

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE  
MATERIAIS - MESTRADO**

**JOHNATA HENRIQUE RODRIGUES**

**DEGRADAÇÃO DE MADEIRA DE *PINUS SP* POR CONTATO COM  
METABÓLITOS EXTRACELULARES DE FUNGOS FILAMENTOSOS**

**PONTA GROSSA  
2019**

**JOHNATA HENRIQUE RODRIGUES**

**DEGRADAÇÃO DE MADEIRA DE *PINUS SP* POR CONTATO COM  
METABÓLITOS EXTRACELULARES DE FUNGOS FILAMENTOSOS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Materiais na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Desenvolvimento e Caracterização de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Luís Antônio Pinheiro

Co-orientador: Prof. Dr. Marcio Silva

**PONTA GROSSA  
2019**

R696                    Rodrigues, Johnata Henrique  
Degradação de madeira de *pinus sp.* por contato com metabólitos  
extracelulares de fungos filamentosos / Johnata Henrique Rodrigues. . Ponta  
Grossa, 2019.  
92 f.

Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Materiais - Área de  
Concentração: Desenvolvimento e Caracterização de Materiais), Universidade  
Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Luís Antônio Pinheiro.  
Coorientador: Prof. Dr. Marcio Silva.

1. Enzimas lignocelulolíticas. 2. Fungos filamentosos. 3. Degradação. I.  
Pinheiro, Luís Antônio. II. Silva, Marcio. III. Universidade Estadual de Ponta  
Grossa. Desenvolvimento e Caracterização de Materiais. IV.T.

CDD: 620.12

**JOHNATA HENRIQUE RODRIGUES**

**DEGRADAÇÃO DE MADEIRA DE *PINUS* SP. POR CONTATO COM  
METABÓLITOS EXTRACELULARES DE FUNGOS FILAMENTOSOS**

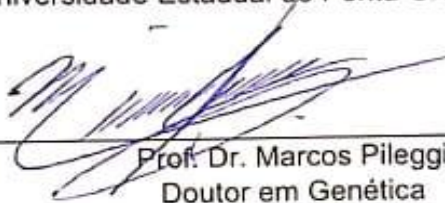
Dissertação apresentada para obtenção de título de mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa na área de Desenvolvimento e Caracterização de Materiais.

Ponta Grossa, 27 de fevereiro de 2019.



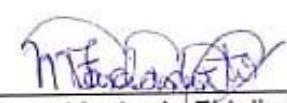
---

Prof. Dr. Luis Antônio Pinheiro – Orientador  
Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais  
Universidade Estadual de Ponta Grossa- UEPG



---

Prof. Dr. Marcos Pileggi  
Doutor em Genética  
Universidade Estadual de Ponta Grossa- UEPG



---

Dra. Mariana Machado Fídelis Do Nascimento  
Doutora em Microbiologia, Parasitologia e Patologia  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR

Dedico a Telma Padilha de Novais e Pedro Roberto Rodrigues.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos Prof. Dr. Luís Antônio Pinheiro e Prof. Dr. Marcio Silva pela contribuição de seus conhecimentos e sugestões na orientação desta dissertação.

Aos técnicos laboratoriais Luciano Tozetto e Dirceu, ao marceneiro João Maria Carriel, as futuras Doutoradas Elizangela Paz de Oliveira e Amanda Flávia da Silva Rovida, pelo apoio na elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcos Pileggi, pelo apoio e incentivo na elaboração deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta pesquisa.

Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento.

Clarice Lispector

## RESUMO

A biodegradação da madeira, classificada como biomassa lignocelulósica, era vista somente como um problema, entretanto com o avanço da percepção a respeito da enzimologia que envolve a degradação desse substrato criou-se um novo cenário a respeito dos microrganismos que participam desse processo. Desse modo, objetivou-se com esta pesquisa avaliar a capacidade de produção de enzimas do complexo lignocelulósico de fungos filamentosos e o efeito desses metabólitos sobre a biomassa lignocelulósica submetida a fermentação submersa (FSm). Para tanto por meio de ensaios de resistência mecânica de tração paralela às fibras, cisalhamento paralelo às fibras e resistência a impacto fez-se a estimativa a respeito da capacidade desses microrganismos em promover a degeneração das propriedades de resistência mecânica da madeira de *Pinus sp.* Dentre as linhagens analisadas, a A1 apresentou 48,68% de redução percentual do módulo elástico frente ao ensaio de cisalhamento paralelo às fibras e 36,35% de redução percentual da energia de resistência ao impacto por área e a J13 apresentou uma redução de 46,92% e 57,42% para os mesmos ensaios. Dessa forma, pode-se afirmar que o processo de seleção das melhores linhagens se mostrou satisfatório, bem como a ação de degradação de corpos-de-prova submetidos ao processo de FSm. Assim, esses podem ser utilizadas em processos que demandem da ação degradativa da biomassa lignocelulósica.

**Palavras-chave:** Enzimas lignocelulolíticas. Fungos filamentosos. Degradação.



## **Abstract**

The biodegradation of the wood, classified as lignocellulosic biomass, was seen as a problem, however, with the advance of the perception about the enzyme that involves in the process of degradation of this substrate, a new scenario was created in relation to the microorganisms that participate. Therefore, the present study seeks evaluate the enzyme production capacity of the lignocellulosic complex of filamentous fungi and the effect of these metabolites on the lignocellulosic biomass submitted to submerged fermentation (SmF) inoculated with the five best-selected strains. For this purpose, the tensile strength of *Pinus* sp. It was evaluated by tensile strength, shear parallel to fiber and impact resistance tests. Among the analyzed strains, A1 presented 48,68% modulus of elasticity reduction in the shear test parallel to fibers and 36,35% of the percentage of energy reduction in impact resistance and J13 presented a reduction of 46,92% and 57,42% for the same tests. Therefore, the selection process of the best strains was satisfactory, as well as the degradation action of the specimens submitted to the FSm process. Thus, these can be used in processes that depends on the degradative action of lignocellulosic biomass.

**Keywords:** Lignocellulolytic enzymes. Filamentous fungi. Degradation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|            |                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - | (A) Seção transversal de uma célula do esclerênquima (gênero Podocarpus) composta por células com paredes secundárias espessas e lignificadas. (B) Estrutura tridimensional da parede célula vegetal dividida em camadas.....                                               | 19 |
| Figura 2 - | Representação esquemática de uma porção da célula vegetal com destaque a estrutura simplificada da Roseta e o processo de exportação das microfibrilas de celulose para fora da membrana citoplasmática.....                                                                | 20 |
| Figura 3 - | Estrutura química da celulose com representação das ligações de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares.....                                                                                                                                                         | 21 |
| Figura 4 - | Rotas de obtenção das estruturas polimórficas da celulose.....                                                                                                                                                                                                              | 22 |
| Figura 5 - | Ilustração exemplificativa da disposição das hemiceluloses dispersas entre as estruturas que compõem a parede celular vegetal.....                                                                                                                                          | 24 |
| Figura 6   | Exemplo de uma estrutura de lignina contendo as ligações mais frequentes e os monómeros correspondentes que fazem parte da sua estrutura: p-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S).....                                                                              | 26 |
| Figura 7   | (A) Representação esquemática de uma madeira de conífera; (B) representação esquemática de uma madeira de folhosa; (C) micrografia da seção transversal do tronco de uma madeira de conífera; (D) micrografia da seção transversal do tronco de uma madeira de folhosa..... | 27 |
| Figura 8   | (A) Representação dos planos de cortes anatômicos da madeira: transversal, tangencial e radial. (B) Representação dos eixos principais da madeira em relação à direção das fibras e crescimento dos anéis.....                                                              | 28 |
| Figura 9   | (A) Representação de carregamentos submetidos ao longo das fibras (direção axial). (B e C) Representação carregamentos submetidos perpendicular as fibras, em que as paredes das células sofreram flexão (direção tangencial ou radial).....                                | 29 |
| Figura 10  | Representação esquemática do comportamento global da madeira solicitada à flexão simples.....                                                                                                                                                                               | 30 |
| Figura 11  | Exemplo de uma estrutura de lignina contendo as ligações mais frequentes e os monómeros correspondentes que fazem parte da sua estrutura: p-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S).....                                                                              | 36 |
| Figura 12  | Imagem aérea da região de Ponta Grossa – Paraná, com destaque Rodovia do Talco na PR-513 que liga Ponta Grossa a Itaiacoca, além dos locais de coleta das amostras fúngicas (Furna do Passo do Pupo 1 e Águia Florestal).....                                               | 41 |
| Figura 13  | Diagrama de blocos simplificado com as etapas de procedimentos executados na realização desta pesquisa.....                                                                                                                                                                 | 42 |

|           |                                                                                                                                                                                                          |    |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 14 | Diagrama de blocos das etapas de determinação da atividade da enzima Exo-1,4- $\beta$ -D-glicanase.....                                                                                                  | 48 |
| Figura 15 | Diagrama de blocos das etapas de determinação da atividade da enzima Endo-1,4- $\beta$ -D-glicanase.....                                                                                                 | 49 |
| Figura 16 | Diagrama de blocos das etapas de determinação da atividade da enzima Lacase.....                                                                                                                         | 51 |
| Figura 17 | Diagrama de blocos das etapas de determinação da atividade da enzima Lignina peroxidase.....                                                                                                             | 52 |
| Figura 18 | Diagrama de blocos das etapas de determinação da atividade da enzima Manganês peroxidase.....                                                                                                            | 53 |
| Figura 19 | (A) Corpos-de-prova de madeira de Pinus sp. autoclavados e secos. (B) Recipientes utilizados no processo de fermentação.....                                                                             | 55 |
| Figura 20 | Dimensões nominais dos corpos-de-prova do ensaio submetidos a FSm (NBR 7190:1997), com dimensões em centímetro.....                                                                                      | 56 |
| Figura 21 | Dimensões nominais dos corpos-de-prova do ensaio de cisalhamento paralelo às fibras (ASTM ISO 13910:2005), com dimensões em centímetro.....                                                              | 56 |
| Figura 22 | Dimensões nominais dos corpos-de-prova do ensaio de impacto (ASTM E23 – 07aE1), com dimensões em milímetro.....                                                                                          | 57 |
| Figura 23 | (A), (B) e (C) Arranjo dos ensaios de tração paralela na máquina de ensaios universal Shimadzu Autograph AGS-X com uma célula de carga de 10KN.....                                                      | 58 |
| Figura 24 | Arranjo do ensaio de cisalhamento paralelo das fibras com destaques nas dimensões padrões fixados para o teste.....                                                                                      | 59 |
| Figura 25 | (A) Equipamento de impacto instrumentado Zwick/Roell HIT50P com martelo de impacto de 5,5 J. (B) Arranjo do gabarito confeccionado e corpo-de-prova acondicionado para o ensaio....                      | 60 |
| Figura 26 | Exemplo das características de cultura das linhagens utilizadas para execução deste trabalho.....                                                                                                        | 61 |
| Figura 27 | (A) Exemplo do halo translucido de hidrólise após a revelação com vermelho do congo, com 24 horas de inoculação. (B) Exemplo do halo marrom da oxidação do ácido tânico após 24 horas de inoculação..... | 62 |
| Figura 28 | Exemplos dos fungos (A) <i>Mucor</i> sp. e (B) B1 inoculados em meio extrato de malte-ácido com indicação a região amarronzada.....                                                                      | 65 |
| Figura 29 | Atividade da Endo-1,4- $\beta$ -D-glicanase das linhagens inoculadas com CMC 0,5 g.L <sup>-1</sup> no decorrer de 30 dias com destaque nos primeiros 3 dias.....                                         | 68 |
| Figura 30 | Atividade da Exo-1,4- $\beta$ -D-glicanase das linhagens inoculadas com CMC 0,5 g.L <sup>-1</sup> no decorrer de 30 dias.....                                                                            | 69 |
| Figura 31 | Atividade da Manganês peroxidase das linhagens inoculadas com CMC 0,5 g.L <sup>-1</sup> no decorrer de 30 dias.....                                                                                      | 70 |

|            |                                                                                                                                                                                                          |    |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 32  | Atividade da Endo-1,4- $\beta$ -D-glicanase das linhagens inoculadas com pó de madeira de Pinus sp. 0,5 g.L <sup>-1</sup> no decorrer de 7 dias.....                                                     | 71 |
| Figura 33  | Atividade da Exo-1,4- $\beta$ -D-glicanase das linhagens inoculadas com pó de madeira de Pinus sp. 0,5 g.L <sup>-1</sup> no decorrer de 7 dias....                                                       | 72 |
| Figura 34  | Atividade da Endo-1,4- $\beta$ -D-glicanase das linhagens inoculadas com CMC 0,5 g.L <sup>-1</sup> no decorrer de 35 dias.....                                                                           | 74 |
| Figura 35  | Atividade da Exo-1,4- $\beta$ -D-glicanase das linhagens inoculadas com CMC 0,5 g.L <sup>-1</sup> no decorrer de 35 dias.....                                                                            | 75 |
| Figura 36  | Proteínas totais estimada das linhagens inoculadas com CMC 0,5 g.L <sup>-1</sup> no decorrer de 35 dias.....                                                                                             | 76 |
| Figura 37  | Curva-padrão de glicose utilizada para a determinação da concentração de glicose em mmol no extrato enzimático bruto.....                                                                                | 77 |
| Figura 38  | Curva-padrão de BSA utilizada para a determinação da concentração proteínas totais em mg/mL no extrato enzimático bruto.....                                                                             | 77 |
| Figura 39  | Dados obtidos nos ensaios de Tração paralelas às fibras dos corpos-de-prova submetidos a FSm sem inoculação, denominado de (A) Branco Fermentação, e com inoculação: (B) J13, (C) M10 e (D) A1.....      | 79 |
| Figura 40  | Dados obtidos nos ensaios de Cisalhamento paralelo às fibras dos corpos-de-prova submetidos a FSm sem inoculação, denominado de (A) Branco Fermentação, e com inoculação: (B) J13, (C) M10 e (D) A1..... | 80 |
| Figura 41  | Dados obtidos nos ensaios de Resistência ao Impacto (RI) dos corpos-de-prova submetidos a FSm sem inoculação, denominado de (A) Branco Fermentação, e com inoculação: (B) J13, (C) M10 e (D) A1.....     | 82 |
| Quadro 1 - | Linhagens fúngicas de podridão-branca e podridão-parda utilizadas em pesquisas na produção de celulase.....                                                                                              | 32 |
| Quadro 2 - | Resultado da triagem inicial frente a capacidade de produção de enzimas celulolíticas e lignolíticas.....                                                                                                | 64 |

## LISTA DE SIGLAS

|          |                                                                    |
|----------|--------------------------------------------------------------------|
| BLAST    | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>                           |
| CMC      | Carboximetilcelulose                                               |
| CMIB     | Coleção de Microrganismos de Interesse Industrial e Biotecnológico |
| DNS      | ácido 3,5-dinitrosalicílico                                        |
| FPU      | <i>Filter Paper Units</i>                                          |
| FSm      | Fermentação submersa                                               |
| GP       | Grau de polimerização                                              |
| ITS      | <i>Internal Transcribed Spacer</i>                                 |
| Lac      | Lacases                                                            |
| Lip      | Lignina peroxidase                                                 |
| MnP      | Manganês peroxidase                                                |
| NBR      | Normas Brasileiras                                                 |
| NCBI     | <i>National Center for Biotechnology Information</i>               |
| rDNA     | <i>Ribosomal DNA</i>                                               |
| UEPG     | Universidade Estadual de Ponta Grossa                              |
| UTFPR-PG | Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Ponta Grossa    |

## SUMÁRIO

|           |                                                                                                    |           |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                                                            | <b>14</b> |
| <b>2.</b> | <b>OBJETIVO .....</b>                                                                              | <b>16</b> |
| <b>3.</b> | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>                                                                 | <b>17</b> |
| 3.1       | BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA .....                                                                     | 17        |
| 3.2       | CELULOSE .....                                                                                     | 18        |
| 3.3       | HEMICELULOSE .....                                                                                 | 22        |
| 3.4       | LIGNINA .....                                                                                      | 23        |
| 3.5       | ESTRUTURA DA MADEIRA .....                                                                         | 25        |
| 3.6       | PROPRIEDADES MECÂNICAS DA MADEIRA.....                                                             | 27        |
| 3.7       | BIODEGRADAÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA .....                                                    | 30        |
| 3.8       | ENZIMOLOGIA DA BIODEGRADAÇÃO DA MADEIRA.....                                                       | 34        |
| 3.8.1     | Enzimas Celulolíticas .....                                                                        | 34        |
| 3.8.2     | Enzimas Ligninolíticas .....                                                                       | 35        |
| 3.9       | PRINCIPAIS CONCLUSÕES DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....                                               | 37        |
| <b>4.</b> | <b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>                                                                   | <b>38</b> |
| 4.1       | MATERIAIS .....                                                                                    | 38        |
| 4.1.1     | Biomassa lignocelulósica .....                                                                     | 38        |
| 4.1.2     | Fungos .....                                                                                       | 39        |
| 4.2       | MÉTODOS .....                                                                                      | 40        |
| 4.2.1     | Manutenção das Linhagens Fúngicas .....                                                            | 41        |
| 4.2.2     | Triagem das Linhagens Fúngicas.....                                                                | 41        |
| 4.2.3     | Avaliação Qualitativa da Atividade Enzimática Celulolíticas (Meio Sólido).42                       |           |
| 4.2.4     | Avaliação Qualitativa da Atividade Enzimática Ligninolíticas (Meio Sólido)42                       |           |
| 4.2.5     | Preparação dos Pré-Inóculos Fúngicos.....                                                          | 42        |
| 4.2.6     | Avaliação da Cinética de Produção Enzimática Celulolíticas e Lignolíticas (Meio Líquido).....      | 43        |
| 4.2.6.1   | Avaliação da cinética de produção enzimática (1ª etapa) .....                                      | 44        |
| 4.2.6.2   | Avaliação da cinética de produção enzimática (2ª etapa) .....                                      | 45        |
| 4.2.6.3   | Avaliação da cinética de produção de celulasas e determinação de proteínas totais (3ª etapa) ..... | 45        |
| 4.2.7     | Determinação da Atividade de Enzimas Celulolíticas.....                                            | 45        |
| 4.2.7.1   | Atividade da enzima Exo-1,4-β-D-glicanase.....                                                     | 46        |

|          |                                                                                                    |           |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2.7.2  | Atividade da enzima Endo-1,4- $\beta$ -D-glicanase .....                                           | 47        |
| 4.2.8    | Determinação da Atividade de Enzimas Ligninolíticas .....                                          | 49        |
| 4.2.8.1  | Lacase (Lac).....                                                                                  | 49        |
| 4.2.8.2  | Lignina peroxidase (LiP).....                                                                      | 50        |
| 4.2.8.3  | Manganês peroxidase (MnP).....                                                                     | 51        |
| 4.2.9    | Quantificação de Proteínas Totais.....                                                             | 52        |
| 4.2.10   | Determinação do Tempo Ótimo de Fermentação.....                                                    | 53        |
| 4.2.11   | Fermentação Submersa dos Corpos-de-prova.....                                                      | 53        |
| 4.2.12   | Confecção dos Corpos-de-prova.....                                                                 | 54        |
| 4.2.13   | Ensaio resistência mecânica dos corpos-de-prova.....                                               | 56        |
| 4.2.13.1 | Tração paralela às fibras .....                                                                    | 57        |
| 4.2.13.2 | Cisalhamento paralelo às fibras .....                                                              | 57        |
| 4.2.13.3 | Resistência ao impacto .....                                                                       | 58        |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                                                | <b>60</b> |
| 5.1      | TRIAGEM DAS LINHAGENS FÚNGICAS (MEIO SÓLIDO).....                                                  | 60        |
| 5.2      | AVALIAÇÃO DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA CELULOLÍTICAS E LIGNOLÍTICAS (MEIO LÍQUIDO).....                  | 66        |
| 5.2.1    | Avaliação da Produção Enzimática (1ª Etapa) .....                                                  | 67        |
| 5.2.2    | Avaliação da Produção Enzimática (2ª Etapa) .....                                                  | 70        |
| 5.2.3    | Avaliação da Cinética de Produção de Celulases e Determinação de Proteínas Totais (3ª Etapa) ..... | 73        |
| 5.2.4    | Curva de Calibração.....                                                                           | 76        |
| 5.3      | ENSAIOS RESISTÊNCIA MECÂNICA DOS CORPOS-DE-PROVA.....                                              | 77        |
| 5.3.1    | Tração Paralela às Fibras.....                                                                     | 77        |
| 5.3.2    | Cisalhamento Paralelo às Fibras.....                                                               | 79        |
| 5.3.3    | Resistência ao Impacto .....                                                                       | 80        |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÃO .....</b>                                                                             | <b>82</b> |
|          | <b>SUGESTÕES DE TRABALHOS.....</b>                                                                 | <b>83</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                            | <b>84</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da humanidade em que os *Australopithecus* (gênero ancestral do *Homo sapiens*) começaram a tomar espaço da superfície terrestre, pode-se dizer que o homem se desenvolveu a partir da “simbiose” unilateral estabelecida com diversas biomassas oriundas das diferentes classes de seres vivos. Fruto do desenvolvimento intelectual e consequentemente tecnológico, a percepção a respeito das relações existentes (direta ou indiretamente) entre os seres que compõem os diferentes ecossistemas, tem produzido grande quantidade de material elucidativo a respeito do papel dos inúmeros indivíduos que participam dos bioprocessos envolvidos no ciclo global do carbono (FRAGA et al., 2012).

A cada dia que passa mais indivíduos de diferentes taxonomias são isolados e classificados mundialmente. De acordo com a estimativa de Mora et al. (2011), existem cerca de 8,7 milhões de espécies de eucariontes (animais, plantas, fungos, protozoários e o reino Chromista), sendo que dentre essas, aproximadamente 1,2 milhões de espécies já foram catalogadas, fato que reflete o cenário de que 86% das espécies terrestre e 91% das espécies marinhas ainda aguardam o isolamento e a classificação.

Corroborando com esses dados, os pesquisadores Bar-On, Phillips e Milo (2018) publicaram a mais recente estimativa a respeito da quantificação da biomassa global. Incluindo os procariontes, estimaram que existam aproximadamente 550 gigatoneladas de carbono (Gt C) de biomassa no planeta. Apesar de ser uma estimativa de caráter menos específica, tem-se que em termos de peso combinado os fungos (12 Gt C) tem 200 vezes mais peso do que os seres humanos (0,06 Gt C) no planeta, as bactérias (70 Gt C) com 1200 vezes e as plantas no topo da biomassa global com 450 Gt C, equivalente a 7500 vezes o peso dos seres humanos.

O princípio que envolve o ciclo biológico do carbono em meio terrestre, tem como pilar fundamental os organismos fotossintetizantes, os quais por meio da assimilação da luz solar, utilizam-se do dióxido de carbono da atmosfera e a água para produzir matéria sólida carbonada, que no caso pode ser denominada de biomassa vegetal. Sem um tratamento específico, toda biomassa vegetal, mesmo ainda viva, é suscetível a sofrer o processo de degradação que promove a



decomposição da matéria orgânica complexa que constitui da parede celular vegetal em moléculas mais simples (AGUIAR; FERRAZ, 2011a).

Durante muito tempo, a biodegradação dos materiais lignocelulósicos foi estudada com foco em desenvolver métodos que intervissem nesse processo de forma a neutralizar ou minimizar o efeito negativo do mesmo, uma vez que muitos materiais eram originados dessas matérias-primas. Entretanto com o avanço do conhecimento a respeito do tema, muito mais que a elucidação da importância desse processo no ciclo natural do carbono, outras aplicações biotecnológicas começaram a ser estudadas (ARANTES; MILAGRES, 2009).

Um exemplo seria a utilização de linhagens fúngicas específicas capazes de hidrolisar a resíduos da cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração (TECHAPARIN; THANONKEO; KLANRIT, 2017). Assim como, a utilização de fungos sobre a biomassa ou de seus metabólitos enzimáticos em processo de polpação e branqueamento na indústria de papel e celulose ou até utilização desses metabólitos como pré-tratamento de resíduos agroindustriais e rações utilizados na alimentação de ruminantes e não ruminantes, facilitando a assimilação de nutricional (BERMEK; LI; ERIKSSON, 2002; SOUZA; OLIVEIRA; ANDRADE, 2008).

As aplicações biotecnológicas dos fundamentos que envolvem a biodegradação de materiais lignocelulósicos são vastas e incluem desde a ação direta de fungos sobre a biomassa ou de seus metabólitos enzimáticos em etapas de pré-tratamento aos processos de polpação e branqueamento na indústria de celulose e papel (DUARTE et al., 2003). Também, a utilização de fungos como agentes auxiliares da destoca de tocos remanescentes do processo de corte de árvores de florestas plantadas (COSTA et al., 2009).

Frente ao que foi exposto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar por meio de ensaios de resistência mecânica a capacidade de linhagens fúngicas específicas em promover a degeneração da estrutura de amostras de madeira de *Pinus* sp submetidas a fermentação submersa com os metabólitos.

## 2. OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar por meio de ensaios mecânicos a degeneração das propriedades de resistência mecânica da madeira de *Pinus sp* submetidas ao contato com metabolitos extracelulares de diferentes fungos filamentosos.

Como objetivo específico:

- Selecionar dentre das linhagens fúngicas estudadas quais são as melhores produtoras de enzimas do complexo lignocelulósico.
- Estabelecer um tempo ótimo de fermentação para o processo de produção do complexo enzimático por fermentação submersa.
- Avaliar as alterações físicas das amostras de madeira de *Pinus sp* submetidas ao contato com os metabólitos extracelulares produzidos pelos fungos selecionados.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

O termo biomassa foi introduzido pelo pesquisador Dr. Eugene Adam, por volta de 1989, que abrange a matéria orgânica oriunda dos cinco reinos biológicos compostos por: plantas, animais, fungos, protistas e moneras (SARKANEN; TILLMAN, 2013). As interconexões entre as diferentes fontes de biomassa está fundamentada na sua origem, em que direta ou indiretamente, derivam de organismos fotossintetizantes (plantas, algas e cianobactérias) que compartilham da capacidade de absorver energia solar para conversão energética, entrelaçando-se consecutivamente pelo conjunto de etapas da cadeia trófica (NELSON; COX, 2011).

