

# MICROMORFOLOGIA DA DEGRADAÇÃO DE MADEIRA DA ESPÉCIE AMAZÔNICA *Hura crepitans* L. POR FUNGOS LIGNOLÍTICOS PERTENCENTES A CLASSE HYMENOMYCETES<sup>(1)</sup>

Ademir CASTRO E SILVA<sup>(2)</sup>, Izonete de Jesus Araujo AGUIAR<sup>(3)</sup>

**RESUMO** – Foram estudadas as mudanças micromorfológicas e químicas que ocorrem na madeira de “açacu” *Hura crepitans* L. através de vários estágios de deterioração provocada pelos fungos *Pycnoporus sanguineus* (L.: F.) Murr, *Antrodia albida* (F.) Donk e *Tyromyces* sp. coletados nos arredores do município de Manaus, AM, Brasil. O microscópio eletrônico de varredura foi utilizado para a observação da extensão do ataque dos fungos aos diversos elementos xilêmicos de *Hura crepitans*. A otimização das condições de cultivo para os fungos foi estudada no que diz respeito ao efeito da temperatura e pH no crescimento micelial utilizando diferentes meios de cultura. Os fungos tendem a preferir um ambiente com pH entre 5.0-8.0 sendo o pH 6.0 o ótimo. A temperatura ótima ficou na faixa de 30-35 °C. Ocorreu a perda progressiva do teor de lignina. Os polissacarídeos são degradados simultaneamente com a lignina, sendo que esta é degradada no estágio inicial com razão superior a dos polissacarídeos especialmente para *P. sanguineus* e *Tyromyces* sp. A medida que a lignina é removida, a estrutura fibrilar da celulose na parede celular torna-se evidente. Os elementos de vaso são completamente destruídos no estágio inicial da deterioração. Ocorre o estreitamento da parede celular dos elementos fibrosos adjacentes aos raios com ataque à parede primária e secundária. No estágio mais avançado de deterioração ocorre a destruição dos raios e a formação de cristais (presumivelmente oxalato de cálcio).

**Palavras-chave:** madeira amazônica, deterioração, fungos, seletividade de lignina.

## Micromorphology of Wood Degradation of Amazonian Species *Hura crepitans* L. by Ligninolytic Fungi Belonging to Hymenomyces Class.

**ABSTRACT** – Changes in wood microstructure and chemistry of “Açacu” *Hura crepitans* L. through progressive stages of decay by *Pycnoporus sanguineus* (L.: F.) Murr, *Antrodia albida* (F.) Donk and *Tyromyces* sp. collected around Manaus, AM, Brazil were studied. Scanning Electron Microscopy (SEM) was used for observation on degree of attack to various xylematic elements of *Hura crepitans* L. (Euphorbiaceae). Optimization of growth for fungi tested in relation to the effect of temperature and pH on micelial growth in different medium were also studied. The fungi prefer an environment with pH range 5.0-8.0 and pH 6.0 as optimum. Temperature optimum range 30-35 °C. Occur progressive decrease on lignin content. Polysaccharides are degraded concurrently with lignin, which is degraded, in initial stage, on higher rate other than polysaccharide particularly to *Pycnoporus sanguineus* and *Tyromyces* sp. As lignin is removed the fibrillar structure of cellulose on cell wall become evident. Vessel elements are completely destroyed on initial stage of deterioration. Occur narrowing of fiber elements cell wall neighboring rays with attack to primary and secondary wall. At advanced stage of deterioration occur the ray's destruction and formation of crystals (presumably calcium oxalate).

**Key words:** amazonian wood, deterioration, fungi, lignin selectivity.

## INTRODUÇÃO

Vários aspectos da aplicação biotecnológica de fungos têm sido

explorados nos últimos anos, inclusive de caráter ambiental no tratamento de resíduos líquidos e biorremediação de

<sup>1</sup>Parte do trabalho de Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas – Convênio INPA/FUA.

<sup>2</sup>Instituto de Tecnologia da Amazônia – UTAM, Manaus, AM.

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Manaus, AM.

solos poluídos, mineralogia e biohidrometalurgia, produção de biomassa, tecnologia de combustíveis, particularmente na solubilização do carvão e emprego em controle biológico. Castro e Silva *et al.* (1993), por exemplo, mostraram o possível potencial que *Pycnoporus sanguineus* possui para clarificação de efluentes da indústria papelreira. Este fungo pertence aos causadores de podridão branca, capazes de degradar a lignina, e que têm sido cada vez mais empregados em indústria de polpa de madeira e papel. Estudos têm sido realizados buscando-se a degradação seletiva de lignina durante a biodegradação, considerando-se que poderia ser aplicada em alguns estágios do processo de produção de polpas celulósicas uma vez que um pré-tratamento dos cavacos pode proporcionar uma economia de cerca de 50% de energia no processo termomecânico (Ericksson, 1985; 1990; Jurasek & Paice, 1988; Leathan *et al.*, 1989; Durán *et al.*, 1990). Estudo sobre a biodegradação de cavacos de madeira mostrou um rendimento de polpa após um estágio posterior de polpação kraft de até cerca de 6% superior a um controle não biodegradado (Oriran *et al.*, 1990).

Um dos aspectos importante de se conhecer para que se possa utilizar fungos para fins industriais, diz respeito ao conhecimento da maneira que tais microorganismos degradam diferentes células da madeira e como se dá o processo responsável por essa degradação.

A anatomia do hospedeiro e a

estrutura da parede celular dos vários tipos de células são fatores decisivos na determinação do padrão da deterioração que ocorre particularmente entre os fungos que são seletivos da lignina (Ander & Eriksson, 1977; Reuel *et al.*, 1981; Otjen & Blanchette, 1982). Estudos micromorfológicos em madeiras da América do Norte e Europa indicam que a lamela média, por exemplo, é relativamente resistente ao ataque até o último estágio de degradação (Cowl- ing, 1961; Liese, 1970; Eriksson, 1981). Portanto, conhecendo-se o modo básico de ação, requerido pelos fungos para tornar os carboidratos da parede celular acessível a enzimas, através da utilização do microscópico eletrônico na identificação de fungos capazes de degradar a lignina, poderá facilitar o entendimento do mecanismo pelo qual o fungo de podridão branca é capaz de deteriorar a madeira. Este tipo de conhecimento é essencial para aprimorar a bioconversão da biomassa lenhosa florestal.

Assim, em razão da escassez de informações na literatura sobre as cepas amazônicas de *Pycnoporus sanguineus* (L.:F) Murr, *Antrodia albida* (F.) Donk e *Tyromyces* sp. coletados em ambiente natural, no que diz respeito ao modo de ataque desses microorganismos aos diversos elementos celulares do xilema de madeiras amazônicas, o presente trabalho tem como objetivos determinar além dos aspectos relacionados com a fisiologia destes fungos, tais como, crescimento e condições ótimas de cultivo, os

aspectos morfológicos da deterioração da madeira de "açacu" *Hura crepitans* L. (Euphorbiaceae).

A capacidade destes fungos de degradar os componentes químicos da parede celular dos diversos elementos xilêmáticos de *H. crepitans* também será estudada.

## MATERIAL E MÉTODO

Corpos frutíferos de *Pycnoporus sanguineus*, *Antrodia albida* e *Tyromyces* sp. foram coletados em diversas serrarias, capoeiras e terrenos baldios do perímetro urbano de Manaus durante o período de um ano e quatro meses.

A identificação dos fungos foi baseada em Cavalcanti (1976), Ryvarden & Johansen (1980), enquanto que a identificação da madeira foi realizada através da análise microscópica e comparação com madeira identificada botanicamente registrada no Laboratório de Anatomia da Madeira do Instituto de Tecnologia da Amazônia-UTAM. O isolamento dos fungos seguiu o método proposto por Bettucci & Guerrero (1971). Após o crescimento, a cepa foi conservada em óleo mineral. Os meios empregados para plaqueamento foram: Sabourad-dextrose-ágar (BBL) e ágar-malte (DIFCO), ambos acrescidos de cloranfenicol 200 mg, utilizando-se glicose e maltose como principais fontes de carbono. A quantificação do crescimento fúngico foi realizada através da medição diária do aumento do diâmetro da colônia. O pH ótimo

para crescimento dos fungos foi determinado medindo-se a taxa de crescimento dos fungos em placa de petri com meio de cultura ágar-malte, tamponado com tampão fosfatado para valores iniciais de pH entre 3,0 e 8,0. O pH foi ajustado antes da autoclavagem dos meios de cultura, sendo que, para evitar a degradação do ágar abaixo do pH 5,0, também foi realizado o ajuste após a autoclavagem. Foi realizada uma medição diária para cada pH a intervalo de duas horas, durante o período de sete dias após crescimento micelial.

