

MECANISMOS ENVOLVIDOS NA BIODEGRADAÇÃO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS E APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS CORRELATAS

André Aguiar*

Universidade Federal de São João Del-Rei, Campus Alto Paraopeba, CP 131, 36420-000 Ouro Branco - MG, Brasil

André Ferraz

Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, CP 116, 12602-810 Lorena - SP, Brasil

Recebido em 9/11/10; aceito em 21/6/11; publicado na web em 8/8/11

MECHANISMS INVOLVED IN THE BIODEGRADATION OF LIGNOCELLULOSIC MATERIALS AND RELATED TECHNOLOGICAL APPLICATIONS. The biodegradation of lignocellulosic materials is an important natural process because it is responsible for the carbon recycling. When induced under controlled conditions, this process can be used for technological applications such as biopulping, biobleaching of cellulosic pulps, pre-treatment for subsequent saccharification and cellulosic-ethanol production, and increase of the digestibility in agroindustrial residues used for animal feed. In the present work, the enzymatic and non-enzymatic mechanisms involved in the biodegradation of lignocellulosic materials by fungi were reviewed. Furthermore, the technological applications of these extracellular metabolites are presented and discussed.

Keywords: wood biodegradation; oxidative enzymes; Fenton reaction.

INTRODUÇÃO

A biodegradação dos materiais lignocelulósicos tem sido objeto de muitos estudos, pois, além de corresponder a uma importante etapa do ciclo do carbono na natureza, também pode ser aplicada em processos tecnológicos. As aplicações em questão são variadas e incluem desde a ação direta de fungos sobre a madeira, desenhada como uma etapa de pré-tratamento aos processos de fabricação de celulose e papel,^{1,2} até processos que usam os fungos decompositores de materiais lignocelulósicos como agentes indutores da degradação de compostos xenobióticos, quer em solos contaminados³ ou em efluentes industriais.⁴ O pré-tratamento de materiais lignocelulósicos com fungos também tem sido apontado como uma forma de facilitar processos subsequentes de conversão da celulose em açúcares fermentescíveis destinados à bioconversão em etanol e outros produtos de interesse comercial.^{5,6} Também na área de nutrição animal, a aplicação de fungos decompositores de materiais lignocelulósicos tem sido descrita. Nesse caso, o pré-tratamento biológico é usado para aumentar a digestibilidade de resíduos agroindustriais utilizados na alimentação de ruminantes e não ruminantes. Os fungos, principalmente os causadores de podridão branca seletivos na degradação de lignina, desestruturam a parede celular vegetal, promovendo a conversão dos polissacarídeos em açúcares de fácil assimilação. Além disso, a biomassa fúngica que se desenvolve sobre o lignocelulósico pode servir como fonte de proteína.⁷

A aplicação de enzimas produzidas pelos fungos decompositores de materiais lignocelulósicos também tem ganhado muito interesse na atualidade. O uso de xilanases⁸ e lacases^{9,10} em processos de branqueamento de polpas celulósicas e a aplicação de celulases na hidrólise enzimática de celulose nos processos de produção de etanol de segunda geração,¹¹ são exemplos de como o avanço no entendimento da biodegradação dos lignocelulósicos tem permitido explorar aplicações tecnológicas de grande relevância para o mundo moderno.

O desenvolvimento das aplicações mencionadas anteriormente tem ocorrido de forma simultânea à geração de conhecimento fundamentado no entendimento dos mecanismos biodegradativos empregados pelos fungos sobre os materiais lignocelulósicos. O tema em questão tem sido abordado em várias revisões.¹²⁻¹⁵ Por isso, alguns dos tópicos aqui apresentados serão referenciados para maior detalhamento em outros textos específicos já disponíveis na literatura. A abordagem fundamental da presente revisão mostra e discute como o entendimento dos mecanismos biodegradativos tem permitido desenvolver tecnologias inspiradas na ação dos fungos, mas muitas vezes simplificadas por meio de processos biomiméticos ou da ação isolada de enzimas sobre os materiais lignificados.

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS E ENZIMAS ENVOLVIDAS NA SUA DEGRADAÇÃO

A fim de manter uma abordagem completa e autossuportada, revisamos brevemente os fundamentos relacionados à composição química dos materiais lignocelulósicos, bem como os fundamentos bioquímicos relacionados à sua biodegradação. Um maior detalhamento de cada tópico deve ser buscado pelo leitor nas referências sugeridas em cada caso.

A celulose é o componente mais abundante nos materiais lignocelulósicos e corresponde cerca de 50% da massa seca total. Trata-se de um polímero linear, possuindo porções amorfas e cristalinas, formado exclusivamente por moléculas de anidro-glicose unidas por ligações β -(1,4)-glicosídicas.^{11,16,17} As polioses ou hemiceluloses são polissacarídeos ramificados e de menor massa molar que a celulose. Estas são compostas por vários açúcares como a glicose, manose, galactose e xilose, além de pequenas quantidades de arabinose, ácidos urônicos e grupos acetila. O teor de polioses em diferentes tipos de materiais lignocelulósicos pode variar de 20 a 25%.^{8,16} A lignina difere significativamente dos polissacarídeos, pois é, de fato, uma macromolécula aromática formada a partir do acoplamento radicalar

*e-mail: andrepiranga@yahoo.com.br

de alcoóis hidroxi-cinâmílicos. Em massa, esse componente representa cerca de 20 a 30% do lignocelulósico seco. Os diferentes tipos de acoplamento entre os alcoóis hidroxi-cinâmílicos dão origem a vários tipos de ligações entre as unidades fenilpropano, sendo as mais frequentes, éter β -O-4, éter diarila, bifenila, β -5/ α -O-4 (fenil cumarato) e β - β (pinorresinol).¹⁸ Dibenzodioxocinas, que são estruturas envolvendo o acoplamento múltiplo entre 3 fragmentos fenilpropano via ligações 5-5, β -O-4 e α -O-4, também têm sido descritas mais recentemente como parte da estrutura desta macromolécula em madeiras de coníferas.¹⁹

Os componentes citados anteriormente estão intimamente associados e/ou ligados quimicamente, formando a parede celular dos vegetais lenhosos. Entre as células existe ainda uma camada fina e rica em lignina, denominada lamela média, que funciona como uma cola, conferindo coesão à estrutura celular. A parede celular em questão apresenta baixa porosidade, o que impede a infiltração de moléculas de elevada massa molar como as proteínas.^{16,20} Justamente a ultraestrutura coesa e a parede celular não porosa correspondem à grande barreira ao processo biodegradativo. Dessa forma, o grupo de organismos aptos a degradar os materiais lignocelulósicos é bastante restrito. Esses organismos desenvolveram sistemas metabólicos complexos que permitem desestruturar a parede celular e despolimerizar os componentes mencionados anteriormente, gerando substâncias susceptíveis ao metabolismo intracelular.

Entre os sistemas degradativos estão relativamente bem descritas algumas enzimas que podem atuar sobre os componentes de forma isolada. Entre elas, podem ser mencionadas as celulases, que são divididas em endo-1,4- β -glicanases (hidrolisam ligações glicosídicas ao acaso, gerando oligômeros) e celobio-hidrolases (hidrolisam os oligômeros gerados pelas endo-1,4- β -glicanases, liberando moléculas de celobiose). Um grupo finalizador da hidrólise é composto pelas 1,4- β -glicosidases que hidrolisam a celobiose a glicose.^{11,12,20} Ainda dentro do complexo celulolítico há a celobiose-desidrogenase que oxida vários açúcares como celobiose, lactose, oligômeros de glicose e, inclusive, a celulose. Comoceptor de elétrons para fechar o seu ciclo catalítico, essa enzima pode utilizar quinonas, citocromos, radicais orgânicos, O_2 molecular, íons Fe^{3+} e Cu^{2+} . Ao reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} , a celobiose-desidrogenase pode gerar radicais hidroxila via reação de Fenton, os quais podem atuar na despolimerização dos polissacarídeos e na modificação estrutural da lignina. O H_2O_2 envolvido na reação pode ser gerado por várias vias que incluem a redução de O_2 pela própria celobiose-desidrogenase ou por outras enzimas oxidativas,^{12,13,21} que serão descritas mais à frente.

