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

GINA GABRIELA SEABRA CUNHA

**Biopolpação a partir de cultivos mistos de basidiomicetos sobre
madeira de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urograndis*
(híbrido *E. grandis* x *E. urophilla*)**

**Lorena - SP
2012**

GINA GABRIELA SEABRA CUNHA

**Biopolpação a partir de cultivos mistos de basidiomicetos sobre
madeira de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urograndis*
(híbrido *E. grandis* x *E. urophilla*)**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências do
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Industrial na área de conversão de biomassa.

Orientador: Prof. Dr. André Luis Ferraz

Edição reimpressa e corrigida

**Lorena - SP
Janeiro - 2012**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação

Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Cunha, Gina Gabriela Seabra

Biopolpação a partir de cultivos mistos de basidiomicetos sobre madeira de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urograndis* / Gina Gabriela Seabra Cunha. –ed. reimpr., corr.– 2012.

111 p. : il.

Tese (Doutor em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

Orientador: André Luis Ferraz.

1.

Polpação 2. Basidiomycetes 3. Peroxidase 4. Biodegradação. I.

Título

630*84 - CDU

Aos meus pais, Gino e Angélica, e meus
irmãos Feliciano e Bruna, pelo amor e tudo
de bom que eles têm me proporcionado

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. André Luis Ferraz pela orientação constante, atenção, apoio e empenho.

Ao amigo José Moreira pelo apoio e assistência incondicional, mas acima de tudo pela amizade e companheirismo.

Aos professores Marco Aurélio, Walter Carvalho e André Ferraz pela oportunidade e ensinamentos durante a realização do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino.

À empresa Fibria pela oportunidade de realização de alguns experimentos.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Biotecnologia que me auxiliaram.

Às grandes amizades conquistadas durante todo este tempo, em especial a Priscila, Manuela e Renata pelo incentivo, pelos conselhos, por ouvir meus desabaços e pelo enorme carinho.

Aos inesquecíveis amigos do Debiq pelo companheirismo e bons momentos de descontração.

À FAPESP pela bolsa e auxílio financeiro concedido.

“Tenho pensamentos que se pudesse revelá-los e fazê-los viver, acrescentariam nova luminosidade às estrelas, nova beleza ao mundo e maior amor ao coração dos homens”

Fernando Pessoa

RESUMO

CUNHA, G. G. S. **Biopolpação a partir de cultivos mistos de basidiomicetos sobre madeira de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urograndis* (híbrido *E. grandis* x *E. urophilla*)**. 2011. 111 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2012.

A biopolpação consiste no biotratamento de madeira por fungos degradadores de lignina como etapa prévia à produção de polpa celulósica. De uma forma geral, as madeiras biotratadas facilitam os processos posteriores de polpação. Entretanto, ensaios anteriores que avaliaram a biopolpação em escala piloto mostraram que é difícil estabelecer os cultivos de basidiomicetos de interesse livre de bolores contaminantes, já que não é fácil controlar perfeitamente a assepsia durante a inoculação. Para contribuir com o avanço do processo de biopolpação, este trabalho avaliou os cultivos mistos de *Ceriporiopsis subvermispora* e *Phanerochaete chrysosporium* sobre madeira de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urograndis* em regimes de incubação em temperaturas variáveis e em condições não assépticas. A estratégia de iniciar os cultivos em temperatura mais elevada (37°C) e depois manter as culturas em temperaturas variáveis de 27°C e 37°C se mostrou eficiente para inibir o crescimento de contaminantes indesejáveis tanto nos cultivos mistos como nos individuais de cada espécie avaliada. Para avaliar o efeito do biotratamento da madeira numa etapa subsequente de polpação quimiotermomecânica (CTMP) foi feito um estudo preliminar de ajuste de variáveis de polpação por refinamento mecânico de cavacos pré-digeridos com licor alcalino contendo sulfito de sódio. Os dados mostraram que é possível simular o rendimento e as características físico-mecânicas de polpas industriais empregando uma etapa de pré-digestão dos cavacos com 6% de Na₂SO₃ e 3% de NaOH a 120°C por 2 h, seguida de desfibramento e refino em refinador de discos. As curvas de refino nesse processo CTMP mostraram que os cavacos biotratados deram origem a polpas com 300 mL de Freeness (CSF) consumindo menos energia do que o observado para o refino da madeira controle. As economias de energia chegaram a 60% em alguns casos, porém não foram maximizadas pelo efeito sinérgico do cultivo misto dos dois basidiomicetos em questão. Experimentos adicionais foram desenvolvidos empregando as espécies fúngicas *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes versicolor* que foram eficientes para competir com contaminantes mesmo a 27°C. Neste caso, as economias de energia no processo CTMP subsequente somente foram obtidas com tempos mais longos de biotratamento (30 dias) e ainda assim os valores obtidos foram inferiores àqueles obtidos com as madeiras biotratadas por *C. subvermispora* e *P. chrysosporium*. Também a combinação das espécies *C. subvermispora* e *Pleurotus ostreatus* foi avaliada. Neste caso havia informação prévia da literatura indicando um efeito sinérgico da ação das duas espécies no que diz respeito a secreção da enzima manganês-peroxidase (MnP) e na degradação de lignina. Os resultados corroboraram que os cultivos mistos de *C. subvermispora* e *P. ostreatus* proporcionam maior produção de MnP do que os cultivos individuais de cada espécie. Por outro lado, *P. ostreatus* foi ineficiente para promover a redução do consumo de energia no processo CTMP subsequente. Os cultivos mistos também não proporcionaram efeito superior àquele observado com o cultivo individual de *C. subvermispora*.

PALAVRAS-CHAVE: Polpação. Basidiomycetes. Peroxidase. Biodegradação

ABSTRACT

CUNHA, G. G. S. **Biopulping based on mixed cultures of basidiomycetes on *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urograndis* (*E. grandis* x *E. urophilla* hybrids) wood chips.** 2011. 111 p. Thesis (Doctoral in Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2012.

Biopulping involves the wood biotreatment by selected white-rot fungi as a pretreatment step of conventional pulping processes. In general, the biotreated wood facilitates the subsequent pulping processes. However, previous studies on pilot scale showed that the process is susceptible to contamination by molds when the inoculation and biodegradation steps are carried out under non-aseptic conditions. To contribute with the biopulping progress this study evaluated the use of mixed cultures of *Ceriporiopsis subvermispora* and *Phanerochaete chrysosporium* acting on *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urograndis* wood under non aseptic conditions where incubation was performed at varied temperatures. The simple strategy of initiating the incubation at 37°C for 3 days followed by a non-controlled step where the temperature could oscillate in the range of 27°C to 37°C proved to be efficient to inhibit the growth of contaminants. To evaluate the wood biotreatment effect in a subsequent step of chemithermomechanical pulping (CTMP), a preliminary study to adjust pulping variables was performed. Wood chips were pre-digested with alkaline-sulfite liquor, fibrillated and refined in a disk refiner. It was possible to simulate the yield and physico-mechanical properties of industrial CTMP pulps using a pre-digestion stage with 6% of Na₂SO₃ and 3% of NaOH at 120°C for 2 h. The refining curves in the CTMP process showed that the biotreated chips required less energy to reach 300 mL of Freeness (CSF) in the pulps than energy required to refine the control wood chips. Energy savings reached 60% in some cases, but were not maximized by the eventual synergic effect of the mixed cultures of the two basidiomycetes. Additional experiments were developed using the fungal species *Trametes versicolor* and *Pycnoporus sanguineus* that were efficient to compete with contaminants even at 27°C. In this case, the energy savings in the subsequent CTMP process were obtained only after long biotreatment times (30 days) and these values were lower than those obtained with the biotreated wood by *C. subvermispora* and *P. chrysosporium*. The combination *C. subvermispora* and *Pleurotus ostreatus* was also evaluated. In this case, previous literature information indicated some synergic effect of the two species regarding secretion of manganese peroxidase (MnP) and lignin degradation. The results corroborated that the mixed cultures of *C. subvermispora* and *P.ostreatus* provided an increased production of MnP compared to the individual cultivation of each species. On the other hand, *P.ostreatus* was not efficient to promote energy savings in the subsequent CTMP process. The mixed cultures did not provide increased energy savings as compared with the individual biotreatment with *C. subvermispora*.

KEYWORDS: Pulping. Basidiomycetes. Peroxidase. Biodegradation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Micrografia de polpa não refinada (A) e de polpa obtida após a etapa de refino (B)	21
Figura 2. Fibra refinada em um processo de polpação termomecânica onde se nota claramente a fibrilação externa.	21
Figura 3. Finos e fragmentos de fibras em uma suspensão de fibras (A). Células de parênquima que também integram a fração de finos em uma polpa de eucalipto (B). As setas indicam, respectivamente, um fragmento de fibra (em A) e uma célula de parênquima (em B).	23
Figura 4. Biorreatores de polipropileno de 20L (A); Sacos de polipropileno de 20L (B).....	40
Figura 5. (A) Refinador de discos modelo Bauer MD-300, onde as polpas são refinadas por esmagamento das fibras (a 2% de consistência) entre os dois discos, sendo que um deles é fixo e o outro gira, acionado por um motor elétrico; (B) Refinador <i>Jökro</i> , onde as polpas são refinadas por moagem das fibras (a 11% de consistência) que ficam presas à superfície interna da câmara e sofrem a ação do moente que gira no interior da câmara por movimentação orbital da mesa.....	49
Figura 6. Curva de refino de polpas CTMP de <i>E. grandis</i> preparadas a partir das condições definidas no experimento número 7 descrito na Tabela 2.....	52
Figura 7. Propriedades mecânicas das folhas formadas a partir de polpas controle de <i>E. grandis</i> em função do grau de refino. Resistência à tração (A); Resistência ao estouro (B); Resistência ao rasgo (C).....	55
Figura 8. Características das fibras de polpas CTMP de <i>E. grandis</i> em função do refino em refinador de discos. Comprimento médio das fibras ponderado por comprimento (A); Largura média das fibras (B); e Teor de finos (C)	57
Figura 9: Curva de refino de polpas CTMP de <i>E. grandis</i> preparadas a partir de madeira controle (●); Madeira biotratada no cultivo misto de <i>C. subvermispota</i> com <i>P. chrysosporium</i> (◆) e; Madeira de referência para o processo de biopolpação (autoclavada e biotratada por <i>C. subvermispota</i> em condições assépticas e previamente otimizadas que incluem a adição de 0,5% de milhocina aos cultivos (Vicentim e Ferraz, 2008)) (■).....	61
Figura 10. Curva de refino de polpas CTMP de <i>E. grandis</i> preparadas a partir de madeira controle (●); madeira de cultivo misto de <i>C. subvermispota</i> com <i>P. chrysosporium</i> (◆); somente <i>C. subvermispota</i> (▲); somente <i>P. chrysosporium</i> (●); Referência inoculada com <i>C. subvermispota</i> em condições assépticas e meio otimizado (Vicentin e Ferraz, 2008) (■)	64
Figura 11. Características das fibras de polpas CTMP de <i>E. grandis</i> em função do refino em refinador de discos. Comprimento médio das fibras ponderado por comprimento (A); Largura média das fibras (B); e Teor de finos (C). Controle (●); Cultivo misto de <i>C. subvermispota</i> com <i>P. chrysosporium</i> (◆); somente <i>C. subvermispota</i> (▲); somente <i>P. chrysosporium</i> (●).....	67
Figura 12. Curva de refino de polpas CTMP de <i>E. grandis</i> preparadas a partir de madeira controle (●); Madeira biotratada com <i>C. subvermispota</i> por 15 dias (▲);	

e 30 dias (◆); Referência inoculada com <i>C. subvermispora</i> em condições assépticas e meio otimizado (Vicentin e Ferraz, 2008) (■).....	69
Figura 13. Curva de refino de polpas CTMP de <i>E. grandis</i> preparadas a partir de madeira controle (●); Madeira biotratada com <i>P. chrysosporium</i> por 15 dias (▲); e 30 dias (◆); Referência inoculada com <i>C. subvermispora</i> em condições assépticas e meio otimizado (Vicentin e Ferraz, 2008) (■).....	69
Figura 14. Características das fibras de polpas CTMP de <i>E. grandis</i> em função do refino em refinador de discos. Comprimento médio das fibras ponderado por comprimento (A); Largura das fibras (B), e Teor de finos (C). Controle (●); <i>C. subvermispora</i> por 15 dias (▲); <i>C. subvermispora</i> por 30 dias (◆); <i>P. chrysosporium</i> por 15 dias (▲); <i>P. chrysosporium</i> por 30 dias (◆).....	72
Figura 15. Perfil de refinamento de polpas CTMP de <i>E. urograndis</i> . Controle (●); Madeira biotratada com <i>C. subvermispora</i> por 15 dias (▲).....	74
Figura 16. Propriedades mecânicas das folhas formadas a partir de polpas controle e biotratadas por <i>C. subvermispora</i> de <i>E. urograndis</i> , em função do grau de refino. Resistência a Tração (A); Resistência ao Rasgo (B); Resistência ao Estouro (C); Contraposição dos índices de resistência à tração e ao rasgo das folhas (D). Polpa controle (●); polpa biotratada com <i>C. subvermispora</i> (○).....	76
Figura 17. Características das fibras de polpas CTMP de <i>E. urograndis</i> em função do refino em refinador de discos. Comprimento médio das fibras ponderado por comprimento (A); Largura das fibras (B), e Teor de finos (C). Controle (●); somente <i>C. subvermispora</i> (▲).	78
Figura 18. Porosidade gurley das folhas formadas a partir de polpas controle e biotratadas por <i>C. subvermispora</i> de <i>E. urograndis</i> . Polpa controle (●); polpa biotratadas com <i>C. subvermispora</i> (○).	80
Figura 19. Perfil de refinamento de polpas CTMP de <i>E. grandis</i> biotratadas com <i>T. versicolor</i> em função do consumo de energia. Controle (●); <i>T. versicolor</i> – 15 dias (▲); <i>T. versicolor</i> – 30 dias (◆); Referência (■).	81
Figura 20. Perfil de refinamento de polpas CTMP de <i>E. grandis</i> biotratadas com <i>P. sanguineus</i> em função do consumo de energia. <i>P. sanguineus</i> – 15 dias (▲); Controle (●); <i>P. sanguineus</i> – 30 dias (◆); Referência (■).....	82
Figura 21. Características das fibras de polpas CTMP de <i>E. grandis</i> em função do refino em refinador de discos. Comprimento médio das fibras ponderado por comprimento (A); Largura das fibras (B), e Teor de finos (C). Controle (●); <i>P. sanguineus</i> (◆); <i>T. versicolor</i> (◆).	84
Figura 22. Perfil de refinamento de polpas CTMP de <i>E. urograndis</i> biotratadas por <i>P. ostreatus</i> e <i>C. subvermispora</i> , em função do consumo de energia. Somente <i>P. ostreatus</i> (●); cultivo misto de <i>C. subvermispora</i> com <i>P. ostreatus</i> (◆); controle (●); somente <i>C. subvermispora</i> (▲).	89
Figura 23. Perfil de refinamento de polpas CTMP de <i>E. grandis</i> biotratadas com <i>P. ostreatus</i> em condições variadas de co-substrato. Controle (●); <i>P. ostreatus</i> suplementado com milhocina (▲); <i>P. ostreatus</i> sem suplementação (◆); Referência (■).....	92
Figura 24. Perfil de refinamento de polpas CTMP de <i>E. grandis</i> biotratadas com <i>C. subvermispora</i> em condições variadas de co-substrato. Controle (●); <i>C.</i>	

<i>subvermispora</i> sem suplementação (◆); <i>C. subvermispora</i> suplementado com milhocina (▲); Referência (■).	93
Figura 25. Perfil de refinamento de polpas CTMP de <i>E. grandis</i> biotratadas com <i>C. subvermispora</i> e <i>P. ostreatus</i> em condições variadas de co-substrato. Controle (●); Cultivo misto sem suplementação (◆); Cultivo misto suplementado com milhocina (▲); Referência (■)	93
Figura 26. Correlação entre os níveis de MnP detectados em cultivos individuais e mistos de <i>C. subvermispora</i> e <i>P. ostreatus</i> e a economia de energia observada num processo CTMP subsequente usado para preparar polpas com 300 mL de CSF.....	95
Figura 27. Correlação entre a atividade de MnP produzida em cultivos de <i>E. grandis</i> por <i>C. subvermispora</i> com o grau de fibrilação de polpas CTMP após 90 minutos de refino em refinador <i>Jökro</i> (reproduzido de Vicentim e Ferraz (2008)).....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis avaliadas frente ao processo de polpação CTMP de <i>E. grandis</i> em refinador Bauer.....	45
Tabela 2. Dados experimentais de rendimento de polpa obtidos a partir na polpação CTMP de <i>E. grandis</i>	50
Tabela 3. Características do processo de polpação CTMP de <i>E. grandis</i> biotratado por 30 dias por <i>C. subvermispota</i> e <i>P. chrysosporium</i> : economia de energia, teor de palitos e rendimento de polpação.	65
Tabela 4. Características do processo de polpação CTMP de <i>E. grandis</i> biotratado com <i>C. subvermispota</i> e <i>P. chrysosporium</i> : economia de energia, teor de palitos e rendimento de polpação.	70
Tabela 5. Características do processo de polpação CTMP de <i>E. urograndis</i> biotratados com <i>C. subvermispota</i> e controle: economia de energia, teor de palitos e rendimento de polpação.....	74
Tabela 6. Grau de Fibrilação das polpas controle e biopolpas de <i>E. urograndis</i> após a etapa de polpação CTMP.....	79
Tabela 7. Características do processo de polpação CTMP de <i>E. grandis</i> biotratados com <i>P. sanguineus</i> e <i>T. versicolor</i> : economia de energia, teor de palitos e rendimento da etapa química.....	82
Tabela 8. Atividades enzimáticas obtidas durante a biodegradação de <i>E. urograndis</i> por <i>C. subvermispota</i> e <i>P. ostreatus</i>	88
Tabela 9. Características do processo de polpação CTMP de <i>E. urograndis</i> biotratados com <i>C. subvermispota</i> e <i>P. ostreatus</i>	89
Tabela 10. Atividades enzimáticas provenientes da biodegradação de <i>E. grandis</i> por <i>C. subvermispota</i> e <i>P. ostreatus</i>	91
Tabela 11. Características do processo de polpação CTMP de <i>E. grandis</i> biotratados com <i>C. subvermispota</i> e <i>P. ostreatus</i> em condições variadas de co-substrato: economia de energia, teor de palitos e rendimento da etapa química.	94

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 Polpação.....	18
2.2 Características morfológicas das fibras geradas no processo de polpação	20
2.3 Biopolpação	23
2.4 Ação simultânea de várias espécies de fungos sobre madeira e a competição entre as espécies	25
2.5 Espécies fúngicas utilizadas no processo de biopolpação: <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Trametes versicolor</i> e <i>Pycnoporus sanguineus</i>	29
3 OBJETIVO	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Fungos.....	37
4.2 Madeira	37
4.3 Preparação do inóculo.....	38
4.4 Experimentos de biodegradação	38
4.5 Extração da madeira biotratada com solução tampão suplementada com tween 60 para recuperação de enzimas	42
4.5.1 Manganês peroxidase (<i>MnP</i>).....	42
4.5.2 <i>Lacases</i>	42
4.5.3 <i>Endocelulases</i>	43
4.5.4 <i>Xilanases totais</i>	43
4.6 Ajuste de variáveis que afetam o processo de polpação CTMP de <i>E. grandis</i> em refinador Bauer	44
4.7 Polpação CTMP da madeira biotratada	46
4.8 Análise morfológica de fibras.....	46
4.9 Formação de folhas e análise de suas propriedades físico-mecânicas.....	47

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 Ajuste de variáveis de processo na polpação quimiotermomecânica (CTMP) de <i>E. grandis</i>	48
5.2 Biopolpação usando <i>C. subvermispota</i> e <i>P. chrysosporium</i>	58
5.3 Biopolpação usando <i>P. sanguineus</i> e <i>T. versicolor</i>	80
5.4 Biopolpação em cultivos mistos de <i>C. subvermispota</i> e <i>P. ostreatus</i>	87
6 CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS	99

1 INTRODUÇÃO

A biodegradação de madeira por fungos de decomposição branca pode ser utilizada como um pré-tratamento benéfico em processos de produção de celulose e papel. A aplicação da biodegradação de madeira, sob condições controladas e com fungos pré-selecionados, como pré-tratamento aos processos de polpação, tem demonstrado grande êxito, principalmente quando utilizada previamente à polpação mecânica. Essa combinação tem sido denominada de polpação biomecânica e a aplicação desse bioprocessos permite reduzir consideravelmente o consumo de energia no desfibramento/refino mecânico posterior.

A biopolpação tem sido avaliada não somente em escala de laboratório, mas também em 2 plantas piloto (uma em Madison, WI, USA e outra em Caieiras, SP, Brasil). Os ensaios em escala piloto desenvolvidos em Caieiras têm mostrado que é difícil estabelecer cultivos dos basidiomicetos de interesse livre de bolores contaminantes. Isso porque não é simples controlar a assepsia durante a inoculação e o biotratamento de cavacos em larga escala e em pilhas abertas (FERRAZ et al., 2008; MASARIN; FERRAZ, 2008).

Uma alternativa possível para esses problemas seria o emprego de cultivos mistos de basidiomicetos. Em algumas situações, esses cultivos permitem a maximização das capacidades degradativas dos basidiomicetos quando estão competindo por um mesmo substrato. Essa abordagem é bastante inovadora, pois, no caso específico da biopolpação, além de melhorar a ação degradativa sobre a lignina da madeira, permitiria também estabelecer cultivos nos quais o controle de temperatura não seria uma etapa crítica, desde que se combinassem basidiomicetos que possam atuar em temperaturas variáveis e complementares, cobrindo a região entre 25 e 40°C.

No presente trabalho, cultivos mistos de *Ceriporiopsis subvermispora* e *Phanerochaete chrysosporium* foram avaliados com o objetivo de estabelecer condições degradativas da madeira que maximizem os benefícios do pré-tratamento biológico para um processo posterior de polpação quimiotermomecânica. A abordagem experimental foi centrada no uso desses dois basidiomicetos, pois eles são seletivos para a degradação de lignina em madeiras de folhosas e apresentam temperaturas ótimas de crescimento complementares (27 e 37°C, respectivamente). Isso permitiria manter a ação degradativa da madeira numa faixa ampla de temperatura, além de permitir que os cultivos tenham início em temperaturas mais elevadas (cerca de 40°C), o que já se demonstrou efetivo para

minimizar a ocorrência de bolores primários atuando como contaminantes em cultivos com baixo controle de assepsia. Um estudo exploratório com outras espécies fúngicas como *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* e *Pycnoporus sanguineus* também foi conduzido. Os processos de polpação foram avaliados a partir do monitoramento do consumo de energia em refinadores de disco, bem como através da determinação de características morfológicas das fibras contidas nas biopolpas e das propriedades mecânicas de folhas de papel preparadas com as amostras em estudo. Algumas atividades metabólicas também foram monitoradas quando a etapa de biotratamento envolveu espécies que previamente mostraram interação sinérgica para a degradação de lignina e a secreção da enzima manganês peroxidase, *C. subvermispora* e *P. ostreatus*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O entendimento do processo de biopolpação depende do estudo multidisciplinar que envolve as características químicas e ultra-estruturais dos materiais lignocelulósicos, os aspectos químicos e bioquímicos envolvidos na biodegradação da madeira, bem como as particularidades dos processos industriais de polpação. No corpo do trabalho abordaremos principalmente a revisão bibliográfica relativa aos tópicos que sustentam a pesquisa especificamente proposta, ou seja, o uso de cultivos mistos de basidiomicetos sobre madeira e o processo de biopolpação.

2.1 Polpação

A polpação é a técnica mais importante na conversão de madeira em polpa celulósica, sendo o objetivo principal a fabricação de papéis dos mais variados fins. A separação das fibras para obtenção da polpa celulósica é realizada por processos químicos e/ou mecânicos. Nos processos mecânicos, o desfibramento da madeira é causado pelo atrito de troncos contra uma superfície abrasiva em rotação ou pelo desfibramento de cavacos em refinadores de disco que também giram a altas velocidades. Isso causa o colapso da lignina e consequente rompimento da estrutura lamelar, liberando as fibras da madeira. Como grande parte da lignina permanece retida na polpa, o rendimento desses processos é elevado, usualmente entre 90% e 95%. Apesar da relativa simplicidade de instalação de uma planta industrial, os processos mecânicos de polpação consomem grande quantidade de energia elétrica durante o desfibramento dos cavacos de madeira e também

na etapa posterior de refino, para que as polpas atinjam propriedades específicas para a fabricação de papel. São considerados como processos mecânicos de polpação a moagem com pedra (SGW), a moagem com pedra sob pressão (PGW), a polpação mecânica por refinamento (RMP), a polpação termomecânica (TMP), a polpação quimiomecânica (CMP) e a polpação quimiotermomecânica (CTMP) (BIERMANN, 1993; EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009).

Nos processos de polpação química, a liberação das fibras ocorre por meio da fragmentação e solubilização da lignina e parte das polioses no licor de cozimento. Os processos kraft e sulfito destacam-se por serem os mais desenvolvidos na produção de polpas químicas, pois geram polpas com qualidade superior às polpas mecânicas, devido a remoção eficiente da lignina. O processo kraft é o mais empregado mundialmente, tendo como principais agentes de deslignificação da madeira o hidróxido de sódio (NaOH) e o sulfeto de sódio (Na₂S). Apesar de proporcionar polpas de boa resistência mecânica, uma das desvantagens deste processo é a dificuldade de branquear as polpas. O processo apresenta ainda um baixo rendimento devido à solubilização da lignina e à degradação parcial dos polissacarídeos e ocorre ainda a emissão indesejada de mercaptanas na atmosfera (BIERMANN, 1993; EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009).

