

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Sector Departamental Grupo de Disciplinas de Ecologia da Hidrosfera

LENHINA E O SEU CONTRIBUTO NA ÁREA ALIMENTAR

MARLENE CARREIRA REMÉDIOS

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar.

Orientadora: Professora Doutora Benilde Mendes.

Monte da Caparica

2010

AGRADECIMENTOS

A realização do presente trabalho foi possível com o apoio e a colaboração de diversas pessoas e instituições, que directa ou indirectamente contribuíram para o seu desenvolvimento. Foi também o culminar do meu percurso académico, no qual contei com o apoio e amizade de colegas, amigos e familiares. Todos os que estiveram envolvidos quer no meu percurso académico, quer na elaboração da presente dissertação são igualmente merecedores de todo o meu apreço e gratidão e a quem expresso o meu mais sincero agradecimento.

Um agradecimento à Professora Doutora Benilde Mendes pela disponibilidade e pela oportunidade que me concedeu de poder realizar a minha dissertação neste grupo de investigação.

Às amigas Sandra Ferreira, Natalina Silva, Ana Salomé Alves e Catarina Guerra, pela grande amizade, companheirismo, pelos bons momentos, pelo apoio e encorajamento constantes e por mostrarem interesse pelo meu trabalho, dando-me ânimo para continuar.

Aos meus pais, Rui e Maria Helena, e ao meu irmão Duarte, uma palavra especial pelo enorme apoio, carinho, paciência, incentivo, compreensão que em todas as ocasiões mostraram, não só durante todo o meu percurso académico mas ao longo de toda a minha vida. Pela oportunidade que me deram e pelos esforços que efectuaram para que eu pudesse chegar onde cheguei. Aos meus avós e restante família, pelo seu carinho, força, companhia, compreensão, infinita paciência com que sempre me presentearam durante estes anos académicos e pela constante preocupação.

Ao meu namorado, Márcio, um agradecimento especial por todo o seu amor, carinho, cumplicidade, apoio incondicional e compreensão nas horas mais difíceis, pela sua presença e incentivo constante, por me fazer acreditar que era possível.

Por último, todos aqueles que não foram mencionados e contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho são igualmente merecedores de todo o meu apreço. Foram a base da motivação para continuar e chegar ao fim.

SUMÁRIO

A lenhina é um polímero fenólico natural muito complexo, de elevado peso molecular, presente nas paredes das células vegetais, e que tem surgido na natureza como subproduto proveniente de indústrias processadoras, nomeadamente da indústria papeleira.

Alguns estudos recentes têm revelado que a lenhina, que é sujeita a certos tipos de processamento (lenhina purificada), origina fragmentos fenólicos de pesos moleculares mais baixos que possuem propriedades diferentes relativamente à lenhina nativa, nomeadamente propriedades nutricionais e antioxidantes com uma importância relevante para o sector industrial.

A dificuldade na estabilização da cor da lenhina tem sido um impedimento para avançar com a possibilidade de adoptar este composto como aditivo alimentar, mais concretamente como corante alimentar.

No entanto, a existência de fungos com capacidade de degradar total ou parcialmente a lenhina, como é o caso de fungos de podridão mole, podridão castanha e podridão branca, conduz à possibilidade de se estudar a estabilidade da cor da lenhina através da acção fúngica.

Palavras-chave: Lenhina, Biodegradação, Estabilidade da Cor em Produtos Alimentares

ABSTRACT

Lignin is a natural phenolic polymer, quite complex, of very high molecular weight, present in the plant cell walls, which have arisen in nature as waste from processing industries.

Some recent studies have revealed that the lignin, that is subject to certain types of processing (purified lignin), leads to phenolic fragments with lower molecular weights that have different properties regardless to native lignin, including nutritional and antioxidant properties with a great importance for the industrial sector.

The difficulty in stabilizing the color of lignin has unable to come up with the possibility of taking this compound as a food additive, specifically as a food coloring.

However, the existence of fungi able to degrade totally or partially the lignin, as is the case of soft rot, brown rot and white rot fungi leads to the possibility of studying the stability of the color of lignin by fungal action.

Keywords: Lignin, Biodegradation, Color Stability in Foodstuffs

SIMBOLOGIA E NOTAÇÕES

FE: Fibrilas Elementares

UV: Ultravioleta

Vis: Visível

H: Hidroxifenilo (unidade monomérica da lenhina)

G: Guaiacilo (unidade monomérica da lenhina)

S: Siringilo (unidade monomérica da lenhina)

HAAs: Aminas Aromáticas Heterocíclicas

BHA: Butil-hidroxianisol

BHT: Butil-hidroxitolueno

TBHQ: Tert-butilhidroquinona

ERO: Espécies reactivas de oxigénio

ERA: Espécies reactivas de azoto

ADN: Ácido desoxirribonucleico

RL: Radical livre

SNC: Sistema Nervoso Central

LiP: Lenhina Peroxidase

MnP: Manganês Peroxidase

UNIDADES

g: Grama

kg: Kilograma

µg: Micrograma

mL: Mililitro

nm: Nanómetro

Kcal: Kilocalorias

Da: Dalton

KDa: Kilodalton

°C: Grau Celsius

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	ii
Súmario	iii
Abstract	iv
Simbologia e Notações	v
Índice Geral	vii
Capítulo 1 – Introdução	1
1.1 Materiais Lenhocelulósicos	1
1.1.1 Celulose	5
1.1.2 Hemicelulose	6
1.1.3 A Lenhina	7
1.1.3.1 Estrutura Química da Lenhina	9
1.1.3.2 Importância da Lenhina	12
1.1.3.2.1 Lenhina como Fibra Alimentar	14
Capítulo 2 – Biodegradação da Lenhina	16
2.1 Biodegradação da Lenhina pela Acção de Fungos	16
2.1.1 Fungos da Podridão Mole da Madeira	19
2.1.2 Fungos da Podridão Parda da Madeira	19
2.1.3 Fungos da Podridão Branca da Madeira	19
2.2 Enzimas Implicadas no Processo de Degradação da Lenhina	20
2.2.1 Lenhina Peroxidase (LiP)	21
2.2.2 Manganês Peroxidase (MnP)	23
2.2.3 Lacase	24
2.2.4 Enzimas Produtoras de Peróxido de Hidrogénio	25
Capítulo 3 – Importância da Lenhina na Alimentação	26

3.1 Lenhina como Suplemento nas Rações Animais.....	26
3.1.1 Implicações na Saúde Animal.....	27
3.1.1.1 Propriedade Antibacteriana da Lenhina Purificada.....	27
3.1.1.2 Efeitos Prebióticos da Lenhina	28
3.2 Lenhina e o seu Poder Antioxidante	29
3.2.1 O Antioxidante	31
3.2.2 Implicação na Saúde Humana.....	35
3.3 Lenhina como Pigmento	37
3.3.1 A Cor	38
3.3.1.1 A Luz	39
3.3.1.2 O Olho Humano.....	40
3.3.2 Importância da Cor nos Alimentos	42
3.3.2.1 Definição de Corante como Aditivo Alimentar	42
3.3.2.2 Interesse da Cor na Escolha de Alimentos.....	43
Capítulo 4 – Conclusão	44
Referências	46

Índice de Figuras

Capítulo 1

Figura 1.1: Ilustração esquemática da morfologia dos traqueídeos, camadas secundárias da parede celular e parede celular primária	4
Figura 1.2: Estrutura da celulose	5
Figura 1.3: Esquema explicativo da estrutura da celulose	6
Figura 1.4: Monómeros constituintes da lenhina	10
Figura 1.5: Principais tipos de ligações entre monómeros de lenhina e estruturas diméricas associadas	11

Capítulo 2

Figura 2.1: Ciclo catalítico da Lenhina Peroxidase.....	22
Figura 2.2: Ciclo catalítico da Manganês Peroxidase	23
Figura 2.3: Centros de Cobre da Lacase.....	24

Capítulo 3

Figura 3.1: A Percepção	39
Figura 3.2: Espectro Electromagnético	40
Figura 3.3: As estruturas e camadas do olho.....	41

Índice de Tabelas

Capítulo 1

Tabela 1.1: Fontes de materiais lenhocelulósicos que contêm lenhina	1
Tabela 1.2: Composição de alguns materiais lenhocelulósicos.....	2
Tabela 1.3: Propriedades Físico-químicas da lenhina	7
Tabela 1.4: Funções da Lenhina <i>versus</i> Propriedades da Planta	8

Capítulo 3

Tabela 3.1: Divisão dos compostos fenólicos por classes	30
Tabela 3.2: Espécies reactivas de oxigénio	33
Tabela 3.3: Origem, localização e mecanismos de acção dos principais antioxidantes.	35
Tabela 3.4: Doenças associadas ao stress oxidativo	36

Capítulo 1 – Introdução

1.1 Materiais Lenhocelulósicos

O material lenhocelulósico representa cerca de 50% da biomassa lenhocelulósica global, tem uma produção anual estimada de 10-50 mil milhões de toneladas e é predominantemente originada pelos resíduos agrícolas e florestais (Salanti *et al.*, 2010).

Nos últimos anos estes resíduos têm recebido um interesse crescente por duas razões principais: grande quantidade produzida anualmente e elevado poder de bioconversão (Stewart, 2008).

Os resíduos destes materiais provenientes da madeira, floresta, agricultura, indústria e resíduos sólidos urbanos (Tabela 1.1) são particularmente abundantes, e têm vindo a acumular-se em grandes quantidades, eventualmente diminuindo a qualidade ambiental (Huang *et al.*, 2010).

Tabela 1.1 - Fontes de materiais lenhocelulósicos que contêm lenhina (adaptado de Janshekar *et al.*, 1983).

Lenhina Nativa	Lenhina existente em águas residuais	Resíduos sólidos
Madeira, algodão, vegetais, palhas de cereais, talos de milho	Águas residuais dispendidas no processo Kraft, no processo ao sulfito e na polpa dos caules de milho	Urbanos, estrume de ruminantes, cascas e folhas provenientes da indústria de celulose

O material lenhocelulósico é o principal constituinte da biomassa vegetal, produzido por fotossíntese e representa o recurso biológico do solo renovável mais abundante (Sánchez, 2009) (Tabela 1.2). É composto por três tipos de polímeros: a celulose, a hemicelulose e a lenhina, que estão fortemente entrelaçadas e quimicamente ligadas por ligações covalentes e não covalentes (Kovur, 2003).

Tabela 1.2 - Composição de alguns materiais lenhocelulósicos (adaptado de Janshekar *et al.*, 1983).

Composição aproximada (% peso seco)			
	Celulose	Hemicelulose	Lenhina
Madeira	40-50	20-40	15-35
Algodão	94	2	0
Bagaço da cana do açúcar	40	30	20
Cascas de nozes	25-30	25-30	30-40
Espigas de milho	45	35	15
Talos de milho	35	25	35
Palha de trigo	30	50	15
Papel	85-99	0	0-15
Papel para impressão	50	20	30

O maior componente do material lenhocelulósico é geralmente a celulose (38-48%), seguida da hemicelulose (24-40%) e lenhina (18-35%) (Kovur, 2003). A celulose e a hemicelulose são macromoléculas constituídas por diferentes açúcares, enquanto a lenhina é um polímero aromático sintetizado por precursores fenilpropanóides (Sánchez, 2009).

A parede celular é uma estrutura típica da célula vegetal. Cada célula possui a sua própria parede celular, que está firme à parede da célula vizinha pela lamela média (Salmén, 2004).

A arquitetura da parede celular é determinada, principalmente pela celulose que forma um sistema de fibrilas entrelaçadas. Isto é, moléculas lineares de celulose, paralelas entre si, unem-se em feixes formando as microfibrilas que, por sua vez, se enrolam entre si formando as fibrilas ou macrofibrilas de celulose (Salmén, 2004).

Durante o crescimento da célula desenvolve-se uma parede celular designada por parede primária. Sobre ela poderá ou não formar-se a parede secundária que é composta por camadas designadas por S1, S2 e S3 (Figura 1.1). Esta diferenciação da parede secundária em camadas deve-se à diferença no arranjo das fibrilas de celulose, à espessura e à composição química de cada camada (Carvalho *et al.*, 2009).

A camada adjacente à parede primária (S1) e a camada mais interior (S3) possuem microfibrilas orientadas de forma transversal. A camada intermédia (S2) é a mais espessa e apresenta microfibrilas orientadas longitudinalmente em relação ao comprimento da célula (Figura 1.1) (Carvalho *et al.*, 2009).

Em termos de composição química da madeira, a parede celular vegetal é constituída por celulose, hemicelulose e lenhina como componentes principais. A proporção entre os vários compostos depende da espécie vegetal e varia de camada para camada (Tuomela, 2002). Ou seja, enquanto na lamela média e parede primária a lenhina corresponde a aproximadamente 84% do peso, a parede secundária interna (S3) é constituída por até 87% de hemicelulose com uma percentagem baixa e por vezes nula de lenhina. A parede secundária média contém cerca de 54% de celulose na sua constituição e a camada S1 tem uma proporção de cerca de 29% de lenhina, 36% de celulose e 36% de hemicelulose (Carvalho *et al.*, 2009).

A lenhina surge nas paredes celulares de certos tecidos como, por exemplo, nas células do xilema, conferindo-lhes rigidez e resistência (Peixe *et al.*, 2007).

O xilema é o tecido das plantas vasculares por onde circula a água com sais minerais dissolvidos (seiva). As células do xilema são os traqueídeos (Figura 1.1). Os traqueídeos são células cilíndricas e alongadas. A existência de lenhina nestas células torna-as impermeáveis. Quando se encontram totalmente formadas as células perdem todo o citoplasma, tornando-se células mortas, ficando a funcionar como vasos condutores da seiva (Peixe *et al.*, 2007).