A biodegradação de polioles envolve a ação de enzimas frequentemente classificadas de acordo com os distintos substratos. As xilanases rompem ligações entre unidades monoméricas de xilose, enquanto as mananases atuam sobre ligações entre moléculas de manose, respectivamente. A β -xilidase e a β -manosidase hidrolisam dímeros de xilose e manose, respectivamente. Outras enzimas importantes são as α -glicuronidas e acetil-esterases, que atuam sobre ligações de ácidos urônicos e grupos acetila com moléculas de açúcares, respectivamente.^{8,12,20}

Um vasto grupo de enzimas está relacionado à biodegradação da lignina. No entanto, até os dias de hoje, existem inúmeras dúvidas sobre a real participação de cada grupo e a função que cada um deles exerce no processo global de oxidação que leva a lignina até dióxido de carbono e água.²² Desde a descoberta das lignina-peroxidases (LiP) em 1983,²³ e posteriormente das Manganês-peroxidases (MnP),²⁴ boa parte do que foi estabelecido sobre a biodegradação da lignina provém de experimentos realizados com o basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium*. Em menor extensão, outros estudos têm sido realizados com outros basidiomicetos, como *Trametes* (ou *Coriolus*) *versicolor*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Phlebia radiata*, *Phlebia* (ou *Merulius*)

tremellosus, *Phlebia subserialis*, *Phanerochaete sordida*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* e *Bjerkandera adusta*.^{12,22} A descrição do genoma de *P. chrysosporium*, nos últimos anos,^{25,26} certamente abriu uma nova janela para estudos sobre essas espécies, incluindo estudos da proteômica extracelular.^{27,28}

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

As fenoloxidasas compreendem um grupo característico de enzimas por pertencerem às metaloproteínas. Entre as fenoloxidasas, ainda se podem descrever dois subgrupos; um contém as enzimas dependentes de peróxido: LiP e MnP e o outro subgrupo, as lacases, que são cuproproteínas independentes de peróxido para atuarem.^{12,14,20}

Em termos gerais, as enzimas do complexo ligninolítico podem ser ordenadas segundo suas capacidades oxidativas: LiPs > MnPs > Lacases.^{20,22} Estas enzimas são comumente produzidas por fungos causadores de podridão branca; no entanto, existem algumas espécies que são eficientes na degradação de lignina, mas que produzem somente uma, duas ou as três enzimas simultaneamente.^{12,13} Já os fungos causadores de podridão parda são conhecidos como não produtores de fenoloxidasas.^{29,30}

As LiPs podem abstrair elétrons de estruturas aromáticas não fenólicas, dando origem a radicais cátion. As MnPs são dependentes de Mn^{2+} e são capazes de abstrair elétrons apenas de estruturas fenólicas. A Figura 1 mostra os ciclos catalíticos simplificados dessas duas enzimas. Nos dois casos, a enzima é ativada pela oxidação por H_2O_2 , levando à formação do composto I (C_I) que é um oxocomplexo deficiente em 2 elétrons. A redução do C_I até a enzima nativa ocorre por meio de duas etapas, com a abstração de 1 elétron de cada vez. No caso das LiPs, a redução de C_I a C_{II} e também de C_{II} a C_0 pode ocorrer por meio da oxidação de substratos fenólicos e não fenólicos levando à formação de radicais cátion (Figura 1a). Nas LiPs há um resíduo de triptofano na cadeia proteica (trp171) que ocorre invariavelmente em várias das isoenzimas conhecidas. Supõe-se que esse triptofano atue como elo de transferência de elétrons com substratos

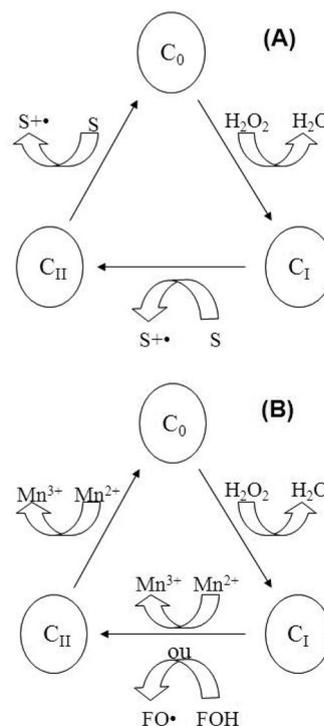


Figura 1. Ciclo catalítico simplificado da LiP (A) e MnP (B); S = substrato aromático; FOH = substrato fenólico

aromáticos que não podem ter um contato direto com o grupo heme oxidado da enzima.²² Por outro lado, as MnPs dependem de Mn^{2+} para a redução de C_{II} a C_0 (Figura 1b). O composto I pode ser reduzido ao composto II à custa da oxidação direta de uma estrutura fenólica ou de um átomo de Mn^{2+} , mas o íon Mn^{2+} parece o elo preferencial de transferência de elétrons, visto que as MnPs não possuem o resíduo de triptofano comumente encontrado nas LiPs. De fato, nas MnPs há um sítio de ligação de manganês e não o resíduo de triptofano, sendo essa a principal diferença entre os dois grupos de enzimas.²² O Mn^{3+} formado é bastante reativo, podendo atuar como um mediador da MnP e é normalmente estabilizado por quelantes produzidos pelo próprio fungo, como o ácido oxálico. O complexo Mn^{3+} -oxalato, por sua vez, pode ser reduzido à custa da oxidação de outra estrutura fenólica.²²

Estudos envolvendo a mutagênese dirigida permitiram a preparação de LiP contendo um sítio de ligação de manganês e isso conferiu atividade de MnP à LiP em questão.³¹ O inverso também foi realizado, ou seja, a introdução de um resíduo de triptofano 171 numa MnP proporcionou a atividade de LiP na MnP transformada.³² Algumas enzimas com a dupla atividade também foram encontradas em espécies fúngicas selvagens dos gêneros *Pleurotus* e *Bjerkandera*,³³ sendo denominadas de peroxidases versáteis (VP).

As lacases atuam pela abstração de 1 elétron de fenóis, em função da redução de Cu^{2+} a Cu^{1+} que, por sua vez, reduz O_2 a H_2O , permitindo que a enzima atue de forma cíclica (Figura 2). Entretanto, essas enzimas também podem degradar estruturas aromáticas não fenólicas por meio da oxidação de alguns mediadores sintéticos como o hidroxibenzotriazol (HBT),³⁴ ou mesmo naturais como derivados do ácido benzoico e íons Mn^{2+} .³⁵

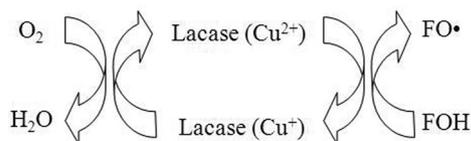


Figura 2. Ciclo catalítico das lacases; FOH = substrato fenólico. A estequiometria do ciclo envolve 4 Cu^{2+} (normalmente ligados a uma única proteína ou a 2 cadeias proteicas acopladas), 4 substratos fenólicos, 4 prótons e 1 molécula de O_2

As enzimas que produzem peróxido são acessórias às peroxidases. Essas enzimas geram peróxido de hidrogênio *in situ* e possibilitam que as peroxidases atuem. As principais enzimas produtoras de peróxido envolvidas na biodegradação de lignina são glicose-oxidase e metanol-oxidase (intracelulares) que utilizam glicose e metanol como substratos, respectivamente.^{12,20} A glicose é originária da biodegradação da celulose e das polioses que contêm glicose. O metanol é produzido durante a biodegradação da própria lignina por meio da remoção de metoxilas ligadas aos anéis aromáticos. A produção de H_2O_2 por enzimas extracelulares também tem sido descrita em alguns fungos causadores de podridão branca. Entre elas constam a glioxal-oxidase^{26,27,36} e a aril-álcool-oxidase.³⁷ A oxalato-oxidase (intracelular) pode gerar H_2O_2 a partir da oxidação de ácido oxálico.³⁸ Também MnP pode gerar H_2O_2 a partir da oxidação de ácidos orgânicos como o glioxílico e o oxálico.³⁹ Nesse caso, o ácido dicarboxílico se decompõe dando origem a CO_2 e radical formato que, ao reagir com O_2 , gera superóxido-ânion que pode então gerar H_2O_2 .

DESESTRUTURAÇÃO DA PAREDE CELULAR LIGNIFICADA E A BIODEGRADAÇÃO DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Os organismos que decompõem os materiais lignocelulósicos podem ser classificados como fungos causadores de podridão branca,

que degradam todos os componentes dos lignocelulósicos, e fungos causadores de podridão parda, que degradam principalmente os polissacarídeos. Os fungos causadores de podridão branca apresentam dois comportamentos distintos: alguns degradam todos os componentes da parede celular vegetal simultaneamente, enquanto outros atacam preferencialmente a lignina nos estágios iniciais de colonização. Fungos causadores de podridão branca e parda pertencem à classe dos basidiomicetos, sendo que os ascomicetos e os deuteromicetos são classificados como fungos causadores de podridão branca, que também são capazes de degradar lignina e polissacarídeos, porém em velocidades muito inferiores aos basidiomicetos.^{16,40} Todavia, ascomicetos dos gêneros *Xylaria*, *Daldinia* e *Hypoxylon* são considerados fungos causadores de podridão branca.⁴⁰ A ocorrência de várias comunidades de micro-organismos agindo durante a decomposição natural de um lignocelulósico e a classificação desses organismos tem sido o foco de várias revisões disponíveis na literatura, inclusive em língua portuguesa.¹⁴

Uma das chaves para o entendimento da biodegradação dos lignocelulósicos tem sido a observação microscópica do processo (Figura 3). Com base nesses estudos, está claro que as hifas fúngicas invadem o lúmen das células dos materiais lignocelulósicos e produzem diversos metabólitos extracelulares que então agem na degradação da parede celular vegetal. Os componentes da parede celular vegetal são obrigatoriamente transformados em moléculas menores e solúveis, pois só assim podem se tornar susceptíveis ao metabolismo intracelular responsável pela obtenção de energia.²⁰

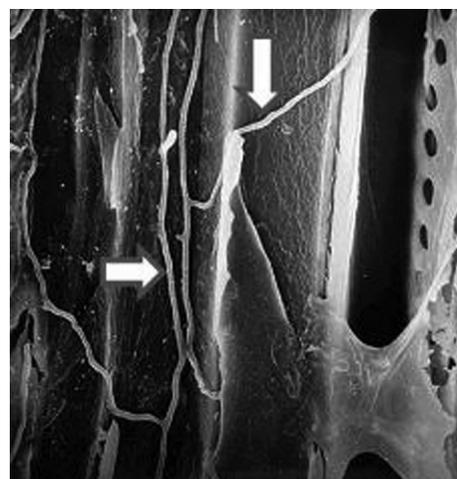


Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura mostrando hifas de *Ganoderma australe* (indicadas por setas) no interior do lúmen de células de *Nothofagus dombeyi*. Magnificação de 800 vezes. Adaptada da ref. 14

Os mecanismos que explicariam a biodegradação dos componentes de materiais lignocelulósicos têm sido objeto de muitos estudos. Um aspecto relevante dentro desse tema envolve o modo de ação das enzimas e de compostos de baixa massa molar produzidos pelos fungos, pois a degradação da parede celular lignificada depende da ação de uma série de metabólitos que somente são eficientes quando produzidos simultaneamente pela hifa. O entendimento desses mecanismos permite avaliar a complexidade do sistema biológico usado na degradação dos lignocelulósicos e, a partir daí, a eventual proposição de sistemas biomiméticos destinados à desconstrução da parede celular lignificada.

