

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA**

Fernando Masarin

**Habilidade degradativa de *Ceriporiopsis subvermispora* e
Phanerochaete chrysosporium em cultivos sobre madeira de
Eucalyptus grandis não autoclavada**

**LORENA
2006**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Fernando Masarin

**Habilidade degradativa de *Ceriporiopsis subvermispora* e
Phanerochaete chrysosporium em cultivos sobre madeira de
Eucalyptus grandis não autoclavada**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia
de Lorena da Universidade de São Paulo para
obtenção de título de Mestre em Biotecnologia
Industrial

Área de concentração: Conversão de Biomassa
Orientador: Dr. André Luis Ferraz

**LORENA
2006**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Habilidade degradativa de *Ceriporiopsis subvermispora* e *Phanerochaete chrysosporium* em cultivos sobre madeira de *Eucalyptus grandis* não autoclavada

FERNANDO MASARIN

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Biotecnologia Industrial

Área de concentração: Conversão de Biomassa

Banca examinadora

Prof. Dr. André Luis Ferraz - EEL - USP

Prof. Dra. Adriane Milagres - EEL - USP

Prof. Dra. Marcia Brandão Palma - CCT - FURB

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo apoio e ajuda ao projeto de mestrado.

Ao Dr. André Ferraz pela orientação, apoio e paciência durante todo o mestrado.

Às Dras. Adriane Milagres, Márcia Brandão e Clarice Loguércio Leite pelas sugestões e atenção durante a realização deste trabalho.

Aos amigos Zé Cobrinha e Zé Gambira pela assistência técnica, companheirismo e paciência durante todo o desenvolvimento dos experimentos.

Aos alunos do Departamento de Biotecnologia da EEL – USP pela amizade e momentos de descontração durante todo o desenvolvimento do projeto.

Aos demais funcionários do Departamento de Biotecnologia

A CAPES pela bolsa e demais apoios financeiros.

RESUMO

MASARIN, F. Habilidade degradativa de *Ceriporiopsis subvermispora* e *Phanerochaete chrysosporium* em cultivos sobre madeira de *Eucalyptus grandis* não autoclavada. 2006. 89f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2006.

Este trabalho aborda a biopolpação de cavacos de *Eucalyptus grandis* não autoclavados por duas espécies de fungos de decomposição branca, *Ceriporiopsis subvermispora* e *Phanerochaete chrysosporium*. *C. subvermispora* não foi capaz de competir com contaminantes presentes na madeira de *E. grandis* não autoclavada em cultivos suplementados com 0,5% de milhocina mesmo com cargas de inóculo de 3000 mg de micélio/kg de madeira. No caso de cultivos similares inoculados com *P. chrysosporium* em cargas de 5 e 50 mg de micélio/kg de madeira foi observado o crescimento concomitante do fungo de interesse e de alguns contaminantes. O monitoramento da atividade metabólica desses fungos foi feito através da determinação dos níveis de enzimas oxidativas e hidrolíticas produzidas em cada sistema de cultivo. O padrão típico de atividade metabólica em *C. subvermispora* e *P. chrysosporium* inoculados sobre madeira autoclavada (experimentos controle) foi a secreção de Manganês-peroxidase (MnP), xilanases e endocelulases. O pH dos cultivos diminuiu nos dois casos. Em cultivos semelhantes aos anteriores com *C. subvermispora*, porém com madeira não autoclavada, foram observadas baixas atividades de xilanases e endocelulases e nenhuma atividade de MnP, confirmando que essa espécie não cresceu eficientemente no período de cultivo avaliado (tempo máximo de 60 dias). Já nos experimentos nas mesmas condições com *P. chrysosporium*, foram observadas atividades de xilanases e endocelulases apreciáveis, porém MnP não foi detectada. Um experimento adicional foi feito para avaliar a eficiência de um lavado ácido da madeira (pH 2,5, 80 °C/1h) como etapa de descontaminação. Nesse caso, os cultivos de *C. subvermispora* apresentaram o crescimento simultâneo do fungo de interesse e poucos contaminantes, além de atividades apreciáveis das mesmas enzimas dos cultivos com cavacos autoclavados. Cultivos com madeira autoclavada (experimentos controle) ou em condições onde houve baixo nível de contaminação e alguma atividade metabólica dos fungos de interesse foram repetidos em maior escala utilizando um novo lote de cavacos de *E. grandis*. A madeira biotratada nessas condições por 15 e 28 dias foi submetida a polpação quimiomecânica. A madeira biotratada por *C. subvermispora* em cultivos com cavacos pré-submetidos ao lavado ácido proporcionou maiores graus de refino em um mesmo tempo de processamento ou tempos de processamento mais curtos para se atingir um mesmo grau de refino. Nesse caso as propriedades mecânicas das biopolpas e das polpas controle foram semelhantes. A madeira não autoclavada biotratada por *P. chrysosporium* também proporcionou benefícios para o processo de refinamento, especialmente para tempos longos de refino. As propriedades mecânicas dessas biopolpas foram significativamente melhores quando comparadas com as polpas controle.

PALAVRAS CHAVE: *Ceriporiopsis subvermispora*, biopolpação, celulose e papel, biodegradação de madeira.

ABSTRACT

MASARIN, F. Degradative abilities of *Ceriporiopsis subvermispora* and *Phanerochaete chrysosporium* on culture systems containing non-autoclaved *Eucalyptus grandis* wood chips. 2006. 89f. Dissertation (Master of Science in Industrial Biotechnology) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2006.

This work evaluates biopulping of non-autoclaved *Eucalyptus grandis* wood chips by two white-rot fungi species, *Ceriporiopsis subvermispora* and *Phanerochaete chrysosporium*. *C. subvermispora* was not able to compete in corn-steep liquor supplemented cultures with the naturally occurring wood contaminants, even with inoculum sizes of 3000 mg of mycelium/kg of wood. Growth of the interest fungus simultaneously with some contaminants was observed in similar cultures inoculated with *P. chrysosporium* at 5 and 50 mg of micellium/kg of wood. Metabolic activity of these fungi was determined by monitoring the levels of extracellular hydrolytic and oxidative enzymes. The typical pattern for metabolic activity of *C. subvermispora* and *P. chrysosporium* inoculated on autoclaved wood (control experiments) was the secretion of Manganese-peroxidase (MnP), xylanases e endocellulases. The culture pH decreased in both cases. In similar cultures as described before with *C. subvermispora*, but using non-autoclaved wood, low levels of xylanases and endocellulases and none MnP activities were observed, corroborating that this species did not grow efficiently during the culture periods evaluated (maximum of 60 days). On the other hand, in similar experiments using *P. chrysosporium* significant levels of xylanases e endocellulases were observed, despite MnP was not detected. An additional experiment was performed with *C. subvermispora* by using wood chips previously decontaminated by an acid washing (pH 2,5, 80 °C/1h). In this case, the cultures presented simultaneous growth of *C. subvermispora* and some contaminants. Significant levels of xylanases, endocellulases and MnP were also detected. Cultures on autoclaved wood (control experiments) or under conditions that presented low level of contaminants and at least some typical metabolic activity of the interest fungi were selected for scale-up with a new group of *E. grandis* wood chips. Wood samples biotreated for 15 and 28 days in these cultures was submitted to a chemimechanical pulping process. Wood samples biotreated by *C. subvermispora* in cultures with acid-washed wood chips gave higher refining levels at a fixed processing time or required shorter refining periods to give a desired refining level. In this case, the mechanical properties of the biopulps were similar to the ones prepared from control wood chips. Non-autoclaved wood chips biotreated by *P. chrysosporium* also provided refining benefits, especially for long refining periods. Mechanical properties of the *P. chrysosporium*-biopulps were significantly higher than that of pulps prepared from control wood chips.

KEY WORDS: *Ceriporiopsis subvermispora*, biopulping, pulp and cellulose, wood biodegradation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades mecânicas e óticas de polpas de <i>E. grandis</i> biotratado por <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> . Biotratamento de 15 dias em fermentação em meio sólido (Guerra <i>et al.</i> , 2005).....	15
Tabela 2 – Composição típica de milhocina (Akhtar <i>et al.</i> , 1998).....	34
Tabela 3 – Aminoácidos encontrados em milhocina (Filipovic <i>et al.</i> , 2002).....	35
Tabela 4 – Composição aminoácidos, vitaminas e sais minerais de milhocina obtida pela Corn Products Brasil Ltda.....	36
Tabela 5 – Solubilidade em NaOH 1% de <i>E. grandis</i> biodegradado por <i>C. subvermispora</i> . Cultivos suplementados com milhocina sobre madeira autoclavada ou madeira não autoclavada e cargas de inóculo de 5, 50 e 3000mg de micélio/kg de madeira (base seca).....	56
Tabela 6 – Solubilidade em NaOH 1% de <i>E. grandis</i> biodegradado por <i>C. subvermispora</i> . Cultivos sobre madeira autoclavada ou madeira não autoclavada e cargas de inóculo de 3000 mg de micélio/kg de madeira.....	61
Tabela 7 – Solubilidade em NaOH 1% de <i>E. grandis</i> biodegradado por <i>C. subvermispora</i> . Cultivos sobre madeira lavada com ácido e autoclavada ou madeira lavada com ácido e não autoclavada e cargas de inóculo de 3000 mg de micélio/kg de madeira.....	68
Tabela 8 - Atividades enzimáticas e pH detectados em cultivos de <i>C. subvermispora</i> sobre madeira de <i>E. grandis</i> após 28 dias de cultivo.....	71
Tabela 9 – Solubilidade em NaOH 1% de <i>E. grandis</i> biodegradado por <i>C. subvermispora</i> . Cultivos sobre madeira lavada com ácido ou madeira lavada com água e cargas de inóculo de 500 mg de micélio/kg de madeira.....	72
Tabela 10 – Amostras biotratadas selecionadas para os ensaios de polpação quimiomecânica.....	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma de uma planta piloto do processo de biopolpação.....	17
Figura 2 – Perfil da temperatura ao longo do tempo em uma pilha de cavacos sem ventilação submetida ao biotratamento com <i>C. subvermispora</i> por duas semanas (Scott <i>et al.</i> , 1998).....	19
Figura 3 – Regiões para instalação de equipamentos para medir a temperatura na pilha de biopolpação (Scott <i>et al.</i> , 1998).....	20
Figura 4 - Perfil da temperatura ao longo do tempo em uma pilha de cavacos com ventilação submetida ao biotratamento com <i>C. subvermispora</i> por duas semanas (Scott <i>et al.</i> , 1998).....	20
Figura 5 - Microscopia eletrônica de varredura mostrando hifas de <i>Ganoderma australe</i> colonizando o lúmen de células de madeira. A magnitude do aumento nesta microscopia é de 800 vezes. Foto de A. Ferraz.....	22
Figura 6 - Microscopia ótica mostrando o ataque progressivo (erosão) da parede celular de <i>Picea abies</i> por <i>Heterobasidium annosum</i> . Note que a célula ao centro apresenta erosões irregulares na parede celular. A escala no canto superior esquerdo da foto indica a magnitude do aumento (Reproduzido com modificações de Fengel e Wegener, 1989).....	22
Figura 7 – Micrografia – UV de <i>Pinus</i> sp. Em (A) madeira controle, em (B) madeira tratada com <i>C. subvermispora</i> por 30 dias. As cores representam valores de absorbância em 280 nm na parede celular e os números para cada cor indicam o valor da absorbância definido entre zero no lúmen ("underflow") e 1.0 no canto das células ("overflow") (Mendonça <i>et al.</i> , 2004).....	23
Figura 8 – Ciclo catalítico simplificado de lignina-peroxidase (LiP). S representa um substrato aromático não fenólico (Ferraz, 2004).....	28
Figura 9 – Ciclo catalítico simplificado de peroxidase dependente de manganês (MnP). PhOH representa um substrato fenólico (Ferraz, 2004).....	28
Figura 10 – Ciclo catalítico de lacase. PhOH representa um substrato fenólico. A estequiometria do ciclo envolve 4 Cu ²⁺ (normalmente ligados a uma única proteína ou a 2 cadeias protéicas acopladas), 4 substratos fenólicos, 4 prótons e 1 molécula de O ₂ (Ferraz, 2004).....	29
Figura 11 – Cavacos de <i>E. grandis</i> inoculados com <i>C. subvermispora</i> por 28 dias.(A) madeira autoclavada e (B) madeira não autoclavada. Cultivos com carga de inóculo de 3000mg de micélio/kg de madeira (base seca) e suplementação com milhocina (0,5 % m/m em base de madeira seca).....	49
Figura 12 - Atividades de MnP, xilanases e níveis de pH em cultivos de <i>C. subvermispora</i> sobre madeira autoclavada (A) e madeira não autoclavada (B). Cargas de inóculo de 5, 50 e 3000mg de micélio/kg de madeira e suplementação com milhocina (0,5 % m/m em base de madeira seca).....	50
Figura 13 - Atividades de endoglucanases e lacases em cultivos de <i>C. subvermispora</i> sobre madeira autoclavada (A) e madeira não autoclavada (B). Cargas de inóculo de 5, 50 e 3000mg de micélio/kg de madeira e suplementação com milhocina (0,5 % m/m em base de madeira seca).....	52
Figura 14 – Perda de massa de cavacos de <i>E. grandis</i> em cultivos de <i>C. subvermispora</i> sobre madeira autoclavada (A) ou madeira não autoclavada (B). Cargas de inóculo de 3000mg de micélio/kg de madeira e suplementação com milhocina (0,5 % m/m em base de madeira seca).....	53

Figura 15 - Atividades de xilanases, endoglucanases e níveis de pH em cultivos de <i>P. chrysosporium</i> sobre madeira autoclavada (A) e madeira não autoclavada (B). Cargas de inóculo de 5 e 50 mg de micélio/kg de madeira e suplementação com milhocina (0,5 % m/m em base de madeira seca).....	56
Figura 16 - Atividades de MnP em cultivos de <i>P. chrysosporium</i> sobre madeira autoclavada. Cargas de inóculo de 5 e 50 mg de micélio/kg de madeira e suplementação com milhocina (0,5 % m/m em base de madeira seca).....	57
Figura 17 – Perda de massa de cavacos de <i>E. grandis</i> em cultivos de <i>P. chrysosporium</i> sobre madeira autoclavada (A) ou madeira não autoclavada (B). Cargas de inóculo de 5 e 50 mg de micélio/kg de madeira e suplementação com milhocina (0,5 % m/m em base de madeira seca).....	57
Figura 18 - Atividades de MnP, xilanases e níveis de pH em cultivos de <i>C. subvermispora</i> sobre madeira autoclavada (A) e madeira não autoclavada (B). Cargas de inóculo de 50, 200 e 3000mg de micélio/kg de madeira.....	60
Figura 19 - Atividades de endocelulases em cultivos de <i>C. subvermispora</i> sobre madeira autoclavada (A) e madeira não autoclavada (B). Cargas de inóculo de 50, 200 e 3000mg de micélio/kg de madeira.....	61
Figura 20 – Placa de Petri cultivada por 7 dias contendo meio batata-dextrose/extrato de levedura, 4 ppm de benomil e um cavaco de <i>E. grandis</i> proveniente de um cultivo (28 dias) contaminado que recebeu inóculo de <i>C. subvermispora</i> na carga de 500 mg de micélio/kg de madeira. O micélio branco crescendo a partir do cavaco apresenta as características típicas de <i>C. subvermispora</i>	63
Figura 21 - Atividades de MnP, xilanases e níveis de pH em cultivos de <i>C. subvermispora</i> sobre madeira lavada com ácido e autoclavada (A) e madeira lavada com ácido, porém não autoclavada (B). Cargas de inóculo de 50, 200 e 3000mg de micélio/kg de madeira. (*). Nos cultivos sobre madeira lavada com ácido e não autoclavada, as atividades de MnP foram detectadas somente nos experimentos cuja carga de inóculo foi de 3000mg de micélio/kg de madeira. Nos experimentos com menor carga de inóculo os níveis de MnP estiveram abaixo do limite detectável.....	66
Figura 22 - Atividades de endocelulases e lacases em cultivos de <i>C. subvermispora</i> sobre madeira lavada com ácido e autoclavada (A) e madeira lavada com ácido, porém não autoclavada (B). Cargas de inóculo de 50, 200 e 3000mg de micélio/kg de madeira.....	67
Figura 23 – Perda de massa de cavacos de <i>E. grandis</i> em cultivos de <i>C. subvermispora</i> sobre madeira lavada com ácido e autoclavada (A) ou madeira lavada com ácido e não autoclavada (B). Cargas de inóculo de 3000 mg de micélio/kg de madeira.....	67
Figura 24 - Atividades de xilanases em cultivos de <i>C. subvermispora</i> sobre madeira lavada com ácido, porém não autoclavada com cargas de inóculo de 5 e 50 mg de micélio/kg de madeira e suplementação com milhocina (0,5 % m/m em base de madeira seca).....	69
Figura 25 – Perda de massa de cavacos de <i>E. grandis</i> em cultivos de <i>C. subvermispora</i> sobre madeira lavada com ácido (B) ou lavada com água (A). Cargas de inóculo de 500 mg de micélio/kg de madeira.....	72

Figura 26 - Curvas de refinamento de cavacos de <i>E. grandis</i> pré-digeridos com sulfito alcalino (A) e resistência dos papéis preparados a partir das fibras obtidas frente aos esforços de tração (B), rasgo (C) e tração versus rasgo (D). As diferentes curvas indicam os resultados para a madeira controle autoclavado (controle), madeira autoclavada e biotratada em cultivos suplementados com milhocina e inóculo de 5 mg de micélio/kg madeira (A-M) e madeira autoclavada e biotratada em cultivos não suplementados e inóculo de 500 mg de micélio/kg madeira (A).....	75
Figura 27 - Curvas de refinamento de cavacos de <i>E. grandis</i> pré-digeridos com sulfito alcalino (A) e resistência dos papéis preparados a partir das fibras obtidas e avaliadas pelo gráfico de resistência à tração versus rasgo (B). As diferentes curvas indicam os resultados para a madeira controle lavado com ácido (controle LA), madeira lavada com ácido e biotratada com 500 mg de micélio/kg madeira (LA) e madeira lavada com ácido e biotratada em cultivos suplementados com milhocina e inóculo de 5 mg de micélio/kg madeira (LA-M).....	76
Figura 28 – Curva de refino versus tempo. Controle (não biotratada); A-M (autoclavado e biotratado por 15 e 28 dias); F-M (cavacos recém-cortados e biotratados por 28 dias). Adição de milhocina (M).....	78
Figura 29 – Curva de grau de refino versus índice de tração. Controle (não biotratada); A-M (autoclavado e biotratado por 15 e 28 dias); F-M (cavacos recém-cortados e biotratados por 28 dias). Adição de milhocina (M).....	79
Figura 30 – Grau de refinamento versus índice de rasgo. Controle (não biotratada); A-M (autoclavado e biotratado por 15 e 28 dias); F-M (cavacos recém-cortados e biotratados por 28 dias). Adição de milhocina (M).....	80
Figura 31 – Índice de rasgo verso índice de tração. Controle (não biotratada); A-M (autoclavado e biotratado por 15 e 28 dias); F-M (cavacos recém-cortados e biotratados por 28 dias). Adição de milhocina.....	81

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA COMENTADA.....	14
2.1. Biopolpação.....	14
2.1.1. Otimização do processo de biopolpação.....	16
2.1.2. Fungos selecionados para biopolpação e seu mecanismo de ação.....	20
2.2. Produção de enzimas por fungos de decomposição branca.....	25
2.3. A biodegradação de madeira em condições não assépticas.....	30
2.4. Lavado ácido dos cavacos de madeira.....	33
2.5. Uso de milhocina como co-substrato no processo de biopolpação.....	34
3. OBJETIVOS.....	37
4. MATERIAS E MÉTODOS.....	38
4.1. Fungo e preparação do inóculo.....	38
4.2. Madeira utilizada.....	39
4.3. Experimentos de biodegradação.....	39
4.3.1. Determinação do pH	42
4.3.2. Extração e quantificação das enzimas produzidas durante a biodegradação da madeira.....	42
4.4. Incubação de cavacos contaminados em meio contendo benomil.....	44
4.5. Determinação da solubilidade em NaOH 1% das amostras de madeira.....	45
4.6. Experimentos de biodegradação em escala ampliada.....	46
4.7. Polpação quimiomecânica de cavacos de madeira.....	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1. Cultivos de <i>C. subvermispora</i> sobre cavacos autoclavados ou não com a adição de milhocina.....	48
5.2. Cultivos de <i>P. chrysosporium</i> em cavacos autoclavados ou não com a adição de milhocina.....	54
5.3. Cultivos de <i>C. subvermispora</i> em cavacos autoclavados ou não sem a adição de milhocina.....	55
5.4. Testes em placas de Petri com adição de benomil.....	62
5.5. Cultivos de <i>C. subvermispora</i> em cavacos lavados com ácido sem a adição de milhocina.....	64
5.6. Cultivos de <i>C. subvermispora</i> sobre cavacos lavados com ácido com a adição de milhocina.....	68
5.7. Experimentos de biodegradação utilizando um lote diferenciado de cavacos de <i>E. grandis</i>	70

5.8. Cultivos selecionados para a etapa de polpação quimiomecânica.....	72
6. CONCLUSÕES.....	82
REFERÊNCIAS.....	84

1 - Introdução

A biodegradação de madeira é um processo natural onde os organismos degradadores secretam enzimas e outras substâncias para transformar a base lignocelulósica em moléculas menores que podem ser utilizadas no metabolismo intracelular. Esse processo, sob condições controladas e com fungos selecionados tem se demonstrado útil como uma etapa de pré-tratamento à polpação mecânica, mostrando resultados muito atrativos do ponto de vista tecnológico e econômico e vem sendo testado em escala piloto. Sua implementação industrial depende do licenciamento da tecnologia e do ajuste da planta industrial, principalmente em relação à operação de descontaminação e resfriamento dos cavacos de madeira para posterior inoculação.

A biodegradação de madeira em um cultivo com baixa carga de contaminantes pode proporcionar uma redução de até 40% no consumo de energia durante o refinamento mecânico da madeira biodegradada, além de um ganho efetivo nas propriedades mecânicas do papel (AKHTAR *et al.*, 1998). No entanto, resultados recentes de operação de uma planta piloto indicam contaminação dos cultivos com organismos indesejados. A contaminação ocorre principalmente na operação de resfriamento dos cavacos com ar. Nesta etapa se utilizam filtros para inibir a entrada de contaminantes presentes no ar, porém a eficiência da filtração é limitada devido ao elevado fluxo de ar requerido (FERRAZ, A. dados não publicados).

Os principais fungos selecionados para a biopolpação até o momento pertencem a espécies que degradam seletivamente a lignina, sendo *Ceriporiopsis subvermispora* e *Phanerochaete chrysosporium* os mais utilizados. Neste contexto, a dissertação de mestrado aqui apresentada avaliou a viabilidade da realização da biopolpação de *E. grandis* não autoclavado a partir do biotratamento feito com as espécies mencionadas anteriormente e utilizando diferentes cargas de inóculo e novos sistemas de descontaminação dos cavacos, a

fim de obter cultivos livres de contaminantes ou com níveis de contaminação que não interfiram com a eficiência da biopolpação.

2-Revisão Bibliográfica Comentada

2.1 - Biopolpação

A indústria de papel e celulose utiliza os métodos de polpação química ou mecânica, ou a combinação desses, para a produção de polpas de várias características. A polpação química envolve o uso de reagentes químicos para degradar e dissolver a lignina da parede celular da madeira, soltando as fibras de celulose. Esse processo produz polpa com resistência mecânica alta e apresenta um rendimento por volta de 40-50%; entretanto, possui um elevado potencial poluidor e demanda um alto custo do investimento inicial. A polpação mecânica envolve o uso de força mecânica para separar as fibras de celulose. Esse processo proporciona um rendimento de cerca de 95% e produz papel com boa opacidade. Os custos de instalação de uma planta de polpação mecânica são muito menores que aqueles requeridos por uma indústria de polpação química (BIERMANN, 1993). Entretanto, esse processo requer um elevado consumo de energia elétrica, o papel produzido apresenta alta reversão de cor (tendência da cor amarela retornar com o tempo), baixa resistência mecânica e é difícil de ser branqueado, servindo apenas para a produção de jornais, catálogos, papelão e, em misturas com polpas de melhor qualidade, para papéis sanitários e absorventes (FENGEL; WEGENER, 1989). Polpas kraft são freqüentemente misturadas a polpas mecânicas para aumentar a resistência mecânica do papel.

A biopolpação é um pré-tratamento dos cavacos de madeira com fungos selecionados que degradam preferencialmente a lignina e apresenta um grande potencial para resolver problemas associados com a polpação química e mecânica convencionais. Mesmo com períodos curtos de biodegradação (15 a 30 dias), a madeira biotratada já apresenta um “amolecimento” característico que permite maior facilidade de desfibramento mecânico, ou no caso da polpação química, maior facilidade de penetração dos reagentes, bem como maior susceptibilidade da lignina parcialmente degradada à solubilização pelos licores de polpação.