No processo sulfito os agentes de deslignificação da madeira são soluções de ácido sulfuroso e/ou seus sais que geram íons sulfito (SO_3^{2-}) ou bissulfito (HSO_3^-) durante o cozimento. Os processos sulfito diferem entre si em função dos sais utilizados e do pH do licor de cozimento. As polpas sulfito apresentam maior alvura em relação às polpas kraft, são refinadas mais rapidamente, portanto há menor consumo de energia elétrica, e o rendimento é maior. Entretanto, elas apresentam menor resistência mecânica do que as polpas kraft e o processo de recuperação dos reagentes inorgânicos é mais complexo e menos eficiente do que o do processo kraft (BIERMANN, 1993; EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009). É bastante comum existir uma combinação do processo sulfito com a polpação mecânica nos processos de polpação denominados quimiotermomecânicos. Nestes casos, usualmente a severidade da etapa química é baixa o que demanda uma segunda etapa de desfibramento/refino mecânica (BIERMANN, 1993).

2.2 Características morfológicas das fibras geradas no processo de polpação

Nos processos de produção de celulose e papel busca-se obter elevada produtividade e qualidade dos produtos com o mínimo possível de custos e o máximo de eficiência. Para esse fim, testes de rotina são realizados para fins de controle dos processos de produção, bem como para caracterizar a qualidade do produto para o cliente. A caracterização de uma polpa é uma ferramenta importante para a melhoria e desenvolvimento de novos produtos. O comportamento "papeleiro" de uma polpa depende de fatores múltiplos que incluem as características morfológicas das fibras, a composição química das polpas e os efeitos inerentes ¹ao tipo de processo empregado na produção da polpa e do papel (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009; FOELKEL, 2007).

As características das fibras se diferenciam principalmente de acordo com sua origem. As madeiras de folhosas apresentam fibras curtas medindo entre 1 e 1,5 mm, enquanto as de coníferas medem entre 3 e 5 mm, conforme IPT¹ (1998 apud BITTENCOURT, 2004). As fibras mais longas permitem um maior número de pontos de contato, o que está relacionado com a maior resistência mecânica intrínseca da folha de papel preparada com polpas de coníferas, segundo Ek, Gellerstedt e Henriksson, 2009 e Manfredi² (1998 apud SILVA, 2002). Entretanto, o comprimento das fibras e o próprio formato, de forma geral são diretamente afetados pelos processos de polpação e refino. Durante o refino as fibras são submetidas a uma ação mecânica que acarreta primariamente no maior adensamento da massa fibrilar (Figura 1) o que por si só aumenta a interação entre as fibras. Além disso, algumas características morfológicas das fibras também são alteradas, pois o refinamento reduz o comprimento das fibras e introduz modificações na sua secção transversal, que pode incluir fibrilação interna e externa (Figura 2), bem como o escamamento da superfície externa em situações de refino intenso.

¹ IPT. **Celulose e papel**: tecnologia de fabricação da pasta celulósica. São Paulo: IPT. 2 ed. v. 2, 1998.

² MANFREDI, V. **O refino da celulose**. In: Curso de especialização em papel. Módulo 6 – preparação da massa. ABTCP/UFV: Mucuri, 1998, 42 p.

Figura 1. Micrografia de polpa não refinada (A) e de polpa obtida após a etapa de refino (B)
Fonte: Ek, Gellerstedt e Henriksson, 2009.

Figura 2. Fibra refinada em um processo de polpação termomecânica onde se nota claramente a fibrilação externa.
Fonte: Metso Automation, 2006.

O comprimento médio das fibras pode ser expresso de três formas: comprimento aritmético, comprimento ponderado por comprimento e comprimento ponderado por peso. O comprimento médio ponderado por comprimento é o mais utilizado porque se relaciona melhor com as propriedades do papel e não é tão dependente da proporção de finos (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009).

A largura da fibra é outra característica muito importante para as propriedades do papel. Fibras mais largas produzirão papéis com menor resistência a passagem do ar, maior volume específico aparente e maior resistência ao rasgo. As resistências à tração são prejudicadas quando as fibras são mais largas, devido ao ajuste imperfeito das fibras no papel, prejudicando as ligações entre fibras (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009). A espessura da parede é uma característica anatômica tão importante quanto a largura da fibra e geralmente está relacionada com a rigidez da fibra. Durante o processo de refino, as fibras com maiores espessuras de parede podem sofrer maior fibrilação, o que aumenta o

potencial de ligações interfibrilares. Este processo aumenta a área de ligação entre as fibras e, conseqüentemente, a resistência à tração do papel (CARVALHO et al., 1998). Segundo os autores, fibras com maiores espessuras de parede sofrem maior efeito de hidratação e inchamento, aumentando ainda mais seu volume, gerando maior área para ligações e, desta forma, proporcionando condições para maiores resistências mecânicas do papel.

Durante a polpação mecânica, as fibras são submetidas a ações mecânicas severas. O tratamento simultâneo dos cavacos em meio contendo sulfito alcalino permite a remoção parcial de componentes, a sulfonação de parte da lignina residual (o que a torna menos hidrofóbica) e o meio alcalino promove o inchamento das paredes celulares. Estes efeitos combinados caracterizam o processo de polpação quimiotermomecânica e promovem o enfraquecimento da rede de microfibrilas que se torna mais frouxa e fraca, tornando o processo de refino mais eficiente e menos drástico em termos de danos mecânicos às fibras. Entretanto, a resistência intrínseca da fibra é prejudicada, pois as mesmas se tornam mais fracas e mais sensíveis a deformações causadas pelas forças aplicadas no processo. Em casos extremos, as fibras podem quebrar e gerar fragmentos de menor tamanho ou, nos casos menos severos, podem sofrer deformações comumente definidas como uma curvatura gradual e contínua (Curl index) ou como curvatura torcida das fibras (kink index). Estas alterações podem reduzir a resistência das fibras individuais e por extensão a resistência da polpa e do papel. No entanto, provocam melhorias na porosidade, volume específico, absorção e maciez das folhas de papel (FOELKEL, 2007).

Outro aspecto importante na qualidade de um papel está relacionado com o teor de finos presentes na polpa de origem. Os finos incluem as células de parênquima e também os fragmentos de fibras e elementos de vasos que são gerados nos processos de polpação (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009) (Figura 3). Os finos são formados em maior quantidade quando as fibras são refinadas, afetando a drenagem da folha úmida nas máquinas de papel e proporcionando uma alta densidade na folha. Por outro lado, uma polpa sem finos apresenta baixa interação entre as fibras e baixa resistência físico-mecânica. Propriedades como porosidade, absorção, permeabilidade e volume específico são melhorados no papel quando há finos na massa fibrosa (FOELKEL, 2007).

Figura 3: Finos e fragmentos de fibras em uma suspensão de fibras (A). Células de parênquima que também integram a fração de finos em uma polpa de eucalipto (B). As setas indicam, respectivamente, um fragmento de fibra (em A) e uma célula de parênquima (em B).

Fonte: Foelkel, 2007; Queiroz, 2002.

2.3 Biopolpação

Os processos de polpação podem ser associados a um pré-tratamento biológico dos cavacos de madeira para a produção subsequente de polpas químicas e/ou mecânicas. Essa combinação de processos tem sido denominada como biopolpação. O pré-tratamento biológico tem sido bastante estudado nos últimos anos devido aos benefícios que ele pode proporcionar. No processo de polpação mecânica pode-se diminuir o consumo de energia durante o desfibramento e o refinamento dos cavacos, enquanto menores demandas de insumos químicos e/ou tempo de cozimento podem ser obtidas em processos de polpação química ao se utilizar cavacos biotratados. A biopolpação consiste na habilidade de alguns fungos de podridão branca em degradar os extrativos, a lignina e as polioses seletivamente nos estágios iniciais de colonização da madeira, mantendo a celulose praticamente intacta. 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. Dentre as várias espécies de fungos estudadas para o processo de biopolpação, uma tem se destacado, trata-se do basidiomiceto *C. subvermispora* (AKHTAR et al., 1998; FERRAZ et al., 2008).

A madeira biotratada também tem sido avaliada frente ao processo de polpação CTMP. Este processo produz polpas com melhores propriedades mecânicas do que aquelas

obtidas no processo TMP (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009). Guerra, Mendonça e Ferraz (2005) demonstraram que o biotratamento de cavacos de *E. grandis* por *C. subvermispora* proporcionou redução de até 45 min nos tempos de refinamento das biopolpas, além de leve aumento de suas propriedades mecânicas, principalmente quanto à resistência à tração. No processamento CTMP industrial de cavacos de *E. grandis* biotratados em escala piloto, foi verificada economia de até 27% do total de energia nas etapas de desfibramento e refinamento, tendo as polpas apresentado propriedades mecânicas semelhantes às convencionais (FERRAZ et al., 2008).

O pré-tratamento de cavacos de madeira com fungos ligninolíticos seguido de polpação química tem recebido menor atenção quando comparado aos processos de polpação biomecânica. A maioria dos trabalhos publicados está relacionada 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 (BAJPAI et al., 2001; ORIARAN; LABOSKY; BLAKEHORN 1990). Por outro lado, alguns trabalhos demonstram 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 (AKHTAR, 1998; FERRAZ; CHRISTOV; FERRAZ et al., 2000, FERRAZ; MENDONÇA; SILVA, 2000; MENDONÇA; GUERRA; FERRAZ, 2002). No trabalho de Mendonça, Guerra e Ferraz (2002), por exemplo, o biotratamento de *Pinus taeda* por *C. subvermispora* por períodos entre 15 e 60 dias permitiu a redução de até 4,1 % no teor de álcali ativo para a produção de polpa kraft com Kappa 80, e os rendimentos de polpação a partir da madeira biotratada foram levemente superiores aos obtidos a partir de madeira não-biotratada. As polpas preparadas sob condições de reação mais amenas 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).

A biopolpação tem sido avaliada não somente em escala de laboratório, mas também em 2 plantas piloto (uma em Madison, WI, USA e outra em Caieiras, SP, Brasil).

Os ensaios em escala piloto têm mostrado que é difícil estabelecer cultivos dos basidiomicetos de interesse livre de bolores contaminantes. Isso porque não é factível controlar perfeitamente a assepsia durante a inoculação e o biotratamento de cavacos de madeira em pilhas abertas (MASARIN; FERRAZ, 2008). Uma alternativa para esses problemas seria o emprego de cultivos mistos de basidiomicetos. Em algumas situações, esses cultivos permitem a maximização das capacidades degradativas dos basidiomicetos quando estão competindo por um mesmo substrato. Essa abordagem é bastante inovadora, pois, no caso específico da biopolpação, poderia, além de potencializar a ação degradativa sobre a lignina da madeira, permitiria também estabelecer cultivos nos quais o controle de temperatura não seria uma etapa crítica, desde que se combinassem basidiomicetos que possam atuar em temperaturas variáveis e complementares, cobrindo a região entre 25 e 40°C.

2.4 Ação simultânea de várias espécies de fungos sobre madeira e a competição entre as espécies

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).

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 apresentam 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 constroem uma substancial rede micelial e em seguida a usam para produzir algumas frutificações grandes. Como exemplo desta categoria pode-se citar os fungos causadores de podridão pertencentes à classe Basidiomycetes (WIDDEN, 1997).

A madeira e seus respectivos produtos já foram avaliados contra a degradação por basidiomicetos pelo uso de preservantes químicos ou por controle biológico (BRUCE; HIGHLEY, 1991). Entre os estudos que abordam o controle biológico, há informações muito interessantes sobre a competição entre os basidiomicetos e os contaminantes frequentemente observados nos processos de biopolpação. Por exemplo, espécies de *Trichoderma* são capazes de inibir vários tipos de fungos degradadores de madeira através da produção de substâncias químicas solúveis ou voláteis, ou ainda degradar o micélio dos basidiomicetos secretando quitinases e laminarinases (BETTUCCI; LUPOS; SILVAS, 1988; BRUCE; AUSTIN; KING, 1984; BRUCE; HIGHLEY, 1991; BRUCE et al., 1995; BRUCE KUNDZEWICZ; WHEATLEY, 1996; HIGHLEY; RICARD, 1988; HOEVARH; BURGEL; MESSNER, 1995; MORREL; SEXTON, 1990; WHEATLEY et al., 1997). Além da inibição mediada pela secreção de substâncias químicas, várias espécies de *Trichoderma* se desenvolvem rapidamente em cultivos de madeira, sendo capazes de utilizar açúcares livres e resinas presentes no substrato e consequentemente podem inibir o crescimento dos basidiomicetos (HULME; SHIELDS, 1972).

Quando há competição entre espécies, a secreção de enzimas pode ser diretamente afetada. Por exemplo, um trabalho de Score, Palfreyman e White (1997) mostrou que a secreção de fenoloxidasas foi afetada durante a interação de basidiomicetos de decomposição parda (*Serpula lacrymans* e *Coniophora puteana*) e vários deuteromicetos (*Trichoderma* sp. e *Scytalidium* FY). De forma geral, as lacases formam o grupo de enzimas mais estimuladas quando há interação entre as espécies. Em um outro trabalho, Savoie, Mata e Billette (1998) mostraram que a produção de lacases por diferentes cepas de *Lentinula edodes* em culturas axênicas foram estimuladas pela competição com *Trichoderma* sp. Zhang et al (2006) também demonstraram que cultivos mistos de *Trichoderma* sp. ZH1 com o fungo de decomposição branca *Trametes* sp. AH28-2, suplementados com algumas fontes de carbono e nitrogênio, foram capazes de estimular a síntese de lacases. Os maiores níveis de lacases foram obtidos nos cultivos mistos contendo meio xilose-triptona. Nessas condições, os níveis de lacase foram similares aos obtidos por indução com compostos aromáticos, que são indutores amplamente conhecidos (XIAO et al., 2003). Esta elevada síntese de lacase foi atribuída a uma resposta defensiva de *Trametes* sp. AH28-2 contra a invasão por *Trichoderma* sp. ZH1. Esse tipo de resposta também foi observado em outros basidiomicetos como *Pleorotus ostreatus* (VELÁZQUEZ-CEDENO et al., 2004).

Em um trabalho desenvolvido por Lang, Eller e Zadrazil (1997) verificou-se como a adição de microrganismos presentes no solo afetam a atividade metabólica de *Pleurotus* sp., *Dichomitus squales* e *Ganoderma applanatum* agindo sobre palha de trigo moída. Foi demonstrado que os basidiomicetos foram capazes de competir com os microrganismos presentes no solo e nesse caso, a principal enzima ligninolítica produzida foi manganês peroxidase (MnP) e não lacase. Recentemente, Kausar et al (2010) avaliaram o potencial de compostagem da palha de arroz por dez basidiomicetos degradadores de materiais lignocelulósicos. A eficiência deste cultivo foi avaliada a partir da produção de biomassa e da secreção de enzimas líticas produzidas durante a interação micelial por estes fungos. A interação entre *Trichoderma viride* e *Aspergillus niger* proporcionou uma degradação significativa de celulose, hemicelulose e lignina em apenas três semanas de cultivo quando se fez a associação aos demais basidiomicetos.

Em meios líquidos, que diferem significativamente dos cultivos sobre madeira, também se observa comportamento semelhante dos basidiomicetos quando há competição entre espécies. Por exemplo, estudos desenvolvidos por Baldrian (2004) avaliaram as interações entre diferentes microrganismos e fungos de decomposição branca em meio líquido, assim como, suas habilidades em degradar um composto modelo xenobiótico. Nestes experimentos, a interação entre *Trametes versicolor* e *Trichoderma harzianum* despertou um maior interesse, pois proporcionou um aumento significativo na produção de lacase, que foi correlacionada com a forte descoloração do composto sintético Azul Brilhante de Remazol. A atividade de lacase também foi bastante expressiva em cultivos de *Trametes versicolor* e *Pleurotus ostreatus*, quando microrganismos presentes no solo, incluindo fungos, bactérias e leveduras foram inoculados no meio.

A interação entre duas ou mais espécies de basidiomicetos tem sido menos explorada pela pesquisa. Entre alguns exemplos encontrados pode-se mencionar um estudo que avaliou a interação entre *Marasmiellus troyanus* e *Marasmius pallescens* cultivados em meio líquido (GREGORIO et al., 2006). Nesse estudo foi possível demonstrar que a interação micelial entre estes dois fungos estimulou a síntese de lacase e MnP. As elevadas atividades de lacase foram destacadas pelos autores, já que os níveis observados foram similares àqueles obtidos a partir da indução química com dimetilalanina (BOURBONNAIS et al., 1995; EGGERT et al., 1996). Atividades diferenciadas de lacase também foram encontradas em cultivos de basidiomicetos de degradação branca (*Antrodia citrinella*, *Flammulina velutipes*, *Heterobasidion annosum*, *Junghuhnia collabens*, *Phlebia centrifuga*, *Phlebiopsis gigantea* e *Resinicium bicolor*) e parda

(*Fomitopsis pinicola*), durante diferentes níveis de interação micelial, em diferentes estágios de degradação da madeira (IAKOVLEV; STENLID, 2000). A análise das regiões de interação miceliana mostrou que a secreção de lacase foi estimulada na região onde co-existiam micélios de 2 espécies.

Um trabalho desenvolvido por Chi, Hatakka e Maijala (2007) avaliou o efeito do co-cultivo de fungos de decomposição branca sobre a produção de enzimas que degradam a lignina. Os fungos avaliados foram *C. subvermispora*, *Physisporinus rivulosus*, *P. chrysosporium* e *P. ostreatus*. Algumas interações entre as espécies proporcionaram efeitos sinérgicos para a maximização da secreção de enzimas. Por exemplo, a interação entre *C. subvermispora* e *P. ostreatus* estimulou a secreção de lacase e MnP, proporcionando uma maior degradação da madeira. Esses resultados são bastante relevantes, pois abrem uma nova possibilidade de aplicação nos processos de biopolpação, onde uma ou mais espécies de fungos de decomposição branca podem ser utilizadas simultaneamente, desde que exista vantagem para a maximização da degradação de lignina ou ainda para a maior capacidade dos basidiomicetos competirem com os bolores primários eventualmente presentes.

O co-cultivo de microrganismos também tem sido útil para proporcionar a secreção de uma mistura de enzimas adequadas para o branqueamento de polpas celulósicas. Por exemplo, um trabalho desenvolvido por Dwivedi et al (2010) mostrou que misturas enzimáticas contendo xilanase e lacase foram preparadas a partir do co-cultivo em meio sólido de *Penicillium oxalicum* SAU_E-3.510 e *P. ostreatus* MTCC1804 modificados geneticamente. Os resultados de branqueamento da polpa kraft de folhosas utilizando estas enzimas indicou uma notável diminuição do número Kappa (21%) e um aumento da alvura (8%), quando comparado ao uso da xilanasas obtidas a partir de cultivos com apenas um fungo. As fibras das polpas branqueadas também foram avaliadas, apresentando alterações morfológicas após o tratamento, onde foi observada uma maior porosidade, intumescência, separação e escamação destas fibras durante uma análise por microscopia eletrônica de varredura.

Em um trabalho desenvolvido por Toljander, Holmer e Högberg (2006), madeira de *Picea abies* foi inoculada simultaneamente com oito espécies de fungos de decomposição branca (*Resinicium bicolor*, *Junghunia collabens*, *Phlebiopsis gigantea*, *Phellinus ferrugineofuscus*, *Phellinus nigrolimitatus*, *Laurilia sulcata*, *Stereum sanguinolentum* e *Phlebia centrifuga*) e oito de decomposição parda (*Amylocystis lapponica*, *Antrodia heteromorpha*, *Serpula himantioides*, *Oligoporus placenta*, *Fomitopsis pinicola*, *Gloeophyllum sepiarium*, *Fomitopsis rosea* e *Pycnoporellus fulgens*).

Após seis meses de cultivo, foi notado que o número de espécies que permaneceram ativas foi bastante baixo (em geral, uma espécie quando o cultivo foi incubado a temperatura constante de 19°C). Quando o mesmo tipo de cultivo foi submetido a um regime de temperatura flutuante (1 mês a 19°C e posteriormente 3 semanas em cada uma das seguintes temperaturas: 11, 31, 23, 7, 27, 15 e 19°C, sequencialmente), foi notado que o número de espécies que permaneceram ativas aumentou para 2,3 em média. A capacidade degradativa, medida como perda de massa da madeira também aumentou no regime de incubação sob temperatura variável.

Uma lacuna existente na literatura atual tem relação com o entendimento da degradação de lignina por fungos. Os mecanismos de degradação de lignina por fungos de decomposição branca são relativamente bem conhecidos, porém a maioria da informação disponível foi obtida a partir de culturas em meio líquido e em menor extensão em cultivos sobre madeira. No entanto, praticamente inexistem estudos sobre a bioquímica e enzimologia de cultivos mistos de fungos de decomposição branca durante a decomposição da madeira e sua influência sobre o processo de biopolpação.

2.5 Espécies fúngicas utilizadas no processo de biopolpação: *Ceriporiopsis subvermispora*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* e *Pycnoporus sanguineus*

As espécies de basidiomicetos inicialmente selecionadas para o desenvolvimento do presente projeto foram *Ceriporiopsis subvermispora* e *Phanerochaete chrysosporium*. A seleção foi baseada na capacidade que estas duas espécies apresentam em degradar lignina seletivamente e no fato de elas apresentarem temperaturas ótimas de crescimento que se diferenciam em 10°C, sendo 27°C para *C. subvermispora* e 37°C para *P. chrysosporium* (AKHTAR et al., 1998). Um estudo adicional envolvendo *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* e *Pycnoporus sanguineus* foi realizado considerando que: o basidiomiceto *P. ostreatus* está incluído em um grupo de fungos que degradam eficientemente a lignina mantendo a celulose praticamente intacta (HATAKKA, 1994), além de ter apresentado efeito sinérgico para secretar enzimas oxidativas e degradar lignina quando cultivado simultaneamente com *C. subvermispora* (CHI; HATAKKA; MAIJALA, 2007); *T. versicolor* e *P. sanguineus* são fungos de decomposição branca bastante estudados e de grande aplicação biotecnológica, além de possuírem potencial para os

processos de biopolpação e se mostrarem aptos a competir com bolores em sistemas não assépticos (LEVIN et al., 2007).

Os fungos do gênero *Ceriporiopsis* Dom. são causadores de decomposição branca e pertencem à família Polyporaceae (HAROLD, 1998). *C. subvermispora* tem sido reportado como um dos fungos mais seletivos para a degradação de lignina tendo ainda apresentado os melhores resultados na biopolpação (AKHTAR et al., 1998). Sabe-se também que entre as enzimas oxidativas, essa espécie produz lacases e MnPs. A produção de LiP não foi detectada em cultivos desse fungo mesmo em diversos meios e formas de cultivo (LOBOS et al., 1994; SOUZA-CRUZ et al., 2004). Entre as enzimas hidrolíticas, esse fungo produz um complexo celulolítico pobre em exo-celulases (MILAGRES et al., 2006; SETHURAMAN; AKIN; ERIKSSON, 1998; SOUZA-CRUZ et al., 2004;) e quantidades expressivas de xilanases (LEAL, 1999; MILAGRES; MAGALHÃES; FERRAZ, 2005).

Com relação à degradação da lignina, esta espécie causa alterações estruturais significativas na lignina presente na parede celular e na lamela média, mesmo antes do início da penetração de enzimas extracelulares nessa parede celular (BLANCHETTE et al., 1997). A degradação da lignina nestas regiões deve ocorrer pela atuação de compostos de baixa massa molar produzidos pelo fungo. Esses compostos agem como mediadores das enzimas e seriam capazes de penetrar no complexo celular vegetal e degradar os componentes da madeira, favorecendo uma desestruturação da parede celular, o que permite a penetração posterior de enzimas oxidativas e hidrolíticas (KIRK; CULLEN, 1998). Entre os mediadores mencionados, já foram descritos alguns sistemas de moléculas e metais associados que incluem o oxalato e íons Mn^{2+} e Mn^{3+} , além dos ácidos graxos insaturados e seus respectivos radicais peroxila (AGUIAR; SOUZA-CRUZ; FERRAZ, 2006; AGUIAR; FERRAZ, 2011; ENOKI et al., 1999; HAMMEL et al., 2002; KAPICH; JENSEN; HAMMEL, 1999).

Uma série de trabalhos permitiu demonstrar que a degradação da lignina por *C. subvermispora* estaria relacionada com a peroxidação de lipídeos iniciada por Mn^{3+} oriundo da ação de MnP (CUNHA et al., 2010; JENSEN et al., 1996; KAPICH; JENSEN; HAMMEL, 1999; SREBOTNIK et al., 1997). O mecanismo químico envolvido na decomposição desta macromolécula deve passar necessariamente por um modelo onde um elétron é abstraído diretamente de estruturas não fenólicas. Ou seja, a abstração de elétron é induzida por espécie ativa com elevada capacidade oxidativa. Isso foi demonstrado pela determinação dos produtos de degradação de um composto modelo de lignina, marcado

com ^{14}C , ligado a uma cadeia polimérica de polietilenoglicol (PEG). Kapich, Jensen e Hammel (1999) demonstraram que os radicais peroxila oriundos da peroxidação de ácido linoleico por MnP podem atuar em modelos de lignina não fenólicos, abstraindo um elétron (e um próton) do carbono alfa, levando a posterior degradação do composto modelo. Esta hipótese explicaria a degradação de lignina no interior da parede celular da madeira através de um processo não erosivo, uma vez que está baseado na ação de um mediador de baixa massa molar.

Apesar da importância promissora deste fungo na aplicação industrial, o sistema extracelular que esse organismo utiliza para decompor a madeira ainda não está completamente esclarecido. Desta forma, os pesquisadores têm buscado apoio na biologia molecular para o melhor entendimento deste processo. Pesquisas recentes com o sequenciamento do genoma de *C. subvermispora* mostraram que há 14 sequências de genes que codificam para MnP e 7 que codificam para lacase, além de uma sequência que codifica para peroxidase versátil (Informação verbal)³. O genoma completo de *C. subvermispora* está depositado no Joint Genome Institute (JGI), porém ainda não há uma publicação dessa informação no formato de artigo científico.

