

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

Este exemplar corresponde a  
revisão final de Tese defendida  
por o sr. Héctor Daniel Mansilla  
González e aprovada pela comissão  
fuerpadora.

25/8/86

Nelson Durán

ESTUDOS DA DEGRADAÇÃO FOTOQUÍMICA E  
ENZIMÁTICA DE LIGNINAS

Héctor Daniel Mansilla González

Tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Nelson Durán

Campinas

-1986-

UNICAMP

A Valentina e Paula

Mucho mas temprano  
que tarde  
de nuevo abrirán  
las grandes  
alamedas  
por donde pase  
el hombre libre....

S. A.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Nelson Durán pela orientação e dedicação dispensadas durante o decorrer deste trabalho.

A Profa. Dra. Adelaide Faljoni-Alário (IQ-USP), pelos espectros de Dicroísmo Circular.

Ao Prof. Dr. G. Cilento (IQ-USP) pelas facilidades na utilização do contador de fótons.

A Luciana C. C. Leite (IQ-USP) pelos espectros de RPE.

Ao Dr. David Hon pela acolhida no seu laboratório (Forest Prod. Lab., Virginia Polytechnic Institute, USA).

Ao Dr. K. Lunduist (Goteborg University, Sweden) pelas amostras de estilbeno.

Ao Carlão e Jean-Luc pela leitura crítica deste trabalho.

Aos meus Companheiros.

Ao Instituto de Química pelo apoio material.

Ao Instituto de Biologia pelos equipamentos.

A SUBIN/MRE, FAPESP, CAPES, OEA, CNPq, FINEP, PADCT e UNESCO pelo apoio financeiro.



RESUMO

ABSTRACT

ABREVIACES

## CAPÍTULO I

|                                                     |    |
|-----------------------------------------------------|----|
| I. INTRODUÇÃO                                       | 1  |
| I.1. GENERALIDADES                                  | 2  |
| I.3. CONCEITO DE BIOMASSA                           | 3  |
| I.3. MÉTODOS DE PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA          | 7  |
| I.4. LIGNINA: ESTRUTURA, APLICAÇÕES E BIODEGRADAÇÃO | 10 |
| I.5. DEGRADAÇÃO FOTOQUÍMICA DA LIGNINA              | 21 |
| I.6. OBJETIVOS                                      | 30 |

## CAPÍTULO II

|                                                 |    |
|-------------------------------------------------|----|
| II. PARTE EXPERIMENTAL                          | 31 |
| II.1. MATERIAIS                                 | 32 |
| II.1.1. Reagentes                               | 32 |
| II.1.2. Instrumentação                          | 34 |
| II.2. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES                   | 35 |
| II.2.1. Solução de Peroxidase (HRP)             | 35 |
| II.2.2. Soluções de DBAS e DPAS                 | 36 |
| II.2.3. Soluções de Lignina                     | 36 |
| II.3. MÉTODOS                                   | 37 |
| II.3.1. Purificação de Dioxano                  | 37 |
| II.3.2. Extração de Ligninas                    | 37 |
| II.3.3. Análise de Grupos Fenólicos em Ligninas | 39 |

|                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| II.3.4. Análise de Grupos Carbonila em Ligninas                                     | 40 |
| II.3.5. Cromatografia de Permeação em Gel                                           | 41 |
| II.3.6. Fotólise das Ligninas                                                       | 41 |
| II.3.7. Conteúdo Relativo de Grupos Carbonila na<br>LE Fotolisada (Reação com DNFH) | 41 |
| II.3.8. Calorimetria Diferencial de Varredura da LE                                 | 42 |
| II.3.9. Quimiluminescência da Lignina e Modelos em<br>Meio Básico                   | 43 |
| II.3.10. Quimiluminescência do Sistema Luminol/LE                                   | 44 |
| II.3.11. Quimiluminescência do Sistema HRP/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /LD        | 44 |
| II.3.12. Ciclo da Peroxidase                                                        | 44 |
| II.3.13. Detecção de Radicais Hidroxila                                             | 45 |
| II.3.14. Acetilação de Ligninas                                                     | 45 |
| II.4. CALCULOS                                                                      | 46 |
| II.4.1. Rendimento Quântico de Quimiluminescência                                   | 46 |
| II.4.2. Energia de Ativação                                                         | 47 |
| II.4.3. Cálculo da Fluência                                                         | 48 |

## CAPÍTULO III

|                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------|----|
| III. RESULTADOS E DISCUSSÃO                                  | 49 |
| III.1. CARACTERIZAÇÃO DAS LIGNINAS                           | 50 |
| III.2. ESTUDO FOTOQUÍMICO DAS LIGNINAS                       | 57 |
| III.2.1. Análise por Fluorescência                           | 57 |
| III.2.2. Variação da Absorbância, pH e Propriedades Térmicas | 61 |
| III.3. QUIMILUMINESCÊNCIA DA LIGNINA EM MEIO BASICO          | 65 |
| III.4. DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DAS LIGNINAS                    | 79 |

## CAPÍTULO IV

### IV. CONCLUSÕES

94

### APÊNDICE

97

### REFERÊNCIAS

99

Foram estudadas duas ligninas de diferentes fontes vegetais. Lignina de eucalipto extraída com ácido sulfúrico e lignina de casca de arroz extraída com dioxano. Sua composição em grupos hidroxila fenólicos e carbonilas foi estimada mediante espectrofotometria de UV. A distribuição porcentual aproximada dos diferentes tipos de prótons foi determinada por RMN- $^1\text{H}$ .

Neste estudo abordou-se a fotoquímica como método de pré-tratamento da lignina no intuito de modificar sua estrutura para permitir uma maior acessibilidade deste polímero a um posterior ataque químico ou enzimático.

Foi investigado o mecanismo de quimiluminescência da degradação alcalina da lignina, utilizando-se material irradiado com luz UV e sem irradiar.

A degradação enzimática da lignina irradiada e sem irradiar, foi realizada com a enzima peroxidase de rabanete (HRP). Foi proposto um mecanismo para a degradação da lignina por este sistema, utilizado como modelo da degradação fungal do polímero.

A faixa de fluência encontrada (entre 2000 e 4000  $\text{KJ/m}^2$ ) na qual a lignina perde sua propriedade antioxidante, foi determinada nos dois sistemas descritos.

## ABSTRACT

Two different lignins were studied. One extracted with sulfuric acid from eucalyptus wood and the other one from rice hulls with dioxane. Their relative composition in phenolic hydroxyl and carbonyl groups were estimated by UV spectrophotometry and the percentage of different protons presents in the polymer by  $^1\text{H-NMR}$ .

In order to modify the structure of lignin and to improve the accessibility of chemicals and enzymes, UV irradiation was used as lignin pretreatment.

Alkaline degradation mechanism of lignin, treated and untreated with UV irradiation, was investigated in relation to the chemiluminescence of this reaction.

Enzymatic degradation of lignin with horseradish peroxidase (HRP) was carried out in samples irradiated and unirradiated with UV lamp. A mechanism of this enzymatic system, a model for fungal lignin degradation, acting on lignin was proposed.

The fluence range (between 2000 to 4000  $\text{KJ/m}^2$ ) in which lignin lost this antioxidant property was determined in both chemical and enzymatic systems.

## ABREVIACÖES

|            |                                            |
|------------|--------------------------------------------|
| CD.....    | dicroísmo circular                         |
| DABCO..... | 1,4-diazobíclclo-(2,2,2)-octano            |
| DBAS.....  | 9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato de sódio |
| DMPO.....  | 5,5'-dimetil-1-pirrolina-N-óxido           |
| DNFH.....  | 2,4-dinitrofenilhidrazina                  |
| DPAS.....  | 9,10-difenilantraceno-2-sulfonato de sódio |
| DSC.....   | calorimetria diferencial de varredura      |
| GPC.....   | cromatografia de permeação em gel          |
| HRP.....   | peroxidase de rabanete                     |
| LD.....    | lignina de casca de arroz                  |
| LE.....    | lignina de eucalipto                       |
| RPE.....   | ressonância paramagnética eletrônica       |
| SOD.....   | superóxido dismutase                       |

## CAPÍTULO I

### INTRODUÇÃO

## INTRODUÇÃO

### 1.1. GENERALIDADES

Em decorrência do esgotamento gradativo das fontes fósseis de matérias primas, intensas pesquisas têm sido efetuadas na racionalização dos recursos disponíveis e no desenvolvimento de novas tecnologias que visem o aproveitamento de fontes alternativas, principalmente no que diz respeito às fontes renováveis.

A biomassa, fonte de recursos renováveis, não tem sido até o presente momento devidamente aproveitada. Em vista disso, é de vital importância a realização de estudos sistemáticos que possibilitem o desenvolvimento de processos economicamente viáveis na conversão da biomassa em produtos de interesse industrial.

Acredita-se que um método adequado de pré-tratamento do material vegetal nativo, levaria a uma diminuição dos custos envolvidos nos processos de aproveitamento. Neste estudo abordou-se a fotoquímica como ferramenta de pré-tratamento da biomassa, no intuito de modificar a estrutura da lignina (importante componente da biomassa vegetal) para permitir uma maior acessibilidade deste polímero frente a um posterior ataque químico ou enzimático. Outro aspecto estudado foi o modo de ação de um sistema enzimático modelo agindo sobre a lignina.

Para melhor entendimento do problema, serão introduzidos alguns conceitos básicos e resultados de pesquisas recentes na área.



## 1.2. CONCEITO DE BIOMASSA

Entende-se por biomassa materiais produzidos por biossíntese e aqueles provenientes de resíduos de procedência industrial, agrícola e doméstica.

Atualmente a produção mundial de biomassa foi estimada em  $25 \times 10^{11}$  ton/ano tendendo a aumentar no futuro (1). Devido à sua capacidade de renovação, ao contrário das fontes fósseis, acredita-se que a biomassa possa contribuir, no futuro, para o contínuo fornecimento de produtos com valor químico ou energético comparável aos obtidos na indústria petroquímica.

Cerca de 95 % da biomassa corresponde a componentes lignocelulósicos (2), que formam estruturas muito estáveis, resistentes a ataques de microorganismos e às variações de condições ambientais. Esse conjunto de propriedades físicas e químicas levaram, durante séculos, à utilização da madeira tanto como elemento de construção quanto como fonte de energia. Contudo, a partir de meados do século XIX, carvão e petróleo preencheram as funções da madeira. Na figura 1.1, o gráfico ilustra a importância relativa da biomassa num intervalo de 250 anos, destacando a perspectiva de utilização crescente da biomassa nas próximas décadas, em detrimento do uso de carvão e petróleo (projeção baseada no estágio tecnológico atual) (3). Este fato realça a necessidade da realização de estudos que promovam a utilização racional da biomassa.

Os materiais lignocelulósicos podem ser considerados como energia solar armazenada e constituem o produto biossintetizado mais abundante da terra. O potencial energético que encerram pode ser liberado por combustão direta ou por conversão em combustíveis orgânicos. No atual estágio de utilização da biomas-

sa mais de 7 % da energia consumida nos Estados Unidos provieram de fontes renováveis (4), ao passo que no Brasil a contribuição destas foi de 30 % (5). Por outro lado, pode-se obter a partir de material lignocelulósico, um grande número de substâncias de baixo peso molecular de interesse industrial e químico-farmacêutico (6-10). Tem-se observado também nos últimos anos um grande avanço nas pesquisas relacionadas à biomassa e sua ligação com a nutrição. É o caso da produção de proteínas unicelulares apropriadas para o enriquecimento das rações animais (11,12), tal processo tem-se mostrado economicamente viável (1). Na figura 1.2 apresenta-se um esquema que mostra a potencialidade da madeira como suprimento de matérias primas para a indústria (13).

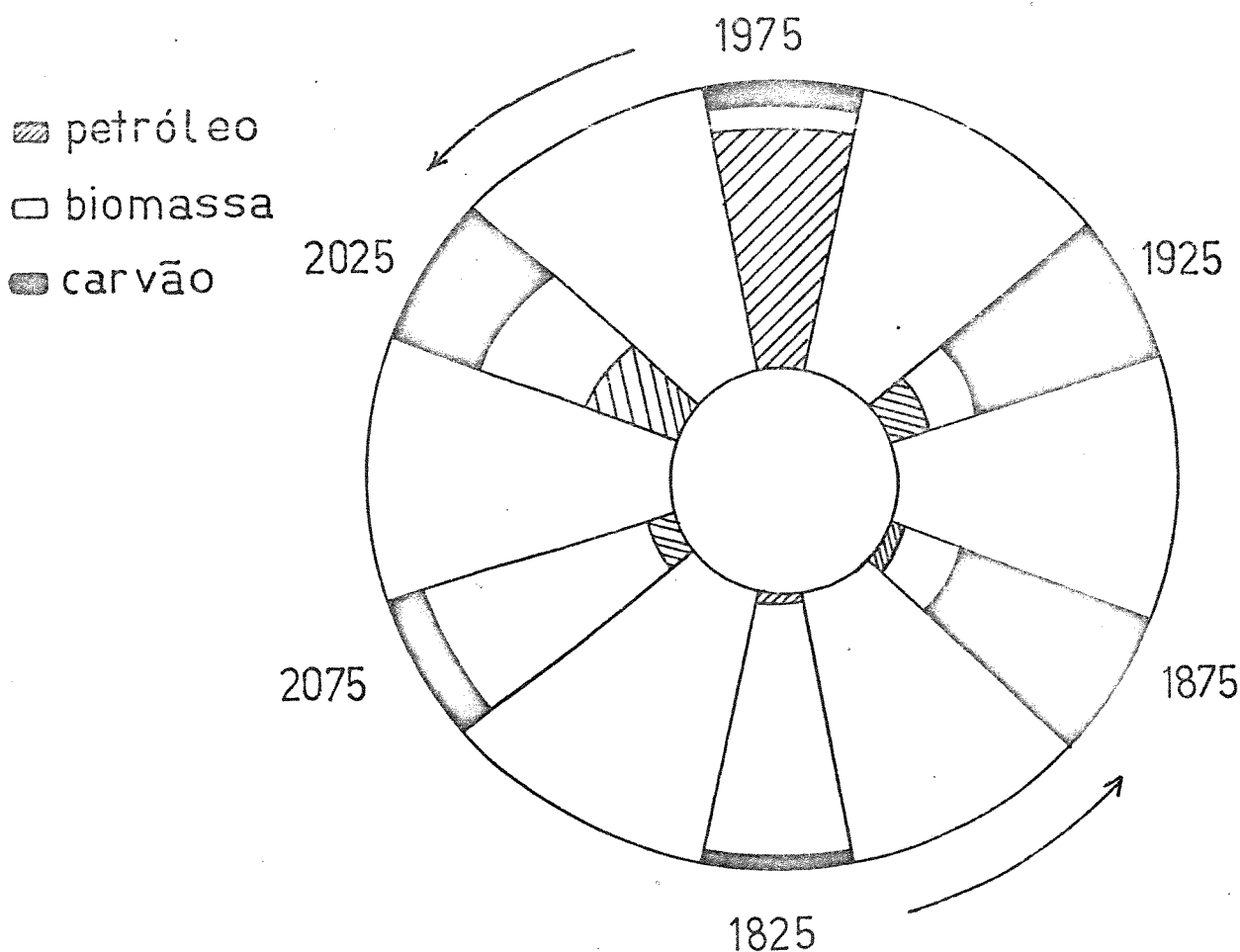


Figura 1.1. Importância relativa do petróleo, carvão e biomassa como fonte de matérias primas na indústria química.

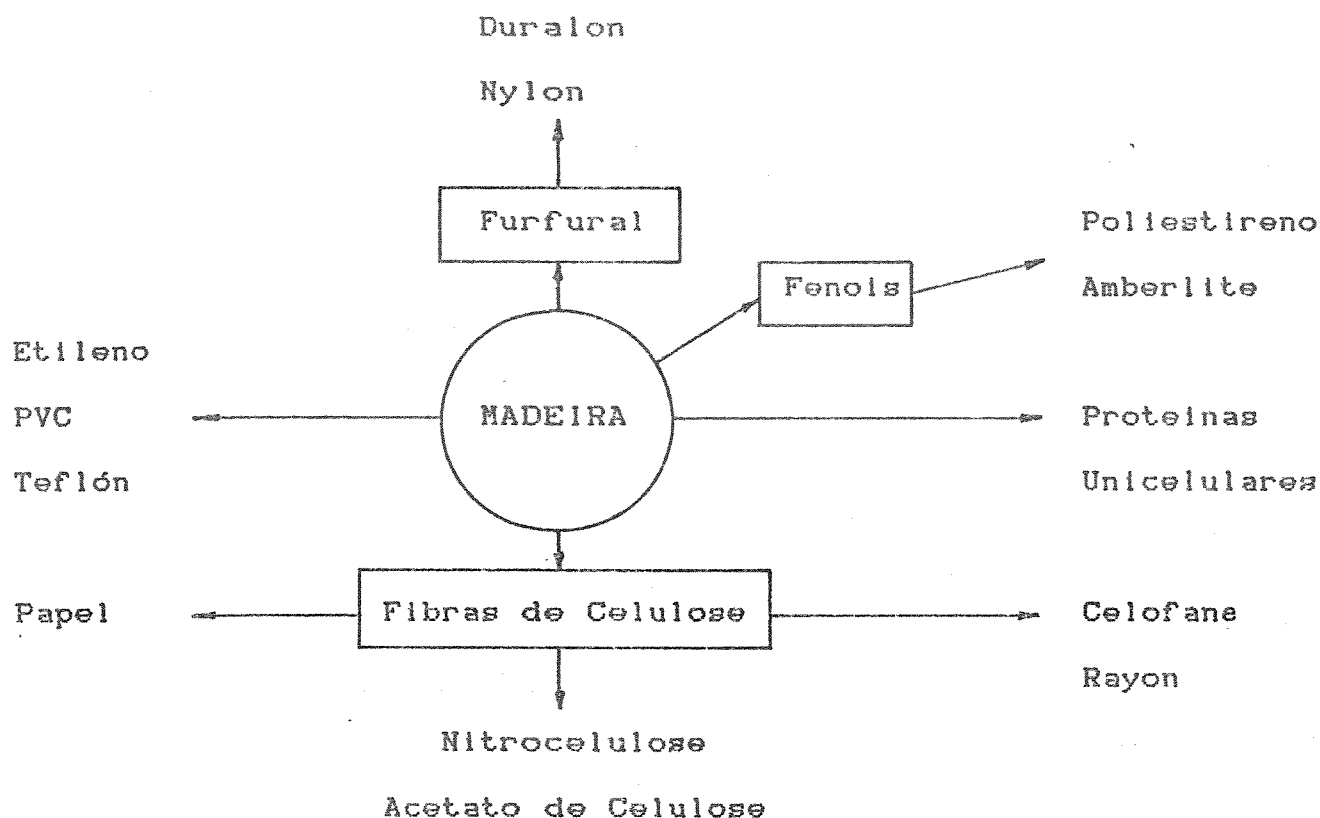


Figura 1.2. Possibilidades de uso integral da madeira (13).

A lignocelulose, componente estrutural da biomassa vegetal, é formada por três macromoléculas principais: celulose, hemicelulose e lignina, mostradas na figura 1.3. A celulose é um polímero formado por unidades de anidro-glicose unidas entre si por ligações glicosídicas  $\beta$ -D-1,4. As cadeias de celulose formam microfibrilas, por meio de ligações intermoleculares do tipo ponte de hidrogênio. Estas microfibrilas contêm sequências alternadas de fases amorfas e cristalinas (14). A hemicelulose é um polímero ramificado de polipentoses, cuja composição depende da fonte da qual é isolada. Atua como matriz para as microfibrilas de celulose e é constituída principalmente por unidades de D-xilose (15). A lignina é um polímero complexo, tridimensional, formado por unidades de fenilpropano. Sua composição varia de acordo com a fonte vegetal estudada (16).

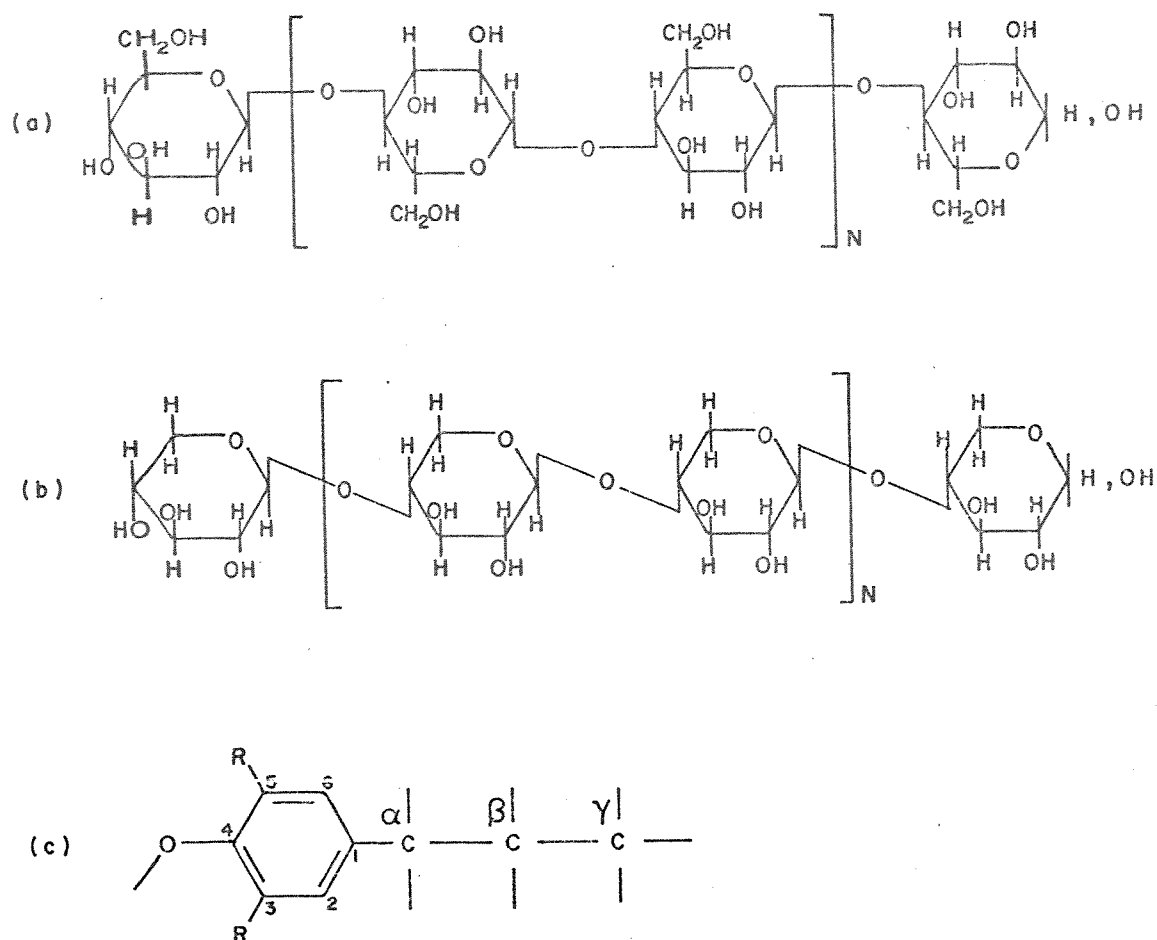


Figura 1.3. Componentes estruturais dos lignocelulósicos. (a) celulose (b) D-xilose e (c) unidade de fenilpropano.

O maior obstáculo encontrado no tratamento de resíduos lignocelulósicos é a presença da lignina, que unida à celulose e hemicelulose torna o material mais resistente aos processos de conversão, sejam estes químicos ou biológicos. Tal resistência faz com que seja necessário desenvolver técnicas de pré-tratamento do material lignocelulósico, no intuito de um aproveitamento mais completo dessa fonte de matérias primas (17).

### 1.3. MÉTODOS DE PRÉ-TRATAMENTO DA BIONASSA

A transformação direta dos materiais lignocelulósicos nativos é economicamente desfavorável do ponto de vista energético. A resistência do material é atribuída a três fatores determinantes (18): (a) a celulose possui uma estrutura altamente cristalina, (b) os sítios disponíveis para um ataque químico ou enzimático são limitados e (c) a lignina, que rodeia a celulose, forma uma barreira física altamente resistente. Assim, um pré-tratamento é um requisito essencial para aumentar a suscetibilidade dos resíduos lignocelulósicos ao ataque químico ou enzimático. Isto torna-se mais relevante se considerarmos que os processos de conversão atualmente utilizados requerem o emprego de ácidos diluídos a elevadas temperaturas ou então, de ácidos concentrados a baixas temperaturas, introduzindo dificuldades tecnológicas de alto custo energético (19). Em resumo, um pré-tratamento tem por objetivo a preparação do material lignocelulósico antes de que este seja submetido aos processos de conversão. Como exemplo, pode-se citar a transformação da biomassa em etanol, mostrada na figura 1.4, na qual a primeira etapa consiste num pré-tratamento que visa separar a lignina da celulose para o aproveitamento desta última na produção do álcool (20).

Os métodos de pré-tratamento podem ser classificados como: (a) físicos: moagem (21), radiação eletromagnética (22), etc., (b) químicos: hidrólise (23), delignificação por solventes (24), etc., (c) químico-físicos: explosão com vapor (25) e (d) biológicos: bactérias (26), fungos (27), etc.. Estes métodos podem ser utilizados individualmente ou combinados entre si.

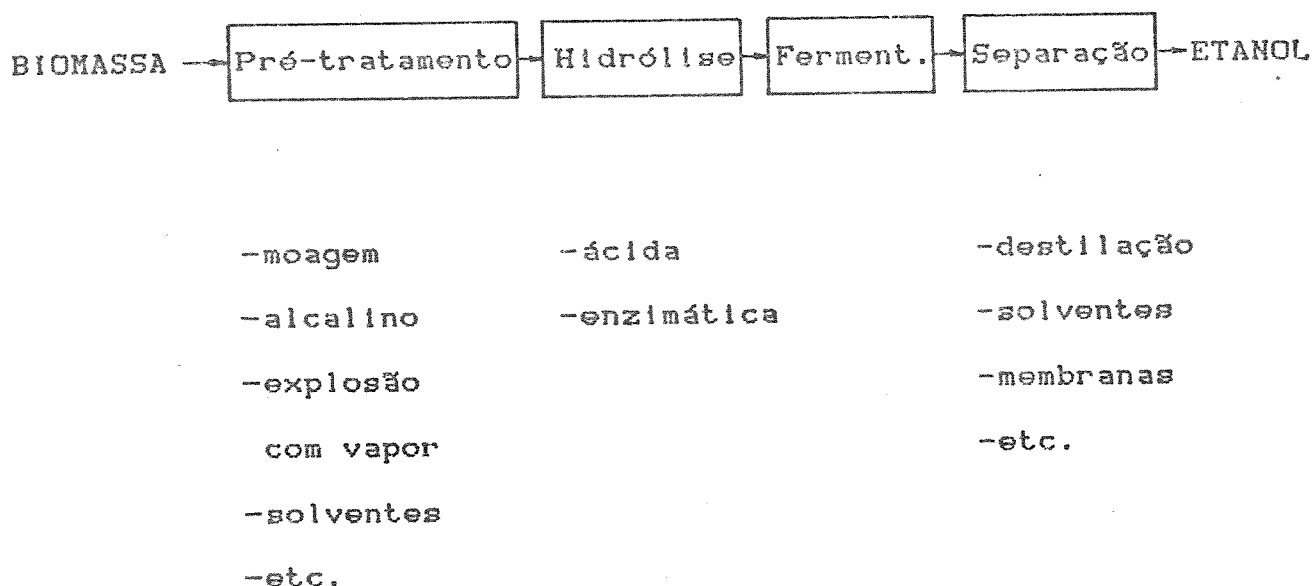


Figura 1.4. Conversão de biomassa em etanol.

A escolha de determinado pré-tratamento depende do objetivo a que se propõe. Por exemplo, a hidrólise ácida do material lignocelulósico e posterior delignificação por solventes objetiva a separação completa da lignina dos carboidratos. Outros, como tratamento com bases, seguida de moagem, pretendem uma separação parcial da lignina e carboidratos. Se por sua vez, o interesse é um processo de bioconversão, os polissacarídeos produzidos podem ser utilizados pelos microorganismos e, portanto, não se faz necessária uma separação completa (28).

Outro fator relevante a considerar é o consumo energético do pré-tratamento, que depende da severidade do processo. Isto, somado às dificuldades de separação de produtos, faz com que alguns destes pré-tratamentos sejam energeticamente in-

convenientes.

A atual tecnologia da biomassa está principalmente concentrada na depolimerização dos carboidratos, gerando assim grandes quantidades de lignina que não são devidamente aproveitadas. O potencial que representam estas ligninas pode contribuir à criação de novos processos e tecnologias para o aproveitamento integral dos materiais lignocelulósicos (29).

#### 1.4. LIGNINA: ESTRUTURA, APLICAÇÕES E BIODEGRADAÇÃO

A assimilação fotossintética do dióxido de carbono pelas plantas conduz à formação de carboidratos. Estes são metabolizados e convertidos em fenilalanina e tirosina, precursores dos álcoois cinâmicos (Figura 1.5). Os álcoois, por polimerização enzimática oxidativa, geram a lignina com uma composição que dependerá da relação entre os aminoácidos precursores (30,31).

A lignina é responsável por uma série de funções essenciais para a vida vegetal. Por exemplo, é o material ligante entre as paredes celulares e fibras da celulose, conferindo assim às plantas resistência às tensões mecânicas, químicas ou biológicas. Tem também como função o transporte de água e nutrientes e desempenha um papel significativo no ciclo do carbono na natureza (32,33).

As unidades de oxifenil propano, que compõem a lignina, estão unidas entre si por ligações etéreas e carbono-carbono, formando uma estrutura tridimensional. A proporção relativa dos três álcoois cinâmicos precursores (Figura 1.5), incorporados na estrutura da lignina, varia de acordo com a espécie da planta e a localização dos mesmos dentro das paredes celulares da planta (34). Fatores ecológicos tais como a idade da madeira, clima, quantidade de luz solar, etc., afetam igualmente a estrutura química da lignina.