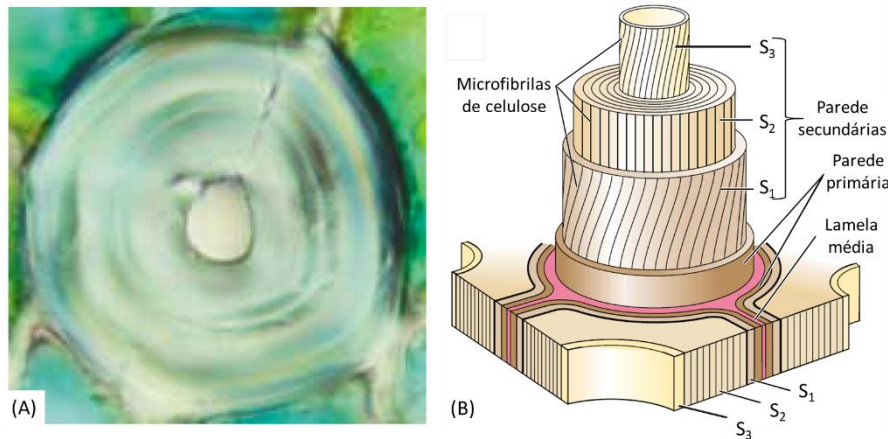
A maior fração da biomassa fotossintética está na porção lenhosa das plantas e árvores, também denominada de biomassa lignocelulósica. Essa é constituída basicamente pela celulose, lignina, hemicelulose e extrativos, com composição variável dependendo da espécie, tecido e condição de crescimento do vegetal (NISGOSKI; MUÑIZ; KLOCK, 2011). A biomassa lignocelulósica compõe a estrutura interna dos vegetais e tem o papel de promover a estabilidade e robustez estrutural das paredes celulares das plantas, bem como sua resistência à degradação química e microbiana (AGUIAR; FERRAZ, 2011b).

A parede celular vegetal é dividida em camadas, em que o arranjo concêntrico característico celular se dá pelas diferenças na composição química e orientação dos elementos estruturais majoritários que a compõe (celulose, lignina e hemicelulose), além da quantidade de água disponível para a planta (SIQUEIRA; FILHO, 2010).

Morfologicamente a parede celular vegetal pode ser dividida em parede primária (P), que é composta por fibrilas de celulosas arranjadas em delgadas camadas formando uma espécie de rede com polioses (hemiceluloses), pectina e proteínas imersos numa matriz de lignina (EICHHORN, 2011).

Na parede secundária (S), que é subdivida em camadas: S1, S2 e S3, e diferenciam entre si pelo ângulo de orientação das microfibrilas em relação ao eixo axial da fibra e pela espessura do tecido (EICHHORN, 2011). As estruturas descritas podem ser observadas na Figura 1.

Figura 1 – (A) Seção transversal de uma célula do esclerênquima (gênero *Podocarpus*) composta por células com paredes secundárias espessas e lignificadas. (B) Estrutura tridimensional da parede célula vegetal dividida em camadas.



Fonte: Adaptada de Taiz e Zieger (2002)

No interstício celular a lamela média é o elemento estrutural que une as células entre si formando o tecido vegetal. Na parede primária o percentual de celulose podem chegar a 90% ou mais, resultando num arranjo altamente orientado e cristalino, variando de acordo com a espécie vegetal (NISGOSKI; MUÑIZ; KLOCK, 2011).

### 3.2 CELULOSE

Em meados dos anos de 1840 o químico agrícola francês Anselme Payen efetuou estudos a respeito da composição das plantas. Ele observou que diferentes estruturas vegetais (sementes, folhas, raízes e etc.) produziam uma mesma substância fibrosa e resistente quando tratados com amônia seguida de extrações utilizando álcool e éter. Assim, depois de uma série de experimentos, ele concluiu que a substância fibrosa proveniente das estruturas vegetais estudadas consistia de uma mesma substância química (HABIBI; LUCIA; ROJAS, 2010).

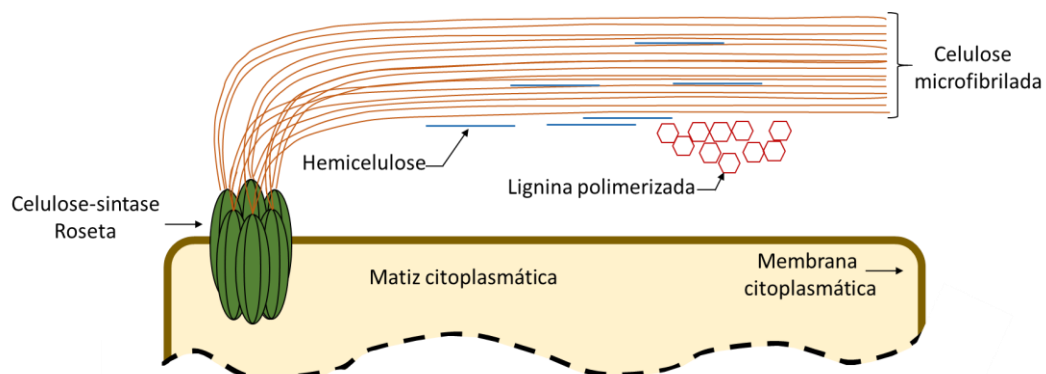
Com cadeia linear, no caso, um carboidrato composto por glicose e isômeros, a estrutura descoberta foi nomeada pela academia francesa de *Cellulose* em 1839 em homenagem póstuma a Payen, no artigo “*Rapport sur un mémoire de M. Payen, relatif à la composition de la matière ligneuse.*” (HON, 1994).

Conforme já foi dito, o teor de concentração dos compostos lignocelulósicos na biomassa vegetal dependendo da espécie, tecido e condição de crescimento do vegetal, mas independente desse fato, a celulose é o composto de maior concentração na biomassa vegetal (HARRIS et al., 2010; NISGOSKI; MUÑIZ; KLOCK, 2011).

A celulose é biopolimerizada a partir precursores enzimáticos citoplasmáticos, designadas de celulose-sintase. Essas estruturas enzimáticas, denominadas de rosetas, atuam na iniciação, alongamento e a exportação das microfibrilas para fora da membrana citoplasmática. As quais são suscetíveis à formação de ligações de hidrogênio entre si, levando à sua cristalização como bastões rígidos insolúveis (DOBLIN et al., 2002).

A roseta é composta de seis glóbulos arranjados em um hexágono regular com diâmetro aproximado de 25 nm. Cada um dos glóbulos consiste em múltiplas subunidades proteicas que juntas sintetizam seis cadeias de celulose, o que gera a produção simultânea de trinta e seis moléculas de celulose. (DOBLIN et al., 2002; SORIEUL et al., 2016). As quais podem ser observadas na Figura 2.

Figura 2 – Representação esquemática de uma porção da célula vegetal com destaque a estrutura simplificada da Roseta e o processo de exportação das microfibrilas de celulose para fora da membrana citoplasmática.



Fonte: Adaptada de Sorieul et al. (2016)

Sabe-se que no precursor da celulose, as ligações predominantes entre as D-glicose e os nucleotídeos são do tipo  $\alpha$ , entretanto na celulose os resíduos de glicose são unidos por ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), de forma que há uma inversão de configuração no carbono anômero (C-1) à medida que a ligação glicosídica se forma (NG et al., 2015).

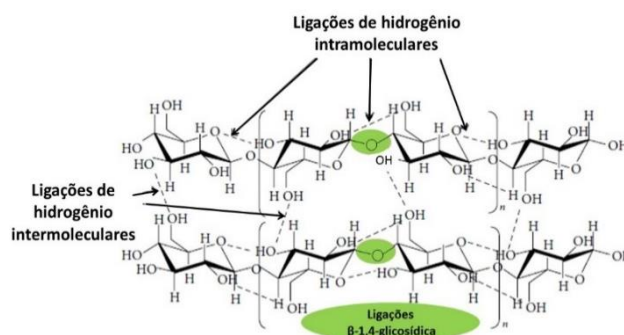
O mecanismo de polimerização não é perfeitamente elucidado, mas em decorrência desse processo, defeitos na cristalinidade são evidentes, assim a matriz estrutural da parede celular apresenta morfologia composta de regiões cristalinas e amorfas (DUFRESNE, 2013; MILANEZ et al., 2014; NG et al., 2015).

Caracterizada como um homopolissacarídeo composto por unidades moleculares de anidro-glicose ( $\beta$ -D-glicopirranose) ligadas entre si, como já dito, por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), tal qual demonstrada na Figura 3. Nas plantas, a celulose pode apresentar um grau de polimerização de aproximadamente 10.000 unidades de anidro-glicose, podendo atingir até 15.000 unidades em algodão (ODEGA; PETRI, 2010; TEIXEIRA; SIQUEIRA; BATISTA, 2016).

A polimerização da  $\beta$ -D-glicose da celulose se dá através de ligação glicosídica, que apresenta conformação do tipo “cadeira”. De caráter mais estável e com livre rotação de 180° em relação às subunidades vizinhas, forma uma cadeia linear e estendida, diferente da ligação  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) característica das moléculas de amido que apresentam conformação helicoidal.

Esse fato, promove a estrutura fundamental da celulose grande estabilidade estrutural e resistência a tensão devido à alta densidade de ligações de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares, bem como a fundamenta a formação das estrutura cristalina na celulose (LAVOINE et al., 2012; NISGOSKI; MUÑIZ; KLOCK, 2011). Tais ligações também podem ser observadas na Figura 3.

Figura 3 – Estrutura química da celulose com representação das ligações de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares.



Fonte: Adaptada de Lee; Hamid e Zain (2014)

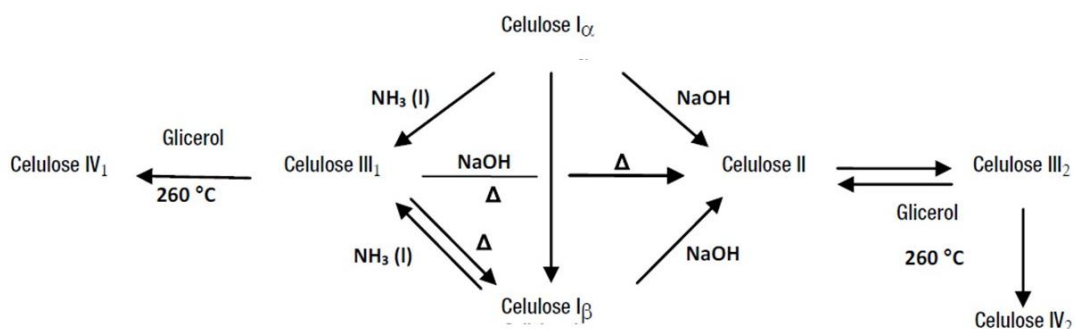
A celobiose é definida como unidade mínima da celulose, formada por duas unidades adjacentes de  $\beta$ -D-glucopirranose através da eliminação de uma molécula de

água, envolvendo grupos hidroxílicos dos carbonos 1 e 4 (LEE; HAMID; ZAIN, 2014; NELSON; COX, 2011). Em sua estrutura três grupos hidroxilas capazes de formar ligações de hidrogênio, promovendo para a celulose importantes propriedades estruturais que podem ser citadas, tal como, estrutura microfibrilada dispostas em escalas variadas, organização hierarquizada (regiões cristalinas e amorfas) e alta natureza coesiva com a temperatura de transição vítrea maior que a temperatura de degradação (LAVOINE et al., 2012).

A celulose é um polímero que apresenta polimorfismo, podendo ser encontradas em quatro formas: celulose tipo I, II, III e IV. A celulose tipo I é a encontrada na natureza em apresentações alomórficas, denominadas de  $I_\alpha$  e  $I_\beta$ . A primeira com estrutura triclinica e a segunda com estrutura monoclinica.  $I_\alpha$  pode ser convertida irreversivelmente através de tratamento térmico em  $I_\beta$ , forma mais estável (SÈBE et al., 2012; SIQUEIRA et al., 2011).

Já a celulose tipo II ou celulose regenerada é a celulose sintética, oriunda de um processo de recristalização induzido ou mercerizarão com hidróxido de sódio. E as celulosas dos tipos III e IV, também sintetizadas, são obtidas a partir do tratamento com amônia das celulosas I e II, respectivamente. As rotas de obtenção das diferentes morfologias citadas podem ser visualizadas na Figura 4 (SÈBE et al., 2012; SIQUEIRA et al., 2011).

Figura 4 – Rotas de obtenção das estruturas polimórficas da celulose.



Fonte: Adaptada de Klemm, Schmauder e Heinze (2005)

Como resultado da biopolimerização a estrutura supramolecular da celulose apresenta regiões altamente ordenadas (regiões cristalinas) intermediadas por regiões menos ordenadas (regiões amorfas). O qual detém maior concentração de defeitos estruturais, espaços vazios e maior área superficial, apresentando assim

maior susceptibilidade a agentes degradativos químicos ou biológicos (AGUIAR; FERRAZ, 2011a; ODEGA; PETRI, 2010).

Essa organização hierarquizada se apresenta no vegetal em forma de fibrilas elementares, que integradas compõem as microfibrilas que apresentam espessura de 3 a 20 nanômetros e encontram-se imergidas em uma matriz composta por lignina e hemicelulose compondo a estrutura da parede celular dos vegetais (CHEN et al., 2011; NELSON; COX, 2011).

### 3.3 HEMICELULOSE

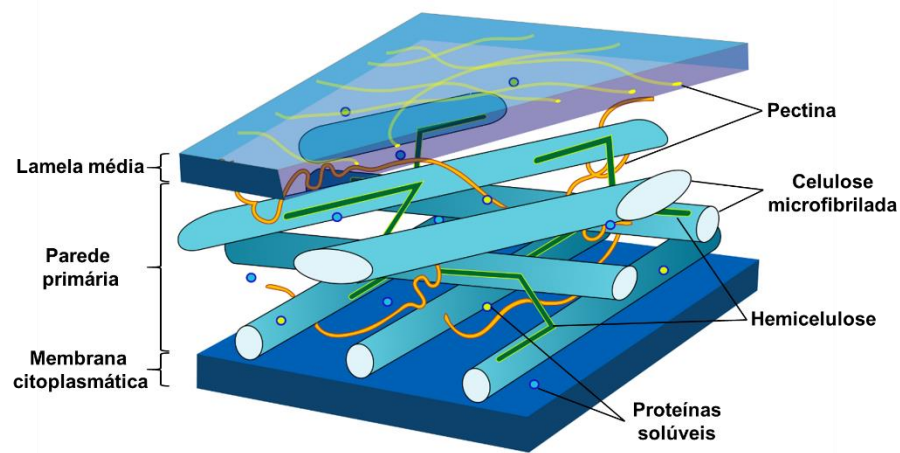
O termo hemicelulose é utilizado para definir uma classe bastante variada de polissacarídeos ou polioses complexos, os quais têm considerável representatividade mássica na biomassa lignocelulósica, podendo apresentar teores de 5 a 20% na planta, sendo que o teor em massa, também, varia de acordo com a espécie, tecido e estágio de desenvolvimento da planta (SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

As hemicelulose podem ser formadas de diferentes monômeros, tais como: pentoses (xilose e arabinoses), hexoses (galactose, glucose e manose), ácidos urônicos (ácidos D-glucurônico, D-galacturônico e metilglucurônico) e deoxiexoses (ramnose e fucose), sendo a xiloglucana e glucomanana as duas estruturas monoméricas mais abundantes dentre as que compõem essa classe (GÍRIO et al., 2010; NISGOSKI; MUÑIZ; KLOCK, 2011).

Na parede celular vegetal as hemiceluloses encontram-se em associação com a celulose e lignina na matriz extra celular vegetal, podendo ser encontradas em todos os domínios da parede celular vegetal, mas são encontradas em maior concentração nas camadas primárias e secundárias (GÍRIO et al., 2010). Tal disposição é exemplificada na Figura 5.



Figura 5 – Ilustração exemplificativa da disposição das hemiceluloses dispersas entre as estruturas que compõem a parede celular vegetal.



Fonte: Adaptada de Sticklen (2008)

Com grau de polimerização (GP) significativamente inferior a celulose, menores que 400, as hemicelulose também se diferenciam da celulose devido ao fato de que possuem ramificações de pequenas cadeias laterais mantidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3), além de apresentarem caráter amorfo, o que as tornam muito mais susceptíveis a hidrólise química ou enzimática, quando comparada com a celulose ou lignina (LEE; HAMID; ZAIN, 2014; ODEGA; PETRI, 2010).

### 3.4 LIGNINA

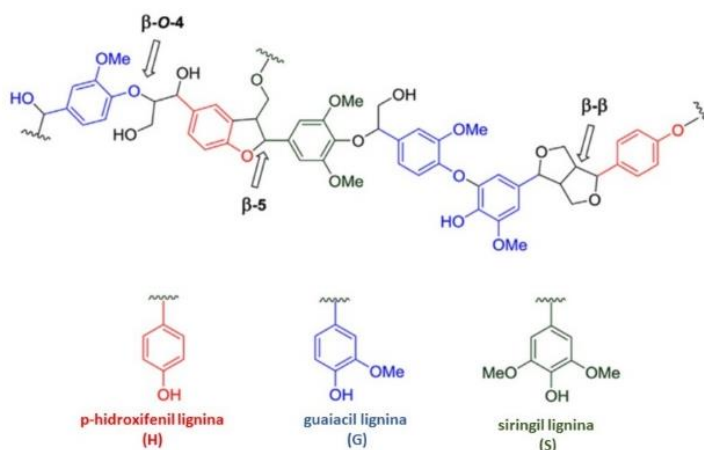
Depois da celulose, a lignina, é a macromolécula orgânica mais abundante nos materiais lignocelulósicos, podendo atingir entre 18 a 35% em peso da biomassa. Localizada principalmente na lamela média onde é depositada durante a lignificação do tecido vegetal, é considerada um produto final do metabolismo da planta, pois o depósito coincide com a morte da célula (LANGE; DECINA; CRESTINI, 2013; MOTTIAR et al., 2016).

Formada apenas em plantas vasculares, apresenta papel importante nos tecidos especializados em funções de transporte de fluidos e suporte mecânico devido sua atuação como barreira contra a trocas fluídicas, fotodegradação e ação de agentes infecciosos (GALL et al., 2017; MOTTIAR et al., 2016).

A lignina pode ser classificada como um complexo fenilpropanoide tridimensional gerado pela polimerização oxidativa de três precursores, denominados

de monolignóis: o álcool cumarílico, o álcool coniferílico e o álcool sinapílico, que geram três tipos de lignina: p-hidroxifenil lignina (H), guaiacil lignina (G) e siringil lignina (S), respectivamente, que podem ser observados na Figura 6 (LEE; HAMID; ZAIN, 2014; MOTTIAR et al., 2016).

Figura 6 - Exemplo de uma estrutura de lignina contendo as ligações mais frequentes e os monómeros correspondentes que fazem parte da sua estrutura: p-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S).



Fonte: Adaptada de Gonzalo et al. (2016)

Dentro os três principais biopolímeros que compõe a biomassa lignocelulósica, a lignina é o que possui a composição e a estrutura mais complexa e heterogênea, fato que se dá devido ao seu processo de biopolimerização, em que ocorre a incorporação dos radicais monolignóis na estrutura da lignina, resultando em polímeros racêmicos com distribuição e propriedades físico-químicas variáveis (ABDELAZIZ et al., 2016; DAI; PATTI; SAITO, 2016).

Como já exposto, os componentes da biomassa lignocelulósica apresentam-se em diferentes concentrações de acordo com a espécie, tecido ou condições de crescimento. A lignina não foge a essa premissa, uma vez que nas dicotiledôneas a lignina predominante é a do tipo S, já nas monocotiledôneas detêm de todos os tipos em proporções similares (ABDELAZIZ et al., 2016).

Nas gimnospermas em que se incluem plantas como pinheiros, sequoias e ciprestes, o tipo G é o predominante. E nas angiospermas representadas por um vasto grupo de espécies de plantas que apresentam flor e fruto contém do tipo G e S nas mesmas proporções. Quantidades significativas do tipo H são encontradas em herbáceas (KLOCK et al., 2005; YINGHUI; YUANTING; HOSMANE, 2013).

### 3.5 ESTRUTURA DA MADEIRA

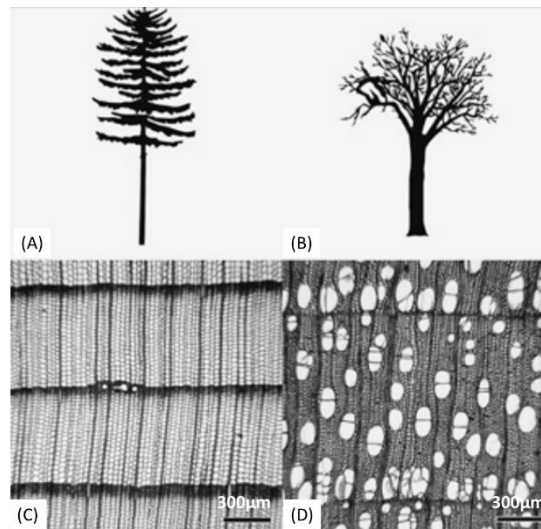
Do ponto de vista da botânica as árvores são classificadas como vegetais superiores, denominados de fanerógamas. Dentro da classificação filogenética a biomassa lenhosa é produzida por duas classes: Gimnosperma e Angiosperma. De maneira sucinta, as gimnospermas são representadas pelas coníferas, em que a maior parte dos seus indivíduos apresentam folhagem aciculifoliadas e raízes pivotantes. Essas árvores apresentam madeira mole e são denominadas por *softwoods* (ROWELL, 2005).

Já as angiospermas têm uma classificação mais abrangente que engloba as monocotiledôneas, representadas pelas palmas e gramíneas, e as dicotiledôneas que podem ser representadas por indivíduos que vão desde pequeno porte como a soja e o café até árvores de grande porte tais como peroba ou mogno (ROWELL, 2005).

Não são todas as espécies de dicotiledônias que produzem madeira, mas as que expressam essa característica produzem uma madeira dura, conhecidas como *hardwoods* (ROWELL, 2005). As diferenciações básicas entre as duas classes de madeira descritas podem ser observadas na Figura 7.

Composta por diferentes tipos de células, com diferentes funções, a madeira é um tecido complexo. Caracterizada por ser um material fundamentalmente heterogêneo, sendo sua variabilidade estrutural e química refletida numa ampla gama de propriedades físicas, tais como: densidade, permeabilidade, capilaridade, condutividade térmica, elasticidade, resistência à tração e compressão, entre outras. O arranjo de suas estruturas físicas (macroscópicas, microscópicas e ultramicroscópicas) e químicas promovem a madeira uma engenhosa organização arquitetônica (ROWELL, 2005).

Figura 7 – (A) Representação esquemática de uma madeira de conífera; (B) representação esquemática de uma madeira de folhosa; (C) micrografia da seção transversal do tronco de uma madeira de conífera; (D) micrografia da seção transversal do tronco de uma madeira de folhosa.



Fonte: Adaptada de Rowell (2005)

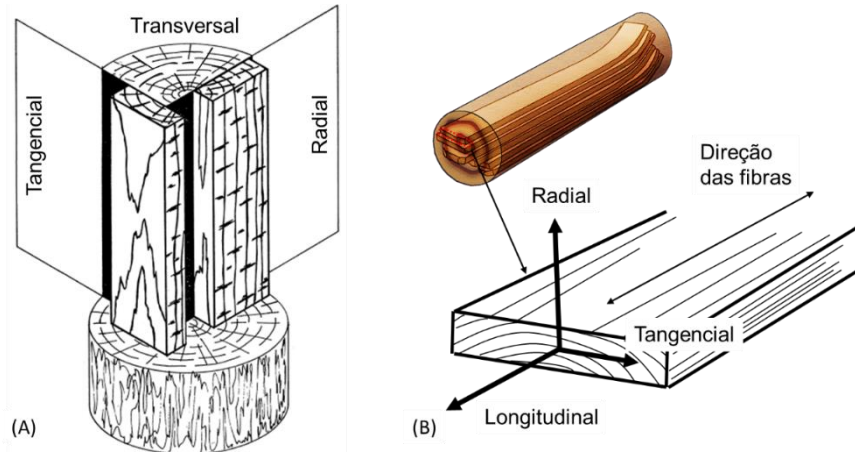
O crescimento das árvores se dá em dois sentidos: vertical e radial. O vertical se dá de forma específica de acordo com a espécie e as condições ambientais (disponibilidade de nutriente, água e luz), o mesmo se aplica ao crescimento radial, entretanto ele se caracteriza pelo acúmulo de sucessivas sobreposições de novas camadas ao redor das camadas mais antigas. Em um corte transversal do tronco, essas camadas aparecem como anéis de crescimento com morfologias suficientemente distintas entre as células do início e fim de cada ciclo de crescimento regidas pelas transições das estações climáticas do ano (PLOMION; LEPROVOST; STOKES, 2001).

A madeira é constituída principalmente por células de forma alongada apresentando vazio interno, tendo tamanhos e formas variadas de acordo com a função. Podem ser encontradas nas madeiras nos seguintes elementos: traqueídeos, vasos, fibras e raios medulares. Os que compõem o tecido da madeira, são constituídos de tal forma a suprir as necessidades naturais da árvore e consequentemente na sustentação mecânica, condução, armazenamento e de secreção (ROWELL, 2005).

O sentido e arranjo das células podem ser reconhecidos nas seções dos três principais planos de corte utilizados na caracterização anatômica da madeira: transversal, tangencial e radial, bem como a direção longitudinal que se tem a partir

do corte de ripas de madeiras no sentido paralelo as fibras, que podem ser observados na Figura 8 (RITTER, 1990).

Figura 8 – (A) Representação dos planos de cortes anatômicos da madeira: transversal, tangencial e radial. (B) Representação dos eixos principais da madeira em relação à direção das fibras e crescimento dos anéis.



Fonte: Adaptada de Beals e Davis (1977)

Dada essa conformação estrutural, a madeira é caracterizada como um material anisotrópico, ou seja, possui diferentes propriedades em relação aos diversos planos ou direções perpendiculares entre si. Em que de acordo com o ângulo de aplicação do esforço e a orientação das fibras, observa-se que não há simetria de propriedades em torno de qualquer eixo (ROWELL, 2005).

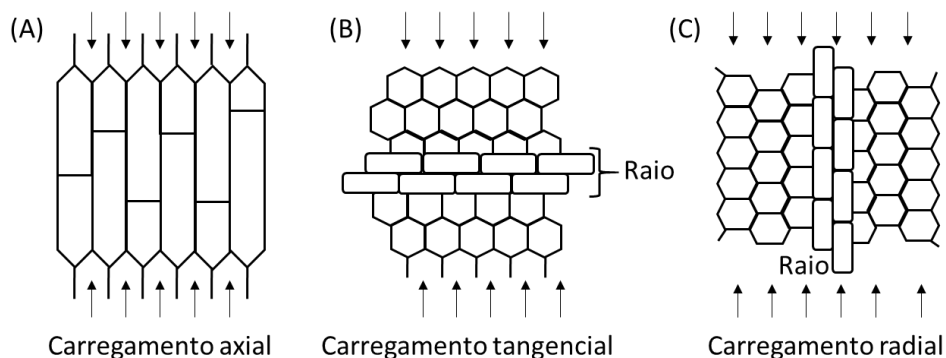
### 3.6 PROPRIEDADES MECÂNICAS DA MADEIRA

Como já foi exposto, a madeira é um material com estrutura complexa de caráter anisotrópico, em que diferentes fatores estarão ligados e refletiram nas propriedades específicas de um lote amostral de uma dada espécie, entretanto, independente desses pontos citados, todas as propriedades da madeira dependem, até certo ponto, da quantidade de água que nela contém. A madeira verde pode conter aproximadamente 50% do seu peso em água. Sendo que ao promover a secagem de uma amostra de madeira, até umidade aproximadamente 10%, tem-se o fenômeno de contração das fibras, em que seu módulo elástico e resistência aumentam devido

o aglomeramento das fibras de celulose, devido ao aumento da densidade (ASHBY; JONES, 2007).