Este pré-tratamento biológico permite então uma redução de até 40% no consumo de energia para o desfibramento e refino mecânico posterior, ou no caso da polpação química, diminuição no tempo, na temperatura de reação ou mesmo na carga de reagentes químicos utilizados. Esta “amenização” nas condições necessárias para a produção de polpas celulósicas ainda proporciona a obtenção de polpas com melhor resistência mecânica, o que resulta em um menor consumo de polpas químicas na fabricação de papeis a partir de polpas mecânicas (AKHTAR *et al.*, 1998; FERRAZ, 2001).

Um exemplo de resultados oriundos da combinação do pré-tratamento biológico de *Eucalyptus grandis* com a polpação quimiomecânica é mostrado na Tabela 1 (GUERRA; MENDONÇA; FERRAZ, 2005).

Tabela 1 – Propriedades mecânicas e óticas de polpas de *E. grandis* biotratado por *Ceriporiopsis subvermispota*. Biotratamento de 15 dias em fermentação em meio sólido (GUERRA; MENDONÇA; FERRAZ, 2005).

Propriedades da polpa/característica do processo	Controle	Madeira biotratada
Tempo para atingir 323mL de "freeness" (min)	135	120
Índice de resistência ao estouro (kN.g ⁻¹)	3	3
Índice de resistência ao rasgo (mN.m ² .g ⁻¹)	1,8	2,3
Índice de resistência à tração (N.m.g ⁻¹)	52	56
Alvura (% ISO)	23,7	22,7

Embora exista uma possibilidade promissora de aplicação do pré-tratamento biológico para a produção de polpas mecânicas, na maioria dos casos, as polpas obtidas apresentam valores inferiores para alvura e espalhamento de luz em relação a um controle não inoculado. Experimentos mais recentes mostram que as biopolpas com uma alvura inicialmente menor que a de polpas controle podem ser facilmente branqueadas e retornarem aos níveis de alvura comumente requeridos pelo mercado, sem que isso signifique um gasto adicional significativo de peróxido de hidrogênio na etapa de branqueamento (GUERRA; MENDONÇA; FERRAZ, 2005).

O pré-tratamento de cavacos de madeira com fungos ligninolíticos seguido de

polpação química têm recebido menos atenção quando comparado aos processos de polpação mecânica. A maioria dos trabalhos publicados está relacionado ao uso de processos bioquímicos desenhados para a preparação de polpas de baixo número kappa e susceptíveis ao branqueamento. Nestes casos, sempre é necessário o emprego de um processo de polpação severo, realizado a altas temperaturas e com elevadas cargas de reagentes. Em tais condições, o pré-tratamento fúngico pode levar a uma diminuição na carga de álcali requerida no cozimento da ordem de 1-2% (processo Kraft), gerando polpas de propriedades similares às obtidas a partir de controles não biodegradados, ou ainda pode levar a obtenção de polpas com teores de lignina residual levemente menores (ORIRAN; LABOSKY; BLAKEHORN 1990; BAJPAI *et al.*, 2001). Por outro lado, alguns trabalhos recentes têm demonstrado que o máximo benefício do pré-tratamento fúngico somente é obtido quando o processo posterior de polpação química é realizado em condições mais amenas de reação (MENDONÇA *et al.*, 2004; MENDONÇA; GUERRA; FERRAZ, 2002). Nestas condições, as polpas preparadas apresentam teor de lignina residual elevado e por isso possuem uma aplicação mais restrita na preparação de papéis. Estas polpas, denominadas de polpas de alto rendimento, geralmente são utilizadas na preparação de papéis de recobrimento de embalagens e usualmente não são branqueadas (BIERMANN, 1993).

2.1.1 - Otimização do processo de biopolpação

Atualmente, a biopolpação prévia ao tratamento mecânico da madeira atingiu um grau de desenvolvimento que permitiu a ampliação de escala do processo para nível piloto e semi-industrial, sendo que diversas operações em nível industrial estão em vias de implementação em várias empresas em todo o mundo, inclusive no Brasil (AKHTAR *et al.*, 1998).

No Brasil, a empresa Melhoramentos Ltda iniciou o processo de biopolpação em escala piloto (50 toneladas de cavacos biotratados) e a figura 1 demonstra as operações dessa planta em um fluxograma básico.

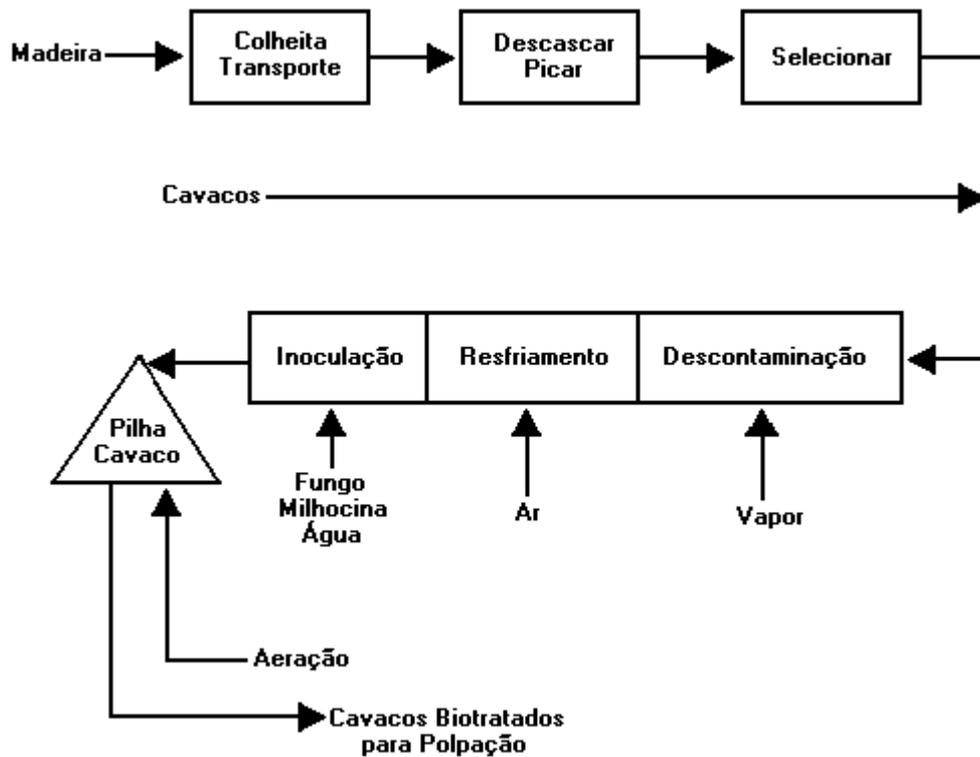


Figura 1 – Fluxograma de uma planta piloto do processo de biopolpação

A madeira é colhida e transportada para a fábrica. A tora é descascada, lavada, picada e os cavacos selecionados. A primeira etapa do processo de biopolpação é a descontaminação, que é importante, pois a superfície dos cavacos normalmente está contaminada com esporos de fungos e bactérias. Esses organismos indesejáveis podem impedir a biopolpação com o fungo selecionado. Recentemente, algumas pesquisas indicam que a completa esterilização não é necessária, apenas as superfícies dos cavacos devem ser descontaminadas (AKHTAR *et al.*, 1998). Para isso, apenas trata-se os cavacos com vapor d'água por um tempo curto. A vaporização no início era realizada por 10 minutos no laboratório. No entanto, alguns resultados mostram que em 2,5 minutos de vaporização obtêm-se um material descontaminado suficiente para o crescimento do fungo desejado num cultivo praticamente isento de contaminantes (SCOTT *et al.*, 1998).

A descontaminação de cavacos de madeira depende de uma temperatura mínima e

quando a temperatura aumenta, o tempo de tratamento requerido diminui. Em sistemas de descontaminação com vapor em escala piloto, muitos fatores são considerados. Para um aumento rápido na temperatura acima de 100°C é necessária uma pressurização do equipamento. No entanto, a pressurização requer um elevado capital de investimento (SCOTT *et al.*, 1998). Como apenas a superfície dos cavacos devem ser descontaminadas, a temperatura deve ser aumentada somente nas superfícies expostas. Para minimizar o calor que penetra nos cavacos, o tempo de residência deve ser o mais curto possível, o que possibilita um resfriamento posterior rápido.

A etapa posterior ao tratamento com vapor é o resfriamento para a aplicação do fungo. Não é necessária a espera do término total desta etapa para a inoculação do fungo, porém a temperatura dos cavacos deve estar abaixo de 45°C para a mistura de micélio e cavaco. Na etapa de resfriamento se utiliza ar filtrado para impedir que esporos encontrados no ar contaminem os cavacos. Porém, o fluxo necessário para o resfriamento é elevado e isso impede a instalação de filtros absolutos com poros de 0,22 µm que impessam a passagem de quaisquer esporos.

O próximo passo do processo é a inoculação dos cavacos de madeira. Nesta etapa aplica-se uma suspensão contendo fungo, co-substrato e água. Essa suspensão tem uma concentração definida de micélio e co-substrato, proporcionando micélio e nutrientes necessários para o crescimento inicial do fungo. A aplicação é efetuada através de um equipamento composto de tanques, bombas, registro dosador e rotâmetro. A suspensão é bombeada nos cavacos em um fluxo pré-determinado para a planta.

A etapa final do processo é manter a pilha de cavacos em condições ideais para o crescimento do fungo ao longo do tempo. As variáveis envolvidas são a temperatura, a umidade, o oxigênio disponível e a acessibilidade ao ambiente externo. O fungo apresenta um crescimento ótimo dependente dessas variáveis. Por exemplo, a biopolpação de uma tonelada

de cavacos em uma pilha deve ser ventilada, pois 48 horas depois da inoculação, a temperatura sofre um aumento de 27°C para 42°C, sendo esse aumento resultado do metabolismo fúngico (SCOTT *et al.*, 1998). Em bioreatores pequenos, o calor gerado não é um problema, devido ao pequeno volume, porém, em grandes pilhas a temperatura pode rapidamente exceder o valor do crescimento ótimo do fungo. A Figura 2 ilustra a variação da temperatura em uma pilha de 1 tonelada, quando se mantém o sistema de resfriamento artificial desligado (SCOTT *et al.*, 1998). Para a análise a pilha foi dividida em regiões, como demonstrado na Figura 3. Nota-se que a região central e o topo da pilha atingem uma temperatura elevada em poucos dias de cultivo; no entanto, as extremidades tendem a apresentar temperaturas inferiores, devido principalmente a troca de calor com o ar do ambiente e a evaporação.

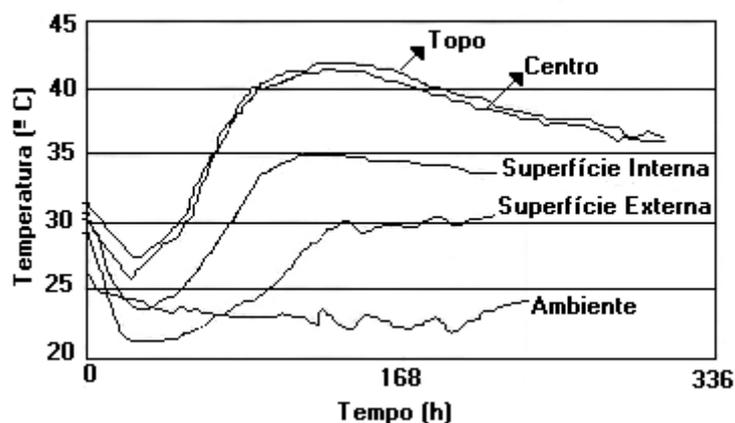


Figura 2 – Perfil da temperatura ao longo do tempo em uma pilha de cavacos sem ventilação submetida ao biotratamento com *C. subvermispora* por duas semanas (SCOTT *et al.*, 1998).

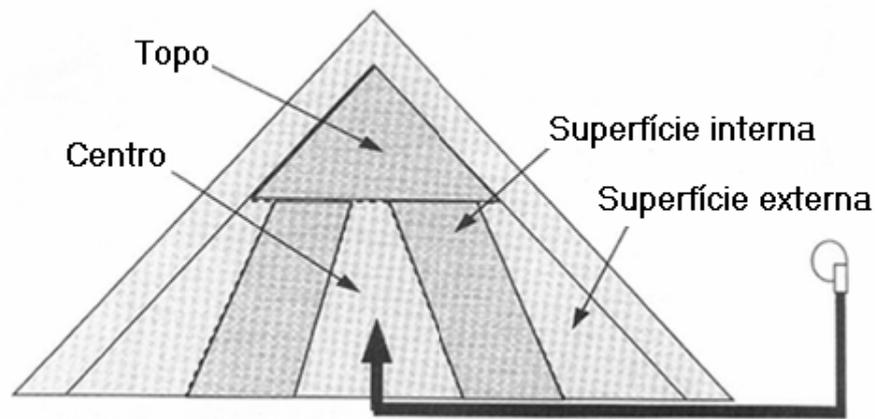


Figura 3 – Regiões para instalação de equipamentos para medir a temperatura na pilha de biopolpação (SCOTT *et al.*, 1998).

Utilizando-se um sistema de resfriamento é possível manter a temperatura da pilha dentro do ótimo de crescimento do fungo. O fluxo de ar umedecido é ajustado para manter a temperatura da pilha em torno de 32°C ou menos. Inicialmente, a ventilação é regulada em um fluxo baixo suficiente para manter a pressão positiva da pilha, além de manter a umidade. A temperatura da pilha aumenta aproximadamente no quarto dia de cultivo, sendo resultado do crescimento do fungo; neste estágio o fluxo de ar do sistema deve ser aumentado, mantendo a temperatura da pilha como demonstrado na Figura 4.

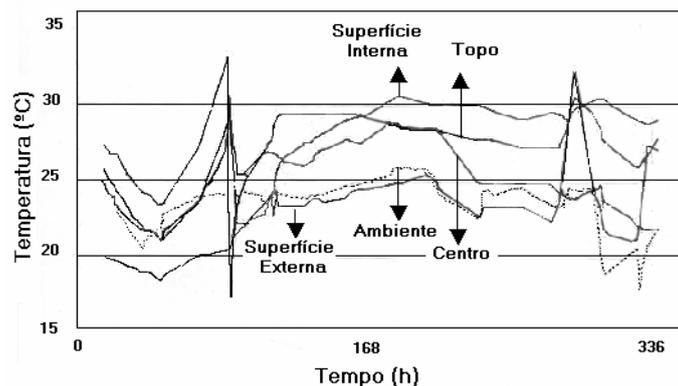


Figura 4 - Perfil da temperatura ao longo do tempo em uma pilha de cavacos com ventilação submetida ao biotratamento com *C. subvermispora* por duas semanas (SCOTT *et al.*, 1998).

2.1.2 - Fungos selecionados para a biopolpação e seu mecanismo de ação

Os organismos mais efetivos na biodegradação dos materiais lignocelulósicos na natureza são os fungos de decomposição branca (degradam todos os componentes da madeira)

e os de decomposição parda (degradam principalmente polissacarídeos). A grande maioria desses organismos pertence à classe Badiomycetes, sendo que a maioria dos ascomicetos e fungos mitospóricos são classificados como fungos de decomposição branca (podem degradar lignina e polissacarídeos, porém em velocidades muito baixas) (KIRK; CULLEN, 1998). Os materiais lignocelulósicos (especialmente a madeira) decompostos por fungos de decomposição branca adquirem uma aparência esbranquiçada e se rompem facilmente no sentido das fibras dos vegetais. Já a aparência de um lignocelulósico decomposto por fungos de decomposição parda é a de um material marrom que quebra facilmente em cubos, no sentido transversal ao das fibras dos vegetais.

Em geral, é possível distinguir três modos para o balanço de massas envolvidos na degradação de cada componente dos materiais lignocelulósicos. Os fungos de decomposição parda, por degradarem principalmente os polissacarídeos, geram um resíduo enriquecido com lignina. Os fungos de decomposição branca podem degradar os lignocelulósicos de duas formas distintas: uma delas, a mais típica, envolve a remoção simultânea de todos os componentes; a outra, menos freqüente, envolve a remoção seletiva de lignina e polioses, mantendo a celulose praticamente intacta (AGOSIN *et al.*, 1990; KIRK; CULLEN, 1998; FERRAZ, 2004).

Em termos microscópicos, observa-se que a ação dos fungos ocorre através da penetração de suas hifas pelo lúmen das células (Figura 5). As hifas aí instaladas produzem muitos metabólicos extracelulares que então atuam degradando a parede celular vegetal. Do ponto de vista microscópico, pode-se identificar dois modos principais de degradação da célula vegetal por fungos de decomposição branca: o primeiro envolve uma “escamação” progressiva da parede celular no sentido lúmen-lamela média, levando à diminuição progressiva e irregular da espessura da parede celular (Figura 6); o outro modo, que tem sido observado em fungos seletivos para a degradação de lignina, envolve a remoção de lignina e

polioses sem a simultânea erosão da parede celular vegetal. Nestes casos, a parede celular, apesar de degradada, mantém sua forma original (Figura 7). Ambos mecanismos de degradação têm sido estudados, e um aspecto a ser considerado é o modo de ação das enzimas extracelulares sobre o complexo lignocelulósico (KIRK; CULLEN, 1998; FERRAZ, 2004).

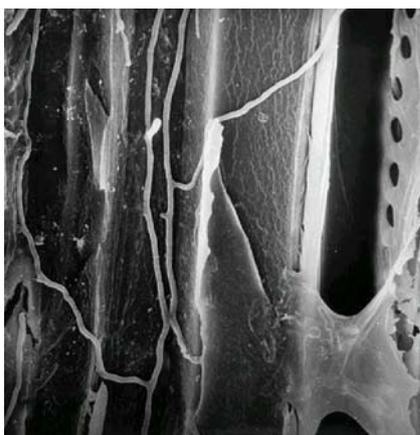


Figura 5 - Microscopia eletrônica de varredura mostrando hifas de *Ganoderma australe* colonizando o lúmen de células de madeira. A magnitude do aumento nesta microscopia é de 800 vezes. Foto de A. Ferraz.

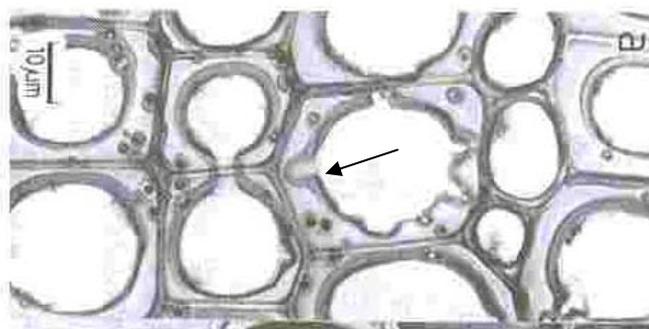


Figura 6 - Microscopia ótica mostrando o ataque progressivo (erosão) da parede celular de *Picea abies* por *Heterobasidium annosum*. Note que a célula ao centro apresenta erosões irregulares na parede celular. A escala no canto superior esquerdo da foto indica a magnitude do aumento (Reproduzido com modificações de FENGEL; WEGENER, 1989).

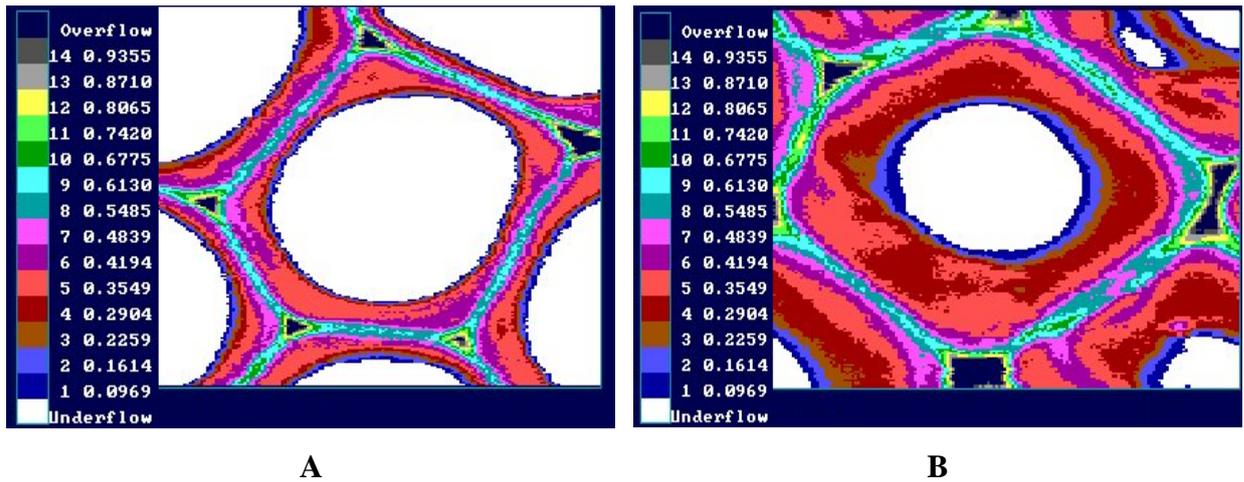


Figura 7 – Micrografia – UV de *Pinus* sp. Em (A) madeira controle, em (B) madeira tratada com *C. subvermispora* por 30 dias. As cores representam valores de absorvância em 280 nm na parede celular e os números para cada cor indicam o valor da absorvância definido entre zero no lúmem ("underflow") e 1.0 no canto das células ("overflow") (MENDONÇA *et al.*, 2004).

Vários trabalhos têm demonstrado que enzimas ligninocelulolíticas não penetram na parede celular vegetal intacta (SREBOTNIK; MESSNER; FOISNER, 1988; FLOUNOY *et al.*, 1993; GOODELL *et al.*, 1997; BLANCHETTE *et al.*, 1997). Com isto, a degradação enzimática dos componentes da parede celular não poderia justificar o modelo de ataque não erosivo apresentado anteriormente na Figura 7. Ou seja, se as enzimas responsáveis pela decomposição dos componentes da madeira não podem penetrar na parede celular vegetal, somente um processo de “escamação” da parede celular pode ser efetivo na biodegradação. No entanto, para os fungos de decomposição branca que degradam lignina seletivamente, este modelo não é adequado. Em trabalho bastante esclarecedor, Blanchette *et al.* (1997) demonstraram que *C. subvermispora* (um dos fungos mais seletivos já descritos para a degradação de lignina) causa alterações estruturais significativas na lignina presente na parede celular e na lamela média, mesmo antes da parede celular vegetal ser permeável a proteínas do tamanho da insulina (5730 Da.). Na figura 7 pode ser observado o efeito do biotratamento por *C. subvermispora*. As cores nessa figura estão de acordo com a concentração de lignina na parede celular. Baixas concentrações de lignina apresentam cores azul e marrom. Essas

frações são mais significativas na madeira biodegradada (Figura 7B) do que na madeira controle (Figura 7A). Isso indica menos lignina da madeira biotratada, mesmo em regiões onde não poderiam atuar enzimas (MENDONÇA *et al.*, 2004). Desta forma, vários trabalhos têm proposto que alguns compostos de baixa massa molar poderiam atuar nos estágios iniciais da biodegradação da madeira. Estes compostos deveriam apresentar atividade degradativa, mas serem pequenos o suficiente para penetrar no complexo celular vegetal, degradar os componentes aí existentes e com isto desestruturar a parede celular a ponto de permitir a penetração de enzimas oxidativas e hidrolíticas.

Entre as espécies de fungos de decomposição branca, destaca-se principalmente *C. subvermispora* e *Phanerochaete chrysosporium*.

C. subvermispora tem demonstrado seletividade para degradação de lignina mesmo em substratos diferentes. A degradação de lignina por várias cepas desse fungo em três substratos diferentes (*Betula papyrifera*, *Populus tremuloides* – madeiras duras e *Pinus taeda* – madeira mole), mostram que não há grandes variações nos valores finais de perda (mineralização) detectados (BLANCHETTE *et al.*, 1992). Nesse estudo, a perda de massa dos lignocelulósicos após 12 semanas de tratamento com várias cepas de *C. subvermispora*, variou entre 26 e 36%, 19 e 30% e, 23 e 28% para *B. papyrifera*, *P. taeda* e *P. tremuloides*, respectivamente. A perda de lignina nesses cultivos foi sempre significativamente superior a perdas de celulose e a perda de hemiceluloses foi similar as perdas de lignina (BLANCHETTE *et al.*, 1992).

