condições de cultivo utilizadas, degradaram todos os componentes em igual intensidade.

Em termos micromorfológicos, o ataque da madeira por fungos ocorre através da penetração de hifas destes microorganismos nas células da madeira. A penetração das hifas ocorre ao longo das células e através de "pits" (furos que ligam duas células) ou da parede celular [Ruel e Barnoud, 1985].

A biodegradação de madeira por bactérias ocorre principalmente em ambientes aquáticos, sendo que em ambientes normais estes microorganismos são pouco efetivos nos processos de biodegradação, devido a dificuldade de penetração neste material [McCarthy, 1987].

II.3.2 - Biodegradação Induzida: A biodegradação induzida de madeira tem merecido interesse especial nos últimos anos, principalmente devido a aspectos tecnológicos relacionados à indústria papeleira [Eriksson, 1985; 1987a; 1990; Jurasek e Paice, 1988; Durán e col. 1990]. Muitos estudos têm sido desenvolvidos visando a degradação seletiva de lignina durante a biodegradação.

A biodegradação seletiva de lignina poderia, a princípio, ser aplicada em alguns estágios do processo de produção de polpas celulósicas (Biopolpação, ou do inglês "Biopulping").

Um dos caminhos estudados para a biodegradação seletiva de lignina, foi a obtenção de mutantes de fungos de decomposição branca (principalmente *P. chrysosporium*) celulase negativos (CEL<sup>-</sup>) [Eriksson e Godell, 1974; Ander e Eriksson, 1975]. Estas linhagens proporcionaram menores perdas de celulose durante a biodegradação de madeira, porém concomitantemente apresentaram menor capacidade de degradar lignina em relação a espécie original [Eriksson e col., 1983]. No entanto, traba-

lhos recentes apresentaram alguns mutantes CEL<sup>-</sup> com igual capacidade em degradar lignina com relação às espécies originais [Johnsrud e Eriksson, 1985].

A utilização destas linhagens CEL<sup>-</sup> na biodegradação de cavacos de madeira e posterior produção de polpas termomecânicas mostrou ser um processo pouco eficiente, uma vez que uma pequena economia de energia no processo de polpação termomecânico foi obtida. Já a aplicação destas linhagens CEL<sup>-</sup> na biopolpação de bagaço de cana, seguido de tratamento termomecânico/soda fria, proporcionou ganhos energéticos no processamento termoquímico da ordem de 40% [Eriksson, 1990].

Por outro lado, a utilização de espécies selvagens de fungos de decomposição branca na biopolpação tem apresentado resultados mais satisfatórios. Grande parte destes trabalhos foram desenvolvidos com base em um consórcio de 17 indústrias papeleiras e o Laboratório de Produtos Florestais em Madison, Wisconsin, sob coordenação de Kirk [Young, 1987].

Resultados recentes mostraram remoções de lignina durante a biodegradação de cavacos na faixa de 3 a 37 % após 4 semanas de tratamento. Os cavacos assim pré-tratados, proporcionaram uma economia de 50% na energia gasta nos tratamentos termomecânicos posteriores para a obtenção de polpa celulósica [Eriksson, 1990].

Leathan e col. [1989; 1990] estudaram a biodegradação de cavacos de madeira prévio à obtenção de polpas termomecânicas e demonstraram que o processo de pré-tratamento com fungos de decomposição branca proporcionou uma economia de energia no processo termomecânico, bem como a polpa obtida apresentou melhores características físicas em relação a um controle não biodegradado. Por outro lado, cavacos pré-tratados com fungos de decomposição parda não proporcionaram melhorias nas propriedades físicas das polpas e diminuíram o brilho das mesmas,

apesar de também proporcionarem ganhos energéticos.

Uma alternativa interessante para a execução de biodegradações prolongadas foi sugerida em uma patente onde se propõe que a biodegradação seja efetuada no interior de "Containers" durante o transporte dos cavacos de madeira em navios. Este tempo de transporte ocorre normalmente devido a importações desta matéria prima por países europeus [Heden e col., 1988].

Outro enfoque para a biodegradação seletiva de lignina foi a avaliação de condições físico-químicas onde a degradação de lignina é maior que a degradação de polissacarídeos. Neste aspecto, os fatores determinantes foram a concentração de nitrogênio e a adição de um co-substrato (glicose) em culturas de *P. chrysosporium*. Nestes experimentos a biodegradação de celulose foi fortemente inibida pela presença de glicose como co-substrato e a degradação de lignina estimulada a baixas concentrações de nitrogênio [Yang e col., 1980; Tran e Chambers, 1987].

A biodegradação de cavacos de madeira por *P. chrysosporium* em meio suplementado com glicose foi recentemente avaliada [Oriran e col., 1990]. Neste estudo foram observados rendimentos de polpa (em uma posterior etapa de polpação Kraft) 3 a 6% superiores a um controle não biodegradado. Um papel obtido a partir desta polpa apresentou propriedades físicas superiores ao controle não biodegradado.

A aplicação da biodegradação seletiva de lignina também tem sido estudada como uma alternativa ao processo de branqueamento de polpas celulósicas. Outro aspecto é a utilização de simuladores de enzimas ligninolíticas (por exemplo, hemina) para a deslignificação seletiva. Estes aspectos e vários outros relacionados à biopolpação foram alvo de uma revisão recente [Durán e col., 1990].

II.3.2.1 - Mecanismos da degradação de lignina: A avaliação dos mecanismos de biodegradação da madeira e seus componentes aparece como uma das mais importantes abordagens do tema, pois a compreensão destes processos pode levar à manipulação e controle dos mesmos.

Neste sentido, inúmeros trabalhos têm dedicado interesse ao estudo da degradação da celulose [Eriksson e Wood, 1985], hemicelulose [Dekker, 1985] e lignina.

A biodegradação de lignina tem sido estudada através da degradação de compostos modelo de lignina [Higuchi, 1985], ligninas de diferentes procedências [Kirk e Farrel, 1987; Rodríguez e Durán, 1988] e ligninas contidas nos lignocelulósicos (biodegradação "in situ") [Chen e Chang, 1985]. Esta última abordagem é mais realista como modelo, pois trata da degradação de lignina durante a biodegradação do lignocelulósico como um todo. Embora sendo a mais realista, a biodegradação "in situ" esbarra em dificuldades técnicas de isolamento e caracterização dos produtos de degradação.

Em um estudo detalhado desta questão, Kirk e Chang [1974; 1975] demonstraram que ligninas fortemente alteradas podem ser extraídas do lignocelulósico biodegradado residual, através do tratamento deste material com solventes orgânicos. As extrações assim desenvolvidas apresentaram rendimentos baixos, porém os extratos obtidos representam fragmentos de lignina que ficaram retidos fisicamente na matriz do lignocelulósico após a biodegradação.

Outro enfoque da biodegradação "in situ" de lignina é a caracterização dos fragmentos de baixo peso molecular liberados a partir da macromolécula e solubilizados no meio de cultura. Estes fragmentos podem ser obtidos através da extração líquido-líquido do caldo de cultivo e por destilação (remoção de voláteis). Esta abordagem tem sido desenvolvida e levado a inúmeras conclusões a respeito da biodegradação

da lignina "in situ" [Crawford, 1981; Chen e col., 1982].

Os trabalhos envolvendo o mecanismo de biodegradação de lignina têm utilizado em sua grande maioria o Basidiomiceto *P. chrysosporium* e o conhecimento acumulado a respeito deste microorganismo tem sido generalizado para os demais fungos de decomposição branca. As modificações mais óbvias observadas na estrutura de ligninas biodegradadas "in situ" foram o aumento no teor de oxigênio e diminuição no teor de metoxilas. Uma exceção foi a obtenção de uma fração de lignina a partir da madeira "birch" biodegradada por *P. chrysosporium* que apresentou alto teor de hidrogênio e baixo teor de oxigênio em relação a lignina controle (Milled wood lignin), indicando que processos redutivos também ocorrem durante a biodegradação [Chen e Chang, 1985].

Outras evidências de modificações estruturais de ligninas biodegradadas "in situ" têm sido obtidas através de análises espectroscópicas, determinação de grupos funcionais e estudos degradativos, como oxidação com nitrobenzeno e acidólise [ Kirk e Chang, 1974;1975; Chua e col., 1982; Chen e Chang, 1985; Chen e col., 1982; Robert e Chen, 1989; Tai e col., 1990].

Estes estudos proporcionaram observações genéricas sobre o processo de biodegradação de lignina por fungos de decomposição branca e levaram a conclusão de pelo menos tres modos principais de degradação:

- a) Quebra oxidativa de cadeias laterais envolvendo os carbonos e levando a formação de ácidos carboxílicos.
- b) Quebra de ligações  $\beta$ -aryl-éter e conseqüente modificações das cadeias laterais.
- c) Degradação de núcleos aromáticos através de abertura oxidativa dos anéis.

As figuras 5 e 6 mostram mecanismos propostos para a degradação de lignina por fungos de decomposição branca envolvendo a quebra de



estruturas  $\beta$ -O-4 [Chen e Chang, 1985].

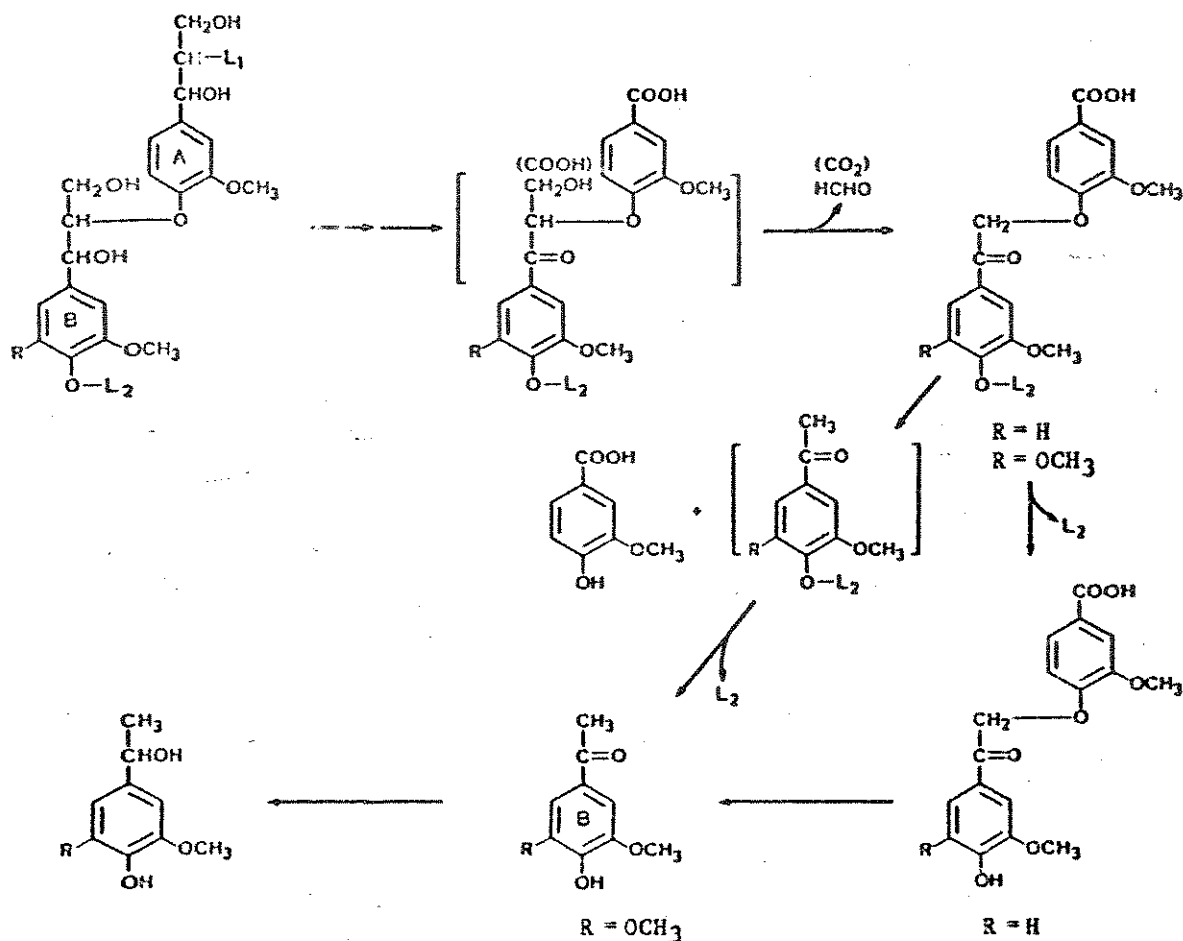


FIG. 5 - Mecanismo proposto para a degradação de lignina (estruturas  $\beta$ -O-4) durante a biodegradação de madeira por fungos de decomposição branca: Quebra de ligações C<sub>α</sub>-C<sub>β</sub> e C<sub>β</sub>-C<sub>γ</sub> [Chen e Chang, 1985].

Estudos simultâneos envolvendo a degradação de ligninas isotopicamente marcadas e diversos compostos modelo de lignina, levaram a demonstração definitiva destes tipos de reações com algumas discrepâncias. As diferenças observadas foram atribuídas a diferentes tipos de cultivo e ao fato de lignina isolada e compostos modelo de lignina não apresentarem as mesmas características físicas que a lignina contida no interior do lignocelulósico [Chen e Chang, 1985; Robert e Chen, 1989].

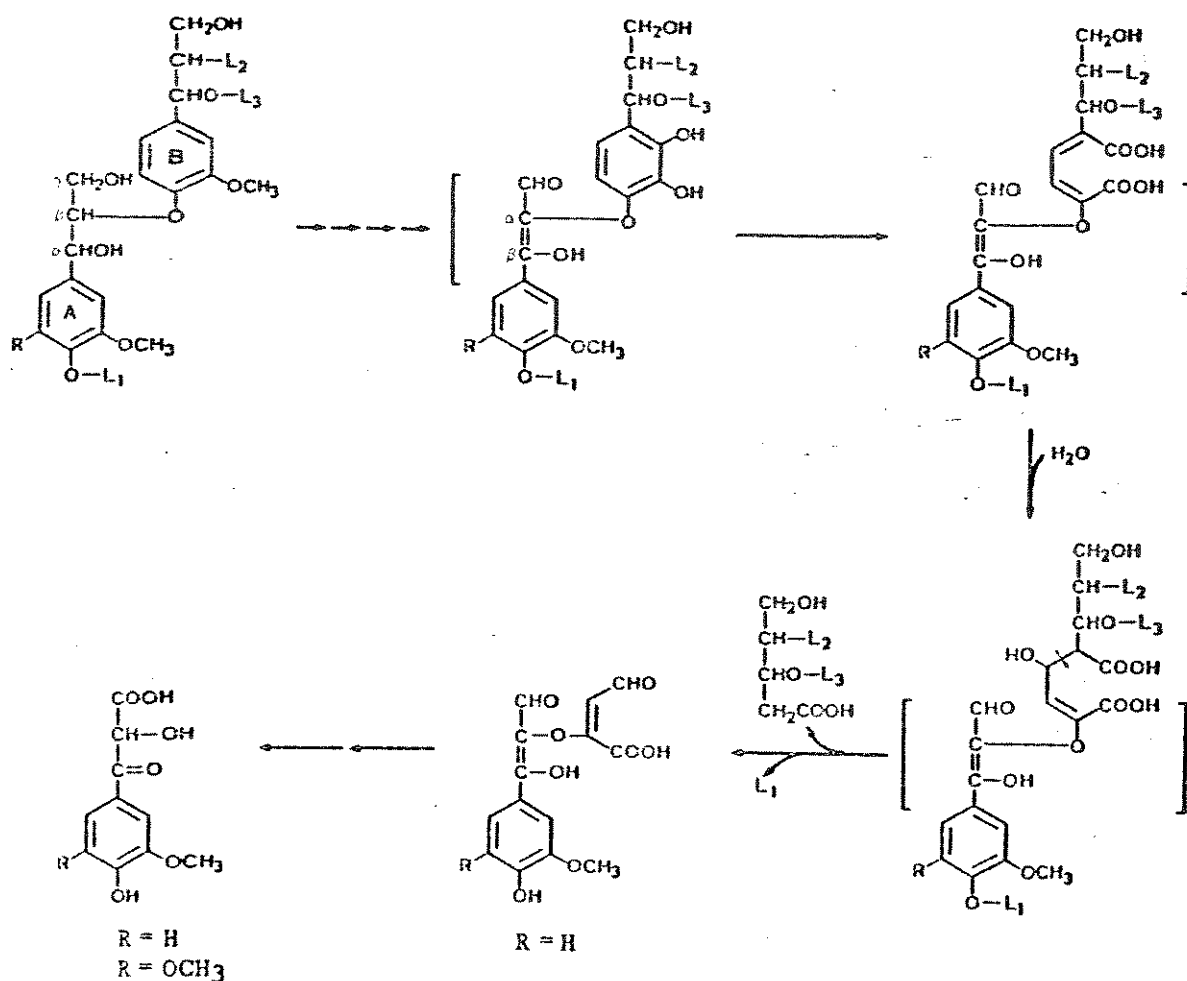


FIG. 6 - Mecanismo proposto para a degradação de lignina (estruturas  $\beta$ -O-4) durante a biodegradação de madeira por fungos de decomposição branca: Quebra oxidativa de anéis aromáticos [Chen e Chang, 1985].

As reações de degradação da lignina ocorrem principalmente através da formação inicial de um radical cátion nos núcleos aromáticos, mediada pela ação das enzimas lignina peroxidases. Este mecanismo foi primeiramente demonstrado para a degradação de 1,2,4,5-tetrametoxi benzeno por lignina peroxidases de *P. chrysosporium*, conforme mostrado na figura 7 [Kersten e col., 1985].

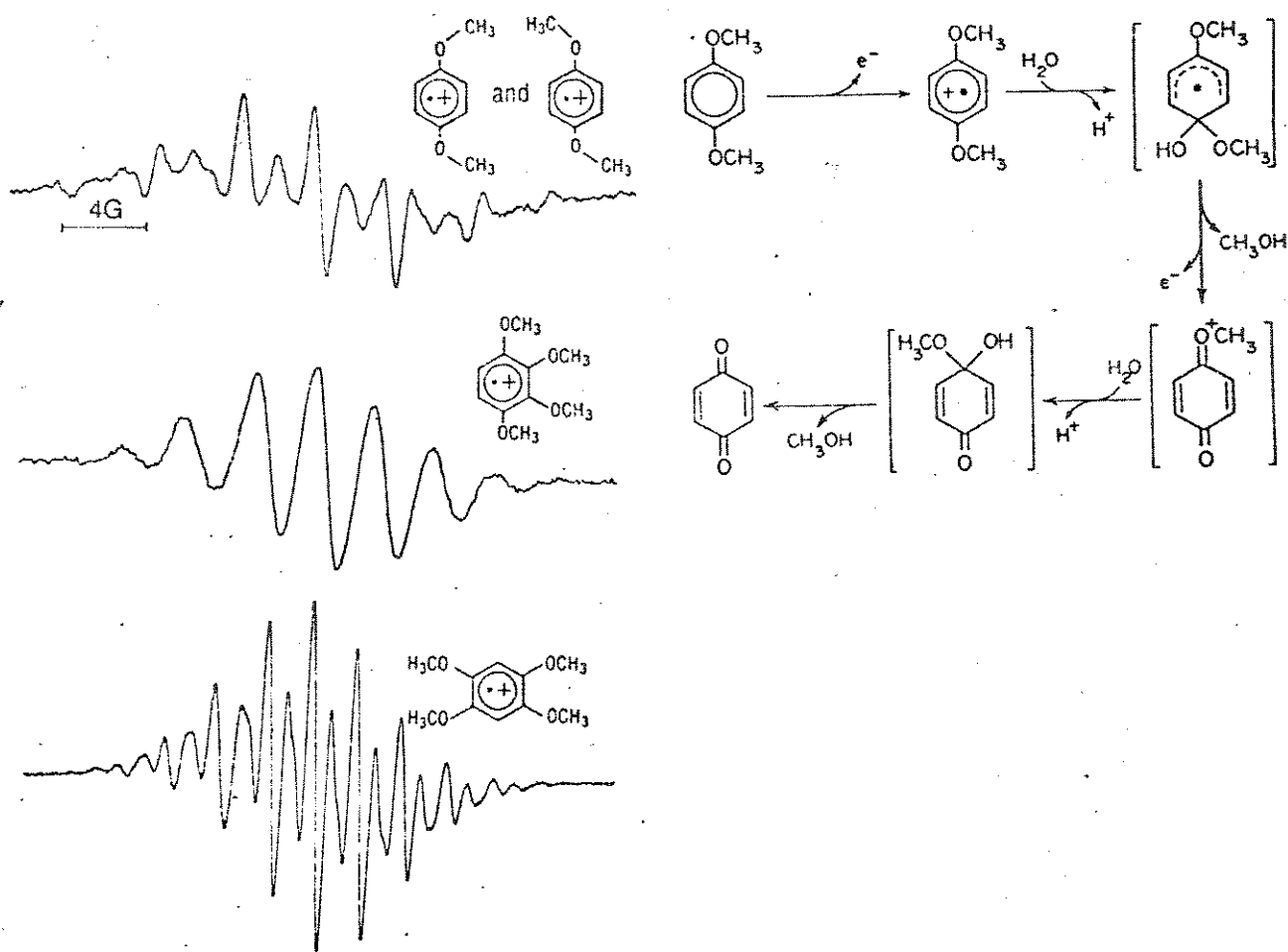


FIG. 7 - Identificação de radical cátion por ressonância paramagnética de elétrons em metoxi-benzenos degradados por lignina peroxidase de *P. chrysosporium* e o mecanismo proposto para a biodegradação.

Com base no conhecimento acumulado sobre a biodegradação de lignina por *P. chrysosporium* e com novas evidências obtidas a partir de espectros quantitativos de RMN- $^{13}\text{C}$  de ligninas biodegradadas "in situ", Robert e Chen [1989] propuseram um mecanismo que seria a principal via de degradação da lignina por este Basidiomiceto. A via de degradação sugerida é mostrada na figura 8 e ilustra o mecanismo a partir da formação inicial de um radical cátion mediado pela ação de lignina peroxidase.

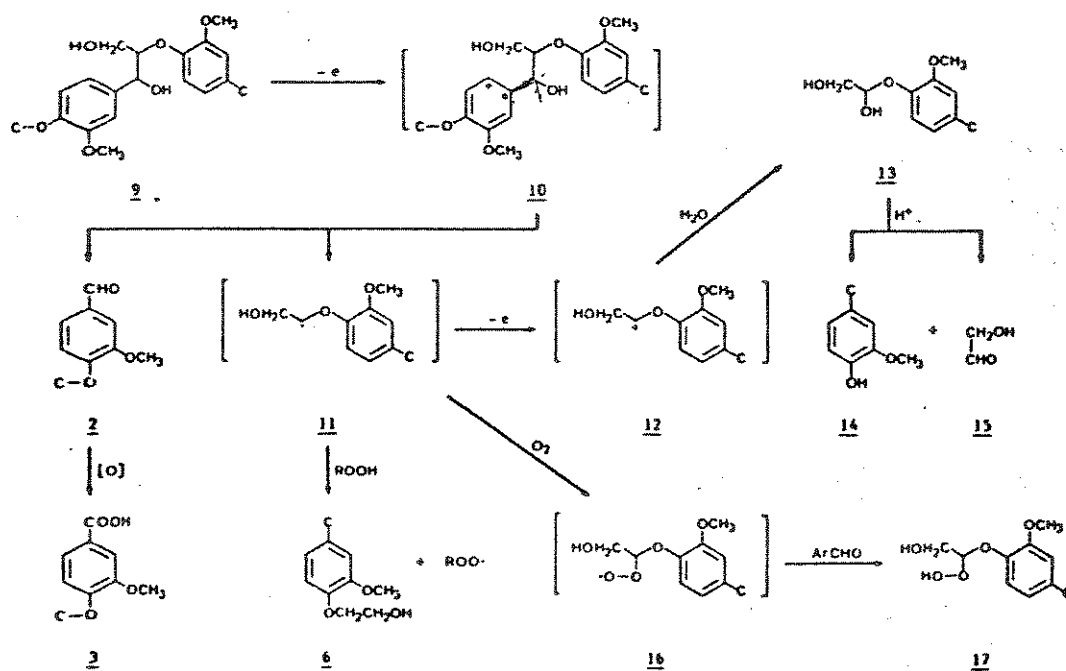


FIG. 8 - Mecanismo para a degradação de lignina durante a biodegradação de madeira por *P. chrysosporium* proposto por Robert e Chen [1989].

A degradação de lignina por várias outras espécies de fungos de decomposição branca, tais como *Coriolus versicolor* e *Phlebia radiata* têm sido desenvolvidas e levado a conclusões semelhantes àquelas obtidas com *P. chrysosporium* [Dodson e col., 1987; Kawai e col., 1988; Enoki e col., 1988].

No caso da degradação de lignina por fungos de decomposição parda Fukuda e Haragushi [1985], reportaram a biodegradação de *Picea jezensis* Carr. (uma madeira mole) por *Tyromyces palustris* onde a lignina residual na madeira apresentou um decréscimo do conteúdo de metoxilas, incremento do conteúdo de hidroxilas fenólicas, decréscimo do conteúdo de hidroxilas alifáticas e um incremento de carboxilas e carbonilas.

Kirk e Adler [1970] reportaram que ligninas residuais de madeira biodegradada por fungos de decomposição parda apresentaram teores de metoxilas significativamente inferiores aos de "milled wood lignin" controle obtida de madeira não biodegradada.

Crawford e col., [1982] reportaram a biodegradação de *Piceas pungens* (uma madeira mole) por *Streptomyces viridosporus* (uma bactéria) e constataram que a lignina residual foi significativamente alterada, mostrando processos de desmetoxilações, abertura de anéis e oxidações das cadeias laterais do polímero, contrariando o conhecimento genérico que indica pequenas modificações da lignina degradada por bactérias.

### II.3.3 - FATORES QUE AFETAM O SISTEMA LIGNINOLITICO DE FUNGOS DE DECOMPOSIÇÃO BRANCA.

Recentemente em um trabalho de Eriksson [1987b], a questão dos parâmetros de cultivo durante a biodegradação de lignina, madeira ou produção de enzimas ligninolíticas, foi extremamente bem discutida. Parece claro até o momento que em culturas de *P. chrysosporium* o sistema ligninolítico é estimulado quando carbono, enxofre e principalmente nitrogênio tornam-se limitantes na cultura. Além destes fatores foi reportado que a presença de álcool veratrílico (3,4-dimetoxi benzil álcool) e lignina no meio, estimulam a produção de enzimas ligninolíticas, indicando uma estreita relação entre biossíntese de álcool veratrílico (pelo fungo) e degradação de lignina [Leisola e Fiechter 1985].

### II.4 - PRODUÇÃO DE PROTEINAS UNICELULARES:

Outro aspecto abordado na degradação de materiais lignocelulósicos é a produção de proteínas unicelulares. O termo proteínas unicelulares (single-cell protein) foi introduzido por C.L. Wilson em 1966 e é atribuído a células de microorganismos, tais como, algas, actinomicetos, bactérias, leveduras, bolores e a fungos superiores, quando

cultivados em larga escala com a finalidade de servir como fonte proteica para alimentação humana e/ou como ração para alimentação animal [Litchfield, 1983].

Inúmeros trabalhos têm sido publicados na área de produção de proteínas unicelulares, sendo que recentemente a utilização de lignocelulósicos como fonte renovável de carboidratos tem merecido interesse especial [Tanaka e Matsuno, 1985; Durán, 1990].

A produção de proteínas unicelulares através do crescimento direto de microorganismos sobre lignocelulósicos mostra-se um processo atrativo, devido a sua simplicidade e possível viabilidade econômica [Tanaka e Matsuno, 1985]. Este processo enfrenta basicamente dois problemas: 1) a dificuldade de separação entre o microorganismo produzido e o material residual e 2) grande parte dos microorganismos lignocelulolíticos apresentam baixos conteúdos proteicos [Tanaka e Matsuno, 1985].

Um aspecto importante da produção de proteínas unicelulares é a avaliação da qualidade destas proteínas, isto é, as características químicas do microorganismo a ser utilizado na alimentação animal ou humana.

O teor proteico de uma ração ou alimento, normalmente é um indicativo de sua qualidade, porém a constituição destas proteínas é de fundamental interesse, pois existem aminoácidos denominados nutricionalmente essenciais, a saber: arginina, leucina, valina, isoleucina, lisina, histina, metionina, treonina, fenilalanina, triptofano e tirosina, que devem ser absorvidos de fontes exógenas pelos animais superiores [Harper, 1961].

Também desempenham fator importante, na qualidade de uma ração ou alimento, os teores de fibras, carboidratos, vitaminas, ácidos nucleicos, lipídeos e sais minerais.

As fibras representam a parte da ração ou alimento que dificilmente são digeridos [Lara e col., 1976].

Os carboidratos, de maneira geral, são a principal fonte de energia para os organismos vivos. As vitaminas atuam de diversas maneiras no organismo, porém sempre em pequenas quantidades. Os animais superiores necessitam absorver a maior parte das vitaminas através de fontes exógenas. Os ácidos nucleicos quando são metabolizados fornecem sub-produtos, tais como o ácido úrico e são indesejáveis quando em altas concentrações nas rações e alimentos. Os lipídeos são constituintes importantes da dieta, não só pelo elevado valor energético, como também, pelas vitaminas lipossolúveis e ácidos graxos essenciais (poliinsaturados) encontrados nas gorduras dos alimentos naturais. Finalmente os sais minerais servem, fundamentalmente, como fonte exógena de elementos como cálcio, magnésio, sódio, potássio e outros metais na forma de traços [Harper, 1961].

Embora tenham sido desenvolvidos muitos trabalhos envolvendo a biodegradação de materiais lignocelulósicos, estes em sua maioria utilizaram o Basidiomiceto *P. chrysosporium* ou outros fungos de decomposição branca da classe dos Basidiomicetos, sendo que o estudo de novos microorganismos é um ponto necessário e ainda em aberto [Kirk, 1987; Jurasek e Paice, 1988; Durán e col., 1990, Eriksson, 1990; Gullién e col., 1990].

O presente trabalho aborda o estudo de um microorganismo pertencente a classe dos Ascomicetos, *C. sitophila*, que apresenta a capacidade de degradar materiais lignocelulósicos.

## II.5 - OBJETIVO

O objetivo desta tese é estudar o Ascomiceto *Chrysonilia sitophila* frente a biodegradação de madeira e seus componentes.

Para a abordagem deste objetivo maior, foram propostos os seguintes objetivos específicos.

- Otimizar as condições de cultivo do Ascomiceto *C. sitophila* utilizando celulose como fonte de carbono.

- Avaliar o potencial deste microorganismo para a produção de proteínas unicelulares a partir de substratos lignocelulósicos e/ou açúcares livres.

- Estudar as condições de cultivo onde *C. sitophila* provoca a máxima deslignificação de madeira.

- Estudar o mecanismo da degradação de lignina durante a biodegradação de madeira por *C. sitophila*.



### III - PARTE EXPERIMENTAL

#### III.1 - OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DE *Chrysonilia sitophila*

III.1.1 - Quantificação do Crescimento Fúngico: Para quantificar o crescimento fúngico foi utilizada a metodologia desenvolvida por Ryan e col. [1943]. O método consiste na inoculação do fungo numa das extremidades de um tubo de crescimento horizontal, como é mostrado na figura 9.

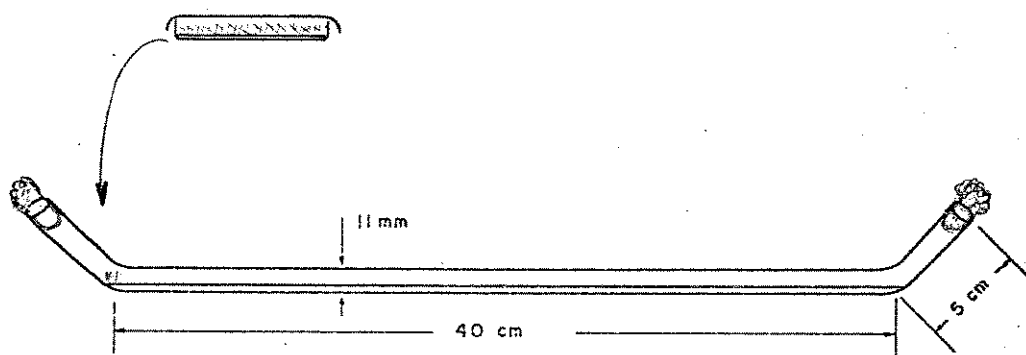


FIG. 9 - Tubo de crescimento horizontal recém inoculado

O tubo foi previamente esterilizado em estufa a 140°C por 4 horas e o meio de cultivo em autoclave a 121°C/1 atm por 15 minutos. Com o auxílio de provetas esterilizadas, 10 ml de meio foram colocados em cada tubo. A progressão da fronteira micelial foi medida contra o tempo, duas vezes ao dia com o auxílio de uma régua. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

## III.1.2 - Composição Química dos Meios Utilizados(\*)

## III.1.2.1 - Meio de Fries Modificado [Ryan e col., 1943]

$(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ (tartarato de amônio).....	5,0 g/l
$\text{NH}_4\text{NO}_3$ .....	1,0 g/l
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	1,0 g/l
$\text{MgSO}_4$ .....	0,5 g/l
$\text{NaCl}$ .....	0,1 g/l
$\text{CaCl}_2$ .....	0,1 g/l
Traços: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .....	0,10 mg/l
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	0,20 mg/l
$\text{MnSO}_4$ .....	0,02 mg/l
$\text{ZnCl}_2$ .....	0,15 mg/l

## III.1.2.2 - Meio de Czapek [DIFCO, 1978]

$\text{NaNO}_3$ .....	3,0 g/l
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ .....	1,0 g/l
$\text{MgSO}_4$ .....	0,5 g/l
$\text{KCl}$ .....	0,5 g/l
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	0,01 g/l

III.1.2.3 - Meio Mínimo com  $\text{NO}_3^-$  (MM  $\text{NO}_3^-$ )

$\text{NaNO}_3$ .....	3,0 g/l
$\text{MgSO}_4$ .....	0,5 g/l
$\text{CaCl}_2$ .....	0,1 g/l
$\text{NaCl}$ .....	0,1 g/l
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	1,0 g/l

III.1.2.4 - Meio Mínimo com  $\text{NH}_4^+$  (MM  $\text{NH}_4^+$ )

Idem ao MM  $\text{NO}_3^-$ , onde  $\text{NaNO}_3$  foi trocado por tartarato de amônio (3,25 g/l).

(\*) - As fontes de nitrogênio (tartarato de amônio e nitrato de amônio) foram substituídas por  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em concentrações pré-determinadas em alguns experimentos conforme citação em legendas de tabelas e figuras.

- No caso da utilização de meios sólidos (placas de Petri e tubos horizontais) foi adicionado 15 g/l de ágar.

- As fontes de carbono utilizadas (glicose, sacarose e celulose) e suas respectivas concentrações estão mencionadas nas legendas de tabelas e figuras.

III.1.3 - Efeito da Temperatura: Foram estudadas as temperaturas na faixa ambiente, isto é, 28, 30, 35 e 37°C. Os tubos com meio de Fries modificado (pH = 5,6) foram inoculados e mantidos em banho termostaticado ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) a uma temperatura pré-determinada.

III.1.4 - Efeito do pH: Foi estudada a faixa de pH 2,7-9,0. O meio de Fries modificado, originalmente com pH 5,6 foi ajustado para cada caso com NaOH 1,0 M ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,0 M. Para evitar a degradação do ágar abaixo de pH 5,0 o ajuste foi feito após a autoclavagem. Posteriormente os tubos foram inoculados e incubados em estufa microbiológica a 28°C.

III.1.5 - Efeito do Ion Tartarato: O meio de Fries modificado foi alterado quanto ao sal tartarato de amônio (5,0 g/l), o qual foi trocado por sulfato de amônio em igual proporção de ions amônio (3,59 g/l). O pH do meio com sulfato de amônio foi ajustado em 6,0. Os tubos foram inoculados e incubados em estufa a 28°C.

III.1.6 - Efeito da Concentração e Fonte de Nitrogênio: Foi testado o crescimento fungal nos meios de Fries e Czapeck e outros dois meios mínimos propostos neste trabalho com diferentes fontes de nitrogênio. Os meios foram ajustados a pH 5,6 com NaOH 1,0 M ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,0 M. Os tubos foram inoculados e incubados em estufa a 28°C.

No meio de Fries modificado foi alterado a fonte de nitrogênio original. A única forma de nitrogênio fornecida foi sulfato de amônio em concentrações que variaram entre 0,0 - 150 mEq N/l. O pH dos meios foram ajustados em 6,0 e os tubos foram inoculados e incubados a 28°C.

III.1.7 - Efeito da Biotina: Foram testadas concentrações de biotina usualmente encontradas em meios de cultivo, isto é, entre 0,0 a 8,0  $\mu\text{g/l}$ . Também foi realizado um experimento onde a concentração de biotina foi de 30,0  $\mu\text{g/l}$ . O meio utilizado foi o de Fries modificado, suplementado com biotina nas concentrações acima descritas. O pH dos

meios foram ajustados em 6,0 e os tubos foram inoculados e incubados em estufa a 28°C.

III.1.8 - Efeito do Tipo de Tampão: Foram utilizados cultivos em erlenmeyers de 125 ml contendo meio de Fries modificado, 1,0% de glicose como fonte de carbono e diferentes tampões à concentração final de 0,05 M e pH 6,0. Os tampões utilizados foram fosfato de potássio, biftalato de potássio e citrato de sódio, 0,05 M, além de uma cultura ajustada a pH 6,0 inicial sem a presença de tampão. As culturas foram inoculadas com 1,0 ml de uma suspensão homogênea de *C. sitophila* (uma alçada de micélio + esporos/10 ml de meio) e incubadas sob agitação circular a 28°C e 80 rpm durante 8 dias (Incubador New Brunswick).

Após 8 dias, o conteúdo dos frascos foi filtrado a vácuo em papéis de filtro previamente secos e pesados. No filtrado foi determinado o pH e o material retido no filtro foi seco a 80°C durante uma noite para a determinação de peso seco do micélio.

III.1.9 - Efeito da Agitação: Foram estudadas culturas submersas agitadas e não agitadas (300 mg de celulose/20 ml de meio Fries modificado), assim como culturas em meio semi-sólido (300 mg de celulose/5 ml de meio de Fries modificado).

Um grupo de erlenmeyers de 125 ml contendo meio de cultivo (líquido ou semi-sólido) foi tamponado com biftalato de potássio 0,05 M em pH 6,0 e outro corrigido o pH inicial em 6,0 com NaOH 1,0 M. Os frascos com cultura não agitadas foram inoculados com 1,0 ml de uma suspensão homogênea de *C. sitophila* (item III.1.8) e incubados em estufa a 28°C. Os frascos com cultura agitada foram inoculados e incubados em agitador termostatizado a 28°C e aproximadamente 80 rpm. A cada dia estudado, o conteúdo dos frascos foi filtrado a vácuo. No filtrado foi determinado o pH. O material retido no papel de filtro foi seco a 80°C por uma noite e então analisado quanto ao teor de proteínas. A

determinação de proteínas foi feita através de extração com NaOH 1,0 M a 100°C por 10 minutos e quantificação pelo método do Biureto (item III.2.9).

### III.2 - ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO MICÉLIO DE *Chrysonilia sitophila*

III.2.1 - Obtenção de Micélio para Análise Química: O micélio foi obtido após 5-10 dias de crescimento em placas de Petri com meio de Fries-1,5% Sacarose a 28°C. Posteriormente o micélio foi seco a 100°C por 4 horas e então analisado.

III.2.2 - Determinação da Porcentagem de Água: Foi determinada pela diferença de peso antes e após a secagem a 80°C durante uma noite. A análise foi feita em triplicata.

III.2.3 - Extração com NaOH 1,0 M: O micélio foi tratado com NaOH 1,0 M a 100°C por 10 minutos (12 mg micélio seco/ml de solução). A solução resultante foi neutralizada com HCl 1,0 M e centrifugada a 2000 rpm por 15 minutos. No sobrenadante foi analisado o teor de proteínas pelo método colorimétrico do Biureto (item III.2.9) e o teor de carboidratos totais pelo método colorimétrico do fenol-ácido sulfúrico (item III.2.10).

III.2.4 - Extração com HCl 0,1 M: O micélio foi tratado com HCl 0,1 M a 121°C/1 atm em autoclave por 1 hora (1,8 mg de micélio seco/ml de solução). O material resultante foi filtrado, lavado com água e o filtrado analisado quanto ao teor de tiamina (item III.2.11).

III.2.5 - Extração com Éter Etilico: O micélio foi extraído com éter etílico anidro sob refluxo por 6 horas a uma velocidade de 2 a 4 gotas/segundo (0,4 mg de micélio seco/ml de éter). O material obtido foi rapidamente filtrado e o filtrado seco a 100°C por 30 minutos. O material seco foi reportado como extrato etéreo [AOAC Methods, 1980a].

III.2.6 - Determinação de Fibras: O micélio foi lavado com 2 porções de éter etílico. O material obtido foi então tratado com  $H_2SO_4$  1,25% (p/v) e NaOH 1,25% (p/v), por 30 minutos sob refluxo em duas etapas distintas (0,4 mg de micélio seco/ml de solução). O material residual foi filtrado em papel de filtro "millipore", lavado e seco a  $105^\circ C$  por uma hora (P1). Posteriormente este resíduo foi incinerado em mufla a  $600^\circ C$  e pesado (P2). A diferença entre P1 e P2 dividido pela massa de amostra x100 forneceu a porcentagem de fibras no micélio [Lara e col., 1976].

III.2.7 - Determinação de Cinzas: O micélio foi incinerado em mufla a  $600^\circ C$ . A massa de resíduo após a incineração dividido pela massa de amostra foi reportada como cinzas [Lara e col., 1976].