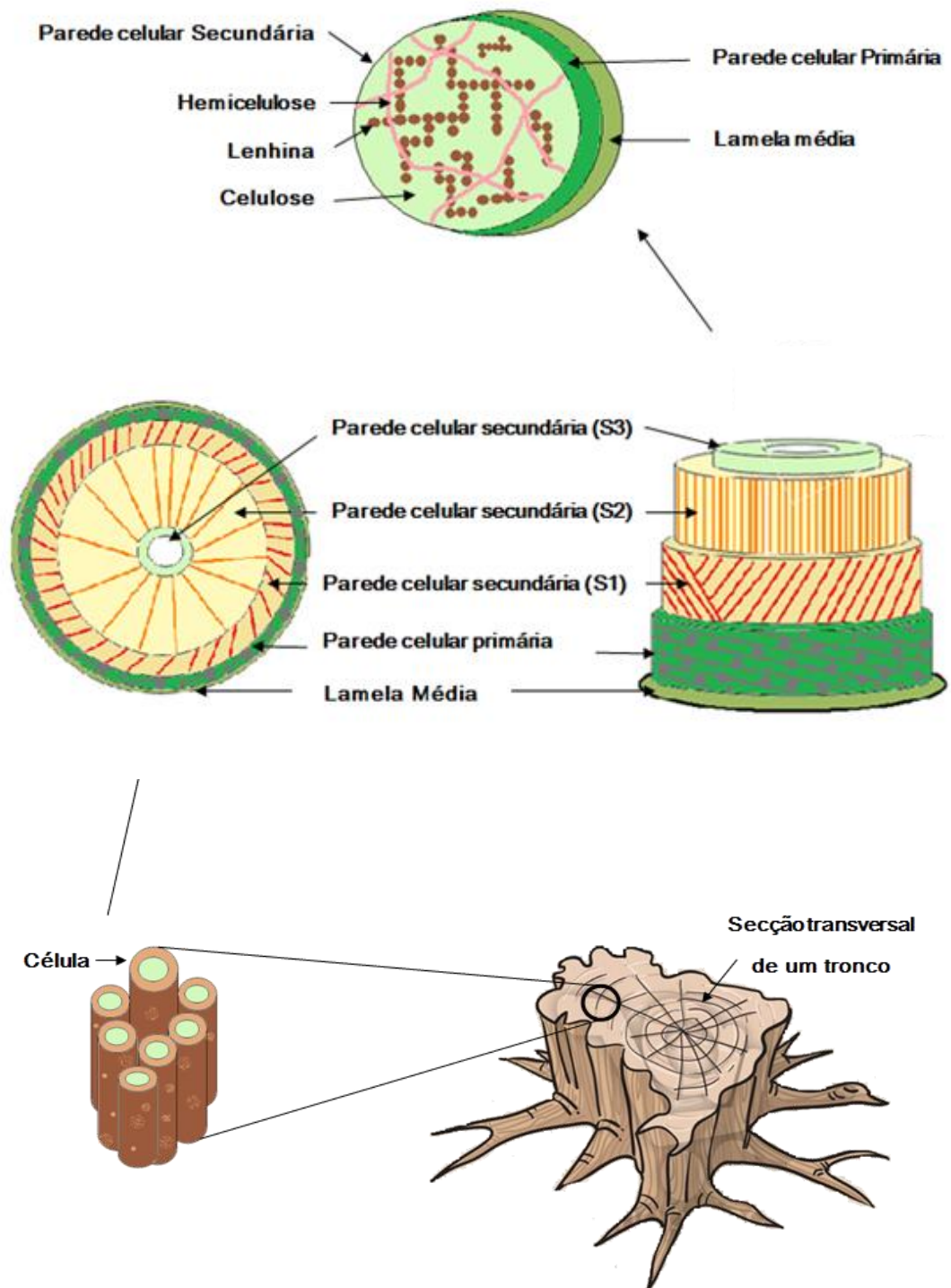


Figura 1.1 - Ilustração esquemática da morfologia dos traqueídeos, camadas secundárias da parede celular (S1, S2 e S3) e parede celular primária. Relação da lenhina, hemicelulose e celulose na parede secundária das células vegetais (adaptado de Sánchez, 2009).

1.1.1 - Celulose

A celulose é uma substância natural que está amplamente distribuída no reino vegetal (Kovur, 2003). Trata-se de um homopolímero de grandes dimensões composto por unidades de D-glucose unidas por ligações glicosídicas β -1,4, constituindo o dímero celobiose (Figura 1.2). A ligação consecutiva destes dímeros forma longas cadeias designadas por fibras de celulose (Sánchez, 2009) e apresentam entre 4000 a 10000 unidades de D-glucose (Tavares, 2006). As moléculas de celulose são lineares e ligam-se umas às outras por pontes de hidrogénio intra e intermoleculares, formando fibrilas elementares (Figura 1.3).

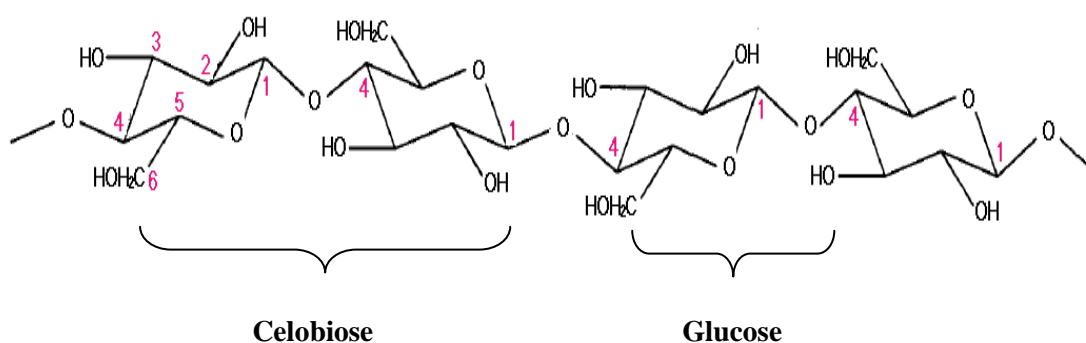


Figura 1.2 - Estrutura da celulose (adaptado de Kovur, 2003)

As fibrilas elementares (FE) de celulose quando agregadas formam as microfibrilas. Estas microfibrilas são constituídas por regiões cristalinas rigorosamente ordenadas alternando com regiões amorfas e mais desorganizadas. A agregação de microfibrilas dá origem a macrofibrilas e, a associação de macrofibrilas origina as fibras (Tavares, 2006). A celulose surge na natureza associada a outros componentes das plantas, podendo esta associação afectar a sua biodegradação (Sánchez, 2009). Isto é, a celulose está estruturalmente ligada à hemicelulose e à lenhina e, desta forma, não se traduz num substrato facilmente acessível. Assim a forma amorfa é primeiramente degradada, uma vez que a forma cristalina é mais resistente ao ataque químico e à degradação microbiana (Tavares, 2006).

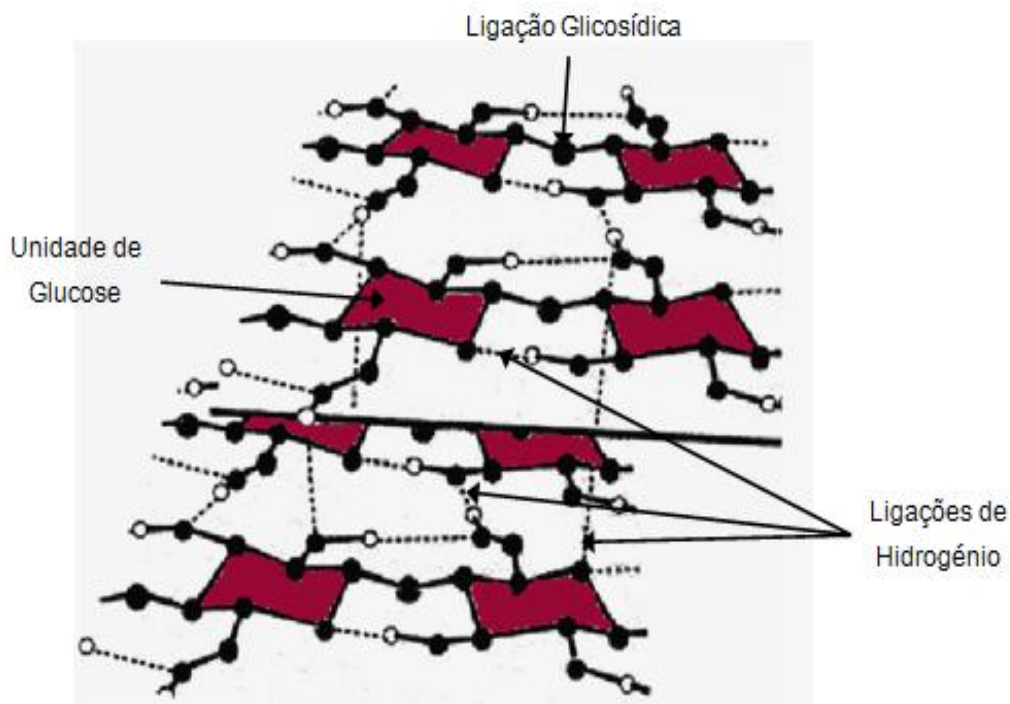


Figura 1.3 - Esquema da estrutura da celulose mostrando as ligações β -(1,4) dos resíduos de D-glucose e as ligações de hidrogénio inter e intra moleculares (adaptado de Tavares, 2006)

1.1.2 - Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolímero, ou seja, é um polissacárido constituído a partir de vários açúcares e cujo peso molecular é inferior ao da celulose (McCarthy *et al.*, 2000). Estes polissacáridos não celulósicos podem ser lineares e/ou ramificados e compreendem dois grandes grupos: pentosanos e hexosanos, na forma cíclica. Os pentosanos são polímeros constituídos pela condensação de unidades de pentoses (D-xilose, L-arabinose) e os hexosanos são polímeros constituídos pela condensação de unidades de hexoses (D-glucose, D-galactose, D-manose). Também apresentam pequenas quantidades de L-ramnose, L-fucose e ainda desoxi-hexoses e ácidos urónicos: ácido D-glucurónico, ácido 4-O-metil-D-glucurónico e ácido D-galacturónico (Tavares, 2006).

As hemiceluloses para além de terem uma estrutura central linear de açúcares ligados topo-a-topo, tal como na celulose, possuem ainda ramificação, com açúcares ligados lateralmente à cadeia principal, possuindo a celulose uma estrutura mais facilmente hidrolisável (McCarthy *et al.*, 2000). Os açúcares são unidos essencialmente por ligações glicosídicas β -1,4. No entanto, podem ainda surgir ligações glicosídicas β -1,3, β -1,6, α -1,2, α -1,3 e α -1,6 (Tavares, 2006). A hemicelulose difere ainda da celulose pelo grau de polimerização que é substancialmente mais baixo (McCarthy *et al.*, 2000). As hemiceluloses encontram-se junto aos feixes de celulose a constituir as microfibrilas e a dar resistência à parede celular (Tavares, 2006). Tanto a celulose como a hemicelulose possuem um grande número de grupos hidroxilo na sua periferia, com os quais podem estabelecer pontes de hidrogénio com os polímeros vizinhos (Graça, 2006).

1.1.3 - Lenhina

A lenhina é um dos componentes mais importantes e abundantes do reino vegetal. Este composto encontra-se nas paredes vegetais das células e consiste num heteropolímero aromático amorfo, não solúvel em água e de difícil degradação (Tabela 1.3). Este polímero actua como uma barreira física para proteger os hidratos de carbono e retardar a degradação da celulose e da hemicelulose das plantas (Huang *et al.*, 2010).

Tabela 1.3 - Propriedades Físico-químicas da lenhina
(Adaptado de Janshekar *et al.*, 1983; Lara *et al.*, 2003).

Propriedades Físico-químicas da Lenhina
Polímero amorfo
Sem cristalinidade
Opticamente inactiva
Peso molecular entre 8000 e 11000 Da
Resistência ao ataque microbiano
pH fisiológico
Oxidável pelo ar
Insolúvel em água

A influência inibitória da lenhina na degradação da parede celular deve-se essencialmente a factores estereoquímicos. Isto é, deve-se essencialmente à ligação lenhina-polissacárido que limita o acesso das enzimas fibrolíticas aos substratos que, neste caso, são os polissacáridos. A hidrofobicidade da lenhina, bem como o revestimento que esta permite na matriz da parede celular podem impedir a penetração de enzimas, cuja acção resulta na hidrólise dos polissacáridos estruturais (Funk *et al.*, 2007).

As plantas possuem vários locais onde o composto pode ser acumulado, sendo que a maior parte da lenhina se situa nas paredes celulares das plantas (Janshekar *et al.*, 1983). A lenhina desempenha também um importante papel ao nível do ciclo do carbono, na medida em que a actividade fotossintética das plantas é dedicada à conversão do dióxido de carbono atmosférico em lenhina. Desta forma, a lenhina representa cerca de 40% da energia solar armazenada nas plantas e realiza uma série de funções essenciais à vida das plantas e as suas propriedades (Tabela 1.4) afectam as características das plantas (Janshekar *et al.*, 1983).

Tabela 1.4 - Funções da lenhina *versus* propriedades da planta
(Adaptado de Janshekar *et al.*, 1983).

Função da Lenhina	Função / Propriedades da Planta
Sistema de armazenamento de energia	Fotossíntese
Agente de ligação entre células	Resistência a forças mecânicas
Impedimento para a penetração de enzimas destrutivas (inibidores da degradação enzimática)	Resistência ao “stress” bioquímico: ataque microbiano, infecções e fermentos
Antioxidantes, estabilizantes da luz UV, retardador de chama	Resistência ao “stress” químico: degradação atmosférica e radiação da luz UV; destruição pelo fogo
Impermeabilidade à água	Resistência a tensões físico-químicas, resposta à humidade, balanços hídricos e de transporte de nutrientes

A lenhina funciona como um material de ligação para os constituintes da parede celular, dando rigidez à planta e ajudando a que esta resista a condições menos favoráveis provenientes do meio exterior. A lenhina diminui também a infiltração de água na parede celular dos tecidos condutores, impedindo fugas de água das paredes celulares. A propriedade de reduzir a permeabilidade da água desempenha também um papel importante no transporte interno de água, nutrientes, e metabolitos na planta. A lenhificação é uma resposta comum das plantas à infecção ou lesão. O processo de cicatrização de feridas envolve a lenhificação e suberificação das células da superfície, estando associado a uma maior resistência à infecção (Janshekar *et al.*, 1983).

1.1.3.1 - Estrutura Química da Lenhina

A molécula da lenhina é altamente ramificada e apresenta uma forma estrutural tridimensional e heterogénea. O polímero natural é formado basicamente por unidades fenilpropano, ligadas entre si em diversas posições (Lara *et al.*, 2003).

A composição elementar da lenhina é de 53-65% de carbono, 6-9% de hidrogénio e 26-36% de oxigénio. Assim, quando não é modificada, a lenhina não apresenta enxofre, fósforo, azoto ou outros elementos na sua composição. Os grupos funcionais mais importantes são: metoxilo (-OCH₃), hidroxilo (-OH), carbonílos (R-CO-R), carboxílicos (-COOH), éteres (R-O-R), ésteres (-COO-R) e insaturações (C=C) (Graça, 2006). A lenhina é constituída por três tipos de monómeros diferentes (Figura 1.4), constituídos por um anel fenólico ligado a uma cadeia de três carbonos que possui um grupo hidroxilo (álcool) no carbono terminal. O que distingue estes três monómeros é a ausência do substituinte metoxilo (álcool cumarílico), a presença de um metoxilo (álcool coniferílico) e a existência de dois grupos metoxilo (álcool sinapílico) (Graça, 2006).

Os monómeros da lenhina são muitas vezes mencionados fazendo alusão apenas à parte fenólica. Assim, os monómeros podem ser designados por hidroxifenilo (sem metoxilos), guaiacilo (possui um metoxilo) e siringilo (possui dois grupos metoxilo). Estas designações podem ainda ser abreviadas para H, G e S, respectivamente (Graça, 2006).