P. chrysosporium tem demonstrado menor seletividade para a degradação de lignina. Existe uma dependência para a cepa do fungo e o tipo de substrato utilizado. Muitas cepas removem preferencialmente a lignina, porém outras removem aproximadamente a mesma porcentagem de lignina e celulose (BLANCHETTE *et al.*, 1992; AKHTAR *et al.*, 1998). Em cultivos com várias cepas dessa espécie sobre *B. papyrifera*, *P. taeda* e *P. tremuloides*, as

perdas de massa após 12 semanas de tratamento variaram entre 7 a 73% para *B. papyrifera* e *P. tremuloides*, enquanto que para *P. taeda* as perdas de massa foram baixas e variaram entre 1 e 25% (BLANCHETTE *et al.*, 1992). Esses resultados indicam maior seletividade de *P. chrysosporium* em madeiras duras, enquanto que em madeiras moles a seletividade para a degradação de lignina é menor.

2.2 - Produção de enzimas por fungos de decomposição branca

Muitos tipos de enzimas são produzidas por fungos de decomposição branca. De um modo geral, a biodegradação de materiais lignocelulósicos por esses Basidiomycetes é justamente atribuída a essas enzimas e também a compostos de baixa massa molar.

As enzimas responsáveis pela degradação da celulose e das polioses são hidrolases que apresentam certa especificidade pelo respectivo substrato (KIRK; CULLEN, 1998). Dessa forma, as enzimas hidrolíticas (celulases e hemicelulases) atuam diretamente sobre os polissacarídeos da madeira e têm sua ação limitada nos estágios iniciais de decomposição da madeira, justamente por não poderem penetrar no complexo celular do material lignocelulósico, ou ainda podem ser responsáveis somente por processos degradativos "erosivos", onde um contato direto do complexo enzimático com a parede celular poderia levar a uma degradação.

No caso das enzimas oxidativas, vários mediadores têm sido propostos como intermediários do processo biodegradativo. A partir desses mediadores se tenta explicar a ação, à distância, das enzimas oxidativas, ou seja, a enzima produzida pela hifa fúngica no lúmen da célula do lignocelulósico atuaria sobre compostos de baixa massa molar (mediadores) produzidos pelo próprio fungo ou encontrados na madeira. Esses mediadores, após serem oxidados pela enzima, gerariam espécies reativas, porém com estabilidade suficiente para difundir no interior da parede celular do lignocelulósico e então seriam reduzidos às custas da oxidação da lignina, ou mesmo dos polissacarídeos (KIRK; CULLEN,

1998).

A biodegradação da celulose é um tópico bem elucidado do ponto de vista bioquímico. A degradação do polímero é feita pela ação de três grupos de enzimas que atuam de forma sequencial e sinergicamente. Estes grupos de enzimas compreendem as endo-1,4- β -glicanases (rompem a molécula de celulose nas regiões amorfas ao acaso gerando fragmentos menores), as exo-1,4- β -glicanases ou celobiohidrolases (hidrolisam as moléculas de celulose pelas pontas, gerando dímeros de glicose) e as 1,4- β -glicosidases (hidrolisam a celobiose até glicose). Os diferentes grupos de enzimas atuam de forma cooperativa, causando a hidrólise completa de celulose até glicose (HIGUCHI, 1985; ERIKSSON; BLANCHETTE; ANDER, 1990; EVANS *et al.* 1994).

A biodegradação das polioses requer um conjunto de enzimas extracelulares mais complexo devido a sua estrutura de hetero-polissacarídeo ramificado. A biodegradação das polioses ocorre de forma semelhante à da celulose. As enzimas envolvidas na biodegradação são hidrolases específicas que clivam determinados tipos de ligações existentes no polímero. Assim, as xilanases rompem ligações glicosídicas entre moléculas de xilose e as glucuronidases sobre ligações de ácidos urônicos com moléculas de açúcares. As hemicelulases são divididas em grupos: as endo-hemicelulases, que hidrolisam o polímero ao acaso e liberam fragmentos de menor massa molar; as exo-hemicelulases que hidrolisam pelas pontas os fragmentos gerados pelas endo-hemicelulases gerando dímeros, e as xilosidases que hidrolisam dímeros a açúcares monoméricos (HIGUCHI, 1985; ERIKSSON; BLANCHETTE; ANDER, 1990).

Um vasto grupo de enzimas tem sido relacionado à biodegradação da lignina. No entanto, até os dias de hoje, existem inúmeras dúvidas sobre a real participação de cada grupo e a função que cada um deles exerce no processo global de oxidação que leva a lignina até dióxido de carbono e água.

Desde a descoberta da lignina-peroxidase LiP (EC 1.11.1.14) (TIEN; KIRK, 1983), e das peroxidases dependentes de Manganês MnP (EC 1.11.1.13) (KUWAHARA *et al.*, 1984), as enzimas envolvidas na degradação de lignina têm sido agrupadas em duas classes distintas:

- Fenoloxidasas e;
- Enzimas que produzem peróxido de hidrogênio.

As fenoloxidasas compreendem um grupo de enzimas pertencentes as metaloproteínas. Entre elas, pode-se ainda identificar dois subgrupos:

- enzimas dependentes de peróxido ou peroxidases e;
- enzimas que não dependem de peróxido para atuarem ou lacases.

Pode-se ordenar as enzimas do complexo ligninolítico segundo seus potenciais de oxidação: LiPs > MnPs > Lacases (KIRK; CULLEN, 1998). As LiPs são heme-proteínas que apresentam potencial de oxidação suficientemente elevado para abstrair elétrons de estruturas aromáticas não fenólicas, dando origem a radicais catiônicos. As MnPs também são heme-proteínas, porém diferem das LiPs por dependerem de Mn^{2+} e apresentarem potencial de oxidação suficiente somente para abstrair elétrons de estruturas fenólicas. As Figuras 8 e 9 mostram os ciclos catalíticos destas duas enzimas, respectivamente. Nos dois casos, a enzima é ativada através da oxidação por H_2O_2 , levando a formação do composto 1 (C_I) que é um oxo-complexo deficiente em 2 elétrons. A redução do C_I até a enzima nativa pode dar-se por um doador de 2 elétrons como o iodeto ou, como ocorre durante a degradação de lignina, através de duas etapas de abstração de 1 elétron de cada vez. No caso das LiPs, a redução de C_I a C_{II} e também de C_{II} a C_0 pode ocorrer através da oxidação de substratos não fenólicos levando a formação de radicais cáton.

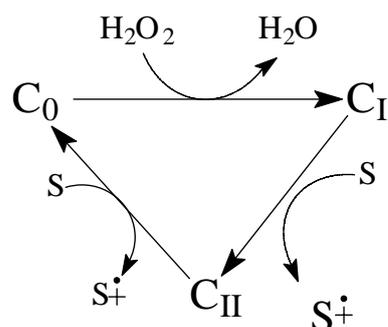


Figura 8 – Ciclo catalítico simplificado de lignina-peroxidase (LiP). S representa um substrato aromático não fenólico (FERRAZ, 2004).

As MnPs dependem de Mn^{2+} para a redução de C_{II} a C_0 (Figura 9). O composto I pode ser reduzido a composto II às custas da oxidação direta de uma estrutura fenólica ou de um átomo de Mn^{2+} . Por outro lado, o Mn^{3+} formado é bastante reativo e pode atuar como um mediador da MnP, pois normalmente é estabilizado por quelantes produzidos pelo próprio fungo, como o ácido oxálico. O complexo Mn^{3+} -oxalato, por sua vez, pode ser reduzido às custas da oxidação de outra estrutura fenólica.

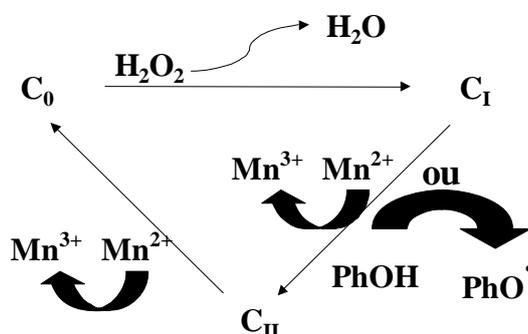


Figura 9 – Ciclo catalítico simplificado de peroxidase dependente de manganês (MnP). PhOH representa um substrato fenólico (FERRAZ, 2004).

As lacases são cupro-proteínas e atuam diretamente sobre estruturas fenólicas através da oxidação dos fenóis pela abstração de 1 elétron mediada pela redução de Cu^{2+} a Cu^+ , que por sua vez, reduz O_2 a H_2O , permitindo que a enzima atue de forma cíclica (Figura 10).

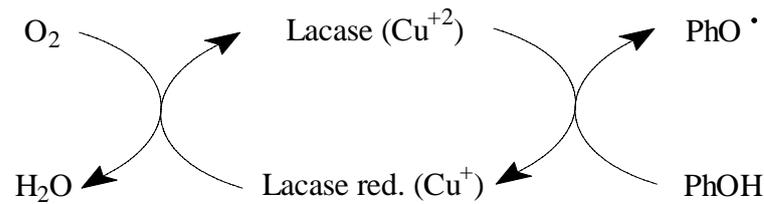


Figura 10 – Ciclo catalítico de lacase. PhOH representa um substrato fenólico. A estequiometria do ciclo envolve 4 Cu^{2+} (normalmente ligados a uma única proteína ou a 2 cadeias protéicas acopladas), 4 substratos fenólicos, 4 prótons e 1 molécula de O_2 (FERRAZ, 2004).

As enzimas que produzem peróxido são acessórias as peroxidases. Estas enzimas geram peróxido de hidrogênio *in situ* e possibilitam que as peroxidases atuem. As principais enzimas produtoras de peróxido envolvidas na biodegradação de lignina são glicose oxidase e metanol oxidase (intracelulares) que utilizam glicose e metanol como substratos, respectivamente (KIRK; CULLEN, 1998; KUHAD; SINGH; ERIKSSON, 1997). A glicose é originária da biodegradação da celulose e das polioses que contêm glicose. O metanol é produzido durante a biodegradação da própria lignina através da remoção de metoxilas ligadas aos anéis aromáticos. A produção de H_2O_2 por enzimas extracelulares também tem sido descrita em alguns fungos de decomposição branca. Entre elas estão a glioxal oxidase (KERSTEN; KIRK, 1987) e a aril-álcool oxidase (ANDER; MARZULLO, 1997). Foi demonstrado que também MnP pode gerar H_2O_2 a partir da oxidação de ácidos orgânicos como o malônico e o oxálico (URZÚA; KERSTEN; VICUÑA, 1998).

Estudos recentes indicam que *C. subvermispora* produz a maioria dos tipos de enzimas mencionadas, porém lignina-peroxidase e celobiohidrolases não têm sido detectadas em meios líquidos ou extratos de fermentações em meio sólido contendo lignocelulósicos (SETHURAMAN; AKIN; ERIKSSON, 1998; SOUZA-CRUZ *et al.*, 2004; RÜTTIMANN *et al.*, 1992; VICENTIM; FERRAZ, 2006).

Lignina-peroxidase e as demais enzimas têm sido reportadas em *P. chrysosporium* cultivado em meio líquido (KIRK; CULLEN, 1998) e em extratos de palha (meio sólido),

porém nesse último caso, a presença de LiP foi detectada somente em condições experimentais especiais que incluíam baixas concentrações de peróxido de hidrogênio, adição de álcool veratrilco e diluição significativas dos extratos enzimáticos (CASTILLO; ANDER; STENSTROM, 1997).

2.3 - A biodegradação de madeira em condições não assépticas

A esterilização ou descontaminação parcial dos cavacos de madeira é uma operação necessária para a inoculação de fungos de decomposição branca, pois a maioria desses organismos não é capaz de competir com os contaminantes presentes em cavacos não autoclavados.

Durante a biodegradação de madeira em condições não assépticas podem ocorrer interações intensas quando várias espécies querem ocupar o mesmo habitat e utilizar os recursos disponíveis do mesmo substrato. Um fungo pode interagir com outros fungos de espécies diferentes e também organismos completamente diferentes como as bactérias e os artrópodes. Essas interações podem envolver dois ou mais indivíduos e ter impacto variado, desde nocivo até proveitoso ou às vezes não apresentar efeitos (MOORE-LANDECKER, 1996).

Um fungo de interesse pode interagir com fungos de outras espécies de várias formas:

- 1) Habilidade de uma espécie excluir a outra por competição (competição por exploração), ou seja, ser mais rápido na exploração de uma fonte de recurso.
- 2) Habilidade de uma espécie excluir ou substituir a outra por antagonismo (competição de interferência ou combate)
- 3) Habilidade de duas espécies interagirem para o benefício de uma ou de ambas, sem impacto negativo sobre nenhuma delas.

Os fungos que interagem competitivamente podem adotar diversas estratégias dependendo da disponibilidade do substrato e dos nutrientes. Os fungos que utilizam apenas

nutrientes monoméricos simples (açúcares e aminoácidos, por exemplo), os quais também podem ser utilizados por outros organismos, desenvolveram uma estratégia de exploração rápida destes substratos, produzindo muitos esporos de fácil dispersão o que maximiza a chance de encontrarem novos substratos. No entanto, os fungos que tem um maquinário enzimático muito complexo e podem degradar polímeros, crescem mais lentamente. Estes últimos têm uma longa fase de crescimento sobre o substrato durante o qual constrói uma substancial rede micelial e em seguida a usa para produzir algumas frutificações grandes. Como exemplo desta categoria temos os fungos causadores de podridão pertencentes à classe Basidiomycetes (WIDDEN, 1997).

A madeira e seus respectivos produtos têm tradicionalmente sido protegidos contra a degradação de basidiomycetes e fungos de decomposição branda através do uso de preservantes químicos (BRUCE; HIGHLEY, 1991). Entretanto, devido ao impacto ambiental e a introdução de legislações mais severas nos últimos anos, pesquisas vêm sendo desenvolvidas com a utilização de agentes biológicos como forma de preservação da madeira (BRUCE; HIGHLEY, 1991). Destes estudos pode-se obter informações muito interessantes sobre a competição entre os Basidiomycetes e os contaminantes freqüentemente observados nos processos de biopolpação.

Espécies de *Trichoderma* são capazes de inibir vários tipos de fungos degradadores de madeira através da produção de várias substâncias químicas solúveis ou voláteis (competição de interferência). Fungos de decomposição parda geralmente são mais inibidos que os de decomposição branca (BETTUCCI; LUPOS; SILVAS, 1988; BRUCE; AUSTIN; KING, 1984; BRUCE; KUNDZEWICZ; WHEATLEY, 1996; BRUCE; HIGHLEY, 1991; HIGHLEY; RCARD, 1988; MORREL; SEXTON, 1990). Várias espécies de *Trichoderma* se desenvolvem rapidamente em cultivos de madeira, sendo capazes de utilizar açúcares livres e resinas presentes no substrato e conseqüentemente podem inibir o crescimento de

Basidiomycetes (HULME; SHIELDS, 1970, 1972). Esses fungos podem produzir metabólicos fungicidas solúveis (HOEVARH *et al.*, 1995), compostos orgânicos voláteis (VOCs), além de quitinases e laminarinases capazes de inibir fungos degradadores de madeira (BRUCE; AUSTIN; KING, 1984; BRUCE *et al.*, 1995b; BRUCE; KUNDZEWICZ; WHEATLEY, 1996; WHEATLEY *et al.*, 1997).

A inibição por esses contaminantes pode estar relacionada principalmente à diminuição de velocidade inicial de crescimento dos Basidiomycetes sobre a madeira. Alguns resultados indicam que o pré-tratamento da madeira com esporos de *Trichoderma* limita a degradação por fungos de decomposição branda (soft-rot) e Basidiomycetes, porém, a proteção da madeira está limitada ao tempo de exposição, que neste caso são tempos relativamente curtos (BROWN; BRUCE; STAINES, 1999). A composição do substrato afeta significativamente a secreção de VOCs por cepas isoladas de *Trichoderma*, o que está relativamente interligado com o nível de inibição que esses compostos têm contra fungos degradadores de madeira (WHEATLEY *et al.*, 1997). Por exemplo, a quantidade e o tipo de aminoácidos presentes num cultivo afetam a capacidade de produção de VOCs por alguns tipos de fungos como *Penicillium* (LARSEN; FRISVAD, 1995 a, b), *Gloeophyllum* (KAHLOS; KIVIRANTI; HILTUNEN, 1994) e *Aspergillus* (BJURMAN; KRITENSSON, 1992). Em cultivos com adição de aminoácidos, alguns VOCs têm sido identificados: 2-propanona, 2-metil-1-butanol, heptanal, octanal e decanal (BRUCE *et al.*, 2000). Em outro estudo, Humphris *et al.*, (1999) confirmaram que Basidiomycetes são inibidos por octanal e heptanal em concentrações de 2,5 ppm.

Dentro do contexto do processo de biopolpação, uma vantagem notável da espécie *P. chrysosporium* é sua capacidade de competir com contaminantes. Um dos fatos que explicam essa capacidade é a temperatura ideal de crescimento desse fungo, que fica entre 37 e 39°C e a sua capacidade de lançar esporos ao meio externo. Já a espécie *C. subvermispora* tem maior

dificuldade em competir com contaminantes, neste caso a temperatura ideal de crescimento é de 27°C (AKHTAR *et al.*, 1998).

Algumas espécies de basidiomycetes têm grande capacidade de produzir e lançar esporos ao meio externo, ou seja, germinam esporos que podem gerar novas cepas da espécie. Essa capacidade pode ajudar na preparação do inóculo, não sendo necessário o preparo de suspensões de micélio. Porém, o controle dos processos industriais pode ser prejudicado, pois esporos podem migrar para o meio ambiente e atacar outros seres vivos. O controle desses esporos em escalas industriais como, por exemplo, a biopolpação pode ser uma missão muito complexa. *P. chrysosporium* produz esses esporos com muita facilidade, enquanto *C. subvermispora* não tem a capacidade de produzir esses tipos de esporos, porém em condições de estresse essa espécie pode produzir esporos de resistência (clamidosporos) que não são lançados ao meio externo, mas que também podem germinar (SAXENA *et al.*, 2001; SOUZA-CRUZ, 2005).

2.4 - Lavado ácido dos cavacos de madeira

O tratamento de cavacos com uma solução de ácido sulfúrico em pH=2,5 a 80°C por 1 hora (tratamento denominado para fins práticos como "lavado ácido") é uma etapa que tem sido introduzida na indústria de celulose e papel com o objetivo de remover metais da madeira e facilitar etapas posteriores de recirculação de água dentro do processo industrial (LUNDQVIST *et al.*, 2005). Essa etapa poderia também servir como um processo de descontaminação dos cavacos num processo de biopolpação, visto que há uma lixiviação da superfície dos cavacos por uma solução com baixo pH e temperatura relativamente elevada.

A maioria dos íons metálicos contidos na madeira estão associados a grupos carboxilatos ligados a hemicelulose. Dependendo do tipo e espécie de madeira, esses metais podem ser removidos em até 70% (LUNDQVIST *et al.*, 2005). Desde que a temperatura do lavado ácido não ultrapasse a 100°C, a velocidade de hidrólise ácida dos carboidratos é muito

baixa e dessa forma tem se demonstrado que não há efeitos negativos nas propriedades da polpa após o cozimento dos cavacos (LUNDQVIST *et al.*, 2005).

2.5 - Uso de milhocina como co-substrato no processo de biopolpação

Quando se adiciona 0,5 % de milhocina em cultivos de *C. subvermispora* sobre madeira autoclavada, a quantidade de inóculo requerida para uma efetiva colonização da madeira é extremamente menor (5g/ton), em comparação com cultivos sem a adição de milhocina (3kg/ton) (AKHTAR *et al.*, 1998).

A milhocina é um fermentado concentrado extraído do milho. Industrialmente, o milho seco é macerado em uma solução de ácido sulfúrico a quente, a fração solúvel sofre uma suave fermentação láctica natural que ocorre devido à presença de bactérias na solução, e é então submetida a uma operação de evaporação, onde a milhocina é concentrada. A milhocina é usada principalmente como suplemento alimentício para ruminantes, fonte de nutrientes para aves, na confecção de iscas atrativas para as moscas das frutas e fonte de nutrientes para processo de fermentação industrial (FILIPOVIC; RISTIC; SAKC, 2002).

A composição da milhocina é muito variável dependendo da origem da matéria prima e de seu processamento. Uma composição típica é mostrada na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição típica de milhocina (AKHATAR *et al.*, 1998).

Substâncias	Porcentagem
Milhocina em base seca	50,7
pH	3,9
Proteína	40,8 (base seca)
Ácido láctico	16,0 (base seca)
Açúcares redutores	12,8 (base seca)
Compostos variados	30,4 (base seca)

Dentre os compostos variados encontram-se ions metálicos, vitaminas e outros compostos em pequenas quantidades. Os aminoácidos são derivados das proteínas e apresentam a composição mostrada na Tabela 3.

Tabela 3 – Aminoácidos encontrados em milhocina (FILIPOVIC; RISTIC; SAKC, 2002).

Amino-ácido	(%) em base seca
Ácido aspartame	2,34
Treonina	1,85
Serina	2,02
Ácido glutâmico	5,34
Prolina	4,89
Glicina	2,28
Alanina	3,87
Cisteína	0,47
Valina	2,20
Metionina	0,74
Isoleucina	1,31
Leucina	3,79
Tirosina	1,17
Fenilalanina	1,40
Histidina	1,36
Lisina	1,20
Arginina	1,86

A milhocina concentrada obtida pela Corn Products do Brasil Ltda, que é utilizada nos experimentos deste trabalho, possui a composição básica mostrada na Tabela 4. A composição pode ainda variar devido às diferenças entre as plantações de milho de região para região (BOLETIM TÉCNICO – CORN PRODUCTS DO BRASIL).

Tabela 4 – Composição aminoácidos, vitaminas e sais minerais de milhocina obtida pela Corn Products Brasil Ltda.

Aminoácidos (% base seca)

Alanina	9,83	Glicina	5,27	Metionina	1,98
Arginina	3,68	Histidina	3,72	Fenilalanina	2,85
Ácido aspártico	5,82	Isoleucina	3,07	Prolina	9,64
Cistina	2,20	Leucina	8,28	Serina	5,18
Ácido glutâmico	18,07	Lisina	4,75	Treonina	4,08
Triptofano	-	Tirocina	3,09	Valina	5,16

Vitaminas (mg/kg)

Biotina	0,3	Ácido pantotênico	15,0
Cholina	3.500,0	Piridoxina	9,0
Inositol	6.000,0	Riblovavina	6,0
Niacina	80,0	Tiamina	3,0

Minerais

Cálcio (%)	0,14	Magnésio (%)	0,6	Selênio (mg/kg)	0,3
Cobre (mg/kg)	15,0	Potássio (%)	2,8	Zinco (mg/kg)	60,0
Manganês (mg/kg)	20,0	Sódio (%)	0,1	Enxofre (%)	0,6
Ferro (mg/kg)	100,0	Fósforo (%)	1,8		

Diferenças entre as composições básicas também podem ser observadas em diferentes empresas que produzem milhocina. No entanto, um estudo detalhado de biopolpação suplementada com milhocina de 3 procedências distintas mostrou que, independentemente da origem e, por consequência, da composição da milhocina, os resultados da biopolpação em termos de economia de energia num processo posterior de refinamento mecânico foram muito semelhantes (AKHTAR *et al.*, 1998).

3 - Objetivos

O objetivo deste trabalho foi avaliar a biopolpação de cavacos de *Eucalyptus grandis* não autoclavados por duas espécies de fungos de decomposição branca, *Ceriporiopsis subvermispora* (cepa SS-3) e *Phanerochaete chrysosporium* (cepa RP-78).

As seguintes etapas foram realizadas para cumprir esse objetivo:

- Realização de cultivos de *C. subvermispora* e *P.chrysosporium* sobre cavacos de *E. grandis* não autoclavados na presença de 0,5% de milhocina.
- Realização de cultivos de *C. subvermispora* sobre cavacos de *E. grandis* não autoclavados sem a adição de milhocina.
- Avaliação das cargas de inóculo necessárias para estabelecer cultivos livres de contaminantes ou com níveis de contaminação que não interfiram no processo de biopolpação.
- Avaliação da viabilidade do micélio de *C. subvermispora* aplicado aos cavacos não autoclavados com utilização de benomil como inibidor de contaminantes.
- Avaliação de um lavado ácido dos cavacos como uma etapa de descontaminação.
- Avaliação dos cavacos biotratados em condições selecionadas frente a um processo de polpação quimiomecânica.

4 – Materiais e Métodos

A execução desse trabalho envolveu 3 grupos de experimentos distintos que são descritos a seguir de forma geral, mencionando seus respectivos objetivos. O detalhamento experimental em cada caso está apresentado na seqüência.

Biodegradação de madeira não autoclavada – O objetivo desses experimentos foi verificar a habilidade de *C. subvermispora* e *P. chrysosporium* para colonizar madeira de *E. grandis* não autoclavada. A atividade metabólica do fungo foi verificada a partir da secreção de enzimas oxidativas, hidrolíticas e ácidos orgânicos ao longo de cultivos de até 60 dias.