Phanerochaete chrysosporium é um fungo muito utilizado nos processos de biodegradação de lignina e biopolpação, porém, tem demonstrado menor seletividade para a degradação de lignina do que *C. subvermispora* (AKHTAR et al., 1998). Este fungo produz duas enzimas extracelulares de degradação da lignina, LiP (TIEN; KIRK, 1983, 1984) e MnP (GLENN et al., 1983). O recente sequenciamento do seu genoma confirmou a presença de dez genes que codificam LiP (*lipA* a *lipJ*) e cinco que codificam MnP (*mnp1* a *mnp5*). Supostamente, *P. chrysosporium* não produz lacases e a análise do seu genoma revelou a ausência de genes que codificam esta enzima (MARTÍNEZ et al., 2004).

A MnP tem sido considerada menos importante que a LiP durante a degradação de lignina por *P. chrysosporium* devido a incapacidade da MnP em oxidar diretamente estruturas não fenólicas. Entretanto, estudos conduzidos por Bao et al (1994) e Wariishi, Valli e Gold (1991) demonstraram que MnP sintetizada por *P. chrysosporium* pode despolimerizar lignina sintética e degradar compostos aromáticos recalcitrantes via peroxidação de lipídeos.

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),

³ Informação fornecida por Vicuña no IV Seminário sobre Papel e Celulose em 2010

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 veratrílico e diluição significativa dos extratos enzimáticos (CASTILLO et al., 1997). A adição de surfactante tween 80 sobre o meio de cultivo também estimulou a produção de LiP (JÄGER; CROAN; KIRK, 1985).

P. chrysosporium também é capaz de remover a lignina do interior da parede celular no início da biodegradação da madeira, quando as enzimas ainda não podem penetrar a parede celular vegetal (KIRK; CULLEN, 1998). Um mediador proposto para realizar esse processo biodegradativo é o álcool veratrílico que é um metabólito secundário secretado pelo basidiomiceto. Nesse caso, o álcool veratrílico seria inicialmente oxidado pela LiP gerando um radical cátion de baixa massa molar que iniciaria a degradação da lignina no interior da parede celular vegetal (HAMMEL, 1996; HARVEY; SCHOEMAKER; PALMER, 1986). Por outro lado, Khindaria et al (1995) demonstraram que os radicais cátion de álcool veratrílico são pouco estáveis e atuam com dificuldade como mediadores difusíveis da LiP.

Diferentes formas de cultivo têm sido usadas para melhorar a produção de enzimas ligninolíticas por *P. chrysosporium*, como os meios limitados em carbono e nitrogênio (ERIKSSON; BLANCHETTE; ANDER, 1990; JANSHEKAR; FIECHTER, 1988; KIRK; FARRELL, 1987; LEISOLA; THANEI-WYSS; FIECHTER, 1985) ou quando são adicionados substratos lignocelulósicos ao meio (KAPICH et al., 2004). O aumento da atividade pode ser obtido por adição de álcool veratrílico, ácidos orgânicos dicarboxílicos, polipropilenoglicol, fosfolipídeos e ácidos graxos insaturados (ASTHER et al., 1988; LEISOLA; THANEI-WYSS; FIECHTER, 1985). A adição de óxido de manganês sólido em culturas de *P. chrysosporium* também favoreceu uma maior produção de enzimas ligninolíticas (KERN, 1989).

Com relação à degradação da celulose por este fungo, algumas enzimas estão envolvidas: a endoglucanase (endo-1,4- β -glucanase), a celobiohidrolase (exo-1,4- β -glucanase), a β -glicosidase (ERIKSSON; BLANCHETTE; ANDER, 1990), e a celobiose desidrogenase (HABU et al., 1993; HENRIKSSON et al., 1991;). Entre as enzimas que degradam hemiceluloses destacam-se as endoxilanases, que atuam sinergicamente com β -xilosidases e α -arabinofuranosidase (CASTANARES et al., 1995). A glioxal oxidase (HATAKKA, 1994; KERSTEN; KIRK, 1987; ORTH; ROYSE; TIEN, 1993) e a piranose oxidase (DANIEL; VOLC; KUBATOVA, 1994) incluem um grupo de enzimas que produzem peróxido de hidrogênio e que são produzidas por *P. chrysosporium*. Algumas

enzimas intracelulares também geram peróxido de hidrogênio, como: glicose-1-oxidase (KELLEY; REDDY, 1986), glicose-2-oxidase (ERIKSSON et al., 1986), acil-CoA-graxo oxidase (GREENE; GOULD, 1984) e metanol oxidase (NISHIDA; ERIKSSON, 1987).

Pleurotus ostreatus já foi reportado como um fungo bastante importante para a produção de alimento (trata-se de um fungo comestível) e branqueamento de polpas celulósicas. Estas diferentes aplicações proporcionaram diversas pesquisas envolvendo a bioquímica e a biologia molecular deste basidiomiceto (ASGEIRSDÓTTIR; DE VRIES; WESSELS, 1998; BEZALEL; HADAR; CERNIGLIA, 1997; GIARDINA et al., 1995; LARRAYA et al., 1999a; LARRAYA et al., 1999b; MARTÍNEZ et al., 1994; MARZULLO et al., 1995).

P.ostreatus é um fungo de decomposição branca que produz lacase, MnP e peroxidases versáteis (VPs) como principais enzimas ligninolíticas dentro das condições de cultivo em meio líquido e em meio sólido, incluindo madeira, farelo de trigo, glicose, celulose e peptona. Porém, a atividade de LiP por este fungo não tem sido detectada em nenhuma condição de cultivo (HA et al., 2001; HIBBETT et al., 2007; KOFUJITA et al., 1991; MONCALVO et al., 2002; SNAJDR; BALDRIAN, 2007). Este basidiomiceto pode ser incluído em um grupo de fungos que degradam eficientemente a lignina *in natura* mesmo sem produzir LiP. Desta maneira, comporta-se como um fungo seletivo capaz de degradar parte da lignina de um substrato vegetal mantendo a celulose praticamente intacta (HATAKKA, 1994). Em geral, a atividade de lacase e MnP pode ser induzida pela adição de alguns íons metálicos ao meio como Cu, Mn, Pb e Zn (BALDRIAN et al., 2005; GIARDINA et al., 1999). No entanto, a adição de Cd em meios com restrição de nitrogênio inibe a atividade de MnP (BALDRIAN; GABRIEL, 2002; BALDRIAN; GABRIEL, 2003), favorecendo apenas a atividade de lacase. O mesmo comportamento é observado com a adição de dimetil sulfoxido (DMSO) na cultura (SHAH et al., 2006).

Entre as enzimas hidrolíticas, este fungo possui um complexo celulolítico e hemicelulolítico rico em endo-1,4- β -glucanase, exo-1,4- β -glucanase, 1,4- β -glicosidase, endo-1,4- β -xilanase, 1,4- β -xilosidase e 1,4- β -manosidase (BALDRIAN; GABRIEL, 2003; BALDRIAN et al., 2005).

Trametes versicolor é um dos fungos de decomposição branca mais estudados. Várias linhagens de *T. versicolor* são conhecidas por produzir lacases e MnP (ARCHIBALD, 1992; HATAKKA, 1994; PAICE et al., 1993), além de celulasas e hemicelulasas (FREITAG; MORRELL 1992a; TANAKA; ITAKURA; ENOKI, 1999). LiP não foi detectada em culturas deste fungo (MOREDO et al., 2003). A mais ativa destas

enzimas é a lacase (ROY-ARECAND; ARCHIBALD, 1991). Esta enzima está envolvida na degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), policlorofenol, antraceno e benzo[α]pireno (ROY-ARCAND; ARCHIBALD, 1991; ULLAH; BEDFORD; EVANS, 2000), além de solubilizar carvão, destoxificar extratos de madeira e degradar polímeros sintéticos (SEDARATI et al., 2003).

Em geral, a secreção de enzimas oxidativas pode ser influenciada por alguns compostos adicionados ao meio de cultivo. Em um estudo desenvolvido por Elisashvili et al (2010) avaliou-se a indução de lacases por hidroquinona e xilidina durante o crescimento de *T. versicolor* em meio complexo. Os resultados demonstraram que a secreção de lacase foi três vezes maior quando estes compostos aromáticos foram adicionados ao meio. Entretanto, a presença de cobre e ferro não influenciou a atividade de lacase, favorecendo a diminuição da produção de β -glicosidase, β -xilosidase e celobiohidrolase (SHAH, 2010).

O aumento da atividade enzimática também é observado quando ocorre uma interação de *T. versicolor* com outros microrganismos. A atividade de β -glicosidade aumenta durante a interação entre *T. versicolor* e *Trichoderma harzianum* (FREITAG; MORRELL, 1992a). Já a indução da atividade de lacase e MnP é observada durante a interação de *T. versicolor*, *Fomes* sp. e *Tyromyces* sp. (JASZEK et al., 2006), e em cultivos de *T. versicolor* interagindo com *Stereum gausapatum*, *Daldinia concentrica*, *Bjerkandera adusta*, *Fomes fomentarius* e *Hypholoma fasciculare* (HISCOX, 2010).

T. versicolor tem sido reportado como um fungo promissor para os processos de biobranqueamento. Polpas Kraft não branqueadas de madeiras de folhosas tratadas com *T. versicolor* sofreram um aumento de alvura com um correspondente decréscimo na concentração de lignina residual (KIRKPATRICK et al., 1989; PAICE et al., 1989). Katagiri, Tsutsumi e Nishida (1995) avaliaram o biobranqueamento de polpas Kraft não branqueadas de madeiras de folhosas por *P. chrysosporium* e *T. versicolor* em sistemas de fermentação em estado sólido com diferentes meios de cultura. Nos sistemas de fermentação com baixa concentração de nitrogênio e altas concentrações de carbono, a alvura das polpas aumentaram após 5 dias de tratamento com os fungos e o número Kappa diminuiu com o aumento da alvura.

Pycnoporus sanguineus é um basidiomiceto saprófito da família Polyporaceae (SMÂNIA et al., 1995). Este fungo é capaz de sintetizar algumas substâncias com aplicações medicinais (SMÂNIA et al., 1995) e de produzir várias enzimas de aplicações industriais como a invertase (QUIROGA; VATTUONE; SAMPIETRO, 1995), a α -amilase

(DE ALMEIDA SIQUEIRA; MIZUTA; GIGLIO, 1997), a xilanase e a β -glicosidase (ESPOSITO et al., 1993), e a lacase (POINTING; JONES; VRIJMOED, 2000). Entre as enzimas produzidas por *P. sanguineus*, a lacase tem um interesse particular devido à numerosa aplicação biotecnológica (MAYER; STAPLES, 2002).

A lacase secretada por *P. sanguineus* tem demonstrado habilidade em descolorir corantes Azo e Trifenilmetano (POINTING; VRIJMOED, 2000), corantes Poli R-478 (FREITAG; MORRELL, 1992b; KIISKINEN; RATTO; KRUUS, 2004; LEVIN; PAPINUTTI; FORCHIASSIN, 2004) e corantes antraquinônicos na ausência de mediadores (LU et al., 2007), além de oxidar compostos modelo de lignina não fenólicos (UZAN et al., 2010). Lacases de *P. sanguineus* também oxidam outros substratos, incluindo 2,6-dimetoxifenol, siringaldazina e ABTS (LU et al., 2007).

P. sanguineus é capaz de produzir lacase em fermentação em meio sólido (VIKINESUARY et al, 2006) ou submersa (POINTING; JONES; VRIJMOED, 2000). Pointing, Jones e Vrijmoed (2000) observaram que *P. sanguineus* foi capaz de crescer eficientemente sobre resíduo lignocelulósico e agrícola, sendo ressaltado um aumento na síntese de lacase quando este fungo foi cultivado em meio líquido adicionado de fibras de madeira na ausência de outros indutores. A alta atividade de lacase produzida por *P. sanguineus* também foi observada em meios líquidos contendo elevada concentração de carbono e baixa concentração de nitrogênio (QUIROGA et al., 2009), quando cultivado em extrato de malte (ARORA; GILL, 2001) ou oligossacarídeos de manana (VANHULLE et al., 2007).

Em estudos desenvolvidos por Messner et al (1998), *P. sanguineus* apresentou um grande potencial para os processos de biopolpação. Este fungo foi cultivado sobre cavacos de *Pinus taeda* suplementados com milhocina (3%), onde foram observadas notáveis perdas de lignina e hemicelulose. O conteúdo de celulose permaneceu praticamente intacto, demonstrando que o *P. sanguineus* é um fungo seletivo para a deslignificação da madeira. Um trabalho desenvolvido por Van Heerden et al (2008) avaliou o efeito do co-cultivo de *P. sanguineus* com *Accacia flavipes* durante a degradação de *Eucalyptus grandis*. Os resultados indicaram que não houve sinergismo quanto à alteração da composição química dos cavacos de madeira biotratada.

3 OBJETIVO

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a biopolpação a partir de cultivos mistos de diversos basidiomicetos agindo sobre madeira de Eucalipto sob regimes de incubação em temperaturas variáveis entre 37°C e 27°C e conduzidos em condições não assépticas.

Para atingir o objetivo descrito anteriormente foram realizadas as seguintes etapas:

- Biodegradação de madeira fresca ou pré-tratada a 80°C/30 min em cultivos mistos de *C. subvermispora* e *P. chrysosporium* incubados em regimes variados de temperatura entre 37°C e 27°C;
- Biodegradação de madeira pré-tratada a 80°C/30 min por *P. sanguineus* e *T. versicolor* incubados em temperatura fixa de 27°C;
- Biodegradação de madeira fresca e autoclavada em cultivos mistos de *C. subvermispora* e *P. ostreatus* incubados em temperatura fixa de 27°C;
- Avaliação das madeiras biotratadas frente ao processo de polpação quimiotermomecânica;
- Análise morfológica das fibras geradas no processo de polpação CTMP;
- Formação de folhas e análise das propriedades mecânicas de amostras selecionadas entre as polpas controle e biopolpas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Fungos

Os fungos utilizados neste estudo foram os basidiomicetos de decomposição branca *Ceriporiopsis subvermispora* (cepa SS-3), *Phanerochaete chrysosporium* (cepa RP-78), *Pleurotus ostreatus* (cepa CCB010), *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes versicolor* (cepas originárias de coleções de cultura Argentinas, Laboratório de Biotecnología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales - Prof^a. Laura Villalba) (LEVIN et al., 2007). Cada cepa foi mantida por repiques sucessivos sobre o meio composto por extrato de malte (2%), extrato de levedura (0,2%) e ágar (2%). Os cultivos de manutenção foram realizados a 27°C, nos quais em tubos de ensaio com o fungo em fase de crescimento, foram adicionados pequenos cavacos de madeira de *Pinus taeda* com aproximadamente 0,2 x 2,4 x 0,2 cm. Após colonização desses cavacos, os tubos foram estocados em refrigerador a 4°C por períodos de até 6 meses. Cada procedimento de repique de manutenção foi realizado pela transferência dos cavacos colonizados para placas de Petri com o mesmo meio de manutenção e, após o crescimento, novos tubos foram preparados a partir de micélio em fase de crescimento oriundo das bordas da placa.

4.2 Madeira

As madeiras utilizadas nesse trabalho foram *Eucalyptus grandis* obtido junto às empresas Melhoramentos Ltda, em Caieiras-SP, e o híbrido *Eucalyptus urograndis* proveniente da empresa Fibria, em Jacareí-SP. O híbrido *E. urograndis* resulta do cruzamento entre as espécies de *E. grandis* e *E. urophylla* e apresenta características desejáveis para a produção de polpa celulósica, boa produtividade florestal e boa adaptação ecológica (IKEMORI; JÚNIOR, 1983).

As árvores com aproximadamente 8 anos de crescimento foram cortadas, descascadas, lavadas e picadas na forma de cavacos utilizando a linha de processamento industrial de cada empresa em questão. No caso de *E. grandis*, imediatamente após o picador industrial, os cavacos foram recolhidos de uma esteira de condução, armazenados em sacos plásticos limpos e então congelados a -18 °C até o momento do uso. No caso de *E. urograndis*, os cavacos coletados foram secos ao ar até cerca de 10% de umidade e mantidos em sacos plásticos em ambiente seco e arejado até o momento do uso.

4.3 Preparação do inóculo

Para obtenção de inóculos de *P. chrysosporium*, o conteúdo de cada placa de Petri cultivada por 7 dias em meio composto por extrato de malte (2%), extrato de levedura (0,2%) e ágar (2%) foi retirado com o auxílio de uma espátula e suspenso em Erlenmeyers de 125 mL contendo água esteril. A quantidade de esporos inoculada em cada experimento foi determinada a partir da contagem em câmara de Neubauer. Para a produção de inóculo de *C. subvermispora*, *P. ostreatus*, *T. versicolor* e *P. sanguineus*, 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 de 8 mm de diâmetro contendo o micélio proveniente 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 aço inox para a maceração. Da suspensão obtida foi retirada uma alíquota de 25 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 quantidades requeridas de micélio por Kg de madeira em cada experimento.

4.4 Experimentos de biodegradação

A execução desse trabalho envolveu 7 grupos de experimentos distintos que são descritos primeiramente de forma geral para uma visão geral da estratégia experimental adotada e, na sequência, estão apresentados de forma mais detalhada.

Experimento 1: Biodegradação de madeira de *E. grandis* não autoclavada em cultivos inoculados com *C. subvermispora* e *P. chrysosporium* simultaneamente, utilizando regimes variados de temperatura entre 27 e 37°C.

Experimento 2: Biodegradação da madeira de *E. grandis* não autoclavada, porém pré-tratada a 80°C/30 min, em cultivos inoculados com *C. subvermispora* e/ou *P. chrysosporium* simultaneamente, utilizando regimes variados de temperatura entre 27 e

37°C. Estes experimentos contaram também com cultivos de controle em que cada espécie fúngica foi inoculada separadamente, além dos cultivos mistos.

Experimento 3: Biodegradação da madeira de *E. grandis* não autoclavada, porém pré-tratada a 80°C/30 min, em cultivos inoculados com *C. subvermispora* ou *P. chrysosporium*, utilizando regimes de temperatura que iniciaram a 37°C por 3 dias e foram mantidos posteriormente a 27°C;

Experimento 4: Biodegradação da madeira de *E.urograndis* não autoclavada, porém pré-tratada a 80°C/30 min, em cultivos inoculados apenas com *C. subvermispora*, utilizando regimes de temperatura que iniciaram a 37°C por 3 dias e foram mantidos posteriormente a 27°C.

Experimento 5: Biodegradação da madeira de *E. grandis* não autoclavada, porém pré-tratada a 80°C/30 min, em cultivos inoculados com *P. sanguineus* ou *T. versicolor* utilizando regimes temperatura fixa de incubação a 27°C.

Experimento 6: Biodegradação da madeira de *E. urograndis* não autoclavada, porém pré-tratada a 80°C/30 min, em cultivos inoculados com *C. subvermispora* e *P. ostreatus* simultaneamente, utilizando regimes de temperatura que iniciaram a 37°C por 3 dias e foram mantidos posteriormente a 27°C.

Experimento 7: Biodegradação da madeira de *E. grandis* autoclavada em cultivos inoculados com *C. subvermispora* e *P. ostreatus* simultaneamente, incubados a 27°C.

No experimento 1 a madeira de *E. grandis* armazenada em freezer foi descongelada 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 2000g (base seca) foram transferidos para biorreatores de polipropileno de 20 L (Figura 4A). A umidade dos cavacos neste caso era de 39%, sendo que água esterilizada foi adicionada em cada biorreator a fim de aumentar esse valor para 55%. A carga de inóculo de *C.subvermispora* utilizada foi de 500 mg de micélio/kg de madeira (ambos em base seca). Já a carga de esporos de *P. chrysosporium* foi aquela obtida pela raspagem de 4 placas pré-cultivadas por 7 dias. Os esporos obtidos dessas placas foram raspados e suspensos em cerca de 8 mL de água, sendo posteriormente utilizados para inoculação no biorreator. Essa carga de inóculo correspondeu, portanto, aos esporos provenientes de 2 placas/kg de madeira. Uma estimativa do teor de esporos nessa suspensão foi feita por contagem em câmara de Neubauer e correspondeu a 29×10^4 esporos/mL. Todos os biorreatores

receberam ainda a adição de milhocina na razão de 0,5% (0,5 g de milhocina/100 g de madeira – ambas em base seca). Os biorreatores foram então fechados e agitados manualmente para homogeneização. Os cultivos foram mantidos por 30 dias sob regime de temperaturas variáveis que seguiram a seguinte sequência. Os três primeiros dias de incubação foram a 37°C, seguidos de resfriamento e manutenção a 27°C por mais 3 dias. Essa rotina foi então repetida (elevação a 37°C por 3 dias e resfriamento a 27°C por 3 dias) até completar os 30 dias de cultivo. Este conjunto de experimentos foi realizado em triplicata.

No experimento 2 a madeira de *E. grandis* armazenada em freezer foi igualmente descongelada e após o descongelamento e a homogeneização dos cavacos, cerca de 1000g (base seca) foram transferidos para sacos de polipropileno de 20 L (Figura 4B). Água foi adicionada a cada saco de polipropileno até completar o seu volume e então eles foram imersos em banho termostaticado a 80°C por 30 min. Após o tratamento a 80°C, o excedente de água foi drenado e os cavacos (apresentando umidade média de 55%) foram posteriormente inoculados em câmara de fluxo laminar.

Figura 4. Biorreatores de polipropileno de 20L (A); Sacos de polipropileno de 20L (B)

A inoculação foi feita com as mesmas cargas de *C. subvermispora* e *P. chrysosporium* descritas no experimento 1. Também nesse caso se adicionou milhocina na razão de 0,5% (0,5 g de milhocina/100 g de madeira – ambas em base seca) e o regime de temperatura variável de incubação foi idêntico ao descrito no experimento 1. O conjunto de experimentos foi realizado em triplicata.

No experimento 3 a única alteração em relação ao experimento 2 foi que o regime de temperatura variável de incubação foi o seguinte: os três primeiros dias de cultivo foram

mantidos a 37°C. Posteriormente, a temperatura foi diminuída para 27°C e então mantida constante até completar 15 ou 30 dias de cultivo. Este conjunto de experimentos foi realizado em duplicata.

No experimento 4 foi empregado apenas o basidiomiceto *C. subvermispora* e a única diferença em relação ao experimento 3 é que a madeira empregada foi a de cavacos secos ao ar de *E.urograndis* e o tempo de incubação foi de 15 dias.

No experimento 5 foram empregados os basidiomicetos *P. sanguineus* e *T. versicolor*, ambos inoculados na razão de 500 mg de cada micélio/kg de madeira (em base seca). Também nesse caso se empregou a madeira de *E. grandis* que estava armazenada em freezer e a rotina de descontaminação a 80°C por 30 min. Os cultivos foram realizados no interior de biorreatores de polipropileno de 20 L (Figura 4A) e não em sacos de polipropileno. Os cultivos foram suplementados com milhocina na razão de 0,5% (g de milhocina/100 g de madeira – ambas em base seca) e mantidos por todo o período de incubação (15 e 30 dias) na temperatura fixa de 27°C. Este conjunto de experimentos foi realizado em duplicata.

No experimento 6 foram empregados os basidiomicetos *C.subvermispora* e *P.ostreatus*, ambos inoculados na razão de 500 mg de micélio/kg de madeira (em base seca). As condições experimentais foram as mesmas do experimento 4. O conjunto de experimentos foi realizado em duplicata.

No experimento 7 foram empregados os basidiomicetos *P.ostreatus* e *C. subvermispora* porém atuando sobre madeira de *E. grandis* autoclavada como substrato. Para isso, cerca de 2000g (base seca) de cavacos frescos foram transferidos para biorreatores de polipropileno de 20 L aos quais se adicionou água até completar 20 L. 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. Após o resfriamento, os cavacos foram suplementados, ou não, com 0,5% de milhocina e inoculados com suspensões de micélio em cargas de inóculo pré-definidas. No caso dos cultivos suplementados com milhocina, a carga de inóculo foi de 100 mg de micélio/kg de madeira, enquanto que nos ensaios sem adição de milhocina as cargas de inóculo foram de 500 mg/kg de madeira, para ambas espécies fúngicas. Os cultivos foram incubados a 27°C por 15 dias. Este conjunto de experimentos foi realizado em duplicata.

4.5 Extração da madeira biotratada com solução tampão suplementada com Tween 60 para recuperação de enzimas

Cerca de 50 g de madeira biodegradada no experimento 6 e 7 foram extraídos utilizando 200 mL de uma solução contendo tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5, adicionado de 0,01% de Tween 60. A extração foi conduzida sob agitação de 120 rpm durante 5 h a $10 \pm 1^\circ\text{C}$ (Agitador New Brunswick C25KC). Este procedimento, segundo Souza-Cruz et al., (2004) é suficiente para a extração de aproximadamente 50% da atividade enzimática total do meio. Os extratos enzimáticos foram recuperados por centrifugação a 2000 g a 4°C por 15 min (centrífuga refrigerada Jouan CR4i). Nos extratos enzimáticos obtidos foram determinadas as atividades enzimáticas relacionadas à degradação da lignina, celulose e hemicelulose. A atividade enzimática foi determinada como descrito a seguir e expressa em unidades internacionais (UI) por kg de madeira inicial.

4.5.1 Manganês peroxidase (MnP)

A atividade de MnP foi medida por oxidação de vermelho de fenol. As reações foram realizadas em tubos de ensaio de 15 mL contendo 1,5 mL de tampão succinato de sódio 50 mM e pH 4,5, 1,5 mL de lactato de sódio 50 mM, 0,5 mL de MnSO_4 1,0 mM, 0,5 mL de vermelho de fenol 1 g.L^{-1} , 0,25 mL de albumina bovina 10 g.L^{-1} , 0,5 mL de extrato enzimático e 0,25 mL de H_2O_2 2,0 mM. Em intervalos de 1 min, 1 mL desta mistura reacional foi adicionada sobre 30 μL de NaOH 6,5 M e a absorbância foi medida a 610 nm em um espectrofotômetro GBC Cintra 20 (absortividade do vermelho de fenol oxidado: $22.000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) (KHINDARIA; GROVER; AUST, 1994).

