

## POLPAÇÃO QUIMIOMECÂNICA DE *EUCALYPTUS GRANDIS* BIOTRATADO POR *PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM*

Fernando Masarin\*, Marcos Paulo Vicentim e André Ferraz

Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena – EEL-USP Lorena. C.P. 116, Lorena, 12602-810, SP, Brasil.  
fernandomasa@gmail.com

### RESUMO

O presente trabalho avaliou a biopolpação de madeira recém cortada de *Eucalyptus grandis* por *Phanerochaete chrysosporium* em condições não assépticas. Num primeiro grupo de experimentos foi utilizada madeira sem nenhum tratamento de assepsia (cavaco fresco). Paralelamente, foi realizado um grupo de experimentos com madeira previamente tratada com solução de ácido sulfúrico em pH 2,5 a 80°C por 1 hora (lavado ácido). Também foram avaliados cultivos controle com madeira autoclavada (condição asséptica). Em todos os casos foi utilizado 0.5% de milhocina como co-substrato. A atividade metabólica do fungo foi avaliada através da determinação de enzimas oxidativas e hidrolíticas. A manganês-peroxidase (MnP) foi encontrada somente nos cultivos com madeira autoclavada (32 UI/kg de madeira no 15º dia de cultivo), os quais proporcionaram as maiores atividades também das demais enzimas. Nos cultivos com cavaco fresco foi observado o crescimento de contaminantes oportunistas. Nesses cultivos as xilanases foram predominantes, atingindo 512 UI/kg. A madeira tratada com ácido apresentou menor susceptibilidade à contaminação e foi verificada apenas atividade de xilanases, a qual atingiu 1200 UI/kg. A partir das amostras biotratadas foram produzidas polpas quimiomecânicas (CMP) com diferentes graus de refino. A etapa de refinamento foi realizada em moinho Jokro por períodos de 60 a 220 minutos. As polpas de madeira não biotratada apresentaram curva de refino entre 13 °SR e 30 °SR. Os cultivos em condição asséptica apresentaram crescimento efetivo do fungo já aos 15 dias de biotratamento e as amostras biotratadas nestas condições proporcionaram a melhor curva de refino (20 °SR a 56 °SR), neste caso houve ganho efetivo nas propriedades mecânicas das polpas obtidas em relação ao seu respectivo controle. Cultivos nessas mesmas condições com tempo mais longo (28 dias) proporcionaram madeiras biotratadas com refino entre 14 °SR e 38 °SR, neste caso houve perda das propriedades mecânicas na maior parte da curva de refino. No caso dos cultivos em condições não assépticas, a ocorrência de contaminantes exigiu um tempo maior de biotratamento (28 dias) gerando amostras que apresentaram curvas de refino entre 14 °SR e 31 °SR e ganho efetivo nas propriedades mecânicas das polpas em relação ao seu respectivo

controle. As madeiras tratadas com ácido e biodegradada por 28 dias proporcionaram graus de refino entre 17 °SR e 47 °SR, neste caso as propriedades mecânicas das amostras foram muito próximas do seu respectivo controle. Os dados analisados em conjunto indicam que *P. chrysosporium* foi capaz de colonizar *E. grandis* em condições não assépticas, e que a etapa de pré-lavagem ácida permitiu a eliminação parcial de contaminantes. O pré-tratamento fúngico apresenta claros benefícios, uma vez que as amostras biotratadas foram mais facilmente refinadas frente ao processo CMP.

### INTRODUÇÃO

Dentro do contexto do processo de biopolpação, alguns parâmetros têm sido otimizados e envolvem a introdução de co-nutrientes, o tempo de tratamento, a necessidade de esterilização e a quantidade de inóculo necessária. A suplementação dos cultivos com milhocina proporciona um decréscimo na quantidade de inóculo requerido para uma efetiva colonização dos cavacos pelo fungo *Ceriporiopsis subvermispora* (1). No entanto, esse co-nutriente também fomenta a contaminação dos cultivos. 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 (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 e apresenta temperatura ideal de crescimento de 27°C (2).

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 (2). 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. Uma espécie fúngica pode interagir com outras e também com outros organismos, como bactérias e artrópodes. Essas interações podem envolver dois ou mais tipos de indivíduos e ter impacto variado, desde nocivo até proveitoso a uma ou ambas as partes, ou ainda pode não apresentar efeitos (3).

Alguns basidiomicetos 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 escala industrial, principalmente quanto à biopolpação, pode ser uma tarefa muito complexa. *P.*

*chryso sporium* 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, denominados clamidósporos, que não são lançados ao meio externo, mas que também podem germinar (4,5).

A biodegradação da madeira pelo basidiomicetos é promovida pela ação de uma série de enzimas. As responsáveis pela degradação da celulose e das polioses são as celulasas e as hemicelulasas (hidrolases) que apresentam alta especificidade pelo respectivo substrato (6). Como atuam diretamente sobre seus substratos, têm sua ação limitada à superfície do lúmen da fibra vegetal nos estágios iniciais de decomposição da madeira, por não poderem-na devido a seu grande volume.

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. As enzimas ligninolíticas são: LiP > MnP > Lacase, ordenadas segundo seus potenciais de oxidação (6). Lignina-peroxidase (LiP) é uma heme-proteína que apresenta potencial de oxidação suficientemente elevado para abstrair elétrons de estruturas aromáticas não fenólicas, dando origem a radicais catiônicos. MnP também é uma heme-proteína, cujo ciclo catalítico é dependente de  $Mn^{2+}$ , e apresenta potencial de oxidação suficiente apenas para abstrair elétrons de estruturas fenólicas. Lacase é uma cupro-proteína que atua diretamente sobre estruturas fenólicas.

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 (7). Essa etapa poderia também servir como um processo de descontaminação dos cavacos para o processo de biopolpação, visto que ocorre lixiviação da superfície dos cavacos por uma solução com baixo pH e temperatura relativamente elevada.

A maioria dos íons metálicos presentes na madeira encontram-se associados a grupos carboxilatos ligados a hemicelulose. Dependendo do tipo e espécie de madeira, esses metais podem ser removidos em até 70% (7). Desde que a temperatura do lavado ácido não ultrapasse 100°C, a velocidade de hidrólise dos carboidratos é muito baixa, não havendo assim efeitos negativos nas propriedades das polpas obtidas a partir das madeiras lavadas (7).