Para estudo do efeito da temperatura no crescimento micelial foi analisada a faixa de temperatura de 20-30 °C, com intervalo de 5 °C. As placas de petri com blocos de ágar de 0,6 mm<sup>2</sup> dos fungos crescidos nos meios utilizados foram mantidas em câmara à temperatura pré-determinada. Para cada estudo de temperatura e pH os testes foram realizados em quadruplicata.

Blocos de madeira de *Hura crepitans* de 2x2x3 cm foram obtidos de pranchas oriundas de diferentes árvores e utilizadas para determinar as perdas de massa durante o período de degradação. Os blocos foram retirados somente do alburno para se evitar a influência dos extrativos que poderiam inibir o crescimento fúngico. A intervalo de quatro semanas, durante cinco meses, os blocos foram retirados, pesados e colocados na estufa a 105 °C e a perda de massa de cada bloco, devida à degradação, foi expressa como porcentagem do peso seco original.

Foi realizado o isolamento dos constituintes químicos da madeira de *Hura crepitans* em várias etapas de deterioração. O teor de glucana, xilana, acetil e lignina foi determinado a partir de hidrólise com ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 72%. Os teores de açúcar foram determinados por cromatografia líquida em cromatógrafo HP 1082 utilizando coluna BIORAD HPX-87X e  $H_2SO_4$  0,01N e 0,6 ml/min como efluente e um detector de índice de refração. O teor de lignina solúvel foi determinado através da leitura da absorção em 205 nm, tomando-se como base a absorvidade da lignina neste comprimento de onda como 105 l/(g.cm).

O índice de seletividade da lignina dos fungos estudados foi calculado de acordo com o proposto por Nishida *et al.* (1988) através da relação lignina insolúvel/holocelulose. No presente estudo o teor de celulose foi obtido pela seguinte equação: holocelulose = S - (LI + LS), onde : S = peso específico da amostra, LI = lignina insolúvel e LS = lignina solúvel (Nishida *et al.*, 1988).

As amostras de madeira para análise ao microscópico eletrônico de varredura Hitachi H300 foram fixadas em 2% (p/v) glutaraldeído em 0,1 M tampão de cacodilato, pH 7,4 por 24 horas de osmificação (1%  $O_5 O_4$  em 0,1 M tampão de cacodilato) por duas horas e lavadas durante cinco minutos no tampão. Posteriormente, foram desidratadas em uma série de acetona e etanol, secas ao ponto-crítico em um Hitachi Critical Pointer Dryer- HCP2, e montadas em suporte de alumínio.

As amostras foram analisadas e fotografadas a uma aceleração de 16 kv.

## RESULTADOS

### Efeito da Temperatura e pH no Crescimento

A massa micelial de *Antrodia albida* e *Tyromyces* sp. apresentou-se de cor branca algodonosa com pigmentação de cor amarela. Durante o crescimento micelial observou-se a formação de pigmentação amarela na parte superior dos blocos da madeira de *Hura crepitans*. Por outro lado, no estágio inicial de crescimento micelial de *Pycnoporus sanguineus* nos blocos de madeira, a colônia apresentou cor branca e pigmentação cor-de-rosa, tornando-se laranja-escuro com o passar do tempo.

No período inicial de 24 horas, à temperatura de 20 °C não ocorreu crescimento micelial de *Pycnoporus sanguineus* nos meios utilizados. Nas outras temperaturas testadas, 24 horas após o início do cultivo já se observa crescimento micelial tanto para *P. sanguineus*, *A. albida* e *Tyromyces* sp. Foi na faixa de 30-35 °C que ocorreu maior desenvolvimento do micélio. Observou-se, entretanto, que para o meio de cultura de ágar-malte os fungos apresentaram um maior crescimento micelial na temperatura de 35 °C. O ótimo térmico obtido para os três fungos em torno de 30-35 °C é compatível com as condições de temperatura ambiental em que comumente são encontrados. Durante a coleta de campo, somente encontrou-

se esses fungos no período do verão quando a temperatura chega a oscilar entre 28 e 35 °C.

As curvas de pH para todos os fungos foram similares e observou-se uma preferência por ambiente um pouco ácido. A faixa de pH 5,0-8,0 é a melhor para crescimento dos fungos estudados, sendo o pH 6,0 o ótimo.

### Perda dos Componentes Químicos

Ocorreu um aumento progressivo na perda de massa dos blocos de madeira (Tab. 1). A análise química dos blocos revela a perda progressiva do teor de lignina, quando comparado com aquele da madeira sem ataque. Com exceção de *Antrodia albida*, que mostrou diferença no teor de lignina após doze semanas de ataque, *P. sanguineus* e *Tyromyces* sp. mostraram já nas quatro primeiras semanas de ataque, maior preferência por lignina aparentemente com ataque

concomitante de celulose (Tab. 1). *Antrodia albida* e *Tyromyces* sp. tornam-se preferenciais de hemicelulose num estágio mais avançado. Pouco acetil foi utilizado. O aumento no teor de cinzas da madeira de "açacu" *Hura crepitans* com o avanço da deterioração, muito embora não tenha apresentado diferença significativa dentro de cada tratamento, indica um acúmulo de constituintes inorgânicos, a presença de manganês e outros íons.

### Taxa de Seletividade

*P. sanguineus* e *Tyromyces* sp. degradam consideravelmente a lignina e a capacidade de degradação é muito seletiva a julgar pelo baixo valor da relação de lignina insolúvel para holocelulose quando comparada com a madeira sem ataque (Tab. 2). Todos os fungos mostram alguma

**Tabela 1.** Dados da perda de massa e análise química em diferentes períodos de ataque.

Tempo (semanas)	Perda massa(%)	Lignina (%)	Glucana (%)	Xilana (%)	Acetil (%)	Cinzas (%)
<i>Antrodia albida</i> (F.) Donk						
4	16,5b	27,1a**	-	-	-	-
8	42,7a	27a	42,1a	12a	2a	2,2a
12	56,5c	20b	40,6a	11,4a	1,4a	2a
<i>Tyromyces</i> sp.						
4	8,2b	20,5b	61,2b	13,8b	2,4a	0,9a
8	48,74a	28,2a	38,9a	17,5a	1,9a	2,1a
12	51,71a	28,5a	40,5a	18a	2a	2a
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (L.: F.) Murr.						
4	17,68b	19,5b	63,8b	10,8a	1,8a	0,9a
8	39,04a	26,3a	49,9a	12,6a	1,9a	2a
12	42,96a	26,3a	44,7a	10,9a	1,8a	1,9a
Controle*		32,4	43,6	12,4	1,8	1

\* Refere-se a determinação do teor dos constituintes químicos da madeira sem ataque.

\*\* Médias na coluna dentro do tratamento seguida pela mesma letra não são diferentes no nível de 5%.

**Tabela 2.** Taxa de seletividade da lignina determinada pela relação lignina insolúvel/holocelulose em diferentes períodos de ataque.

SEM ANOS	Antrodia albida (F.) Donk.			Tyromyces sp.			Pycnoporus sanguineus (L.:F.) Murr.		
	SEMANAS								
	(%)	4	8	12	4	8	12	4	8
Lignina insolúvel, LI	20,3	26,7	19,6	20,1	27,8	28,1	19,1	25,8	25,8
Holocelulose, H (1)	81,4	72,9	73	79,5	71,5	71,5	80,5	73,7	73,6
Taxa LI/H (2)	0,26	0,36	0,36	0,21*	0,38	0,38	0,23*	0,35	0,35

Controle (taxa LI/H da madeira sã) = 0,28

(1) Calculada pela diferença dos componentes total.

(2) Os valores menores do que o controle (0,28), indicados por asteriscos, mostram remoção seletiva da lignina.

seletividade para lignina em algum período da deterioração. Nas quatro primeiras semanas *P. sanguineus* e *Tyromyces* sp. removeram seletivamente mais lignina do que celulose. Após esse período os carboidratos da madeira que estavam sendo envoltos pela lignina tornam-se susceptíveis ao ataque enzimático como resultado da remoção preferencial ou seletiva dessa lignina.

### Aspectos Morfológicos da Deterioração da Madeira de *Hura crepitans*

#### *Antrodia albida*

As hifas deste fungo, inicialmente, mostraram-se finas ( $1,5 \pm 0,5 \mu\text{m}$  diâm.) e escassas no início do ataque e, a medida que o período de deterioração aumenta, tornam-se mais numerosas (Fig. 1). Nos últimos estágios de degradação os raios tornaram-se bastante atacados, e poucas hifas foram encontradas nos elementos de vaso. As hifas presentes nos

estágios mais avançados de deterioração eram mais espessas do que aquelas do estágio inicial.