De forma geral, as propriedades mecânicas da madeira são determinadas pelo seu comportamento quando submetida a um carregamento externos. Com característica de um sólido visco-elástico que sob carregamento mostram deformação imediata seguida por fluência lenta. Em geral a madeira é carregada ao longo das fibras (direção axial), assim, é importante conhecer o módulo axial. Ocasionalmente, ao sofrer carregamentos transversais, tem-se valores mais baixos, fato ligado a menor resistência da parede celular nessa direção devido a morfologia celular, em que ao sob carregamento transversal, as paredes da célula tendem a sofrerem flexão (RITTER, 1990). A figura 9 ilustra o comportamento descrito anteriormente.

Figura 9 – (A) Representação de carregamentos submetidos ao longo das fibras (direção axial). (B e C) Representação carregamentos submetidos perpendicular as fibras, em que as paredes das células sofreram flexão (direção tangencial ou radial).



Fonte: Adaptada de Ashby e Jones (2007)

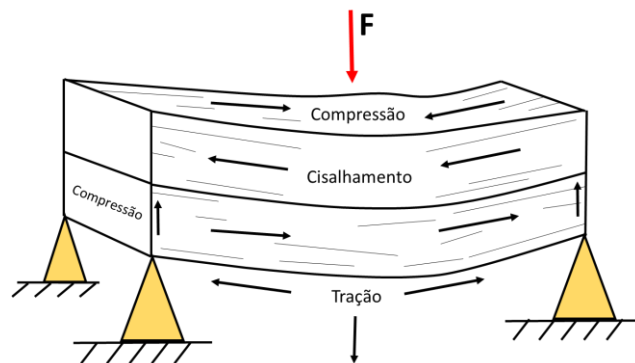
Como ilustrado na Figura 10 (B e C), ao submeter uma estrutura de madeira a um carregamento compressivo perpendicular às fibras, ocorre a compactação das fibras e eliminação dos vazios, resultando no aumento da densidade aparente e consecutivo aumento na capacidade de carga da estrutura. Em contrapartida, quando a estrutura é solicitada por compressão paralela às fibras, as forças agem paralelamente à direção do comprimento das células, provocando o achatamento das células ao longo do seu eixo longitudinal. Desta forma, ocorre o aumento da resistência à compressão (ASHBY; JONES, 2007; RITTER, 1990).

Na madeira, a tração pode ocorrer com orientação paralela ou normal às fibras. Na solicitação paralela, as fibras tendem a se separar por deslizamento entre

as células ou por ruptura das paredes celulares. Em ambos os casos, a ruptura é de caráter frágil (com valores baixos de deformação), mas com elevados valores de resistência. Uma vez que o carregamento age na direção normal ao comprimento das fibras, promovendo a separação das mesmas. Já a tração paralela provoca alongamento das células da madeira ao longo do eixo longitudinal, promovendo a separação das células perpendicular ao eixo (ASHBY; JONES, 2007).

Ao empregar uma força de flexão sobre uma estrutura de madeira é possível observar quatro esforços distintos entre as fibras que compõem o material: compressão paralela às fibras, tração paralela às fibras, cisalhamento horizontal, e nas regiões de apoios, compressão perpendicular às fibras. Esses fenômenos são exemplificados pela figura 10. Ao submeter sobre a peça ao carregamento que gere a flexão ocorre com a formação de minúsculas falhas de compressão seguidas pelo esmagamento macroscópico e a redução da área tracionada, gerando um acúmulo de tensões nesta região, que pode gerar uma falha com consecutivo rompimento do material (RITTER, 1990).

Figura 10 – Representação esquemática do comportamento global da madeira solicitada à flexão simples.



Fonte: Adaptada de Ritter (1990)

De forma geral, tem-se que o comportamento dos materiais sujeitos a esforços dinâmicos expressem um comportamento diferentes de quando sujeitos a cargas estáticas. A madeira não foge à regra, em que a partir de ensaios de choque ou impacto, é possível obter informações a respeito da capacidade global do material em absorver e dissipar energia, através de deformações elásticas. Alguns fatores podem influenciar na resistência ao choque, tais como: forma e dimensões das peças, inclinação da grã, massa específica, teor de umidade e propriedades anatômicas da

madeira. A resiliência das madeiras aos esforços de flexão dinâmica é máxima quando os esforços são aplicados na direção radial aos anéis de crescimento, uma vez que os anéis funcionam como molas de absorção (ASHBY; JONES, 2007).

### 3.7 BIODERGRADAÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A biodegradação da biomassa lignocelulósica é um processo biológico complexo que pode iniciar-se com o vegetal ainda vivo, em geral actinobactérias e fungos poliporóides (classe Basidiomycetes) são os principais microrganismos que atuam nessa fase (MARTÍNEZ et al., 2005), além de uma gama de insetos xilófagos. Entretanto, com a morte do vegetal inúmeras espécies de fungos decompositores podem ser encontrados, sendo que as comunidades tendem a variar de acordo com o estágio de decomposição que se encontra o substrato, bem como a quantidade de água presente na mesma ou a presença de algum agente externo, tendo como exemplo a existência de algum tipo de agente químico antifúngico ou alguma resina que impeça o contato entre a superfície do substrato e o fungo (AGUIAR; FERRAZ, 2011b).

Conforme já exposto, devido à forte interação entre os biopolímeros que a compõe a matriz da parede celular vegetal, essa apresenta baixa porosidade, o que impede a infiltração de moléculas de elevada massa molar, como as proteínas, pela superfície celular, agindo assim como a principal barreira para a biodegradação (ARANTES; MILAGRES, 2009). Dessa forma, os grupos de microrganismos aptos a degradar os materiais lignocelulósicos são bastante restritos, uma vez que esses necessitam de um sistema metabólico específico que permita promover a fragmentação da parede celular a partir da despolimerização de seus componentes, gerando substâncias susceptíveis à metabolização intracelular (NELSON; COX, 2011; TEIXEIRA; SIQUEIRA; BATISTA, 2016).

De forma genérica, a biodegradação promovida por fungos se dá devido a capacidade desses em realizar a digestão extracelular através de estruturas filamentosas, denominadas de hifas, capazes de penetrar no lúmen da célula vegetal por meio da secreção de metabólitos específicos. Esses apresentam composição variada dependendo do microrganismo e da etapa de degradação do substrato, são constituídos de enzimas lignocelulolíticas e compostos químicos de baixa massa



molar (outras substâncias específicas também pode ser encontradas, mas não fazem jus à citação devido ao caráter desse trabalho) que levam à conversão e despolimerização dos componentes da parede celular vegetal (celulose, lignina e hemicelulose) em moléculas com peso molecular significativamente menor, as quais são passíveis de serem absorvidas através da membrana plasmática fúngica e assim metabolizadas pelo microrganismo (AGUIAR; FERRAZ, 2011b, 2012; ARANTES; MILAGRES, 2009).

De acordo com as características de crescimento do fungo sobre a biomassa lignocelulósica e do tipo de sistema degradativo, diferenças físicas, químicas e morfológicas podem ser observadas. Com base nas características em que se desenvolve a degradação da biomassa lignocelulósica, os fungos podem ser divididos em três grupos: os causadores de degradação branca (*white-rot*), parda (*brown-rot*) e mole (*soft-rot*) (MARTÍNEZ et al., 2005; ROUCHES et al., 2016; YOON et al., 2014). O quadro 1 apresenta alguns pesquisadores que estudam os diferentes tipos de degradação e os microrganismos classificados.

Quadro 1 - Linhagens fúngicas de podridão-branca e podridão-parda utilizadas em pesquisas na produção de celulase.

(continua)

| Gênero                                        | Espécie              | Referência                                                                                   |
|-----------------------------------------------|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Degradação Branca (*)<br>( <i>white-rot</i> ) |                      | -                                                                                            |
| <i>Phanerochaete</i>                          | <i>chrysosporium</i> | (DONG et al., 2013; SHRESTHA et al., 2010)                                                   |
| <i>Trametes</i>                               | <i>versicolor</i>    | (ELISASHVILI et al., 2009; FERRAZ; MENDONÇA; DA SILVA, 2000; MACHADO; MATHEUS; BONONI, 2005) |
| <i>Trametes</i>                               | <i>hirsuta</i>       | (ELISASHVILI et al., 2009)                                                                   |
| <i>Pleurotus Lentinus</i>                     | <i>ostreatus</i>     | (DONG et al., 2013; ITOH et al., 2003; OZCIRAK ERGUN; OZTURK UREK, 2017)                     |

Quadro 1 - Linhagens fúngicas de podridão-branca e podridão-parda utilizadas em pesquisas na produção de celulase.

(conclusão)

|                                      |                      |                                                   |
|--------------------------------------|----------------------|---------------------------------------------------|
| <i>Lentinus</i>                      | <i>edodes</i>        | (DONG et al., 2013; PHILIPPOUSSIS et al., 2011)   |
| <i>Cerrena</i>                       | <i>maxima</i>        | (ELISASHVILI et al., 2009)                        |
| <i>Pycnoporus</i>                    | <i>coccineus</i>     | (ELISASHVILI et al., 2009; MACHUCA; FERRAZ, 2001) |
| <i>Ceriporiopsis</i>                 | <i>subvermispora</i> | (FERRAZ et al., 2000, 2008; WAN; LI, 2010)        |
| <i>Pseudotremella</i>                | <i>gibbosa</i>       | (ELISASHVILI et al., 2009)                        |
| Degradação parda (*)<br>(brown-rot)- |                      | -                                                 |
| <i>Laetiporeus</i>                   | <i>sulfurous</i>     | (MACHUCA; FERRAZ, 2001)                           |
| <i>Gloeophyllum</i>                  | <i>trabeum</i>       | (ARANTES et al., 2011; SHRESTHA et al., 2010)     |
| <i>Fomitopsis</i>                    | -                    | (DESWAL; KHASA; KUHAD, 2011)                      |
| <i>Wolfiporia</i>                    | <i>cocos</i>         | (ARANTES et al., 2011; MACHUCA; FERRAZ, 2001)     |
| <i>Piptoporus</i>                    | <i>betulinus</i>     | (VALÁŠKOVÁ; BALDRIAN, 2006)                       |

Fonte: O autor.

Nota: (\*) Classificação utilizada por Yoon et al. (2014)

A degradação branca é causada por um grande grupo heterogêneo de fungos classificados entre os gêneros *Phanerochaete*, *Trametes*, *Pleurotus*, *Lentinus*, *Cerrena*, *Funalia*, *Coriolorpus*, *Fomes*, *Irpex*, *Trichaptum* e *Ceriporiopsis* caracterizados pela sua habilidade em degradar todos os componentes da parede celular. Entretanto, podem efetuar decomposição seletiva, que ocorre quando a lignina

é preferencialmente consumida ou simultânea, quando todos os componentes da parede celular sofrem degradação (CARVALHO et al., 2009; YOON et al., 2014). Na qual há preferência pela degradação da lignina e a madeira adquire aspecto fibroso-esbranquiçado em decorrência da decomposição de até 97% da lignina com o acúmulo de celulose (MARTÍNEZ et al., 2005).

A degradação parda é realizada preferencialmente por basidiomicetos através de um ataque difuso sobre todos os componentes da biomassa. A celulose e as hemiceluloses sofrem despolimerização, já a lignina sofre modificação química, uma vez que os fungos dessa classe não produzem fenol oxidases, sendo assim, a lignina residual do processo de degradação sofre o processo parcial de desalquilação, desmetoxilação e desmetilação, permanecendo os anéis aromáticos (LEE et al., 2007; MARTÍNEZ et al., 2005).

A camada S2 da parede secundária é preferencialmente atacada, por fungos de degradação parda, esse fato está ligado a baixa densidade fibrilar, comparada com as demais camadas, e baixo teor de lignina. Evidenciando-se que no avanço do processo de degradação a parede primária e a lamela média (altamente lignificadas) tende a resistir ao ataque fúngico (SINGH et al., 2016a).

A biomassa submetida a essa degradação tende a apresentar característica quebradiça com decréscimo significativo de sua resistência mecânica, devido a despolimerização da celulose durante o processo (SINGH et al., 2016a).

Por fim e não menos importante a decomposição mole, que recebeu esse nome devido à característica dos locais os quais os primeiros indivíduos dessa classe foram isolados, no caso, em ambientes úmidos. Os fungos que promovem esse ataque são classificados como ascomicetos e deuteromicetos.

Esses não promovem degradação seletiva, mas são classificados de acordo com os dois tipos característicos de defeito que promovem a parede celular vegetal, em que o primeiro induz cavidades distintas, bicônicas ou cilíndricas no interior das paredes celulares, e o segundo erode a parede celular gradativamente por completo (CARVALHO et al., 2009; SINGH et al., 2016a).

### 3.8 ENZIMOLOGIA DA BIODERADAAÇÃO DA MADEIRA

Os processos descritos de decomposição da biomassa lignocelulósica requerem a presença de enzimas específicas como ligninases, hemicelulases e celulasas cuja produção é uma propriedade inerente a diferentes espécies de fungos e outros microrganismos, diferindo-se no tipo e na quantidade em que são produzidas. Sendo assim, com o intuito de produzir uma revisão que fundamente a execução desse trabalho, as principais enzimas que compõem os complexos ligninolítico e de forma mais abrangente o complexo celulolítico serão abordadas.

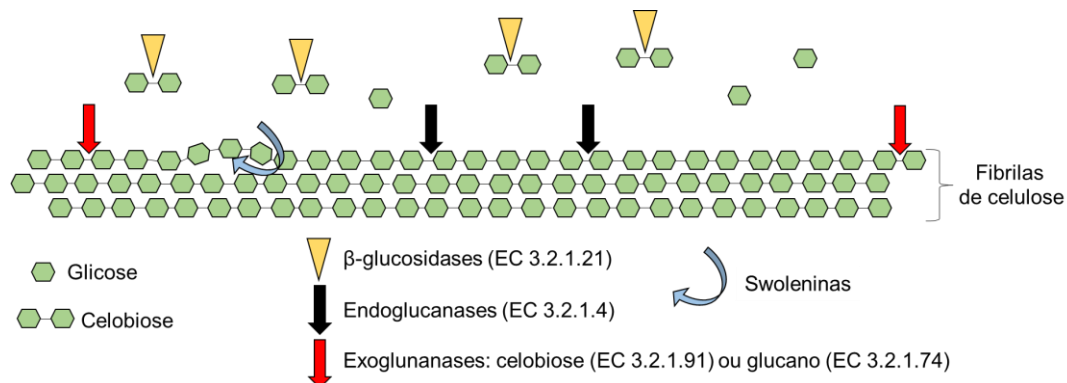
#### 3.8.1 Enzimas Celulolíticas

A hidrólise completa da celulose se dá pela ação sinérgica de um grupo de enzimas, dentre as quais, pode-se destacar três como as principais. As endoglucanases (EC 3.2.1.4) responsável pela hidrólise de ligações glicosídicas no interior da cadeia, principalmente nas regiões amorfas, liberando fragmentos menores (ODEGA; PETRI, 2010; PECIULYTE et al., 2017).

De forma oposta, as exoglucanases que tem suas principais representantes: celobiose-hidrolase (EC 3.2.1.91) e glucano-hidrolase (EC 3.2.1.74) hidrolisam ligações glicosídicas nas extremidades da cadeia, liberando dímeros de glucose (celobioses) (ODEGA; PETRI, 2010; SINGH et al., 2016b). A representação esquemática pode ser observada na Figura 11.

Por fim a  $\beta$ -glucosidases (EC 3.2.1.21) que hidrolisam as celobioses e oligossacarídeos solúveis em glucose. Além destas, outras proteínas como as expansinas e as swoleninas (Figura 11), tem sido reportado como capazes de afrouxar a estrutura da celulose cristalina sem promover a hidrólise da celulose, o que facilita o acesso das demais enzimas ao substrato (BROTMAN et al., 2008; PECIULYTE et al., 2017).

Figura 11 - Exemplo de uma estrutura de lignina contendo as ligações mais frequentes e os monómeros correspondentes que fazem parte da sua estrutura: p-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S).



Fonte: Adaptada de Aro, Pakula e Penttilä (2005)

Fato interessante, é quando se utiliza a biomassa celulósica em processos de sacarificação, visando a redução do consumo de energia na produção de etanol de segunda geração em que o consorcio de enzimas atua de forma sinérgica sobre o substrato ocasionando o “afrouxamento” das fibras (ALVIRA et al., 2010; TALEBNIA; KARAKASHEV; ANGELIDAKI, 2010).

### 3.8.2 Enzimas Ligninolíticas

As enzimas celulolíticas são classificadas como hidrolases, apresentando especificidade muito grande pelo substrato, tanto que diversos estudos ressaltam a capacidade inibidora da lignina pela absorção e neutralização das enzimas que compõem o complexo celulolítico (BREXÓ; PASSARINI; SETTE, 2013).

Já as enzimas ligninolíticas são classificadas como oxidases inespecíficas e exercem sua ação catalítica por intermédio de compostos de baixa massa molar (AGUIAR; FERRAZ, 2011b; ODEGA; PETRI, 2010), sendo que os fungos da classe Basidiomycetes são que se apresentam como os mais eficientes em promover a despolimerização e consequente mineralização da lignina (ARO; PAKULA; PENTTILÄ, 2005).

As enzimas que compõem o complexo ligninolítico podem ser agrupadas em duas classes distintas: as enzimas que produzem peróxido de hidrogênio e as fenoloxidades. Existem as que dependem do peróxido hidrogênio (lignina peroxidases – E.C. 1.11.1.14 e manganês peroxidases – E.C. 1.11.1.13) e a que não depende

(lacases – E.C. 1.10.3.2) (GALL et al., 2017; YINGHUI; YUANTING; HOSMANE, 2013).

A lignina peroxidase (LiP) foi a primeira enzima identificada como parte do sistema ligninolítico em fungos basidiomicetos. É uma glicoproteína que tem sua atividade catalítica dependente do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O peróxido de hidrogênio necessário à atividade da LiP pode ser oriundo de diferentes vias bioquímicas, expressas diferencialmente de acordo com fatores nutricionais e condições de crescimento do microrganismo (ARANTES et al., 2011; ODEGA; PETRI, 2010).

Essa glicoproteína, tem a capacidade de abstrair elétrons de estruturas aromáticas não fenólicas, dando origem a radicais catiônicos com alto potencial redox, agindo sobre os anéis aromáticos contidos na estrutura da lignina. Na presença de  $H_2O_2$  os mecanismos de degradação da lignina que a LiP promove são variados e ocorrem simultaneamente, sendo alguns deles: clivagem oxidativa da ligação C-C na cadeia principal, oxidação e hidroxilação de grupos metileno benzílicos, oxidação de fenóis e álcoois benzílicos.

A LiP também tem a capacidade de oxidar substratos não fenólicos, através da produção de radicais catiônicos arílicos, os quais promovem clivagem de ligações C-C, hidroxilações, desmetilações e abertura de anéis aromático (AGUIAR; FERRAZ, 2011a; ARANTES et al., 2011).

As lacases (Lac) são enzimas difundidas pela natureza, podem ser produzidas por fungos, bactérias e plantas, já foram reportadas envolvidas como agentes de polimerizações, desmetilações, oxidações e despolimerizações de compostos fenólicos, agindo como a enzima inicial da clivagem de cadeias laterais e anéis aromáticos das porções fenólicas da lignina (AGUIAR; FERRAZ, 2011b).

Classificadas como glicoproteínas, contém cobre em seu sítio ativo, esse qual tem a capacidade de abstrair um elétron de fenóis pela redução de  $Cu^{+2}$  a  $Cu^{+1}$ , catalisando a redução de  $O_2$  para  $H_2O$ , sem a necessidade de  $H_2O_2$  (AGUIAR; FERRAZ, 2011a; ARANTES et al., 2011).

Em relação à produção de Lac, tem-se que vários estudos mostram que a composição do meio de cultura e o modo de cultivo (fermentação submersa ou em estado sólido), bem como condição de cultivo (estático e agitação), produzem

diferentes padrões de isoenzimas de lacase, as quais apresentaram capacidade de oxidar diferentes substratos, inclusive em diferentes pHs (BALDRIAN, 2006; MELO et al., 2015).

Já, as enzimas manganês peroxidase (MnP) são classificadas como hemiperoxidase, com elevada especificidade pelo íon manganês ( $Mn^{2+}$ ) como substrato redutor. São produzidas simultaneamente com a LiP, durante o metabolismo secundário dos fungos e é regulada pelas concentrações de nitrogênio e carbono no meio de cultura, também dependentes de  $H_2O_2$  para sua atividade oxidativa, em que a partir da redução de  $Mn^{3+}$  a  $Mn^{2+}$ , o que por sua vez oxidam um grande número de substratos fenólicos (HOFRITER, 2002).

No complexo enzimático fúngico, ácidos orgânicos (oxalato, malonato, malato, lactato e tartarato) são produzidos e promovem a quelação dos íons  $Mn^{2+}$  gerados durante o ciclo catalítico da MnP, atuando como poderosos mediadores de transferência de carga difusíveis, permitindo a oxidação de vários substratos fenólicos (constituente majoritário da lignina) (AGUIAR; FERRAZ, 2011a; CARVALHO et al., 2009; MARTÍNEZ et al., 2005).

### 3.9 PRINCIPAIS CONCLUSÕES DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A gama de microrganismos capazes de promover a biodegradação da biomassa lignocelulósica é grande, mas nem todos foram isolados e testados, assim devido a abundância de indivíduos que ainda não foram estudados, esse tema é pertinente frente as diferentes implementações biotecnológicas em que eles podem ser empregados.

Avaliar as propriedades mecânicas da madeira mostra-se como uma abordagem de baixo custo e rápida para inferir a respeito da ação degradativa, que as linhagens fúngicas que serão empregadas para desenvolver esse trabalho, podem promover a biomassa lignocelulósica.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção são apresentadas as informações referente aos matérias e métodos utilizados nesta pesquisa. Os ensaios foram executados nos seguintes laboratórios: Laboratório de Microbiologia Ambiental, vinculada ao Departamento de Ciência Biológicas; Laboratório de Microbiologia Clínica, vinculada ao Departamento de Análise Clínicas e Toxicológicas; Laboratório de Ensaios Mecânicos, vinculado ao Departamento de Engenharia de Materiais e Mestrado em Engenharia e Ciências de Materiais. Todos localizados na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), campus Uvaranas.

### 4.1 MATERIAIS

Para a realização deste trabalho de pesquisa os materiais utilizados foram divididos em 2 grupos: materiais de origem biológica e materiais analíticos. Os materiais de origem biológica compuseram: linhagens fúngicas, complexo enzimático, biomassa lignocelulósica (madeira de *Pinus* sp.) e reagentes específicos que estarão descritos juntamente com os procedimentos.

Já os materiais analíticos compõem a gama de reagentes utilizados na manutenção das linhagens fúngicas, produção do complexo enzimático, quantificação das atividades enzimáticas e processo de fermentação submersa (FSm). Os reagentes serão de grau analítico e estarão especificados juntamente com o procedimento.

#### 4.1.1 Biomassa Lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica que foi utilizada como substrato para produção de complexo enzimático (FSm) foi a madeira de *Pinus* sp., utilizada na forma de pó com gramatura de 80 mesh, a qual foi fornecida pela empresa Pinho Pó (Ponta Grossa – PR, Brasil).

A madeira utilizada para no ensaio de resistência dos corpos-de-prova de foram confeccionados a partir de ripas de madeira de *Pinus* sp., não tratadas, cortadas



na direção axial (sentido de crescimento das fibras) e fornecidas pela empresa Montenegro Industria, Comércio e Transporte de Madeira Ltda. (Ponta Grossa – PR, Brasil).

O lote utilizado era composto por 250 ripas, dessas foram selecionadas aleatoriamente 36 unidades, quantidade estimada de acordo com o número mínimo de amostras determinadas pela norma NBR 7190:1997 para confecção de todos os corpos-de-prova. As ripas tinham dimensões de aproximadamente 50x50x2500mm e estavam acondicionadas ao ar livre com cobertura.

#### 4.1.2 Fungos

Para a execução deste trabalho de pesquisa, foram utilizadas 23 linhagens fúngicas, sendo que 10 delas são do gênero *Mucor* sp provenientes da bioprospecção feita pelo autor do presente trabalho na fumaça do Passo do Pupo 1, localizada no Parque Nacional dos Campos Gerais – Ponta grossa.

As demais foram fornecidas por alunos de Engenharia Química da UTFPR-PG. Em que 10 linhagens foram isoladas, por Mayra Scheffer, em um depósito de resíduos de madeira e 3 linhagens foram isoladas, por João Eduardo Levandoski, em troncos remanescentes do corte de uma floresta plantada de *Pinus* sp., ambos isolamentos procedidos dentro da propriedade da madeireira do grupo Águia Florestal (Itaiacoca – PR, Brasil).

Todas as linhagens utilizadas encontram-se depositados na Coleção de Microrganismos de Interesse Industrial e Biotecnológico (CMIB) localizada na UTFPR-PG. A Figura 12 destaca os locais de isolamento das linhagens fúngicas utilizadas na pesquisa.

Figura 12 – Imagem aérea da região de Ponta Grossa – Paraná, com destaque Rodovia do Talco na PR-513 que liga Ponta Grossa a Itaiacoca, além dos locais de coleta das amostras fúngicas (Furna do Passo do Pupo 1 e Águia Florestal).



Fonte: O autor.