A biotratamento da madeira prévio aos processos convencionais de polpação mecânica (polpação biomecânica) gera economia de energia e aumento nas propriedades mecânicas das biopolpas. A economia pode chegar a 40% no processamento

mecânico tradicional (RMP) de madeiras duras ou moles (8,9). Mas são os processos termomecânicos (TMP) e quimioterme-mecânicos (CTMP) que têm recebido mais atenção quanto à biopolpação, uma vez que a demanda de polpas provenientes destes processos tem aumentado nos últimos anos, por serem processos de alto rendimento, que produzem polpas relativamente baratas e de melhor qualidade que as obtidas pelo processo RMP (2,10).

Em estudos recentes de nosso grupo de pesquisa, foi realizado o biotratamento de *E. grandis* por *C. subvermispora* durante 15 dias. As amostras biotratadas foram submetidas a um processo quimioterme-mecânico (bio-CMP). Os resultados mostraram que as amostras biotratadas demandaram menor tempo de refinamento para obtenção de polpas com mesmo grau de fibrilação que controles não biotratados, o que poderia gerar economia de energia ou aumento de produtividade. Além disso, as biopolpas apresentaram maior resistência à tração e rasgo (11). No presente trabalho, foi investigado o biotratamento de cavacos de *E. grandis* por *P. chryso sporium* em condições não assépticas, e avaliado o desempenho do fungo em se desenvolver e degradar a madeira. Os cavacos assim tratados foram submetidos à produção de polpa CTMP e avaliadas suas propriedades.

## EXPERIENTAL

### Fungo e preparação do inóculo

O fungo utilizado neste estudo foi o basidiomiceto causador de decomposição branca *Phanerochaete chryso sporium* (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. O cultivo foi realizado a 38 °C. A partir destas placas foram obtidos os inóculos para o tratamento da madeira. Para a produção de inóculo, o fungo foi repicado 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.

### **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 (~ 4 x 3 x 0,4 cm). Os cavacos foram recolhidos imediatamente após sua produção e armazenados em sacos plásticos a -18 °C até o momento do uso.

### **Experimentos de biodegradação**

Os cultivos controle, em que a madeira foi autoclavada, foram conduzidos da seguinte maneira. 10g (base seca) de cavacos foram descongelados, inseridos em Erlenmeyers de 250 ml, imersos em água por um período de 16 horas, drenados e autoclavados a 121 °C por 15 minutos. A umidade final desses cavacos foi de aproximadamente 55%. Após resfriamento, os cavacos foram suplementados com milhocina e inoculados com suspensões de micélio em cargas de 5 e 50mg de micélio/kg de madeira (peso seco).

Nos cultivos com madeira não autoclavada, o descongelamento dos cavacos foi realizado em câmara asséptica de fluxo laminar. Após descongelamento e homogeneização, 10g (base seca) de cavacos foram transferidos para Erlenmeyers de 250 mL para as inoculações. 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 250 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/kg de madeira em base seca). A temperatura da mistura foi elevada para 80°C em um banho de água por um período de 1 hora (7). Após o tratamento, a solução foi drenada. Em um grupo de experimentos, os cavacos após serem transferidos foram autoclavados a 121 °C por 15 min. Um experimento controle foi realizado com água destilada e pH ajustado para 6.

A inoculação dos Erlenmeyers foi feita em câmara asséptica de fluxo laminar, quando então foi adicionada uma suspensão de micélio fúngico e milhocina. O Erlenmeyer carregado foi fechado e agitado manualmente para homogeneização. Os cultivos foram mantidos 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 (3 a 35 dias). Todos os experimentos de biodegradação foram suplementados com 0,5% (m/m, milhocina/madeira, base seca) de milhocina.

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, para tempos de cultivo entre 7 e 35 dias.

### **Determinação do pH**

Os 10 g de cavacos de um dos Erlenmeyers (controle ou madeira biodegradada) foram extraídos com 60 mL de água bidestilada com pH previamente ajustado em 7, sob agitação em 120 rpm por 48 horas, seguida de filtração, e o pH do filtrado foi determinado.

### **Extração das enzimas produzidas durante a biodegradação da madeira**

Ao final do período de incubação, 3 cultivos foram extraídos com 40 mL de uma solução contendo tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5, adicionado de 0,01% (m/v) de Tween 60. A extração foi conduzida sob agitação em 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 por quilograma de madeira (UI/kg, em base seca inicial), e determinadas como segue.

### **Mangânês-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 (pH4,5), 3 mL de lactato de sódio 50 mM, 1 mL de MnSO<sub>4</sub> 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 ( $\epsilon = 22000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) (12,13).

### **Lacase**

As atividades de lacases foram determinadas pela oxidação de ABTS (ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolona-6)-sulfônico). A cinética de oxidação do substrato foi acompanhada durante 10 minutos 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. As leituras foram feitas em 420 nm ( $\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) (14).

### **Lignina-peroxidase**

Para a determinação de LiP, utilizou-se o corante Azure B como substrato (15). 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, 500 µL de caldo enzimático e 500 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1,76 mM. Para o branco, substituiu-se o corante por água destilada. A cinética enzimática foi lida em 651 nm por 5 min.

### Endoglucanases

A atividade de endoglucanases foi determinada pela hidrólise de carboximetilcelulose (CMC). 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 (16). 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 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> a vácuo) foi utilizada para construção da curva de calibração.

### Xilanases totais

As atividades de xilanases foram determinadas pela hidrólise de xilana de bétula (17). 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 (16). 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 descrito para endoglucanases. Xilose (seca em P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> a vácuo) foi utilizada para construção da curva de calibração.

### Experimentos de biodegradação em escala ampliada

Alguns cultivos foram selecionados para serem executados em maior escala, a fim de fornecer madeira em quantidade suficiente para produção de polpas celulósicas. Todos em maior escala foram realizados com a carga mínima de inóculo (5 mg de micélio/kg de madeira) nas seguintes condições: autoclavado, biotratamento por 15 e 28 dias; não autoclavado, 28 dias; não autoclavado e lavado com ácido, 28 dias; autoclavado e lavado com ácido, 28 dias. Estes experimentos foram conduzidos em Erlenmeyers de 2L contendo 50g de cavacos (peso seco). Para cada condição de biodegradação foram inoculados 3 Erlenmeyers.