Vários estudos mostram que as enzimas são demasiadamente grandes para penetrar a parede celular lignificada. Srebotnik e colaboradores⁴¹ e Flounoy e colaboradores⁴² demonstraram que as proteínas não infiltram a parede celular lignificada. Mesmo paredes celulares vegetais não lignificadas apresentam baixa porosidade e com isso

impedem a infiltração de proteínas.⁴³ Embora estudos anteriores já indicassem a dificuldade de infiltração de enzimas na parede celular vegetal, um trabalho chave, desenvolvido por Blanchette e colaboradores,⁴⁴ foi muito relevante por associar o avanço do processo de biodegradação da madeira com a infiltração de proteínas na parede celular. Os autores mostraram, de forma inequívoca, que a lignina contida na parede celular sofria alterações estruturais importantes mesmo antes da parede celular ser permeável às enzimas.

Com base nessas observações microscópicas, surgiram teorias que associam o processo biodegradativo a uma etapa inicial de desestruturação da parede celular lignificada induzida pela ação de compostos de baixa massa molar, que podem infiltrar a parede celular e atuar diretamente sobre os componentes macromoleculares. Após essa etapa inicial de desestruturação, haveria um aumento de porosidade da parede celular e a consequente abertura de vias de penetração das enzimas oxidativas e hidrolíticas.²⁹

Muitos compostos de baixa massa molar foram identificados nos cultivos de fungos decompositores de madeira. O modo de ação desses compostos consiste em atuar diretamente sobre a parede celular vegetal ou agir como mediadores das enzimas oxidativas. Alguns desses compostos e suas vias de atuação estão descritos a seguir.

Álcool veratrílico e LiP

Um dos primeiros mediadores descritos foi o álcool veratrílico (álcool 3,4-dimetoxi-benzílico).⁴⁵ Trata-se de um metabólito produzido pelo fungo causador de podridão branca *P. chrysosporium* que, ao ser oxidado por LiP, gera um radical cátion extremamente instável que pode oxidar a lignina.¹³ Embora o sistema LiP/álcool veratrílico tenha sido bem caracterizado do ponto de vista de ação *in vitro*, o curto tempo de vida do radical cátion do álcool veratrílico limita a possibilidade de ser esse o principal sistema mediador capaz de infiltrar a parede celular vegetal e causar a degradação inicial da lignina.²² Além de produzir LiP, o fungo *T. versicolor* sintetiza o composto organoclorado 2-cloro-1,4-dimetoxibenzeno, que também atua como substrato mediador dessa enzima.⁴⁶

Ácido oxálico, MnP e as reações de peroxidação de ácidos graxos insaturados

O ácido oxálico é produzido por vários fungos causadores de podridão branca e parda e serve como um acidificante do meio em que o fungo está buscando sobreviver.³⁸ Essa acidificação do meio tem se mostrado algo fundamental para o metabolismo desses fungos, visto que a maioria das enzimas extracelulares, envolvidas no processo biodegradativo dos lignocelulósicos, atua em pH ideal da ordem de 3 a 5,5.

O oxalato pode atuar diretamente na parede celular vegetal sequestrando cálcio, o que poderia provocar desestruturação entre as microfibrilas e um eventual aumento de porosidade.⁴⁷ A presença de cristais de oxalato de cálcio em madeiras biodegradadas tem sido amplamente descrita e confirma que parte expressiva do ácido oxálico secretado pelo fungo acaba formando cristais insolúveis com o cálcio disponível.^{1,48,49} Por outro lado, a formação do oxalato de cálcio indisponibiliza parte do ácido oxálico secretado pelo fungo para atuar como quelante de outros íons metálicos como os de manganês, como será descrito mais à frente. De fato, há trabalhos que mostram claramente que os fungos decompositores de materiais lignocelulósicos podem ajustar a concentração de oxalato disponível no meio em que estão agindo, a partir da sua biossíntese, insolubilização por cálcio ou, também, pela sua degradação por vias metabólicas ainda não perfeitamente descritas, que podem incluir a ação da enzima oxalato-decarboxilase, oxalato-oxidase ou mesmo a MnP.^{38,39,48}

Um papel alternativo para a ação do ácido oxálico secretado pelos fungos causadores de podridão branca foi proposto por Hunt e colaboradores.⁵⁰ Os autores postularam que esse ácido pode formar ésteres com os polissacarídeos durante o processo de biodegradação. O éster seria formado por meio de uma das carboxilas, mantendo a outra livre e gerando pontos de carga na superfície do polissacarídeo, que seriam os responsáveis pelo aumento da capacidade das fibras em absorver água, ocasionando um maior inchamento das mesmas e um eventual aumento de porosidade.

O oxalato proveniente da ionização do ácido oxálico secretado pelo fungo ($pK_{a1} = 1,25$; $pK_{a2} = 4,28$) também pode atuar como quelante de íons manganês, indispensáveis para a atuação da MnP. Nos sistemas *in vivo*, a MnP depende de oxalato para transportar o íon Mn^{3+} para fora do canal de manganês e, com isso, liberar novo ponto para a entrada de Mn^{2+} . Outros ácidos orgânicos (málico, malônico, fumárico, succínico) também têm sido encontrados em culturas de fungos de podridão branca, mas apenas o ácido oxálico é produzido em concentrações fisiológicas suficientes para quelar e estabilizar o Mn^{3+} .^{39,48,49,51,52} O oxalato de Mn^{3+} apresenta estabilidade suficiente para difundir longe da enzima e infiltrar a parede celular vegetal. Quando em contato com alguma subestrutura da lignina susceptível à oxidação, o Mn^{3+} é reduzido a Mn^{2+} , dando origem a uma subestrutura de lignina oxidada. A limitação desse mecanismo degradativo é a baixa capacidade oxidativa do oxalato de Mn^{3+} . De fato, o oxalato de Mn^{3+} pode oxidar subestruturas fenólicas da lignina, mas não abstrair elétrons diretamente de estruturas aromáticas não fenólicas,⁵² como é o caso da ação do sistema LiP/álcool veratrílico.

Estudos bastante esclarecedores sobre a ação mediada da enzima MnP foram conduzidos no início da década de 90. O grupo de pesquisas coordenado por K. E. Hammel do *Forest Products Laboratory*, em Madison (Wisconsin), demonstrou que vários compostos recalcitrantes podiam ser decompostos em um meio reacional que continha a MnP além de Mn^{2+} /ácido dicarboxílico/ H_2O_2 e ácido linoleico (um ácido graxo poli-insaturado) emulsionado em algum surfactante.⁵³ Os autores obtiveram várias evidências experimentais que demonstravam a ação de radicais peroxila sobre os compostos xenobióticos. Os radicais peroxila seriam formados a partir da peroxidação do ácido linoleico iniciada pela oxidação por Mn^{3+} , gerado no ciclo catalítico da MnP. O processo seria similar ao já amplamente demonstrado para as reações de peroxidação de lipídeos iniciadas por radicais derivados do oxigênio.⁵⁴ A ação dos íons Mn^{3+} sobre o ácido graxo geraria uma espécie ativa com maior capacidade oxidativa do que o próprio Mn^{3+} . Nesse possível radical de carbono gerado, ocorreria a adição de O_2 molecular produzindo, assim, os radicais peroxila, como ilustra a Figura 4.

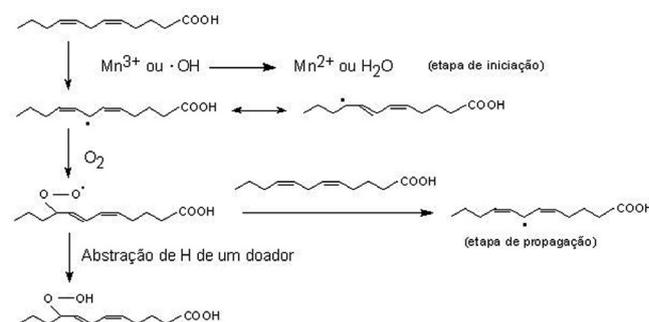


Figura 4. Peroxidação de um ácido graxo di-insaturado iniciada por Mn^{3+} ou radical hidroxila. Adaptada da ref. 54

Esse grupo inicial de trabalhos abriu uma janela para explicar as reações de degradação de lignina por um sistema mediado pela ação de MnP sobre ácidos graxos insaturados. O próprio grupo co-

ordenado por Hammel mostrou que os radicais peroxila oriundos da peroxidação de ácido linoleico por MnP podem atuar em modelos de lignina não fenólicos, abstraindo um elétron (e um próton) do carbono alfa, levando à posterior degradação do composto modelo,⁵⁵ conforme a Figura 5.