A maior dificuldade encontrada no estudo da lignina deriva da impossibilidade prática de extraí-la do material lignocelulósico sem alterar sua estrutura (35). Tanto as quebras de ligações como mudanças no conteúdo de grupos funcionais são consequência das reações que ocorrem durante a separação da lignina dos tecidos vegetais.



a)  $R_1 = R_2 = H$

b)  $R_1 = OCH_3, R_2 = H$

c)  $R_1 = R_2 = OCH_3$

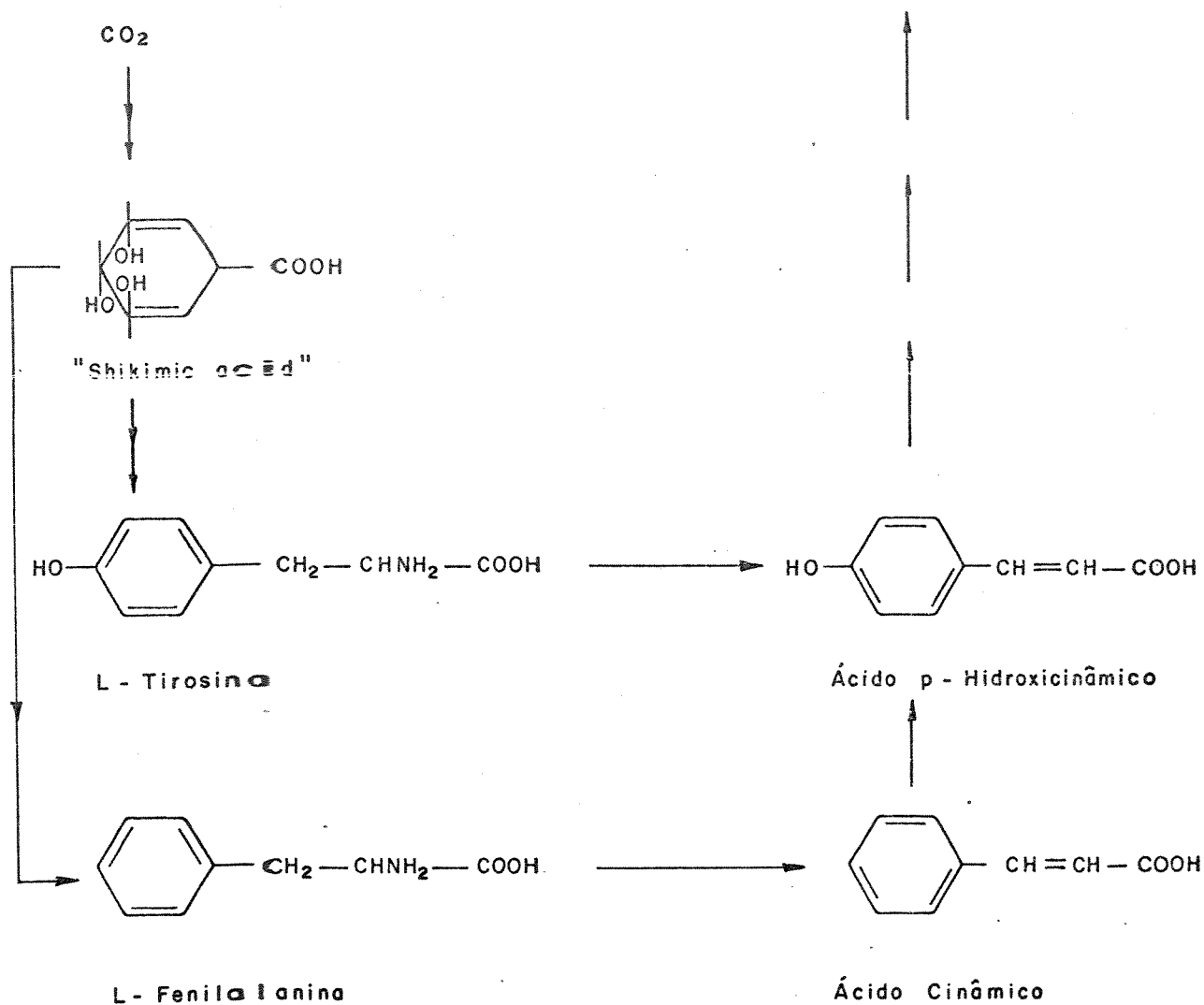
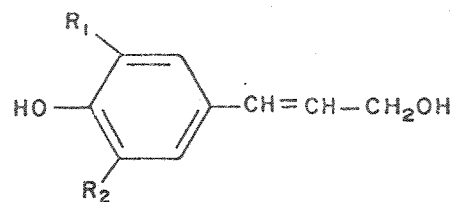


Figura 1.5. Biossíntese dos álcoois cinâmicos precursores da lignina: (a) cumarílico, (b) coniferílico e (c) sinapílico.

Vários métodos ou combinações de métodos têm sido utilizados para elucidar a estrutura da lignina. Estes incluem desde técnicas espectroscópicas convencionais (36-38) até fotoacústica (39) ou métodos de simulação computacional (40). Embora a estrutura da lignina ainda não seja conhecida de forma exata e definitiva, algumas fórmulas aproximadas têm sido propostas (41-42). Na figura 1.6, apresenta-se uma estrutura que representa uma parte de lignina de fava proposta por Nimz (43).

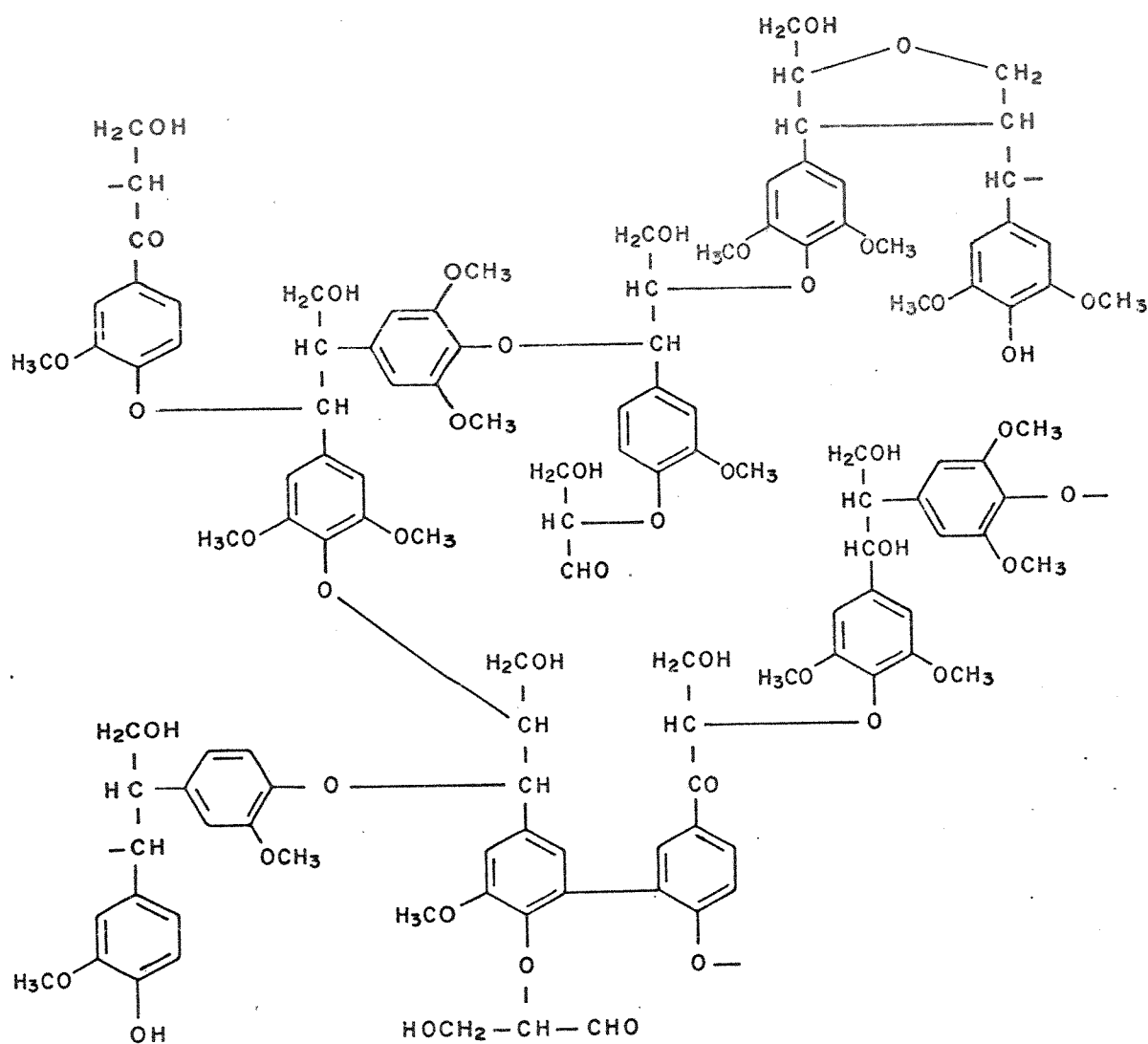


Figura 1.6. Fórmula aproximada da lignina de fava (43).

As sub-unidades mais representativas correspondem às estruturas  $\beta$ -O-4 (éter  $\beta$ -arílico, 55 %),  $\alpha$ -O-4 (éter  $\alpha$ -arílico, 7 %) e  $\beta$ -1 (1,2-diarilpropano, 7 %) (42,44,45). Entre os grupos funcionais predominantes encontram-se as metoxilas, hidroxilas (fenólicas e alifáticas) e também duplas ligações e carbonilas em posição  $\alpha$  ou  $\beta$  ao anel aromático (46).

Como se observa na figura 1.6, não existem cadeias de unidades repetitivas nem ligações facilmente hidrolisáveis. A molécula é globular e opticamente inativa apesar da presença de átomos de carbono assimétricos. O polímero é insolúvel em água e tem peso molecular variável. Nas plantas, a lignina encontra-se ligada covalentemente à celulose e hemicelulose, por ligações tipo éster, formando o complexo lignina-carboidrato (LCC) (47). Além disso ocorrem ligações covalentes entre a lignina e proteínas vegetais (48).

O caráter fenólico das ligninas e seu baixo custo de produção (p.e. sulfonatos de lignina provenientes do polpamento), tem levado à criação de processos economicamente vantajosos que envolvem ou depolimerização gradativa à compostos de baixo peso molecular, ou então, conversão da lignina numa grande variedade de polímeros (29).

Uma das aplicações mais diretas da lignina é como combustível devido a seu alto poder calorífico (7.1 Kcal/g) (2). Também é utilizada comercialmente como aditivo na fabricação de cartões (49), pneus (50), na fabricação de plásticos termoestáveis (51), resinas formo-fenólicas (52), corantes (53), fotoestabilizantes (54), como aditivo de cimentos na construção de estradas (55), e ainda na fabricação de inúmeros produtos de baixo peso molecular de utilidade industrial e farmacêutica (56).

Nos últimos anos, o reconhecimento do valor da lignina como possível fonte alternativa e renovável de matérias primas tem também intensificado as pesquisas relativas ao aproveitamento dos sistemas bio-lignolíticos. As possibilidades dos sistemas microbiais que degradam lignina incluem o polpeamento da madeira, branqueamento de polpas, aumento da digestibilidade e do valor proteico da ração animal, tratamento de rios poluídos com lignina, bioconversão em produtos de interesse industrial, etc. (57-59).

O sistema bioquímico que degrada lignina é oxidativo (60,61), não específico (62) e extracelular (63). Em 1980, Hall (64) sugeriu que a degradação fungal da lignina ocorre através de espécies ativadas de oxigênio, que incluem formas reduzidas e eletronicamente excitadas. Esta sugestão foi acolhida por muitos investigadores pois explicava, em parte, o caráter inespecífico, oxidativo e extracelular da biodegradação. Inicialmente foi proposto oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) como espécie ativa na degradação fungal (65). Contudo, trabalhos posteriores (66,67) refutaram-no como possível agente de degradação ligninolítico. Amer e Drew (68) detectaram o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) extracelular em culturas de Corillius versicolor e finalmente, Forney e col. (69) e Kutsuki e Gold (70) apresentaram evidências do envolvimento de radicais hidroxila ( $OH\cdot$ ) na degradação de lignina por Phanerochaete chrysosporium. Acreditava-se que estas espécies eram produzidas a partir de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), substância anteriormente detectada no meio fungal (71). Foi demonstrado também por Bar-Lev e Kirk (72) que o incremento da concentração de oxigênio na reação de biodegradação, causava uma elevação na produção de peróxido de hidrogênio e, paralelamente um aumento na velocidade de degradação.

Um dos argumentos experimentais utilizados pelos autores para explicar a presença destas espécies está baseado na sua detecção direta em culturas ligninolíticas, com resultados nem sempre conclusivos, e na inibição da degradação da lignina com a adição de agentes supressores específicos para cada espécie envolvida. Uma forma de estudar os sistemas ligninolíticos é mediante a utilização de compostos modelos relacionados à lignina, permitindo dessa maneira um meio de reação menos complexo. Uma outra forma é a identificação dos metabólitos produzidos no meio de cultura. Entre os produtos do metabolismo fungal foram identificados ácidos carboxílicos (73), álcoois (74) e outros que levam finalmente à formação de dióxido de carbono como produto final (75), através de mecanismos do tipo mostrado na figura 1.7.

O fungo Phanerochaete chrysosporium, conhecido como sendo o de maior atividade ligninolítica, tem a propriedade de produzir enzimas extracelulares que degradam eficazmente a lignina. Em 1983, Tien e Kirk (76) e Gold e col. (77) isolaram do fungo, pela primeira vez, uma hemoproteína denominada ligninase, que apresenta a capacidade de transformar lignina em dióxido de carbono, na presença de peróxido de hidrogênio. A enzima purificada por Kirk apresentou peso molecular de 42.000, não exibindo seletividade estérica.

Muitas reações complexas ocorrem durante a degradação da lignina pelo fungo, ou pela enzima isolada. Estas incluem: (a) quebra de ligações  $\beta$ -O-4, (b) quebra de ligações  $C\alpha$ - $C\beta$ , (c) quebra oxidativa de anéis aromáticos, (d) desmetilações, e inúmeras outras transformações oxidativas.

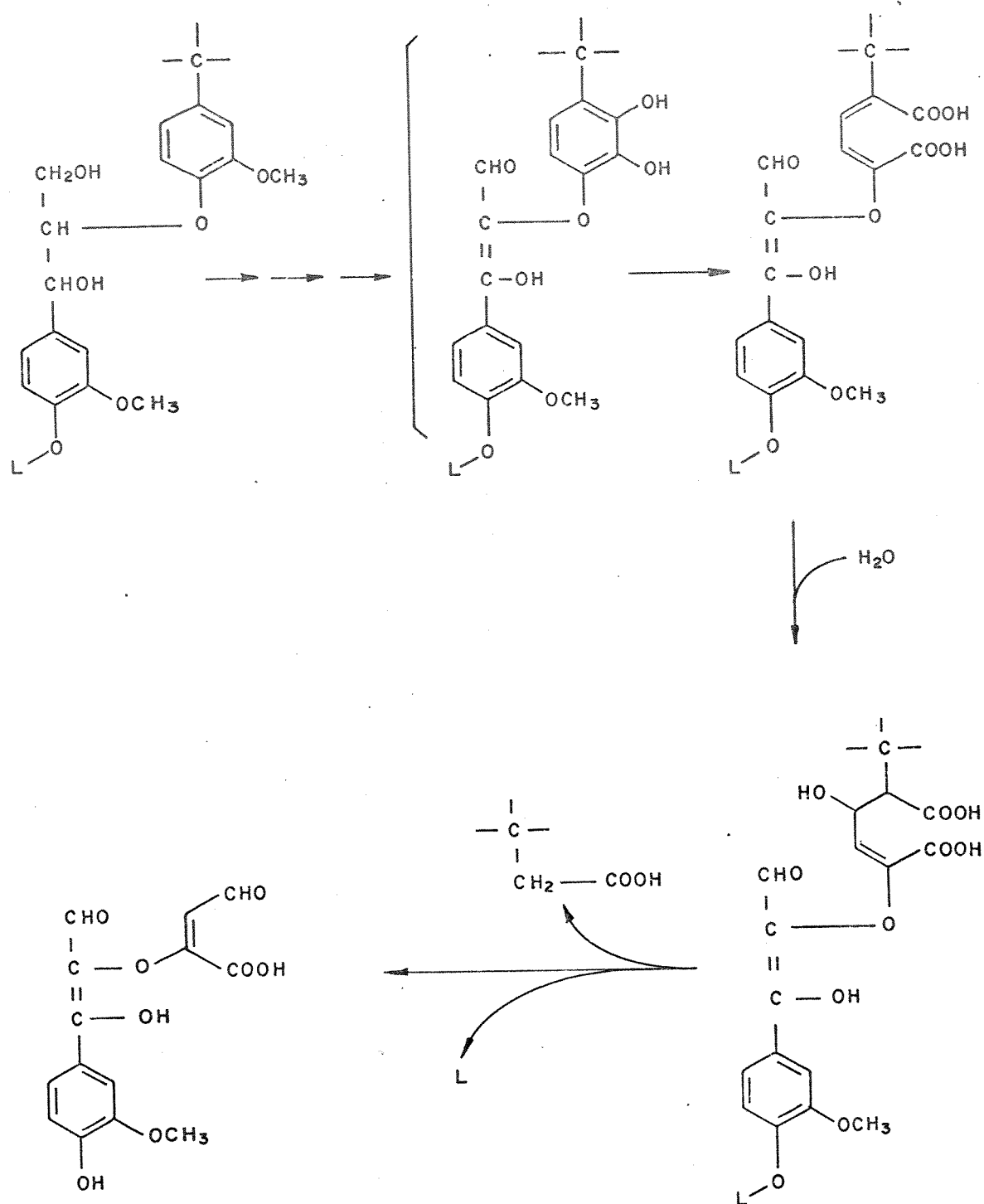


Figura I.7. Mecanismo hipotético de formação de metabólitos de lignina em culturas de *P. chrysosporium* (73).

Durante os últimos anos, as pesquisas têm-se centralizado no mecanismo de ação da ligninase sobre a lignina e compostos relacionados (78-80). Um esquema baseado em evidências experimentais, que indica os produtos da reação da ligninase atuando sobre os modelos de tipo  $\beta$ -1 e  $\beta$ -Q-4, é mostrado na figura 1.8. Observa-se que em ambos casos há quebra da ligação  $C_{\alpha}$ - $C_{\beta}$ , com a incorporação do oxigênio no carbono  $\beta$  (81).

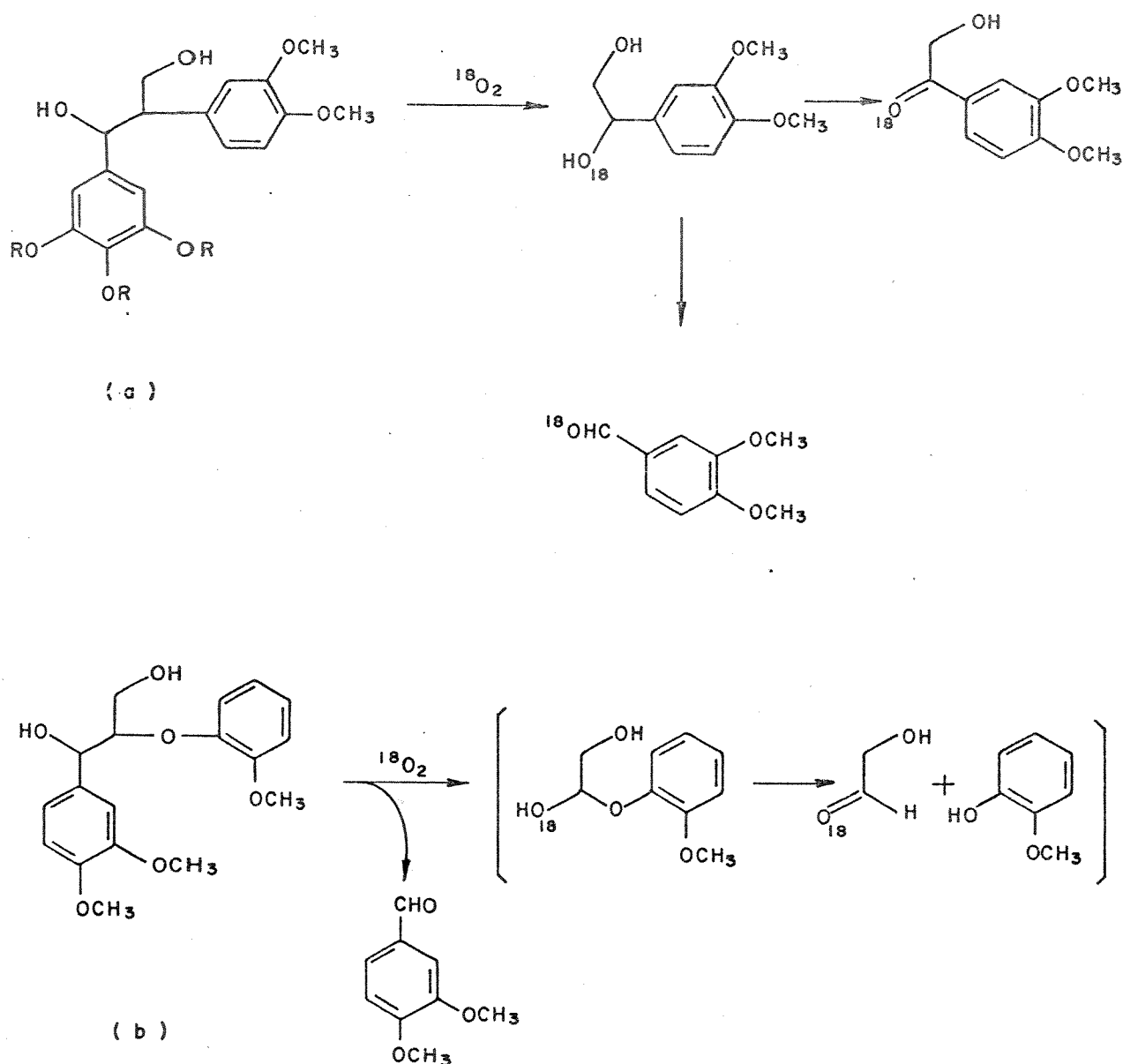


Figura 1.8. Reação dos modelos de lignina em presença de ligninase: (a) modelo  $\beta$ -1 e (b) modelo  $\beta$ -Q-4 (81).

Estudos recentes com ressonância paramagnética eletrônica (RPE), demonstraram que a oxidação de dimetoxibenzenos por ligninase ocorre com a formação de radicais cátion-aromáticos (82). Segundo os mecanismos atualmente propostos (83,84), a reação ocorre numa primeira etapa com a formação de um complexo de tipo oxi-ferrilo (Figura 1.9, (85)), formado pelo grupo porfirínico da proteína (grupo heme) e peróxido de hidrogênio (produzido pelo fungo). Este complexo seria capaz de oxidar a lignina por um mecanismo de transferência de um elétron, gerando um radical cátion-aromático no polímero de lignina. Este mecanismo é mostrado na figura 1.10 (86).

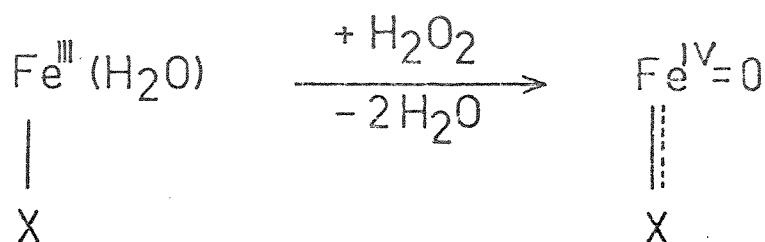


Figura 1.9. Complexo oxi-ferrilo (85).

Outra prova adicional ao mecanismo de degradação, via complexo oxi-ferrilo e radical cátion, consiste na simulação do grupo heme da proteína por sistemas modelos, tais como tetrametilporfirinato-Fe (III) (87) ou fenantrolina-Fe (III) (83). Os resultados destas pesquisas sugerem que o aspecto central no mecanismo de biodegradação de lignina é a criação de um centro oxi-ferrilo de alto potencial de oxido-redução (86). Uma vez formado o radical cátion, por remoção de um elétron do anel aromático, este pode reagir com oxigênio molecular explicando assim os produtos de reação observados em publicações anteriores (ver Figura 1.8).



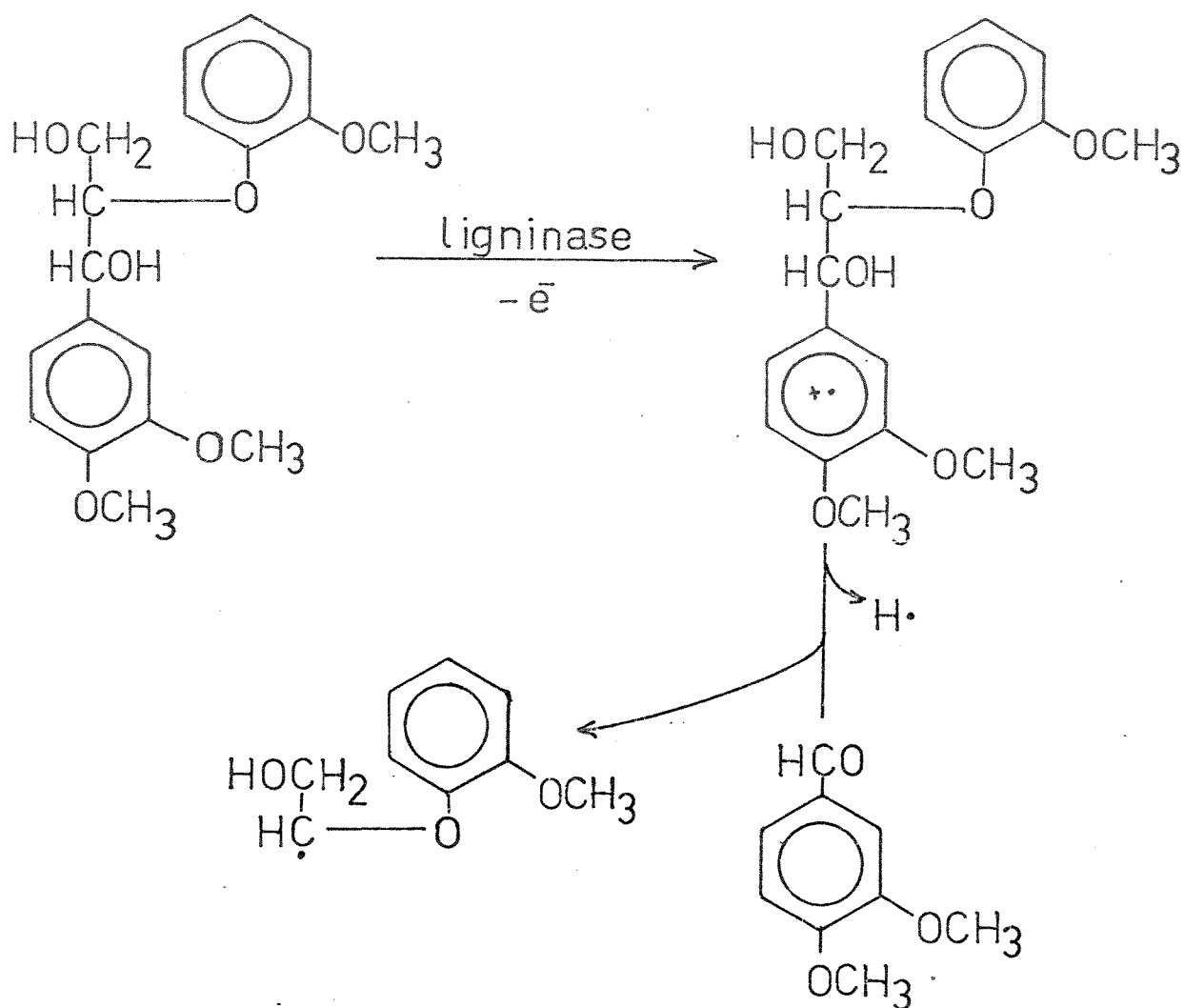


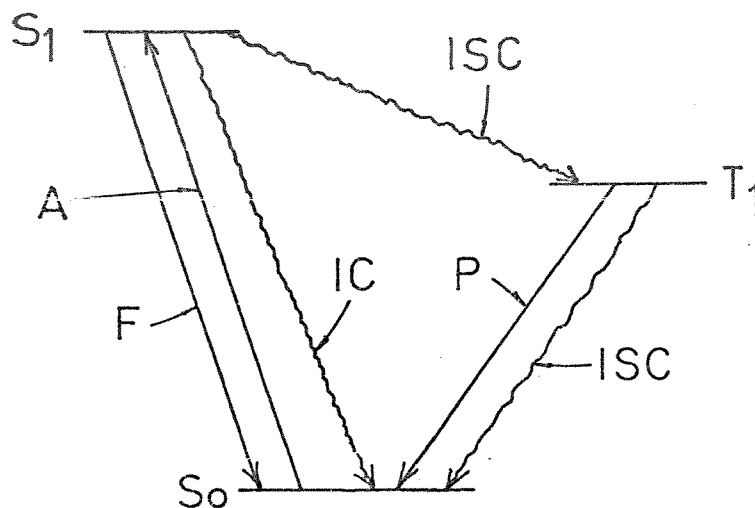
Figura I.10. Mecanismo de decomposição enzimática proposto para o modelo de tipo  $\beta$ -O-4.

A habilidade de degradação de um microorganismo para um determinado substrato, depende da capacidade do sistema enzimático e da estrutura do substrato. Muitos compostos orgânicos, sob condições apropriadas, podem ser metabolizados por um ou mais microorganismos. No entanto, há certos tipos de moléculas que são extremamente resistentes ao ataque microbial; este é o caso da lignina. Na busca de melhores condições para sua biodegradação, a lignina tem sido submetida a pré-tratamentos com o objetivo de modificar sua estrutura e otimizar sua decomposição. A fotoquímica já foi utilizada, com êxito, como ferramenta para aumentar a suscetibilidade de sulfonato de lignina frente à bactéria Pseudomonas putida (88).

### 1.5. DEGRADAÇÃO FOTOQUÍMICA DA LIGNINA

Em essência, uma reação fotoquímica é iniciada por um processo de absorção de radiação eletromagnética pelo sistema em estudo. A energia de ativação que leva a molécula a um estado eletronicamente excitado pode ser dissipada por emissão de energia, processos não radiativos ou reações fotoquímicas.

Na ausência de reações fotoquímicas e de supressão bimolecular a molécula excitada pode-se desativar. Isto está representado pelas etapas mostradas na figura 1.11 (89).



|                                                     |                                |
|-----------------------------------------------------|--------------------------------|
| $h\nu + S_0 \longrightarrow S_1$                    | excitação (A)                  |
| $S_1 \xrightarrow{\text{~~~~~}} S_0 + \text{calor}$ | conversão interna (IC)         |
| $S_1 \xrightarrow{\text{~~~~~}} T_1 + \text{calor}$ | cruzamento intersistemas (ISC) |
| $T_1 \xrightarrow{\text{~~~~~}} S_0 + \text{calor}$ | cruzamento intersistemas (ISC) |
| $T_1 \longrightarrow S_0 + h\nu$                    | fosforescência (P)             |
| $S_1 \longrightarrow S_0 + h\nu$                    | fluorescência (F)              |

Figura 1.11. Diagrama de energia de uma molécula excitada e os processos envolvidos.