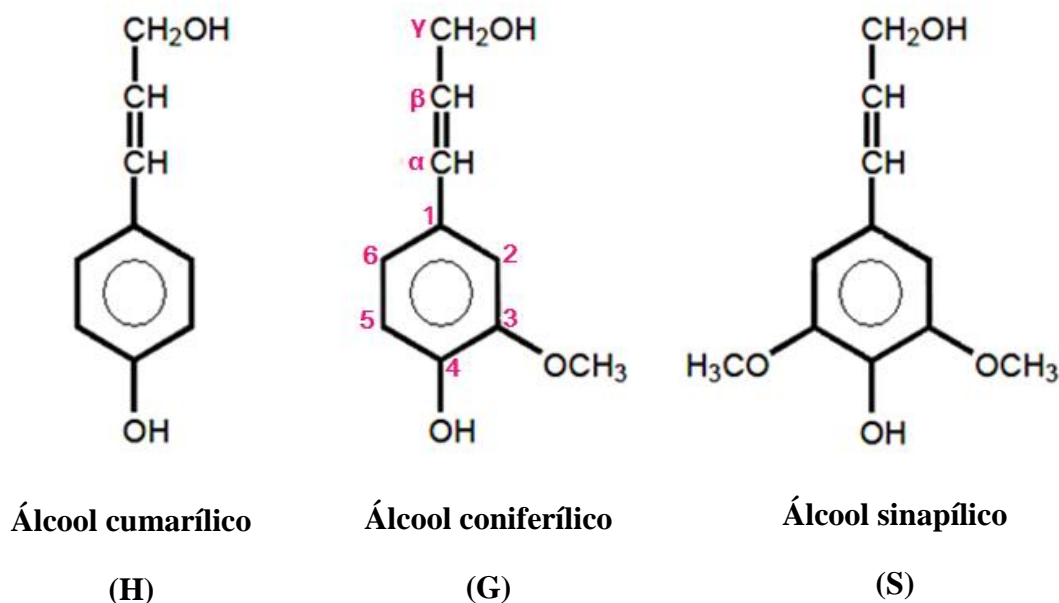


Figura 1.4 - Monómeros constituintes da lenhina. Os carbonos correspondentes ao anel fenólico são designados pelos números de 1 a 6. Os carbonos respeitantes à cadeia propanoica são designados pelas letras α , β e γ (Adaptado de Graça, 2006).

Na polimerização, os monómeros podem associar-se a partir de dois tipos de ligações: ligações éter, na maioria das vezes, através do oxigénio do grupo hidroxilo do anel fenólico e ligações directas carbono-carbono (Lara *et al.*, 2003). O tipo de polimerização dá origem a um polímero tridimensional e amorfo. Os principais acoplamentos que ocorrem entre as unidades monoméricas são do tipo: α -O-4' e β -O-4' (49-65%); β -5' (6-16%); 5-5' (2-9%) e β - β ' (2-5%) (Souza, 1999) (Figura 1.5).

As ligações éter, nomeadamente α -O-4' e β -O-4', permitem uma estrutura da lenhina mais “aberta”, enquanto as ligações carbono-carbono aproximam os monómeros entre si, originando uma estrutura mais compacta na lenhina (del Río *et al.*, 2005). As unidades monoméricas do tipo H e G permitem um maior grau de condensação. Uma vez que os monómeros têm uma maior aproximação entre si devido aos grupos metoxilo, que ou não estão no caso do monómero H, ou está apenas presente num dos lados do anel, no caso do monómero G. Desta forma, não há grande impedimento por parte dos substituintes metoxilo originando uma lenhina mais condensada. Como os monómeros S possuem dois grupos metoxilo, o volume dos substituintes faz com que a aproximação para ligações entre monómeros esteja mais limitada (del Río *et al.*, 2005).

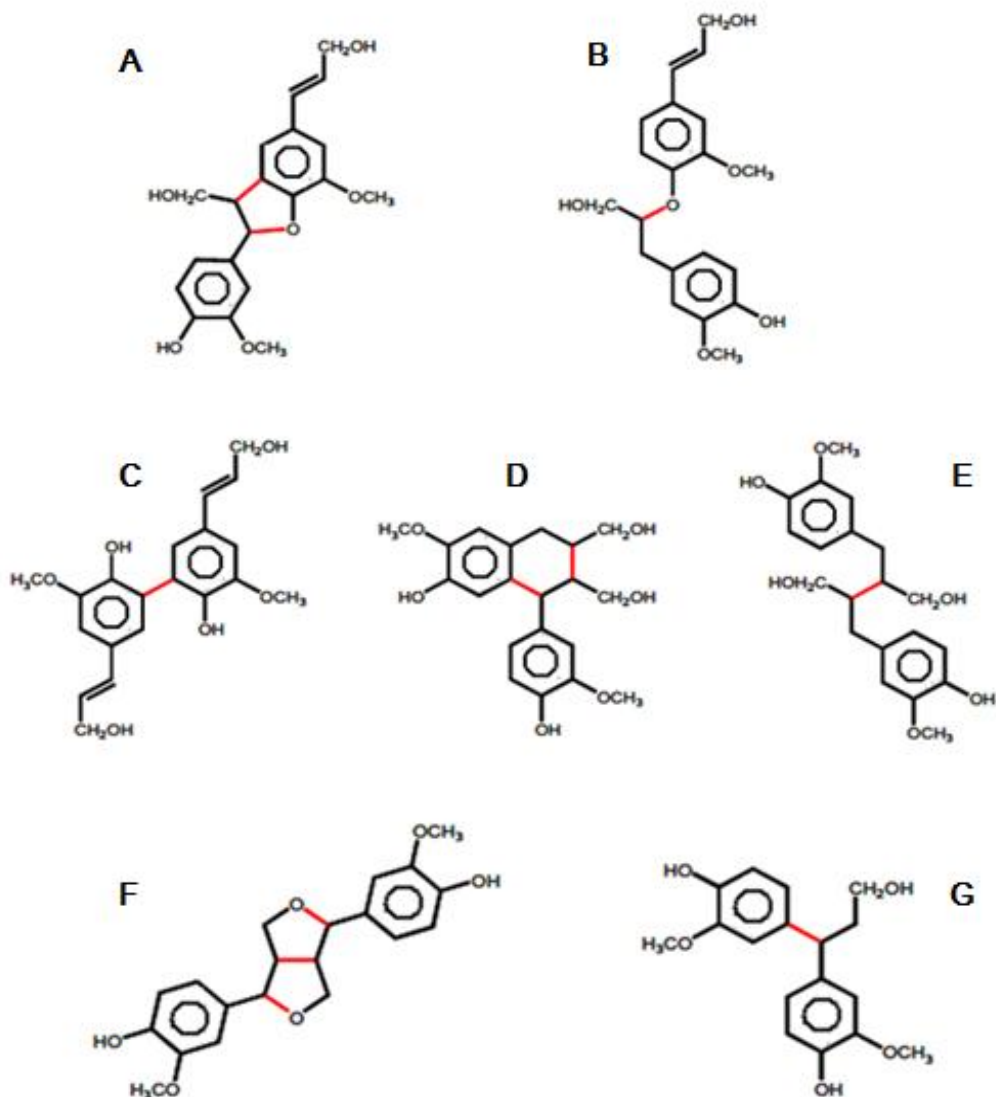


Figura 1.5 - Principais tipos de ligações entre monómeros de lenhina e estruturas diméricas associadas. **Painel A:** Ligações α -O-4', β -5'; **Painel B:** Ligação β -O-4'; **Painel C:** Ligação 5-5'; **Painel D:** Ligações β - β' , 6- α' ; **Painel E:** Ligação β - β' ; **Painel F:** Ligações α -O- γ' , β - β' , γ -O- α' ; **Painel G:** Ligação 1- α' (Adaptado de Graça, 2006).

As lenhinas mais condensadas são mais difíceis de despolimerizar, e o grau de condensação é, em parte, determinado pela proporção relativa dos três tipos de monómeros presentes na lenhina. Desta forma, a estrutura química da lenhina depende não só das espécies vegetais, como também dos tecidos da planta, da localização da

lenhina no interior da célula vegetal, idade da planta, clima e qualidade da luz solar, entre outros factores (Janshekar *et al.*, 1983).

O tipo de ligações, existente entre os monómeros da lenhina, são menos reactivas do que as existentes na maioria dos polímeros biológicos, e tornam este composto numa macromolécula mais resistente à degradação microbiana, quando comparada com a celulose e a hemicelulose (Souza, 1999). Além disso, o polímero de lenhina possui grande diversidade química, impedindo o reconhecimento de enzimas capazes de degradar este composto (Weng *et al.*, 2008). Desta forma, a lenhina funciona como um agente protector da degradação das paredes celulares das plantas, entre outras propriedades importantes que detém e que já foram citadas (Souza, 1999).

1.1.3.2 - Importância da Lenhina

A lenhina é uma macromolécula que apresenta várias propriedades físicas que permitem que este polímero seja utilizado em diferentes sistemas directamente ou após modificações químicas. Desta forma a lenhina pode ser utilizada reaproveitando as lenhinas industriais de forma a produzir novos produtos, e usando este composto eventualmente como uma mais-valia na medicina e alimentação (McCarthy *et al.*, 2000; Stewart, 2008) e ainda a possibilidade de ser utilizada como dispersante, emulsificante e estabilizante, sequestrante de metais, ligantes e adesivos, aditivos, entre outros (Fernandes, 2005).

Grande parte dos resíduos de lenhina deriva das indústrias, principalmente da indústria papelreira. A presença de lenhina afecta negativamente algumas propriedades do papel e a sua remoção é efectuada durante a polpação de forma a não haver degradação significativa das fibras de celulose. A polpação é o processo utilizado para transformar a madeira numa massa de fibras individualizadas, através da ruptura das ligações entre fibras no interior da estrutura da madeira. A extensão da remoção de lenhina depende não só do processo de polpação como também das matérias-primas utilizadas (Lara *et al.*, 2003).

Os resíduos de lenhina são frequentemente usados como combustível na produção de energia do processo de polpação. Este uso acaba por ser, na maioria das vezes, o escolhido, devido quer à estrutura química da lenhina e dos seus derivados ser muito complexa, envolvendo ligações carbono-carbono difíceis de serem quebradas, quer à sua heterogeneidade e às grandes quantidades de impurezas existentes no licor negro, ou seja, os efluentes contaminados gerados após a produção da polpa de celulose (Lara *et al.*, 2003) e, conseqüentemente, ao custo elevado para a purificação e para o processamento do licor cru comparando-o com o seu uso como material combustível (McCarthy *et al.*, 2000).

O uso da lenhina para combustão é um dos fins mais utilizados pelas indústrias, não só pelos factores descritos, como também por apresentar um valor calórico elevado (7,1 kcal g⁻¹), quando comparado com o do carvão e do petróleo, ficando economicamente mais atraente à medida que os preços do petróleo tendem a aumentar e, por isso, os produtos da lenhina podem competir com os produtos similares produzidos a partir do petróleo (Janshekar *et al.*, 1983, Weng *et al.*, 2008).

A lenhina tem ainda um grande interesse ao nível da indústria de plásticos, na medida em que este polímero é altamente resistente ao impacto e à temperatura. Para além disso, no fabrico deste tipo de produtos é essencial o uso de antioxidantes para inibir os processos de oxidação que ocorrem com o aumento da temperatura, irradiação com luz ultravioleta, etc. A propriedade antioxidante pode ser conseguida a partir da lenhina devido aos compostos fenólicos que contém. Alguns estudos têm demonstrado que a lenhina e os seus produtos de degradação podem agir como estabilizantes térmicos e inibidores da fotodegradação de alguns polímeros (McCarthy *et al.*, 2000).

A acumulação de elevadas quantidades de lenhina em lugares onde os resíduos agrícolas apresentam problemas na sua eliminação, resulta não só numa eventual alteração do ecossistema, mas também na perda de material potencialmente valioso.

Os resíduos lenhocelulósicos quando lançados em águas naturais, podem conduzir a eventuais problemas ambientais, como por exemplo, é o caso da desregulação endócrina do estrogénio nos animais aquáticos. Isto é, estes resíduos são desreguladores endócrinos para espécies existentes nas águas naturais, podendo danificar um órgão endócrino, alterar a função de um órgão endócrino, interagir com um receptor de hormonas ou alterar o metabolismo de uma hormona num órgão endócrino. Estas alterações no sistema endócrino conduzem a uma diminuição na adaptação reprodutiva (Bila *et al.*, 2007; Chamorro *et al.*, 2009).

No entanto, estes resíduos apresentam potencial de bioconversão, isto é, o material lenhocelulósico poderá adquirir inúmeras utilidades e entrar em diferentes mercados, tais como, no fabrico de papel, na produção de combustíveis, na compostagem e na alimentação humana e animal, entre outros (Baurhoo *et al.*, 2008; Stewart, 2008).

A bioconversão de resíduos lenhocelulósicos tem um valor acrescentado, pois requer um processo com várias etapas que incluem, habitualmente, um pré-tratamento (mecânico, químico ou biológico), a hidrólise de polímeros de forma a obter moléculas metabolizáveis (por exemplo, açúcares como hexoses ou pentoses), a utilização das moléculas obtidas como substrato para o crescimento microbiano ou para produzir produtos químicos e, por fim, a separação e purificação (Sánchez, 2009).

1.1.3.2.1 A Lenhina como Fibra Alimentar

A importância das fibras alimentares na dieta tem vindo a ser reconhecida ao longo dos anos. As fibras alimentares podem ser de dois tipos, solúveis e insolúveis, exercendo diferentes efeitos fisiológicos na saúde humana (Zia-ur-Rehman *et al.*, 2004). As fibras alimentares encontram-se apenas em alimentos de origem vegetal, tais como as frutas, vegetais e grãos, e consistem na parte das plantas não digerível pelas enzimas do tracto intestinal e, parte delas, podem ser metabolizadas pelas bactérias no intestino grosso (Anderson *et al.*, 2007). Para diferentes tipos de plantas, existem diferentes tipos de fibras, incluindo pectina, goma, mucilagem, celulose, hemicelulose e lenhina (Anderson *et al.*, 2007).

As fibras pectina, goma e mucilagem são solúveis em água e podem ser encontradas no interior das células vegetais. Estas fibras diminuem a velocidade de passagem de alimentos nos intestinos, mas não induzem a um aumento do volume fecal (Anderson *et al.*, 2007). As fibras solúveis demonstraram ter a capacidade de diminuir os níveis de colesterol e glicemia do sangue e, assim, ajudar a reduzir o risco de algumas doenças cardiovasculares (Dantas, 1989). Alguns dos alimentos onde é possível encontrar fibras solúveis são o feijão, farelo de aveia, frutas e verduras (Zia-ur-Rehman *et al.*, 2004).

As fibras das paredes celulares (a hemicelulose, a celulose e a lenhina) são insolúveis em água e aceleram a passagem dos alimentos através do tracto digestivo e aumentam o volume fecal, ou seja, previnem ou atenuam, as hemorróides, diverticulose e a prisão de ventre (Dantas, 1989).