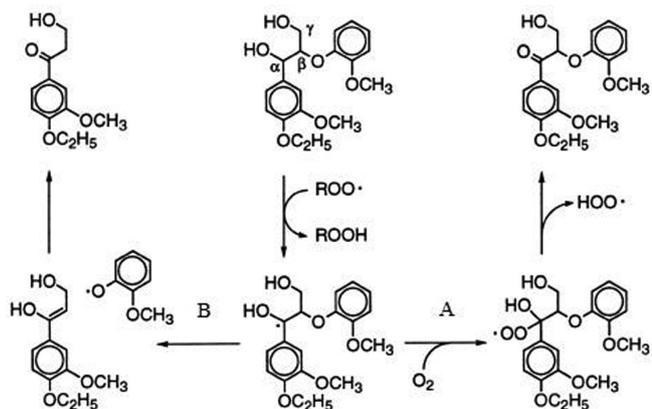


Figura 5. Degradação de um composto modelo de lignina (não fenólico) pelo sistema MnP, ácido linoleico e H₂O₂. O modelo proposto explicaria a via de oxidação Cα (A) e a clivagem β-O-4 (B). Ambas as reações seriam iniciadas pela abstração de um hidrogênio benzílico do composto modelo através da ação de um radical peroxila gerado pelo sistema MnP/ácido linoleico/H₂O₂. Adaptada da ref. 55

Corroborando a teoria da degradação de lignina mediada por ácidos graxos insaturados que sofrem peroxidação iniciada por MnP, Enoki e colaboradores⁵⁶ demonstraram que um dos fungos mais eficientes em degradar lignina, *C. subvermispota*, produz vários ácidos graxos (ácidos linoleico, oleico, valérico, palmítico e esteárico) quando cultivado em meio sólido contendo madeira moída pré-extraída para a remoção da fração lipídica. Esses ácidos foram produzidos principalmente nos estágios iniciais da biodegradação, tendo suas concentrações diminuídas significativamente após 2 semanas de cultivo, o que foi seguido pelo aparecimento de hidroperóxidos orgânicos. Esses dados levaram os autores a relacionar a formação dos hidroperóxidos orgânicos com a ação de Mn³⁺ (oriundo da oxidação de Mn²⁺ por MnP) sobre os ácidos graxos, seguido da adição de oxigênio aos radicais alila inicialmente formados, exatamente como já bastante estudado para a peroxidação de lipídeos. O mesmo grupo⁵⁷ demonstrou posteriormente que há a formação de diversos radicais, incluindo o radical acila por ação de MnP sobre ácido linoleico. A formação desses radicais poderia ocorrer pela decomposição dos hidroperóxidos gerados, longe do ponto onde a enzima é produzida. O grupo de Watanabe estudou ainda em detalhes a peroxidação de ácido linoleico por MnP purificada a partir de cultivos de *C. subvermispota*.⁵⁸ Nesse estudo foi determinado que a peroxidação de ácido linoleico pelo sistema MnP/Mn²⁺/H₂O₂ gerou n-pentanal, n-hexanal e glicoxal como principais produtos de reação. O glicoxal formado continua a sofrer reações de oxidação, levando à formação inicial de um radical acila por abstração de hidrogênio do carbono aldeídico. Essa reação produz quimioluminescência com um espectro com λ máximo entre 700 e 710 nm, sem nenhum ombro na região de 630 nm. Esse espectro de emissão não corresponde a espécies excitadas bem documentadas como carbonila triplete (λ_{máx} 400-500 nm), bi-acila triplete (acoplamento de dois radicais acila - λ_{máx} 500-600 nm) e oxigênio singlete (λ_{máx} 634 e 703 nm). Os autores concluíram que a emissão de luz na reação de glicoxal com MnP é um evento químico novo e de difícil explicação, baseada na ocorrência de espécies excitadas oriundas de radicais acila anteriormente descritas.⁵⁸

Um trabalho recentemente realizado por nosso grupo de pesquisas mostrou que a adição de uma fonte extra de triglicerídeos (óleo de soja) a um cultivo de *C. subvermispota* sobre madeira de *Pinus taeda* resultou num maior acúmulo de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (ensaio indicativo de peroxidação de lipídeos), corroborando que esse fungo promove peroxidação de lipídeos *in vivo*.⁵⁹

Os sistemas baseados na ação de MnP sobre ácido linoleico têm sido a base atual das aplicações de MnP nos processos de branqueamento de polpas Kraft, que serão discutidos mais adiante.

Ainda com relação à peroxidação de ácidos graxos insaturados por enzimas envolvidas na degradação de lignina, alguns trabalhos mostraram que as lacases podem atuar como se fossem MnP, desde que um mediador fenólico esteja presente no meio reacional. Por exemplo, Srebotnik e Boisson³⁵ observaram que lacase pode degradar ácido linoleico, desde que o ácido 4-hidroxi-benzoico esteja presente no meio reacional. A explicação é que a enzima oxida o fenol a radical fenoxila, conforme amplamente descrito.²⁰ O radical fenoxila atuaria então como iniciador da peroxidação do lipídeo insaturado, uma vez que este não se mostrou um substrato acessível à ação direta da lacase. Cunha e colaboradores⁶⁰ também demonstraram que o ácido linoleico pode ser peroxidado por lacases na presença do ácido 4-hidroxi-benzoico. A reação de peroxidação é ainda mais intensa quando conduzida na presença de íons Mn²⁺.³⁵ Com base nesses resultados,^{35,60} tem sido proposto que a lacase pode atuar como se fosse uma MnP por meio de uma reação em cascata que envolveria a oxidação inicial do ácido 4-hidroxi-benzoico a radical fenoxila; oxidação de Mn²⁺ a Mn³⁺ por redução do radical fenoxila; oxidação do ácido linoleico por Mn³⁺ e, peroxidação final do ácido linoleico.

Sistema lacase-mediador

Também tem sido demonstrado que as lacases podem degradar estruturas aromáticas não fenólicas por meio de mediadores como o ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6)-sulfônico). Nesse caso, o substrato inicial da enzima é o mediador de baixa massa molar que, por sua vez, oxida a lignina por um mecanismo ainda não claramente definido.^{9,10,61} Os experimentos precursores foram realizados com o tratamento de uma suspensão de lignina com lacases na presença do ABTS. Nessas condições, foi demonstrado que a lignina sofria despolimerização significativa, enquanto que na ausência do mediador ela repolimerizava (para revisão ver ref. 61). Esse mediador inicialmente utilizado é um composto nitrogenado frequentemente usado em ensaios de determinação da atividade de lacase *in vitro*. No entanto, trata-se de um composto tóxico e de custo incompatível com os processos tecnológicos de branqueamento de celulose. A partir dos estudos iniciais houve uma busca intensa por mediadores alternativos, que aliassem eficiência na degradação de lignina e baixo custo, além de nível mínimo de toxicidade. Na busca desses mediadores surgiu o HBT, que se mostrou bastante eficiente para os processos de deslignificação, embora ainda apresentasse custo elevado.⁹

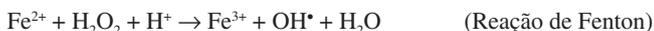
O estudo do sistema lacase/mediador ganhou grande desenvolvimento, visto que a enzima é secretada durante o metabolismo primário de muitos fungos decompositores de materiais lignocelulósicos e pode ser produzida em níveis significativamente mais elevados do que a MnP e a LiP. Os mediadores amplamente estudados são moléculas sintéticas que foram selecionadas com base em estudos empíricos.⁹ Por outro lado, Eggert e colaboradores⁶² demonstraram que o fungo causador de podridão branca *Pycnoporus cinnabarinus* produz um mediador natural, o ácido 3-hidroxi-antranílico. Ao ser oxidado pela lacase, esse metabólito é convertido em um radical capaz de degradar porções não fenólicas da lignina. No entanto, trabalhos subsequentes desenvolvidos com essa espécie fúngica mostraram que mesmo na

ausência desse mediador (culturas com inibidores da biossíntese ou mutantes deficientes em sua produção) o fungo foi capaz de degradar lignina,⁶³ o que mantém em aberto a questão sobre a existência e a eficiência do sistema lacase/mediador nos processos naturais de biodegradação da lignina.

A maioria das lacases secretadas por fungos decompositores de materiais lignocelulósicos apresenta baixa capacidade oxidativa e corresponde ao grupo das lacases azuis, pois apresenta espectro de absorção característico em torno de 600 nm. Todavia, alguns fungos ligninolíticos secretam também algumas lacases denominadas amarelas, que apresentam capacidade oxidativa para degradar diretamente estruturas aromáticas não fenólicas. Estas enzimas são produzidas somente a partir de substratos lignocelulósicos e acredita-se que produtos de degradação da lignina poderiam estar de certa forma ligados a elas, alterando seus espectros de absorção (por isso denominadas de lacases amarelas) e atuando como seus mediadores naturais.⁶⁴

Sistema Fenton

O íon Fe^{3+} é essencial para os fungos causadores de podridão branca, pois faz parte do sítio ativo das peroxidases.^{52,65} Além disso, os íons ferro podem ser utilizados por fungos causadores de podridão parda para gerar radicais hidroxila via reação de Fenton, visto que H_2O_2 é produzido pela maioria deles.^{29,66,67}