Em geral, as moléculas orgânicas contêm um número par de elétrons os quais estão emparelhados no estado fundamental, ou seja, há  $n$  elétrons em  $n/2$  orbitais (90). Neste estado, conhecido como estado singlete ( $S_0$ ), as moléculas não apresentam momento angular de spin. Quando a luz é absorvida, um elétron é promovido a um orbital vazio de maior energia ( $S_n$ ) originando um estado com orbitais eletronicamente desemparelhados; isto é, há um elétron em cada orbital e estes possuem spins antiparalelos (Figura 1.12). O novo estado produzido neste processo ( $S_0 \rightarrow S_n$ ) é conhecido como singlete excitado. A partir deste, pode-se gerar por inversão do spin o estado triplete ( $T_n$ ) com os dois elétrons com spins paralelos em diferentes orbitais.

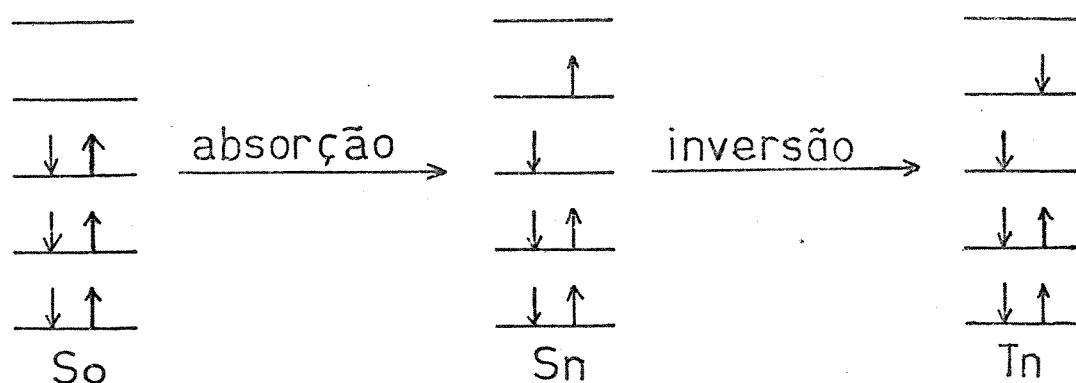


Figura 1.12. Formação dos estados excitados Singlete e Triplete.

As leis fundamentais que governam as reações fotoquímicas são a de Grotthus-Draper e a de Stark-Einstein. A primeira estabelece que as alterações químicas num sistema ocorrem somente após a absorção de radiação eletromagnética. A segunda lei, estabelece que cada molécula que participa de uma reação química induzida por luz, absorve um quantum de radiação.

As reações fotoquímicas envolvem um ou mais processos primários. Considera-se, como um processo primário, a absorção de um quantum de radiação pela molécula com a subsequente formação de um estado excitado (92). Um processo primário também inclui as reações da molécula enquanto permanece no estado excitado. Um processo secundário envolve a formação de produtos no estado fundamental e pode ocorrer por diferentes vias, tais como reações radicalares, adições, substituições, transferência de energia, etc. (93).

A utilização de processos fotoquímicos para a decomposição de compostos orgânicos tem sido extensivamente estudada. A fotoquímica, por exemplo, foi empregada na remoção de matérias orgânicas de águas poluídas (94). Também, pesticidas (95) e polímeros sintéticos têm sido degradados por estes processos (96). Os estudos realizados com este tipo de polímeros demonstraram que o mecanismo fotolítico é de natureza oxidativa e ocorre principalmente através de radicais livres.

Apesar da lignina ser consideravelmente mais complexa que os polímeros sintéticos, o mecanismo da reação fotoquímica é essencialmente similar. Inicialmente, a absorção de luz provoca a excitação da molécula de lignina. A energia de excitação pode ser dissipada ou empregada numa reação fotoquímica. As reações envolvem intermediários radicalares que levam a uma série de mecanismos fotoquímicos de decomposição, substituição e polimerização.

Quando a madeira é exposta à luz, o primeiro efeito observável é uma alteração na coloração. Uma comparação das propriedades de absorção entre lignina e celulose, indicam que os grupos cromóforos presentes nas ligninas são os responsáveis pelas mudanças da cor (97). Leary (98), reportou que o escurecimen-

to da madeira quando exposta à luz, é devido à absorção, pela lignina, de radiação eletromagnética na faixa de 330-400 nm. Paralelamente observou uma diminuição no conteúdo de grupos metoxila na lignina irradiada. Posteriormente (99,100), num estudo de fotodegradação da lignina em diferentes atmosferas e com a proteção dos grupos fenólicos livres, demonstrou-se que : (a) a reação não ocorre na ausência de oxigênio, (b) a reação é iniciada com a remoção de hidrogênio dos grupos fenólicos da lignina e (c) os produtos da reação fotoquímica são principalmente quinonas. Com base nestes fatos, foi proposto um mecanismo (Figura 1.13) que envolve a absorção de luz por um cromóforo (A) de natureza desconhecida, gerando uma molécula eletronicamente excitada a qual remove um hidrogênio fenólico.

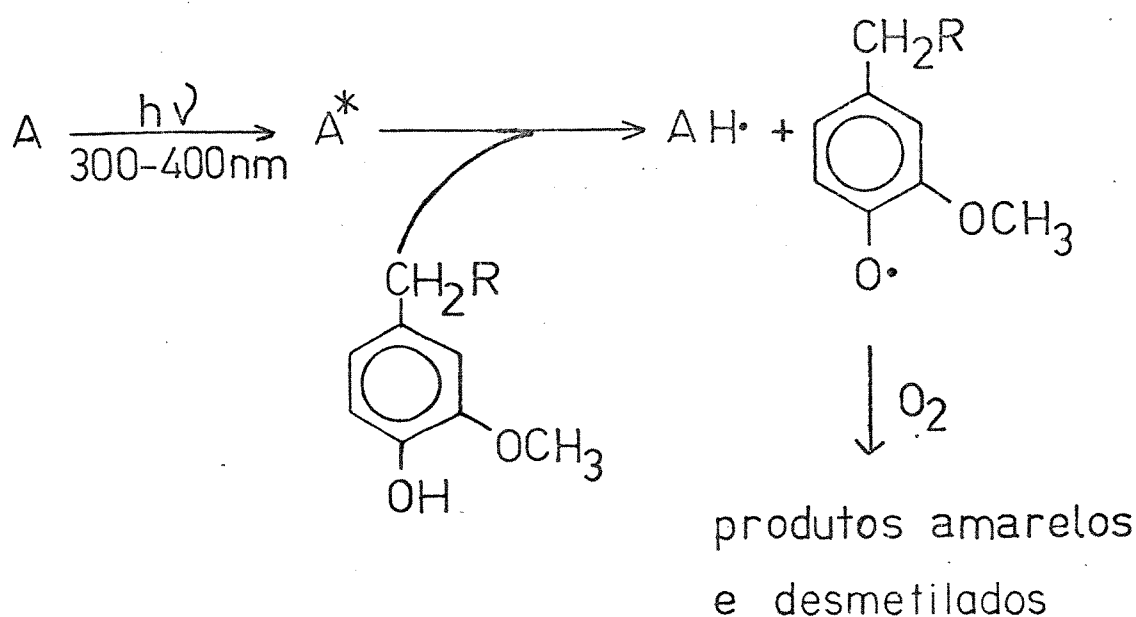


Figura 1.13. Mecanismo Inicial de fotodegradação da lignina.

Outra teoria, proposta por Kringstad (101) para explicar a formação de quinonas, supõe uma oxidação fotoinduzida com a formação de radicais na primeira etapa da reação (Figura 1.14). A formação de radicais livres no curso da fotólise da lignina foi relatada por Kalnins e col. (102), mediante estudos de RPE em atmosfera inerte. Em presença de oxigênio, estes radicais não são observáveis, indicando a possibilidade de uma outra reação mostrada na figura 1.14.

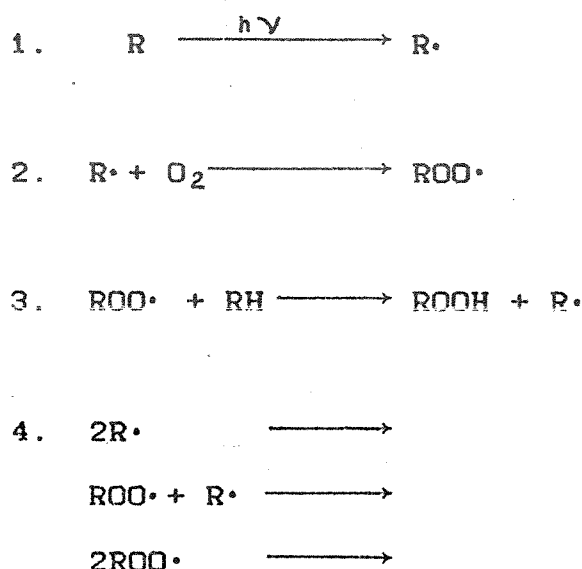


Figura 1.14. Reação iniciada por radicais livres induzidos por luz.

Em trabalhos posteriores Lin e Kringstad (103,104) estudaram os grupos fotossensíveis da lignina e compostos modelos relacionados, encontrando que os grupos  $\alpha$ -carbonila, duplas ligações conjugadas e bifenilas são os responsáveis pela absorção de luz na faixa de 300 a 400 nm. Destes, as carbonilas conjugadas ao anel aromático apresentam-se como os cromóforos mais efetivos para dar início à fotodegradação.

Confirmada a formação de radicais fenoxila por análise de RPE, foram propostos os mecanismos de fotodegradação da lignina e compostos modelos mostrados na figura 1.15 (105-107).

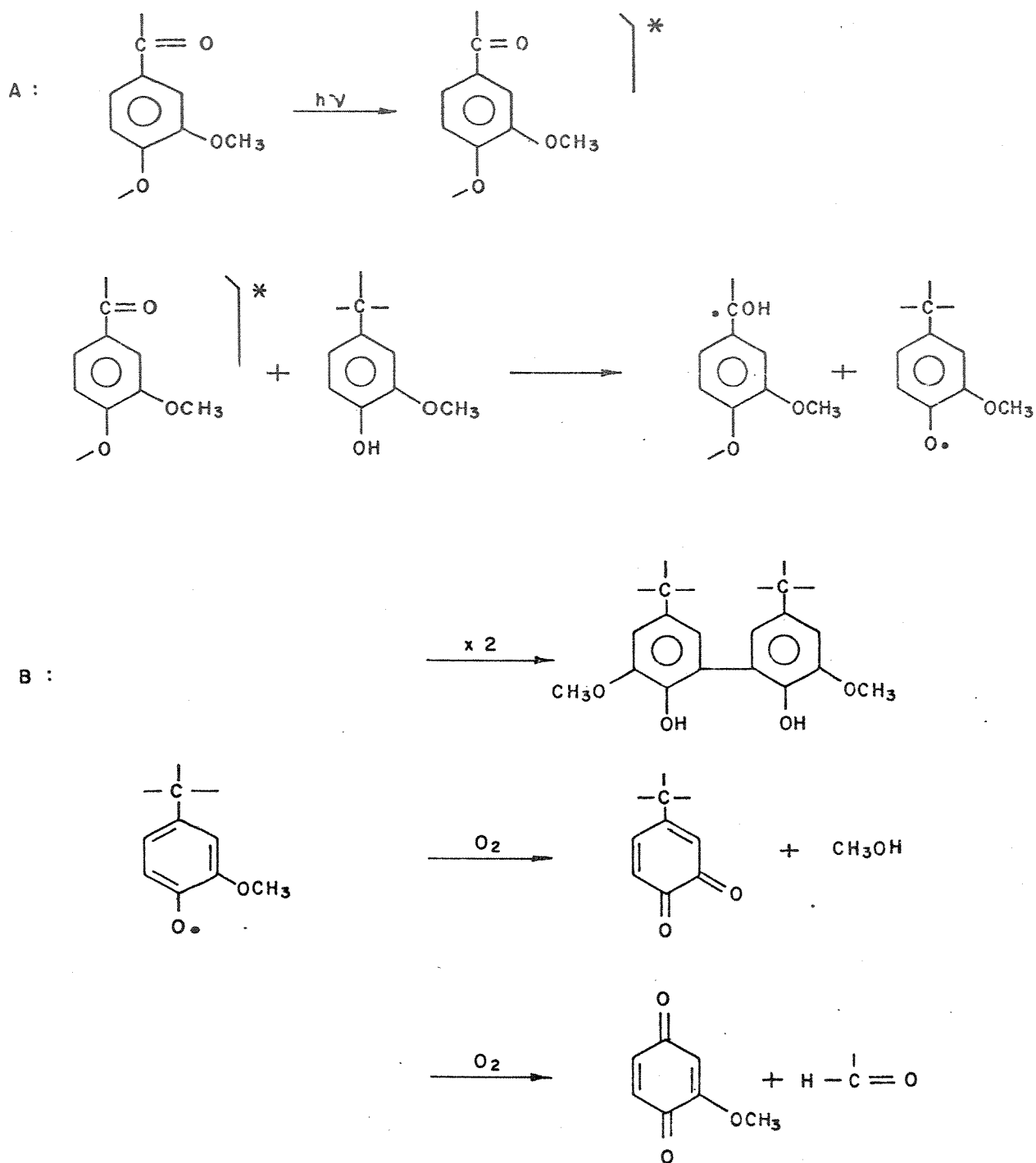


Figura 1.15. Mecanismos de fotodegradação da lignina.



A figura I.15 (A) mostra o mecanismo geral de formação de uma molécula excitada de tipo carbonila e a posterior remoção de hidrogênio de um grupo fenólico. Os radicais gerados na primeira etapa da reação podem reagir como mostrado em I.15 (B). Nestes mecanismos, a principal reação observada é a eliminação da cadeia lateral com a formação de quinonas como produtos finais.

Gierer e Lin (108) propuseram vias alternativas para o mecanismo das reações radicalares, encontrando uma boa correlação com os produtos observados experimentalmente.

Um mecanismo que envolve a transferência de energia de uma molécula excitada para oxigênio molecular (triplete no estado fundamental) com a formação de oxigênio singlete, foi reportado por Gellestedt e col. (109-111) e Brunow e col. (112). As evidências experimentais foram obtidas da fotólise de compostos relacionados à lignina na presença de reagentes supressores de oxigênio singlete. Um exemplo deste mecanismo é mostrado na figura I.16, na qual o cromóforo é uma dupla ligação. Na primeira etapa da reação ocorre a absorção de energia pela molécula, gerando uma espécie excitada no estado singlete. Depois, por um mecanismo de cruzamento intersistemas, a molécula é levada ao estado triplete e a partir deste estado, transfere seu excesso de energia ao oxigênio molecular. O oxigênio singlete assim gerado, reage com duplas ligações e, via intermediário dioxetano, forma compostos carbonílicos.

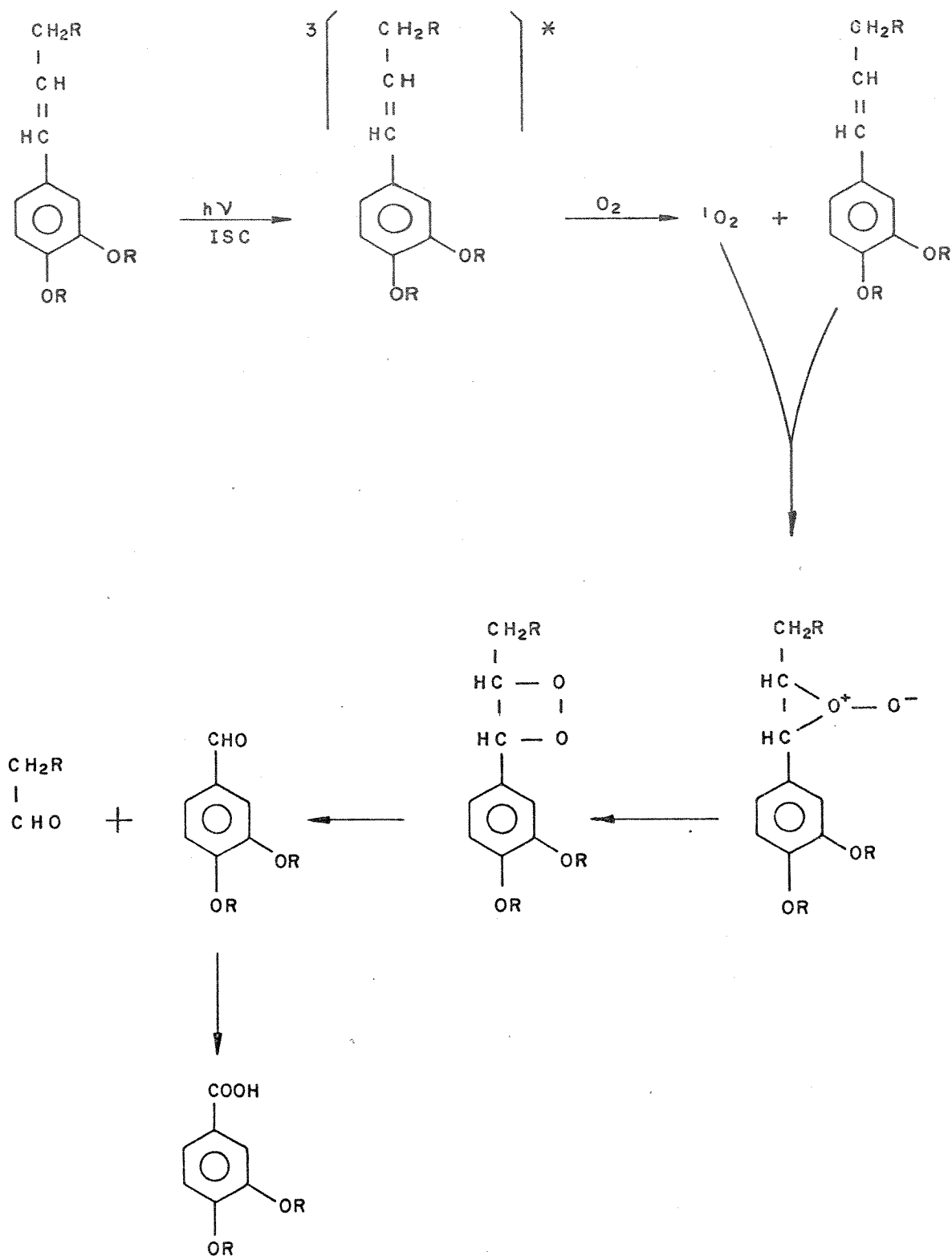


Figura I.16. Mecanismo de fotooxidação via  $^1O_2$ .

Estudos mais recentes (113) com compostos modelo de lignina, fotossensibilizados com riboflavinina e outros corantes, indicam que a participação de oxigênio singlete não é relevante na fotodegradação. Postula-se um mecanismo de reação Tipo I, ou seja a remoção direta de hidrogênio desde o grupo fenila por meio de uma molécula excitada, e não a reação de oxigênio singlete com o substrato (reação Tipo II). No entanto, a formação de oxigênio singlete no meio da reação fotoquímica foi confirmada posteriormente por Forsskahl (114,115) em reações fotossensibilizadas, mas sem necessariamente participar na formação de produtos,

## 1.6. OBJETIVOS

Neste trabalho, empregou-se a fotoquímica como método de pré-tratamento da lignina, com o objetivo de modificar sua estrutura, correlacionando estas mudanças com parâmetros químicos ou espectroscópicos. Estudou-se também o mecanismo de quimiluminescência da lignina em meio básico no intuito de utilizar esta técnica como uma medida das mudanças estruturais do substrato submetido a fotólise.

Outro aspecto estudado está relacionado com o mecanismo da bio-degradação da lignina utilizando para este fim, um sistema enzimático (peroxidase/ $H_2O_2$ ) como modelo das enzimas envolvidas na degradação fungal. Neste caso também foi utilizada lignina previamente fotolisada.

Uma das ligninas empregadas neste trabalho provém de um processo industrial (lignina de eucaliptus [LE]) e a outra foi extraída no laboratório a partir de casca de arroz com dioxano (LD).

## CAPÍTULO II

### PARTE EXPERIMENTAL

## PARTE EXPERIMENTAL

## II.1 MATERIAIS

## II.1.1. Reagentes

| Reagente                                           | procedência   |
|----------------------------------------------------|---------------|
| acetato de etila                                   | Queel         |
| ácido ascórbico                                    | Sigma         |
| ácido clorídrico                                   | Merck         |
| ácido ferúlico                                     | Sigma         |
| ácido sulfúrico                                    | Carlo Erba    |
| ácido vanilínico                                   | Sigma         |
| água deuterada (99.8 %)                            | Merck         |
| azoteto de sódio                                   | Merck         |
| benzeno                                            | Merck         |
| benzoato de sódio                                  | Merck         |
| bicarbonato de sódio                               | Grupo Química |
| boroidreto de sódio                                | Carlo Erba    |
| 1,4-diazobiciclo-(2,2,2)-octano (DABCO)            | Merck         |
| 9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato de sódio (DBAS)  | (a)           |
| 9,10-difenil antraceno-2-sulfonato de sódio (DPAS) | (a)           |
| 4,4'-dihidroxi-3,3'-dimetoxiestilbeno              | (b)           |
| 2,6-dimetilbenzoquinona                            | Aldrich       |
| 5,5'-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO)            | Aldrich       |
| 2,4-dinitrofenil hidrazina (DNFH)                  | Aldrich       |
| 1,4-dioxano                                        | Merck (c)     |
| etanol                                             | Carlo Erba    |

|                                        |        |
|----------------------------------------|--------|
| eosina                                 | Merck  |
| formiato de sódio                      | Merck  |
| fosfato dibásico de sódio              | Queel  |
| fosfato monobásico de sódio            | Queel  |
| hidróxido de potássio                  | Merck  |
| hidróxido de sódio                     | Merck  |
| iodeto de potássio                     | Merck  |
| luminol                                | Sigma  |
| metanol                                | Merck  |
| pentóxido de fósforo                   | Fisher |
| Peroxidase de rabanete (tipo VI) (HRP) | Sigma  |
| peróxido de hidrogênio                 | Merck  |
| rosa de bengala                        | Merck  |
| sulfato de sódio                       | Merck  |
| sulfato ferroso amoniacal hexaidratado | Queel  |
| superóxido dismutase (SOD)             | Sigma  |
| Vanilina                               | Sigma  |

(a) DBAS e DPAS obtidos por síntese em trabalhos anteriores (116).

(b) Fornecido pelo Dr. K. P. Lundquist da Universidade de Goteborg, Suécia.

(c) Purificado como descrito em 11.3.1.

### 11.1.2. Instrumentação

Os espectros de fluorescência das ligninas foram obtidos através de um espectrofluorímetro Perkin-Elmer MPF-44B. As análises por espectrofotometria foram realizadas num aparelho Zeiss DMR 21. Para as determinações de pH das soluções de lignina empregou-se um potenciômetro Metrohm-Herisau E-512.

As irradiações das ligninas foram efetuadas, a diferentes fluências, empregando-se uma lâmpada de mercúrio OSRAM HQL de 125 W ( $\lambda > 254$  nm). A velocidade de fluência da lâmpada foi determinada com um radiômetro YSI-Kettering modelo 65A, nos comprimentos de onda  $\lambda > 254$  nm ( $108,0 \text{ W/m}^2$ ) e  $\lambda > 300$  nm ( $68,4 \text{ W/m}^2$ ) a uma distância entre 15 e 20 cm. Irradiações em comprimentos de onda maiores que 300 nm foram realizadas intercalando-se, entre a amostra e a lâmpada, um vidro pirex como filtro.

As análises por calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram efetuadas num calorímetro Perkin-Elmer modelo DSC-2.

A quimiluminescência da lignina de eucalipto (LE) em meio básico e no sistema enzimático foi determinada num contador de cintilação líquida Beckman LS-7000 com o circuito de coincidência ligado.

A leitura da emissão da lignina de eucalipto em diferentes temperaturas foi feita num contador de cintilação Beckman LS-100c com o circuito de coincidência desligado.

A distribuição espectral da emissão foi registrada num contador de fótons Hamamatsu TVC-767.

A quimiluminescência do sistema luminol/LE, foi analisada num fotômetro Mitchell-Hastings, acoplado com registrador.



Os experimentos com ressonância paramagnética eletrônica (RPE) foram realizados num espectrômetro Varian E4 a temperatura ambiente (25 °C).

Os espectros de Dicroísmo Circular (CD) foram registrados num espectropolarímetro Cary 50 acoplado com acessório de CD modelo 5001.

Para as cromatografias de permeação em gel (GPC) utilizou-se um colector de frações LKB munido de detector ultravioleta (UVICORD S-2138), e as medidas de absorção feitas em 280 nm.

Os espectros na região do infra-vermelho foram feitos, em pastilhas de KBr, num espectrofotômetro da Perkin-Elmer modelo 337 (calibração com poliestireno),

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de prótons das ligninas acetiladas, foram realizados num espectrômetro VARIAN XL-100 (100,1 MHz) em clorofórmio deuterado.

## 11.2. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES

### 11.2.1. Solução de Peroxidase (HRP)

Foram dissolvidos 4 mg de HRP nativa em 1 ml de água destilada. A concentração molar exata foi determinada pela leitura da absorbância em 403 nm cujo coeficiente de extinção molar, neste comprimento de onda, é  $102.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### 11.2.2. Soluções de DBAS e DPAS

Foram adicionados a 1 mg de DBAS 0.1 ml de etanol e 4.5 ml de água. Devido à baixa solubilidade do composto, este foi agitado no escuro por 2 horas e logo filtrado. A seguir foi lida a absorvância em 382 nm ( $\epsilon_{382} = 8940 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e calculada a concentração. Da mesma forma foi determinada a concentração de DBAS considerando que em 375 nm o coeficiente de extinção molar é  $5040 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### 11.2.3. Soluções de Lignina

As soluções de lignina foram preparadas em dioxano/ $\text{H}_2\text{O}$  (1/1) (v/v) nas concentrações oportunamente indicadas em cada caso.

A lignina de casca de arroz (LD) é completamente solúvel em solução de dioxano/ $\text{H}_2\text{O}$ . A lignina de eucalipto (LE) não é totalmente solúvel em dioxano/ $\text{H}_2\text{O}$ , portanto o resíduo não dissolvido foi filtrado, secado a  $105 \pm ^\circ\text{C}$  e pesado, permitindo o cálculo da concentração da solução de estoque.

### 11.3. METODOS

#### 11.3.1. Purificação de Dioxano

Antes de ser utilizado, o dioxano foi purificado da seguinte forma (117): 1 l de dioxano, 14 ml de ácido clorídrico concentrado e 100 ml de água destilada foram refluxados durante 10 horas sob atmosfera de nitrogênio. A solução fria, a temperatura ambiente, foi tratada sob agitação com pastilhas de hidróxido de potássio em quantidade tal que algumas pastilhas não se dissolvam. A fase orgânica foi separada e mantida durante 24 horas sobre pastilhas de hidróxido de potássio. Posteriormente, o dioxano, separado do KOH, foi refluxado com sódio metálico durante 24 horas, até o sódio permanecer brilhante. Finalmente, o dioxano foi destilado a 102 °C (760 mm Hg).

Quando o dioxano purificado, conforme descrito, foi utilizado em espectroscopia, foi ainda filtrado em coluna de óxido de alumínio ativado por 12 horas a 180 °C (118). A eliminação de peróxidos do dioxano obtida através do óxido de alumínio, foi comprovada pela ausência de absorbância em 353 nm ( $\epsilon_{353} = 2,55 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Este teste consiste na reação de HRP ( $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ ), KI ( $5 \times 10^{-2} \text{ M}$ ) e dioxano (10  $\mu\text{l}$ ) (119).

#### 11.3.2. Extração de Ligninas

Foram estudadas duas ligninas de diferentes fontes vegetais: lignina de eucalipto (LE) e lignina da casca de arroz (LD).

A lignina de eucalipto (*Eucalyptus paniculata*) fornecida pela Escola de Engenharia de Lorena (EEL), SP, foi extraída com ácido sulfúrico. A composição aproximada, fornecida pela EEL é: 72 % de lignina, 19.8 % de celulose e 8.2 % de cinzas.

A lignina de casca de arroz (LD) foi preparada de acordo com o método de Pepper e col. (120). Resumidamente a técnica de preparação consiste no seguinte: a casca de arroz foi previamente moída e peneirada (malha de 0.3 mm). O material peneirado foi extraído de forma contínua num aparelho Soxhlet com 2.5 l de solução de etanol/benzeno (1/1, v/v) durante 53 horas. Em seguida foi filtrado, secado ao ar e, posteriormente, secado até peso constante num dessecador sob vácuo na presença de pentóxido de fósforo. Foram colocados 25 gramas do material pré-extraído num balão 3 bocas, conectadas simultaneamente, a um condensador de refluxo, funil de adição e borbulhador de nitrogênio e bomba de vácuo, estes últimos ligados à mesma boca através de uma torneira em T.

Com o funil de adição carregado com a mistura de solventes, este sistema foi submetido a vácuo durante 15 minutos. Em seguida iniciou-se o borbulhamento de nitrogênio e a adição de solvente. A mistura de solventes, constituída de 500 ml de dioxano/H<sub>2</sub>O (9:1, v/v) e 0,2 N em HCl, foi adicionada lentamente. Atingiu-se a ebulição com auxílio de manta elétrica e o sistema reacional foi refluxado por 30 minutos, sob agitação e atmosfera de nitrogênio.

A mistura resultante foi esfriada até temperatura ambiente e filtrada. O resíduo sólido foi lavado imediatamente com 50 ml da mistura de solventes acima descrita. O filtrado, neutralizado com excesso de bicarbonato de sódio até pH 7, foi deixado em repouso durante 24 horas. A solução foi concentrada

até 30 ml num evaporador rotatório e adicionada sobre 1 litro de água destilada que continha 1 % (p/v) de sulfato de sódio.

A lignina de casca de arroz, precipitada nesta última etapa, foi separada por centrifugação e lavada com água. Esta operação foi repetida 3 vezes. A seguir a lignina foi secada até peso constante num dessecador sob vácuo na presença de pentóxido de fósforo.

### 11.3.3. Análise de Grupos Fenólicos em Ligninas

O conteúdo de grupos fenólicos livres nas ligninas foi determinado conforme o método de Wexler (121). Tal método consiste na obtenção do espectro diferencial da lignina em meio básico, usando-se como branco a mesma amostra, porém em meio acidificado, e finalmente lendo-se a altura do pico em 250 nm pelo método da linha base. Destes espectros foi calculado o conteúdo porcentual de grupos fenólicos aplicando-se a seguinte equação:

$$\% \text{ } \phi \text{ OH} = \frac{\Delta A_1 (0.192)}{C}$$

onde  $\Delta A_1$  é a leitura diferencial em absorbância em 250 nm e  $c$  é a concentração da lignina em g/l.

As soluções foram preparadas da seguinte forma: a 3.4 ml de solução de lignina (0.15 g/l) foram adicionados 1.1 ml de água destilada e 0.5 ml de HCl 1N (branco). A amostra foi preparada da mesma forma, porém ao invés de adicionar ácido, adicionou-se 0,5 ml de KOH 1N.

