

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO, ENZIMÁTICO E
CRESCIMENTO DE UM ISOLADO AMAZÔNICO DO FUNGO**
Pycnoporus sanguineus.

NATÁLIA MARTINS DA SILVA

**MANAUS
AGOSTO / 2010**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO, ENZIMÁTICO E
CRESCIMENTO DE UM ISOLADO AMAZÔNICO DO FUNGO
Pycnoporus sanguineus.**

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Mestrado em Biotecnologia e Recursos Regionais da Universidade do Estado do Amazonas – UEA, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

ORIENTADORA: Prof^a Dr.^a Helena Camarão Telles Ribeiro.
CO - ORIENTADOR: Prof. Dr. Ademir Castro e Silva.

**MANAUS
AGOSTO / 2010**

NATÁLIA MARTINS DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO, ENZIMÁTICO E
CRESCIMENTO DE UM ISOLADO AMAZÔNICO DO FUNGO
Pycnoporus sanguineus.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia

Data da Aprovação: 25. 08. 2010

Banca Examinadora:

PRESIDENTE: Prof^a Dr.^a Helena Camarão Telles Ribeiro.

MEMBRO 1: Prof^a Dr.^a Ana Hilda Romero Costa

MEMBRO 2: Prof^o. Dr.^o Aldo Procópio

Ficha Catalográfica

S586a Silva, Natália Martins da
Avaliação do potencial antimicrobiano, enzimático e crescimento de um isolado amazônico do fungo *Pycnoporus sanguineus* / Natália Martins da Silva. -- Manaus : Universidade do Estado do Amazonas - UEA, 2010.
154 p. : il.

Dissertação – Título de Mestre - Universidade do Estado do Amazonas - UEA, 2010.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Helena Camarão Telles Ribeiro.

Co-orientador: Prof. Dr^o Ademir Castro e Silva.

Ficha Catalográfica elaborada pela bibliotecária
Sheyla Lobo Mota / CRB 484

“O mundo não descrito dos fungos pode ser visualizado como um recurso potencial massivo que espera ser compreendido.”

Hawksworth (1991)

DEDICATÓRIA

A Deus pela vida, pelos pais que tenho, pelas pessoas maravilhosas que me rodeiam, pelas oportunidades e principalmente por guiar meus passos e me fazer chegar até aqui não por escolha própria, mas por sua vontade.

A meu pai: Nivaldo Cortez, pelo incentivo e educação... Hoje tudo que sou devo a você.

A minha mãe: Solange Martins pelas inúmeras noites mal dormidas que passou ao meu lado enquanto eu me dedicava a esta pesquisa... Você é a razão de tudo que faço, tudo que sinto e tudo que sou.

Ao meu namorado Daniel Martins pela paciência, apoio e dedicação a mim concedidos durante todo o desenvolvimento desta pesquisa. E por muitas vezes ter compreendido minha ausência ...

A vocês dedico: minha eterna gratidão, todo o meu amor e mais esta conquista.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Toda Minha Família** base da minha existência, por compreender, mesmo a contragosto: minha constante ausência, fatos não comemorados, sorrisos não dados, abraços não realizados. Enfim, pelos momentos que eu estive ausente em decorrência da realização deste sonho. Pela confiança e orações dedicadas durante não somente o meu curso, mas sim durante toda a minha vida.

A **Prof. Dra. Helena Camarão Telles Ribeiro** pela amizade, carinho, atenção, confiança e absoluta dedicação durante todas as fases desta pesquisa.

Ao **Dr. Ademir Castro e Silva** por ter sido a primeira pessoa a apoiar este estudo, pelos ensinamentos iniciais, profissionalismo e pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa.

A minha amiga **Msc. Dolores Fonseca** por ter me contagiado com sua paixão pelos fungos e por tudo que fez por mim durante todo o curso de mestrado.

Aos meus tios(a) **Sidlene Martins e Silas Martins**, pela companhia durante momentos fundamentais e importantes da minha vida acadêmica.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade do Estado do Amazonas (UEA)**, em especial ao Programa de **Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais (MBT)** pela oportunidade a mim concedida.

Aos amigos e pesquisadores: **Rafael Lopes e Renan Boanerges**, muito obrigada pela prestimosa ajuda e companheirismo a mim dedicado.

À minha amiga **Rafaelle Maria Paz Nepomucena**, por ter me acompanhado durante a graduação e nos primeiros momentos desta pesquisa.

À Prof^a. Dr^a. **Ormesinda Celeste Cristo**, pela amizade, ensinamentos, orientação e apoio dados sempre que necessitei.

Aos amigos(as) conquistados: **Márcia Jaqueline, Danielle Mendes, Margarida Athayde e Andrey Azedo**.

À **Maria da Glória Lima Pastor** por ter tantas vezes me apoiado, compreendido e incentivado.

Ao **Mestre Ewandro Mattos Martins** e ao amigo **Denilson Nascimento** pelo apoio dado durante a publicação de trabalhos e realização de congressos.

À **Todos** que, de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização desta pesquisa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais malefícios causados pelos fungos	26
Figura 2 - Principais benefícios proporcionados pelos fungos	27
Figura 3 – Vias de colonização da madeira pelos fungos	32
Figura 4 – Podridão branca em madeira	34
Figura 5 – Corpo frutífero do fungo <i>P. sanguineus</i>	38
Figura 6 – Estrutura da cinabarina	41
Figura 7 - Esquema de mecanismo de ação das lacases	46
Figura 8 – Mn (II) é oxidada a Mn (III) por uma peroxidase dependente de Mn	49
Figura 9 - Isolamento da amostra Amazônica do fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i>	74
Figura 10 - Crescimento após 4 dias da amostra Amazônica do fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i>	74
Figura 11 - Esquema metodológico da preparação do isolado Amazônico do fungo <i>P. sanguineus</i>	75
Figura 12 – Esquema metodológico da obtenção de biomassa do fungo <i>P. sanguineus</i>	79
Figura 13 – Esquema metodológico da obtenção do líquido metabólito de <i>Pycnoporus sanguineus</i>	85
Figura 14 – Esquema metodológico da obtenção do extrato de <i>Pycnoporus sanguineus</i>	85
Figura 15 – Esquema metodológico da avaliação antimicrobiana do fungo <i>P. sanguineus</i>	86
Figura 16 – Esquema metodológico da análise de produção enzimática	89
Figura 17 -- Variabilidade da produção de biomassa do fungo <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias sob condição de agitação em meios de cultura suplementados com resíduos agrícolas.....	93
Figura 18 – Variabilidade da produção de biomassa do fungo <i>P.sanguineus</i> durante 25 dias sob condição estacionaria em meios de cultura suplementados com resíduos agrícolas.....	95
Figura 19 - Variabilidade da produção de biomassa do fungo <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias sob condição de agitação <i>versus</i> condição estacionária no meio de cultura R1.	97
Figura 20 - Variabilidade da produção de biomassa do fungo <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias sob condição de agitação <i>versus</i> condição estacionária no meio de cultura R2.	97
Figura 21 - Variabilidade da produção de biomassa do fungo <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias sob condição de agitação <i>versus</i> condição estacionária no meio de cultura R3.	97
Figura 22 - Variabilidade da produção de biomassa do fungo <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias sob condição de agitação <i>versus</i> condição estacionária no meio de cultura R4.	98

Figura 23 - Variabilidade da produção de biomassa do fungo <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias sob condição de agitação em meios de cultura suplementados com produtos regionais.	100
Figura 24 - Variabilidade da produção de biomassa do fungo <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias sob condição estacionária em meios de cultura suplementados com produtos regionais.	102
Figura 25 - Variabilidade da produção de biomassa do fungo <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias sob condição de agitação <i>versus</i> condição estacionária no meio de cultura M1.	104
Figura 26 - Variabilidade da produção de biomassa do fungo <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias sob condição de agitação <i>versus</i> condição estacionária no meio de cultura M2.	104
Figura 27 - Variabilidade da produção de biomassa do fungo <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias sob condição de agitação <i>versus</i> condição estacionária no meio de cultura M3.	105
Figura 28 - Variabilidade da produção de biomassa do fungo <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias sob condição de agitação <i>versus</i> condição estacionária no meio de cultura M4.	105
Figura 29 - Variabilidade da produção de biomassa do fungo <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias sob condição de agitação <i>versus</i> condição estacionária no meio de cultura M5.	105
Figura 30 - Determinação da atividade antimicrobiana de <i>P.sanguineus</i> , quando cultivado em meio de cultura suplementado com buriti (M4), contra <i>S. aureus</i>	107
Figura 31 - Variabilidade na produção de lacase pelo fungo <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias sob condição de agitação em meios de cultura suplementados com resíduos agrícolas.	110
Figura 32 - Variabilidade na produção de lacase pelo fungo <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias sob condição de estacionária em meios de cultura suplementados com resíduos agrícolas.	113
Figura 33 - Variabilidade na produção de lacase pelo fungo <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias sob condição de agitação <i>versus</i> condição estacionária no meio de cultura R1.	114
Figura 34 - Variabilidade na produção de lacase pelo fungo <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias sob condição de agitação <i>versus</i> condição estacionária no meio de cultura R2.	114
Figura 35 - Variabilidade na produção de lacase pelo fungo <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias sob condição de agitação <i>versus</i> condição estacionária no meio de cultura R3.	114
Figura 36 - Variabilidade na produção de lacase pelo fungo <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias sob condição de agitação <i>versus</i> condição estacionária no meio de cultura R4.	115
Figura 37 - Variabilidade na produção de lacase pelo fungo <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias sob condição de agitação em meios de cultura suplementados com produtos regionais	117
Figura 38 - Variabilidade na produção de lacase pelo fungo <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias sob condição estacionária em meios de cultura suplementados com produtos regionais	120
Figura 39 - Variabilidade na produção de lacase pelo fungo <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias sob condição de agitação <i>versus</i> condição estacionária no meio de cultura M1.....	121