Os radicais hidroxila são fortes oxidantes que ocasionam a rápida despolimerização dos polissacarídeos, além de poderem ocasionar a inserção de novas hidroxilas nos anéis aromáticos da lignina (para uma revisão ver ref. 67). A quantidade de ferro presente na maioria dos materiais lignocelulósicos é suficiente para dar origem aos radicais OH, os quais são propostos como os principais oxidantes de baixa massa molar que iniciam a degradação, principalmente dos polissacarídeos na parede celular vegetal, por fungos causadores de podridão parda.^{29,66} No entanto, o ferro presente nesses materiais é encontrado predominantemente na forma oxidada e insolúvel (Fe^{3+}), o que gera a demanda por agentes quelantes para solubilizá-lo e reduzi-lo. O ácido oxálico é um excelente quelante de Fe^{3+} , mas necessita de luz para reduzi-lo.^{29,38} Alguns fungos e também bactérias produzem outros compostos de baixa massa molar quelantes de íons metálicos denominados de sideróforos.⁶⁸

Alguns trabalhos têm mostrado que fungos causadores de podridão parda do gênero *Gloeophyllum*, principalmente a espécie *Gloeophyllum trabeum*, produzem compostos do tipo catecol com atividade redutora de Fe^{3+} . Esses compostos exibem atividade pró-oxidante (devido à maior formação de radicais OH entre o metal e H_2O_2) por meio da redução de Fe^{3+} e permitem que o fungo disponha de um sistema cíclico e extracelular de oxirredução de quinonas apto a gerar os dois reagentes de Fenton. Isso foi demonstrado a partir da identificação de 2,5-dimetoxi-hidroquinona e 4,5-dimetoxi-catecol, ambos produzidos por *G. trabeum* em meio sintético, inicialmente livre de quaisquer compostos fenólicos. As respectivas formas oxidadas das hidroquinonas também foram detectadas nesses cultivos.^{66,69} Posteriormente, Jensen e colaboradores⁷⁰ demonstraram que há uma enzima presente no micélio desse fungo (quinona-redutase) que pode catalisar a conversão de quinonas em suas respectivas formas reduzidas, fechando o ciclo de oxirredução, conforme a Figura 6. Ainda nesses estudos,⁶⁶ foi observada a formação de H_2O_2 no próprio ciclo de oxirredução, quando um radical semiquinona formado pela oxidação inicial da hidroquinona reage com O_2 e não outro íon Fe^{3+} .

Vários outros compostos com atividade redutora de íons Fe^{3+} podem ser encontrados naturalmente na madeira (fazendo parte da

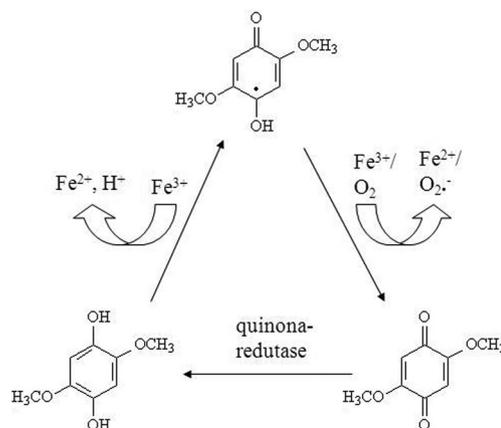


Figura 6. Mecanismo proposto para redução extracelular de Fe^{3+} e O_2 e produção de H_2O_2 pelo fungo *G. trabeum*. Adaptada da ref. 66

fração de extrativos) ou ainda produzidos durante a biodegradação da lignina. Esses compostos podem atuar de forma similar ao descrito anteriormente para as hidroquinonas produzidas por *G. trabeum* e, com isso, conferir atividade redutora de Fe^{3+} não somente em cultivos de fungos causadores de podridão parda, mas também em cultivos de fungos causadores de podridão branca.^{48,49,71}

Alguns glicopeptídeos de baixa massa molar, produzidos por fungos causadores de podridão branca, parda e branda, também podem atuar como agentes redutores de Fe^{3+} , conforme descrito por Enoki e colaboradores.⁷² Estes autores mostraram que os glicopeptídeos em questão promovem reações de oxirredução entre O_2 e um doador de elétrons, como o NADH (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzido), gerando radicais OH via reação de Fenton.

A reação de Fenton, além de gerar radicais OH aptos a despolimerizar os polissacarídeos, também pode funcionar como um processo iniciador das reações de peroxidação de lipídeos já discutidas no tópico sobre a ação de MnP. Dessa forma, além da atividade das enzimas MnP e lacase nos cultivos de fungos decompositores de madeira, também a atividade redutora de íons metálicos e, obviamente, a atividade geradora de H_2O_2 são eventos críticos dentro do processo de peroxidação de lipídeos.

Com base no exposto até o momento, é de se supor que a reação de Fenton ocorra com frequência em cultivos de basidiomicetos sobre madeira. Recentemente, Gutiérrez e colaboradores⁷³ analisaram cultivos de quatro espécies de basidiomicetos na biodegradação de eucalipto, incluindo *P. radiata*, *Pleurotus pulmonarius*, *B. adusta* e *C. subvermispora*. Foi identificada uma nova classe de lipídeos dicarboxílicos de cadeia longa, sendo alguns deles insaturados, os quais se acumularam principalmente nas culturas de *C. subvermispora* (24 mg/100 g de madeira). No decorrer dos períodos de biodegradação estudados (1, 2, 4 e 7 semanas), os ésteres presentes originalmente na madeira foram hidrolisados e, conseqüentemente, a concentração de ácidos linoleico, palmítico, oleico e esteárico na forma livre foi aumentada. Supõe-se que os fungos efetuaram reações de condensação envolvendo estes ácidos graxos, sintetizando ácidos alquil-itacônicos, principalmente os ácidos tetradecil, *cis*-7-hexadecenil- e hexadecil-itacônico.

Além do ácido *cis*-7-hexadecenil-itacônico, os ácidos 1-heptadeceno-2,3-dicarboxílico e 1-nonadeceno-2,3-dicarboxílico também foram identificados em cultivos de *C. subvermispora* por um grupo de pesquisadores japoneses.^{74,75} Esse grupo propõe que os ácidos alquil-itacônicos podem participar na supressão da reação de Fenton por meio da interação e indisponibilização de íons ferro, além de evitar também a repolimerização de fenóis derivados de lignina, oxidados pela ação enzimática.^{74,76}

As hipóteses mencionadas anteriormente são corroboradas pela grande seletividade de algumas espécies de fungos causadores de podridão branca em degradar lignina, mantendo os polissacarídeos de certa forma preservados.^{30,77,78} Isso tem sugerido que algumas espécies apresentam algum sistema que pode inibir a geração de radicais hidroxila. Por exemplo, durante a biodegradação de *P. taeda* por *C. subvermispora*, somente uma pequena perda de glicana pôde ser observada (2%), mesmo em estágios avançados de biodegradação (90 dias).⁷⁸ No entanto, parte da celulose residual foi despolimerizada a partir de 30 dias de cultivo, indicando que ao menos algum nível de degradação deve ocorrer.⁷⁹ Essa despolimerização de celulose poderia ser induzida tanto por radicais hidroxila oriundos da reação de Fenton como pela ação de endoglicanases, produzidas pelo fungo.^{49,80} A baixa capacidade degradativa da celulose poderia ser atribuída à biossíntese dos ácidos alquil-itacônicos, como postulado pelo grupo de Watanabe,^{76,81} ou ainda pela secreção de elevadas quantidades de ácido oxálico no meio, que também pode quelar e indisponibilizar Fe^{3+} para as reações de redução por derivados fenólicos e a posterior reação de Fenton.⁴⁹

A ocorrência de ácidos alquil-itacônicos no meio extracelular dos cultivos de alguns fungos seletivos para degradar lignina certamente previne a degradação de celulose.⁸¹ No entanto, do ponto de vista evolutivo, o fungo não deve ter desenvolvido um sistema que o limitasse na capacidade de metabolizar fontes de carbono energéticas como a celulose. O mais provável é que os ácidos alquil-itacônicos também sejam substratos para processos de peroxidação e consequente geração de radicais peroxila, que teriam como função principal a degradação de lignina. A elevada capacidade quelante desses ácidos para íons ferro implicaria, portanto, somente em um efeito secundário que culmina na supressão das reações de Fenton e a consequente limitação da degradação de celulose.

DEGRADAÇÃO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS POR ENZIMAS, SISTEMAS BIOMIMÉTICOS E SUAS APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS

A aplicação direta dos fungos decompositores de madeira em processo biotecnológicos tem encontrado alguma restrição devido à morosidade da ação biológica dentro de um contexto industrial de elevada produtividade e turnos reacionais cada vez mais curtos e eficientes. Mesmo assim, o processo de biopolpação, que se caracteriza por um pré-tratamento de cavacos de madeira com fungos causadores de podridão branca, já foi testado em escala industrial e demonstrou resultados promissores quando combinado com os processos de polpação mecânica. Nesse contexto, o pré-tratamento biológico de cavacos de madeira permitiu a redução de até 40% no consumo de energia nos processos de desfibramento e refino mecânico destinados à produção de polpas celulósicas usadas na fabricação de cartões e papéis absorventes (para uma revisão ver ref. 2). Os processos de biorremediação de solos contaminados utilizando a inoculação direta de fungos decompositores de materiais lignocelulósicos também têm obtido sucesso, visto que o tempo prolongado de tratamento não chega a ser um problema, pois nessa situação o objetivo exclusivo é a remediação e recuperação dos solos em questão e não a preparação de um produto de interesse comercial.³