Assim como os demais fungos estudados, só uma simples hifa ou algumas vezes um par de hifas foram encontrados no lume das fibras.

Este fungo mostrou-se seletivo de lignina no início do ataque que começou pela colonização dos elementos de vaso e células dos raios. A movimentação de uma célula para outra é geralmente em sentido longitudinal no lume da célula, penetrando na parede celular através do canal de pontuação. A medida que a lignina é removida da parede celular a estrutura fibrilar da celulose na parede celular torna-se evidente (Figs. 2 e 3). Esta característica morfológica de deterioração da parede celular identifica que a deslignificação é seletiva. Os elementos de vaso e parênquima axial (Fig. 4) e células eretas e procumbentes do parênquima radial (Fig. 5) são

rapidamente colonizadas.

Durante o estágio inicial de deterioração o fungo movimentase verticalmente através dos elementos de vaso colonizando, posteriormente, as células parenquimáticas adjacentes, e em estágio mais avançado ataca as células radiais. Ao que parece, no estágio inicial as células dos raios interferem com a capacidade enzimática do fungo. Cristais estão presentes nas células do parênquima axial (Fig. 6).

A tabela 3 mostra as

características microscópicas visíveis nos estágios de deterioração da madeira por *Antrodia albida*.

#### *Tyromyces* sp.

A seção transversal da madeira de *Hura crepitans* atacada mostra as células xilemáticas mais severamente degradadas (Fig. 7; Tab. 4). Observa-se a completa destruição dos raios assim como uma progressiva remoção da parede secundária da parede celular a partir da camada S2, mas na maioria das vezes esta camada tinha desaparecido completamente.

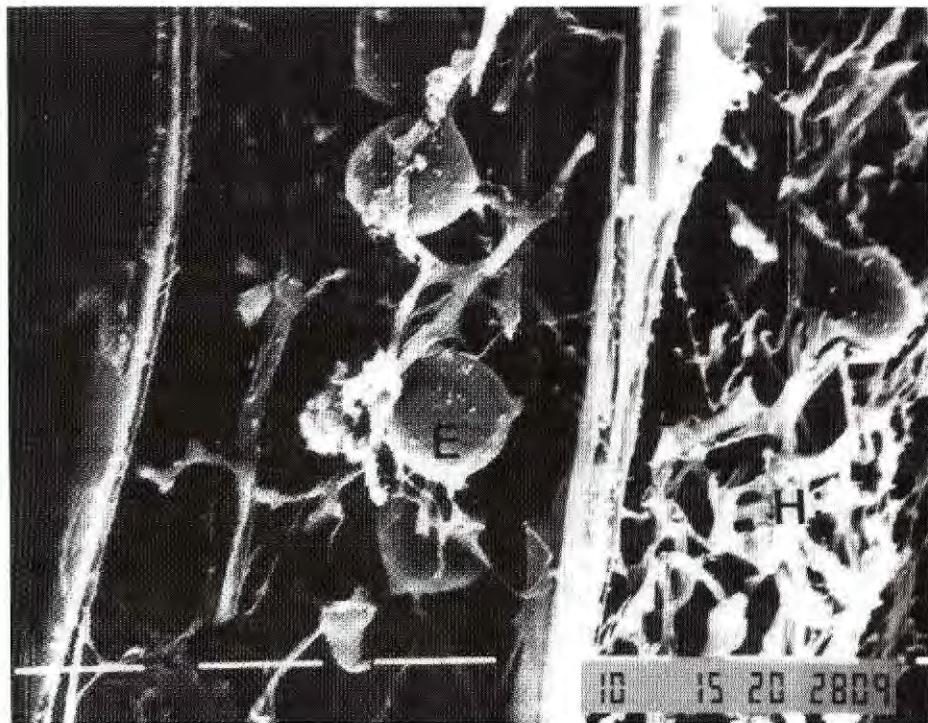
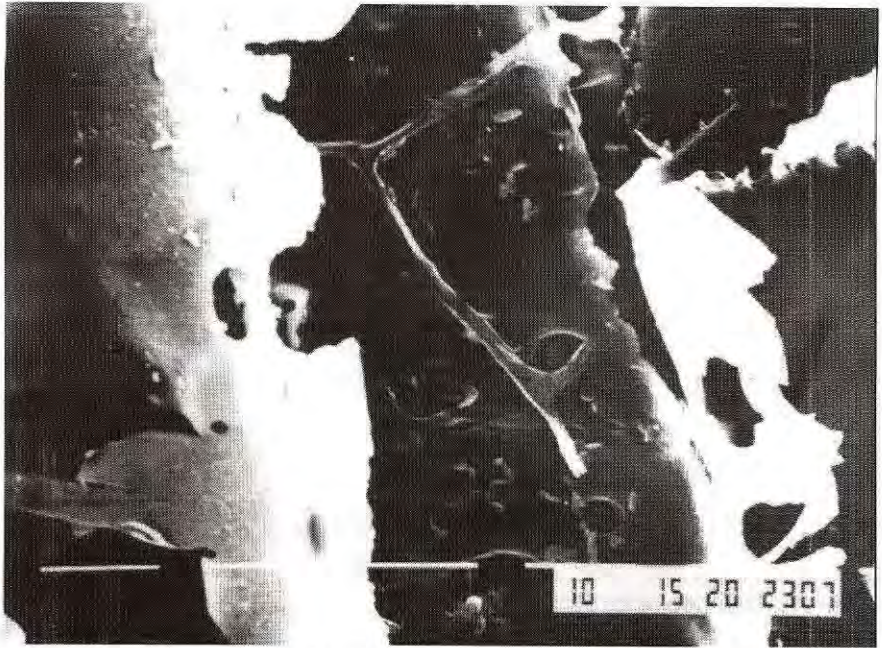
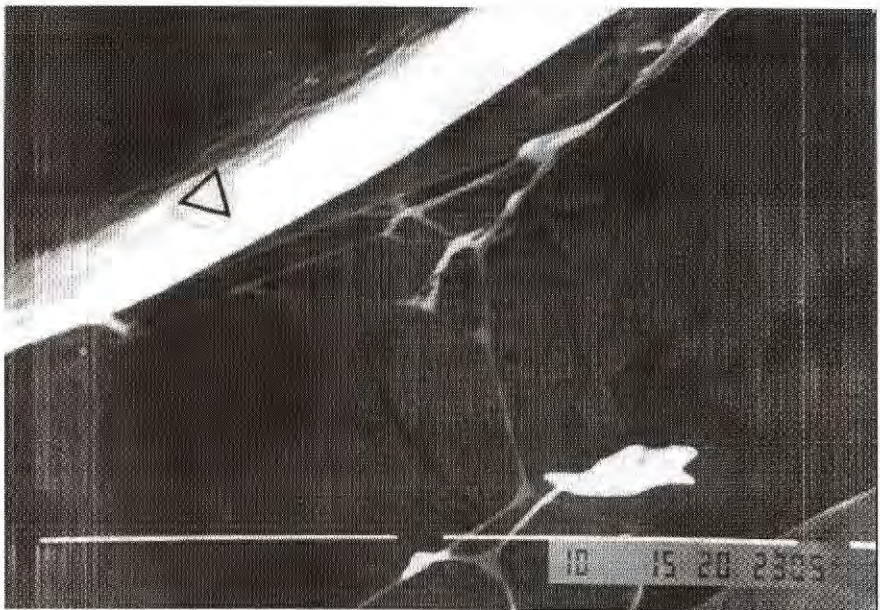


Figura 1. Corte tangencial mostrando hifas(H) e esporos (E) de *Antrodia albida* num período de 12 semanas de ataque (1.600X).