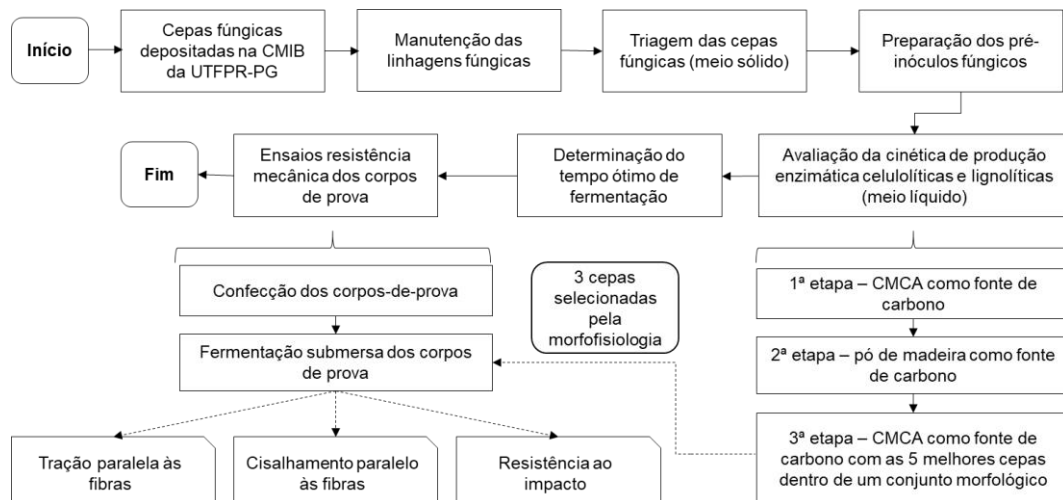
As 10 linhagens fúngicas isoladas pelo autor do presente trabalho foram identificadas em parceria com o programa de pós-graduação em Biotecnologia da UTFPR-PG através de ferramentas moleculares baseadas no sequenciamento da região *Internal Transcribed Spacer (ITS)* do *Ribosomal DNA (rDNA)*.

Posteriormente procedeu-se a análise comparativa das sequências obtidas com a base de dados do *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* por meio da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* com sequências de referência.

## 4.2 MÉTODOS

Os métodos utilizados para a execução desta pesquisa seguiram o fluxo de atividades apresentada no diagrama de blocos a baixo, designado como Figura 13. O diagrama apresenta uma visão global das etapas desenvolvidas.

Figura 13 – Diagrama de blocos simplificado com as etapas de procedimentos executados na realização desta pesquisa.



Fonte: O autor.

#### 4.2.1 Manutenção das Linhagens Fúngicas

O cultivo das linhagens fúngicas procedeu a partir do repique das 23 linhagens fúngicas, depositadas na CMIB da UTFPR-PG, acondicionadas em , para placas de Petri contendo o meio de cultura sólido, autoclavados a 120°C por 20 minutos e postos a resfriamento até temperatura ambiente, composto pela solução de Manachini ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,0 g.L<sup>-1</sup>;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1,0 g.L<sup>-1</sup>;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g.L<sup>-1</sup>;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,9 g.L<sup>-1</sup>; ágar, 18,0 g.L<sup>-1</sup>; extrato de levedura, 1,0 g.L<sup>-1</sup>), com o pH corrigido para 5,0, suplementada com 5,0 g.L<sup>-1</sup> de carboximetilcelulose (CMC) como fonte de carbono (SOUZA; OLIVEIRA; ANDRADE, 2008; TEIXEIRA et al., 2011).

Todos os procedimentos foram efetuados com auxílio de alça de platina em câmara de fluxo laminar e as placas ficaram incubadas em estufa com ausência de luz por 7 dias a 28°C. Novos repiques foram feitos para manutenção das linhagens.

#### 4.2.2 Triagem das Linhagens Fúngicas

Aos 23 microrganismos disponíveis para a execução desta pesquisa, inicialmente fez-se a triagem, em meio sólido, frente a produção de enzimas celulolíticas e lignolíticas. As linhagens foram analisadas visualmente e de acordo com as características apresentadas, as linhagens foram classificadas em: positivo, negativo ou duvidoso. Aos indivíduos que foram classificados como “positivo” para os dois

ensaios, fez-se uma segunda triagem com objetivo de agrupar os indivíduos que apresentassem características morfológicas semelhantes.

#### 4.2.3 Avaliação Qualitativa da Atividade Enzimática Celulolíticas (Meio Sólido)

Os microrganismos utilizados foram submetidos a uma primeira triagem em meio sólido para a avaliação da produção qualitativa de enzimas celulolíticas utilizando a metodologia descrita por Teixeira et al. (2011), a partir da inoculação, em duplicata, dos indivíduos em meio de cultura composto pela solução de Manachini, com o pH corrigido para 5,0, suplementada com 5,0 g.L<sup>-1</sup> de CMC, em placas autoclavadas a 120°C por 20 minutos e postas a resfriar até temperatura ambiente.

As placas foram incubadas à temperatura de 28°C por 24 horas. Após este período, foram reveladas com Vermelho do Congo 0,1% (p/v), deixadas em repouso por 20 minutos, com posterior lavagem com solução de NaCl 1M. A produção das enzimas foi observada pela formação dos halos enzimáticos translúcidos no meio.

#### 4.2.4 Avaliação Qualitativa da Atividade Enzimática Ligninolíticas (Meio Sólido)

A segunda triagem feita, foi com intuito de avaliar a produção qualitativa de enzimas lignolíticas utilizando a metodologia descrita Krugner e Castro (1984), com base na inoculação, em duplicata, dos indivíduos em meio extrato de malte-ácido (extrato de malte, 15,0 g.L<sup>-1</sup>; ácido tânico, 5,0 g.L<sup>-1</sup>; ágar, 20,0 g.L<sup>-1</sup>), em placas autoclavadas a 120°C por 20 minutos e postos a resfriar até temperatura ambiente.

As placas foram incubadas à temperatura de 28 °C por 48 horas. Assim, após esse período, baseado no teste de Bavendamm de oxidação do ácido tânico, procedeu-se com a avaliação da formação de um halo marrom, considerado como reação positiva para produção de oxidases (NOBLES, 1958).

#### 4.2.5 Preparação dos Pré-inóculos Fúngicos

Os microrganismos selecionados no item 4.2.2.3 foram cultivados em frascos Erlenmeyer de 250 mL com aproximadamente 180 mL da solução basal composta pela adaptação do meio de cultura de Manachini (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,0 g.L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O,

0,05 g.L<sup>-1</sup>; CaCl<sub>2</sub>, 0,01 g.L<sup>-1</sup>; extrato de levedura, 1,0 g.L<sup>-1</sup>), com o pH corrigido a 5,0, previamente autoclavados a 120°C por 20 minutos e postos a resfriar até temperatura ambiente.

Em cada frasco, foram adicionados separadamente 3 pedaços quadrados do meio de cultura proveniente de repique (item 4.2.1) com dimensões de aproximadamente 10x10mm. Os ensaios procederam com os frascos fechados com tampões de algodão com objetivo de garantir trocas gasosas sem contaminação externa de outros microrganismos. A incubação procedeu em shaker sob agitação de 120 rpm a 28°C por 72 horas.

Com objetivo de padronizar a biomassa fúngica nos processos de FSm, o procedimento de produção do pré-inóculo foi tomada como padrão antecessora das etapas, que serão descritas: avaliação da cinética de produção enzimática (celulolíticas e lignolíticas), determinação do tempo ótimo de fermentação frente a produção de enzimas celulolíticas e fermentação submersa dos corpos-de-prova de madeira de *Pinus* sp.

#### 4.2.6 Avaliação da Cinética de Produção Enzimática Celulolíticas e Lignolíticas (Meio Líquido)

Avaliação da cinética de produção enzimática (celulolíticas e lignolíticas) foi desenvolvida em 3 etapas. Sendo que a 1ª etapa foi efetuada com as linhagens selecionadas no item 4.2.2.3, utilizando-se da solução basal composta pela adaptação do meio de cultura de Manachini (descrita no item 4.2.3), com o pH corrigido a 5,0, utilizando-se de CMC, 0,5 g.L<sup>-1</sup>, como fonte de carbono.

Na segunda etapa os mesmos microrganismos foram testados utilizando, também com a solução basal composta pela adaptação do meio de cultura de Manachini da 1ª etapa, mas suplementada com pó de madeira de *Pinus* sp., 0,5 g.L<sup>-1</sup>, como fonte de carbono.

Por fim, a 3ª etapa foi desenvolvida com 5 linhagens, as quais foram selecionadas pelas características morfológicas e com melhores desempenho na produção de enzimas celulolíticas nas 1ª e 2ª etapas. O meio de cultura utilizado foi o mesmo da etapa 1, utilizando-se de CMC, 0,5 g.L<sup>-1</sup>, como fonte de carbono.

Todas as etapas que serão descritas a seguir compartilharam da mesma metodologia de produção do complexo enzimático bruto, que consistiu em cultivar dos microrganismos por meio de fermentação submersa (FSm) em frascos Erlenmeyers contendo 150 ml da solução basal, em duplicata (SOUZA; OLIVEIRA; ANDRADE, 2008).

Após a desinfecção dos frascos em autoclave a 120°C por 20 minutos e posto a resfriamento até temperatura ambiente. A inoculação se deu por meio do pré-inóculo na proporção de 1:50 (v/v), com posterior incubação em shaker sob agitação de 120 rpm a 28°C.

Todos os procedimentos que são descritos, em que houve a manipulação dos microrganismos foram executados dentro de capela de fluxo laminar, previamente desinfetada com álcool 70% e postas a secar sobre incidência de luz ultravioleta por 15 minutos.

#### 4.2.6.1 Avaliação da cinética de produção enzimática (1ª etapa)

A 1ª etapa de avaliação da cinética de produção enzimática procedeu sobre as linhagens selecionadas (tal como descrito no item 4.2.2) durante 30 dias, em duplicata. Durante os 7 primeiros dias o processo fermentativo se deu sobre agitação, em *shaker* sob agitação de 120 rpm a 28°C. Sendo que, a partir da inoculação, a cada 48 horas foram coletados 10 mL em tubos de 25 mL de polipropileno (fabricante *Nalgene*).

Imediatamente após as coletas que ocorreram durante todo o período de fermentação, o material foi submetido a centrifugação a 15.000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi considerado o produto de interesse do processo de centrifugação e utilizado como complexo enzimático bruto (MENEZES; BARRETO, 2015). Esse foi então encaminhando para determinação das atividades enzimáticas celulolíticas (Endo-1,4- $\beta$ -D-glicanase e Exo-1,4- $\beta$ -D-glicanase) e lignolíticas (Lacase, Manganês Peroxidase e Lignina Peroxidase).

Os volumes restantes dos primeiros 7 dias foram transferidos para uma estufa e permaneceram incubados a 28°C por 23 dias sem agitação e na ausência de luz. No final desse período 10 mL foram coletados e encaminhando para determinação

das atividades enzimáticas celulolíticas (Endo-1,4- $\beta$ -D-glicanase e Exo-1,4- $\beta$ -D-glicanase) e lignolíticas (Lacase, Manganês Peroxidase e Lignina Peroxidase). O restante do material foi armazenado em tubos falcon de 25 mL e posto em refrigerador a -15°C.

#### 4.2.6.2 Avaliação da cinética de produção enzimática (2ª etapa)

A 2ª etapa de avaliação da cinética de produção enzimática procedeu sobre as linhagens selecionadas (item 4.2.2) durante 7 dias sobre agitação, em duplicata, tal nas condições descritas no item 4.2.4.1. Sendo que, a partir da inoculação, a cada 48 horas foram coletada 10 mL em tubos de 25 mL de polipropileno (fabricante *Nalgene*).

Tal como descrito no item anterior, imediatamente após as coletas, as amostras foram centrifugadas e encaminhadas ao para determinação das atividades enzimáticas celulolíticas (Endo-1,4- $\beta$ -D-glicanase e Exo-1,4- $\beta$ -D-glicanase) e lignolíticas (Lacase, Manganês Peroxidase e Lignina Peroxidase).

#### 4.2.6.3 Avaliação da cinética de produção de celulasas e determinação de proteínas totais (3ª etapa)

Tal como descrito no item 4.2.4, 5 linhagens selecionadas para a 3ª etapa de avaliação da cinética de produção enzimática foram fermentadas por 42 dias sobre agitação, em triplicata, sendo que, a partir da inoculação, a cada 6 dias foram coletada 10 mL em tubos de 25 mL de polipropileno (fabricante *Nalgene*). E como descrito no item 4.2.4.1, imediatamente após as coletas, as amostras foram centrifugadas e encaminhadas ao para determinação das atividades enzimáticas celulolíticas (Endo-1,4- $\beta$ -D-glicanase e Exo-1,4- $\beta$ -D-glicanase) e determinação de proteínas totais pelo método de Bradford.

#### 4.2.7 Determinação da Atividade de Enzimas Celulolíticas

A seguir serão apresentados os ensaios utilizados para determinação das atividades enzimáticas celulolíticas Endo-1,4- $\beta$ -D-glicanase e Exo-1,4- $\beta$ -D-glicanase.

#### 4.2.7.1 Atividade da enzima Exo-1,4- $\beta$ -D-glicanase

A determinação da atividade enzima celulolítica Exo-1,4- $\beta$ -D-glicanase segundo o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) em papel de filtro e expressa em unidades de filtro de papel (FPU – *Filter Paper Units*) por volume de enzima original, como recomendado pela IUPAC (GHOSE, 1987). Uma unidade de atividade em papel de filtro (FPU) corresponde a 1 mol de açúcares redutores, expresso como glicose, liberados por minuto ( $\text{moles produto} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{unidade de volume}^{-1}$ ).

Para tanto, o procedimento efetuado seguiu de acordo com as sugestões metodológicas de Vasconcelos, Pinto e Aragão (2013) as alterações no procedimento buscando utilizar de menores volumes de reagentes, o que implica menor geração de resíduos.

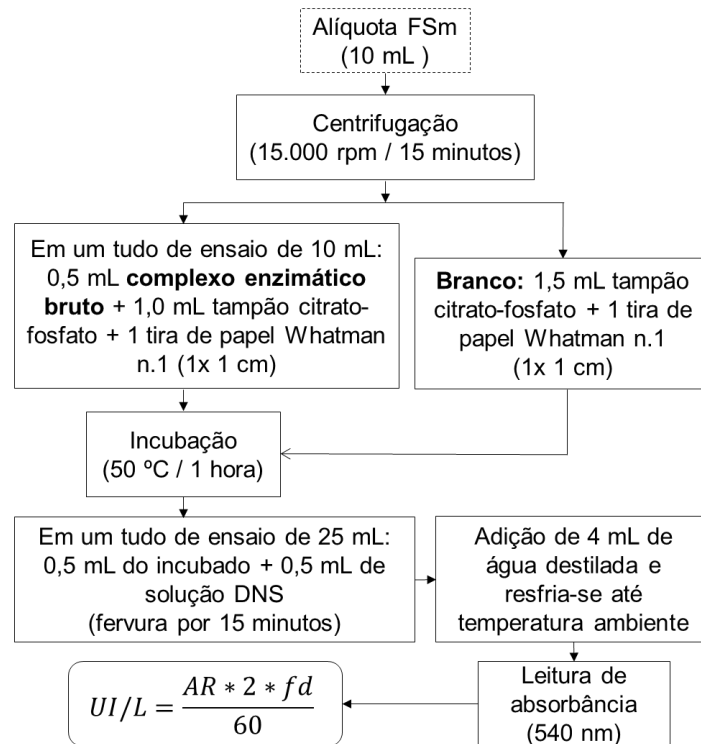
Assim, utilizou-se de tubos de ensaio de 10 mL, em que se utiliza 0,5 mL do complexo enzimático bruto e 1,0 mL do tampão citrato-fosfato e uma tira de papel Whatman n.1 (10x10mm), feito em duplicata. O branco utilizado trata-se de mistura de 1,5 mL de tampão citrato-fosfato e uma tira de papel Whatman n.1, com a mesma dimensão dos demais tubos.

Aos sistemas preparados, fez-se a incubação à 50 °C por 1 hora. Em paralelo, em tubos de ensaio de 25 mL adicionou 0,5 mL da solução ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) ( $\text{NaOH}$ , 160,0 g.L<sup>-1</sup>;  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 300 g.L<sup>-1</sup>; DNS, 50 g.L<sup>-1</sup>). Após o término da incubação, 0,5 mL da solução foi adicionado ao tubo com DNS e postos a ferver por 15 minutos. Por fim adiciona-se 4 mL de água destilada, resfriando a temperatura ambiente.

A determinação da absorbância é medida em espectrofotômetro contra espectro zero a 540 nm. As etapas para a determinação da atividade da enzima Exo-1,4- $\beta$ -D-glicanase é apresentada na Figura 14. A determinação da concentração de glicose liberada é feita a partir da curva-padrão de glicose com concentração de 0,1 a 1,0 g/L, feita anteriormente ao procedimento descrito.



Figura 14 – Diagrama de blocos das etapas de determinação da atividade da enzima Exo-1,4-β-D-glicanase.



Fonte: O autor.

Assim, de posse da equação 1 pode-se mensurar a quantidade de celulose convertida devido a atividade enzimática de conversão de celulose em glicose e outros produtos intermediários, tais como celobiose e oligossacarídeos, essa expressa na unidade internacional UI/L.min (μmoles produto.min<sup>-1</sup>.L<sup>-1</sup>) (SPEROTTO, 2014).

$$UI/L = \frac{AR * 2 * fd}{60} \quad (1)$$

Onde AR é concentração de açúcares redutores (glicose) na amostra em mmol/mL, determinada através da curva de calibração de glicose e fd é o fator de diluição.

#### 4.2.7.2 Atividade da enzima Endo-1,4-β-D-glicanase

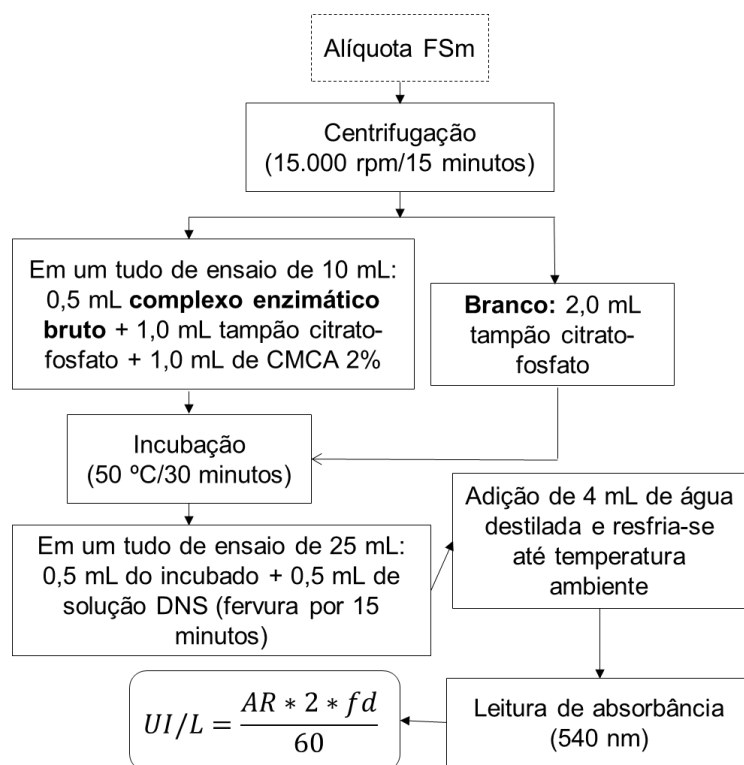
A determinação da atividade enzima celulolítica Endo-1,4-β-D-glicanase segundo o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) com o substrato CMC de acordo

com a metodologia de Miller (1959). Para tanto, o procedimento efetuado seguiu, tal como descrito no item anterior as sugestões metodológicas de Vasconcelos, Pinto e Aragão (2013).

Para o experimento utilizou-se de tubos de ensaio de 10 mL com 0,5 mL do complexo enzimático bruto, 1,0 mL do tampão citrato-fosfato e 0,5 mL de CMC 2%, feito em duplicata. O branco utilizado, trata-se de mistura de 2,0 mL do tampão citrato-fosfato (MAKHUVELE et al., 2017). Aos sistemas preparados, fez-se a incubação à 50°C por 30 minutos. Em paralelo, em tubos de ensaio de 25 mL adicionou 0,5 mL da solução ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (NaOH, 160,0 g.L<sup>-1</sup>; KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·4H<sub>2</sub>O, 300 g.L<sup>-1</sup>; DNS, 50 g.L<sup>-1</sup>).

Após termino da incubação, 0,5 mL da solução foi adicionado ao tubo com DNS e postos a ferver por 15 minutos. Por fim adiciona-se 4 mL de água destilada, resfriando a temperatura ambiente. A determinação da absorbância é medida em espectrofotômetro contra espectro zero a 540 nm. As etapas para a determinação da atividade da enzima Endo-1,4-β-D-glicanase é apresentada na Figura 15.

Figura 15 – Diagrama de blocos das etapas de determinação da atividade da enzima Endo-1,4-β-D-glicanase.



Fonte: O autor.

A determinação da concentração de glicose procedeu da mesma forma como descrito no item anterior, utilizando-se da curva de calibração de glicose (Figura 16) e determinando a atividade pela equação 1 expressa unidade internacional UI/L.min ( $\mu\text{moles produto} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ ) (SPEROTTO, 2014).

#### 4.2.8 Determinação da Atividade de Enzimas Ligninolíticas

Dentre a gama de enzimas que compõem o complexo enzimático bruto as ligninolíticas que tiveram sua atividade específica determinadas são: lignina peroxidase (LiP – E.C. 1.11.1.14), manganês peroxidase (MnP – E.C. 1.11.1.13), e lacase (Lac – E.C. 1.10.3.2).

##### 4.2.8.1 Lacase (Lac)

A determinação da atividade da Lacase (Lac) foi determinada segundo o protocolo de Szklarz et al. (1989). Utilizando-se de dois tubos de ensaio 15 mL com 0,6 mL do complexo enzimático bruto e 0,3 mL do tampão citrato-fosfato, feito em duplicata. Um desses tubos foi posto em fervura por 10 minutos (controle branco) e resfriado a temperatura ambiente.

Aos dois tubos, em temperatura ambiente, adicionou 0,1 mL da solução de Siringadazine (0,05 g siringadazine em 50 mL de etanol), tomando essa ação como tempo zero, fez-se a medição da absorbância em espectrofotômetro. Após 10 minutos, nova medição da absorbância foi feita, sendo as duas medidas feitas contra espectro zero a 525 nm ( $\epsilon_{525\text{nm}} = 65000 \text{ L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

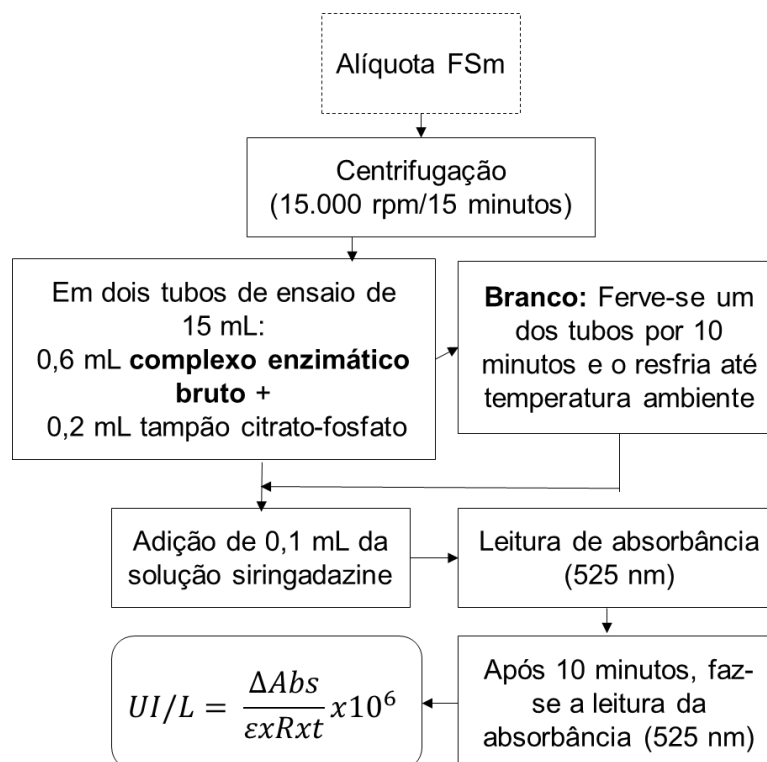
De posse dos valores de absorbância, pode-se calcular a atividade enzimática expressa na unidade internacional UI/L.min ( $\mu\text{moles produto} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ ), pela equação 2, abaixo:

$$UI/L = \frac{\Delta Abs}{\epsilon x R x t} \times 10^6 \quad (2)$$

Onde  $\Delta Abs$  é absorbância final - absorbância inicial;  $\epsilon$  é o coeficiente de absorção molar; R é a quantidade de complexo enzimático em litros; e t é o tempo de

reação (minutos). As etapas para a determinação da atividade da Lacase são apresentadas na Figura 16.

Figura 16 – Diagrama de blocos das etapas de determinação da atividade da enzima Lacase.



Fonte: O autor.

#### 4.2.8.2 Lignina peroxidase (LiP)

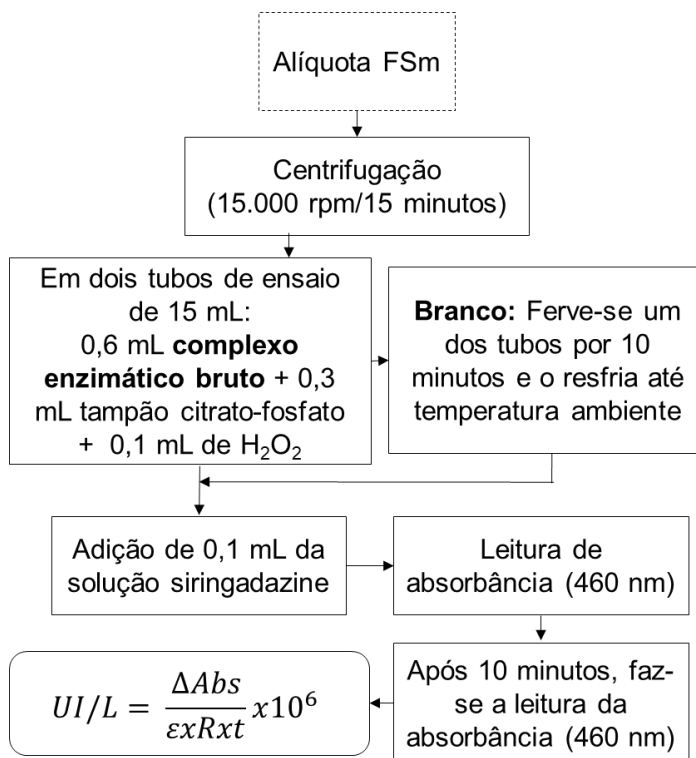
A determinação da atividade da Lignina Peroxidase (LiP) foi determinada segundo o protocolo de Archibald (1992). Utilizando-se de dois tubos de ensaio 15 mL com 0,6 mL do complexo enzimático bruto, 0,2 mL do tampão citrato-fosfato e 0,1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, feito em duplicata. Um desses tubos foi posto em fervura por 10 minutos (controle branco) e resfriado a temperatura ambiente.