As fibras alimentares insolúveis aumentam a taxa de resíduos removidos pelo corpo humano, fazendo com que a exposição a substâncias tóxicas produzidas durante a digestão seja menor (Anderson *et al.*, 2007). Um exemplo é a adsorção eficaz, pela lenhina, de aminas aromáticas heterocíclicas (HAAs), detectadas em produtos de carne e peixe cozinhados, devido à sua hidrofobicidade, impedindo a absorção de HAAs por parte do intestino delgado e, assim, evitando a sua passagem pelo fígado que as transforma em formas activas, que representam um perigo para a saúde humana por serem mutagénicas e possivelmente cancerígenas (Anderson *et al.*, 2007).

As fibras insolúveis podem encontrar-se em variadíssimos alimentos, como por exemplo o farelo de trigo, cereais integrais, legumes e produtos de grãos inteiros como o feijão (Anderson *et al.*, 2007). Desta forma o uso de dietas contendo lenhina, poderá reduzir o risco de algumas formas de cancro (Funk *et al.*, 2007).

Capítulo 2 - Biodegradação da Lenhina

2.1 - Biodegradação da Lenhina pela Acção de Fungos

Os eventuais benefícios para a saúde e as aplicações industriais de lenhinas tornam-na uma fonte de pesquisa muito promissora. Os avanços nestes estudos poderão resultar tanto numa redução do impacte ambiental, causados pelos resíduos industriais de origem agrícola e florestal, como numa aplicação das diferentes lenhinas obtidas após processos industriais, que têm propriedades físico-químicas e biológicas diferentes da lenhina nativa, existente na natureza e cuja estrutura é complexa e heterogénea (Ugartondo *et al.*, 2009).

Antes de serem desenvolvidas potenciais utilizações da lenhina é necessário garantir que este composto é seguro, e que pode ser aplicado em formulações de futuro sem causar danos ou lesões. Ugartondo *et al.* realizaram, em 2009, estudos citotóxicos, ou seja, estudos onde é analisado o poder tóxico que um determinado composto exerce sobre células de um tecido, revelando que a lenhina tem efeitos citotóxicos, mas apenas em concentrações superiores às utilizadas para exercer efeito antioxidante. Isto é, ao ser estudada a relação entre o potencial citotóxico e a actividade antioxidante, observaram que a concentração (150 µg/ml) à qual o efeito antioxidante é eficaz é menor do que a concentração necessária para se verificar efeitos citotóxicos (as concentrações de efeito antioxidante são 5 a 10 vezes menor) (Ugartondo *et al.*, 2008). Assim, a baixa toxicidade da lenhina mantém em aberto a possibilidade de novas aplicações deste composto.

A degradação da lenhina para aproveitamento e reutilização pode ser realizada por diferentes vias: mecânica, térmica, química e biológica. Os mecanismos para a modificação e degradação da lenhina, na natureza, já foram desenvolvidos e a sua decomposição eficiente deve-se, essencialmente, à acção cooperativa entre os vários tipos de fungos, bactérias e microflora do solo (Martínez *et al.*, 2005), isto é, a degradação biológica da lenhina adquiriu importância extrema no ciclo do carbono.

Muitos microrganismos são capazes de degradar e utilizar a celulose e a hemicelulose como fonte de carbono e energia. Contudo, apenas um grupo restrito de fungos e bactérias tem a capacidade de mineralizar o carbono constituinte deste polímero. No que diz respeito às bactérias, a decomposição conseguida por estes microrganismos é parcial e centrada na modificação de alguns radicais da cadeia lateral das unidades de fenilpropano, e sobretudo na eliminação do conteúdo de hidratos de carbono associados ao polímero. As bactérias desempenham, provavelmente, um papel secundário na degradação da lenhina (Martínez *et al.*, 2005).

O processo biológico de degradação apresenta vantagens sobre os procedimentos não biológicos, na medida em que o custo associado aos sistemas enzimáticos de hidrólise de lenhina, por exemplo, por fungos é relativamente baixo e os subprodutos resultantes são potencialmente úteis, levando a uma diminuição nos desperdícios (Sánchez, 2009).

Na natureza existem fungos que são extremamente prejudiciais para a saúde do Homem, causando inúmeras doenças e intoxicações (Lopes *et al.*, 1996). No entanto, existem também fungos utilizados na formulação de géneros alimentícios (queijos, iogurtes, bebidas alcoólicas, pão e outros produtos à base de trigo, molho de soja, entre outros alimentos) e na elaboração de medicamentos como é o caso da penicilina (Sánchez, 2009).

Os fungos são organismos eucarióticos e podem ser de dois tipos consoante a sua morfologia: fungos filamentosos (possuem hifas) e leveduras (normalmente unicelulares) (Lopes *et al.*, 1996). Os fungos filamentosos apresentam uma morfologia complexa e heterogénea, podendo exibir diferentes formas na sua estrutura, durante o ciclo de vida. A sua estrutura vegetativa básica é um filamento tubular (hifa) originado a partir de um único esporo. Assim, a colónia de um fungo filamentoso é uma estrutura repetitiva. Isto é, é composta por uma rede tridimensional ramificada por hifas interconectadas e possui um indefinido número de pontos de crescimento (Lopes *et al.*, 1996).

O crescimento dos fungos é afectado por factores físicos e químicos como: temperatura, humidade, condições de luminosidade, concentração de oxigénio, pH, micronutrientes, fontes de carbono e azoto, entre outros (Tuomela, 2002). Os fungos têm uma maior capacidade de degradação do material lenhoso devido, principalmente, à existência de hifas que lhes conferem capacidade de penetração. Assim, diferentes tipos de fungos irão dar origem a diferentes tipos de penetração (Martínez, et al., 2005).

O reino *Fungi* compreende cinco classes: Quitridiomycetas; Zigomicetas; Ascomycetas; Basidiomycetas e Deuteromycetas (Lopes *et al.*, 1996).

Os Deuteromycetas diferenciam-se das outras classes por não possuírem sexualidade e por se reproduzirem unicamente de forma assexuada. Nos Quitridiomycetas a sexualidade envolve a fusão de gâmetas e nos Zigomicetas a reprodução sexual realiza-se pela fusão dos gâmetas e pela posterior formação de um zigosporo (Mosquera, 2007).

Nos Ascomycetas as hifas compatíveis reúnem-se, levando a uma fusão de núcleos e a uma posterior meiose em cada célula asco mãe, originando os meiosporos. Dentro do asco, os meiosporos sofrem mitoses formando assim os ascosporos. Cada asco contém 4-8 ascósporos (Mosquera, 2007).

Nos Basidiomycetas, as hifas compatíveis reúnem-se por meio de fusão de células vegetativas que não estão sexualmente diferenciadas com a formação de hifas dicarióticas. A cariogamia e posterior meiose, irá dar origem a uma célula em forma de basídio. Depois da meiose, os núcleos haplóides saem através de pedúnculos curtos (sterigmas) do basídio e o esporo (basidiosporo) começa o seu desenvolvimento. Os basídios estão localizados em camadas que fazem parte do basidiocarpo (Mosquera, 2007).

Os fungos capazes de degradar total ou parcialmente a lenhina são os fungos da podridão mole, os fungos da podridão parda e os fungos da podridão branca (Tuomela, 2002).

2.1.1 - Fungos da Podridão Mole da Madeira

Os fungos que causam a podridão mole são taxonomicamente classificados como Ascomicetas e Deuteromicetas. Estes fungos caracterizam-se por enfraquecer a camada superficial da madeira, tornando-a mais mole, aquando da presença de humidade excessiva. A estes fungos está associada uma perda de força dos tecidos afectados, devido à degradação de polímeros essenciais à constituição destas células (Schwarze *et al.*, 2000).

Estes fungos são capazes de atravessar, durante o seu crescimento, as paredes secundárias de células lenhificadas, dando lugar a cavidades cilíndricas, através das quais se introduz a hifa do fungo (Schwarze *et al.*, 2000). Contudo, a capacidade de degradação da lenhina é escassa, centrando-se na eliminação de certas estruturas da cadeia lateral dos monómeros constituintes (Tuomela, 2002).

2.1.2 - Fungos da Podridão Parda da Madeira

Os fungos responsáveis pela podridão parda são geralmente fungos Basideomicetas. Estes fungos atacam principalmente a celulose e a hemicelulose, tendo uma acção muito limitada sobre a lenhina, devido a não conseguirem crescer entre a lenhina, ou seja, as hifas avançam longitudinalmente, paralelas a este polímero (Schwarze *et al.*, 2000). Apesar disso são capazes de modificar, em parte, a estrutura da lenhina. A consequência principal, resultante do ataque destes fungos à lenhina, é a abundante desmetilação do polímero (Tuomela, 2002). Contudo, a capacidade em degradar a lenhina é muito inferior à dos fungos de podridão branca, devido possivelmente à carência de componentes do sistema enzimático responsáveis pela mesma (Sánchez, 2009).

2.1.3 - Fungos da Podridão Branca da Madeira

Este grupo possui uma grande diversidade de géneros pertencentes principalmente aos grupos Basideomicetas e Ascomicetas (Tuomela, 2002). A degradação da lenhina é completa, sendo este tipo de microrganismos os mais eficazes no que diz respeito à sua decomposição. Estes fungos provocam um grande estreitamento nas paredes das células lenhificadas e na lamela média. A erosão da parede das células vegetais é conseguida a

uma certa distância da hifa do fungo, sugerindo a implicação de um sistema degradativo extracelular (Schwarze *et al.*, 2000). Os fungos da podridão branca atacam os polímeros de lenhina inalterados, causando a clivagem de ligações, tais como ligações C_{α} - C_{β} , C_1 - C_{α} , e clivagem dos anéis aromáticos (Janshekar *et al.*, 1983).

A capacidade que estes fungos têm de degradar o material lenhocelulósico estará associada com o seu eficiente sistema enzimático, à capacidade oxidativa elevada e a enzimas de baixa especificidade para o substrato. Isto é, os fungos têm dois tipos de sistema enzimático extracelular, o sistema hidrolítico, que produz hidrolases que são responsáveis por degradar polissacáridos, e um sistema lenholítico oxidativo, que degrada a lenhinha e abre os anéis fenílicos (Sánchez, 2009).

Devido à estrutura da lenhina, macromolécula estereoirregular com acoplamentos intermonómeros do tipo carbono-carbono e éter, o seu sistema decompositor deve ser extracelular, pouco específico e com um mecanismo preferencialmente oxidativo a hidrolítico (Kersten & Cullen, 2007; Maijala, 2000) Estas características podem ser encontradas nos fungos da podridão branca, que apresentam peroxidases e oxidases extracelulares, que actuam sem especificidade via geração de radicais livres não estáveis, sofrendo uma variedade de reacções espontâneas de clivagem (Kersten & Cullen, 2007).

2.2 - Enzimas Implicadas no Processo de Degradação da Lenhina

A natureza química da lenhina, como anteriormente referido, condiciona a sua degradação pelo sistema biológico. Assim, o sistema biológico terá de ser inespecífico na forma como actua, com uma localização preferencialmente extracelular e de natureza não hidrolítica (Sánchez, 2009).

O sistema capaz de decompor a lenhina é composto por uma série de enzimas extracelulares que actuam conjuntamente. Desta forma, as investigações ligadas a degradação da lenhina têm sido realizadas com maior extensão usando fungos da podridão branca da madeira, por serem os microrganismos com maior eficácia neste processo (Maijala, 2000). O primeiro passo da degradação destes compostos pelos fungos envolve a formação de radicais livres, muito reactivos, que desencadearão

depois reacções em cadeia. Esta é a base da não especificidade destes processos (Kersten & Cullen, 2007).

Nos fungos da podridão branca da madeira, as enzimas lenholíticas são sintetizadas no interior da célula, e posteriormente transportadas para o exterior através da membrana e da parede celular. Estas enzimas são normalmente produzidas como resposta à limitação de nutrientes do meio, como carbono, azoto ou enxofre (Maijala, 2000). As enzimas implicadas directa ou indirectamente na degradação da lenhina são peroxidases, fenoloxidasas e enzimas produtoras de peróxido de hidrogénio (Niebisch, 2009).

As peroxidases são oxido-redutoras e catalisam uma grande variedade de reacções, necessitando da presença de peróxido de hidrogénio, como é o caso da lenhina peroxidase e a manganês peroxidase (Soares, 2000). As fenoloxidasas, onde se inclui a lacase, também se integram nas oxido-redutases, mas catalisam reacções de oxidação de compostos fenólicos, não necessitando de peróxido de hidrogénio como co-substrato (Soares, 2000).

2.2.1 - Lenhina Peroxidase (LiP)

A Lenhina Peroxidase (LiP) foi descoberta no fungo *Phanerochate chrysosporium*, em 1983. Est enzima é uma glicoproteína, com um peso molecular entre 38 e 43 KDa, contém ferroporfirina IX como grupo prostético e requer peróxido de hidrogénio para a sua actividade catalítica. A enzima catalisa a oxidação de vários compostos, sendo capaz de despolimerizar a lenhina. Esta enzima surge na forma de um conjunto de isoenzimas as quais variam em número e características dependendo do fungo em estudo (Tavares, 2006).

A capacidade de oxidação de substratos deve-se ao grupo hemo poder conter até dois equivalentes de oxidação: um sobre o átomo de ferro central e outro no anel de protoporfirina IX (Niebisch, 2009). O ciclo catalítico (Figura 2.1) inicia-se com a oxidação da enzima pelo peróxido de hidrogénio, dando origem ao composto I. Este irá oxidar substratos aromáticos através da obtenção de um electrão, originando agora o composto II, que novamente oxida substratos aromáticos regenerando a enzima férrica nativa. A oxidação sobre os substratos conduz à formação de radicais catiónicos. Estes

radicais livres sofrerão processos não enzimáticos de estabilização até serem obtidos os produtos de degradação (Kersten & Cullen, 2007).

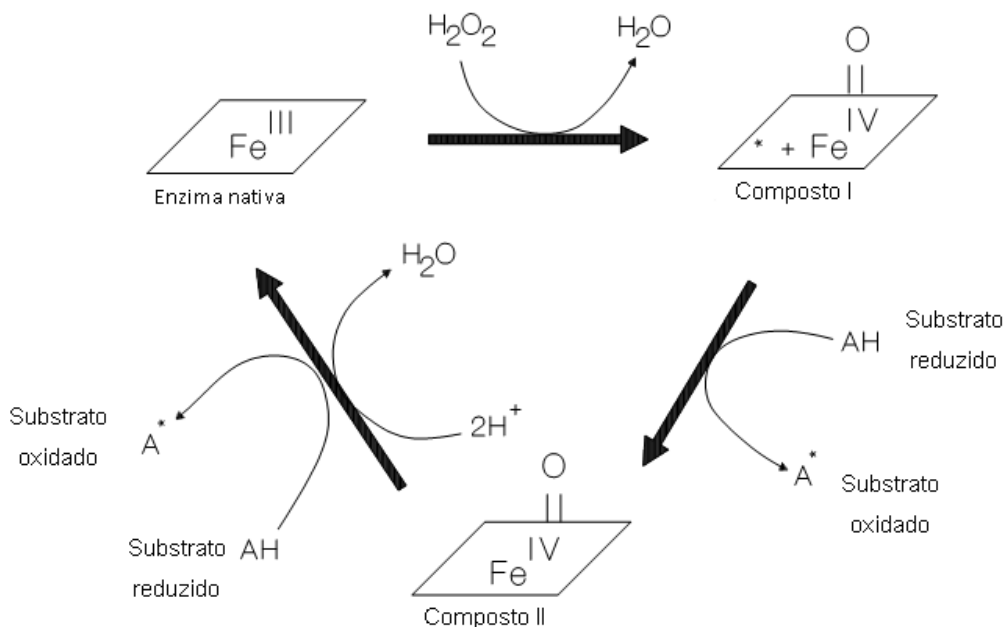


Figura 2.1. – Ciclo catalítico da lenhina peroxidase (adaptado de Niebisch, 2009)

O processo de oxidação monoelectrónica, catalizado pela lenhina peroxidase sobre a lenhina, provoca dois tipos de reacções bem diferenciadas, a despolimerização das unidades fenilpropano e a rotura dos anéis aromáticos presentes neste polímero (Niebisch, 2009). Os radicais livres originados por acção desta enzima são similares aos requeridos na síntese do polímero de lenhina. Assim, há a possibilidade destes radicais realizarem a repolimerização da lenhina, não podendo a lenhina peroxidase ser a única enzima do sistema lenholítico (Kersten & Cullen, 2007).