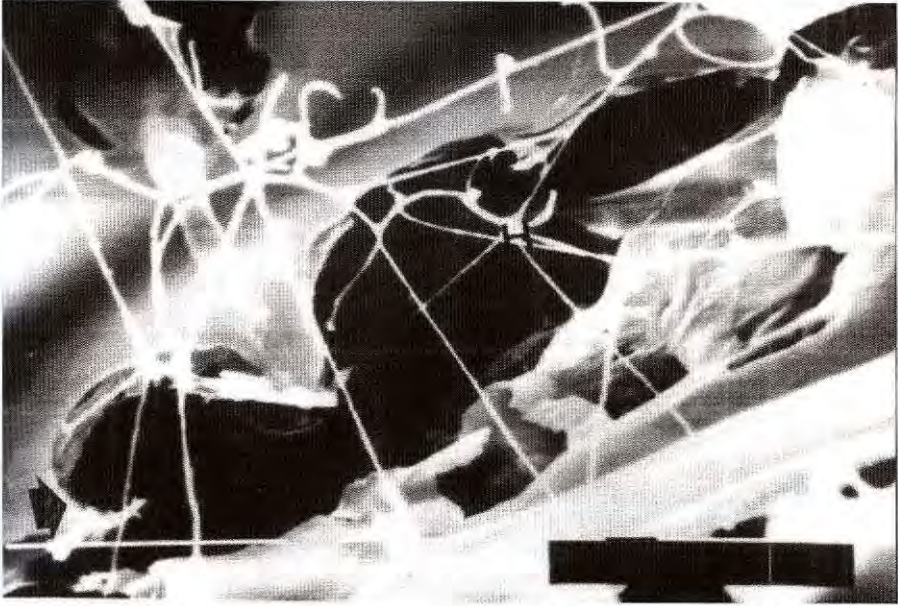


**Figura 2.** Hifa de *Antrodia albida* penetrando no lume de uma célula parenquimática através da pontuação na parede celular (1.600X).

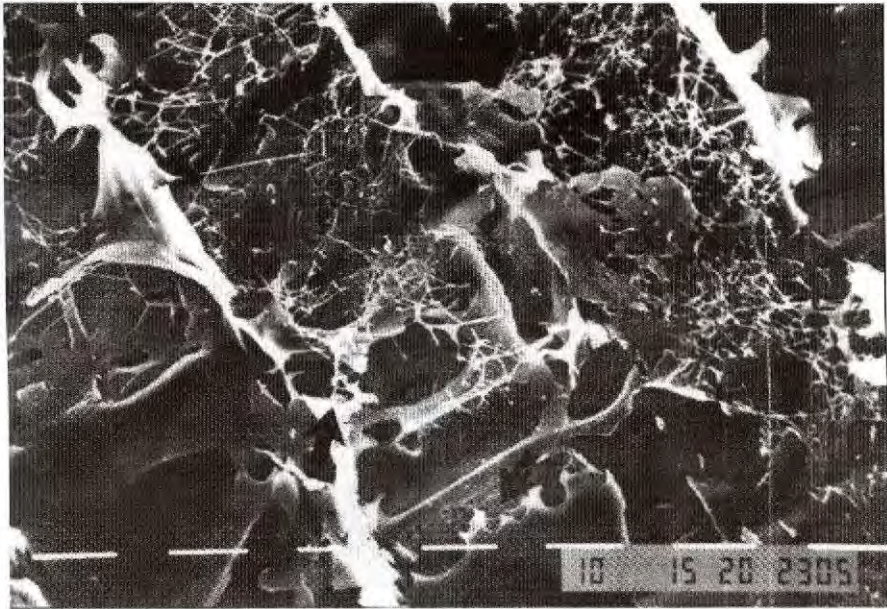


**Figura 3.** Parede celular de uma fibra vista no corte tangencial onde se observa a estrutura fibrilar da celulose (4.800X).

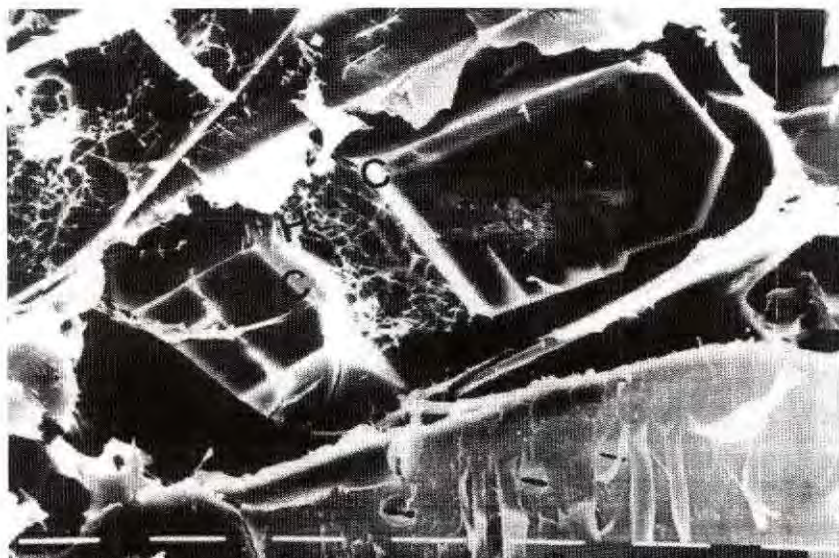




**Figura 4.** Célula de parênquima axial no corte tangencial completamente atacada por hifas de *Antrodia albida*. Observa-se a completa destruição das pontuações simples da parede celular (3.500X).



**Figura 5.** Resquício da parede celular de células procumbentes destruídas por *Antrodia albida* com 12 semanas de ataque (corte radial)(1.100X).



**Figura 6.** Presença de cristal do tipo rombóide em células do parênquima axial em amostra atacada por *Antrodia albida* (corte tangencial). Presença freqüente de hifas (1.100X).

**Tabela 3.** Características microscópicas visíveis nos estágios de deterioração da madeira de "açacu" *Hura crepitans* L. por *Antrodia albida* (F.) Donk.

Observação	Estágio inicial (80-100% P.R.)	Estágio intermediário (60-80% P.R.)	Estágio avançado (0-60% P.R.)
Distribuição da hifa	Elementos de vasos e células do parênquima axial com bastante hifas, algumas colonizam os raios	Várias hifas nos elementos de raios e algumas no lume das fibras	Hifas numerosas nos raios
Movimentação das hifas de uma célula para outra	Através das pontuações nas paredes dos elementos	Através dos orifícios na parede celular	Aumento dos orifícios a medida que colonizam as células
Efeito nas células do parênquima radial	Pouco ataque	Mais ataque às células individuais dos raios	Ataque severo e destruição das células eretas e procumbentes
Efeito nos elementos de vaso	Ataque severo aos elementos de vaso	Pouco ataque	Pouco ataque
Mudanças na microestrutura da parede celular das fibras	Pouco ataque à parede celular	Início da separação das paredes celulares; lamela média atacada; remoção inicial da lignina da lamela média	Ataque mais severo à camada S2 e e parede primária

P.R. (Peso Residual) - Calculado subtraindo-se o peso perdido em porcentagem.

Ocorre o estreitamento da parede celular dos constituintes anatômicos de *H. crepitans*. A camada gelatinosa da parede celular não foi atacada por este fungo mesmo num estágio avançado (Fig. 8). Observa-se a completa destruição da parede celular, mas a camada gelatinosa, característica de madeira de tensão, continua intacta. À medida que se aproxima da parede primária, este fungo muda o tipo de ataque conforme evidenciado pelos orifícios encontrados em algumas amostras deterioradas por este organismo (Fig. 9). Assim como acontece com *Antrodia albida*

observou-se num estágio mais avançado de degradação, a presença de cristais presumivelmente de oxalato de cálcio.

As células dos raios foram deslignificadas assim como a lamela média. Posteriormente, ocorreu o ataque não seletivo à parede primária com a formação de orifícios característicos de fungos de podridão branca (Fig. 9). Ao que tudo indica, *Tyromyces* sp. causa dois tipos distintos de deterioração. O estreitamento da parede celular dos constituintes anatômicos de *Hura crepitans* leva a crer que

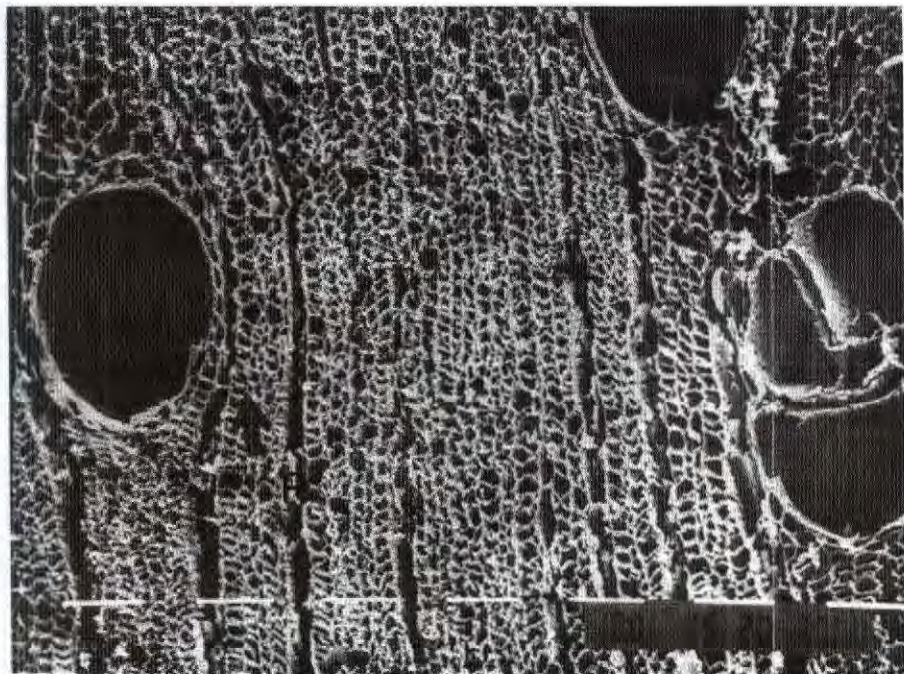


Figura 7. Corte transversal mostrando ataque de *Tyromyces* sp. Observa-se a completa destruição dos raios, o estreitamento da parede celular das fibras e a presença de pontuações na parede celular de um vaso múltiplo (1.100X).

