

EFEITO DE FUNGOS TERMÓFILOS SOBRE
MADEIRA DE Eucalyptus saligna.

I. *Thermoascus aurantiacus*.

PRADO, S. M.

Curso de Engenharia Florestal, ESALQ/USP, CP 9, 13400, Piracicaba, SP.

AUER, C.G.

EMBRAPA/CNPF, CP 3319, 80001, Curitiba, PR.

BARRICHELO, L.E.G.

Depto. de Ciências Florestais, ESALQ/USP, CP 9, 13400, Piracicaba, SP.

SINOPSE - Cavacos de madeira de *Eucalyptus saligna* colonizados pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus*, tiveram seus teores de extrativos reduzidos, com o aumento no período de incubação, a 45 °C. Esta redução foi detectada também após a esterilização dos cavacos, provavelmente devida a ação do calor. O decréscimo real devido ao fungo foi observado em extrativos totais (30,6 %), solúveis em água quente (39,3 %), solúveis em diclorometano (22,9 %) e solúveis em álcool tolueno (48,8 %). A virtual elevação no teor de açúcares livres em etanol 80 % indica uma possível hidrólise enzimática. Madeira colonizada por *T. aurantiacus*, para ensaio de produção de celulose, mostrou decréscimos na densidade básica e no teor de extrativos totais, elevação no teor de holocelulose e nenhuma alteração no teor de lignina. Na produção de celulose não branqueada não se observou modificações nos rendimentos bruto e depurado e número kappa. Os resultados indicam que o fungo não possui atividade celulolítica e lignolítica marcante, provavelmente agindo apenas sobre as hemiceluloses.

ABSTRACT - Wood chips of *Eucalyptus saligna* colonized by the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* showed reduction on extractives contents, increasing with time of incubation period, at 45 °C. This reduction was also detected after chips sterilization, probably due heat hydrolysis. The real removal due fungus was observed on total extractives (30,6 %), hot water extractives (39,3 %), diclorometano extractives (22,9 %) and alcohol tolueno extractives (48,8 %). The virtual increase on sugar content soluble at ethanol 80 % indicated a possible enzymatic hydrolysis. Wood colonized by *T. aurantiacus*, for pulp yield assay, showed decrease on specific gravity (g/cm³) and on total extractives, increase on holocellulose content and without modification on lignin content. Modifications did not appeared on unscreened and screened pulp yield, and permanganate number. The results indicate that the fungus is not capable of degrade cellulose and lignin, probably only fractions such hemicelluloses of wood.

"Trabalho apresentado no 24º Congresso Anual de Celulose e Papel da ABTCP, realizado em São Paulo - SP - Brasil, de 25 a 29 de novembro de 1991".

1. INTRODUÇÃO

Fungos termófilos estão constantemente associados ao fenômeno de auto-aquecimento de substratos lignocelulósicos, ao ar livre. Pilhas de cavacos de madeira para produção de celulose construídas com madeira recém-picada ou com teor elevado de umidade tornam-se aquecidas, criando condições de vida para uma abundante microflora termotolerante / termofílica (SMITH & OFOSU-ASIEDU, 1972), que por sua vez contribui para a manutenção do aquecimento, através da biodeterioração (TANSEY, 1971).

O tipo de degradação determinará a qualidade dos cavacos destinados a produção de celulose. Estudos iniciais acerca do efeito sobre componentes de madeira de eucalipto mostraram que *Thermoascus aurantiacus*, um dos fungos isolados de pilhas auto-aquecidas, reduziu os teores de extrativos solúveis em água quente, açúcares totais e substâncias fenólicas (AUER et alii, 1987). Os autores observaram também modificações estruturais na anatomia da madeira colonizada pelo fungo, quando comparada com madeira não inoculada. Efeitos variados podem ser encontrados após o crescimento de microrganismos termófilos sobre madeira, em função da população associada, inclusive determinar perdas em rendimento na produção de celulose (HATTON, 1970), como consequência da atividade celololítica de alguns fungos (FERGUS, 1969).