2.2.2 - Manganês Peroxidase (MnP)

A manganês peroxidase (MnP) é uma glicoproteína hémica, com um peso molecular que oscila entre os 45 e os 47 KDa, capaz de oxidar, como a LiP, uma grande variedade de substratos. No entanto, tem maior facilidade, relativamente à LiP, em oxidar compostos fenólicos. A enzima requer a presença de iões de manganês livres (Mn²⁺)

para a sua actividade catalítica, bem como de peróxido de hidrogénio (Kersten & Cullen, 2007).

O ciclo catalítico (Figura 2.2) inicia-se através da ligação do peróxido de hidrogénio à enzima. Para quebrar a ligação existente entre a enzima e o peróxido de hidrogénio é necessária a transferência de dois electrões, resultando na formação do composto I e uma molécula de água. Posteriormente um ião Mn^{2+} doa um electrão ao composto I, formando assim o composto II e um ião Mn^{3+} . Este processo repete-se novamente regenerando a enzima férrica nativa (Niebisch, 2009).

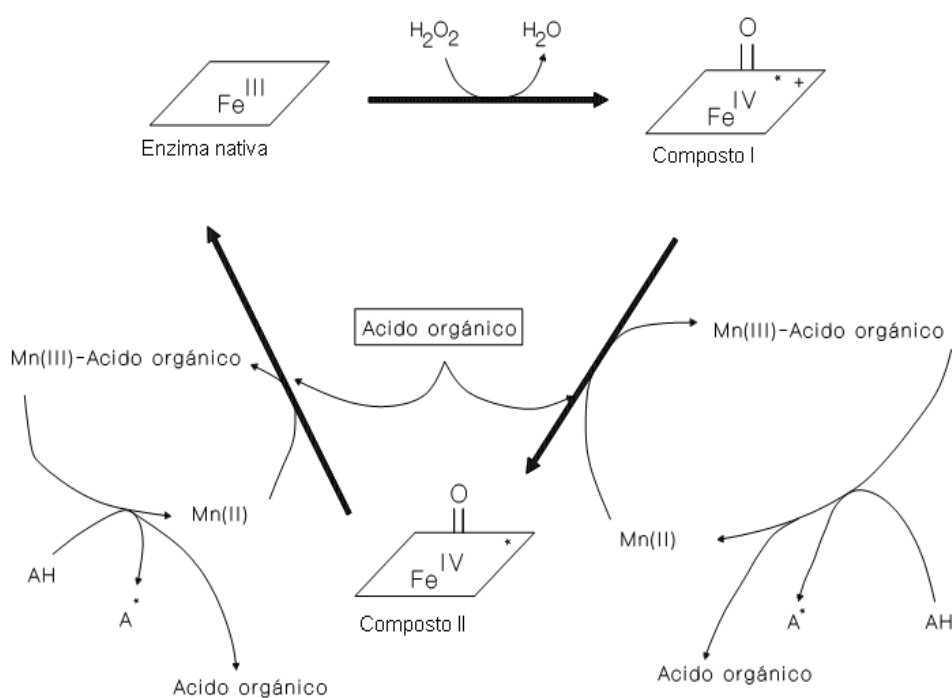


Figura 2.2 - Ciclo catalítico da Manganês Peroxidase (adaptado de Niebisch, 2009)

O ião Mn^{3+} é um oxidante altamente inespecífico, capaz de produzir oxidações graças e encontrar-se estabilizado, formando complexos com ácidos orgânicos produzidos por alguns fungos. Estes complexos têm potencial de oxidorredução, e devido ao seu tamanho reduzido, podem introduzir-se dentro da matriz lenhocelulósica mais facilmente que as enzimas (Kersten & Cullen, 2007).

2.2.3 - Lacase

A lacase é uma enzima pertencente ao grupo das oxidases que complexam o cobre e catalisam a oxidação de vários compostos, principalmente fenóis, com a concomitante redução do oxigénio molecular a água. A lacase foi amplamente estudada, tendo sido detectada em várias espécies de plantas, bactérias, insectos e fungos (Soares, 2000). As lacases são enzimas que diferem das peroxidases por não serem de natureza hémica, e por terem como átomo central o cobre. O sítio activo da lacase é formado por quatro átomos de cobre sendo estes divididos em três grupos com diferentes papéis durante o processo enzimático (Figura 2.3).

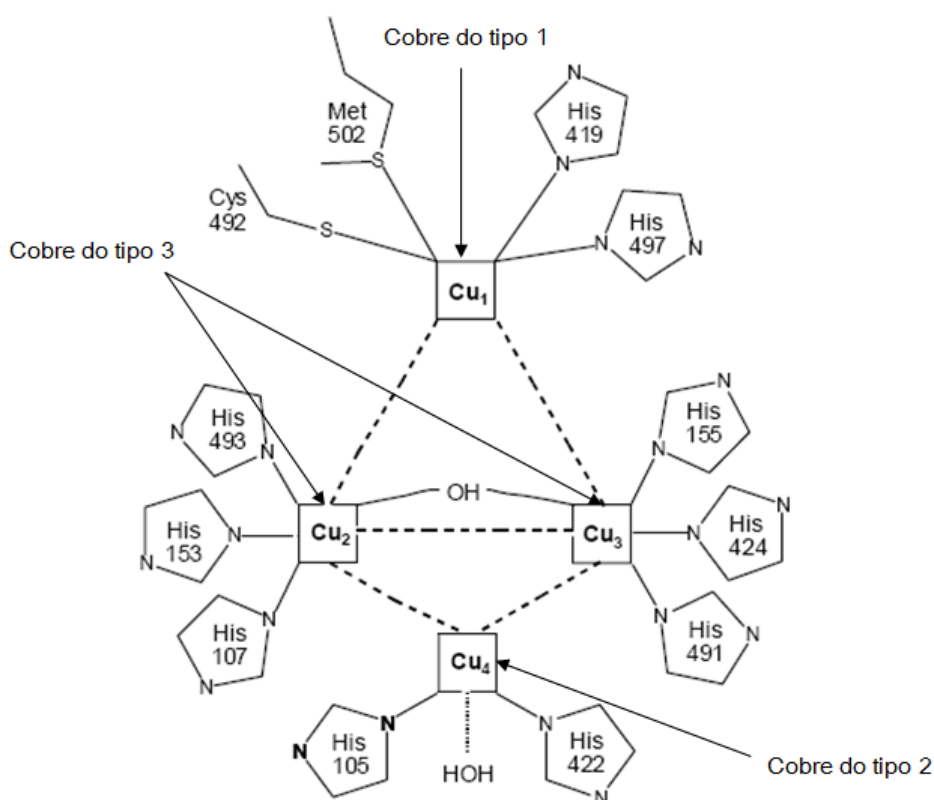


Figura 2.3 - Centros de cobre da lacase (adaptado de Claus, 2004)

Por convenção, um cobre é do tipo 1 (T1), outro do tipo 2 (T2) e dois do tipo 3 (T3) (Niebisch, 2009). No cobre T1 ocorre a oxidação do substrato, sendo os electrões recebidos pelo cobre T1 transferidos para o “cluster” trinuclear formado por dois cobres T3 e um cobre T2, onde ocorre a redução do oxigénio molecular em água (Niebisch, 2009).

A lacase é um fenol oxidase, capaz de catalisar a extracção de um electrão de uma grande variedade de substratos, causando a formação de radicais fenoxi. Uma vez formados, estes radicais podem originar uma série de reacções para a sua estabilização. Estas reacções de estabilização são de natureza espontânea e não enzimática, tal como ocorria nos radicais catiónicos formados pelas enzimas LiP e MnP (Claus, 2004).

2.2.4 - Enzimas Produtoras de Peróxido de Hidrogénio

Para que haja uma completa degradação da lenhina é necessária a acção de enzimas intracelulares. Estas enzimas são importantes na geração de metabolitos secundários que suportam o metabolismo extracelular (Kersten & Cullen, 2007).

Um componente importante do sistema lenholítico, tal como foi referido, é o peróxido de hidrogénio. Assim, algumas oxidases produzem este composto, fazendo com que haja uma grande correlação fisiológica entre as enzimas produtoras de peróxido de hidrogénio, as enzimas peroxidases e o composto peróxido de hidrogénio. As enzimas produtoras de peróxido de hidrogénio usam como substratos os metabolitos secundários, excretados pelo fungo para o meio, gerando este composto que é posteriormente utilizado pelas enzimas peroxidases, que intervêm na degradação (Kersten & Cullen, 2007).

Capítulo 3 - Importância da Lenhina na Alimentação

3.1 Lenhina como Suplemento nas Rações Animais

Devido à estrutura complexa da lenhina, este polímero tem tido pouca utilidade ao nível industrial. A lenhina é normalmente vista como um resíduo da indústria do papel e utilizada como combustível para o balanço energético do processo de polpação. As indústrias agrícolas também geram quantidades elevadas de resíduos, incluindo farelo de arroz, folhas de chá usadas e polpas que restam após serem espremidas frutas para produção de sumos (Toh *et al.*, 2010). Apesar de alguns destes resíduos serem reutilizados como fertilizantes, óleo e combustível, muitos não são reaproveitados (Toh *et al.*, 2010).

Na agropecuária, a lenhina nativa, tal como existe na natureza, é considerada uma barreira para a digestibilidade dos nutrientes. Presumivelmente por esta razão, a lenhina purificada (lenhina processada, nomeadamente lenhina resultante da indústria papeleira) não recebe muito interesse científico e o seu potencial como aditivo alimentar não tem sido reconhecido (Baurhoo *et al.*, 2008).

No entanto, estudos recentes, têm mostrado que a lenhina na sua forma purificada é constituída por fragmentos fenólicos de baixo peso molecular que possuem efeitos biológicos diferentes dos característicos da lenhina nativa. Existe a possibilidade de estes fragmentos poderem exercer efeitos benéficos sobre a produtividade dos animais e a segurança dos produtos de origem animal (Jung & Fahey, 1983).

As diferenças nos tratamentos utilizados levam à obtenção de fragmentos de lenhina diferentes. No processo ao sulfito, o ácido sulfúrico é usado para converter a lenhina em lenhosulfonatos. O processo Kraft utiliza hidróxido de sódio e sulfito de sódio para extrair a lenhina da celulose (Janshekar & Fiechter, 1983). O processo Alcell quebra a integridade química da lenhina nativa, gerando fragmentos de lenhina purificada como co-produto. Este processo envolve o etanol aquoso como licor de cozimento a uma temperatura entre 185 e 195 °C. A lenhina Alcell, em contraste com a lenhina Kraft e ao sulfito, contém fragmentos fenólicos com maior hidrofobicidade (Baurhoo *et al.*, 2007). Assim a lenhina na sua forma purificada possui estruturas químicas que diferem da

lenhina nativa. Por esta razão a lenhina purificada pode possuir propriedades biológicas que não são características da lenhina nativa (Baurhoo *et al.*, 2008).

3.1.1 Implicações na saúde animal

Os estudos sobre os efeitos da lenhina no desempenho animal são limitados. No entanto, estudos recentes revelaram efeitos positivos da lenhina purificada no desempenho animal (Baurhoo *et al.*, 2008). A lenhina Alcell, quando presente nas rações numa concentração de 12,5g/kg, favoreceu o aumento de peso corporal de bezerros da raça holandesa, sendo que nenhum benefício foi observado para níveis mais elevados de lenhina (25 ou 50 g/kg). Já em suínos esta lenhina numa concentração de 12,5 g/kg não afectou nem o peso nem a eficiência alimentar (i.e., eficiência na digestão e absorção de nutrientes). Em frangos a lenhina Kraft provocou também um aumento de peso e de eficiência alimentar. Outros estudos mostraram que nos gansos a suplementação das rações com uma lenhina purificada favorecia o aumento de peso, mas a alimentação foi utilizada de forma menos eficiente, sugerindo que este efeito era causado por uma maior rapidez da digestão (Baurhoo *et al.*, 2008).

Estes resultados sugerem que as diferenças nas formas e concentrações de lenhina, bem como nas espécies animais, podem contribuir para uma resposta animal variável (Baurhoo *et al.*, 2008).

3.1.1.1 Propriedade antibacteriana da lenhina purificada

Os fragmentos fenólicos da lenhina podem ainda inibir o crescimento de microrganismos como *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus licheniformis* e *Aspergillus niger* (Baurhoo *et al.*, 2008). No entanto, a concentração inibitória mínima é variável consoante os diferentes fragmentos fenólicos (Baurhoo *et al.*, 2008).

A estrutura da cadeia lateral e a natureza dos grupos funcionais vão determinar os efeitos antimicrobianos da lenhina. Em geral, a adição de grupos alquil ao anel benzóico de compostos fenólicos aumenta a actividade antimicrobiana, enquanto aumentos de hidroxilação diminui estes efeitos (Jung & Fahey, 1983). Alguns estudos relativos à

actividade antimicrobiana da lenhina, mostraram que a lenhina purificada alterou o padrão de fermentação do tracto intestinal de frangos ao inibir o crescimento de certas bactérias. Em ruminantes, a resposta à dieta com lenhina é variável. Segundo Baurhoo *et al.* (2007) a lenhina Alcell reduz a concentração de *E. coli* após 3 e 9 dias, sendo a inibição mais acentuada nas concentrações mais elevadas (25 e 12,5 g/kg), sugerindo que os efeitos antibacterianos da lenhina Alcell ocorrem principalmente em altas concentrações.

A *E. coli* intestinal contamina carcaças de aves durante o abate, representando uma causa de doenças de origem animal em humanos. Estas descobertas sugerem que a lenhina Alcell pode representar uma estratégia alimentar para reduzir a carga de *E. coli* no intestino de frangos, podendo oferecer uma oportunidade para melhorar a segurança dos produtos de aves de capoeira (Baurhoo *et al.*, 2008).

O mecanismo exacto da acção da lenhina não está ainda bem definido. No entanto, alguns autores sugerem que os compostos polifenólicos da lenhina causam danos na membrana celular e a lise de bactérias com posterior libertação do conteúdo das células (Baurhoo *et al.*, 2008).