4.5.2 Lacases

A atividade de lacase foi medida através da oxidação de ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico) (BOURBONNAIS; LEECH; PAICE, 1998). As reações foram realizadas diretamente em cubetas de 3 mL contendo 0,6 mL de tampão fosfato de sódio 200 mM/citrato de sódio 100 mM a pH 5,0, 0,2 mL de água, 1,0 mL de extrato enzimático e 0,2 mL de ABTS 1,0 mM. A reação foi monitorada entre 10 s e 5 min

através da leitura da absorbância em um aparelho de UV-visível (GBC-Cintra 20) no comprimento de onda de 420 nm (absortividade do ABTS oxidado = $36.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

4.5.3 *Endocelulases*

A atividade de endocelulase foi determinada 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 foi medida a absorbância em 540 nm (MILLER, 1959). Para o branco, o caldo enzimático foi substituído 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 realizado adicionando o próprio caldo após a adição de DNS. Glicose (seca em P_2O_5 a vácuo) foi utilizada para construção da curva de calibração.

4.5.4 *Xilanases totais*

A atividade de xilanases foi determinada pela hidrólise de xilana de bétula (BAILEY; BIELY; POUTANEN, 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 foi medida a absorbância em 540 nm (MILLER, 1959). Para o branco, o caldo enzimático foi substituído 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, foi realizado o mesmo procedimento das endocelulases. Xilose (seca em P_2O_5 à vácuo) foi utilizada para construção da curva de calibração.

4.6 Ajuste de variáveis que afetam o processo de polpação CTMP de *E. grandis* em refinador Bauer

Um ajuste prévio de variáveis que podem afetar o rendimento de polpação e a facilidade do desfibramento dos cavacos durante a polpação quimiotermomecânica foi feita por refinamento mecânico de cavacos pré-digeridos com licor alcalino contendo sulfito de sódio. Os cavacos de *E. grandis* (aproximadamente 11% de umidade) foram imersos em licor alcalino contendo sulfito de sódio na razão de 1:5,3 (peso de cavacos em base seca (g)/volume de licor (mL)). Esse licor continha Na_2SO_3 (g/100g de madeira seca) em variações de 6% e 10%, e NaOH (g/100g de madeira seca) em variações de 3% e 5%, como mostra a tabela 1. Os cavacos foram transferidos para um kitassato de 5 L (570 g de cavacos em base seca). O kitassato dispunha de uma tampa de silicone contendo uma mangueira interrompida por uma torneira. Na saída lateral do kitassato foi aplicado vácuo em ambiente fechado por 30 min. Após esse período, 3000 mL de licor sulfito alcalino foi deslocado para o interior do kitassato por sucção causada pelo próprio vácuo. Isso foi feito, simplesmente, abrindo a torneira ligada à mangueira fixada na tampa de silicone. Aos cavacos impregnados foi então aplicado vácuo em sistema fechado por mais 15 min. Essa mistura foi transferida para uma autoclave e tratada a 121°C (1 atm) por períodos mínimos de 80 min e máximo de 120 min (Tabela 1). Os cavacos pré-digeridos foram drenados, lavados com água e então desfibrados em liquidificador METVISA de 10 L seguido de refinamento em refinador de discos Regmed Bauer MD-3000. As facas do liquidificador tiveram a afiação eliminada pela ação de 10 ciclos de defibramento de cavacos de madeira em água, sendo este um procedimento feito uma única vez por ocasião do início de uso do liquidificador em questão.

A etapa de desfibramento em liquidificador foi feita por períodos de 40 min ou 1 hora (Tabela 1) na proporção de aproximadamente 166 g de cavacos (base seca)/8,3 L de água (2% de consistência). Foram necessários 3 ciclos de desfibramento em liquidificador para processar toda a massa de cavacos pré-digeridos. O material desfibrado foi centrifugado (em centrífuga Arno) e armazenado em um balde plástico de 20 L. Este material continha cerca de 1200 mL de água, correspondente a 70% de umidade. Ao balde contendo o material desfibrado foi adicionada toda a água recolhida da etapa de centrifugação anterior (evitando a perda da fração de finos) e mais água suficiente para totalizar um volume final de 4 L, incluindo a água contida na polpa. No recipiente do refinador Bauer foi adicionado 20 L de água e o sistema de refino ligado. Os discos foram

aproximados até a distância mínima possível (aproximadamente 0,1 mm) e então toda a madeira desfibrada foi lentamente adicionada no recipiente que continha a água em circulação. O tempo de adição da massa desfibrada foi de aproximadamente 3,5 min. Os resíduos de material desfibrado retidos no balde foram transferidos para o refinador com o auxílio de 1 L adicional de água, o que resultou num volume total de água no sistema de refino de 25 L, correspondendo a uma consistência de fibras de aproximadamente 2%. O refinamento foi monitorado por amostragens de 1 L da suspensão de fibras. As amostragens foram feitas em intervalos regulares em níveis de consumo de energia bruta acumulada entre 250 e 1700 Wh. Este consumo de energia se refere ao consumo do motor acionador do disco giratório e inclui o consumo necessário para efetuar a recirculação da massa de fibras juntamente com o volume total de água contido no refinador. As massas de fibras de cada amostra e a massa final restante no refinador foram determinadas para o cálculo do rendimento do processo. De cada amostra gerada no processo de refino foi determinado o grau de fibrilação das polpas em triplicata pelo método de "Canadian Standard Freeness (CSF)" seguindo a norma TAPPI T 227.

Tabela 1 - Variáveis avaliadas frente ao processo de polpação CTMP de *E. grandis* em refinador Bauer

Experimento	Variáveis		
	A	B	C
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

Variáveis:

A: Carga de Reagentes Químicos (Na_2SO_3 e NaOH)

B: Tempo de Cozimento a 120 °C

C: Tempo de desfibramento em liquidificador

Níveis das variáveis:

A-: 6% e 3% (g/100g base madeira seca)

A+: 10% e 5% (g/100g base madeira seca)

B-: 80 min

B+: 120 min

C-: 40 min

C+: 60 min

4.7 Polpação CTMP da madeira biotratada

Após os tempos pré-determinados de biodegradação, os cavacos retirados dos biorreatores e dos sacos de polipropileno foram lavados e secos ao ar antes de serem utilizados no processo de polpação CTMP. O experimento consistiu basicamente do desfibramento e refino mecânico de cavacos pré-digeridos com licor alcalino contendo sulfito de sódio conforme descrito no item 4.6. Tanto os cavacos biotratados quanto o controle não inoculado com os fungos foram imersos em licor alcalino contendo sulfito de sódio na razão de 1:5,3 (m/v). Esse licor continha 6% de Na_2SO_3 (g/100g de madeira seca) e 3% de NaOH (g/100g de madeira seca). A rotina de impregnação, digestão e desfibramento em liquidificador foi idêntica à descrita no item 4.6. Da polpa obtida após o desfibramento em liquidificador, cerca de 30g (base seca) foi separada e utilizada para classificação e consequente determinação do teor de palitos e fibras. Para isso, o material fibroso resultante do desfibramento em liquidificador foi classificado em classificador Noram CA-328 contendo uma placa perfurada com ranhuras de 0,15 mm. Os cerca de 30 g de material foi suspenso em água e classificado em regime contínuo por aproximadamente 1,5 h. As massas secas de cada fração (polpa e palito) foram determinadas e usadas para o cálculo do teor de polpa e palito. A somatória dessas massas também foi computada no cálculo de rendimento total do processo CTMP. O restante do material oriundo do desfibramento em liquidificador foi transferido para o recipiente do refinador Bauer MD 300 e refinado conforme descrito no item 4.6.

4.8 Análise morfológica de fibras

Após o processo de polpação quimiotermomecânica, as polpas de madeira biotratada e o controle foram submetidas à determinação da distribuição do tamanho de fibras. Cerca de 0,15 g de amostra (base seca) foram diluídas em 5 L de água destilada e submetidas a análise de morfologia de fibras no equipamento KajaaniFiberLab (Metso Automation) seguindo a norma TAPPI T 271, sendo classificadas durante 15 minutos, o que correspondeu a integração das medidas de no mínimo 10 mil fibras/análise. Para isto, três pontos de refino de cada amostra foram selecionados e o experimento foi realizado em

triplicata. Nesta etapa foram obtidos os dados referentes à distribuição do comprimento ponderado (em função do comprimento) e a porcentagem de finos da amostra, além de outros parâmetros como largura da fibra e porcentagem de fibrilação. Todos estes experimentos foram realizados em colaboração com o Centro de Tecnologia da empresa Fibria SA, planta industrial de Aracruz, ES. Os experimentos foram realizados durante uma estadia de pesquisa que a estudante Gina G. S. Cunha realizou no referido laboratório.

4.9 Formação de folhas e análise de suas propriedades físico-mecânicas

As fibras refinadas foram desagregadas em água destilada e transferidas para um formador de folhas Lorentzen & Wettre Scan - TAPPI T 205. Foram formadas 5 folhas de 20 cm de diâmetro com gramatura de aproximadamente 150 g/m² para cada amostra. As folhas foram prensadas até atingir uma umidade de aproximadamente 10% e depois mantidas em um ambiente com 50% de umidade e temperatura de 27°C por um tempo de 18 horas.

De cada uma das folhas teste descritas anteriormente foram avaliadas as seguintes propriedades físico-mecânicas: índice de resistência à tração (aparelho Lorentzen & Wettre, modelo Tensile Tester - TAPPI T 494), índice de resistência ao rasgo (aparelho Lorentzen & Wettre, modelo Tearing Tester - TAPPI T 414), índice de resistência ao estouro (aparelho Lorentzen & Wettre, modelo Burst-o-Matic - TAPPI T 403) e Porosidade Gurley zero (aparelho Lorentzen & Wettre, modelo Air Permanence Tester - TAPPI T 547). Todos estes experimentos foram realizados em colaboração com o Centro de Tecnologia da empresa Fibria SA, planta industrial de Aracruz, ES. Os experimentos foram realizados durante uma estadia de pesquisa que a estudante Gina G. S. Cunha realizou no referido laboratório.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As atividades experimentais desenvolvidas no presente trabalho avaliaram o uso de cultivos mistos de basidiomicetos sobre madeira de eucalipto (*E. grandis* ou *E. urograndis*) com a finalidade de proporcionar vantagem competitiva dos basidiomicetos contra contaminantes indesejáveis, usualmente encontrados em condições de cultivo não assépticas que se aproximam da realidade do processo de biopolpação em escala industrial. Estes estudos foram centrados no uso dos basidiomicetos *C. subvermispora* e *P. chrysosporium* cultivados em regimes de temperaturas variadas entre 27 e 37°C. Ainda dentro do contexto de viabilizar cultivos de basidiomicetos sobre madeira em condições não assépticas, foram avaliadas 2 espécies que se mostraram eficazes para colonizar madeira em condições não assépticas a 27°C, *P. sanguineus* e *T. versicolor*. Foi também avaliada a combinação de dois basidiomicetos, *C. subvermispora* e *P. ostreatus* que, em estudos anteriores, se mostrou útil para maximizar a secreção de uma enzima importante no processo de biopolpação, a MnP. Como todo o processo de biodegradação foi seguido de uma etapa de polpação quimiatermomecânica, o trabalho desenvolvido envolveu ainda o ajuste de algumas condições de polpação quimiatermomecânica de *E. grandis* utilizando um refinador de discos de pequena escala. Os resultados obtidos nas diferentes abordagens experimentais citadas anteriormente foram divididos em tópicos que são descritos a seguir.

5.1 Ajuste de variáveis de processo na polpação quimiatermomecânica (CTMP) de *E. grandis*

Os estudos de biopolpação em escala de laboratório demandam a existência de um processo de polpação por refinadores de disco de pequeno porte que não possuem as mesmas características de potência e torque dos refinadores de disco industriais. Em virtude desta demanda, um grupo inicial de experimentos foi delineado para ajustar as variáveis de processo que permitissem gerar polpas de *E. grandis* com rendimentos similares aos observados em processos industriais destinados a preparação de polpas CTMP usadas na fabricação de papéis absorventes (rendimentos entre 85 e 95%). Nos últimos anos, o laboratório de Ciências da Madeira utilizou um sistema simulado de polpação CTMP que fazia uso de um refinador *Jökro* (GUERRA; MENDONÇA; FERRAZ, 2005; VICENTIN; FERRAZ, 2008). As condições de polpação utilizadas nestes experimentos serviram como base para o delineamento do processo desenvolvido nesta

tese que se baseou no emprego de um refinador de discos modelo Bauer MD-300 (Figura 5A) e não um refinador *Jökro* (Figura 5B). O refinador de discos de pequeno porte pode simular a polpação CTMP de escala industrial de forma mais adequada do que o refinador *Jökro*. O primeiro sistema utiliza discos ranhurados como agente de desfibramento e refino (similar ao usado no processo industrial) enquanto que o sistema *Jökro* promove o refino por ação de moagem (BIERMAN, 1993). Como o refino por ação de moagem é menos eficiente, a simulação da polpação CTMP neste sistema requer a pré-digestão dos cavacos com cargas mais elevadas de sulfito alcalino (10% de Na_2SO_3 e 5% de NaOH), o que acarreta maiores níveis de deslignificação e menores rendimentos (cerca de 75%) (VICENTIM; FERRAZ, 2008), caracterizando as polpas obtidas mais apropriadamente como semi-químicas e não CTMP.

Figura 5. (A) Refinador de discos modelo Bauer MD-300, onde as polpas são refinadas por esmagamento das fibras (a 2% de consistência) entre os dois discos, sendo que um deles é fixo e o outro gira, acionado por um motor elétrico; (B) Refinador *Jökro*, onde as polpas são refinadas por moagem das fibras (a 11% de consistência) que ficam presas à superfície interna da câmara e sofrem a ação do moente que gira no interior da câmara por movimentação orbital da mesa.

No presente trabalho avaliamos como condições variadas de pré-digestão dos cavacos, seguidas de 2 etapas mecânicas de desfibramento e refino em refinador de discos, afetam o rendimento de polpação. Três variáveis de processo foram avaliadas de acordo com o planejamento experimental mostrado na tabela 1.

Os cavacos passaram por um pré-tratamento com sulfito alcalino sob alta temperatura, e em seguida foram desfibrados e refinados mecanicamente. Este pré-tratamento químico acarreta pequenas perdas de lignina e hemicelulose, além de remoção

expressiva de extrativos (BIERMAN, 1993). A lignina residual contida nos cavacos apresenta ainda pontos de sulfonação, o que torna o material mais hidrofílico e “macio”, facilitando o desfibramento e refino mecânico (BIERMAN, 1993; BÖRAS; GATENHOLM, 1999). As condições ideais de polpação em nosso caso seriam aquelas que facilitam o desfibramento/refino, preservando o rendimento de polpa em níveis acima de 90%, o que é compatível com o observado nos processos industriais desse tipo (BIERMANN, 1993; GUERRA; MENDONÇA; FERRAZ, 2005). A etapa de desfibramento foi simulada pela ação de um liquidificador de 10 L trabalhando com baixa consistência de fibras (1,7%), buscando mimetizar o primeiro estágio de polpação CTMP. O material obtido após o pré-desfibramento foi então refinado em refinador de discos do tipo Bauer até grau de fibrilação (CSF-Freeness) de aproximadamente 200 mL, simulando o segundo estágio de refino industrial. Os resultados para o rendimento de polpa obtida estão mostrados na tabela 2.

Tabela 2 - Dados experimentais de rendimento de polpa obtidos a partir na polpação CTMP de *E. grandis*

Experimento	Variáveis			
	*Carga de reagentes químicos Na ₂ SO ₃ -NaOH (%)	Tempo de cozimento a 120°C (min)	Tempo de desfibramento (min)	Rendimento de polpa após refino até 200 mL CSF (%)
1	6% - 3%	80	40	93,7
2	10% - 5%	80	40	90,0
3	6% - 3%	120	40	89,0
4	10% - 5%	120	40	89,0
5	6% - 3%	80	60	93,0
6	10% - 5%	80	60	90,0
7	6% - 3%	120	60	92,0
8	10% - 5%	120	60	81,0

*Carga de reagentes químicos em g/100 g, base madeira seca

Os rendimentos de polpa obtidos variaram entre 81 e 93,7% (Tabela 2), sendo que os menores rendimentos foram claramente obtidos quando a carga de NaOH e sulfito de sódio estavam no nível mais elevado das condições experimentais avaliadas. De fato, o cálculo do efeito numérico das variáveis avaliadas (considerando um modelo linear simples) sobre o rendimento indicou um efeito predominante da carga de reagentes (magnitude do efeito: - 4,5) e do tempo de cozimento (magnitude do efeito: - 4,0), contra um efeito mínimo da variável tempo de desfibramento (magnitude do efeito: -1,5). Neste

contexto, a condição experimental de pré-cozimento e desfibramento que utilizou 6% de Na_2SO_3 e 3% de NaOH , tempo de digestão de 120 min e desfibramento em liquidificador por 60 min foi considerada ótima por simular um rendimento próximo ao observado em escala industrial para a mesma espécie de madeira (92%) (dados de produção não publicados - Melhoramentos Papéis Ltda). Quando tempos curtos de cozimento e refino foram empregados, o material desfibrado no liquidificador foi problemático para a etapa de refino, pois várias vezes houve travamento do disco do refinador.

Após essa avaliação inicial de ajuste de variáveis, 3 repetições do processo de polpação foram feitas nas condições descritas para o experimento número 7 e o material desfibrado foi avaliado quanto a curva de refino no refinador de discos Bauer MD-300. As polpas foram refinadas com níveis progressivos de consumo de energia entre 250 a 1700 Wh e os valores de freeness obtidos estão mostrados na figura 6 (o grau CSF-Freeness é inversamente proporcional a capacidade de reter água apresentada por uma determinada massa de fibras; ou seja, quanto mais refinada a polpa, menor será o valor de freeness). Os desvios mostrados para cada ponto experimental se referem a repetições autênticas, ou seja, 3 experimentos repetidos na totalidade, partindo de conjuntos diferentes de cavacos de um mesmo lote. Pode-se notar que houve grande reprodutibilidade entre os 3 experimentos, sendo que o desvio padrão médio para todos os pontos de amostragem foi de 5,8%, com valores mínimos de 3,5% para os pontos no início do refino (650-550 mL CSF) e máximos de 10% para os pontos no final do refino (250 mL CSF). Esses dados indicam que as condições definidas para a polpação permitem preparar polpas com elevado rendimento, simulando o rendimento industrial, além de proporcionar o refinamento em refinador de discos de forma eficiente e reprodutível, sendo, portanto, útil para nossos estudos comparativos entre madeira controle e madeiras biotratadas que serão avaliadas no decorrer desse trabalho.

Figura 6. Curva de refino de polpas CTMP de *E. grandis* preparadas a partir das condições definidas no experimento número 7 descrito na Tabela 2.

Durante o refinamento, as fibras são submetidas a uma ação mecânica para potencializar propriedades importantes para a fabricação subsequente de papéis dos mais variados fins. Resultados obtidos por Sanjuan (1997), Smook (1990) e Walker (1993) mostraram que o processo de refino acarreta um decréscimo da resistência ao rasgo e um aumento da resistência à tração, devido a maior área de contato entre as fibras e maior adensamento da massa fibrilar.

Como mencionado anteriormente, durante o refino, as fibras podem sofrer ruptura e, com isso, o teor de finos (partículas com comprimento menor do que 200 μm) e de fragmentos de fibras aumentam no material refinado (FOELKEL, 2007). Até um certo ponto de refino, este processo de ruptura e fibrilação das fibras é benéfico, proporcionando papéis com maior resistência à tração. No entanto, há um ponto em que a ruptura das fibras passa a ser tão expressiva que leva à formação de papéis com menor resistência à tração. Esse ponto comumente é denominado como ponto de "quebra" na curva de refino; ou seja, é o ponto em que refinar mais se torna um processo indesejável, pois há perda de resistência à tração no papel preparado na etapa subsequente (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009). O grau de refino que uma determinada polpa atinge depende das condições de polpação e do material de partida, sendo que, em geral, o refinamento proporciona menores benefícios quando se refina polpas com fibras de parede mais espessa e estrutura menos flexível (FERREIRA; FIGUEIREDO, 2001). No caso particular de *E. grandis*, um trabalho desenvolvido por Vicentim e Ferraz (2008) estudou o comprimento das fibras em polpas CTMP de *E. grandis* produzidas por uma etapa de defibramento em

liquidificador e refino em refinador *Jökro*. A pré-digestão empregada foi feita com 10% de Na_2SO_3 e 5% de NaOH ocasionando rendimento final de polpa da ordem de 75%. Neste caso, o comprimento médio das fibras refinadas foi de aproximadamente 920 μm , independentemente do tempo de refinamento no moinho *Jökro* (entre 30 e 90 min). Os valores de freeness variaram entre 770 mL e 520 mL, para os tempos de 30 e 90 min de refinamento, respectivamente, indicando que o fenômeno principal de refino foi a fibrilação da parede celular, pois a diminuição de freeness não foi acompanhada de formação de fragmentos de fibras. Esta é uma característica de fibras flexíveis que não fragmentam expressivamente durante o refino (FERREIRA; FIGUEIREDO, 2001), pois apresentam teor reduzido de lignina e elevada hidrofilicidade devido à sulfonação expressiva ocorrida durante a etapa de pré-digestão química (BIERMAN, 1993; BÖRAS; GATENHOLM, 1999). De fato, estas mesmas polpas apresentaram índices de resistência à tração de 47 N.m/g a 520 mL de freeness. Este valor é bastante superior aos normalmente obtidos com o processo industrial (16 N.m/g) que utiliza *E. grandis* como matéria prima e menor carga de reagentes na etapa química da polpação CTMP (FERRAZ et al., 2008).

No caso de amostras biotratadas por *C. subvermispora*, o trabalho de Vicentim e Ferraz (2008) mostrou ainda que as biopolpas refinaram mais facilmente do que o controle, proporcionaram papéis com resistência à tração levemente melhoradas (aumento de 4% para polpas com 520 mL de freeness) e apresentaram fibras com comprimentos médios similares aos observados no controle. No entanto, um dos biotratamentos avaliados por Vicentim e Ferraz (2008) empregou cultivos suplementados com glicose e milhocina que proporcionaram biopolpas com fibras mais frágeis que sofreram ruptura expressiva durante o refino. Neste caso, o comprimento médio das fibras foi de 620 μm após 90 min de refino. Este menor comprimento médio das fibras implicou em graus de refino mais intensos (320 mL de freeness nas biopolpas refinadas por 90 min), mas, mesmo nesta situação, ainda não houve perda de resistência à tração das biopolpas que apresentaram 52 N.m/g a 540 mL de freeness (aumento de 10% em relação ao controle).

O conjunto de dados discutido anteriormente é bastante relevante, pois permite ter uma magnitude de como as características das polpas são alteradas em função do refino e do biotratamento da madeira e qual a implicação destas alterações nas propriedades mecânicas do papel. As polpas CTMP preparadas no presente trabalho (usando refinador de discos) também foram avaliadas quanto às propriedades mecânicas e as características morfológicas das fibras. A figura 7A mostra o perfil de resistência à tração das folhas formadas a partir de polpas com graus de refino que variaram de 465 a 205 mL de freeness.

Nota-se claramente que todos os pontos de refino avaliados ainda estão dentro da faixa em que se observa um aumento na resistência à tração da polpa. As polpas com 205 e 465 mL de freeness deram origem a folhas com índices de resistência à tração de 33 e 19 N.m/g, respectivamente. O dado de resistência à tração destas polpas é similar àquelas obtidas industrialmente com cerca de 480 mL de freeness, 16 N.m/g, o que corrobora uma boa simulação do processo industrial utilizando refinadores de discos de pequena escala. O comportamento do índice de resistência ao estouro das polpas foi similar ao da resistência à tração; ou seja, aumentou progressivamente com a intensidade do refino (Figura 7B). Pode-se notar ainda que o índice de resistência ao rasgo não variou de forma expressiva em função do refino (Figura 7C).

Figura 7. Propriedades mecânicas das folhas formadas a partir de polpas controle de *E. grandis* em função do grau de refino. Resistência à tração (A); Resistência ao estouro (B); Resistência ao rasgo (C).

As propriedades de resistência das polpas podem estar relacionadas a diversas características morfológicas das fibras, além de sua composição química. As características morfológicas das fibras contidas nas polpas preparadas em nossos estudos são mostradas na figura 8. Como comentado anteriormente, os rendimentos de polpação do processo em

²desenvolvimento são elevados e a composição química das polpas reflete essencialmente o teor de componentes existentes na madeira de origem. Nestas polpas (preparadas com rendimentos da ordem de 90%), a composição química não é determinante nas propriedades do papel e sim as características morfológicas das fibras (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009). O comprimento médio da fibra como mencionado anteriormente, pode afetar a maioria das propriedades do papel (BAMBER, 1985). O maior índice de resistência à tração de uma determinada polpa pode ser atribuído intrinsecamente ao maior comprimento das fibras que a compõem. Porém, esta correlação vale num determinado intervalo de comprimentos de fibra. Fibras muito longas podem interferir na formação homogênea das folhas, levando à formação de papéis com menor resistência, segundo IPT⁴ (1982 apud BITTENCOURT, 2004). Por outro lado, fibras muito curtas geram papéis menos resistentes à tração devido a maior fragilidade intrínseca de um papel formado com este tipo de fibras. A resistência ao rasgo também é afetada pelo comprimento das fibras e ligação entre elas. Fibras longas com paredes mais espessas proporcionam papéis com maior resistência ao rasgo, segundo IPT⁴ (1982 apud BITTENCOURT, 2004), Walker (1993) e Sanjuan (1997).