Biodegradação de madeira lavada com ácido – O objetivo desses experimentos foi avaliar a eficiência de um lavado ácido como etapa de descontaminação dos cavacos. Neste caso foi utilizado apenas o fungo *C. subvermispora*. A atividade metabólica também foi usada como indicativo de crescimento e degradação de madeira.

Polpação quimiomecânica de madeira biotratada - O objetivo desses experimentos foi avaliar a resposta de algumas madeiras biotratadas frente a um processo de polpação quimiomecânica.

4.1 - Fungo e preparação do inóculo

Os fungos utilizados neste estudo foram os Basidiomycetes de decomposição branca *C. subvermispora* (cepa SS-3) e *P. chrysosporium* (cepa RP-78). A cepa foi periodicamente repicada e mantida em placas de Petri com meio contendo 2% de extrato de malte e 2% de ágar. Os cultivos foram realizados a 27°C para *C. subvermispora* e 38°C para *P. chrysosporium*. A partir destas placas foram obtidos os inóculos para o tratamento da madeira. Para a produção de inóculo, os fungos foram repicados em Erlenmeyers de 2 L contendo 200

mL de meio líquido composto por 2,4% de extrato de batata/dextrose (DIFCO) e 0,7% de extrato de levedura (OXOID). O meio líquido foi esterilizado a 121°C/15min e após resfriamento foi inoculado com 20 discos contendo o micélio de 8 mm de diâmetro provenientes de placas de Petri recém cultivadas (7 dias de cultivo). Após 12 dias de incubação estática, o micélio crescido em meio líquido foi filtrado, lavado com água esterilizada e macerado em 100 mL de água, usando um liquidificador de alumínio para a maceração. Da suspensão obtida foi retirada uma alíquota de 15 mL que foi filtrada sobre papel de filtro previamente seco e pesado. O micélio retido mais o papel de filtro foram então secos até massa constante para a determinação da quantidade de micélio (base seca) contido na suspensão recém preparada. Com base nessa determinação foi então definido o volume de suspensão necessário para adicionar as concentrações de micélio por Kg de madeira em cada Erlenmeyer.

4.2 - Madeira utilizada

A madeira utilizada nesse trabalho foi *Eucalyptus grandis*, obtido junto à empresa Melhoramentos Ltda, Caieiras-SP. A tora de madeira com aproximadamente 8 anos de crescimento foi cortada, descascada, lavada e picada na forma de cavacos utilizando procedimentos de rotina da planta industrial da empresa citada anteriormente. Imediatamente após o picador, os cavacos foram recolhidos de uma esteira de condução, armazenados em sacos plásticos e congelados a -18 °C até o momento do uso.

4.3 – Experimentos de biodegradação

Os cultivos controle, onde a madeira foi autoclavada foram conduzidos da seguinte maneira. No caso de *C. subvermispora*, 50g de cavacos de madeira (em base seca) foram biotratados em Erlenmeyers de 2,0 L. No caso dos cultivos de *P. chrysosporium*, 10g de

cavacos foram tratados em Erlenmeyers de 250 ml. Nos dois casos os cavacos foram mantidos imersos em água por um período de 16 horas. O excesso de água foi então drenado e os cavacos autoclavados a 121° C por 15 minutos. A umidade final desses cavacos foi de aproximadamente 55%. Após resfriamento, os cavacos foram suplementados com milhocina, ou não em alguns experimentos, e inoculados com suspensões de micélio em cargas de inóculo pré-definidas e descritas posteriormente nesse item.

No caso dos cultivos com madeira não autoclavada, os cavacos foram descongelados em bandejas plásticas cobertas com papel alumínio e mantidas em câmara asséptica de fluxo laminar. Após o descongelamento e a homogeneização dos cavacos, cerca de 50g ou 10g (base seca) foram transferidos para Erlenmeyers de 2L ou 250 mL para as inoculações com *C. subvermispora* ou *P. chrysosporium*, respectivamente. A umidade dos cavacos não autoclavados foi de aproximadamente 48%, sendo que água esterilizada foi adicionada em cada experimento a fim de aumentar esse valor para 55%.

Nos cultivos com madeira lavada com ácido o procedimento foi o mesmo descrito para os experimentos com cavacos não autoclavados, porém neste caso os cavacos foram previamente transferidos para Erlenmeyers de 500 mL juntamente com uma solução de ácido sulfúrico com pH 2,5 na proporção de 6 volumes de solução/g de madeira (equivalente a 3,25 g de H₂SO₄/kg de madeira em base seca). A temperatura da mistura foi elevada para 80°C em um banho de água por um período de uma hora (Lundqvist *et al.*, 2005). Após o tratamento, a solução foi drenada e os cavacos transferidos para Erlenmeyers de 2 L em câmara asséptica de fluxo laminar. Em um grupo de experimentos os cavacos após serem transferidos foram autoclavados a 121 °C por 15 min. Um experimento controle usando um 2° lote de madeira de *E. grandis* foi realizado com água destilada em pH = 6.

A inoculação dos Erlenmeyers foi feita em câmara asséptica de fluxo laminar, quando então foi adicionada uma suspensão de micélio fúngico, ou micélio fúngico e milhocina. O

Erlenmeyer carregado foi fechado e agitado manualmente para homogeneização. Os cultivos de *C. subvermispora* foram mantidos em sala termostaticada a 27 ± 2 °C e os de *P. chrysosporium* em câmara de germinação a 38 ± 1 °C até o final de cada período de biodegradação. Os tempos de experimentação variaram dependendo da condição inicial dos cavacos, carga de inóculo e adição de milhocina (3 a 60 dias, conforme mostrado no tópico Resultados e Discussão). A carga de inóculo utilizada variou entre 5 e 3000 mg de micélio/kg de madeira (ambos em base seca). Os experimentos de biodegradação continham, ou não, milhocina adicionada na razão de 0,5% (g de milhocina/100 g de madeira – ambas em base seca).

Para cada condição de biodegradação foram inoculados de 12 a 20 Erlenmeyers de forma idêntica a fim de se obter experimentos em triplicata para análise enzimática e um Erlenmeyer para determinação de pH.

Após a biodegradação, os erlenmeyers foram abertos, e os cavacos utilizados como segue:

- a) Um dos Erlenmeyers foi utilizado para determinação de pH (item 4.3.1).
- b) Os cavacos provenientes dos demais Erlenmeyers foram extraídos com tampão acetato pH 5,5 para extração e quantificação das enzimas produzidas (item 4.3.2), lavados manualmente com água para remoção do micélio superficial e então secos ao ar. A massa final de cavacos secos ao ar foi determinada. O teor de umidade destes cavacos foi determinado em balança com aquecimento por infravermelho (OHAUS) e a massa seca residual calculada. A perda de massa foi calculada como massa inicial menos massa final, dividida pela massa inicial. Uma parte da madeira foi moída para realização do teste de solubilidade em NaOH 1% (item 4.5).

4.3.1 – Determinação do pH

Os cavacos de um dos Erlenmeyers (controle ou madeira biodegradada) foram extraídos com 60 mL ou 300 mL de água para 10g ou 50g de cavacos, respectivamente. O pH da água de extração foi previamente ajustado em 7,0. A extração foi feita por imersão sob agitação de 120 rpm por 48 horas, seguida de filtração. Então o pH do filtrado foi determinado.

4.3.2 – Extração e quantificação das enzimas produzidas durante a biodegradação da madeira

Ao final do período de incubação, 3 cultivos foram extraídos utilizando 200 mL ou 40 mL de uma solução contendo tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5, adicionado de 0,01% de Tween 60 para 50g ou 10g de cavacos, respectivamente. A extração foi conduzida sob agitação de 120 rpm durante 5 h a 10 ± 1 °C. Os extratos enzimáticos foram recuperados por centrifugação em uma temperatura de 10 ± 1 °C, a 3500 g por 15 minutos.

Dos extratos enzimáticos obtidos de cada Erlenmeyer, foram determinadas as atividades enzimáticas das enzimas oxidativas e hidrolíticas. A atividade foi expressa como unidades internacionais (UI) por quilograma de madeira (em base seca inicial), conforme descrito a seguir:

-Manganês-peroxidase

As atividades de MnP foram medidas pela oxidação de vermelho de fenol. As reações foram conduzidas em tubos de 30 mL contendo 3 mL de tampão succinato de sódio 50 mM (pH 4,5), 3 mL de lactato de sódio 50 mM, 1 mL de MnSO_4 1 mM, 1 mL de vermelho de fenol 0,1%, 1 mL de caldo enzimático, 500 μL de albumina 1,8% e 500 μL de H_2O_2 1,76 mM. Para

o branco, substituiu-se o caldo enzimático por tampão de extração enzimática. Em intervalos de 2 min, 2 mL dessa mistura reacional foram reagidos com 60 μL de NaOH 6,5 N para interromper a reação e a absorbância foi lida em 610 nm ($\epsilon = 22000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). (KUWAHARA *et al*, 1984; LUNDELL *et al*, 1990).

-Lacase

As atividades de lacases foram determinadas pela oxidação de ABTS (ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6)-sulfônico). As cinéticas foram acompanhadas em cubetas de quartzo de 3 mL contendo 600 μL de tampão citrato-fosfato 50 mM (pH 5,0), 200 μL de água destilada, 200 μL de ABTS 1 mM e 1 mL de caldo enzimático. Para o branco, substituiu-se o caldo enzimático por tampão de extração enzimática. A cinética enzimática foi acompanhada em intervalos de 10 s a 5 min. A oxidação de ABTS foi medida em 420 nm ($\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) (BOURBONNAIS; LEECH; PAICE, 1998).

-Lignina-peroxidase

Para a determinação de atividades de LiP, utilizou-se o corante Azure B como substrato (ARCHIBALD, 1992). A reação foi conduzida em cubetas de quartzo de 3 mL contendo 1,25 mL de tampão succinato de sódio 50 mM (pH 4,5), 250 μL de Azure B 320 μM , 500 μL de caldo enzimático e 500 μL de H_2O_2 1,76 mM. Para o branco, substituiu-se o corante por água destilada. A cinética enzimática foi lida em 651 nm por 5 min.

-Endocelulases

As atividades de endocelulases foram determinadas pela hidrólise de carboximetilcelulose (CMC) (WOOD; BHAT, 1988). A reação foi conduzida em tubos de ensaios de 10 mL contendo 900 μL de CMC 0,44% em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5) e 100 μL de

caldo enzimático. A reação foi mantida em banho-maria à 50°C. Após 1 h, a reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de reagente DNS. A mistura reacional foi aquecida em banho-maria a 100°C por 5 min e depois de esfriar mediu-se a absorbância em 540 nm (Miller, 1959). Para o branco, substituiu-se o caldo enzimático por tampão de extração enzimática e o tampão acetato de sódio sem adição de CMC. Para descontar o teor de açúcares redutores presentes no caldo e na solução contendo o substrato, um outro procedimento (controle) foi feito adicionando o próprio caldo após a adição de DNS. Glicose (seca em P₂O₅ a vácuo) foi utilizada para construção da curva de calibração.

-Xilanases totais

As atividades de xilanases foram determinadas pela hidrólise de xilana de bétula (Bailey *et al*, 1992). A reação foi conduzida em tubos de ensaios de 10 mL contendo 900 µL de xilana 1% em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,5) e 100 µL de caldo enzimático. A reação foi mantida em banho-maria à 50°C. Após 5 min, a reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de reagente DNS. A mistura reacional foi aquecida em banho-maria a 100°C por 5 min e depois de esfriar mediu-se a absorbância em 540 nm (MILLER, 1959). Para o branco, substituiu-se o caldo enzimático por tampão de extração enzimática e o tampão acetato de sódio sem a adição de xilana. Para descontar o teor de açúcares redutores presentes no caldo e na solução contendo o substrato, fez-se o mesmo procedimento das endocelulases. Xilose (seca em P₂O₅ a vácuo) foi utilizada para construção da curva de calibração.

4.4 - Incubação de cavacos contaminados em meio contendo benomil

Alguns cavacos de madeira não autoclavada que foram inicialmente inoculados com *C. subvermispora* numa carga de 500mg de micélio/kg de madeira e sofreram intensa contaminação após 28 dias de cultivo a 27 °C, foram incubados em placas de Petri contendo

um meio composto por 2,4% de extrato de batata/dextrose, 0,7% de extrato de levedura, 2% de ágar e 4 mg/L de benomil (Metil-1-butilcarbamoil-2-bencenoimidazolcarbamato). Uma solução concentrada de benomil foi inicialmente preparada após suspensão de 6 mg do composto em 50 mL de água. A suspensão foi acidificada com a adição gota a gota de HCl 1 mol/L até dissolução e posteriormente avolumada a 100 mL. Uma alíquota dessa solução foi então transferida para o meio de cultivo para fornecer uma concentração final de 4 mg de benomil/L de meio. Cada placa de petri contendo esse meio de cultivo recebeu a adição de um cavaco contaminado. Os cavacos foram transferidos para as placas de Petri em câmara asséptica de fluxo laminar. As placas foram mantidas em câmara de germinação a temperatura de 27C° por 7 dias.

4.5 - Determinação da solubilidade em NaOH 1% das amostras de madeira

Após a extração de enzimas, cerca de 5g de cavacos secos ao ar foram amostrados ao acaso de cada triplicata de cultivo e moídos em moinho de facas. Cerca de 0,3 g de madeira moída foram transferidos para tubos de ensaio com tampas de rosca. A essas amostras foram adicionados 15 mL de solução NaOH (1% m/v) e deixou-se a mistura em banho a 100° C por uma hora. O produto final foi filtrado com vácuo em filtro de vidro sinterizado nº 3 (previamente secos em estufa a 105°C por 1 hora e meia), lavado com 50ml de NaOH 1% e posteriormente com água até atingir pH neutro. O resíduo retido nos filtros foi seco até massa constante em estufa inicialmente a 60 °C e posteriormente a 105 °C. A massa inicial de madeira moída menos a massa de madeira residual tratada com NaOH dividida pela massa de madeira inicial forneceu as porcentagens de madeira solubilizada em NaOH 1% (ASTM METHODS, 1966)

4.6 – Experimentos de biodegradação em escala ampliada

Alguns cultivos foram refeitos nas mesmas condições descritas anteriormente, porém em maior escala para proporcionar a obtenção de madeiras biotratadas em quantidade suficiente para etapas posteriores de polpação quimiomecânica. A madeira utilizada nesses experimentos foi obtida na empresa Melhoramentos Papéis em novo lote (2º lote). Em um primeiro momento foram realizados os experimentos para avaliar o metabolismo de *C. subvermispora* neste novo lote de madeira. Para tal foi realizada a etapa do lavado ácido como descontaminação dos cavacos utilizando-se cargas de inóculo de 500mg de micélio/kg de madeira para cultivos sem adição de milhocina e 5mg de micélio/kg de madeira para cultivos com adição de milhocina. Após a avaliação do metabolismo experimentos similares foram repetidos para preparar madeira biotratada para os ensaios de polpação quimiomecânica (Tabela 10 – Resultados e Discussão). No caso de *P. chrysosporium*, os experimentos com adição de milhocina com carga mínima de inóculo foram repetidos com o 2º lote de madeira somente para a etapa de polpação quimiomecânica (Tabela 10 – Resultados e Discussão). Para a ampliação de escala foram utilizados Erlenmeyers de 2L com 50g de cavacos. Para cada condição de biodegradação foram inoculados 3 Erlenmeyers.

4.7 - Polpação quimiomecânica de cavacos de madeira

A polpação quimiomecânica foi feita por refinamento mecânico de cavacos pré-digeridos com licor alcalino contendo sulfito de sódio. Tanto cavacos biotratados, quanto o controle não inoculado com o fungo (ambos com cerca de 50% de umidade), foram imersos em licor alcalino contendo sulfito de sódio na razão 1:6 (p/v). Esse licor continha 10% de Na₂SO₃ (g/100g de madeira seca) e 5% de NaOH (g/100g de madeira seca). Os recipientes contendo os cavacos (50 g de cavacos/300 mL de licor) foram autoclavados a 121°C (1 atm) por 120 min. Dos 4 cultivos realizados em cada condição experimental, 3 foram utilizados

para o refinamento posterior em moinho do tipo *Jökro*. Os cavacos pré-digeridos foram drenados e então desfibrados em liquidificador SIRE de 3,5 L por 1 hora na proporção de 50g de cavacos/3 L de água. Os cavacos desfibrados foram centrifugados (em centrífuga Arno) e refinados em um refinador Regmed tipo *Jökro*. Em cada recipiente do refinador *Jökro* foram colocados 20 g de madeira desfibrada (base seca), 90ml de licor contendo 10% de Na₂SO₃ (g/100g de madeira seca) e 5% de NaOH (g/100g de madeira seca) e 90ml de água destilada. O refinamento foi conduzido por tempos variáveis entre 60, 120 e 220 min.

Após o refinamento, as polpas foram classificadas em um classificador com placa com fendas de 0,15 mm (Noram, Lorentzen & Weltre, modelo CA-328) e centrifugadas (centrífuga Arno). As fibras que passaram no classificador foram desagregadas e uma suspensão contendo 2 g de fibras/L foi usada para determinar o grau de fibrilação (drenabilidade) (equipamento Regmed, tipo Schopper-Riegler, modelo SRIP). O restante das suspensões de fibras, contendo de 3 a 6 g, foram usadas para preparar folhas de teste de 20 cm de diâmetro com gramatura de 95 a 190 g/m² em um formador de folhas Regmed, modelo FF/S2.

As folhas foram prensadas e secas por aquecimento direto em formador de folhas Regmed, modelo FF/S2, por aproximadamente 15 minutos. As folhas obtidas foram colocadas em um ambiente com 50% de umidade e temperatura de 27°C por um tempo de 96 horas. Após a estabilização da umidade, as folhas foram pesadas e suas espessuras foram medidas em aparelho Regmed, modelo ESP/AS-10.

De cada uma das folhas teste descritas anteriormente foram avaliadas as seguintes propriedades físico-mecânicas: índice de resistência à tração (aparelho Regmed, modelo RE/A30) e índice de resistência ao rasgo (aparelho Regmed, modelo ED-1600).

As etapas empregando o refinamento mecânico e a preparação e caracterização de folhas teste foram realizadas com equipamentos disponibilizados pela empresa Melhoramentos Ltda.

5 - Resultados e Discussão

5.1 - Cultivos de *C. subvermispora* sobre cavacos autoclavados ou não com a adição de milhocina.

Um primeiro grupo de experimentos foi realizado com o cultivo de *C. subvermispora* sobre madeira não autoclavada suplementada com milhocina. A carga de inóculo aplicada foi de 5, 50 e 3000mg de micélio/kg de madeira (ambos em base seca). Cultivos controle utilizando cavacos autoclavados também foram realizados nas mesmas condições.

Nos cultivos com madeira não autoclavada suplementada com milhocina foi observado o crescimento de contaminantes oportunistas que esporularam já nos primeiros 10 dias de incubação (Figura 11B). A maioria dos contaminantes apresentavam micélio aéreo e não aderido à superfície dos cavacos. As maiores áreas cobertas por contaminantes continham um micélio branco, embora micélios de coloração preta e esverdeada também tenham sido observados. Por outro lado, os experimentos controle que utilizaram madeira autoclavada, mostraram o crescimento exclusivo de *C. subvermispora* e a concomitante descoloração dos cavacos de *E. grandis* (Figura 11A).

A atividade metabólica de *C. subvermispora*, monitorada a partir da secreção de enzimas e de ácidos orgânicos, coincidiu com as observações visuais dos cultivos, ou seja, nos cultivos com madeira autoclavada foi observado um padrão típico de acúmulo de MnP e xilanases, além da diminuição do pH ao longo dos 28 dias de cultivo (Figura 12). Os níveis de MnP e xilanases secretados e a diminuição de pH foram semelhantes aos já descritos em trabalhos anteriores (SOUZA-CRUZ *et al.*, 2004; AGUIAR; SOUZA-CRUZ; FERRAZ, 2006; VICENTIM; FERRAZ, 2006). Já nos cultivos com madeira não autoclavada, nenhuma atividade de MnP foi detectada. Além disso, xilanases foram produzidas em níveis muito baixos e o pH dos cultivos permaneceu praticamente constante (Figura 12).

**A****B**

Figura 11 – Cavacos de *E. grandis* inoculados com *C. subvermispora* por 28 dias.(A) madeira autoclavada e (B) madeira não autoclavada. Cultivos com carga de inóculo de 3000mg de micélio/kg de madeira (base seca) e suplementação com milhocina (0,5 % m/m em base de madeira seca).

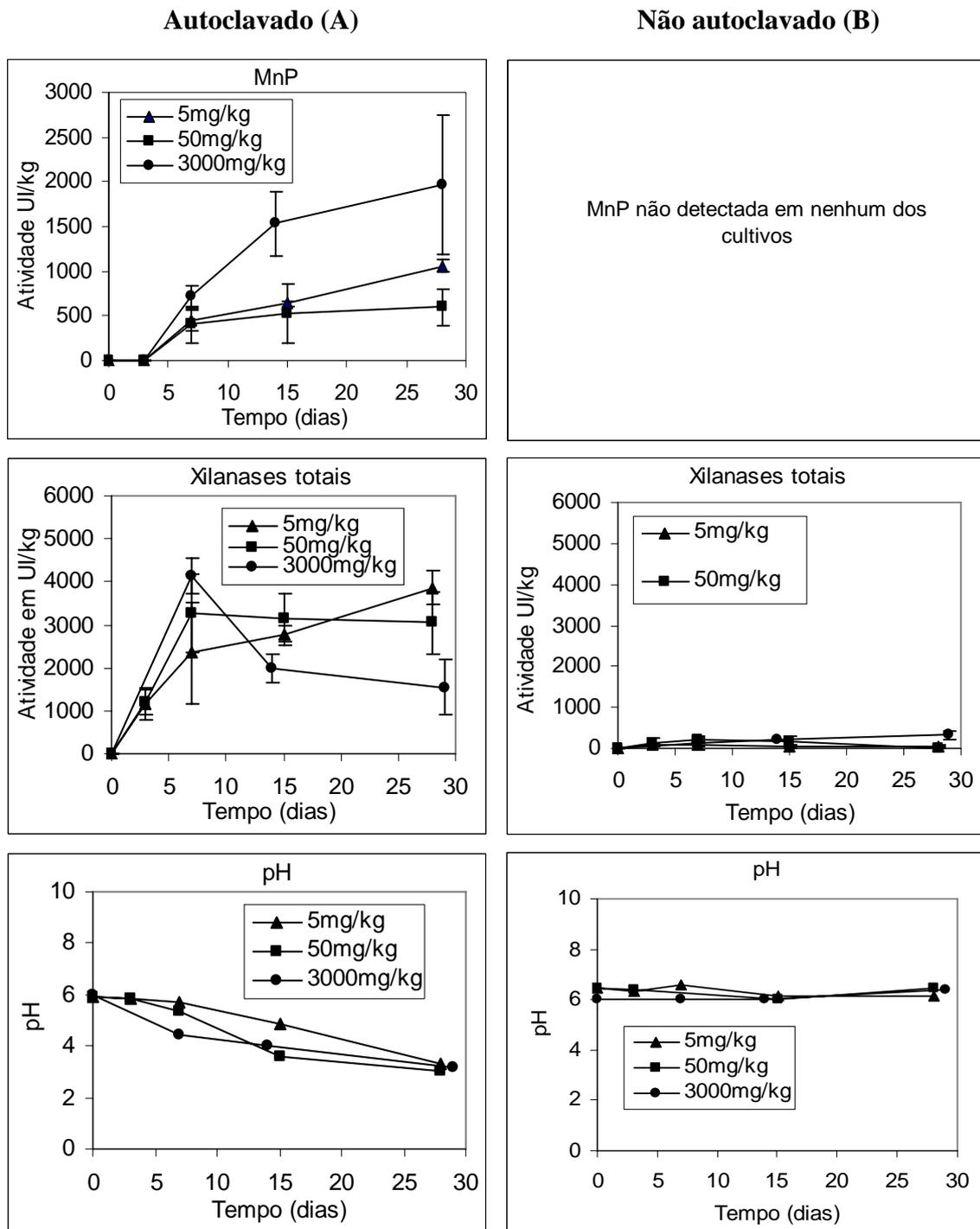


Figura 12 - Atividades de MnP, xilanasas e níveis de pH em cultivos de *C. subvermispora* sobre madeira autoclavada (A) e madeira não autoclavada (B). Cargas de inóculo de 5, 50 e 3000mg de micélio/kg de madeira e suplementação com milhocina (0,5 % m/m em base de madeira seca).

O monitoramento dos níveis de lacases e endoglucanases nesses cultivos também corroborou o não crescimento de *C. subvermispora* quando se utilizou madeira não autoclavada. A enzima lacase foi detectada no início de todos os cultivos com madeira autoclavada, atingindo níveis máximos de 68 UI/kg de madeira (Figura 13). No entanto, essa enzima não foi detectada em nenhum dos cultivos com madeira não autoclavada. Endoglucanases também foram detectadas nos cultivos com madeira autoclavada, atingindo níveis máximos de 700 UI/kg de madeira nos cultivos com carga de inóculo de 3000mg de micélio/kg de madeira, enquanto que os níveis dessas enzimas foram extremamente baixos nos cultivos com madeira não autoclavada (Figura 13).