ocorreu devido a um ataque com liberação de enzimas que têm capacidade de degradar lignina seletivamente. Por outro lado, a presença de orifícios na parede celular num estágio mais avançado de deterioração indica ataque a todos os polissacarídeos. Com a eliminação da lamela média o fungo teve a oportunidade de iniciar a degradação da parte externa da parede primária contígua à lamela média. Isto evidência um padrão totalmente diferente daquele comumente encontrado onde o

fungo inicia seu ataque simultâneo a partir do lume através da camada S3 da parede secundária.

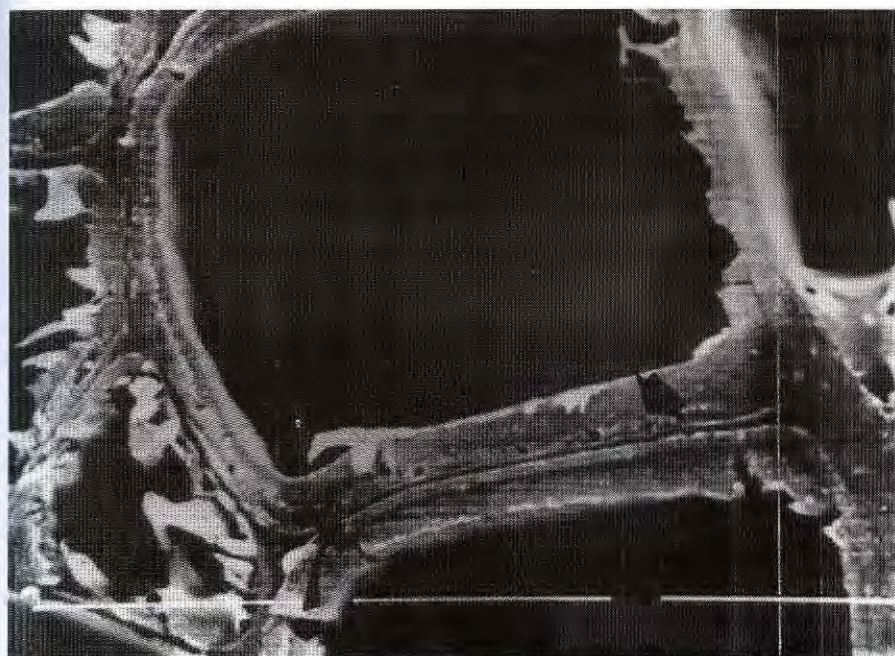
### *Pycnoporus sanguineus*

Durante o estágio inicial de ataque, o fungo move-se através dos vasos (Tab. 5). Mesmo com a presença de tiloses obstruindo os vasos, as hifas de *Pycnoporus sanguineus* colonizam os elementos de vasos e penetram na tilose.

Com oito semanas de ataque os raios estão degradados, mas a maioria dos elementos fibrosos



**Figura 8.** Corte transversal mostrando a camada gelatinosa que não foi atacada por *Tyromyces* sp. Não se observa a parede celular das fibras (1.500X).



**Figura 9.** Corte transversal mostrando a parede primária de uma fibra adjacente a outra ainda intacta. Nota-se a separação da lamela média (3.500X).

**Tabela 4.** Características microscópicas visíveis nos estágios de deterioração da madeira de “açacu” *Hura crepitans* L. por *Tyromyces* sp.

Observação	Estágio inicial (80-100% P.R)	Estágio intermediário (60-80% P.R)	Estágio avançado (0-60% P.R.)
Distribuição da hifa	Elementos de vaso e células do parênquima axial	Colonização dos elementos de raios, algumas fibras com hifas no seu lume	Hifas numerosas nos raios
Movimentação das hifas de uma célula para outra	Através das pontuações nas paredes dos elementos	Pouco através da pontuação; maioria através de orifícios	Diâmetro dos orifícios maiores do que o diâmetro da abertura da pontuação
Efeito nas células do parênquima radial	Pouco ou nenhum ataque às células individuais dos raios	Ataque às parede celulares dos raios	Completa destruição das células eretas e procumbentes dos raios
Efeito nos elementos de vaso	Ataque severo aos elementos de vaso	Pouco ataque	Pouco ataque ou nenhum
Mudanças na microestrutura da parede celular das fibras	Pouco ataque ou nenhum ataque à parede celular das fibras	Início do ataque à parede primária	Ataque mais severo da parede primária, e posterior ataque à camada S1 da parede secundária

P.R. (Peso Residual) - Calculado subtraindo-se o peso perdido em porcentagem.

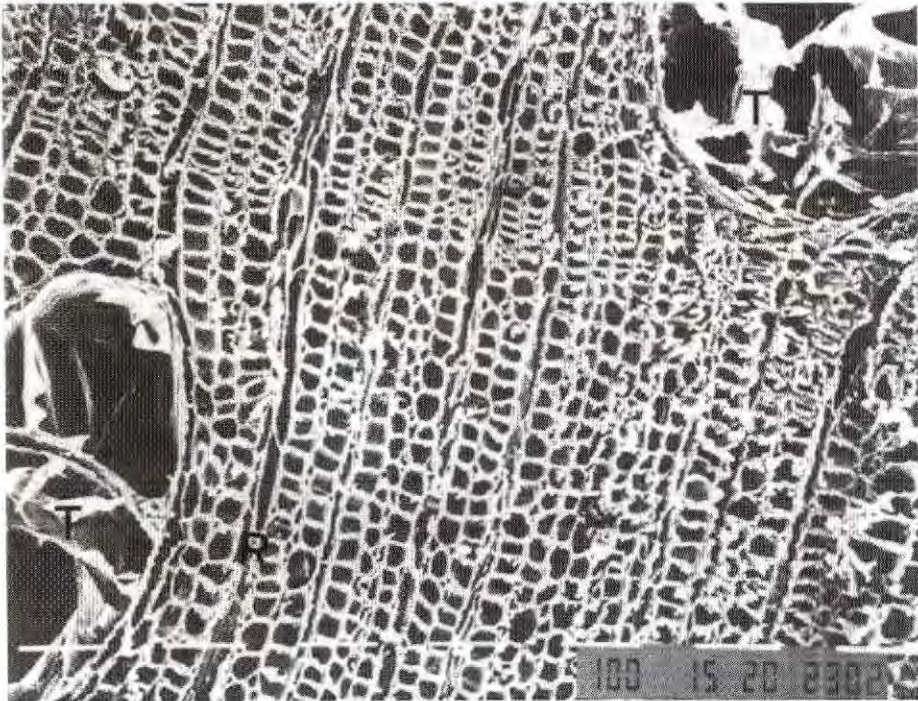
ainda se apresenta com a parede celular intacta (Figs 10 e 11). Neste estágio de deterioração o ataque à parede celular ocorre mais intensamente nas células adjacentes aos vasos e que fazem parte da camada de crescimento. Observa-se também o estreitamento da parede celular dos elementos fibrosos adjacentes aos raios (Fig. 11). Assim como *Tyromyces* sp. apresenta também dois tipos distintos de deterioração da parede celular.

A medida que a lignina é removida da parede celular a

estrutura fibrilar da celulose na parede celular torna-se evidente (Fig. 12) indicando uma seletividade da lignina.

## DISCUSSÃO

A análise da parede celular dos materiais ligninocelulósicos ao microscópio eletrônico depois da incubação com organismos que os degradam fornece uma indicação segura da degradação da lignina e celulose, e eventualmente da seletividade desses eventos. Entretanto, a análise química dos blocos atacados é também essencial para se alcançar resultados



**Figura 10.** Corte transversal mostrando a degradação dos raios e das células fibrosas ao redor do elemento de vaso contendo tilose (T) por *Pycnoporus sanguineus* com oito semanas de ataque. Nota-se que o ataque às fibras não foi ainda total (1.100X).