Os dados da figura 8A mostram que as polpas em estudo apresentavam comprimento médio das fibras que variaram entre 910 µm no material pouco refinado, e 730 µm no material refinado a cerca de 200 mL de CSF. Observa-se claramente que o aumento na intensidade do refino, onde há maior consumo de energia, gerou fibras com menor comprimento médio. A largura média das fibras também variou em função da extensão do refino. Os dados mostram fibras ligeiramente mais espessas no início do refino (22,1 µm) e fibras mais finas no material refinado a aproximadamente 200 mL de CSF (19,3 µm) (Figura 8B). O teor de finos não variou de forma expressiva entre os 3 pontos de refino avaliados (Figura 8C). Estes resultados confirmam aos dados obtidos na literatura (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009), uma vez que o refino acarretou um certo nível de quebra das fibras e uma pequena escamação da superfície externa (diminuindo levemente a espessura da parede) o que não foi necessariamente prejudicial para a propriedade do papel preparado subsequentemente, visto que a resistência à tração aumentou significativamente em função da extensão do refino.

⁴IPT. **Celulose e papel**. São Paulo: IPT, 1982. v. 2: tecnologia de fabricação de papel. 402p.

Figura 8. Características das fibras de polpas CTMP de *E. grandis* em função do refino em refinador de discos. Comprimento médio das fibras ponderado por comprimento (A); Largura média das fibras (B); e Teor de finos (C).

Claramente há um compromisso durante o refino no que diz respeito à qualidade do papel a ser preparado a partir do material refinado. É necessário refinar até um determinado ponto, onde as resistências à tração e ao estouro ainda são melhoradas, mas a

resistência ao rasgo não é significativamente deteriorada. No estudo aqui desenvolvido, nota-se que até o nível de 200 mL de freeness ainda não houve perda expressiva na resistência ao rasgo e as resistências ao estouro e à tração foram melhoradas. De uma forma geral, pode-se inferir que os níveis de quebra das fibras induzidas pelo refino não foram suficientemente elevados para causar perda nas propriedades mecânicas.

No caso específico das polpas CTMP de eucalipto, foi verificado, em nossos próprios experimentos (apresentados em detalhes no item 5.2 para a madeira de *E. urograndis*), que mesmo refinamentos intensos que geraram fibras com comprimento médio de 570 μm e 25,4% de finos, ainda não causaram perda de resistência à tração dos papéis (Figura 16). Isso é bastante relevante no contexto do presente estudo, pois a determinação da distribuição do tamanho de fibras envolve um procedimento simples de análise de imagens realizado com pequena massa de amostras, enquanto que a preparação de papéis requer um procedimento mais moroso e uma massa grande de amostra. Neste sentido, a maior parte dos estudos descritos a seguir se limitou a comparar a distribuição do tamanho de fibras das amostras oriundas do controle (madeira não degradada) e das biopolpas. A comparação em questão serviu de base para inferir se o biotratamento poderia ou não acarretar perdas expressivas das propriedades mecânicas dos papéis que seriam preparados a partir das biopolpas.

5.2 Biopolpação usando *C. subvermispora* e *P. chrysosporium*

Um primeiro grupo de experimentos de biopolpação foi realizado com o cultivo misto de *C. subvermispora* e *P. chrysosporium* sobre madeira não autoclavada e suplementada com milhocina. Esse grupo de experimentos foi realizado a fim de verificar a habilidade destes fungos em colonizar madeira de *E. grandis* em condições não assépticas e regimes de temperatura variáveis de incubação.

Nestes cultivos, a temperatura foi alterada de 37°C a 27°C com ciclos de 3 dias a cada temperatura, sendo que nos 3 primeiros dias a temperatura foi mantida em 37°C. A colonização efetiva dos cavacos foi observada a partir da presença de micélio na superfície da madeira, bem como pelo processo progressivo de descoloração, comumente observado durante a biodegradação de eucalipto (FERRAZ et al., 2008). Foi possível diferenciar o micélio de *C. subvermispora*, que se apresentou aderido à superfície dos cavacos e cresceu de forma gradual e lenta, do micélio de *P. chrysosporium* que predominou rapidamente nos

cultivos, inclusive formando esporos que não permanecem aderidos à superfície dos cavacos.

No cultivo mencionado anteriormente, praticamente não se notou micélio ou esporos de fungos indesejáveis que, caracteristicamente, apresentam micélio aéreo (crescem formando hifas que não ficam aderidas à superfície da madeira) de coloração branca, esverdeada ou preta e são comumente detectados em cultivos contaminados (MASARIN et al., 2009; FERRAZ et al., 2008; MASARIN; FERRAZ, 2008). Isso indicou que o cultivo misto proporciona melhores condições para os basidiomicetos competirem com os contaminantes indesejáveis ou ainda que a simples estratégia de incubar os cultivos em temperaturas variáveis de 37°C e 27°C foi eficiente para controlar o crescimento de contaminantes comumente encontrados no processo desenvolvido desde o início a 27°C (MASARIN; FERRAZ, 2008). Vale mencionar que em estudos anteriores foi demonstrado que *C. subvermispora* não foi apto para colonizar madeira fresca de *E. grandis* quando cultivado desde o início a 27°C (MASARIN, 2006; MASARIN; FERRAZ, 2008). Nestes cultivos, com madeira não autoclavada suplementada com milhocina, foi observado o crescimento de contaminantes oportunistas que esporularam já nos primeiros 10 dias de incubação. A maioria dos contaminantes apresentava micélio aéreo e as maiores áreas cobertas por estes fungos continham um micélio branco, embora micélios de coloração preta e esverdeada também tenham sido observados. Adicionalmente, não se observou o micélio característico de *C. subvermispora* nos cavacos de madeira, bem como as enzimas extracelulares características desse fungo, xilanases e MnPs, não foram detectadas (MASARIN, 2006; MASARIN; FERRAZ, 2008). Alguns dos contaminantes que cresceram a 27°C foram identificados como pertencentes às espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* spp. (MASARIN et al., 2009). Por outro lado, alguns fungos termófilos e termotolerantes como *Aspergillus caespitosus*, *Aspergillus terreus*, *Humicola insolens*, *Humicola fuscoatra*, *Penicillium lagena*, e *Thermoascus aurantiacus*, também tem sido encontrados em cultivos sobre materiais lignocelulósicos mesmo a 37°C (GHATORA et al. 2006). No caso dos experimentos que foram conduzidos em temperaturas variáveis de incubação (37°C e 27°C), este tipo de contaminação não esteve presente.

Supõe-se que nos cultivos mistos em estudo nesta tese, a temperatura inicial relativamente elevada (37°C) favoreça o crescimento de *P. chrysosporium* além de inibir o crescimento de contaminantes indesejáveis. Por outro lado, no conjunto experimental avaliado, que compreendeu uma triplicata de cultivo, foi possível observar que a

descoloração dos cavacos induzida pela ação dos basidiomicetos não foi homogênea. Ou seja, em alguns dos cultivos a descoloração dos cavacos foi muito intensa, enquanto que num outro extremo se observou pouca descoloração da madeira. Essa baixa reprodutibilidade do fenômeno de descoloração poderia, a princípio, indicar que os cultivos não podem ser facilmente repetidos, dependendo assim do lote de madeira empregada ou ainda da homogeneidade e viabilidade da inoculação aplicada.

Em virtude da baixa reprodutibilidade nos níveis de descoloração da madeira, cada repetição desse grupo de cultivos foi ensaiada separadamente frente ao processo posterior de polpação CTMP. Conforme já descrito para a madeira controle, as polpas foram refinadas com níveis variados de consumo de energia de 250 a 1700 Wh. Embora tenhamos observado variações expressivas nos níveis de descoloração dos cavacos durante o biotratamento, as 3 amostras proporcionaram curvas de refino muito similares. Os dados médios de Freeness obtidos e seus respectivos desvios padrão estão mostrados na figura 9. Nota-se claramente que as polpas de madeira biotratada refinaram mais facilmente do que as polpas de madeira controle. Por exemplo, as curvas de refino mostraram que os cavacos biotratados deram origem a polpas com 300 mL de Freeness (CSF) consumindo 33% menos energia do que o observado para o refino da madeira controle.

Como referência para a maioria dos experimentos desenvolvidos no presente trabalho, utilizamos uma amostra de *E. grandis* biotratada por *C. subvermispora* que foi obtida a partir de cultivos suplementados com milhocina e conduzidos em condições otimizadas e de plena assepsia (VICENTIM; FERRAZ, 2008) (Figura 9). Nessas condições, a economia de energia para a preparação de polpas com 300 mL de CSF foi de 67%. A comparação dos dados obtidos com essa madeira biotratada com aqueles obtidos a partir da madeira dos cultivos mistos em condições não assépticas sugere que nos cultivos mistos ainda não se obteve o máximo de eficiência possível. Por outro lado, nos cultivos mistos se empregou madeira não autoclavada o que do ponto de vista de processo industrial seria uma enorme vantagem.

Figura 9. Curva de refino de polpas CTMP de *E. grandis* preparadas a partir de madeira controle (●); Madeira biotratada no cultivo misto de *C. subvermispora* com *P. chrysosporium* (◆) e; Madeira de referência para o processo de biopolpação (autoclavada e biotratada por *C. subvermispora* em condições assépticas e previamente otimizadas que incluem a adição de 0,5% de milhocina aos cultivos (Vicentim e Ferraz, 2008)) (■).

Apesar de as curvas de consumo de energia terem apresentado grande reprodutibilidade entre as 3 repetições das madeiras biotratadas no cultivo misto com madeira não autoclavada, a baixa reprodutibilidade nos níveis de descoloração da madeira observada nesses experimentos indicou a necessidade de realizar um segundo grupo de experimentos no qual se optou por uma etapa de impregnação e lavagem dos cavacos com água a 80°C. Essa etapa foi introduzida com o objetivo de “ajustar” a madeira fresca a condições minimamente reprodutíveis em função de bateladas alternadas de cavacos provenientes do processo industrial. Conforme descrito na sessão de materiais e métodos (item 4.2), os cavacos frescos são coletados imediatamente após a etapa de picagem num picador industrial. Apesar de o sistema de coleta ser repetido em condições idênticas, temos observado que lotes diferentes de cavacos têm apresentado níveis de umidade variáveis entre um mínimo de 35% e um máximo de 55%, dependendo do tempo decorrido entre o corte da árvore e a picagem no pátio industrial. Quando o nível de umidade é inferior a 55%, a etapa de inoculação é feita com a adição de mais água a fim de elevar a umidade para 55%. Essa adição de água pode, em princípio, repor a água desejável para a biodegradação. No entanto, é comum se observar a drenagem de parte da água de inoculação para a parte baixa do biorreator (Figura 4A), resultando um procedimento de inoculação pouco reprodutível.

Tomando como base as informações apresentadas, optou-se por uma etapa de impregnação e lavagem dos cavacos a 80°C com o objetivo principal de elevar o nível de

umidade inicial para 50-55% e também para proporcionar algum nível de descontaminação da superfície dos cavacos.

Os cultivos mistos descritos anteriormente foram refeitos com esse novo lote de madeira. A partir desse experimento também foram realizados cultivos de controle em que cada espécie fúngica foi inoculada separadamente, além dos cultivos mistos. Em todos os casos foi usada a suplementação dos cultivos com 0,5% de milhocina.

De forma similar ao observado nos cultivos anteriores, notou-se que nos cultivos mistos o micélio de *C. subvermispora* cresceu aderido à superfície dos cavacos, durante os 30 dias de biodegradação, enquanto que o micélio de *P. chrysosporium* apresentou esporos que não permanecem aderidos à superfície dos cavacos. Os cultivos mistos foram novamente caracterizados pela ausência de contaminantes. Também se observou uma forte descoloração dos cavacos de *E. grandis* que se reproduziu nas repetições de cultivo avaliadas, diferindo da baixa reprodutibilidade observada anteriormente. Por outro lado, nos cultivos inoculados somente com *C. subvermispora* foi observado o crescimento de alguns contaminantes oportunistas. A maioria dos contaminantes apresentava micélio aéreo de coloração preta, embora micélio de coloração esverdeada também tenha sido observado. Mesmo havendo contaminação dos cultivos, se notou uma descoloração intensa dos cavacos de *E. grandis*, o que sugere que havia atividade metabólica de *C. subvermispora*.

Nos cultivos inoculados somente com *P. chrysosporium* também foi observado o crescimento de contaminantes oportunistas, porém em menor quantidade do que o observado nos cultivos de *C. subvermispora*. Nesse caso, os contaminantes apresentaram micélio aderido à superfície dos cavacos de cor predominantemente preta e esverdeada. Porém, o micélio de *P. chrysosporium* rapidamente predominou nos cultivos, inclusive com esporulação notória. Também se observou a descoloração dos cavacos de *E. grandis*.

Um fator relevante que deve ter contribuído para o menor nível de contaminação nos cultivos de *P. chrysosporium* comparados aos de *C. subvermispora* foi a temperatura ideal de crescimento fúngico nos dois casos. Ambos os cultivos foram realizados em regimes de temperaturas alternadas entre 27°C e 37°C. No entanto, *P. chrysosporium* cresce eficientemente em temperaturas mais elevadas, ou seja, a 37°C, enquanto que os contaminantes não. 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).

Vale lembrar que estes experimentos foram conduzidos com a finalidade de se obter vantagem competitiva dos fungos de interesse sobre a biota contaminante em

condições não assépticas. A combinação de 2 espécies que são eficientes na biopolpação (*C. subvermispora* e *P. chrysosporium*) e que apresentam temperatura de crescimento ótimo diferenciada permite que se obtenha vantagem de uma inoculação inicialmente em temperatura mais elevada (37°C) que minimiza o crescimento de contaminantes para uma continuação do processo biodegradativo em um regime que, hipoteticamente, se poderia abdicar do controle de temperatura. Ou seja, a partir de uma manutenção inicial em temperatura mais elevada, o cultivo poderia continuar na faixa variável entre 27-37°C, pois haveria sempre uma espécie apta a realizar a biodegradação. Os dados obtidos nos dois grupos de experimentos iniciais indicam que, de fato, a combinação das duas espécies e o regime de temperaturas alternadas permitiu eliminar o crescimento dos contaminantes, o que não se obteve nos cultivos individuais de cada espécie, mesmo utilizando o regime alternado de temperaturas.

As diferentes amostras de madeira obtidas no experimento 2 foram avaliadas a partir de parâmetros de eficiência do processo CTMP como as curvas de consumo de energia durante o refino em refinador de discos, já descritas anteriormente. Porém, a partir deste experimento, outros parâmetros também passaram a ser avaliados, tais como: a) a determinação do teor de rejeitos (palitos) e polpa resultantes da etapa de desfibramento em liquidificador; b) a determinação do rendimento global de polpação e c) a distribuição do tamanho das fibras contidas nas polpas.

Os dados médios de Freeness obtidos no refino das amostras oriundas do experimento 2 e seus respectivos desvios padrão estão mostrados na figura 10. Nota-se claramente que as madeiras biotratadas refinaram mais facilmente do que a madeira controle. As curvas de refino mostraram que os cavacos biotratados deram origem a polpas com 300 mL de CSF consumindo entre 30 e 41% menos energia do que o observado para o refino da madeira controle (Tabela 3). Como mencionado anteriormente, uma amostra de *E. grandis* biotratada por *C. subvermispora* em cultivos conduzidos em condições otimizadas e de plena assepsia foi utilizada como referência. Com base na polpação desta amostra de referência para madeira biotratada nota-se que também nos experimentos conduzidos com madeira pré-tratada a 80°C/30 min ainda não se obteve o máximo de eficiência possível. Por outro lado, obteve-se uma colonização e descoloração dos cavacos bastante homogênea, o que não havia sido obtido com madeira fresca (experimento 1). Os dados mostram ainda que o cultivo conduzido somente com *P. chrysosporium* proporcionou uma curva de refino com menores consumos de energia, especialmente

abaixo de 350 mL de CSF, se aproximando dos níveis de consumo de energia observados na amostra de referência quando o grau de refino foi da ordem de 100 mL de CSF. Estes dados indicariam que o cultivo utilizando somente *P. chrysosporium* seriam mais adequados para a preparação de polpas de elevado grau de refino (baixo valor de CSF).

Figura 10. Curva de refino de polpas CTMP de *E. grandis* preparadas a partir de madeira controle (●); madeira de cultivo misto de *C. subvermispora* com *P. chrysosporium* (◆); somente *C. subvermispora* (▲); somente *P. chrysosporium* (●); Referência inoculada com *C. subvermispora* em condições assépticas e meio otimizado (Vicentin e Ferraz, 2008) (■).

O rendimento de polpação e o teor de palitos deste grupo de amostras também são apresentados na tabela 3. O rendimento de polpação da amostra controle foi de $89 \pm 3\%$. No caso das amostras biotratadas, o rendimento foi de 85 a 87%, indicando que não há grande variação entre elas. Já o teor de palitos obtidos após a etapa de desfibramento do material foi de $52 \pm 2\%$ na amostra controle e similar nas amostras biotratadas (54-55%).

Tabela 3 - Características do processo de polpação CTMP de *E. grandis* biotratado por 30 dias por *C. subvermispora* e *P. chrysosporium*: economia de energia, teor de palitos e rendimento de polpação.

Espécies inoculadas	Parâmetros avaliados			Rendimento (%)**
	Economia de Energia (%) em 300 mL de CSF	Classificação de Fibras (%)*		
		Polpa	Palito	
Controle	0	48	52	89
<i>C. subvermispora</i>	33 ± 2	45	55	85
<i>P. chrysosporium</i>	41 ± 5	45	55	86
<i>Cultivo misto</i>	30 ± 8	46	54	87
Referência	67 ± 2	44	56	89

(*) a variação experimental entre três experimentos realizados com a madeira controle foi de 2%.

(**) a variação experimental entre três experimentos realizados com a madeira controle foi de 3%.

As polpas refinadas neste experimento foram avaliadas quanto à distribuição do tamanho de fibras. Nota-se na figura 11 que todas as amostras apresentaram polpas com menor comprimento de fibra em função da extensão do refino, como já evidenciado anteriormente para a madeira controle (item 5.2). O comprimento das fibras para as amostras tratadas por *P. chrysosporium* variou entre 910 µm no material pouco refinado e 570 µm no material refinado a cerca de 70 mL de CSF (Figura 11A). Nas amostras controle, o comprimento das fibras foi de 910 µm para polpas pouco refinadas, e 730 µm para polpas mais refinadas (cerca de 200 mL de freeness). Já para as amostras envolvendo *C. subvermispora* e o cultivo misto dos dois basidiomicetos, o comprimento das fibras foi bastante similar e mostraram fibras com 920 µm no material pouco refinado, e 620 µm nas polpas com maior grau de refino, como mostra a figura 11A.

A largura da fibra nas amostras de madeira tratada com *P. chrysosporium* correspondeu a 21,6 µm no material pouco refinado e 18,9 µm no material refinado a aproximadamente 70 mL de CSF, enquanto que no controle estes valores foram de 22,1 µm e 19,3 µm, respectivamente (Figura 11B). Para os cultivos mistos e cultivos individuais envolvendo *C. subvermispora*, os resultados para largura da fibra não diferiu. A largura das fibras nestas amostras variou entre 21,8 µm no início do refino e 19,2 µm nas polpas mais refinadas, como mostra a figura 11B. Já o teor de finos variou pouco entre as amostras avaliadas. Para o material pouco refinado este valor foi de 18,6%, e 24% no final do processo de refino (Figura 11C).

No conjunto de dados discutidos anteriormente nota-se que o refino das biopolpas proporcionou maior degradação das fibras do que aquele observado com a madeira controle, sugerindo que a madeira biotratada apresenta fibras com paredes menos resistentes. Esses dados indicam que mesmo que os fungos em questão sejam seletivos para degradar lignina (FERRAZ; CHRISTOV; AKHTAR, 1998; MASARIN, 2006), houve um certo nível de degradação da parede celular que a tornou mais susceptível ao dano mecânico causado pelos refinadores de disco. Por outro lado, a diminuição no comprimento médio das fibras parece não ter atingido níveis elevados a ponto de causar uma eventual perda de propriedade mecânica do papel a ser preparado com estas fibras. Isso pode ser inferido com base nos estudos anteriormente discutidos nesta tese que contrapõem a resistência mecânica dos papéis e as características morfológicas das fibras (item 5.1).

Figura 11. Características das fibras de polpas CTMP de *E. grandis* em função do refino em refinador de discos. Comprimento médio das fibras ponderado por comprimento (A); Largura média das fibras (B); e Teor de finos (C). Controle (●); Cultivo misto de *C. subvermispora* com *P. chrysosporium* (◆); somente *C. subvermispora* (▲); somente *P. chrysosporium* (●).

Uma análise geral dos dados obtidos com as amostras do experimento 2 mostra que a economia de energia obtida no refino das madeiras biotratadas parece não depender necessariamente da combinação dos dois fungos no cultivo. De fato, os cultivos isolados de cada espécie proporcionaram economias de energia maiores do que as observadas no

cultivo misto. O estudo envolvendo as características morfológicas das fibras geradas também não indicou diferença expressiva no comportamento das amostras biotratadas em função do tipo de fungo usado. Por outro lado, a estratégia de executar um cultivo com temperatura variável, iniciando em 37°C por 3 dias foi eficiente para minimizar a presença de contaminantes. Dessa forma, foi realizado um novo grupo de experimentos em que a temperatura inicial foi de 37°C por 3 dias, porém o restante do período de cultivo foi mantido a 27°C (experimento 3). Nesse experimento, não se avaliou o cultivo misto, pois os dados anteriores já apontavam para a ausência de benefício associada à combinação dos dois fungos em questão (uma combinação alternativa de fungos, *C. subvermispora* e *P. ostreatus*, está descrita no item 5.4). O objetivo do experimento 3 foi avaliar se somente a primeira etapa de cultivo a 37°C seria suficiente para minimizar a presença de contaminantes, além de verificar se isso foi o efeito determinante nos cultivos com temperatura variável (experimento 2). Adicionalmente, optamos por avaliar também períodos mais curtos de biotratamento (15 dias).

Os resultados obtidos no experimento 3 mostraram que a simples estratégia de iniciar o cultivo a 37°C foi eficiente para controlar parcialmente o crescimento de contaminantes comumente encontrados no processo com madeira não autoclavada. Neste experimento foi possível observar que o nível de contaminação após 15 dias de incubação era baixo tanto para os cultivos com *C. subvermispora* como com *P. chrysosporium*. No entanto, nos dois casos foi observado o aparecimento de contaminantes oportunistas em tempos mais longos de tratamento (30 dias). Isso sugeriu, que a elevação esporádica de temperatura até 37°C (como foi feito no experimento 2) pode ajudar a controlar os contaminantes. Nos cultivos de *C. subvermispora*, a maioria dos contaminantes observados apresentava micélio aéreo de cor branca, embora micélios de coloração preta também tenham sido observados. No caso de *P. chrysosporium*, o nível de contaminação foi menor e o micélio de *P. chrysosporium* claramente predominou nos cultivos. Nos dois casos se observou a típica descoloração dos cavacos de *E. grandis*.

Da mesma forma que o descrito para os experimentos 1 e 2, as madeiras biotratadas por 15 e 30 dias no experimento 3 foram submetidas ao processo de polpação CTMP. Os dados obtidos estão mostrados nas figuras 12 e 13 e na tabela 4. Nos cultivos onde a madeira foi biodegradada apenas com *C. subvermispora* (Figura 12), nota-se claramente, pelas curvas de refino, que as madeiras biotratadas refinaram mais facilmente do que o controle. Como a temperatura de cultivo foi mantida somente 3 dias acima do ideal para essa espécie fúngica, observamos ainda que as curvas de refino da madeira biotratada por

15 e 30 dias se aproximam da curva considerada como referência obtida a partir de cultivos com madeira autoclavada (Figura 12). Para a produção de polpas com 300 mL de Freeness, as amostras biotratadas com *C. subvermispora* por 15 e 30 dias consumiram 49 e 54 % menos energia do que o controle, respectivamente. Isso indicou que estender o tempo de cultivo acima dos 15 dias não se mostra interessante, mesmo nos cultivos com madeira não autoclavada (Tabela 4).

Figura 12. Curva de refino de polpas CTMP de *E. grandis* preparadas a partir de madeira controle (●); Madeira biotratada com *C. subvermispora* por 15 dias (▲); e 30 dias (◆); Referência inoculada com *C. subvermispora* em condições assépticas e meio otimizado (Vicentin e Ferraz, 2008) (■).

Figura 13. Curva de refino de polpas CTMP de *E. grandis* preparadas a partir de madeira controle (●); Madeira biotratada com *P. chrysosporium* por 15 dias (▲); e 30 dias (◆); Referência inoculada com *C. subvermispora* em condições assépticas e meio otimizado (Vicentin e Ferraz, 2008) (■).

Tabela 4 - Características do processo de polpação CTMP de *E. grandis* biotratado com *C. subvermispora* e *P. chrysosporium*: economia de energia, teor de palitos e rendimento de polpação.

Espécies inoculadas	Parâmetros avaliados			
	Economia de Energia (%) em 300 mL de CSF	Classificação de Fibras (%)*		Rendimento (%)**
		Polpa	Palito	
<i>Controle</i>	0	48	52	89
<i>C. subvermispora</i> ¹⁵	49 ± 4	49	51	94
<i>P. chrysosporium</i> ¹⁵	47 ± 5	48	52	95
<i>C. subvermispora</i> ³⁰	54 ± 3	46	54	93
<i>P. chrysosporium</i> ³⁰	60 ± 4	39	61	95
<i>Referência</i>	67 ± 2	44	56	89

¹⁵ 15 dias de Biodegradação ³⁰ 30 dias de Biodegradação

(*) a variação experimental entre três experimentos realizados com a madeira controle foi de 2%.

(**) a variação experimental entre três experimentos realizados com a madeira controle foi de 3%.

Para as amostras biotratadas com *P. chrysosporium* (Figura 13) nota-se que as reduções no consumo de energia foram ainda maiores: 47% e 60% para cultivos de 15 e 30 dias, respectivamente. Esses dados foram, inclusive, superiores aos obtidos nos cultivos anteriores em que se alterou a temperatura de 37 a 27°C ao longo do cultivo (experimento 2): 41% após 30 dias de cultivo.