III.2.8 - Determinação do Teor de Ácidos Nucleicos:

III.2.8.1 - Análise de Ácidos Nucleicos Totais: O micélio foi lavado sob agitação magnética com acetona a  $4^\circ C$  por 20 minutos (5 mg de micélio seco/ml de solução), seguido de separação e descarte do sobrenadante por centrifugação. Este processo foi repetido mais duas vezes utilizando éter etílico e  $HClO_4$  0,5 M, respectivamente. O micélio resultante do processo anterior foi extraído com 2 ml de  $HClO_4$  0,5 M por 50 minutos a  $70^\circ C$  com frequente agitação. Este último procedimento foi repetido mais uma vez e os extratos foram combinados e diluídos a 10 ml.

O extrato obtido anteriormente foi diluído em 1:100 e lida a absorbância em 260 e 268 nm. Segundo Ceriotti [1959], a absortividade de soluções de ARN e ADN são 30; 28,3  $l.g^{-1}.cm^{-1}$  e 27; 28,4  $l.g^{-1}.cm^{-1}$  em 260 e 268 nm, respectivamente.

Contra a média destes valores em cada comprimento de onda foi calculada a concentração de ácidos nucleicos totais. A concentração de RNA no micélio foi obtida por diferença entre ácidos nucleicos totais

e DNA determinado pelo método colorimétrico da difenilamina (item III.2.8.2).

III.2.8.2 - Análise de ADN: O mesmo extrato obtido no item III.2.8.1 foi analisado quanto ao teor de ADN pelo método da difenilamina. Este método consiste em determinar a desoxirribose do ADN por uma reação com difenilamina [Keyser e col., 1978].

A 2,0 ml de amostra ou solução padrão foram adicionados 2,5 ml de DFA (1,0 g de difenilamina dissolvidos em 20 ml de  $H_2SO_4$  concentrado e 98 ml de ácido acético glacial). Esta mistura foi colocada em um banho em ebulição por 5 minutos. Após resfriamento foi lida a absorvância em 540 nm. A concentração na amostra foi calculada contra curva de calibração com ADN de "Calf Thymus".

III.2.9 - Determinação de Proteínas - Método do Biureto [Plummer, 1978]: Foram adicionados 1,0 ml de amostra e 1,5 ml de Reagente Biureto, agitados e incubados a  $37^\circ C$  por 10 minutos. A absorvância da solução resultante foi lida em 540 nm. A concentração na amostra foi calculada contra curva de calibração com albumina bovina.

Reagente do Biureto:  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  .....2,6 g

$KNaC_4H_4O_6$  .....9,0 g

Diluído a 1,0 l com NaOH 0,2 M contendo 5,0 g de KI.

III.2.10 - Determinação de Carboidratos - Método do Fenol-ácido sulfúrico [Dubois e col., 1956]: Foram adicionados 2,0 ml de amostra, 50  $\mu$ l de fenol 80% (o fenol foi previamente destilado e 8 g foram dissolvidos em 2 ml de água) e 0,5 ml de ácido sulfúrico concentrado, agitados e resfriados a  $25-30^\circ C$ . A absorvância foi lida em 490 nm. A concentração na amostra foi calculada contra curva de calibração com glicose.

III.2.11 - Determinação de Tiamina [AOAC Methods, 1980b]: Foram adicionados 5,0 ml de amostra, 3,0 ml de solução oxidante (4,0 ml de

$K_3(FeCN_6)$  1,0% em 100 ml de NaOH 15%) e 13,0 ml de iso-butanol e agitados por 2 minutos. Na fase de iso-butanol foi determinada a fluorescência a 435 nm com excitação em 365 nm (Fluorímetro Perkin Elmer MP1045). Brancos foram preparados repassando a solução oxidante por NaOH 15%. A concentração na amostra foi calculada contra curva de calibração com dicloreto de tiamina.

III.2.12 - Análise de Aminoácidos (Colaboração Dr. Jaime Baeza): O micélio foi hidrolisado com HCl 6 N na presença de mercaptoetanol (5  $\mu$ l/10ml de HCl 6 N) em atmosfera de nitrogênio por 22 horas (o tubo foi selado a fogo logo após o borbulhamento de nitrogênio). O material obtido foi seco a vácuo e submetido a análise em analisador de aminoácidos Beckman 119L. Uma análise em duplicata foi feita em analisador Aminochron II (IQ-UNICAMP).

III.2.13 - Análise da Distribuição dos Carboidratos (Colaboração Dr. Gerd Wegener): O micélio foi submetido a hidrólise extensiva (4h) com ácido trifluoroacético 80% sob refluxo. O material resultante foi filtrado a vácuo, o filtrado foi neutralizado através da evaporação do ácido trifluoroacético e analisado em analisador de açúcares Biotronik LC2000).

III.1.14 - Análise de Ácidos Graxos (Colaboração Dra Sonia Erazo): O extrato etéreo obtido no item III.2.5 foi saponificado e esterificado com KOH/metanol e então submetido a análise de ácidos graxos por cromatografia gasosa, utilizando uma coluna Chromosorb - LAC 3R-728/5%, forno a 160°C por 2 minutos e aumento posterior de 4°C/minuto até 230°C e detector de ionização de chama (Cromatógrafo Perkin Elmer 3920).

III.2.15 - Estudo dos Carotenóides Presentes no Micélio

III.2.15.1 - Extração com Acetona/Água: O micélio "in natura" foi tratado com acetona/água (80:20) sob agitação com pérolas de vidro por



1 minuto seguido de filtração. O filtrado foi extraído com éter de petróleo. Todo o processo foi desenvolvido na ausência de luz. Da solução etérea foi registrado um espectro visível na região de 350 a 550 nm.

III.2.15.2 - Obtenção de Extratos para Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE): Foram testados 3 diferentes métodos de extração de carotenos, a saber: extração com tetrahidrofurano (THF) por 5 minutos [Bureau e Bushway, 1986], extração subsequente com THF por 30 horas e extração subsequente com acetona por 30 horas. Todos os processos foram desenvolvidos na ausência de luz.

a) Extração com THF por 5 minutos: A extração foi feita com 3 porções de 40 ml de THF (previamente passado por coluna de óxido de alumínio para eliminação de peróxidos) por 5 minutos sob intensa agitação manual, utilizando pérolas de vidro e sulfato de sódio para facilitar a maceração. Os extratos obtidos foram reunidos e evaporados sob pressão reduzida. O material resultante foi dissolvido em éter de petróleo e estocado em geladeira. Uma alíquota deste extrato foi evaporada a temperatura ambiente, redissolvida em clorofórmio e então cromatografada.

b) Extração com THF e Acetona por 30 horas: O micélio residual do processo de extração anterior foi dividido em 4 porções, sendo que 2 foram tratadas com 50 ml de acetona e as outras 2 com 50 ml de THF. Estes sistemas foram agitados a 200 rpm por 30 horas em temperatura ambiente. Os extratos resultantes foram cromatografados.

c) Condições Experimentais para a Cromatografia dos Carotenóides: Coluna  $\mu$ -Bondapak C-18 (Waters); solvente de eluição acetonitrila/THF/água (85:12,5:2,5) a 1,5 ml/minuto; detector em 470 nm (Sistema cromatográfico Waters 6000A).

III.2.15.3 - Obtenção Preparativa de Carotenóides: O micélio foi tratado com lisozima em tampão fosfato de potássio 0,05 M e pH 7,7 por

18 horas (22 mg de lisozima/8,64 g de micélio "in natura") [Norgard e col., 1970]. A suspensão formada foi extraída com acetona fria sob intensa agitação por 3 minutos (utilizando pérolas de vidro para maceração). Os carotenos foram então extraídos com éter de petróleo. A fase etérea foi seca com  $\text{CaCl}_2$  anidro e cromatografada em placa preparativa (alumina neutra, aprox. 1 mm, ativada a  $110^\circ\text{C}$  por 3 horas) utilizando éter de petróleo/acetona/éter etílico (90:5:5) como eluente. Os carotenóides separados foram dessorvidos com acetona/água (80:20) e extraídos com éter de petróleo. Esta fase etérea foi seca com peneira molecular e analisada por espectroscopia visível. Todos os processos foram desenvolvidos na ausência de luz.

III.2.16 - Conversão de Diferentes Substratos à Massa Fúngica: Foram desenvolvidas culturas com diferentes substratos (glicose, sacarose e celulose) em meio de Fries modificado tamponado com biftalato de potássio 0,05 M, pH 6,0 sob agitação de 80 rpm a  $28^\circ\text{C}$  durante 6 dias. No caso de substratos solúveis (glicose e sacarose) foi determinado o peso seco de micélio após filtração e secagem a  $80^\circ\text{C}$  durante uma noite. Para as culturas com substratos insolúveis (celulose), o peso seco de micélio foi determinado indiretamente através da análise de proteínas no resíduo (item III.2.9), assumindo como 40% o teor de proteínas no micélio seco.

III.2.17 - Determinação de Digestibilidade em Madeiras Biodegradadas: Foi feita a biodegradação de madeira *P. radiata* (40 mesh) em meio de Fries com 1,5% de madeira e 0,2% de glicose tamponado com biftalato de potássio 0,05 M a pH 6,0. As culturas foram inoculadas com 1,0 ml de uma suspensão homogênea de *C. sitophila* (item III.1.8) e incubadas a  $28^\circ\text{C}$  e 80 rpm durante 28 dias.

As amostras de madeira residual foram tratadas com celulase comercial (Gist-Brocardes previamente testada, possuindo atividade espe-

cífica de 0,115 U.I./mg de sólido) por 24 horas.

Uma amostra entre 100-200 mg foi exatamente pesada em frascos plásticos de 15 ml; a estes frascos foram adicionados 10 ml de uma solução de celulase em tampão citrato de sódio 0,05 M a pH 4,8 correspondendo a uma atividade de 1,0 U.I./ml. Em cada frasco foram adicionados 1 a 2 gotas de mertiolate para manter o meio estéril e então incubados (na posição horizontal) a 50°C em um agitador a 200 rpm. As amostras foram posteriormente filtradas a vácuo e no filtrado foi determinado o teor de açúcares redutores totais pelo método do DNS (item III.2.18).

III.2.18 - Determinação de Açúcares Redutores Totais - Método do DNS [Mandels e col., 1976]: A 1,0 ml de amostra foram adicionados 0,5 ml de tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 4,8 e 3,0 ml do reagente de DNS. A mistura foi colocada em banho em ebulição por 5 minutos e a absorbância lida em 550 nm. A concentração de açúcares redutores na amostra foi calculada contra curva de calibração com glicose.

Reagente do DNS:

Acido 3,5-dinitrosalicílico	....10,6 g
Hidróxido de sódio	.....19,8 g
Tartarato de sódio e potássio	..306,0 g
Fenol	.....7,6 ml
Bissulfito de sódio	.....8,3 g
Agua	.....1,4 l

### III.3 - BIODEGRADAÇÃO DE MADEIRA POR *Chrysonilia sitophila*

III.3.1 - Preparação da Madeira (Extração com Éter Etilico e Etanol): A madeira de *Pinus radiata* D. Don (30 anos - procedência Chilena) foi moída (aprox. 40 mesh) e extraída com éter etílico em um extrator de Soxhlet até a solução drenada não apresentar coloração (8-10h). Este processo foi repetido com etanol como solvente de extração. A madeira extraída obtida (30,4±0,9 % lignina; 47,5±0,5 % celulose e 22,5±0,4 % hemicelulose) foi utilizada na maioria dos experimentos realizados, exceto quando especialmente mencionado.

III.3.2 - Degradação Seletiva de Lignina - Influência da Concentração de Glicose e Nitrogênio: Aproximadamente 600 mg de madeira foram suspensas em 40 ml de meio de Fries modificado com diferentes concentrações de glicose (0-2%) e sulfato de amônio (0-50 mEq N/l) e esterilizadas a 121°C/1 atm por 10 minutos. Estes frascos (erlenmeyer 250 ml) foram inoculados com 1,0 ml de uma suspensão homogênea de *C. sitophila* (1 alçada de micélio + esporos/10 ml de meio) e incubados durante 15 dias a 28°C em estufa microbiológica sem agitação.

Após 15 dias o material foi filtrado e a madeira mais fungo retidos no papel de filtro foram suspensos várias vezes em água para separação do micélio por flotação. A madeira livre de fungo foi seca a 80°C por uma noite e pesada.

A diferença entre massa inicial e massa obtida nesta etapa foi determinada como perda de peso total. Um branco foi conduzido sem a inoculação de fungo e posteriormente tratado como os demais frascos. A perda de peso deste controle foi descontada da perda de peso total.

Esta madeira foi analisada quanto ao teor de lignina Klason, celulose e hemicelulose (itens III.3.2.1 e III.3.2.2) e a perda de componentes foi calculada como segue:

$$\% \text{ Perda de Componente} = \frac{\text{m. componente inicial} - \text{m. comp. final}}{\text{m. componente inicial}}$$

onde: m. comp. inicial = m. madeira inicial x % do comp. inicial

m. comp. final = m. madeira final x % comp. final

Os cultivos foram feitos em triplicata e cada amostra de madeira foi analisada em duplicata.

III.3.2.1 - Determinação de Lignina Klason: A determinação de lignina Klason foi feita pelo método ASTM [ASTM Methods, 1966a]. Cerca de 200 mg de madeira previamente seca a 80°C durante uma noite foram digeridas com 3 ml de ácido sulfúrico 72% (66.5% v/v) durante 2 horas a 19-20°C sob agitação magnética. A seguir a mistura foi diluída com 72 ml de água e colocada sob refluxo por 4 horas. Ao término do refluxo o material foi filtrado em funil de vidro sinterizado (previamente seco e pesado) e lavado com aproximadamente 100 ml de água destilada quente. O material retido no funil foi seco a 105°C por 2 horas e novamente pesado. O resíduo insolúvel do processo é denominado lignina Klason.

#### III.3.2.2 - Determinação de Celulose e Hemicelulose:

Na fração solúvel da determinação de lignina Klason foi determinado o teor de açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência. A análise foi desenvolvida em coluna BIORAD HPX-87H (45°C), utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 N a 0,6 ml/min como eluente e detector de índice de refração (cromatógrafo HP-1082). Nestas condições glicose é separada dos demais açúcares provenientes da hemicelulose (xilose, manose, galactose e arabinose). O teor de celulose foi calculado como o teor de glicose x 0,9 (fator de hidrólise) e hemicelulose como o teor de xilose e outros açúcares x 0,88 (fator de hidrólise).

III.3.2.3 - Determinação do Índice de Degradação (rot-index): O índice de degradação foi obtido como a porcentagem de solúveis obtidos no tratamento das amostras com NaOH 1,0 % a 100°C durante 1 hora [ASTM Methods, 1966b].

III.3.2.4 - Análise Termogravimétrica: Foi realizado o estudo termogravimétrico de madeiras não inoculada (controle) e biodegradada. As amostras foram previamente pulverizadas em moinho de bolas durante 50 minutos (jarra de porcelana de 30 cm de altura e 16 cm de diâmetro contendo 10 bolas de porcelana com 5 cm de diâmetro) à rotação de aproximadamente 50 rpm. A madeira pulverizada foi lavada com água destilada e seca a 80°C durante 8 horas e posteriormente em dessecador com P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e vácuo durante uma noite. O termograma foi registrado com uma termobalança Perkin-Elmer DSC-2 à velocidade de aquecimento de 15°C/minuto sob atmosfera de nitrogênio.

A partir do termograma obtido foram calculados os valores de  $\ln(-d\ln M/dT)$  e  $1/T$  na faixa de 220°C a 310°C, os quais foram graficados para a obtenção do valor da energia de ativação aparente para a pirólise da madeira [Nguyen e col., 1981] (figuras 30 e 31 - apêndice I).

III.3.3 - Biodegradação de Cavacos: Cavacos de *P. radiata* (4,0 x 3,0 x 0,1 cm) foram extraídos sucessivamente com éter etílico e etanol, conforme descrito no item III.3.1. Posteriormente, foram esterilizados em água a 121°C/1 atm por 10 minutos. A biodegradação foi desenvolvida colocando-se os cavacos em placas de Petri previamente cultivadas com *C. sitophila* em meio de Fries 85 mEq N/l e 1,0 % de glicose durante 3 dias. Após 29 e 46 dias de incubação a 28°C, os cavacos foram retirados, lavados com água, secos a 80°C durante uma noite e pesados.

III.3.3.1 - Determinação de Fenol-oxidases: A presença de fenol oxidases foi observada através da adição de orto-dianisidina 1,0 mM em etanol:água (70:30) sobre as placas cultivadas. O desenvolvimento de coloração avermelhada foi observado após 12 hora [Ander e Eriksson, 1976].

III.3.3.2 - Análise Espectroscópica dos Cavacos Biodegradados: Os cavacos foram analisados antes e depois da biodegradação por espectroscopia de reflectância na região do U.V. . Os espectros foram registrados com o auxílio de um dispositivo para reflectância no espectrofotômetro Zeiss-DMR 21, utilizando MgO como referência. A intensidade de reflexão foi medida nos espectros a cada 5 nm e os dados tratados conforme sugerido por Polcin e Rapson [1969], pela seguinte equação:

$$K/S = (1-R)^2/2R$$

onde: K: fator relacionado à absorção.

S: fator relacionado ao espalhamento (constante em todo comprimento de onda)

R: % de reflectância obtida

Os resultados obtidos para K/S foram graficados como função do comprimento de onda.

Como as intensidades dos espectros diferem de um cavaco para outro, foram normalizados os espectros para um valor inicial (após a autoclavagem) de  $K/S = 10,0$  a 280 nm.

III.3.4 - Estudo do Mecanismo de Degradação da Lignina Durante a Biodegradação de Madeira: A biodegradação foi feita em Erlenmeyers de 1000 ml contendo 5,0 g de madeira moída (40 mesh) e 20 ml de meio de cultura (3 frascos com madeira previamente extraída e 3 frascos com madeira não extraída). Os frascos foram inoculados com micélio de *C.*

*sitophila* obtido após 5 dias de crescimento em meio Fries 85 mEq N/l, 1,0 % glicose, tampão biftalato de potássio 0,05 M, pH 6,0. A inoculação foi feita como segue: após 5 dias de crescimento, o meio original foi trocado por 20 ml de meio recente, agitado energicamente e então adicionado a 5g de madeira previamente esterilizada a seco por 3 horas a 121°C/1 atm. Os frascos inoculados foram incubados a 28-30°C e mantidos estacionários. Foram feitas 3 adições (20 ml, compensando a evaporação) de meio Fries 85 mEq N/l, 1,0 % de glicose, tampão biftalato de potássio 0,05 M, pH 6,0 a cada 10 dias durante 1 mes. Após este período foram feitas adições de solução de glicose 1,0 % a cada 10 dias durante 2 meses. O material residual da biodegradação foi filtrado, lavado com água e seco a 80°C durante uma noite.

O diagrama 1 mostra na forma de diagrama de blocos o procedimento utilizado na obtenção dos produtos de degradação da madeira por *C. sitophila*.

III.3.4.1 - Obtenção da Lignina "Milled Wood Lignin" (MWL): A lignina MWL foi obtida através de um processo de moagem da madeira seguida de extração com dioxano/água [Lai e Sarkanen, 1971]. Cerca de 10 g de madeira previamente extraída e seca, foram colocadas em um moinho de bolas de aço (20 x 14 cm de diâmetro carregado com 20 bolas de aço com 0,5 cm de raio) e embebidas em tolueno destilado. O moinho foi agitado com movimentos circulares (aproximadamente 50 rpm) durante 17 dias a temperatura ambiente. Diariamente foi feita uma nova adição de tolueno para compensar as perdas. Após o processo de moagem, a madeira foi recuperada, lavada com tolueno, água, seca a 80°C durante uma noite e pesada. A madeira moída foi extraída com 150 ml de dioxano/água (9:1) por 24 h a 25-30°C. A extração foi repetida com nova mistura de dioxano/água por 144 h. Os extratos foram combinados, evaporados, secos em dessecador com P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> sob vácuo e pesados. A lignina



obtida foi purificada como segue: a) dissolvida em 16 ml de ácido acético 90% e precipitada em 184 ml de água, filtrada, lavada com 150 ml de água e seca em dessecador; b) redissolvida em 30 ml de 1,2-dicloroetano:etanol (2:1), centrifugada e o sobrenadante precipitado em 150 ml de éter etílico a 4°C, filtrado e lavado com 150 ml de éter etílico. A MWL obtida foi seca em dessecador com P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> sob vácuo por 72 horas e pesada.

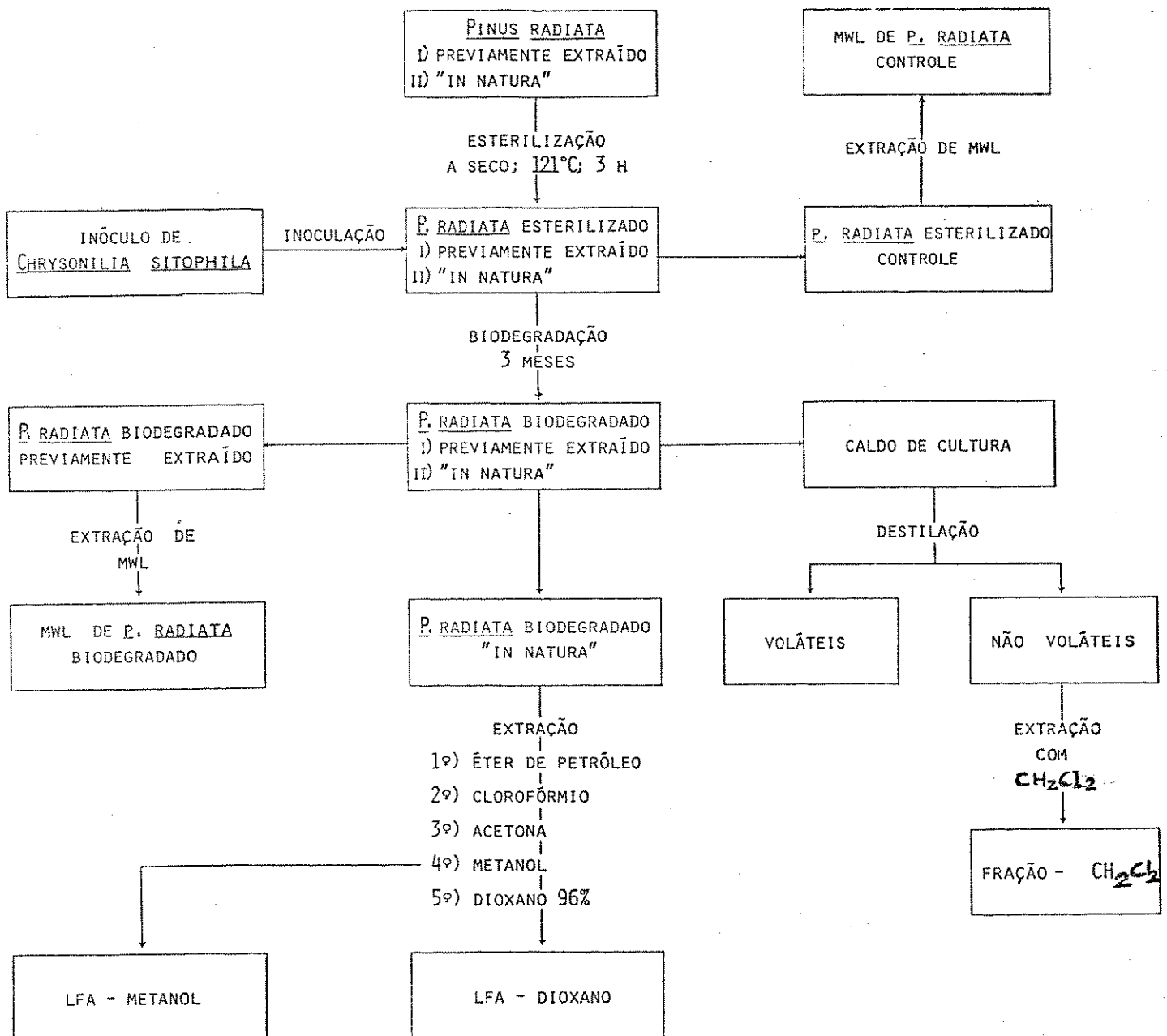


DIAGRAMA 1 - Diagrama de blocos mostrando o procedimento experimental seguido para a obtenção dos produtos de degradação de *Pinus radiata*

por *Chrysonilia sitophila* durante 3 meses.

III.3.4.2 - Obtenção das Ligninas Fortemente Alteradas (LFA): A porção da madeira biodegradada sem prévia extração foi utilizada nesta etapa. Após a biodegradação, a madeira residual foi lavada com excesso de água e então extraída em Soxhlet sucessivamente com éter de petróleo, clorofórmio, acetona, metanol e dioxano 96% ( 8 h/extração). Os extratos em metanol e dioxano foram evaporados sob pressão reduzida e secos em dessecador a vácuo com  $P_2O_5$ . Os produtos obtidos foram denominados como LFA-Dioxano e LFA-Metanol, respectivamente.

III.3.4.3 - Estudo de Sub-produtos do Processo de Biodegradação: Os caldos de cultivo (filtrado) obtidos no item III.3.4 foram tratados como descrito abaixo:

a) Destilação: Os filtrados (diluídos com água de lavagem a cerca de 400 ml) foram destilados sob fluxo constante de nitrogênio durante 15-20 minutos. Os destilados foram coletados e avolumados a 50 ml com água. Estes destilados foram analisados em cromatógrafo a gás Van den 50890A, coluna LM-100 - Polietilenoglicol, nitrogênio como gás de arraste a 4,1 ml/min e detector de ionização de chama. A identificação dos voláteis (etanol e metanol) foi feita através de contaminação da amostra com padrão externo.

b) Extração com  $CH_2Cl_2$ : Após a destilação, o caldo residual foi extraído com  $CH_2Cl_2$  em funil extrator (3 vezes). Os 3 extratos de cada amostra foram combinados, evaporados e pesados. Os extratos foram dissolvidos em 2,0 ml de  $CH_3CN/H_2O(1:8)$  e cromatografados em cromatógrafo líquido de alta eficiência Waters 6000A, coluna  $\mu$ -Bondapak C-18,  $CH_3CN:H_2O$  (1:8 e 1,0% de  $CH_3COOH$ ) como eluente a um fluxo de 1,0 ml/minuto e detector em 280 nm. Alguns monômeros modelo de lignina (álcool veratrílico, aldeído veratrílico e ácido ftálico) foram usados como padrão para uma discriminação dos fragmentos obtidos. Este extra-

to também foi analisado por cromatografia de permeação em gel utilizando uma coluna com Sephadex LH-20 (item III.3.4.4).

III.3.4.4 - Determinação da Distribuição de Pesos Moleculares - Permeação em Gel Sephadex LH-20 e LH-60: Foi preparada uma coluna com Sephadex LH-20 (66 x 1,1 cm) e a permeação em gel foi desenvolvida utilizando os seguintes parâmetros [Connors e col., 1978]:

- Solvente; N,N-dimetilformamida; fluxo 0,30 ml/min (bomba peristáltica LKB).
- Detector U.V. em 275 nm (LKB-UVCORD S2138).
- Registrador LKB 2210).
- Concentração das amostras: Compostos modelo = 1,0 mg/ml; volume injetado = 0,40 ml.  
Ligninas = 2,0 mg/ml; volume injetado = 0,40 ml.
- Calibração - Compostos modelo de lignina: peso molecular 504-168 (figura 32 - apêndice I).
- Volume morto: poliestireno de peso molecular 12500.
- Volume limite inferior de detecção: acetona, peso molecular 68

De maneira semelhante foi preparada uma coluna 60 x 1,0 cm empacotada com Sephadex LH-60 [Connors e col., 1980].

- Solvente: N,N-dimetilformamida/0,1 M LiCl; fluxo; 0,11 ml/min.
- Detecção: Frações de 1,0 ml coletadas e absorvância lida em espectrofotômetro Micronal B382.
- Concentração das amostras: Poliestirenos = 10 mg/ml; volume injetado 0,40 ml (detecção em 254 nm).  
Ligninas = 2,5 mg/ml; volume injetado 0,40 ml (detecção em 280 nm).
- Calibração - Poliestirenos de peso molecular conhecido: 47500; 28000; 25000; 12500; 4000 (figura 33 - apêndice I).

Os cromatogramas obtidos foram integrados em frações de 2 ml e os valores de  $M_w$  (massa molecular média),  $M_n$  (massa molecular média em número) e  $M_w/M_n$  (dispersibilidade) foram calculados pelas equações abaixo [Goring, 1971]:

$$\bar{M}_w = \frac{\sum_i a_i \times M_i}{\sum_i a_i} \quad ; \quad \bar{M}_n = \frac{\sum_i a_i}{\sum_i a_i/M_i} \quad ; \quad \text{Dispersibilidade} = M_w/M_n$$

onde:  $a_i$  = área do cromatograma sob uma fração "i" (2 ml).

$M_i$  = peso molecular para a fração "i" obtido por interpolação na curva de calibração.

III.3.4.5 - Análise Espectroscópica das Ligninas na Região do U.V./Visível: Foi preparada uma solução estoque de cada lignina em dioxano 96% (0,5 mg/ml). Esta solução foi diluída 1:10 com dioxano/água (1:1) e então registrado o espectro U.V.. No caso do espectro visível foi utilizada a solução estoque para obtenção do espectro (Espectrofotômetro Intralab DMS-100). Foi calculada a absorvidade a cada 5 nm na região de 240 - 550 nm. Estes valores foram graficados em função do comprimento de onda.

III.3.4.6 - Análise Espectroscópica das Ligninas na Região do I.V.: Foi registrado o espectro de infra vermelho das ligninas entre 4000 e 800  $\text{cm}^{-1}$  utilizando pastilhas de KBr (2% de lignina) num espectrofotômetro Perkin Elmer 1430.

III.3.4.7 - Acetilação e Espectroscopia RMN das Ligninas: A acetilação foi feita com 50 mg de lignina dissolvidas em 2 ml de piridina e 2 ml de anidrido acético (ou quantidades menores de lignina mantendo-se a proporção de reagentes) [Lenz, 1968]. A mistura foi borbulhada por 15 minutos com nitrogênio e o frasco selado. O sistema foi deixado a temperatura ambiente por 50 h no escuro e o produto recuperado por precipitação em éter etílico frio. A lignina acetilada foi dissolvida

em  $\text{CDCl}_3$  e analisada por espectroscopia RMN- $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

No caso das LFA não ocorreu precipitação em éter etílico e então o excesso de anidrido acético foi degradado pela adição de metanol seguido de evaporação sob pressão reduzida com o auxílio da formação de azeótropos com tolueno e etanol. Finalmente as amostras foram completamente secas em dessecador com  $\text{P}_2\text{O}_5$  sob vácuo (1 mm Hg) por 3 horas.

Os espectros RMN- $^1\text{H}$  foram registrados em espectrômetros Bruker AW 80 e Varian Gemini-300 utilizando tetrametilsilano como referência interna. Os espectros RMN- $^{13}\text{C}$  foram registrados em espectrômetro Varian Gemini-300 utilizando tetrametilsilano como referência interna.

III.3.4.2.8 - Determinação de Carbonilas (Estruturas tipo Coniferil aldeído e Acetoguaiacona): Foi utilizado o método descrito por Adler e Marton [1959]. Uma solução de lignina (solução estoque item III.3.4.5) foi reduzida pela adição de borohidreto de sódio (260-300 mg/mg de lignina) e deixada durante 15 horas no escuro. Esta solução foi posteriormente acidificada a pH 2,0, diluída com dioxano/água (1:1) e utilizada como branco para a obtenção de um espectro U.V. diferencial de uma amostra em mesma concentração porém não reduzida. O espectro U.V. foi registrado na região 250 - 400 nm (espectrofotômetro Intralab DMS-100) e o teor de carbonilas foi calculado com base nas absorvidades do coniferil aldeído e da acetoguaiacona (figuras 34-37 - apêndice I/Espectros; figuras 58 e 59 - apêndice II/estruturas).

III.3.4.9 - Determinação de Hidroxilas Fenólicas: Foi utilizado o método descrito por Wexler [1964]. Uma solução de lignina (diluição da solução estoque, item III.3.4.5 em dioxano/água (1:1)) que foi acidificada até pH 1,0 com a adição de HCl 1,0 M foi utilizada como referência para a obtenção de um espectro U.V. diferencial utilizando como amostra uma solução em mesma concentração, porém basificada a pH 13,0. O espectro foi registrado entre 220-340 nm e o teor de hidroxilas fe-

nólicas calculados com base nas absorvidades em 255 nm de compostos modelo previamente reportadas [Wexler, 1964] (figuras 38-41 - Apêndice I).

III.3.4.10 - Determinação de metoxilas nas MWLs: O teor de metoxilas foi determinado segundo o método descrito por Browing [1967]. Cerca de 50 mg de lignina foram tratadas com 6,0 ml de HI e 2,0 ml de anidrido propiônico em um Kit para determinação de metoxilas (figura 42 - apêndice I). A digestão foi feita durante 40 minutos a 150°C sob fluxo constante de nitrogênio. O destilado passa por um frasco lavador contendo uma suspensão de fósforo vermelho (60 mg/100 ml de água) e é coletado em uma solução de bromo (0,7 ml de Br<sub>2</sub> e 20 ml de solução acetato de sódio 10% em ácido acético/anidrido acético 9:1), na qual ocorre a formação de I<sub>2</sub>. O I<sub>2</sub> formado foi então titulado com tiosulfato de sódio previamente padronizado. A partir do volume gasto na titulação, calculou-se a porcentagem de metoxilas na amostra (figura 42 - apêndice I).

III.3.4.2.11 - Análise Elementar: Foi realizada a determinação dos elementos Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio em analisador elementar (Perkin Elmer CHN-2400 e IQ-USP).

#### IV - RESULTADOS E DISCUSSAO

Como mencionado anteriormente, a necessidade do estudo de novos microorganismos capazes de degradar lignocelulósicos é um ponto necessário ao conhecimento dos processos de degradação e suas possíveis aplicações tecnológicas. Neste contexto desenvolvemos o estudo do ascomiceto *C. sitophila* utilizando substratos como madeira, celulose e açúcares livres, visando abranger diversos aspectos relacionados à biodegradação de lignocelulósicos.

##### IV.1 - OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DE *C. sitophila*

Foram avaliados diversos fatores físicos e químicos relacionados ao crescimento do ascomiceto *C. sitophila*. A metodologia do cultivo em tubos horizontais foi empregada para o monitoramento do crescimento fúngico em função do tempo, conforme descrito por Ryan e col. [1943].

IV.1.1 - Quantificação do crescimento fúngico - Linearidade do método: Um gráfico típico do avanço da fronteira micelial versus o tempo é mostrado na figura 10. A inclinação da reta obtida foi definida como a velocidade de crescimento do fungo, sendo que em todos os experimentos desenvolvidos as retas apresentaram coeficientes de correlação maiores ou iguais a 0,98 [Ferraz e Durán, 1989].

Inicialmente observamos que a velocidade de crescimento apresentou certa variabilidade numa mesma condição de cultivo, desenvolvida em diferentes séries de experimentos (variação máxima em relação a média = 4,8%). Desta forma, em cada série foi conduzido um experimento em condições padronizadas (Meio de Fries modificado, pH 6,0, 85 mEq N/l a 28°C). A velocidade de crescimento média obtida nestas condições foi 2,68 mm/h, sendo que desvios desse valor foram normalizados juntamente com os demais experimentos da mesma série.

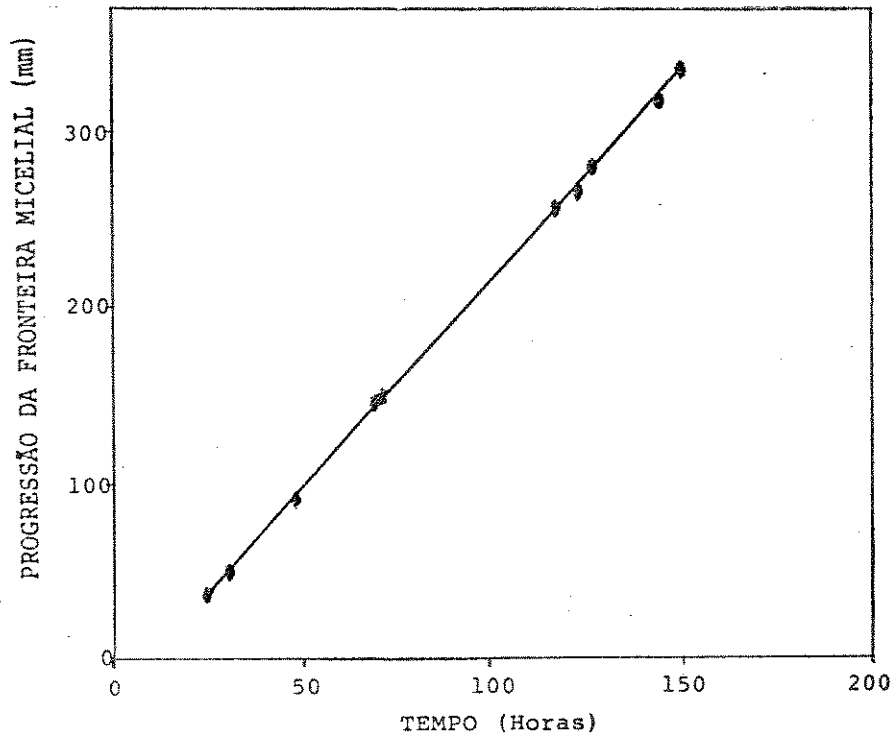


FIG. 10 - Progressão da fronteira micelial de *Chysonilia sitophila* em função do tempo em um tubo de crescimento horizontal. Meio de Fries modificado, 1,5%  $\alpha$ -celulose, 85 mEq N/l, pH 5,6 a 37°C.

IV.1.2 - Efeito da temperatura: Foram estudadas temperaturas na faixa de 28-37°C. As velocidades de crescimento obtidas estão mostradas na tabela 1 e indicam pouca variação na velocidade de crescimento dentro da faixa de temperatura estudada. Este resultado é interessante, uma vez que um controle rígido de temperatura não é necessário durante o crescimento.

TAB. 1 - Efeito da temperatura na velocidade de crescimento de *Chysonilia sitophila*(\*)

Temperatura (°C)	Velocidade de Crescimento (mm/h)
28	2,68 $\pm$ 0,05
30	2,41 $\pm$ 0,06
35	2,44 $\pm$ 0,05
37	2,37 $\pm$ 0,07

(\*) Meio de Fries modificado, 1,5% de  $\alpha$ -celulose, 85 mEq N/l, pH 5,6.



IV.1.3 - Efeito do pH: Foram estudados cultivos na faixa de pH 2,7 a 9,0. Os resultados obtidos estão mostrados na figura 11. A máxima velocidade de crescimento foi obtida em pH 6,0, sendo restrita a faixa ótima entre 5,6 a 6,3. Este resultado indicou a necessidade de controle do pH em culturas com meio líquido, considerando que alterações do pH provocadas durante o crescimento fúngico são bastante comuns. Cabe ressaltar que na metodologia do tubo horizontal, a variação de pH do meio utilizado pelo microorganismo é desprezível, já que a fronteira micelial sempre cresce em um setor ainda intacto [Ryan e col., 1943]:

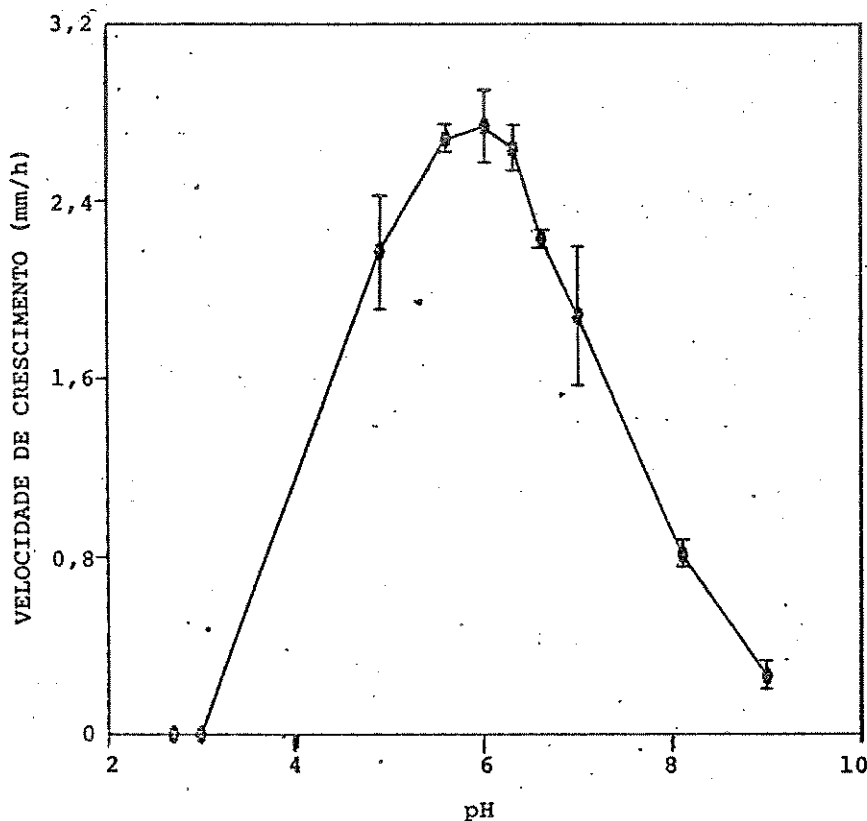


FIG. 11 - Efeito do pH na velocidade de crescimento de *Chrysonilia sitophila*. Meio de Fries modificado, 1,5% de  $\alpha$ -celulose, 85 mEq N/l a 28°C.