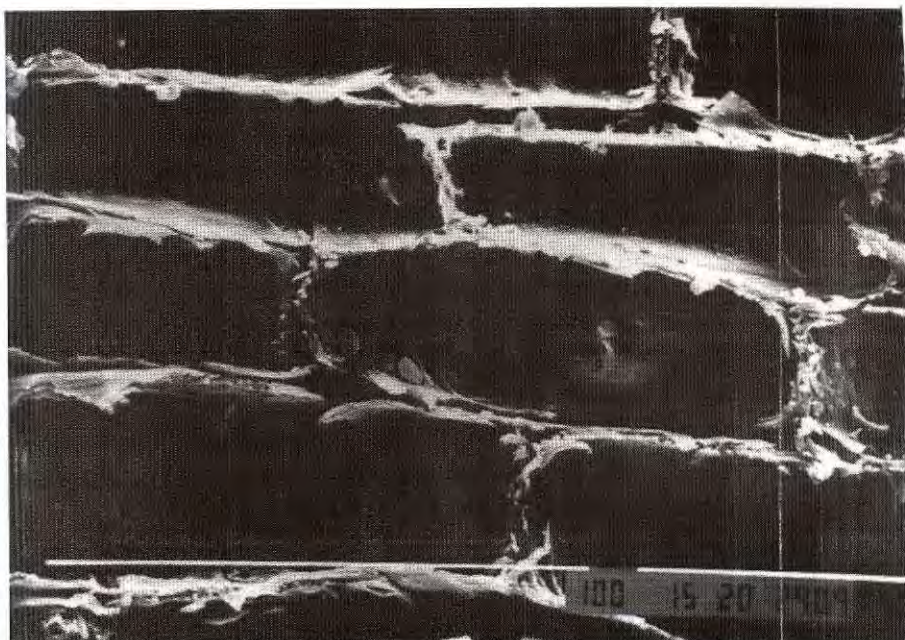


Figura 11. Corte radial mostrando a completa destruição das células do parênquima radial por *Pycnoporus sanguineus* com oito semanas de ataque (700X).

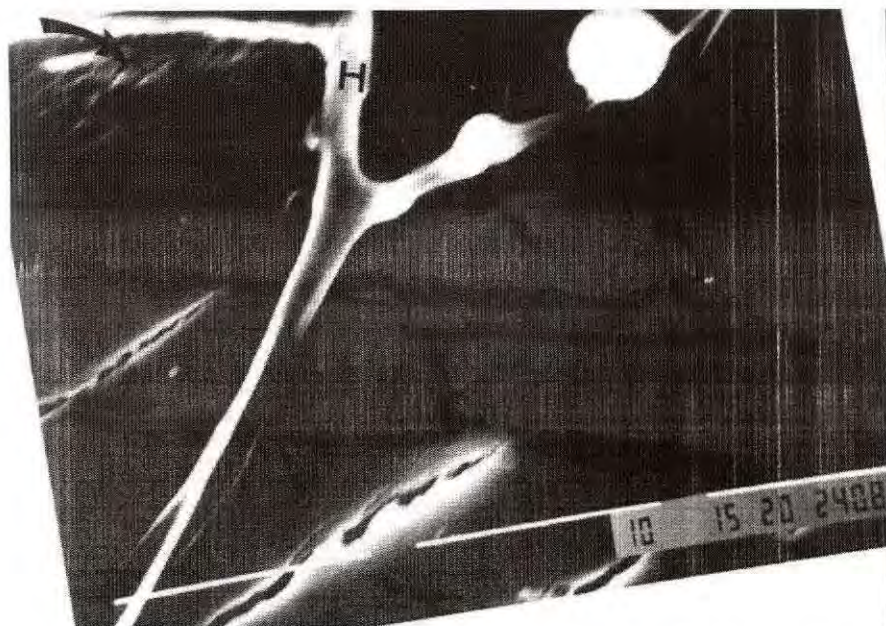


Figura 12. Estrutura fibrilar da parede de uma fibra. Nota-se a presença de hifa (H) de *Pycnoporus sanguineus* (3.600X).

**Tabela 5.** Características microscópicas visíveis nos estágios de deterioração da madeira de “açacu” *Hura crepitans* L. por *Pycnoporus sanguineus* (L.:F.) Murr.

Observação	Estágio inicial (80-100% P.R)	Estágio intermediário (60-80% P.R)	Estágio avançado (0-60% P.R.)
Distribuição da hifa	Várias nos elementos de vasos e células do parênquima axial	Decréscimo do nº hifas nos elementos celulares anteriores, várias nos raios e algumas no lume das fibras	Esparsa nas fibras, elementos de vaso e parênquima axial, numerosas nos raios
Movimentação das hifas de uma célula para outra	Através das pontuações nas paredes dos elementos	Através de orifícios na parede celular; diâmetro das hifas ligeiramente menor do que no lume	Diâmetro das pontuações e dos orifícios quase que iguais; ambas maiores
Efeito nas células do parênquima radial	Pouco ou nenhum ataque	Ataque das células individuais dos raios	Ataque severo e destruição das células individuais
Efeito nos elementos de vaso	Ataque severo aos elementos de vaso	Pouco ataque	Pouco ataque ou nenhum
Mudanças na microestrutura da parede celular das fibras	Pouco ou nenhum ataque à parede celular. Geralmente cama da S3 é ligeiramente atacada	Início da separação das paredes celulares; lamela média atacada; remoção inicial da lamela média	Destruição das camadas S1 e S2 separação total das células devido ao ataque da parede primária e remoção de lignina da lamela média

P.R. (Peso Residual) - Calculado subtraindo-se o peso perdido em porcentagem.

conclusivos (Otjen *et al.*, 1987; Blanchette *et al.*, 1988).

Baseado na análise química dos blocos de madeira “açacu” *Hura crepitans*, os fungos estudados causaram apreciáveis perdas de lignina e holocelulose. As perdas causadas por estes fungos de podridão branca foram consideradas típicas; somente *P. sanguineus* e *Tyromyces* sp. apresentaram seletividade por ligninas nas primeiras quatro semanas de

ataque conforme indicado pelo baixo valor da relação lignina/holocelulose comparado com valor da madeira sem ataque.

*P. sanguineus* já foi reportado (Castro e Silva *et al.*, 1993) como causador de deslignificação da madeira da espécie amazônica *Parkia oppositifolia* assim como mostrou ataque severo à lignina de *Eucalyptus grandis* (Durán *et al.*, 1993). Entretanto, apresentou pequena perda



de peso e não degradou seletivamente a lignina quando testado em *Pinus* (Dr. André Ferraz FAENQUIL/SP "comunicação pessoal"), o que não causa surpresa visto que a lignina difere da frequência relativa de certas estruturas químicas e essa diferença é especialmente grande até mesmo entre diferentes espécies de angiospermas (Sarkanen & Ludwig, 1971; Kirk *et al.*, 1975).

Se a degradação da lignina é causada por um mecanismo de oxidação conforme sugerido por vários autores, então a habilidade do *P. sanguineus* para degradar diferentemente a madeira proveniente de ambiente diferente do amazônico, pode estar relacionado a outros fatores genéticos ou ambientais que afetam o crescimento fúngico nesses substratos.

Após o período de quatro semanas os fungos testados causaram ataque simultâneo ou remoção preferencial da holocelulose conforme indicado pelo alto valor da relação lignina/holocelulose quando comparado com aquela da madeira não atacada. Tudo indica que os carboidratos da madeira que estavam "protegidos" pela lignina tornaram-se susceptíveis ao ataque enzimático como resultado da remoção preferencial ou seletiva da lignina em volta. Por outro lado pode acontecer que estes fungos possam utilizar a hemicelulose principalmente por causa da sua proximidade física com a lignina na parede celular (Fengel, 1970; Kerr & Goring, 1975) e não porque necessite de grande quantidade desses carboidratos para degradar a

lignina.

Dos fungos estudados *Tyromyces* sp. causou extensiva perda de holocelulose num período de doze semanas. Geralmente fungos conhecidos como "deslignificadores" (podridão branca) causam perda mínima de glucose nas folhosas (Blanchette *et al.*, 1988; Adaskaveg *et al.*, 1990). Entretanto, Adaskaveg *et al.* (1991) indicaram perda de holocelulose na palmeira *Phoenix canariensis* degradada por *Phanerochete chrysosporium* e *Ganoderma zonatum* conhecidos deslignificadores da madeira. Esses resultados são diferentes dos geralmente encontrados para fungos de podridão parda. Kirk & Highley (1973), por exemplo, determinaram grande perda de glucana e xilana em *Picea abies* atacada por *Poria monticola*, enquanto que Blanchette & Abad (1988) observaram também grande perda desses mesmos polissacarídeos em *Betula papyrifera* atacada por *Fomitopsis pinicola* ambos conhecidos como fungos de podridão parda.