3.1.1.2 Efeitos Prebióticos da lenhina

Os prebióticos são compostos indigestos que estimulam selectivamente o crescimento ou actividade metabólica de um número limitado de microrganismos intestinais em aves e mamíferos.

As lactobacilos e bifidobactérias são bactérias benéficas que limitam a colonização de microrganismos patogénicos no intestino, através da competição por nutrientes e sítios de ligação, secretando substâncias antibacterianas (Baurhoo *et al.*, 2008). Estudos realizados por Baurhoo *et al.* (2007) mostraram que a lenhina Alcell, numa concentração de 12,5 g/kg aumentou a concentração de lactobacilos e bifidobactérias no intestino de frangos. No entanto, quando eram aplicadas concentrações superiores (25 g/kg) a lenhina inibia o crescimento dessas bactérias.

Os prebióticos também podem desempenhar papéis importantes na melhoria da morfologia intestinal de espécies animais. As velocidades mais longas estão geralmente relacionadas com uma melhor saúde intestinal e aumento da eficiência da digestão e absorção. Estudos feitos com a lenhina Alcell sugeriram que em frangos esta lenhina (12,5 g/kg) favorecia o aumento das velocidades, tornando assim a digestão e a absorção de nutrientes mais eficaz. O mesmo não foi observado quando se aumentou a concentração (25 g/kg), sugerindo que o efeito prebiótico da lenhina Alcell só ocorre dentro de uma determinada gama de concentrações (Baurhoo *et al.*, 2008).

3.2 Lenhina e poder antioxidante

Recentemente, têm surgido alguns estudos de forma a encontrar novas aplicações para a lenhina. (Pouteau *et al.*, 2003). Na realidade, a lenhina é um polímero fenólico podendo exercer importantes funções, nomeadamente actividade antioxidante (Pouteau *et al.*, 2003).

Os compostos fenólicos estão omnipresentes nas plantas e são compostos resultantes do metabolismo secundário destes organismos vivos. Os compostos fenólicos intervêm directamente na pigmentação, regulação do crescimento celular e na defesa contra agentes agressivos (Angelo & Jorge, 2007). Quando são consumidos alimentos de origem vegetal, esses fitoquímicos contribuem para a ingestão de antioxidantes naturais na dieta humana (Balasundrama *et al.*, 2006).

Nos alimentos, os compostos fenólicos desempenham um papel importante nas características organolépticas como a cor, aroma e sensações gustativas, nomeadamente ao nível da adstringência e do amargor (Angelo & Jorge, 2007). As principais fontes de compostos fenólicos são as frutas cítricas, como limão, laranja e tangerina, além de outras frutas como cereja, uva, ameixa, pêra e maçã. Estes compostos são encontrados em maiores quantidades na polpa do que no sumo da fruta. A pimenta verde, brócolos, cebola, alho e tomate são também fontes importantes de compostos fenólicos (Angelo & Jorge, 2007).

Estruturalmente, os compostos fenólicos incluem um ou mais anéis aromáticos, tendo em cada anel um ou mais substituintes hidroxilos, e variam de simples moléculas

fenólicas a compostos altamente polimerizados. A maioria dos compostos fenólicos naturais está conjugada com mono e polissacáridos. Apesar da vasta diversidade estrutural dos compostos fenólicos, estes podem ser basicamente divididos em várias classes (Tabela 3.1) (Balasundrama *et al.*, 2006). Nos grupos funcionais, presentes em maior quantidade na lenhina, incluem-se os hidroxilos, carbonilos e metóxilos, cuja quantidade e proporção dependem da origem genética e processos de extracção (Ugartondo *et al.*, 2009).

Tabela 3.1 - Divisão dos compostos fenólicos por classes
(adaptado de Balasundrama *et al.*, 2006)

Classe	Número de Carbonos
Fenólicos simples, benzoquinonas	C_6
Ácidos Hidroxibenzóicos	C_6-C_1
Ácidos fenilacéticos, acetofenol	C_6-C_2
Ácidos Hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	C_6-C_3
Nafitoquinonas	C_6-C_4
Xantonas	$C_6-C_1-C_6$
Estilbenos, antoquinonas	$C_6-C_2-C_6$
Flavonóides, isoflavonóides	$C_6-C_3-C_6$
Lenhanas, neolenhanas	$(C_6-C_3)_2$
Biflavonóides	$(C_6-C_3-C_6)_2$
Lenhinas	$(C_6-C_3)_n$
Taninos	$(C_6-C_3-C_6)_n$

A actividade antioxidante de compostos fenólicos, nomeadamente na lenhina, depende da sua estrutura. Isto é, a actividade antioxidante depende do número e posições dos grupos hidroxilo e da natureza das substituições nos anéis aromáticos (Toh *et al.*, 2010).

A capacidade que os compostos fenólicos têm em sequestrar radicais livres depende não só da capacidade de formar um radical fenoxil (abstracção de um átomo de hidrogénio), como também da estabilidade deste radical. As estruturas fenólicas com substituintes capazes de estabilizar os radicais fenoxil têm maior actividade antioxidante. Por exemplo, substituintes como grupos metoxilo nas posições orto e para estabilizam radicais fenoxil por ressonância. Ligações duplas conjugadas podem proporcionar uma estabilização adicional dos radicais fenoxil através de uma maior deslocalização. No entanto, os grupos carbonilo têm um efeito negativo sobre a actividade antioxidante (Pan *et al.*, 2006).

A actividade antioxidante da lenhina é também influenciada pelo seu peso molecular. Ou seja, lenhinas com pesos moleculares superiores têm maior dificuldade na actividade sequestradora de radicais livres (Pan *et al.*, 2006). Assim, o efeito antioxidante da lenhina é influenciado por vários factores relacionados com as características da lenhina, como os grupos funcionais e o peso molecular (Pan *et al.*, 2006). Os antioxidantes sintéticos como o butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT) e tert-butilhidroquinona (TBHQ) têm sido amplamente usados como antioxidantes em alimentos, mas preocupações com a segurança no seu uso têm levado ao interesse no estudo de antioxidantes naturais. Assim, estes antioxidantes sintéticos vão sendo substituídos por compostos fenólicos (Balasundrama *et al.*, 2006).

Os compostos fenólicos fazem parte da dieta e parecem estar associados a benefícios para a saúde humana, nomeadamente no tratamento e prevenção do cancro, doenças cardiovasculares e outras patologias, devido sobretudo à sua capacidade antioxidante (Garrot *et al.*, 2004).

3.2.1. O Antioxidante

O oxigénio é um dos principais elementos da crosta terrestre e constitui cerca de 21% da composição do ar atmosférico. Esta molécula é indispensável para a produção de energia, pois a oxidação constitui a parte fundamental do metabolismo aeróbio. Porém, embora seja indispensável, este processo conduz à formação de espécies reactivas de oxigénio (ERO) e de espécies reactivas de azoto (ERA) (Ferreira *et al.*, 2007).

A acumulação destas espécies reactivas pode resultar em danos reversíveis ou mesmo irreversíveis e daí a necessidade da sua inactivação permanente para manutenção da homeostasia (Ferreira *et al.*, 2007). A inactivação das espécies reactivas e o combate aos seus efeitos nocivos são realizados por mecanismos antioxidantes, enzimáticos ou não enzimáticos. Um desequilíbrio entre a produção de espécies reactivas e a defesa antioxidante conduz a uma situação de “stress” oxidativo e, conseqüentemente, ao dano oxidativo (Kohen & Nyska, 2002).

Os sistemas vivos estão expostos a uma variedade destas espécies reactivas, de origem exógena (exposição a O₂ e O₃; radiações ionizantes, radiação UV, poluição atmosférica, fármacos, xenobióticos, infecções microbianas e alimentos) e endógena (provenientes do metabolismo) (Ugartondo *et al.*, 2009).

O excesso de espécies reactivas de oxigénio apresenta efeitos prejudiciais nas proteínas, lípidos e hidratos de carbono. Nas proteínas, as interacções com as ERO podem provocar alteração na estrutura terciária, degradação, alteração da funcionalidade e perda da actividade enzimática. A peroxidação lipídica danifica sobretudo os lípidos membranares devido ao seu elevado teor em ácidos gordos insaturados, propagando-se habitualmente através de um conjunto de reacções em cadeia. Ao nível da molécula de ADN podem ocorrer vários danos, a modificação de bases, a alteração da molécula do açúcar, a quebra da dupla cadeia ou dano no sistema reparador do ADN (Kohen e Nyska, 2002). Esta produção descontrolada de espécies reactivas de oxigénio está envolvida no aparecimento de muitas doenças como o cancro, artrite reumatóide, arteriosclerose, bem como processos degenerativos associados com o envelhecimento (Ugartondo *et al.*, 2009).

Os radicais livres são agentes tóxicos e potencialmente geradores de condições patológicas. Estes agentes constituem um grupo de substâncias químicas que se caracterizam por possuírem um ou mais electrões desemparelhados. É esta particularidade que lhes confere a reactividade e a instabilidade que levam a que tenham afinidade para doar ou obter electrões e/ou átomos de hidrogénio de modo a se tornarem estáveis (Ferreira *et al.*, 2007). Os radicais livres (RL) podem ser encontrados em grande quantidade na natureza associados aos átomos de carbono, enxofre, azoto e

oxigénio, sendo classificados em função do átomo portador do(s) electrão(ões) desemparelhado(s) (Ferreira *et al.*, 2007). No entanto, os radicais livres de oxigénio são os que possuem maior relevância biológica, pois são os mais prevalentes nos organismos que utilizam o oxigénio na respiração.

Porém, existem outras moléculas altamente reactivas e potencialmente tóxicas para o organismo, as quais, pelo facto de não terem electrões desemparelhados, não se enquadram na definição de radical livre. São exemplos destas moléculas o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e o ácido hipocloroso (HOCl). Estas moléculas são geradoras de radicais livres e, por essa razão, passou a utilizar-se a designação “espécies reactivas” de forma a englobar os radicais livres e essas moléculas (Tabela 3.2). As espécies reactivas de oxigénio são as que têm maior expressão nos organismos vivos (Ferreira *et al.*, 2007). Assim, torna-se necessário que os organismos estejam suficientemente preparados com uma diversidade de sistemas de antioxidantes de forma a se protegerem de efeitos nocivos (Ferreira *et al.*, 2007).

Tabela 3.2 - Espécies Reactivas de Oxigénio (Ferreira *et al.*, 2007)

Espécies Reactivas de Oxigénio			
Radicais		Não-Radicais	
Nome	Fórmula Química	Nome	Fórmula Química
Superóxido	O ₂ • ⁻	Peróxido de Hidrogénio	H ₂ O ₂
Hidroxilo	HO•	Ácido hipocloroso	HOCl
Peroxilo	ROO•	Ozono	O ₃
Alcoxilo	RO•	Oxigénio singleto	¹ O ₂
Hidroperoxilo	HO ₂ •	Peroxinitrito	ONOO ⁻

A exposição contínua a diferentes tipos de espécies oxidantes conduziu ao desenvolvimento, por parte dos organismos aeróbios, de uma gama de mecanismos de defesa antioxidante, enzimática e não enzimática, de modo a neutralizar as espécies reactivas e evitar os seus danos (Angelo & Jorge, 2007). Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, quando estão em baixas concentrações, atrasam ou inibem a oxidação realizada pelas ERO, fornecendo electrões ou átomos de hidrogénio às espécies reactivas sem se transformarem em moléculas instáveis (Ferreira *et al.*, 2007).

Os antioxidantes podem ser divididos em duas classes: a dos que têm actividade enzimática e a dos que não têm esta actividade. Na primeira, estão os compostos capazes de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, enzimas que interceptam as espécies reactivas, evitando que estas exerçam efeitos nefastos. Estes antioxidantes possuem uma ampla acção contra grande variedade de espécies reactivas, podendo ser regenerados pela própria célula, que possui também capacidade para regular a sua concentração. Na segunda classe, estão moléculas que actuam por intercepção das espécies reactivas e participam na reparação das alterações estruturais da célula, contribuindo em conjunto com os outros agentes antioxidantes para a manutenção do equilíbrio do estado redox da célula (Ferreira *et al.*, 2007).

Os mecanismos de defesa antioxidante podem ser ainda classificados em função da sua localização orgânica (antioxidantes intracelulares e extracelulares) e em função da sua proveniência (antioxidantes exógenos caso surjam a partir da dieta e antioxidantes endógenos quando surgem da síntese endógena) (Ugartondo *et al.*, 2009). Os antioxidantes podem exercer a sua acção de três formas: preventivamente, directamente (interceptando espécies reactivas oxidantes) e indirectamente (estimulando as defesas antioxidantes e os mecanismos de reparação do dano oxidativo) (Tabela 3.3) (Ferreira *et al.*, 2007).

Tabela 3.3 - Origem, localização e mecanismos de acção dos principais antioxidantes (adaptado de Ferreira *et al.*, 2007).

Antioxidantes Exógenos	Antioxidantes Endógenos	
	Intracelulares	Extracelulares
Prevenção	Prevenção	Prevenção
Zinco		
Selénio	Albumina	Glutationa peroxidase
	Bilirrubina	Superóxido dismutase
	Ceruloplasmina	Catalase
	Ferritina	Glutationa redutase
	Mioglobina	Intercepção
	Metalotioneína	Glutationa
	Haptoglobina	Ácido Úrico
		Coenzima Q
		Reparação
		Proteases
		Fofolipases

3.2.2. Implicações na Saúde Humana

Quando incorporados na alimentação humana, os compostos fenólicos não só conservam a qualidade do alimento, como também reduzem o risco de ocorrência de variados fenómenos biológicos e o desenvolvimento de patologias, nomeadamente processos inflamatórios, mutações, envelhecimento, carcinogénese, doenças cardiovasculares, disfunção endotelial, arteriosclerose, doenças do tracto intestinal, artrite reumatóide, diabetes, doenças oculares e doenças neurodegenerativas, como por exemplo a doença de Alzheimer ou de Parkinson (Kohen & Nyska, 2002) (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 - Doenças cuja susceptibilidade de ocorrência aumenta com o “stress” oxidativo
(adaptado de Pereira, 2009)

Alvo	Patologias
Tracto gastrointestinal	Diabetes; Pancreatite; Dano hepático
Cérebro e Sistema Nervoso	Doença de Parkinson; Doença de Alzheimer; Hipertensão; Esclerose múltipla
Coração e vasos sanguíneos	Aterosclerose; Trombose coronária
Pulmão	Asma; Enfisema pulmonar
Olho	Cataratas; Retinopatia
Articulações	Artrite reumatóide
Rim	Glomerulonefrite
Pele	Manchas de envelhecimento; Rugas
Diversos	Envelhecimento; Cancro; Doenças auto-imunes Estados inflamatórios; SIDA; Lupus

Os compostos fenólicos apresentam uma vasta gama de propriedades fisiológicas, tais como efeitos anti-alérgicos, anti-inflamatórios, anti-microbianos, antioxidantes, anti-trombóticos, cardioprotectores e vasodilatadores (Balasundrama *et al.*, 2006).