IV.1.4 - Efeito de Ions Tartarato e da Fonte e Concentração de Nitrogênio: O efeito de íons tartarato foi estudado considerando que este ânion está presente na principal fonte de nitrogênio do meio de

Fries, na forma de tartarato de amônio. Os resultados obtidos estão mostrados na tabela 2.

TAB 2 - Efeito do íon tartarato na velocidade de crescimento de *Chrysonilia sitophila* (\*)

Meio de Fries modificado	Velocidade de crescimento (mm/h)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> como (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,67 ± 0,05
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> como (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> )	2,68 ± 0,04

(\*) Meio de Fries modificado, 1,5% de  $\alpha$ -celulose, 85 mEq N/l, pH 5,6 a 28°C

Os resultados obtidos indicaram que o ânion tartarato não é metabolizado como fonte de carbono e também não atua como inibidor do crescimento.

No estudo da fonte de nitrogênio mais adequada ao crescimento de *C. sitophila*, avaliamos dois meios de cultivo tradicionais: Czapek e Fries, além de duas composições mínimas de sais propostos neste trabalho. O meio de Czapek e o meio de Fries apresentam NaNO<sub>3</sub> e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>)/NaNO<sub>3</sub> como fontes de nitrogênio, respectivamente. As duas composições de sais propostas apresentam os nutrientes básicos além de uma fonte de nitrogênio na forma de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (MM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e MM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, respectivamente). Os resultados obtidos estão mostrados na tabela 3.

Os resultados provenientes dos MM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e MM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> indicaram que o fungo utiliza indiscriminadamente NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> como fontes de nitrogênio. A utilização de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup> como fonte de nitrogênio proporciona a vantagem de empregar-se qualquer dos dois íons dependendo da disponibilidade, enquanto que numerosos fungos necessitam de uma forma específica de nitrogênio como NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, uréia ou amino ácidos [Moore-Landecker, 1972].

TAB 3 - Efeito da composição do meio de cultura e da fonte de nitrogênio na velocidade de crescimento de *Chrysonilia sitophila* (\*)

Meio	Concentração de Nitrogênio (mEq/l)	Velocidade de Crescimento (mm/h)
Fries modificado	85	2,67 ± 0,03
Czapek	35	2,46 ± 0,09
MM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	35	2,22 ± 0,05
MM NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	35	2,31 ± 0,24

(\*) Meio indicado acima com 1,5% de  $\alpha$ -celulose, pH 6,0 a 28°C.

O efeito da concentração de nitrogênio na velocidade de crescimento de *C. sitophila* foi estudado na faixa de 0 a 150 mEq N/l. Os resultados obtidos estão mostrados na figura 12. Pode-se notar uma velocidade de crescimento máxima na faixa de 50 a 150 mEq N/l e ainda que ocorreu crescimento a níveis constitutivos de nitrogênio. Este último resultado mostra que *C. sitophila* é capaz de reciclar seu próprio nitrogênio como no caso dos Basidiomicetos [Leisola e Fiechter, 1985].

IV.1.5 - Efeito da concentração de biotina: Várias espécies de *Neurosporas* estudadas por Ryan e col. [1943] apresentaram dependência de biotina para o crescimento. Neste sentido foi avaliado o efeito desta vitamina no crescimento de *C. sitophila* utilizando concentrações na faixa de 0 a 30  $\mu$ g/l. Os resultados obtidos estão mostrados na tabela 4. Pudemos notar que em contraste com várias espécies de *Neurosporas*, o Ascomiceto *C. sitophila* não apresentou mudança significativa na velocidade de crescimento devido a presença de biotina no meio de cultura.

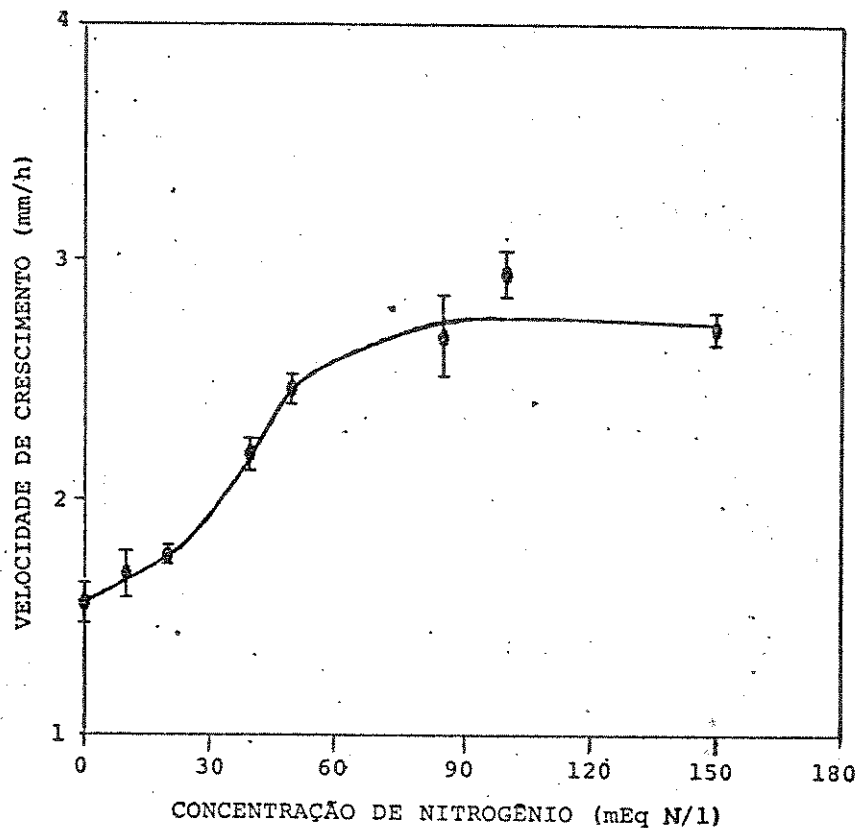


FIG. 12 - Efeito da concentração de nitrogênio na velocidade de crescimento de *Chrysonilia sitophila*. Meio de Fries modificado, 1,5%  $\alpha$ -celulose, pH 6,0 a 28°C.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como única fonte de nitrogênio.

TAB. 4 - Efeito da concentração de biotina na velocidade de crescimento de *Chrysonilia sitophila* (\*)

Biotina ( $\mu\text{g/l}$ )	Velocidade de crescimento (mm/h)
0,0	$2,68 \pm 0,13$
2,0	$2,87 \pm 0,14$
4,0	$2,74 \pm 0,13$
8,0	$2,82 \pm 0,10$
30,0	$2,76 \pm 0,03$

(\*) Meio de Fries modificado, 1,5% de  $\alpha$ -celulose, 85 mEq N/l, pH 6,0 a 28°C.

A metodologia do tubo horizontal utilizada proporcionou a avaliação do efeito dos principais fatores físicos e químicos sobre a velocidade de crescimento de *C. sitophila*. No entanto, enquanto a metodologia utilizada relaciona a progressão da fronteira micelial (crescimento) com o tempo como uma função linear, o crescimento fúngico medido pelo aumento de massa não apresenta-se como uma função linear, conforme mostrado na figura 13 (item IV.1.6). Este fato implica que em última análise, a otimização da velocidade de crescimento poderia não corresponder exatamente às condições ótimas de crescimento baseadas no acúmulo de massa fúngica com o tempo [Cooney, 1981].

IV.1.6 - Efeito do Tipo de Tampão e da Agitação: Após a avaliação de parâmetros básicos relacionados às condições de cultivo de *C. sitophila*, desenvolvemos o estudo de um tampão apropriado para a realização de culturas em meio líquido. Os resultados obtidos estão mostrados na tabela 5. Podemos notar que o crescimento fúngico não foi fortemente afetado devido a natureza dos tampões, porém fica evidente que o tampão mais indicado é o biftalato de potássio/ácido ftálico, uma vez que apresenta maior capacidade tamponante na faixa de pH 6,0.

TAB. 5 - Crescimento de *Chysonilia sitophila* em culturas líquidas utilizando diferentes tampões (\*).

Tampão utilizado	Peso seco do micélio(mg)	pH final da cultura
Não Tamponado	72,7 ± 2,3	2,4 ± 0,1
Fosfato	76,5 ± 4,9	3,5 ± 0,1
Biftalato	75,3 ± 3,0	5,0 ± 0,1
Citrato	90,2 ± 5,9	8,1 ± 0,1

(\*) Meio de Fries modificado, 1,0% de glicose (20 ml), 85 mEq N/l, agitação de 80 rpm a 28°C. Todos os tampões 0,05 M, pH inicial 6,0. Peso seco e pH final determinados após 8 dias de crescimento.

Definido um tampão apropriado estudamos o efeito da agitação no crescimento de *C. sitophila*, bem como a utilização de culturas semi-sólidas (figura 13).

A agitação apresentou um efeito marcante no crescimento fúngico, considerando que sob agitação o resíduo celulósico apresentou 2 vezes mais proteínas que o resíduo de culturas não agitadas. Em culturas com meio semi-sólido foram observados teores de proteína no resíduo celulósico comparáveis aos obtidos em culturas agitadas, indicando que o efetivo crescimento de *C. sitophila*, utilizando substratos insolúveis como celulose, necessita de um contato eficiente entre micélio e o substrato em questão.

Nestes cultivos, o efeito tamponante do biftalato foi avaliado através de medidas do pH nos filtrados das culturas em diferentes dias. Os resultados obtidos indicaram pequenas mudanças no pH, sendo que não foram observados valores inferiores a 5,6. Culturas semelhantes desenvolvidas sem a utilização de tampão apresentaram quedas de pH até 4,5, enquanto que os teores de proteína no resíduo celulósico foram semelhantes aos obtidos em culturas tamponadas até o 4º e 5º dias, porém um teor inferior de proteínas no resíduo após 8 e 9 dias de cultivo foi observado.

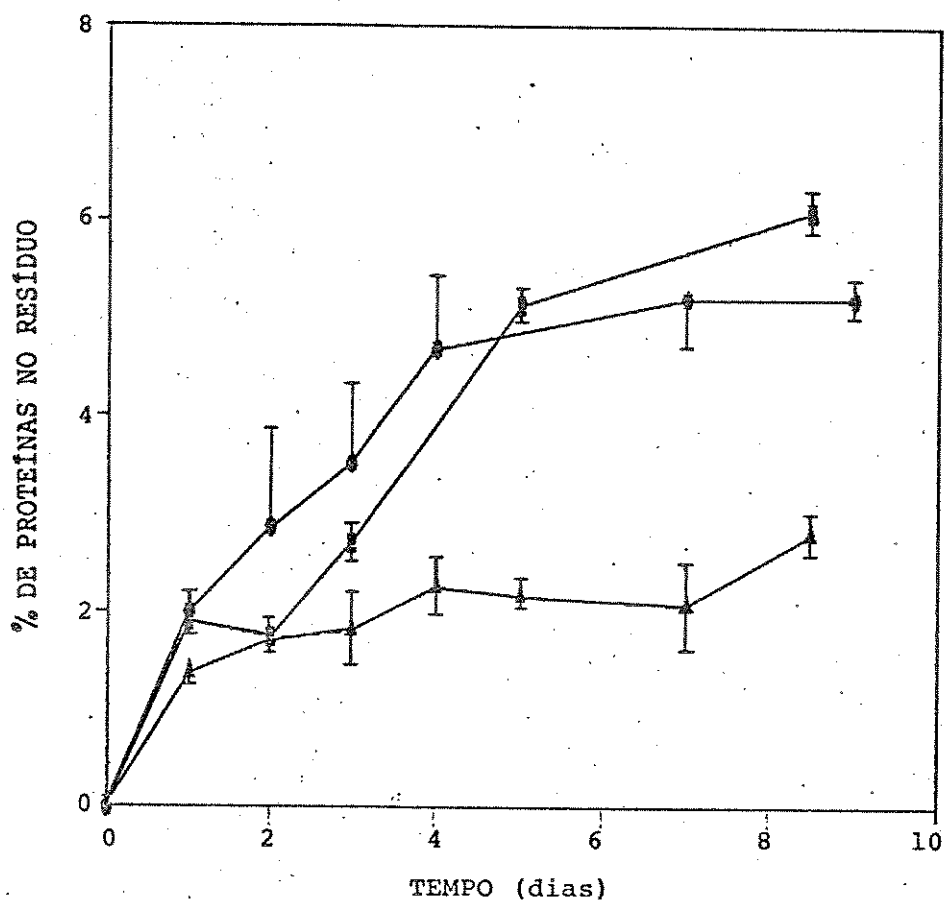


FIG. 13 - Crescimento de *Chrysonilia sitophila* em culturas estacionárias (—▲—); agitadas a 80 rpm (—■—); e meio semi-sólido (—●—). Meio de Fries modificado, 85 mEq N/l, Biftalato 0,05M, pH 6,0 a 28°C (item III.1.9).

OBS.: As barras de erro indicadas somente em um sentido têm como correspondência igual erro no outro sentido.

#### IV.2 - ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO MICÉLIO DE *C. sitophila*:

O estudo da composição química do micélio de *C. sitophila* foi desenvolvido visando avaliar o potencial deste microorganismo para a produção de proteínas unicelulares. Os teores de cada componente foram comparados aos reportados para microorganismos em estudo ou já utilizados em formulações de ração animal ou em dietas de alimentação humana.

IV.2.1 - Composição Química: A distribuição dos principais componentes presentes no micélio de *C. sitophila* está mostrada na tabela 6. O teor de água observado no micélio "in natura" foi  $56 \pm 4 \%$ .

TAB. 6 - Composição química do micélio de *Chrysonilia sitophila*(\*)

Componente	Porcentagem (peso/peso)
Proteínas	$39,2 \pm 1,5$
Carboidratos	$29,3 \pm 2,2$
Extrato etéreo	$12,1 \pm 1,6$
Fibras	$5,6 \pm 1,0$
Cinzas	$3,3 \pm 0,2$
Acidos nucleicos totais	$3,3 \pm 0,2$
ARN	$2,6 \pm 0,4$
ADN	$0,7 \pm 0,2$

(\*) Micélio obtido em placas de Petri com 5-10 dias de crescimento em meio de Fries-1,5% sacarose a 28°C, 85 mEq N/l e pH 6,0.

O teor proteico no micélio de *C. sitophila* é comparável aos encontrados na literatura para várias espécies de leveduras (34-50%) [Lichifield, 1983], a *Sporotrichum pulverulentum* (= *P. chryso sporium*) (38%) [Thomke e col., 1980] e a *Chaetomium cellulolyticum* (45%) [Waslien e Steinkraus, 1980], já utilizados na produção de proteínas uni-



celulares. Devemos ressaltar que um dos principais inconvenientes para a produção de proteínas unicelulares diretamente a partir de materiais lignocelulósicos é o baixo conteúdo proteico normalmente encontrado nos microorganismos celulolíticos [Tanaka e Matsuno, 1985].

Dentro deste contexto, o Ascomiceto *C. sitophila* apresenta um enorme potencial para a produção de proteínas unicelulares a partir de materiais lignocelulósicos, considerando sua capacidade em metabolizar este tipo de substrato [Durán e col., 1988 a e b; Ferraz e Durán, 1989; Freer e col., 1990] aliado ao seu alto teor proteico.

O teor de carboidratos no micélio de *C. sitophila* foi superior ao reportado para "Torula Yeast" (20,5%) e inferior ao de *Rhizopus* sp. (40%) [Shay e Wegner, 1985; Sales e col., 1983]. O teor de extrato etéreo é um indicativo do conteúdo de ácidos graxos, porém no caso da extração do micélio de *C. sitophila* com éter etílico, ocorreu uma extração simultânea de carotenóides, os quais contribuíram para o elevado teor observado.

O teor de fibras observado foi pouco superior ao reportado para "Torula Yeast" enquanto que o teor de cinzas foi compatível aos reportados para este último e *Rhizopus* sp. [Shay e Wegner, 1985; Sales e col., 1983].

Quando comparamos os teores de ácidos nucleicos presentes no micélio de *C. sitophila* aos observados em leveduras (6-12%), algas (3-8%), bactérias (8-16%) [Kihlberg, 1972] e fungos filamentosos (8-10%) [Reed, 1983], podemos notar que o Ascomiceto em questão apresenta teores inferiores aos reportados para a maioria dos microorganismos utilizados na produção de proteínas unicelulares. Este resultado é um bom indicativo, pois o aparecimento de sub-produtos indesejáveis na metabolização dos ácidos nucleicos, tais como ácido úrico, seriam minimizados no consumo de uma proteína à base de *C. sitophila*.

Neste ponto fez-se necessário uma análise detalhada de cada componente do micélio de *C. sitophila* visando avaliar com profundidade o potencial deste microorganismo para a produção de proteínas unicelulares.

IV.2.2 - Composição em Aminoácidos: A composição em aminoácidos das proteínas do micélio de *C. sitophila* está mostrada na tabela 7.

TAB. 7 - Distribuição dos aminoácidos no micélio de *Chrysonilia sitophila* (\*).

Aminoácido	% (g a.a./100 g proteína)	FAO-WHO [1965]
Ac. aspártico	13,06	-
Treonina	5,12	2,8
Serina	5,23	-
Ac. Glutâmico	20,12	-
Prolina	6,51	-
Glicina	7,40	-
Alanina	8,79	-
Valina	9,46	4,2
Metionina	1,89	2,2
Isoleucina	1,45	4,9
Leucina	7,90	4,8
Tirosina	1,07	2,8
Fenilalanina	4,12	2,8
Lisina	3,03	4,2
Histidina	0,01	-
Arginina	4,82	-
Cisteína	0,06	1,2

(\*) Micélio obtido em placas de Petri com 5-10 dias de crescimento em meio de Fries-1,5% sacarose a 28°C, 85 mEq N/l e pH 6,0. O desvio máximo observado para a análise de aminoácidos foi de 3% .

Quando comparamos os teores de aminoácidos obtidos para *C. sitophila* com outros microorganismos e cereais, podemos notar que: os teores de ácido aspártico, prolina, glicina, alanina e valina são superiores aos reportados para *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium* sp., *Trichoderma viride*, *Chaetomium* sp., "Torula Yeast", *Rhizopus* sp., *Geotrichium candidum*, farinha de milho e farinha de amendoim; treonina e serina são superiores a *Chaetomium* sp., *T. viride* e compatível aos demais indicados anteriormente; ácido glutâmico é superior a *A. fumigatus*, *Penicillium* sp., *T. viride*, *Chaetomium* sp., *G. candidum*, compatível a farinha de amendoim, farinha de soja e inferior a "Torula Yeast"; leucina e metionina são compatíveis a todos anteriormente citados; fenilalanina é inferior a todos anteriormente citados com exceção de *Penicillium* sp.; lisina, cisteína e arginina são inferiores a todos anteriormente citados com exceção de farinha de amendoim e farinha de soja; isoleucina e tirosina são inferiores a todos anteriormente citados [Shay e Wegner, 1985; Rogers e col., 1972; Sales e col., 1983].

De maneira geral, pudemos notar que a qualidade das proteínas de *C. sitophila* com relação a constituição de aminoácidos, é comparável a dos microorganismos e cereais anteriormente descritos. Ressaltamos ainda que a maioria dos aminoácidos de *C. sitophila* se enquadram nos níveis mínimos sugeridos pela FAO para uma proteína destinada a alimentação [FAO-WHO, 1965], com exceção de isoleucina, tirosina, cisteína e lisina.

Freer e col. [1990] demonstraram que as proteínas de *C. sitophila* apresentaram valores nutricionais (relação aminoácido essencial/ aminoácidos totais) superiores aos recomendados pela FAO e comparáveis aos das proteínas do ovo e caseína, sendo os aminoácidos sulfurados os únicos limitantes. Outros aspectos sobre a composição de aminoácidos

das proteínas de *C. sitophila* foram estudados recentemente [O'Reilly e col., 1991; Freer e col., 1990] e indicaram que dependendo do substrato utilizado como fonte de carbono observaram-se diferentes distribuições de amino ácidos.

IV.2.3 - Composição em Açúcares: A composição de açúcares presentes nos carboidratos totais de *C. sitophila* está mostrada na tabela 8, onde podemos observar a predominância de glicose.

TAB. 8 - Distribuição de carboidratos no micélio de  
*Chrysonilia sitophila* (\*)

Carboidrato	% (g do açúcar/100 g carboidratos totais)
Manose	10,4
Frutose	1,5
Galactose	6,9
Xilose	0,8
Glucose	80,3

(\*) Micélio obtido em placas de Petri com 5-10 dias de crescimento em meio de Fries-1,5% sacarose a 28°C, 85 mEq N/l e pH 6,0. O desvio máximo observado em análise de açúcares foi de 7,5 % .

IV.2.4 - Composição em Ácidos Graxos: A composição de ácidos graxos presentes no extrato etéreo de *C. sitophila* está mostrada na tabela 9.

Observamos uma composição bastante variada de ácidos graxos, sendo que o teor do ácido graxo essencial linolênico (C 18:3) e de ácido esteárico (C 18) foram superiores aos reportados para "Torula Yeast" e *Rhizopus* sp. [Shay e Wegner, 1985; Sales e col., 1983]. Os demais ácidos graxos apresentam-se em quantidades compatíveis com os microorganismos anteriormente citados, com excessão de ácido linoleico (C 18:2)

que apresenta-se em pequena quantidade.

TAB.9 - Distribuição de ácidos graxos no micélio de  
*Chrysonilia sitophila* (\*).

Acido graxo		% (g de ác. graxo/100 de ác. graxo total)
Cáprico	(C 6)	2,7
Caprílico	(C 8)	2,6
Capróico	(C 10)	1,1
Laurico	(C 12)	3,5
Mirístico	(C 14)	4,0
Palmitico	(C 16)	7,4
Palmitoleico	(C 16:1)	6,0
Esteárico	(C 18)	11,6
Oleico	(C 18:1)	18,0
Linoleico	(C 18:2)	13,6
Linolênico	(C 18:3)	9,5
Outros		20,0

(\*) Micélio obtido em placas de Petri com 5-10 dias de crescimento em meio de Fries-1,5% sacarose a 28°C, 85 mEq N/l e pH 6,0. O desvio máximo observado em análise de ácidos graxos foi de 7,5% .

IV.2.5 - Estudo dos Carotenóides: O extrato etéreo de *C. sitophila* apresentou uma quantidade significativa de carotenóides, os quais são responsáveis pela coloração rósea deste Ascomiceto. Com o objetivo de estudar estes carotenóides de maneira qualitativa e quantitativa, foram desenvolvidos extrações do micélio utilizando solventes orgânicos.

Inicialmente foi feita uma extração do micélio "in natura" com acetona/água fria durante 1 minuto. O extrato apresentou coloração

alaranjada característica e um espectro visível com máximos pouco definidos em 448, 470 e 495 nm indicando a presença de carotenos [Vetter e col., 1971].

Experimentos posteriores realizando extração descrita por Bureau e Bushway [1986] foram desenvolvidos utilizando Tetrahidrofurano (THF). Como após 5 minutos de extração o micélio residual ainda apresentou coloração rósea, foram feitas extrações subsequentes por 30 horas com THF ou acetona.

A análise cromatográfica (CLAE) destes extratos indicaram a presença de vários compostos conforme mostrado nas figuras 14 e 15.

A partir da análise dos extratos obtidos após 30 horas de extração subsequente à extração de 5 minutos (fig. 15), podemos notar claramente que em prolongados tempos de extração, os carotenóides são degradados a compostos ainda coloridos, porém muitas frações devem ser formadas (diminuição dos picos com tempo de retenção entre 7 e 12 minutos, com aumento de absorbância posterior sem definição de picos). Estes resultados indicaram que extrações prolongadas não são adequadas para a obtenção destes carotenóides.

Embora as extrações por 30 horas proporcionarem maiores descolorações, o micélio residual ainda apresentou coloração rósea inviabilizando desta forma, a determinação quantitativa dos carotenóides.

A obtenção preparativa dos carotenóides de *C. sitophila* foi desenvolvida com extração precedida de uma proteólise, conforme descrito por Norgard e col. [1970]. A separação dos carotenóides feita em placa cromatográfica preparativa, indicou a existência de 6 compostos com bandas distintas, sendo que 3 deles apresentaram coloração alaranjada intensa.

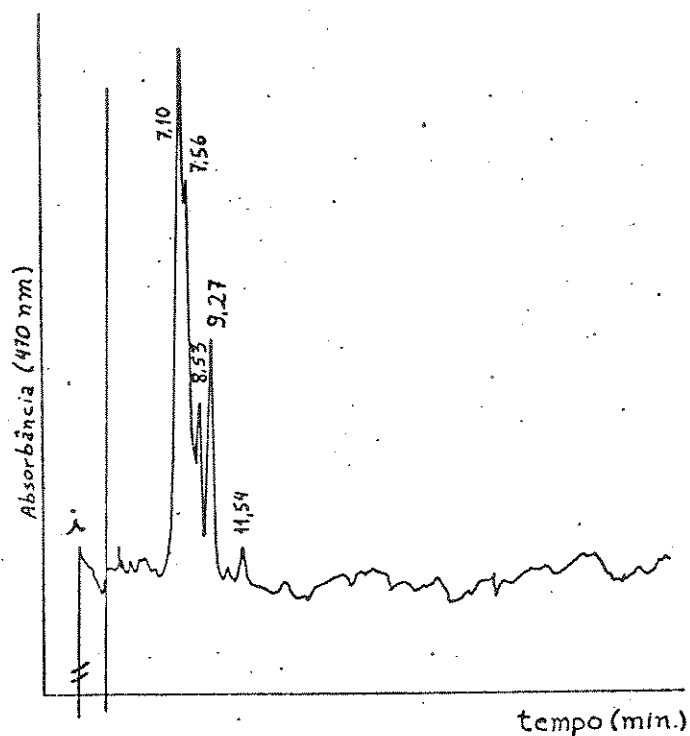


FIG. 14 - Cromatograma (CLAE) dos carotenóides presentes no extrato de THF/5 minutos obtido a partir do micélio de *Chrysonilia sitophila*. Coluna  $\mu$ -Bondapak C-18, solvente acetonitrila/THF/água (85:12,5:2,5) 1,5 ml/min (item III.2.15.2, p. 29).

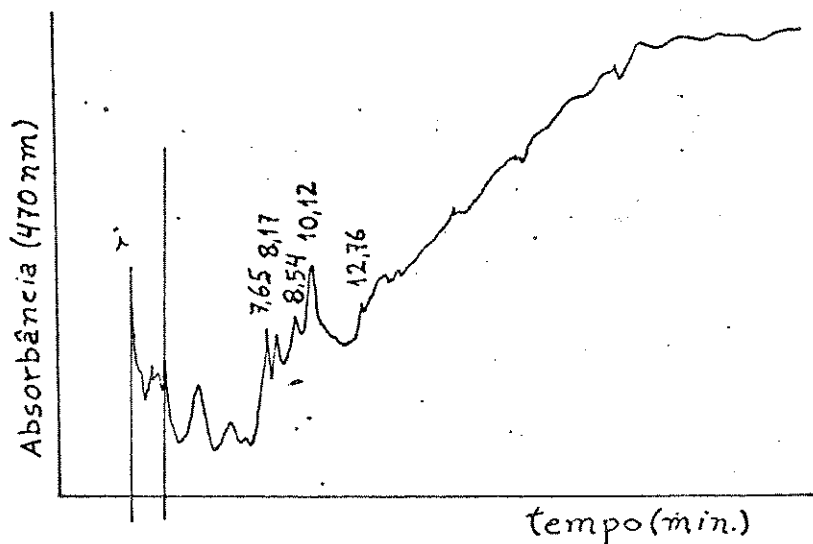


FIG. 15 - Cromatograma (CLAE) dos carotenóides presentes no extrato de THF/30 horas obtidos a partir do micélio de *Chrysonilia sitophila*. Coluna  $\mu$ -Bondapak C-18, solvente acetonitrila/THF/água (85:12,5:2,5) 1,5 ml/min (item III.2.15.2, p. 29).

A pureza de cada fração separada foi monitorada por cromatografia de camada delgada. Os espectros Visível de 2 desses compostos estão mostrados nas figuras 16 e 17. O terceiro composto de coloração alaranjada apresentou-se em pequena quantidade e sua recuperação não foi possível.

O composto nº 1 apresentou um espectro visível de máximos pouco definidos (fig. 16), típico de carotenos substituídos com funções aldeídos, ésteres ou epóxidos. O composto nº 2 apresentou um espectro visível com máximos em regiões típicas do licopeno (fig. 175 - 446, 472, 505 nm) [Vetter e col., 1971].

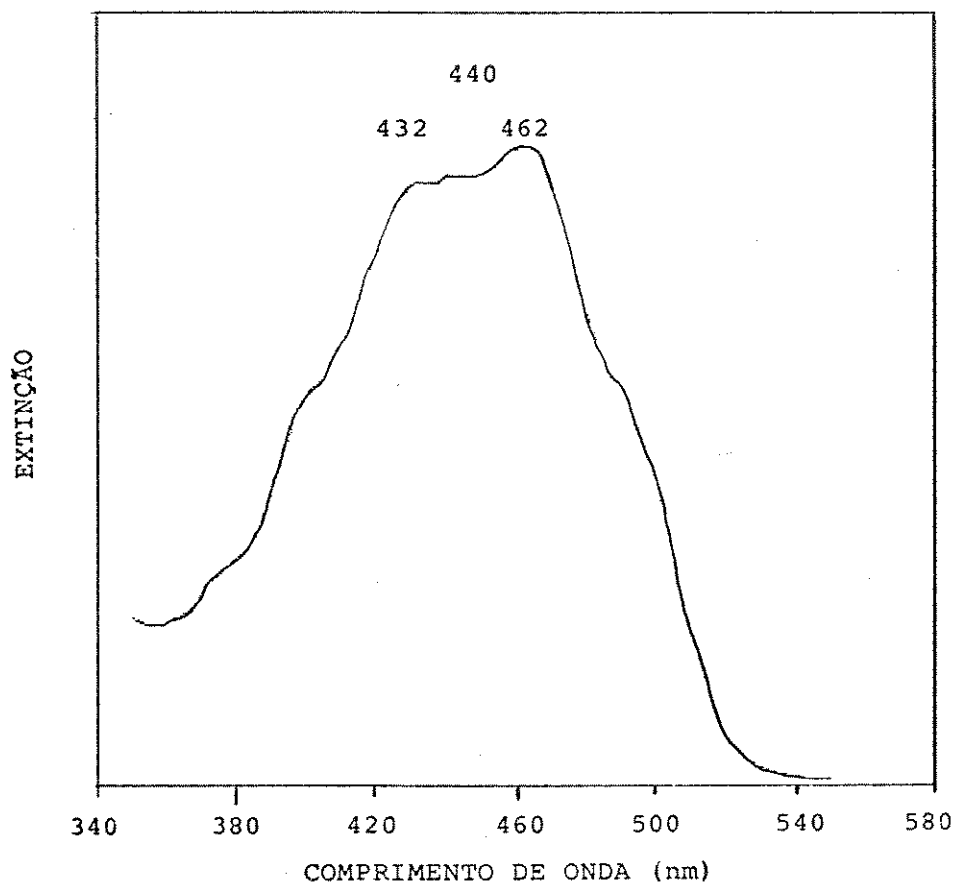


FIG. 16 - Espectro Visível de um caroteno purificado a partir do extrato-preparativo/éter de petróleo do micélio de *Chrysonilia sitophila*. Composto nº 1. Solvente utilizado éter de petróleo.



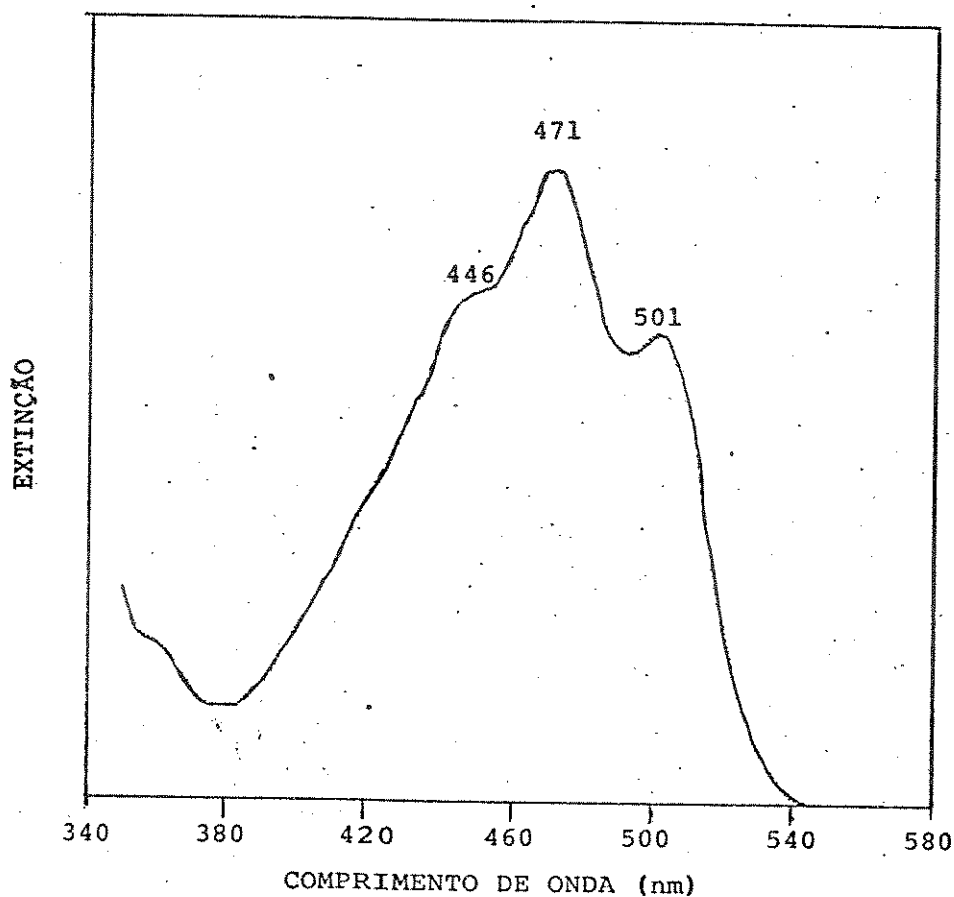


FIG. 17 - Espectro Visível de um caroteno purificado a partir do extrato-preparativo/éter de petróleo do micélio de *Chrysonilia sitophila*. Composto nº 2. Solvente utilizado éter de petróleo.

Estudos posteriores [O'Reilly e col., 1991] envolvendo os carotenóides de *C. sitophila* indicaram a presença de compostos pertencentes aos grupos das apoxantinas, xantophilas e aos  $\beta$ -carotenos, porém nenhum destes compostos foram preparados e identificados definitivamente até o momento.

Como ilustrativo do teor de vitaminas no micélio de *C. sitophila*, foi determinado o teor de tiamina (1,93 mg/g de micélio seco).

De maneira geral foi observado que a composição química de *C. sitophila* coloca este Ascomiceto como um microorganismo potencial para a produção de proteínas unicelulares visando não somente a suplementação de rações animais, como também para a utilização em dietas de alimentação humana. De fato, espécies semelhantes a *C. sitophila*, as *Neurosporas sitophila e crassa*, têm sido extensamente utilizadas na produção de fermentados de farelo de amendoim, um alimento típico da Indonésia denominado "Ontjon" [Quinn e col., 1975; Beuchat, 1976; Fardaiz e Markakis, 1981].

IV.2.6 - Avaliação da Conversão de Diferentes Substratos à Massa Fúngica: Após a avaliação das características químicas do micélio de *C. sitophila* estudamos a capacidade de conversão de diferentes substratos à massa fúngica. Os rendimentos de conversão (g de micélio seco/g de substrato total) obtidos para glicose(1,0%), sacarose(1,0%) e celulose(1,5%) foram 0,38; 0,24 e 0,14, respectivamente (ao 6º dia de crescimento). A conversão de glicose obtida é comparável a observada para várias espécies de fungos e bactérias (0,34-0,51) [Nagay, 1979].

IV.2.7 - Avaliação da Digestibilidade de Madeira Biodegradada: Estudos da digestibilidade de serragem de *Pinus radiata* biodegradado durante 28 dias mostraram que a madeira biodegradada teve sua digestibilidade (à celulasas comerciais) aumentada em 1,8 vezes (4,5 e 8,0 mg de glicose produzida/100 g de madeira nas madeiras não tratada e biodegradada, respectivamente).

#### IV.3 - BIODEGRADAÇÃO DE MADEIRA POR *Chrysonilia sitophila*

IV.3.1 - Degradação Seletiva de Lignina - Avaliação das Condições de Cultivo: Em relação ao aspecto da biodegradação de lignocelulósicos que envolve a busca de métodos alternativos de polpação, estudamos o efeito dos dois principais fatores que afetam a degradação seletiva de lignina durante a biodegradação da madeira, conforme descrito em estudos com Basidiomicetos [Yang e col., 1980; Leisola e Fiechter, 1985; Tran e Chambers, 1987]. Estes dois fatores compreendem a concentração de nitrogênio no meio de cultura e a adição de um co-substrato, como glicose.

Os resultados obtidos estão mostrados nas figuras 18 e 19. A figura 18 mostra que as perdas de celulose foram maiores que as perdas de lignina em todas as concentrações de nitrogênio estudadas, quando não foi adicionado um co-substrato ao meio de cultura. No entanto, quando as culturas continham 1% de glicose (fig.19), as perdas de lignina foram superiores às de celulose apresentando um máximo de 18 % a 10 mEq N/l. Observa-se então, que a adição de 1% de glicose ao meio proporcionou a inibição da ação e/ou produção das celulases, bem como um crescimento mais efetivo de fungo (peso seco de micélio 2,1 vezes superior aqueles observados em culturas sem glicose), ocasionando maior deslignificação da madeira.

A variação da concentração de nitrogênio mostrou que em 10 mEq N/l foi obtida a maior deslignificação quando na presença de 1% de glicose como co-substrato. Nas culturas com 0% de glicose a deslignificação não foi significativamente alterada pela concentração de nitrogênio.

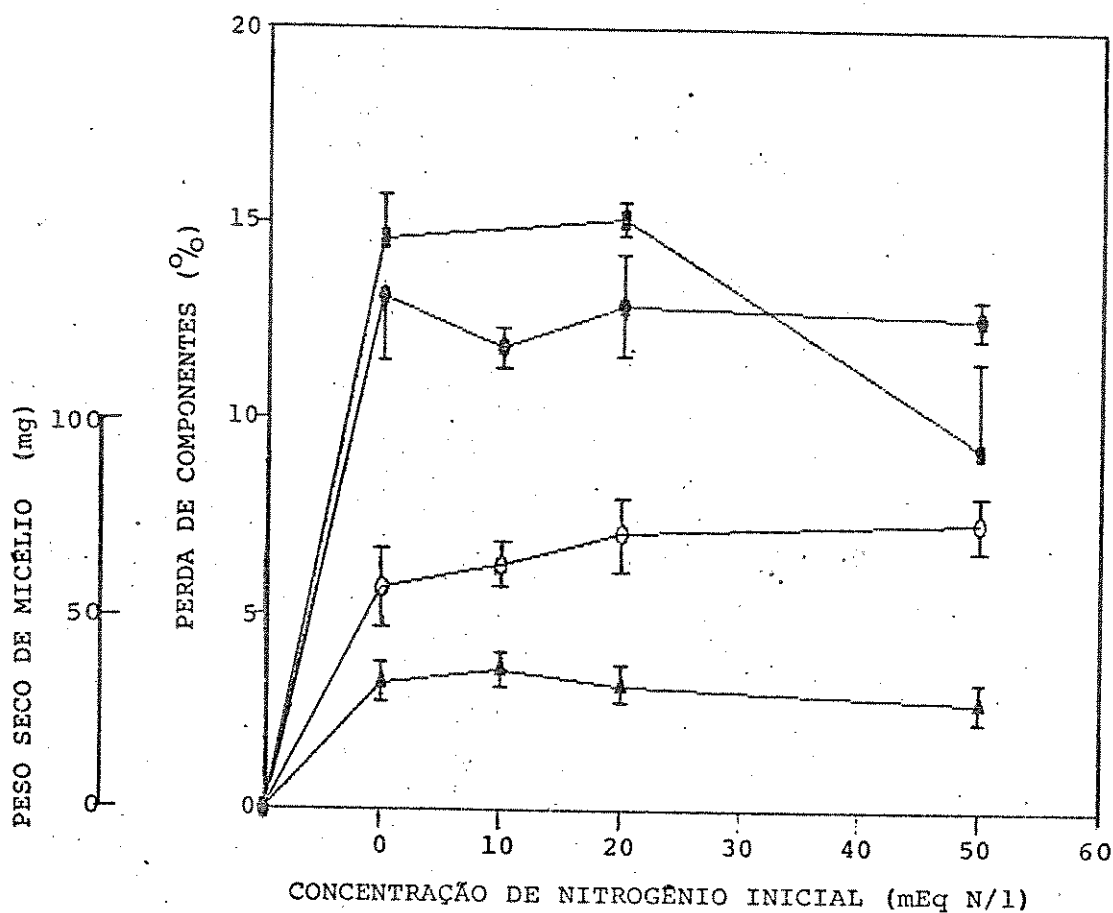


FIG. 18 - Perda de componentes na madeira de *Pinus radiata* após 15 dias de biodegradação por *Chrysonilia sitophila* na ausência de um co-substrato (0 % de glicose) em concentrações variáveis de nitrogênio. (—▲—) Perda de Peso; (—●—) Perda de Lignina; (—■—) Perda de celulose; (—○—) Peso seco de micélio. Meio de Fries modificado - 0,0% de glicose, 3% de madeira, 28°C, tampão biftalato 0,05M, pH 6,0.

Em todos experimentos desenvolvidos as perdas de hemiceluloses foram inferiores a 2% ficando dentro da faixa do erro experimental.

Outro experimento foi desenvolvido utilizando concentrações de glicose entre 0 e 2% e 10 mEq N/l, sendo que a máxima perda de lignina obtida foi em 1% de glicose e a perda de carboidratos não foi inibida significativamente acima desta concentração de glicose.