A diminuição na razão da perda em lignina depois de doze semanas ocorrida na madeira estudada pode ser devido à excreção de lacase pelo fungo num estágio avançado de deterioração. Esta enzima polimeriza a lignina via ligação de grupos hidroxílicos fenólicos (Ishihara & Ishihara, 1976). A lacase, por exemplo, foi detectada em *P. sanguineus* quando inoculado em meio contendo alto teor de açúcar, i.e., extrato de malte (Castro e Silva *et al.*, 1993).

Os requisitos energéticos para a degradação da lignina são tão grandes que os fungos necessitam de uma fonte adicional de energia facilmente acessível servindo assim os polissacarídeos como co-substrato (Eriksson *et al.*, 1980). *P. sanguineus*, por exemplo, foi que mais degradou xilana dentre os fungos estudados e provavelmente possui xilanases que produzem xilose, necessária para suprir a demanda de energia requerida e também para a produção de peróxido de hidrogênio (Eriksson, 1988).

Castro e Silva *et al.* (1993) detectaram a produção de xilanase por *P. sanguineus* em meio de cultura utilizando a madeira amazônica *Parkia oppositifolia* como fonte de carbono. Este fungo, comparado com os outros dois incluídos neste estudo, é o que mais requer energia adicional para o ataque da lignina. Curiosamente a xilana num período de doze semanas de ataque por *P. sanguineus*, praticamente alcança quase que o mesmo nível da primeira semana provavelmente devido a alguma inibição das enzimas por algum metabólito tóxico na biomassa final.

Em geral, fungos de podridão parda causam uma rápida despolimerização da celulose (Cowling, 1961; Eriksson *et al.*, 1980), enquanto que fungos de podridão branca causam uma degradação gradual da celulose e utilizam rapidamente os produtos dessa degradação (Eriksson, 1990). Nesse contexto, Castro e Silva *et al.* (1993) mostraram que *P. sanguineus* exibe atividade celulolítica relativamente

alta quando comparado com outros fungos de podridão branca. Por outro lado a presença de ligninase ou lacases juntamente com  $M_n$  peroxidase na presença de  $\beta$ -glucosidade são importantes na degradação de compostos cloroligninados (Esposito *et al.*, 1991; Durán, 1992). Esse "pool" enzimático de *P. sanguineus* indica um grande potencial deste fungo para descoloração, por exemplo, de efluentes kraft.

Morfologicamente os fungos estudados decompõem inicialmente os elementos de vaso e as células do tecido de parênquima axial. Considerando que o conteúdo dessas células parenquimatosas inclui amido (Cutter, 1986), é de se esperar que a presença desses componentes possa intensificar a produção de enzimas ou reações não enzimáticas pelos fungos para degradar a holocelulose e amido. Por outro lado, a pouca resistência dos elementos de vaso ao ataque dos fungos se deve também a pouca lignina na parede celular. Ressalta-se que apenas a pouca quantidade de lignina não é fator preponderante para a facilidade de ataque aos elementos de vaso. O tipo de lignina encontrado é que determina a máxima ou mínima resistência dos mesmos ao ataque enzimático dos fungos. Blanchette *et al.* (1988) mostraram que a resistência ao ataque dos elementos de vaso da madeira de *Acacia koa* por basidiomicetos foi atribuída ao tipo de lignina bem como à morfologia das paredes celulares. Os fungos utilizados neste estudo colonizaram rapidamente os elementos de vaso da madeira de

*Hura crepitans* indicando pouca resistência oferecida ao ataque.

As células do parênquima radial, que têm sido estimada em 4-30% do volume do xilema para folhosas (Highley & Bowyer, 1982; Fujiwara *et al.*, 1991) são altamente lignificadas em *Hura crepitans*. Os raios são mais resistentes ao ataque somente num estágio inicial de deterioração. Após o ataque dos elementos de vaso e células do parênquima axial, os raios sofrem a penetração do fungo. Considerando que as células parenquimáticas do raio possuem grande teor de nitrogênio (quando comparada com outros tipos de células), e que alguns fungos de podridão branca decompõem menos lignina com aumento de nitrogênio (Otjen & Blanchette, 1982), a biodegradação da lignina num estágio inicial pode ser inibida por essas células. Ressalta-se, entretanto, que os raios têm função de conduzir e armazenar substâncias nutritivas (amido, proteína, por exemplo) que foram elaboradas no processo de fotossíntese (Sauter & van Cleve, 1989). Pode ocorrer que a facilidade inicial de movimentação do fungo através dos elementos de vaso e células do parênquima axial faça com que os raios sejam atingidos somente depois de esgotadas as reservas nutricionais dessas células. Além disso, os elementos de vaso e células do parênquima axial apresentam uma parede celular mais simples do que as das células dos raios. Estes, assim como os elementos fibrosos, apresentam uma parede primária com uma orientação irregular das

microfibrilas, enquanto que a parede secundária é lamelada, ou seja, as microfibrilas possuem orientação distinta e diferente nas várias camadas existentes nesta parede. O fungo usa uma via mais fácil de ataque para economizar energia que lhe será muito útil para efetuar o ataque da parede de células dos elementos fibrosos num estágio mais avançado de deterioração.

O estreitamento da parede celular dos constituintes anatômicos de *Hura crepitans* observado nos elementos celulares da madeira atacada por *Tyromyces* sp. foi semelhante ao reportado anteriormente para outros fungos de podridão branca (Cowling, 1961; Wilcox, 1968). Entretanto, estes resultados discordam da afirmação de Highley & Murrain (1984) de que, quando ocorre o sistema de difusibilidade enzimática em fungos de podridão branca para a degradação da parede celular, não poderá ocorrer o estreitamento da parede celular.

Cristais do tipo prismático foram encontrados associados a hifas e também em áreas de intensa deterioração. A presença de tais cristais tem sido documentada em madeiras atacadas por fungos e são tidos como depósitos de potássio, manganês, cálcio ou outros minerais. Podem ser produtos metabólicos secundários dos fungos que a medida que vão quebrando enzimaticamente os componentes químicos acumulam esses depósitos minerais na sua estrutura, os quais são liberados no tecido xilemático vindo então a se cristalizar na forma que se observa ao

microscópio.

O aumento do teor de cinzas observado nos estágios avançados de deterioração da madeira de *Hura crepitans*, e a cor preta das cinzas nestes estágios avançados em contraste com a cor branca do estágio inicial, conduz a inferir sobre a produção de dióxido de manganês conforme reportado por Blanchette (1984) e Agostin *et al.* (1990) para *Ganoderma* sp. sobre *Eucryphia cordifolia* e *Nothofagus dombeyu*, respectivamente.

## CONCLUSÃO

Face aos resultados obtidos, pode-se concluir que :

• Os fungos estudados apresentam um melhor crescimento num meio com um alto teor de açúcares, pH 6,0 e ótimo térmico de 30-35 °C.

• A lignina é degradada simultaneamente com os polissacarídeos sendo que num estágio inicial de deterioração *Pycnoporus sanguineus* e *Tyromyces* sp. degradam a lignina numa razão superior a dos polissacarídeos.

• *Antrodia albida* e *Tyromyces* sp. tornam-se preferenciais de hemicelulose num estágio mais avançado de deterioração. Pouco acetil é utilizado.

• Com o avanço da deterioração ocorre um acúmulo de constituintes inorgânicos.

• Análise da madeira atacada ao microscópico eletrônico de varredura mostra que as hifas de *Antrodia albida* são finas e escassas no início de ataque.

• A colonização da madeira inicia-se pelos elementos de vasos e

parênquima axial adjacente e num estágio mais avançado pelas células do parênquima radial e elementos fibrosos.

• A movimentação de uma célula para outra é geralmente no sentido longitudinal no lume da célula penetrando na parede celular através do canal de pontuação.

• A separação dos elementos fibrosos na zona da lamela média, quando observados ao microscópio eletrônico, indica que todos os fungos são preferenciais de lignina num determinado estágio.

Mais estudos sobre o modo de ação dos fungos sobre os componentes químicos da madeira são necessários para uma possível utilização biotecnológica.