Figura 40 - Variabilidade na produção de lacase pelo fungo <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias sob condição de agitação <i>versus</i> condição estacionária no meio de cultura M2	121
Figura 41 - Variabilidade na produção de lacase pelo fungo <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias sob condição de agitação <i>versus</i> condição estacionária no meio de cultura M3.....	121
Figura 42 - Variabilidade na produção de lacase pelo fungo <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias sob condição de agitação <i>versus</i> condição estacionária no meio de cultura M4.....	122
Figura 43 - Variabilidade na produção de lacase pelo fungo <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias sob condição de agitação <i>versus</i> condição estacionária no meio de cultura M5.....	122
Figura 44 - Variabilidade na produção de fenoxidase pelo fungo <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias sob condição de agitação em dez meios de cultura	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Classificação dos Fungos	25
Tabela 02 – Classificação Internacional das Enzimas	43
Tabela 03 – Fungos Produtores de Antimicrobianos	54
Tabela 04 – Composição centesimal da casca de melancia	60
Tabela 05: Atividade média de biomassa produzida por <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias de crescimento em meio de cultura suplementado com resíduos agrícolas em comparação ao meio de cultura controle sob condição de agitação.....	92
Tabela 06 – Análise de variância (ANOVA) da biomassa produzida em diferentes meios de cultura a base de resíduos sob condição de agitação.....	94
Tabela 07 - Atividade média de biomassa produzida por <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias de crescimento em meio de cultura suplementado com resíduos agrícolas em comparação ao meio de cultura controle sob condição de estacionária.....	94
Tabela 08 – Análise de variância (ANOVA) da biomassa produzida em diferentes meios de cultura a base de resíduos sob condição de agitação.....	96
Tabela 09 – Análise de Tukey para produção de biomassa em meios de cultura suplementados com resíduos sob condição estacionária.....	96
Tabela 10 – Parâmetros Descritivos da produção média de biomassa produzida por <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias de crescimento em meio de cultura suplementado com produto regional e no meio de cultura controle a 180rpm	99
Tabela 11: Análise de variância (ANOVA) da biomassa produzida em diferentes meios de cultura a base de produtos regionais sob condição de agitação	99
Tabela 12: Análise de Tukey para produção de biomassa em meios de cultura a base de produtos regionais sob condição de agitação	100
Tabela 13: Produção média de biomassa por <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias de crescimento em meio de cultura suplementado com produto regional e no meio de cultura controle na condição estacionária.....	101
Tabela 14: Análise de variância (ANOVA) da biomassa produzida em diferentes meios de cultura a base de produtos regionais sob condição estacionária	103
Tabela 15: Análise de Tukey para produção de biomassa em meios de cultura a base de produtos regionais sob condição estacionária	103
Tabela 16: Atividade antimicrobiana dos metabólitos de <i>Pycnoporus sanguineus</i> , em diferentes meios de cultura, frente a <i>S. aureus</i> e <i>E.coli</i> determinada a 37 °C por 24 horas, em ágar Müeller-Hinton (halo = mm)	107
Tabela 17: Atividade de lacase produzida por <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias de crescimento em meio de cultura suplementado com resíduos agrícolas e no meio de cultura controle	108
Tabela 18: Análise de variância (ANOVA) da produção de lacase em diferentes meios de cultura a base de resíduos sob condição de agitação	108
Tabela 19: Análise de Tukey para produção de lacase em meios de cultura a base de resíduos sob condição de agitação	110
Tabela 20 – Atividade de lacase produzida por <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias de crescimento em meio de cultura suplementado com resíduos agrícolas e no meio de cultura controle	111
Tabela 21: Análise de variância (ANOVA) da produção de lacase em diferentes meios de cultura a base de resíduos sob condição de estacionária	112

Tabela 22: Análise de Tukey para produção de lacase em meios de cultura a base de resíduos sob condição estacionária	112
Tabela 23: Parâmetros Descritivos da produção média de lacase produzida por <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias de crescimento em meio de cultura suplementado com produto regional e no meio de cultura controle	116
Tabela 24: Análise de variância (ANOVA) da produção de lacase em diferentes meios de cultura a base de produtos regionais sob condição de agitação	116
Tabela 25: Análise de Tukey para produção de lacase em meios de cultura a base de produtos regionais sob condição de agitação	117
Tabela 26: Parâmetros Descritivos da produção média de lacase produzida por <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias de crescimento em meio de cultura suplementado com produto regional e no meio de cultura controle	118
Tabela 27: Análise de variância (ANOVA) da produção de lacase em diferentes meios de cultura a base de produtos regionais sob condição estacionária	119
Tabela 28: Análise de Tukey para produção de lacase em meios de cultura a base de produtos regionais sob condição estacionária	119
Tabela 29: Produção média de fenoloxidasas por <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias de crescimento em meio de cultura suplementado com resíduos e no meio de cultura controle sob agitação.....	124
Tabela 30: Produção média de fenoloxidasas por <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias de crescimento em meio de cultura suplementado com resíduos e no meio de cultura controle sob condição estacionária.....	124
Tabela 31: Produção média de fenoloxidasas por <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias de crescimento em meio de cultura suplementado com produtos regionais sob condição de agitação	125
Tabela 32: Produção média de fenoloxidasas por <i>P.sanguineus</i> durante vinte e cinco dias de crescimento em meio de cultura suplementado com produtos regionais sob condição estacionária	125

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- **BDA** - Batata Dextrose Ágar.
- **FIOCRUZ** - Fundação Oswaldo Cruz.
- **H₂O₂** - Água Oxigenada.
- **INPA** - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.
- **LiP** - Lignina Peroxidase.
- **MnP** - Mangânes Peroxidase.
- **R1** - Meio de Cultura com Casca de Melancia (*Citrullus lanatus*).
- **R2** - Meio de Cultura com Coroa de Abacaxi (*Ananas comosus*).
- **R3** - Meio de Cultura com Bagaço da Laranja moído e seco a 35°C (*C. sinensis*).
- **R4** - Meio de Cultura com Bagaço da Laranja com umidade natural (*C. sinensis*).
- **M1** - Meio de Cultura com Cará. (*Dioscorea alata*).
- **M2** - Meio de Cultura com Macaxeira. (*Manihot esculenta*).
- **M3** - Meio de Cultura com Pupunha. (*Bactris gasipaes*).
- **M4** - Meio de Cultura com Buriti. (*Mauritia flexuosa*).
- **M5** - Meio de Cultura com Açaí. (*Euterpe oleracea*).
- **C1** - Meio de Cultura com Batata. (*Solanum tuberosum*).
- **MBT** - Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais.
- **MnP** - Manganês Peroxidase.
- **nm** - Nanômetros.
- **rpm** - Rotações por minuto.
- **PPM** - Partes por Milhão.
- **UEA** - Universidade do Estado do Amazonas.

RESUMO

O desenvolvimento da Biotecnologia tem importância ímpar para o Brasil, devido ao seu baixo impacto ambiental, e a grande e quase inexplorada biodiversidade do país, especialmente na região amazônica. Nesta perspectiva, os fungos têm sido bastante usados em processos biotecnológicos, em especial como produtores de diferentes substâncias de interesse econômico, tais como: enzimas, antibióticos, vitaminas, aminoácidos e esteróides. Assim esta pesquisa teve como foco o estudo da cepa amazônica (PIC- 04) do fungo *P.sanguineus* Um isolado amazônico de *P.sanguineus* que foi cultivado em dez diferentes meios de cultura suplementados com produtos regionais e resíduos agrícolas com o objetivo de aperfeiçoar as produções de biomassa, enzimas e atividade antimicrobiana. Os resultados mostraram que a maior produção de biomassa ocorreu em vinte e cinco dias de crescimento sob condição de agitação no meio suplementado com buriti (M4), o qual apresentou produção de biomassa média 128.4% superior a biomassa produzida pelo meio controle C1. Para a atividade antimicrobiana os metabólitos produzidos no meio suplementado com buriti (M4) e no meio acrescido de bagaço de laranja com umidade (R3) apresentaram halos de inibição superiores, aos halos produzidos pelo meio acrescido de batata, controle (C1) para a cepa de *S. aureus* (CBAM 001). Já para a cepa de *E. coli* (CBAM 001) apenas o meio R4, obteve atividade antimicrobiana comparável ao controle (C1). A atividade enzimática mostrou-se variável durante o período de vinte e cinco dias de experimento sendo que a maior produção de lacase, fenoloxidasas totais e peroxidases deu-se no meio suplementado com buriti (M4) e no meio acrescido de bagaço de laranja com umidade (R3) sob condição de agitação. A análise dos resultados apontam que os meios de cultura testados influenciaram diretamente na produção de biomassa pelo fungo assim como a produção de enzimas e biomoléculas com atividade antimicrobiana.