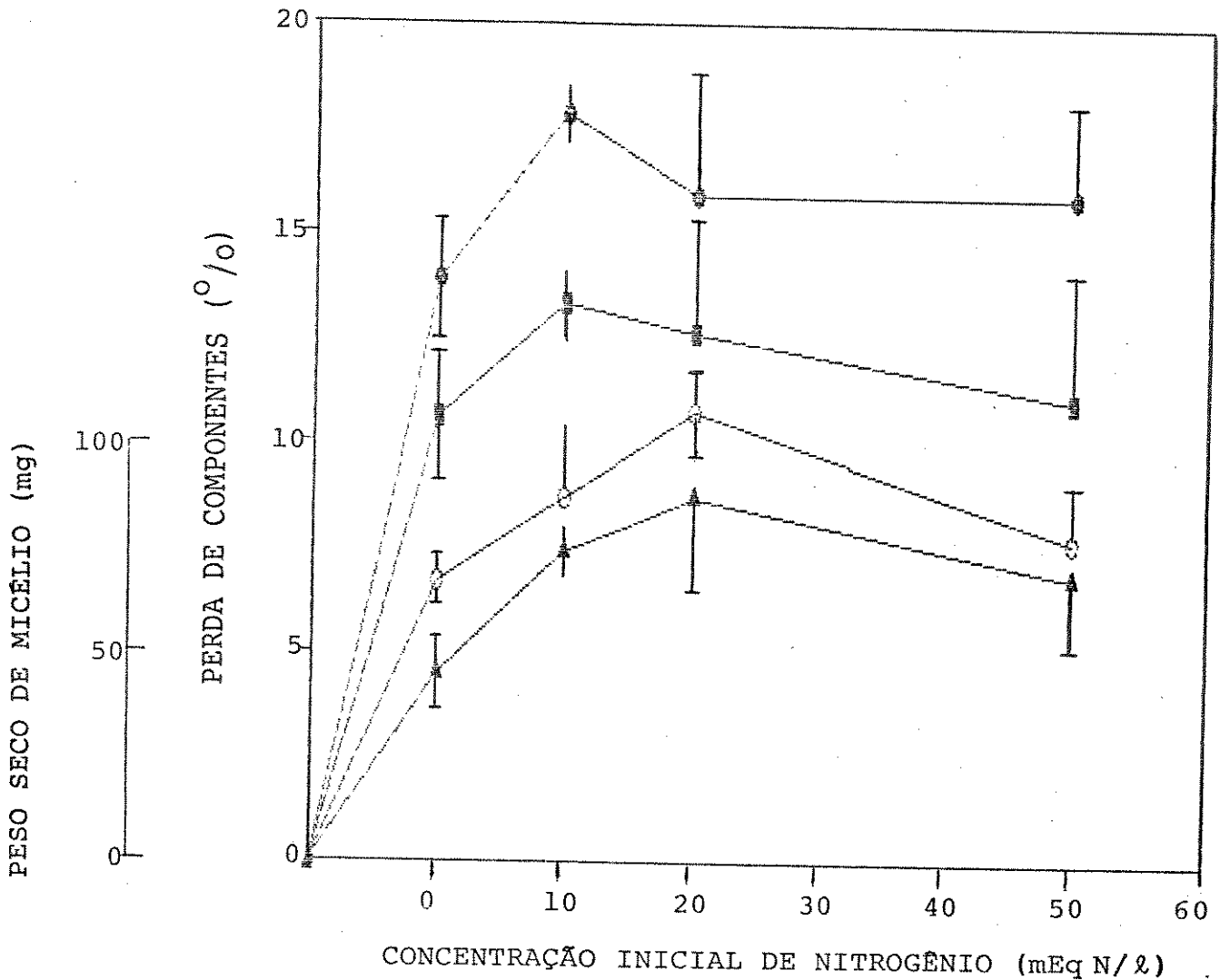


FIG. 19 - Perda de componentes na madeira de *Pinus radiata* após 15 dias de biodegradação por *Chrysonilia sitophila* na presença de um co-substrato (1 % de glicose) em concentrações variáveis de nitrogênio.

—▲—) Perda de Peso; (—●—) Perda de Lignina; (—■—) Perda de celulose; (—○—) Peso seco de micélio. Meio de Fries modificado - 0,0% de glicose, 3% de madeira, 28°C, tampão biftalato 0,05M, pH 6,0.

Resultados semelhantes foram reportados para biodegradações de colpas termomecânicas e Kraft utilizando o Basidiomiceto *P. chrysosporium*. Nestes experimentos a máxima degradação de lignina foi obtida quando baixas concentrações de nitrogênio foram adicionadas ao meio de cultura e a degradação de carboidratos foi inibida pela adição de glicose [Yang e col., 1980; Tran e Chambers, 1987].

Podemos ainda avaliar a quantidade de proteínas unicelulares (micélio fúngico) gerado como sub-produto dos processos de biodegradação seletiva de lignina. Foram obtidos 1,9 mg de micélio/ml de meio de cultivo com 1% de glicose a 10 mEq N/l (máxima deslignificação) e no caso das culturas sem glicose foram obtidos 0,9 mg/ml de meio a 10 mEq N/l. Estes resultados indicam que o micélio fúngico aparece como um sub-produto pouco expressivo do processo, porém em escala ampliada deve ser considerado a viabilidade de sua separação e recuperação.

A madeira obtida nas condições de máxima deslignificação (1,0% de glicose e 10 mEq N/l) foi caracterizada por técnicas adicionais com a finalidade de evidenciar as modificações ocorridas, como descrito abaixo.

IV.3.1.1 - Índice de Degradação e Análise Termogravimétrica: Um aumento de 4 vezes na solubilidade em NaOH 1% (índice de degradação) foi observado na madeira biodegradada, indicando um processo de degradação generalizado ( $4,2 \pm 0,5 \%$  e  $17,5 \pm 0,1 \%$  para controle e madeira biodegradada respectivamente).

Foi desenvolvido um estudo termogravimétrico das madeiras controle e biodegradada. Os termogramas diferenciais (DTG) e as curvas utilizadas para o cálculo da energia de ativação aparente para a pirólise estão mostradas na figura 20 e figuras 30 e 31 (apêndice I).

Pudemos notar que a madeira biodegradada apresentou uma menor estabilidade térmica com relação a madeira não tratada, conforme observado nos picos dos DTG em 323°C e 337°C, respectivamente.

Considerando que a pirólise da madeira na faixa de 220-310°C segue uma cinética de primeira ordem [Nguyen e col., 1981], as energias e ativação aparentes obtidas, foram : 23,4 Kcal/mol na madeira biodegradada e 19,2 Kcal/mol no controle.

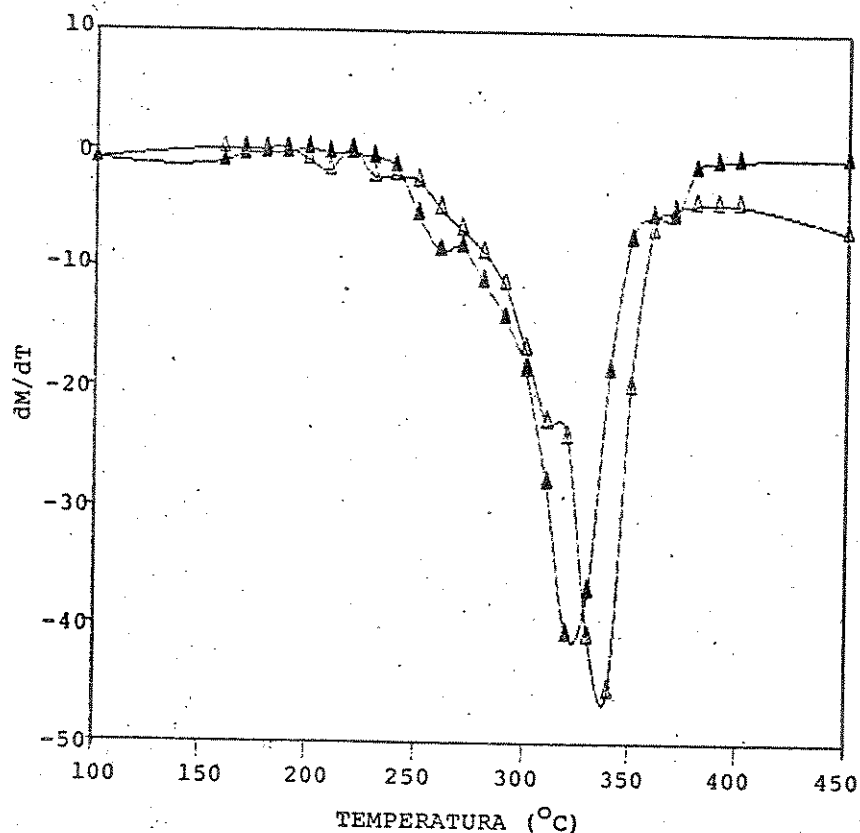
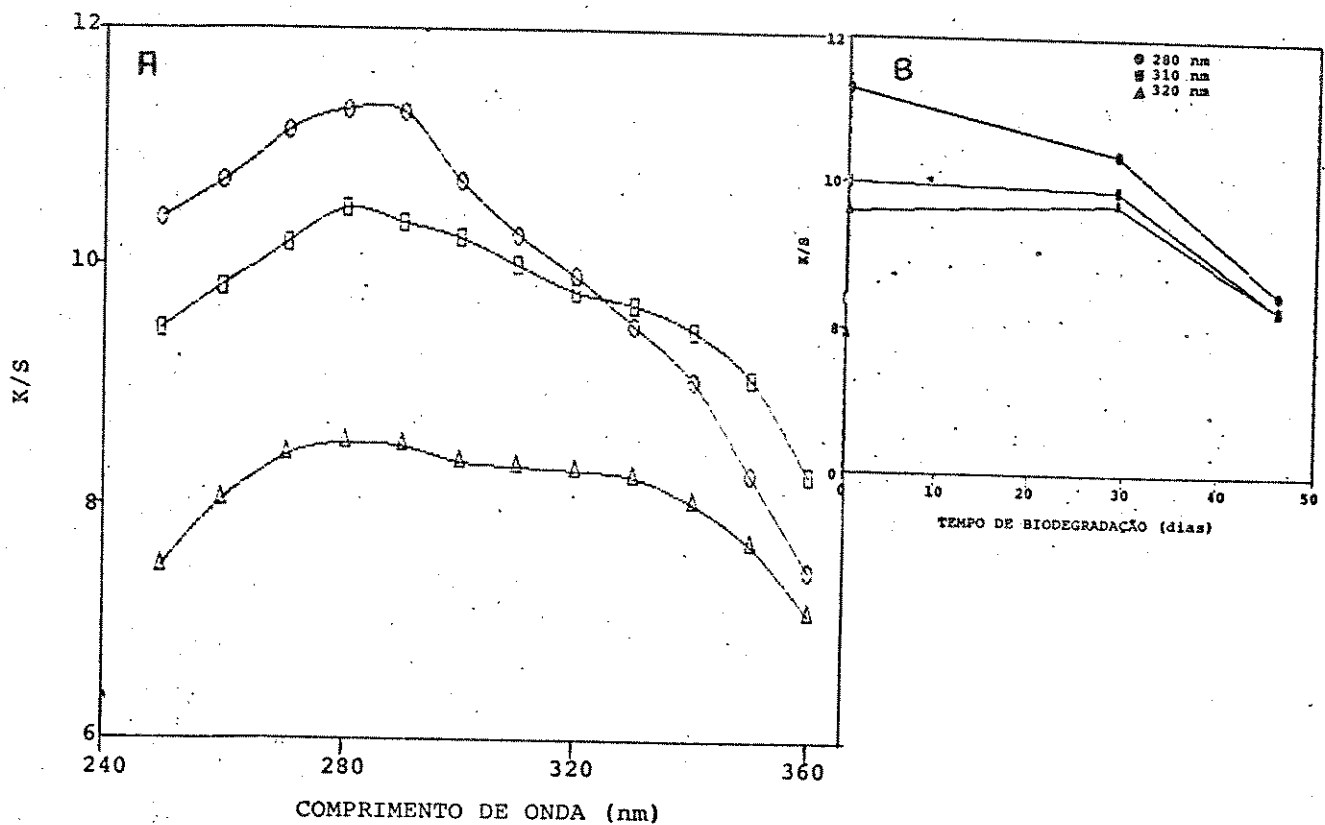


FIG. 20 - Termograma diferencial de *Pinus radiata* controle (—Δ—) e biodegradado por *C. sitophila* durante 15 dias (—▲—). Biodegradação em Meio de Fries modificado, 10 mEq N/l, 1,0% de glicose, 3,0% de madeira, tampão biftalato de potássio 0,05 M, pH 6,0 a 28°C.

Hornof e col. [Nguyen e col., 1981] têm relacionado a energia de ativação para a pirólise com os respectivos teores de lignina e demonstraram que quanto maior a energia de ativação, menor o teor de lignina na polpa. Isto também comprova a diminuição do teor de lignina na madeira biodegradada.

Beall e col. [1976] demonstraram que madeiras biodegradadas, por fungos de decomposição parda e fungos de decomposição branca, com perdas de peso inferiores a 20%, apresentam um aumento na energia de ativação para a pirólise, indicando concordância com os resultados obtidos em nossos experimentos.

IV.3.2 - Biodegradação de Madeira em Cavacos: Este estudo foi desenvolvido para elucidar o comportamento de *C. sitophila* na biodegradação de cavacos de *P. radiata*, bem como para avaliar a espectroscopia de reflectância no U.V. [Polcin e Rapson, 1969] como uma técnica analítica dirigida à biodegradação de madeira. Foram biodegradados cavacos de *P. radiata* (4,0 x 3,0 x 0,1 cm) em placas de Petri durante 0 - 46 dias. Os resultados obtidos estão mostrados nas figuras 21 A e B. Os espectros U.V. obtidos mostraram uma queda significativa da absorção em 280 nm, indicando a degradação da lignina contida na superfície dos cavacos.



IG. 21 - Espectros de reflectância da madeira de *Pinus radiata* autoclavada não inoculada (—O—) e madeira biodegradada durante 9 (—□—) e 46 (—Δ—) dias por *Chrysonilia sitophila*. Culturas em placas de Petri contendo micélio previamente crescido durante 3 dias em meio de Fries modificado, 1,0% glicose, 85 mEq N/l, pH 6,0 a 28°C.

$K/S = (1-R)^2/2R$ , onde: R = % reflexão.



A espectroscopia de reflectância no U.V. aparece como uma ferramenta interessante para seguir processos de biodegradação de madeira, pois além da queda significativa de absorção na região de 280 nm observamos uma tendência diferenciada de queda na região de 310 nm (figura 21B), indicando que a lignina residual da superfície do cavaco apresenta estrutura modificada em relação ao controle.

Esta técnica apresenta um potencial de aplicação em estudos envolvendo a seleção de microorganismos que degradam lignina durante a biodegradação de madeira, pois devido a sua simplicidade experimental possibilita o teste de inúmeros microorganismos simultaneamente [Ferraz e Durán, 1990].

Apesar destes experimentos mostrarem que *C. sitophila* degradou a lignina contida na superfície do cavaco, a profundidade da biodegradação permanece indeterminada.

IV.3.3 - Estudo do Mecanismo de Degradação da Lignina Durante a Biodegradação de Madeira: Estes experimentos foram desenvolvidos com o objetivo de elucidar o mecanismo de degradação da lignina durante o processo de biodegradação da madeira pelo Ascomiceto *C. sitophila*. Desta forma foram realizadas biodegradações por períodos prolongados (3 meses) sem controle específico de nutrientes. O protocolo experimental seguido está resumido no diagrama 1 (item III.3.4.2). As ligninas obtidas foram caracterizadas por análises de grupos funcionais, análise elementar, técnicas espectroscópicas como RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C, I.V., U.V./VISIVEL e pela distribuição de pesos moleculares. Os fragmentos de lignina liberados no meio de cultura foram analisados por cromatografia gasosa e líquida e distribuição de pesos moleculares.

A madeira biodegradada por 3 meses apresentou a seguinte perda de componentes:  $20,1 \pm 3,8 \%$ ,  $25,0 \pm 6,9 \%$  e  $17,7 \pm 4,9 \%$  para a perda de peso, lignina e carboidratos, respectivamente. A solubilidade em

NaOH 1% ( índice de degradação) para esta madeira foi  $11,9 \pm 2,7$  % contra  $4,2 \pm 0,5$  % no controle.

IV.3.3.1 - Rendimentos de Extração das Ligninas de *P. radiata* e *P. radiata* Biodegradado Durante 3 meses: Foram estudadas as ligninas fortemente alteradas metanol e dioxano (LFA-Metanol e LFA-Dioxano, respectivamente), além da "milled wood lignin" (MWL) controle e biodegradada. Os rendimentos obtidos para a extração das ligninas e fragmentos liberados no meio de cultura, estão mostrados na tabela 10.

A pré-extração da madeira biodegradada "in natura" apresentou rendimentos com relação a massa de madeira extraída de 0,19%, 0,35% e 0,35% para os solventes éter de petróleo, clorofórmio e acetona, respectivamente. Estes 3 primeiros extratos não foram estudados por compreenderem os materiais resinosos, taninos e flobafenos da madeira (extratáveis).

TAB. 10 - Rendimentos de extração das ligninas de *Pinus radiata* e *P. radiata* biodegradado por *Chrysonilia sitophila* durante 3 meses

Rendimento (%)	MWL Controle	MWL Biodegradado	LFA Dioxano	LFA Metanol	Extrato CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> do Meio de Cultura
A	8,2(2,9)	10,1(2,7)	0,9	0,6	0,25
B	28,3(9,9)	32,4(9,0)	3,0	2,0	0,75

onde: A: expresso em g de produto/100 g de madeira x 100

B: expresso em g de produto/100 g de lignina na madeira x 100  
(rendimento do produto purificado)

Os rendimentos das LFAs observados foram da mesma ordem que aqueles reportados para a extração de madeira "spruce" biodegradada em sacos por *P. chrysosporium* durante 3 meses (perda de lignina 20% e perda de peso 8%; 0,5 g/100 g de madeira para ambas LFA-Dioxano e LFA-etanol) [Chua e col., 1982].

IV.3.3.2 - Distribuição de Pesos Moleculares das Ligninas Estudadas: As MWL controle e biodegradada eluíram no volume de exclusão da coluna Sephadex LH-20 ( $V_{\text{exclusão-Poliestireno P.M. 12.500}} = 21,0 \text{ ml}$ ;  $V_{\text{eluição-MWL}} = 20 - 22 \text{ ml}$ ) e foram então cromatografadas em coluna com Sephadex LH-60 (figura 22). A coluna LH-60 foi calibrada com poliestirenos de peso molecular conhecido (P.M. 47500 - 4000) (figura 32 - apêndice I) e os resultados obtidos para  $\bar{M}_w$ ,  $\bar{M}_n$  e dispersibilidade ( $\bar{M}_w/\bar{M}_n$ ) estão mostrados na tabela 11.

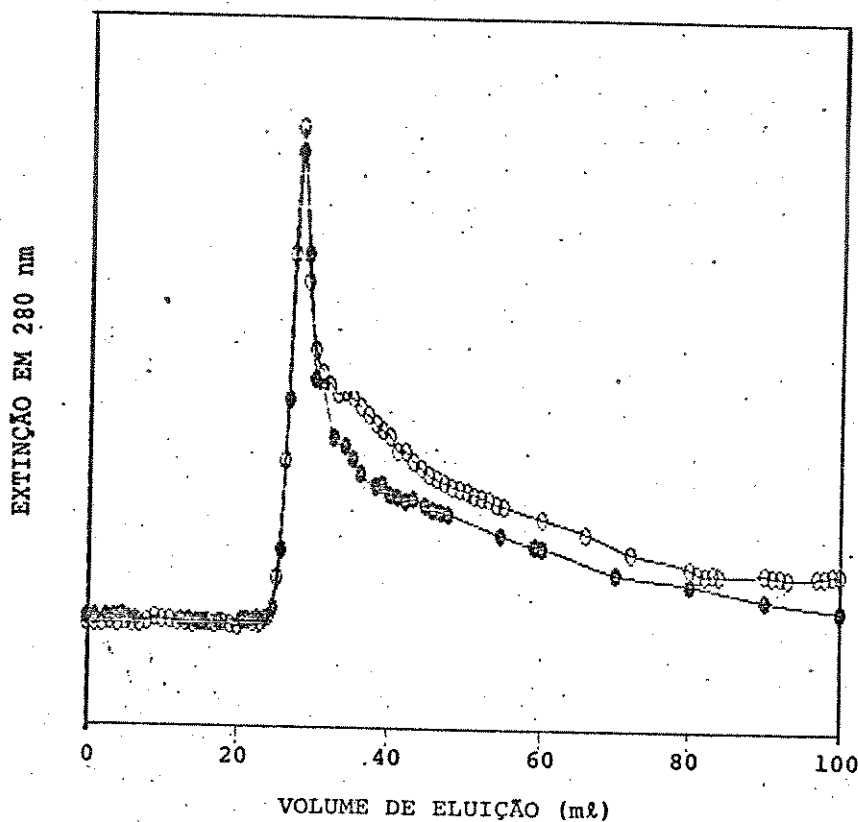


FIG. 22 - Permeação em Gel SEPHADEX LH-60 das Ligninas MWL de *Pinus radiata* e *P. radiata* Biodegradado por *Chrysonilia sitophila* Durante 3 meses. (—○—) MWL Controle; (—●—) MWL de *P. radiata* biodegradado. Solvente Dimetilformamida/0,1 M LiCl 0,1 ml/min (item III.3.4.4, p. 49).

A LFA-Dioxano e LFA-Metanol foram cromatografadas em coluna Sephadex LH-20 e os resultados obtidos são mostrados nas figuras 23 e

24. A coluna LH-20 foi calibrada com 11 compostos modelo de lignina (P.M. 504-166) (figura 33 - apêndice I) e os valores de  $\bar{M}_w$ ,  $\bar{M}_n$  e dispersibilidade estão mostrados na tabela 11. Esta análise evidenciou que as LFAs representam fragmentos da lignina original liberados pelo processo de biodegradação, pois apresentaram pesos moleculares médios ( $\bar{M}_w$ ) inferiores a 1000.

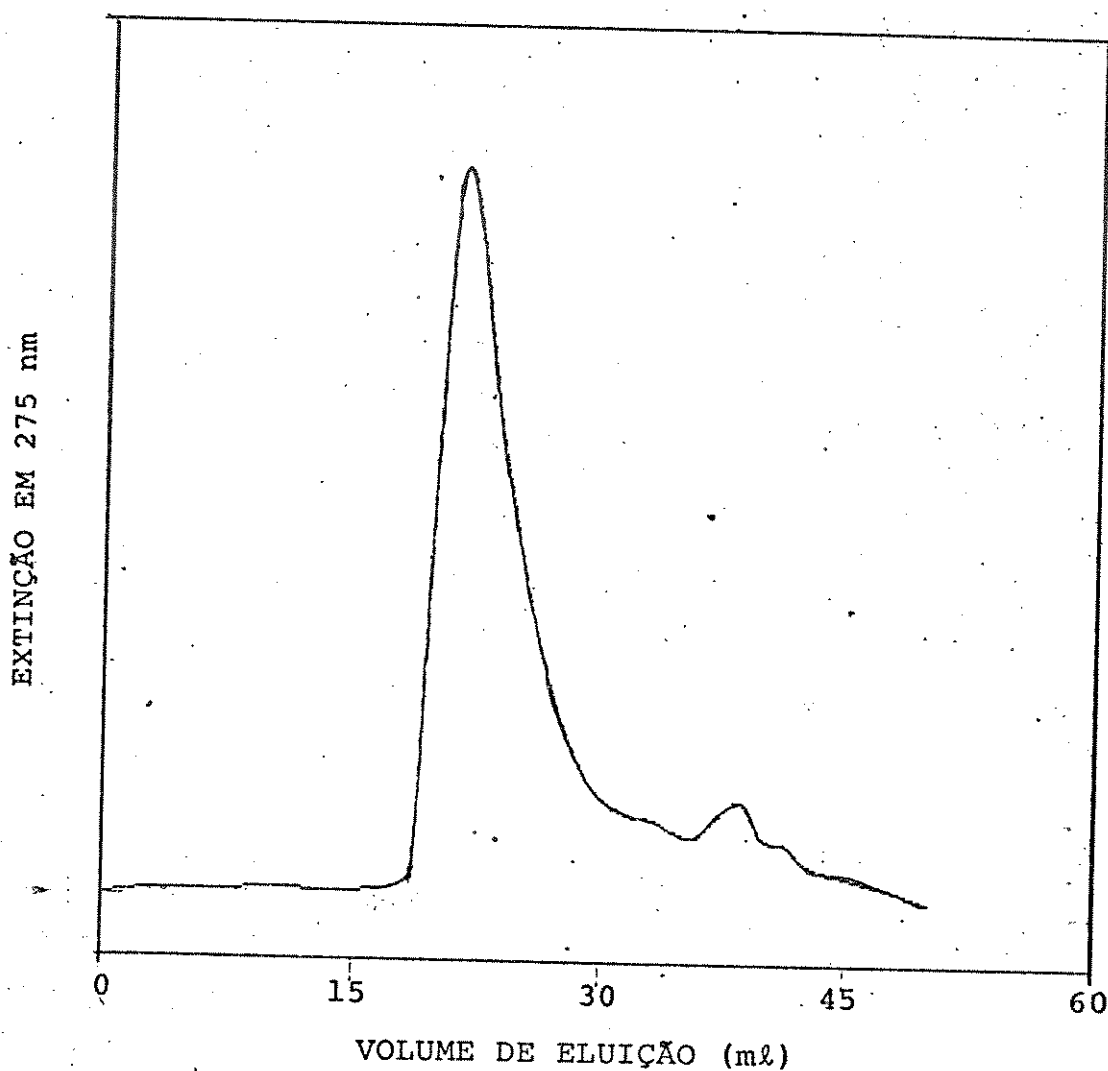


FIG. 23 - Permeação em Gel SEPHADEX LH-20 da lignina LFA-Dioxano de *Pinus radiata* Biodegradado por *Chrysonilia sitophila* durante 3 meses. Solvente dimetilformamida 0,3 ml/min (item III.3.4.4, p. 39).

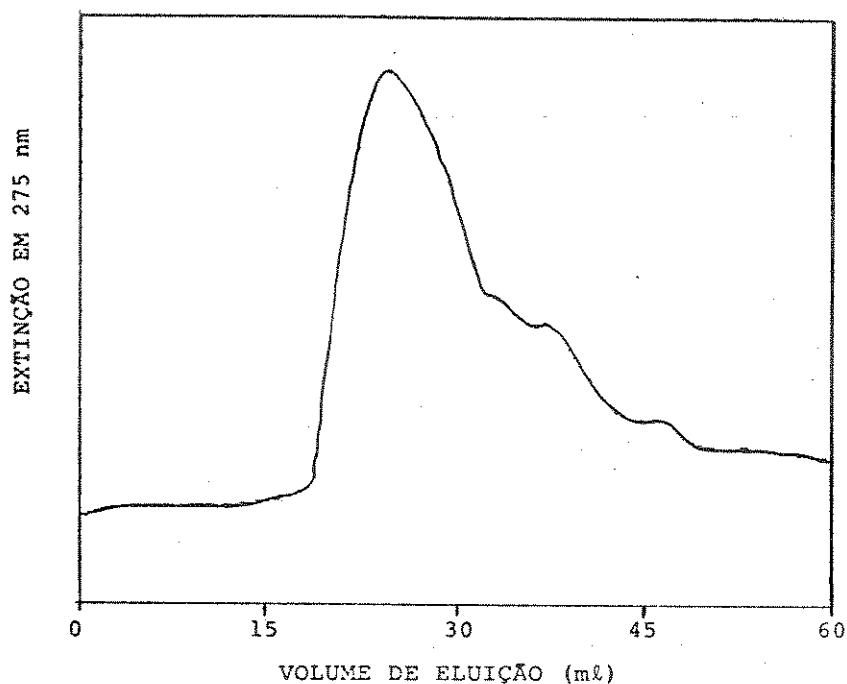


FIG. 24 - Permeação em Gel SEPHADEX LH-20 da lignina LFA-Metanol de *Pinus radiata* Biodegradado por *Chrysonilia sitophila* durante 3 meses. Solvente Dimetilformamida 0,3 ml/min (item III.3.4.4, p. 39).

TAB. 11 - Massas moleculares médias e polidispersibilidade das ligninas obtidas de *Pinus radiata* e *P. radiata* biodegradado por *Chrysonilia sitophila* durante 3 meses.

Lignina Estudada	$\bar{M}_w$	$\bar{M}_n$	$\bar{M}_w/\bar{M}_n$
MWL Controle	13175	5882	2,34
MWL Biodegradada	15030	7141	2,10
LFA-Dioxano	867	693	1,25
LFA-Metanol	753	537	1,40

No caso da MWL biodegradada o aumento no valor de  $\bar{M}_w$  deve ser atribuído ao processo de biodegradação que foi efetivo nos fragmentos de baixo peso molecular. Este fato fica evidenciado pela diminuição da dispersibilidade observada e pela manutenção do peso molecular de pico

(figura 22).

#### IV.3.3.3 - Características Espectrais das Ligninas Estudadas

IV.3.3.3.1 - U.V./Visível: Os espectros U.V./Visível obtidos estão mostrados nas figuras 25 e 26 e algumas relações de absorptividades na tabela 12. Pode-se notar que as ligninas denominadas fortemente alteradas (LFAs) apresentaram características significativamente diferentes em relação a MWL controle, indicando que a obtenção das mesmas foi um procedimento adequado ao estudo da biodegradação de lignina "in situ", conforme descrito anteriormente [Kirk e Chang, 1974, 1975; Chua e col., 1982].

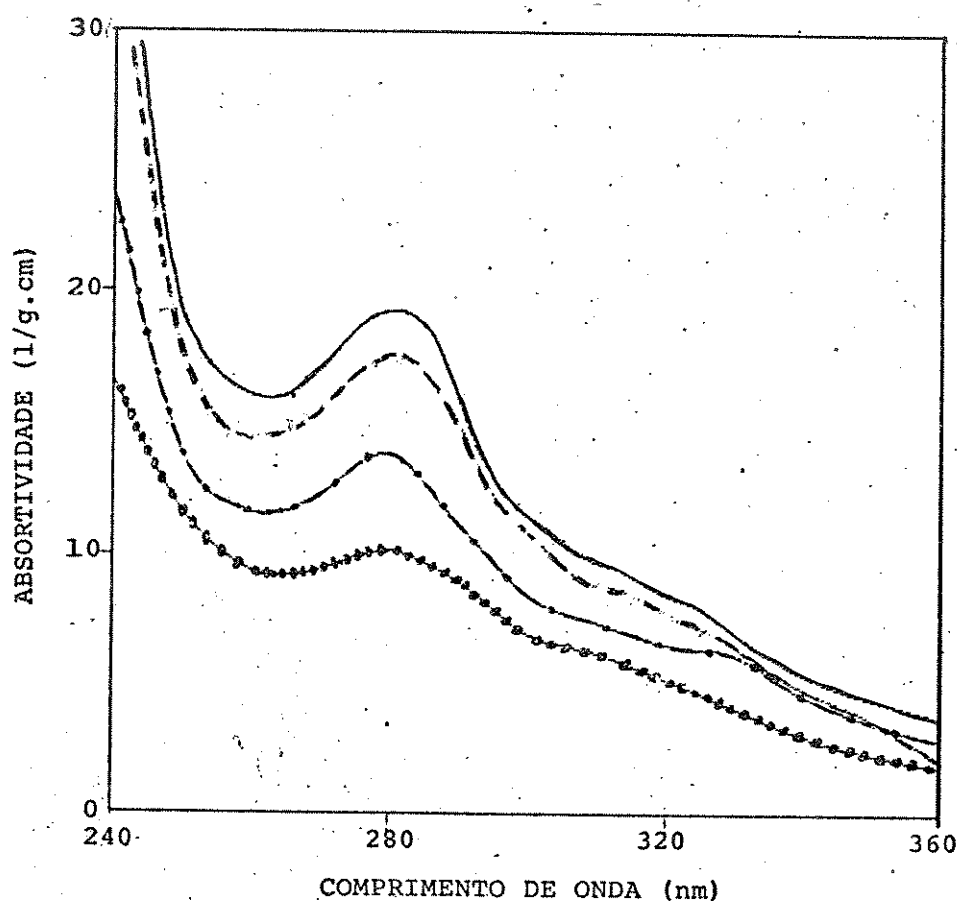


FIG. 25 - Espectros U.V. das Ligninas de *Pinus radiata* e *P. radiata* Biodegradado por *Chrysonilia sitophila* Durante 3 meses.

(—) MWL controle, (---) MWL biodegradada, (-•-) LFA-Dioxano e (••••) LFA-Metanol. Solvente utilizado dioxano/água (54,6%).

A queda significativa na absorvidade em 280 nm e 310 nm das "LFAs" (tab.12) pode ser atribuída a reações de abertura do anél aromático, degradação de  $\alpha$ - $\beta$  insaturações e  $\alpha$ -ceto grupos (310 nm) [Goldshmid, 1971]. A MWL biodegradada apresentou pequena diminuição na absorvidade em 280 nm e 310 nm.

O aumento de absorvidade na região entre 405 e 420 nm nos espectros da LFA-Metanol e LFA-Dioxano podem indicar a presença de grupos tipo quinona nessas ligninas, conforme comparação com compostos modelo que absorvem nesta região [Vanucci e col., 1988].

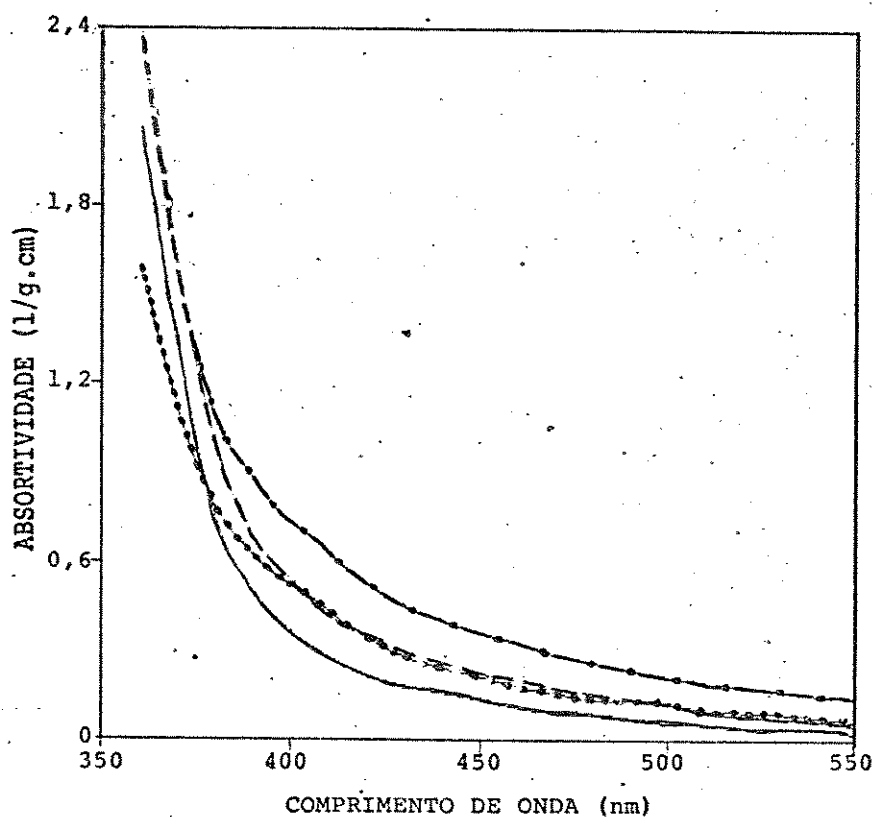


FIG. 26 - Espectros Visível das Ligninas de *Pinus radiata* e *P. radiata* biodegradado por *Chrysonilia sitophila* Durante 3 meses.

—) MWL controle, (---) MWL biodegradada, (-·-·-) LFA-Dioxano e (····) LFA-Metanol. Solvente utilizado dioxano/água (96%)

As relações de absorvidades (tabela 12) foram calculadas para videnciar as modificações ocorridas nas ligninas estudadas. Podemos

observar que a relação 280/310 apresentou pequenas modificações para as ligninas biodegradadas quando comparadas com o controle, indicando que a absorvidade nas duas regiões (280 nm: anel aromático tipo guaiacil e/ou siringil e 310 nm:  $\alpha$ -carbonilas e  $\alpha$ - $\beta$  insaturações) diminuíram em mesma proporção após o processo de biodegradação. As relações 280/405 e 280/420 nm apresentaram quedas significativas nas ligninas biodegradadas (principalmente nas LFAs), indicando o aparecimento de cromóforos que absorvem na região do visível (Quinonas) e concomitante perda de cromóforos que absorvem em 280 nm (anéis aromáticos de lignina).

TAB. 12 - Absortividades na região do U.V./visível de ligninas de *Pinus radiata* e *P. radiata* biodegradado por *Chrysonilia sitophila* durante 3 meses (\*)

Comprimento de onda	MWL	MWL	LFA	LFA
	Controle	Biodegradada	Dioxano	Metanol
ABSORTIVIDADES ( $l.g^{-1}cm^{-1}$ )				
280 nm	18,9	17,6	13,8	10,2
310 nm	9,7	8,8	7,4	6,2
405 nm	0,3	0,5	0,7	0,5
420 nm	0,2	0,3	0,5	0,4
RELAÇÕES DE ABSORTIVIDADE				
280/310	1,9	2,0	1,9	1,6
280/405	59,1	36,9	20,1	20,9
280/420	86,8	50,6	26,1	28,3

(\*) O desvio máximo observado em determinações de absorvidade para ligninas é de 3% .



IV.3.3.3.2 - Infra Vermelho: A atribuição de bandas de espectros I.V. de lignina tem sido feita através de estudos comparativos com modelos, sendo que vários autores reportaram estas atribuições. Hergert [1971] compilou dados de I.V. de ligninas e dividiu-as em 2 grandes grupos, como ligninas guaiacil e siringil-guaiacil. Nestes termos, descrevemos as bandas observadas como segue:

3420  $\text{cm}^{-1}$ : estiramento O-H, esta banda é composta de OH fenólico e OH alifático, sendo que o último normalmente aparece em número de onda maior, o que deve justificar a assimetria da banda observada em nosso caso.

2930  $\text{cm}^{-1}$ : estiramento C-H  $\text{sp}^3$ .

1730-1710  $\text{cm}^{-1}$ : região de estiramento C=O de carbonila não conjugada e ácidos carboxílicos.

1660  $\text{cm}^{-1}$ : estiramento C=O de carbonila conjugada com anél aromático e ácidos carboxílicos conjugados com o anél.

1600 e 1515  $\text{cm}^{-1}$ : vibração de anél aromático.

1470-1450  $\text{cm}^{-1}$ : deformação assimétrica de C-H.

1430  $\text{cm}^{-1}$ : vibração de anél aromático.

1270 e 1220  $\text{cm}^{-1}$ : vibração de anél tipo guaiacil com estiramento C-O.

1140  $\text{cm}^{-1}$ : deformação fora do plano de C-H aromático do tipo guaiacil.

1090  $\text{cm}^{-1}$ : deformação C-O de álcool secundário e éter alifático.

1035  $\text{cm}^{-1}$ : deformação no plano de C-H aromático de tipo guaiacil e deformação C-O de álcool primário.

A partir dos espectros I.V. das ligninas estudadas observamos que as absorções entre 1730 e 1500  $\text{cm}^{-1}$  apresentaram modificações significativas, conforme mostrado no cálculo das relações de bandas para esta região (tabela 13)(figuras 43-46 - apêndice I).

Estes resultados indicaram a ocorrência de reações envolvendo formação ou quebra de grupos carbonilas não conjugados, ácidos carboxílicos,  $\alpha$ -carbonilas além da degradação de anéis aromáticos, porém uma análise mais detlhada destas relações de bandas deve ser feita considerando a determinação do teor das estruturas anteriormente citadas (item III.3.3.4).

TAB. 13 - Relações de intensidade de bandas na região do Infravermelho de ligninas de *Pinus radiata* e *P. radiata* biodegradado por *Chrysonilia sitophila* durante 3 meses (\*).

Bandas ( $\text{cm}^{-1}$ )	Relações de Intensidades			
	MWL Controle	MWL Biodegradada	LFA Dioxano	LFA Metanol
1730/1510	0,24	0,24	0,34	0,76
1660/1510	0,37	0,40	0,51	0,78
1600/1510	0,55	0,54	0,58	0,82
1465/1510	0,66	0,61	0,70	0,85
1430/1510	0,61	0,57	0,60	0,70
1270/1510	1,14	1,19	1,23	1,25
1140/1510	0,89	0,89	0,92	0,93

(\*) O desvio máximo observado no cálculo de relações de bandas I.V. em espectros de lignina é 12% .

IV.3.3.3.3 - RMN- $^1\text{H}$ : Os espectros de RMN- $^1\text{H}$  das ligninas estudadas forneceram as integrações porcentuais mostradas na tabela 14 (figuras 47-50 - apêndice I). A atribuição de cada região de deslocamento foi determinada baseando-se em espectros de compostos modelo de lignina reportados na literatura [Lenz, 1968].