### 11.3.4. Análise de Grupos Carbonila em Ligninas

Na análise de grupos carbonila, que consiste na medida da absorbância da lignina reduzida, empregou-se o método de Adler e Marton (122) modificado por Barnett e col. (123). Para a reação de redução da lignina agregaram-se 30 mg de  $\text{NaBH}_4$  a 5ml de solução de lignina (0.15 g/l) sob agitação e em atmosfera de nitrogênio. Após 15 horas, acidificou-se o meio reacional com  $\text{HCl}$  1N até pH 2.

As soluções de lignina utilizadas para a leitura das absorbâncias foram preparadas com 4 ml de solução de lignina reduzida (amostra), conforme descrito acima, ou então de lignina não reduzida (branco) (0,15 g/l) e 2 ml de solvente.

As absorbâncias lidas em 310 nm e 342 nm, permitiram estimar o conteúdo de grupos carbonila nas ligninas estudadas. Para tal, empregaram-se as fórmulas [1-4] citadas a seguir:

$$(\Delta\text{Er})_{310} = \frac{A_{310}}{C} (175) \quad [1]$$

$$(\Delta\text{Er})_{342} = \frac{A_{342}}{C} (175) \quad [2]$$

onde  $c$  é a concentração da lignina em g/l,  $A_{310}$  e  $A_{342}$  são, respectivamente, as absorbâncias em 310 nm e 342 nm. O valor 175 corresponde à unidade média de peso do grupo fenil propano.

$$10.500 X + 9.400 Y = (\Delta\text{Er})_{310} \quad [3]$$

$$19.800 X + 2.020 Y = (\Delta\text{Er})_{342} \quad [4]$$

seguinte forma: 0.25 g de DNFH foram dissolvidos em 5ml de metanol contendo 0.5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Após 30 min, a mistura foi filtrada. Em seguida 0.5 ml deste reagente foram adicionados a 2 ml de solução de lignina (0.2 g/l em dioxano/H<sub>2</sub>O) e, posteriormente, 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. Após 12 horas de reação, o precipitado obtido foi centrifugado, lavado com água destilada, secado em dessecador sob vácuo e pentóxido de fósforo, e finalmente pesado.

O precipitado, dissolvido em metanol, foi cromatografado em camada delgada (Alufolien Kieselgel-60-Merck) com benzeno/acetato de etila (20/1, v/v) como sistema de solventes. A revelação foi efetuada em câmara saturada com vapor de iodo.

#### 11.3.6. Calorimetria Diferencial de Varredura da LE

As leituras em DSC foram efetuadas nas seguintes condições:

amostra : Velocidade de aquecimento: 40 K/min  
 Velocidade do papel : 20 mm/min  
 Fluxo de energia : 10 mcal/seg

padrão (índio): Velocidade de aquecimento: 5 K/min  
 Velocidade do papel : 80 mm/min  
 Fluxo de energia : 5 mcal/seg

Foi empregada a seguinte fórmula para o cálculo do  $\Delta H$  de transição ( $\Delta H_t$ ), das amostras de LE irradiadas em estado sólido ( $\lambda > 254$  nm):

Nas equações [3] e [4], X representa o número de unidades por mol de estruturas de tipo coniferilaldeído por unidade de metoxila ( $\gamma$ -carbonila), e Y de tipo cetoguaiacona por unidade de metoxila ( $\alpha$ -carbonila).

#### 11.3.5. Cromatografia de Permeação em Gel

Foi utilizada uma coluna de vidro (40 x 1,5 cm) com Sephadex LH-20 (Aldrich) como fase estacionária e dioxano/H<sub>2</sub>O (1/1) como fase móvel. Os cromatogramas das amostras analisadas foram obtidos com injeções de 0,5 ml de lignina (1 g/l). A vazão da fase móvel foi de 1, 5 ml/min por tubo.

#### 11.3.6. Fotólise das Ligninas

A fotólise das ligninas em solução foi feita em dioxano/H<sub>2</sub>O (1/1) em cubetas de quartzo a uma distância entre 15 e 20 cm. As irradiações das ligninas em estado sólido foram realizadas colocando-se uma camada de lignina sobre uma placa de vidro e fotolisada também a uma distância entre 15 e 20 cm.

#### 11.3.7. Conteúdo Relativo de Grupos Carbonila na LE Fotolisada (Reação com DNPH).

A concentração relativa de grupos carbonila na lignina, após fotólise, foi determinada por precipitação com 2,4-dinitrofenil hidrazina (DNPH) (124). Preparou-se o reagente da



$$\Delta H_t = \Delta H_{\text{índio}} \times \frac{W_i}{W_a} \times \frac{A_a}{A_i} \times \frac{R_a}{R_i} \times \frac{S_i}{S_a}$$

onde  $W$  é o peso do material analisado,  $A$  é a área sob a curva,  $R$  é fluxo de energia,  $S$  a velocidade do papel e  $\Delta H_i$  a entalpia de transição do índio. Os sub-índices  $a$  e  $i$  representam, respectivamente, a amostra e o padrão.

A partir de dados obtidos na literatura (125), sabe-se que  $\Delta H_i = 6.79$  cal/g. Desta forma, foi possível calcular a entalpia de transição de cada amostra estudada. As medidas foram repetidas duas vezes e o erro relativo não ultrapassou 5 %.

### 11.3.9. Quimiluminescência da Lignina e de Modelos em Meio Básico

Os estudos de fotocmissão da LE em solução aerada em meio básico foram efetuados da seguinte forma: a 3 ml de solução de lignina (0.15 g/l em dioxano/ $H_2O$ ), adicionou-se 40  $\mu$ l de NaOH 5N e contou-se a emissão da solução a cada 6 segundos. Os reagentes aceptores emissivos e supressores de emissão do sistema foram utilizados nas concentrações indicadas, conforme tabelas de resultados. Nestas amostras, assim preparadas, foram feitos os estudos de distribuição espectral.

Os espectros de emissão dos compostos modelo de lignina foram realizados com amostras obtidas através da adição de 3 ml do composto modelo (10 mM em dioxano/ $H_2O$ , 1/1) com 40  $\mu$ l de NaOH 5N. A contagem da emissão foi feita a cada 6 segundos.

A leitura da emissão da LE em diferentes temperaturas foi realizada com soluções previamente aquecidas em banho de água à temperatura desejada.

### 11.3.10. Quimiluminescência do Sistema Luminol/LE

O sistema de luminol foi preparado como descrito por Pugachevskii e Plesha (126). Em 4 ml de uma solução contendo 10 mM em NaOH, 0.25 mM em  $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2(\text{NH}_4)_2$ , 1.7 mM em  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 5  $\mu\text{l}$  de lignina de eucalipto (0.15 g/l em dioxano/ $\text{H}_2\text{O}$ ), agregou-se luminol até concentração final de 0.25 mM do mesmo. Em seguida foi registrada a cinética de decaimento de quimiluminescência do sistema.

### 11.3.11. Quimiluminescência do Sistema HRP/ $\text{H}_2\text{O}_2$ /LD

Ensaio com este sistema foram realizados segundo a técnica de Young e Steelink (127) que consiste em adicionar peroxidase nativa até concentração final de 2  $\mu\text{M}$  da mesma a uma mistura de 2.3 ml de tampão fosfato 0.1 M (pH 5.5) e 0.5 ml de solução de lignina (0.15 g/l) contendo 90 mM em  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A contagem da emissão deste sistema foi feita a cada 6 segundos.

Os reagentes aceitores emissivos e supressores da emissão foram utilizados nas concentrações indicadas e apresentadas nas tabelas de resultados.

### 11.3.12. Ciclo da Peroxidase

Nos estudos do ciclo da peroxidase, acompanhados por UV e CD, as amostras foram preparadas da seguinte forma: em 3 ml de solução contendo tampão fosfato 0,1 M (pH 5,5) e 40  $\mu\text{M}$  em HRP, foram adicionados  $\text{H}_2\text{O}_2$  até concentração final de 40  $\mu\text{M}$ , fe-

no até concentração final de 20  $\mu\text{M}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  até concentração final de 90  $\mu\text{M}$ . Desta forma foram obtidas, respectivamente, as espécies de peroxidase HRP-I, HRP-II e HRP-III.

#### 11.3.13. Detecção de Radicais Hidroxila

Neste estudo realizado por ressonância paramagnética eletrônica (RPE) as medidas foram feitas na reação de Fenton constituído de 0,01 M em  $\text{FeCl}_2$ , 0,1 M em  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 0,14 M em DMPO e 62  $\mu\text{l}$  de tampão fosfato 0,1 M (pH 5,5) totalizando um volume final de 0,1 ml. No sistema enzimático o sistema foi preparado com 2  $\mu\text{M}$  em peroxidase, 20 mM em  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 0,3 g/l em lignina dioxano e 0,1 M em DMPO.

#### 11.3.14. Acetilação de Ligninas

Aproximadamente 300 mg de lignina foram dissolvidos em 18 ml de piridina e posteriormente foram agregados 20 ml de anidrido acético. Após 48 horas sob agitação magnética e temperatura ambiente, a lignina acetilada foi precipitada com gelo moído e em seguida filtrada. Esta lignina foi solubilizada em clorofórmio e re-precipitada gotejando-a em éter anidro (128).

## 11.4. CALCULOS

### 11.4.1. Rendimento Quântico de Quimiluminescência

O rendimento quântico de quimiluminescência do sistema  $LE/OH^-/O_2$ , foi calculado em relação ao padrão, ou coquetel, de cintilação Mitchell-Hastings. O rendimento Quântico ( $\phi_q$ ) é definido pela seguinte expressão:

$$\phi_q = \frac{\text{fótons emitidos}}{\text{moléculas emissoras}}$$

Conhecido o número de fótons emitidos pelo padrão, por unidade de tempo e volume, pode-se calcular para o sistema em estudo.

A leitura integrada de 3 ml do padrão durante 2 minutos no contador de cintilação líquida Beckman LS-7000 foi de  $1,73 \times 10^7$  contagens. Sabe-se que o padrão emite  $6,2 \times 10^8$  fótons/ml x s, portanto sua emissão nas condições de leitura será de  $2,23 \times 10^9$  fótons. A contagem integrada para 3 ml de lignina (0,15 g/l) em 2 minutos foi de  $1,6 \times 10^5$ . Portanto:

$$\begin{array}{ll} \text{Padrão: } 1,73 \times 10^7 \text{ contagens} & \text{----- } 2,23 \times 10^9 \text{ fótons} \\ LE/OH^-/O_2: 1,16 \times 10^5 \text{ contagens} & \text{----- } 1,49 \times 10^7 \text{ fótons} \end{array}$$

Para conhecer o número de moléculas emissoras, foram feitas as seguintes aproximações: (1) a formação de espécies excitadas é proporcional ao consumo de oxigênio e, (2) a reação termina em aproximadamente 2 minutos consumindo todo o oxigênio

dissolvido na solução. Sabe-se que em solução a concentração aproximada de  $O_2$  é de  $2 \times 10^{-4} M$ , portanto em 3 ml de solução haverá  $6 \times 10^{-7}$  moles (129), ou seja, as moléculas que reagem são  $(6 \times 10^{-7}) \times (6 \times 10^{23}) = 3,6 \times 10^{17}$  moléculas. Então:

$$\phi_q = \frac{1,49 \times 10^{-7} \text{ fótons}}{3,6 \times 10^{17} \text{ moléculas}}$$

$$\phi_q = 4,15 \times 10^{-11} \text{ Einstein/mol}$$

#### 11.4.2. Energia de Ativação

A integração de cada curva de decaimento da emissão luminescente foi feita da seguinte forma:

$$\text{Contas integradas (CI)} = \frac{[I_n + (I_{n+1})] \Delta t}{2}$$

onde  $I_n$  e  $I_{n+1}$  são as leituras das intensidades (em cpm) nos tempos  $t_n$  e  $t_{n+1}$  respectivamente e  $\Delta t_n = t_{n+1} - t_n$ .

Na equação de Arrhenius, a seguinte aproximação foi considerada:

$$K = A \exp(-E_a/RT)$$

onde  $K = CI$ , portanto:

$$\ln CI = \ln A - E_a/RT$$

### II.4.3. Cálculo da Fluência

A fluência de irradiação recebida pelas amostras foi calculada levando-se em conta a velocidade de fluência da lâmpada num determinado comprimento de onda. Por exemplo, para  $\lambda > 254$  nm, a velocidade de fluência da lâmpada tem um valor de 108 W/m (ver II.1.2). Este valor multiplicado pelo tempo de irradiação fornece a fluência de irradiação. Assim, no caso de uma hora de irradiação em  $\lambda > 254$  nm, a fluência será de 388 KJ m<sup>-2</sup> ( $108 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1} \times 3600 \text{ s} = 388 \text{ KJ m}^{-2}$ ).

**CAPÍTULO III****RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

## III.1. CARACTERIZAÇÃO DAS LIGNINAS

As múltiplas aplicações da lignina e derivados tornam aconselhável a caracterização do substrato. Ainda mais se considerarmos que a lignina varia em composição dependendo da fonte e da técnica de extração. Algumas técnicas rotineiras foram aplicadas para a determinação de parâmetros que caracterizam parcialmente a lignina. Considerando-se que a casca de arroz possui a seguinte composição: celulose 38,4 %, lignina 29,4 %, hemicelulose 11,4 % e cinzas (principalmente  $\text{SiO}_2$ ) 20,8 % (130,131), o rendimento de extração da lignina com dioxano (conforme II.3.2) foi de 20 % (1,5 g).

Uma análise qualitativa dos espectros de UV e IV das ligninas extraídas de madeira de eucalipto com ácido sulfúrico (LE) e da casca de arroz com dioxano (LD). (Figura III.1 e III.2), indica uma concordância entre estes e os espectros reportados em literatura para uma ampla variedade de ligninas (132,133). Também as experiências realizadas por Cromatografia de Permeação em Gel mostraram um pico único em ambas ligninas (Figura III.3), indicando portanto uma estreita faixa de pesos moleculares. As bandas características mostradas pelos espectros de IV e UV permitem concluir que as ligninas não foram significativamente modificadas durante o processo de extração. Da mesma forma, isto também é observado para os deslocamentos químicos nos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN.

Um estudo semi-quantitativo do espectro de RMN-  $^1\text{H}$  para ambas ligninas (Figura III.4), permitiu determinar aproxima-



damente a distribuição porcentual dos diferentes tipos de prótons presentes nas ligninas (134). Esta técnica consiste na separação do espectro em faixas de deslocamentos químicos que são atribuídos aos diferentes hidrogênios na estrutura da lignina. Pela integração destas faixas foi possível obter os resultados mostrados na Tabela III.1

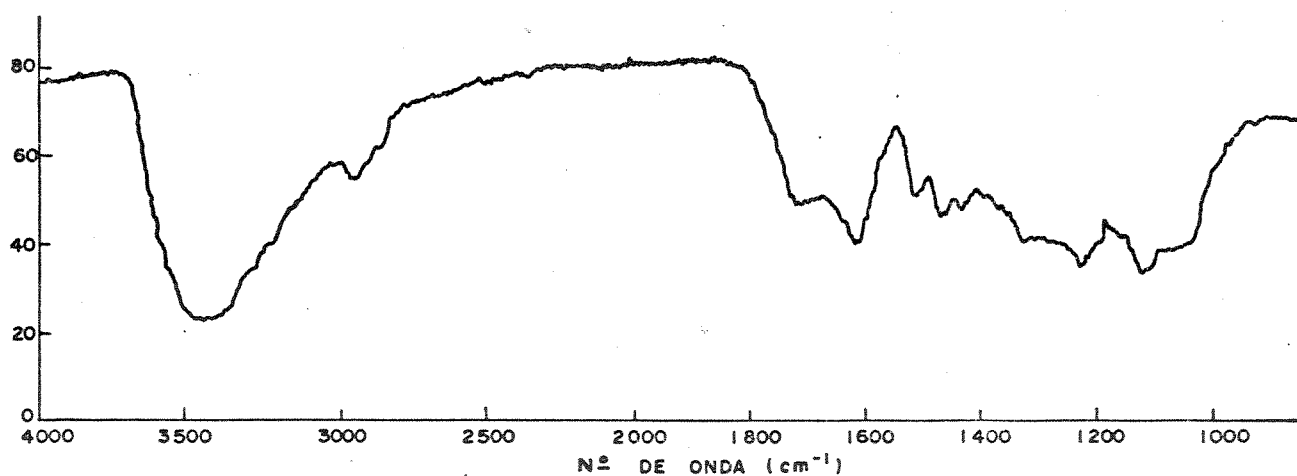
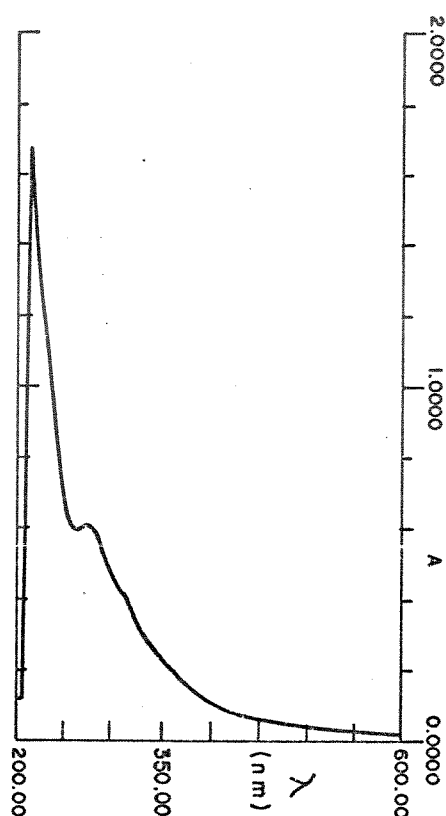


Figura III.1. Espectros de UV e IV da LE (ver II.1.2, p. 34).

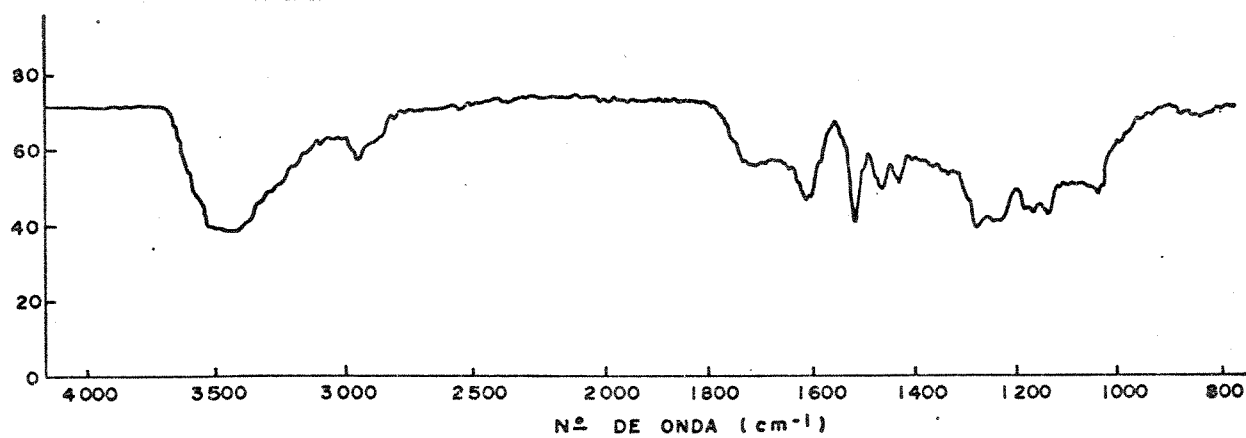
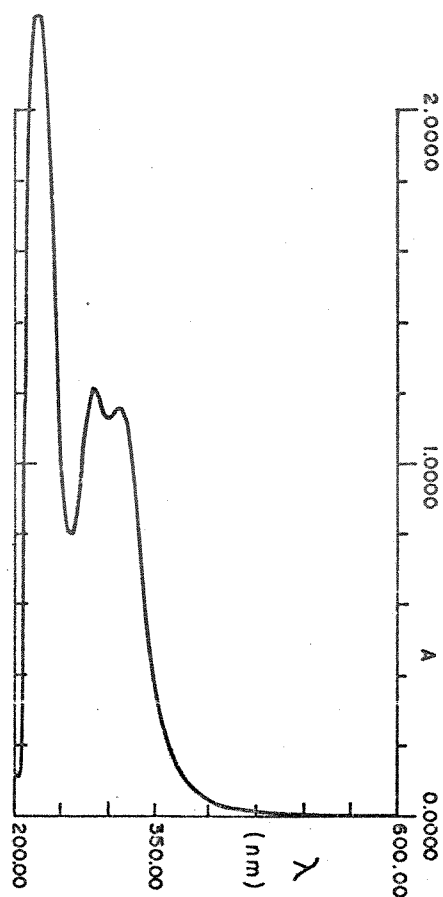


Figura III.2. Espectros de UV e IV da LD (ver II.1.2, p. 34).

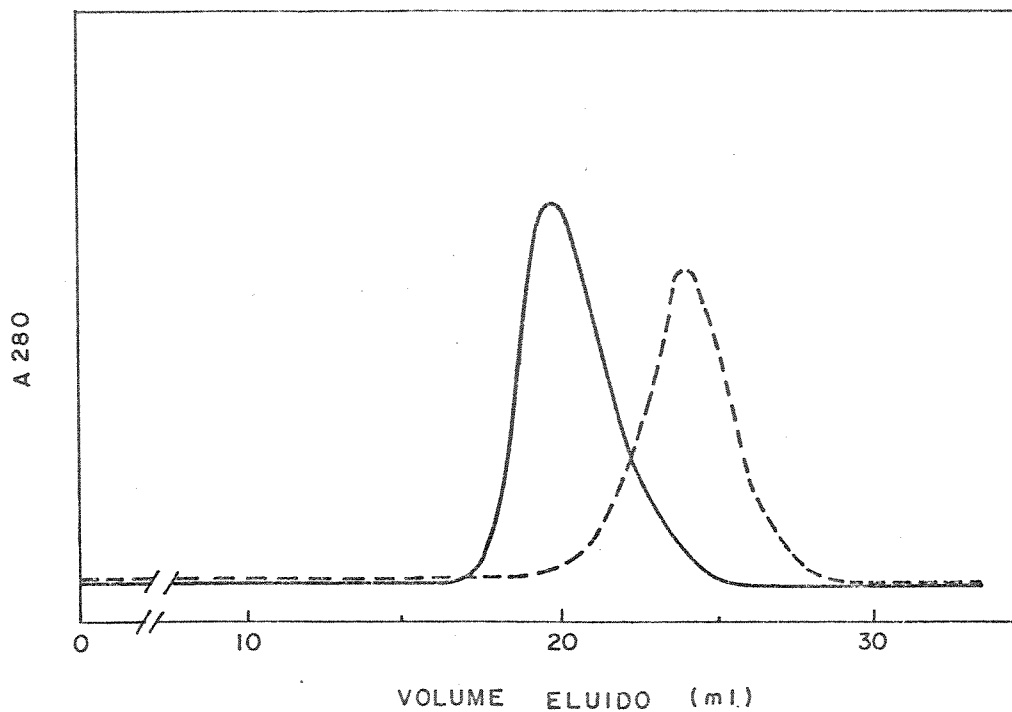


Figura III.3. Permeação em gel das ligninas LE (—) e LD (---).

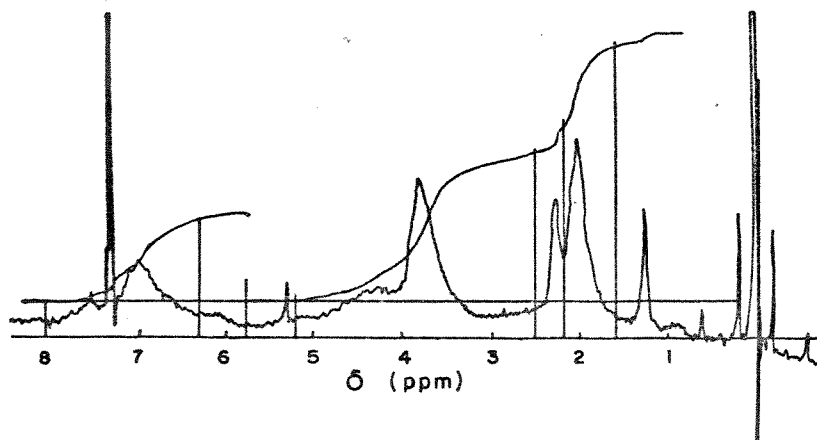
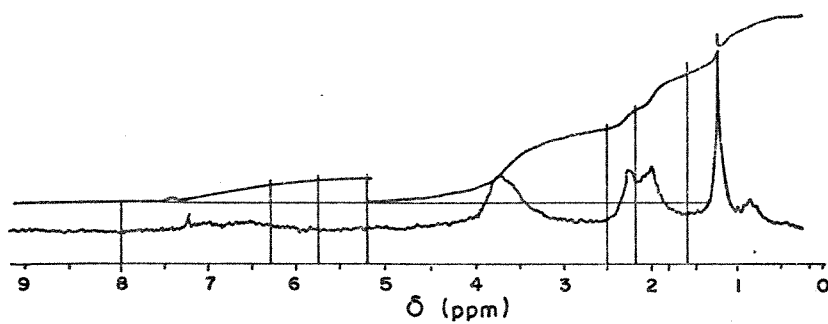


Figura III.4. Espectros de RMN- $^1\text{H}$  de (a) LE e (b) LD (ver II.1.2).

Tabela III.1. Tipos de prótons presentes nas ligninas estudadas.

| tipo de próton       | faixa ppm | %H (LE)      | %H (LD)      |
|----------------------|-----------|--------------|--------------|
| α-vinila e aromático | 8,00-6,28 | 12,2         | 19,3         |
| β-vinila e α-1       | 6,28-5,74 | 2,3          | 1,7          |
| α-3                  | 5,74-5,18 | 1,8          | 0,6          |
| α-2, β, γ e OMe      | 5,18-2,50 | 47,4         | 44,9         |
| acetoxi aromático    | 2,50-2,18 | 12,3         | 8,5          |
| acetoxi alifático    | 2,18-1,58 | 24,0         | 25,0         |
|                      |           | <u>100,0</u> | <u>100,0</u> |

O conteúdo de hidroxilas fenólicas nas ligninas LE e LD, estimado mediante espectros diferenciais das ligninas (ver II.3.3) (Figura III.5), é mostrado na tabela III.2. Este cálculo foi realizado considerando que na casca de arroz há uma relação de 0,73, 1,00 e 0,79, respectivamente, entre grupos p-hidroxifenilpropano, p-hidroxi-3-metoxi-fenilpropano (guaiacila) e p-hidroxi-3,5-dimetoxifenilpropano (siringila) (135) com um peso molecular médio de 180 por unidade de fenilpropano. Assim o número de hidroxilas fenólicas por unidade de peso molecular 180, foi calculado mediante a fórmula mostrada a seguir:

$$\text{nº unidades } \phi\text{-OH} = \frac{180 \times \% \phi\text{-OH}}{17 \times 100}$$

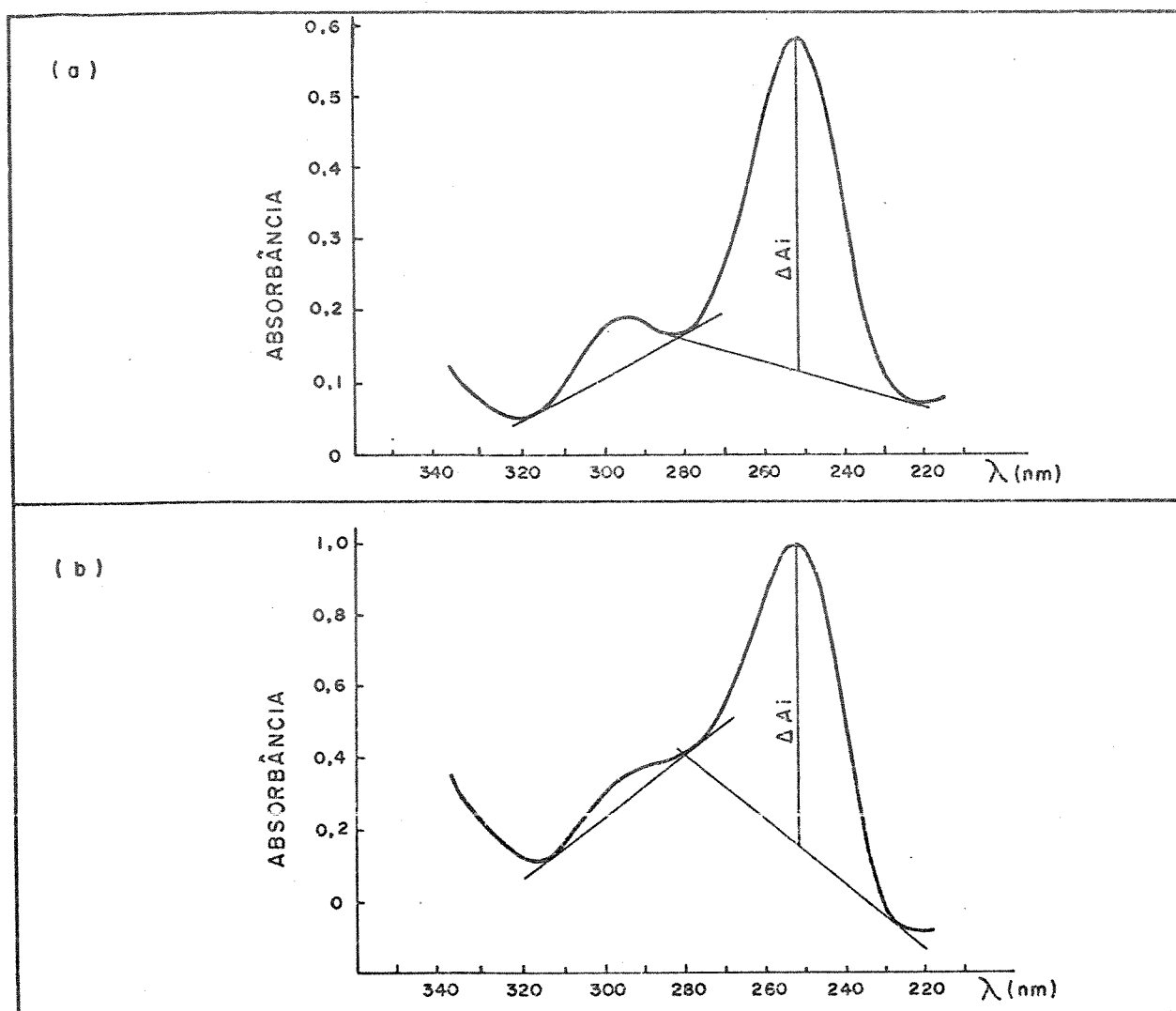


Figura III.5. Espectros diferenciais da (a) LE e (b) LD.

O conteúdo de grupos carbonila das ligninas em estudo, foi analisado de acordo com técnicas citadas anteriormente (ver II.3.4). Desta forma foi determinado que na LE há 0,003 grupos  $\gamma$ -carbonila por metoxila e 0,034 grupos  $\alpha$ -carbonila por metoxila. No caso da LD, há 0,012  $\gamma$ -carbonilas e 0,045  $\alpha$ -carbonilas por metoxila. Os valores calculados para ambas ligninas, junto com o conteúdo de hidroxilas fenólicas, encontram-se na tabela III.2. Estes resultados são comparáveis aos citados na literatura para uma ampla variedade de ligninas (123). A lignina extraída

com dioxano tem sido citada como apropriada para estudos de biodegradação apresentando baixo conteúdo de carboidratos (136).