PALAVRAS CHAVE: Enzimas, Antimicrobiano, Biomassa, Meio de Cultura e *Pycnopus sanguineus*.

ABSTRACT

The development of biotechnology has unique importance for Brazil because of its low environmental impact, and the vast and almost unexplored biodiversity, especially in the Amazon region. From this perspective, the fungi have been extensively used in biotechnology processes, especially as producers of different substances of economic interest, such as enzymes, antibiotics, vitamins, amino acids and steroids. Thus this research focuses on the study of a strain of the fungus *P.sanguineus* (PIC- 04) Amazon that was grown in ten different culture media supplemented with regional products and agricultural waste in order to improve the production of biomass, enzymes and antimicrobial activity. The results show the largest biomass occurred in twenty-five days of growth under conditions of agitation in medium supplemented with buriti (M4), which showed biomass production of 128.4% higher than the biomass produced by the control means C1. For the antimicrobial metabolites produced in medium supplemented with buriti (M4) and in medium supplemented with orange peel with moisture (R3) showed inhibition halos above, the halos produced by the control (C1) for the strain of *S. aureus* (CBAM 001). As for the strain of *E. coli* (CBAM 001) only through R4, had antimicrobial activity comparable to control (C1). The enzyme activity was shown to be variable during the period of twenty-five days of the experiment and the highest production of laccase, peroxidase and total phenoloxidases occurred in the medium supplemented with buriti (M4) and in medium supplemented with orange peel with moisture R3 provided agitation. The results show that the tested media had a direct influence on biomass production by the fungus as well as production of enzymes and biomolecules with antimicrobial activity.

KEY WORDS: Enzymes, Antimicrobial, Biomass, Culture Medium and *Pycnoporus sanguineus*.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	21
2.1. OBJETIVO GERAL	21
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1. Características Gerais dos Fungo	23
3.1.1. Importância Ecológica dos Fungos	27
3.1.2. Importância Biotecnológica dos Fungos	29
3.1.3. Fungos Deterioradores de Madeira	31
3.2. Basidiomicetos	34
3.3. <i>Pycnoporus sanguineus</i>	37
3.3.1. Enquadramento Taxonômico	37
3.3.2. Morfologia	37
3.3.3. Distribuição e Habitat	39
3.3.4. Importância Biotecnológica	40
3.4. Enzimas	41
3.4.1. Fenoloxidasas	44
3.4.2. Lacase (E.C 1.1.0.3.2).....	45
3.4.2.1. Lacase Fúngica	46
3.4.3. Peroxidasas	48
3.5. Testes de avaliação da atividade antimicrobiana	49
3.5.1. Método de Difusão em Ágar	49
3.6. Antimicrobianos	50
3.6.1. Fungos Produtores de Antimicrobianos	52
3.7. Condições de Cultivo	55

3.8. Meios de Cultura	56
3.8.1. Meio de cultura: Fonte de Nutrientes de Resíduos Agrícolas	58
3.8.1.1. Casca de Melancia (<i>Citrullus lanatus</i>)	59
3.8.1.2. "Coroa" de Abacaxi (<i>Ananas comosus.</i>)	60
3.8.1.3. Bagaço da Laranja (<i>C. sinensis</i>)	61
3.8.2. Meio de cultura: Fonte de Nutrientes Regionais da Amazônia	64
3.8.2.1. Cará (<i>Dioscorea alata</i>)	64
3.8.2.2. Macaxeira (<i>Manihot esculenta</i>).....	65
3.8.2.3. Pupunha (<i>Bactris gasipaes</i> Kunth).....	66
3.8.2.4. Buriti (<i>M. flexuosa</i>)	67
3.8.2.5. Açaí (<i>Euterpe edulis</i>)	69
3.8.3. Meio de Cultura: Controle	70
3.8.3.1. Batata (<i>Solanum tuberosum</i>)	70

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Preparação do Isolado Amazônico do Fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i>	72
4.1.1 Coleta dos Fungos	72
4.1.2 Isolamento dos Fungos	73
4.2 Produção de Biomassa Fúngica	76
4.2.1 Meios de Cultura Líquida	76
4.2.2 Semeadura dos Isolados Fúngicos nos Meios de Cultura	78
4.2.3 Determinação da Biomassa Fúngica	79
4.3 Atividade Antimicrobiana	80
4.3.1 Preparação do Líquido-Metabólito	80
4.3.2 Preparação dos Extratos Fúngicos	81
4.3.3 Teste de Difusão em Ágar	82
4.3.3.1 Preparação das placas de Petri com Ágar Mueller-Hinton (MH)	82
4.3.3.2 Preparação do Inóculo e Teste Antimicrobiano.....	82
4.3.3.3 Leitura das Placas e Interpretação dos Resultados	84
4.4 Atividade Enzimática	87
4.4.1 Amostras para Quantificação de Lacase, Fenoloxidasas Totais e Peroxidasas	87

4.4.2 Lacase (E.C 1.1.0.3.2).....	87
4.4.3 Fenoloxidasas Totais	88
4.4.4 Peroxidasas	89
4.5 Análises Estatísticas	89
5. RESULTADOS	91
5.1 Produção de Biomassa	91
5.1.1 Produção de Biomassa em Resíduos Agrícolas	91
5.1.1.1. Produção de Biomassa em Resíduos Agrícolas sob Condição de Agitação	91
5.1.1.2. Produção de Biomassa em Resíduos Agrícolas sob Condição de Estacionária	94
5.1.1.3. Produção de Biomassa em Resíduos Agrícolas: Condição Estacionária <i>versus</i> Condição de Agitação	96
5.1.2 Produção de Biomassa em Meios Regionais	98
5.1.2.1. Produção de Biomassa em Meios Regionais sob Condição de Agitação	98
5.1.2.2. Produção de Biomassa em Meios Regionais sob Condição de Estacionária	101
5.1.2.3. Produção de Biomassa em Meios Regionais: Condição Estacionária <i>versus</i> Condição de Agitação	103
5.2 Atividade Antimicrobiana	106
5.2.1. Atividade antimicrobiana de metabólitos do fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i>	106
5.2.2. Atividade antimicrobiana do extrato de <i>Pycnoporus sanguineus</i>	107
5.3. Atividade Enzimática	108
5.3.1 Produção de Lacase	108
5.3.1.1. Produção de Lacase em Resíduos Agrícolas	108
5.3.1.1.1. Produção de Lacase em Resíduos Agrícolas sob Condição de Agitação	108
5.3.1.1.2 Produção de Lacase em Resíduos Agrícolas sob Condição Estacionária	111

5.3.1.1.3 Produção de Lacase em Resíduos Agrícolas: Condição de Agitação <i>versus</i> Condição Estacionária	115
5.3.1.2. Produção de Lacase em Meios Regionais	115
5.3.1.2.1. Produção de Lacase em Meios Regionais sob Condição de Agitação	115
5.3.1.2.2 Produção de Lacase em Meios Regionais sob Condição Estacionária	118
5.3.1.2.3 Produção de Lacase em Meios Regionais: Condição de Agitação <i>versus</i> Condição Estacionária	120
5.3.2 Produção de Fenoloxidasas Totais	122
5.3.3 Produção de Peroxidasas	125
6. DISCUSSÃO	126
6.1. Efeito de diferentes meios de cultura na produção de biomassa do fungo <i>P.sanguineus</i> , sob condição de agitação e estacionária	126
6.2. Atividade Antimicrobiana	130
6.3. Atividade enzimática de <i>Pycnoporus sanguineus</i> em diferentes meios de cultura sob condição de agitação e estacionária.....	131
7. PERSPECTIVAS.....	136
CONCLUSÕES	134
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137
ANEXOS	151

INTRODUÇÃO

O Brasil detém cerca de 20% da biodiversidade mundial sendo a maior parte desta biodiversidade concentrada na região Amazônica. Esta abriga numerosas formas de vida com grande potencial biotecnológico, em grande parte ainda desconhecido pela ciência. Tal fato mostra a extrema relevância do estudo da aplicabilidade das espécies encontradas na região a fim de desenvolver produtos com a finalidade de satisfazer as necessidades presentes, sem comprometer a capacidade das gerações futuras e de suprir suas próprias necessidades alcançando desta forma o desenvolvimento sustentável.

Devido ao fato de, somente parte da diversidade biológica, tenha sido descrita e estudada, existe uma enorme e inexplorada reserva de compostos naturais a ser explorada. Muitos oriundos de fungos, como fonte potencial de novas substâncias antimicrobianas (Strohl, 2000).