O rendimento de biopolpação observado no grupo de experimentos 3 foi de 93 a 95% (excluindo controle e referência), sendo similar ao observado para a madeira controle. Já o teor de palitos obtidos após a etapa de desfibramento da amostra tratada com *C. subvermispora* foi de 51 e 54% para cultivos de 15 e 30 dias, respectivamente, enquanto que nos casos das amostras biotratadas com *P. chrysosporium* a proporção de palitos foi levemente maior atingindo 61% nas madeiras biotratadas por 30 dias.

As características morfológicas das fibras contidas nas polpas preparadas neste grupo de experimentos são mostradas nas figuras 14A-C. Na figura 14A observa-se que o comprimento médio das fibras para as amostras de madeira tratada com *C. subvermispora* variou entre 890 µm no material pouco refinado, e 480 µm para polpas refinadas com 1700 Wh (60 mL de freeness). Nota-se ainda que não houve uma diferença significativa entre as amostras biotratadas por 15 e 30 dias. As amostras biotratadas por *P. chrysosporium* por 30 dias deram origem a polpas com os menores comprimentos de fibra (700 µm para polpas pouco refinadas, e 410 µm para polpas mais refinadas).

A largura da fibra e o teor de finos são mostrados nas figuras 14B e 14C. Para os cultivos envolvendo *C. subvermispora*, a largura da fibra foi de 22 µm no início do refino e cerca de 18-19 µm para polpas mais refinadas tanto para amostras biotratadas por 15 como 30 dias (Figura 14B). O comportamento das fibras de biopolpas preparadas a partir da madeira tratada com *P. chrysosporium* foi similar àquele observado para as amostras biotratadas com *C. subvermispora*.

O teor de finos refletiu a maior intensidade de ruptura e escamamento das fibras observados neste grupo de experimentos, pois variou entre 18,7%, e 29% nas biopolpas obtidas com madeira tratada por *C. subvermispora*, sem distinção para 15 ou 30 dias de tratamento e entre 17,9% e 24,7%, e 23,7% e 32,6% nas amostras oriundas de madeira tratada com *P. chrysosporium* por 15 e 30 dias, respectivamente (Figura 14C). Quando se compara os dados obtidos no experimento 3 com aqueles obtidos no experimento 2, é possível perceber que a ruptura e o escamamento das fibras das biopolpas foi mais intensa durante o refino das amostras geradas no experimento 3 e não há uma explicação clara para a diferença observada. De qualquer forma, a diferença é importante, pois parte da diminuição de freeness observada nas amostras do experimento 3 pode ser atribuída a formação de finos mais expressiva e não necessariamente a uma maior eficiência do biotratamento dentro do contexto esperado na biopolpação.

Figura 14. Características das fibras de polpas CTMP de *E. grandis* em função do refino em refinador de discos. Comprimento médio das fibras ponderado por comprimento (A); Largura das fibras (B), e Teor de finos (C). Controle (●); *C. subvermispura* por 15 dias (▲); *C. subvermispura* por 30 dias (◆); *P. chrysosporium* por 15 dias (▲); *P. chrysosporium* por 30 dias (◆).

Os três primeiros grupos de experimentos discutidos até o momento mostraram que é possível estabelecer cultivos dos basidiomicetos *C. subvermispura* e *P. chrysosporium* sobre madeira de *E. grandis* em condições não assépticas que permitem obter reduções expressivas no consumo de energia nas etapas subsequentes de polpação CTMP. Para isso foi necessário empregar, no mínimo, um período inicial de incubação a 37°C por 3 dias. Nos 3 experimentos também se observou certa variabilidade nos níveis de eventuais

contaminações e nos percentuais de economia de energia obtidos com o uso das madeiras biotratadas, além de variações nas características morfológicas das fibras contidas nas biopolpas.

Um quarto grupo de experimentos foi desenvolvido nas mesmas condições descritas para o experimento 3, porém empregando um lote de cavacos de madeira de *E. urograndis*. O objetivo deste experimento foi avaliar se um lote de madeira de outra origem (outra planta industrial) e, inclusive, de uma outra espécie (de fato, um híbrido das espécies *E. grandis* e *E. urophila*), proporcionaria resultados similares aos descritos anteriormente. Essa abordagem permite avaliar a "robustez" do sistema de descontaminação e incubação empregado até o momento como forma de viabilizar a biopolpação em condições não assépticas.

Os cavacos de madeira foram suplementados com milhocina e inoculados apenas com *C. subvermispora* empregando o regime de descontaminação dos cavacos e temperaturas de incubação descritos no experimento 3.

A colonização dos cavacos de *E. urograndis* foi eficiente uma vez que se detectou a presença de micélio de *C. subvermispora* na superfície da madeira, além da descoloração dos cavacos e a não detecção visual de contaminantes.

As curvas de refino das polpas CTMP destas amostras mostraram que os cavacos de *E. urograndis* biotratados com *C. subvermispora* deram origem a polpas com 300 mL de Freeness (CSF) consumindo 30% menos energia do que o observado para o refino da madeira controle (Figura 15), confirmando assim a eficiência do biotratamento. No entanto, é importante mencionar que ao comparar as duas amostras controle, se nota que a madeira de *E. urograndis* apresentou maior facilidade de refino do que a de *E. grandis*, o que poderia justificar a menor economia de energia atribuída ao biotratamento das amostras tratadas em condições idênticas no experimento 3 (30% para *E. urograndis* e 49% para *E. grandis*).

Figura 15. Perfil de refinamento de polpas CTMP de *E. urograndis*. Controle (●); Madeira biotratada com *C. subvermispota* por 15 dias (▲).

O rendimento de polpação e o teor de palitos para este experimento são apresentados na tabela 5. O rendimento de polpação da amostra controle foi de $90 \pm 3\%$. No caso da amostra biotratada, o rendimento foi de 94%. Já o teor de palitos obtidos após a etapa de desfibramento do material foi de $55 \pm 2\%$ na amostra controle e na amostra biotratada este teor foi de 57%.

Tabela 5 - Características do processo de polpação CTMP de *E. urograndis* biotratados com *C. subvermispota* e controle: economia de energia, teor de palitos e rendimento de polpação.

Espécies inoculadas	Parâmetros avaliados			
	Economia de Energia (%) em 300 mL de CSF	Classificação de Fibras (%)*		Rendimento (%)**
		Polpa	Palito	
<i>Controle</i>	0	45	55	90
<i>C. subvermispota</i>	30 ± 2	43	57	94

(*) a variação experimental entre três experimentos realizados com a madeira controle foi de 2%.

(**) a variação experimental entre três experimentos realizados com a madeira controle foi de 3%.

Dentre os vários experimentos realizados anteriormente, este grupo de amostras foi selecionada para uma avaliação mais completa das biopolpas, incluindo a determinação das propriedades mecânicas das polpas controle e biotratadas, além da análise morfológica das fibras.

As propriedades mecânicas para as polpas controle e biopolpas de *E.urograndis* com diferentes graus de refino estão apresentadas na figura 16. A figura 16A mostra o perfil de resistência à tração das folhas em função do grau de refino. A polpa de madeira

biotratada apresentou uma resistência à tração levemente menor do que o controle. Para uma polpa com 300 mL de CSF, a diminuição na resistência à tração foi de 24%. Por outro lado, o fato de a amostra biotratada ter atingido níveis de refino mais intensos (valores de CSF menores do que 200 mL), permitiu que se obtivesse papéis com índices de resistência à tração de até 26,4 N.m/g, enquanto que na amostra controle os maiores valores obtidos foram de 24 N.m/g. A resistência ao estouro também foi inferior na polpa de madeira biotratada (Figura 16B), mas seguiu tendência similar aos dados da resistência à tração. Ou seja, houve situações em que a polpa de madeira biotratada atingiu 1,0 kPa.m²/Kg, sendo que este valor não pode ser atingido na amostra controle (Figura 16B).

A resistência ao rasgo das polpas obtidas de madeira biotratada variaram pouco em função do refino, conforme já observado com a madeira controle de *E. grandis*. No entanto, o comparativo entre as duas polpas de *E. urograndis* mostra que a polpa de madeira biotratada apresentou índices de resistência ao rasgo sempre inferiores aos observados no respectivo controle (Figura 16C).

A Figura 16D, apresenta a contraposição dos valores de resistência à tração e ao rasgo, mostrando claramente que a amostra controle apresenta melhor propriedade mecânica do que a amostra biotratada, pois para uma dada resistência a tração, as polpas controle apresentam maior resistência ao rasgo. Esses dados são similares aos observado por Vicentim e Ferraz, 2008 utilizando madeira biotratada por *C. subvermispora* em condições otimizadas e de plena assepsia, porém empregando um refinador do tipo *Jökro* e não de discos como o usado na presente tese.

Figura 16. Propriedades mecânicas das folhas formadas a partir de polpas controle e biotratadas por *C. subvermispura* de *E. urograndis*, em função do grau de refino. Resistência a Tração (A); Resistência ao Rasgo (B); Resistência ao Estouro (C); Contraposição dos índices de resistência à tração e ao rasgo das folhas (D). Polpa controle (●); polpa biotratada com *C. subvermispura* (○).

O fato de ter sido possível obter polpas com resistências à tração e ao estouro mais elevadas com as madeiras biotratadas pode estar relacionado ao maior teor de finos e fibras mais curtas observados nas biopolpas. O maior teor de finos e de fibras de menor comprimento pode levar à formação de folhas mais homogêneas (NAZHAD et al., 2000) e isso pode tornar as ligações interfibras mais fortes (em função da maior área superficial dos finos (PAAVILAINEN, 1993)). Por outro lado, grandes quantidades de finos reduzem a drenabilidade das fibras, podendo aumentar o tempo requerido para o processo de deságüe das biopolpas. O teor excessivo de finos e fibras curtas pode ainda ser prejudicial à resistência dos papéis a partir de um determinado nível (YOUNG, 1994). Ou seja, idealmente há um compromisso do efeito do refino sobre a qualidade das polpas. A ruptura das fibras e a formação de finos devem atingir um nível ideal para que a propriedade mecânica dos papéis sejam máximas.

As características morfológicas das polpas controle e biopolpas de *E. urograndis* estão organizadas na figura 17 e na tabela 6. O efeito mais notório do biotratamento sobre as características das polpas foi a formação de fibras mais curtas nas biopolpas, além de um maior percentual de finos (figuras 17A e 17C). Por exemplo, as biopolpas

apresentaram até 25,4% de finos no ponto mais intenso de refino (1700 Wh), enquanto que na amostra controle o teor de finos não ultrapassou 21%.

As características morfológicas em estudo indicam que as fibras mais curtas e o maior teor de finos contribuíram para que as biopolpas fossem menos resistentes do que as polpas controle, quando se compara uma determinada resistência ao rasgo num mesmo nível de resistência à tração (Figura 16D). Por outro lado, a maior fragmentação das fibras permitiu que as biopolpas atingissem níveis mais elevados de retenção de água (menores valores de freeness) e ainda numa condição em que o teor de finos e as fibras mais curtas geraram papéis com maior resistência à tração (27 e 24 N.m/g para as biopolpas e polpas controle, respectivamente, refinadas à 1700 Wh).

Figura 17. Características das fibras de polpas CTMP de *E. urograndis* em função do refino em refinador de discos. Comprimento médio das fibras ponderado por comprimento (A); Largura das fibras (B), e Teor de finos (C). Controle (●); somente *C. subvermispora* (▲).

O grau de fibrilação medido para as fibras em estudo estão apresentados na tabela 6. É possível observar certa tendência de aumento da fibrilação em função do refino, porém não houve diferença significativa entre as amostras controle e as biopolpas. Esse dado é relevante, pois indica que o efeito principal durante o refino que levou as biopolpas

a apresentar menores valores de freeness pode ser atribuído à formação de finos e não a fibrilação.

Tabela 6 - Grau de Fibrilação das polpas controle e biopolpas de *E. urograndis* após a etapa de polpação CTMP

Consumo de energia (Wh)	Fibrilação (%)	
	Controle	Biotratada
250	3,3 ± 0,1	3,3 ± 0,2
1000	3,9 ± 0,1	3,9 ± 0,1
1700	4,4 ± 0,1	4,5 ± 0,1

Outro parâmetro determinado nas amostras em estudo foi a porosidade gurley (Figura 18). Porosidade gurley ou permeância ao ar é a dificuldade com que um determinado volume de gás passa por uma folha sob uma diferença de pressão. Ela depende do número, tamanho, forma e distribuição dos poros no material, segundo IPT⁴ (1982 apud BITTENCOURT, 2004) e Sanjuan (1997). Desta forma, folhas menos porosas requerem maior tempo para que o ar passe através delas, o significa que durante o refino a porosidade diminui, pois as folhas formadas são mais densas. O perfil de porosidade gurley das amostras de *E. urograndis* está apresentada na figura 18. É possível observar que a porosidade diminui em função do progresso do refino. As duas amostras em estudo apresentaram porosidades similares na região entre 400 e 200 mL de freeness. No entanto, as biopolpas, por terem atingido menores valores de freeness também atingiram porosidades muito baixas, chegando a 21 seg/100 mL, na polpa refinada a 1700 Wh que atingiu 110 mL de freeness. O elevado teor de finos e fibras mais curtas nas biopolpas foi certamente a causa da menor porosidade obtida nos pontos de refino intenso (valores de freeness menores do que 200 mL) (SMOOK, 1990), pois nesta situação as folhas formadas são mais densas e com menor porosidade.

⁴ IPT. **Celulose e papel**. São Paulo: IPT, 1982. v. 2: tecnologia de fabricação de papel. 402p.

Figura 18. Porosidade gurley das folhas formadas a partir de polpas controle e biotratadas por *C. subvermispora* de *E. urograndis*. Polpa controle (●); polpa biotratadas com *C. subvermispora* (○).

Uma síntese sobre os resultados referentes ao tratamento dos cavacos com *C. subvermispora* mostra que mesmo utilizando madeira não autoclavada, o biotratamento foi eficiente e facilitou o refinamento mecânico. Por outro lado, o biotratamento levou a formação de biopolpas CTMP com resistência mecânica levemente inferior à da polpa controle e com algumas características morfológicas diferenciadas, que incluem a maior formação de finos e fibras com menor comprimento. Esta característica indica que o biotratamento deve ter fragilizado as fibras que assim sofreram maior dano mecânico dentro do refinador de discos.

5.3 Biopolpação usando *P. sanguineus* e *T. versicolor*

Um novo grupo de experimentos foi feito utilizando outros dois basidiomicetos de decomposição branca, *P. sanguineus* e *T. versicolor*. Trata-se de duas espécies isoladas por pesquisadores argentinos (Dra. Laura Villalba, Laboratorio de Biotecnología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales) que em estudos prévios mostraram grande capacidade de colonizar madeira e competir com eventuais contaminantes, mesmo quando cultivados a 27°C (LEVIN et al., 2007), o que não foi o caso das espécies *C. subvermispora* e *P. chrysosporium* descritas anteriormente. Desta forma, desenvolvemos uma série de novos experimentos de biopolpação nos quais o procedimento de descontaminação adotado foi o mesmo descrito anteriormente (pré-lavagem com água a 80°C/30 min), porém, após a inoculação, a incubação foi mantida desde o início a 27°C. Nos cultivos de *P. sanguineus* notou-se que o micélio cresceu aderido à superfície dos cavacos durante os 30 dias de biodegradação. Já o micélio de *T. versicolor* apresentou

esporos que não permaneceram aderidos à superfície dos cavacos. Em ambos os casos, não se observou o aparecimento de contaminantes oportunistas, o que confirma os dados anteriores de Levin et al (2007), e indica uma vantagem dessas duas espécies quando comparadas com *C. subvermispora*, o qual não compete com contaminantes quando cultivado a 27°C. Também se observou uma forte descoloração dos cavacos de *E. grandis* nos cultivos com *T. versicolor* e *P. sanguineus*.

A avaliação das amostras biotratadas por 15 e 30 dias frente ao processo de polpação CTMP está mostrada nas figuras 19 e 20 e na tabela 7. As madeiras biotratadas por 30 dias nos cultivos com *P. sanguineus* e *T. versicolor* refinaram mais facilmente quando comparadas aos cultivos incubados por 15 dias (Figuras 19 e 20). As curvas de refino mostraram que os cavacos biotratados por 30 dias deram origem a polpas com 300 mL de Freeness (CSF) consumindo 26% e 37% menos energia do que o observado para o refino da madeira controle, nos casos de biotratamento com *T. versicolor* e *P. sanguineus*, respectivamente (Tabela 7). Já as amostras biotratadas por 15 dias não proporcionaram economia de energia no processo CTMP.

O rendimento de polpação foi cerca de 92% para todas as amostras biotratadas. Já o teor de palitos obtidos após a etapa de desfibramento do material foi de aproximadamente 52% na amostra controle, e nas amostras biotratadas com *P. sanguineus* este valor atingiu 62 %. Nas amostras tratadas com *T. versicolor*, o teor de rejeitos ficou em torno de 58 %, como mostra a tabela 7.

Figura 19. Perfil de refinamento de polpas CTMP de *E. grandis* biotratadas com *T. versicolor* em função do consumo de energia. Controle (●); *T. versicolor* – 15 dias (▲); *T. versicolor* – 30 dias (◆); Referência (■).

Figura 20. Perfil de refinamento de polpas CTMP de *E. grandis* biotratadas com *P. sanguineus* em função do consumo de energia. *P. sanguineus* – 15 dias (▲); Controle (●); *P. sanguineus* – 30 dias (◆); Referência (■).

Tabela 7 - Características do processo de polpação CTMP de *E. grandis* biotratados com *P.sanguineus* e *T.versicolor*: economia de energia, teor de palitos e rendimento da etapa química.

Espécies inoculadas	Parâmetros avaliados			
	Economia de Energia (%) em 300 mL de CSF	Classificação de Fibras (%)*		Rendimento (%)**
		Polpa	Palito	
Controle	0	48	52	89
<i>P. sanguineus</i> ¹⁵	nc	40	60	92
<i>P. sanguineus</i> ³⁰	37 ± 16	38	62	91
<i>T. versicolor</i> ¹⁵	nc	42	58	93
<i>T. versicolor</i> ³⁰	26 ± 13	44	46	92
Referência	67 ± 2	44	56	89

¹⁵ 15 dias de Biodegradação ³⁰ 30 dias de Biodegradação

nc (não calculado): Polpas biotratadas que não atingiram 300mL de Freeness ou que não proporcionaram economia de energia

(*) a variação experimental entre três experimentos realizados com a madeira controle foi de 2%.

(**) a variação experimental entre três experimentos realizados com a madeira controle foi de 3%.

Como os benefícios do processo CTMP para este grupo de experimentos foram obtidos somente com tempos mais longos de biotratamento, as características morfológicas das fibras foram analisadas para as amostras de *P. sanguineus* e *T. versicolor* envolvendo 30 dias de cultivo, como mostra a figura 21. As amostras biotratadas por *P. sanguineus* apresentaram um maior grau de refino e deram origem a polpas com menor comprimento de fibra (Figura 21A). O comprimento médio das fibras para as amostras de *P. sanguineus*

variou entre 860 μm no material pouco refinado e 620 μm nas polpas mais refinadas. Nas amostras envolvendo a biodegradação por *T. versicolor* o comprimento das fibras foi de 980 μm para polpas pouco refinadas e 680 μm para polpas com maior grau de refino (Figura 21A).

A largura da fibra e o teor de finos também são observados na figura 21. Para os cultivos envolvendo *P. sanguineus* a largura da fibra variou entre 23 μm no início do refino e 20 μm para polpas mais refinadas (Figura 21B). Para as amostras de *T. versicolor* a largura da fibra correspondeu a 21,8 μm no material pouco refinado e 19 μm no material com alto grau de refino, como mostra a figura 21B. Já o teor de finos variou pouco entre as amostras avaliadas. Em *P. sanguineus* este valor foi de 23% no final do processo de refino, enquanto que na amostras envolvendo *T. versicolor* este valor foi de 18% (Figura 21C).

Figura 21. . Características das fibras de polpas CTMP de *E. grandis* em função do refino em refinador de discos. Comprimento médio das fibras ponderado por comprimento (A); Largura das fibras (B), e Teor de finos (C). Controle (●); *P. sanguineus* (◆); *T. versicolor* (◆);

Foi possível observar claramente a capacidade destas duas espécies fúngicas em colonizar madeira e competir com eventuais contaminantes durante todo o período de biodegradação. Porém, as economias de energia no processo CTMP somente foram obtidas com tempos mais longos de biotratamento (30 dias) e ainda assim os valores obtidos foram

inferiores aos observados com as madeiras biotratadas por *C. subvermispora* e *P. chrysosporium*, mesmo nos cultivos dessas espécies onde se observou algum nível de contaminação. Ou seja, nota-se que as espécies *T. versicolor* e *P. sanguineus* foram menos adequadas para os objetivos da biopolpação do que *C. subvermispora* e *P. chrysosporium*. Entender os motivos para essa diferenciação pode ajudar nos estudos subsequentes de otimização da biopolpação. Sabe-se, por exemplo, que *T. versicolor* é um fungo capaz de produzir lacase e MnP (ARCHIBALD, 1992; HATAKKA, 1994; PAICE et al., 1993), sendo que, em materiais lignocelulósicos predominam as altas atividades de lacase (MACHUCA; FERRAZ, 2001; MOREDO et al., 2003). Lacases também são produzidas pelo gênero *Pycnoporus* quando cultivados em meio sólido (VIKINESUARY et al., 2006), em madeira ou outros materiais lignocelulósicos (BARMEK; LI; ERIKSSON, 1998; EGGERT et al., 1996; MACHUCA; FERRAZ, 2001). Já as atividades de MnP não foram detectadas nos estudos descritos anteriormente. Essa avaliação sugere que a secreção de MnP (e sua subsequente ação sobre a madeira) possa ser relevante para uma alta eficiência do processo de biopolpação. De fato, um estudo anterior de nosso grupo de pesquisas com *C. subvermispora* atuando sobre madeira autoclavada mostrou que há uma correlação entre a secreção de MnP e a eficiência no processo de biopolpação (FERRAZ et al., 2008; VICENTIN; FERRAZ, 2008). Esse estudo mostrou que era necessário um nível mínimo de MnP para promover, de maneira eficiente, o processo de polpação CTMP subsequente. Outros estudos já publicados que descrevem os sistemas celulolíticos e ligninolíticos de *C. subvermispora* e *P. chrysosporium* também corroboram essa hipótese, pois se sabe que estes basidiomicetos são bons produtores de MnP (GLENN et al., 1983; FERRAZ et al., 2002; GUERRA; MENDONÇA; FERRAZ, 2002; MASARIN, 2006; SOUZA-CRUZ, 2002; SOUZA-CRUZ et al., 2004). Alguns trabalhos demonstraram que *C. subvermispora* produz lacases somente nos estágios iniciais de biodegradação da madeira e geralmente isso ocorre quando o cultivo recebe a adição de um co-substrato como milhocina (CUNHA, 2008; ENOKI et al., 1999; FERRAZ; CÓRDOVA; MACHUCA, 2003; LOBOS et al., 1994; MASARIN, 2006; SOUZA-CRUZ et al., 2004; VICENTIM, 2007; VICUÑA et al., 1996).

Em nenhum dos cultivos apresentados anteriormente nesta tese foi monitorada a secreção de enzimas por *C. subvermispora* ou *P. chrysosporium*. A determinação dos níveis de enzimas extracelulares poderia, a princípio, fornecer informações sobre o nível de atividade metabólica de cada espécie estudada. No entanto, num primeiro momento, a

opção foi avaliar a eficiência do processo somente a partir das curvas de refino das amostras biotratadas e de alguns outros parâmetros de polpação e de qualidade das fibras. Essa abordagem foi adotada devido à observação de experimentos realizados anteriormente em nosso próprio grupo de pesquisas que mostraram que nos cultivos de *C. subvermispora* e *P. chrysosporium* sobre madeira fresca ou descontaminada por lavagem a 80°C com água acidificada, a secreção das enzimas MnP e xilanases era significativamente diminuída quando se comparava com o observado nos cultivos com madeira autoclavada. Um experimento desenvolvido por Masarin e Ferraz (2008) com madeira descontaminada com uma solução de ácido sulfúrico pH 2,5 a 80°C por 1 hora (tratamento denominado para fins práticos como "lavado ácido") mostrou que a secreção de MnPs e xilanase foi diminuída em 2 e 3 vezes, respectivamente, quando se comparou com a secreção de enzimas em madeira autoclavada.

Com base na discussão da importância da MnP para os processos de biopolpação, e na ausência de benefício observada nos cultivos mistos de *C. subvermispora* com *P. chrysosporium*, decidiu-se realizar um novo grupo de experimentos envolvendo cultivos mistos de *C. subvermispora* com *Pleurotus ostreatus*, pois essa espécie fúngica é capaz de produzir MnP quando cultivada isoladamente em madeira e, além disso, mostrou efeito sinérgico positivo para a secreção de MnP quando co-cultivado com *C. subvermispora* (CHI; HATAKKA; MAIJALA, 2007). O objetivo inicial foi avaliar se os cultivos mistos confirmavam o efeito sinérgico para a produção de MnP reportado por Chi, Hatakka, Maijala (2007). Numa etapa subsequente, avaliou-se a polpação CTMP das amostras biotratadas.

Os cultivos foram divididos em dois sub-grupos. Um estudo inicial foi feito com madeira não autoclavada para avaliar a capacidade das duas espécies competirem com eventuais contaminantes, da mesma forma que o já avaliado para *C. subvermispora* e *P. chrysosporium*. Neste caso, a madeira empregada como substrato nos cultivos foi *E. urograndis*. O outro subgrupo de experimentos foi feito com madeira autoclavada (*E. grandis*), já que evidências anteriores apontavam baixos níveis de enzimas quando se utilizou madeira não autoclavada (MASARIN; FERRAZ, 2008). Este último conjunto de experimentos foi realizado essencialmente com a finalidade de verificar se a eventual ação sinérgica de *C. subvermispora* com *P. ostreatus* para a secreção de MnP implicaria também num benefício adicional no processo de polpação CTMP subsequente. Os dados para a produção de enzimas e os resultados de biopolpação desses cultivos estão apresentados no item 5.4.