Ao utilizar fungos ligninolíticos no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos, a recuperação de açúcares fermentescíveis para produção de bioprodutos pode ser incrementada. De acordo com Hatakka,⁸² 35% de palha de trigo foi convertida em açúcares redutores ao serem tratadas por *P. ostreatus* por 5 semanas. Taniguchi e colaboradores⁸³ observaram rendimento similar em palha de arroz com o mesmo fungo por 60 dias. Keller e colaboradores⁸⁴ observaram um acréscimo de 3 a 5 vezes na digestibilidade enzimática de celulose em

sabugo de milho biotratado pelo fungo *Cyathus stercoreus* por 29 dias, enquanto Zhang e colaboradores⁸⁵ mostraram que o biotratamento de resíduos de bambu por *C. versicolor* também aumentou o rendimento de açúcares redutores. O biotratamento emprega condições brandas (temperatura ambiente, dependendo do micro-organismo), evita o uso de reagentes químicos tóxicos e corrosivos, pode proporcionar maior rendimento do produto, menor ocorrência de reações laterais, menor demanda de energia e menores resistências do reator quanto à pressão e à corrosão.⁸⁶ Dessa forma, a deslignificação fúngica aparenta ser uma tecnologia promissora para a produção de etanol e outros bioprodutos. Alguns trabalhos na literatura já têm aplicado pré-tratamento biológico para aumentar o rendimento de açúcares durante a hidrólise de biomassa vegetal e a subsequente produção de etanol.⁵

Embora alguns processos que empregam os fungos diretamente tenham avançado para aplicações industriais, a utilização de metabólitos fúngicos extracelulares, principalmente as enzimas, tem permitido avanços mais significativos dentro dos processos tecnológicos.⁸⁷ A indústria de celulose e papel tem se valido da aplicação de enzimas hidrolíticas em seus processos. As xilanases, por exemplo, têm sido aplicadas como agentes auxiliares aos processos de branqueamento convencional de polpas celulósicas. Em geral, a aplicação da enzima sobre as pastas celulósicas não branqueadas permite uma remoção parcial das hemiceluloses redepositadas sobre as fibras, facilitando a ação posterior de agentes de branqueamento tradicionais, como dióxido de cloro. Essa aplicação não requer grandes modificações no processo industrial, pois a enzima é adicionada nos próprios reatores normalmente utilizados. Adicionalmente, a polpa branqueada obtida não apresenta diminuição significativa de resistência mecânica. Uma dificuldade para a passagem da escala de laboratório para a industrial foi a temperatura e o pH ideais de ação dessas enzimas. As xilanases inicialmente comercializadas não atuavam em temperaturas superiores a 55 °C e pH superior a 7, o que limitava sua aplicação. Atualmente as empresas produtoras de enzimas já comercializam produtos estáveis em elevados valores de pH e elevadas temperaturas, tornando-as compatíveis com as condições de aplicação industrial.⁸

As celulases têm encontrado aplicação como auxiliares do processo de refino da pasta celulósica permitindo a economia de energia no processo ou, ainda, nos processos de reciclagem de papéis que contêm pigmentos. Nesse caso, as enzimas atuam hidrolisando parcialmente a celulose, diminuindo a interação dos pigmentos com a matriz celulósica, o que facilita consideravelmente a flotação dos pigmentos na etapa de destintamento. Uma vantagem adicional da aplicação de celulases e hemicelulases na reciclagem de papel é o aumento na velocidade de drenagem da suspensão de polpa reciclada, permitindo uma maior velocidade de operação da máquina formadora de folhas.⁸⁸

Dentre as enzimas oxidativas, as lacases têm se aproximado rapidamente da aplicação comercial nos processos de biobranqueamento de pastas celulósicas, enquanto as MnPs ainda apresentam restrições devido à limitada capacidade de se produzir a enzima em escala comercial a preços baixos.^{9,89-91}

O biobranqueamento com lacases está baseado na habilidade dessa enzima em oxidar alguns mediadores que, por sua vez, atuam como agentes oxidantes da lignina residual presente nas polpas celulósicas. A lignina oxidada é então removida por um processo de extração alcalina. Call e Mucke⁹ revisaram a vasta literatura disponível até aquela data sobre o biobranqueamento com lacases e mostraram uma série de resultados referentes à otimização do processo, utilizando HBT como mediador da enzima. Em síntese, pode-se verificar que o sistema lacase/HBT proporciona remoções de até 57% da lignina inicialmente contida na polpa, dependendo das condições operacionais e, principalmente, do tipo de polpa em estudo. No entanto, esse mediador ainda é incompatível com os custos de produção de polpas celulósicas e tem havido um empenho expressivo

de vários pesquisadores na busca por mediadores menos custosos. Trabalhos mais recentes têm apontado que a aceto-siringona (metil, 3,5-dimetoxi-4-hidroxi-fenil-cetona) se apresenta como um mediador de baixo custo, porém de menor eficiência que o HBT.^{89,92}

O branqueamento com MnP tem sido menos explorado até o momento, principalmente devido à maior dificuldade de produção dessa enzima, que é secretada durante o metabolismo secundário dos fungos cultivados em meio líquido. Por outro lado, lacases podem ser secretadas durante o crescimento microbiano. Isso implica em grandes diferenças de produtividade da enzima, que pode ser até 1000 vezes maior para as lacases.²⁰ No entanto, o sequenciamento recente do genoma de *P. chrysosporium*⁶⁵ e os estudos de clonagem dos genes responsáveis pela produção de MnP em outros organismos têm alterado rapidamente esse cenário.^{91,93,94} Em condições otimizadas de reação, a ação de MnP sobre uma polpa celulósica não branqueada proporcionou 35% de remoção da lignina inicialmente contida no material.⁹⁵ O sistema reacional envolvido é do tipo multicomponente onde, além da enzima, é demandada a presença de íons Mn^{2+} , um ácido dicarboxílico, H_2O_2 em pequenas quantidades e uma fonte de um ácido graxo insaturado como o surfactante Tween 80, a fim de permitir a ocorrência de reações de peroxidação, conforme já discutido. Quando o Tween 80 foi substituído por ácidos graxos puros com 1, 2 ou 3 insaturações (ácidos oleico, linoleico e linolênico, respectivamente) a deslignificação foi ainda mais efetiva.⁹⁶ Trabalhos recentes têm buscado a otimização das condições de reação, além da procura por variáveis do processo industrial que poderiam afetar a eficiência do sistema enzimático baseado na MnP.⁹⁷

Dois trabalhos recentes exploraram, pela primeira vez, o uso de MnP recombinante no branqueamento de pastas celulósicas.^{91,93} Os tratamentos foram conduzidos com 30 UI (Unidades Internacionais) de MnP/g de polpa e a adição de H_2O_2 foi feita de forma pulsada por 30 s a cada 10 min de reação, durante as 24 h totais de tratamento conduzido à temperatura ambiente. Os dados obtidos mostraram grande capacidade deslignificante do sistema MnP/extração alcalina. Como exemplo, um tratamento sequencial em 3 etapas empregando o sistema MnP intercalado com extrações alcalinas proporcionou a remoção de 61% da lignina inicialmente contida na polpa não branqueada.⁹¹

Vários estudos têm explorado o uso de sistemas biomiméticos relacionados à reação de Fenton para a degradação de compostos xenobióticos.⁹⁸⁻¹⁰¹ Recentemente, foi publicada uma revisão abordando as aplicações do sistema Fenton mediado por compostos fenólicos.¹⁰² Na maioria dos casos, esses trabalhos têm avaliado o uso de Fe^{3+} (ou Fe^{2+}) e H_2O_2 na presença de catecol e/ou seus derivados como reagentes que permitem gerar radicais hidroxila via reação de Fenton de forma contínua e mais intensa, maximizando assim a eficiência do sistema degradativo.^{98,103} Um exemplo de sucesso dessa abordagem foi o uso do sistema ácido 3-hidroxi-antranílico/ Fe^{3+}/H_2O_2 , que proporcionou 80% de degradação do corante Azure B após 10 min de reação à temperatura ambiente.¹⁰¹

Além de explorar sistemas biomiméticos, algumas abordagens experimentais têm demonstrado que compostos xenobióticos podem ser degradados por filtrados de culturas ou mesmo durante cultivos de fungos causadores de podridão parda por reação de Fenton. Como exemplo, a degradação de pentacloro-fenol por íons ferro (Fe^{2+} ou Fe^{3+}) e H_2O_2 aumentou em 30% na presença de metabólitos extracelulares do fungo *G. trabeum*.²⁹ Kramer e colaboradores¹⁰⁴ estudaram a degradação de 2-fluór-fenol dependente de Fe^{2+} ou Fe^{3+} em culturas líquidas do fungo *Gloeophyllum striatum* e observaram a degradação completa do organo-fluorado após 5 dias de cultivo. Em culturas líquidas de *G. trabeum* e *Laetiporus sulphureus*, mais de 70% de tribromofenol adicionado inicialmente nos cultivos foram degradados após 15 dias de tratamento.¹⁰⁰

Além da vasta literatura demonstrando a aplicabilidade dos sistemas baseados na reação de Fenton para a degradação de compostos xenobióticos, a capacidade de metabólitos produzidos por fungos decompositores de madeira para reduzir Fe^{3+} também tem sido explorada para viabilizar a degradação de lignina via peroxidação de lipídeos. Recentemente foi demonstrado que a simples redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} induzida por metabólitos recuperados durante a biodegradação de madeira por *C. subvermispota* foi capaz de iniciar as reações de peroxidação de ácido linoleico.¹⁰⁵ A reação se deve essencialmente à formação de radicais hidroperoxila durante a reoxidação do Fe^{2+} gerado no sistema reacional. Esses radicais atuam como iniciadores da peroxidação de ácido linoleico, da mesma forma descrita para as reações iniciadas por MnP. Quando essa reação foi realizada na presença de um substrato lignocelulósico (madeira moída), parte da lignina contida no material inicial foi solubilizada. Essa fração solubilizada correspondeu a fragmentos de lignina de massa molar da ordem de 200 g/mol.¹⁰⁵ Por outro lado, reações similares iniciadas por MnP também solubilizaram quantidades expressivas de lignina.⁶⁰ A comparação dos sistemas enzimático (baseado na MnP) e biomiméticos (baseados na redução de Fe^{3+}) mostrou que as enzimas foram cerca de 10 vezes mais eficientes para degradar lignina, sugerindo que os sistemas biomiméticos destinados à degradação de lignina ainda demandam aprimoramentos para atingir eficiência compatível com a aplicação industrial, por exemplo, no branqueamento de polpas celulósicas.