TABELA III.2. Conteúdo de hidroxilas fenólicas e carbonilas nas ligninas estudadas

|                                        | LE    | LD    |
|----------------------------------------|-------|-------|
| <hr/>                                  |       |       |
| $\Delta$ A250                          | 0,47  | 0,86  |
| $\phi$ -OH                             | 0,90  | 1,65  |
| n $\phi$ -OH                           | 0,095 | 0,175 |
| $\langle \Delta \text{Er} \rangle 310$ | 350   | 550   |
| $\langle \Delta \text{Er} \rangle 342$ | 112   | 394   |
| $\alpha$ -C=O                          | 0,034 | 0,045 |
| $\gamma$ -C=O                          | 0,003 | 0,012 |
| <hr/>                                  |       |       |

## III.2. ESTUDO FOTOQUÍMICO DAS LIGNINAS

### III.2.1. Análise Por Fluorescência

Estudos realizados com espectroscopia de fluorescência de diferentes ligninas, indicaram que o polímero se comporta como um cromóforo simples (137-139), isto é, a emissão fluorescente corresponde a uma única estrutura. Estas observações foram explicadas assumindo-se que os cromóforos presentes na lignina absorvem a energia de excitação e em seguida, por um mecanismo não radiativo, esta é transferida a uma única estrutura que atua como um depósito de energia a partir da qual é emitida a luz fluorescente. A comparação dos espectros de emissão das ligninas com compostos modelo, revelaram que estes depósitos de energia são diferentes para cada tipo de lignina.

Experimentalmente, o que se observa é uma banda única de emissão (Figura III.6A) que permite o acompanhamento da fotólise da lignina por esta técnica. A lignina de eucalipto (LE) apresenta um máximo de emissão em 480 nm ( $\lambda_{exc} = 330$  nm). O comportamento desta banda durante a irradiação de lignina em solução, a diferentes fluências (ver II.4.3), foi seguido lendo-se a intensidade de emissão em 480 nm. Observa-se (Figura III.6B) que há um aumento da emissão com o tempo de irradiação, ou seja, há geração de novos cromóforos com a fotólise. Este fato é coincidente com resultados anteriormente publicados que indicaram a formação de estruturas carbonílicas conjugadas, quando a lignina é fotolisada (109). Por outro lado, observou-se um pequeno deslocamento do máximo de emissão, a maior comprimento de onda, em relação à amostra sem irradiar.

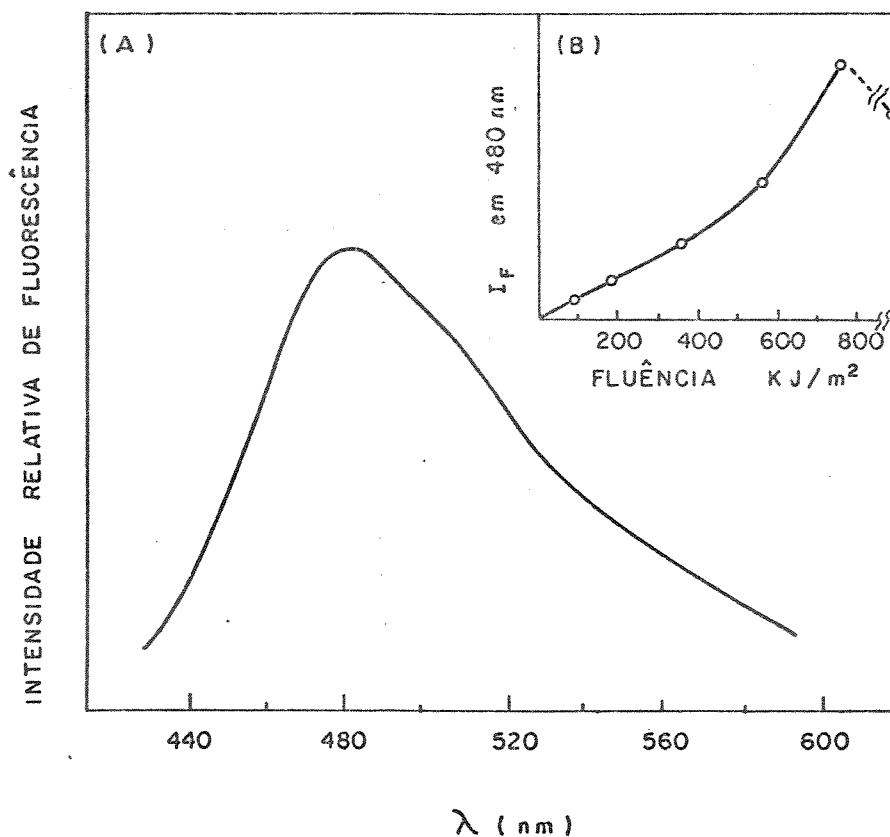


Figura III.6. (A) Espectro de fluorescência da LE (0,15 g/l) e (B) aumento da emissão em 480 nm da LE fotolisada, ( $\lambda_{exc.}$  330 nm)

Uma análise qualitativa de grupos carbonila (reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina) gerados durante a fotólise da LE, permitiu fazer uma correlação entre o aumento da intensidade de fluorescência em 480 nm e a formação de estruturas carbonílicas durante a fotólise. A precipitação de hidrazonas foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (ver II.3.7, p.41), a qual não indicou a formação de outros tipos de compostos. Os resultados das análises são apresentados na figura III.7 em forma normalizada e indicam que há uma boa concordância entre o aumento da fluorescência e a formação de grupos carbonila.



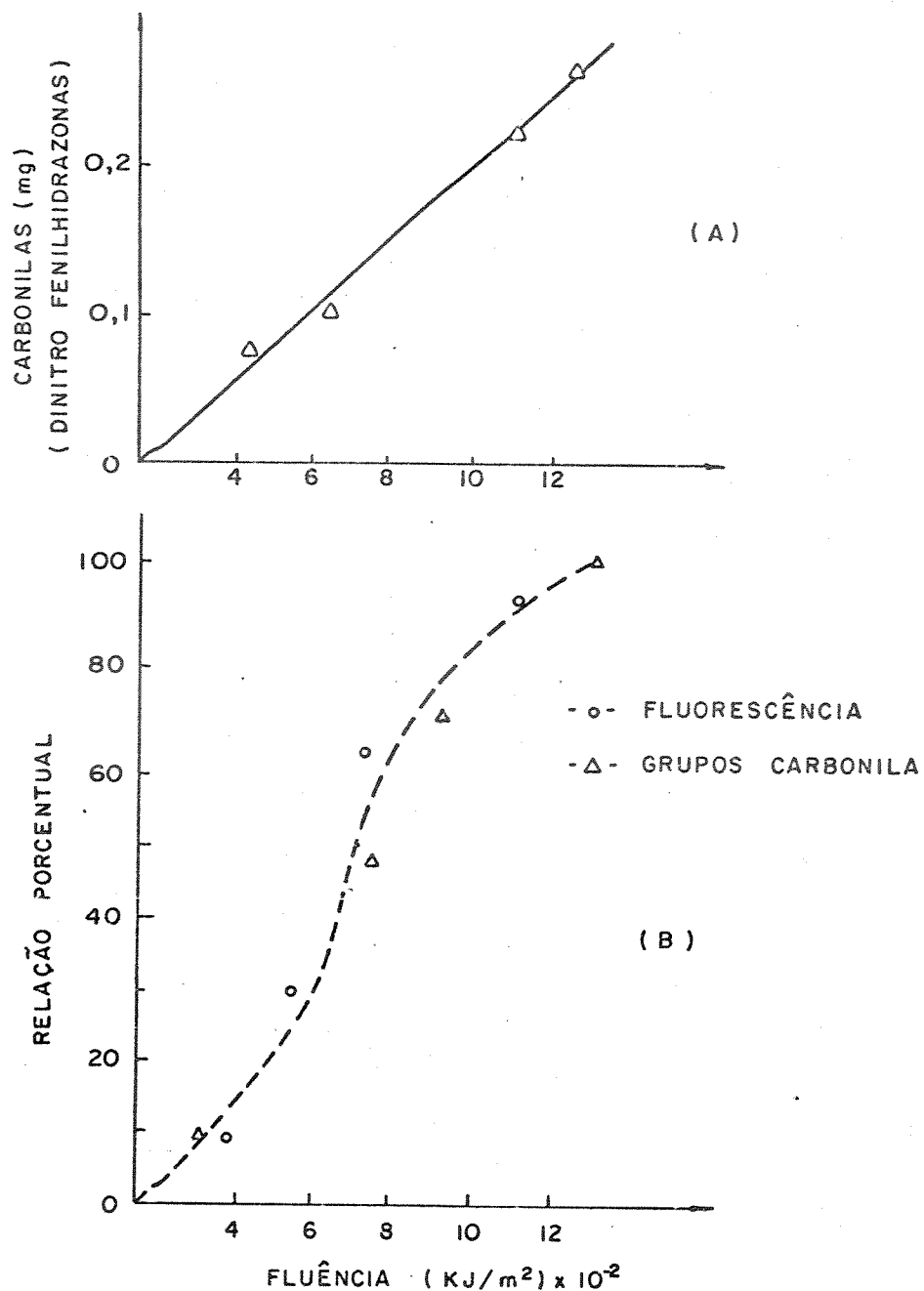


Figura III.7. (A) Aumento de grupos carbonila e (B) correlação entre o aumento da fluorescência e carbonilas, com a fluência.

No caso da lignina extraída da casca de arroz com dioxano (LD), foi realizado um estudo comparativo de fluorescência com compostos modelo relacionados à lignina (ver Apêndice I). Observou-se que o máximo de emissão da LD (410 nm,  $\lambda_{exc} = 360$  nm)

irradiada, sofre um deslocamento positivo em aproximadamente 30 nm. Isto indica, como na LE, que há formação de estruturas diferentes das presentes na lignina nativa. A comparação dos espectros de fluorescência da LD com aqueles dos compostos modelo, sugere a formação de estruturas quinônicas após a fotólise e que a lignina não irradiada apresenta características de estruturas estilbônicas (Figura III.8).

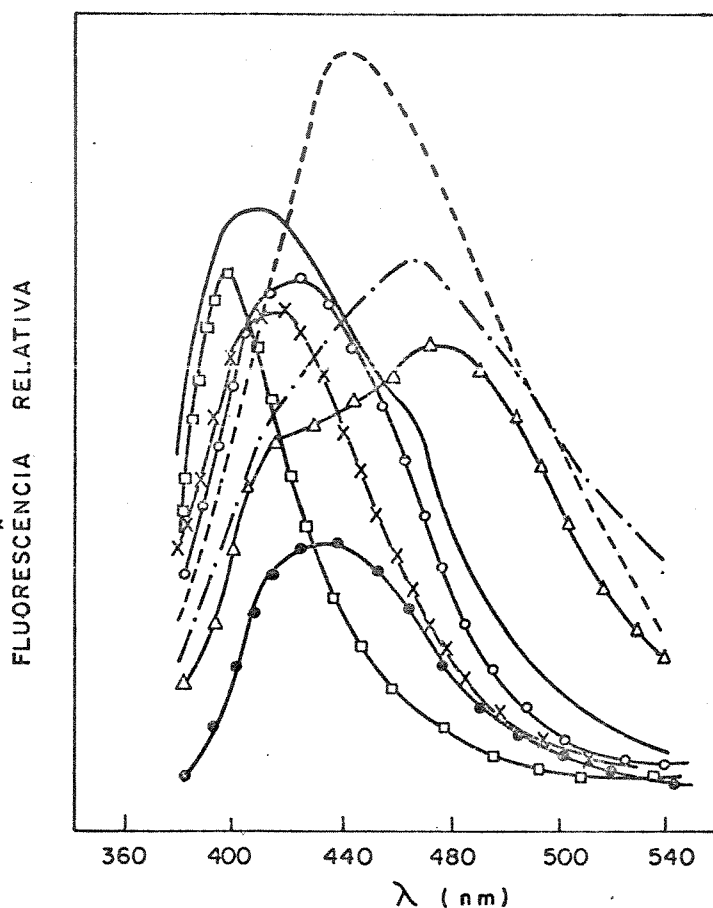


Figura III.8. Espectros de fluorescência da LD sem irradiar (—), irradiada ( $590 \text{ KJ/m}^2$ ) (- -) e de compostos modelo: (□) 4-4'-diidroxil-3-3'-dimetoxiestilbeno, (· ·) 3,5-dimetoxiquinona, (x) vanilina, (Δ) ácido vanilínico, (○) ácido vanilpirúvico e (●) ácido ferúlico.

Quando a LD foi irradiada em estado sólido houve um deslocamento do máximo da emissão fluorescente a comprimentos de onda menores, ao contrário do que acontece quando irradiada em solução. Este fato pode ser explicado considerando o efeito da matriz polimérica com a penetração da luz incidente (entre 75 e 200  $\mu\text{m}$ ) (140). Por outro lado, o polímero em estado sólido deve influir nas reações radicalares que ocorrem, levando à formação de produtos diferentes.

### III.2.2. Variação da Absorbância, pH e Propriedades Térmicas

As modificações estruturais das ligninas durante a fotólise podem ser também observadas no espectro de absorção das ligninas. Dois aspectos devem ser destacados: (a) um aumento da absorbância acima de 400 nm (Figura III.9) e (b) a diminuição da absorbância em 280 nm e 315 nm (Figuras III.10 e III.11), na lignina irradiada em solução. Estes fatos são interpretados na literatura como sendo provenientes da formação de quinonas (108), e do concomitante desaparecimento de duplas ligações e carbonilas conjugadas com anéis aromáticos (141).

O pH da solução de lignina de casca de arroz sem irradiar foi alterado durante a fotólise a qual foi realizada tanto em estado sólido como em solução. Em ambos casos (Figuras III.10 e III.11) observou-se um decaimento do pH com a fluência de irradiação, fato atribuído à formação de grupos ácidos como produtos da fotólise (109).

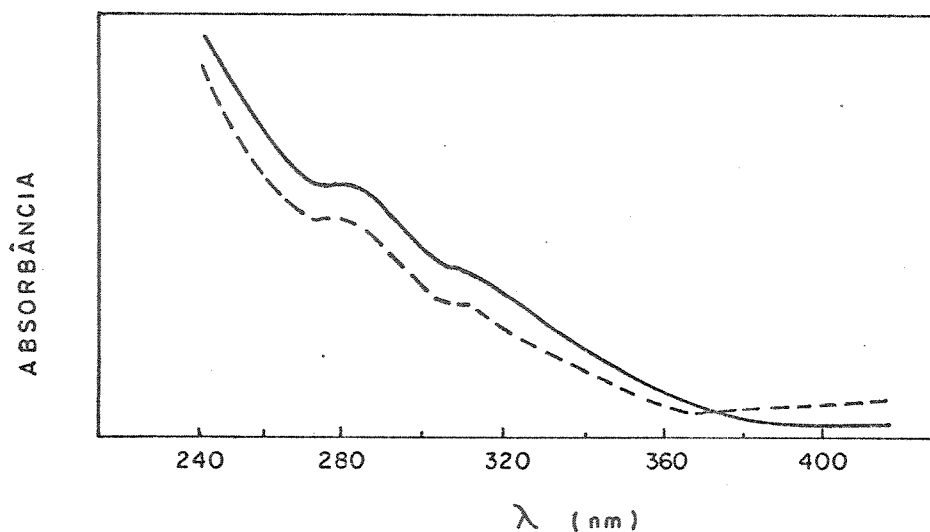


Figura III.9. Espectro de absorção da lignina (—) e da lignina fotolisada (---) com  $390 \text{ KJ/m}^2$ .

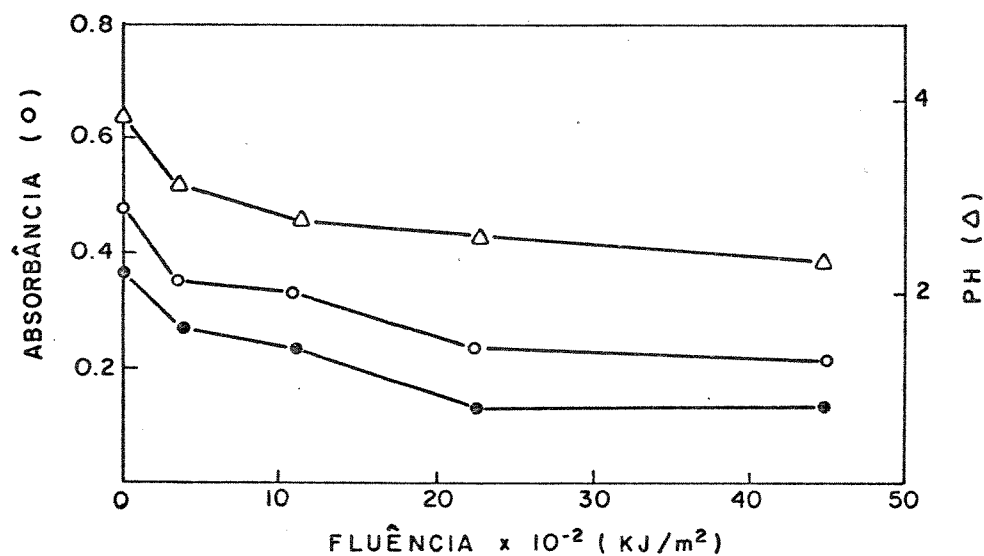


Figura III.10. Variação da absorbância da LD em 280 nm (○) e 315 nm (●) e do PH da solução (Δ), durante a irradiação em solução.

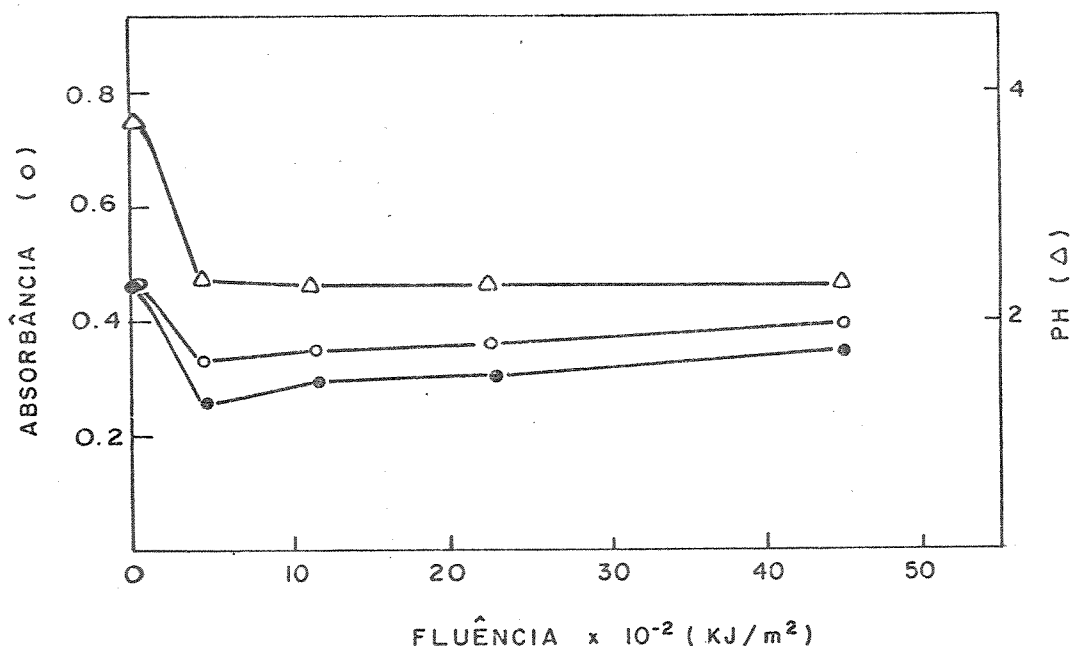


Figura III.11. Variação da absorvância da LD irradiada em estado sólido em 280 nm (○), 315 nm (●) e do pH (Δ).

A técnica de DSC (Calorimetria Diferencial de Varredura) fornece interessante informação relativa às mudanças energéticas associadas às transformações estruturais durante o aquecimento da amostra. Desta forma, a área embaixo da curva é uma medida da entalpia das transições térmicas que ocorrem no substrato (142). A curva DSC da lignina de eucalipto, sem irradiar, mostra uma temperatura de transição ( $T_t$ ) em 370 K, e quando irradiada ( $\lambda > 254 \text{ nm}$ ) em estado sólido em diferentes fluências, sofre um deslocamento para 380 K. Estes valores encontram-se de acordo com os encontrados para sulfonatos de lignina (143). Sabe-se da literatura que no caso das ligninas obtidas por hidrólise com ácido sulfúrico, as transições ocorrem em três etapas (144):

entre 220 e 250 K há condensação e quebra das cadeias laterais; entre 300 e 400 K ocorrem a pirólise e formação de radicais livres e, finalmente, na terceira etapa, acima de 500 K acontece simultaneamente uma série de reações de degradação e condensação.

Obteve-se uma razoável correlação entre a entalpia da transição, calculada em base à entalpia do índio, e a fluência utilizada para fotolisar a lignina de eucalipto (Figura III.12). O fato da lignina aumentar sua temperatura de transição indica uma mudança estrutural da mesma, tornando-a mais resistente à degradação térmica. Este fato reveste-se de grande importância devido ao fato da lignina, em seu estado natural, ser utilizada como elemento retardador da degradação térmica de diversos polímeros (145).

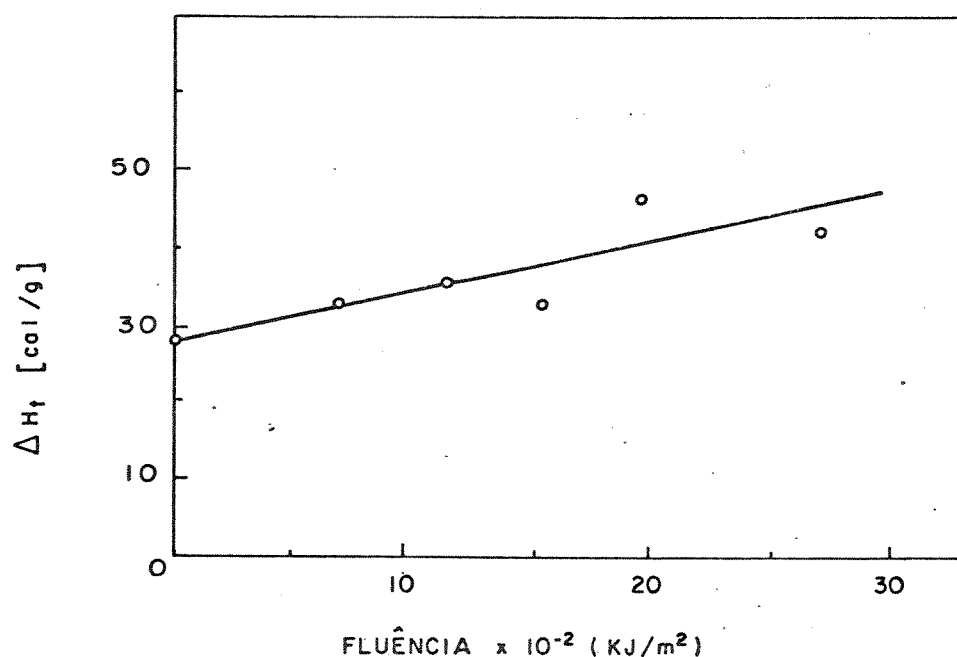


Figura III.12. Correlação entre fluência de irradiação e  $\Delta H$  de transição na LE.

### III.3. QUIMILUMINESCÊNCIA DA LIGNINA EM MEIO BÁSICO

A quimiluminescência é o resultado de reações que levam à formação de produtos em estado eletronicamente excitado. Algumas dessas moléculas excitadas podem desativar-se com a emissão de fótons ou transferir sua energia de excitação a outras moléculas, as quais a sua vez podem emitir fótons (146). Este fenômeno tem-se transformado numa valiosa técnica para avaliar modificações nas estruturas poliméricas (147).

A reação de autooxidação da lignina apresenta quimiluminescência com uma cinética de decaimento característica (Figura III.13). Uma excelente revisão dos possíveis mecanismos desta reação da lignina, em meio alcalino, foi realizada por Kin e col. (148). Nestes mecanismos não se incluem as reações quimiluminescentes aqui reportadas. A natureza das espécies ativadas geradas no meio da reação, e responsáveis pela quimiluminescência, foi investigada com a utilização de compostos modelo e com a análise dos espectros de emissão quimiluminescente.

Inicialmente foram utilizados reagentes aceltadores emissivos e supressores da emissão para as possíveis espécies ativadas, que incluem compostos eletronicamente excitados e espécies reduzidas de oxigênio, geradas no meio reacional (ver Apêndice).

O efeito provocado por esses reagentes na emissão de vanilina e ácido vanil pirúvico em meio alcalino é mostrado na Tabela III.3. Esta tabela mostra a emissão integrada de cada composto modelo de lignina na presença dos agentes específicos.

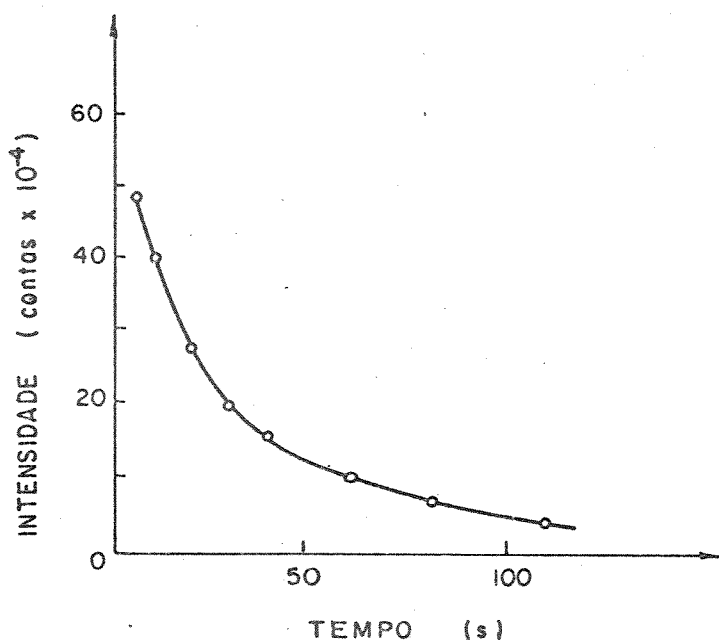


Figura III.13. Emissão fotônica da LE em meio básico.

Uma indicação da presença de oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) na reação quimiluminescente da vanilina em meio básico é o efeito do DABCO (1,4-diazobiciclo [2.2.2] octano). A modificação da cinética de quimiluminescência na presença de DABCO, tem sido interpretada na literatura como sendo devida à presença de  $^1\text{O}_2$  (149). Por outro lado, a reação realizada em água deuterada indica um significativo efeito intermolecular de átomo pesado que ratifica a presença dessa espécie no meio reacional. A autooxidação da vanilina em presença de azoteto de sódio confirma esta afirmação. Este íon inibe a emissão de luz (Tabela III.3) por  $^1\text{O}_2$ , transformando-o em oxigênio molecular (triplete no estado fundamental) de acordo à seguinte reação (150):

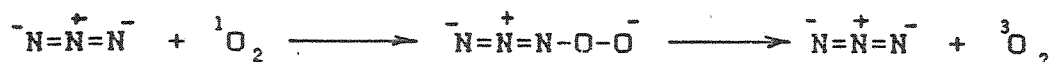


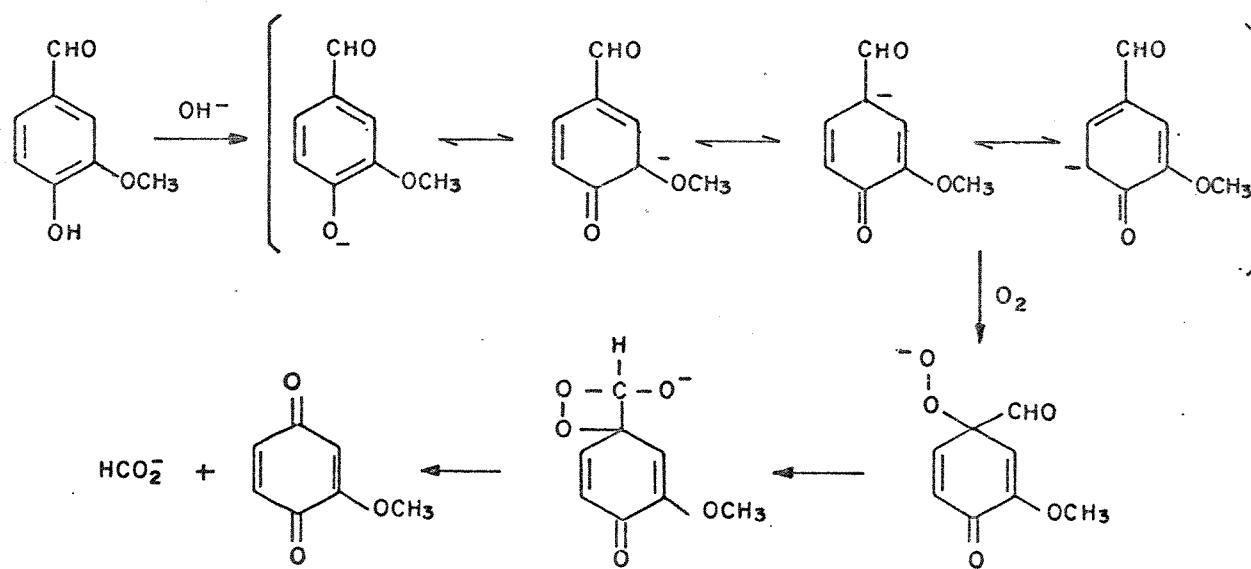


Tabela III.3. Influência de varios agentes na quimiluminescência da vanilina e ácido vanilpirúvico em meio básico. .