TAB. 14 - Porcentagem de prótons (RMN-<sup>1</sup>H) de ligninas de *Pinus radiata* e *P. radiata* biodegradado por *Chrysonilia sitophila* durante 3 meses(\*)

Deslocamento (ppm)	Atribuição	Porcentagem de prótons			
		MWL Controle	MWL Biodegradada	LFA Dioxano	LFA Metanol
7,3 - 6,3	aromático e $\alpha$ -vinila	15,5 $\pm$ 1,1	12,5 $\pm$ 0,1	13,8	8,4
6,3 - 5,75	$\beta$ -vinila e $\alpha$ -1	4,5 $\pm$ 1,5	3,0 $\pm$ 0,3	2,4	2,3
5,75 - 5,2	$\alpha$ -3	2,6 $\pm$ 1,1	2,7 $\pm$ 0,6	2,4	2,8
5,2 - 2,5	$\alpha$ -2; $\beta$ ; $\gamma$ e OCH <sub>3</sub>	37,5 $\pm$ 3,6	37,6 $\pm$ 2,4	35,3	28,3
2,5 - 2,1	acetoxi aromático	6,8 $\pm$ 0,3	6,3 $\pm$ 0,4	6,0	6,0
2,1 - 1,6	acetoxi alifático	23,3 $\pm$ 5,3	21,5 $\pm$ 0,1	24,9	22,5
1,6 - 0,0	H ligado a -C-CH <sub>2</sub> -C-	9,8 $\pm$ 5,4	14,5 $\pm$ 3,5	15,2	29,6

(\*) Denominação de prótons:  $\alpha$ -1 = prótons ligados a C- $\alpha$  em estruturas  $\beta$ -O-4 (figura 55 - apêndice II).

$\alpha$ -2 = prótons ligados a C- $\alpha$  em estruturas pinoresinol (figura 56 - apêndice II).

$\alpha$ -3 = prótons ligados a C- $\alpha$  em estruturas fenil-cumarano (figura 57 - apêndice II).

Quando comparamos as porcentagens de prótons das ligninas biodegradadas com a MWL controle podemos observar diversas modificações estruturais, conforme descrito a seguir.

A MWL biodegradada apresentou diminuição de prótons aromáticos e/ou  $\alpha$ -vinílicos.

A reação de acetilação da lignina introduz grupos acetila aos grupos OH alifáticos e aromáticos, sendo que estes sinais (após acetilação) tornam-se distinguíveis no RMN- $^1\text{H}$  [Lenz, 1968]. Desta forma pudemos observar que os grupos OH alifáticos e OH aromáticos não sofreram modificação significativa na MWL biodegradada, conforme evidenciado pela integração dos grupos acetoxi. Também a região de prótons ligados a carbonos saturados e prótons de grupos metoxila (5,75 - 2,5 ppm) não apresentou mudança significativa.

Para a LFA-Dioxano as modificações mais significativas envolveram a diminuição de prótons aromáticos e/ou  $\alpha$ -vinila e  $\beta$ -vinila e/ou  $\alpha$ -1.

No caso da LFA-Metanol, a diminuição da porcentagem de prótons aromáticos e/ou  $\alpha$ -vinila;  $\beta$ -vinila e/ou  $\alpha$ -1 e  $\alpha$ -2,  $\beta$ ,  $\gamma$  e/ou  $\text{OCH}_3$  foi bastante significativa. Outra modificação significativa foi o aumento de prótons abaixo de 1,6 ppm (tabela 14).

Como no caso da análise dos espectros I.V., a interpretação dos espectros RMN- $^1\text{H}$  deve ser feita considerando outras evidências de modificações estruturais das ligninas estudadas, conforme mostrado pela determinação do teor de grupos funcionais (item IV.3.3.4).

IV.3.3.3.4 - RMN- $^{13}\text{C}$ : Os espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  das ligninas estudadas foram analisados e aos sinais observados foram atribuídos intensidades variando entre muito forte e muito fraco, conforme utilizado previamente por vários autores [Chua e col., 1982; Haider e col., 1985; Robert e Chen, 1989; Tai e col., 1990].

Os sinais observados, suas atribuições e intensidades estão mostrados na tabela 15 (figuras 51-54 - apêndice I).

TAB. 15 - Sinais observados em espectros RMN-<sup>13</sup>C de ligninas de *Pinus radiata* e *P. radiata* biodegradado por *C. sitophila* durante 3 meses (\*).

N	Deslocamento (ppm)	Intensidade Observada				Atribuição
		MWL Controle	MWL Biodegradada	LEA Dioxano	LEA Metanol	
1	193,4	mf	mf	mf	-	C- $\delta$ /G-CH=CH-CHO
2	188,5	mf	mf	mf	-	C- $\alpha$ /G-CHO
3	180,0	mf	-	f	-	COOH alifático ou orto-quinona
4	171,4	-	mf	m	m	C=O/L-O-CH <sub>2</sub> -COOH ou L-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH
5	170,8	f	f	mf	f	C=O acetil alif.1 <sup>o</sup>
6	169,7	-	mf	mf	mf	C=O acetil alif.2 <sup>o</sup>
7	167,1	-	mf	mf	mf	C=O/COOH aromático
8	156,9	mf	mf	mf	mf	C-4/p-hidroxifenil
9	153,0	mf	mf	mf	mf	C-3/G-CHO
10	151,1	f	f	f	mf	C-3/G acetilado
11	149,6	mf	mf	mf	mf	C-3/G
12	148,4	mf	mf	mf	mf	C-4/G- $\beta$ -aryl-éter
13	140,2	-	mf	mf	mf	C-1/G-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -L
14	136,7	mf	mf	mf	mf	C-1/G-CH <sub>2</sub> -OAc
15	133,3	-	mf	-	mf	não determinado
16	131,5	mf	m	m	f	C-1/G-eterificado
17	129,3	mf	m	m	f	C-5/G e/ou C- $\alpha$ e C- $\beta$ em G-CH=CH-CHO
18	122,5	mf	mf	f	mf	C-5/G-acetilado e C- $\beta$ /G-CH=CH-CH <sub>2</sub> OAc
19	120,3	f	mf	mf	mf	C-6/G
20	114,5	mf	mf	mf	mf	C-5/G-eterificado C-6/tipo G-4-O-G-5
21	111,6	mf	mf	mf	mf	C-2/G
22	83,2	-	-	mf	-	C- $\alpha$ / $\alpha$ -éteres
23	80,0	mf	-	mf	mf	C- $\beta$ / $\beta$ -aryl-éter
24	70,1	-	-	-	mf	C- $\alpha$ /L-CH <sub>2</sub> OAc
25	68,3	mf	mf	m	mf	C/-CH-OAc e/ou CH <sub>2</sub> /L-O-CH <sub>2</sub> -COOH
26	64,5	mf	mf	mf	mf	C- $\gamma$ /-CH <sub>2</sub> OAc
27	62,3	mf	mf	mf	f	C- $\gamma$ / $\beta$ -aryl-éter CH <sub>2</sub> /-CH <sub>2</sub> OAc
28	56,1	F	F	F	F	OCH <sub>3</sub> -aromático
29	50,7	-	mf	-	mf	C- $\beta$ /fenilcumarano e/ou estruturas B1
30	42,5	mf	mf	mf	-	C- $\alpha$ /pinoresinol
31	38,9	-	m	m	mf	C- $\alpha$ /pinoresinol
32	34,1	-	-	mf	mf	-CH <sub>2</sub> -
33	32,2	-	mf	mf	m	C- $\alpha$ /G-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OAc
34	29,7	m	MF	MF	MF	-CH <sub>2</sub> -/G-C5-CH <sub>2</sub> -C5-G -CH <sub>2</sub> -/alquil sat.
35	27,5	-	-	-	f	-CH <sub>2</sub> -
36	24,6	f	m	mf	mf	-CH <sub>2</sub> - ; -CH <sub>3</sub> e/ou C- $\beta$ /L-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>
37	23,1	-	m	m	m	-CH <sub>2</sub> - alquil sat.
38	21,1	MF	MF	MF	MF	CH <sub>3</sub> /acetil
39	14,1	f	f	m	m	CH <sub>3</sub> - $\delta$ /G-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>

(\* ) INTENSIDADES: mf = muito fraco; f = fraco; m = médio; F = forte; MF = muito forte. G = unidade guaiacil. L = lignina.

Como referencial foi utilizado o sinal de carbonos de grupos metoxila, aos quais foi atribuída a intensidade "forte".

Os sinais em 171,4 ppm somente estão presentes nas ligninas de madeira biodegradada indicando o aparecimento de grupos carboxílicos nas cadeias laterais destas ligninas.

O sinal em 38,9 ppm aumentou de intensidade nas MWL biodegradada e LFA-Dioxano indicando a resistência de estruturas tipo pinoresinol (figura 58 - apêndice I) à biodegradação. No caso da LFA-Metanol esta observação não ocorreu.

O aumento na intensidade do sinal em 32,2 ppm na LFA-Metanol indicou o aumento da proporção de carbonos saturados na cadeia lateral desta lignina. Também o aumento na intensidade dos sinais em 29,7; 27,5; 23,1 e 14,1 ppm em todas as ligninas de madeira biodegradada indicaram o aumento na proporção de carbonos saturados nas cadeias laterais.

IV.3.3.4 - Análise de Grupos Carbonilas, Hidroxilas, Metoxilas e Análise Elementar das Ligninas Estudadas: A análise elementar foi feita em quadruplicata para a MWL controle e em triplicata para a MWL biodegradada e indicou boa reprodutibilidade para os teores de carbono e hidrogênio (desvio máximo de 3,7% para carbono e 1,8% para hidrogênio). No entanto estas análises têm indicado um teor de nitrogênio variável entre 0,3 e 2,1%, com pouca reprodutibilidade (extremos de 0,33% a 1,48% na MWL controle analisada em quadruplicata). Considerando incomum a presença de teores maiores que 0,2% de nitrogênio em ligninas [Chen e Chang, 1985; Kirk e Chang, 1975; Lai e Sarkanen, 1981] e a baixa reprodutibilidade dos resultados obtidos para este elemento nas análises em questão, foi desprezado qualquer teor de nitrogênio observado e calculado o teor de oxigênio como  $100\% - (\%C + \%H)$ .

A partir das porcentagens de cada elemento foram calculadas as fórmulas mínimas para as ligninas estudadas com base em estruturas fenil-propano (C<sub>9</sub>), conforme mostrado na tabela 16.

TAB. 16 - Análise Elementar e Fórmulas mínimas com base em estruturas fenil-propano (C<sub>9</sub>) das ligninas de *Pinus radiata* e *P. radiata* biodegradado por *Chrysonilia sitophila* durante 3 meses

Lignina	% C	% H	% O	Fórmula	Peso
				Mínima (C <sub>9</sub> )	Molecular
MWL Controle	58,8±2,2	5,7±0,1	35,5±2,3	C <sub>9</sub> H <sub>10,3</sub> O <sub>4,1</sub>	183,9
MWL Biodegradada	60,6±0,5	5,6±0,1	33,8±0,6	C <sub>9</sub> H <sub>9,9</sub> O <sub>3,8</sub>	178,9
LFA-DIOXANO	58,7	6,7	34,6	C <sub>9</sub> H <sub>12,2</sub> O <sub>4,0</sub>	184,4
LFA-METANOL	54,1	6,7	39,2	C <sub>9</sub> H <sub>13,4</sub> O <sub>4,9</sub>	200,0

A LFA-Metanol apresentou um aumento de 3 hidrogênios e 1 oxigênio para cada estrutura fenil-propano. Este resultado é típico de processos oxidativos de biodegradação da lignina, nos quais ocorre a incorporação de oxigênio atmosférico ou de água [Chen e Chang, 1985; Crawford e col., 1982]. No entanto, Chen e Chang [1985] têm ressaltado que algumas ligninas obtidas de "BIRCHWOOD" biodegradado por *P. crhysosporium* apresentaram menores proporções de oxigênio com relação a MWL controle, indicando que a combinação de processos oxidativos e redutivos podem ocorrer durante a biodegradação. Também a identificação de fragmentos de lignina diferenciados apenas pela presença de grupos CO-H e CH<sub>2</sub>OH tem indicado este caráter oxidativo e redutivo da biodegradação [Chen e Chang, 1985]. Neste aspecto podemos observar que a lignina MWL de *P. radiata* biodegradado não apresentou incorporação significativa de oxigênio com relação a MWL controle. No caso da LFA-Dioxa-

no ocorreu aumento de 2 hidrogênios por cada unidade fenil propano sem concomitante incorporação de oxigênio, evidenciando desta forma o caráter redutivo de algumas etapas do processo de biodegradação.

Os resultados obtidos para a análise de grupos funcionais estão mostrados na tabela 17.

TAB. 17 - Grupos Funcionais de Ligninas de *Pinus radiata* e *P. radiata* Biodegradado por *Chrysonilia sitophila* Durante 3 meses (\*)

VARIAVEL	LIGNINA			
	MWL Controle	MWL Biodegradada	LFA-Dioxano	LFA-Metanol
% $\phi$ -OCH <sub>3</sub>	12,2 (0,71)	11,7 (0,67)	n.d.	n.d.
% $\phi$ -OH	2,1 (0,22)	2,1 (0,22)	2,2 (0,24)	1,4 (0,16)
$\alpha$ -C=O/ $\phi$ -OCH <sub>3</sub>	0,063 (0,045)	0,075 (0,050)	0,060 (---)	0,052 (---)
$\gamma$ -C=O/ $\phi$ -OCH <sub>3</sub>	0,021 (0,015)	0,025 (0,017)	0,026 (---)	0,015 (---)
$\alpha$ - $\beta$ insaturada				

(\*) n.d.: não determinado; entre parenteses estão citados os valores de número de grupos funcionais por unidade fenil-propano (C<sub>9</sub>).

A MWL biodegradada apresentou um aumento no teor de  $\alpha$ -carbonilas com relação ao controle. Este resultado analisado em conjunto com as relações de bandas no I.V. (tabela 13) mostram que para a MWL biodegradada o aumento no teor de  $\alpha$ -carbonilas acompanha o aumento da relação 1660/1510 cm<sup>-1</sup>, indicando que neste caso a principal reação ocorrida foi a formação de  $\alpha$ -carbonilas e não a abertura de anéis aromáticos. A concordância entre a não modificação no teor de  $\gamma$ -carbonila- $\alpha$ - $\beta$  insaturadas na MWL biodegradada (tabela 17) e a manutenção da relação em 1730/1510 cm<sup>-1</sup> (tabela 13), bem como a pequena queda de absorvidade em 280 nm (tabela 12), fortalecem a sugestão da não abertura de anéis aromáticos desta lignina. Neste sentido, a diminui-



ção na porcentagem de prótons na região 7,3-6,3 ppm da MWL biodegradada (tabela 14), pode ser atribuída a diminuição no teor de prótons  $\alpha$ -vinílicos.

O aumento na intensidade dos sinais entre 29,7-14,1 ppm no RMN- $^{13}\text{C}$  (tabela 16) sugerem a possibilidade da formação de novos carbonos saturados nas cadeias laterais da MWL biodegradada.

Uma reação característica para a abertura de  $\alpha$ - $\beta$  insaturações de ligninas, causada pela degradação por fungos de decomposição branca, é a quebra da dupla ligação e concomitante formação de um diol [Chen e Chang, 1985]. Como não foi observado um aumento significativo de hidroxilas alifáticas na MWL biodegradada (tabela 14), poderíamos sugerir uma reação para a formação do diol, seguida da oxidação do álcool da posição para um grupo carbonila. Esta última estrutura poderia ainda permanecer estável ou perder os carbonos  $\beta$  e  $\gamma$  (p.e.  $\text{OH-CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ) conforme já demonstrado para a biodegradação de compostos modelo de lignina, por fungos de decomposição branca [Kirk, 1987].

Ainda, a não despolimerização efetiva desta fração de lignina biodegradada sugere que não ocorreram reações extensivas envolvendo a quebra de ligações entre unidades fenil-propano, como  $\beta$ -1 e  $\beta$ -O-4.

A LFA-Metanol apresentou uma diminuição no teor de  $\alpha$ -carbonilas e  $\gamma$ -carbonilas- $\alpha$ - $\beta$  insaturadas conforme mostrado na tabela 17. Neste caso observamos que a diminuição no teor de  $\alpha$ -carbonilas ocorre juntamente com o aumento significativo da relação 1660/1510  $\text{cm}^{-1}$  (tabela 13). Este fato pode ser atribuído a um efeito conjunto onde ocorreram a formação de ácidos carboxílicos (absorção na região de 1730 - 1650  $\text{cm}^{-1}$ ) acompanhados da abertura dos anéis aromáticos.

Outro forte indicativo da abertura de anéis aromáticos na LFA-Metanol é a queda significativa na absorvidade em 280 nm (tabela 11). Este tipo de reação tem sido proposta como um dos mecanismos da degradação de anéis aromáticos em ligninas biodegradadas por fungos de decomposição branca [Chen e Chang, 1985].

Outra possibilidade é a formação de grupos carboxílicos nas cadeias laterais, conforme sugerido pelo aparecimento de sinais em 171,4 ppm no RMN- $^{13}\text{C}$  (tabela 16).

No caso da diminuição de  $\gamma$ -carbonilas - $\alpha$ - $\beta$ -insaturadas pode ter ocorrido a quebra de  $\alpha$ - $\beta$  insaturação e não a diminuição de  $\gamma$ -carbonilas, pois  $\gamma$ -C=O ligadas a carbonos saturados não sofrem redução nas condições de análise utilizadas (item III.3.4.8).

A diminuição de prótons aromáticos e/ou  $\alpha$ -vinila e  $\beta$ -vinila e/ou  $\alpha$ -1 (tabela 14), sugere além da abertura de anéis aromáticos também a quebra de  $\alpha$ - $\beta$  insaturações. A formação de novos carbonos saturados nas cadeias laterais é corroborada pelo aumento significativo de sinais entre 38,9-14,1 ppm no RMN- $^{13}\text{C}$ . Também a formação de estruturas tipo -C-CH<sub>2</sub>-C- nas cadeias laterais desta lignina é corroborada pelo aumento da porcentagem de prótons na região abaixo de 1,6 ppm no RMN- $^1\text{H}$ .

Os teores de hidroxilas fenólicas somente foram significativamente alterados na LFA-Metanol (tabela 17) e pode estar associado com a formação de quinonas, conforme sugerido pela análise das absorvidades no U.V./Visível (tabela 12).

A diminuição de prótons na região de 5,2-2,5 ppm (RMN- $^1\text{H}$ , tabela 15) deve ser atribuída exclusivamente a diminuição do teor de metoxilas, já que os prótons tipo  $\alpha$ -2,  $\beta$  e  $\gamma$  ligados a carbonos saturados devem ter aumentado conforme evidenciado pelo espectro RMN- $^{13}\text{C}$ . Reações de desmetilação podem ter ocorrido seguidas da formação de metanol e

quinonas [Kersten e col., 1985], conforme sugerido pela detecção de metanol nos caldos de cultivo (item IV.3.3.4) e de quinonas através da espectroscopia U.V./Visível (tabela 12).

A LFA-Dioxano apresentou um aumento na relação 1660/1510  $\text{cm}^{-1}$  (tabela 13) seguido da não formação de  $\alpha$ -carbonilas, conforme mostrado na tabela 17. Também o aumento da relação 1730/1510  $\text{cm}^{-1}$  não foi seguido do aparecimento de  $\gamma$ -C=O- $\alpha$ - $\beta$  insaturadas. Neste caso uma reação esperada é a abertura de anéis aromáticos de maneira semelhante ao observado para a LFA-Metanol, porém em menor extensão, já que a diminuição de prótons aromáticos no RMN- $^1\text{H}$  não foi significativa (tabela 15).

A principal reação esperada na LFA-Dioxano é a formação de grupos carboxílicos nas cadeias laterais (aparecimento de sinal em 171,4 ppm no RMN- $^{13}\text{C}$ ). Reações que levam a formação de carbonos saturados nas cadeias laterais também devem ter ocorrido, conforme evidenciado pelo aumento na intensidade de sinais de carbonos saturados no RMN- $^{13}\text{C}$  (34,1 - 14,1 ppm).

As evidências de reações ocorridas nas LFAs envolvendo os carbonos das cadeias laterais e os baixos pesos moleculares médios observados (867 na LFA-Dioxano e 753 na LFA-Metanol) sugerem quebras entre unidades fenil-propano tipo  $\beta$ -1 e  $\beta$ -0-4.

IV.3.3.4 - Estudo dos Sub-produtos da Biodegradação de *P. radiata* por *C. sitophila* Durante 3 meses: A figura 27 mostra a eluição do extrato- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  do caldo de cultivo em coluna com Sephadex LH-20, indicando a presença de compostos com pesos moleculares inferiores a 400.

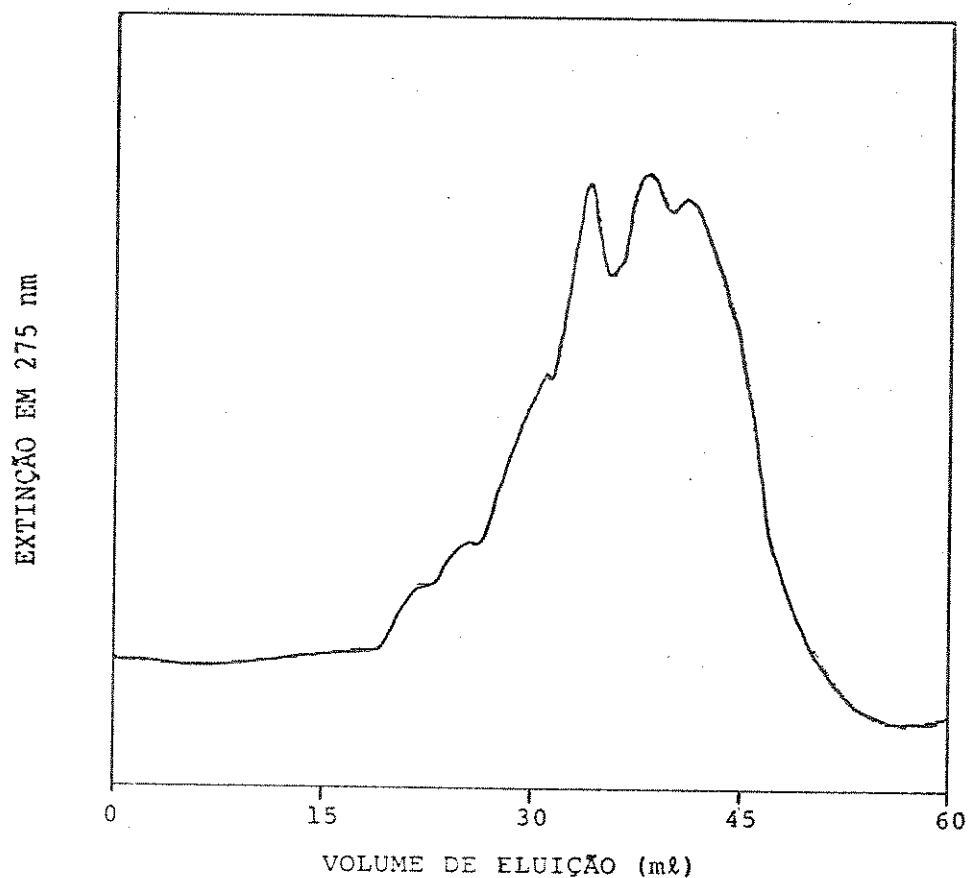


FIG. 27 - Permeação em gel SEPHADEX LH-20 do extrato- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  de caldos de cultivo obtidos na biodegradação de *Pinus radiata* por *Chrysonilia sitophila* durante 3 meses.

Solvente Dimetilformamida 0,3 ml/min (item III.3.3.4, p.39).

A análise cromatográfica (CLAE) dos extratos- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , indicaram a presença de compostos com absorção em 280 nm (figura 28). Pode-se observar que alguns monômeros modelo de lignina injetados como padrão, apresentaram tempos de retenção maiores que aqueles observados para compostos do extrato- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Como a análise cromatográfica foi desenvolvida em uma coluna C-18 (apolar), o aparecimento de compostos com tempo de retenção menor que o aldeído e o ácido veratrílico (figura 28), indica a presença de compostos mais polares (saem primeiro em colunas apolares C-18) no extrato- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

Estes compostos estariam portanto mais oxidados que os modelos citados anteriormente, como já demonstrado por Chen e col. [1982] que detectou a presença de compostos dicarboxilados no anel aromático quando analisou sub-produtos da degradação de madeira "spruce" por *P. Chrysosporium* através da técnica de CG/EM. O tempo de retenção observado para o ácido ftálico, injetado como padrão, também reforça a sugestão da presença de fragmentos dicarboxilados no anel aromático (figura 28).

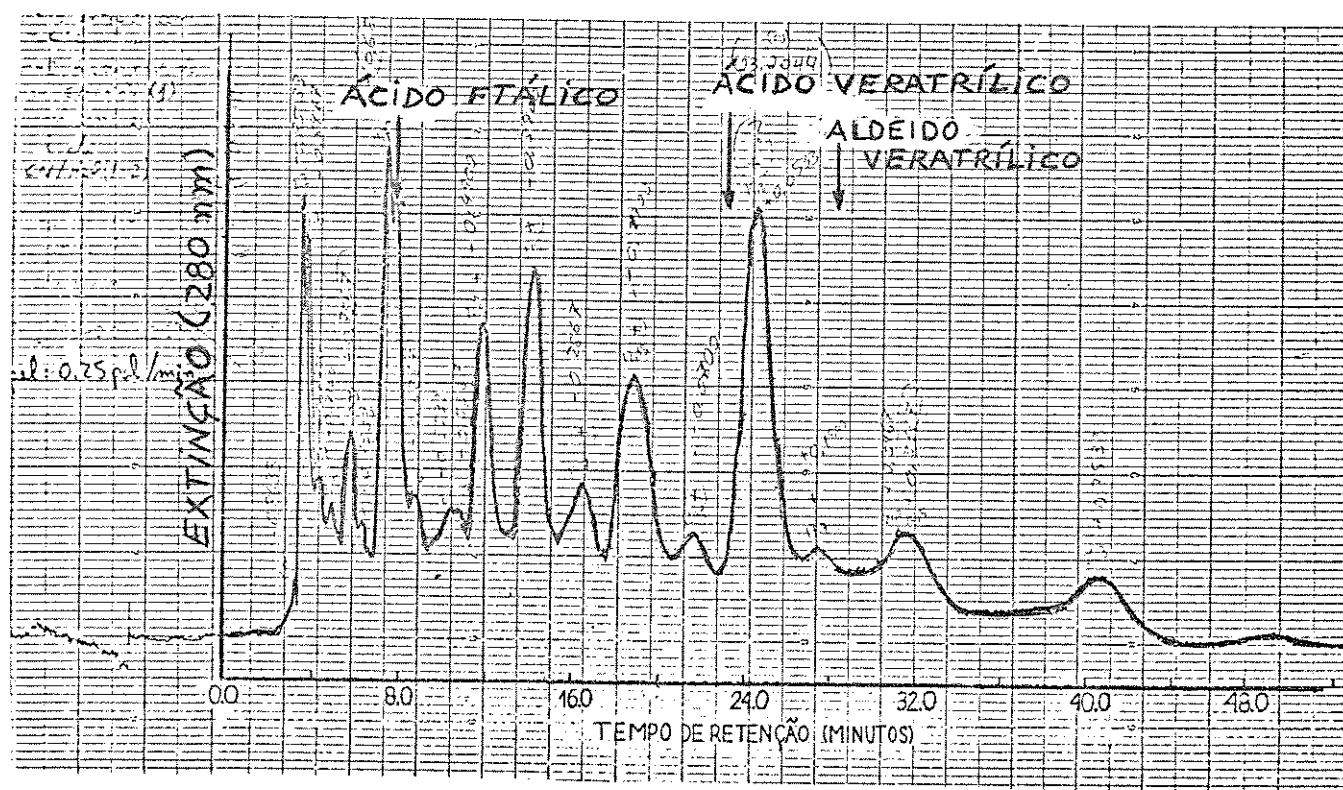


FIG. 28 - Cromatograma (CLAE) do extrato- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  de caldos de cultura obtidos na biodegradação de *Pinus radiata* por *Chrysonilia sitophila* durante 3 meses. Coluna  $\mu$ -Bondapak C-18, solvente acetonitrila/água (1:8 com 1% de ácido acético) 1,0 ml/min (item III.3.4.2, p. 38).

Os destilados obtidos dos caldos de cultivo, mostraram a presença de metanol e etanol, identificados por cromatografia gasosa (figura 30). A presença de metanol em culturas obtidas da biodegradação de ma-

deira tem sido atribuída a desmetilação da lignina, sendo que posteriormente este metanol pode ser utilizado pelo fungo para a produção de peróxido de hidrogênio (necessário para a ação das lignina-peroxidases), através da ação de metanol-oxidases [Eriksson, 1987b]. A detecção de etanol e metanol também tem sido reportada para a degradação de lignina marcada com  $^{14}\text{C}$ , comprovando que o metanol é proveniente da lignina e o etanol da fermentação de glicose [Ander e Eriksson, 1985].

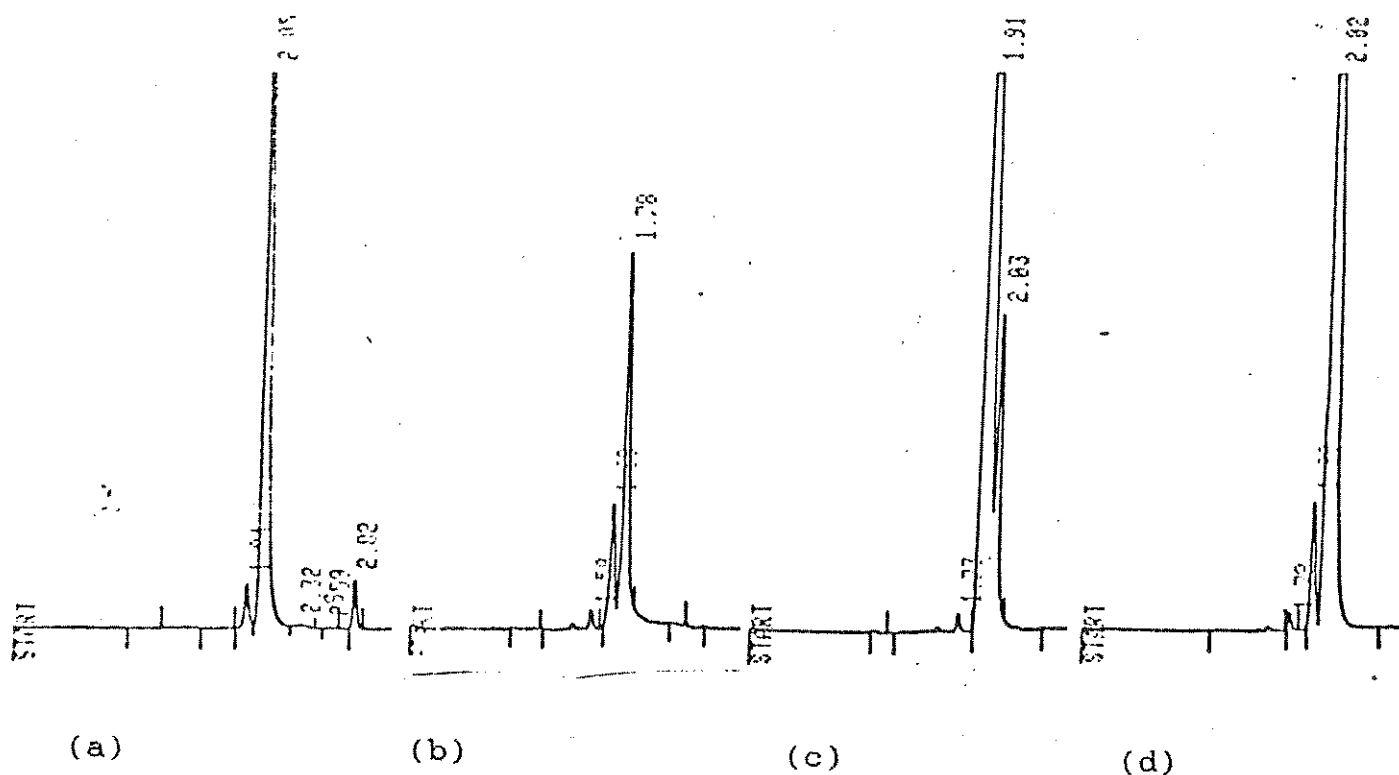


FIG. 29 - Cromatogramas (CG) dos voláteis obtidos na biodegradação de *Pinus radiata* por *Chrysonilia sitophila* durante 3 meses.

(a) Cromatograma dos voláteis obtidos por destilação dos caldos de cultura sem madeira; (b) idem "a" porém de culturas com madeira; (c) idem "b" contaminado com metanol; (d) idem "b" contaminado com etanol. Coluna LM-100/Polietilenoglicol,  $\text{N}_2$  4,1 ml/min (item III.3.4.2, p. 38)

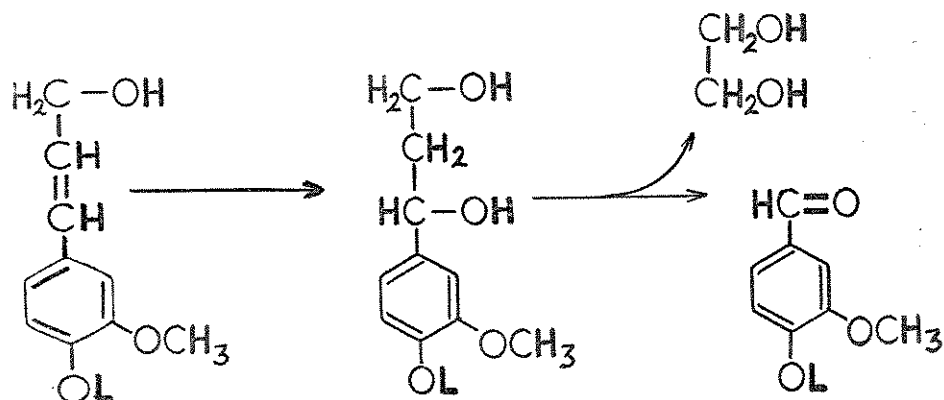
É interessante ressaltar que a relação de metanol/etanol nos destilados de caldo sem madeira é 1:25, enquanto que para as culturas contendo madeira é 1:7, indicando realmente que o metanol encontrado foi proveniente do processo de degradação da madeira.

A compilação dos resultados da análise das ligninas estudadas e dos fragmentos liberados no caldo de cultura, têm proporcionado a possibilidade da sugestão de algumas reações que devem ocorrer durante a biodegradação de lignina "in situ" por *C. sitophila*. Desta forma descrevemos abaixo um resumo das modificações observadas para cada lignina biodegradada, seguidas das evidências analíticas que levaram a estas conclusões e as reações propostas para o processo de biodegradação.

#### MWL de *P. radiata* Biodegradado

- Aumento do teor de  $\alpha$ - carbonilas (análise de grupos funcionais; I.V.)
- Abertura de  $\alpha$ - $\beta$  insaturações (U.V. 280 nm; RMN- $^1\text{H}$ ; I.V.)
- Não abertura de anéis aromáticos (I.V.; U.V. 280 nm; análise de grupos funcionais; RMN- $^1\text{H}$ ).
- Aumento de carbonos saturados (RMN- $^{13}\text{C}$ ).
- Diminuição de metoxilas (análise de grupos funcionais).
- Não modificação no teor de hidroxilas aromáticas e alifáticas (análise de grupos funcionais; RMN- $^1\text{H}$ ).
- Não modificação no teor de oxigênio, carbono e hidrogênio (análise elementar)
- Manutenção de alto peso molecular (distribuição de P.M./LH-60)

ESQUEMA I - Reação proposta:

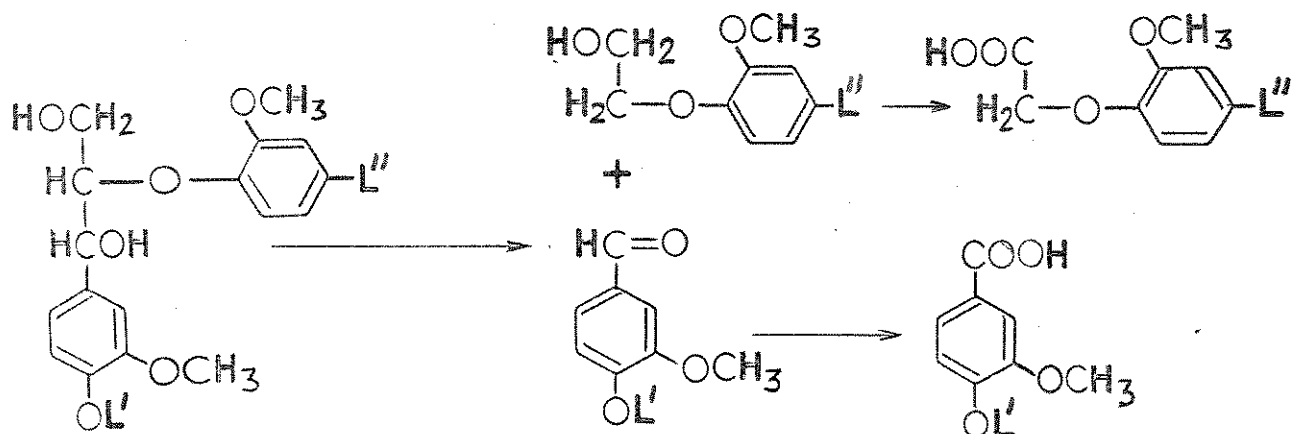


#### LFA-Dioxano

- Abertura de  $\alpha$  -  $\beta$  insaturações e anéis aromáticos (U.V. 280 nm; I.V. RMN- $^1\text{H}$ ; RMN- $^{13}\text{C}$  e análise de grupos funcionais)
- Formação de grupos carboxílicos (I.V.; análise de grupos funcionais e RMN $^{13}\text{C}$ ).
- Incorporação de 2 átomos de hidrogênio/unidade fenil-propano (análise elementar).
- Aumento de carbonos saturados nas cadeias laterais (RMN- $^{13}\text{C}$ ).
- Formação de quinonas (U.V./Visível; metanol no caldo)
- Despolimerização (Distribuição de P.M./LH-20)



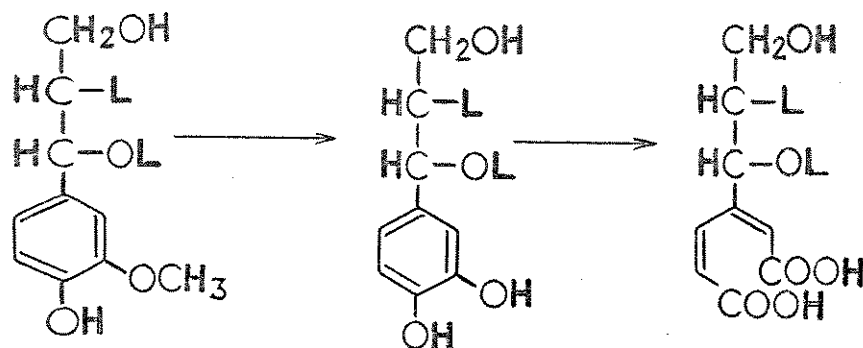
## ESQUEMA II - Reação proposta



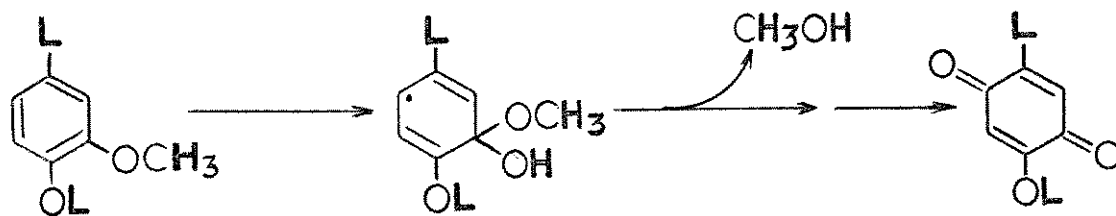
## LFA-Metanol

- Abertura de anéis aromáticos e  $\alpha$ - $\beta$  insaturações (U.V. 280 nm; I.V.; RMN- $^1\text{H}$ ; RMN- $^{13}\text{C}$  e análise de grupos funcionais)
- Formação de grupos carboxílicos (I.V.; análise de grupos funcionais e RMN $^{13}\text{C}$ )
- Diminuição de  $\alpha$ -carbonilas e  $\gamma$ -carbonilas -  $\alpha$  -  $\beta$  -insaturadas (análise de grupos funcionais)
- Incorporação de 3 átomos de hidrogênio e um de oxigênio/unidade fenil-propano (análise elementar).
- Aumento de carbonos saturados nas cadeias laterais (RMN- $^{13}\text{C}$ ).
- Diminuição de metoxilas (RMN- $^1\text{H}$  e RMN- $^{13}\text{C}$  - análise indireta).
- Formação de quinonas (U.V./Visível; metanol no caldo)
- Despolimerização (Distribuição de P.M./LH-20)

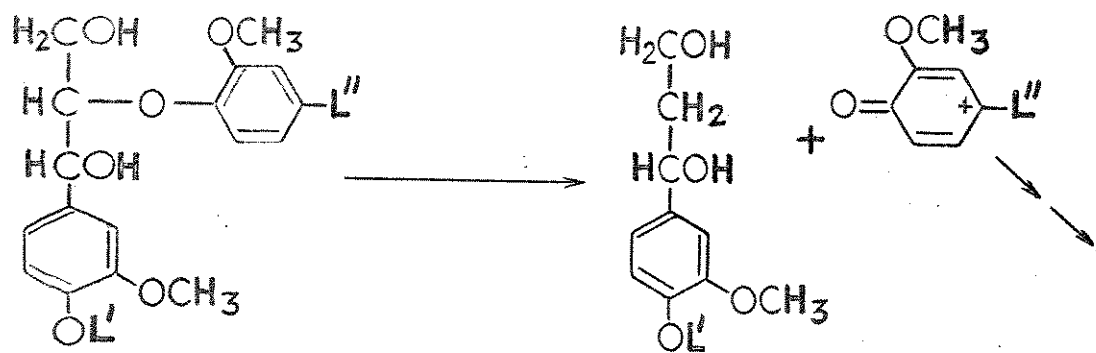
## ESQUEMA III - Reação proposta



## ESQUEMA IV - Reação proposta



## ESQUEMA V - Reação proposta



## V - CONCLUSOES

- Foram otimizadas as principais condições de cultivo para *C. sitophila* utilizando celulose como fonte de carbono.