CONCLUSÕES

O estudo da biodegradação de materiais lignocelulósicos é relevante por permitir entender o processo de podridão que ocorre na natureza, que é responsável por parte importante do reciclo de carbono. Além disso, o processo, quando conduzido de forma induzida e controlada, pode ser usado como pré-tratamento para desestruturação da parede celular vegetal e como auxiliar nos processos de polpação e branqueamento de pastas celulósicas. O entendimento dos mecanismos envolvidos no processo de biodegradação dos lignocelulósicos tem permitido ainda propor sistemas baseados na ação das enzimas isoladas ou em sistemas biomiméticos que já encontram aplicação industrial, como é o caso do uso de xilanases, no branqueamento de polpas e de celulasas na conversão enzimática de celulose, quer para processos de reciclagem de papel, quer para a hidrólise total visando produzir açúcares fermentescíveis. É importante enfatizar que os mecanismos apresentados e discutidos se referem aos fungos até agora identificados (cultiváveis em laboratório). Todavia, muito ainda resta por ser avaliado, visto que da diversidade total de organismos decompositores de materiais lignocelulósicos, somente uma pequena parte tem sido descrita e caracterizada.

AGRADECIMENTOS

Aos auxílios financeiros recebidos da FAPESP, CAPES e do CNPq.

REFERÊNCIAS

1. Akhtar, M.; Blanchette, R. A.; Myers, G.; Kirk, K. Em *Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry*; Young, R.; Akhtar, M., eds.; Wiley and Sons: New York, 1998, cap. 10.
2. Ferraz, A.; Guerra, A.; Mendonça, R.; Masarin, F.; Vicentim, M. P.; Aguiar, A.; Pavan, P. C.; *Enzyme Microb. Technol.* **2008**, *43*, 178.
3. Baldrian, P.; *Fungal Ecol.* **2008**, *1*, 4.
4. Wesenberg, D.; Kyriakides, I.; Agathos, S. N.; *Biotechnol. Adv.* **2003**, *22*, 161; Asgher, M.; Bhatti, H. N.; Ashraf, M.; Legge, R. L.; *Biodegradation* **2008**, *19*, 771.

5. Itoh, H.; Wada, M.; Honda, Y.; Kuwahara, M.; Watanabe, T.; *J. Biotechnol.* **2003**, *103*, 273; Kuhar, S.; Nair, L. M.; Chander, R.; *Can. J. Microbiol.* **2008**, *54*, 305.
6. Amirta, R.; Tanabe, T.; Watanabe, T.; Honda, Y.; Kuwahara, M.; Watanabe, T.; *J. Biotechnol.* **2006**, *123*, 71.
7. Villas-Bôas, S. G.; Esposito, E.; Mitchell, D. A.; *Anim. Feed Sci. Technol.* **2002**, *98*, 1.
8. Polizeli, M. L. T. M.; Rizzatti, A. C. S.; Monti, R.; Terenzi, H. F.; Jorge, J. A.; Amorim, D. S.; *Appl. Microb. Biotechnol.* **2005**, *67*, 577.
9. Call, H. P.; Mucke, I.; *J. Biotechnol.* **1997**, *53*, 163.
10. Widsten, P.; Kandelbauer, A.; *Enzyme Microb. Technol.* **2008**, *42*, 293.
11. Castro, A. M.; Pereira Jr., N.; *Quim. Nova* **2010**, *33*, 181.
12. Kuhad, R. C.; Singh, A.; Eriksson, K. E. L. Em *Biotechnology in the pulp and paper industry*; Eriksson, K. E. L. ed.; Springer-Verlag: Berlin, 1997, cap. 3.
13. Li, K. Em *Wood Deterioration and Preservation - Advances in our Changing World*; ACS Symp. Ser 845, Goodell, B.; Nicholas, D. D.; Schultz, T. P., eds.; American Chemical Society: Washington, 2003, cap. 11.
14. Ferraz, A. Em *Fungos, uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*; Esposito, E.; Azevedo, J. L., eds.; Educ: Caxias do Sul, 2004, cap. 6.
15. Carvalho, W.; Canilha, L.; Ferraz, A.; Milagres, A. M. F.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 2191.
16. Fengel, D.; Wegener, G.; *Wood Chemistry, Ultrastructure and Reactions*, 1^ª ed., Walter de Gruyter: Berlin, 1989.
17. Henriksson, G.; Lennholm, H. Em *Pulp and Paper Chemistry and Technology*; Ek, M.; Gellerstedt, G.; Henriksson, G., eds.; De Gruyter: Stoclm, 2009, vol. 1, cap. 4.
18. Henriksson, G. Em ref. 17, cap. 6.
19. Ralph, J.; Lundquist, K.; Brunow, G.; Lu, F.; Kim, H.; Schatz, P. F.; Marita, J. M.; Hatfield, R. D.; Ralph, S. A.; Christensen, J. H.; Boerjan, W.; *Phytochem. Rev.* **2004**, *3*, 298.
20. Kirk, T. K.; Cullen, D. Em ref. 1, cap. 9.
21. Henriksson, G.; Johansson, G.; Pettersson, G.; *J. Biotechnol.* **2000**, *78*, 93.
22. Hammel, K. E.; Cullen, D.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **2008**, *11*, 349.
23. Glenn, J. K.; Morgan, M. A.; Mayfield, M. B.; Kuwahara, M.; Gold, M. H.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, *114*, 1077; Tien, M.; Kirk, T. K.; *Science* **1983**, *221*, 661.
24. Kuwahara, M.; Glenn, J. K.; Morgan, M. A.; Gold, M. H.; *FEBS Lett.* **1984**, *169*, 247.
25. Martínez, D.; Larrondo, L. F.; Putnam, N.; Gelpke, M. D. S.; Huang, K.; Chapman, J.; Helfenbein, K. G.; Ramaiya, P.; Detter, J. C.; Larimer, F.; Coutinho, P. M.; Henrissat, B.; Berka, R.; Cullen, D.; Rokhsar, D.; *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 695.
26. Wymelenberg, A. V.; Minges, P.; Sabat, G.; Martinez, D.; Aerts, A.; Salamov, A.; Grigoriev, I.; Shapiro, H.; Putnam, N.; Belinky, P.; Dosoretz, C.; Gaskell, J.; Kersten, P.; Cullen, D.; *Fungal Genetics Biol.* **2006**, *43*, 343.
27. Wymelenberg, A. V.; Sabat, G.; Martinez, D.; Rajangam, A. S.; Teeri, T. T.; Gaskell, J.; Kersten, P. J.; Cullen, D.; *J. Biotechnol.* **2005**, *118*, 17.
28. Ravalason, H.; Jan, G.; Mollé, D.; Pasco, M.; Coutinho, P. M.; Lapiere, C.; Pollet, B.; Bertaud, F.; Petit-Conil, M.; Grisel, S.; Sigoillot, J.-C.; Asther, M.; Herpoël-Gimbert, I.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *80*, 719.
29. Goodell, B.; Jellison, J.; Liu, J.; Daniel, G.; Paszczynsky, A.; Fekete, F.; Krishnamurthy, S.; Jun, L.; Xu, G.; *J. Biotechnol.* **1997**, *53*, 133.
30. Machuca, A.; Ferraz, A.; *Enzyme Microb. Technol.* **2001**, *29*, 386.
31. Mester, T.; Tien, M.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *284*, 723.
32. Timofeevski, S. L.; Nie, G.; Reading, N. S.; Aust, S. D.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *256*, 500.
33. Mester, T.; Field, J. A.; *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 15412; Camarero, S.; Ibarra, D.; Martínez, A. T.; Romero, J.; Gutiérrez, A.; del Rio, J. C.; *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1264.
34. Kawai, S.; Nakagawa, M.; Ohashi, H.; *FEBS Lett.* **1999**, *446*, 355.
35. Srebotnik, E.; Boisson, J.; *Enzyme Microb. Technol.* **2005**, *36*, 785.
36. Kersten, P. J.; Kirk, T. K.; *J. Bacteriol.* **1987**, *169*, 2195.
37. De Jong, E.; Field, J.; De Bond, J.; *FEMS Microbiol. Rev.* **1994**, *13*, 153; Ander, P.; Marzullo, L.; *J. Biotechnol.* **1997**, *53*, 115.
38. Shimada, M.; Akamatsu, Y.; Tokimatsu, T.; Mii, K.; Hattori, T.; *J. Biotechnol.* **1997**, *53*, 103.
39. Urzúa, U.; Kersten, P. J.; Vicuña, R.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 68.
40. Nilsson, T. Em ref. 17, cap. 10.
41. Srebotnik, E.; Messner, K.; Foisner, R.; *Curr. Microbiol.* **1988**, *16*, 221.
42. Flounoy, D. S.; Paul, J. A.; Kirk, T. K.; Highley, T. K.; *Holzforchung* **1993**, *47*, 297.
43. Carpita, N.; Sabulase, D.; Montezinos, D.; Delmer, D. P.; *Science* **1979**, *205*, 1144.
44. Blanchette, R. A.; Krueger, E. W.; Haight, J. E.; Akhtar, M.; Akin, D. E.; *J. Biotechnol.* **1997**, *53*, 203.
45. Kersten, P. J.; Tien, M.; Kalyanaraman, B.; Kirk, T. K.; *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 2601.
46. Teunissen, P. J. M.; Field, J. A.; *FEBS Lett.* **1998**, *439*, 219.
47. Meyer-Pinson, V.; Ruel, K.; Gaudard, F.; Valtat, G.; Petit-Conil, M.; Kurek, B.; *C. R. Biologies* **2004**, *327*, 917.
48. Aguiar, A.; Souza-Cruz, P.; Ferraz, A.; *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *38*, 873.
49. Aguiar, A.; Ferraz, A.; *Int. Biodet. Biodegr.* **2008**, *61*, 182.
50. Hunt, C.; Kenealy, W.; Horn, E.; Houtman, C.; *Holzforchung* **2004**, *58*, 434.
51. Galkin, S.; Vares, T.; Kalsi, M.; Hatakka, A.; *Biotechnol. Tech.* **1998**, *12*, 267.
52. Hofrichter, M.; *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *30*, 454.
53. Moen, M. A.; Hammel, K. E.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 1956; Bogan, B. W.; Lamar, R. T.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 1597; Bogan, B. W.; Lamar, R. T.; Hammel, K. E.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 1788.
54. Southorn, P. A.; Powis, G.; *Mayo Clin. Proc.* **1988**, *63*, 381.
55. Kapich, A. N.; Jensen, K. A.; Hammel, K. E.; *FEBS Lett.* **1999**, *461*, 115.
56. Enoki, M.; Watanabe, T.; Nakagame, S.; Koller, K.; Messner, K.; Honda, Y.; Kuwahara, M.; *FEMS Microbiol. Lett.* **1999**, *180*, 205.
57. Watanabe, T.; Katayama, S.; Enoki, M.; Honda, Y.; Kuwahara, M.; *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 422.
58. Watanabe, T.; Shirai, N.; Okada, H.; Honda, Y.; Kuwahara, M.; *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 6114.
59. Aguiar, A.; Mendonça R.; Rodriguez J.; Ferraz, A.; *Int. Biodet. Biodegr.* **2010**, *64*, 588.
60. Cunha, G. G. S.; Masarin, F.; Norambuena, M.; Freer, J.; Ferraz, A.; *Enzyme Microb. Technol.* **2010**, *46*, 262.
61. Rochefort, D.; Leech, D.; Bourbonnais, R.; *Green Chem.* **2004**, *6*, 14.
62. Eggert, C.; Temp, U.; Dean, J. F. D.; Eriksson, K. E. L.; *FEBS Lett.* **1996**, *391*, 144.
63. Li, K.; Horanyi, P. S.; Collins, R.; Phillips, R. S.; Eriksson, K. E. L.; *Enzyme Microb. Technol.* **2001**, *28*, 301.
64. Leontievsky, A.; Myasoedova, N.; Pozdnyakova, N.; Golovleva, L.; *FEBS Lett.* **1997**, *413*, 446; Pozdnyakova, N. N.; Rodakiewicz-Nowak, J.; Turkovskaya, O. V.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, *30*, 19.
65. Martínez, A.; *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *30*, 425.
66. Kerem, Z.; Jensen, K. A.; Hammel, K. E.; *FEBS Lett.* **1999**, *446*, 49.
67. Hammel, K. E.; Kapich, A. N.; Jensen Jr., K. A.; Ryan, Z. C.; *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *30*, 445.
68. Neilands, J. B.; *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 26723.