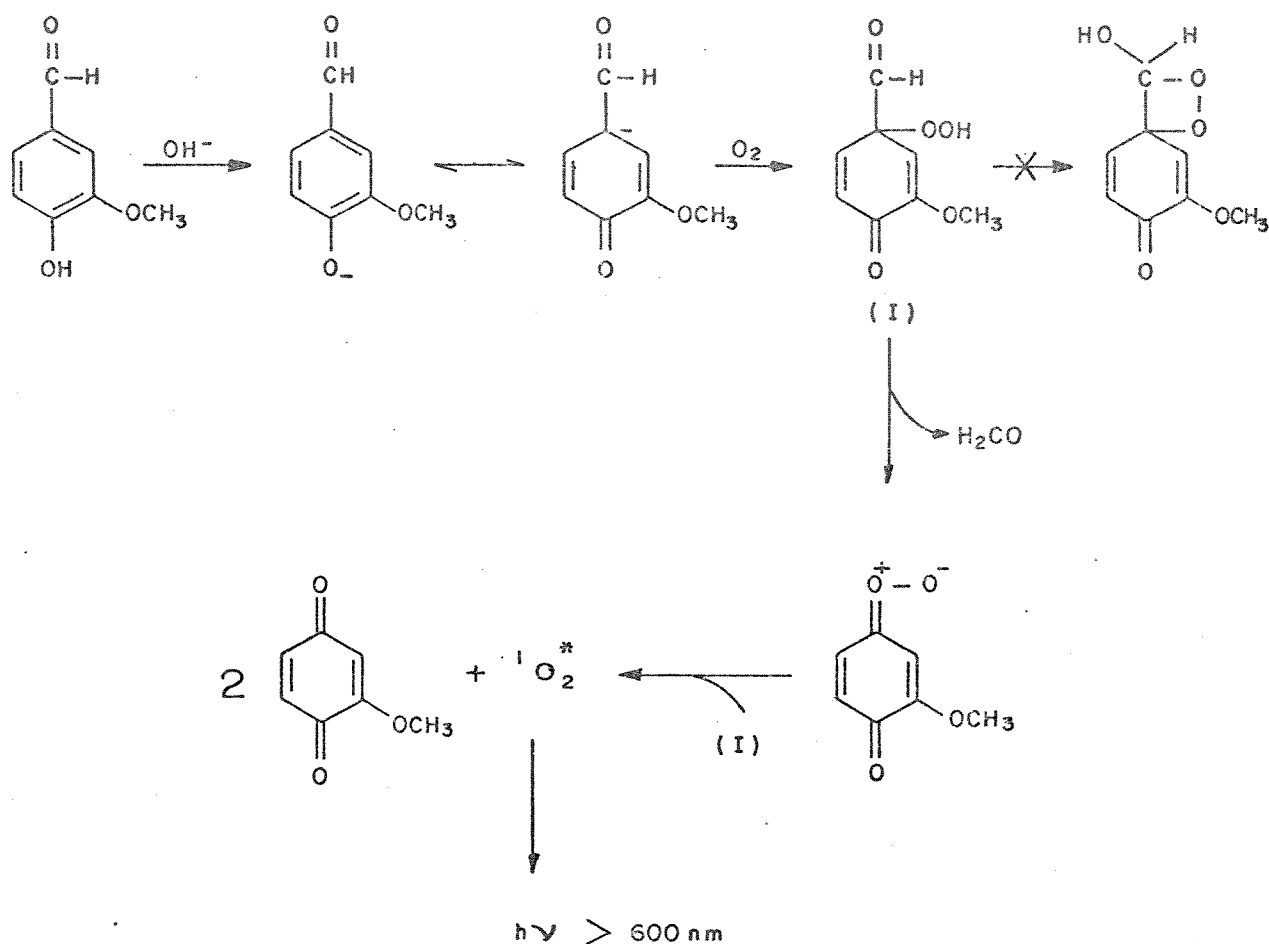
| Agentes                             | Contagens Integradas em 3 min x 10 <sup>-4</sup> |                     |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------|
|                                     | vanilina                                         | ácido vanilpirúvico |
| Controle                            | 1,5                                              | 21,3                |
| DABCO (20 mM)                       | 2780,0                                           | 10,0                |
| D <sub>2</sub> O/dioxano            | 40,6                                             | 21,0                |
| N <sub>3</sub> <sup>-</sup> (20 mM) | 0,8                                              | 21,0                |
| Benzoato de sódio (10 mM)           | 0,9                                              | 21,5                |
| Rosa de Bengala (5 µM)              | 111,0                                            | 60,0                |
| Eosina Y (5 µM)                     | 255,0                                            | 89,1                |
| DPAS (20 µM)                        | 1,2                                              | 20,0                |
| DBAS (20 µM)                        | 1,3                                              | 30,2                |
| Ácido ascorbico (10 mM)             | 0,0                                              | 0,0                 |

O radical hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ), sugerido pela reação com benzoato de sódio, também contribui para a quimiluminescência do sistema. Nesta reação, o benzoato é descarboxilado gerando fenol (151).

O mecanismo de autooxidação da vanilina proposto na literatura (152,153) envolve um intermediário de tipo dioxetano, com a formação de metoxiquinona, como mostrado no esquema I. Esse mecanismo implica na formação de uma espécie carbonílica excitada, a qual não foi detectada pela reação com DBAS e DPAS. Sabe-se que estes reagentes, por transferência de energia, atuam como aceitadores emissivos da emissão de carbonilas excitadas, respectivamente, em estado triplete e singlete (154,155). Portanto, postulou-se um mecanismo que envolve a formação de um intermediário hidroperoxido, o qual, por um mecanismo de Benson (156), produziria oxigênio singlete (esquema II).



Esquema I. Mecanismo de autooxidação da vanilina (152,153).



Esquema II. Mecanismo proposto para a autooxidação da vanilina.

A indicação mais relevante da presença de  $\text{O}$  e da ausência de carbonilas eletronicamente excitadas, é o espectro de emissão da vanilina. Este espectro foi obtido num contador de fótons e é mostrado na figura III.14, onde se observa emissão de luz a comprimentos de onda maiores que 600 nm (157).

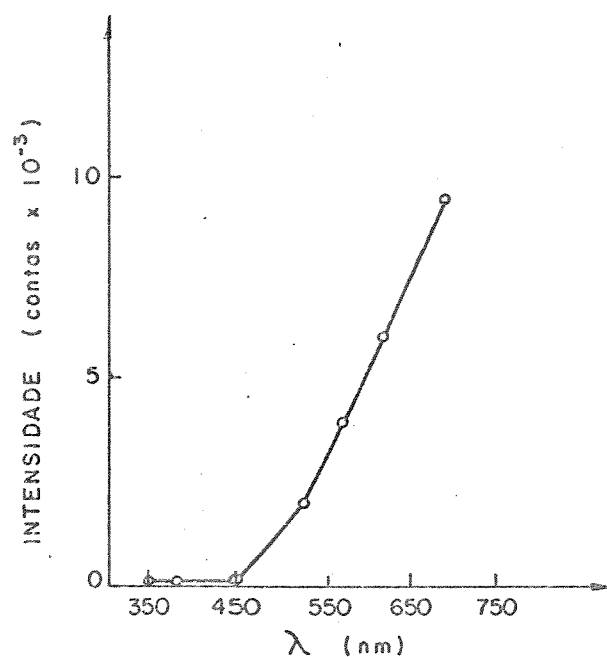
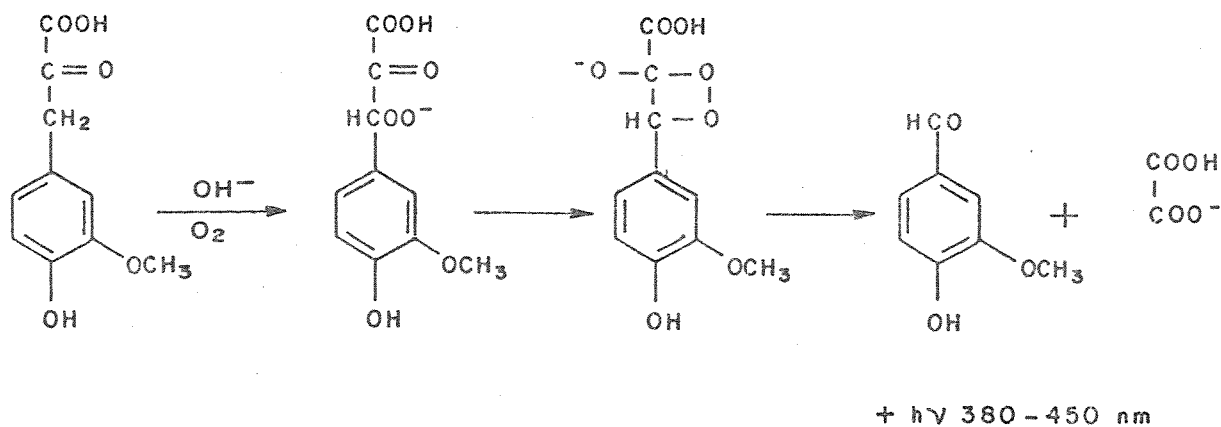


Figura III.14. Distribuição espectral da quimiluminescência da vanilina, integrada em 3 minutos.

No caso da reação do ácido vanilpirúvico com hidróxido de sódio, foram detectadas carbonilas excitadas como responsáveis pela quimiluminescência do sistema (Tabela III). Esta observação baseia-se na reação do sistema em presença de DBAS e DPAS. Desta forma foi possível propor um mecanismo para a reação, na qual há formação destas espécies (esquema III).

Resultados similares foram observados nos outros compostos modelo da lignina, tais como ácido vanilínico e ácido ferúlico. A distribuição espectral da quimiluminescência destes modelos (Figura III.15), indica a presença de carbonilas aromáticas (400-500 nm) (89) e quinonas (500-600 nm) eletronicamente excitadas (158).



Esquema III. Mecanismo proposto para a autooxidação do ácido vanil pirúvico.

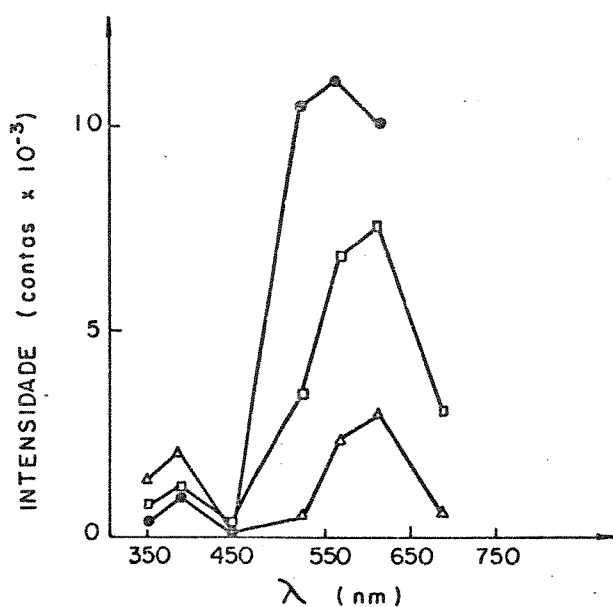


Figura III.15. Distribuição espectral da quimiluminescência a partir de modelos de lignina: (●) ácido vanilpirúvico, (□) ácido vanilínico e (Δ) ácido ferúlico. Integração em 3 minutos.

O espectro de emissão da lignina de eucalipto (Figura III.16), indica a formação de todas as espécies ativadas encontradas na autooxidação dos compostos relacionados à lignina. Isto é, cetonas e quinonas eletronicamente excitadas, assim como oxigênio singlete, são gerados durante a reação do polímero em meio básico. Deve-se destacar que só oxigênio singlete foi citado na literatura, como espécie ativa na autooxidação da lignina (159). Levando-se em conta esses fatos, foi proposto um mecanismo geral de autooxidação da LE, mostrado na figura III.17.

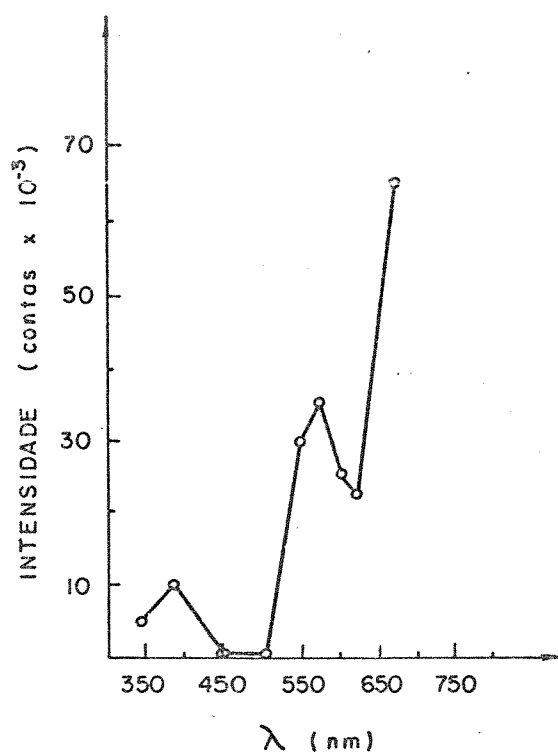


Figura III.16. Distribuição espectral da quimiluminescência da lignina de eucalipto. Integração em 3 minutos.

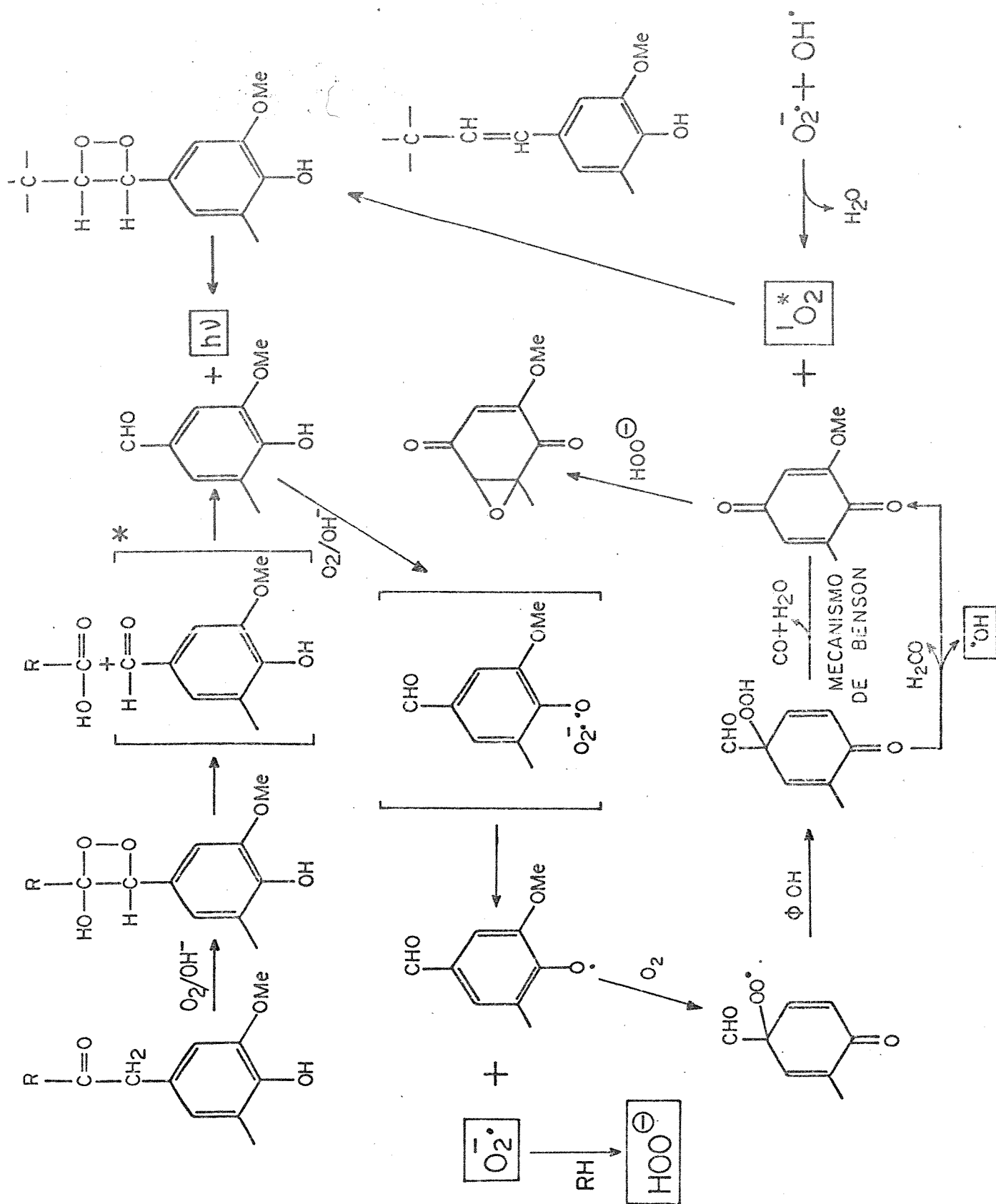
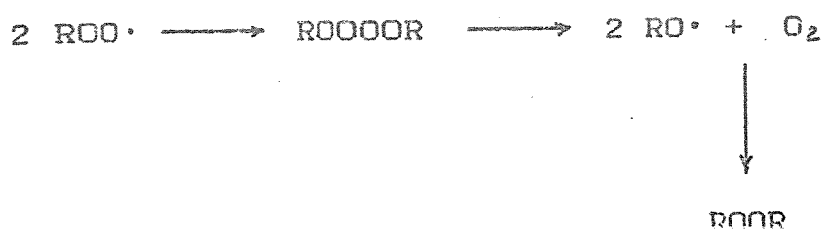


Figura III.17. Mecanismo geral de autooxidação proposto para LE.

A emissão de luz pelo sistema  $LE/OH^-$  é proveniente de uma reação exoenergética, e foi de nosso interesse o cálculo da energia de ativação da reação. Para isso, a cinética da reação foi acompanhada a diferentes temperaturas e os valores integrados da emissão colocados numa equação de Arrhenius (ver II.4.2) (Figura III.18). A energia de ativação ( $E_a = 6,18 \pm 0,46$  Kcal/mol) foi obtida do coeficiente angular da reta. O resultado obtido coincide com os valores reportados na literatura para a recombinação de radicais peroxila, com formação de tetróxidos o posterior liberação de luz, como mostrado na seguinte equação (160):



A lignina de eucalipto fotolizada a diferentes fluências não apresentou uma correlação com a equação de Arrhenius. Provavelmente isto ocorre porque as transformações induzidas na lignina com a irradiação, estimulam uma recombinação aleatória de radicais que independe da temperatura. No entanto, a fotólise da LE modifica a cinética da quimiluminescência do sistema  $LE/OH^-$ . Na figura III.19 observa-se que na lignina irradiada entre 2000 e 4000  $KJ/m^2$  ocorre a máxima emissão, sendo que a tempos maiores de fotólise a lignina torna-se mais resistente à emissão de luz. Isto mostra que a lignina irradiada a baixas fluências comporta-se como uma lignina pouco modificada, aumentando gradativamente a emissão em meio alcalino. Posteriormente, com o aumento da fluência, a lignina adquire uma estrutura que a torna mais antioxidante.



mais antioxidante.

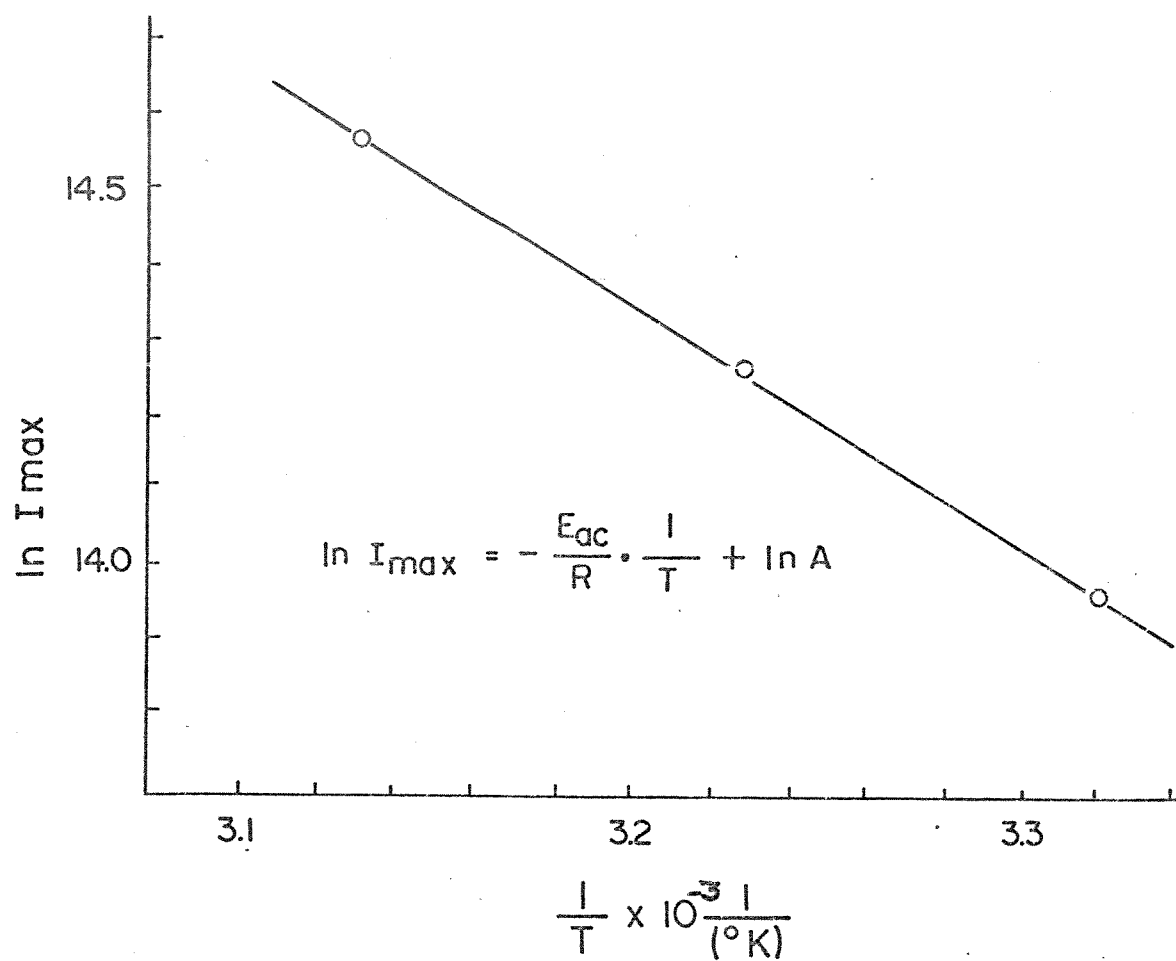


Figura III.18. Gráfico de Arrhenius da emissão fotónica integrada da LE em meio básico

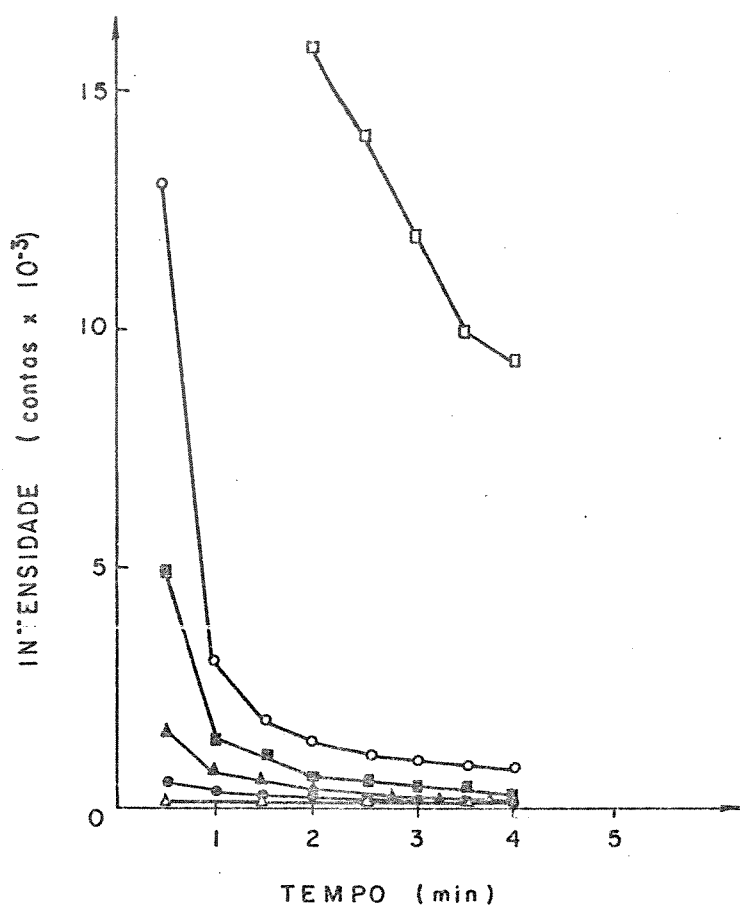


Figura III.19. Emissão da LE irradiada às fluências de: (●) 0,0 KJ/m<sup>2</sup>, (▲) 390 KJ/m<sup>2</sup>, (■) 1015 KJ/m<sup>2</sup>, (□) 2030 KJ/m<sup>2</sup>, (○) 4060 KJ/m<sup>2</sup> e (△) 8120 KJ/m<sup>2</sup>.

Klein e col. (88) demonstraram, por medidas de absorbância, que a formação de cromóforos aumenta até 1,5 horas de exposição à irradiação com luz ultravioleta e que posteriormente, a lignina recupera suas propriedades antioxidantes, formando uma estrutura mais complexa que a nativa.

Um método utilizado para confirmar as alterações mais significativas na estrutura da lignina, foi o teste da quimiluminescência do luminol (161). Este sistema é constituído por luminol,  $H_2O_2$  e  $Fe(II)$ . A emissão de luz por esta reação é resultante da oxidação do luminol, como mostrado na figura III.20.

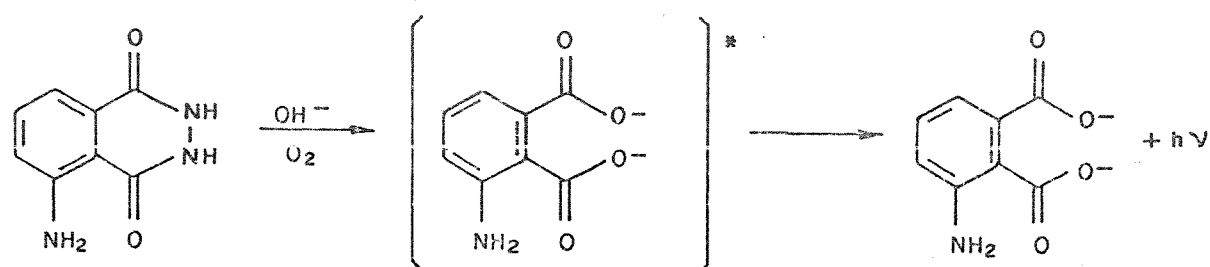


Figura III.20. Mecanismo de emissão de luz pelo sistema de luminol.

A emissão de luz é totalmente suprimida quando a lignina de eucalipto sem irradiar é colocada neste sistema, como esperado pelas conhecidas propriedades da lignina como antioxidante (162,163). No entanto, este efeito supressor começa a desaparecer quando a lignina é previamente irradiada com fluências superiores a  $1000\text{ KJ/m}^2$ . Após irradiação por tempos maiores, fluências acima de  $8000\text{ KJ/m}^2$ , as propriedades antioxidantes da lignina são recuperadas (Figura III.21). Estes resultados confir-

mas aqueles obtidos com o sistema LE/OH<sup>-</sup> e sugerem que na lignina irradiada a baixas fluências há formação de novos cromóforos e que a maiores fluências, como consequência do acúmulo de estruturas radicalares, ocorre polimerização. Esta formação e diminuição de radicais com a fotólise, é confirmada pela literatura recentemente publicada (164).

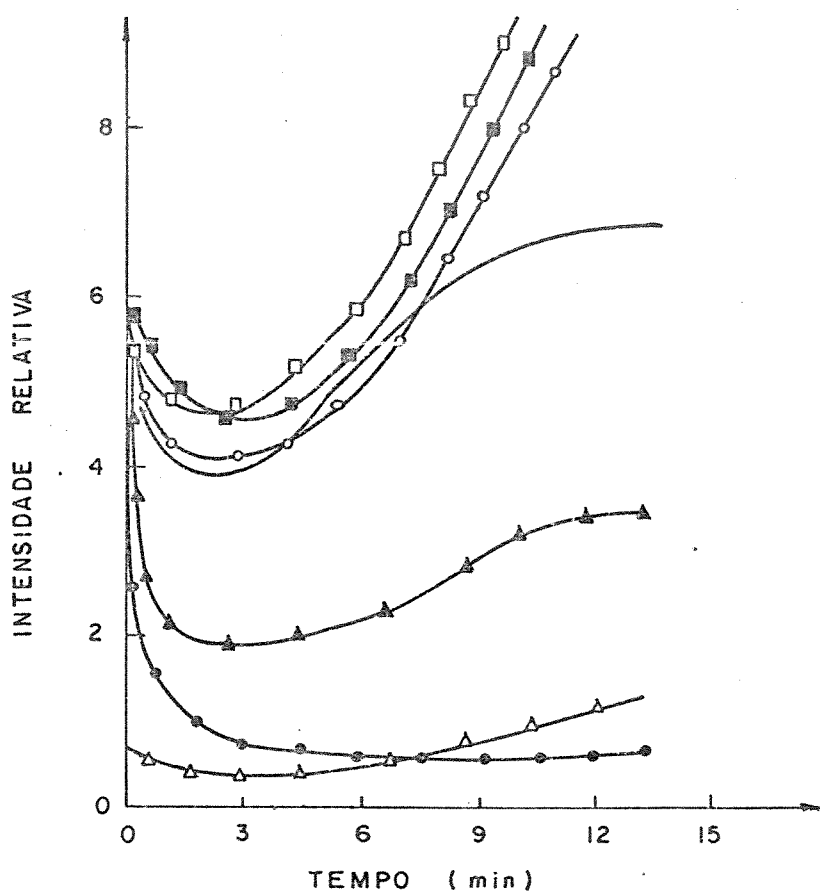


Figura III.21. LE fotolisada a diferentes fluências e adicionada ao sistema de luminol: (●) 0,0 KJ/m<sup>2</sup>, (▲) 390 KJ/m<sup>2</sup>, (■) 1015 KJ/m<sup>2</sup>, (□) 2030 KJ/m<sup>2</sup>, (○) 4060 KJ/m<sup>2</sup> e (Δ) 8120 KJ/m<sup>2</sup>.

### III.4. DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DA LIGNINA

É sabido que a degradação da lignina por fungos ocorre através de enzimas extracelulares as quais formam parte de um complexo de 10 hemoproteínas, responsáveis pela clivagem da ligação  $C_{\alpha}-C_{\beta}$  da cadeia lateral do polímero (165). Neste estudo pretende-se trazer novos antecedentes com respeito ao mecanismo da degradação fungal utilizando-se o sistema enzimático da peroxidase de rabanete (HRP)/ $H_2O_2$  agindo sobre a lignina. A enzima HRP utilizada neste estudo como modelo de ligninase, possui um grupo porfirínico, um átomo de ferro por molécula e apresenta um peso molecular de 40.500. A liberação do sistema enzimático pelos fungos que degradam lignina é induzido pela presença do polímero. Este sistema enzimático natural tem características de peroxidase, e uma das enzimas responsável pela clivagem da ligação  $C_{\alpha}-C_{\beta}$  corresponde a uma peroxidase de peso molecular 42.000 (84,166).