### Polpação quimiomecânica de cavacos de madeira

A polpação quimiomecânica foi realizada por refinamento mecânico de cavacos pré-digeridos a 121 °C por 120 minutos, com licor alcalino na proporção sólido(g):líquido(mL) de 1:6, composto de 10% de sulfito de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) e 5% de hidróxido de sódio NaOH (ambos os reagentes foram adicionados com base na massa seca de madeira). Após digestão química, os cavacos foram drenados e então desfibrados em liquidificador SIRE de 3,5 L por 1 hora, com adição de água na proporção sólido(g):líquido(mL) de 1:60. Os cavacos desfibrados foram centrifugados (em centrifuga Arno) e refinados em um refinador Regmed tipo *Jökro*. Em cada recipiente do refinador *Jökro* foram colocados 20 g de madeira desfibrada (base seca), 90 mL de licor alcalino (nas concentrações já descritas) e 90 mL de água destilada. O refinamento foi conduzido por intervalos de tempo de 60, 120 e 220 min.

Após o refinamento, as polpas foram classificadas em um classificador composto de placa com fendas de 0,15 mm (Noram, Lorentzen & Weltre, modelo CA-328) e as fibras que passaram pelas fendas foram centrifugadas (centrifuga Arno). Uma porção de 2 g (seco) foi ressuspensa em água e desagregada para determinação do grau de fibrilação (drenabilidade) em equipamento tipo Schopper-Riegler (Regmed, modelo SRIP). O restante das fibras foi dividido em três porções de massa aproximadamente iguais, ressuspensas, desagregadas e usadas para formação de folhas de teste de 20 cm de diâmetro, 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 das folhas, elas 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) de acordo com norma TAPPI (T 494 om-01), índice de resistência ao rasgo (aparelho Regmed, modelo ED-1600), norma TAPPI (T 414 om-98) e alvura (TAPPI T525 om-02).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos cultivos de *P. chrysosporium* sobre madeira não autoclavada adicionados de milhocina foi observado o crescimento de contaminantes oportunistas em pequenas quantidades. Os contaminantes eram fungos de coloração preta e também esverdeada, aparentando grande aderência à superfície dos cavacos. Apesar dos organismos oportunistas, *P. chrysosporium* foi capaz de se desenvolver concomitantemente à contaminação, ao contrário do que foi observado em cultivos com madeira não autoclavada com *C. subvermispora* (19). O micélio de *P. chrysosporium* predominou nos

cultivos, inclusive formando e lançando esporos. Também se observou a descoloração dos cavacos. Os experimentos controle (com madeira autoclavada), mostraram o crescimento exclusivo de *P. chrysosporium* e esporulação evidente do micélio a partir de 15 dias de cultivo, além da descoloração dos cavacos. Já nos cultivos com madeira lavada também foi observada a presença dos mesmos contaminantes, porém em quantidades menores que nos cultivos não autoclavados. Neste caso *P. chrysosporium* predominou mais rapidamente que nos cultivos não autoclavados, também formando e lançando esporos.

Um fator relevante que deve ter contribuído para um nível baixo de contaminação nos cultivos foi a temperatura de incubação. A temperatura ideal de desenvolvimento do *P. chrysosporium* é de 35-37 °C, a qual é relativamente elevada para a maioria dos fungos colonizadores de madeira, prejudicando o desenvolvimentos de contaminantes ou até mesmo os eliminando.

Tabela 1 - Atividades de xilanases, endoglucanases e níveis de pH 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).

tempo de cultiv. (dias)	Cargas de inóculo variadas (mg/kg)					
	Xilanases totais (UI/kg)		Endoglucanases (UI/kg)		pH	
	5	50	5	50	5	50
0	0	0	0	0	6	6
7	22±10	32±11	53±20	116±42	4,43	4,4
14	158±41	49±8	89±44	52±25	4,12	4,11
35	871±304	1101±364	135±10	107±11	3,8	3,8

Tabela 2 - Atividades de xilanases, endoglucanases e níveis de pH em cultivos de *P. chrysosporium* sobre madeira não 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).

tempo de cultiv. (dias)	Cargas de inóculo variadas (mg/kg)					
	Xilanases totais (UI/kg)		Endoglucanases (UI/kg)		pH	
	5	50	5	50	5	50
0	0	0	0	0	6	6
7	512±170	237±180	4,5±3	3,5 ± 2,1	6,2	6,8
14	479±79	449±236	0	2,4 ± 3,6	6,7	5,6
35	365±223	190±86	135±10	108 ± 11	6,5	5,9

A atividade metabólica de *P. chrysosporium* foi monitorada a partir da secreção de enzimas e ácidos orgânicos, sendo que as enzimas hidrolíticas e os ácidos orgânicos foram detectados em todas as condições de cultivo. Nos cultivos com madeira lavada com água os níveis de xilanases foram superiores, principalmente no biotratamento de 35 dias, como mostram as Tabelas 1, 2 e 3. As endoglucanases atingiram os maiores níveis nos cultivos de 35 dias autoclavados e nos não autoclavados (Tabelas 1, 2 e 3). Os cultivos lavados com ácido apresentaram pH final próximo aos

cultivos autoclavados e os lavados com água, no entanto os cultivos lavados com ácido já foram iniciados em um pH menor, o que indica menor produção de ácidos orgânicos. MnP foi detectada somente nos cultivos sobre madeira autoclavada, atingindo valores elevados em 35 dias, como mostra a Figura 1. Lacases e LiPs não foram detectadas em nenhum dos cultivos.

Tabela 3 - Atividades de xilanases, endoglucanases e níveis de pH em cultivos de *P. chrysosporium* sobre madeira lavada com ácido, água e lavada com ácido e autoclavada. Cargas de inóculo de 5 mg de micélio/kg de madeira e suplementação com milhocina (0,5% m/m em base de madeira seca).