- A composição química do micélio de *C. sitophila* foi determinada e avaliado que este Ascomiceto tem um potencial para a produção de proteínas unicelulares.

- Foram avaliadas as condições de cultivo onde *C. sitophila* proporciona a máxima deslignificação da madeira *P. radiata*, indicando a necessidade da adição de um co-substrato (glicose) para a ocorrência de deslignificação seletiva.

- O mecanismo da degradação de lignina "in situ" foi estudado e indicou que *C. sitophila* proporciona reações de biodegradação semelhantes as propostas para a biodegradação de lignina por fungos de decomposição branca, tais como: clivagem  $C\alpha - C\beta$  e  $\beta$ -O-aril.

Estas reações foram evidenciadas através da análise de modificações na estrutura das ligninas de *P. radiata* biodegradado, onde concluímos sobre o aparecimento de novas subestruturas contendo ácidos carboxílicos e novos carbonos saturados tipo C-CH<sub>2</sub>-C nas cadeias laterais das ligninas. Também processos envolvendo a abertura de  $\alpha - \beta$  insaturações e anéis aromáticos foram evidenciados.

- Adler, E. e Marton, J. 1959, "Zur Kenntnis der Carbonylgruppen im Lignin I", Acta Chem. Scand. 13: 75-96.
- Agosin, E.; Blanchette, R.A.; Silva, H.; Lapiere, C.; Cease, K.R.; Ibach, R.E.; Abad, A.R. e Muga, P. 1990, "Characterization of Palo Podrido, a Natural Process of Delignification in Wood", Appl. Environ. Microbiol. 56:65-74
- Ander, P. e Eriksson, K.E. 1975. Influence of Carbohydrates on Lignin Degradation by White-rot Fungus *Sporotrichum pulverulentum*, Sven. Papperstidn. 78: 643-652.
- Ander, P. e Eriksson, K.E. 1976, "The importance of Phenol-oxidase Activity in Lignin Degradation by the White-rot Fungus *Sporotrichum pulverulentum*", Arch. Microbiol. 109:1-8
- AOAC Methods 1980a, "Animal Feed", p. 132-134.
- AOAC Methods 1980b, "Vitamins e Other Nutrients", p. 740-742.
- ASTM Methods 1966a, "Standard Method of Test for Lignin in Wood, p. 396-398.
- ASTM Methods 1966b, "Standard Method of Test for One Per Cent Caustic Soda Solubility of Wood", p. 414-415.
- Beall, F.C.; Merrril, W.; Baldwin, R.C. e Wang, J.H. 1976, "Thermogravimetric Evaluation of Fungal Degradation of Wood", Wood e Fiber, 8: 159-167.
- Berry, R.K. e Dekker, R.F.H. 1986, "Fractionation of the Cellulolytic Enzymes Produced by a Species of *Monilia*: Purification and Properties of an Extracellular B-D-Glucosidase. Carbohydrate Res., 157: 1-12.
- Beuchat, L.R. 1976, "Fungal Fermentation of Peanut Press Cake", Ec. Bot., 30, 227-234.
- Browning, B.L. (ed.) 1967, "Methods of Wood Chemistry", John Wiley & Sons, NY, USA, vol. II, p. 660-665.
- Bureau, J. B. e Bushway, R.J. 1986, "HPLC Determionation of Carotenoids in Fruits and Vegetables in the United States", J. Food Sci. 51: 128-130.
- Campos, V.; Salas, E.; Durán, N.; Rodríguez, J. e Baeza, J. 1986, "Isolation of Cellulolytic *Chrysonilia sitophila* from *Tribolium ferrugineum*", Bol. Micol. (Chile) 2: 161-165.
- Ceriotti, G. 1959, "Determination of Nucleic Acids in Animal Tissues", J. Biol. Chem. 214: 59-70.
- Chen, C.L.; Chang, H.M. e Kirk, T.K. 1982, "Aromatic Acids Produced During Degradation of Lignin in Spruce Wood by *Phanerochaete chrysosporium*" Holzforschung 36: 3-9.
- Chen, C.L. e Chang, H.M. 1985, "Chemistry of Lignin Biodegradation" em Higuchi, H. (ed.) Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components, Academic Press, Flórida, USA, p. 535-556.
- Chua, M.G.S.; Chen, C.L.; Chang, H.M. e Kirk, T.K. 1982, "<sup>13</sup>C-NMR Spectroscopy Study of Spruce Lignin Degraded by *Phanerochaete chrysosporium*", Holzforschung 36: 165-172.
- Connors, W.J.; Lorenz, L.F. e Kirk, T.K. 1978, "Chromatographic Separation of Lignin Models by Molecular Weight Using Sephadex LH-20", Holzforschung 32: 106-108.
- Connors, W.J.; Sarkanen, S. e McCarthy, J.L. 1980, "Gel Chromatography and Association Complex of Lignin", Holzforschung 34: 80-85.
- Cooney, C.L. 1981, "Growth of Microorganisms" em Rehm, H.J. e Reed, G. (ed.) Biotechnology - Microbial Fundamentals, Verlag Chemie, Flórida, USA, vol. 1, p. 73-112.

- Crawford, D.L. 1981, "Microbial Conversions of Lignin to Useful Chemicals Using a Lignin Degrading *Streptomyces*", Biotechnol. Bioeng. Symp. 11: 275-291.
- Crawford, D.L.; Barder, M.J.; Pometto III, A.L. e Crawford, R. 1982, "Chemistry of Softwood Lignin Degradation by *Streptomyces viridosporus*", Arch. Microbiol. 131: 140-145.
- Dekker, R.F.H. 1985, "Biodegradation of the Hemicelluloses" em Higuchi, T. (ed.) Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components", Academic Press, Flórida, USA, p. 505-533.
- DIFCO Manual 1978, "Czapek Solution Agar", DIFCO Lab. Inc., Michigan, USA., p. 245.
- Dodson, P.J.; Evans, C.S.; Harvey, P.J. e Palmer, J.M. 1987, "Production and Properties of an Extracellular Peroxidase from *Coriolus versicolor* which Catalyses C - C Cleavage in a Lignin Model Compound", FEMS Lett. 42: 17-22.
- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A. e Smith, F. 1976, "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances", Anal. Chem. 28: 350-356.
- Durán, N. 1990, "Bioconversion to Single Cell Protein: Recovery of Lignocellulosic Materials to Produce Human Food as a Integrated Process", Alimentos 14/15: 39-61.
- Durán, N.; Rodríguez, J.; Ferraz, A. e Campos, V. 1987a, "*Chrysonilia sitophila*: A Hyperligninolytic Strain", Biotechnol. Lett. 9: 357-360.
- Durán, N.; Ferrer, I. e Rodríguez, J. 1987b, "Ligninases from *Chrysolnilia sitophila* (TFB 27441 strain)", Appl. Biochem. Biotechnol. 16: 157-163.
- Durán, N.; Rodríguez, J.; Gómez, E.; Campos, V. e Baeza, J. 1988a, "Biomass Photochemistry - XI. Photochemical Pretreatment of Cellulose and Its Fungal Degradation", Biotechnol. Bioeng. 31: 215-219.
- Durán, N.; Reyes, J.; Baeza, J. e Campos, V. 1988b, "Biomass Photochemistry: XII. Chemical and Photochemical Pretreatment of Rice Hull and Its Fungal Degradation", Biotechnol. Bioeng. 32: 564-568.
- Durán, N.; Ferraz, A. e Manssila, H. 1990, "Biopulping: A New View on Wood Delignification", Arg. Biol. Tecnol. 33:295-315
- Eriksson, K.E. 1985, "Swedish Developments in Biotechnology Related to the Pulp and Paper Industry", TAPPI J. 68: 46-77.
- Eriksson, K.E. 1987a, "Breakthroughs in Biotechnology Show Promise for Paper Industry", Pulp & Paper May: 114-117.
- Eriksson, K.E. 1987b, "Production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Phanerochaete chrysosporium* during Lignin Degradation", Phil. Trans. R. Soc. Lond. A321: 455-459.
- Eriksson, K.E. 1990, "Biotechnology in the Pulp and Paper Industry", Wood Sci. Technol. 24: 79-101.
- Eriksson, K.E. e Goodell, E.W. 1974, "Pleiotropic Mutants of the Wood Rotting Fungus *Poliporus audustus* lacking cellulase, mannanase and xylanase", Can. J. Microbiol. 20: 371-378.
- Eriksson, K.E.; Johnsrud, S.C. e Vallander, L. 1983, "Degradation of Lignin and Lignin Model Compounds by Various Mutants of the White-rot Fungus *Sporotrichum pulverulentum*", Arch. Microbiol. 135: 161-168.
- Eriksson, K.E. e Wood, T.M. 1985, "Biodegradation of Cellulose" em Higuchi, T. (ed.) Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components", Academic Press, Flórida, USA, p. 469-503.
- Enoki, A.; Tanaka, H. e Fuse, G. 1988, "Degradation of Lignin-Related Compounds, Pure Cellulose, and Wood Components by

- White-rot and Brown-rot Fungi", Holzforschung 42: 85-93.
- FAO-WHO 1965, "Protein Requirements Report by a Joint FAO-WHO Expert Group", World Health Org. Tech. - Pap. Ser. N 301.
- Fardaiz, D. e Markakis, P. 1981, "Oligosaccharides and Protein Efficiency Ratio of Oncon (Fermented Peanut Press Cake)", J. Food. Sci. 46: 1970-1971.
- Fengel, D. e Wegener, G. (ed.) 1984a "Wood - Chemistry, Ultrastructure, Reactions", Walter de Gruyter, NY, USA, p. 66-181.
- Fengel, D. e Wegener, G. (ed.) 1984b "Wood - Chemistry, Ultrastructure, Reactions", Walter de Gruyter, NY, USA, p. 13-16.
- Fengel, D. e Wegener, G. (ed.) 1984c "Wood - Chemistry, Ultrastructure, Reactions", Walter de Gruyter, NY, USA, p. 375-406.
- Ferraz, A. e Durán, N. 1989, "Effect of Various Conditions on the *Chrysonilia sitophila* "TFB 27441" Growth", Rev. Microbiol. (Brasil) 20: 240-245.
- Ferraz, A. e Durán, N. 1990, "Reflectance Spectroscopy Used as a Non Destructive Method for Wood Biodegradation Monitoring", Proc. First Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components., v. II, p.200-204.
- Freer, J.; Baeza, J.; Palma, G.; Campos, V.; Salas, E.; Ferraz, A. e Durán, N. 1990, "Production of Microbial Protein from Forest Products", Biomass 23:, 155-162.
- Fukuda, K. e Haraguchi, T. 1985, " Successive Change of Lignin Through All the Stage of Wood Decay by Brown-rot Fungus *Tyromyces palustris*", Bull. Exp. Forests, Tokio Univ. Agric. Technol. 60: 115-121.
- Gullián, F.; Martínez, A.T. e Martínez, M.J. 1990, "Production of Hydrogen Peroxide by Aryl-alcohol Oxidase from the Ligninolytic Fungus *Pleorotus eryngii*", Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 465-469.
- Goldshmid, O. 1971, "Ultraviolet Spectra" em Sarkanen, K.V. e Ludwig, L.H. (ed.) Lignin - Occurrence, Formation, Structure and Reactions, Willey/InterScience, NY, USA, p. 241-266.
- Goring, D.A.I. 1971, "Polymer Properties of Lignin and Lignin Derivatives" em Sarkanen, K.V. e Ludwig, L.H. (ed.) Lignin - Occurrence, Formation, Structure and Reactions, Willey/InterScience, NY, USA, p. 695-768.
- Harper, H.A. (ed.), 1961, Review of Physiological Chemistry, Lange Medical Publ., Califórnia, USA.
- Haider, K.; Kern, H.W. e Ernst, L. 1985, "Intermediate Steps of Microbial Lignin Degradation as Elucidated by <sup>13</sup>C-NMR Spectroscopy of Specifically <sup>13</sup>C-Enriched DHP-Lignin", Holzforschung 39: 23-32.
- Heden, C.G.; Eriksson, K.E. e Johnsrud, S.C. 1988, "Container for Biopulping of Lignocellulosic Materials During Transportation", Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP Patent 63,315,688
- Hergert, L.H. 1971, "Infrared Spectra" em Sarkanen, K.V. e Ludwig, L.H. (ed.) Lignin - Occurrence, Formation, Structure and Reactions, Willey/ InterScience, NY, USA, p. 267-297.
- Higuchi, T. (ed.) 1985, "Degradative Pathways of Lignin Model Compounds" em Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components, Academic Press, Flárida, USA, p. 557-578.
- Horowitz, N.H. e Shen, S.C. 1952, "*Neurospora* Tyrosinase", J. Biol. Chem. 197: 513.

- Johnsrud, S.C. e Eriksson, K.E. 1985, "Cross-breeding of Selected and Mutated Homokaryotic Strains of *Phanerochaete chrysosporium* K-3: New Cellulase-deficient Strains with Increased Ability to Degrade Lignin", Appl. Microbiol. Technol. 21: 230-327.
- Jurasek, L. e Paice, M.G. 1988. Biological Treatments of Pulps. Biomass 15: 103-108.
- Kaarik, A. 1974, "Decomposition of Wood", em Dickinson, C.H. e Pugh, G.J.F. (ed.) *Biology of Plant Litter Decomposition*, Academic Press, London, UK, p. 129-174.
- Kawai, S.; Umezawa, T. e Higuchi, T. 1988, "Degradation Mechanisms of Phenolic  $\beta$ -1 Lignin Structure Model Compounds by Laccase of *Coriolus versicolor*", Arch. Biochem. Biophys. 262: 99-110
- Kersten, P.J.; Tien, M.; Kalynaraman, B. e Kirk, T.K. 1985, "The Ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* Cation Radicals from Methoxy Benzenes", J. Biol. Chem. 260: 2609-2612.
- Keyser, P.; Kirk, T.K. e Zeikus, J.G. 1978, "Ligninolytic Enzyme System of *Phanerochaete chrysosporium*: Synthesized in the Absence of Lignin in Response to Nitrogen Starvation", J. Bacteriol., 135: 790-794.
- Kihlberg, R. 1972, "The Microbe as a Source of Food", Ann. Rev. Microbiol., 26: 427-466.
- Kirk, T.K. 1987, "Lignin-degrading Enzymes", Phil. Trans. R. Soc. Lond. A321: 461-474.
- Kirk, T.K. e Adler, E. 1970, "Methoxyl-deficient Structural Elements in Lignin of Sweetgum Decayed by a Brown-rot Fungus", Acta Chem. Scand. 24: 3379-3390.
- Kirk, T.K. e Chang, H.M. 1974, "Decomposition of Lignin by White-rot Fungi I. Isolation of Heavily Degraded Lignin from Decayed Spruce", Holzforschung 28: 217-222.
- Kirk, T.K. e Chang, H.M. 1975, "Decomposition of Lignin by White-rot Fungi II. Characterization of Heavily Degraded Lignin from Decayed Spruce", Holzforschung 29: 56-64.
- Kirk, T.K. e Farrel, R.L. 1987. "Enzymatic Combustion: The Microbial Degradation of Lignin", Ann. Rev. Microbiol. 41: 217-225.
- Lai, Y.Z. e Sarkanen, K.V. 1971, "Isolation and Structural Studies" em Sarkanen, K.V. e Ludwig, L.H. (ed.) *Lignin - Occurrence, Formation, Structure and Reactions*, Wiley/InterScience, NY, USA, p. 165-230.
- Lara, A.B.W.; Nazário, G.; Almeida, M.E.W. e Pregnotatto, W. 1976, "Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz - Métodos Químicos e Físicos para a Análise de Alimentos", Inst. Adolfo Lutz, p. 24-47.
- Leathan, G.F.; Myers, G.C. e Wegner, T.H. 1989, "Biomechanical Pulping of Aspen Chips: Energy Savings Resulting from Different Fungal Treatments", TAPPI J. May(73): 197-200.
- Leathan, G.F.; Myers, G.C. e Wegner, T.H. 1990, "Biomechanical Pulping of Aspen Chips: Paper Strength and Optical Properties Resulting from Different Fungal Treatments", TAPPI J., March(74): 249-254.
- Leisola, M.S.A. e Fiechter, A. 1985, "New Trends in Lignin Biodegradation", Adv. Biotechnol. Processes. 5: 59-89.
- Lenz, B.L. 1968 "Application of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy to Characterization of Lignin", TAPPI 51(11): 511-519.
- Levy, J.F. 1987, "The Natural History of the Degradation of Wood. Phil. Trans. R. Lond. Soc. A321: 423-433.



- Litchfield, J.H. 1983, "Single Cell Proteins", Science 219:740-746
- Mandels, M.; Andreotti, R. e Roche, C. 1976, "Measurement of Saccharifying Cellulase", Biotechnol. Bioeng. Symp. 6: 21-39
- McCarthy, A.J. 1987, "Lignocellulose-Degrading Actinomycetes", FEMS Microbiol. Rev. 46: 145-163.
- Moore-Landecker, E. (ed.) 1972, "Physiology and Reproduction: Growth" em Fundamentals of the Fungi, Prentice-Hall, NY, USA, p. 145-183.
- Nagai, S. 1979 (ed.), "Mass and Energy Balances for Microbial Growth Kinetics" em Advances in Biochemical Engineering, v. II, p. 49-83.
- Nakazawa, B e Yamazaki, I. 1951, "Studies on *Neurospora*, Grown on Trunks of Tree which were Burned by Air Raid Fire, 1945 in Kyushu", Sci. Bull. of Faculty of Agriculture 13: 143-148.
- Nguyen, T.; Zavarin, E. e Barral II, E.M. 1981, "Thermal Analysis of Lignocellulosic Materials. Part I. Unmodified Materials", J. Macromol. Sci. - Rev. Macromol. Chem. C20: 1-65
- Nilsson, T.; Daniel, G.; Kirk, T.K. e Obst, J.R. 1989, "Chemistry and Microscopy of Wood Decay by some Higher Ascomycetes", Holzforschung 43: 11-18.
- Nogueira, R.F.P. 1990, "Síntese e Biodegradação de Compostos Modelo de Lignina por *Chrysonilia sitophila* (TFB 27441), Tese de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, Brasil.
- Norgard, S.; Aesen, A.J. e Jensen, S.L. 1970, "Bacterial Carotenoids XXXIII. C<sub>50</sub> - Carotenoids 6. Carotenoidas from *Corynebacterium poinsetiae* Including Four New C<sub>50</sub> - Diols", Acta Chem. Scand. 24: 2183-2197.
- O'Reilly, S.; Erazo, S.; Campos, V.; Salas, E.; Baeza, J.; Ferraz, A.; Rodriguez, J. e Durán, N. 1991, "The Effect of Carbon Sources on the Single Cell Protein and Extracellular Enzymes Production by *Chrysonilia sitophila* (TFB 27441 strain)" Appl. Biochem. Biotechnol. 23, 000-000.
- Oriran, T.P.; Labosky Jr, P. e Blankenhorn, P.R. 1990, "Kraft Pulp and Papermaking Properties of *Phanerochaete chrysosporium* Degraded Aspen", TAPPI J. July: 147-152.
- Polcin, J. e Rapson, W.H. 1969, "Spectrophotometric Study of Wood Chromophores in situ I. The Method of Differential (K/S) Curves Related to Bleaching and Color Reversion" TAPPI, 52:1960-1965
- Plummer, D.T. (ed.) 1978, "An Introduction to Practical Biochemistry", McGraw Hill, London, UK, p. 156-159.
- Quinn, M.R.; Beuchat, L.R.; Miller, J.; Young, C.T. e Worthington, R.E. 1975, "Fungal Fermentation of Peanut Flour: Effect on Chemical Composition and Nutritive Value", J. Food. Sci. 40: 470-474.
- Reed, G. (ed.), 1983, "Microbial Biomass, Single Cell Protein, and Other Microbial Products" em Industrial Microbiology, Mescotti & Dunn's Publ. Co. Inc., NY, USA, p. 541-591.
- Robert, D. e Chen, C.L. 1989, "Biodegradation of Lignin in Spruce Wood by *Phanerochaete chrysosporium*: Quantitative Analysis of Biodegraded Spruce Lignins by <sup>13</sup>C-NMR Spectroscopy", Holzforschung 43: 323-333.
- Rodríguez, J. 1987, "Produção de Enzimas Lignocelulolíticas e Proteína Unicelular por *Chrysonilia sitophila*", Tese de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP (Brasil).
- Rodríguez, J. 1990, "Estudo do Sistema Ligninolítico do Ascomiceto *Chrysonilia sitophila*", Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP (Brasil).

- Rodríguez, J. e Durán, N. 1988, "Some New Aspects of Enzymatic Lignin Biodegradation", Brazilian J. Med. Biol. Res. 21: 411-422.
- Rodríguez, J. e Durán, N. 1991, "Biodegradation of Lignosulfonate by *Chrysonilia sitophila*", Appl. Biochem. Biotechnol. (no prelo).
- Rogers, C.J.; Coleman, E.; Spino, D.F.; Purcell, T.C. e Scarpino, P.V. 1972, "Production of Fungal Protein from Cellulose and Waste Cellulosics", Environ. Sci. Technol. 6: 715-719.
- Ruel, K. e Barnoud, F. 1985, "Degradation of Wood by Microorganisms" em Higuchi, T. (ed.) *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*. Academic Press, Flórida, p. 441-467.
- Ryan, F.J.; Beadle, G.W. e Tatum, E.L. 1943, "The Tube Method of Measuring Growth Rate of *Neurospora*" Amer. J. Bot. 30:784-799
- Sales, A.M.; Lajolo, F.M.; Menezes, T.J.B. e Shiroye, I. 1983, "Aproveitamento da Biomassa de Mandioca Fermentada na Alimentação Animal I. Composição Química e Valor Nutritivo do Micélio de *Rhizopus* sp. Obtido por Fermentação Submersa", Col. ITAL, Campinas (Brasil), 13, 59-74.
- Shay, L.K. e Wegner, G.H. 1985, "Improved Fermentation Process for Producing *Torula* Yeast" Food. Technol. October: 61-66.
- Tai, D.S.; Terazawa, M.; Chen, C.L. e Chang, H.M. 1990, "Lignin Biodegradation Products from Birch Wood by *Phanerochaete chrysosporium*", Holzforschung 44: 185-190.
- Tanaka, M. e Matsuno, R. 1985, "Conversion of Lignocellulosic Materials to Single Cell Protein (SCP): Recent Developments and Problems", Enzyme Microb. Technol. 7: 197-206.
- Thonke, S.; Rundgren, M e Eriksson, S. 1980, "Nutritional Evaluation of the White-rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium* as a Feedstuff to Rats, Pigs and Sheep", Biotechnol. Bioeng. 22: 2285-2303.
- Tran, A.V. e Chambers, P. 1987, "Delignification of an Unbleached Hardwood Kraft Pulp by *Phanerochaete chrysosporium*", Appl. Microbiol. Biotechnol. 25:484-490.
- Vanucci, C.; Fornier de Violet, P.; Bous-Laurent, H. e Castellan, A. 1988, "A Photophysical and Photochemical Study of a Non-phenolic  $\alpha$ -carbonyl  $\beta$ -O-4 Lignin Model Dimer, 3,4-dimethoxy- $\alpha$ -(2'-methoxyphenoxy) Acetophenone", J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 41: 251-265.
- Vetter, W.; Englert, G.; Rigassi, N. e Schwieter, U. 1971, em Isler, O.(ed.) *Carotenoids*, Birkhauser Verlag, Stuttgart, Alemanha, p. 189-266.
- Von Arx, J.A. 1981, em "The genera of Fungi Sporulating in Pure Culture", Cramer, J. (ed.), p. 297.
- Waslien, C.I. e Steinkraus, K.H. 1980, "The Potential of Microbial Cells", BioScience 30: 397-398.
- Wexler, A.S. 1964, "Characterization of Lignosulfonates by Ultraviolet Spectrometry", Anal. Chem. 36: 213-221.
- Yang, H.H.; Effland, M.J. e Kirk, T.K. 1980, "Factor Influencing Fungal Degradation of Lignin in a Representative Lignocellulosic, Thermomechanical Pulp. Biotechnol. Bioeng. 22: 46-55.
- Young, J. 1987, "Biopulping Consortium Discussed at Madison Meeting", TAPPI, 68(1); 15-16.
- Zadrazil, F.; Grinbergs, J. e González, A. 1982, "Palo-podrido: Decomposed Wood Used as Feed", Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 15: 167-171.

APENDICE I - Espectros e figuras utilizadas para o cálculo de propriedades físicas e químicas da madeira e lignina.

Cálculo do valor da Energia de ativação aparente ( $E_a$ ) para a pirólise de madeira na faixa 210 - 330°C:

-Pirólise segundo cinética de 1ª ordem: -  $dM/dT = k.M$

onde: M = massa de madeira à temperatura T;

k = constante de velocidade.

- Como k pode ser descrito pela equação de Arrhenius:

$$k = Z e^{-E/RT}$$

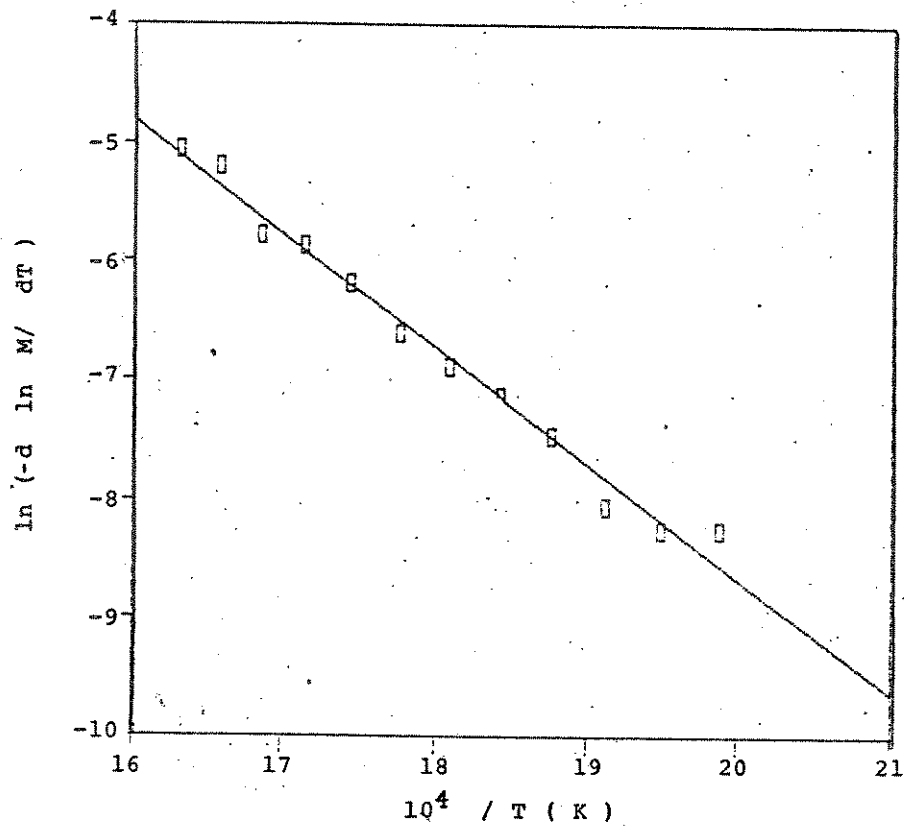
onde: E = energia de ativação; R = constante dos gases;

T = temperatura e Z = fator pré-exponencial.

- Então -  $dM/dT = (Z \cdot e^{-E/RT} \cdot M)$  ou

$$\ln (- d \ln M/dT) = \ln Z - E/RT$$

- Graficando  $\ln (- d \ln M/dT)$  versus  $1/T \rightarrow$  inclinação = - E/R.



THE REGRESSION POLYNOMIAL OF LINE 1 -

$$( 1.063E+01) + (-9.651E-01)*X$$

THE VARIANCE - 1.881E-02

FIG. 30 - Gráfico dos valores de  $\ln(-d \ln M / dT)$  versus  $1/T$  obtidos a partir do termograma da madeira de *Pinus radiata* controle.

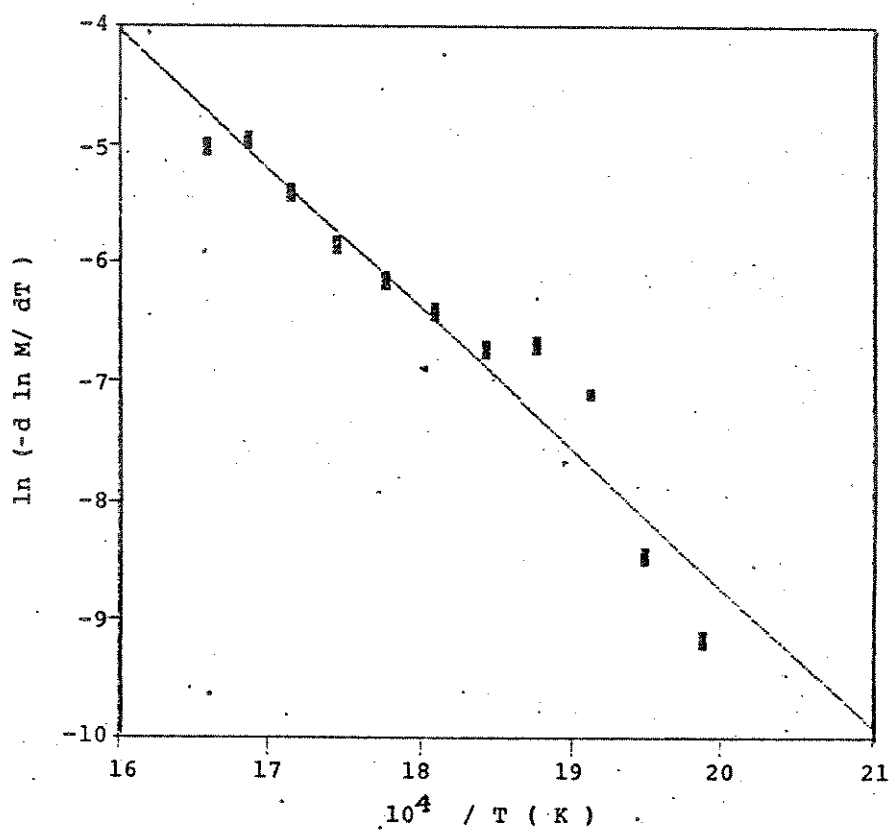
Cálculo do valor da Energia de ativação aparente ( $E_a$ ) para a pirólise na faixa 210 - 330°C:

$$\text{Inclinação} = - E_a/R \rightarrow$$

$$- 0,9651 \cdot 1,9872 \text{ cal/mol.K} = E_a = 1,92 \text{ cal/mol}$$

Como o gráfico está com T em  $10^4/T(K)$ ,

$$E_a = 19,2 \text{ Kcal/mol.}$$



THE REGRESSION POLYNOMIAL OF LINE 1 -

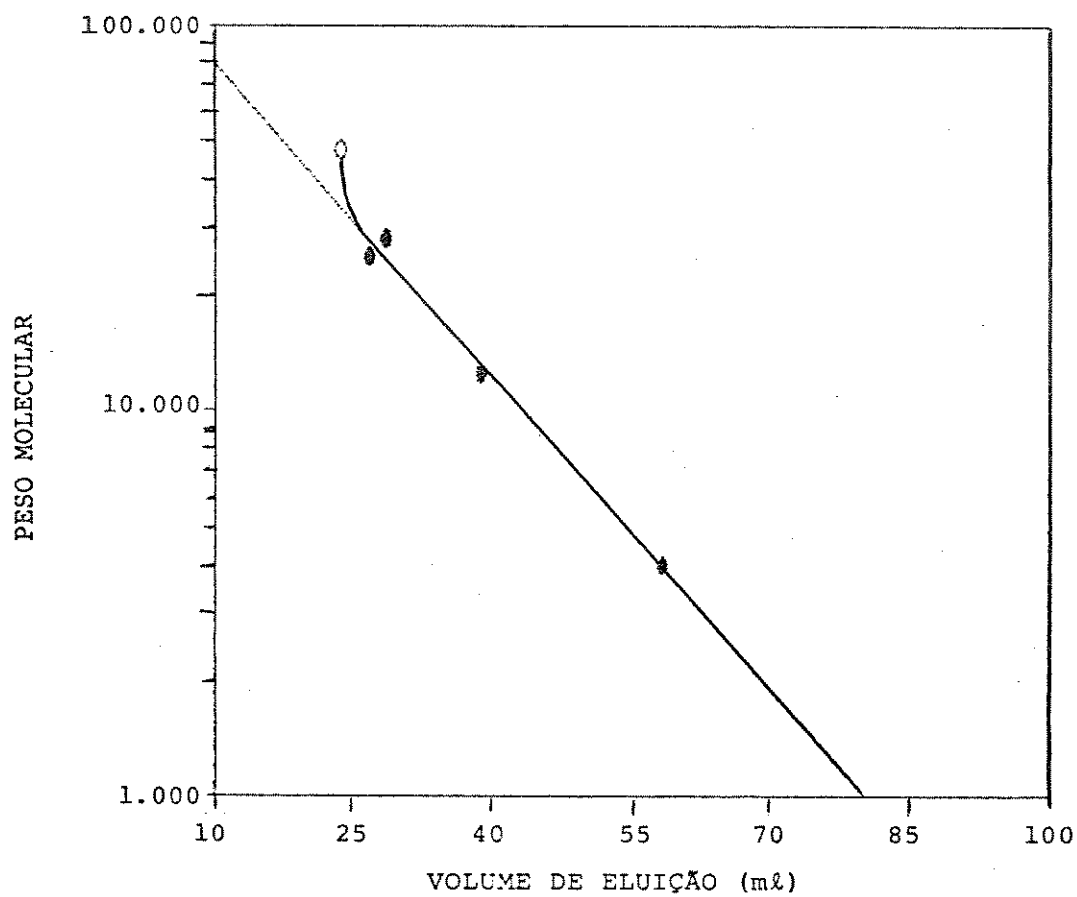
$$( 1.478E+01 ) + (-1.176E+00)*X$$

THE VARIANCE - 1.105E-01

FIG. 31 - Gráfico dos valores de  $\ln(-d \ln M / dT)$  versus  $1/T$  obtidos a partir do termograma da madeira de *Pinus radiata* biodegradada por *Chrysonilia sitophila* durante 15 dias.

Cálculo do valor da Energia de ativação aparente ( $E_a$ ) para a pirólise na faixa 210 - 330°C:

$$E_a = 23,4 \text{ Kcal/mol}$$

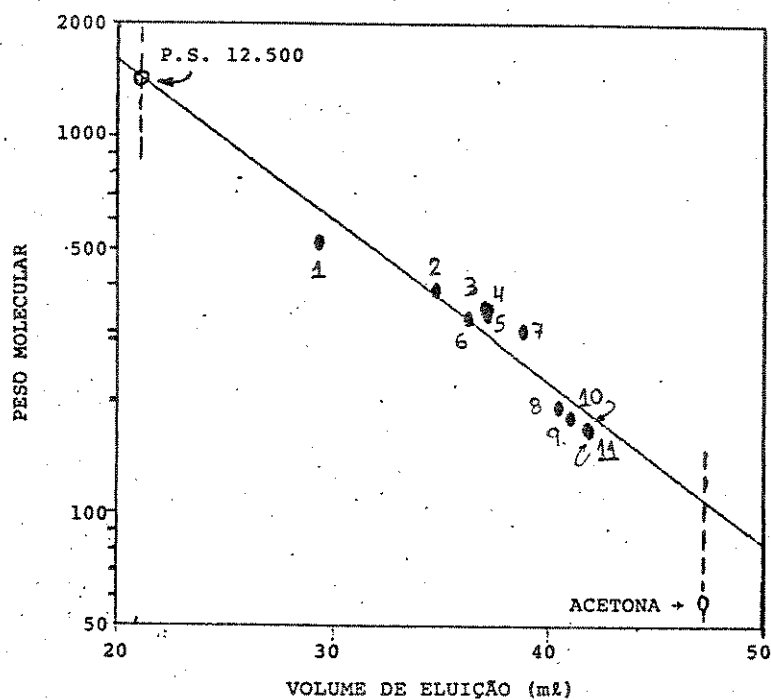


THE REGRESSION POLYNOMIAL OF LINE 1 -

$$( 5.169E+00) + (-2.699E-02)*x$$

THE VARIANCE - 1.379E-03

FIG. 32 - Curva de calibração da coluna Sephadex LH-60 utilizando poliestirenos como padrões.

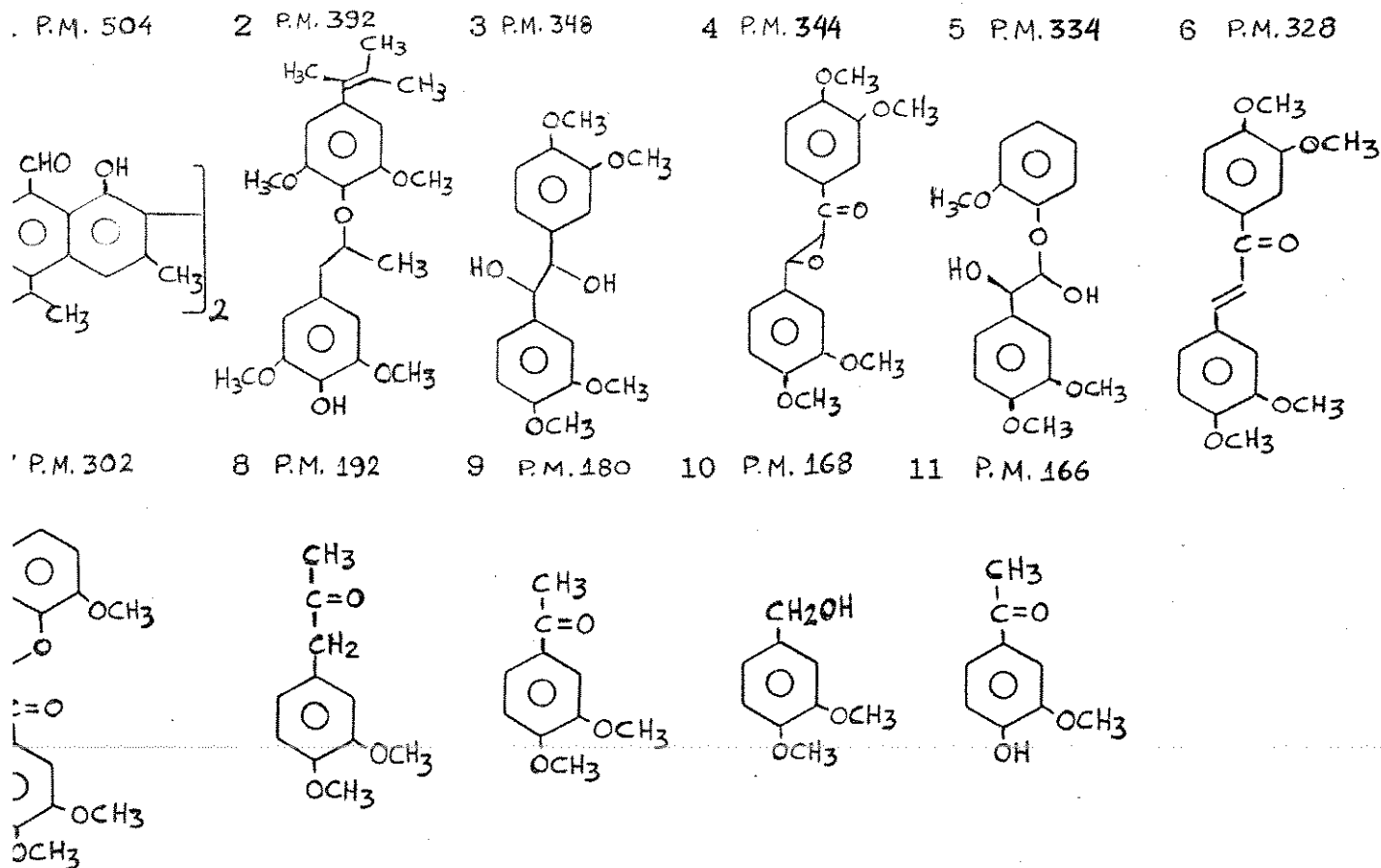


THE REGRESSION POLYNOMIAL OF LINE 1 -

$$(-4.055E+00) + (-4.266E-02)*X$$

THE VARIANCE - 3.187E-03

FIG. 33 - Curva de calibração da coluna Sephadex LH-20 utilizando compostos modelo de lignina como padrões (Nogueira, 1990).



Cálculo do teor de grupos carbonilas (estruturas acetoguaiiacona e coniferil-aldeido) por espectroscopia U.V. diferencial:

Cálculo do  $\Delta E_{310 \text{ nm}}$  e  $\Delta E_{342 \text{ nm}}$ :

$$\Delta E_{310 \text{ nm}} = A_{310} \times \text{P.M. para } C_9 \text{ em questão}/c$$

$$\Delta E_{342 \text{ nm}} = A_{342} \times \text{P.M. para } C_9 \text{ em questão}/c$$

onde:  $A_{310}$  e  $A_{342}$  = Absorbância em 310 e 342 nm respectivamente.

$c$  = concentração da amostra(g/l)

Resolução de 2 equações - teor de carbonilas:

$$\Delta E_{310 \text{ nm}} = 10.500X + 9400Y$$

$$\Delta E_{342 \text{ nm}} = 19.800X + 2020Y$$

onde:  $X$  = nº de  $\gamma$ -carbonilas- $\alpha$ - $\beta$ -insaturadas (figura 59).

$Y$  = nº de  $\alpha$ -carbonilas (figura 58)

Índices numéricos das equações = valores obtidos a partir da determinação de carbonilas em compostos modelo de lignina (acetoguaiiacona e coniferil-aldeido - figuras 58 e 59).