Nos experimentos com madeira autoclavada, a carga de inóculo aplicada não afetou significativamente os níveis de xilanases e lacases secretados, enquanto que os níveis de MnP e endoglucanases foram significativamente maiores nos cultivos inoculados com 3000mg de micélio/kg de madeira (Figuras 12 e 13)

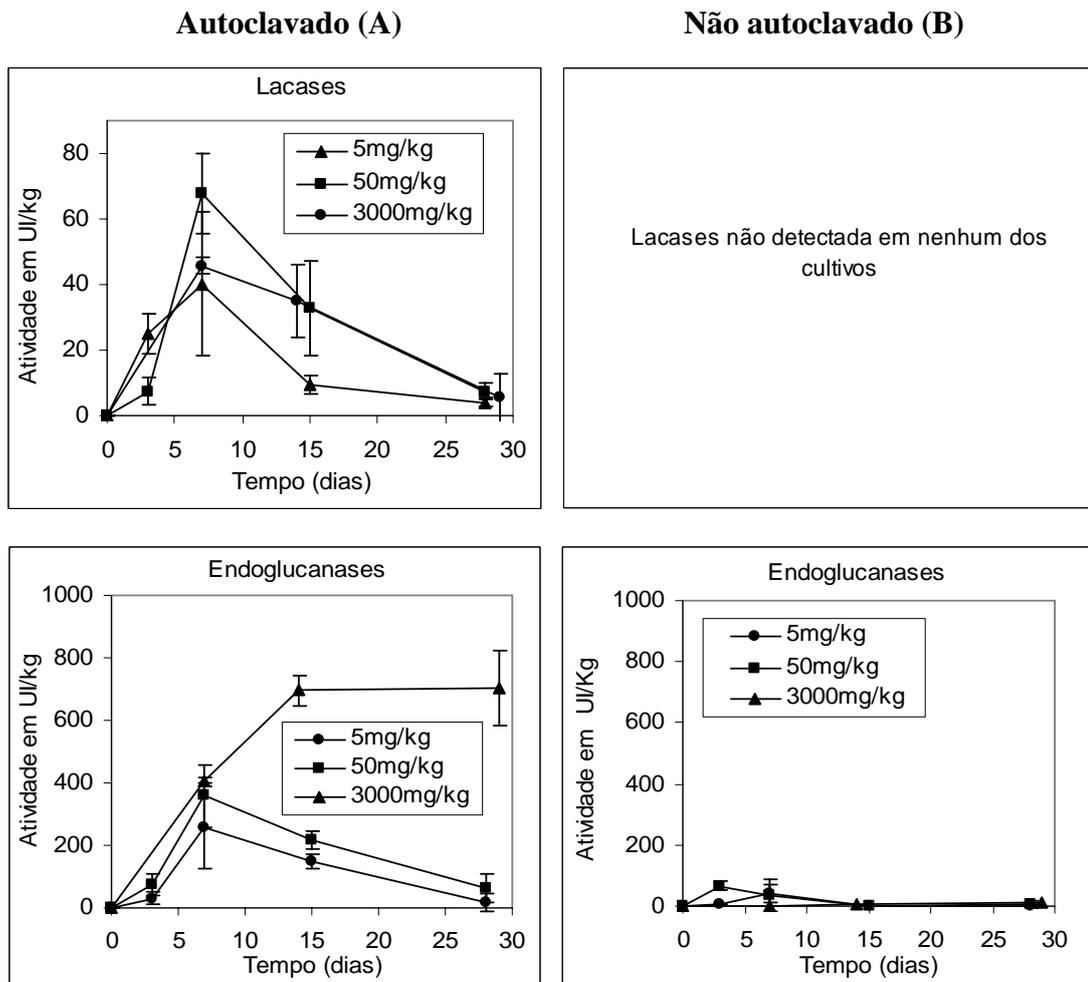


Figura 13 - Atividades de endoglucanases e lacases em cultivos de *C. subvermispora* sobre madeira autoclavada (A) e madeira não autoclavada (B). Cargas de inóculo de 5, 50 e 3000mg de micélio/kg de madeira e suplementação com milhocina (0,5 % m/m em base de madeira seca).

Em síntese, pode-se notar que nos cultivos com madeira não autoclavada houve uma pequena produção de enzimas hidrolíticas que poderia ser atribuída ao crescimento dos contaminantes. Por outro lado, as enzimas oxidativas que são características do metabolismo de *C. subvermispora*, principalmente MnP (SOUZA-CRUZ *et al.*, 2004; RÜTTIMANN *et al.*, 1992), não foram detectadas mesmo em níveis baixos, comprovando que efetivamente *C. subvermispora* não se desenvolveu nesses cultivos. A medida do pH dos cultivos também se mostrou um bom indicativo da atividade de *C. subvermispora*, visto que nos cultivos com madeira autoclavada foi observado a diminuição do pH ao longo do tempo, provavelmente

devido à produção de ácido oxálico pelo fungo (AGUIAR; SOUZA-CRUZ; FERRAZ, 2006). Já nos cultivos com madeira não autoclavada, o pH permaneceu praticamente constante (Figura 12).

A perda de massa de madeira nos cultivos com carga de inóculo de 3000mg de micélio/kg de madeira também se revelou um indicativo da atividade degradadora de *C. subvermispora*, já que no cultivo com madeira autoclavada observou-se uma perda de massa crescente ao longo da biodegradação (Figura 14), enquanto que no cultivo com madeira não autoclavada, apenas uma pequena perda de massa foi evidenciada, provavelmente devido ao consumo de extrativos causado pelos fungos contaminantes.

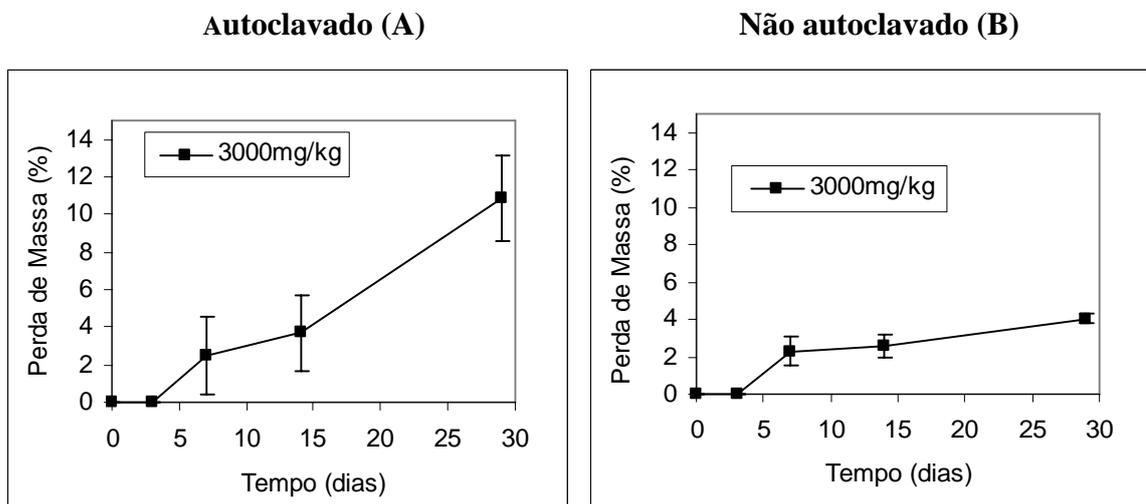


Figura 14– Perda de massa de cavacos de *E. grandis* em cultivos de *C. subvermispora* sobre madeira autoclavada (A) ou madeira não autoclavada (B). Cargas de inóculo de 3000mg de micélio/kg de madeira e suplementação com milhocina (0,5 % m/m em base de madeira seca).

Um índice comumente utilizado na indústria de celulose e papel para avaliar a qualidade de cavacos de madeira quanto à putrefação é a determinação da solubilidade em hidróxido de sódio (ASTM METHODS, 1966). Em geral, se atribui elevadas solubilidades em NaOH à biodegradação da madeira, já que o tratamento alcalino promove a solubilização de lignina e hemiceluloses parcialmente degradadas. Em nossos estudos, a solubilidade em NaOH 1% da madeira biotratada demonstrou ser um bom indicativo da atividade degradativa de *C. subvermispora*, porém apenas a partir do 28º dia de cultivo. Nos cultivos suplementados

com milhocina sobre madeira autoclavada pode ser verificado que a solubilidade da madeira biotratada aumenta significativamente somente após 28 dias de degradação (Tabela 5), exceto no caso dos cultivos com carga de inóculo de 3000mg de micélio/kg de madeira nos quais foi notado um aumento de solubilidade já a partir de 14 dias de cultivo. Por outro lado, os cultivos com madeira não autoclavada geraram amostras biotratadas cuja solubilidade em NaOH 1% foi constante e igual ao observado no controle (Tabela 5).

Tabela 5 – Solubilidade em NaOH 1% de *E. grandis* biodegradado por *C. subvermispora*. Cultivos suplementados com milhocina sobre madeira autoclavada ou madeira não autoclavada e cargas de inóculo de 5, 50 e 3000mg de micélio/kg de madeira (base seca).

Tempo de cultivo (dias)	Solubilidade em NaOH 1% (%)			
	madeira autoclavada		madeira não autoclavada	
	Cargas de inóculo variáveis			
	(5mg/kg)	(50mg/kg)	(3000mg/kg)	(3000mg/kg)
0	10,9 ± 0,5 (a)*	10,9 ± 0,5 (a)	10,9 ± 0,5 (a)	10,9 ± 0,5 (a)
3	9,2 ± 0,6 (a)	8,6 ± 0,6 (a)	nd	nd
7	9,7 ± 0,8 (a)	9,3 ± 0,3 (a)	11,1 ± 0,4 (a)	11,7 ± 0,3 (a)
14	8,9 ± 0,3 (a)	10 ± 1 (a)	12,4 ± 0,5 (b)	12,0 ± 0,5 (a)
28	13,8 ± 1,5 (b)	18,1 ± 0,1 (b)	14,7 ± 0,1 (c)	11,2 ± 0,5 (a)

(*) Em cada coluna, letras iguais indicam que os valores não diferem com 95% de confiança, letras diferentes indicam valores significativamente diferentes (TESTE DE TUKEY; DANNETT – GRAPHPAD INSTAT SOFTWARE). nd = não determinado

5.2 - Cultivos de *P. chrysosporium* em cavacos autoclavados ou não com a adição de milhocina

Desta vez a carga de inoculo aplicada nos cultivos não autoclavados foi de 5 e 50mg de micélio/kg de madeira. Cultivos autoclavados (controle) nas mesmas condições também foram realizados nas mesmas condições.

Nos cultivos de *P. chrysosporium* sobre madeira não autoclavada adicionados de milhocina também foi observado o crescimento de contaminantes oportunistas, porém em menor quantidade e diversidade que o observado nos cultivos de *C. subvermispora*. Nesse

caso, os contaminantes apresentaram micélio predominantemente preto e esverdeado aparentando uma maior aderência à superfície dos cavacos. Um diferencial marcante nesses cultivos foi à observação do crescimento concomitante de *P. chrysosporium* com os contaminantes. O micélio de *P. chrysosporium* rapidamente predominou nos cultivos, inclusive formando e lançando esporos. Também se observou a descoloração dos cavacos de *E. grandis*. Os experimentos controle que utilizaram madeira autoclavada, mostraram o crescimento exclusivo de *P. chrysosporium* e esporulação evidente do micélio a partir de 15 dias de cultivo, além da concomitante descoloração dos cavacos.

Um fator relevante que deve ter contribuído para o menor nível de contaminação nos cultivos de *P. chrysosporium* comparados aos de *C. subvermispora* foi à temperatura de incubação nos dois casos. Os cultivos de *P. chrysosporium* foram realizados em temperaturas mais elevadas (35-37 °C) que devem limitar a diversidade de contaminantes aptos a competir com o fungo de interesse. Já os cultivos de *C. subvermispora* devem ser necessariamente conduzidos a temperaturas mais baixas (27°C), pois essa espécie não cresce adequadamente em temperaturas superiores a 30°C (AKHTAR *et al.*, 1998).

A atividade metabólica de *P. chrysosporium*, monitorada a partir da secreção de enzimas e de ácidos orgânicos mostrou que as enzimas hidrolíticas e os ácidos orgânicos foram produzidos tanto nos cultivos com madeira autoclavada como na madeira não autoclavada, porém sempre em níveis superiores nos cultivos com madeira autoclavada (Figura 15). MnP foi detectada em níveis elevados nos cultivos sobre madeira autoclavada, porém não foi detectada sobre madeira não autoclavada em nenhum dos tempos de cultivo avaliados (Figura 16). Lacases e LiPs não foram detectadas em nenhum dos cultivos.

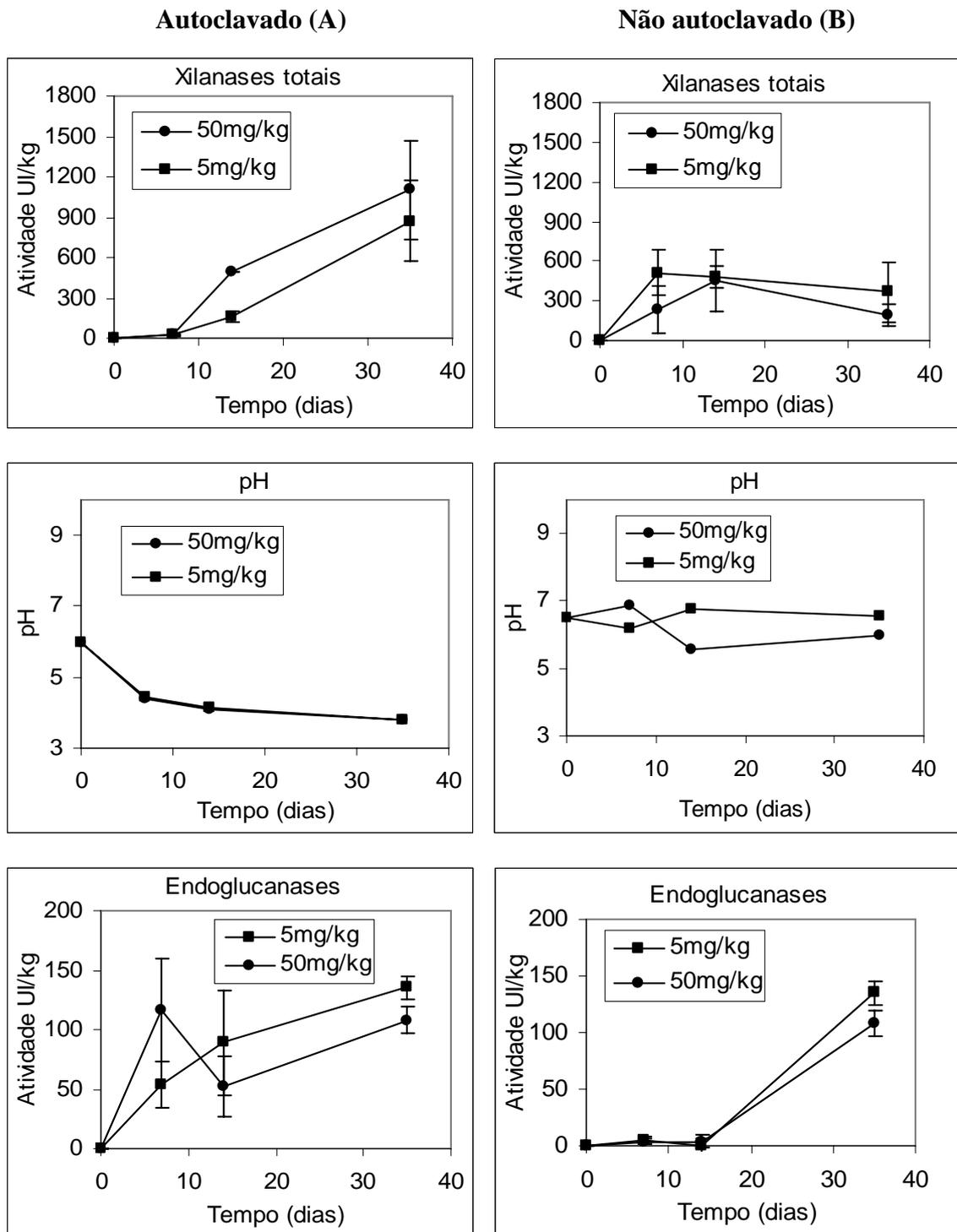


Figura 15 - Atividades de xilanasas, endoglucanases e níveis de pH em cultivos de *P. chrysosporium* sobre madeira autoclavada (A) e madeira não autoclavada (B). Cargas de inóculo de 5 e 50 mg de micélio/kg de madeira e suplementação com milhocina (0,5 % m/m em base de madeira seca).

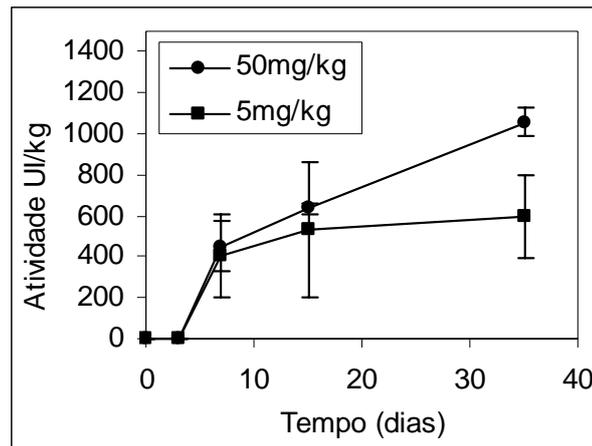


Figura 16 - Atividades de MnP em cultivos de *P. chrysosporium* sobre madeira autoclavada. Cargas de inóculo de 5 e 50 mg de micélio/kg de madeira e suplementação com milhocina (0,5 % m/m em base de madeira seca).

Nos cultivos de *P. chrysosporium* com madeira autoclavada, as perdas de massa atingiram valores de até 12%, enquanto que nos cultivos com madeira não autoclavada a máxima perda de massa observada foi de 6% (Figura 17).

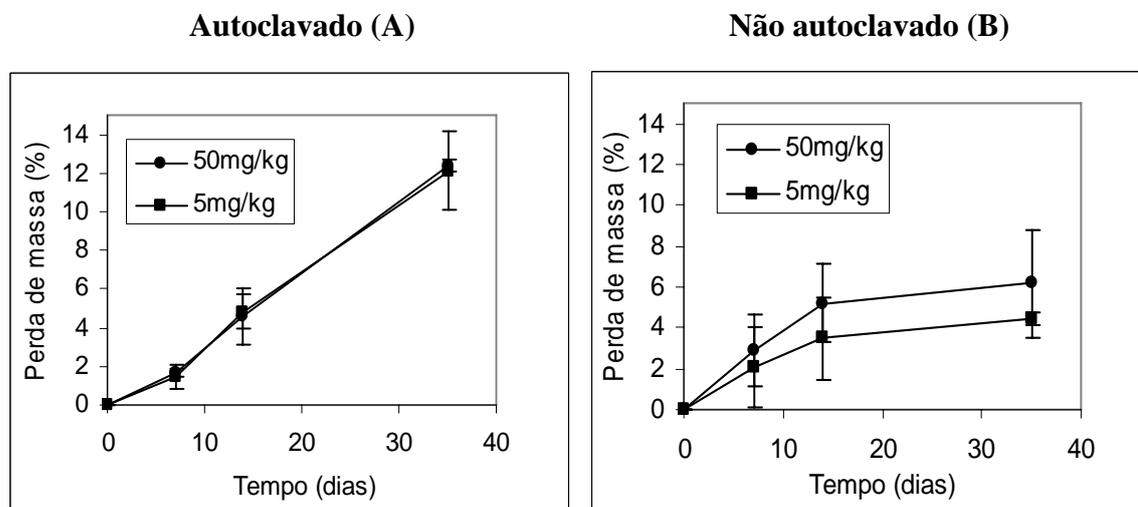


Figura 17 – Perda de massa de cavacos de *E. grandis* em cultivos de *P. chrysosporium* sobre madeira autoclavada (A) ou madeira não autoclavada (B). Cargas de inóculo de 5 e 50 mg de micélio/kg de madeira e suplementação com milhocina (0,5 % m/m em base de madeira seca).

5.3 - Cultivos de *C. subvermispora* em cavacos autoclavados ou não sem a adição de milhocina

Considerando que no primeiro grupo de experimentos *C. subvermispora* não se mostrou apto a competir com contaminantes naturais da madeira de *E. grandis*, um segundo grupo de experimentos foi realizado sem a adição de milhocina, pois nos cultivos anteriores se detectou que os contaminantes não eram fungos degradadores de madeira e, portanto, poderiam estar crescendo a partir do consumo predominante do co-substrato (milhocina).

Os cultivos sem a adição de milhocina foram realizados com cargas de inóculo de 50, 200 e 3000mg de micélio/kg de madeira. Nesse caso, foi realizado somente um experimento controle, com madeira autoclavada e sem a adição de milhocina utilizando uma carga de inóculo de 3000 mg de micélio/kg de madeira.

Novamente os cultivos de *C. subvermispora* com madeira não autoclavada mostraram o crescimento de contaminantes, porém desta vez em menor proporção, pois não havia milhocina, além do aparente não crescimento de *C. subvermispora*. Esse resultado indicou que não só a milhocina serviu de substrato para o crescimento dos contaminantes, mas que também os extrativos e resinas presentes na madeira e nutrientes vindos do próprio inóculo de *C. subvermispora* devem ter servido como substrato para o crescimento inicial desses contaminantes. Com base nesses resultados, os cultivos sobre madeira não autoclavada foram mantidos incubados por um períodos superiores a 28 dias. Nesses casos, mesmo após 60 dias de incubação ainda não se observava micélio de *C. subvermispora* em nenhum cultivo, embora os contaminantes já não fossem tão notórios.

As atividades de enzimas hidrolíticas e oxidativas nesses cultivos, novamente corroboraram as observações visuais. Ou seja, os extratos enzimáticos obtidos desses cultivos não apresentaram atividade de MnP nem diminuição significativa de pH, além de baixas atividades de xilanases (Figura 18). Endocelulases foram detectadas em atividades baixas, similares às observadas nos cultivos com madeira não autoclavada com adição de milhocina

(Figura 19). Os cultivos com madeira autoclavada mostraram novamente o crescimento de *C. subvermispora*. As atividades de enzimas hidrolíticas e oxidativas nesses cultivos foram de forma geral parecidas com os cultivos autoclavados com suplementação de milhocina (Figuras 18 e 19).

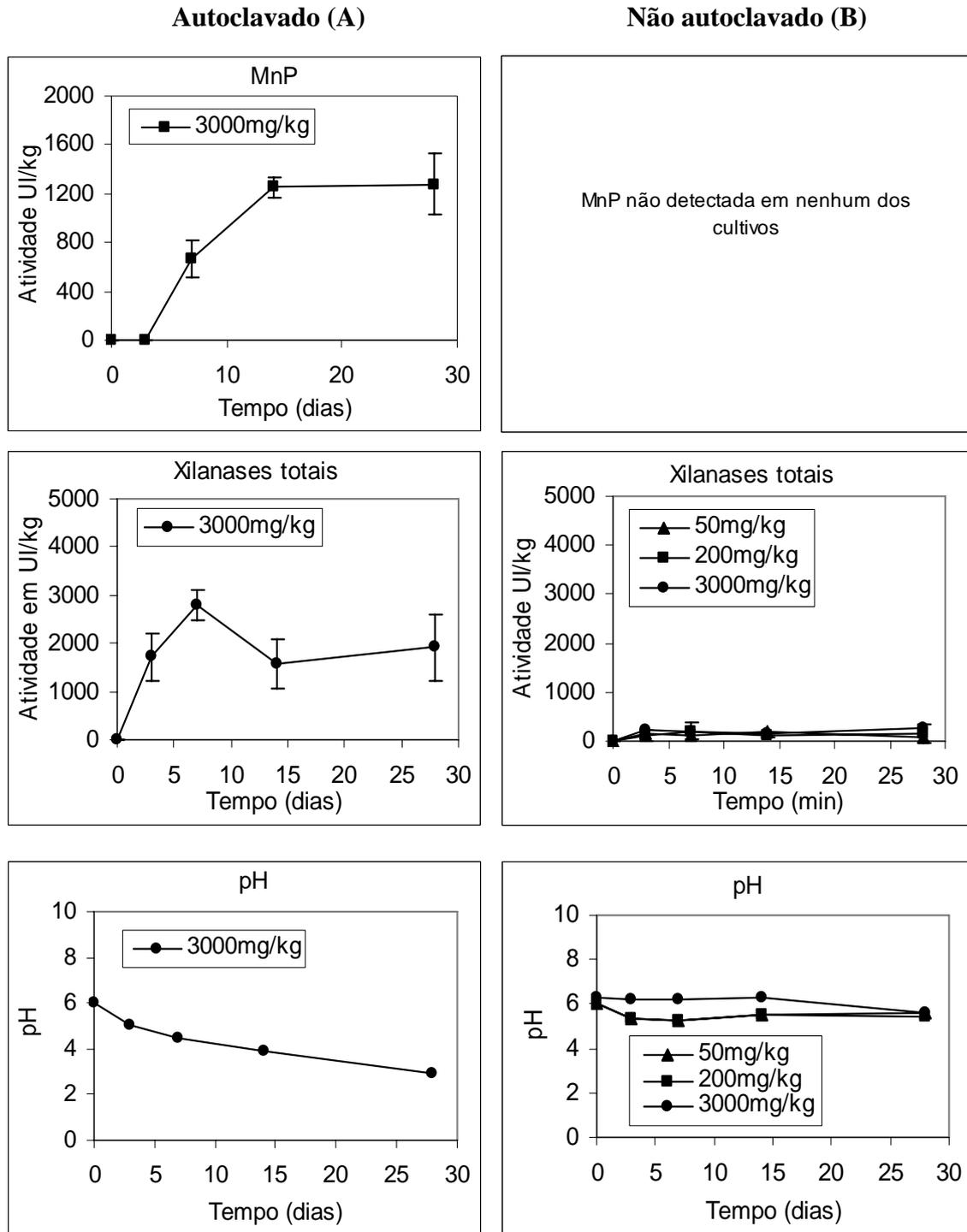


Figura 18 - Atividades de MnP, xilanases e níveis de pH em cultivos de *C. subvermispora* sobre madeira autoclavada (A) e madeira não autoclavada (B). Cargas de inóculo de 50, 200 e 3000mg de micélio/kg de madeira.