A partir das dúvidas existentes, o trabalho desenvolvido visou analisar a ação do fungo termófilo *Thermoascus aurantiacus* sobre cavacos de madeira de *Eucalyptus saligna* e a qualidade da celulose não branqueada produzida com cavacos colonizados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Madeira de *Eucalyptus saligna*, com 6 anos de idade, foi utilizada para este estudo. Discos de madeira de 2,5 cm de espessura, faces paralelas, livre de nós foram transformados manualmente em cavacos com espessura aproximada de 3 mm. Os cavacos foram secos ao ar, com umidade final ao redor de 40 %.

A colonização dos cavacos foi conduzida em frascos de Erlenmeyer de 500 ml. Para manter a umidade dos cavacos durante o experimento, sem haver contato direto com água, utilizou-se uma camada de esferas de vidro, com diâmetro médio de 1,7 cm, no fundo dos frascos e 100 g de cavacos colocados sobre as mesmas. Os frascos foram tamponados com algodão e autoclavados (120 °C, 1 atm, 1h). Após esterilização, colocou-se, em cada frasco, 50 ml de água destilada esterilizada. Por este método, a água manteve-se no fundo do frasco, separada dos cavacos, condicionando uma câmara úmida durante o período de incubação.

O experimento constou de um lote de cavacos secos sem nenhum tratamento, como testemunha, e de dois tratamen

tos: (1) esterilização por autoclavagem e (2) esterilização e inoculação com 1 ml de suspensão padronizada contendo 10 ascósporos de *Thermoascus aurantiacus*. A suspensão foi obtida de colônias puras do fungo, cultivadas em meio BDA, incubadas a 45°C. Todos os tratamentos tiveram 5 frascos como repetição, e a incubação dos cavacos inoculados ocorreu em estufa controlada a 45°C, durante 30 dias, no laboratório do Departamento de Fitopatologia, ESALQ/USP.

As análises químicas foram efetuadas no laboratório do Setor de Química, Celulose e Energia do Departamento de Ciências Florestais, ESALQ/USP. Foram determinados o teor de extrativos totais, extrativos solúveis em água quente, em diclorometano e álcool-tolueno 1:2 e açúcares livres em álcool etílico 80 %.

Os cavacos colonizados foram obtidos segundo metodologias de manutenção de umidade, inoculação e incubação, já descritas. A única variação que houve foi o uso de frascos de 2000 ml contendo, em cada, 500 g de cavacos e 200 ml de água destilada esterilizada.

Quatro lotes de cavacos foram destinados ao cozimento: (1) cavacos secos, (2) cavacos autoclavados, (3) cavacos autoclavados, inoculados e incubados por 30 dias e (4) cavacos autoclavados, inoculados e incubados por 60 dias.

Finda a incubação, parte dos cavacos foi processada, transformando-se uma subamostra em serragem em moinho Wiley, para determinação da composição química de holocelulose, lignina (TAPPI 13m-54, ABCP m70171) e de extrativos totais. Determinou-se, também, a densidade básica dos cavacos pelo método do máximo teor de umidade (FOELKEL et alii, 1975).

A celulose foi obtida pelo processo sulfato, em digestor de laboratório (aço inoxidável, aquecimento direto, rotatório, 20l de capacidade), com as condições de cozimento apresentadas na Tabela 1. A celulose produzida foi peneirada em malha 120, lavada e passada por um desfibrador de discos. A polpa foi lavada com água e retirou-se o excesso por compressão manual. A partir das amostras de celulose determinou-se o número kappa, rendimento bruto e depurado e teor de rejeitos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cavacos de *Eucalyptus saligna* colonizados por *Thermoascus aurantiacus* mostraram tendência de queda nos teores de extrativos, independentemente do tratamento efetuado, porém maior em cavacos autoclavados e colonizados (Tabela 2). Este tipo de resultado também foi encontrado por AUER et alii (1986) com cavacos de *Eucalyptus* spp, colonizados pelo mesmo fungo, ocorrendo decréscimo no teor de extrativos em água quente, da ordem de 16 %.

Houve eliminação de extrativos da madeira, tanto pela autoclavagem, como pela ação do fungo (Tabela 3). Devido a

ocorrência de solubilização e volatilização de compostos, como resultado da pressão e temperatura elevada da autoclavagem, provavelmente, será necessário se modificar o método de esterilização. Os resultados mostram também degradação diferenciada entre os diferentes componentes dos extrativos, segundo o tipo de solvente utilizado.