O uso de antibióticos constitui uma importante ferramenta no tratamento de patologias ocasionadas por bactérias. Porém o uso destes é acompanhado da seleção das bactérias mais resistentes o que acaba gerando uma resistência microbiana, fato que leva a um aumento das patologias, principalmente pelo número de antibióticos produzidos serem inferiores ao número de novas patologias. A fim de resolver este problema deve-se ter um equilíbrio entre o aumento da resistência microbiana e o número de novos antibióticos produzidos. Tal patamar só será possível através do desenvolvimento de novas pesquisas.

Dentre os microrganismos que acumulam substâncias antimicrobianas, os fungos destacam-se pela quantidade de produtos farmacêuticos de uso corrente na medicina com tais propriedades. Mas são os fungos, pertencentes ao filo Basidiomycota, usados na medicina popular desde tempos ancestrais, que apresentam maior importância na pesquisa de substâncias antivirais, antifúngicas e antibacterianas a partir de seus metabólitos secundários (Hwang *et al.*, 2003).

O *Pycnoporus sanguineus* popularmente conhecido como orelha de pau vermelha é um tipo de cogumelo bastante utilizado desde os tempos mais remotos com finalidades medicinais para combater patologias como hemorragias, cólicas, feridas e asma. Estudos recentes mostram que entre as suas características pode-se destacar a produção de cinabarina substância com potencial antimicrobiano comprovado contra: *Bacillus cereus* e *Leuconostoc plantarum* e *Klebsiella pneumoniae*, destaca-se ainda sua capacidade de degradar enzimaticamente a estrutura da lignina (polímero encontrado nas plantas terrestres), sendo este importante na biorremediação do solo. (Smânia *et al.*, 1998).

Neste contexto, encontram-se ainda os estudos da atividade enzimática de fungos degradadores de madeira notadamente aqueles pertencentes à classe dos basidiomicetos com capacidade de degradar a lignina e inúmeros substratos de natureza fenólica, pesticida, corantes entre outros. Estes estudos estão voltados principalmente para aquelas enzimas de interesse comercial, de emprego em várias áreas da atividade industrial. O mercado mundial dessas enzimas tem um faturamento anual estimado em

cerca de US\$ 1,5 bilhões, com um aumento de 12% na quantidade de enzimas produzidas (Castro e Silva, 2002).

Segundo Eggert e colaboradores (1996), o gênero *Pycnoporus* se mostra bastante promissor devido sua capacidade de produzir enzimas lignolíticas. Lomascolo et al. (2002) afirmam que linhagens de *Pycnoporus sanguineus* de origem tropical e subtropical produzem maior quantidade de enzimas lignolíticas que as linhagens de outras regiões.

Durante os processos fermentativos para a obtenção de metabólitos secundários de fungos existem duas fases distintas. A primeira é a tropofase, fase de crescimento da massa micelial, e a segunda é a idiofase, fase onde o crescimento fúngico é interrompido e se inicia a produção de metabólitos secundários. Estas duas fases dependem diretamente do ambiente nutricional, que pode afetar qualitativa e quantitativamente o metabolismo destes organismos (Demail, 2000).

Assim, esta investigação teve por finalidade submeter o basidiomiceto *Pycnoporus sanguineus*, coletado na zona leste da cidade de Manaus – AM, ao crescimento em dez diferentes meios nutricionais suplementados com fontes de nutrientes regionais e resíduos agrícolas e ainda analisar os metabólitos deste organismo, quanto ao potencial enzimático e antimicrobiano, assim como aperfeiçoar o cultivo deste microrganismo para produção de biomassa fúngica.

OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliação da produção de biomassa, potencial antimicrobiano e enzimático de um isolado amazônico do fungo *Pycnoporus sanguineus* quando cultivado em dez meios de cultura a base de matéria prima regional e resíduos agrícolas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar o efeito de dez meios de cultura na produção de biomassa do fungo *Pycnoporus sanguineus*. sob condição de agitação e estacionária.
- Propor alternativas para o aproveitamento de resíduos agrícolas através da elaboração de meio de cultura a base de casca de melancia, coroa do abacaxi e bagaço da laranja.
- Avaliar o potencial de produção da enzima lacase, fenoloxidasas totais e atividade das peroxidases pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* nos dez meios de cultura testados e sob diferentes condições.

- Comparar a atividade antimicrobiana de *Pycnoporus sanguineus* cultivado no meio de maior produção de biomassa e no meio controle sob cepas de *E.coli*, e *E. aureus*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Características Gerais dos Fungos

Os fungos são seres eucariontes, heterotróficos, aclorofilados, aeróbios a microaerófilos, uni ou pluricelulares, com parede celular composta geralmente de quitina e/ou celulose, além de outros carboidratos complexos, com glicogênio como substância de reserva, nutrição por absorção, podendo viver como saprófitos, parasitas ou simbiontes com outros organismos (Lacaz, 2002; Putzke & Putzke, 2004). Possuem o corpo formado por um emaranhado de filamentos, denominados hifas, e o seu conjunto recebe o nome de micélio. As hifas variam no diâmetro, espessura da parede, localização do pigmento, etc. (Putzke, 2004).

Constituem um grupo muito grande e heterogêneo encontrado virtualmente em qualquer nicho ecológico. Fries, em 1825, estimou em 140 mil as espécies de fungos; no entanto, a partir de 1990, as estimativas variam de 1,5 a 13,5 milhões (Lodge 1995; Lodge 2001). A mais aceitável por micólogos e em trabalhos de biodiversidade global é de 1,5 milhão de espécies. Proposta por Hawksworth (2001), desta estimativa menos de 7% das espécies estão descritas e identificadas.

Estes organismos são amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontrados na água, no solo, sobre os animais e vegetais vivos parasitando-os, na matéria orgânica em decomposição, nos produtos alimentícios, industriais, ou seja, são encontrados praticamente em qualquer local do ambiente que nos cerca inclusive no ar onde estruturas reprodutivas, na forma de esporos, podem desenvolver novas estruturas vegetativas e reprodutivas quando encontram substrato adequado (Putzke & Putzke, 2004).

Eles necessitam, para se alimentarem, de substâncias orgânicas (hidratos de carbono) as quais são incapazes de elaborar, devido à falta de clorofila, pois, esta substância é que torna possível à planta assimilar o anidrido carbônico do ar atmosférico, o qual facilita a síntese dos hidratos de carbono. Eles não têm celulose na sua parede celular, exceto alguns aquáticos e não armazenam amido como substância de reserva (Trabulsi, 1998). A presença de substâncias quitinosas na parede da maior parte das espécies fúngicas e a sua capacidade de depositar glicogênio os assemelham às células animais (Eriksson, 1985; Silveira & Guerrero, 1991).

O crescimento é em geral apical, mas normalmente qualquer fragmento hifálico pode dar origem a outra formação micelial quando destacado e colocado em meio apropriado. As estruturas reprodutivas são diferenciadas das vegetais, o que constitui a base sistemática dos fungos (Putzke & Putzke, 1998). A variação morfológica é muito grande, existindo espécies macro e microscópicas o que contribui para existência de muitos sistemas de classificação (Tabela 1) que ainda hoje sofrem adições e alterações (Putzke & Putzke, 2004).

Tabela 1. - Classificação dos Fungos.

Alexopoulos et al (1996)	Hawksworth et al (2001)	Hawksworth et al (1983)
<p>Reino Stramenopila Filo Oomycota Filo Hyphochytridiomycota Filo Labyrinthulomycota</p> <p>Reino Protistas Filo Dictyosteliomycota Filo Acrasiomycota Filo Myxomycota Filo Plasmodiophoromycota</p> <p>Reino Fungi Filo Chytridiomycota Filo Zygomycota Filo Ascomycota Filo Basidiomycota</p>	<p>Reino Chromista Filo Hyphochytridiomycota Filo Labyrinthulomycota Filo Oomicota</p> <p>Reino Protozoa Filo Acrasiomycota Filo Dictyosteliomycota Filo Myxomycota Filo Plasmodiophoromycota</p> <p>Reino Fungi Filo Chytridiomycota Filo Zygomycota Filo Ascomycota Filo Basidiomycota</p>	<p>Reino Fungi Divisão Myxomycota Divisão Eumycota</p> <p>Subdivisões: Mastigomycotina Zygomycotina Ascomycotina Basidiomycotina Deuteromycotina</p>

Fonte: Modificado de Putzke & Putzke, 2004

Os fungos estão agrupados em um reino a parte o Reino Fungi. Este está subdividido em cinco filos: Oomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota e Deuteromycota. Tal classificação baseia-se na forma do corpo frutífero do organismo.

Apesar da utilização milenar dos fungos nos mais diversos ramos ainda é comum estes serem lembrados principalmente pelos seus efeitos prejudiciais, principalmente pelo fato de existir algumas espécies que podem causar doenças aos animais, aos vegetais e também ao homem, bem como a deteriorização de vários tipos de materiais causando prejuízos econômicos (Figura 1). No entanto, a maioria das espécies é benéfica para diversas áreas. (Figura 2).



Figura 1 - Principais malefícios causados pelos fungos / Fonte: Putzke (2002).