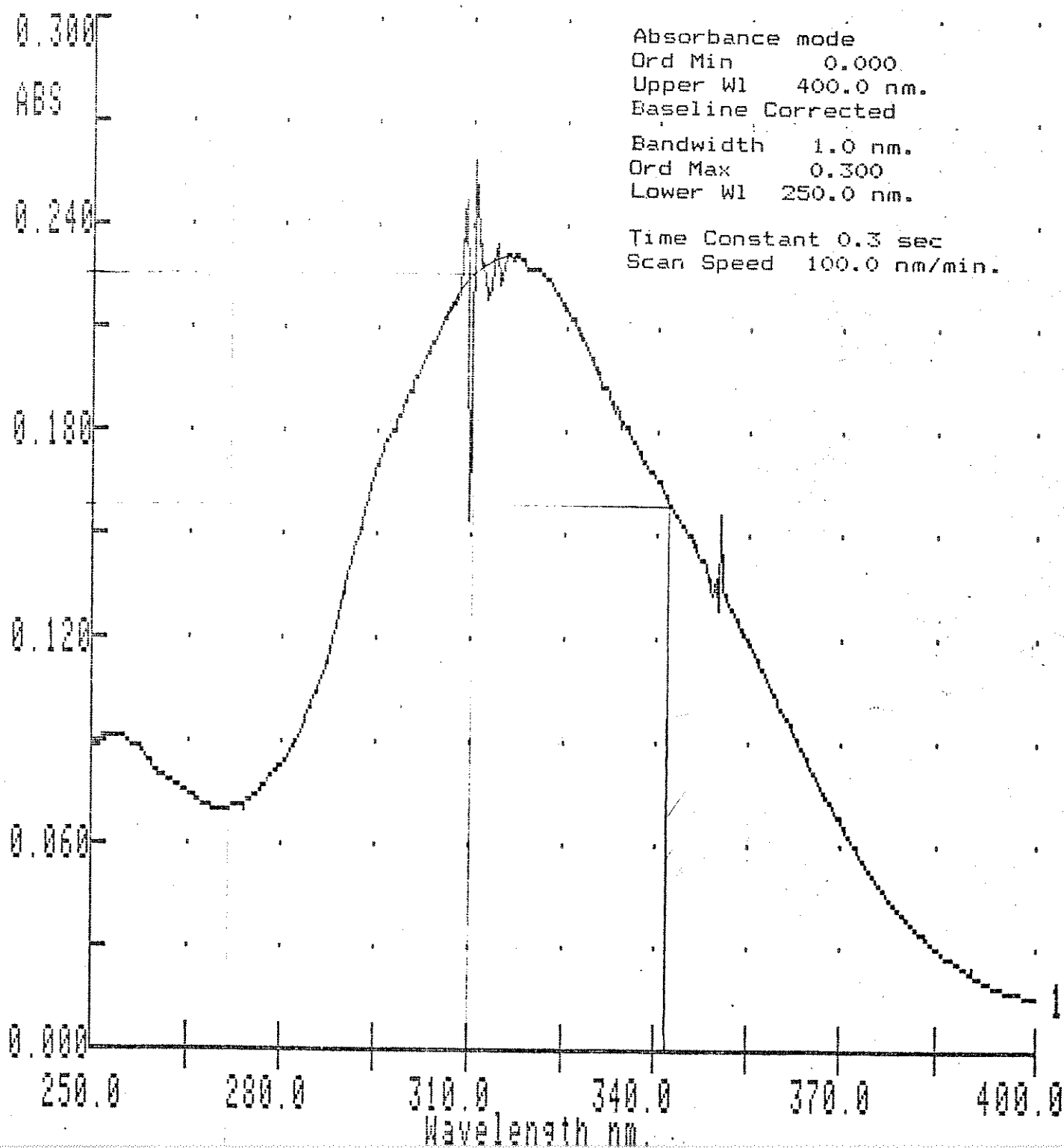


FIG. 34 - Espectro U.V. diferencial utilizado para a determinação de carbonilas na lignina "MWL" de *Pinus radiata* controle.

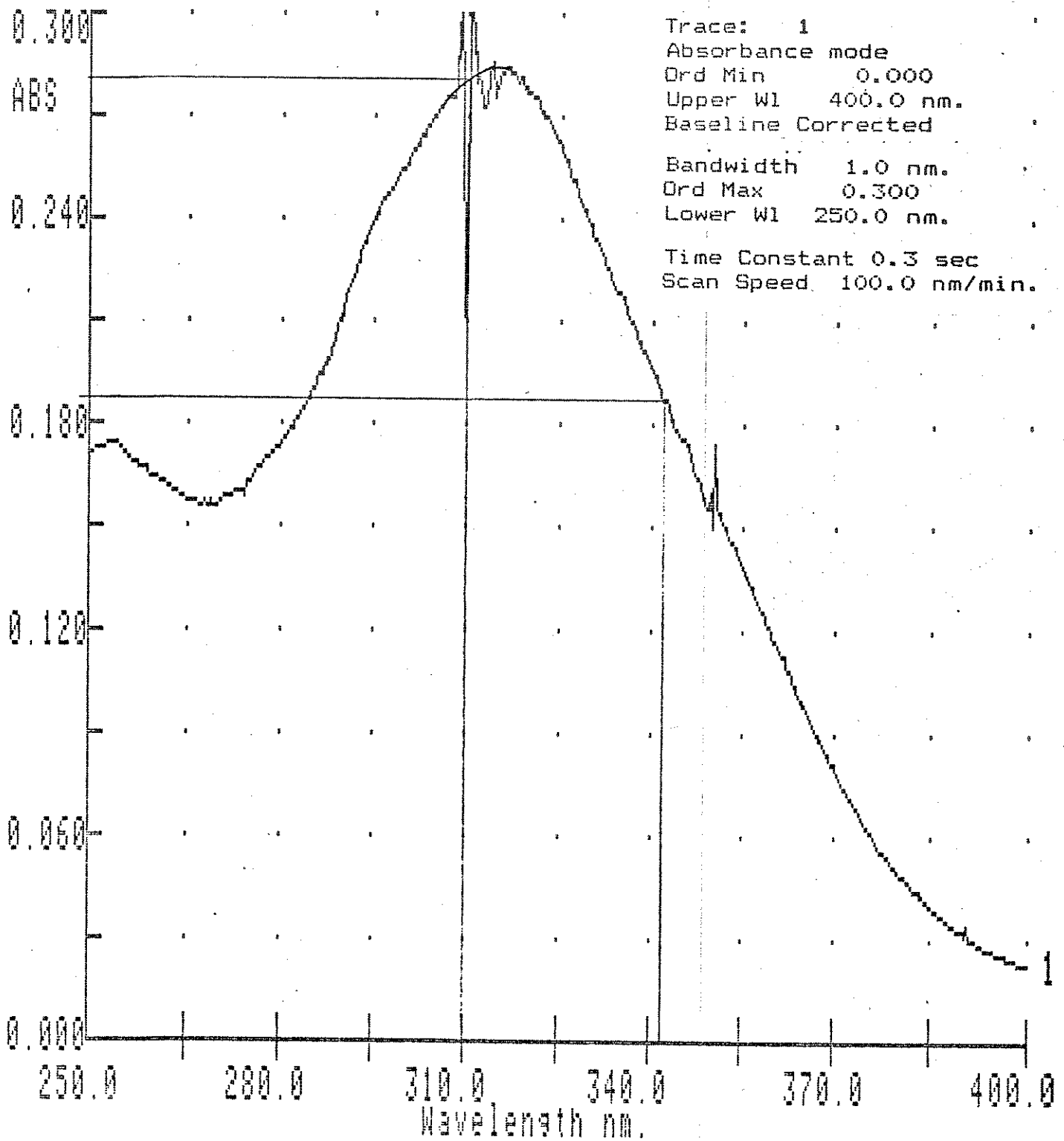


FIG. 35 - Espectro U.V. diferencial utilizado para a determinação de carbonilas na lignina "MWL" de *Pinus radiata* biodegradado por *Chrysonilia sitophila*.

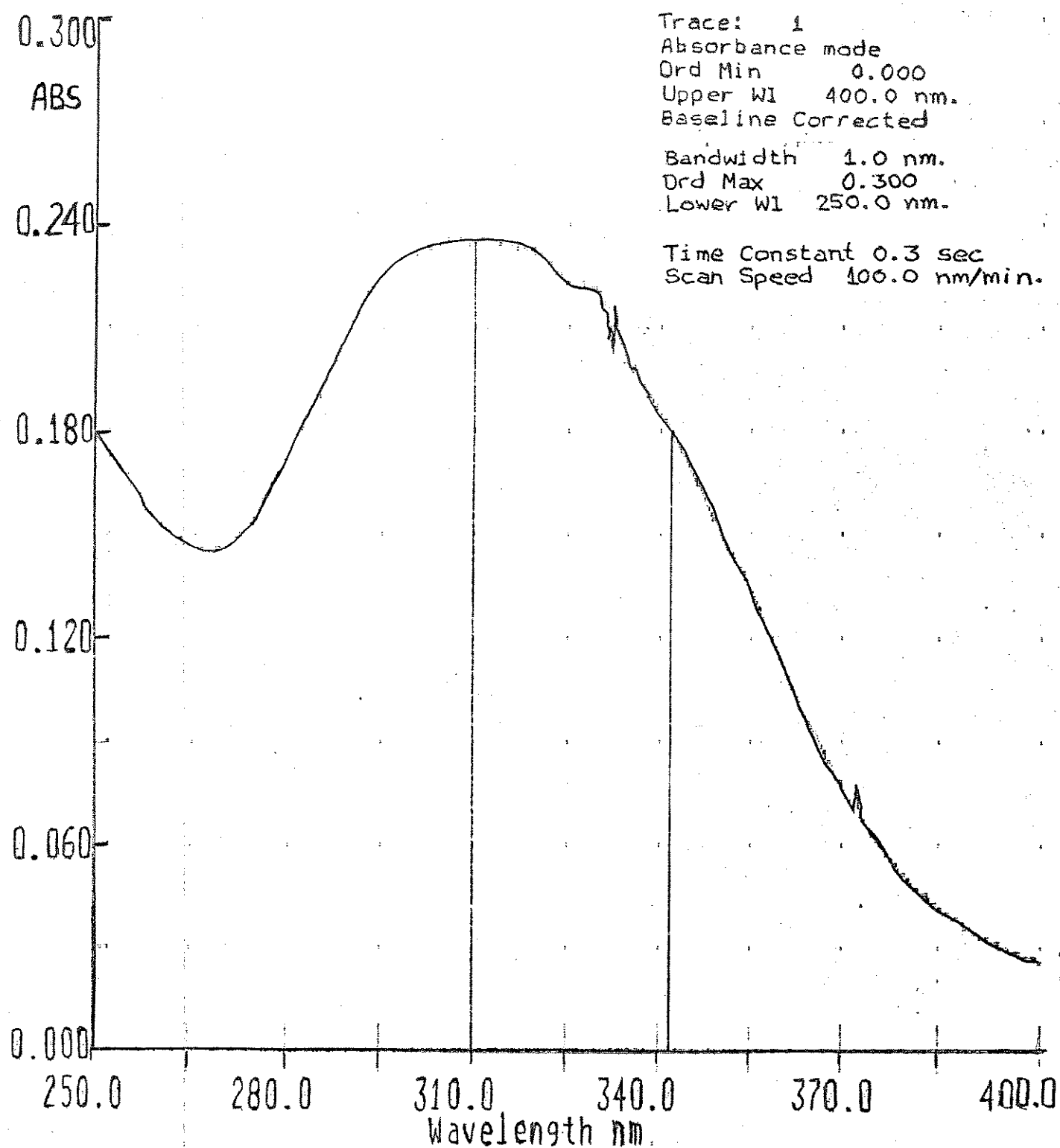


FIG. 36 - Espectro U.V. diferencial utilizado para a determinação de carbonilas na lignina "LFA-Dioxano" de *Pinus radiata* biodegradado por *Chrysonilia sitophila*.

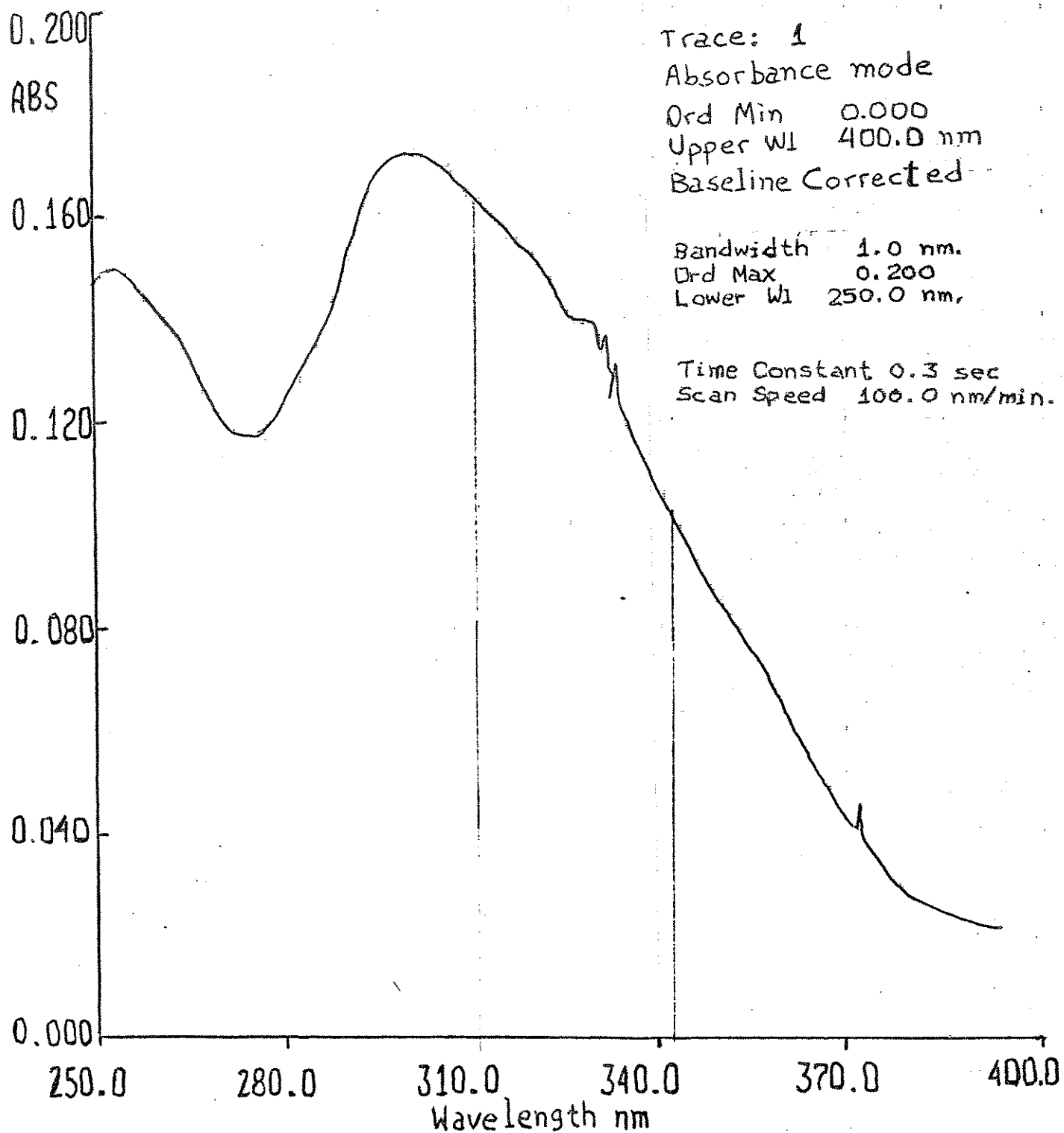


FIG. 37 - Espectro U.V. diferencial utilizado para a determinação de carbonilas na lignina "LFA-Metanol" de *Pinus radiata* biodegradado por *Chrysonilia sitophila*.

Cálculo do teor de hidroxilas aromáticas por espectroscopia U.V. diferencial:

$$\% \phi\text{-OH} = A_i \times 0.192 / c$$

onde:  $A_i$  = leitura da absorvância em 250 nm contra linha base.

0.192 = fator correspondente a absortividade média de 14 compostos modelo de lignina com teor de  $\phi\text{-OH}$  conhecidos.

$c$  = concentração da amostra em g/l.

$$N^{\circ} \phi\text{-OH}/C_g = \frac{\text{P.M. para } C_g \text{ em questão} \times \% \phi\text{-OH}}{(17 \times 100)}$$

onde: 17 = peso molecular do fragmento OH.

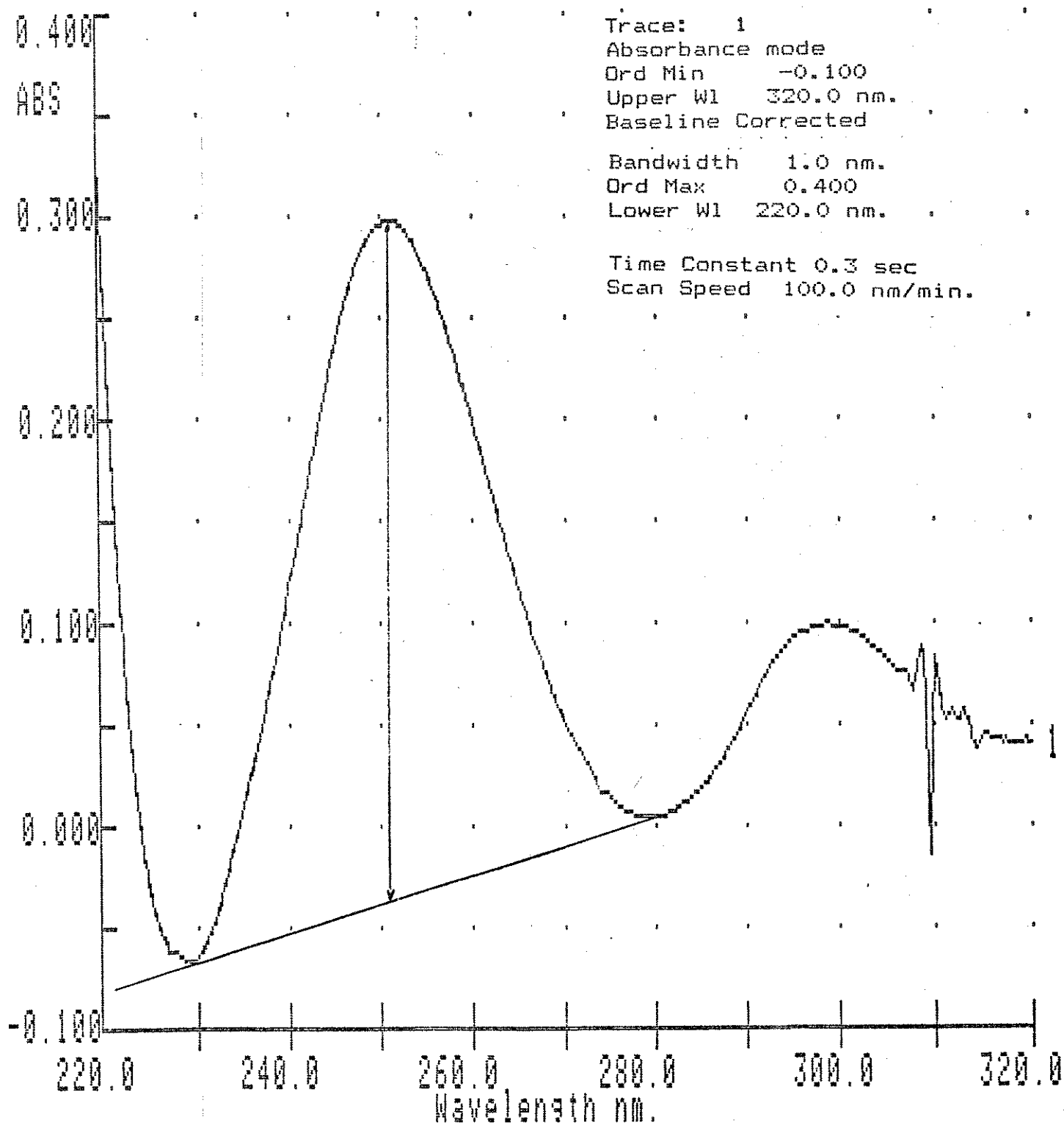


FIG. 38 - Espectro U.V. diferencial utilizado para a determinação de hidroxilas fenólicas na lignina "MWL" de *Pinus radiata* controle.

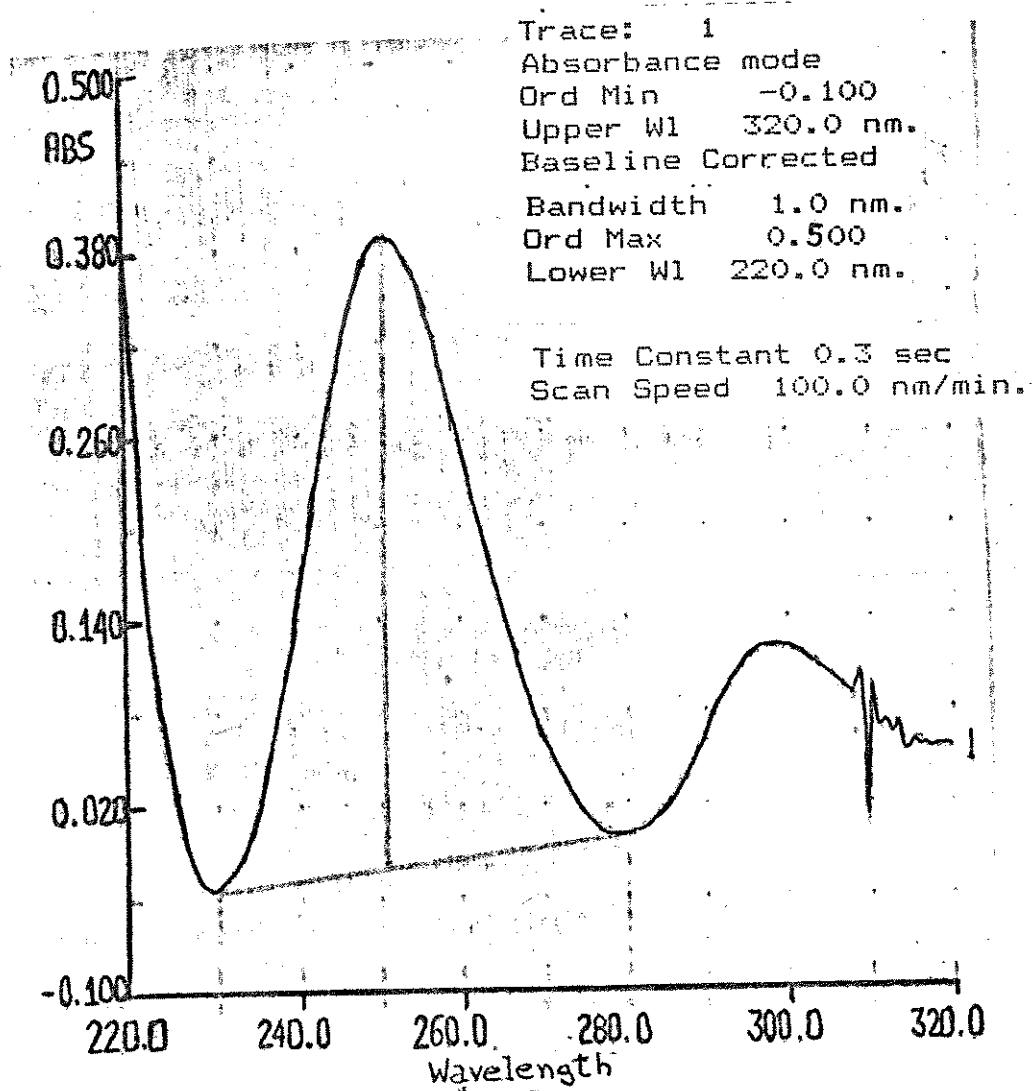


FIG. 39 - Espectro U.V. diferencial utilizado para a determinação de hidroxilas fenólicas na lignina "MWL" de *Pinus radiata* biodegradado por *Chrysonilia sitophila*.

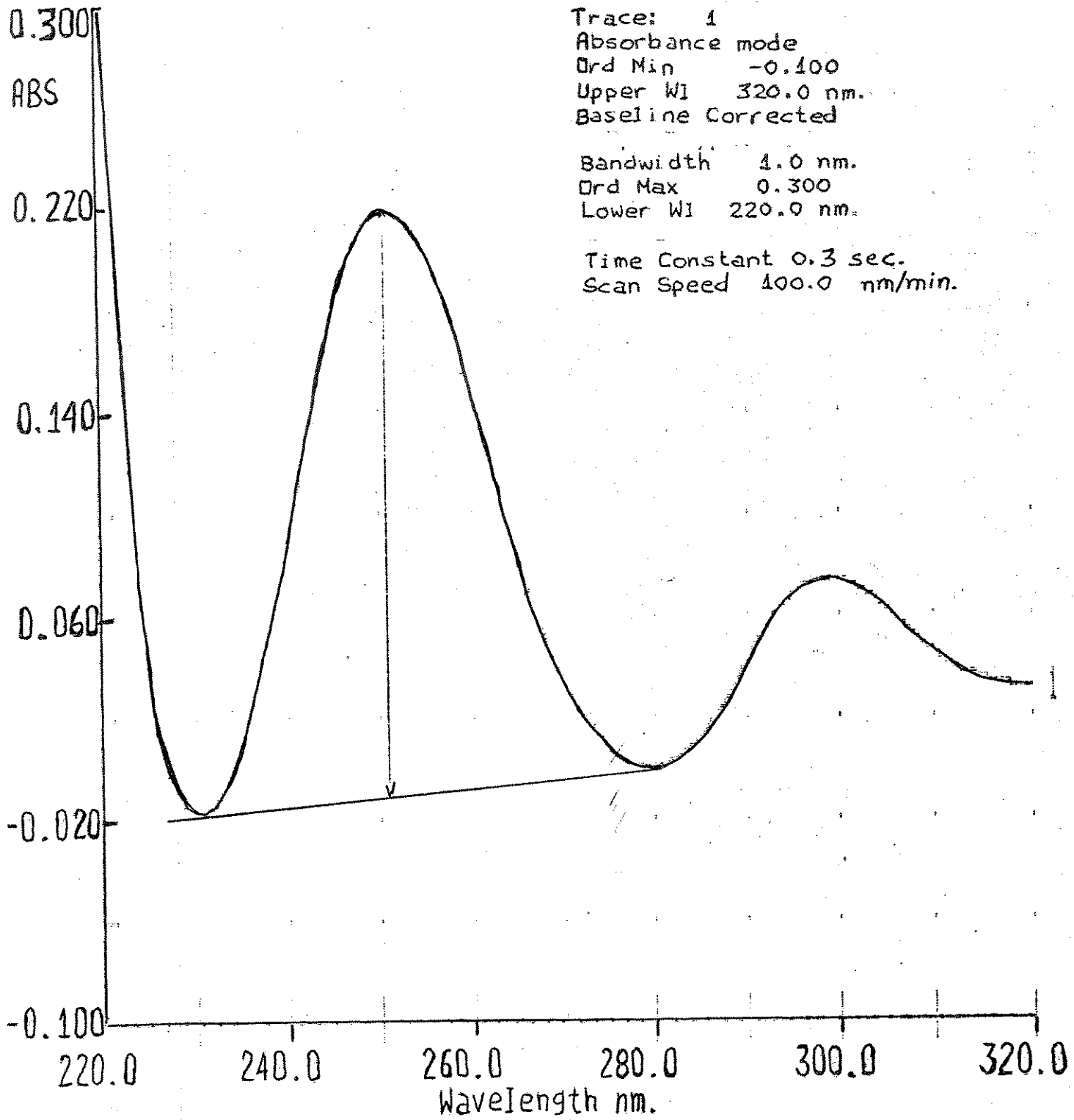


FIG. 40 - Espectro U.V. diferencial utilizado para a determinação de hidroxilas fenólicas na lignina "LFA-Dioxano" de *Pinus radiata* biodegradado por *Chrysonilia sitophila*.



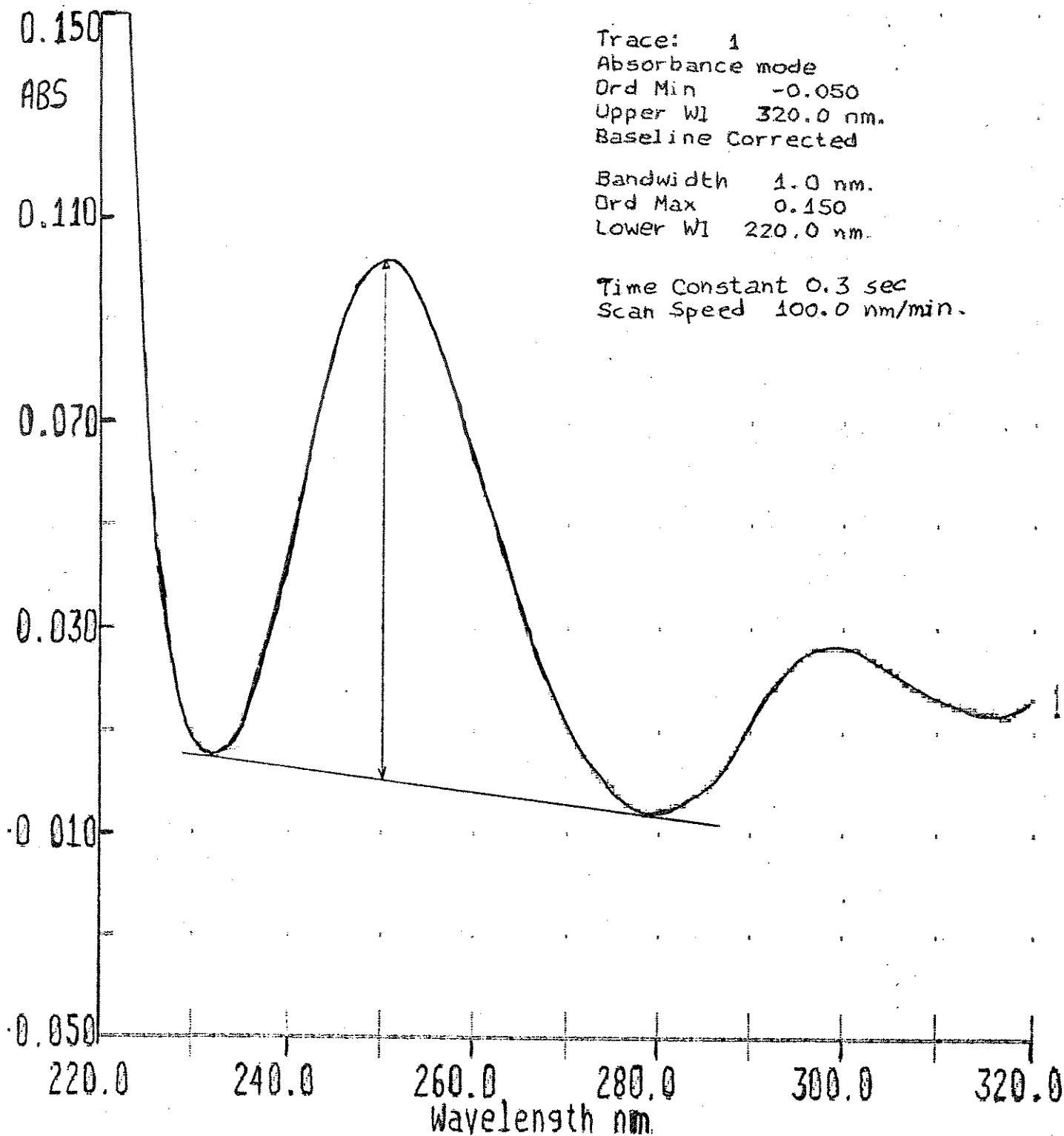


FIG. 41 - Espectro U.V. diferencial utilizado para a determinação de hidroxilas fenólicas na lignina "LFA-Metanol" de *Pinus radiata* biodegradado por *Chrysonilia sitophila*.

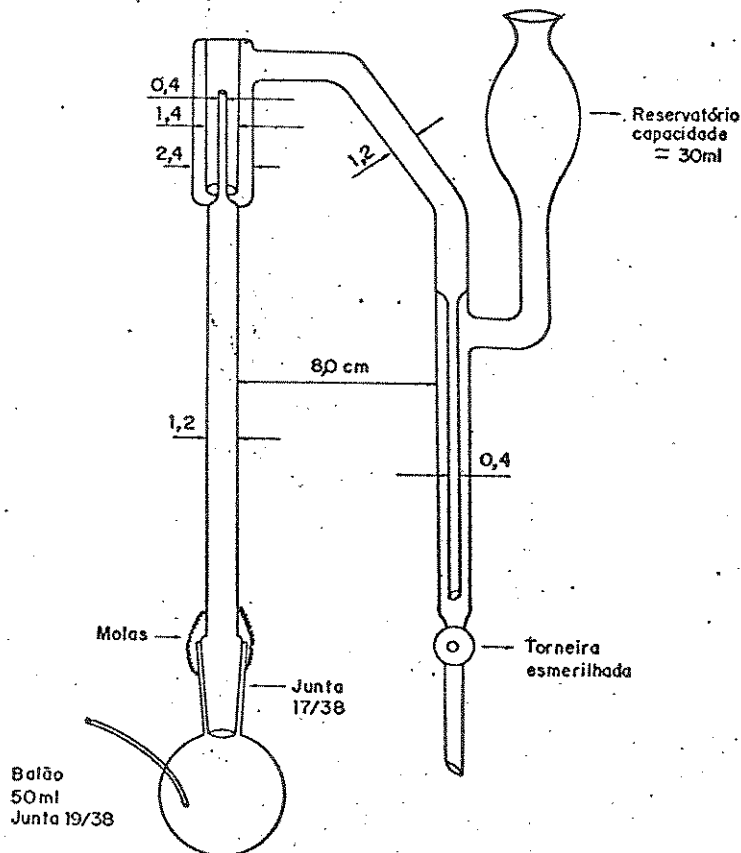
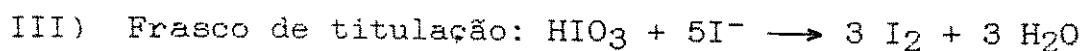
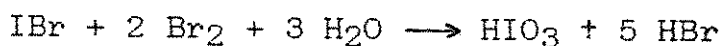
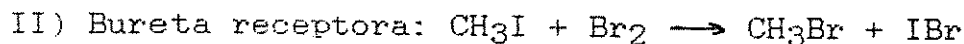
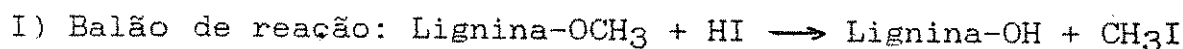


FIG. 42 - Kit para determinação de metoxilas

Reações envolvidas na determinação de metoxilas



IV) Finalmente o  $\text{I}_2$  é titulado com tiosulfato de sódio.

Cálculo do teor de metoxilas

$$\% \text{OCH}_3 = \frac{\text{Vol. Tiosulfato (ml)} \times N (\text{tiosulfato}) \times 0,00517 \times 100}{\text{Massa de lignina (g)}}$$

onde: 0,00517 =

(P.M.  $\text{OCH}_3$ )

(1000 x n<sup>o</sup> átomos de iodo formados nas reações)

$$= 31 \quad / \quad 1000 \times 6$$

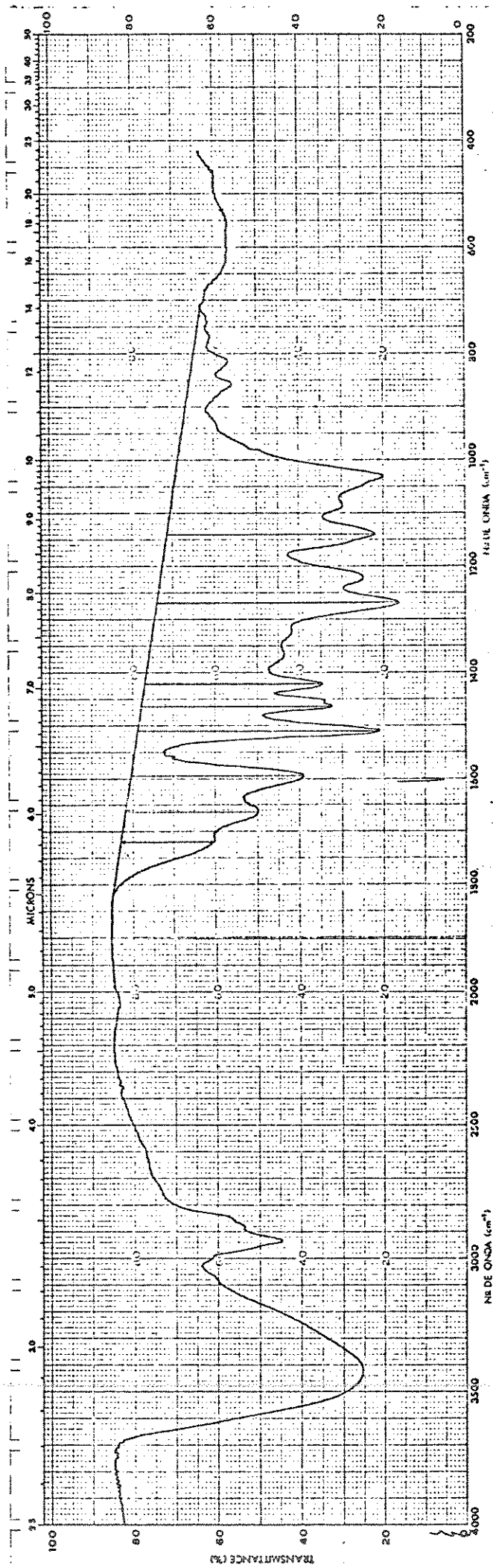


FIG. 43 - Espectro I.V. de lignina "MWL" de *Pinus radiata* controle

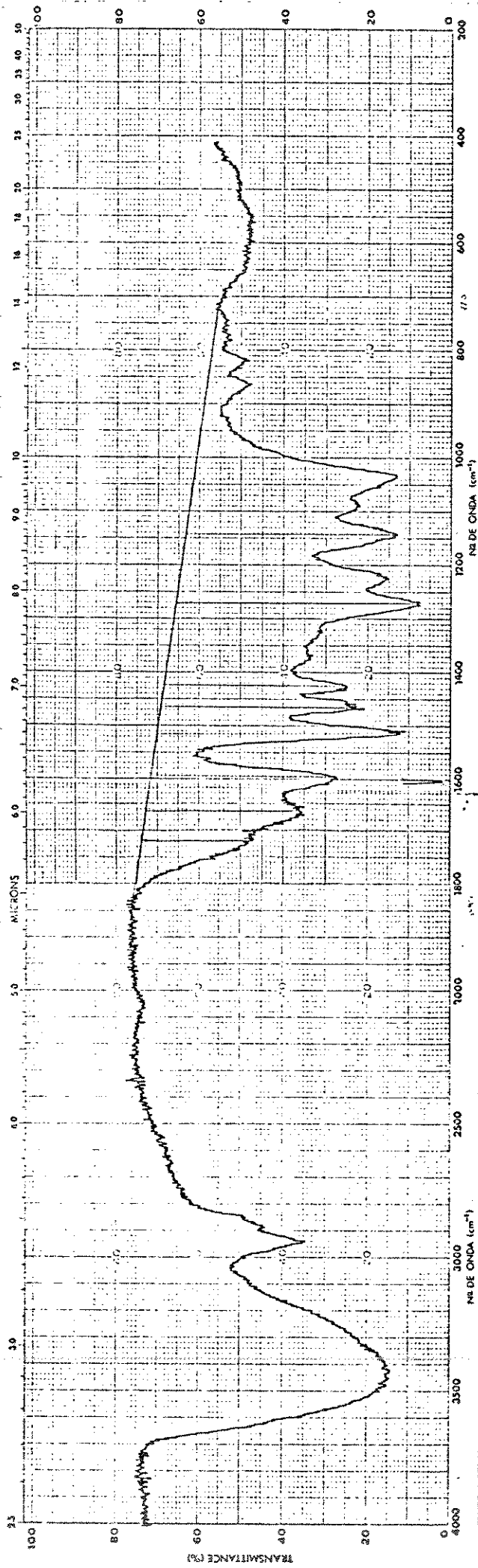


FIG. 44 - Espectro I.V. de lignina "MWL" de *Pinus radiata* biodegradado por *Chrysonilia sitophila*

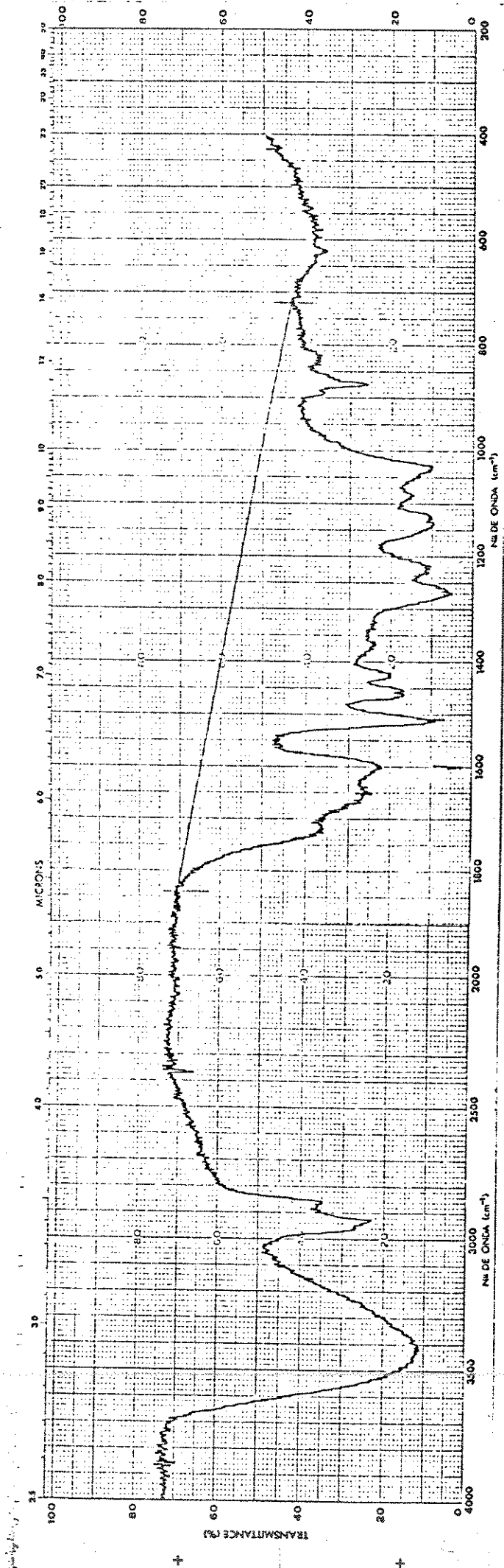


FIG. 45 - Espectro I.V. de lignina "LFA-Dioxano" de *Pinus radiata* biodegradado por *Chrysonilia sitophila*