Tempo de cultivo (dias)	Xilanases (UI/kg)	Endogluc. (UI/kg)	pH
	Lavado com ácido		
0	0	0	4,8
7	515 ± 142	5 ± 4	3,1
14	337 ± 150	8 ± 7	3,8
28	1228 ± 537	0,8 ± 1	4,3
35	905 ± 419	0,5 ± 1	3,9
Lavado com água			
0	0	0	5,5
7	647 ± 304	151 ± 21	3,5
14	545 ± 259	104 ± 11	4,1
28	1085 ± 113	65 ± 30	4,1
35	5391 ± 1130	25 ± 24	4
Lav. c/ ác. e autoclavado			
0	0	0	4,8
7	795 ± 86	218 ± 76	3,6
14	572 ± 130	100 ± 41	4,4
28	1215 ± 221	19 ± 8	3,9
35	697 ± 343	8 ± 7	4

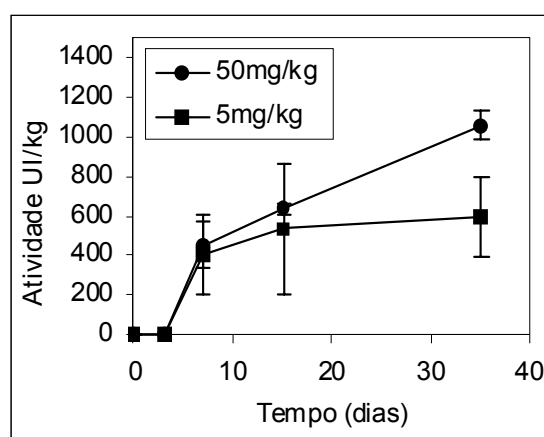


Figura 1- Atividades de MnP em cultivos de *P. chrysosporium* sobre madeira autoclavada. Cargas de inóculo de 5 e 50 mg de micélio/kg de madeira e suplementação com milhocina (0,5 % m/m em base de madeira seca).

A perda de massa das madeiras biotratadas

também indicou atividade degradativa de *P. chrysosporium* em todos os cultivos. No caso dos cultivos em madeira autoclavada e em madeira lavada, as perdas de massa chegaram a 12 e 13% (m/m), respectivamente, enquanto que nos cultivos com madeira não autoclavada a perda máxima foi de 6%, como mostram a Figuras 2 e 3.

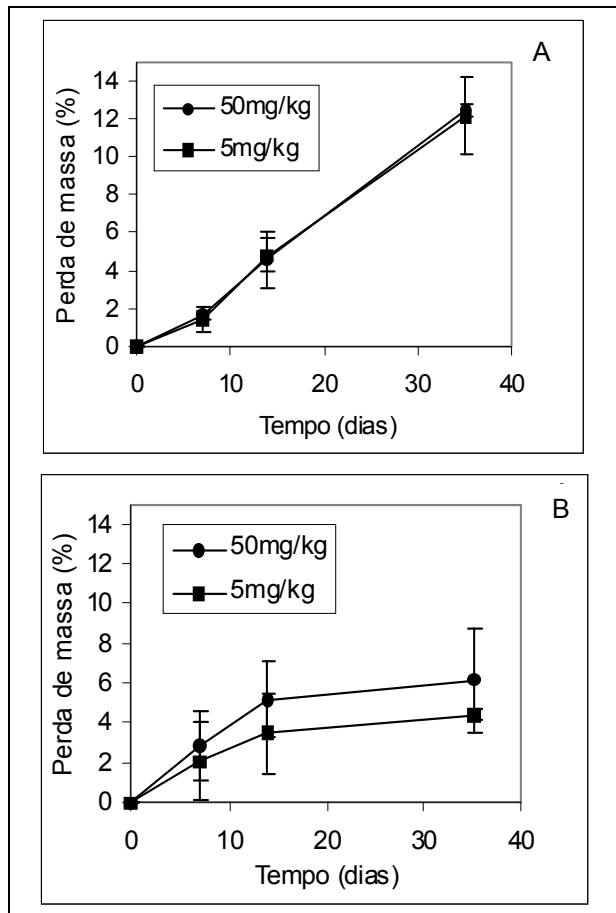


Figura 2 – Perda de massa de cavacos de *E. grandis* em cultivos de *P. chrysosporium* sobre madeira autoclavada (A) ou madeira não autoclavada (B). Cargas de inóculo de 5 e 50 mg de micélio/kg de madeira e suplementação com milhocina (0,5 % m/m em base de madeira seca).

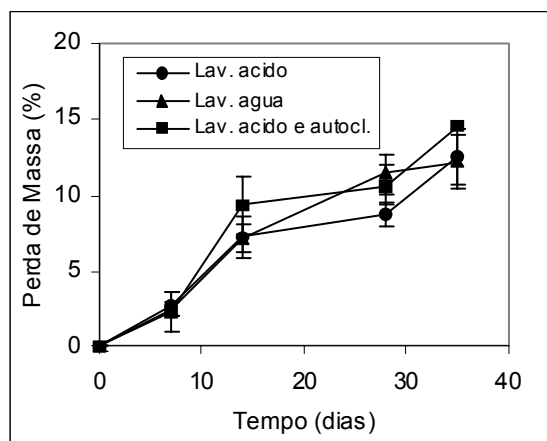


Figura 3 – Perda de massa de cavacos de *E. grandis* em cultivos de *P. chrysosporium* sobre madeira

lavada com ácido, lavada com água e lavado com ácido e autoclavado. Inóculo: 5 mg/kg. Suplementação: 0,5% de milhocina 0,5%.

Dentre os experimentos apresentado acima, algumas condições foram selecionadas para serem repetidas com maior quantidade de madeira, a fim de suprir quantidade suficiente de madeira para a preparação de polpas CTMP. Foram selecionadas condições que proporcionaram o crescimento somente ou principalmente de *P. chrysosporium*, e que tenha sido detectada atividade metabólica e/ou degradativa característica do basidiomiceto em estudo. As amostras selecionadas estão listadas na Tabela 4. Polpações com madeira "controle" também foram realizadas para refletir a resposta do material não biotratado em cada situação avaliada.

As polpações das madeiras biotratadas foram avaliadas através dos seguintes parâmetros: tempo de refinamento; rendimento total do processo (18). Em um experimento típico, os cavacos pré-digeridos com sulfito alcalino foram refinados por intervalos de tempo entre 60 e 220 min e o grau de fibrilação obtido foi estimado através da determinação do índice de Schopper-Riegler. Madeiras biotratadas de maneira adequada por fungos causadores de decomposição branca, refinam mais facilmente, o que significa menor tempo para se atingir um determinado grau de fibrilação, ou visto de outra forma, quando refinadas por um mesmo intervalo de tempo que uma madeira não-biotratada, atingem maior grau de fibrilação (2).