5.4 Biopolpação em cultivos mistos de *C. subvermispora* e *P. ostreatus*

Um primeiro grupo de experimentos (experimento 6) foi realizado com o cultivo de *C. subvermispora* e *P. ostreatus* sobre madeira não autoclavada de *E. urograndis* suplementada com milhocina. Os cultivos foram inicialmente mantidos a 37°C por 3 dias e posteriormente a 27°C até completarem 15 dias.

Nos cultivos envolvendo *P. ostreatus* foi observado o crescimento de contaminantes oportunistas. A maioria dos contaminantes apresentava micélio aéreo, de coloração escura e não aderido à superfície dos cavacos. Nos cultivos envolvendo *C. subvermispora*, e no cultivo misto dos dois fungos não foi notada a presença de contaminantes. O micélio de *C. subvermispora* e *P. ostreatus* predominou sobre os cavacos de madeira, onde foi ressaltada uma forte descoloração.

Em função do crescimento eficiente dos fungos sobre a madeira, a atividade metabólica foi tentativamente monitorada a partir da secreção de enzimas (Tabela 8). Em todos os cultivos avaliados, nenhuma atividade de MnP foi detectada. Já as atividades de lacase foram muito baixas em todos os cultivos. Na tabela 8 é possível observar que a atividade enzimática máxima de lacase não ultrapassou 33 UI/kg de madeira, nos cultivos de *C. subvermispora*. Nos cultivos mistos, a atividade de lacase foi de 19 UI/kg de madeira, enquanto que no cultivo que utilizou somente *P. ostreatus* a atividade foi 29 UI/Kg. Este comportamento já era esperado, pois *P. ostreatus* é capaz de sintetizar lacase em meio líquido e em meio sólido (HA et al., 2001; HIBBETT et al., 2007; KOFUJITA, 1991; MONCALVO et al., 2002; SNAJDR; BALDRIAN, 2007). Quanto ao *C. subvermispora*, vários trabalhos mostraram que este fungo produz lacases somente nos estágios iniciais de biodegradação da madeira e geralmente isso ocorre quando o cultivo recebe a adição de um co-substrato como milhocina (CUNHA, 2008; ENOKI et al., 1999; FERRAZ; CÓRDOVA; MACHUCA, 2003; LOBOS et al., 1994; MASARIN, 2006; SOUZA-CRUZ et al., 2004; VICENTIM, 2007; VICUÑA et al., 1996).

Tabela 8 - Atividades enzimáticas obtidas durante a biodegradação de *E. urograndis* por *C. subvermispora* e *P. ostreatus*.

Espécies Fúngicas	Atividades Enzimáticas (UI/Kg)			
	MnP	Lacase	Endoglucanase	Xilanase
<i>C. subvermispora</i>	0 ± 0	33 ± 14	0 ± 0	314 ± 10
<i>P. ostreatus</i>	0 ± 0	29 ± 0	2 ± 1	378 ± 141
<i>C. subvermispora</i> + <i>P. ostreatus</i>	0 ± 0	19 ± 13	0 ± 0	665 ± 276

Dentro do complexo hidrolítico foram determinadas as atividades de endoglucanase e xilanase total, utilizando como substratos carboximetilcelulose e xilana de bétula, respectivamente. A xilanase foi a principal enzima detectada nestes cultivos. Para os cultivos individuais envolvendo *C. subvermispora*, as atividades atingiram 314 UI/Kg. As atividades desse complexo xilanolítico devem ser referentes às endoxilanas, pois a secreção de β -xilosidases é baixa em cultivos de *C. subvermispora* (HEIDORNE et al., 2006; SETHURAMAN; AKIN; ERIKSSON, 1998). Atividades de xilanase também foram detectadas em *P.ostreatus*, como mostra a tabela 8. Segundo Baldrian (2003; 2005), este fungo possui um rico complexo celulolítico e hemicelulolítico. Já nos cultivos mistos, as atividades de xilanas foram superiores às observadas nos cultivos individuais de cada espécie e atingiu 665 UI/Kg. Tudo indica que a interação entre os basidiomicetos teria proporcionado maior secreção de xilanas. As atividades de endoglucanase foram nulas ou muito baixas nos 3 cultivos avaliados (Tabela 8).

As amostras controle e biotratadas geradas neste experimento foram avaliadas frente ao processo de polpação CTMP. Os dados obtidos para o consumo de energia na etapa de refino em refinador de discos estão mostrados na figura 22 e tabela 9. Nos cultivos onde a madeira foi biodegradada apenas com *C. subvermispora*, nota-se claramente pelas curvas de refino, que as madeiras biotratadas refinaram mais facilmente do que o controle consumindo 30% menos energia. Já as amostras biotratadas por *P. ostreatus* e no cultivo misto não proporcionaram economia de energia no processo CTMP.

Figura 22. Perfil de refinamento de polpas CTMP de *E. urograndis* biotratadas por *P. ostreatus* e *C. subvermispora*, em função do consumo de energia. Somente *P. ostreatus* (●); cultivo misto de *C. subvermispora* com *P. ostreatus* (◆); controle (●); somente *C. subvermispora* (▲).

Tabela 9 - Características do processo de polpação CTMP de *E. urograndis* biotratados com *C. subvermispora* e *P. ostreatus*.

Espécies inoculadas	Parâmetros avaliados			
	Economia de Energia (%)	Classificação de Fibras (%)*		Rendimento (%)**
		Polpa	Palito	
Controle	0	45	55	90
<i>C. subvermispora</i>	30 ± 2	43	57	94
<i>P. ostreatus</i>	nc	42	58	91
<i>C. subvermispora</i> + <i>P. ostreatus</i>	0	40	60	93

nc (não calculado): Polpas biotratadas que não atingiram 300mL de Freeness

(*) a variação experimental entre três experimentos realizados com a madeira controle foi de 2%.

(**) a variação experimental entre três experimentos realizados com a madeira controle foi de 3%.

O rendimento de polpação variou de 91 a 94% para todas as amostras biotratadas, enquanto que nas amostras controle este valor atingiu 90%. Já o teor de palitos obtidos após a etapa de desfibramento do material foi de 55% na amostra controle, e nas amostras biotratadas com *C. subvermispora* ou *P. ostreatus* este valor foi de aproximadamente 58%. Nos cultivos mistos, o teor de rejeitos ficou em torno de 60%, como mostra a tabela 9.

Os resultados indicaram que os cultivos envolvendo *P. ostreatus* não proporcionaram benefícios frente ao processo de polpação CTMP, quando se utilizou madeira fresca de *E. urograndis*. No entanto, como houve contaminação expressiva destes cultivos, não é possível definir se o efeito principal foi a ineficiência de *P. ostreatus* ou a

inexistência de crescimento adequado do basidiomiceto em questão. Com base nos dados obtidos, também se observa que *P. ostreatus* não proporcionou efeito sinérgico quando cultivado com *C. subvermispora*.

Como mencionado anteriormente, um novo grupo de experimentos foi realizado envolvendo ainda os cultivos mistos de *C. subvermispora* com *P. ostreatus*, porém agora utilizando madeira autoclavada (*E. grandis*). Neste caso, o objetivo foi verificar se estas espécies fúngicas eram capazes de produzir MnP quando cultivadas isoladamente em madeira, ou quando co-cultivadas em madeira autoclavada. Além disso, os resultados poderiam mostrar qualquer relevância da secreção de MnP para os benefícios da biopolpação. Este experimento foi, inclusive, desenvolvido com suplementação ou não de milhocina, pois já se antecipava níveis diferenciados de secreção de MnP (VICENTIM; FERRAZ, 2008). Os cultivos foram inoculados com cargas de inóculo variáveis (100 ou 500mg de micélio/kg de madeira) dependendo, respectivamente da suplementação ou não com milhocina. A incubação foi mantida sempre a 27°C, pois a autoclavagem da madeira permitiria a eliminação completa de contaminantes. Nesse grupo de experimentos, como já era esperado, devido ao uso de madeira autoclavada, não foi observado o crescimento de contaminantes na maioria das condições avaliadas, mesmo nas que continham milhocina. Apenas nos cultivos inoculados com *P. ostreatus* suplementados com milhocina foi observado o crescimento de alguns contaminantes oportunistas que esporularam durante todo o tempo de biodegradação. Estes contaminantes apresentavam micélio aéreo e não aderidos à superfície dos cavacos, e a maioria das áreas cobertas por contaminantes continham um micélio de coloração esverdeada. No entanto, foi possível notar uma pequena descoloração de alguns cavacos de *E. grandis* em 30 dias de cultivo.

As xilanases foram as enzimas predominantes dentre as hidrolases (Tabela 10). A atividade de xilanase secretada foi maior nos cultivos de *C. subvermispora* suplementados com milhocina, atingindo 582 UI/Kg. Os cultivos de *P.ostreatus* suplementados ou não com co-substrato, também apresentaram atividades de xilanases, como mostram os dados da tabela 10.

As atividades de endoglucanases foram baixas nos cultivos das duas espécies (Tabela 10). Este comportamento não era esperado para *P. ostreatus*, já que este fungo é capaz de secretar enzimas celulolíticas (BALDRIAN, 2003; 2005).

Tabela 10 - Atividades enzimáticas provenientes da biodegradação de *E. grandis* por *C. subvermispora* e *P. ostreatus*

Espécies Fúngicas	Atividades Enzimáticas (UI/Kg)			
	MnP	Lacase	Endoglucanase	Xilanase
<i>C. subvermispora</i> ^M	190 ± 9	25 ± 1	60 ± 19	582 ± 3
<i>C. subvermispora</i> SM	153 ± 27	3 ± 1	0 ± 0	405 ± 122
<i>P. ostreatus</i> ^M	36 ± 2	62 ± 1	8 ± 10	135 ± 3
<i>P. ostreatus</i> SM	45 ± 5	13 ± 0	9 ± 3	168 ± 115
<i>C. subvermispora</i> + <i>P. ostreatus</i> ^M	411 ± 18	23 ± 0	2 ± 4	372 ± 3
<i>C. subvermispora</i> + <i>P. ostreatus</i> SM	270 ± 43	20 ± 0	1 ± 4	392 ± 339

^M Cultivos suplementados com milhocina SM Cultivos sem suplementação

A MnP foi a principal enzima oxidativa presente nos cultivos. Esta enzima foi detectada em todas as condições de cultivo. Nos cultivos de *C. subvermispora* adicionados de milhocina, as atividades foram 5 vezes superiores quando comparadas as atividades dos cultivos individuais de *P. ostreatus*, atingindo 190 UI/Kg, como mostrado na tabela 10. Já nos cultivos mistos de *C. subvermispora* e *P. ostreatus*, cujos cavacos foram suplementados com milhocina, a atividade (411 UI/Kg) foi aproximadamente 2 vezes maior quando comparada aos cultivos individuais de *C. subvermispora*, e 11 vezes superior aos cultivos de *P. ostreatus* suplementados. Em um trabalho desenvolvido por Chi, Hatakka, Maijala (2007) já havia sido demonstrado que cultivos mistos de *C. subvermispora* e *P. ostreatus* estimulam a produção de MnP em 7 dias de crescimento em meio líquido.

As atividades de lacase foram baixas em todos os cultivos. Na tabela 10 é possível observar que a atividade enzimática máxima de lacase não ultrapassou 62 UI/kg de madeira, nos cultivos de *P. ostreatus*. Nos cultivos individuais com a adição de milhocina, as atividades foram 5 vezes maiores quando comparadas às atividades encontradas nos cultivos não suplementados. Entretanto, nos cultivos mistos de *C. subvermispora* e *P. ostreatus*, um aumento da atividade de lacase foi observado quando comparado aos cultivos de *C. subvermispora* não suplementados. A interação fúngica proporcionou um aumento na produção desta enzima, como mostra a tabela 10. Estudos revelam que a interação fungo-fungo favorece a uma resposta rápida da síntese de enzimas ligninolíticas.

P. ostreatus e *C. subvermispora* quando cultivados em interação em meio líquido, proporcionam uma alta atividade de lacase após 3 dias de cultivo (CHI, HATAKKA, MAIJALA, 2007).

As amostras de madeira obtidas neste experimento foram então avaliadas quanto ao grau de refino com níveis variados de consumo de energia de 250 a 1700 Wh. Na avaliação do processo CTMP da madeira biotratada apenas com *P. ostreatus*, a figura 23 mostra que as amostras biotratadas suplementadas ou não com milhocina apresentaram um grau de refino similar ao observado para a madeira controle. A economia de energia para polpas de 300 mL de CSF foi de somente 12% e 22% para os cultivos, suplementado e não suplementado com milhocina, respectivamente (Tabela 11).

Figura 23. Perfil de refinamento de polpas CTMP de *E. grandis* biotratadas com *P. ostreatus* em condições variadas de co-substrato. Controle (●); *P. ostreatus* suplementado com milhocina (▲); *P. ostreatus* sem suplementação (◊); Referência (■).

Nos cultivos inoculados somente com *C. subvermispora* (Figura 24) as amostras de madeira biotratada refinaram mais facilmente do que o controle, como já era esperado, pois, de fato, esse cultivo reproduziu estudos anteriores desenvolvidos com madeira autoclavada (VICENTIM; FERRAZ, 2008). Nota-se que a madeira biotratada no cultivo suplementado com milhocina atingiu graus de refino similares aos observados na amostra de referência preparada no trabalho de Vicentim e Ferraz (2008) em condições idênticas de cultivo. A amostra biotratada no cultivo não suplementado resultou em polpas com graus de refino intermediários entre o controle e a amostra de referência.

Figura 24. Perfil de refinamento de polpas CTMP de *E. grandis* biotratadas com *C. subvermispota* em condições variadas de co-substrato. Controle (●); *C. subvermispota* sem suplementação (◆); *C. subvermispota* suplementado com milhocina (▲); Referência (■).

Os dados obtidos para a polpação CTMP das amostras biotratadas nos cultivos mistos de *C. subvermispota* e *P. ostreatus* estão mostrados na figura 25. Observa-se claramente que a eficiência de refino das amostras biotratadas se assemelha àquela obtida nos cultivos individuais usando *C. subvermispota*, sugerindo que não há efeito sinérgico da ação simultânea dos dois fungos.

Figura 25. Perfil de refinamento de polpas CTMP de *E. grandis* biotratadas com *C. subvermispota* e *P. ostreatus* em condições variadas de co-substrato. Controle (●); Cultivo misto sem suplementação (◆); Cultivo misto suplementado com milhocina (▲); Referência (■).

Tabela 11 - Características do processo de polpação CTMP de *E. grandis* biotratados com *C. subvermispora* e *P. ostreatus* em condições variadas de co-substrato: economia de energia, teor de palitos e rendimento da etapa química.

Espécies inoculadas	Parâmetros avaliados			
	Economia de Energia (%)	Classificação de Fibras (%)*		Rendimento (%)**
		Polpa	Palito	
<i>Controle</i>	0	48	52	89
<i>C. subvermispora</i> ^M	60 ± 4	56	44	86
<i>C. subvermispora</i> SM	45 ± 10	56	44	90
<i>P. ostreatus</i> ^M	12 ± 15	57	43	93
<i>P. ostreatus</i> SM	22 ± 16	61	39	91
<i>C. subvermispora</i> + <i>P. ostreatus</i> ^M	60 ± 3	53	47	91
<i>C. subvermispora</i> + <i>P. ostreatus</i> SM	44 ± 6	42	59	91
<i>Referência</i>	67 ± 2	44	56	89

^M Cultivos suplementados com milhocina SM Cultivos sem suplementação

(*) a variação experimental entre três experimentos realizados com a madeira controle foi de 2%.

(**) a variação experimental entre três experimentos realizados com a madeira controle foi de 3%.

O rendimento de polpação e o teor de palitos deste grupo de amostras também são apresentados na tabela 11. O rendimento de polpação da amostra controle foi de 89 ± 3%. No caso das amostras biotratadas, o rendimento manteve-se entre 86 a 93%. Já o teor de palitos obtidos após a etapa de desfibramento do material foi de 52 ± 2% na amostra controle e nas amostras biotratadas este teor variou de 39 a 59%.

Os resultados mostrados nas figuras 23-25 e na tabela 11 indicam claramente que *P.ostreatus* é uma espécie fúngica pouco adequada para os objetivos de biopolpação. Por outro lado, os dados apresentados por Chi, Hatakka e Maijala (2007) mostraram que o co-cultivo de *P. ostreatus* com *C. subvermispora*, além de proporcionar maior secreção de MnP do que o observado em cultivos individuais de cada espécie, também induz maiores perdas de lignina durante a biodegradação da madeira de folhosas (*Aspen - Populus spp*) mantendo a celulose praticamente intacta. No caso da biodegradação de *E. grandis*, a maior secreção de MnP também foi detectada em nossos estudos (Tabela 10), porém a madeira biotratada respondeu à polpação CTMP de forma muito similar àquela degradada nos cultivos que continham somente *C. subvermispora* (Tabela 11), indicando que o cultivo misto dessas duas espécies também não proporcionou benefício extra ao processo de biopolpação. De fato, a elevação do nível de secreção de MnP no cultivo misto,

comparado ao cultivo isolado de *C. subvermispora* significou atividades partindo de 190 UI/kg para 411 UI/kg. A figura 26 correlaciona os níveis de MnP detectados nos cultivos de *P. ostreatus* e *C. subvermispora* com os benefícios obtidos pelo uso da madeira biotratada na polpação CTMP (economia de energia observada para preparar polpas com 300 mL de CSF). Pode-se observar que há uma tendência indicando que quanto maior o nível de MnP nos cultivos, maior foi o benefício na polpação CTMP. Porém, diferindo de estudos anteriores de Vicentim e Ferraz (2008), o patamar onde se observa esse benefício já se encontra em cerca de 200 UI de MnP/kg, enquanto que no estudo de Vicentim e Ferraz (2008) esse patamar era formado a partir de cerca de 500 UI de MnP/kg (Figura 27). A comparação direta dos dados pode ser prejudicada pelo uso de dois métodos diferentes de polpação CTMP empregados nos estudos aqui discutidos, porém os dados indicam de uma forma geral, que a atividade de MnP não é a única atividade extracelular relevante para os benefícios da biopolpação. Nos dois estudos em discussão também foram alterados os níveis de outras enzimas extracelulares como as xilanases e as celulases. Provavelmente, o benefício da biopolpação é decorrente de uma ponderação multivariada desses dados.

Figura 26. Correlação entre os níveis de MnP detectados em cultivos individuais e mistos de *C. subvermispora* e *P. ostreatus* e a economia de energia observada num processo CTMP subsequente usado para preparar polpas com 300 mL de CSF.

Figura 27. Correlação entre a atividade de MnP produzida em cultivos de *E. grandis* por *C.subvermispora* com o grau de fibrilação de polpas CTMP após 90 minutos de refino em refinador *Jöko* (reproduzido de Vicentim e Ferraz (2008)).

6 CONCLUSÕES

Foi possível estabelecer uma condição experimental de polpação CTMP que pudesse preparar polpas de *E. grandis* com elevado rendimento, simulando o rendimento industrial. Esta condição de polpação empregou 6% de Na₂SO₃ e 3% de NaOH para a etapa de pré-cozimento e desfibramento, um tempo de digestão de 120 min a 120 °C e desfibramento em liquidificador por 60 min. Esta condição proporcionou um refinamento em refinador de discos reprodutível e eficiente, e foi utilizada como base para os estudos comparativos entre madeira controle e biotratada. Foi verificado que as polpas controle obtidas após o processo de refinamento apresentaram maior resistência à tração, rasgo e estouro, em função do aumento progressivo da intensidade do refino. De maneira geral, as maiores resistências mecânicas foram atribuídas à degradação parcial das fibras que se tornaram menores e mais finas.

Os cultivos mistos envolvendo *C. subvermispora* e *P. chrysosporium* sobre madeira fresca ou pré-tratada a 80°C/30 min, em regime de temperaturas alternadas permitiu eliminar o crescimento dos contaminantes indesejáveis que geralmente são encontrados no processo de biopolpação. Nestes cultivos, a temperatura alterada de 37°C a 27°C proporcionou o crescimento dos basidiomicetos, o que não se obteve nos cultivos individuais de cada espécie. Para isso foi necessário empregar, no mínimo, um período inicial de incubação a 37°C por 3 dias. Ainda neste contexto, no conjunto experimental avaliado, as polpas de madeira biotratada refinaram mais facilmente consumindo menos energia do que o observado para o refino da madeira controle. Os dados mostram ainda que o cultivo conduzido somente com *P. chrysosporium* proporcionou uma curva de refino com economias de energia que chegaram a 60%. O cultivo utilizando somente *P. chrysosporium* seria mais adequado para a preparação de polpas de elevado grau de refino. O estudo ainda sugere que um tempo de cultivo acima dos 15 dias não se mostra interessante, mesmo nos cultivos com madeira não autoclavada.

As características morfológicas das fibras geradas neste grupo de experimentos não indicaram diferença expressiva no comportamento das amostras biotratadas em função do tipo de fungo usado. No entanto, foi observado que o refino das biopolpas proporcionou maior degradação das fibras do que aquele observado com a madeira controle.

A colonização dos cavacos envolvendo um lote diferenciado de madeira (*E. urograndis*) por *C. subvermispora* também se mostrou eficiente. No entanto, nestes

cultivos foram observadas menores economias de energia quando comparadas as amostras envolvendo *E. grandis*. Em geral, as propriedades mecânicas das biopolpas geradas neste experimento foram levemente piores quando comparado com as polpas controle. No entanto, o fato de ter sido possível atingir níveis mais elevados de refino com as biopolpas também implicou na obtenção de polpas com resistências à tração e ao estouro. É provável também que o elevado teor de finos e fibras mais curtas nas biopolpas tenha proporcionado menor porosidade gurley nas amostras biotratadas obtidas nos pontos de refino intenso.

Na biodegradação de madeira pré-tratada por *P. sanguineus* e *T. versicolor* foi possível observar claramente a capacidade destas duas espécies fúngicas em colonizar madeira e competir com eventuais contaminantes durante todo o período de biodegradação. Nos cultivos envolvendo tempos mais longos de biotratamento (30 dias) as economias de energia no processo CTMP atingiram 26% e 37% nos casos de biotratamento com *T. versicolor* e *P. sanguineus*, respectivamente. Entretanto, as amostras biotratadas por 15 dias não proporcionaram economia de energia no processo CTMP. As amostras biotratadas por *P. sanguineus* que apresentaram um maior grau de refino deram origem a polpas com menor comprimento de fibra e maior teor de finos. De forma geral, foi possível determinar que estas espécies fúngicas foram menos adequadas para os objetivos da biopolpação do que *C. subvermispora* e *P. chrysosporium*.

Nos cultivos envolvendo *P. ostreatus* foi possível observar que esta espécie não foi eficiente para os propósitos da biopolpação tanto nos cultivos com madeira fresca como autoclavada. No caso da biodegradação de *E. grandis* foi detectada uma maior secreção de MnP no cultivo misto de *C. subvermispora* e *P. ostreatus*, que, no entanto, não proporcionou benefício extra ao processo de biopolpação. O nível de secreção de MnP no cultivo misto atingiu 411 UI/kg, enquanto que nos cultivos isolados de *C. subvermispora* e *P. ostreatus* foram observadas atividades de 190 UI/kg e 36 UI/Kg, respectivamente. De fato, os níveis de MnP detectados nos cultivos foram relacionados as economias de energia do processo, porém até cerca de 200 UI/kg de madeira. Acima deste nível de atividade enzimática não houve benefício extra para processo de polpação CTMP.

Por fim, o desenvolvimeto deste trabalho permitiu ainda indicar um cultivo ideal aos processos de biopolpação, envolvendo *C. subvermispora* em madeira pré-tratada a 80°C/30 min, por um período inicial de incubação a 37°C por 3 dias. O estudo ainda sugere que um tempo de cultivo de 15 dias, nestas condições, poderia proporcionar maiores economias de energia e melhores benefícios ao processo de refinamento.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A.; SOUZA-CRUZ, P. B.; FERRAZ, A. Oxalic acid, Fe^{3+} -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.
- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**, 2011. No prelo
- AKHTAR, M., et al. An overview of biomechanical pulping research. In: Young, R. and Akhtar, M., **Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**. New York: John Wiley and Sons, 1998, p.309-383.
- ARCHIBALD, F. S. Lignin peroxidase activity is not important in biological bleaching and delignification of unbleached kraft pulp by *Trametes versicolor*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.3101-3109, 1992.
- ARORA, D. S.; GILL, P. K. Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi. **Bioresource Technology**, v. 77, p.89-91, 2001.
- ASGEIRSDÓTTIR, S. A., DE VRIES, O. M. H.; WESSELS, J. G. H. Identification of three differentially expressed hydrophobins in *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom). **Microbiology**, v.144, p.2961-2969, 1998.
- ASTHER M., et al. Phospholipid and fatty acid enrichment of *Phanerochaete chrysosporium* INA-12 in relation to ligninase production. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.27, p.393-398, 1988.
- BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Inter-laboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v.23, p.257-270, 1992.
- BAJPAI, P. et al. Biokraft pulping of *Eucalyptus* with selected lignin-degrading fungi. **Journal of Pulp and Paper Science**, v. 27, p. 235-239, 2001.
- BALDRIAN, P. Increase of laccase activity during interspecific interactions of white-rot fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, v.50, p.245-253, 2004.
- BALDRIAN, P., et al. Degradation of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. **Research in Microbiology**, v.156, p.670-676, 2005.
- BALDRIAN, P.; GABRIEL, J. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. **FEMS Microbiology Letters**, v.206, p.69-74, 2002.
- BALDRIAN, P.; GABRIEL, J. Lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus* in the presence of cadmium. **FEMS Microbiology Letters**, v.220, p.235-240, 2003.
- BAMBER, R. K. The wood anatomy of *Eucalyptus* and paper making. **Appita Journal**, v.38, n.3, p.210-216, 1985.