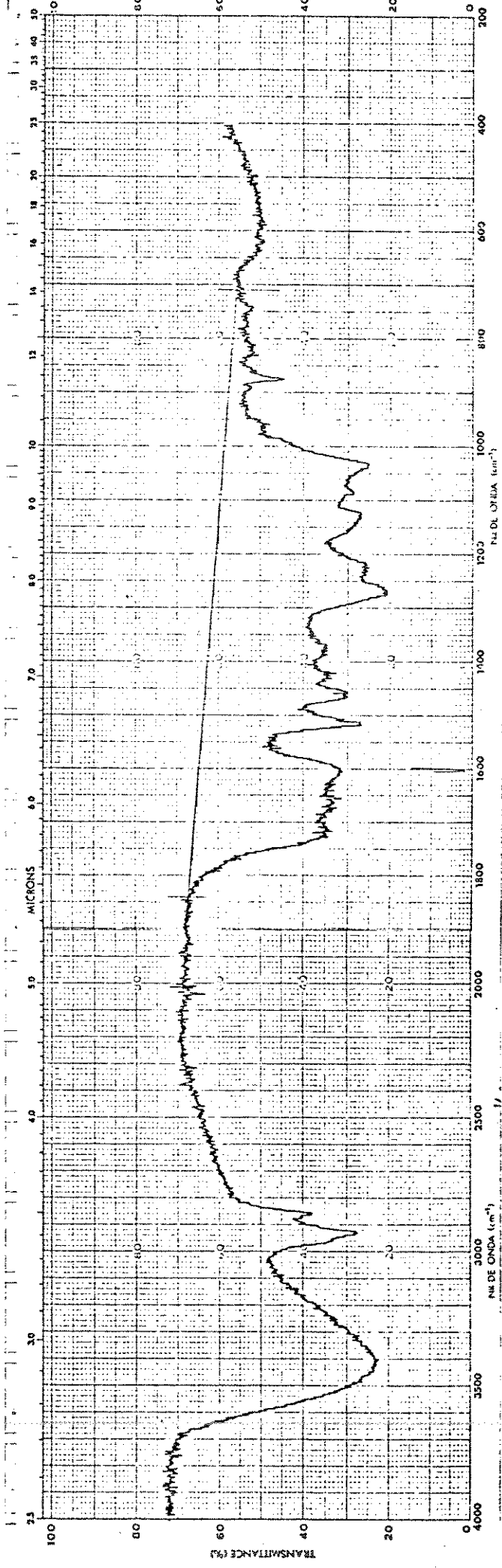


FIG. 46 - Espectro I.V. de lignina "LFA-Metanol" de *Pinus radiata* biodegradado por *Chrysonilia sitophila*

EXP4 PULSE SEQUENCE: S2PUL  
DATE 01-16-91  
SOLVENT CDCL3  
FILE H

OBSERVE PROTON  
FREQUENCY 300.075 MHZ  
SPECTRAL WIDTH 4500.5 HZ  
ACQ. TIME 1.778 SEC  
PULSE WIDTH 47 DEGREES  
AMBIENT TEMPERATURE  
NO. REPETITIONS 256  
DOUBLE PRECISION ACQUISITION  
DATA PROCESSING  
FT SIZE 16K  
DISPLAY  
WIDTH OF PLOT 10.5 PPM  
START OF PLOT -0.5 PPM  
TOTAL TIME 7.6 MINUTES

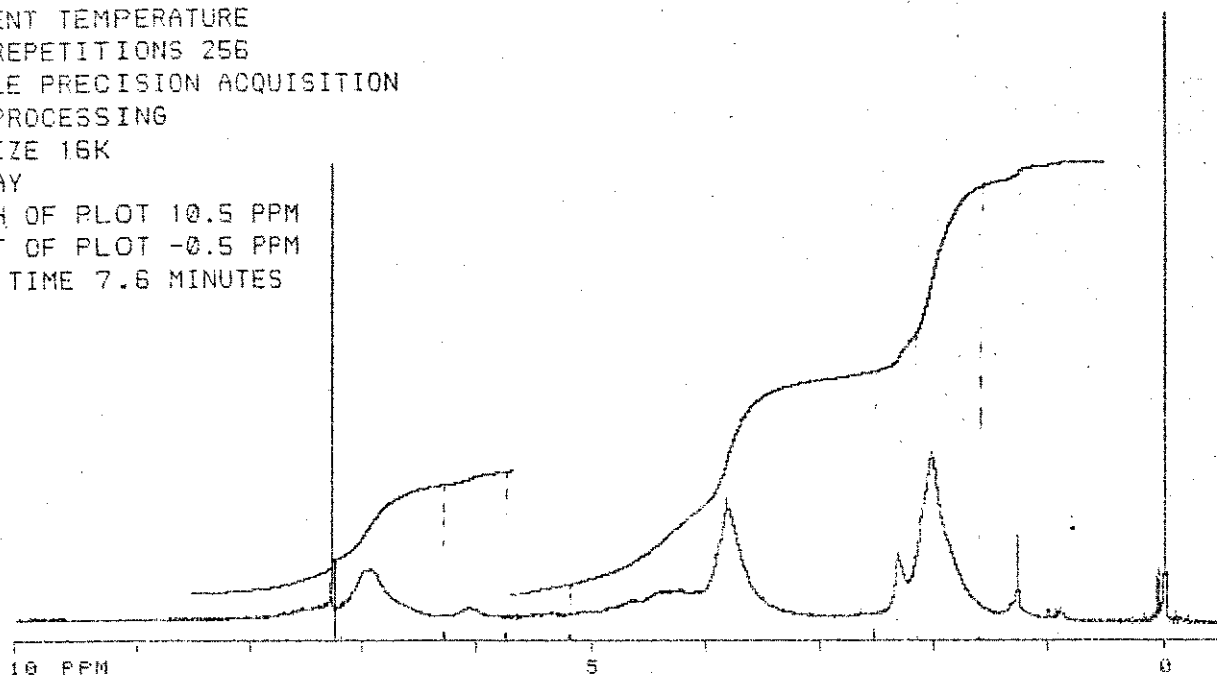


FIG. 47 - Espectro RMN-<sup>1</sup>H de lignina "MWL" de *Pinus radiata* controle

EXP1 PULSE SEQUENCE: S2PUL  
DATE 02-15-91  
SOLVENT CDCL3  
FILE H

OBSERVE PROTON  
FREQUENCY 300.075 MHZ  
SPECTRAL WIDTH 4500.5 HZ  
ACQ. TIME 1.778 SEC  
PULSE WIDTH 50 DEGREES  
AMBIENT TEMPERATURE  
NO. REPETITIONS 148  
DOUBLE PRECISION ACQUISITION  
DATA PROCESSING  
FT SIZE 16K  
DISPLAY  
WIDTH OF PLOT 10.5 PPM  
START OF PLOT -0.5 PPM  
TOTAL TIME 4.4 MINUTES

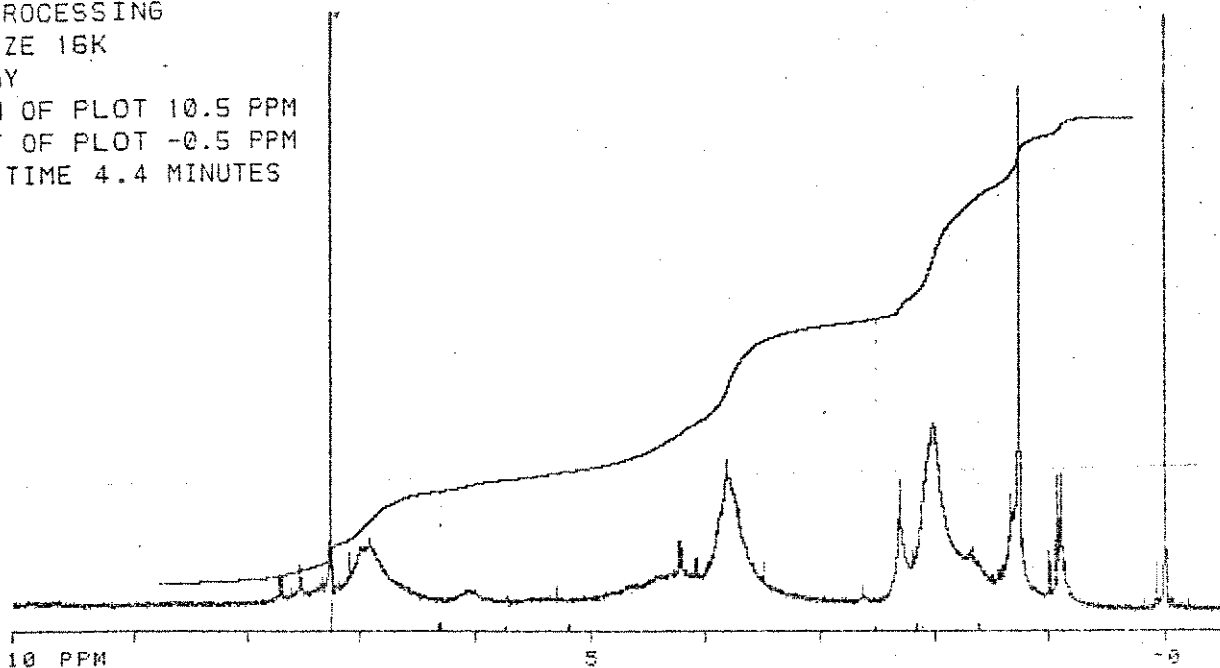


FIG. 48 - Espectro RMN-<sup>1</sup>H de lignina "MWL" de *Pinus radiata*  
biodegradado por *Chrysonilia sitophila*



EXP3 PULSE SEQUENCE: S2PUL  
DATE 11-06-90  
SOLVENT CDCL3  
FILE H

OBSERVE PROTON  
FREQUENCY 300.075 MHZ  
SPECTRAL WIDTH 5000.0 HZ  
ACQ. TIME 3.002 SEC  
PULSE WIDTH 45 DEGREES  
AMBIENT TEMPERATURE  
NO. REPETITIONS 256  
DOUBLE PRECISION ACQUISITION  
DATA PROCESSING  
FT SIZE 32K  
DISPLAY  
WIDTH OF PLOT 14.5 PPM  
START OF PLOT -0.52 PPM  
TOTAL TIME 12.8 MINUTES

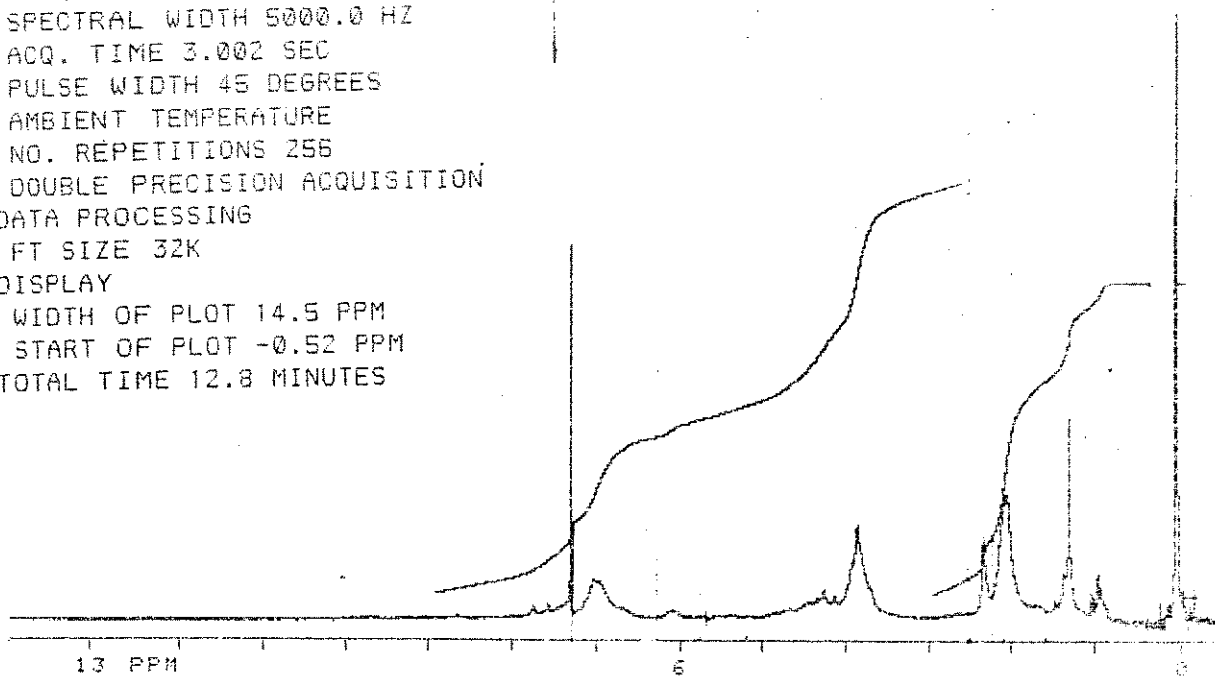


FIG. 49 - Espectro RMN-<sup>1</sup>H de lignina "LFA-Dioxano" de *Pinus radiata*  
biodegradado por *Chrysonilia sitophila*

EXP2 PULSE SEQUENCE: S2PUL  
DATE 11-06-90  
SOLVENT CDCL3  
FILE H

OBSERVE PROTON  
FREQUENCY 300.075 MHZ  
SPECTRAL WIDTH 5000.0 HZ  
ACQ. TIME 3.002 SEC  
PULSE WIDTH 45 DEGREES  
AMBIENT TEMPERATURE  
NO. REPETITIONS 256  
DOUBLE PRECISION ACQUISITION  
DATA PROCESSING  
FT SIZE 32K  
DISPLAY  
WIDTH OF PLOT 14.5 PPM  
START OF PLOT -0.52 PPM  
TOTAL TIME 12.8 MINUTES

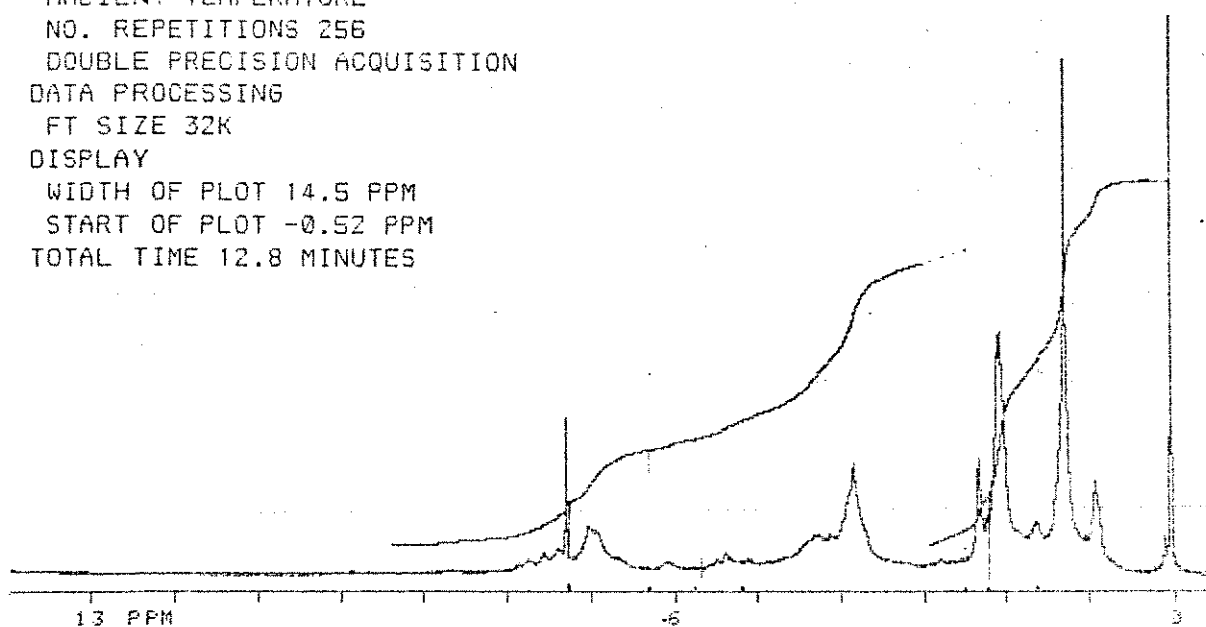


FIG. 50 - Espectro RMN-<sup>1</sup>H de lignina "LEA-Metanol" de *Pinus radiata*  
biodegradado por *Chrysonilia sitophila*

EXPS PULSE SEQUENCE: S2PUL  
DATE 01-16-91  
SOLVENT CDCL3  
FILE C

OBSERVE CARBON  
FREQUENCY 75.462 MHZ  
SPECTRAL WIDTH 18761.7 HZ  
ACQ. TIME 0.8 SEC  
PULSE WIDTH 45 DEGREES  
AMBIENT TEMPERATURE  
NO. REPETITIONS 51508  
DECOUPLE PROTON  
LOW POWER 20 DB  
WALTZ-16 MODULATED  
CONTINUOUS DECOUPLING  
DOUBLE PRECISION ACQUISITION  
DATA PROCESSING  
LINE BROADENING 1.0 HZ  
FT SIZE 32K  
DISPLAY  
WIDTH OF PLOT 248.62 PPM  
START OF PLOT -12.55 PPM  
TOTAL TIME 11 HOURS  
26.7 MINUTES

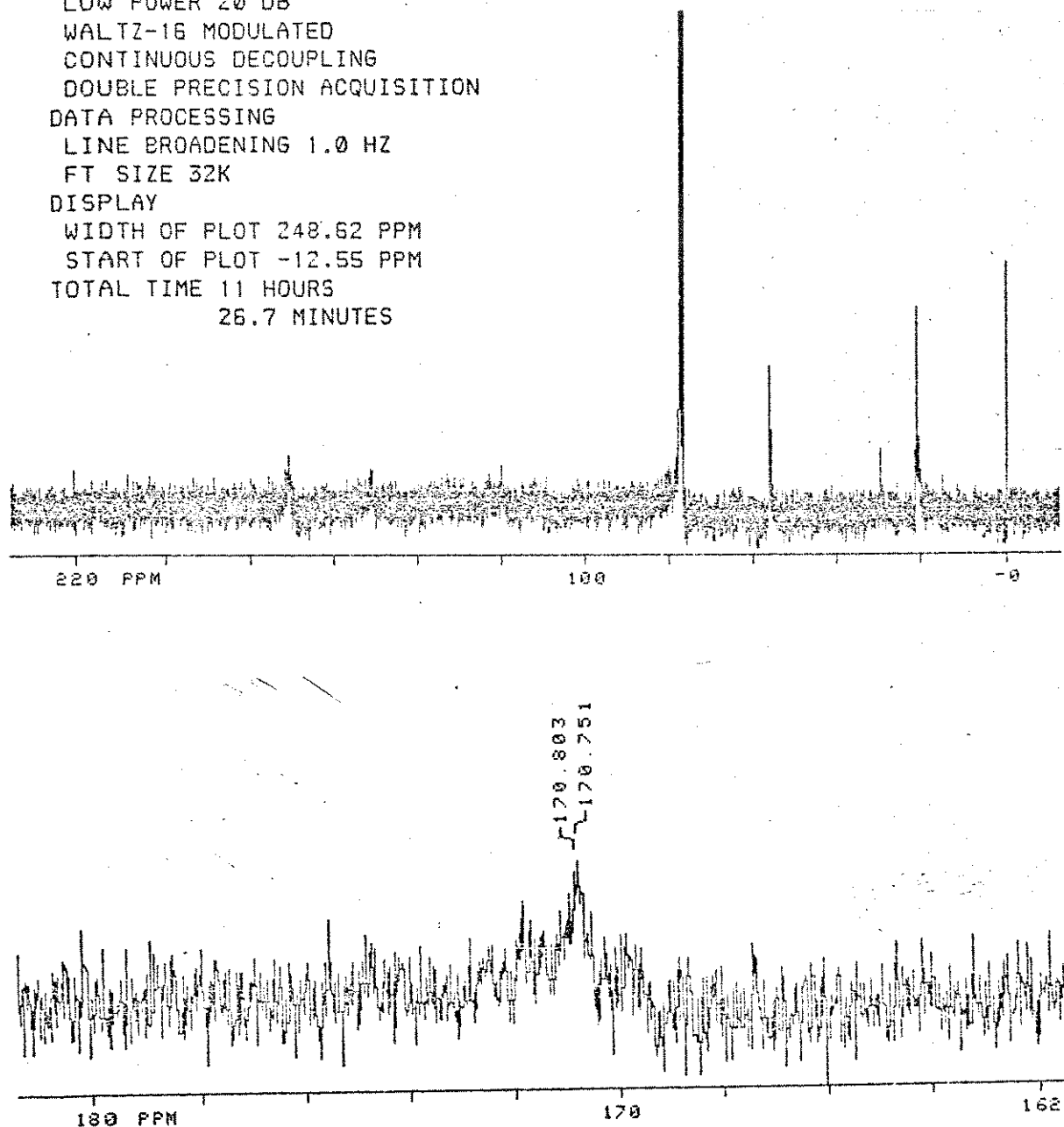


FIG. 51 - Espectro RMN- $^{13}\text{C}$  de lignina "MWL" de *Pinus radiata* controle

EXP2 PULSE SEQUENCE: 52PUL  
DATE 02-15-91  
SOLVENT CDCL3  
FILE C

128

OBSERVE CARBON  
FREQUENCY 75.462 MHZ  
SPECTRAL WIDTH 18761.7 HZ  
ACQ. TIME 0.8 SEC  
PULSE WIDTH 45 DEGREES  
AMBIENT TEMPERATURE  
NO. REPETITIONS 125440  
DECOUPLE PROTON  
LOW POWER 20 DB  
WALTZ-16 MODULATED  
CONTINUOUS DECOUPLING  
DOUBLE PRECISION ACQUISITION  
DATA PROCESSING  
LINE BROADENING 1.0 HZ  
FT SIZE 32K  
DISPLAY  
WIDTH OF PLOT 248.62 PPM  
START OF PLOT -13.13 PPM  
TOTAL TIME 27 HOURS  
52.4 MINUTES

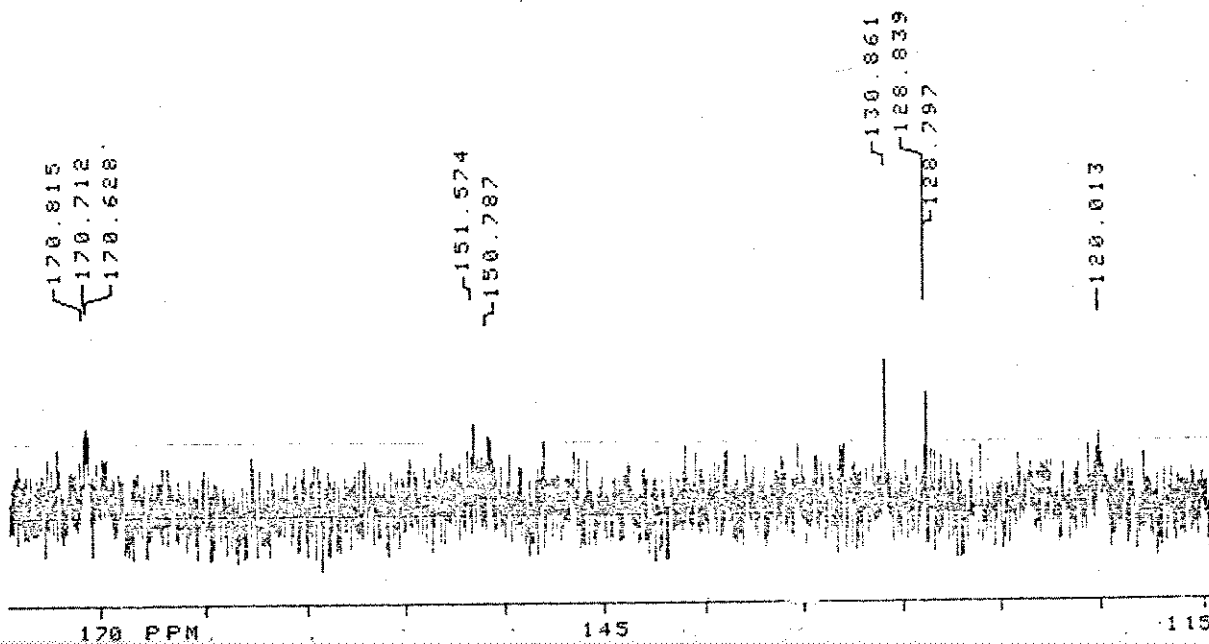
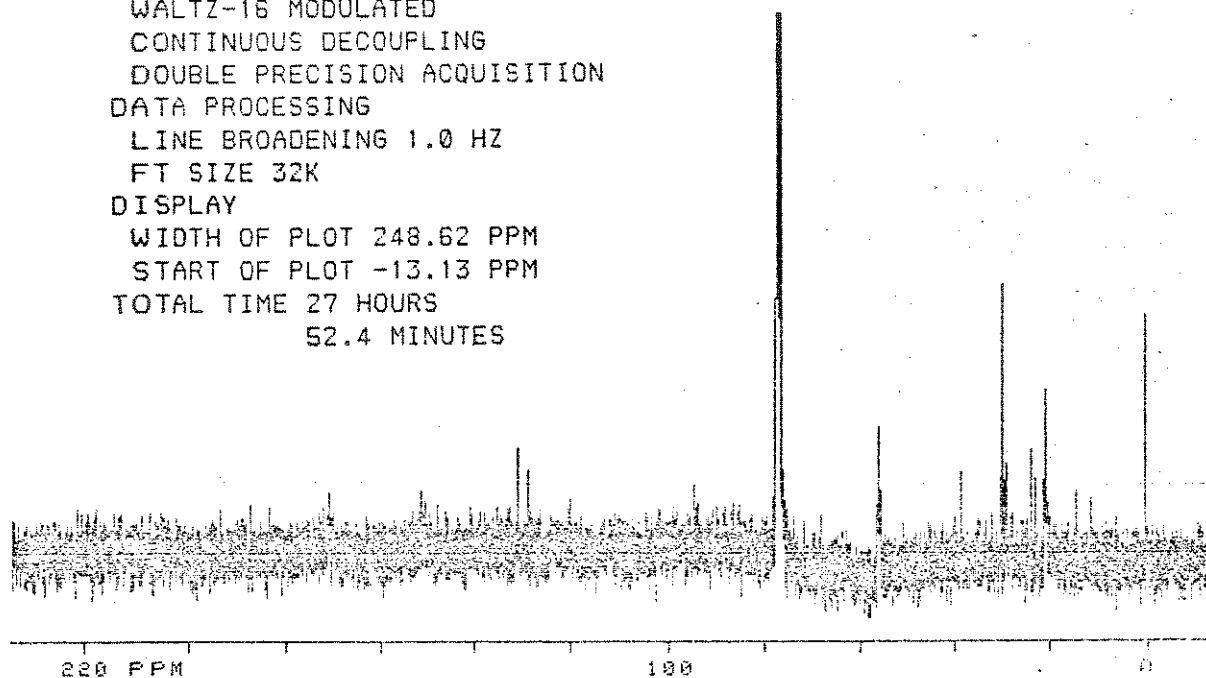


FIG. 52 - Espectro RMN- $^{13}\text{C}$  de lignina "MWL" de *Pinus radiata*  
biodegradado por *Chrysonilia sitophila*

EXP2 PULSE SEQUENCE: S2PUL  
DATE 11-14-90  
SOLVENT CDCL3  
FILE ANDRE

129

OBSERVE CARBON  
FREQUENCY 75.462 MHZ  
SPECTRAL WIDTH 18761.7 HZ  
ACQ. TIME 0.8 SEC  
PULSE WIDTH 44 DEGREES  
AMBIENT TEMPERATURE  
NO. REPETITIONS 53534  
DECOUPLE PROTON  
LOW POWER 20 DB  
WALTZ-16 MODULATED  
CONTINUOUS DECOUPLING  
DOUBLE PRECISION ACQUISITION  
DATA PROCESSING  
LINE BROADENING 1.0 HZ  
FT SIZE 32K  
DISPLAY  
WIDTH OF PLOT 248.62 PPM  
START OF PLOT -12.13 PPM  
TOTAL TIME 11 HOURS  
53.7 MINUTES

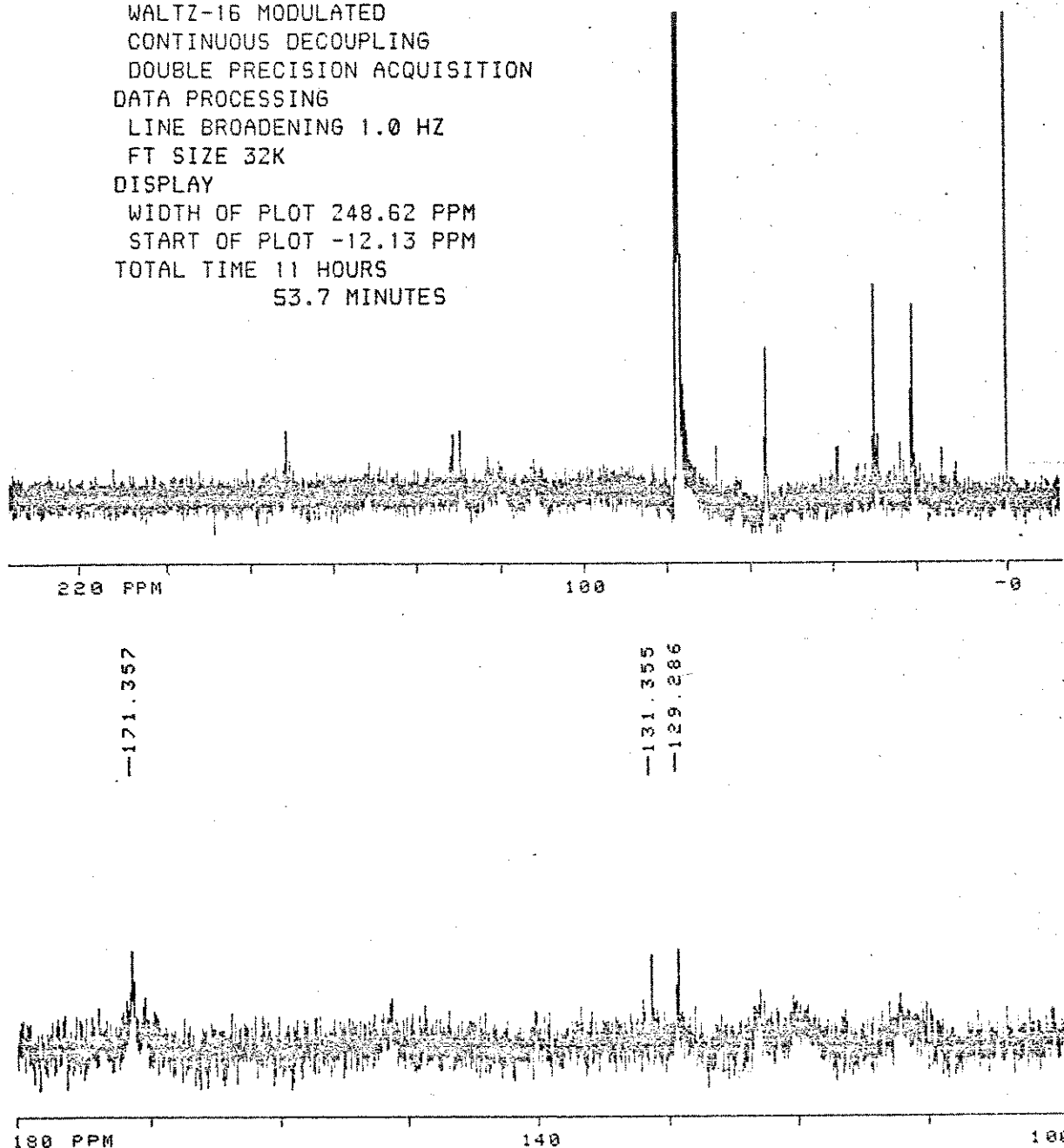


FIG. 53 - Espectro RMN-<sup>13</sup>C de lignina "LFA-Dioxano" de *Pinus radiata*  
biodegradado por *Chrysonilia sitophila*

EXP1 PULSE SEQUENCE: S2PUL  
DATE 01-02-90  
SOLVENT CDCL3  
FILE LIGNIN

130

OBSERVE CARBON  
FREQUENCY 75.462 MHZ  
SPECTRAL WIDTH 18761.7 HZ  
ACQ. TIME 0.8 SEC  
PULSE WIDTH 44 DEGREES  
AMBIENT TEMPERATURE  
NO. REPETITIONS 49999  
DECOUPLE PROTON  
LOW POWER 20 DB  
WALTZ-16 MODULATED  
CONTINUOUS DECOUPLING  
DOUBLE PRECISION ACQUISITION  
DATA PROCESSING  
LINE BROADENING 5.0 HZ  
FT SIZE 32K  
DISPLAY  
WIDTH OF PLOT 248.62 PPM  
START OF PLOT -12.45 PPM  
TOTAL TIME 11 HOURS  
6.6 MINUTES

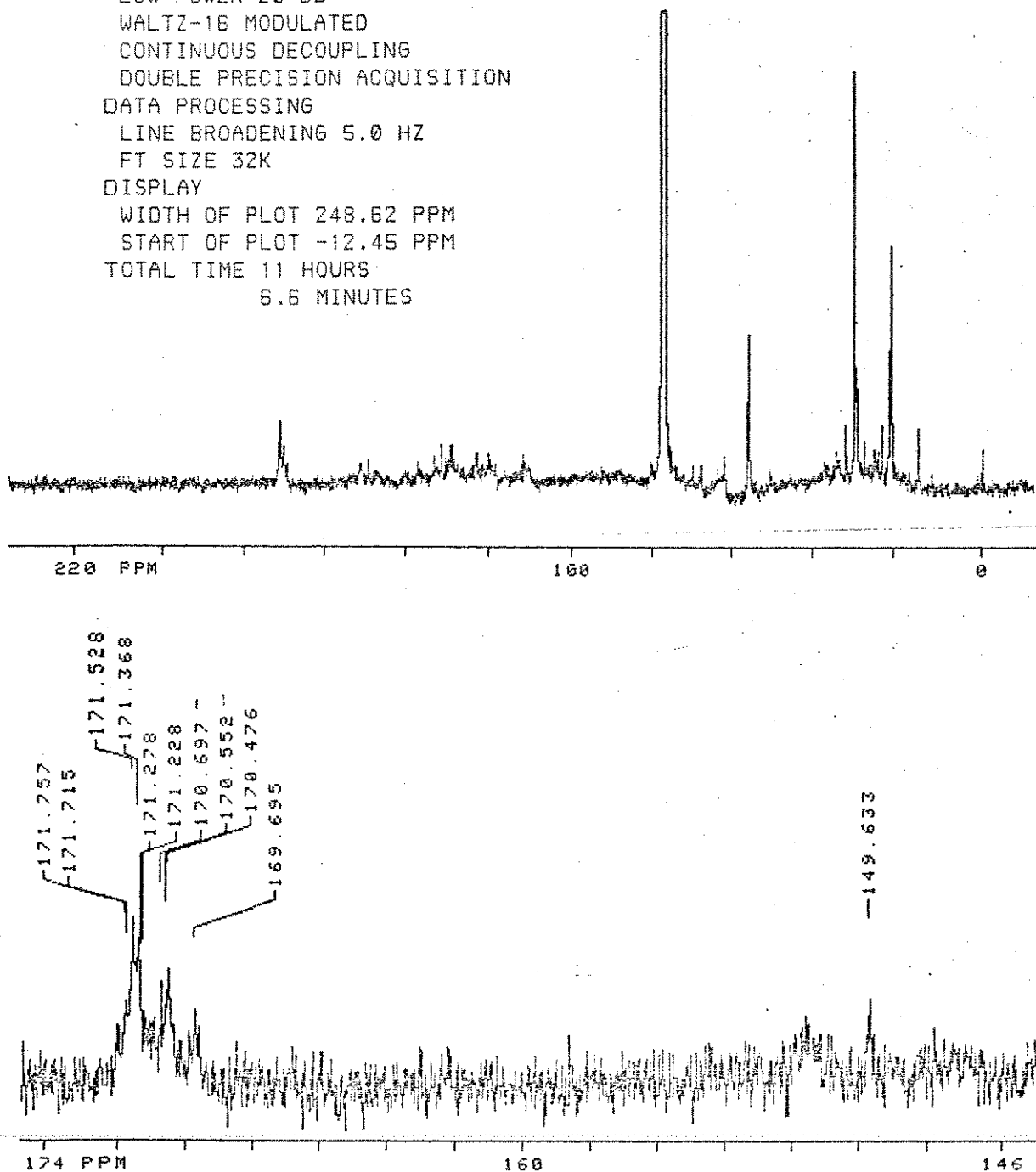


FIG. 54 - Espectro RMN-<sup>13</sup>C de lignina "LFA-Metanol" de *Pinus radiata* biodegradado por *Chrysonilia sitophila*

APENDICE II - Estruturas de fragmentos de lignina mencionados no texto.

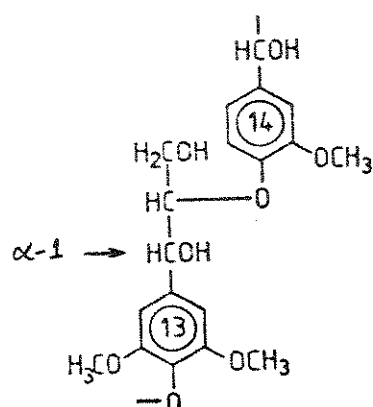


FIG. 55 - Estrutura  $\beta$ -O-4 com  $\alpha$ -hidroxilas. Prótons  $\alpha$ -1.

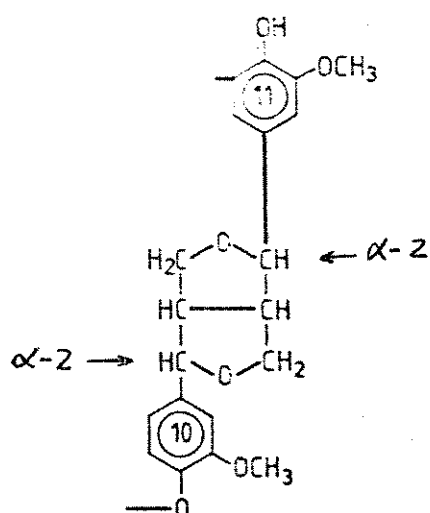
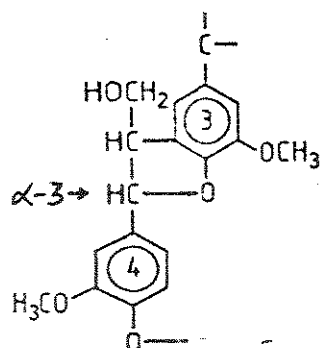
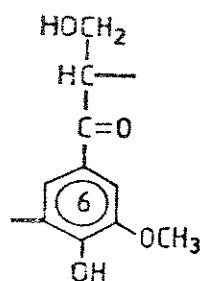


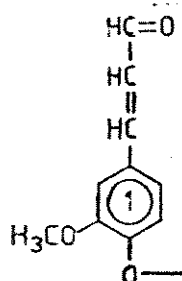
FIG. 56 - Estruturas Pinosresinol. Prótons  $\alpha$ -2.



57 - Estruturas Fenilcumarano. Prótons  $\alpha$ -3.



58 - Estrutura Acetoguaiacona.  $\alpha$ -carbonilas.



~~Estrutura Coniferil aldeido.  $\alpha$ -carbonilas- $\alpha$ - $\beta$ -insaturadas~~



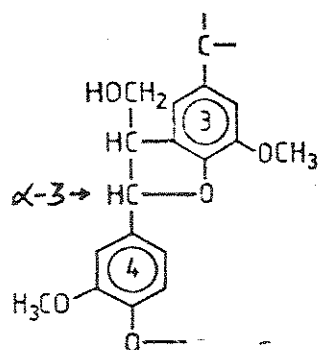


FIG. 57 - Estruturas Fenilcumarano. Prótons  $\alpha$ -3.

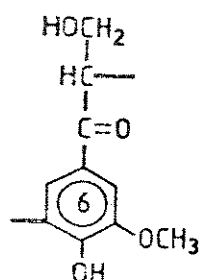
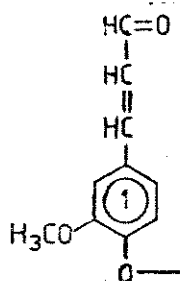


FIG. 58 - Estrutura Acetoguaiacona.  $\alpha$ -carbonilas.



i. 59 - Estrutura Coniferil aldeido.  $\beta$ -carbonilas- $\alpha$ - $\beta$ -insaturadas