Numa primeira etapa estudou-se a fotoemissão do sistema HRP/ $H_2O_2$  e o comportamento emissivo quando a lignina dio-xano (LD), irradiada a diferentes fluências, foi colocada em tal sistema. O objetivo desta experiência foi utilizar o sistema enzimático como medida das modificações estruturais que sofre o polímero quando fotolisado. A figura III.22 mostra que a LD irradiada apresenta a máxima emissão entre as fluências de 2000 e 4000  $KJ/m^2$ , sendo que a lignina sem irradiar e aquela irradiada com fluências maiores que 4000  $KJ/m^2$  inibem consideravelmente a quimiluminescência do sistema. Este resultado coincide com o encontrado para a lignina de eucalipto (LE) no sistema quimiluminescente  $LE/OH^-$  (ver Figura III.19). Assim pode-se deduzir que aparentemente a faixa de fluências em que ocorre a maior modificação da lignina corresponde a fluências entre 2000 e 4000  $KJ/m^2$ ,

fato demonstrado por dois sistemas diferentes que são quimiluminescência em meio alcalino e sistema enzimático. Também é importante destacar que a faixa encontrada para melhor modificar a lignina é a mesma para duas ligninas de procedência e métodos de extração diferentes, como são a lignina de eucalipto isolada com ácido sulfúrico (LE) e a lignina de casca de arroz extraída com dioxano (LD).

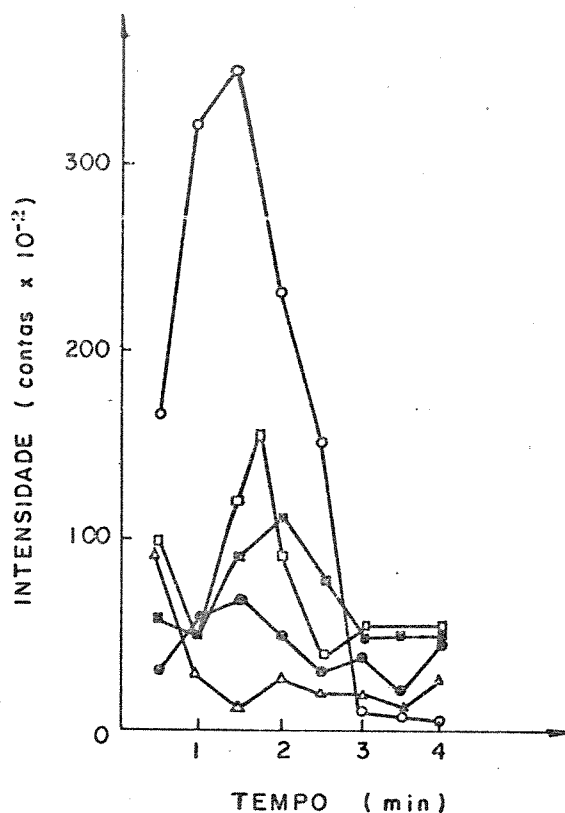


Figura III.22. Quimiluminescência do sistema HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/LD. A lignina foi irradiada às seguintes fluências: (●) 0,0 KJ/m<sup>2</sup>, (■) 1015 KJ/m<sup>2</sup>, (□) 2030 KJ/m<sup>2</sup>, (○) 4060 KJ/m<sup>2</sup> e (Δ) 8120 KJ/m<sup>2</sup>.

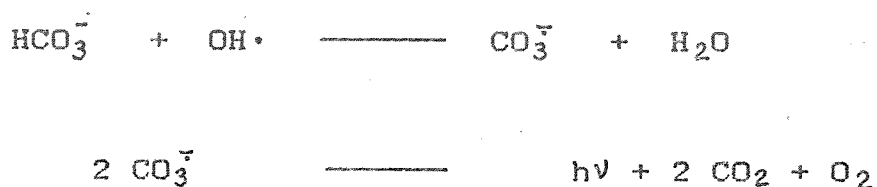
Espécies reduzidas de oxigênio ou eletronicamente excitadas, responsáveis pela emissão, foram analisadas utilizando-se agentes aceitadores emissivos e supressores da emissão do sistema enzimático. A emissão integrada de cada uma destas experiências é mostrada na tabela III.4.

Tabela III.4. Influência de vários agentes sobre a emissão do sistema HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/LD

| Agente                                        | Contagens Integradas em 3 min $\times 10^{-4}$ |
|-----------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Controle (HRP/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) | 22,7                                           |
| HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (10 mM)         | 22,0                                           |
| Controle + lignina (a)                        | 59,1                                           |
| SOD (60 U)                                    | 48,7                                           |
| SOD desnaturado (60 U)                        | 59,0                                           |
| Formiato de sódio (100 mM)                    | 56,0                                           |
| DPAS (50 mM)                                  | 59,0                                           |
| DBAS (50 mM)                                  | 59,0                                           |
| HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (10 mM)         | 84,7                                           |
| HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (20 mM)         | 224,1                                          |
| DABCO (10 mM)                                 | 14,0                                           |

(a) 0,27 mg/ml.

Nesta tabela observa-se que para o sistema controle (HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) não há formação do radical hidroxila, o que é demonstrado pela reação com bicarbonato de sódio. Quando lignina é adicionada ao sistema enzimático na presença de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, há um aumento na emissão de 1,4 e 3,8 vezes, respectivamente, para 10 mM e 20 mM de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Ou seja, a formação de radicais hidroxila é induzida pela lignina no sistema enzimático. O aumento da quimiluminescência do sistema com HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> poderia ser gerado por uma reação de transferência de hidrogênio do íon bicarbonato ao radical hidroxila, de acordo ao seguinte esquema (167):



O ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) foi detectado no sistema enzimático mediante a reação com a enzima superóxido dismutase (SOD), a qual inibe seletivamente a quimiluminescência produzida por este ânion (168). Portanto, outra fonte provável de quimiluminescência seria a reação do ânion superóxido com o radical hidroxila, reação que ocorre conforme a seguinte equação (169):



No sistema reacional não foram detectadas carbonilas excitadas, como mostrado nas experiências com DBAS e DPAS. Oxigênio singlete poderia ser também outra fonte de emissão, já que ele encontra-se presente no sistema. A reação com DABCO prova este último fato.

A emissão de luz pelo sistema enzimático ocorre



concomitantemente com a degradação da lignina. Isto pode ser observado nos espectros de fluorescência mostrados na figura III.23 que indicam a formação de um cromóforo que emite em 460 nm quando a lignina é incubada no sistema HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

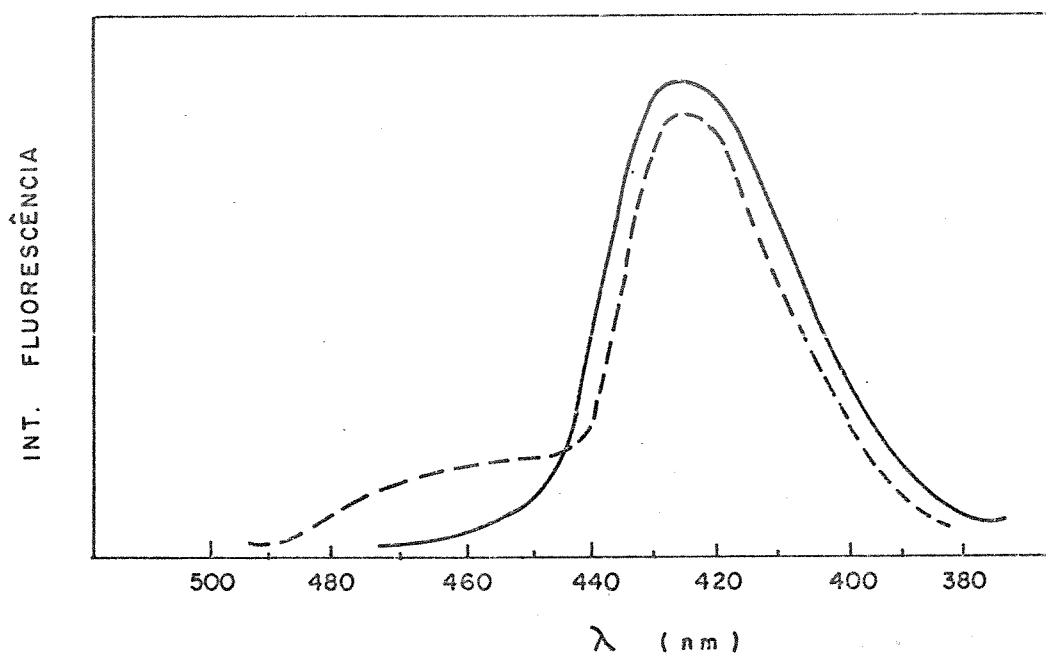


Figura III.23. (—) Espectro de fluorescência da LE e (---) da LE incubada no sistema enzimático HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A cinética de formação deste novo composto foi acompanhada fixando-se o comprimento de onda de emissão de fluorescência em 460 nm e processando-se a reação em presença de SOD e formiato de sódio para determinar, respectivamente, a importância das espécies O<sub>2</sub><sup>-</sup> e OH<sup>•</sup>, na degradação da lignina pelo sistema

enzimático. Na figura III.24 observa-se que SOD não altera a cinética e portanto  $O_2^{\cdot -}$  não participa na reação de degradação da lignina. O formiato inibe moderadamente a formação do novo cromóforo, indicando que  $OH^{\cdot}$  não é a espécie de maior atividade lignolítica. Resultados recentemente publicados na literatura demonstraram que o radical hidroxila não desempenha um papel importante na biodegradação, apesar desta espécie estar presente no meio fungal (170).

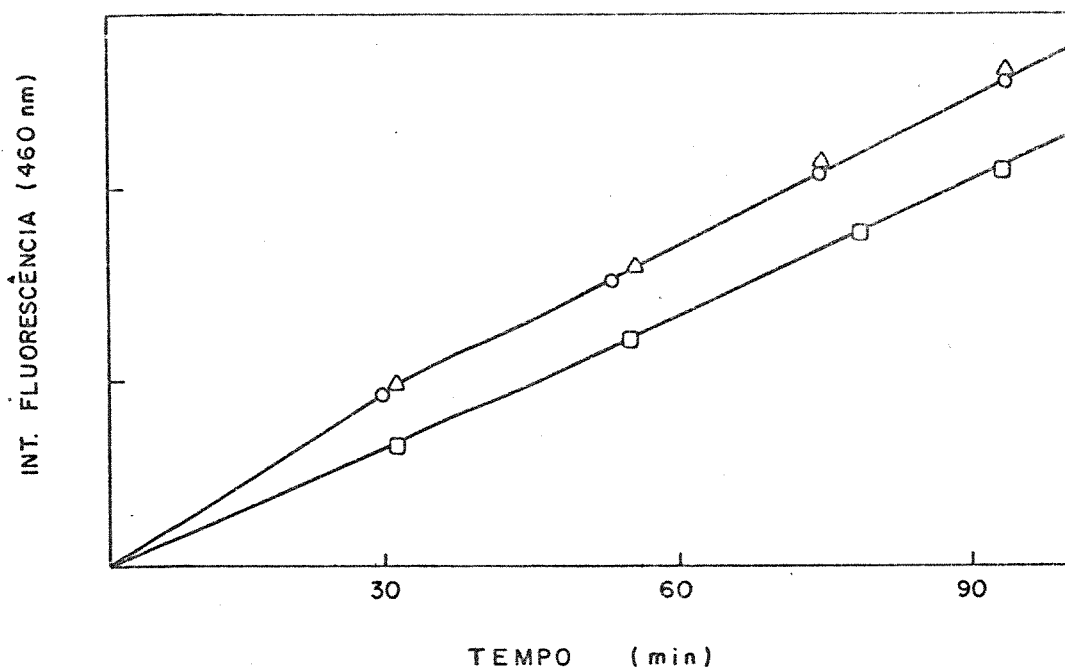


Figura III.24. Cinética de degradação da LE nos sistemas: (○) HRP/ $H_2O_2$ /LE, (Δ) HRP/ $H_2O_2$ /LE/SOD (60 U) e (□) HRP/ $H_2O_2$ /LE/formiato (100 mM).

A oxidação de compostos fenólicos e ligninas por HRP tem sido objeto de muitos estudos em relação a sua participação na biogênese e biodegradação de ligninas (171). Atualmente sabe-se que as enzimas lignolíticas provenientes do fungo são de tipo peroxidase (172,173), portanto, foi estudado o ciclo da enzima HRP utilizando-se LD como substrato. O estudo foi inicialmente acompanhado mediante espectrofotometria. A figura III.25A mostra que a adição de lignina à espécie HRP-I (obtida adicionando-se quantidades equimolares de  $H_2O_2$  sobre HRP nativa) provoca uma rápida transformação de HRP-I em HRP-II. A cinética desta transformação, acompanhada a 411 nm, é mostrada na figura III.25 B. Observa-se claramente nesta figura, que a espécie HRP-I apresenta atividade frente à lignina. Sabe-se que a transformação de HRP-I em HRP-II é promovida por grupos fenólicos livres (174). Portanto pode-se sugerir que a espécie HRP-I agiria sobre os grupos hidroxila-fenólicos livres da lignina provocando alguma reação de degradação no polímero.

Quando  $H_2O_2$  é adicionado em excesso sobre a peroxidase nativa, é produzida a espécie HRP-III com bandas de absorção características no espectro visível (416 nm, 546 nm e 673 nm) (175). A figura III.26A mostra essa transformação. Neste caso observa-se que a espécie HRP-III também apresenta atividade frente à lignina com uma cinética de reação que é mostrada na figura III.26B.

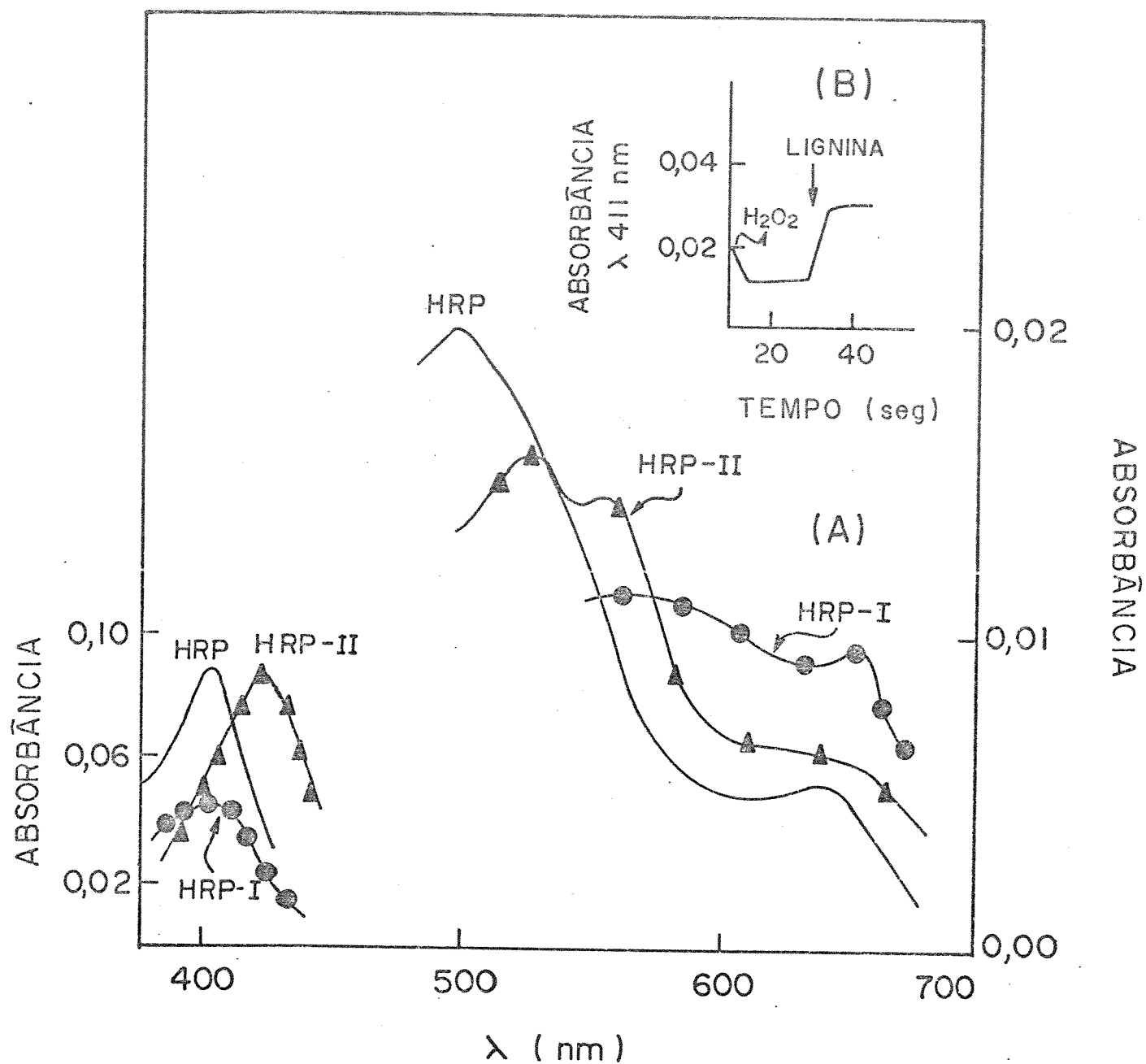


Figura III.25. Comportamento espectral da peroxidase durante a degradação da LD (0,7  $\mu\text{g/ml}$ ). (A) HRP nativa (—), HRP-I (●), HRP-II (▲) e (B) cinética da transformação acompanhada em 411 nm (ver II.3.12, p. 44).

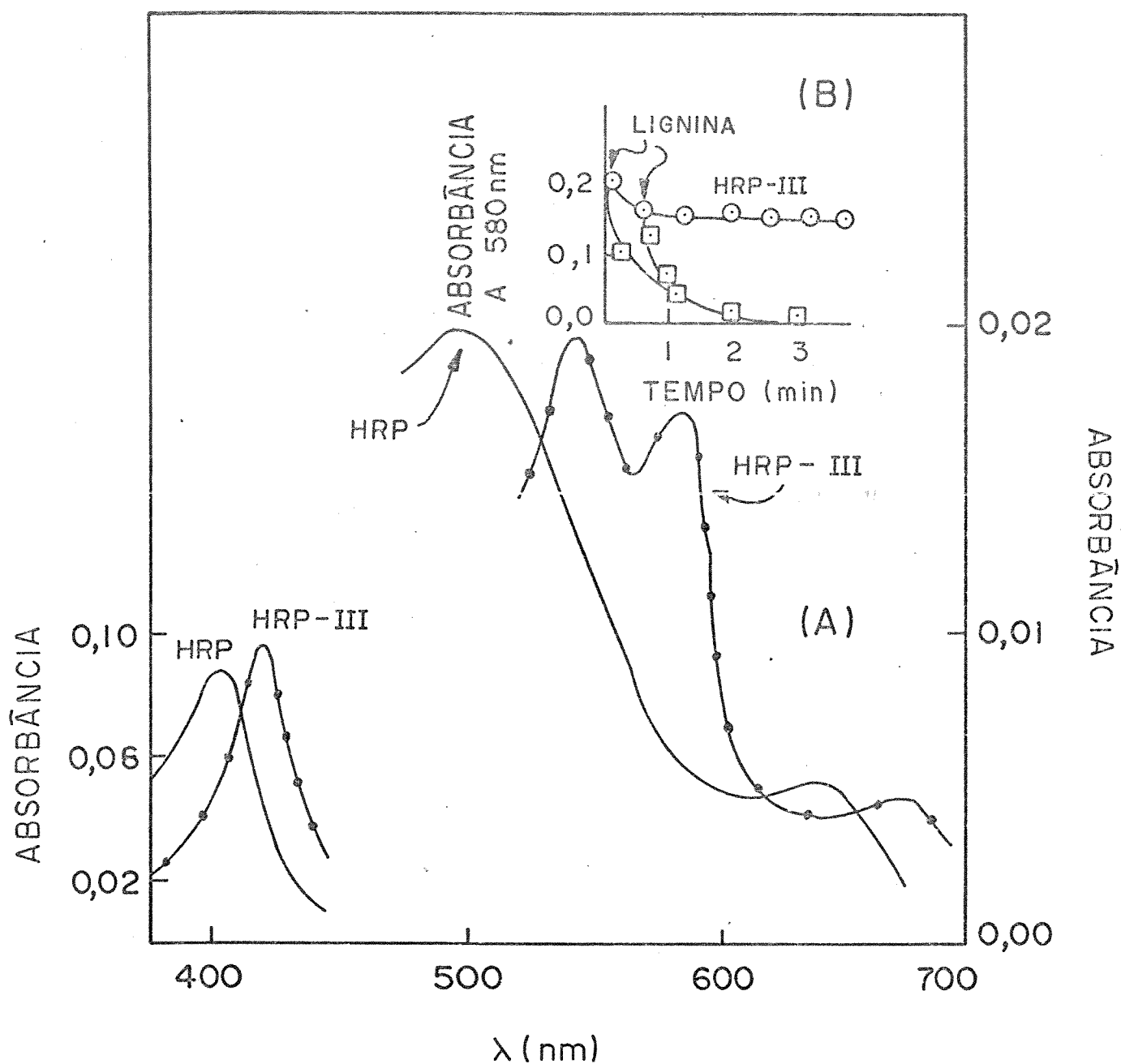


Figura III.26. Comportamento espectral da poroxidase durante a degradação da LD ( $0,7 \mu\text{g/ml}$ ). (A) HRP nativa (—), HRP-III (●) e (B) decaimento de HRP-III antes (○) e após (□) a adição de LD (ver II.3.12, p. 44).

Em resumo, os compostos HRP-I e HRP-III são consumidos rapidamente na presença de lignina transformando-se, respectivamente, em HRP-II e HRP-I. Da literatura sabe-se que a espécie HRP-II apresenta atividade, com uma velocidade maior que HRP-III, frente a estruturas fenólicas similares à lignina. Por exemplo as velocidades de reação reportadas para grupos guaiacila (4-hidroxil-3-metoxibenzeno) frente à HRP-II e HRP-III, são, respectivamente,  $3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  e  $9 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (176).

Resultados análogos foram obtidos fazendo-se o estudo por meio de dicroísmo circular (CD). Na figura III.27 observam-se os espectros de CD para as diferentes espécies de peroxidase. A cinética de degradação da lignina frente às espécies HRP-I e HRP-III, acompanhadas a 430 e 425 nm respectivamente, é mostrada em destaque na mesma figura.

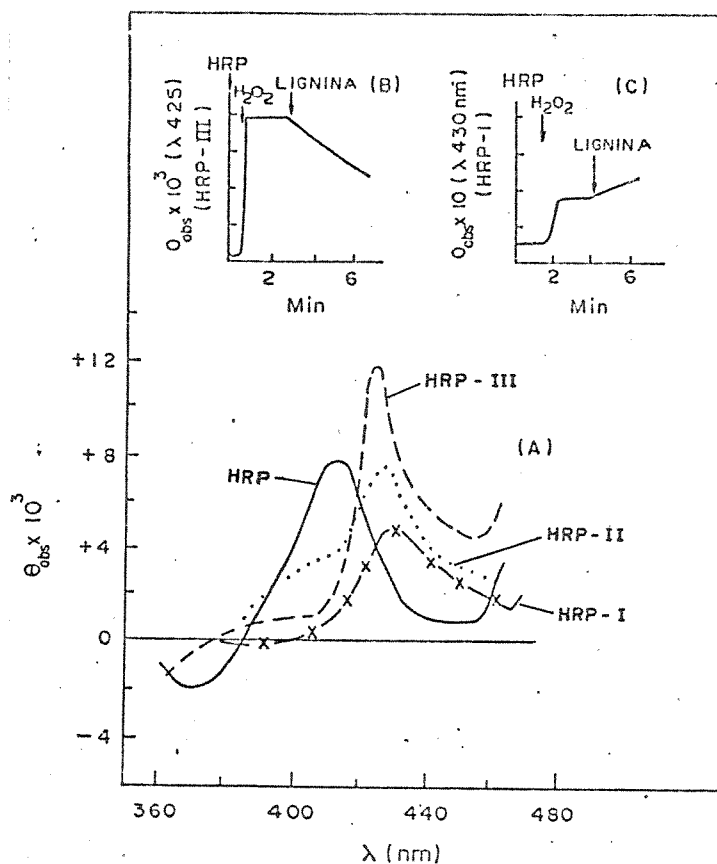
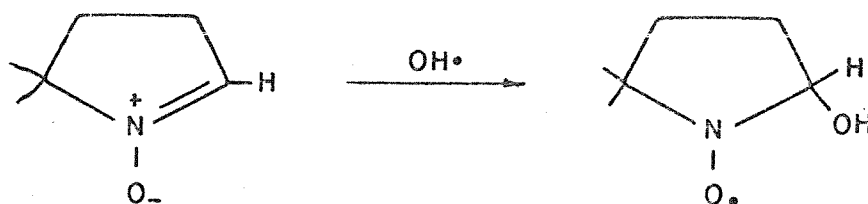


Figura III.27. (A) Espectros de DC das espécies de peroxidase e (B) atividade de HRP-I e HRP-III frente a LD.

Conclui-se portanto que as espécies HRP-I e HRP-II teria atividade lignolítica frente às estruturas fenólicas livres presentes na lignina, levando à formação de radicais fenoxila, com posterior quebra da cadeia lateral. A formação de radicais fenoxila por HRP agindo sobre fenóis foi reportada anteriormente (177)

A detecção de radicais no meio reacional foi realizada mediante ressonância paramagnética eletrônica (RPE). Esta técnica permitiu acompanhar a formação de derivados destes radicais fazendo-se a reação na presença de 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO). Esta reação, mostrada a seguir, produz radicais estáveis, de tipo nitróxido, que permitem um melhor acompanhamento da reação.



Os espectros obtidos (Figura III.28), indicam a presença do aduto radicalar DMPO-OH na reação de Fenton (178) e no sistema enzimático. Na reação enzimática, observa-se também a contribuição de outros radicais, provavelmente de tipo DMPO-R que indicam a formação de radicais de carbono.

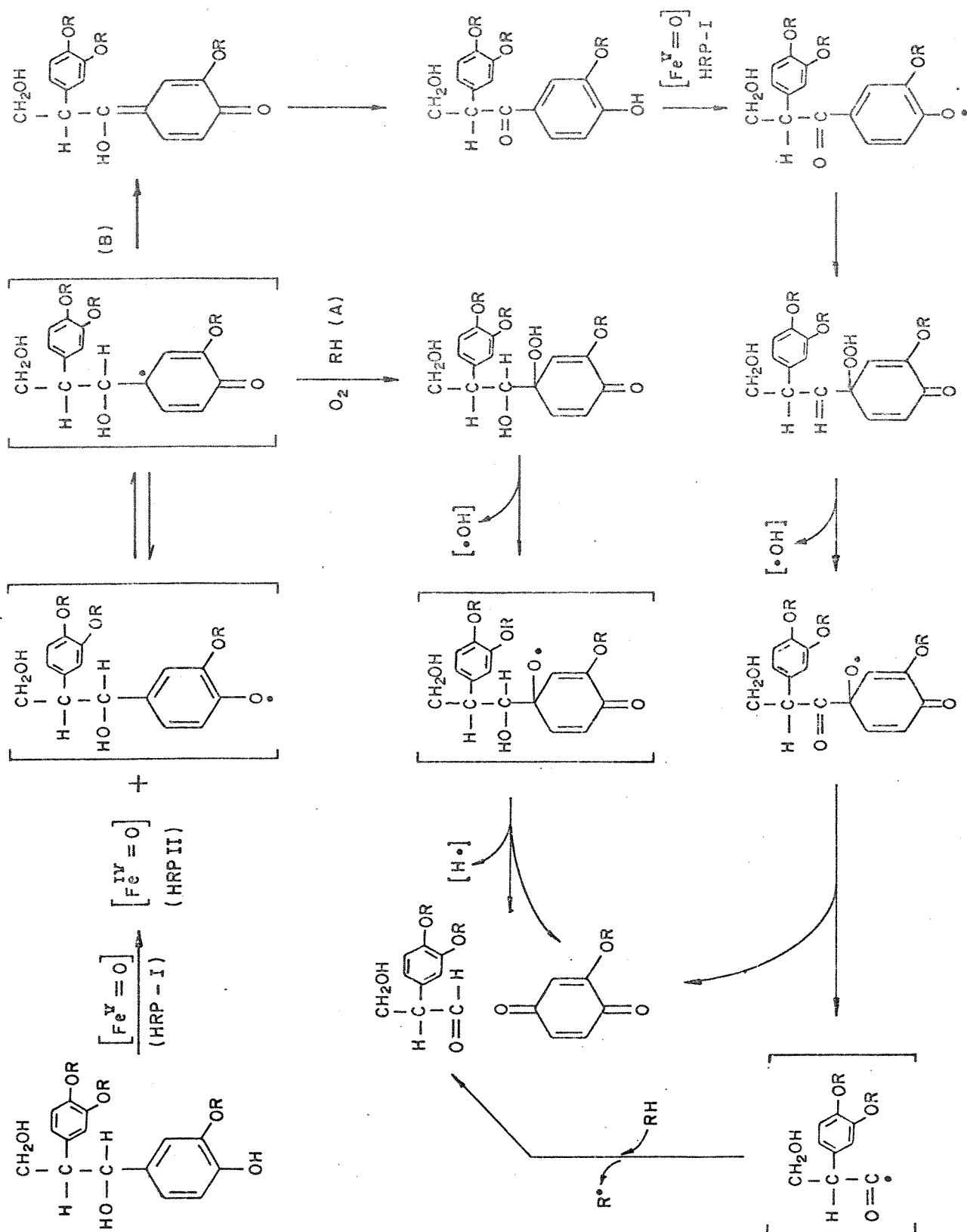
Novamente foi corroborada a formação de radicais hidroxila no sistema enzimático, os quais poderiam ser gerados na reação de peroxidação da lignina.