Tabela 4 – Condições e tempos de cultivo de *P. chrysosporium* sobre cavacos de *E. grandis* selecionados para os ensaios de polpação quimiomecânica. Foram usadas cargas de inóculo de 5 mg de micélio/kg de madeira e suplementação com milhocina (0,5% m/m em base de madeira seca).

Condições de cultivo	Tempo (dias)
Madeira autoclavada	15 e 28
Madeira não autoclavada	28
Madeira lavada com ácido	28
Madeira lav. c/ ac. e autoclavada	28

Pode-se notar que as amostras de madeira autoclavadas e biotratadas por 15 e 28 dias refinaram mais facilmente que o controle, corroborando dados já publicados (2,11), o que industrialmente pode refletir diretamente em economia de energia no processo CTMP, ou ainda em aumento de produtividade. Destas, as amostras biotratadas por 28 dias, as quais apresentaram atividade biodegradativa mais intensa, proporcionaram benefícios inferiores aos observados no período mais curto (Figura 4). As polpas provenientes de biotratamento de madeira não autoclavada, proporcionaram um perfil de refinamento semelhante à madeira controle, mas ainda com algum benefício quando refinada por 220 minutos (Figura 4). No caso das amostras lavadas com ácido, o biotratamento também facilitou o refinamento em comparação com seu respectivo

controle. Nas amostras lavadas com ácido e autoclavadas, o biotratamento também apresentou benefício quanto ao refinamento em relação ao seu respectivo controle, porém o benefício foi inferior ao proporcionado pelo cultivo apenas lavado com ácido (Figura 4).

O biotratamento por 15 dias da madeira autoclavada elevou a resistência à tração das folhas de teste em até 18,4%, sendo que as folhas formadas a partir de polpas com 26 °SR, apresentaram índice de resistência a tração de 45 N.m/g e 38 N.m/g, para a amostra biotratada e controle, respectivamente (Figura 5). No caso da amostra autoclavada e biotratada por 28 dias, notou-se diminuição de mais de 10% no índice de resistência à tração para as polpas refinadas por mais de 120 minutos (34 N.m/g para as folhas formadas a partir de polpa com 26 °SR) (Figura 5). As folhas formadas a partir das amostras biotratadas em condição não autoclavada, o índice de resistência à tração aumentou em média 30% em relação ao controle (50 N.m/g, 26 °SR). No caso das amostras lavadas com ácido e as amostras lavadas e autoclavadas, os índices de resistência à tração permaneceram quase idênticos aos respectivos controles (Figura 5). Esses resultados indicam que o biotratamento por 28 dias, dos cavacos lavados com ácido e dos cavacos lavados e autoclavados, foi muito prolongado, provavelmente levando à significativa despolimerização de celulose (20). O mesmo fato deve também ter ocorrido nos cultivos de 28 dias em madeira autoclavada. Nestas condições de cultivo (cavacos lavados e cavacos lavados e autoclavados), o biotratamento por 15 dias poderia resultar em melhores propriedades mecânicas, como observado para os cultivos autoclavados. Estes resultados indicam que apenas os cultivos com cavacos sem nenhum pré-tratamento (cavacos frescos) podem ser prolongados, pois os contaminantes parecem atrasar o desenvolvimento do fungo selecionado.

Os índices de resistência ao rasgo das folhas de teste formadas a partir de cavacos autoclavados e biotratados por 15 dias também foram superiores às folhas controle, com aumento médio de 13% (5,2 mN.m<sup>2</sup>/g e 4,6 mN.m<sup>2</sup>/g, respectivamente, para folhas formadas a partir de polpas com 26 °SR). No caso das amostras autoclavadas e biotratadas por 28 dias, houve redução de até 10% no índice de resistência ao rasgo, para tempo de refino superiores à 120 minutos (4 mN.m<sup>2</sup>/g, 26 °SR). Para as amostras biotratadas com cavacos não autoclavados, também foi verificado aumento, de até 24%, no índice de resistência ao rasgo em relação ao controle (5,7 mN.m<sup>2</sup>/g, 26 °SR). No caso da amostra lavada com ácido, também houve um aumento, de até 50%, no índice de rasgo em relação ao seu controle, sendo que a folha formada a partir de polpa com 26 °SR o índice foi de 5,2 mN.m<sup>2</sup>/g. Já a amostra lavada com ácido e autoclavada apresentou aumento menor em relação ao seu respectivo controle (4,5 mN.m<sup>2</sup>/g, 26 °SR), com incremento médio de 25% (Figura 6).

A construção de um gráfico onde o índice de

resistência ao rasgo é plotado em função do índice de resistência à tração, permite melhor visualização do desempenho geral de propriedades mecânicas as polpas, onde as folhas mais resistentes proporcionam curvas mais deslocadas no sentido direito-superior do gráfico. A Figura 7 mostra este tipo de gráfico, onde é possível notar que a grande maioria das amostras biotratadas proporcionou curvas mais deslocadas ao canto direito-superior que seus respectivos controles. Apenas as amostras biotratadas por 28 dias em madeira autoclavada apresentaram deslocamento no sentido contrário quando suas polpas foram refinadas por mais de 120 minutos.

## CONCLUSÕES

O biotratamento por *P. chrysosporium* em cavacos de *E. grandis* em condições não assépticas com suplementação de milhocina mostrou-se eficaz. Todas amostras biotratadas refinaram mais facilmente que as controles quando submetidas ao processo CTMP. O biotratamento da madeira autoclavada e biotratada por 15 dias e madeira não autoclavada biotratada por 28 dias também resultou em aumento significativo das propriedades mecânicas de suas folhas de teste. No caso das polpas obtidas a partir de madeira autoclavada e biotratada por 28 dias, houve diminuição de propriedades mecânicas no preparo de polpas mais refinadas. Já as amostras tratadas com ácido proporcionaram folhas com índices de tração e de rasgo ligeiramente superiores aos seus respectivos controles, podendo ser melhoradas com um biotratamento em um tempo menor.