Sendo a lenhina um composto fenólico poderá estar envolvida na aplicabilidade ao nível medicinal. Alguns autores estudaram essa possibilidade sugerindo que a lenhina poderá ter efeito sobre o ADN e inibir processos de mutagenicidade, resultando num potencial agente antimutagénico e anticarcinogénico (García *et al.*, 2010). Trabalhos recentes confirmaram também que a lenhina pode ser utilizada em produtos cosméticos e farmacêuticos sem efeitos prejudiciais nas células humanas (García *et al.*, 2010). Outros interesses da aplicabilidade da lenhina na saúde têm vindo a surgir, atribuindo benefícios à lenhina no que respeita à actividade antiviral e antiparasita (Ugartondo *et al.*, 2009).

No entanto, a lenhina é um polímero polar (em média com 1-2 grupos hidroxilo por monómero), e portanto apresenta uma baixa solubilidade em meios apolares. Este facto pode limitar a sua reactividade com radicais responsáveis pela oxidação, e consequentemente limitar o seu efeito protector. Assim, existem alguns factores que são importantes para a análise de antioxidantes: boa solubilidade, mobilidade e baixa volatilidade (Pouteau *et al.*, 2003).

Contudo, a estrutura da lenhina depende de uma série de factores incluindo a origem botânica, as condições ambientais de crescimento e as condições de extracção da lenhina. Na verdade, todas as técnicas de deslenhificação consistem na clivagem de ligações covalentes da lenhina natural, convertendo-a em fragmentos de peso molecular mais baixo, mais solúveis (Pouteau *et al.*, 2003).

3.3 Lenhina como Pigmento

A lenhina é um composto que apresenta uma coloração castanha. Sendo a lenhina um composto natural, com propriedades interessantes ao nível de possíveis aplicações na medicina e alimentação animal, como anteriormente referido, surge também a hipótese de uma possível aplicação deste composto na alimentação humana, mais propriamente no seu uso como aditivo (corante) alimentar.

As reacções de escurecimento são uma grande preocupação da indústria alimentar. Estas reacções causam transformações nos alimentos que levam à alteração de compostos do aroma, do sabor e principalmente da cor, que podem levar à rejeição por parte do consumidor (Balbi, 2009). Assim, a indústria alimentar enfrenta o desafio de impedir ou retardar estas reacções com metodologias seguras para o consumidor, de forma a tornar os produtos atractivos e economicamente viáveis.

No entanto, a lenhina é um composto que em determinadas condições ambientais é potencialmente degradável. A luz ultravioleta é um desses factores. A luz solar, especialmente a ultravioleta (UV) pode dar início à fotodegradação da lenhina. Tal fotodegradação pela luz UV induz mudanças na composição química da lenhina, levando à posterior mudança de cor (Feist, 1983).

A lenhina contém cromóforos aromáticos (grupos funcionais que conferem cor às substâncias por serem capazes de absorver radiação ultravioleta ou visível) e, como tal, a sua interacção com a luz UV/VIS na presença de oxigénio é a sua principal causa de oxidação. A foto-oxidação da lenhina refere-se a um processo onde este polímero sofre modificações químicas, tais como a ruptura de uma ligação, ou a perda de hidrogénio resultando na formação de radicais, a formação de peróxidos com o oxigénio e, finalmente, a decomposição com produção de cor e subprodutos hidrofílicos, designados por cromóforos. Embora a temperatura possa não ser um factor tão crítico como a radiação UV, quando esta aumenta, a taxa de oxidação fotoquímica favorece algumas das reacções envolvidas na mudança da cor (Feist, 1983).

Devido a estes factores, não tem sido fácil encontrar métodos que possam ser utilizados na indústria alimentar, e que consigam estabilizar a lenhina e mantê-la com a mesma qualidade inicial. Assim pensa-se que alguns fungos poderão actuar sobre a lenhina convertendo-a numa molécula mais homogénea, podendo esta ser uma solução para a estabilidade da cor deste composto.

3.3.1 A Cor

A cor desempenha um papel importante na visualização de propriedades associadas aos objectos visualizados. No entanto, a cor não é uma característica absoluta de um objecto, mas sim uma percepção humana, e por isso, a cor de um objecto é uma sensação (Melchiades *et al.*, 1999). Ou seja, a influência que a cor tem sobre o ser humano resulta da associação das cores a determinadas sensações, vivências ou memórias. Desta forma, culturas distintas podem ter diferentes significados para determinadas cores, devido às lembranças e sensações que elas podem provocar nos indivíduos (Abramov *et al.*, 1994). De uma maneira geral, o córtex cerebral compara o “input” sensorial com a nova informação e também com informações passadas para assim extrair as características mais importantes (Figura 3.1) (Sherwood, 2007).



Figura 3.1 - A percepção (Sherwood, 2007)

Assim, a cor não corresponde só a propriedades físicas, corresponde também a representações internas ao nível cerebral (Abramov *et al.*, 1994). A percepção está interligada aos órgãos sensoriais e neurológicos, possibilitando que sensações provocadas num indivíduo por estímulos do ambiente sejam sentidas, organizadas e interpretadas, de forma a criar uma representação do ambiente visualizado, numa impressão imediata da realidade (Abramov *et al.*, 1994). A sensação de cor consegue-se através da acção do cérebro perante os estímulos recebidos. De uma forma mais concreta, o fenómeno cromático (a cor), é o resultado da interacção entre três componentes: o observador, o objecto e a fonte de luz (Melchiades *et al.*, 1999).

3.3.1.1 A Luz

Muitos dos fenómenos electromagnéticos são explicados por se considerar a radiação um conjunto de ondas que viajam no espaço, embora outros sejam mais facilmente compreendidos se se considerar a radiação como um fluxo de partículas ou fótons (Oliveira *et al.*, 2004). O espectro electromagnético contém uma vasta gama de frequências e comprimentos de onda de radiação electromagnética (Figura 3.2). Cada parte do espectro electromagnético apresenta aplicações associadas, onde estão compreendidas: as ondas de rádio, as microondas, a radiação infravermelha, a luz visível, a radiação ultravioleta, os raio-X e os raios-gama. A luz tem como propriedade a dualidade onda-partícula e é o único tipo de radiação electromagnética capaz de ser percebido pelo olho humano.

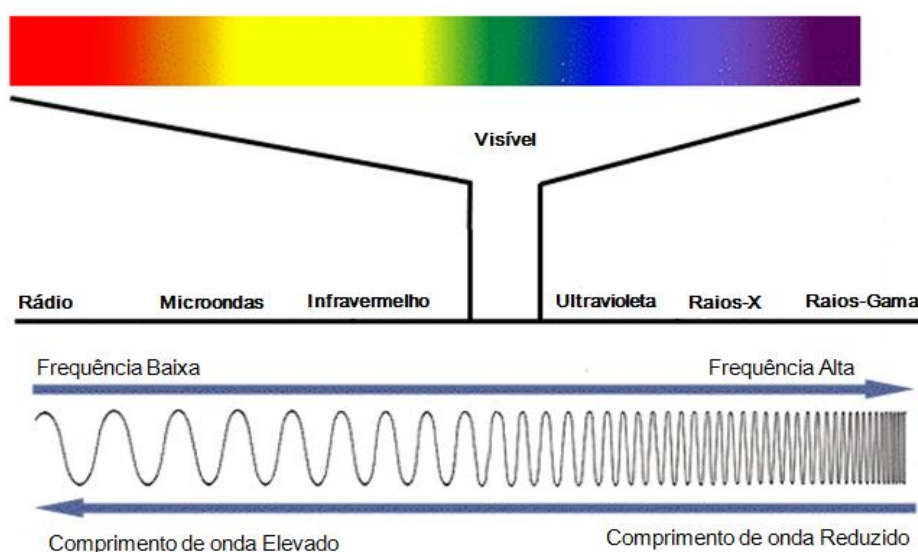


Figura 3.2 - Espectro electromagnético onde estão presentes as principais bandas de radiações electromagnéticas, evidenciando a banda correspondente à luz visível (Matsushiro *et al.*, 2003)

As cores correspondem a comprimentos de onda bem determinados do espectro visível. No entanto, nem todas as cores visíveis se encontram representadas no espectro visível (Matsushiro *et al.*, 2003). As cores não representadas no espectro visível resultam da mistura de luzes com diferentes comprimentos de onda. As cores não espectrais podem ainda ser obtidas por mistura subtractiva, ou seja, faz-se incidir uma luz branca numa superfície que absorva todos os comprimentos de onda não desejáveis para a formulação da cor, tendo a luz reflectida por essa superfície os comprimentos de onda desejáveis para a cor que se quer obter (Matsushiro *et al.*, 2003).

3.3.1.2 O Olho Humano

Os olhos são órgãos sensíveis à radiação electromagnética na região respectiva à luz visível. No caso do olho humano a zona visível encontra-se entre 400 e 700 nm aproximadamente, variando de indivíduo para indivíduo (Martínez *et al.*, 2003).

Cada olho é uma estrutura esférica constituída por um fluído de enchimento que contém três camadas que são, da mais externa para a mais interna: (1) a esclerótica/córnea, camada dura que forma a parte branca visível do olho; (2) a coróideia/corpo é uma

camada especializada e contém o corpo ciliar e a íris e (3) a retina, que contém uma película externa pigmentada e uma película interna de tecido nervoso e os bastonetes e cones que são os fotorreceptores que convertem a energia luminosa em impulsos nervos. Em direcção ao interior do olho a camada externa contém a córnea, substância transparente entre a qual os raios de luz passam para o interior do olho (Figura 3.3).

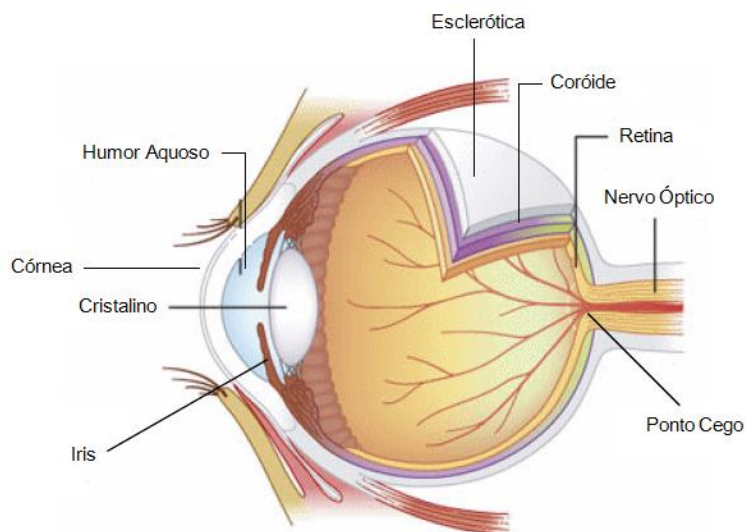


Figura 3.3 - As estruturas e camadas do olho (Adaptado de Sherwood, 2007)

A camada do meio contém vasos sanguíneos que alimentam a retina (Sherwood, 2007). Os pigmentos na coróide absorvem luz, que penetra posteriormente a retina, para impedir que a luz reflecta ou se dissipe dentro do olho (Sherwood, 2007). O interior do olho consiste em duas cavidades de fluido de enchimento, separadas pelo cristalino, e são transparentes para permitir que a luz passe no interior do olho da córnea até à retina. A cavidade anterior contém um fluido aquoso claro (humor aquoso) e a grande cavidade posterior contém um semifluido, uma substância gelatinosa (humor vítreo).

Nem toda a luz que passa na córnea atinge os fotorreceptores sensíveis à luz, devido à presença da íris. A íris é um músculo fino e macio pigmentado, que forma uma estrutura anelar visível no humor aquoso. O pigmento na íris é responsável pela cor do olho. Uma abertura circular no centro da íris, cujo tamanho pode ser ajustado por contracções

variáveis dos músculos e receber mais ou menos luz, mostra que a luz entra para a pupila (Sherwood, 2007).

A função principal do olho é focar os raios luminosos do ambiente nas células fotorreceptoras que transformam a energia proveniente da luz em sinais eléctricos para a transmissão do sistema nervoso central (SNC). A retina é uma extensão do SNC e não um órgão periférico isolado. Os bastonetes não detectam cor devido a não discriminarem a luz que é recebida e permitem a detecção das formas e movimento de objectos, a visão nocturna e a informação necessária à orientação (visão periférica). Já os cones são fotorreceptores sensíveis à luz visível e, por isso, permitem a identificação dos pormenores e das cores, bem como a focagem do olho (visão central) (Sherwood, 2007).

3.3.2 Importância da cor nos alimentos

3.3.2.1 Definição de corante como aditivo alimentar

Um aditivo alimentar é uma substância, com ou sem valor nutritivo, adicionada intencionalmente durante os processos de fabrico, transformação, preparação, tratamento, acondicionamento, transporte ou armazenamento de um produto alimentar. Não é habitualmente consumido de forma isolada nem utilizado como ingrediente característico na alimentação. Tem uma função tecnológica ou organoléptica, precisa e permanente no alimento, sob a sua forma inicial ou sob uma forma modificada. Torna-se portanto, directa ou indirectamente, um composto cuja presença no produto final é desejada (Crepaldi, 2006). Noutros termos, os aditivos são substâncias adicionadas a um produto alimentar para lhe melhorarem determinadas características, como a cor, o sabor, a durabilidade ou a consistência (Constant *et al.*, 2002).

Um corante é uma substância adicionada aos produtos alimentares para acentuar ou alterar a sua cor original e torná-las mais atractivas. Os corantes podem ser de origem natural. Neste caso, são extraídos de substâncias vegetais, animais ou minerais. Entre os corantes naturais, distinguem-se os hidrossolúveis, os lipossolúveis e os minerais. Existem também corantes idênticos às substâncias naturais, mas produzidos por síntese.

Quanto aos corantes artificiais ou sintéticos, distinguem-se os azóicos e os não azóicos (Crepaldi, 2006).

Estes últimos são, actualmente, os mais usados por conferirem algumas vantagens quando comparados aos naturais. Os corantes artificiais apresentam na sua maioria uma elevada estabilidade em condições diversas de luz, oxigénio, temperatura e pH, a saber uniformidade na cor, tempo de vida elevado e um custo de produção relativamente baixo (Constant *et al.*, 2002).

3.3.2.2 Interesse da cor na escolha de alimentos

Os comportamentos de ingestão alimentar são determinados por vários factores, para além do mero apetite. A cor tem a capacidade de conseguir induzir a sensação global resultante de outras características como o aroma, o sabor e a textura dos alimentos. Assim, a cor poderá exercer um efeito estimulante ou inibidor do apetite (Constant *et al.*, 2002).

É ainda importante salientar que a ingestão de alimentos não é vista apenas como um acto de sobrevivência, sendo também um momento de prazer e satisfação. Por esta razão, a preocupação na formulação de corantes alimentares que agradem ao consumidor torna-se natural (Crepaldi, 2006). No entanto, as cores não são escolhidas apenas pelo seu gosto pessoal. Isto é, existem gostos para vários tipos de objectos: vestuário, carros, alimentos, etc., onde as preferências não podem ser aplicadas indistintamente (Crepaldi, 2006).