Aos dois tubos, em temperatura ambiente, adicionou-se 0,1 mL da solução de Siringadazine descrita no item anterior, tomando essa ação como tempo zero, fez-se a medição da absorbância em espectrofotômetro. Após 10 minutos, nova medição da absorbância foi feita, sendo as duas medidas feitas contra espectro zero a 460 nm ( $\epsilon_{460nm} = 29400 \text{ L.M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ).

De posse dos valores de absorbância, pode-se calcular a atividade enzimática utilizando a equação 2, expressa na unidade internacional UI/L.min<sup>-1</sup> (µmoles

produto.min<sup>-1</sup>.L<sup>-1</sup>) tal como no item anterior. As etapas para a determinação da atividade de Lignina peroxidase são apresentadas na Figura 17.

Figura 17 – Diagrama de blocos das etapas de determinação da atividade da enzima Lignina peroxidase.



Fonte: O autor.

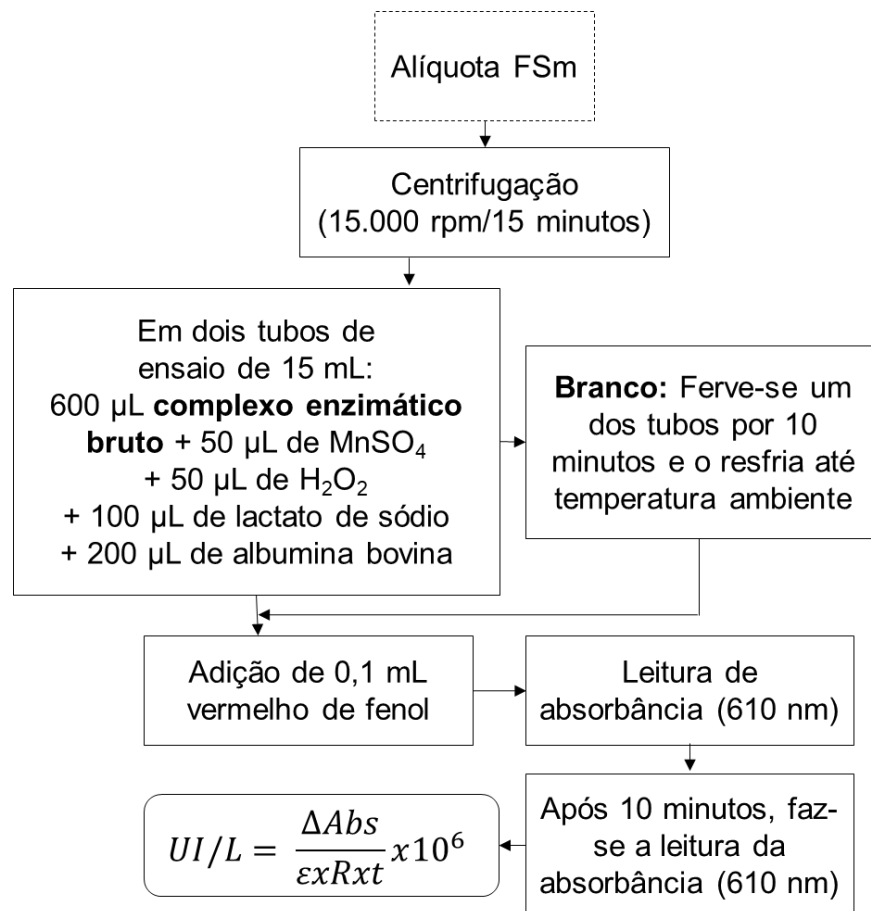
#### 4.2.8.3 Manganês peroxidase (MnP)

A determinação da atividade da Manganês Peroxidase (MnP) foi determinada segundo o protocolo de Kuwahara et al. (1984). Utilizando-se de dois tubos de ensaio de 15 mL com 600 µL do complexo enzimático bruto, 50 µL de MnSO<sub>4</sub>, 50 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão succinato, 100 µL de lactato de sódio e 200 µL de albumina bovina, feito em duplicata. Um desses tubos foi posto em fervura por 10 minutos (controle branco) e resfriado a temperatura ambiente.

Aos dois tubos, em temperatura ambiente, adicionou 0,1 mL de vermelho fenol, tomando essa ação como tempo zero, fez-se a medição da absorbância em espectrofotômetro. Após 10 minutos, nova medição da absorbância foi feita após adição de 40 µL de NaOH para parar a reação, sendo as duas medidas feitas contra espectro zero a 610 nm ( $\epsilon_{610nm} = 44600 \text{ L.M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ).

De posse dos valores de absorbância, pode-se calcular a atividade enzimática utilizando a equação 2, expressa na unidade internacional  $UI/L \cdot min^{-1}$  ( $\mu moles \cdot produto \cdot min^{-1} \cdot mL^{-1}$ ) tal como no item anterior. As etapas para a determinação da atividade de Manganês peroxidase são apresentadas na Figura 19.

Figura 18 – Diagrama de blocos das etapas de determinação da atividade da enzima Manganês peroxidase.



Fonte: O autor.

#### 4.2.9 Quantificação de Proteínas Totais

Para a determinação de proteínas totais foi utilizado o método de Bradford (BRADFORD, 1976). Para tanto, alíquotas de 200 µL dos extratos enzimáticos foram incubadas com o reagente de Bradford (Sigma) em triplicata e após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente, realizou-se leituras espectrofotométricas a 595 nm. Como padrão utilizou-se a albumina sérica bovina (BSA) (Chem-Inpex).

#### 4.2.10 Determinação do Tempo Ótimo de Fermentação

Com a determinação das atividades enzimáticas celulósicas Endo-1,4- $\beta$ -D-glicanase e Exo-1,4- $\beta$ -D-glicanase provenientes da 3ª etapa, foi avaliado a cinética de produção enzimática e assim determinado o tempo ótimo de fermentação, no caso, tempo de fermentação em que se obteve os maiores índices enzimáticos de enzimas do complexo celulolítico, correlacionada pelo teor de açúcar redutores (AR) na solução, tal como descrito no item 4.2.7 (BELO; SOUZA, 2016).

#### 4.2.11 Fermentação Submersa dos Corpos-de-prova

Para a avaliação da degradação da madeira, optou-se em utilizar os fungos M10, A1 e J13 devido a diferença morfológica apresentada por esses indivíduos, em conjunto com os resultados obtidos na 3ª etapa do ensaio de avaliação da cinética de produção enzimática celulolíticas (item 4.2.6.3).

O método utilizado consistiu, basicamente, no crescimento dos microrganismos em meio de cultura líquido composto pela solução basal adaptada de Manachini, em contato com os corpos-de-prova de madeira, sendo assim a única fonte de carbono do meio. Foram mantidas as proporções dos sais utilizados na solução basal e a proporção de 1:50 (v/v) para inoculação, a partir do pré-inoculo (descrito no item 4.2.5).

Os fermentadores utilizados foram recipientes de plástico de 40 L, os quais passaram por uma rigorosa etapa de limpeza com água e sabão neutro líquido, seguida da desinfetados com uma solução de hipoclorito de sódio 20%, feita com o auxílio de um borrifador (PEREIRA et al., 2015). Para secar, os recipientes permaneceram dentro da câmara de fluxo laminar por 30 minutos sobre incidência de luz ultravioleta.

Uma vez feita a etapa de limpeza e desinfecção, ainda dentro da câmara de fluxo laminar, os recipientes foram enxaguados com 2 L de água autoclavadas. Assim, os corpos-de-prova, já autoclavados a 120°C por 20 minutos e colocados a secar em estufa de secagem a 80°C por 3 dias, foram acondicionados nos recipientes. Por fim procedeu com a inoculação e vedação do mesmo. A figura 19 mostra os corpos-de-prova autoclavados e secos, e os recipientes utilizados no processo de fermentação, já vedados.

Figura 19 – (A) Corpos-de-prova de madeira de *Pinus* sp. autoclavados e secos. (B) Recipientes utilizados no processo de fermentação.



Fonte: O autor.

O processo de fermentação procedeu em uma estufa com controle de temperatura (30°C) durante 35 dias. Os conjuntos de corpos-de-prova eram retirados dos fermentadores a cada 5 dias e encaminhados para etapa de preparo do corpo-de-prova para o ensaio de resistência mecânica (descrito no item 4.2.11).

Como controle do processo, dois ensaios foram tomados como brancos: branco da fermentação e o branco da amostra. Para o branco da fermentação, fez-se um ensaio seguindo todas as etapas de confecção e desinfecção dos corpos-de-prova, esses foram “incubados” em água deionizada (previamente autoclavado).

Para evitar a proliferação de microrganismos durante o período de incubação, fez-se o uso de hipoclorito de sódio na proporção de 10% (v/v). Já o branco da amostra trata-se dos corpos-de-prova confeccionados e submetidos aos ensaios de resistência mecânica sem nenhum tipo de tratamento.

#### 4.2.12 Confecção dos Corpos-de-prova

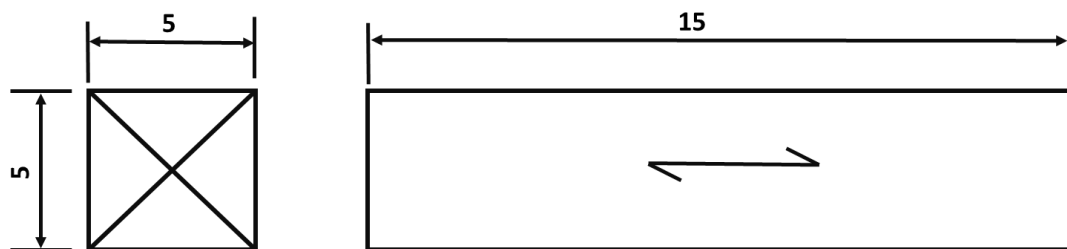
Para cada ensaio, os corpos foram confeccionados de acordo com as indicações das normativas utilizadas como referência, limitações dos equipamentos utilizados e as dimensões da ripa fornecidas pela empresa Montenegro Ltda (especificadas no item 4.1.1).



No ensaio de tração paralela às fibras (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TECNICAS, 1997) os corpos-de-prova foram confeccionados nas dimensões nominais conforme a Figura 20, ao passo que as variações apresentadas entre os corpos de prova confeccionados foram individualmente utilizadas na estimativas feitas para cada parâmetro de resistência avaliado.

Após o ensaio de FSm os mesmos foram cortados com espessura de 10 mm, devido a limitações estruturais do equipamento utilizado para efetuar o ensaio de tração.

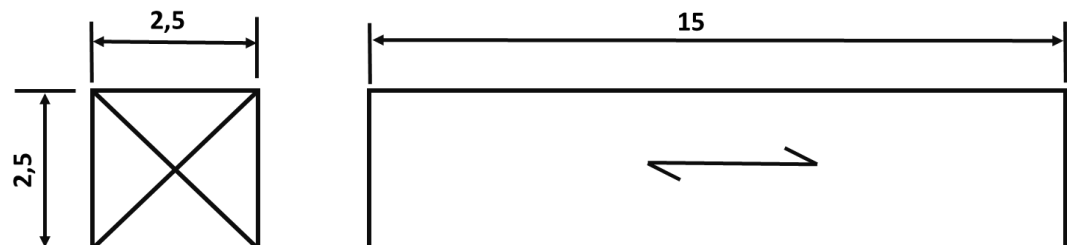
Figura 20 – Dimensões nominais dos corpos-de-prova do ensaio submetidos a FSm (NBR 7190:1997), com dimensões em centímetro.



Fonte: O autor.

Para o ensaio de cisalhamento paralelo às fibras (ASTM ISO 13910:2005), os corpos-de-prova foram dimensionados de acordo com as indicações feitas pela norma americana. As dimensões nominais podem ser observadas na figura 21. As medias utilizadas foram tomadas com objetivo de consumir a menor quantidade de matéria-prima e respeitando as indicações normativas.

Figura 21 – Dimensões nominais dos corpos-de-prova do ensaio de cisalhamento paralelo às fibras (ASTM ISO 13910:2005), com dimensões em centímetro.

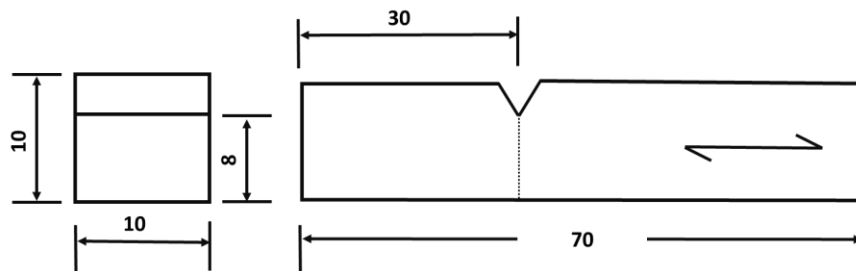


Fonte: O autor.

Por fim, os corpos-de-prova para o ensaio de impacto (ASTM E23 – 07aE1) foram confeccionados a partir da adaptação das dimensões indicadas na norma

americana. Como a madeira trata-se de material fibroso, o entalhe foi confeccionado com auxílio de uma serra circular. Um gabarito foi confeccionado para efetuar os entalhes. As dimensões nominais podem ser observadas na figura 22.

Figura 22 – Dimensões nominais dos corpos-de-prova do ensaio de impacto (ASTM E23 – 07aE1), com dimensões em milímetro.



Fonte: O autor.

Os corpos-de-prova foram confeccionados na marcenaria da UEPG, campus Uvaranas.

#### 4.2.13 Ensaio Resistência Mecânica dos Corpos-de-prova

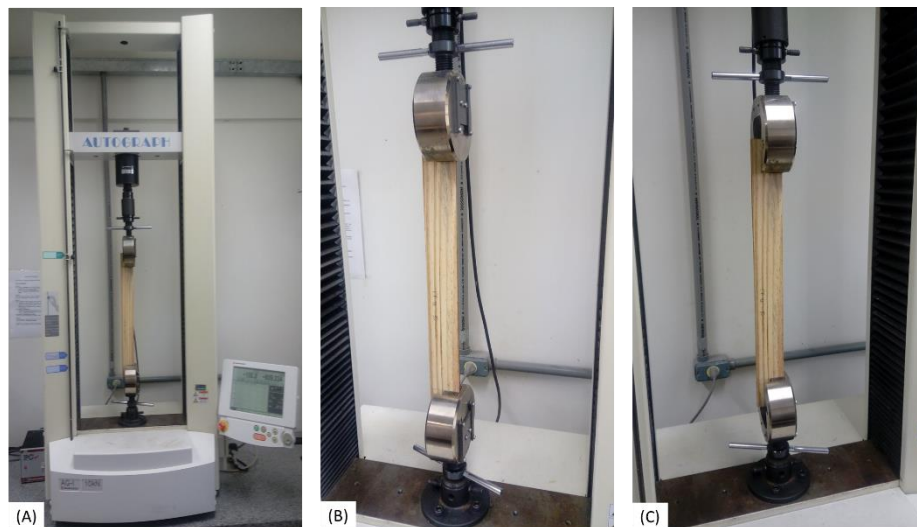
As análises executadas nesse trabalho para avaliação das propriedades mecânicas das estruturas de madeira, submetidas a FSm com as linhagens fúngicas, foram escolhidas em função da característica das ripas de madeira utilizadas (descritas no item 4.1.1), aspectos observados na revisão de literatura e de limitações a respeito dos equipamentos disponíveis para execução dos testes. Assim, as análises escolhidas são: tração paralela às fibras (NBR 7190:1997), cisalhamento paralelo às fibras (ASTM ISO 13910:2005) e resistência ao impacto (ASTM E23 – 07a<sup>E1</sup>). Adaptações foram feitas e serão descritas nos próximos itens.

Com o intuito de não promover a contaminação dos equipamentos utilizados nos ensaios de resistência mecânica, todos os corpos-de-prova que foram submetidos a FSm, foram previamente autoclavados a 120°C por 20min e postos a secar em estufa de secagem a 60°C por 120h. Tempo preestabelecido de acordo com testes para determinação da densidade, em que se buscou manter umidade de aproximadamente 12% para as estruturas ensaiadas de acordo com o Anexo B na NBR 7190:1997.

#### 4.2.13.1 Tração paralela às fibras

Para o ensaio de tração paralela às fibras utilizou-se a máquina de ensaios universal Shimadzu Autograph AGS-X com uma célula de carga de 10KN. O procedimento foi desenvolvido com adaptações as indicações da NBR 7190:1997, uma vez que diferente da normativa, o ensaio foi efetuado com carregamento monotônico de 10 Mpa/min até o rompimento do corpo-de-prova. A conformação do ensaio tal como foi executado pode ser evidenciada na Figura 23.

Figura 23 – (A), (B) e (C) Arranjo dos ensaios de tração paralela na máquina de ensaios universal Shimadzu Autograph AGS-X com uma célula de carga de 10KN.



Fonte: O autor.

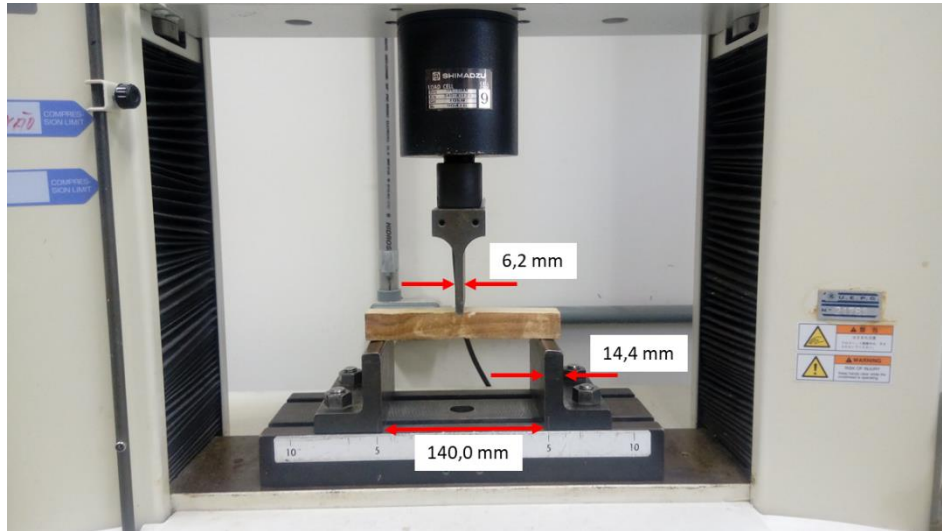
Seguindo a indicação de utilizar no mínimo 8 corpos-de-prova para execução do ensaio, foram utilizados de 12 a 14 unidades dependendo do corte após o ensaio de fermentação, onde as peças com espessura menor que 50 mm foram descartadas.

#### 4.2.13.2 Cisalhamento paralelo às fibras

Para o ensaio de cisalhamento paralela às fibras utilizou-se a máquina de ensaios universal Shimadzu Autograph AGS-X com uma célula de carga de 10KN. O procedimento foi desenvolvido com adaptações a ASTM ISO 13910:2005, pois diferente da normativa americana que faz a indicação para se utilizar um apoio inferior móvel e um fixo, o ensaio foi efetuado em uma disposição com os apoios fixos, tal

como exemplificado na Figura 24. Para a execução do ensaio foram utilizados 8 corpos-de-prova.

Figura 24 – Arranjo do ensaio de cisalhamento paralelo das fibras com destaques nas dimensões padrões fixados para o teste.



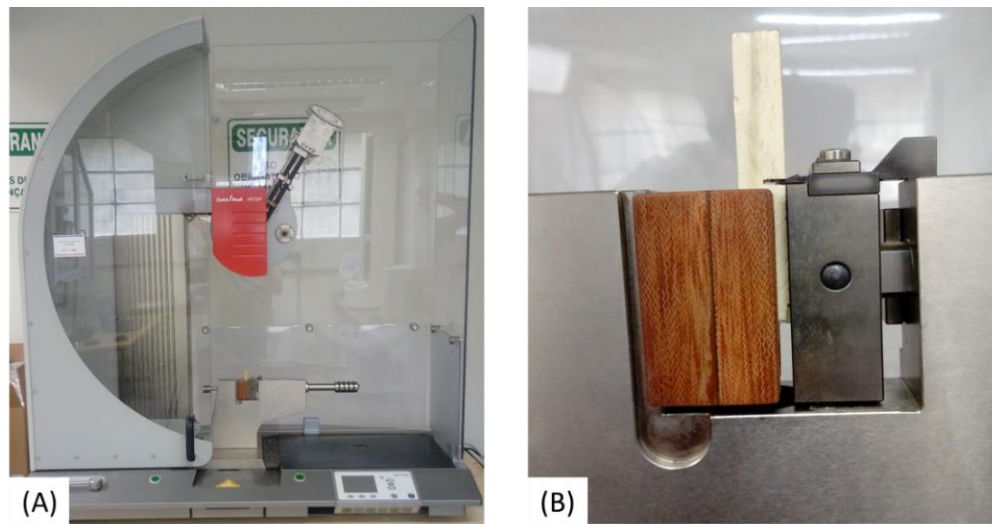
Nota: As medidas indicadas na figura foram utilizadas na execução de todos os ensaios.  
Fonte: O autor.

Para o ensaio com as amostras previamente preparadas, o carregamento foi estimado utilizando-se de 8 corpos-de-prova gêmeos, em que se determinou qual o carregamento que promoveria a destruição da amostra em aproximadamente 1 min, assim, o carregamento estimado foi de 10 mm/seg, o qual foi utilizado em todos os ensaios.

#### 4.2.13.3 Resistência ao impacto

Para o ensaio de resistência a impacto utilizou-se o equipamento de impacto instrumentado Zwick/Roell HIT50P, utilizando-se um martelo de impacto de 5,5 J. O procedimento foi desenvolvido com adaptações a ASTM E23 – 07a<sup>E1</sup>.

Figura 25 – (A) Equipamento de impacto instrumentado Zwick/Roell HIT50P com martelo de impacto de 5,5 J. (B) Arranjo do gabarito confeccionado e corpo-de-prova acondicionado para o ensaio.



Fonte: O autor.

Devido as características dos corpos-de-prova, um novo gabarito foi confeccionado para efetuação do ensaio, o sistema não promoveu modificações ao ensaio e pode ser observado na figura 25. Para a execução do ensaio foram utilizados 8 corpos-de-prova.

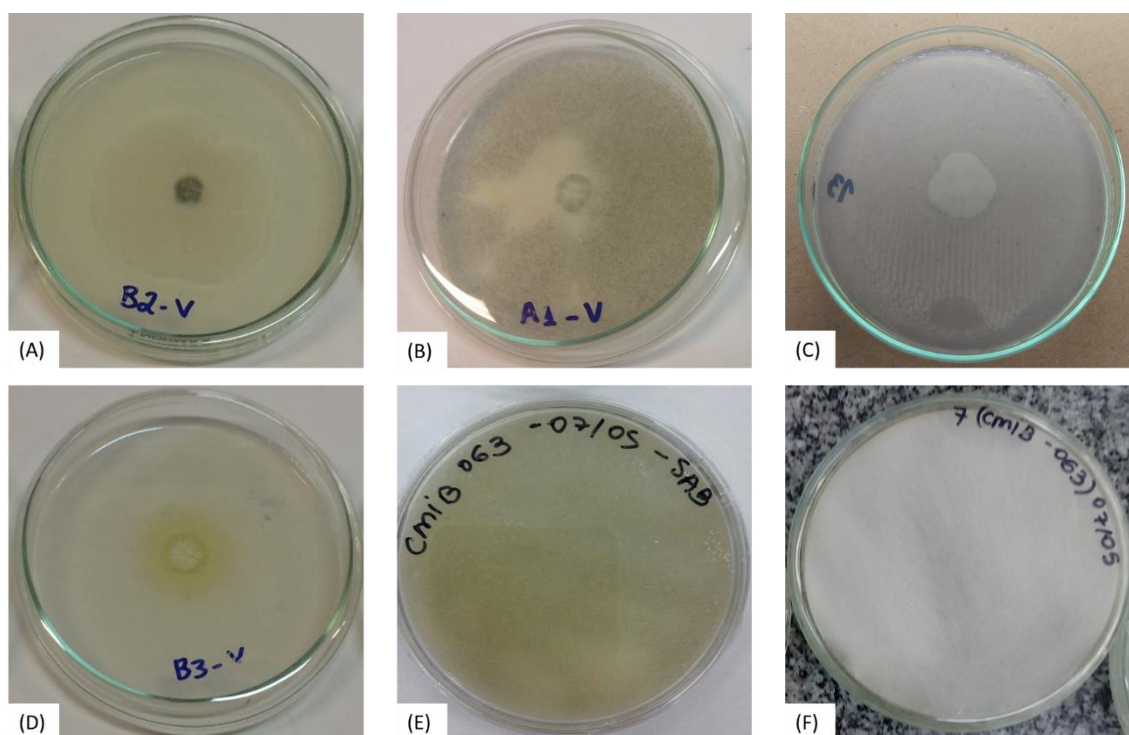
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nessa seção serão apresentados e discutidos os resultados obtidos nas diferentes etapas implementadas na execução desta pesquisa.

### 5.1 TRIAGEM DAS LINHAGENS FÚNGICAS (MEIO SÓLIDO)

Para efetuar a triagem dos microrganismos utilizados neste trabalho, inicialmente fez-se o repique das linhagens depositadas no CMIB da UTFPR-PG. Essas foram fornecidas em placas de Petri com meio de cultura Ágar Saburo e apresentaram crescimento característico normal quando repicadas no meio de cultura composto pela solução de Manachini. A Figura 26 exemplifica as diferentes características de cultura das linhagens utilizadas neste trabalho.

Figura 26 – Exemplo das características de cultura das linhagens utilizadas para execução deste trabalho.



Fonte: O autor.