## AGRADECIMENTOS

FAPESP, CNPq, CAPES e Melhoramentos Papéis Ltd.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AKHTAR, M.; LENTZ, M. J.; BLANCHETTE, R. A.; KENT KIRK, T. Corn steep liquor lowers the amount of inoculum for biopulping. **Tappi J.**, v. 80 p. 161, 1997.
- [2] AKHTAR, M.; BLANCHETTE, R. A.; MYERS, G.; KENT KIRK, T. 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.
- [3] MOORE-LANDECKER, E. Fungi as saprófitos. **Em Fundamentals of the fungi**. New Jersey : Prentice Hall 1996, p. 371-403.
- [4] SAXENA, R. K.; SANGEETHA, L.; VOHRA, A.; GUPTA, R.; GULATI, R. 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.
- [5] 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 Engenharia Química de Lorena – Lorena - 2005.
- [6] 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.
- [7] LUNDQVIST, F.; BRELID, H.; SALTBERG, A.; GELLERSTEDT, G.; TOMANI, P. Removal of non-process elements from hardwood chips prior to kraft cooking. **Proc. 59<sup>th</sup> Appita and 13<sup>th</sup> ISWFPC**, Auckland - New Zealand, 2005, 147-154.
- [8] LEATHAM, G.F.; MYERS, G.C.; WEGNER, T.H. Biomechanical pulping of aspen chips: Energy savings resulting from different fungal treatments. **Tappi J.**, v. 73 p. 197-200, 1990.
- [9] AKHTAR, M.; ATTRIDGE, M. C.; MYERS, G. C.; BLANCHETTE, R. A. Biomechanical pulping of loblolly pine chips with selected white-rot fungi. **Holzforschung**, v. 47 p. 36-40, 1993.
- [10] SCOTT, G.M.; AKHTAR, M.; SWANEY, R. E.; HOUTMAN, C. J. Recent developments in biopulping technology at Madison. In: VIHKARI, L. LANTTO, R. **Progress in Biotechnology 21-Biotechnology in the Pulp and Paper Industry**, Amsterdam, Elsevier, 2002. p. 61-72.
- [11] 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.
- [12] KUWAHARA, M. GLENN, J. K., MORGAN, M. A. E GOLD, M. H. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*, **FEBS Letters**, v. 169, p. 247-250, 1984.
- [13] LUNDELL, T.; LEONOWICZ, A.; ROGALSKI, J.; HATAKKA, A. Formation and action of lignin-modifying enzymes in cultures of *Phlebia radiata* supplemented with veratric acid. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p. 2623-2629, 1990.
- [14] 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.
- [15] ARCHIBALD, F.S. A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye Azure B. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58. p. 3110-3116, 1992.
- [16] MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic reagent for the determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. v. 31, p. 426-428, 1959.
- [17] 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.
- [18] BIERMANN, C. Pulping Fundamentals. In: BIERMANN, C. **Essentials of Pulping and Papermaking**. New York: Academic Press, 1993. p. 55-100.
- [19] MASARIN, F. **Habilidade degradativa de *Ceriporiopsis subvermispora* e *Phanerochaete chrysosporium* em cultivos sobre madeira de *Eucalyptus grandis* não autoclavada**. Dissertação de mestrado, 89f. Escola de Engenharia de Lorena (USP), Lorena, SP, Brasil, 2006
- [20] GUERRA, A.; MENDONÇA, R.; FERRAZ, A. Molecular weight distribution of wood components extracted from *Pinus taeda* biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33 p. 12-18, 2003



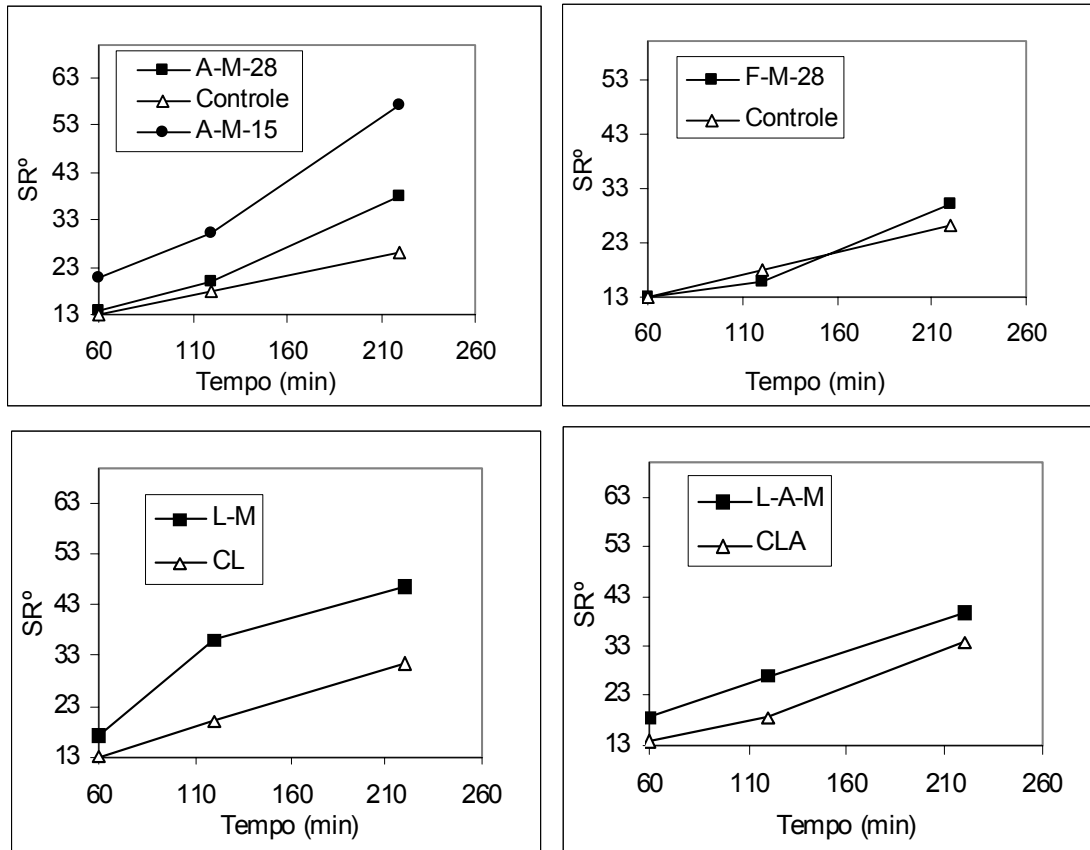


Figura 4 – Curvas de refinamento de cavacos de *E. grandis* pré-digeridos com sulfito alcalino. As diferentes curvas indicam os resultados para a madeira controle autoclavado (Controle), madeira autoclavada e biotratada por 15 e 28 dias (A-M-15 e A-M-28, respectivamente) e madeira não autoclavada e biotratada por 28 dias (F-M-28). Controle lavado com ácido (CL), madeira lavada com ácido e biotratada por 28 dias (L-M). Controle lavado com ácido e autoclavado (CLA), madeira lavada com ácido, autoclavada e biotratada por 28 dias (L-A-M). Todos os cultivos foram suplementados com milhocina e inoculados com uma carga de 5 mg de micélio/kg madeira.