Os açúcares livres tiveram seus teores reduzidos pela autoclavagem, com posterior elevação após a colonização pelo fungo. O aumento estaria ligado a degradação enzimática promovida por hemicelulases produzidas por *T. aurantiacus* (TAN et alii, 1987). A degradação poderia recompor o nível de açúcares a valores próximos dos encontrados em cavacos sem tratamento. Por outro lado, uma parcela da degradação teria origem no aumento da concentração de ácidos orgânicos e fragmentação de carboidratos por hidrólise ácida e oxidação, desencadeada pela autoclavagem e temperatura de incubação (ZVINAKEVICIUS et alii, 1978).

O lote de cavacos inoculado para produção de celulose apresentou também alteração na composição química. Houve decréscimo leve na densidade básica e no teor de extrativos totais, com o aumento do período de incubação (Tabela 3). A lignina não foi alterada significativamente indicando uma atividade lignolítica fraca do fungo. Quanto ao teor de holocelulose, a elevação observada é explicada pela diminuição no teor de extrativos totais.

A celulose não branqueada produzida com cavacos colonizados não apresentou grandes modificações na porcentagem de rendimento bruto e depurado (Tabela 5). Este fato confirma uma atividade celulolítica fraca do fungo, nutrindo-se de carboidratos de madeira de fácil hidrólise (FERGUS, 1969; FLANNIGAN & SELLARS, 1972). O principal efeito detectado foi a diminuição do teor de rejeitos, notadamente em cavacos incubados por 60 dias. Não houve relação entre o aumento do teor de holocelulose detectada na madeira inoculada e os rendimentos bruto e depurado obtidos.

Os pequenos efeitos do crescimento de *T. aurantiacus* sobre a produção de celulose são devidos, provavelmente, ao curto período de incubação do material inoculado. Se o processo fosse mantido por um tempo maior, como acontece na pilha de cavacos ao ar livre, haveriam condições para que o consumo de extrativos fosse significativo para refletir na produção de celulose.

Finalmente, um aspecto que deve ser salientado foi a série de ensaios envolvendo somente uma espécie fúngica. A presença de uma população associada ao fenômeno de auto-aquecimento em pilhas de cavacos, descrita por AUER (1986), indica a necessidade do estudo dos outros fungos presentes, inclusive a população como um todo. O efeito populacional poderia promover, pelo sinergismo, expressiva atividade degradativa sobre os componentes da madeira (JAIN et alii, 1979).

4. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Champion Papel e Celulose S.A pelos materiais e facilidades oferecidas e à FAPESP pela bolsa de Iniciação Científica cedida ao primeiro autor, para o desenvolvimento dos trabalhos.

Tabela 1. Condições de cozimento de cavacos de *Eucalyptus saligna* inoculados com *Thermoascus aurantiacus*.

Alcali ativo (%)	14
Sulfidez (%)	25
Atividade (%)	100
Relação licor/madeira	5:1
Temperatura máxima (°C)	170
Tempo até temp. máxima (min)	80
Tempo à temp. máxima (min)	30
Concentração de Na ₂ O ativo	223

Tabela 2. Porcentagem de extrativos e teor de açúcares livres (g/l) em cavacos de *Eucalyptus saligna* inoculados com *Thermoascus aurantiacus* e incubados por 30 dias a 45°C.

Tratamento dos Cavacos	Teor de extrativos				Açúcares Livres em Álcool Etílico 80%
	Totais	Solúveis em			
		Água Quente	Dicloro metano	Álcool Tolueno	
Nenhum	6,44a	1,66a	2,27a	3,03a	0,396a
Autoclavagem Somente	5,42b	1,55b	1,72b	2,78b	0,294b
Autoclavagem e Inoculação	3,45c	0,87c	1,20c	1,35c	0,394a

Cada valor é média de 5 repetições. Números acompanhados de mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente (Tukey, nível de 1%).

Tabela 3. Porcentagem de extrativos eliminados da madeira de *Eucalyptus saligna* por autoclavagem e pela colonização de *Thermascus aurantiacus*, após 30 dias de incubação a 45°C.

Tratamento dos Cavacos	Solvente Utilizado			Extrativos Totais
	Água Quente	Dicloro metano	Alcool Tolueno	
Autoclavagem	8,3*	24,2	6,6	15,8
Colonização pelo Fungo	39,3	22,9	48,8	30,6

* valores obtidos a partir da Tabela 1.