Estima-se em cerca de 1.800 o número destas espécies de Basidiomicetos para o hemisfério norte. Nas regiões tropicais e hemisfério sul o total deve ser bem maior. Em qualquer evento envolvendo a decomposição de materiais lignocelulósicos, é bastante alta a incidência deste grupo de microrganismos, o que revela a sua importância ecológica. (Blanchete, 1991; Hatakka et al., 1994)

Na cadeia alimentar, os fungos ocupam a posição de decompositores, tendo, portanto, um papel muito importante na manutenção do equilíbrio ambiental. Estes seres são capazes de deteriorar vários tipos de materiais, atuando assim como decompositores, ou seja, recicladores de nutrientes.

Assim os fungos juntamente com as bactérias heterotróficas são os principais decompositores de materiais lignocelulósicos da biosfera. Vários fungos estão associados a degradar dejetos e detritos de esgotos até um grau em que possam ser considerados adubo ou substância equivalente.

Ecologicamente podem ser considerados os lixeiros do mundo, por degradarem todo tipo de restos orgânicos, independente da origem, transformando-os em elementos assimiláveis pelas plantas (Neufeld, 1997; Putzke & Putzke, 2002, 2004). Como saprófitas, decompõem resíduos complexos de plantas e animais, transformando-os em formas químicas mais simples, que retornam ao solo. Tais substâncias são, então, absorvidas pelas gerações vegetais subsequentes. Desse modo, a atividade fúngica é amplamente responsável pela fertilidade do solo.

Um dos grandes problemas que o mundo industrializado vem enfrentando nos dias atuais é a contaminação de solos, lençóis freáticos e sedimentos por compostos orgânicos tóxicos. Esses poluentes são potenciais ameaças à saúde pública e ao ambiente. Devido a este fato a biorremediação está sendo muito pesquisada e testada, principalmente, no caso de contaminação por hidrocarbonetos. Os sistemas mais utilizados para a biorremediação são os microbiológicos, principalmente bactérias, fungos filamentosos e leveduras (Silva & Esposito, 2004).

A contaminação de solos por metais pesados tem diversas origens, incluindo emissão de veículos automotores e de indústrias (Gray, 1998). A remoção de metais pesados e da água tem sido um grande desafio. Devido à preocupação ambiental, vêm aumentando o interesse por métodos alternativos, como o uso de fungos para a biorremediação de áreas contaminadas por metais pesados (Kotrba & Ruml, 2000)

3.1.2. Importância Biotecnológica dos Fungos

A biotecnologia é uma área de investigação que explora sistemas biológicos, microbianos ou de culturas vegetais e animais, visando à obtenção de produtos de interesse industrial. Devido aos microrganismos apresentarem crescimento rápido, menor custo e espaço para crescimento, possibilitando maior controle dos processos operacionais, há mais vantagens no seu uso, principalmente nos processos fermentativos (Demain, 1996).

O desenvolvimento da Biotecnologia tem importância ímpar para o Brasil, devido ao seu baixo impacto ambiental, fator que possibilita conciliar o desenvolvimento industrial com a preservação de ecossistemas.

Os fungos têm sido bastante usados em processos biotecnológicos, em especial como produtores de diferentes substâncias de interesse econômico, tais como: enzimas, antibióticos, vitaminas, aminoácidos e esteróides (Souza et al, 2008).

Historicamente, o potencial metabólico dos microrganismos inseriu-se naturalmente em aspectos fundamentais da vida humana. Assim, fungos apresentam peculiaridades metabólicas que permitiram o seu uso de forma empírica na produção do pão e do vinho, alimentos simbólicos na história da humanidade. (Panek, 1993)

As fermentações industriais contribuem atualmente de forma significativa para a economia de vários países. São produzidas por ano centenas de toneladas de leveduras utilizadas para a produção de pão, vinho, cerveja, bebidas destiladas, cidra, saquê e licores.

A comercialização de produtos terapêuticos microbianos iniciou-se há mais de 50 anos com a penicilina (Buckland & Lilly,1993).Inicialmente empregados apenas como agentes antibacterianos, os produtos do metabolismo secundário de fungos apresentam hoje em dia uma gama bastante diversificada de aplicações farmacológicas, incluindo o uso como imunossuppressores em terapias sofisticadas para pacientes transplantados (Pearce, 1997).

Em geral, os fungos basidiomicetos são capazes de tolerar elevadas concentrações de poluentes orgânicos, o que possibilita a aplicação destes organismos na biorremediação (Barr & Aust 1994).

Os fungos juntamente com as bactérias heterotróficas são os principais decompositores de materiais lignocelulósicos da biosfera. Vários fungos estão associados a degradar dejetos e detritos de esgotos até um grau em que possam ser considerados adubo ou substância equivalente. Ecologicamente podem ser considerados os lixeiros do mundo, por degradarem todo tipo de restos orgânicos, independente da origem, transformando-os em elementos assimiláveis pelas plantas (Neufeld,1997; Putzke & Putzke, 2002, 2004). Assim dentro da biotecnologia moderna, uma das maiores contribuições para a questão do tratamento de resíduos é representada pelo desenvolvimento de processos fundamentados em fungos.

3.1.3. Fungos Deterioradores de Madeira

A madeira é degradada biologicamente porque os organismos reconhecem os polímeros naturais da parede celular como fonte de nutrição, e alguns destes possuem sistemas enzimáticos específicos capazes de metabolizá-los em unidades digeríveis (Blanchette, 1980; Oliveira et al, 1986; Castro e Silva, 1996).

Entre os organismos vivos, os que apresentam um grande potencial enzimático são os fungos. Dentre estes, temos o fungo *Pycnoporus sanguineus* que causam grandes perdas de material estrutural devido seu ataque aos componentes químicos da madeira

(Kirk & Chang, 1981; Castro e Silva et al, 1993; Castro e Silva & Aguiar, 2001; Oliveira et al., 1986).

Para a degradação dos componentes da parede celular os fungos degradadores de madeira utilizam-se de enzimas que podem apresentar potencial para uso industrial. Cada componente químico pode ser metabolizado por diferentes enzimas, daí que, podemos classificar a podridão da madeira em função do tipo de componente químico que é atacado (Castro e Silva, 1996).

As primeiras vias de colonização da madeira por todos os tipos de fungos são usualmente as células dos raios que são vias anatômicas de mais acesso e menor resistência (Figura 3). Através das células do raio as hifas têm acesso aos nutrientes de reserva não estruturais de fácil assimilação contidos nas células parenquimáticas (não lignificadas). Por meio da ação do complexo enzimático produzido por essas hifas dá-se o processo de decomposição da madeira (Kirk e Cullen, 1998).

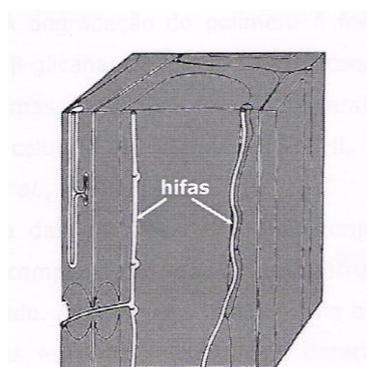


Figura 3 - Vias de colonização da madeira pelos fungos.

Dessa forma, assume-se que o processo de biodegradação de um substrato lignocelulósico, como a madeira, ocorre pela ação combinada de uma variedade de sistemas enzimáticos e alguns agentes não enzimáticos de baixa massa molar como ácido oxálico, álcool veratrílico, ácido graxo insaturados e agentes redutores de ferro, que são produzidos extracelularmente pelos fungos. Através destes sistemas lignocelulósicos, os fungos degradam os componentes insolúveis da madeira, transformando-os em componentes menores e solúveis. (Fengel e Wegener., 2003).

O tipo de podridão de madeira causada pelos fungos pode ser dividido, em três classes: podridão branca, podridão parda e podridão mole (Castro e Silva & Aguiar, 2001). Estes tipos de podridões são identificados através de aspectos macroscópicos e microscópicos, alterações químicas na composição da madeira.

Dentro da biotecnologia moderna, uma das maiores contribuições para a questão do tratamento de resíduos é representada pelo desenvolvimento de processos fundamentados em fungos, principalmente os de decomposição branca. Trata-se de uma família de fungos que apresenta elevada eficiência para degradação de lignina e de inúmeros substratos de natureza fenólica similar.

No caso específico do *Pycnoporus sanguineus* a podridão causada é a do tipo podridão branca (Figura 4). Os fungos que provocam este tipo de degradação atacam tanto a lignina como os polissacarídeos.

Alguns no estágio inicial da deterioração quebram enzimaticamente as estruturas da lignina para posterior acesso aos polissacarídeos. Portanto, este tipo de podridão

pode sofrer a ação do fungo de duas maneiras distintas: uma envolvendo a remoção simultânea de todos os componentes e outra, menos freqüente, envolvendo a remoção seletiva de lignina e polioses, mantendo a celulose praticamente intacta (Wilcox, 1968).

A Podridão Branca é caracterizada por perda da pigmentação, tornando a aparência alvejada, a madeira torna-se mais macia, esponjosa, e após um longo período de degradação ocorre a perda da consistência, ou seja, a madeira rompe-se facilmente no sentido das fibras.