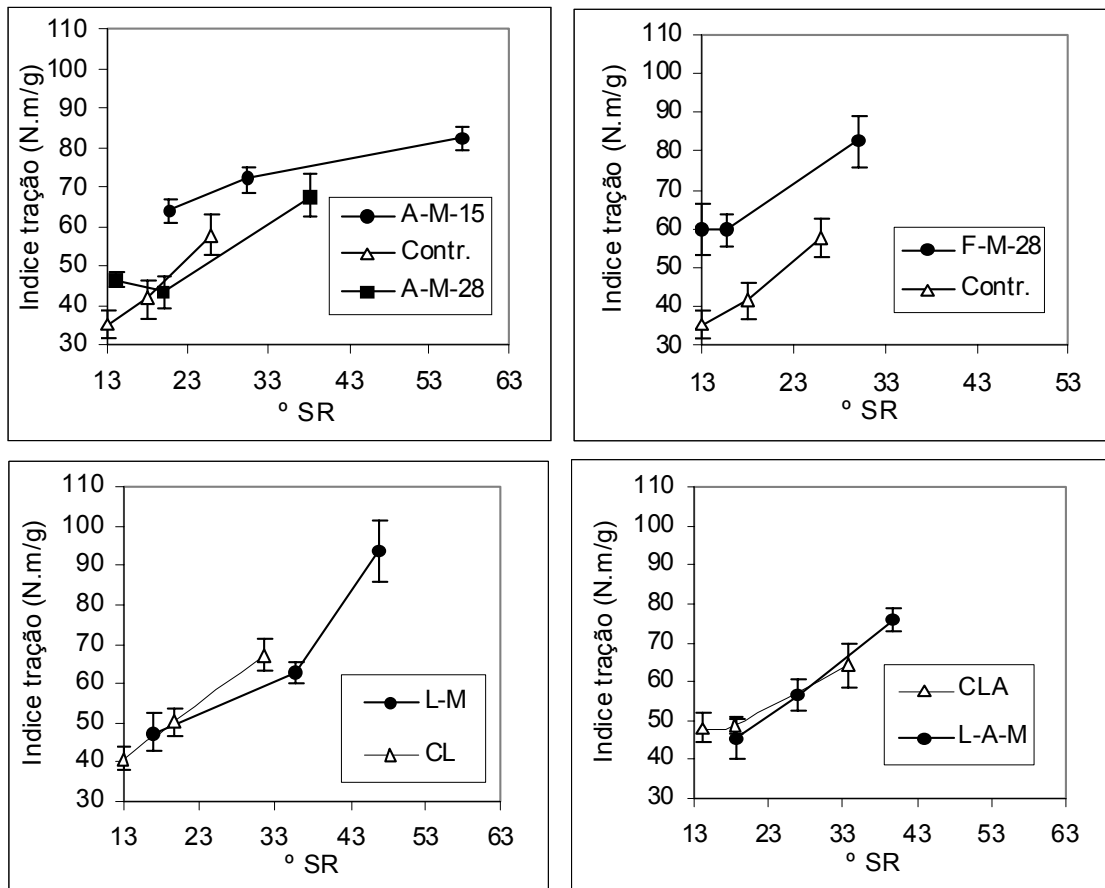


Figura 5 – Curvas de resistência à tração dos cavacos de *E. grandis* pré-digeridos com sulfito alcalino. As diferentes curvas indicam os resultados para a madeira controle autoclavado (Contr.), madeira autoclavada e biotratada por 15 e 28 dias (A-M-15 e A-M-28, respectivamente) e madeira não autoclavada e biotratada por 28 dias (F-M-28). Controle lavado com ácido (CL), madeira lavada com ácido e biotratada por 28 dias (L-M). Controle lavado com ácido e autoclavado (CLA), madeira lavada com ácido, autoclavada e biotratada por 28 dias (L-A-M). Todos os cultivos foram suplementados com milhocina e inoculados com 5 mg de micélio/kg madeira.