Tabela 4. Características dos cavacos de madeira de *Eucalyptus saligna* inoculados e não inoculados com *Thermascus aurantiacus* destinados a produção de celulose, em laboratório.

Tratamento dos Cavacos	Densidade Básica (g/cm ³)	Holocelulose (%)	Lignina (%)	Extrativos Totais (%)
Nenhum	0,552*	70,26	24,52	5,22
Autoclavagem Somente	0,539	70,24	24,92	4,83
Autoclavagem, Inoculação e Incubação-30 dias	0,525	70,20	25,44	4,36
Autoclavagem, Inoculação e Incubação-60 dias	0,524	72,73	25,15	2,27

* somente os valores de densidade básica são média de 2 repetições. Os outros valores são média de 5 repetições.

Tabela 5. Porcentagem de rendimento bruto, rendimento depurado, teor de rejeitos e número kappa de celuloses não branqueadas de *Eucalyptus saligna*, obtidos de cavacos colonizados por *Thermoascus aurantiacus*.

Tratamento dos Cavacos	Rendimento Bruto	Rendimento Depurado	Teor de Rejeitos	Número kappa
Nenhum	50,84*	49,89	0,95	20,2
Autoclavagem Somente	49,21	48,15	1,06	19,7
Autoclavagem, Inoculação e Incubação-30 dias	50,74	48,73	2,01	20,6
Autoclavagem, Inoculação e Incubação-60 dias	50,65	49,91	0,74	19,8

* cada valor é média de 3 repetições.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUER, C.G. Levantamento de fungos termófilos associados a pilhas de cavacos de *Eucalyptus* spp. Piracicaba, ESALQ/USP, 87 p. (Dissertação de Mestrado).
- AUER, C.G.; BARRICHELO, L.E.G. & FERRARI, M.P. Utilização do fungo termófilo *Thermoascus aurantiacus* na degradação controlada de cavacos de eucalipto. *Silvicultura*, São Paulo, 41:194, 1986.
- AUER, C.G.; FERRARI, M.P.; TOMAZELLO FILHO, M. & BARRICHELO, L.E.G. Estrutura anatômica e composição química de cavacos de madeira de eucalipto inoculados com o fungo *Thermoascus aurantiacus*. IPEF, Piracicaba, 37:45-50, dez. 1987.
- FEIST, W.C.; HAJNY, G.J. & SPRINGER, E.L. Effect of storing green wood chips at elevated temperatures. *TAPPI*, Atlanta, 56(8): 91-95, 1973.
- FERGUS, C.L. The cellulolytic activity of thermophilic fungi and actinomycetes. *Micologia*, New York, 61(1): 120-129, jan/feb. 1969.
- FLANNIGAN, B. & SELLARS, P.N. Activities of thermophilous fungi from barley kernels against arabinoxylan and carboxymethylcellulose. *Transactions of the British Mycological Society*. London, 58(2): 338-341, april 1972.
- FOELKEL, C.E.B.; BARRICHELO, L.E.G. & MILANEZ, A.F. Estudo comparativo de madeiras de *Eucalyptus saligna*, *E. paniculata*, *E. citriodora* e *E. tereticornis* para produção de celulose sulfato. IPEF, Piracicaba, 10: 17-37, 1975.

- JAIN, M.K.; KAPOOR, K.K. & MISHRA, M.M. Cellulase activity de gradation of cellulose and lignin, and humus formation by thermophilic fungi. Transactions of the British Mycological Society. London, 73(1):85-89, aug. 1979.
- SMITH, R. & OFOSU-ASIEDU, A. Distribution of thermophilic and thermotolerant fungi in a spruce-pine chip pile. Canadian Journal of Forest Research, Ottawa, 2(1): 16-26, 1972.
- TAN, L.U.L.; MAYERS, P. & SADDLER, J.N. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 33(8): 689-692, aug. 1987.
- TANSEY, M.R. Isolation of thermophilic fungi from self-heated, industrial wood chip piles. Mycologia, New York, 63(3):537-547, may/june 1971.
- JVINAKEVICIUS, C.; FOELKEL, C.E.B. & ANDRADE, J.R. Influência de armazenamento de cavacos de eucalipto na qualidade da madeira e da celulose kraft. O Papel, São Paulo, 39(11) : 73-80, nov, 1978.