A cor nos alimentos tem a função de ajudar a clarificar a mensagem a ser transmitida, quer o objectivo seja para transmitir a sensação de realidade, quer seja para causar impacto. Porém, é difícil prever a reacção do ser humano aos estímulos cromáticos, na medida em que nem sempre o consumidor reage da mesma forma. Neste sentido, a preferência por cores muda de acordo com a moda, situação económica, idade do indivíduo, clima vivido pelo consumidor, entre outros factores (Constant *et al.*, 2002). Em geral, a cor é dos aspectos de maior relevância na escolha de géneros alimentícios, na medida em que é desta forma que o consumidor se irá recordar do produto e seleccioná-lo no momento de uma aquisição.

Capítulo 4 – Conclusão

A cor dos alimentos tem a capacidade de induzir a sensação global, resultante de outras características como o aroma, o sabor e a textura, exercendo um efeito estimulador ou inibidor do apetite do consumidor. Assim, torna-se importante a formulação de corantes alimentares que auxiliem a clarificar a mensagem que pretende ser transmitida ao consumidor por um determinado produto alimentar.

A coloração acastanhada da lenhina, bem como as suas vantagens nutricionais tem despertado o interesse da comunidade científica para investigações no ramo alimentar, nomeadamente para a utilização deste composto como aditivo alimentar (corante alimentar). No entanto, a dificuldade na estabilização da cor tem impossibilitado levar este eventual proveito avante.

A lenhina purificada, que pode ser obtida a partir de diversos tipos de processamento, é uma lenhina com um peso molecular inferior ao da lenhina nativa. Estudos realizados por alguns autores têm mostrado que a lenhina purificada apresenta efeitos biológicos que não são característicos da lenhina nativa.

A lenhina purificada pode exibir efeitos prebióticos em animais monogástricos, favorecendo o crescimento de bactérias benéficas e melhorar as estruturas biológicas do intestino. Além disso, as propriedades bactericidas de fragmentos de lenhina podem auxiliar no controlo de organismos patogénicos intestinais, garantindo uma melhor saúde dos animais, bem como uma segurança aumentada dos produtos de origem animal.

A lenhina é um polímero fenólico e, tal como os outros compostos fenólicos, desempenha funções importantes para as características organolépticas como a cor, aroma e sensações gustativas. Uma das propriedades dos compostos fenólicos é a capacidade antioxidante. Assim, caso sejam incorporados na alimentação humana, estes compostos conservam não só a qualidade do alimento, como ainda reduzem o risco de ocorrência de alguns fenómenos biológicos e desenvolvimento de patologias nomeadamente processos inflamatórios, mutações, envelhecimento, carcinogénese,

doenças cardiovasculares, entre outras. A actividade antioxidante da lenhina é, no entanto, influenciada por factores relacionados com a sua estrutura química como são os grupos funcionais e o seu peso molecular.

A degradação da lenhina para reutilização pode ser realizada por diferentes vias, a mecânica, térmica, química e biológica. No entanto, o processo biológico, por exemplo através da acção fúngica, apresenta vantagens sobre procedimentos não biológicos. Isto é, o custo de sistemas enzimáticos de degradação de lenhina, por exemplo por fungos, é relativamente baixo e os subprodutos resultantes são potencialmente úteis, levando a uma diminuição dos desperdícios.

Os fungos com maior capacidade para degradar a lenhina são os fungos da podridão branca da madeira, tendo os fungos da podridão mole e parda da madeira um papel também importante. Esta capacidade na degradação da lenhina está associada ao eficiente sistema enzimático que é preferencialmente oxidativo, pouco específico e maioritariamente extracelular. As enzimas envolvidas podem provocar a despolimerização das unidades fenilpropano que constituem o polímero de lenhina e provocar a rotura de anéis aromáticos.

Este trabalho apontou para a problemática da estabilização da cor da lenhina, colocando a possibilidade de a solucionar através da acção de fungos especializados, que poderiam converter a lenhina numa molécula mais homogénea e desta forma estabilizar a sua cor.

Os avanços nestes estudos poderiam levar a uma aplicação da lenhina na área alimentar, nomeadamente como aditivo alimentar.

REFERÊNCIAS

- Abramov, I., & Gordon, J. (1994). Color appearance: on seeing red--or yellow, or green, or blue. *Annu. Rev. Psychol.* , 45, 451-485 pp.
- Anderson, J., Perryman, S., Young, L., & Prior, S. (2007). Dietary Fiber. *Food and Nutrition Series* , 1-4 pp.
- Angelo, P. M., & Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* , 66, 232-240 pp.
- Balasundrama, N., Sundramb, K., & Sammana, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* , 99, 191-203 pp.
- Balbi, S. F. (2009). Estudo do Impacto de Stress Abiótico Controlado na Componente Bioactiva de Polpas de Maça. *Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Alimentar na Universidade Técnica de Lisboa - Instituto Superior de Agronomia* .
- Baurhoo, B., Letellier, A., Zhao, X., & Ruiz-Feria, C. A. (2007). Cecal Populations of Lactobacilli and Bifidobacteria and Escherichia coli Populations After In Vivo Escherichia coli Challenge in Birds Fed Diets with Purified Lignin or Mannanligosaccharides. *Poultry Science* , 86, 2509-2516 pp.
- Baurhoo, B., Ruiz-Feria, C. A., & Zhao, X. (2008). Purified Lignin: Nutritional and Health Impacts on Farm Animals - A Review. *Animal Feed Science and Technology* , 144, 175-184 pp.
- Bila, D. M., & Dezotti, M. (2007). Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequencias. *Química Nova* , 30, 651-666 pp.
- Carvalho, W., Canilha, L., Ferraz, A., & Milagres, A. M. (2009). Uma Visão sobre a Estrutura, Composição e Biodegradação da Madeira. *Química Nova* , 32, 2191-2195 pp.
- Chamorro, S., Xavier, C. R., Hernández, V., Becerra, J., & Vidal, G. (2009). Aerobic removal of stigmasterol contained in kraft mill effluents. *Electronic Journal of Biotechnology* , 12, 1-7 pp.
- Claus, H. (2004). Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* , 35, 93-96 pp.

- Constant, P. B., Stringheta, P. C., & Sandi, D. (2002). Corantes Alimentícios. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos* , 20, 203-220 pp.
- Crepaldi, L. (2006). A influência das cores na decisão de compras: um estudo do comportamento do consumidor no ABC paulista. *Intercom – Sociedade Brasileira de Estudos Interdisciplinares da Comunicação* , 1-14 pp.
- Dantas, W. (1989). Fibra e aparelho digestivo. *Revista brasileira de colo-proctologia* , 9 (2), 75-79 pp.
- del Río, J. C., Gutiérrez, A., Hernando, M., Landín, P., Romero, J., & Martínez, A. T. (2005). Determining the influence of eucalypt lignin composition in paper pulp yield using Py-GC/MS. *Journal Analytical and Applied pyrolysis* , 110–115 pp.
- Feist, W. C. (1983). Weathering and Protection of Wood. *American Wood-Preservers'Association* , 79, 195-205 pp.
- Fernandes, D. M. (2005). Estudo da estabilidade térmica de blendas de poli(álcool vinílico)/lignina modificada. *Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Química na Universidade Estadual de Maringá* .
- Ferreira, F., Rita, F., & Duarte, J. A. (2007). Stress oxidativo e dano oxidativo muscular esquelético: influência do exercício agudo inabitual e do treino físico. *Revista Portuguesa de Ciência do Desporto* , 7, 257-275 pp.
- Funk, C., Braune, A., Grabber, J. H., Steinhart, H., & Bunzel, M. (2007). Model Studies of Lignified Fiber Fermentation by Human Fecal Microbiota and Its Impact on Heterocyclic Aromatic Amine Adsorption. *Mutation Research* , 624, 41–48 pp.
- García, A., Toledano, A., Andrés, M. A., & Labidi, J. (2010). Study of the antioxidant capacity of Miscanthus sinensis lignins. *Process Biochemistry* , 45, 935-940 pp.
- Garrot, G., Cruz, J. M., Moure, A., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2004). Antioxidant activity of byproducts from the hydrolytic processing of selected lignocellulosic materials. *Trends in Food Science & Technology* , 15, 191-200 pp.
- Graça, J. (2006). *Composição Química da Madeira de Eucalipto (Eucalyptus globulus L.)*. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa - Instituto Superior de Agronomia.

- Huang, D., Zeng, G., Feng, C., Hu, S., Lai, C., Zhao, M., et al. (2010). Changes of microbial population structure related to lignin degradation during lignocellulosic waste composting. *Bioresource Technology* , 101, 4062–4067 pp.
- Janshekar, H., & Fiechter, A. (1983). Lignin: Biosynthesis, Application, and Biodegradation. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* , 27, 119-179 pp.
- Jung, H. G., & Fahey, G. C. (1983). Nutritional Implications of Phenolic Monomers and Lignin: a Review. *Journal of Animal Science* , 57, 206-219 pp.
- Kersten, P., & Cullen, D. (2007). Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Fungal Genetics and Biology* , 44, 77–87 pp.
- Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology* , 30, 620–650 pp.
- Kovur, S. R. (2003). Lignin Carbohydrate Complexes. *Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre de Ciências em Química na Universidade de Maine* .
- Lara, M. A., Rodríguez-Malaver, A. J., Rojas, O. J., Holmquist, O., González, A. M., Bullón, J., et al. (2003). Blackliquor lignin biodegradation by *Trametes elegans*. *International Biodeterioration & Biodegradation* , 52, 167 – 173 pp.
- Lopes, A. M., & Fonseca, Á. (1996). *Biologia Microbiana*. Lisboa: Universidade Aberta, 10-60 pp.
- Maijala, P. (2000). *Heterobasidion annosum* and wood decay: Enzymology of cellulose, hemicellulose, and lignin degradation. *Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências na Universidade de Helsinquia - Faculdade de Ciências* .
- Martínez, Á. T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., et al. (2005). Biodegradation of lignocellulosics :microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology* , 8, 195-204 pp.
- Matsushiro, N., & Ohta, N. (2003). Theoretical Analysis of Subtractive Color Mixture Characteristics. *Color reseaech and application* , 28, 175-181 pp.

McCarthy, J. L., & Islam, A. (2000). Lignin Chemistry, Technology, and Utilization: A Brief History. In W. e. Glasser, Lignin: Historical, Biological, and Materials Perspectives. Washington, DC: *American Chemical Society*, 2-99 pp.

Melchiades, F. G., & Boschi, A. O. (1999). Cores e Tonalidades em Revestimentos Cerâmicos. *Cerâmica Industrial* , 4, 11-18.

Mosquera, J. C. (2007). Evaluación del Crecimiento y Producción de Lentinula edodes (shitake), en Residuos Agroindustriales. *Dissertação apresentada para obtenção do título de Microbiólogo Industrial pela Faculdade de Ciências da Universidade de Javeriana* .

Niebisch, C. H. (2009). Biodegradação do corante Textil Remazol Azul por Lentinus crinitus, Lepista sordida e Hydno-polyporus fimbriatus. *Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Bioquímica pela Universidade Federal do Paraná* .

Oliveira, C., Fernandes, C., Carpinteiro, G., & Correia, L. (2004). *ABC das Ondas ElectroMagnéticas*. Lisboa: Instituto de Telecomunicações / Instituto Superior Técnico, UTL, 1-6 pp.

Pan, X., Kadla, J. F., Ehara, K., Gilkes, N., & Saddler, J. N. (2006). Organosolv Ethanol Lignin from Hybrid Poplar as a Radical Scavenger: Relationship between Lignin Structure, Extraction Conditions, and Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 54, 5806-5813 pp.

Peixe, A., Serras, M., Campos, C., Zavattieri, M. A., & Dias, M. A. (2007). Estudo histológico sobre a formação de raízes adventícias em estacas. *Revista de Ciências Agrárias* , xxx, 476-482 pp.

Pereira, O. C. (2009). Rumex induratus: Caracterização Química e Potencial Antioxidante. *Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Controlo de Qualidade - Especialização em Águas e Alimentos pela Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto* .

Pouteau, C., Dole, P., Cathala, B., Averous, L., & Boquillon, N. (2003). Antioxidant Properties of Lignin in Polypropylene. *Polymer Degradation and Stability* , 81, 9-18 pp.

Salanti, A., Zoia, L., Orlandi, M., Zanini, F., & Elegir, G. (2010). Structural Characterization and Antioxidant Activity Evaluation of Lignins from Rice Husk. *Agricultural and Food Chemistry* , 58, 10049-10055 pp.

- Salmén, L. (2004). Micromechanical Understanding of the Cell-Wall Structure. *Comptes Rendus Biologies* , 327, 873–880 pp.
- Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* , 27, 185-194 pp.
- Schwarze, F. W., Engels, J., & Mattheck, C. (2000). *Fungal Strategies of Wood Decay in Trees* (1ª Edição ed.). Berlim, Alemanha: Springer-Verlag, 150-250 pp.
- Sherwood, L. (2007). *Human Physiology: From Cells to Systems* (7ª ed.). Belmont, EUA: Brooks Cole, 183-237 pp.
- Soares, G. M. (2000). Aplicação de Sistemas Enzimáticos à Degradação de Corantes Têxteis. *Dissertação apresentada para obtenção do título de Doutor em Engenharia Têxtil pela Universidade do Minho* , Minho.
- Souza, J. A. (1999). Estudo da Biodegradação do Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético em Formulações de Liberação Controlada. *Dissertação apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências na Universidade Estadual de Campinas* .
- Stewart, D. (2008). Lignin as a base material for materials applications: Chemistry, application and economics. *Industrial Crops and Products* , 27, 202-207 pp.
- Tavares, A. P. (2006). Produção de Lacase Para Potencial Aplicação Como Oxidante na Indústria Papeleira. *Dissertação apresentada para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Química na Universidade de Aveiro* .
- Toh, K., Yokoyama, H., Noda, H., & Yuguchi, Y. (2010). Antioxidant Capacity of Lignin from Green Tea Waste. *Journal of Food Biochemistry* , 34, 192-206 pp.
- Tuomela, M. (2002). Degradation of lignin and other ¹⁴C-labelled compounds in compost and soil with an emphasis on white-rot fungi. *Dissertação apresentada para obtenção do grau de mestre em Microbiologia na Universidade de Helsinquia* .
- Ugartondo, V., Mitjans, M., & Vinardell, M. P. (2009). Applicability of lignins from different sources as antioxidants based on the protective effects on lipid peroxidation induced by oxygen radicals. *Industrial Crops and Products* , 30, 184-187 pp.

Weng, J., Li, X., Bonawitz, N. D., & Chapple, C. (2008). Emerging strategies of lignin engineering and degradation for cellulosic biofuel production. *Current Opinion in Biotechnology*, 19, 166–172 pp.

Zia-ur-Rehman, & Shah, W. H. (2004). Domestic Processing Effects on Some Insoluble Dietary Fibre Components of Various Food Legumes. *Food Chemistry*, 87, 613–617 pp.