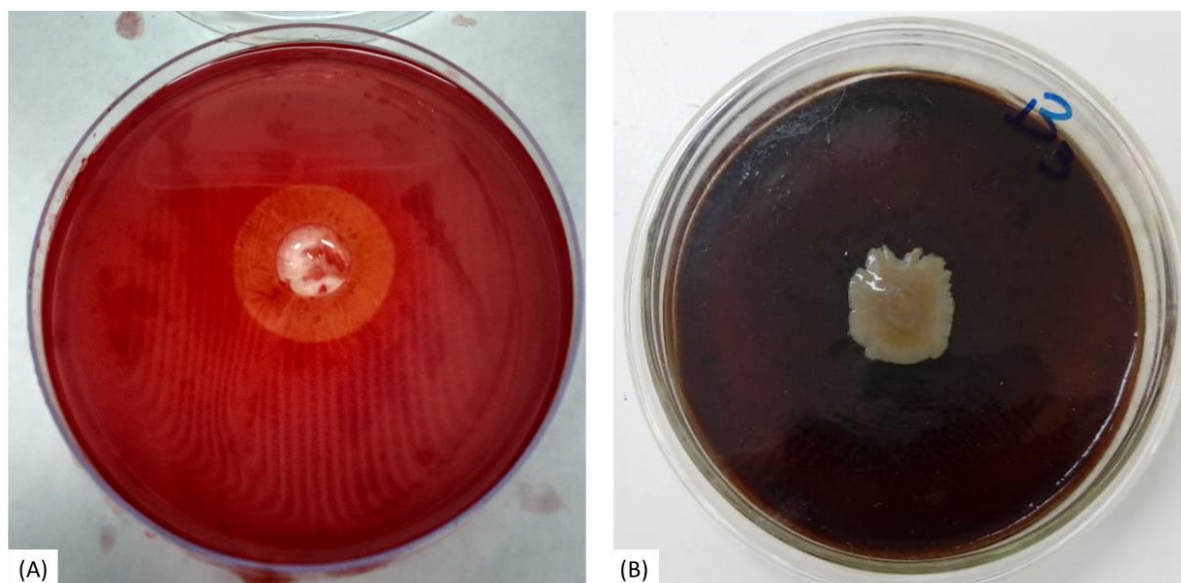
Nota: Somente a quinta (E) e sexta (F) linhagens foram identificadas como gênero *Mucor* sp, as demais (A - D) ainda não foram identificadas, somente isoladas e depositadas no CMIB da UTFPR – PG. As nomenclaturas das placas foram adaptadas convenientemente para a produção deste trabalho e seguiram o ordenamento durante todo os processos descritos.

A primeira etapa de triagem efetuada sobre as 23 linhagens fúngicas consistiu na observação do crescimento dos fungos em placa de Petri contendo substrato composto pela Solução de Manachini, suplementada com CMC como única fonte de carbono.

De acordo com Teather e Wood (1982) ao aplicar o vermelho do congo sobre um substrato celulósico, tem-se o efeito revelado da interação do corante com polissacarídeos que contenham em sua estrutura ligações  $\beta$ -(1-4),(1-3)-D-Glucanas. Assim com a presença de enzimas  $\beta$ -Glucanases, a interação não existe e se faz possível evidenciar os halos translúcidos, que revela o caráter positivo dos microrganismos em produzir enzimas celulolíticas, devido a clivagem dessas ligações.

Já a segunda triagem, também sobre as 23 linhagens fúngicas, procedeu com a observação da formação de halos marrons, como indicador positivo da presença de oxidases, baseado no teste de Bavendamm de oxidação do ácido tânico (NOBLES, 1958). A Figura 27 (A) ilustra a formação do halo translucido das linhagens testadas frente a produção de enzimas celulolíticas e a (B) ilustra a formação do halo marrom das linhagens testadas frente a produção de enzimas ligninolíticas, ambas após 24 horas de inoculação à 28°C.

Figura 27 – (A) Exemplo do halo translucido de hidrólise após a revelação com vermelho do congo, com 24 horas de inoculação. (B) Exemplo do halo marrom da oxidação do ácido tânico após 24 horas de inoculação.



Fonte: O autor.



Os métodos escolhidos para triagem das linhagens fúngicas quanto a produção de enzimas celulolíticas e lignolíticas são usualmente utilizados para estimar qualitativamente o índice enzimático de enzimas celulolíticas e lignolíticas. Em que esse utiliza da relação entre diâmetros da colônia pelo diâmetro do halo para inferir e comparar o potencial produtivo dessas enzimas em relação aos fungos analisados.

Entretanto, existem controversa a respeito dessa abordagem, tal como relatado por Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004) que evidenciou ao analisar 15 linhagens fúngicas com meio basal suplementado com CMC, durante 120 horas à 28°C, observaram que os fungos *Glicladium nigrovirens* e *Penicillium simplicissimum* III apresentaram menores valores diâmetro de colônia, mas foram os que apresentaram maiores índices enzimáticos.

Esse fato também é discutido por Singhanian et al. (2010) que revisa o desempenho de diferentes microrganismos cultivados em meio sólido (Fermentação em estado sólido – FS) e cultivos em meio líquido (Fermentação Submersa - FSm). Além do método de cultivo, a produção de celulasas é diretamente afetada pela morfofisiologia do fungo.

A relação entre a morfofisiologia dos fungos e a singular produtividade das enzimas ainda é não está totalmente elucidada, uma vez que a produção mundial de celulasas é proveniente de microrganismos manipulados geneticamente, em parte pelo desenvolvimento de celulasas artificiais (*engineered cellulases*) e coquetéis de enzimas (ABDELAZIZ et al., 2016; HANDAKUMBURA et al., 2013; SUMIT SHARMA et al., 2014).

Acrescentando, o meio utilizado para o cultivo do microrganismo (sólido ou líquido) também influencia no valor real do índice enzimático, bem como a acessibilidade sobre essas enzimas, sendo necessidade de implementar processos de purificação, estabilização e armazenamento da enzima produzida (SINGHANIAN et al., 2010; YOON et al., 2014), temas complexos e importantes, mas que devido ao perfil dessa pesquisa não serão abordados.

Com tudo, devido ao fato de que em processos de FSm as enzimas encontram-se dispersas no meio de cultura, foi essa a abordagem escolhida para estimar o índice enzimático neste trabalho. Sendo assim, o Quadro 2 apresenta o resultado da etapa de triagem, feito em meio sólido, uma vez que Auer, Amaro e



Pimentel (2014) e Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004) afirmam que esse método é uma medida útil como um parâmetro simples e rápido para comprovação capacidade de produção de enzimas específicas .

Como controle negativo, utilizou-se uma bactéria comercial produtora de celulase do gênero *Cellulomonas*, a qual foi fornecida pela CMIB. Essa foi utilizada como controle negativo, uma vez que a produção é intracelular, assim o efeito de hidrólise visualizado com a formação do halo fúngico não é evidenciado.

Tal como pode ser observado no Quadro 2 e disposto na Tabela 1, todos as linhagens apresentaram resultados positivo frente a produção de enzimas celulolíticas, esse fato já era esperado, uma vez que todas foram isoladas de fontes das quais era esperado microrganismos com essa capacidade.

Quadro 2 – Resultado da triagem inicial frente a capacidade de produção de enzimas celulolíticas e lignolíticas.

(contínua)

| Fonte do isolamento                                                        | Nomenclatura utilizada    | Atividade celulolítica | Atividade lignolíticas |
|----------------------------------------------------------------------------|---------------------------|------------------------|------------------------|
| Troncos remanescentes do corte de uma floresta plantada de <i>Pinus</i> sp | J11                       | +                      | -                      |
|                                                                            | J12                       | +                      | -                      |
|                                                                            | J13                       | +                      | +                      |
| Solo da Furna do Passo do Pulpo 1                                          | <i>Mucor</i> sp. I (M1)   | +                      | -                      |
|                                                                            | <i>Mucor</i> sp II (M2)   | +                      | -                      |
|                                                                            | <i>Mucor</i> sp III (M3)  | +                      | +                      |
|                                                                            | <i>Mucor</i> sp IV (M4)   | +                      | -                      |
|                                                                            | <i>Mucor</i> sp V (M5)    | +                      | ⊖                      |
|                                                                            | <i>Mucor</i> sp VI (M6)   | +                      | -                      |
|                                                                            | <i>Mucor</i> sp VII (M7)  | +                      | +                      |
|                                                                            | <i>Mucor</i> sp VIII (M8) | +                      | -                      |
|                                                                            | <i>Mucor</i> sp IX (M9)   | +                      | ⊖                      |
|                                                                            | <i>Mucor</i> sp X (M10)   | +                      | ⊖                      |

Quadro 2 – Resultado da triagem inicial frente a capacidade de produção de enzimas celulolíticas e lignolíticas.

|                                            |    |   |   |
|--------------------------------------------|----|---|---|
| Depósito de madeira de<br><i>Pinus</i> sp. | A1 | + | Θ |
|                                            | B1 | + | Θ |
|                                            | A2 | + | - |
|                                            | B2 | + | - |
|                                            | C2 | + | - |
|                                            | B3 | + | + |
|                                            | C3 | + | + |
|                                            | D3 | + | + |

Fonte: O autor.

Nota: Simbologia utilizada na classificação dos resultados (+) – Positivo; (-) – Negativo; (Θ) – Inconclusivo.

Frente aos resultados obtidos, a Tabela 1 apresenta a resolução dos resultados absolutos e relativos da triagem inicial frente a capacidade de produção de enzimas celulolíticas e lignolíticas.

Tabela 1 – Resultados absoluto e relativo da triagem inicial frente a capacidade de produção de enzimas celulolíticas e lignolíticas.

| Teste     | Resultado Absoluto |          |              | Resultado Relativo |          |              |
|-----------|--------------------|----------|--------------|--------------------|----------|--------------|
|           | Positivo           | Negativo | Inconclusivo | Positivo           | Negativo | Inconclusivo |
| Celulases | 23                 | 0        | 0            | 100%               | 0%       | 0%           |
| Oxidases  | 7                  | 11       | 5            | ≈ 30%              | ≈ 48%    | ≈ 22%        |

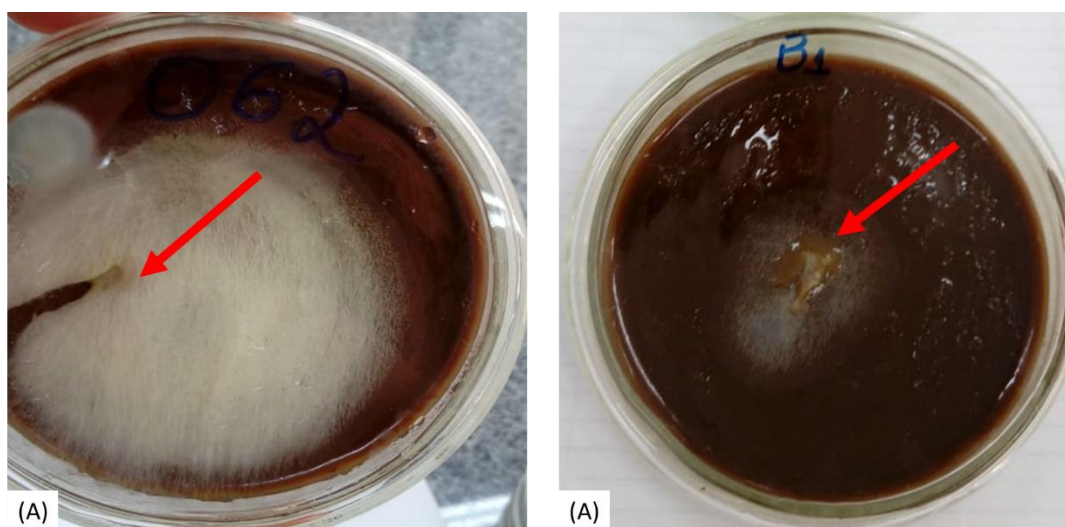
Fonte: O autor.

Tal como pode ser observado no Quadro 2 e disposto na Tabela 1, todos as linhagens apresentaram resultados positivo frente a produção de enzimas celulolíticas, esse fato já era esperado, uma vez que todas foram isoladas de fontes das quais era esperado microrganismos com essa capacidade.

Já em relação ao resultado frente a produção de enzimas oxidases o resultado não teve valores expressivos, uma vez que somente 7 (≈30%) das 23 linhagens apresentaram halo marrom nítido tal como exemplificado na Figura 28 (B).

Além desse fato, 5 linhagens ( $\approx 22\%$ ) M5, M9, M10, A1, B1 apresentam características que não puderam ser tomadas como conclusivas. Um exemplo desse perfil está exemplificado na Figura 28 (A e B), em que a linhagem M5 (na ocasião, denominada de 062) e a linhagem B1 apresentam crescimento de colônia, com pequenas manchas com tonalidade tirante ao marrom.

Figura 28 – Exemplos dos fungos (A) *Mucor* sp. e (B) B1 inoculados em meio extrato de malte-ácido com indicação a região amarronzada.



Fonte: O autor.

Para as linhagens do gênero *Mucor* sp. foram selecionadas as que apresentaram maior colônia no dia de avaliação da produção de enzimas celulolíticas, mesmo sem apresentar valor positivo no ensaio de produção de oxidases.

Dos microrganismos que passaram pela triagem os selecionados para a etapa de produção do pré-inóculo e consequente avaliação da produção enzimática celulolíticas e lignolíticas foram: M1, M3, M7, M8, M9, M10, A1, A3 e J13. Essas foram selecionadas de acordo com o desempenho da triagem e com a variedade morfológica aparente observadas nas colônias.

O fato de todos os indivíduos do gênero *Mucor* sp. terem demonstrado capacidade de produção de enzimas celulolíticas também foi evidenciado por Baffi et al. (2012) que isolou 14 linhagens fúngicas de frutos de azeitona fresca (*Olea europaea* L.) da região de Castilha La Mancha, das quais as do gênero *Mucor* sp. apresentaram capacidade de produção de endo e exo-1,4- $\beta$ -D-glicanase, frente aos ensaios efetuado em meio sólido, semelhante ao utilizado neste trabalho.

Esse perfil de produção enzimática também foi evidenciado por Huang et al. (2014) que utilizando-se de método de reconhecimento de padrões peptídicos, demonstrou a atividade de  $\beta$ -glucosidases em fungos *Mucor circinelloides*, fato que corrobora para a tomada de decisão tomada neste trabalho de pesquisa em escolher esses microrganismos para serem testados em um processo ativo de degradação de biomassa lignocelulósica.

Além do fato de que, tal como na revisão de Morin-Sardin et al. (2017), dentro do reino Fungi, mesmo tendo o primeiro indivíduo isolado e identificado em 1665, o gênero *Mucor sp.* tem menos atenção frente aos emblemáticos filo Ascomycota e Basidiomycota, tendo seu foco de estudos relacionados a seu caráter patológico, tal como reportado por Mignogna et al. (2011; Suthanathan, Koek, Sieunarine (2017) como causadores de *Mucormicose* em pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos.

## 5.2 AVALIAÇÃO DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA CELULOLÍTICAS E LIGNOLÍTICAS (MEIO LÍQUIDO)

A partir da etapa de triagem, os microrganismos selecionados foram submetidos a processo de FSm utilizando-se do meio de cultura adaptado de Manachini, suplementado com duas diferentes fontes de carbono: CMC 0,5 g.L-1 e pó de madeira de pinus 0,5 g.L-1. O objetivo desses experimentos foi avaliar quantitativamente o potencial de cada uma das 9 linhagens selecionadas, frente a inoculação com as diferentes fontes de carbono citadas.

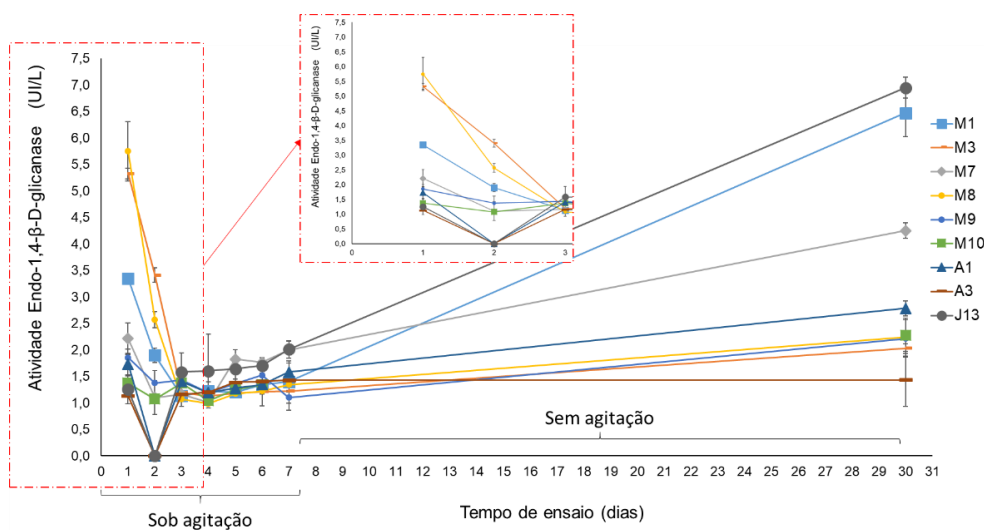
A abordagem metodológica de estimativa de produção de enzimas lignocelulolíticas ao longo do período de incubação mostrou-se eficaz nos trabalhos desenvolvidos por Dong et al., (2013), Moreira et al. (2012) e Siqueira et al. (2010), entre outros na literatura, e é utilizada como uma ferramenta versátil para se estabelecer comparações e análises a respeito do desempenho de mesma linhagens submetidas a diferentes substratos e condições de processamento, ou estabelecer comparações entre diferentes linhagens.

### 5.2.1 Avaliação da Produção Enzimática (1ª Etapa)

A 1ª etapa foi executada com a inoculação das linhagens selecionada durante 30 dias em duas fases, sendo a primeira, durante os 7 primeiros dias sob agitação, com análises a cada 24 horas, e em repouso pelos 23 dias restantes do processo fermentativo, com a análise somente no último dia.

Tal como pode ser evidenciado na Figura 29, que apresenta o perfil de atividade da enzima Endo-1,4- $\beta$ -D-glicanase ao longo de todo o período de incubação, tem-se um pico inicial da atividade na primeira análise (24 horas após a inoculação), acompanhado por um declino na atividade entre 48 e 72 horas e seguida de um aumento progressivo com o passar tempo de incubação.

Figura 29 – Atividade da Endo-1,4- $\beta$ -D-glicanase das linhagens inoculadas com CMC 0,5 g.L<sup>-1</sup> no decorrer de 30 dias com destaque nos primeiros 3 dias.



Nota: As barras de erro foram calculadas para as duplicatas experimentais.  
Fonte: O autor.

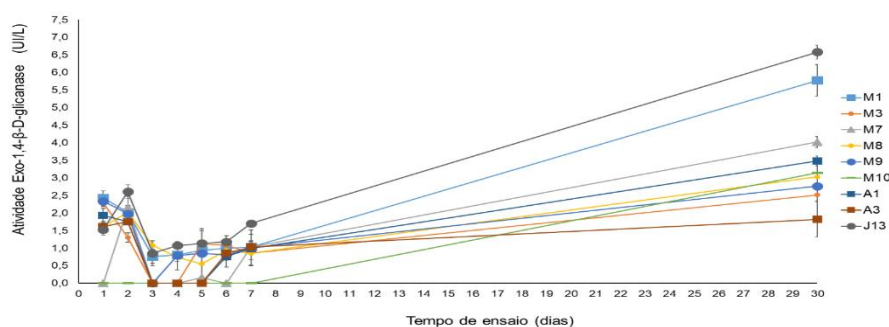
O padrão inicial com altos valores de atividade enzimática seguido de um declino no decorrer das consecutivas 72 horas de incubação está ligado ao fato de que no pré-inóculo produzido a partir de 72 horas de fermentação (descrito no item 4.2.3), provavelmente arrastou ao novo sistema enzimas já existentes provocando, de certa forma, uma contaminação externa ao ensaio. Esse perfil também foi evidenciado no trabalho de Henn (2009) na determinação da atividade de xylanases, entretanto

com a causa relacionada ação do herbicida clornitrofen, que no caso era o substrato em estudo.

Quando se observa o perfil dos 7 primeiros dias, tal como demonstrado na Figura 29, temos que as linhagens do gênero *Mucor sp.* (M1, M3, M7, M9 e M10) apresentaram o declínio na atividade, mas não atingiram o valor zero de atividade. Ao passo que as linhagens A1, A3 e J13 apresentaram atividade zero com 2 dias de fermentação. Essas diferenças entre as respostas de produção enzimática, tal como descrito por Singhanian et al. (2010) não é facilmente elucidada, mas tem grande relação com a características de cultura dos indivíduos e as condições testadas. Em contrapartida ao fato de não ter apresentado atividade no segundo dia de processo, a linhagem J13 foi a que apresentou maior atividade com  $6,95 \text{ UI.mL}^{-1}$ , seguida da M1 e M7 com  $6,47$  e  $4,25 \text{ UI.mL}^{-1}$ , respectivamente. Os demais indivíduos apresentaram valores entre  $1,43$  e  $2,78 \text{ UI.mL}^{-1}$ .

A figura 30 apresenta o perfil da estimativa de atividade da Exo-1,4- $\beta$ -D-glicanase sobre as mesmas condições de fermentação. Em que o fenômeno inicial de alta atividade enzimática evidenciado na Endo-1,4- $\beta$ -D-glicanase não se estendeu a todos os indivíduos testados. Esse fato pode-se observar somente nos indivíduos M1, M3, M9 e A1. Já com M7, M8, A3 e J13, entre o dia 1 e o dia 2 evidencia um pequeno aumento seguindo de um declino ao dia 3. Interessante ressaltar que mesmo os indivíduos M10 que não apresentou atividade nos dias de fermentação sobre agitação (1ª etapa), também o A3 sem valores positivos e o M7 com um pico no 2ª dia, ao permanecerem inoculados pelos 23 dias até o fim processo (30 dias) sem agitação, todos apresentaram atividade enzimática.

Figura 30 – Atividade da Exo-1,4- $\beta$ -D-glicanase das linhagens inoculadas com CMC  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  no decorrer de 30.



Nota: As barras de erro foram calculadas para as duplicatas experimentais.

Fonte: O autor.

Ainda sobre a atividade Exo-1,4- $\beta$ -D-glicanase os 3 indivíduos que apresentaram maiores valores no final do 7 dia foram J13 com 1,7 UI.mL<sup>-1</sup>, M1 e M7 ambos com 1,03 UI.mL<sup>-1</sup>. E no final do processo, tal como para Endo-1,4-  $\beta$ -D-glicanase as linhagens J13, M1 e M7 apresentaram os maiores valores 6,58 UI.mL<sup>-1</sup>, 5,77 UI.mL<sup>-1</sup> e 4,02 UI.mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

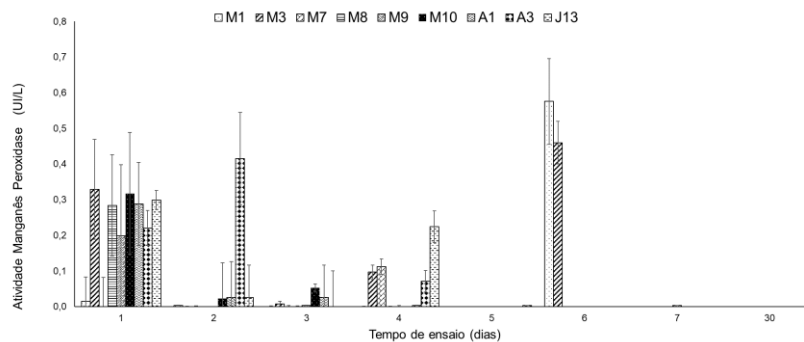
Aos valores estimados de atividade enzimática, existe uma boa perspectiva de aplicação biotecnológica aos microrganismos analisados, uma vez que de dentre os trabalhos que buscam avaliar a produção de celulasas de fungos filamentosos Siqueira et al. (2010) estimou, com 7 dias de cultivo valores a 30°C, não superiores a 0,179 UI.ML<sup>-1</sup> para endo-1,4- $\beta$ -D-glicanase com 4 linhagens de fungos do gênero *Mucor sp*,

Em relação a estimativa da atividade das enzimas lignolíticas: Lacase, Manganês Peroxidase e Lignina Peroxidase, somente os valores de Manganês Peroxidase serão considerados. Pois durante a execução do experimento, que seguiu método sugerido por Szklarz et al. (1989).

Também utilizado pelos pesquisadores contemporâneos Guerra, Mendonça e Ferraz (2003) e Menezes e Barreto (2015), baseado na oxidação siringaldazina para sua forma quinona, que apresenta absorção a 525 nm, houve a formação de precipitado entre a medida no t(0) e t(10s) (tal como descrito no item 4.2.6.1). Esse fato inviabiliza medição da absorbância, uma vez que o feixe é obstruído pelo precipitado.

O mesmo fenômeno de formação de precipitado ocorreu na estimativa da Lignina Peroxidase, em que se utilizou do protocolo sugerido por Archibald (1992), o qual segue o mesmo princípio de oxidação da siringaldazina, que apresenta absorção a 460 nm. Não há relatos bibliográficos a respeito da formação de precipitado na execução desses procedimentos. Aos valores encontrados da estimativa da atividade de Manganês Peroxidase, a Figura 31 apresenta os valores encontrados.

Figura 31 – Atividade da Manganês peroxidase das linhagens inoculadas com CMC 0,5 g.L<sup>-1</sup> no decorrer de 30 dias.



Fonte: O autor.

Nota: As barras de erro foram calculadas para as duplicatas experimentais.

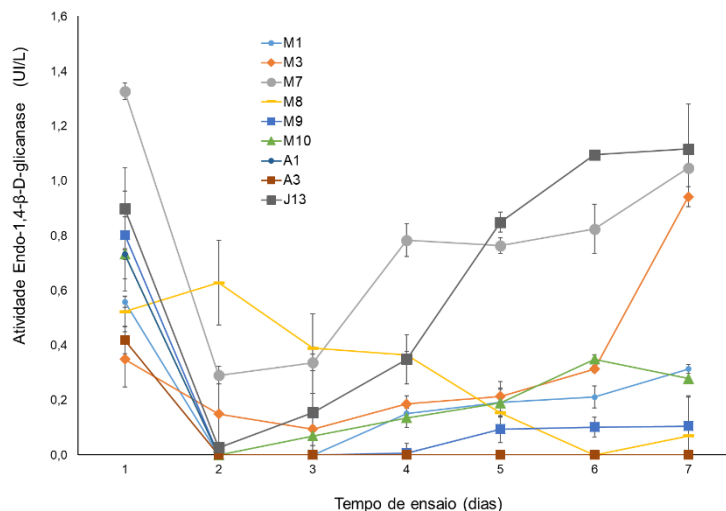
Mesmo que sem a formação de precipitado, a partir dos valores encontrado, que não seguem um perfil característico ou regularidade significativa, tornando-se difícil até a exposição dos dados, tal como feito com as enzimas celulolíticas. Por tanto optou-se também por desconsiderar a estimativa dessa enzima tal como a Lac e Lip para as tomadas de decisão que se seguiram no desenvolver desta pesquisa.

### 5.2.2 Avaliação da Produção Enzimática (2ª Etapa)

Diferente da 1ª etapa de etapa, na 2ª etapa o tempo de fermentação foi de 7 dias, em que o meio de cultura basal composto pela solução de Manachini, agora suplementada com pó de madeira de *Pinus sp.* na mesma proporção da CMC (0,5 g.L<sup>-1</sup>). Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 32. Tal como ocorreu na 1ª etapa, é possível observar que ocorreu o arraste de enzimas do pré-inóculo, uma vez que praticamente todas as linhagens, à exceção da M8, apresentam altos valores no início da fermentação seguidas de um declino no decorrer das primeiras 48 horas.



Figura 32 – Atividade da Endo-1,4- $\beta$ -D-glicanase das linhagens inoculadas com pó de madeira de *Pinus sp.* 0,5 g.L<sup>-1</sup> no decorrer de 7 dias.