. Este tipo de degradação da madeira só é possível pelo fato destes organismos possuírem um pool de enzimas que lhes permitem degradar e modificar a lignina, celulose e hemicelulose.



Figura 4 – Podridão branca em madeira.

3.2. Basidiomicetos

Os fungos, em particular os Basidiomicetos, são conhecidos, seja pelas suas propriedades nutricionais e medicinais, seja pela sua toxicidade. É uma subclasse de grande importância econômica por abranger fungos parasitas, fungos degradadores da

madeira e os fungos comestíveis que sustentam a atividade industrial (Lacaz et al, 1970).

Basidiomicetos são consideradas todas as espécies de fungos que produzem corpos frutíferos facilmente visíveis a olho nu. O filamento dos Basidiomycetes, denominado de hifa é tubular e a massa de hifas recebe a denominação de micélio. A reprodução é realizada por meio da produção de esporos, contudo, qualquer fragmento de hifa possui capacidade de propagação (Raven et al., 1978).

Diferenciações morfológicas e fisiológicas do micélio formam os corpos de frutificação conhecidos como basidiocarpos, carpóforos ou cogumelos. No desenvolvimento dos cogumelos, distinguem-se duas fases conhecidas como estágio vegetativo e estágio reprodutivo ou de frutificação. O estágio vegetativo refere-se ao desenvolvimento do micélio e o reprodutivo à formação dos basidiocarpos. Durante a colonização do substrato, enzimas extracelulares são secretadas degradando a matéria orgânica transformando-a em compostos orgânicos solúveis absorvidos pelas hifas. O crescimento do micélio resulta de uma efusão de hifas, gerando uma associação entre hifa e substrato, que proporciona um forte suporte físico necessário a formação dos corpos de frutificação. Quando este estágio é atingido o micélio é considerado como estabilizado e a mudança para o estágio reprodutivo está normalmente condicionada a variação de fatores físicos como o decréscimo de temperatura e aumento de umidade (Chang et al, 1998).

A maioria dos Basidiomycetes pode utilizar os componentes da madeira para o seu crescimento, porque possuem um sistema enzimático que os torna capazes de

degradar fontes complexas de carbono como a celulose, a hemicelulose e a lignina, mostrando o importante papel desses fungos no processo de reciclagem da biomassa das florestas (Buswell, et al., 1998).

São conhecidos alguns parasitas de espécies agrícolas importantes ou de árvores. Podem ainda formar associações micorrízicas com vegetais ou algas, formando líquens (Loguércio-Leite, 2004). Algumas espécies de Basideomicetos são cultivadas comercialmente e outras são coletadas em áreas naturais e utilizadas como alimentos (Przbylowicz & Donogue, 1990; Herrera & Ulloa, 1998; Loguercio-Leite, 2004).

O número de espécies de basideomicetos está estimado em 140.000, no entanto menos de 10% é conhecido (Lindequist et al., 2005). Esta classe compreende 22.300 espécies distribuídas em 3 classes, 41 ordens, e 165 famílias (Raven et al 2001; Loguercio-Leite, 2004).

A fase vegetativa dos basidiomicetos é denominada micélio, que por sua vez é formado por muitos filamentos septados chamados hifas. As hifas penetram no substrato e absorvem nutrientes (Alexoporus,1962). Individualmente, a hifa é microscópica, mas pode ser visível quando é formada a massa micelial. A cor do micélio é usualmente branca, podendo variar de amarelo ao alaranjado ou cores mais escuras, inclusive marrom e preto. (Alexoporus,1962; Putzke & Putzke, 2004).

3.3. *Pycnoporus sanguineus*

3.3.1. Enquadramento Taxonômico

Reino: Fungi

Divisão (Filo): Basidiomycota.

Classe: *Basidiomycetes*

Ordem: *Polyporales*.

Família: *Polyporaceae*.

Gênero: *Pycnoporus*

Espécie: *sanguineus*

Nome Binomial: *Pycnoporus sanguineus* (L.: Fr.)Murr.

3.3.2. Morfologia

O fungo *Pycnoporus sanguineus* possui corpo frutífero com aspecto semelhante a uma flor de coloração alaranjada (Figura 5).



Figura 5 - Corpo frutífero do fungo *P. sanguineus*.

Esta espécie apresenta uma frutificação semi-circular e encontra-se distribuída horizontalmente contra os caules das árvores. Sua superfície é lisa e ligeiramente marcada em zonas concêntricas de coloração vermelho-laranja com dimensões que variam de 2,0 x 7,0 x 1,5-4,5 cm (Leep 2005; Smânia et al, 1998).

O Basidioma é anual, séssil a subestipitado, coriáceo. O basidioma de coloração avermelhada distingue *Pycnoporus sanguineus* das demais espécies encontradas (Nobles & Frew, 1962).

3.3.3. Distribuição e Habitat

Evidências genéticas e morfológicas indicam a presença de três espécies para o gênero *Pycnoporus*: *P. cinnabarinus* (Jacq. Ex Fr.) Karst., que ocorre em regiões de clima temperado no hemisfério Norte; *P.coccineus* (Fr.) Bond & Sing., que ocorre em regiões de clima temperado do hemisfério sul e em países vizinhos à Índia e oceano pacífico; e *P.sanguineus* (L. Ex Fr.) Murr, que caracteriza-se por ser um cogumelo de ocorrência ampla, sendo facilmente encontrado em regiões tropicais e subtropicais dos hemisférios Norte e Sul (Nobles & Frew, 1962).

Pycnoporus sanguineus é cosmopolita e comum no Brasil, e está associado a clareiras em florestas, sugerindo uma provável adaptação a ambientes pouco úmidos ou com temperaturas elevadas (Ryvarden & Johansen, 1980).

O *Pycnoporus sanguineus* desenvolve-se especialmente em locais perturbados, sobre troncos caídos ou queimados (Herrera & Ulloa 1998). (Smânia, et al 1998), afirma que o apesar do gênero *Pycnoporus* possui ocorrência pantropical a única espécie encontrada no Brasil é a de *Pycnoporus sanguineus* A distribuição pantropical do *P.sanguineus*, é relatada para o Amapá, Pará (Sotão et al. 2003), Bahia (Góes-Neto 1999), Espírito Santo (Vinha 1988), Paraná (Ryvarden & Meijer 2002), Alagoas, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte (Gibertoni et al. 2004), Rio Grande do Sul (Silveira & Guerrero 1991, Guerrero & Homrich 1999, Groposo & Loguercio-Leite 2002), Rondônia (Capelari & Maziero 1988), Santa Catarina (Loguercio-Leite & Wright 1991, Gerber 1996) e São Paulo (Gugliotta & Capelari 1995, Gugliotta & Bononi 1999).

3.3.4. Importância Biotecnológica de *Pycnoporus sanguineus*

O fungo *P.sanguineus* tem sido objeto de inúmeras pesquisas com diferentes objetivos tais como: investigação de potencial antimicrobiano, fungicida, biopolpação, biobranqueamento, tratamento de efluentes, produção de enzimas (lacase, peroxidase, cellobiohidrolase, endo-1,4-β-D-Glucanase, β-xilosidase e β-glicosidase) e biossorção de metais pesados.

P.sanguineus ficou conhecido por suas propriedades fitoterápicas empregadas em tratamentos de reumatismo, artrite e gota, quando moído e em infusão é usado contra disenteria, cistos subcutâneos, verrugas e para desinflamar os pés Smânia (1995). Possui ainda propriedade adstringente, antibacteriana e antifúngica. Fidalgo (1968) relata que alguns indígenas brasileiros usavam *P.sanguineus* para estancar hemorragias. Segundo Pérez-Silva et al., (1988), o fungo tem sido usado na medicina popular por tribos indígenas das Américas e da África para tratamento de diversas doenças.

Este fungo sintetiza vários pigmentos, como por exemplo, a cinabarina (Figura 6), pigmento alaranjado que tem uma estrutura básica de fenoxazin-3-one, com um grupo de carbonila em C-1, um grupo amino no C-2 e um grupo hidróxila em C-9 (1.3). Seu nome químico é 2-amino-9-(hidroximetil)-3-oxo-3H-fenoxazina-1-acido carboxílico, (C₁₄H₁₀N₂O₅). A produção desta substância ocorre *in vitro* entre o 18 e 20 dias da incubação. A síntese da cinabarina é aumentada significativamente quando o pH dos meio de cultura é ajustado a 9.0, com incubação em 25°C, sob a luz (Smânia, et al 1995).

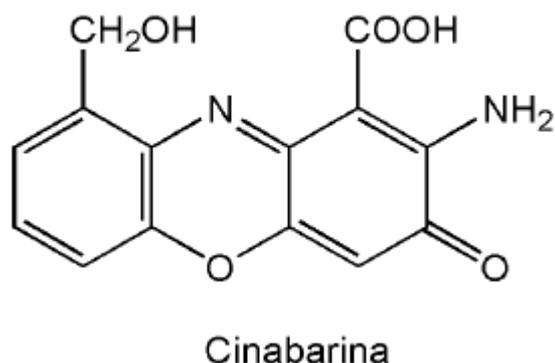


Figura 6 - Estrutura da cinabarina.