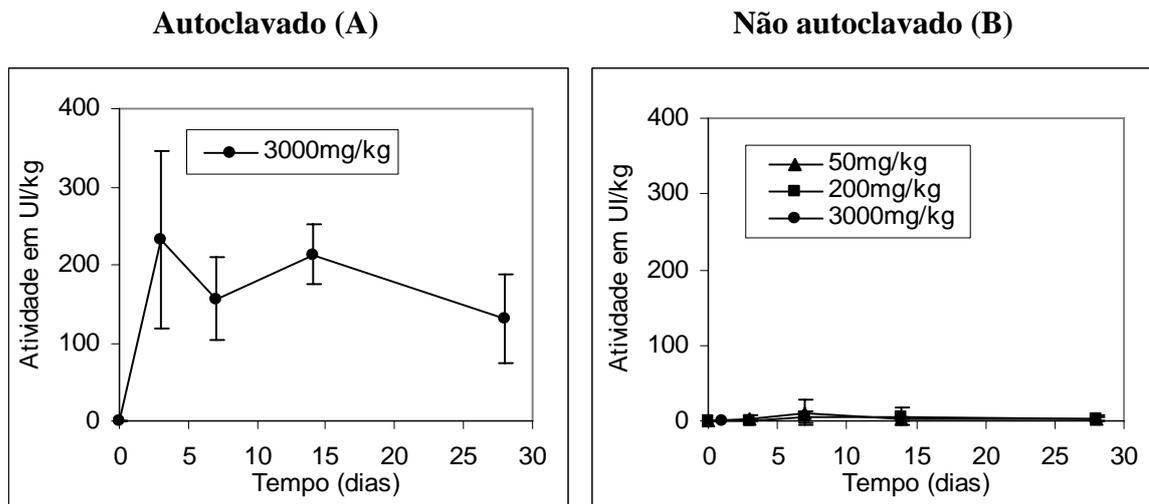


Figura 19 - Atividades de endoglucanases em cultivos de *C. subvermispota* sobre madeira autoclavada (A) e madeira não autoclavada (B). Cargas de inóculo de 50, 200 e 3000mg de micélio/kg de madeira.

Como no caso anterior, a solubilidade em NaOH 1% demonstrou ser também um indicativo da atividade de *C. subvermispota*, porém apenas no 28º dia dos cultivos com madeira autoclavada pode ser verificado o aumento de solubilidade. Os cultivos com madeira não autoclavada mostraram uma solubilidade em soda constante em relação ao controle (Tabela 6).

Tabela 6 – Solubilidade em NaOH 1% de *E. grandis* biodegradado por *C. subvermispota*. Cultivos sobre madeira autoclavada ou madeira não autoclavada e cargas de inóculo de 3000 mg de micélio/kg de madeira.

Tempo de cultivo (dias)	Solubilidade em NaOH 1% (%)	
	madeira autoclavada	madeira não autoclavada
0	10,9 ±0,5 (a)*	10,9±0,5 (a)
3	9,1 ±0,4 (a)	11,50 ±1,03 (a)
7	10,4 ±0,1 (a)	9,6 ±1,4 (a)
14	9,3 ±1,4 (a)	10,6 ±0,6 (a)
28	14,7 ±1,72 (b)	10,4 ±0,6 (a)

(*) Em cada coluna, letras iguais indicam que os valores não diferem com 95% de confiança, letras diferentes indicam valores significativamente diferentes (TESTE DE TUKEY; DANNETT – GRAPHPAD SOFTWARE).

5.4 - Testes em placas de Petri com adição de benomil

Os cultivos de *C. subvermispora* sobre madeira não autoclavada apresentaram o crescimento de contaminantes que aparentemente impediram o desenvolvimento de *C. subvermispora* dentro dos períodos desejados para um processo de biopolpação (que não deveriam ultrapassar a 35 dias). No entanto, amostras de madeiras inoculadas em uma planta piloto de biopolpação instalada na empresa Melhoramentos Papéis que sofreram forte contaminação e foram posteriormente armazenadas em biorreatores por períodos de até 6 meses, mostraram o crescimento de *C. subvermispora* e a completa colonização dos cavacos (FERRAZ A., dados não publicados). Essa observação indica que os contaminantes competem com *C. subvermispora* por nutrientes de fácil assimilação (como a milhocina ou os extrativos da madeira), mas não causam a morte do micélio inicialmente inoculado. Para comprovar esse dado, mas avaliando tempos curtos de biotratamento, cavacos que foram inoculados com *C. subvermispora* e sofreram forte contaminação posterior, foram inoculados sobre um meio nutritivo adicionado de um inibidor de crescimento de Ascomicetos (o antibiótico benomil) (SCORE *et al.*, 1998). Para isso, alguns cavacos inoculados com *C. subvermispora* em condições não assépticas (madeira não autoclavada), onde foi detectada a presença de contaminantes (28 dias de cultivo), foram incubados em placas de Petri suplementadas com 4 ppm de benomil. Os resultados mostraram que após 7 dias de incubação houve crescimento de *C. subvermispora* e inibição dos contaminantes na maioria das placas testadas (Figura 20). Isso indica que o inóculo de *C. subvermispora* ainda se encontrava em condições de crescimento. Como o benomil presente nos cultivos inibiu o crescimento dos contaminantes, *C. subvermispora* pode se desenvolver. Esses resultados sugerem que num cultivo onde co-existam *C. subvermispora* e contaminantes, os contaminantes devem prevalecer por apresentarem maior velocidade de consumo de substrato ou mesmo por produzirem algum tipo de antibiose. Dados semelhantes foram reportados na avaliação da competição entre *Trichoderma aureoviride* e Basidiomycetes como *Neolentinus lepideus*,

Gloeophyllum trabeum, *Serpula lacrymans* e *Trametes versicolor* (BRUCE; AUSTIN; KING, 1984, BRUCE *et al.*, 1995b; BRUCE; KUNDZEWICZ; WHEATLEY, 1996; BRUCE *et al.*, 2000; WHEATLEY *et al.*, 1997; SCORE *et al.*, 1998). Recentemente, Souza-Cruz (2005) também avaliou a competição de *C. subvermispota* com alguns contaminantes isolados do processo de biopolpação. Nesse estudo os micélios de cada fungo foram confrontados em placas de Petri contendo meio nutritivo. Nesse caso, a principal interação entre os micélios foi a de sobreposição, indicando que não deve ter havido antibiose ou parasitismo causados pelos contaminantes. Nota-se, porém que interações em placas de Petri suplementadas (meio homogêneo) não são necessariamente reprodutivas em cultivos com cavacos de madeira (meio heterogêneo) (BODDY, 2000).

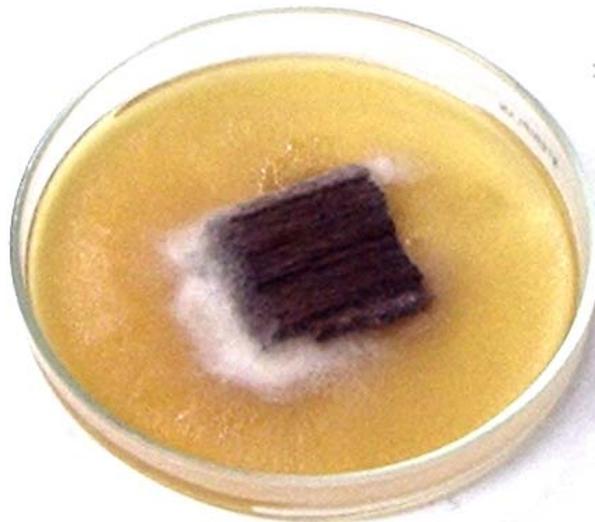


Figura 20 – Placa de Petri cultivada por 7 dias contendo meio batata-dextrose/extrato de levedura, 4 ppm de benomil e um cavaco de *E. grandis* proveniente de um cultivo (28 dias) contaminado que recebeu inóculo de *C. subvermispota* na carga de 500 mg de micélio/kg de madeira. O micélio branco crescendo a partir do cavaco apresenta as características típicas de *C. subvermispota*.

5.5 - Cultivos de *C. subvermispota* em cavacos lavados com ácido sem a adição de milhocina

Os experimentos anteriores indicaram que *C. subvermispota* não foi capaz de colonizar cavacos não autoclavados de *E. grandis*, mesmo usando carga de inóculo bastante

elevada de 3000mg de micélio/kg de madeira, ao contrário do que ocorreu com *P. chrysosporium*, que foi capaz de colonizar cavacos não autoclavados. Desta forma, um novo grupo de experimentos foi realizado para avaliar uma etapa de descontaminação dos cavacos que tomou como base o tratamento da madeira com uma solução de ácido sulfúrico pH=2,5 a 80°C por 1 hora. (tratamento denominado para fins práticos como "lavado ácido"). Esse tipo de lavado ácido tem sido introduzido na indústria de celulose e papel com um outro objetivo que é o de remover metais da madeira e facilitar etapas posteriores de recirculação de água dentro do processo industrial (LUNDQVIST *et al.*, 2005). Num primeiro grupo de experimentos, os cavacos lavados com ácido foram inoculados com cargas de 3000, 200 e 50 mg de micélio/kg de madeira sem a adição de milhocina. Cultivos controle com madeira lavada com ácido e autoclavada foram realizados somente na carga máxima de inóculo de 3000 mg de micélio/kg de madeira.

Nos cultivos com madeira lavada com ácido não autoclavada foi observado o crescimento de contaminantes em pequenas proporções a partir de 15 dias de biodegradação, porém, nesse caso foi verificado também o crescimento de *C. subvermispora* e a concomitante descoloração dos cavacos de *E. grandis*. A lavagem com ácido provavelmente provocou a remoção parcial de extrativos e resinas que são essenciais para o desenvolvimento dos contaminantes, que desta forma acabaram não encontrando substrato disponível para o seu crescimento. A lavagem com ácido a 80°C por 1 h também deve ter provocado a morte de parte dos esporos dos contaminantes inicialmente presentes na madeira. A atividade metabólica de *C. subvermispora*, monitorada a partir da secreção de enzimas e de ácidos orgânicos indicou o acúmulo de MnP e xilanases além do decréscimo do pH ao longo do período de biodegradação, tanto nos cultivos com madeira lavada com ácido e autoclavada como nos cultivos com madeira lavada com ácido e não autoclavada. No entanto, o metabolismo observado foi diferente dos padrões observados anteriormente com madeira

autoclavada (Figuras 21 e 18, respectivamente). A lavagem com ácido pode provocar a lixiviação dos cavacos removendo íons metálicos (LUNDQVIST *et al.*, 2005). Entre os metais removidos pode estar o Manganês que é essencial para a síntese de MnP (MANUBENS *et al.*, 2003). A remoção parcial de metais da madeira poderia ter afetado o metabolismo do fungo e isso justificaria níveis diferenciados de atividades enzimáticas quando se comparam os experimentos com madeira autoclavada (Figura 18) e madeira lavada com ácido (Figura 21), embora nas duas situações tenham sido observados o crescimento de *C. subvermispora* e a descoloração dos cavacos.

Outro indicativo de que a atividade degradadora de *C. subvermispora* sobre madeira lavada com ácido e não autoclavada e madeira lavada com ácido e autoclavada foi semelhante é obtido a partir da comparação das atividades de lacases e endoglucanases e perdas de massa de madeira ocorridas durante a biodegradação (Figura 22 e 23, respectivamente). Em ambos experimentos, as perdas de massa foram crescentes com os períodos de biodegradação e atingiram valores de 4 a 5%.

Lavado com ácido e autoclavado (A) **Lavado com ácido e não autoclavado (B)**

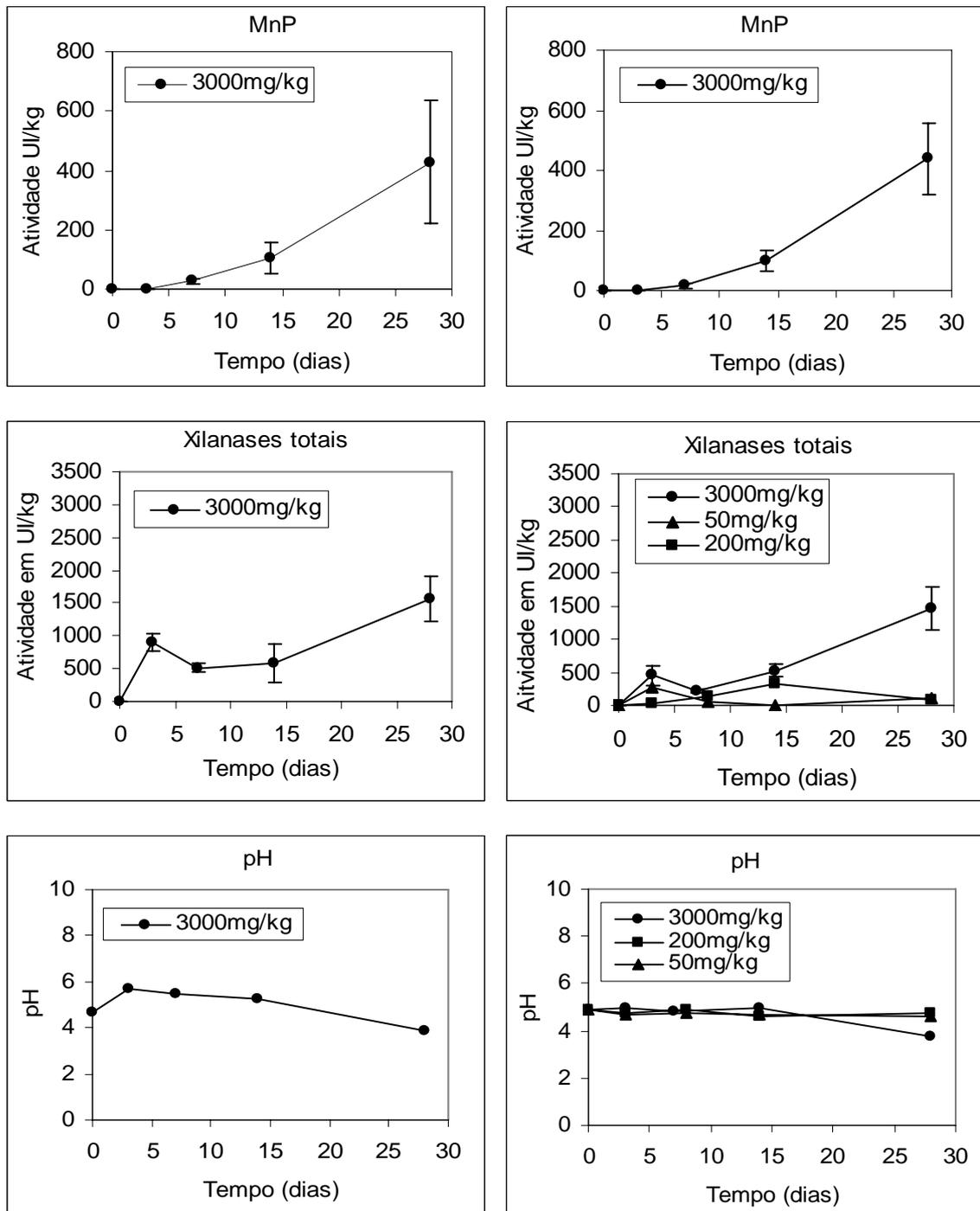


Figura 21 - Atividades de MnP, xilanases e níveis de pH em cultivos de *C. subvermispora* sobre madeira lavada com ácido e autoclavada (A) e madeira lavada com ácido, porém não autoclavada (B). Cargas de inóculo de 50, 200 e 3000mg de micélio/kg de madeira.

(*) Nos cultivos sobre madeira lavada com ácido e não autoclavada, as atividades de MnP foram detectadas somente nos experimentos cuja carga de inóculo foi de 3000mg de micélio/kg de madeira. Nos experimentos com menor carga de inóculo os níveis de MnP estiveram abaixo do limite detectável.

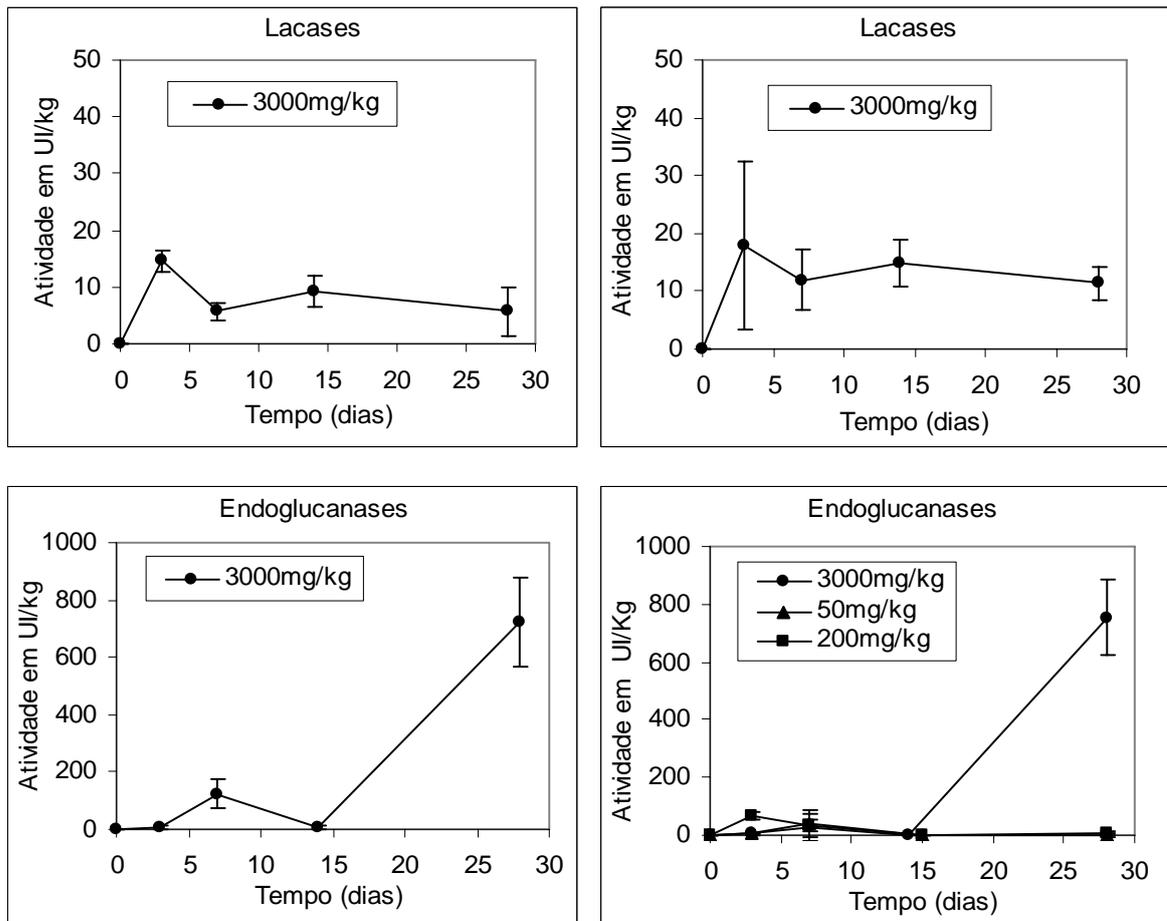
Lavado com ácido e autoclavado (A)**Lavado com ácido e não autoclavado (B)**

Figura 22 - Atividades de endocelulases e lacases em cultivos de *C. subvermispora* sobre madeira lavada com ácido e autoclavada (A) e madeira lavada com ácido, porém não autoclavada (B). Cargas de inóculo de 50, 200 e 3000mg de micélio/kg de madeira.

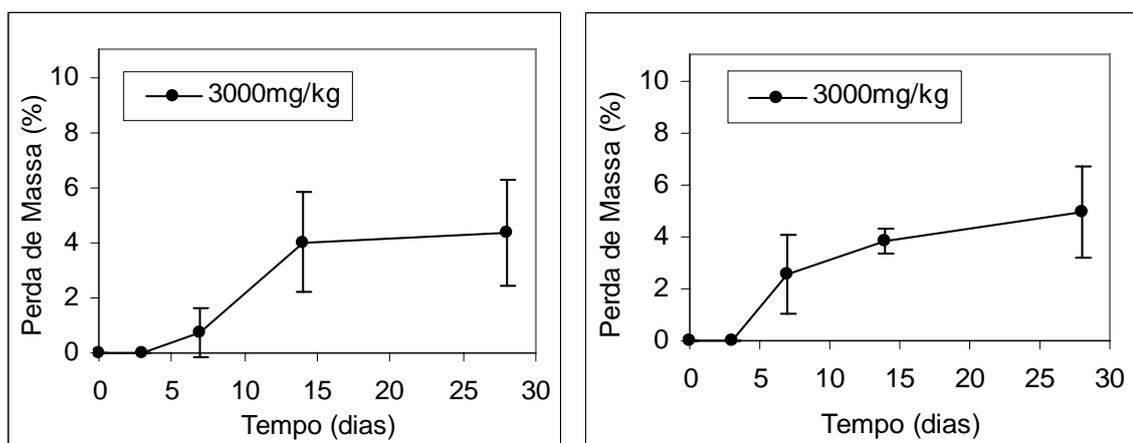
Lavado com ácido e autoclavado (A)**Lavado com ácido e não autoclavado (B)**

Figura 23 - Perda de massa de cavacos de *E. grandis* em cultivos de *C. subvermispora* sobre madeira lavada com ácido e autoclavada (A) ou madeira lavada com ácido e não autoclavada (B). Cargas de inóculo de 3000 mg de micélio/kg de madeira.

A solubilidade em NaOH 1% nos cultivos sobre madeira lavada com ácido, autoclavada ou não (carga de 3000mg de micélio/kg madeira), mostrou valores iguais aos observados para a madeira não biotratada, mesmo após 28 dias de cultivo (Tabela 7). O resultado mostra que provavelmente a fermentação com madeira lavada não atingiu um nível necessário para o aumento da solubilidade em NaOH 1%, ou seja, a lignina e a hemicelulose não foram despolimerizadas o suficiente para tal efeito.

Tabela 7 – Solubilidade em NaOH 1% de *E. grandis* biodegradado por *C. subvermispota*. Cultivos sobre madeira lavada com ácido e autoclavada ou madeira lavada com ácido e não autoclavada e cargas de inóculo de 3000 mg de micélio/kg de madeira.

Tempo de cultivo (dias)	Solubilidade em NaOH 1% (%)	
	madeira lavada com ácido e autoclavada	madeira lavada com ácido e não autoclavada
0	10,9 ± 0,5 (a)*	10,9 ± 0,5 (a)
3	9 ± 3 (a)	11 ± 3(a)
7	11 ± 2 (a)	10 ± 2 (a)
14	11 ± 3 (a)	11,6 ± 0,5 (a)
28	7 ± 1 (a)	10 ± 1 (a)

(*) Em cada coluna, letras iguais indicam que os valores não diferem com 95% de confiança, letras diferentes indicam valores significativamente diferentes (TESTE DE TUKEY; DANNETT – GRAPHPAD SOFTWARE).