69. Paszczynski, A.; Crawford, R.; Funk, D.; Goodell, B.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 674.
70. Jensen, K. A.; Ryan, Z. C.; Wymelenberg, A. V.; Cullen D.; Hammel, K. E.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 2699.
71. Ferraz, A.; Parra, C.; Freer, J.; Baeza, J.; Rodríguez, J.; *Int. Biodet. Biodegr.* **2001**, *47*, 203; Goodell, B.; Daniel, G.; Jellison, J.; Qian, Y. H.; *Holzforchung* **2006**, *60*, 630.
72. Enoki, A.; Tanaka, H.; Itakura, S. Em ref. 13, cap. 8.
73. Gutiérrez, A.; del Río, J. C.; Martínez-Íñigo, M. J.; Martínez, M. J.; Martínez, A. T.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 1344.
74. Enoki, M.; Honda, Y.; Kuwahara, M.; Watanabe, T.; *Chem. Phys. Lipids* **2002**, *120*, 9.
75. Amirta, R.; Fujimori, K.; Shirai, N.; Honda, Y.; Watanabe, T.; *Chem. Phys. Lipids* **2003**, *126*, 121.
76. Watanabe, T.; Teranishi, H.; Honda, Y.; Kuwahara, M.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *297*, 918.
77. Ferraz, A.; Mendonça, R.; Silva, F. T.; *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2000**, *75*, 18; Ferraz, A.; Baeza, J.; Rodríguez, J.; Freer, J.; *Bioresour. Technol.* **2000**, *74*, 201; Ferraz, A.; Rodríguez, J.; Freer, J.; Baeza, J.; *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *17*, 31.
78. Mendonça, R.; Guerra, A.; Ferraz, A.; *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2002**, *77*, 411.
79. Guerra, A.; Mendonça, R.; Ferraz, A.; *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, *33*, 12.
80. Sethuraman, A.; Akin, D. E.; Eriksson, K. E. L.; *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1998**, *27*, 37.
81. Rahmawati, N.; Ohashi, Y.; Watanabe, T.; Honda, Y.; Watanabe, T.; *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2851.
82. Hatakka, A. I.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1983**, *18*, 350.
83. Taniguchi, M.; Suzuki, H.; Watanabe, D.; Sakai, K.; Hoshino, K.; Tanaka, T.; *J Biosci. Bioeng.* **2005**, *100*, 637.
84. Keller, F. A.; Hamilton, J. E.; Nguyen, Q. A.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2003**, *105*, 27.
85. Zhang, X.; Xu, C.; Wang, H.; *J. Biosci. Bioeng.* **2007**, *104*, 149.
86. Lee, J.; *J. Biotechnol.* **1997**, *56*, 1.
87. Oliveira, L.G.; Mantovani, S. M.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 742.
88. Stork, G.; Pereira, H.; Wood, T. M.; Dusterhoft, E. M.; Toft, A.; Puls, J.; *Tappi J.* **1995**, *78*, 79; Bajpai, P. K.; *Bioresources* **2010**, *5*, 1311.
89. Camarero, S.; Ibarra, D.; Martínez, A. T.; Romero, J.; Gutiérrez, A.; del Río, J. C.; *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1264.
90. Hilden, K.; Hakala, T. K.; Lundell, T.; *Biotechnol. Lett.* **2009**, *31*, 1117.
91. Xu, H.; Scott, C. M.; Jiang, F.; Kelly, C.; *Holzforchung* **2010**, *64*, 137.
92. Ibarra, D.; Camarero, S.; Romero, J.; Martínez, M. J.; Martínez, A. T.; *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2006**, *81*, 1159.
93. Xu, H.; Scott, C. M.; Jiang, F.; Kelly, C.; *Holzforchung* **2010**, *64*, 145.
94. Jiang, F.; Kongsaree, P.; Charron, R.; Lajoie, C.; Xu, H.; Scott, G. M.; Kelly, C.; *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *99*, 540.
95. Kondo, R.; Kurashiki, K.; Sakai, K.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 921.
96. Bermek, H.; Li, K.; Eriksson, K. E. L.; *Bioresour. Technol.* **2002**, *85*, 249.
97. Feijoo, G.; Moreira, M. T.; Álvarez, P.; Lu-Chau, T. A.; Lema, J. M.; *J. Appl. Polym. Sci.* **2008**, *109*, 1319.
98. Rodríguez, J.; Contreras, D.; Parra, C.; Freer, J.; Baeza, J.; Durán N.; *Water Sci. Technol.* **1999**, *40*, 351; Rodríguez, J.; Parra, C.; Contreras, D.; Freer, J.; Baeza, J.; *Water Sci. Technol.* **2001**, *44*, 251.
99. Oviedo, C.; Contreras, D.; Freer, J.; Rodríguez, J.; *Fresenius Environ. Bull.* **2003**, *12*, 1323.
100. Monrroy, M.; Freer, J.; Baeza, J.; Rodríguez, J.; *Electronic J. Biotechnol.* **2006**, *9*, 253.
101. Aguiar, A.; Ferraz, A.; *Chemosphere* **2007**, *66*, 947.
102. Aguiar, A.; Ferraz, A.; Contreras, D.; Rodríguez, J.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 623.
103. Qian, Y.; Goodell, B.; Jellison, J.; Felix, C. C.; *J. Polym. Environ.* **2004**, *12*, 147.
104. Kramer, C.; Kreisel, G.; Fahr, K.; Kassbohrer, J.; Schlosser, D.; *Appl. Microb. Biotechnol.* **2004**, *64*, 387.
105. Horta, M. A.; Masarin, F.; Rodríguez, J.; Ferraz, A.; *Int. Biodet. Biodegr.* **2011**, *65*, 164.