BAO, W. L., et al. Oxidative degradation of non-phenolic lignin during lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase. **FEBS Letters**, v.354, p.297-300, 1994.

BARMEK, H.; LI, K.; ERIKSSON, K-EL. Laccase-less mutants of the white rot fungus *Picnoporus cinnabarinus* cannot delignify kraft pulp. **Journal of Biotechnology**, v.66, p.117-124, 1998.

BETTUCCI, L.; LUPOS, S.; SILVAS, S. Growth control of wood rotting fungi by nonvolatile metabolites from *Trichioderma* spp. and *Gliocladium virens*. **Cryptogamie Mycology**, v.9, n.2, p.157-165, 1988.

BEZALEL, L.; HADAR, Y.; CERNIGLIA, C. E. Enzymatic mechanisms involved in phenanthrene degradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.2495-2501, 1997.

BIERMANN, C. J. **Essentials of Pulping and Papermaking**. San Diego: Academic Press, 1993. p.472.

BITTENCOURT, E. **Parâmetros de otimização no processo de fabricação de celulose e papel**. 2004. 73f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

BLANCHETTE, 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. 03-213, 1997.

BÖRAS L.; GATENHOLM P. Surface composition and morphology of CTMP fibers. **Holzforschung**, v. 53, p. 188-194, 1999.

BOURBONNAIS R. et al. Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) in kraft lignin depolymerisation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.1876-1880, 1995.

BOURBONNAIS, R.; LEECH, D.; PAICE, M. G. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1379, p.381-390, 1998.

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, n.4, p.337-353, 1995.

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, n.2, p.79-94, 1996.

CARVALHO, H. G., et al. Efeito da idade de corte da madeira e de variáveis de refino nas propriedades da celulose Kraft branqueada de eucalipto. In: CONGRESSO ANUAL DE CELULOSE E PAPEL DA ABTCP, 31., São Paulo, 1998. **Anais** São Paulo: ABTCP, 1998. p. 367-381.

CASTANARES, A., et al. D-Xylan-degrading enzyme system from the fungus *Phanerochaete chrysosporium*: isolation and partial characterization of an alpha-(4-O-methyl)-d-glucuronidase. **Journal of Biotechnology**, v.43, p.183-194, 1995.

CASTILLO, M., et al. Lignin and manganese peroxidase activity in extracts from straw solid substrate fermentations. **Biotechnology Techniques**, v.11. p.701-706, 1997.

CHI, Y.; HATAKKA, A.; MAIJALA, P. Can co-culturing of two white-rot fungi increase lignin degradation and the production of lignin-degrading enzymes? **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.59, p.32-39, 2007.

CUNHA, G. G. S. **Atividade peroxidativa de extratos obtidos a partir de cultivos de *Ceriporiopsis subvermispota* e sua relação com a degradação de lignina**. 2008. 66f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Universidade de São Paulo, Lorena, 2008.

CUNHA, G. G. S., et al. Linoleic acid peroxidation and lignin degradation by enzymes produced by *Ceriporiopsis subvermispota* grown on wood or in submerged liquid cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v.46, p.262-267, 2010.

DANIEL, G.; VOLC, J.; KUBATOVA, E. Pyranose oxidase, a major source of HO during wood degradation by *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, and *Oudemansiella mucida*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, 1994.

DE ALMEIDA SIQUEIRA, E. M.; MIZUTA, K.; GIGLIO, J. R. *Pycnoporus sanguineus*: a novel source of α -amylase. **Mycological Research**, v.2, p.188-190, 1997.

DWIVEDI, P., et al. Bleach enhancement of mixed wood pulp by xylanase-laccase concoction derived through co-culture strategy. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.160, p.255-268, 2010.

EGGERT., et al. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. **FEBS Letters**, v.391, p.144-148, 1996.

EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. **Pulp and Paper Chemistry and Technology: Fibre and Polymer Technology**. Sweden: School of Chemical Science and Engineering, 2009. 484 p. v.2.

ELISASHVILI, V., et al. Effect of aromatic compounds on the production of laccase and manganese peroxidase by white-rot Basidiomycetes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.37, n.10, p.1091-1096, 2010.

ENOKI, M., et al. Extracellular lipid peroxidation of selective white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispota*. **FEMS Microbiology Letters**, v.180, p.205-211, 1999.

ERIKSSON, K. E. L.; BLANCHETTE, R. A.; ANDER, P. **Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components**. Springer Series in wood Science, ed. T. E. Timell. Springer. Verlag, Berlin, 1990.

ERIKSSON, K. E., et al. Formation and partial characterization of glucose-2-oxidase, a H_2O_2 producing enzyme in *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.23, p.257-262, 1986.

ESPOSITO, E., et al. Henoloxidasas and hydrolases from *Pycnoporus sanguineus* (UEC-2050 strain): applications. **Journal of Biotechnology**, v.29, p.219-228, 1993.

FERRAZ, A., CHRISTOV, L.; AKHTAR, M. Fungal pretreatment for organosolv pulping and dissolving pulp production. In: YOUNG, R.; AKHTAR, M., **Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**. New York: John Wiley & Sons, 1998. p.421-447.

FERRAZ, A.; CORDOVA, A. M.; MACHUCA, A. Wood biodegradation and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora* during solid-state fermentation of *Eucalyptus grandis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, p.59-65, 2003.

FERRAZ, A., et al. Formic acid/acetone-organosolv pulping of White-rotted *Pinus radiata* softwood. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.75, p.1190-1196, 2000.

FERRAZ, A., et al. Attempts to correlate biopulping benefits with changes in the chemical structures of wood components and enzymes produced during the wood biotreatment with *Ceriporiopsis subvermispora*, In: VIIKARI, L.; LANITTO, R. **Progress in Biotechnology**, Elsevier Science, B.V., 2002. v.21, p.73-80.

FERRAZ, A., et al. Technological advances and mechanistic basis for fungal biopulping. **Enzyme and microbial technology**, v.43, p.178-185, 2008.

FERRAZ, A.; MENDOÇA, R.; SILVA, F. T. Organosolv delignification of white and Brownrotted *Eucalyptus grandis* hardwood. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.75, p.18-24, 2000.

FERREIRA, P. J.; FIGUEIREDO, M. M. Efeito do cozimento e da refinação nas dimensões transversais de fibras de *E. globulus*. **O Papel**, v.62, n.1, p.73-80, 2001.

FOELKEL, C. **As fibras dos eucaliptos e as qualidades requeridas na celulose kraft para a fabricação de papel**. Eucalyptus online book & Newsletter. 2007. Disponível em: < <http://www.eucalyptus.com.br>>. Acesso em: 23 Fev. 2011.

FREITAG, M.; MORRELL, J. J. Changes in selected enzyme activities during growth of pure and mixed cultures of the white-rot decay fungus *Trametes versicolor* and the potential biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.38, p.317-323, 1992a.

FREITAG, M.; MORRELL, J. J. Decolorization of the polymeric dye Poly R-478 by wood-inhabiting fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, v.38, p.811-22, 1992b.

GHATORA, S. K., et al. Diversity of plant cell wall esterases in thermophilic and thermotolerant fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 125, p. 434-445, 2006.

GIARDINA, P., et al. Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.2408-2413, 1995.

GIARDINA, P., et al. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Biochemical Journal**, v.34, p.655-663, 1999.

GLENN, J. K. et al. An extracellular H₂O₂ requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.114, p.1077-1083, 1983.

GREENE, R. V; GOULD, J. M. Fatty acyl-coenzyme a oxidase activity and H₂O₂ production in *Phanerochaete chrysosporium* mycelia. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.118, p.437-433, 1984.

GREGORIO, A. P. F., et al. Changes in production of lignin degrading enzymes during interactions between mycelia of the tropical decomposer basidiomycetes *Marasmiellus troyanus* and *Marasmius pallescens*. **Mycological Research**, v.110, p.161-168, 2006.

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.

GUERRA, A.; MENDONÇA, R.; FERRAZ, A. Characterization of the residual lignins in *Pinus taeda* biodegraded by *Ceriporiopsis subvermisporea* by using *in situ* CuO oxidation and DFRC methods. **Holzforschung**, v.56, p.157-160, 2002.

HA, H. C., et al. Production of manganese peroxidase by pellet culture of the lignin-degrading basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.55, p.704-711, 2001.

HABU, N., et al. Release of the fad domain from cellobiose oxidase by proteases from cellulolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*, **FEBS Letters**, v.327, n.2, p.161-164, 1993.

HAMMEL, K. E., et al. Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. **Enzyme and microbial technology**, v.30, p.445-453, 2002.

HAMMEL, K. In Driven by nature: Plant litter quality and decomposition. GADISH, G. and GILLER, G., editors. **CAB International**, 1996. p.33.

HAROLD J. R. Taxonomy of industrially important white-rot fungi. In: YOUNG, R.; AKHTAR, M. **Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**. New York: John Wiley, 1998. p.259-272.

HARVEY, P. J.; SCHOEMAKER, H. E.; PALMER, J. M. Veratryl alcohol as a mediator and the role of radical cations in lignin biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium* **FEBS Letters**. v.195, n.1-2, p.242-246, 1986.

HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. **FEMS Microbiology Reviews**, v.13, p.125-135, 1994.

HEIDORNE, F. O. et al. Characterization of hemicellulases and cellulases produced by *Ceriporiopsis subvermispora* grown on wood under biopulping conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v.38, p.436-442, 2006.

HENRIKSSON, G., et al. Cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* can be cleaved by papain into two domains. **European Journal of Biochemistry**, v.196, n.1, p.101, 1991.

HIBBETT, D.S.; et al. A higher level phylogenetic classification of the fungi. **Mycological Research**, v.111, p.509-47, 2007.

HIGHLEY, T. L.; RICARD, J. Antagonism of *Trichoderma* spp and *Gliocladium virens* against wood fungi. **Material und Organismen**, v.23, p.157-169, 1988.

HISCOX, J., et al. Changes in oxidative enzyme activity during interspecific mycelial interactions involving the white-rot fungus *Trametes versicolor*. **Fungal Genetics and Biology**, v.47, p.562-571, 2010.

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, n.1, p.1-14, 1995.

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.

IAKOVLEV, A.; STENLID, J. Spatiotemporal Patterns of Laccase Activity in Interacting Mycelia of Wood-Decaying Basidiomycete Fungi. **Microbial Ecology**, v.39, p.236-245, 2000.

IKEMORI, Y. K.; JÚNIOR, C., E. Produção de sementes de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* por polinização aberta: resultados preliminares. **Silvicultura**, v.8, n.28, p.306-308, 1983.

JÄGER, A.; CROAN, S.; KIRK, T. K. Production of ligninase and degradation of lignin in agitated submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.50, p.1274-1278, 1985.

JANSHEKAR, H.; FIECHTER, A. Cultivation of *Phanerochaete chrysosporium* and production of lignin peroxidases in submerged stirred tank reactors. **Journal of Biotechnology**, v.8, p.97-112, 1988.

JASZEK, M., et al. Ligninolytic enzymes can participate in a multiple response system to oxidative stress in white-rot basidiomycetes: *Fomes fomentarius* and *Tyromyces pubescens*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.58, n.3-4, p.168-175, 2006.

JENSEN, J. R. E. et al. Manganese-dependent cleavage of nonphenolic lignin structures by *Ceriporiopsis subvermispora* in the absence of lignin peroxidase. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.3679-3686, 1996.

KAPICH, A. N., et al. Effect of lignocellulose-containing substrates on production of ligninolytic peroxidases in submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium* ME-446. **Enzyme and Microbial Technology**, v.34, n.2, p.187-195, 2004.

KAPICH, A. N.; JENSEN, K. A.; HAMMEL, K. E. Peroxyl radicals are potential agents of lignin biodegradation. **FEBS Letters**, v.461, p.115-119, 1999.

KATAGIRI, N.; TSUTSUMI, Y.; NISHIDA, T. Correlation of brightening with cumulative enzyme activity related to lignin biodegradation during biobleaching of kraft pulp by white rot fungi in the solid-state fermentation system. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.617-622, 1995.

KAUSAR, H., et al. Development of compatible lignocellulolytic fungal consortium for rapid composting of rice straw. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.64, n.7, p. 594-600, 2010.

KELLEY, R. L.; REDDY, C. A. Purification and characterization of glucose oxidase from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Bacteriology**. v.166, p.269-274, 1986.

KERN, H. W. Improvement in the production of extracellular lignin peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of solid manganese (IV) oxide. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.32, p.223-234, 1989.

KERSTEN, P. J.; KIRK, T. K. Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal Bacteriology**. v.169, p.2195-2201, 1987.

KHINDARIA, A., et al. Veratryl alcohol oxidation by lignin peroxidase. **Biochemistry**, v.34, n.51, p.16860-16869, 1995.

KHINDARIA, A.; GROVER, T.; AUST, S. Oxalate-dependent reductive activity of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.314, p.301-306, 1994.

KIISKINEN, L. L.; RATTO, M.; KRUUS, K. Screening for novel laccase-producing microbes. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p.640-646, 2004.

KIRK, T. K, FARRELL, R. L. Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology**. v.41, p.465-505, 1987.

KIRK, T. K.; CULLEN, D. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In: YOUNG, R and AKHTAR, M. **Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**. New York: John Wiley and Sons, 1998, p.273-308.

KIRKPATRICK, N., et al. Relationship between fungal biomass production and the brightening of hardwood kraft pulp by *Coriolus versicolor*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p.1147-1152, 1989.

KOFUJITA, H., et al. Alkyl-aryl cleavage of phenolic β -O-4 lignin substructure model compound by Mn(II)-peroxidase isolated from *Pleurotus ostreatus*. **Mokuzai Gakkaishi**, v.37, p.555-561, 1991.

LANG, E; ELLER, G; ZADRAZIL, F. Lignocellulose decomposition and production of ligninolytic enzymes during interaction of white rot fungi with soil microorganisms. **Microbial Ecology**, v.34, p.1-10, 1997.

LARRAYA, L.M., et al. Identification of incompatibility alleles and characterization of molecular markers genetically linked to the A incompatibility locus in the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Current Genetics**, v.34, p.486-493, 1999a.

LARRAYA, L. M., et al. Molecular karyotype of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.3413-3417, 1999b.

LEAL, A. M. C. **Biodegradação de *Eucalyptus grandis* pelo fungo de decomposição branca *Ceriporiopsis subvermispota*: Aspectos químicos e bioquímicos**. 1999. 112f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 1999.

LEISOLA, M. S. A.; THANEI-WYSS, U.; FIECHTER, A. Strategies for production of high ligninase activities by *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Biotechnology**, v.3, p.97-107, 1985.

LEVIN, L., et al. Comparative studies of loblolly pine biodegradation and enzyme production by Argentinean white rot fungi focused on biopulping processes. **Process Biochemistry**, v.42, p.995-1002, 2007.

LEVIN, L.; PAPINUTTI, L.; FORCHIASSIN, F. Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. **Bioresource Technology**, v.94, p.169-76, 2004.

LOBOS, S., et al. Isoenzymes of manganese-dependent peroxidase and laccase produced by the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispota*. **Microbiology**, v.140, p.2691-2698, 1994.

LU, L., et al. Purification and characterization of laccase from *Pycnoporus sanguineus* and decolorization of an anthraquinone dye by the enzyme. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.1232-1239, 2007.

MACHUCA, A.; FERRAZ, A. Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white- and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v.29, p.386-391, 2001.

MARTÍNEZ, A. T., et al. Progress in biopulping of non-woody materials: chemical, enzymatic and ultrastructural aspects of wheat straw delignification with ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. **FEMS Microbiology Reviews**, v.13, p.265-274, 1994.

MARTÍNEZ, D., et al. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. **Nature Biotechnology**, v.22, p.695-700, 2004.

MARZULLO, L., et al. Veratryl alcohol oxidase from *Pleurotus ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevents polymerization of laccase-oxidized substrates. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, p.3823-3827, 1995.

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). Universidade de São Paulo, Lorena, 2006.

MASARIN, F., et al. Laboratory and mill scale evaluation of biopulping of *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden with *Phanerochaete chrysosporium* RP-78 under non-aseptic conditions. **Holzforschung**, v.63, n.3, p.259-263, 2009.

MASARIN, F; FERRAZ, A. Evaluation of *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden biopulping with *Ceriporiopsis subvermispora* under non-aseptic conditions. **Holzforschung**, v.62, p.1-7, 2008.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v.60, p.551-565, 2002.

MENDONÇA, R.; GUERRA, A., FERRAZ, A. Delignification of *Pinus taeda* wood chips treated with *Ceriporiopsis subvermispora* for preparing high-yield kraft pulps. **Journal Chemical Technology and Biotechnology**, v.77, p.411-418, 2002.

MESSNER, K., et al. Fungal treatment of wood chips for chemical pulping. In: Young, R. Akhtar, M. editors. **Environmentally friendly technologies for the Pulp and Paper Industry**. New York: Wiley; 1998. p.385-419.

METSO AUTOMATION. 2006. **KajaaniFS300 Industry Standard Fiber Measurement**. (Documento gerado em Power Point).

MILAGRES, A. M. F., et al. Characterization of hemicellulases and cellulases produced by *Ceriporiopsis subvermispora* grown on wood under biopulping conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v.38, p.436-442, 2006.

MILAGRES, A.M.F; MAGALHÃES, P.O; FERRAZ, A. Purification and properties of a xylanase from *Ceriporiopsis subvermispora* cultivated on *Pinus taeda*. **FEMS Microbiology Letters**, v.253, p.267-272, 2005.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic reagent for the determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1959.

MONCALVO, J. M., et al. One hundred and seventeen clades of euagarics. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.23, p.357-400, 2002.

MOORE-LANDECKER, E. Fungi as saprótrofes. **Em Fundamentals of the fungi**. New Jersey : Prentice Hall. 1996, p.371-403.

MOREDO, M. N., et al. Enhanced ligninolytic enzyme production and degrading capability of *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.19, p.665-669, 2003.

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.

NAZHAD, M. et al. The influence of formation on tensile strength of paper made from mechanical pulps. **Tappi Journal**, v. 83, n. 12, p. 63-72, 2000.

NISHIDA, A.; ERIKSSON, K. E. Formation, purification, and partial characterization of methanol oxidase, a H₂O₂- producing enzyme in *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.9, p.325-338, 1987.

ORIARAM, T.; LABOSKY J. R.; BLAKEHORN, P. Kraft pulp and papermaking properties of *Phanerochaete chrysosporium*- degraded aspen. **Tappi Journal**, v.73 p.147-152, 1990.

ORTH, A.; ROYSE, D.; TIEN, M. Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p. 4017-4023, 1993.

PAAVILAINEN, L. Importance of cross-dimensional fiber properties and coarseness for the characterization of softwood sulfate pulp. **Paper and Timber**, v. 75, n. 5, p. 343-351, 1993.

PAICE, M. G. et al. Direct biological bleaching of hardwood kraft pulp with the fungus *Coriolus versicolor*. **Tappi Journal**, v.72, p.217-221, 1989.

PAICE, M. G. et al. Peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies kraft pulp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.260-265, 1993.

POINTING, S. B.; JONES, E. B. G.; VRIJMOED, L. L. P. Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture. **Mycologia**, v.92, p.139-144, 2000.

POINTING, S. B.; VRIJMOED, L. L. P. Decolorization of azo and triphenylmethane dyes by *Pycnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenoloxidase. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.16, p.317-318, 2000.

QUEIROZ, S. C. S. **Efeito das características anatômicas e químicas na densidade básica da madeira e na qualidade da polpa de *Eucalyptus***. 2002. 65 f. Dissertação. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

QUIROGA, E. N. et al. Purification and characterization of an exo-polygalacturonase from *Pycnoporus sanguineus*. **Mycological research**, v.113, p.1404-1410, 2009.

QUIROGA, E. N.; VATTUONE, M. A; SAMPIETRO, A.R. Purification and characterization of the invertase from *Pycnoporus sanguineus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1251, p.75-80, 1995.

ROY-ARCAND, L.; ARCHIBALD, F.S. Direct dechlorination of chlorophenolic compounds by laccases from *Trametes (Coriolus) versicolor*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.13, p.194-203, 1991.

SANJUAN, D. R. **Obtención de pulpas y propiedades de las fibras para papel.** Guadalajara: Universidad de Guadalajara, 1997. 293 p.

SAVOIE, J.-M., MATA, G.; BILLETTE, C. Extracellular laccase production during hyphal interactions between *Trichoderma sp.* and Shiitake, *Lentinula edodes*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.49, p.589-593, 1998.

SCORE, A. J., PALFREYMAN, J. W., WHITE, N. A. Extracellular phenoloxidase and peroxidase enzyme production during interspecific fungal interactions. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.39, p.225-233, 1997.

SEDARATI, M. R., et al. Transformation of high concentrations of chlorophenols by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor* immobilized on nylon mesh. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.6, p.104-114, 2003.

SETHURAMANN, 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, 1998.

SHAH, V., et al. Influence of dimethyl sulfoxide on extracellular enzyme production by *Pleurotus ostreatus*. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 651-655, 2006.

SHAH, V., et al. Influence of iron and copper nanoparticle powder on the production of lignocellulose degrading enzymes in the fungus *Trametes versicolor*. **Journal of Hazardous Materials**, v.178, p.1141-1145, 2010.

SILVA, R. P. **Utilização de vibrações ultra-sônicas para o refino de celulose Kraft de Eucalipto.** 2002. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

SMÂNIA, A., et al. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. **Journal of Ethnopharmacology**, v.45, p.177-181, 1995.

SMOOK, G. A. **Manual para técnicos de pulpa y papel.** Vancouver: A. Wilde, 1990. 397 p.

SNAJDR, J., BALDRIAN, P. Temperature Affects the Production, Activity and Stability of Ligninolytic Enzymes in *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor*. **Folia Microbiology**, v.52, n.5, p.498-502, 2007.

SOUZA-CRUZ, P. B. **Estudo das enzimas produzidas por *Ceriporiopsis subvermispora* (Pilát) Gilbn. e Ryv. durante a biodegradação de *Pinus taeda* L.** 2002. 59f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2002.

SOUZA-CRUZ, P.B., 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.

SREBOTNIK, E., et al. Evidence that *Ceriporiopsis subvermispora* degrades nonphenolic lignin structure by a one-electron-oxidation mechanism. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.4435-4440, 1997.

TANAKA, H.; ITAKURA, S.; ENOKI, A. Hydroxyl radical generation by an extracellular low molecular weight substance and phenol oxidase activity during wood degradation by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. **Journal of Biotechnology**, v.75, p.57-70, 1999.

TIEN, M., KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporim* burds. **Science**, v.221, p.661-663, 1983.

TIEN, M., KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporim*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.81, p.2280-2284, 1984.

TOLJANDER, Y. K.; HOLMER, B. D. L. L.; HÖGBERG, N. O. S. Environmental fluctuations facilitate species co-existence and increase decomposition in communities of wood decay fungi. **Oecologia**, v.148, p.625-631, 2006.

ULLAH, M. C.; BEDFORD, M. C.; EVANS, C. Reactions of pentachlorophenol with laccase from *Coriolus versicolor*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.53, p.230-234, 2000.

UZAN, E., et al. High redox potential laccases from the ligninolytic fungi *Pycnoporus coccineus* and *Pycnoporus sanguineus* suitable for white biotechnology: from gene cloning to enzyme characterization and applications. **Journal of Applied Microbiology**, v.108, p.2199-2213, 2010.

VAN HEERDEN, A., et al. Assessment of wood degradation by *Pycnoporus sanguineus* when co-cultured with selected fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, p.2489-2497, 2008.

VANHULLE, S., et al. Effect of mannan oligosaccharide elicitor and ferulic acid on enhancement of laccases production in liquid cultures of basidiomycetes. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.1712-1718, 2007.

VELÁZQUEZ-CEDENO, M. A ., et al. Variations of lignocellulosic activities in dual cultures of *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma longibrachiatum* on unsterilized wheat straw. **Mycologia**, v.96, p.712-719, 2004.

VICENTIM, M. P.; FERRAZ, A. Alkaline-sulfite chemithermomechanical pulping of *Eucalyptus grandis* biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora* under varied culture conditions. **Holzforchung**, v.62, p.375-382, 2008.

VICENTIM, M.P. **Secreção diferenciada de enzimas lignocelulolíticas durante a biodegradação de madeira por *Ceriporiopsis Subvermispora* e resposta da madeira biotratada frente a processos posteriores de polpação.** 2007. 139f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Universidade de São Paulo, Lorena, 2007.

VICUÑA, R., et al. Culture conditions of *Ceriporiopsis subvermispora* determine the pattern of MnP isoenzymes. In: Srebotnik, E., **Biotechnology in the Pulp and Paper Industry: Recent Advances in Applied and Fundamental Research**. Vienna: Facultas-Universitätsverlag, 1996, p. 345-350.

VIKINESUARY, S., et al. Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by *Pycnoporus sanguineus*. **Bioresource Technology**, v.97, p.171-177, 2006.

WALKER, J. C. F. **Primary wood processing: Principles and practice**. London: Chapman & Hall, 1993. 595 p.

WARIISHI, H.; VALLI, K.; GOLD, M. H. In vitro depolymerization of lignin by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.176, p.269-276, 1991.

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, n.2-3, p.199-205, 1997.

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

WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulase activities. **Methods in Enzymology**, v.160, p.87-113, 1988.

XIAO, Y. Z., et al. Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a laccase from a basidiomycete *Trametes* sp. strain AH28-2. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.60, p.700-707, 2003.

YOUNG, R. A. Comparison of the properties of chemical cellulose pulps. **Cellulose**, v. 1, p.107-130, 1994.

ZHANG, H., et al. Efficient production of laccases by *Trametes* sp. AH28-2 in cocultivation with a *Trichoderma* strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.73, p.89-94, 2006.