5.6 - Cultivos de *C. subvermispota* sobre cavacos lavados com ácido com a adição de milhocina

O segundo grupo desses experimentos com cavacos lavados com ácido foi realizado com uma carga de 5 e 50mg de micélio/kg de madeira com adição de milhocina. Neste caso não houve cultivos controles. Logo no início da biodegradação pode ser notada a presença de contaminantes, que se desenvolveram devido à presença de milhocina. Também pode ser notada a presença de *C. subvermispota*, e uma pequena descoloração de alguns cavacos de *E. grandis* em 28 dias de cultivo, não alcançando níveis semelhantes aos observados nos cultivos sem milhocina com carga de 3000mg de micélio/kg madeira, mas superando os cultivos com

cargas de 50 e 200mg de micélio/kg de madeira sem milhocina. Esse experimento demonstrou que os contaminantes realmente não foram eliminados totalmente (seja arrastados no lavado ou mortos com o tratamento térmico).

O estudo da atividade metabólica de *C. subvermispora* revelou atividades de xilanases totais e uma pequena atividade de MnP ao longo dos 28 dias de cultivo. Os cultivos mostraram uma pequena atividade de MnP (na carga 5mg de micélio/kg madeira = 80 UI/kg \pm 19 e na carga de 50mg de micélio/kg madeira = 22,5 UI/kg \pm 5) apenas no 28º dia de biodegradação. O pH dos cultivos também permaneceu praticamente constante com valores próximos do inicial que era de 4,8. No entanto, as atividades de xilanases totais foram crescentes ao longo do tempo de biodegradação e se assemelharam aos níveis detectados nos cultivos com madeira lavada com ácido sem a adição de milhocina inoculadas com 50 e 200 mg de micélio/kg de madeira (Figuras 24 e 21, respectivamente).

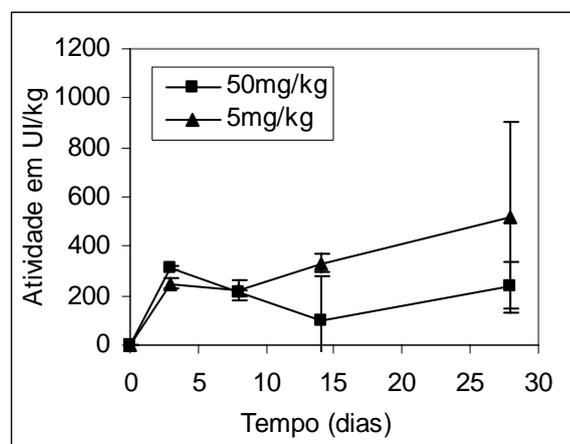


Figura 24 - Atividades de xilanases em cultivos de *C. subvermispora* sobre madeira lavada com ácido, porém não autoclavada com cargas de inóculo de 5 e 50 mg de micélio/kg de madeira e suplementação com milhocina (0,5 % m/m em base de madeira seca).

As atividades de lacases também foram extremamente baixas. Nos cultivos com carga de 50mg de micélio/kg de madeira foi observado uma atividade de $1,4 \pm 0,4$ UI/kg de madeira apenas no 14º dia de biodegradação e nos cultivos com carga de 5mg de micélio/kg de madeira foram detectadas atividades máximas de 3 ± 2 UI/kg de madeira no 28º dia de

biodegradação. As atividades de endocelulases também foram bastante baixas, atingindo 90 UI/kg de madeira no 28º dia de cultivo com carga de inóculo de 5 mg de micélio/kg de madeira.

5.7 - Experimentos de biodegradação utilizando um lote diferenciado de cavacos de *E. grandis*

Uma vez que várias situações de cultivo com *C. subvermispora* e *P. chrysosporium* haviam sido avaliadas, um novo grupo de experimentos foi iniciado com a finalidade de preparar amostras biotratadas para experimentos posteriores de polpação. Para esse grupo de experimentos foi empregado um novo lote de cavacos de *E. grandis* que tinha origem e data de coleta diferentes do lote estudado até o momento. Os experimentos foram realizados com madeira lavada com ácido e não autoclavada com e sem a adição de milhocina, além de ter sido incluído um experimento controle extra que avaliou uma amostra de madeira lavada somente com água nas mesmas condições do lavado ácido (80 °C/1h). Nesse grupo de experimentos não foi observado o crescimento de contaminantes em nenhuma das condições avaliadas, mesmo nas que continham milhocina, o que difere do observado anteriormente nos cultivos de *C. subvermispora* suplementados com milhocina. Também foi notada a presença de micélio de *C. subvermispora* e a concomitante descoloração dos cavacos de *E. grandis*. Os resultados para as atividades enzimáticas observadas nesses cultivos estão mostrados somente para o tempo de cultivo de 28 dias (Tabela 8). As atividades metabólicas observadas nos 3 tipos de cultivo indicam que quando havia milhocina, as atividades de MnP foram significativamente maiores, o que novamente difere do observado anteriormente, pois nos cultivos anteriores suplementados com milhocina, além de se observar o crescimento de contaminantes, também se observava atividade metabólica de *C. subvermispora* muito baixa. Esse grupo de resultados reforça a observação que diferentes lotes de madeira, mesmo de uma mesma espécie, podem apresentar níveis iniciais de contaminação diferentes e dessa forma influenciarem na habilidade do fungo de interesse em colonizar os cavacos em questão.

Tabela 8 - Atividades enzimáticas, pH e solubilidade em NaOH 1% detectados em cultivos de *C. subvermispora* sobre madeira de *E. grandis* após 28 dias de cultivo.

Atividade enzimática (UI/kg), pH e solubilidade em NaOH 1%	Tipo de cultivo		
	Madeira lavada com ácido suplementada de milhocina *	Madeira lavada com ácido não suplementada de milhocina **	Madeira lavada com água não suplementada de milhocina **
MnP (UI/kg)	737 ± 153	102 ± 28	168 ± 60
Xilanase (UI/kg)	1262 ± 461	863 ± 125	563 ± 285
Endoglucanase (UI/kg)	355 ± 82	98 ± 26	203 ± 48
Lacase (UI/kg)	21 ± 4	9 ± 2	8 ± 2
pH	3	3	3,1
Sol. em NaOH (%)	14 ± 1	11,1 ± 0,7	13,1 ± 0,2

(*) Carga de inóculo de 5 mg de micélio/kg de madeira

(**) Carga de inóculo de 500 mg de micélio/kg de madeira

(***) Solubilidade média do controle em NaOH = 10,9 ± 0,5 %

Outro dado importante obtido nesse grupo de experimentos se refere às pequenas diferenças observadas nos cultivos sobre madeira lavada com ácido e lavada somente com água nas mesmas condições. Nesses 2 cultivos, as atividades metabólicas foram bastante parecidas (Tabela 8) e também o foram as perdas de massa e as solubilidades em NaOH 1% (Figura 25 e Tabela 9, respectivamente). Esses dados analisados em conjunto indicam que o principal efeito do lavado ácido foi efetivamente o tratamento térmico dos cavacos a 80 °C por 1 hora somado ao efeito de lixiviação e não o efeito do pH, pois mesmo um lavado com água em pH 6,0 proporcionou resultados semelhantes aos observados para o lavado ácido.

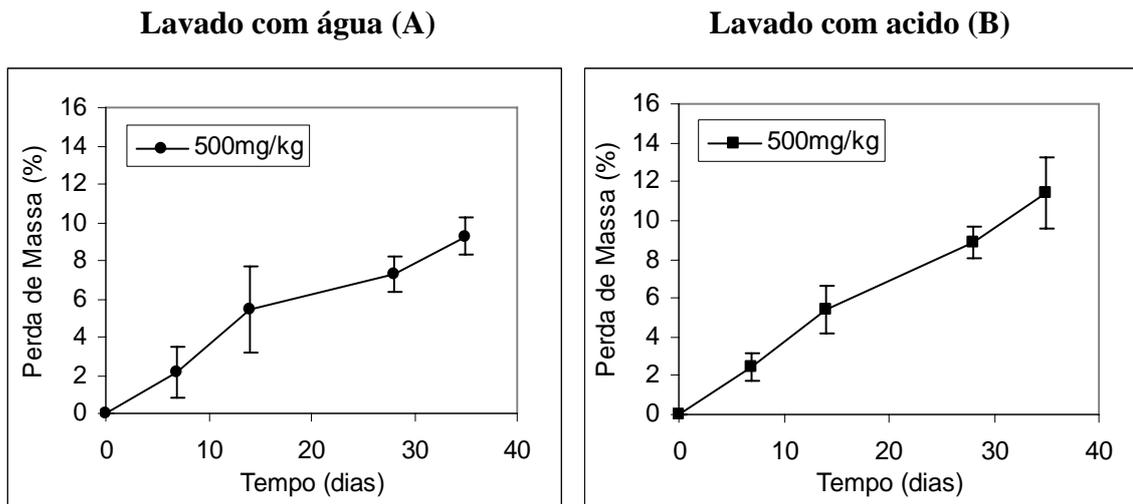


Figura 25 – Perda de massa de cavacos de *E. grandis* em cultivos de *C. subvermispora* sobre madeira lavada com ácido (B) ou lavada com água (A). Cargas de inóculo de 500 mg de micélio/kg de madeira.

Tabela 9 – Solubilidade em NaOH 1% de *E. grandis* biodegradado por *C. subvermispora*. Cultivos sobre madeira lavada com ácido ou madeira lavada com água e cargas de inóculo de 500 mg de micélio/kg de madeira.

Tempo de cultivo (dias)	Solubilidade em NaOH 1% (%)	
	madeira lavada com ácido	madeira lavada com água
0	10,9 ± 0,5 (a)*	10,9 ± 0,5 (a)
7	10,0 ± 0,3 (a)	11 ± 1 (a)
14	10,7 ± 0,7 (a)	11,3 ± 0,9 (a)
28	11,1 ± 0,7 (a)	13,1 ± 0,2 (b)
35	13 ± 1 (b)	14,0 ± 0,3 (b)

(*) Em cada coluna, letras iguais indicam que os valores não diferem com 95% de confiança, letras diferentes indicam valores significativamente diferentes (TESTE DE TUKEY; DANNETT – GRAPHPAD SOFTWARE).

5.8 - Cultivos selecionados para a etapa de polpação quimiomecânica

Dentre os vários experimentos realizados anteriormente, um grupo de amostras biotratadas foi selecionada para a etapa de polpação quimiomecânica (CMP). A seleção de amostras foi feita levando em consideração os cultivos onde houve crescimento do fungo de interesse (*C. subvermispora* e *P. chrysosporium*) e pouco ou nenhum crescimento de contaminantes. Nesses casos se detectou ao menos alguma atividade metabólica ou

degradadora característica dos basidiomicetos em estudo. As amostras selecionadas são listadas na tabela 10. Polpações com madeira "controle" também foram realizadas para refletir a resposta do material não biotratado em cada situação avaliada.

Tabela 10 – Amostras biotratadas selecionadas para os ensaios de polpação quimiomecânica.

Amostras	Fungo	Carga de inóculo (mg/kg)	Milhocina	Tempo de cultivo (dias)
Madeira autoclavada	<i>C. subvermispora</i>	5	SIM	28
Madeira autoclavada	<i>C. subvermispora</i>	500	NÃO	28
Madeira lavada com ácido e não autoclavada	<i>C. subvermispora</i>	5	SIM	28
Madeira lavada com ácido e não autoclavada	<i>C. subvermispora</i>	500	NÃO	28
Madeira autoclavada	<i>P. chrysosporium</i>	5	SIM	15 e 28
Madeira não autoclavada	<i>P. chrysosporium</i>	5	SIM	28

A eficiência de um processo de polpação quimiomecânica pode ser avaliada a partir da facilidade de refinamento dos cavacos pré-digeridos, bem como pela qualidade dos papéis preparados a partir das fibras obtidas (BIERMANN, 1993). Em um experimento típico, os cavacos pré-digeridos com sulfito alcalino foram refinados por tempos progressivos variando entre 60 e 220 min e o grau de fibrilação obtido foi estimado através da determinação do índice de Schopper-Riegler (Figura 26A).

Uma amostra de madeira que sofreu um biotratamento eficiente para os objetivos da biopolpação, refina mais facilmente que um controle não biotratado (AKHTAR *et al.*, 1998). No caso das amostras provenientes de cultivos com *C. subvermispora* sobre madeira autoclavada, essa facilidade de refinamento foi observada conforme mostra a Figura 26A. Nota-se que para qualquer tempo de refinamento estudado, as amostras biotratadas geram polpas com maior grau de fibrilação, ou ainda, quando se avalia as polpas preparadas a um mesmo grau de fibrilação, pode-se observar que as amostras biotratadas demandam menor

tempo de refinamento, o que poderia gerar uma economia de energia no processo de obtenção das polpas bio-quimiomecânicas, corroborando dados já publicados (AKHTAR *et al.*, 1998; GUERRA; MENDONÇA; FERRAZ, 2005).

As propriedades mecânicas das polpas produzidas são mostradas nas figuras 26B-D. Pode-se notar que tanto os índices de resistência à tração como o rasgo são semelhantes nas amostras controle e biotratadas. Uma exceção poderia ser feita aos índices de resistência à tração das amostras biotratadas em cultivos suplementados com milhocina, cujos valores foram levemente inferiores aos observados para as outras amostras. Uma forma comumente utilizada para comparar a qualidade de polpas celulósicas é a verificação de curvas de resistência à tração em função da resistência ao rasgo como ilustrado na figura 26D. Nessa abordagem, usualmente quanto melhor a resistência mecânica da polpa, mais acima no gráfico estará a curva com os dados experimentais (BIERMANN, 1993). A partir dos dados da figura 26D fica claro, portanto, que não deve haver diferenças significativas entre as polpas obtidas do controle e das amostras biotratadas nos dois sistemas de cultivo avaliados.

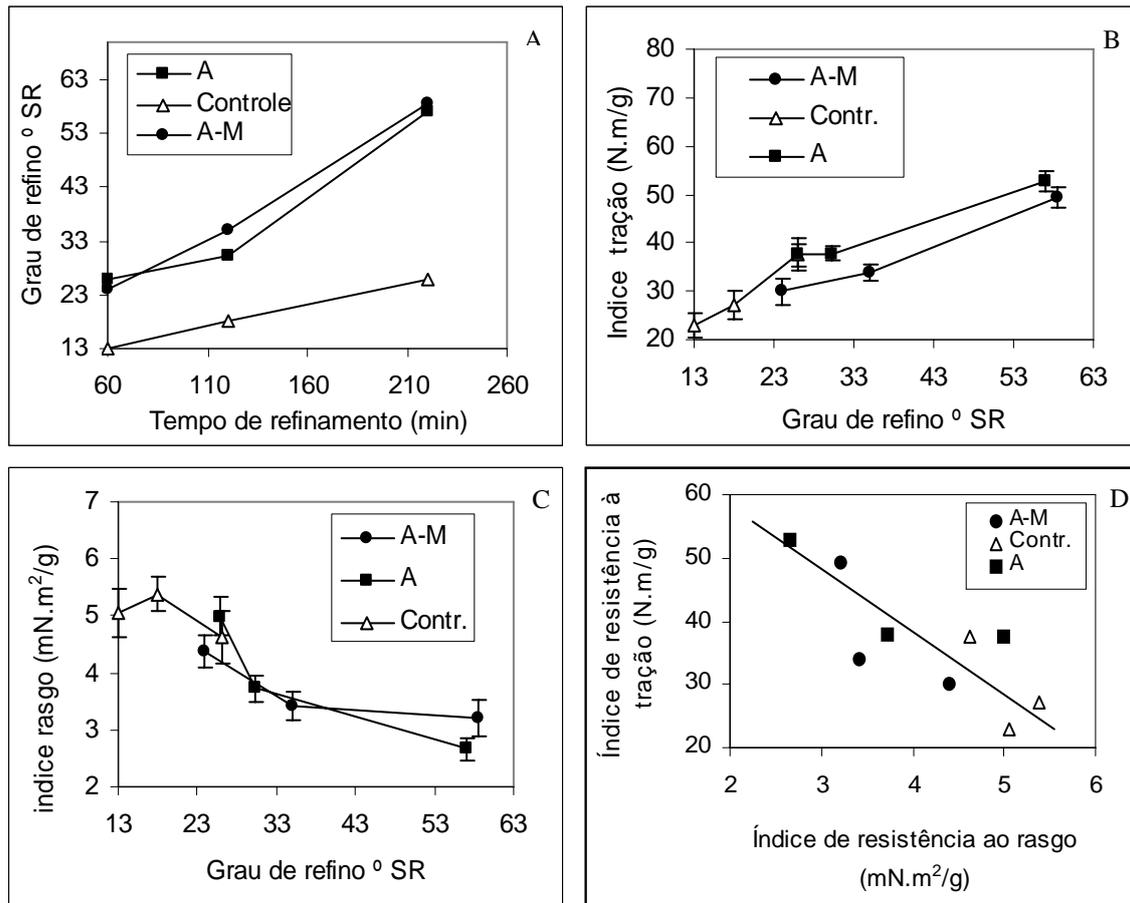


Fig 26. Curvas de refinamento de cavacos de *E. grandis* pré-digeridos com sulfito alcalino (A) e resistência dos papéis preparados a partir das fibras obtidas frente aos esforços de tração (B), rasgo (C) e tração versus rasgo (D). As diferentes curvas indicam os resultados para a madeira controle autoclavado (Controle), madeira autoclavada e biotratada em cultivos suplementados com milhocina e inóculo de 5 mg de micélio/kg madeira (A-M) e madeira autoclavada e biotratada em cultivos não suplementados e inóculo de 500 mg de micélio/kg madeira (A).

As amostras biotratadas por *C. subvermispora* provenientes de cultivos com cavacos previamente submetidos a uma etapa de lavagem com ácido foram avaliadas frente à polpação quimiomecânica conforme mostra a Figura 27. Nesse caso, a polpa controle foi obtida a partir de madeira lavada com ácido (Controle LA). A lavagem dos cavacos com ácido, por si, facilitou levemente o processo posterior de polpação quimiomecânico visto que a fibrilação desse controle atingiu 31 °SR contra 26 °SR para o controle autoclavado (Figuras 27A e 26A, respectivamente). Os cultivos sobre madeira lavada com ácido proporcionaram amostras biotratadas que facilitaram a polpação quimiomecânica de forma semelhante ao observado

com madeiras autoclavadas, conforme mostrado na Figura 27. Novamente, os cultivos adicionados de milhocina com menor carga de inóculo apresentaram benefícios semelhantes aos observados nos cultivos sem a adição de milhocina com maior carga de inóculo.

As propriedades mecânicas das biopolpas preparadas a partir da madeira lavada com ácido estão sumarizadas na Figura 27B. Pode-se observar que somente o lavado ácido (controle LA) proporcionou polpas com índices de resistência ao rasgo levemente inferiores aos observados na madeira controle autoclavada (Figuras 26D e 27B, respectivamente). Isso poderia ser atribuído a certa degradação dos polissacarídeos ocorrida durante a etapa de lavagem com ácido. As polpas obtidas a partir das amostras biotratadas, apresentaram qualidade levemente superior ao controle LA, visto que para um mesmo índice de rasgo se obtém maiores índices de resistência à tração.

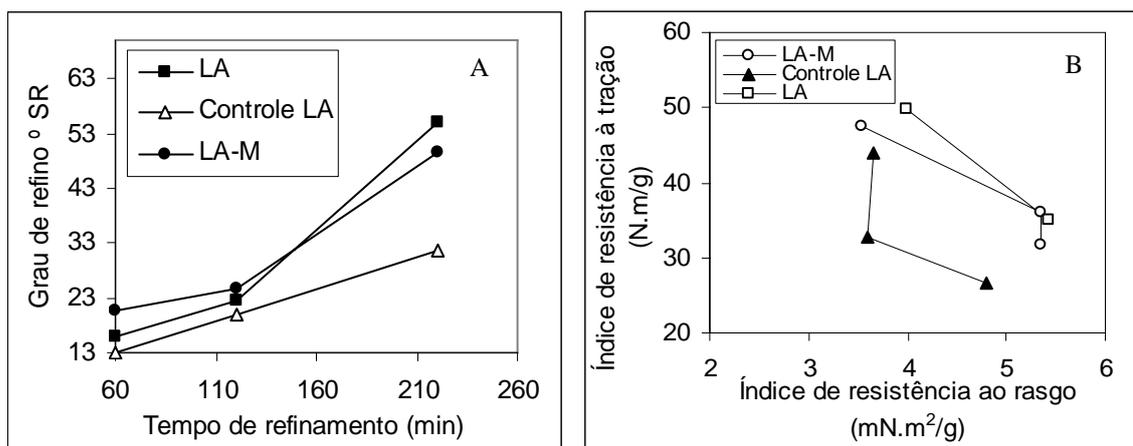


Fig 27. Curvas de refinamento de cavacos de *E. grandis* pré-digeridos com sulfito alcalino (A) e resistência dos papéis preparados a partir das fibras obtidas e avaliadas pelo gráfico de resistência à tração versus rasgo (B). As diferentes curvas indicam os resultados para a madeira controle lavado com ácido (controle LA), madeira lavada com ácido e biotratada com 500 mg de micélio/kg madeira (LA) e madeira lavada com ácido e biotratada em cultivos suplementados com milhocina e inóculo de 5 mg de micélio/kg madeira (LA-M).

Em síntese, o biotratamento por 28 dias de cavacos autoclavados facilitou enormemente o refinamento mecânico, porém não proporcionou ganhos expressivos na resistência mecânica das polpas. A princípio, esses dados podem ser comparados com os reportados recentemente por Guerra; Mendonça; Ferraz, (2005) que avaliaram a polpação

quimiomecânica de *E. grandis* biotratado por 15 dias com *C. subvermispora* (cultivos que utilizaram madeira autoclavada inoculada com cavacos pré-colonizados pelo fungo). O biotratamento por 15 dias proporcionou uma pequena facilitação do refinamento mecânico (menor que os observados nessa dissertação), porém as biopolpas mostraram índices de resistência à tração e ao rasgo até 25% maiores que os índices observados nas polpas de controles não tratados. Ou seja, tudo indica que os benefícios obtidos podem ser função do tempo de biotratamento onde biotratamentos por tempos mais prolongados melhoram a resposta frente ao refinamento, porém não geram polpas com resistência mecânica superiores. Esse fato deve ser considerado no momento de otimizar os tempos de biotratamento. Por exemplo, empresas com processos de obtenção das polpas bio-quimiomecânicas que necessitem de aumento de produção e/ou economia de energia para a produção de polpas com as mesmas propriedades ópticas-mecânicas, deveriam usar cavacos biotratados por tempos mais longos. Já no caso de empresas que necessitem de melhoria das propriedades mecânicas das polpas, os tempos de biotratamento devem ser mais curtos.

No caso das amostras biotratadas com *P. chrysosporium*, foram avaliadas polpas quimiomecânicas obtidas a partir de um controle autoclavado e de amostras autoclavadas e biotratadas por 15 e 28 dias, além de amostras não autoclavadas biotratadas por 28 dias (Figuras 28, 29, 30 e 31). Pode-se notar que as amostras de madeira autoclavada e biotratada por 15 e 28 dias refinaram mais facilmente que o controle, porém as amostras biotratadas por um período mais longo (28 dias) proporcionaram menores benefícios que os observados num período mais curto de biotratamento. Já a polpa proveniente de madeira não autoclavada e biotratada por 28 dias, mostrou uma curva de refino semelhante à do controle com algum benefício observável somente em tempos prolongados de refino (26 °SR e 30 °SR em 220 min, respectivamente) (Figura 28).

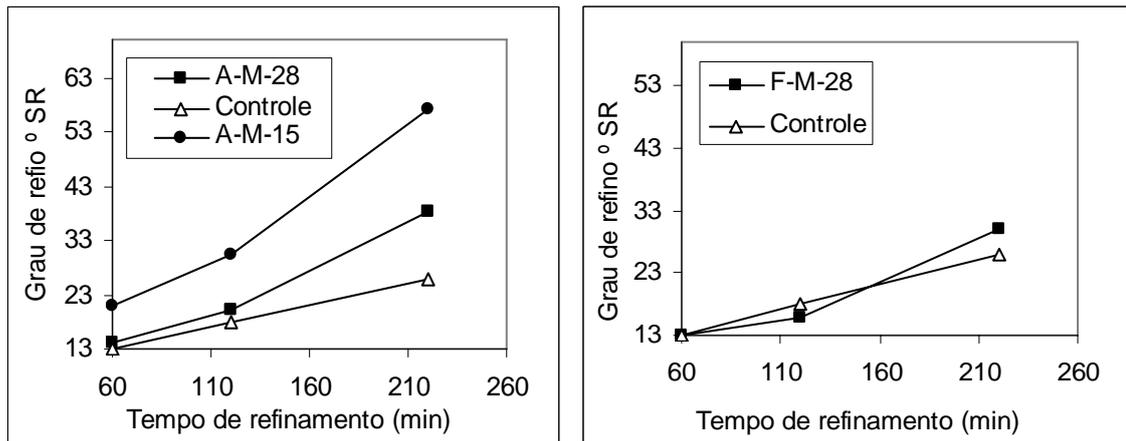


Figura 28 – Curvas de refinamento de cavacos de *E. grandis* pré-digeridos com sulfito alcalino. As diferentes curvas indicam os resultados para a madeira controle autoclavado (Controle), madeira autoclavada e biotratada por *P. chrysosporium* em cultivos suplementados com milho e inóculo de 5 mg de micélio/kg madeira por 15 e 28 dias (A-M-15 e A-M-28, respectivamente) e madeira não autoclavada e biotratada por *P. chrysosporium* em cultivos suplementados com milho e inóculo de 5 mg de micélio/kg madeira por 28 dias (F-M-28).