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Nelson Durán/ UNICAMP pelas discussões iniciais e apoio ao desenvolvimento do presente projeto; ao Lab. de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco, nas pessoas da Dra. Isaira Padovan e do Dr. Paulo Padovan, aos técnicos e estagiários pelo apoio na preparação e observação do material ao microscópio eletrônico; à Tecnóloga Florestal, Maria de Jesus Pierre, pela paciente colaboração em diversos estágios de desenvolvimento desta pesquisa; ao Dr. André Ferraz/ CEBIQ-FTI/Lorena, SP pela colaboração na parte química do desenvolvimento experimental; ao CNPq pela bolsa de estudo concedida para obtenção dos métodos de desenvolvimento da pesquisa; à

Associação Técnico-Científica "Calvino Mainieri"- ATECAM/Manaus, AM pela liberação de recursos para a consecução de parte da presente pesquisa; à Dra. Maria Auxiliadora Cavacanti da Universidade Federal de Pernambuco pela ajuda na identificação dos fungos.

### Bibliografia citada

- Adaskaveg, J.E.; Blanchette, R.A.; Gilbertson, R.L. 1990. Decay of date palm wood by white-rot and brown-rot fungi. *Can. J. Bot.*, 69: 615-629.
- Adaskaveg, J.E.; Gilbertson, R.L.; Blanchette, R.A. 1991. Comparative studies of delignification caused by *Ganoderma* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56:1932-1943.
- Agosin, E.; Blanchette, R.A.; Silva, H.; Lapierre, C.; Cease, K.R.; Ibach, R.E.; Abad, A.R.; Muga, P. 1990. Characterization of Palo Podrido a natural process of delignification in wood. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56:65-74.
- Ander, P.; Eriksson, K.E. 1977. Selective degradation of wood components by white-rot fungi. *Physiol. Plant.*, 4:239-248.
- Bettucci, I.; Guerrero, R.T. 1971. Hongos xilofagos: Estudo de Cultivos. *Bol. Univ. de la Rep. Montivideo*, 183:3-40.
- Blanchette, R.A. 1984. Selective degradation of eastern hemlock by *Ganoderma tsugae*. *Phytopathology*, 74: 153-160.
- Blanchette, R.A.; Abad, A.R. 1988. Ultrastructural localization of hemicellulose in birch wood (*Betula papyfera*) decayed by brown and white-rot fungi. *Holzforchung*, 42:393-398.
- Blanchette, R.A.; Burnes, T.A.; Leatham, G.F.; Efland, M.J. 1988. Selection of white-rot fungi for biopulping. *Biomass*, 15:93-101.
- Castro e Silva, A.; Esposito, E.; Ferraz, A.; Durán, N. 1993. Decay of *Parkia oppositifolia* in Amazonia by *Pycnoporus sanguineus* and potential use for effluent decolorization. *Holzforchung*, 47:361-368.
- Cavalcanti, M.A.Q. 1976. *Introdução ao conhecimento dos basidiomicetos poliporóides da zona da mata de Pernambuco*. Tese de Livre Docência. Recife: UFP, 200p.
- Cowling, E.B. 1961. Comparative biochemistry of the decay of sweetgum sapwood by white-rot and brown-rot fungi. *USDA Tech. Bull.*, 1258.
- Cutter, E.G. 1986. *Anatomia Vegetal. Part I. Células e tecidos*. São Paulo: Editora Rocci. 304 p.
- Durán, N. 1992. Reduction of chemical oxygen demand in bleach plant effluent by a combination of photochemical and biological method. *Proc. Second Symp. Chem. Lignin and Other Wood Components, Campinas*, 3:232-333.
- Durán, N.; Ferraz, A.; Mansila, H. 1990. Biopulping: A new view on wood delignification. *Arch Biol. Tecnol.*, 33:295-315.
- Durán, N.; Ferraz, A.; Esposito, E.; Jara, A.; Castro e Silva, A. 1993. Fungal degradation of *Eucalyptus grandis*: Diffuse reflectance spectrometry (DRIFT), Scanning electron microscopy (SEM) and chemical analysis. *The Third Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Others Wood Components, Belo Horizonte*.
- Eriksson, K.E. 1981. Fungal degradation of wood components. *Pure Appl. Chem.*, 55:33-43.
- Eriksson, K.E. 1985. Swedish developments in biotechnology related to the pulp and paper industry. *TAPPI*, 68:46-77.
- Eriksson, K.E. 1988. Recent development in biotechnology in the pulp and paper industry. *Biomass*, 15:117-119.
- Eriksson, K.E. 1990. Biotechnology in the pulp and paper industry. *Wood Sci. Technol.*, 24:79-101.
- Eriksson, K.E.; Grunewald, A.; Vallander, L. 1980. Studies of growth conditions in wood of three white-rot fungi and their cellulase-less mutants. *Biotechnol. Bioeng.*, 22: 363-376.

- Esposito, E.; Canhos, V.P.; Durán, N. 1991. Screening of lignin-degrading fungi for removal of color Kraft mill wastewater with no additional extra carbon-source. *Biotechnol. Letter*, 13:571-576.
- Fengel, D. 1970. Ultrastructural behavior of cell wall polysaccharides. *TAPPI*, 53:497-503.
- Fujiwara, S.; Sameshima, K.; Kuroda, K.; Takamura, N. 1991. Anatomy and properties of japaneses woods. I. Variation of fibre dimensions and tissue proportion and their relation to basic density. *IAWA Bull.*, 12(2):419-424.
- Highely, J.G.; Bowyer, J.L. 1982. *Forest Products and Wood Sciences. An introduction*. IOWA: The Iowa State University Press/ AMES. 159p.
- Highely, T.L.; Murmamis, L.L. 1984. Ultrastructural aspects of cellulose decomposition by white-rot fungi. *Holzforschung*, 38:73-78.
- Ishihara, T.E.; Ishihara, M. 1976. Oxidation of syringic acid by fungi laccase. *Mokuzai Gakkaishi*, 22:371-375.
- Jurasek, L.; Paice, M.G. 1988. Biological treatments of pulps. *Biomass*, 15:103-108.
- Kerr, A.J.; Goring, D.A.I. 1975. The ultrastructural arrangement of wood cell wall. *Cellulose Chem. Technol.*, 9:563-573.
- Kirk, T.K.; Highley, T.L. 1973. Quantitatives changes in structural components of conifer woods duraing decay by white and brown-rot fungi. *Phytopathol.*, 63:1338-1342.
- Kirk, T.K.; Connors, W.J.; Bleam, R.D.; Hackett, W.F.; Ziekus, G. 1975. Preparation and microbial decomposition of synthetic <sup>14</sup>C-lignins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 72:2515-2519.
- Leathan, G.F.; Myers, H.G.C.; Wegner, T.H. 1989. Biochemical pulping of aspen chips: energy savings resulting from different fungal treatments. *TAPPI*, 73: 197-200.
- Liese, W. 1970. Ultrastructural aspects of woody tissue desintegration. *Ann. Ver. Phytophatol.*, 8:231-257.
- Nishida, T.; Kashiro, Y.; Mimura, A.; Takara, Y. 1988. Lignin biodegradation by wood-rotting fungi I. Screening of lignin-degrading fungi. *Mokuzai Gakkaishi*, 34(6): 530-536.
- Oriran, T.P.; Labosky Jr., P.; Nlanckenhom, P.R. 1990. Kraft and pulp and papermaking properties of *Phanerochaete chrysosporium* degraded aspen. *TAPPI*, 74:147-152.
- Otjen, L.; Blanchette, R.A. 1982. Patterns of decay caused by *Inonotus dryphilus* (Aphyllphorales: Hymenochaetaceae) a white-pocket rot fungus of oaks. *Can. J. Bot.*, 60:2270-2279.
- Otjen, L.; Blanchette, R. A.; Efland, M.; Leatham, G.F. 1987. Assesment of 30 white-rot basidiomycetes for selective lignin degradation. *Holzforschung*, 41: 343-349.
- Reuel, K.; Barnould, F.; Eriksson, K.E. 1981. Micromorphological and ultrastructural aspects of spruce wood degradation by wil type *Sporotrichum pulverulentum* and its cellulase-less mutant. *Holzforschung*, 35:157-171.
- Ryvarden, L.; Johansen, J. 1980. A preliminary polypory flora of east Africa. *Oslo:Fungiflora*, 636p.
- Sarkanen, K.V.; Ludwig, C.H. 1971. *Lignins: Occurence, Formation, Structure and Reactions*. New-York: Wiley-Interscience Publication, 916p.
- Sauter, J.J.; van Cleve, B. 1989. Micromophometric determination of organelles and of storage material in wood rays cells-A useful method for detecting differentiation within a tissue. *IAWA Bull.*, 10(4):393-403.
- Wilcox, W.W. 1968. Changes in wood microstructure through progressive stages of decay. USDA Forest Service. *Research paper FPL 70.72p*.