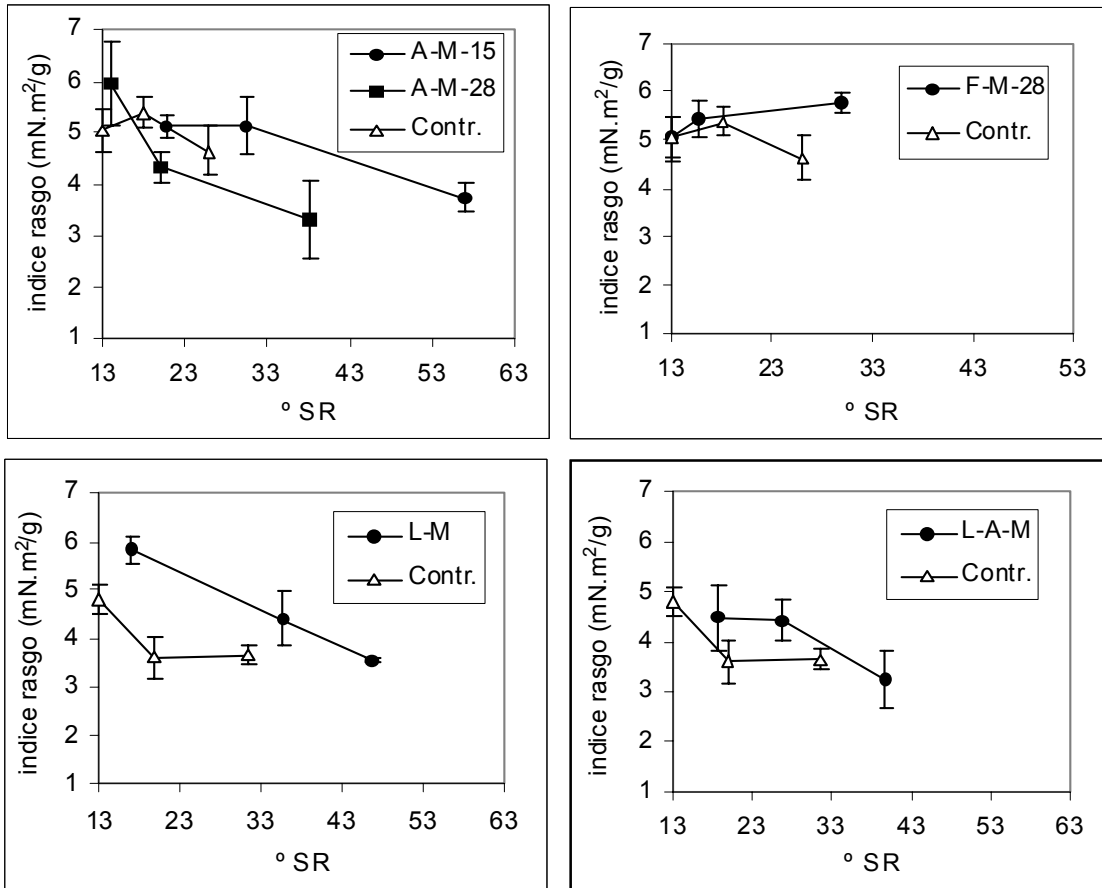


Figura 6 – Índice de resistência ao rasgo de polpas preparadas a partir de cavacos de *E. grandis* pré-digeridos com sulfito alcalino. As diferentes curvas indicam os resultados para a madeira controle autoclavado (Contr.), madeira autoclavada e biotratada por 15 e 28 dias (A-M-15 e A-M-28, respectivamente) e madeira não autoclavada e biotratada por 28 dias (F-M-28). Controle lavado com ácido (Contr.), madeira lavada com ácido e biotratada por 28 dias (L-M). Controle lavado com ácido e autoclavado (Contr.), madeira lavada com ácido, autoclavada e biotratada por 28 dias (L-A-M). Todos cultivos suplementados com milho e inóculo de 5 mg de micélio/kg madeira.

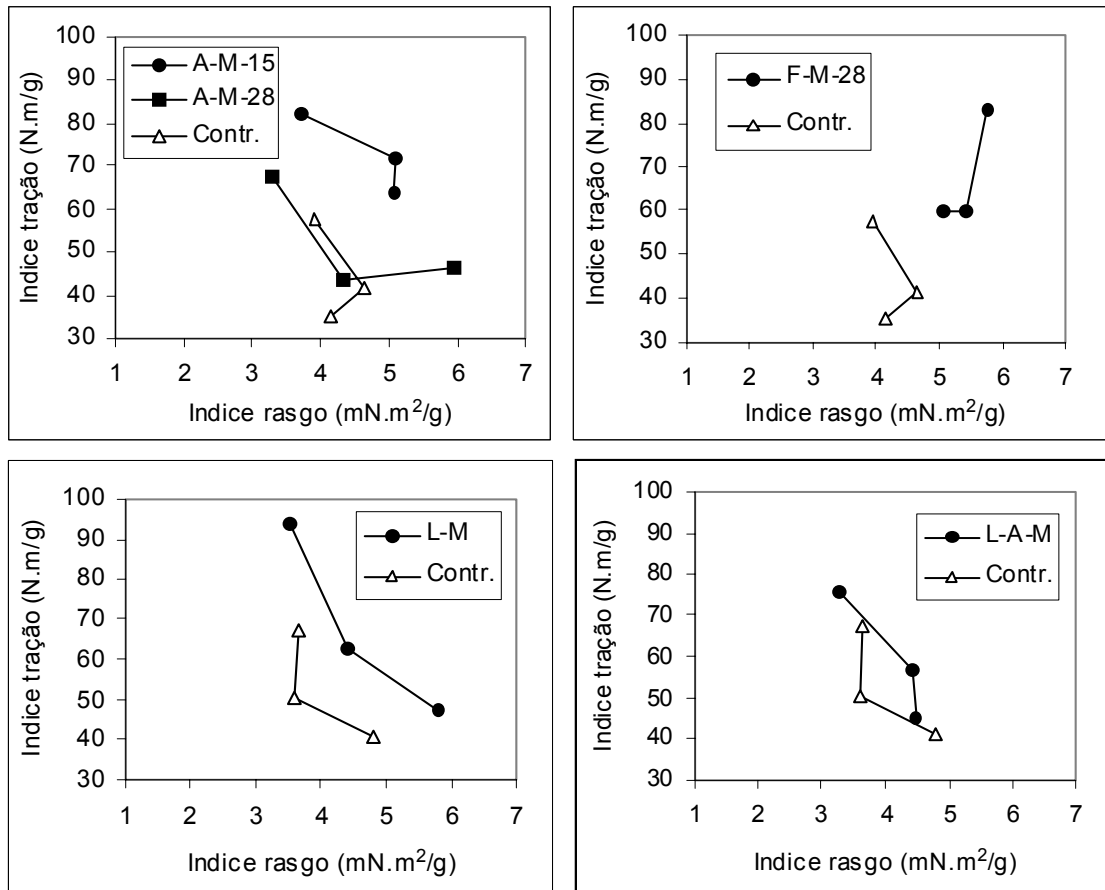


Figura 7 – Índice de resistência rasgo vs índice de resistência à tração de polpas preparadas a partir de cavacos de *E. grandis* pré-digeridos com sulfito alcalino. As diferentes curvas indicam os resultados para a madeira controle autoclavado (Contr.), madeira autoclavada e biotratada por 15 e 28 dias (A-M-15 e A-M-28, respectivamente) e madeira não autoclavada e biotratada por 28 dias (F-M-28). Controle lavado com ácido (Contr.), madeira lavada com ácido e biotratada por 28 dias (L-M). Controle lavado com ácido e autoclavado (Contr.), madeira lavada com ácido, autoclavada e biotratada por 28 dias (L-A-M). Todos os cultivos foram suplementados com milhocina e inoculados com 5 mg de micélio/kg madeira.