A cinabarina obtida do caldo micelial de *Pycnoporus sanguineus* teve atividade antibacteriana contra diferentes estirpes isoladas de humanos: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus spp.* Verificou-se em relatos da literatura que a cinabarina produziu maior inibição de crescimento frente aos cocos Gram-positivos (Smânia et al., 1995). Esta substância quando testada contra onze espécies bacterianas isoladas de alimentos, foi mais eficiente em relação à *Bacillus cereus* e *Leuconostoc plantarum* (Smânia et al.; 1998). É reportado na literatura que este mesmo composto demonstrou atividade antiviral contra o vírus da raiva (Smânia, 1995).

3.4. Enzimas

A palavra enzima, do grego énzymo (em: na; zymos: levedura) foi sugerida por Kuhne, no seu primeiro trabalho, como nome genético para “fermentos” que atuavam na ausência de organismos ou fora deles. (Bon, et al., 2008).

As enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas. Elas estão entre as biomoléculas mais notáveis devido a sua extraordinária especificidade e poder catalítico, que são muito superiores aos dos catalisadores produzidos pelo homem. Praticamente todas as reações que caracterizam o metabolismo celular são catalisadas por enzimas. Como catalisadores celulares extremamente poderosos, as enzimas aceleram a velocidade de uma reação, sem participar dela como reagente ou produto (Lehninger, 1995).

Segundo Lehninger (1995), a catálise enzimática das reações é essencial para os sistemas vivos. Sob condições biológicas relevantes, as reações não catalisadas tendem a ser lentas.

As enzimas são usadas, em grande escala, na indústria de tecidos (celulases), detergentes (proteases e lipases), de alimentos (amilases, pectinases, proteases e celulases) e de couro (proteases e lipases) (Nielsen & Oxenboll, 1998).

A vantagem da utilização de enzimas em muitos processos deve-se à menor produção de subprodutos residuais, o que propicia a obtenção de produtos de melhor qualidade e com menor probabilidade de poluição do meio ambiente.

Outras vantagens da aplicação de enzimas estão relacionadas com o custo de produção relativamente baixo, susceptibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais, espectro amplo de características físico-químicas de diferentes enzimas (geralmente relacionadas ao habitat e fisiologia do microorganismo

produtor), susceptibilidade de manipulação genética e por representarem um recurso natural renovável.

As enzimas foram classificadas de acordo com o tipo de reação catalisada. (Tabela 02). A maioria das enzimas catalisa a transferência de elétrons, átomos ou grupos funcionais. Assim, elas são classificadas, recebem nomes e números de código de acordo com a reação de transferência, o grupo doador e o grupo receptor. (Lehninger, 1995).

Tabela. 02 - Classificação Internacional das Enzimas.

N ^o .	Classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons (íons hidretos ou átomos H).
2	Transferases	Reações de transferência de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise
4	Liases	Adição de grupos em ligações duplas ou formação de ligações duplas pela remoção de grupos
5	Isomerasas	Transferência de grupos dentro da mesma molécula para formar isômeros
6	Ligasas	Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N pelo acoplamento da clivagem do ATP com as reações de condensação.

Fonte: Lehninger, 1995.

A produção de enzimas sofreu grande expansão desde os anos 60 devido ao desenvolvimento da tecnologia de fermentação e mais recentemente pela introdução da engenharia genética. Microrganismos recombinantes estão agora se tornando a principal fonte para uma ampla variedade de tipos de enzimas. Não resta dúvida que a tendência

no futuro é aumentar, principalmente, pela facilidade da manipulação genética e a descoberta de uma variedade de enzimas disponíveis de microrganismos encontrados em ambientes adversos. Muitas enzimas animais têm sido encontradas e desenvolvidas para substituir muitas outras enzimas existentes de origem animal e vegetal (Carvalho, 1997).

No que diz respeito às enzimas animais, ainda nos dias atuais, tecidos e órgãos de animais são excelentes fontes de lipases, esterases e proteases, sendo as mais notáveis, pepsina, tripsina e quimosina. (Rodwel, et al., 1985; Tanaka et al., 1993).

Por outro lado, microrganismos são as fontes mais convenientes de enzimas. O número e a diversidade de enzimas é proporcional ao número e diversidade de microrganismos (Lowe, 2001). Microrganismos têm sido coletados de ambientes extremamente hostis como ártico, fontes termais, floresta tropical e desertos. O espectro de atividades enzimáticas é grande. Técnicas de engenharia genética tem contribuído com a indústria de enzimas aumentando a produtividade de fermentação enzimática. Mesmo as propriedades dessas enzimas podem ser alteradas e melhoradas pela engenharia da proteína (Archer *et al.*, 2001).

3.4.1. Fenoloxidasas

As fenoloxidasas compreendem um conjunto de enzimas. Dentre as fenoloxidasas estão as maiores famílias de enzimas fúngicas ligninolíticas como lacases e manganês peroxidase-MnP (D'Souza et al, 1999). Os mais efetivos biodegradadores de lignina na natureza são os fungos da podridão branca, pertencentes ao grupo dos

basidiomicetos. A maioria destes fungos produz lacase, fenoloxidase extracelular com importante papel na degradação da lignina.

Estas enzimas são utilizadas principalmente na indústria de biopolpação da madeira, aproveitamento de resíduos lignocelulósicos para ração animal, degradação de xenobióticos e biorremediação (Maciel et al, 2010; Valmaseda et al, 1990).

3.4.2. Lacase (E.C 1.1.0.3.2)

A lacase foi descrita pela primeira vez por Yoshida em 1883, sendo, portanto, uma das primeiras enzimas já descritas. A primeira referência da ocorrência de lacases em fungos foi feita provavelmente em 1897. (Shleev et al, 2004).

Lacases são principalmente glicoproteínas extracelulares ligadas ao cobre bivalente, o qual é reduzido durante a oxidação de fenóis (Figura 7) e subsequentemente oxidado novamente ao estágio bivalente pelo oxigênio (Forss et al., 1989). Lacase são enzimas monoméricas, diméricas ou tetraméricas com pesos molecular entre 60 e 80 kDa e com teor de carboidrato entre 15 e 20% (Thurston,1994).

Vários estudos têm demonstrado a participação da lacase em eventos ligninolíticos significativos que incluem a oxidação de unidades não- fenólicas da lignina, a geração de H₂O₂ requerida tanto para as atividades peroxidases como para a formação de radical oxídrico (OH), e a produção de Mn³⁺ a partir de Mn²⁺ presente nos lignocelulósicos.

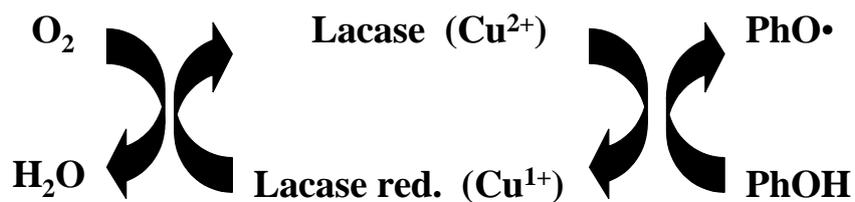


Figura 7 - Esquema de mecanismo de ação das lacases / Fonte: Ferraz (2004).

As lacases catalizam a polimerização oxidativa das unidades fenólicas da lignina e uma variedade de compostos fenólicos e aminas aromáticas, os quais são facilmente removidos por filtração. Sob certas condições clivam um grande número de compostos fenólicos sintéticos e biológicos (Roy-Arcand & Archibald, 1991). A reação normalmente envolve um mecanismo de remoção de um radical mesomérico.

Ressalta-se ainda que no caso específico da lacase o seu papel específico na degradação da lignina ainda não está completamente elucidado, sabe-se que esta degradação pode ocorrer mesmo na ausência de LIP e MnP (Garcia, 2006) e que ela está envolvida tanto na polimerização, quanto na despolimerização da lignina (Thurston, 1994).

A seqüência de aminoácidos da lacase contém resíduos de uma cisteína e dez histidinas os quais estão envolvidos na ligação dos átomos de cobre (Thurston, 1994).

3.4.2.1. Lacase Fúngica

Lacases fúngicas tem sido encontradas em diferentes gêneros de ascomicetos, alguns deuteromicetos e principalmente basidiomicetos, particularmente aqueles

associados com madeira deteriorada ou em estágio terminal de decomposição (Wood 1980, citado por Souza et al.2004).

Os melhores produtores de lacases são os basidiomicetos pertencentes ao grupo de decomposição branca, eficientes degradadores de madeira (Thurston 1994).

Entre os basidiomicetos, membros do gênero *Pycnoporus* tem se mostrado como produtores de várias enzimas de aplicações industriais como xilase, glicosidase e invertase (Esposito 1992).

Este gênero se mostra bastante interessante por produzir lacase como a principal enzima lignolítica (Eggert et al. 1996), o que pode em alguns casos, dispensar etapas de purificação para uso em processos biotecnológicos (Lomascolo et al. 2002). Entre as 20 espécies de *Pycnoporus* estudadas por Lomascolo e colaboradores (2002), a maior atividade de lacase foi detectada em uma linhagem de *P. sanguineus*. Ainda no mesmo trabalho foi detectada uma maior produção de lacase entre as linhagens de *P. sanguineus* originárias de regiões tropicais e subtropicais.