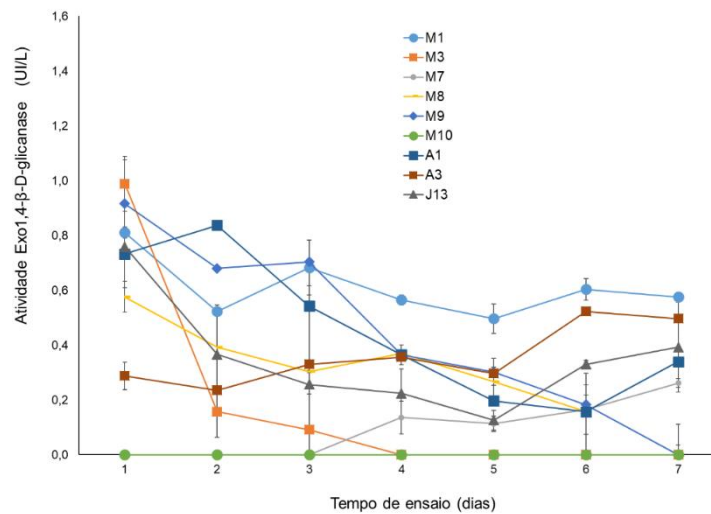
Fonte: O autor.

Nota: As barras de erro foram calculadas para as duplicatas experimentais.

De forma global, o desempenho de produção enzimática das linhagens inoculadas com pó de madeira de *Pinus sp.* não apresentaram valores excepcionais, além de que os indivíduos A1 e A3 somente apresentam atividade no 1º dia, o que leva a supor que esses microrganismos não apresentaram capacidade de utilizar a madeira de *Pinus sp.* como fonte de carbono, tal como foi feita a inoculação. Ao passo que as linhagens que apresentaram melhor desempenho foram as M3, M7 e J13, como atividade de 0,94, 1,04 e 1,11 UI.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Valores significativamente menores que quando fermentadas com meio basal suplementada com CMC e as demais linhagens apresentaram valores de atividade que variaram entre 0,06 e 0,31 UI.mL<sup>-1</sup>.

Com valores ainda menos expressivos de atividade enzimática, a Figura 33 apresenta os valores estimados da enzima Exo-1,4- $\beta$ -D-glicanase, em que o valores de atividade enzimática variaram entre 0,57 a 0,49 UI.mL<sup>-1</sup> (M1 com o maior valor e M7 com o menor), além das linhagens M10 que não apresentou atividade e a M3 que a partir do 4 dias de incubação também se mostrou improdutivo. O único indivíduo que não demonstrou o perfil de declínio entre o 1º para o 2º dia foi a linhagem A1 com atividade final de 0,34 UI.mL<sup>-1</sup> no último dia de ensaio.

Figura 33 – Atividade da Exo-1,4- $\beta$ -D-glicanase das linhagens inoculadas com pó de madeira de Pinus sp. 0,5 g.L<sup>-1</sup> no decorrer de 7 dias.



Fonte: O autor.

Nota: As barras de erro foram calculadas para as duplicatas experimentais.

Tal como descrito no item anterior a respeito da impossibilidade de efetuar a medida confiável das enzimas lignolíticas Lac e Lip, o mesmo se aplica para o ensaio efetuado com suplementação com pó de madeira. A respeito da MnP, o resultado foi tão insatisfatório quanto o obtido na 1ª etapa, em que somente a linhagem M1 expressou um único valor positivo após 120 horas de incubação de 0,10 UI.mL<sup>-1</sup>, o que de fato, fortaleceu o apontamento de não utilizar as estimativa da atividade lignolíticas como critério para tomada de decisões.

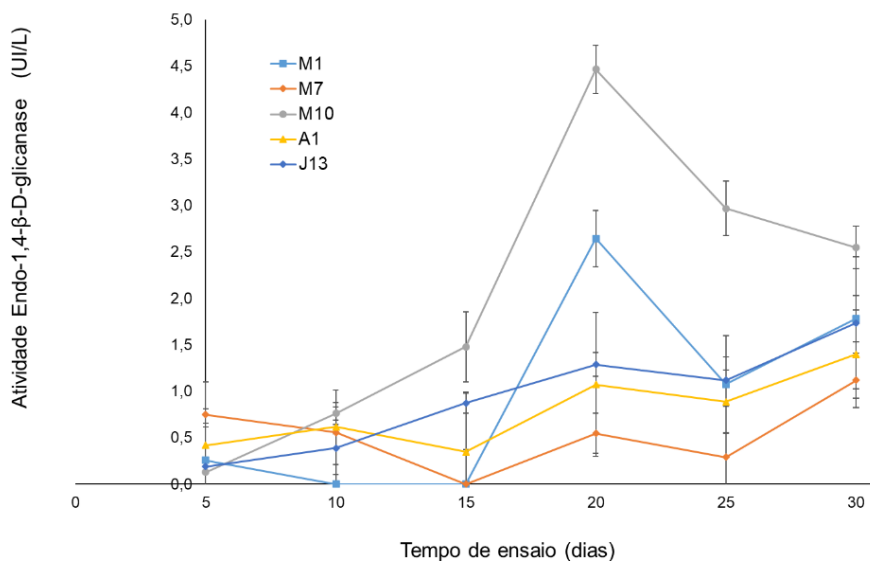
Sendo assim, na 3ª etapa a abordagem de estimar as proteínas totais no meio foi acrescentada a rotina, bem como, devido aos valores encontrados, somente a estimativa da atividade celulolítica foi adotada. Ao passo que em decorrência do desempenho nas duas primeiras etapas e com intuito de comparar o desempenho das diferentes características de cultura das linhagens utilizadas, as linhagens M1, M7, M10, A1 e J13 foram selecionadas para a 3ª etapa, para fermentação durante 35 dias com meio basal de Manachini suplementada com CMC na proporção de 0,5 g.L<sup>-1</sup>.

O tempo de 35 dias, foi estipulado com objetivo de analisar qual a tendência da produção enzimática no decorrer do ensaio, levando em consideração que na 1ª etapa o tempo de ensaio foi de 30 dias, em que se obteve os maiores valores de atividade celulolítica.

### 5.2.3 Avaliação da cinética de produção de celulasas e determinação de proteínas totais (3ª etapa)

Diferente da 1ª e 2ª etapa em foi feita a estimativa das atividades enzimáticas celulolíticas já nas primeiras 24 horas a partir da inoculação, o ensaio de avaliação da cinética de produção celulasas (3ª etapa) procedeu com a implementação das coletas e análises a cada 5 dias, assim, é possível observar o reflexo dessa mudança nos dados obtidos da primeira análise, tal como apresentado na Figura 34, em que não se faz evidente o arraste de enzimas do pré-inóculo, fato que foi observado nos ensaios de determinação Endo/Exo-1,4- $\beta$ -D-glicanase das etapas que antecederam o último experimento.

Figura 34 – Atividade da Endo-1,4- $\beta$ -D-glicanase das linhagens inoculadas com CMC 0,5 g.L<sup>-1</sup> no decorrer de 35 dias.



Fonte: O autor.

Nota: As barras de erro foram calculadas para as triplicatas experimentais.

Entre os valores estimados para Endo-1,4- $\beta$ -D-glicanase na 1ª etapa e os valores obtidos na 3ª etapa, pode-se observar que a atividade enzimática apresentou valores menores ao final do experimento, com valor máximo 4,46 UI.mL<sup>-1</sup> para M10 no 20º dia, seguido de decréscimo até 2,46 UI.mL<sup>-1</sup> no último dia de ensaio, necessariamente é um pequeno ganho, se comparado com a 1ª etapa, em que essa finalizou o período de testes com 2,26 UI.mL<sup>-1</sup>.

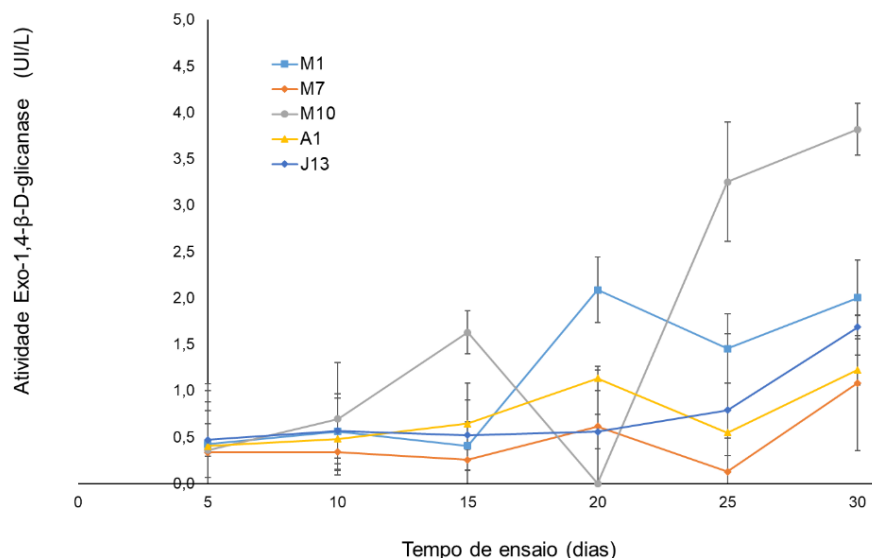
Ainda na 3ª etapa, a M1 apresentou valor máximo de atividade no 20º dia com valor de 2,64 UI.mL<sup>-1</sup>, finalizando com 1,78 UI.mL<sup>-1</sup>, valores quais, bem inferiores apresentados no final da primeira etapa de 5,77 UI.mL<sup>-1</sup>, valor que a colocou entre as três melhores da 1ª etapa, compartilhando essa posição com M7 e J13. Dessas, a M7 apresentou valores pouco expressivos finalizando o ensaio com 1,11 UI.mL<sup>-1</sup>, contrário ao que havia apresentado na 1ª etapa com 4,02 UI.mL<sup>-1</sup>. A outra, J13, seguiu a mesma tendência com valor final de 1,73 UI.mL<sup>-1</sup>, valor bem abaixo de outra que a havia colocado como a linhagem com melhor desempenho entre todas analisadas, com 6,95 UI.mL<sup>-1</sup>.

Por fim a linhagem M7, também vinha compondo o bloco das três melhores linhagens na 1ª e 2ª etapa frente a produção de Endo-1,4-β-D-glicanase, demonstrou o menor desempenho finalizando o ensaio com atividade estimada de 1,11 UI.mL<sup>-1</sup>, mesmo valor encontrado no 7º dia de ensaio da 2ª etapa. Sobre o foco na produção da Exo-1,4-β-D-glicanase a M7 ocupou o mesmo patamar, apresentando também o menor valor de atividade com 1,08 UI.mL<sup>-1</sup> no final dos 35 dias, evidenciado na Figura 36.

Fora a linhagem M10 que apresentou atividade significativamente acima das demais (3,81 UI.mL<sup>-1</sup>), os valores de atividade da Exo-1,4-β-D-glicanase ficaram entre 2,00 e 1,08 UI.mL<sup>-1</sup>. Ainda sobre a M10 o valor encontrado no 20º dia está associada a contaminação da amostra na etapa de incubação, assim a mesma teve que ser desconsiderada.

Tanto para Endo, como para a Exo-1,4-β-D-glicanase a linhagem A1 apresentou uma regularidade em sua atividade apresentando valores intermediários no fim dos dois processos com 1,39 UI.mL<sup>-1</sup> no primeiro e 1,22 UI.mL<sup>-1</sup> no segundo. O mesmo perfil pode ser observado para M1 e J13, em que a atividade estimada no final do experimento foi próximo para as duas enzimas de 2,00 e 1,68 UI.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, a Figura 35 exemplifica o perfil descrito.

Figura 35 - Atividade da Exo-1,4- $\beta$ -D-glicanase das linhagens inoculadas com CMC 0,5 g.L<sup>-1</sup> no decorrer de 35 dias.

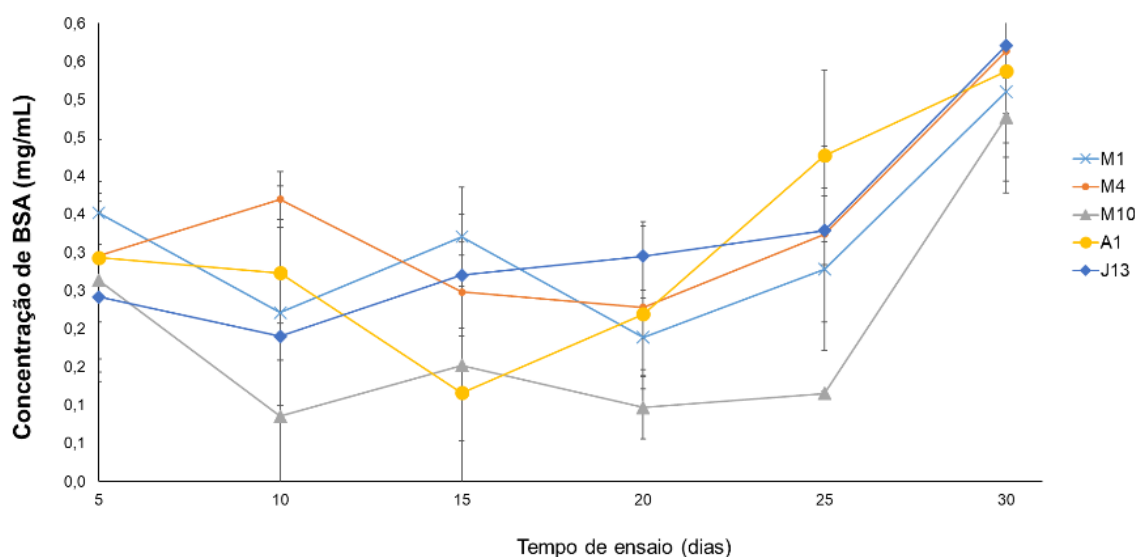


Nota: As barras de erro foram calculadas para as triplicatas experimentais.

Fonte: O autor.

Além das estimativas enzimáticas Endo/Exo-1,4- $\beta$ -D-glicanase, a produção de proteínas totais foi estimada. A quantidade de proteínas oscilou durante o período de cultivo, mostrando-se sensível ao processo de fenômeno já descrito de arraste proteico do pré-inóculo, tal como demonstrado na Figura 36.

Figura 36 - Proteínas totais estimada das linhagens inoculadas com CMC 0,5 g.L<sup>-1</sup> no decorrer de 35 dias.



Fonte: O autor.

Nota: As barras de erro foram calculadas para as triplicatas experimentais.

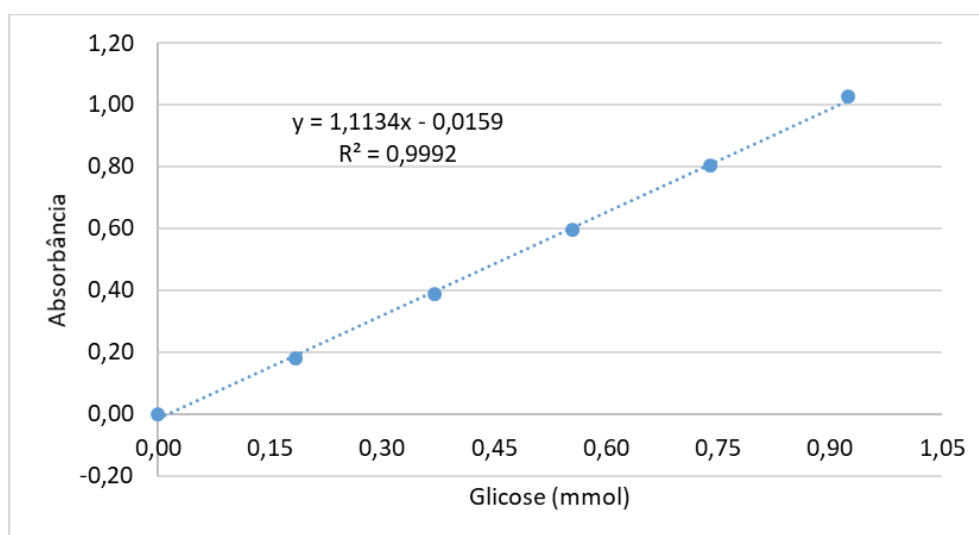
Uma vez que não nenhum processo de purificação foi aplicado aos complexos enzimáticos, o resultado obtido abrange outras enzimas além das de interesse, que são produzidas concomitantemente e que também participam do processo de degradação do substrato. Portanto, tal como as enzimas do complexo lignolítico, esse parâmetro não foi tomado como preponderante para a tomada de decisões.

Entretanto é pertinente observar (Figura 36) que o método se mostrou sensível ao processo de produção proteico dos microrganismos cultivados, uma vez que é possível observar que no final do processo, decorrente de 30 dias de fermentação, há uma elevação do valor de proteínas totais, sendo, no caso, os maiores valores estimados durante todo o período de análise.

#### 5.2.4 Curva de calibração

A curva-padrão utilizada para determinação da concentração de glicose liberada nas determinações das enzimas Endo/Exo-1,4- $\beta$ -D-glicanase é apresentada na Figura 37 abaixo.

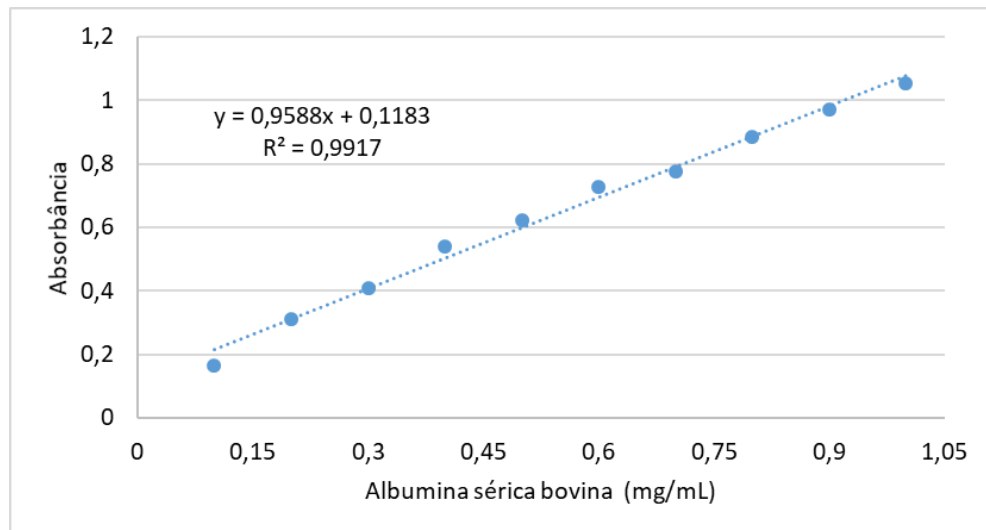
Figura 37 – Curva-padrão de glicose utilizada para a determinação da concentração de glicose em mmol no extrato enzimático bruto.



Fonte: O autor.

A curva-padrão utilizada para determinação da concentração de BSA na solução é apresentada na Figura 38 abaixo.

Figura 38 – Curva-padrão de BSA utilizada para a determinação da concentração proteínas totais em mg/mL no extrato enzimático bruto.



Fonte: O autor.

### 5.3 ENSAIOS RESISTÊNCIA MECÂNICA DOS CORPOS-DE-PROVA

Afim de avaliar o efeito degradativo que das enzimas sobre um substrato lignocelulósico fez-se o cultivo por meio de uma fermentação submersa das linhagens M10, A1 e J13, utilizando, no caso, os corpos-de-prova de madeira de *Pinus sp.* como única fonte de carbono.

As linhagens foram escolhidas pelo desempenho demonstrado nos ensaios preliminares (1ª, 2ª e 3ª etapas) e por se tratarem de exemplos das três principais morfologias que foram testadas. A seguir os resultados dos ensaios de resistência mecânica dos corpos de provas ensaiados serão apresentados.

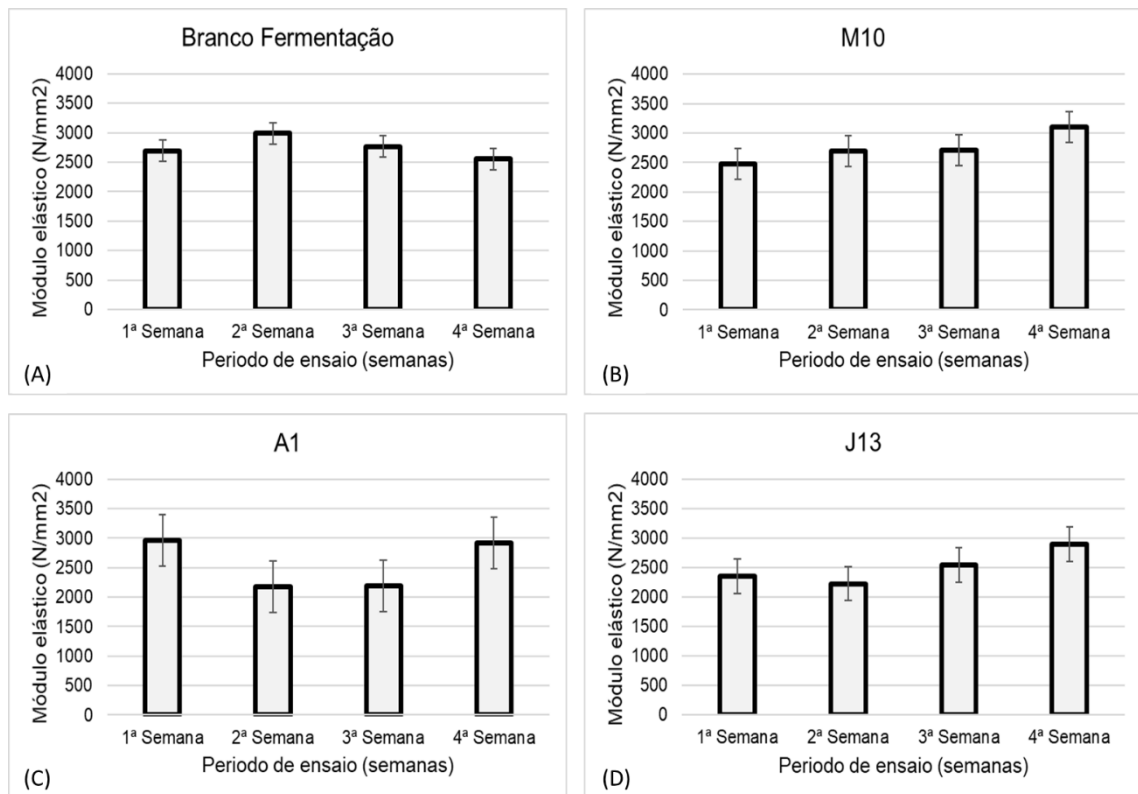
#### 5.3.1 Tração paralela às fibras

Ao analisar os dados obtidos com o ensaio de tração paralela às fibras, pode-se observar que nenhuma tendência positiva à degradação é evidenciada, tal como demonstrado na Figura 39.

A estes resultados, atribuir-se as ações de adequação efetuadas sobre os corpos-de-prova, tal como descrito no item 4.2.9.3, que por medida de conveniência efetuou-se o descarte das amostras cortadas com espessura menor que 50 mm.

Fato que, em suma, as amostras descartadas foram as peças da extremidade do corpo-de-prova, que no caso, tratava-se da região de maior contato com o complexo enzimático bruto produzido pelos microrganismos durante o processo de FSm.

Figura 39 – Dados obtidos nos ensaios de Tração paralelas às fibras dos corpos-de-prova submetidos a FSm sem inoculação, denominado de (A) Branco Fermentação, e com inoculação: (B) J13, (C) M10 e (D) A1.



Fonte: O autor.

Nota: As barras de erro foram calculadas médias dos módulos elásticos estimados.

Sobre os dados obtidos, tem-se que as variações apresentadas estão ligadas as características específicas de cada lote analisado em si e não refletem a ação do tratamento efetuado. Ao passo que nenhum dos parâmetros analisados (característica do perfil ou módulo elástico) foram utilizados como base para inferências a respeito da efetividade do tratamento efetuado.



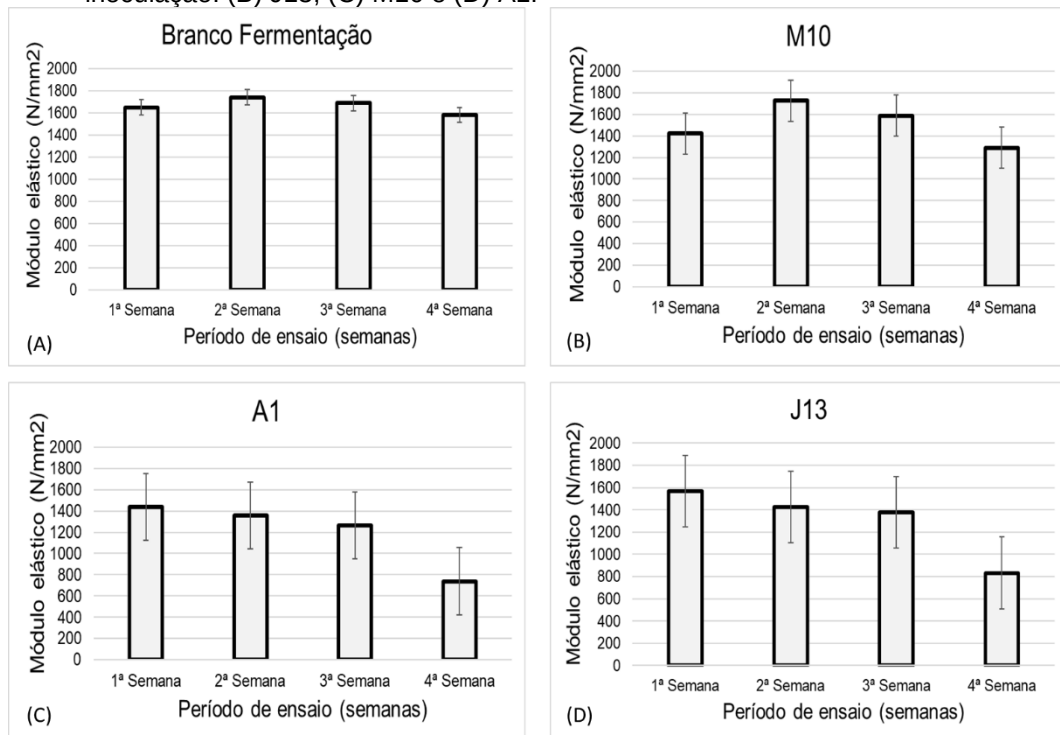
### 5.3.2 Cisalhamento paralelo às fibras

A respeito do ensaio de Cisalhamento paralelo às fibras, tem-se que o tratamento do Branco Fermentação apresentou uma pequena variação do módulo elástico de magnitude  $E = 161,74 \text{ N/mm}^2$  e desvio de  $\sigma^2 = 38,07\%$ , se comparado com as variações obtidas nos demais ensaios com as linhagens inoculadas  $700,56 \text{ N/mm}^2$ ,  $735,33 \text{ N/mm}^2$  e  $435,44 \text{ N/mm}^2$ , para as linhagens A1, J13 e M10, respectivamente, no decorrer do ensaio de FSM. Esse fato mostra que a metodologia utilizada de controle (branco) foi eficaz, demonstrando que o uso do hipoclorito de sódio na proporção de 10% (v/v) utilizado para inibir o crescimento de microrganismos não atuou negativamente na resistência das peças.