Os índices de resistência à tração das amostras autoclavadas e biotratadas por 15 dias foram superiores ao controle (45 N.m/g e 38 N.m/g, respectivamente para 26 °SR ou 18,4% de aumento). No caso da amostra autoclavada e biotratada por 28 dias houve uma queda no índice de resistência à tração após 120 min de refinamento em relação ao controle (34 N.m/g e 38 N.m/g, respectivamente para 26 °SR ou 10% de redução). Para as amostras biotratadas com cavacos não autoclavados, o índice de resistência à tração aumentou em relação ao controle (50 N.m/g e 38 N.m/g, respectivamente para 26 °SR ou 31% de aumento) (Figura 29).

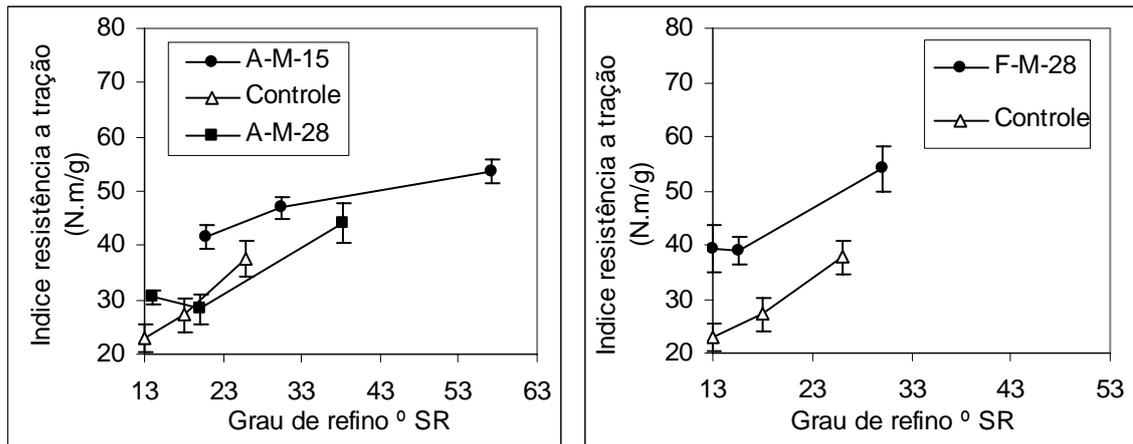


Figura 29 – Índice de resistência à tração de polpas preparadas a partir de cavacos de *E. grandis* pré-digeridos com sulfito alcalino. As diferentes curvas indicam os resultados para a madeira controle autoclavado (Controle), madeira autoclavada e biotratada por *P. chrysosporium* em cultivos suplementados com milhocina e inóculo de 5 mg de micélio/kg madeira por 15 e 28 dias (A-M-15 e A-M-28, respectivamente) e madeira não autoclavada e biotratada por *P. chrysosporium* em cultivos suplementados com milhocina e inóculo de 5 mg de micélio/kg madeira por 28 dias (F-M-28).

Os índices de resistência ao rasgo das amostras autoclavadas e biotratadas por 15 dias também foram superiores ao controle (5,2 mN.m²/g e 4,6 mN.m²/g, respectivamente para 26 °SR ou 13% de aumento). No caso da amostra autoclavada e biotratada por 28 dias houve uma queda no índice de rasgo após 120 min de refinamento em relação ao controle (4mN.m²/g e 4,6 mN.m²/g, respectivamente para 26 °SR ou 10% de redução). Para as amostras biotratadas com cavacos não autoclavados também foi verificado aumento no índice de resistência ao rasgo em relação ao controle (5,7 mN.m²/g e 4,6, mN.m²/g, respectivamente para 26 °SR ou 24% de aumento) (Figura 30).

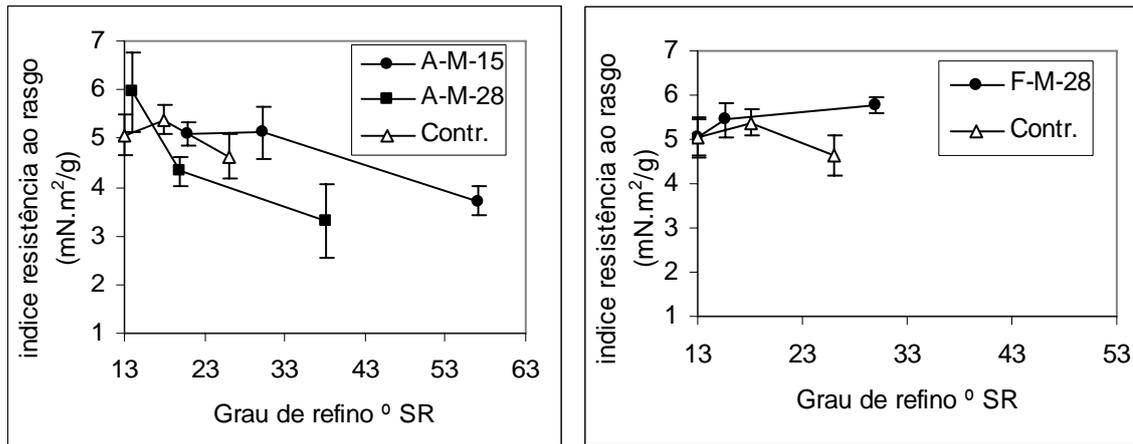


Figura 30 – Índice de resistência ao rasgo de polpas preparadas a partir de cavacos de *E. grandis* pré-digeridos com sulfito alcalino. As diferentes curvas indicam os resultados para a madeira controle autoclavado (Controle), madeira autoclavada e biotratada por *P. chrysosporium* em cultivos suplementados com milhocina e inóculo de 5 mg de micélio/kg madeira por 15 e 28 dias (A-M-15 e A-M-28, respectivamente) e madeira não autoclavada e biotratada por *P. chrysosporium* em cultivos suplementados com milhocina e inóculo de 5 mg de micélio/kg madeira por 28 dias (F-M-28).

Os índices de resistência ao rasgo *versus* os índices de resistência à tração novamente mostram valores superiores para o rasgo em um valor fixo de tração e vice-versa nas amostras autoclavadas e não autoclavadas biotratadas por 15 e 28 dias, respectivamente em relação aos controles. No caso da amostra autoclavada e biotratada por 28 dias foram notados valores menores na maior parte da curva de refino (após 120min de refinamento) (Figura 31).

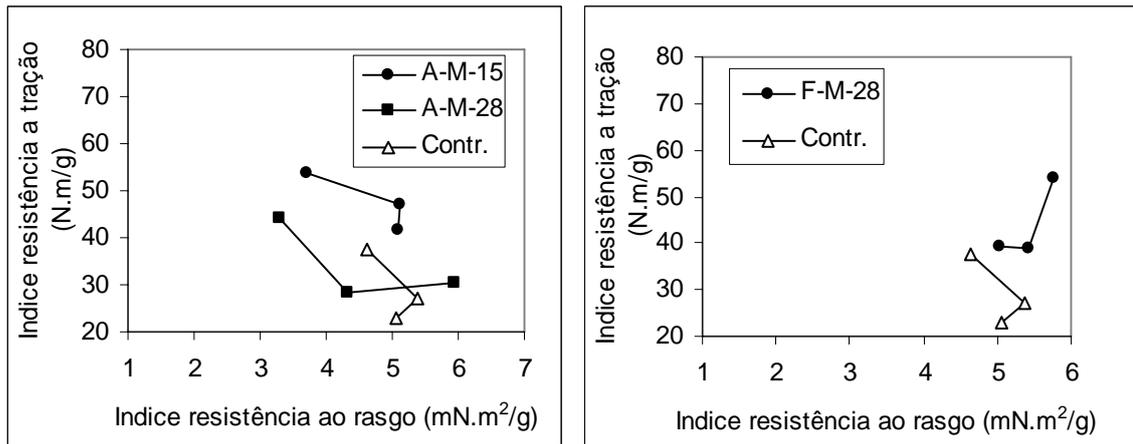


Figura 31 – Índice de resistência à tração versus resistência ao rasgo de polpas preparadas a partir de cavacos de *E. grandis* pré-digeridos com sulfito alcalino. As diferentes curvas indicam os resultados para a madeira controle autoclavado (Controle), madeira autoclavada e biotratada por *P. chrysosporium* em cultivos suplementados com milhocina e inóculo de 5 mg de micélio/kg madeira por 15 e 28 dias (A-M-15 e A-M-28, respectivamente) e madeira não autoclavada e biotratada por *P. chrysosporium* em cultivos suplementados com milhocina e inóculo de 5 mg de micélio/kg madeira por 28 dias (F-M-28).

6 - Conclusões

- O fungo *C. subvermispora* não se desenvolveu em cavacos de *E.grandis* não autoclavados, enquanto *P. chrysosporium* sim. O crescimento de *C. subvermispora* em cavacos lavados com ácido variou dependendo da adição de co-substrato (milhocina) e do lote de madeira.
- O fungo *C. subvermispora* produziu atividades hidrolíticas durante todos os períodos de biodegradação em condições assépticas (autoclavado), sendo que a enzima xilanase apresentou os maiores níveis entre as atividades hidrolíticas estudadas. Em condições não assépticas, apenas os cultivos lavados com ácido mostraram atividades hidrolíticas, principalmente xilanases.
- O fungo *P. chrysosporium* também produziu atividades hidrolíticas, porém em todas as condições de cultivo (cavaco autoclavado e não autoclavado), sendo que a enzima xilanase apresentou os maiores níveis.
- No caso das enzimas oxidativas, MnP foi detectada em todos os cultivos em condições assépticas (*P. chrysosporium* e *C. subvermispora*). Também foi observada nos cultivos lavados com ácido (e controles) no caso de *C. subvermispora*. Com cavacos não autoclavados não foi detectada a presença de MnP em nenhum dos cultivos avaliados. Lacases foram detectadas em níveis extremamente baixos em alguns cultivos de *C. subvermispora*. De forma geral, os cultivos de *C. subvermispora* que apresentaram MnP levaram a benefícios na polpação quimiomecânica, enquanto que no caso de *P. chrysosporium* mesmo o cultivo sem a presença de MnP proporcionaram benefícios na polpação.
- A solubilidade em NaOH 1% da madeira obtida dos cultivos de *C. subvermispora* aumentou significativamente apenas após 28 dias de cultivo nas condições assépticas e lavada com ácido (2º lote de madeira).
- A madeira biotratada por *C. subvermispora* em cultivos com cavacos lavados com ácido

(além de seus controles) submetida à etapa de polpação quimiomecânica (CMP) mostrou aumento de grau de refino em um mesmo tempo e propriedades ópticas-mecânicas praticamente constantes em relação a seus respectivos controles.

- A madeira biotratada por *P. chrysosporium* em cultivos com cavacos não autoclavados submetida à polpação CMP mostrou benefícios para o refinamento, principalmente em tempos longos de refino. As propriedades mecânicas das biopolpas foram significativamente melhores quando comparado com as polpas controles.

7– Referências Bibliográficas

- AGOSIN, E. *et al.* Characterization of palo poderido, a natural process of delignification in wood. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56 p. 65-74, 1990.
- AGUIAR, A.; SOUZA-CRUZ, P.; FERRAZ, A. Oxalic acid, Fe³⁺-reduction activity and oxidative enzymes detected in culture extracts recovered from *Pinus taeda* wood chips biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38 p. 873-878, 2006.
- AKHTAR, M. *et al.* An overview of biomechanical pulping research. In: RAYMOND, A. YOUNG.; AKHTAR, M. **Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**. New York: John Wiley and Sons, 1988. p. 309-339.
- ANDER, P.; MARZULLO, L. Sugar oxidoreductases and veratryl alcohol oxidase as related to lignin degradation. **Journal of Biotechnology**, v. 53. p. 115-131, 1997.
- ARCHIBALD, F.S. A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye Azure B. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58. p. 3110-3116, 1992.
- ASTM Methods “ Standard Method of Test for one Per Cent Caustic Soda Solubility of Wood”, p. 414-415, 1966.
- BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Inter-laboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal Biotechnology**, v. 23 p. 257-270, 1992.
- BAJPAI, P. *et al.* Biokraft pulping of eucalyptus with selected lignin-degrading fungi. **Journal of Pulp Paper Science**, v.27 p.235-241, 2001.
- BETTUCCI, L.; LUPOS S.; SILVAS S. Growth control of wood rotting fungi by nonvolatile metabolites from *Trichoderma spp.* and *Gliocladium virens*. **Cryptogamie Mycology**, v. 9 (2) p. 157-165, 1988.
- BIERMANN, C. Pulping Fundamentals. In: BIERMANN, C. **Essentials of Pulping and Papermaking**. New York: Academic Press, 1993. p. 55-100.
- BJURMAN, J.; KRISTNESSON J. Volatile production by *Aspergillus versicolor* a possible cause of odour in houses affected by fungi. **Mycopathologia**, v. 118 p. 173-178, 1992.
- BLANCHETE, R. A. *et al.* Cell wall alterations in loblolly pine wood decayed by the white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. **Journal of Biotechnology**, v. 53. p. 203-213, 1997.
- BLANCHETTE, R. A. *et al.* Evaluating Isolates of *Phanerochate chrysosporium* and *Ceriporiopsis subvermispora* for Use in Biological Pulping Processes. **Holzforshung**, v. 46. p. 109-115, 1992.
- BODDY, L. Interspecific combative interactions between wood-dacaying basidiomycetes **FEMS Microbiology and Ecology**, v. 31. p. 185-194, 2000.

- BOURBONNAIS, R.; LEECH, D.; PAICE, M. G. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. **Biochemical and Biophysical Acta**, v. 1379. p. 381-390, 1998.
- BROWN, H. L.; BRUCE, A.; STAINES, H. J. Assessment of the bio-control potential of a *Trichoderma viride* isolate. Part II: Protection against soft rot and basidiomycete decay. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 44 p. 225-231, 1999.
- BRUCE, A. *et al.* Chitinase and laminarinase production in liquid culture by *Trichoderma spp.* and their role in biocontrol of wood decay fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 35 (4) p. 337-353, 1995b.
- BRUCE, A. *et al.* Production of Volatile Organic Compounds by *Trichoderma* in Media Containing Different Amino Acids and Their Effect on Selected Wood Decay Fungi. **Holzforschung**, v. 54 p. 481-486, 2000.
- BRUCE, A.; AUSTIN, W. J.; KING, B. Control of growth of *Lentinus lepideus* by volatiles from *Trichoderma*. **Transition Britain Mycology Society**, v. 82 p. 423-428, 1984.
- BRUCE, A.; HIGHLEY, T. L. Control of growth of wood decay basidiomycetes by *Trichoderma spp.* and other potentially antagonistic fungi. **Forest Products Journal**, v. 41 p. 63-67, 1991.
- BRUCE, A.; KUNDZEWICZ, A.; WHEATLEY, R. E. Influence of culture age on the volatile organic compounds produced by *Trichoderma aureoviride* and associated inhibitory effects on selected wood decay fungi. **Material Und Organismen**, v. 30 (2) p. 79-94, 1996.
- CASTILLO, M. DEL PILAR; ANDER P.; STENSTROM J. Lignin and manganese peroxidase activity in extracts from straw solid substrate fermentations. **Biotechnology Techniques**, v. 11. p. 701-706, 1997.
- DIX, N.J.; WEBSTER, J. *Fungal ecology*. London: Chapman & may 1995.
- ERIKSSON, K.E.L.; BLANCHETTE, R.A.; ANDER, P. *Microbiological and Enzymatic Degradation Wood and Wood Components*. Germany: Spring-Verlag 1990, p. 560.
- EVANS, C.S. *et al.* Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. **FEMS Microbiology Review**, v. 13. p. 235-239, 1994.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. Pulping Processes. In: FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood Chemistry, Ultrastructure and Reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. p. 414-473.
- FERRAZ, A. Aplicações da biotecnologia na produção de papel e celulose. In: LIMA U. A.; AQUARONE E.; BOORZANI W.; SCHMIDELL W. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda 2001, v. 1. p. 465-484.

- FERRAZ, A. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: ESPOSITO E.; AZEVEDO J. L. **Fungos: uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2004. p. 215-242.
- FILIPOVIC S. S.; RISTIC, M. D.; SAKAC M. B. Technology of Corn Steep Application in Animal Mashs and their Quality. **Roumanian Biotechnology Letters**, v. 7. p. 705-710, 2001.
- FLOUNOY, D. S. *et al.* Changes in the size and volume of pores in sweet gum wood during simultaneous rot by *Phanerochaete chrysosporium*. **Holzforschung**, v.47. p. 297-301, 1993.
- GOODELL, B. *et al.* Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolate from wood decay fungus and their role in the fungal biodegradation of wood. **Journal of Biotechnology** v. 53. p. 133-152, 1997.
- GUERRA, A.; MENDONÇA, R.; FERRAZ, A. Bio-chemimechanical Pulps from *Eucalyptus grandis*: Strength Properties, Bleaching, and Brightness Stability. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 25 p.203-216, 2005.
- HIGHLEY, T. L.; RICARD J. Antagonism of *Trichoderma spp* and *Gliocladium virens* against wood fungi. **Material und Organismen**, v.23 p. 157-169, 1988.
- HIGUCHI, T. Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components. In: HIGUCHI, T. Orlando: Academic Press, 1985. p. 679.
- HORVATH, E. M.; BURGEL J. L.; MESSNER K. The production of soluble antifungal metabolites by the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* in connection with the formation of conidiospores. **Material Und Organismen**, v. 29(1) p. 1-14, 1995.
- HULME, M. A.; SHIELDS J. K. Biological control of decay fungi in wood by competition for non-structural carbohydrates. **Nature**, v. 227 p. 300-301, 1970.
- HULME, M. A.; SHIELDS J. K. Effect of primary fungal infection upon secondary colonisation of birch bolts. **Material Und Organismen**, v. 7 p. 177-188, 1972.
- HUMPHRIS, S. N. *et al.* Assessment of the inhibition of wood decay fungi by volatile organic compounds identified from *Trichoderma spp*. **International research Group on Wood Preservation. Document** No.IRG/WP 99-10302, p. 11, 1999.
- KAHLOS, K.; KIVIRANTI J. L. J.; HILTUNEN V. K. Volatile constituents of wild and *in vitro* cultivated *Gloeophyllum odoratum*. **Phytochemistry**, v. 36 p. 917-922, 1994.
- KIRK, T. K.; CULLEN, D. Enzimology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In: RAYMOND A. YOUNG.; AKHTAR, M. **Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**. New York: John Wiley and Sons, 1998. p. 273-308.

- KUHAD, R.C.; SINGH, A.; ERIKSSON, K.E.L. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. In: ERIKSSON, K. E. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, 1997. p. 45-126.
- KUWAHARA, M. *et al.* Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*, **FEBS Letters**, v.169. p. 247-25, 1984.
- LARSEN, T. O.; FRISVAD J. C. Characterisation of volatile metabolites from 47 *Penicillium* taxa. **Mycological Research**, v. 99 p. 1153-1166, 1995 a.
- LARSEN, T. O.; FRISVAD J. C. Chemosystematics of *Penicillium* based on profiles of volatile metabolites. **Mycological Research**, v. 99 p. 1167-1174, 1995 b.
- LUNDELL, T. *et al.* Formation and action of lignin-modifying enzymes in cultures of *Phlebia radiata* supplemented with veratric acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56 p. 2623-2629, 1990.
- LUNDQVIST, F. *et al.* Removal of non-process elements from hardwood chips prior to Kraft cooking. In: ISWFPC XIII., 2005, Atlant. **Anais...** Atlant: 2005. v. 2. p. 147-154.
- MANUBENS, A. *et al.* Differential regulation of genes encoding manganese peroxidase (MnP) in the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispota*. **Current Genetics**, v. 43 p. 433-438, 2003.
- MENDONÇA R. *et al.* Cellular UV-microspectrophotometric investigations on pine wood (*Pinus taeda* and *Pinus elliottii*) delignification during biopulping with *Ceriporiopsis subvermispota* (Pilát) Gilbn. & Ryv. and alkaline sulfite/anthraquinone treatment. **Wood Science and Technology**, v. 38. p. 567-575, 2004.
- MENDONÇA, R.; GUERRA, A.; FERRAZ, A. Delignification of *Pinus taeda* wood chips treated with *Ceriporiopsis subvermispota* for preparing high-yield Kraft pulps. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 77 p. 411-418, 2002
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic reagent for the determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31. p. 426-428, 1959.
- MOORE-LANDECKER, E. Fungi as saprótrofos. **Em Fundamentals of the fungi**. New Jersey : Prentice Hall 1996, p. 371-403.
- MORRELL. J. J.; SEXTON C. M. Evaluation of a biocontrol agent for controlling Basidiomycete attack of Douglas –fir and southern pine. **Wood and Fibre Science**, v. 22 p.10-21, 1990.
- ORIARAM, T.; LABOSKY J. R.; BLAKEHORN, P. Kraft pulp and papermaking properties of *Phanerochaete chrsosporium*- degraded aspen. **Tappi Journal**, v. 73 p. 147-152, 1990.

- RÜTTIMANN, C. *et al.* Ligninolytic Enzymes of the White Rot Basidiomycetes *Phlebia brevispora* and *Ceriporiopsis subvermispora*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 16 p. 64-76, 1992.
- SAXENA, R. K. *et al.* Induction and mass sporulation in lignin degrading fungus *Ceriporiopsis subvermispora* for its potential usage in pulp and paper industry. **Current Science**, v. 81 p. 591-594, 2001.
- SCORE, J. A. *et al.* The biological control of *Serpula lacrymans* by *Trichoderma* species. **Holzforschung**, v. 52 p. 124-132, 1998.
- SCOTT, G. M. *et al.* Engineering, scale-up, and economic aspects of fungal pretreatment of wood chips. In: RAYMOND, A. YOUNG.; AKHTAR, M. **Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**. New York: John Wiley & Sons, 1998. p. 341-384.
- SETHURAMAN, A.; AKIN, D. E.; ERIKSSON, K. E. L. Plant-cell-wall-degrading enzymes produced by the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 27 p.37-47, 1988.
- SOUZA-CRUZ B. P. *et al.* Extraction and determination of enzymes produced by *Ceriporiopsis subvermispora* during biopulping of *Pinus taeda* wood chips. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34. p. 228-234, 2004.
- SOUZA-CRUZ, P. B. **Morfo-Fisiologia da Biodegradação de Madeiras por *Ceriporiopsis subvermispora* (Pil.) Gilbn & Ryv. e *Phlebia tremellosa* (Schrad.: Dr.) Nakas & Burds.** 2005.91f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Departamento de Biotecnologia Industrial, Faculdade de Engenharia Química de Lorena – Lorena - 2005.
- SREBOTNIK, E.; MESSNER, K.; FOISNER, R. Ultrastructural localization of ligninase of *Phanerochaete Chrysosporium* by immunogold labeling. **Current Microbiology**, v. 16. p. 221-227, 1988.
- TIEN, M.; KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete Chrysosporium* Burds. **Science**, v. 221 p. 661-663, 1983.
- URZÚA, U.; KERSTEN, P. J.; VICUÑA, R. Kinetics of Mn^{3+} -oxalate formation and decay in reactions catalyzed by manganese peroxidase of *Ceriporiopsis subvermispora*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 360 p. 215-222, 1998.
- VINCENTIM, M. P.; FERRAZ, A. Enzyme production and chemical alterations of *Eucalyptus grandis* wood during biodegradation by *Ceriporiopsis subvermispora* in cultures supplemented with Mn^{+2} , corn steep liquor and glucose. **Enzyme and Microbial Technology**, doi:10.1016/j.enzmictec.2006.05.021 (no prelo).
- WHEATLEY. R. E. *et al.* Effect of substrate composition on the production of volatile organic compounds from *Trichoderma spp.* inhibitory to wood decay fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 39 (2-3) p. 199-205, 1997.

WIDDEN, P. Competition and the fungal community. Em: **the mycota – Environmental and microbial**. Germany: Springer-Verlag 1997, p. 135-148.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)