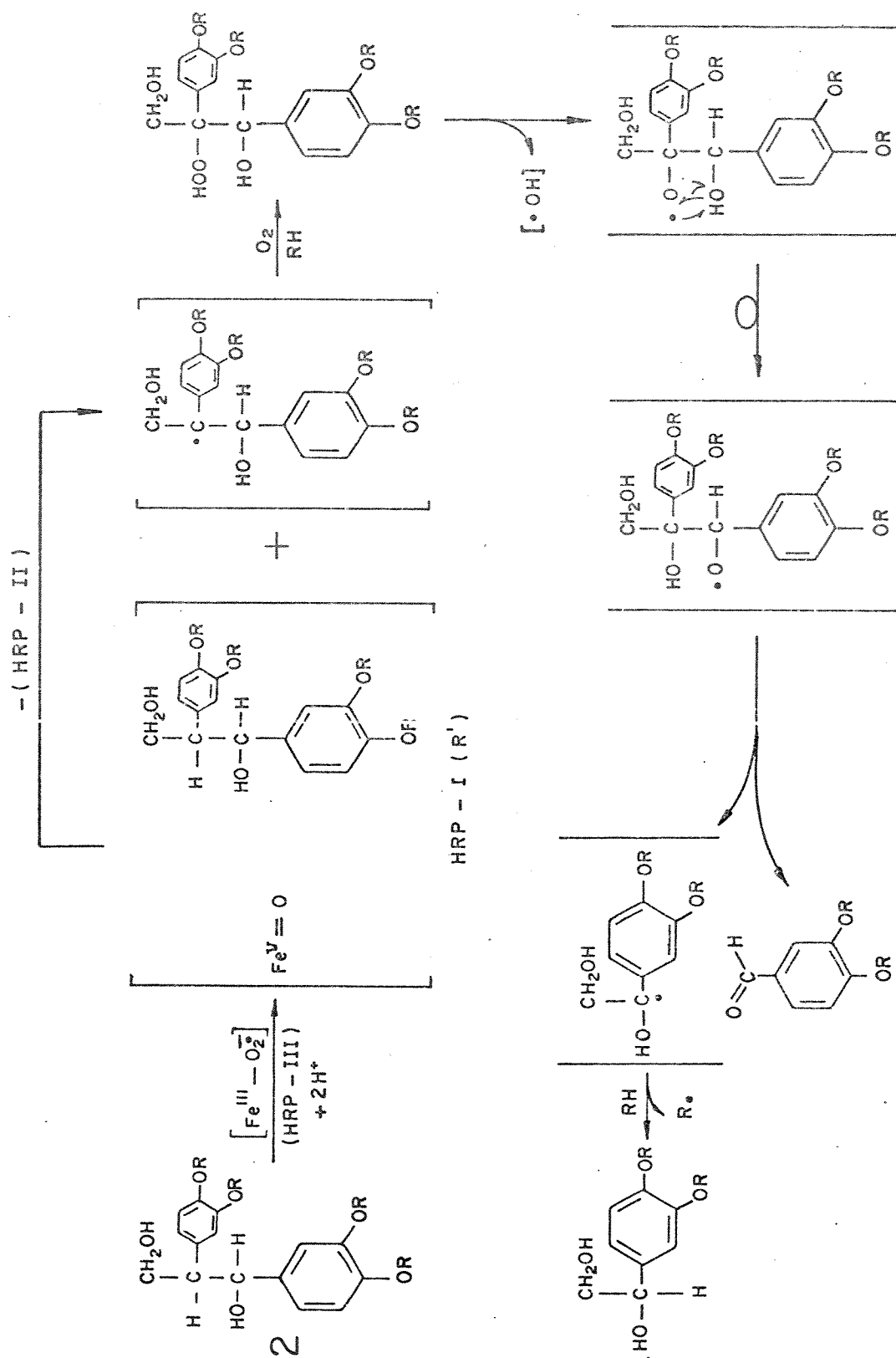
Figura III.28. Espectros de RPE dos radicais formados na reação de: (A) LD/DMPD/Fenton e (B) HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/DMPD/LD (ver II.3.13, p. 45).

Com base nos resultados de UV, DC e RPE, postula-se que um dos prováveis mecanismos para a reação da peroxidase agindo sobre a lignina é o apresentado no esquema IV, que mostra a participação da espécie HRP-I reagindo com grupos fenólicos livres da lignina. Neste mecanismo proposto observa-se que a clivagem do polímero acontece entre a cadeia lateral e o anel aromático. A formação de quinonas como produtos de reação está de acordo com o reportado por Kirk (179), quando a lignina foi incubada em sistemas fungais.





Esquema IV. Mecanismo proposto para a degradação enzimática da lignina iniciada por grupos fenólicos livres.



Esquema V. Mecanismo proposto para a degradação enzimática da lignina iniciada por radicais de carbono.

A reação mais conhecida e estudada que ocorre na biodegradação da lignina por sistemas fungais consiste na quebra da ligação  $C_{\alpha}-C_{\beta}$  da cadeia lateral do polímero (180). Este mecanismo, de acordo com nossos resultados, ocorre com a participação da espécie HRP-III agindo sobre as estruturas fenólicas substituídas (esquema V) que induz à formação de radicais de carbono na cadeia lateral da lignina, formação de peróxido e, posterior, quebra da ligação  $C_{\alpha}-C_{\beta}$ . Esta proposta baseia-se nos resultados de UV, CD e RPE que indicaram que HRP-III tem participação na degradação da lignina e que sugerem a formação de radicais de carbono.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES

## CONCLUSÕES

Nos capítulos anteriores foram analisados vários aspectos relacionados à lignina. Este estudo teve-se à caracterização da lignina e sua degradação fotoquímica, alcalina e enzimática.

Verificou-se que a irradiação das ligninas (LE e LD) com luz ultravioleta ( $\lambda > 254$  nm) modifica a estrutura do polímero. Análises de fluorescência indicaram que a fotólise da lignina em solução induz à formação de estruturas quinônicas. Estes resultados confirmam aqueles anteriormente reportados por outros autores, apesar de empregarem técnicas diferentes (100). Os resultados obtidos através da técnica de DSC, utilizada para estudar as modificações das propriedades térmicas da lignina irradiada em estado sólido, indicaram que esta adquire uma estrutura que lhe permite aumentar sua resistência à temperatura.

A reação de autooxidação da lignina ocorre com emissão de luz. Foi proposto o mecanismo desta oxidação com base na identificação das espécies reduzidas de oxigênio e eletronicamente excitadas no meio reacional. Este mecanismo postula a participação de oxigênio singlete e carbonilas eletronicamente excitadas como responsáveis pela emissão do sistema. A prova mais convincente para esta proposição consiste na detecção destas espécies mediante espectros de emissão da lignina e de compostos modelos.

A técnica da quimiluminescência da lignina em meio básico mostrou ser uma valiosa ferramenta para encontrar a faixa de fluências em que ocorreram as modificações mais significativas. A faixa de fluências encontrada, foi entre 2000 e 4000  $\text{KJ/m}^2$ .

observando-se nesta faixa, a perda das propriedades antioxidantes, propriedades estas características das ligninas.

Constatou-se que os intermediários envolvidos na autooxidação da ligninas coincidem com aqueles reportados para a reação de fotooxidação do polímero (109,110).

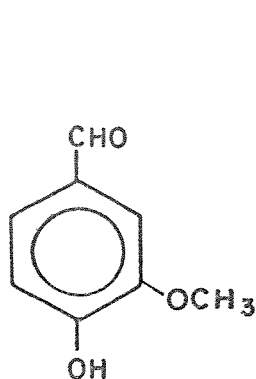
O sistema enzimático (HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) utilizado como modelo de ligninase permitiu confirmar com precisão a faixa de fluências na qual a lignina, submetida a fotólise, foi mais modificada. Esta coincide exatamente com aquela observada pelo método quimiluminescente em meio básico.

Identificou-se uma série de espécies ativadas de oxigênio no meio enzimático. Chegou-se à conclusão de que nenhuma destas era responsável pela degradação da lignina e sim a própria enzima quando em seus diferentes estados de oxidação. Mediante informação espectroscópica (UV, DC e RPE) postulou-se um mecanismo de degradação enzimática da lignina.

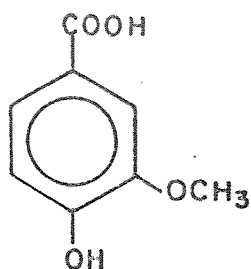
Tanto nos sistemas fotoquímico e alcalino como no enzimático foram detectadas espécies radicalares de tipo fenoxila, como intermediários da reação. Essa informação nos leva a supor que as enzimas lignolíticas naturais reconhecem as modificações geradas fotoquimicamente na lignina. Isto provocaria um aumento da digestibilidade das ligninas nos sistemas fungais.

## APÊNDICE

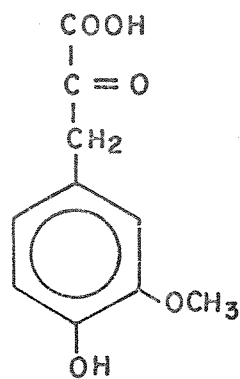
## ESTRUTURAS DOS COMPOSTOS UTILIZADOS COMO MODELOS DA LIGNINA



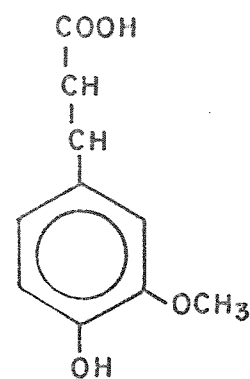
vanilina



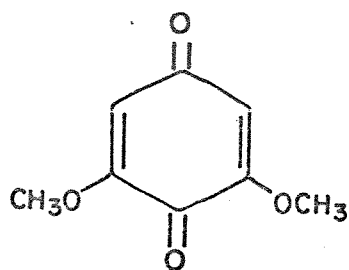
ác. vanilínico



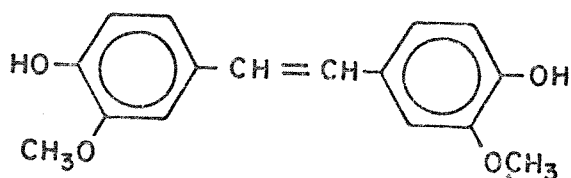
ác. vanilpirúvico



ác. ferúlico

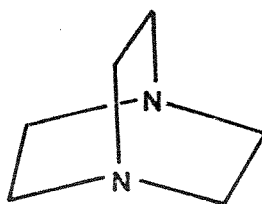


3,5 dimetoxibenzoquinona

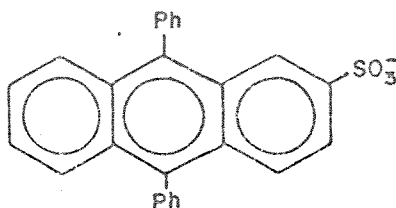


4,4'-dihidroxi-3,3'-dimetoxiestilbeno

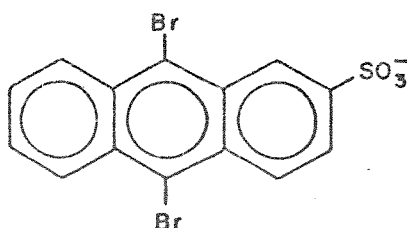
## ESTRUTURA DOS REAGENTES UTILIZADOS NAS REAÇÕES QUÍMILUMINESCENTES



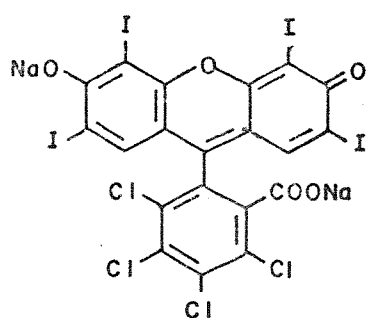
DABCO: 1,4-diazobiciclo-[2,2,2]-octano



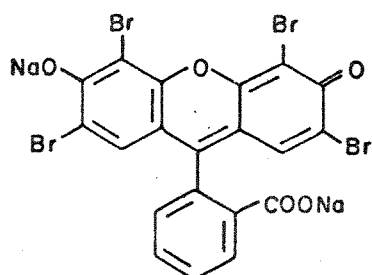
DPAS: 9,10-difenilantraceno-2-sulfonato de sódio



DBAS: 9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato de sódio



Rosa de Bengala: 4,5,6,7-tetrachloro-2',4',5',7'-tetrachlorofluoresceina de sódio



Eosina: tetrabromofluoresceina de sódio



## REFERÊNCIAS

1. Anônimo, Chem. & Eng. News, 63, 59 (1985).
2. H. Janshekar and A. Flechter, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 27, 119 (1983).
3. D. W. Goheen, J. Chem. Ed., 58, 465 (1981).
4. D. L. Klass, Chemtech, 15, 486 (1985).
5. V. Chiaverini, Energia Fontes Alternativas (Brasil), 5, 6 (1983).
6. I. S. Goldstein, Forest Prod. J., 31, 63 (1981).
7. G. T. Tsao, M. R. Ladisch, M. Voloch and P. Bienkowski, Process Biochem., 17, 34 (1982).
8. U. Faust, P. Prave and M. Schlingmann, Process Biochem., 18, 31 (1983).
9. D. W. Goheen, J. Chem. Ed., 58, 544 (1981).
10. F. H. Schwarzenbach and T. Hegetschweiler, Experientia, 38, 22 (1982).
11. J. H. Litchfield, Science, 219, 740 (1983).
12. M. Tanaka and R. Matsuno, Enzyme Microb. Technol., 7, 197 (1985).
13. K. W. Hanselmann, Experientia, 38, 176 (1982).
14. R. L. Gray and R. A. Parham, Chemtech, 12, 232 (1982).
15. K. C. B. Wilkie, Chemtech, 13, 306 (1983).
16. J. A. Phillips, Chemtech, 15, 377 (1985).
17. P. V. Selvam, T. K. Ghoshe and P. Ghosh, Process Biochem., 18, 13 (1983).
18. M. M. Gharpuray, Y.-H. Lee and L. T. Fan, Biotech. Bioeng., 25, 157 (1983).
19. I. S. Goldstein em "Chemicals from Biomass", CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 101, 1981.

20. C. I. Simionescu, V. I. Popa, V. Rusan and M. Rusan, *Cellul. Chem. Technol.*, **18**, 533 (1984).
21. D. N. S. Hon and K. S. V. Srinivasan, *J. Appl. Polymer Sci.*, **28**, 1 (1983).
22. J. Papadopoulos, PhD. Thesis, North Carolina State Univ., Raleigh, USA, 1981.
23. N. Toyama, K. Ogawa, *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **5**, 225 (1975).
24. M. T. Holtzapple, A. E. Humphrey, *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 6701 (1984).
25. T. P. Schultz, M. C. Templeton, C. J. Biermann and G. D. McGinnis, *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 1166 (1984).
26. H. W. Kern, L. E. Webb and L. Eggeling, *System. Appl. Microbiol.*, **5**, 433 (1984).
27. I. D. Reid, *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 133 (1985).
28. R. Datta, *Process Biochem.*, **16**, 16 (1981).
29. W. G. Glasser, *Forest Prod. J.*, **31**, 24 (1981).
30. T. K. Kirk em "Microbial Degradation of Organic Compounds", *Microbiol. Series*, D. T. Gibson Ed., Marcel Dekew, New York V. 13, p.399, 1984.
31. S. A. Brown em "Biochemistry of Phenolic Compounds", J. B. Harborne Ed., Academic, London, p.361, 1964.
32. T. K. Kirk em "Lignin Biodegradation: Importance and Historical Research Perspective", T. Higuchi, H.-M. Chang and T. K. Kirk Eds., *Proc. Int. Seminar, Kioto*, p. 1, 1983.
33. T. Higuchi, *Experientia*, **38**, 159 (1982).
34. F. Brauns and D. Brauns, "The Chemistry of Lignin", *Sup. Vol.*, Acad. Press, London, p. 127, 1960.
35. F. García, F. Martín and J. J. Rodríguez, *Ingeniería Química (Espanha)*, p. 250, Oct. 1984.

36. K. Lundquist, *Acta Chem. Scand.*, B35, 497 (1981).
37. R. Morck and K. Kringstad, *Holzforschung*, 39, 109 (1985).
38. O. Y. Mansour, A. Nagaty, M. Salama and F. Mouty, *Paperi ja Puu*, 6-7, 413 (1982).
39. J. M. Gold, *Plant Physiol.*, 70, 1521 (1982).
40. W. Glasser, H. R. Glasser and N. Morohoshi, *Macromolecules*, 14, 253 (1981).
41. K. Fraudenberg, *Science*, 148, 595 (1965).
42. E. Adler, *Wood Sci. Technol.*, 11, 169 (1977).
43. H. Nimz, *Angew. Chem. Inter. Ed.*, 13, 313 (1974).
44. S. Larsson and G. E. Miksche, *Acta Chem. Scand.*, 25, 647 (1971).
45. M. Ericksson, S. Larsson and G. E. Miksche, *Acta Chem. Scand.*, 27, 903 (1973).
46. J. Schafer, *Macromolecules*, 14, 557 (1981).
47. N. N. Das, S. C. Das, A. S. Dutt and A. Roy, *Carbohydr. Res.*, 94, 73 (1981).
48. F. W. Whitmore, *Phytochemistry*, 21, 315 (1982).
49. M. Nedeltcheva, R. Draganova and E. Tzolova, *Cellul. Chem. Technol.*, 15, 349 (1981).
50. S. I. Falkehag, *Appl. Polym. Symp.*, 28, 247 (1975).
51. O. H. Hsu and W. G. Glasser, *Wood Sci.*, 9, 97 (1976).
52. K. Forss and A. Fuhrmann, *Forest Prod. J.*, 29, 39 (1979).
53. S. Y. Lin, *Pat. FRG*, 3.030.315, *Set.* 1981. [CA: 95,188937z].
54. M. A. De Paoli, L. T. Furlan e M. A. Rodriguez, *Química Nova*, 6, 121 (1983).
55. N. V. Griбанова, G. M. Tarnarutskii and R. G. Gimasheva, *Vodopol'zovaine Ochitska Proizvod Stochnykh Vod*, 22, 58 (1978) [CA: 92,199996g].
56. Anônimo, *Chem. & Eng. News*, 62, 19 (1984).

57. T. K. Kirk, T. W. Jeffries and G. F. Leatham, *Tappi J.*, 66, 45 (1983).
58. K. E. Eriksson and L. Vallander, *Sv. Papperstidn.*, 85, R33 (1982).
59. T. K. Kirk and H.-M. Chang, *Enzyme Microb. Technol.*, 3, 83 (1981).
60. P.-Chr. Ellwardt, K. Halder and L. Ernst, *Holzforschung*, 35, 99 (1981).
61. M. G. S. Chua, C.-L. Chen, H.-M. Chang and T. K. Kirk, *Holzforschung*, 36, 165 (1982).
62. F. Nakatsubo, I. D. Reid and T. K. Kirk, *Biochim. Biophys. Acta*, 719, 284 (1982).
63. M. Kuwahara, J. K. Glenn, M. A. Morgan and M. H. Gold, *FEBS Lett.*, 169, 247 (1984).
64. P. L. Hall, *Enzyme Microb. Technol.*, 2, 170 (1980).
65. F. Nakatsubo, J. Reid and T. K. Kirk, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 102, 484 (1981).
66. T. K. Kirk, F. Nakatsubo and I. Reid, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 111, 200 (1983).
67. H. Kutsuki, A. Enoki and M. H. Gold, *Photochem. Photobiol.*, 37, 1 (1983).
68. G. Amer and S. Drew, *Dev. Ind. Microbiol.*, 22, 479 (1980).
69. L. Forney, C. Reddy, M. Tien and S. Aust, *J. Biol. Chem.*, 257, 11455 (1982).
70. H. Kutsuki and M. H. Gold, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 109, 320 (1982).
71. J. W. Koenigs, *Wood Fiber*, 6, 66 (1974).
72. S. S. Bar-Lev and T. K. Kirk, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99, 373 (1981).

73. C.-L. Chen, H.-M. Chang and T. K. Kirk, *J. Wood Chem. Technol.*, **3**, 35 (1983).
74. P. Ander and K.-E. Eriksson, *Appl. Microb. Biotechnol.*, **21**, 96 (1985).
75. B. D. Faison and T. K. Kirk, *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 1140 (1983).
76. M. Tien and T. K. Kirk, *Science*, **221**, 661 (1983):
77. J. K. Glenn, M. A. Morgan, M. B. Myfield, M. Kuwahara and M. H. Gold, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **114**, 1077 (1983).
78. T. Umezawa, F. Nakatsubo and T. Higuchi, *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2677 (1983).
79. T. K. Kirk and F. Nakatsubo, *Biochem. Biophys. Acta*, **765**, 376 (1983).
80. T. Umezawa, T. Higuchi and F. Nakatsubo, *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2945 (1983).
81. M. Tien and T. K. Kirk, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **81**, 2280 (1984).
82. P. J. Kersten, M. Tien, N. Kalyanaraman and T. K. Kirk, *J. Biol. Chem.*, **260**, 2609 (1985).
83. H. E. Schoemaker, P. J. Harvey, R. Bowen and J. M. Palmer, *FEBS Lett.*, **183**, 7 (1985).
84. P. J. Harvey, H. E. Schoemaker, R. Bowen and J. M. Palmer, *FEBS Lett.*, **183**, 13 (1985).
85. B. Chance, L. Powers, Y. Ching, T. Poulos, G. R. Schonbaun, I. Yamazaki and G. Paul, *Arch. Biochem. Biophys.*, **235**, 596 (1984).
86. A. Paterson and K. Lundquist, *Nature*, **316**, 575 (1985).
87. M. Shimada, T. Habe, T. Umezawa, T. Higuchi and T. Okamoto, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 1247 (1984).

88. D. Klein, P. Rockhill, J. P. Eldridge and J. Park, *Tappl*, 53, 1469 (1970).
89. N. J. Turro, "Molecular Photochemistry", W. Benjamin Inc. New York, p. 44, 1967.
90. G. S. Hammond and N. J. Turro, *Science*, 142, 1541 (1963).
91. R. O. Kan, "Organic Photochemistry", McGraw Series in Adv. Chemistry, McGraw Hill, New York, p. , 1966
92. J. N. Pitts, *J. Chem. Ed.*, 34, 112 (1957).
93. H. E. Gunning, *J. Chem. Ed.*, 34, 121 (1957).
94. J. Beattie, B. Clark and D. Garrin, *Anal. Chem.*, 33, 1890 (1961)
95. A. R. Mosler, W. D. Guenz and L. L. Miller, *Science*, 164, 1083 (1969).
96. G. Scott, *J. Photochem.*, 25, 83 (1984).
97. D. N. S. Hon em "Developments in Polymer Degradation-3", N. Grassie Ed., *Appl. Sci. Publ.*, p. 229, 1981.
98. G. Leary, *Tappl*, 50, 17 (1967).
99. G. Leary, *Nature*, 217, 872 (1968).
100. G. Leary, *Tappl*, 51, 257 (1968).
101. K. P. Kringstad, *Tappl*, 52, 1070 (1969).
102. M. Kalnins, C. Steelink and H. Tarkow, *US Forest Service Res. Paper*, 58 (1966).
103. S. Y. Lin and K. P. Kringstad, *Tappl*, 53, 658 (1970).
104. S. Y. Lin and K. P. Kringstad, *Tappl*, 53, 1675 (1970).
105. K. P. Kringstad and S. Y. Lin, *Tappl*, 53, 2296 (1970).
106. K. P. Kringstad, *Papier*, 27, 462 (1973).
107. S. Y. Lin and K. P. Kringstad, *Nor. Skogind.*, 25, 252 (1971)
108. J. Glerer and S. Y. Lin, *Sv. Papperst.*, 75, 233 (1972).
109. G. Gellerstedt and E.-L. Pettersson, *Acta Chem. Scand.*, B29, 1005 (1975).

110. G. Gellerstedt and E.-L. Pettersson, Sv. Papperst., 80, 15 (1977).
111. G. Gellerstedt, K. P. Kringstad and E. Lindfors em "Singlet Oxygen. Reactions with Organic Compounds and Polymers", Ranby and Rabek Eds., Wiley, London, p. 302, 1978.
112. G. Brunow, I. Forsskahl A. Gronlund, G. Lindstrom and N. Nyberg em "Singlet Oxygen. Reactions with Organic Compounds and Polymers", Ranby and Rabek Eds., Wyley, London, p. 311, 1978.
113. H. Kutsuki, A. Enoki and M. Gold, Photochem. Photobiol., 37, 1 (1983).
114. I. Forsskahl and H. Tyllil, J. Photochem., 27, 85 (1984).
115. I. Forsskahl, J. Photochem., 27, 363 (1984).
116. E. J. H. Bechara, O. M. M. Faria Oliveira, N. Durán, R. C. de Baptista and G. Cilento, Photochem. Photobiol., 30, 101 (1979)
117. A. I. Vogel, "Practical Organic Chemistry", Longman, London, p.177, 1956.
118. D. D. Perrin, W. L. F. Armarego and D. R. Perrin, "Purification of Laboratory Chemicals", Pergamon Press, New York, p. 148, 1966.
119. M. Medeiros, Tese de Doutorado, USP, 1985.
120. J. M. Pepper, P. E. Baylis and E. Adler, Can. J. Chem., 37, 1241 (1959).
121. A. S. Wexler, Anal. Chem., 36, 213 (1964).
122. E. Adler and J. Marton, Acta Chem. Scand., 13, 75 (1959).
123. C. Barnett, K. Loferski and C. Wortman, "Experimental Procedures Routinely Applied in the Wood Chemistry Laboratory", Dep. Forest Prod., Virginia Polytechnic Inst. & SU, USA.

124. A. I. Vogel, "Química Orgânica", V.1, Trad. 3ª ed., p. 370 1971.
125. Catálogo do aparelho Perkin-Elmer DSC-2, p.3-12.
126. G. Pugachevskii and L. Plesha, Izv. Vyssh. Ucheb. Zaved., Tekhnol. Legk. Prom., 3, 40 (1973). [CA: 79,116256y].
127. M. Young and C. Steelink, Phytochemistry, 12, 2851 (1973).
128. K. Lundquist and T. Olsson, Acta Chem. Scand., B31, 788 (1977).
129. M. P. De Mello, Tese de Doutorado, Unicamp, 1982.
130. J. L. Reyes, Tese de Doutorado, UNICAMP (em andamento).
131. V. Jacopian, H. Lang, D. Paul, B. Philipp and E. W. Unger, Cellul. Chem. Technol., 19, 77 (1985).
132. K. Lundquist and T. K. Kirk, Tappl, 63, 80 (1980).
133. E. Guittet, J. Y. Lallemand, C. Lapierre and B. Monties, Tetrahedron Lett., 26, 2671 (1985).
134. B. L. Lenz, Tappl, 51, 511 (1968).
135. S. K. Salpov, Kh. A. Abduazimov, Khim. Prir. Soedin., 6, 794 (1982).
136. E. Odier, E. Janin and B. Monties, Appl. Environ. Microbiol. 41, 337 (1981).
137. H. Konschin, F. Sundholm and G. Sundholm, Acta Chem. Scand., B30, 262 (1976).
138. K. Lundquist, J. Josefsson and G. Nyquist, Holzforschung, 32, 27 (1978).
139. K. Lundquist, J. Egyed, B. Josefsson and G. Nyquist, Cellul. Chem. Technol., 15, 699 (1981).
140. D. N. S. Hon and G. Ifju, Wood Sci., 11, 118 (1978)
141. H. Janshekar, C. Brown and A. Flechter, Anal. Chimica Acta, 130, 81 (1981).



142. T. Nguyen, E. Zavarin and E. Barral II, J. Macromol. Sci-Rev., Macromol. Chem., C21, 1 (1981).
143. H. Hatakeyama, K. Kubota and J. Nakano, Cellul. Chem. Technol., 6, 521 (1972).
144. G. Domburgs, V. N. Sergeeva and A. N. Popov, Khim. Drev., 6, 133 (1970). [CA: 74,43692x].
145. M. H. Nassar and G. D. M. MacKay, Thermochim. Acta, 81, 9 (1984).
146. J. Lee em "The Science of Photobiology", K. C. Smith Ed., Plenum, New York, p. 373, 1977.
147. G. Mendenhall, R. Nathan and M. Golub em "Application of Polymer Spectroscopy", E. G. Braun Jr. Ed., Academic, New York, p. 1001, 1978.
148. Z. Kin, J. Jaworski and E. Przybylek, Cellul. Chem. Technol., 16, 431 (1982).
149. N. Durán em "Chemical and Biological Generation of Excited States", W. Adam and G. Cilento Eds., Academic, New York, p. 345, 1982.
150. C. S. Foote em "Singlet Oxygen", H. Wasserman and R. Murray Eds., Academic, New York, p. 163, 1979.
151. A. I. Cederbaum and G. Cohen em "Methods in Enzimology", L. Packer Ed., Academic, New York, V. 105, p. 516, 1984.
152. H. H. Nimz and G. Turznik, Cellul. Chem. Technol., 14, 727 (1980).
153. S. A. Wallick and Sarkanen, Wood Sci. Technol., 17, 107 (1983).
154. E. J. H. Bechara, O. M. M. Oliveira, N. Durán, R. C. Baptista and G. Cilento, Photochem. Photobiol., 30, 101 (1979).
155. L. H. Catalani and E. J. H. Bechara, Photochem. Photobiol., 39, 823 (1984).

156. D. F. Bowman, T. Gillan and K. U. Ingold, J. Am. Chem. Soc., 93, 6555 (1971).
157. M. Kasha and D. E. Brabham em "Singlet Oxygen", H. Wasserman and R. Murray Eds., Academic, New York, p. 25, 1979.
158. S. Slawinska and T. Michalska em "Singlet Oxygen. Reactions with Organic Compounds and Polymers", B. Ramby and J. Rabeck Eds., Wiley, London, p. 294, 1978.
159. E. I. Chupka and A. D. Sergeev, Dokl. Acad. Nauk SSSR, Phys. Chem., 263, 150 (1982).
160. K. Ingold em "Free Radicals", J. K. Koshi Ed., Wiley, New York, p. 37, 1973.
161. R. C. Allen em "Chemical and Biological Generation of Excited States", W. Adam and G. Cilento Eds., Academic, New York, p. 309, 1982.
162. G. L. Catignani and M. E. Carter, J. Food Sci., 47, 1745 (1982).
163. M. A. De Paoli and L. T. Furlan, Polym. Degrad. Stab., 13, 129 (1985).
164. E. I. Chupka and T. M. Rykova, Khim. Priir., Soedin., 2, 236 (1980).
165. P. Ander, M. E. Eriksson and K. E. Eriksson, Physiol. Plant, 65, 317 (1985).
166. D. Sanglard M. S. Leisola and A. Flechter, Enzyme Microbiol. Technol., 8, 209 (1986).
167. G. Czapski em "Methods in Enzymology", L. Packer Ed., Academic, New York, V. 105, p. 209, 1984.
168. A. Michelson em "Methods in Enzymology", M. A. DeLuca Ed., Academic, New York, V. LVII, p. 404, 1978.

169. R. C. Allen em "Chemical and Biological Generation of Excited States" W. Adam and G. Cilento Eds., Academic, New York, p. 309, 1982.
170. T. K. Kirk, M. D. Mozuch and M. Tien, *Biochem. J.*, 226, 455 (1985).
171. J. M. Harkin and J. R. Obst, *Science*, 180, 296 (1973).
172. T. K. Kirk, M. Tien, S. C. Johnrud and K. E. Eriksson, *Enzyme Microbiol. Technol.*, 8, 75 (1986).
173. D. Kuila, M. Tien, A. Fee and M. R. Ondrias, *Biochemistry*, 24, 3394 (1985).
174. H. Dunford and J. Sullivan, *Coord. Chem. Rev.*, 19, 187 (1976).
175. J. H. Fuhrhop, *Angew. Chem. Inter. Ed.*, 13, 321 (1974).
176. K. Yakota and J. Yamazaki, *Biochim. Biophys. Acta*, 184, 420 (1969).
177. E. S. Caldwell and C. Steelink, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 18, 48 (1965).
178. M. J. Green and H. A. O. Hill em "Methods in Enzymology", L. Packer Ed. Academic, New York, V. 105, p. 6, 1984.
179. T. K. Kirk, *Proc. Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*, London, p. 130, 1983.
180. T. Umezawa and T. Higuchi, *FEBS Lett.*, 192, 147 (1985).