Sobre os demais ensaios, todos apresentaram variações positivas a respeito do decréscimo do módulo elásticos dos corpos-de-prova submetidos a FSM inoculadas com as linhagens fúngicas específicas tal como pode-se observar na Figura 40 (A, B e C).

Para a linhagem M10, tem-se um perfil com elevação do módulo entre a 1ª e a 2ª semana, demonstrado na Figura 40 (B), esse fato pode estar ligado a características do conjunto de amostras selecionadas para o ensaio. Assim, analisando a redução entre a 1ª e a 4ª semana tem-se a redução de somente 9,23% do módulo elástico, o que de fato, levar a conclusão de o tratamento com linhagem M10 não promoveu uma alteração significativa do módulo de elasticidade dos corpos-de-prova.

Figura 40 – Dados obtidos nos ensaios de Cisalhamento paralelo às fibras dos corpos-de-prova submetidos a FSM sem inoculação, denominado de (A) Branco Fermentação, e com inoculação: (B) J13, (C) M10 e (D) A1.



Fonte: O autor.

Nota: As barras de erro foram calculadas médias dos módulos elásticos estimados.

Em contrapartida ao resultado obtido com a linhagem M10, as linhagens A1 e J13, apresentaram um perfil de decrescimento do módulo elástico muito mais acentuado com valores de redução percentual de 46,92% e 48,68%, para A1 e J13, respectivamente, comparando os resultados estimados para o módulo elástico da 1ª com a 4ª semana de ensaio. Com uma redução, tal como já citada anteriormente de aproximadamente 700 N/mm<sup>2</sup> no modulo elástico para as duas linhagens ensaiadas. Os dois perfis apresentados pelas linhagens A1 e J13 demonstram que houve de forma global uma ação degradativa sobre a estrutura da biomassa lignocelulósica refletindo na redução do módulo elástico no decorrer das quatro semanas de ensaio.

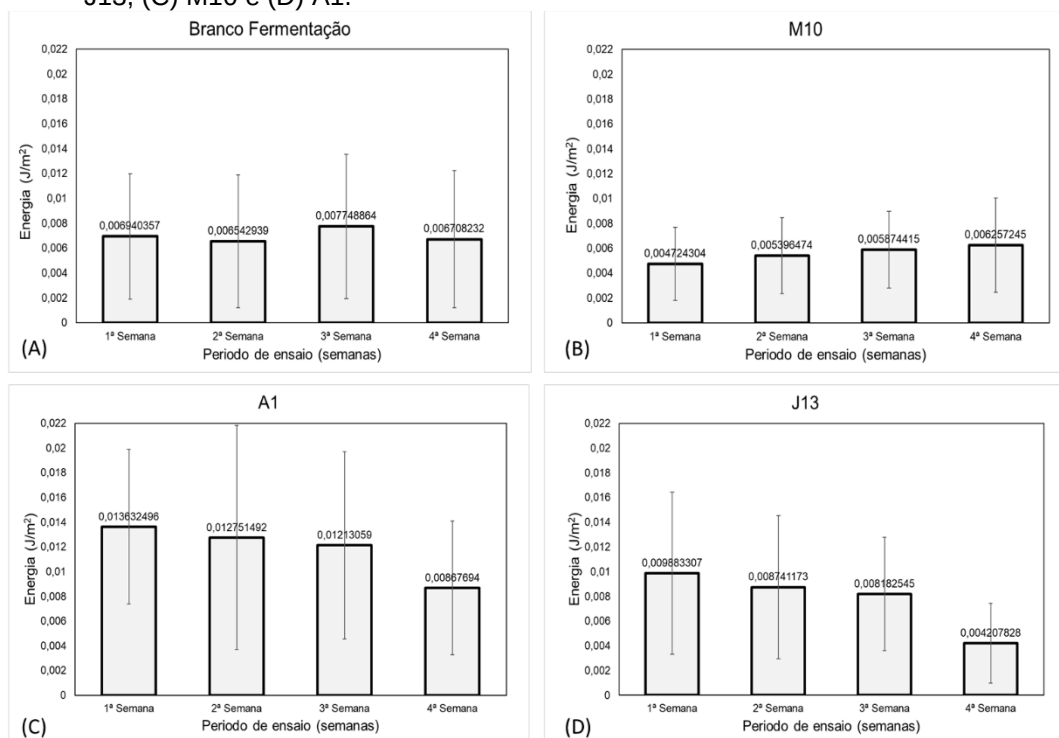
### 5.3.3 Resistência ao impacto

Quanto à Resistência ao impacto tem-se que os dados foram normalizados de acordo com as áreas características de cada corpo-de-prova, assim a energia de impacto obtida no ensaio de impacto instrumentalizado foi estimada em J/m<sup>2</sup>. Como pode ser observado na Figura 41 (A), os corpos-de-prova denominados de Branco

Fermentação, não apresentaram variação significativa ( $\sigma^2 = 0,05\%$ ) entre os valores médios estimados durante as quatro semanas de ensaio.

Analisando os dados das amostras inoculadas com as linhagens específicas, tem-se que a linhagem M10 não mostrou efeito positivo ao tratamento, uma vez que o perfil dos valores médios estimados (Figura 41 (B)) não demonstrou decrescimento na resistência de energia ao impacto. Com um desvio padrão ( $\sigma^2 = 0,07\%$ ) entre os valores médios estimados durante as quatro semanas de ensaio, tem-se que o efeito expresso nesse ensaio é nulo para o tratamento efetuado.

Figura 41 – Dados obtidos nos ensaios de Resistência ao Impacto (RI) dos corpos-de-prova submetidos a FSm sem inoculação, denominado de (A) Branco Fermentação, e com inoculação: (B) J13, (C) M10 e (D) A1.



Fonte: O autor.

Nota: As barras de erro foram calculadas médias dos módulos elásticos estimados.

Por outro lado, o perfil apresentado pelas linhagens J13 e A1 demonstraram um decrescimento nos valores médios estimados na resistência de energia ao impacto (Figura 42 (C e D)). A linhagem J13 e A1 apresentaram uma redução percentual de 57,42% e 36,35%, respectivamente, nas médias das resistências ao impacto estimadas entre a 1ª e a 4ª semana dos ensaios. Demonstrando o efeito positiva de degradação da biomassa lignocelulósica submetida a FSm com as duas linhagens fúngicas inoculadas.

## 6 CONCLUSÃO

A metodologia de triagem e estimativa da atividade enzimática, frente a produção de enzimas que compõem o complexo enzimático foram pertinentes, uma vez que as linhagens classificadas como melhores e utilizadas no procedimento de degradação por contato com os metabolitos extracelulares promoveram a degradação dos substratos.

O efeito degradativo promovido pelas linhagens selecionadas devido a produção de enzimas do complexo enzimático celulolítico sobre os corpos-de-prova de madeira de *Pinus sp* foi evidenciado através dos ensaios de Cisalhamento paralelo das fibras e da Resistência ao impacto, em destaque o efeito progressivo da ação degradativa das enzimas sobre a estrutura da biomassa lignocelulósica no decorrer do tempo de execução do ensaio.

O desempenho das linhagens frente nos ensaios de Resistência ao impacto e de Cisalhamento paralelo das fibras apresentaram valores significativos na redução percentual dos parâmetros estimados, no caso, energia de impacto e módulo elástico, respectivamente. A linhagem A1 apresentou 48,68% e 36,35% de redução percentual e a J13 de 46,92% e 57,42% nos ensaios de Cisalhamento paralelo das fibras e Resistência ao impacto, respectivamente.

Assim, tem-se que as linhagens A1 e J13 demonstram potencial para serem empregados em processos que demandem do efeito degradativo da biomassa lignocelulósica, tal como exemplo, o emprego destas no processo de destoca biológica de tocos remanescentes do processo de corte de florestas plantadas. Os quais demoram cerca de 5 anos para se decompor naturalmente, tornando-se um empecilho para novos plantios uma vez que atrapalha a passagem de máquinas e ocupa espaços estratégicos.

## **SUGESTÕES DE TRABALHOS**

1. Realizar a identificação das linhagens A1 e J13 afim de estabelecer comparações entre as duas espécies e também confrontar com outros trabalhos.
2. Aplicar sobre o complexo enzimático bruto metodologias de purificação enzimática com intuito de aumentar a atividade enzimática.
3. Avaliar a influência da mudança de temperatura no desempenho do ensaio de FSm.
4. Testar a ação hidrolítica do complexo enzimático sobre um substrato designificado.

## REFERÊNCIAS

- ABDELAZIZ, O. Y. et al. Biological valorization of low molecular weight lignin. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 8, p. 1318–1346, 2016.
- AGUIAR, A. (UFSJ/ALTO P.; FERRAZ, A. (UFSJ/ALTO P. MECANISMOS ENVOLVIDOS NA BIODEGRADAÇÃO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS E APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS CORRELATAS. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1729–1738, 2011a.
- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1729–1738, 2011b.
- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Use of additives in the wood biodegradation by the fungus *Ceriporiopsis subvermispore*: Effect in the manganese peroxidase-independent lipid peroxidation. **Química Nova**, v. 35, n. 6, p. 1107–1111, 2012.
- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851–4861, 2010.
- ARANTES, V. et al. Lignocellulosic polysaccharides and lignin degradation by wood decay fungi: The relevance of nonenzymatic Fenton-based reactions. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 4, p. 541–555, 2011.
- ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. RELEVÂNCIA de COMPOSTOS de BAIXA MASSA MOLAR PRODUZIDOS POR FUNGOS e ENVOLVIDOS NA BIODEGRADAÇÃO da MADEIRA. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1586–1595, 2009.
- ARCHIBALD, F. S. A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye azure B. **Applied and environmental microbiology**, v. 58, n. 9, p. 3110–6, set. 1992.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 719–739, 2005.
- ASHBY, M. F.; JONES, D. R. H. **ENGENHARIA DE MATERIAIS VOL. 2**. Elsevier ed. [s.l: s.n.].
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 7190: Projeto de Estruturas de Madeira**Rio de Janeiro, 1997.
- AUER, C. G.; AMARO, T.; PIMENTEL, I. C. FUNGOS ISOLADOS DE ACÍCULAS DE *Pinus taeda*. **Revista Floresta**, v. 44, n. 2, p. 179–184, 2014.
- BAFFI, M. A. et al. Fungi isolated from olive ecosystems and screening of their potential biotechnological use. **New Biotechnology**, v. 29, n. 3, p. 451–456, 2012.

BALDRIAN, P. Fungal laccases-occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 215–242, 2006.

BAR-ON, Y. M.; PHILLIPS, R.; MILO, R. The biomass distribution on Earth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 25, p. 6506–6511, 19 jun. 2018.

BEALS, H. O.; DAVIS, T. C. **Figure in wood : an illustrated review**. [s.l: s.n.]. v. 91

BELO, M. F. R. F.; SOUZA, A. L. F. Estudo cinético da enzima catalase (E.C. 1.11.1.6) de extrato bruto de batata doce (*Ipomoea batatas*). **Scientia Plena**, v. 12, n. 7, p. 1–7, 2016.

BERMEK, H.; LI, K.; ERIKSSON, K. E. L. Studies on mediators of manganese peroxidase for bleaching of wood pulps. **Bioresource Technology**, v. 85, n. 3, p. 249–252, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976.

BREXÓ, R. P.; PASSARINI, M. R. Z.; SETTE, L. D. Influência da Composição do Meio de Cultura na produção de Enzimas Ligninolíticas e de Protease por Fungos Marinhos. **III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia**, p. 339–342, 2013.

BROTMAN, Y. et al. Role of Swollenin, an Expansin-Like Protein from *Trichoderma*, in Plant Root Colonization. **Plant Physiology**, v. 147, n. 2, p. 779–789, 2008.

CARVALHO, W. et al. UMA VISÃO SOBRE A ESTRUTURA, COMPOSIÇÃO E BIODEGRADAÇÃO DA MADEIRA. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2191–2195, 2009.

CHEN, W. et al. Individualization of cellulose nanofibers from wood using high-intensity ultrasonication combined with chemical pretreatments. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 4, p. 1804–1811, 1 fev. 2011.

COSTA, Â. C. F. et al. Ocorrência de fungos macroscópicos em povoamento de eucalipto. **Natural Resources**, v. 1, n. 1, p. 6–18, 2009.

DAI, J.; PATTI, A. F.; SAITO, K. Recent developments in chemical degradation of lignin: catalytic oxidation and ionic liquids. **Tetrahedron Letters**, v. 57, n. 45, p. 4945–4951, 2016.

DESWAL, D.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 6065–6072, 2011.

DOBLIN, M. S. et al. Cellulose biosynthesis in plants: From genes to rosettes. **Plant and Cell Physiology**, v. 43, n. 12, p. 1407–1420, 2002.

DONG, X. Q. et al. Sugarcane bagasse degradation and characterization of three

white-rot fungi. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 443–451, 2013.

DUARTE, M. C. T. et al. Xylan-hydrolyzing enzyme system from *Bacillus pumilus* CBMAI 0008 and its effects on *Eucalyptus grandis* kraft pulp for pulp bleaching improvement. **Bioresource Technology**, v. 88, n. 1, p. 9–15, 2003.

DUFRESNE, A. Nanocellulose: a new ageless bionanomaterial. **Materials Today**, v. 16, n. 6, p. 220–227, jun. 2013.

EICHHORN, S. J. Cellulose nanowhiskers: promising materials for advanced applications. **Soft Matter**, v. 7, n. 2, p. 303–315, 2011.

ELISASHVILI, V. et al. Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot Basidiomycetes isolated from the forests of Georgia. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 331–339, 2009.

FERRAZ, A. et al. Formic acid/acetone-organosolv pulping of white-rotted *Pinus radiata* softwood. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 75, n. 12, p. 1190–1196, 2000.

FERRAZ, A. et al. Technological advances and mechanistic basis for fungal biopulping. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 2, p. 178–185, 2008.

FERRAZ, A.; MENDONÇA, R.; DA SILVA, F. T. Organosolv delignification of white- and brown-rotted *Eucalyptus grandis* hardwood. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 75, n. 1, p. 18–24, 2000.

FRAGA, M. E. et al. Interação microrganismo, solo e flora como condutores da diversidade na Mata Atlântica. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 4, p. 857–865, dez. 2012.

GALL, D. L. et al. Biochemical transformation of lignin for deriving valued commodities from lignocellulose. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 45, p. 120–126, 2017.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1 jan. 1987.

GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, 2010.

GONZALO, G. DE et al. Bacterial enzymes involved in lignin degradation. **Journal of Biotechnology**, v. 236, p. 110–119, 2016.

GUERRA, A.; MENDONÇA, R.; FERRAZ, A. Molecular weight distribution of wood components extracted from *Pinus taeda* biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 1, p. 12–18, 2003.

HABIBI, Y.; LUCIA, L. A.; ROJAS, O. J. Cellulose nanocrystals: Chemistry, self-assembly, and applications. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 6, p. 3479–3500, 2010.



HANDAKUMBURA, P. P. et al. Perturbation of Brachypodium distachyon CELLULOSE SYNTHASE A4 or 7 results in abnormal cell walls. **BMC Plant Biology**, v. 13, n. 1, 2013.

HARRIS, D. et al. Tools for Cellulose Analysis in Plant Cell Walls. **Plant Physiology**, v. 153, n. 2, p. 420–426, 2010.

HENN, C. **SELEÇÃO DE LINHAGENS DE BASIDIOMICETOS RESISTENTES AOS HERBICIDAS ATRAZINA E DIUROM – PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS E DEGRADAÇÃO DOS COMPOSTOS**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2009.

HOFRITER, M. Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 4, p. 454–466, 2002.

HON, D. N. S. Cellulose: a random walk along its historical path. **Cellulose**, v. 1, n. 1, p. 1–25, 1994.

HUANG, Y. et al. Identification of a  $\beta$ -glucosidase from the *Mucor circinelloides* genome by peptide pattern recognition. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 67, p. 47–52, 2014.

ITOH, H. et al. Bioorganosolve pretreatments for simultaneous saccharification and fermentation of beech wood by ethanolysis and white rot fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 103, n. 3, p. 273–280, 2003.

KLEMM, D.; SCHMAUDER, H.-P.; HEINZE, T. Cellulose. In: VANDAMME, E. J.; DE BAETS, S.; STEINBÜCHEL, A. (Eds.). **Biopolymers Online**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005. p. 275–287.

KLOCK, U. et al. Química da Madeira. **Manual Didático. Departamento de Engenharia e Tecnologia Florestal - Fupef do Paraná**, v. 1, n. 16, p. 86, 2005.

KRUGNER, T. L.; CASTRO, H. A. DE. Avaliação da capacidade de apodrecimento de cerne por himenomicetos isolados de árvores vivas de *Eucalyptus* spp. na região de Guaíba, RS. **Fitopatologia Brasileira**, v. 9, p. 233–239, 1984.

KUWAHARA, M. et al. Separation and characterization of two extracellular  $H_2O_2$ -dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, v. 169, n. 2, p. 247–250, 24 abr. 1984.

LANGE, H.; DECINA, S.; CRESTINI, C. Oxidative upgrade of lignin - Recent routes reviewed. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 6, p. 1151–1173, 2013.

LAVOINE, N. et al. Microfibrillated cellulose - Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 2, p. 735–764, 2012.

LEE, J.-W. et al. Biological pretreatment of softwood *Pinus densiflora* by three white rot fungi. **Journal of microbiology (Seoul, Korea)**, v. 45, n. 6, p. 485–491, 2007.

LEE, H. V.; HAMID, S. B. A.; ZAIN, S. K. Conversion of lignocellulosic biomass to nanocellulose: Structure and chemical process. **Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R.; BONONI, V. L. R. Ligninolytic enzymes production and Remazol Brilliant Blue R decolorization by tropical Brazilian basidiomycetes fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 246–252, 2005.

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, n. 6–7, p. 386–391, 2001.

MAKHUVELE, R. et al. Isolation of fungi from dung of wild herbivores for application in bioethanol production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 648–655, out. 2017.

MARTÍNEZ, Á. T. et al. Biodegradation of lignocellulosics: Microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 195–204, 2005.

MELO, T. L. DE et al. Avaliação Do Potencial De Amostras De *Aspergillus Ssp* Isoladas Da Caatinga Para Produção De Lacase. **E-Xacta**, v. 8, n. 1, p. 67–75, 2015.

MENEZES, C. R. DE; BARRETO, A. R. Biodegradação de carboximetilcelulose utilizando fungo *Pleurotus* : Produção de oligossacarídeos e açúcares fermentescíveis para a indústria de etanol. **Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas**, v. 19, n. 21, p. 1303–1307, 2015.

MIGNOGNA, M. D. et al. Mucormycosis in immunocompetent patients: a case-series of patients with maxillary sinus involvement and a critical review of the literature. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, p. e533–e540, ago. 2011.

MILANEZ, D. H. et al. Prospecção tecnológica dos processos de obtenção da nanocelulose a partir de indicadores tecnológicos. **Anais do 69º Congresso Anual da ABM**, p. 1–12, 2014.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, mar. 1959.

MORA, C. et al. How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? **PLoS Biology**, v. 9, n. 8, p. e1001127, 23 ago. 2011.

MOREIRA, L. R. DE S. et al. The hydrolysis of agro-industrial residues by holocellulose-degrading enzymes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 498–505, 2012.

MORIN-SARDIN, S. et al. *Mucor*: A Janus-faced fungal genus with human health impact and industrial applications. **Fungal Biology Reviews**, v. 31, n. 1, p. 12–32, 2017.

MOTTIAR, Y. et al. Designer lignins: Harnessing the plasticity of lignification. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 37, p. 190–200, 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. **Journal of Shoulder and Elbow Surgery**, v. 20, n. 6, p. 1016–1024, set. 2011.

NG, H. M. et al. Extraction of cellulose nanocrystals from plant sources for application as reinforcing agent in polymers. **Composites Part B: Engineering**, v. 75, p. 176–200, 2015.

NISGOSKI, S.; MUÑIZ, G. I. B. DE; KLOCK, U. CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DA MADEIRA DE *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage. **Ciência Florestal**, v. 8, n. 1, p. 67–76, 2011.

NOBLES, M. K. A RAPID TEST FOR EXTRACELLULAR OXIDASE IN CULTURES OF WOOD-INHABITING HYMENOMYCETES. **Canadian Journal of Botany**, v. 36, n. 1, p. 91–99, jan. 1958.

ODEGA, L. T.; PETRI, D. F. S. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549–1558, 2010.

OZCIRAK ERGUN, S.; OZTURK UREK, R. Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. **Annals of Agrarian Science**, v. 15, n. 2, p. 273–277, 2017.

PECIULYTE, A. et al. Hydrolytic potential of five fungal supernatants to enhance a commercial enzyme cocktail. **Biotechnology Letters**, v. 39, n. 9, p. 1403–1411, 2017.

PEREIRA, S. S. P. et al. Disinfection with sodium hypochlorite in hospital environmental surfaces in the reduction of contamination and infection prevention: a systematic review. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 49, n. 4, p. 0681–0688, ago. 2015.

PHILIPPOUSSIS, A. et al. Biomass, laccase and endoglucanase production by *Lentinula edodes* during solid state fermentation of reed grass, bean stalks and wheat straw residues. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 285–297, 2011.

PLOMION, C.; LEPROVOST, G.; STOKES, A. Wood Formation in Trees. **PLANT PHYSIOLOGY**, v. 127, n. 4, p. 1513–1523, 1 dez. 2001.

RITTER, M. A. **Timber Bridges: Design, Construction, Inspection, and Maintenance**. [s.l: s.n.].

ROUCHES, E. et al. Improvement of anaerobic degradation by white-rot fungi pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 59, p. 179–198, 2016.

ROWELL, R. M. **Handbook of wood chemistry and wood composites**. CRC Press

ed. Florida: Taylor & Francis Group, 2005.

RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de. **Brasil Botanica**, v. 27, n. 2, p. 205–211, 2004.

SARKANEN, K. V.; TILLMAN, D. A. **Progress in Biomass Conversion: Volume 1**. [s.l.] Elsevier Ltd., 2013.

SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 263–289, 2010.

SÈBE, G. et al. Supramolecular structure characterization of cellulose II nanowhiskers produced by acid hydrolysis of cellulose i substrates. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 2, p. 570–578, 2012.

SHRESTHA, P. et al. Ethanol production via in situ fungal saccharification and fermentation of mild alkali and steam pretreated corn fiber. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8698–8705, 2010.

SINGH, S. et al. Cellulase in Pulp and Paper Industry. In: **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. [s.l.] Elsevier, 2016a. v. 61p. 152–162.

SINGH, S. et al. Cellulase in Pulp and Paper Industry. In: **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. [s.l.] Elsevier, 2016b. p. 152–162.

SINGH, S. et al. Cellulase in Pulp and Paper Industry. In: **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. [s.l.] Elsevier, 2016c. v. 91p. 152–162.

SINGHANIA, R. R. et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 7, p. 541–549, 2010.

SIQUEIRA, F. G. DE et al. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 64, n. 1, p. 20–26, 2010.

SIQUEIRA, F. G. DE; FILHO, E. X. F. Plant Cell Wall as a Substrate for the Production of Enzymes with Industrial Applications. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 7, n. June 2017, p. 54–60, 2010.

SIQUEIRA, G. et al. Morphological investigation of nanoparticles obtained from combined mechanical shearing, and enzymatic and acid hydrolysis of sisal fibers. **Cellulose**, v. 18, n. 1, p. 57–65, 2011.

SORIEUL, M. et al. Plant Fibre: Molecular Structure and Biomechanical Properties, of a Complex Living Material, Influencing Its Deconstruction towards a Biobased

Composite. **Materials**, v. 9, n. 8, p. 618, 26 jul. 2016.

SOUZA, H. Q. DE; OLIVEIRA, L. A. DE; ANDRADE, J. S. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 116–124, 2008.

SPEROTTO, R. A. **Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana**. 1. ed. Lajeado: Editora univates, 2014.

STICKLEN, M. B. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 6, p. 433–443, 1 jun. 2008.

SUMIT SHARMA et al. Biomass Conversion Technologies for Renewable Energy and Fuels: A Review Note. **IOSR Journal of Mechanical and Civil Engineering (IOSR-JMCE)**, v. 11, n. 2, p. 28–35, 2014.

SUTHANANTHAN, A. E.; KOEK, S. A.; SIEUNARINE, K. Cutaneous mucormycosis in an immunocompromised patient: a case report. **Journal of Surgical Case Reports**, v. 2017, n. 3, p. 536, 1 mar. 2017.

SZKLARZ, G. D. et al. Production of Phenol Oxidases and Peroxidases by Wood-Rotting Fungi. **Mycologia**, v. 81, n. 2, p. 234, mar. 1989.

TALEBNIA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4744–4753, 2010.

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 777–780, 1982.

TECHAPARIN, A.; THANONKEO, P.; KLANRIT, P. High-temperature ethanol production using thermotolerant yeast newly isolated from Greater Mekong Subregion. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 461–475, 2017.

TEIXEIRA, M. F. S. et al. **Fungos da Amazônia: Uma riqueza inexplorada (Aplicações Biotecnológicas)**. 1º ed. Manaus: Edua, 2011.

TEIXEIRA, T. S.; SIQUEIRA, F. G.; BATISTA, R. D. Enzimas Microbianas De Desconstrução Da Parede Celular: Novas Abordagens. **Revista Eletronica de Bioenergia**, v. 6, n. June, p. 27–37, 2016.

VALÁŠKOVÁ, V.; BALDRIAN, P. Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus*. **Research in Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 119–124, 2006.

VASCONCELOS, N. M. DE; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. DE S. **Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do**

**Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos.** Fortaleza: [s.n.].

WAN, C.; LI, Y. Microbial delignification of corn stover by *Ceriporiopsis subvermispora* for improving cellulose digestibility. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 47, n. 1–2, p. 31–36, 2010.

YINGHUI, Z.; YUANTING, K. T.; HOSMANE, N. S. Applications of Ionic Liquids in Lignin Chemistry. **Ionic Liquids - New Aspects for the Future**, v. 2, p. 315–346, 2013.

YOON, L. W. et al. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. **Biomass and Bioenergy**, v. 67, p. 319–338, 2014.