Destaca-se ainda que a grande maioria dos trabalhos publicados refere-se à lacase extracelular de fungos basidiomicetos, havendo pouco estudo sobre lacases intracelulares (Leonowicz et al. 2001)

3.4.3. Peroxidases

Tanto a peroxidase como a lacase oxidam compostos fenólicos. Os produtos resultantes da oxidação polimerizam espontaneamente, formando complexos insolúveis, os quais podem ser removidos por precipitação, filtração ou centrifugação (Davis & Burns, 1978).

As peroxidases mais utilizadas são: Lignina Peroxidase ou Ligninase (LiP) e Mangânes Peroxidase (MnP).

A lignina peroxidase (LiP) possui um peso molecular de 38 a 43 kDa e contém protoporfirina IX como grupo prostético. No processo de degradação da lignina esta enzima oxida o núcleo aromático (fenólico) pela remoção de um elétron, gerando radicais fenoxi e radicais cátions. Por último, reage espontaneamente com nucleotídeos (principalmente água) e oxigênio molecular. O resultado é uma “combustão enzimática” nas quais as ligações C-C e C-O são divididas, despolimerizando a molécula e abrindo os anéis aromáticos, formando, com isso, abundantes produtos aromáticos e alifáticos. (Michel et al., 1991; Maciel et al, 2010).

As manganês-peroxidases são glicoproteínas com peso molecular entre 43 – 49 kDa e ponto isoelétrico entre 4,2 e 4,9, contendo um mol de ferro porfirinico IX / mol de enzima (Glenn & Gold, 1985). Essas enzimas identificam-se em torno de 57% com as LiP (Sundaramoorthy et al., 1994). Em contraste com as LiP, Mn-P contém um

“loop” extra próximo ao sítio ativo e um único sítio é o sítio de ligação do substrato proposto (MnII) mostrado na Figura 8. (Maciel et al, 2010)



Figura 8 - Mn (II) é oxidada a Mn (III) por uma peroxidase dependente de Mn.

Fonte: FERRAZ, 2004

O produto principal da reação Mn(II) o qual é oxidado pela MnPI e MnPII para Mn(III) este é estabilizado formando complexos com ácidos orgânicos, por exemplo, lactato ou oxalato e então oxida um substrato aromático gerando radicais fenox ou radicais cátion aril. Tanto lignina peroxidase com manganês peroxidase, são importantes na descoloração de efluente Kraft (Michel et al., 1991; Maciel et al, 2010).

3.5. Testes de avaliação da atividade antimicrobiana

Diversos métodos laboratoriais podem ser utilizados para medir a sensibilidade *in vitro* de microrganismos aos agentes antimicrobianos. Em muitos laboratórios de microbiologia clínica, utiliza-se rotineiramente o método de difusão em ágar para testar os patógenos mais comuns, de crescimento rápido e determinadas bactérias fastidiosas.

3.5.1. Método de Difusão em Ágar

No método de difusão em ágar: a substância pesquisada é colocada em um reservatório, podendo este ser disco de papel, cavidade no meio de cultura ou cilindro sobre a superfície, em contato com meio de cultura sólido previamente semeado com o

microrganismo teste. A leitura é qualitativa, e realizada após o período de incubação, medindo-se o diâmetro do halo de inibição de crescimento microbiano formado.

3.6. Antimicrobianos

Os antimicrobianos são medicamentos utilizados no controle de infecções de origem bacteriana, viral ou fúngica, porém seu uso errôneo e indiscriminado pode induzir resistência (Uzeda, 2002).

Os antimicrobianos mais conhecidos são os antibióticos, produtos de enorme importância não apenas na área de saúde, como também na economia. Cerca de aproximadamente 8000 substâncias com atividade antimicrobiana são conhecidas e, a cada ano, centenas de novas substâncias são descobertas, mas pouquíssimas são efetivamente aproveitadas e utilizadas como agentes antimicrobianos, visto que muitas destas não atendem aos requisitos mínimos para seu emprego terapêutico. Paralelamente, não podemos deixar de mencionar o crescente problema em relação ao surgimento de espécies bacterianas resistentes aos diferentes antibióticos. Este talvez corresponda ao principal desafio dos pesquisadores, visto que a multirresistência vem se tornando diariamente mais disseminada nas populações microbianas, sejam patogênicas ou não.

Os antibióticos devem ser tóxicos para o patógeno, mas inócuos para o hospedeiro. Isso significa que o fármaco, em uma concentração tolerada pelo hospedeiro, deve ter capacidade para eliminar ou impedir o crescimento do parasita. Por

esta razão, os antibióticos são caracterizados como fármacos de toxicidade seletiva (Rang et al., 2001).

A época áurea da terapia antimicrobiana iniciou-se em 1941 e desde então, inúmeros pacientes foram curados de infecções potencialmente fatais usando-se um ou mais esquemas terapêuticos com antibióticos. Estas substâncias estão entre os fármacos mais utilizados, tanto em ambulatórios quanto em hospitais e têm reduzido drasticamente a incidência de muitas doenças infecciosas (Adolpho et al., 2006).

Por outro lado, muitas infecções causadas por microrganismos emergentes ou multirresistentes permanecem sem opções terapêuticas efetivas, aliado aos sérios efeitos colaterais produzidos pela farmacoterapia, o que tornou necessário a busca, cada vez maior, de novos fármacos. Daí a importância da pesquisa por novas substâncias com poder bactericida ou com propriedades bacteriostáticas (Tavares, 2001; Hardman et al., 2003).

Assim, os compostos de origem natural desempenham funções muito importantes na medicina atual, pois são fonte de medicamentos extremamente úteis como, por exemplo, diversos alcalóides e peptídeos bioativos, antibióticos, vacinas e produtos afins. (Adolpho et al., 2006).

3.6.1. Fungos Produtores de Antimicrobianos

Estima-se que 41% dos medicamentos disponíveis foram desenvolvidos de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais (Calixto & Yunes, 2003).

Aproximadamente 50.000 metabólitos secundários são produzidos por microrganismos. Dentre esses, dos 12.000 antibióticos identificados, 22% são oriundos de fungos filamentosos, dos quais, as penicilinas, cefalosporina C, griseofulvina e ácido fusídico são clinicamente importantes e biossintetizados por *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cephalosporium* (Crueger & Cruger, 1990; Manfio 2002; Pearce, 1997).

A primeira importante descoberta entre os antibióticos, a penicilina, ocorreu acidentalmente quando Alexandre Fleming, em 1928, observou uma cultura de estafilococos eliminada por *Penicilium notatum*. Esta descoberta levou a uma busca concentrada por novas drogas antibacterianas durante os trinta anos seguintes e resultam na descoberta das principais classes de antibióticos conhecidos atualmente, muitas delas derivadas de produtos naturais.(Buther & Buss, 2006).

Em 1941, Florey, Chain e colaboradores iniciaram a utilização experimental da penicilina no tratamento de processos infecciosos em seres humanos. Robert Robinson e colaboradores, em 1943, identificaram a estrutura da penicilina-G, viabilizando sua síntese. Em 1944, foram isolados a estreptomicina e vários outros antibióticos produzidos por *Streptomyces griseus*. Os esforços na descoberta de novos antimicrobianos geraram a descoberta do cloranfenicol em 1947, da eritromicina em

1952, da cicloserina em 1955 e em 1962, o ácido nalidíxico em 1962 (Barreiro & Fraga 2001.; Amarante, 2002).

Os primeiros trabalhos sobre antibióticos de basidiomicetos foram realizados em 1941 por Anchel, Hervey e Wilkins, que examinaram extratos de mais de 2.000 espécies e detectaram diversas atividades antibióticas, sendo que o primeiro antibiótico produzido industrialmente a partir de basidiomicetos foi o mucidim, de nome comercial *Mucidermin Spofa*®, com atividade antibacteriana e antifúngica, e isolado de *Oldemansiella mucida* (Subick et al., 1974).

Grande parte dos antibióticos usados na prática médica são obtidos através de microrganismos. Os compostos com atividade antimicrobiana geralmente localizam-se nos metabólitos secundários. Estes compostos são caracterizados pela grande diversidade de estruturas químicas e funções e possuem ainda vantagem seletiva ao microrganismo produtor. (Buther & Buss, 2006; Demain, 1996; Peláez, 2006; Tavares, 2001).

A tabela 03 mostra exemplos de antibióticos e os respectivos fungos que os produzem, os quais estão sendo utilizados na indústria farmacêutica. Novos compostos têm sido investigados em escala de *screening* farmacológico industrial, como agentes antitumorais e anticancerígenos, inibidores enzimáticos, imunomoduladores e agentes cardiovasculares (Bononi, 1999; Brizuela et al, 1998; Manfio, 2002; Okunade et al, 2004; Sugie et al, 2001).

Tabela 03 - Fungos Produtores de Antimicrobianos.

Microrganismos	Antibióticos
<i>Aspergillus clavatus</i>	Clavalina
<i>Aspergillus flavus</i>	Ácido aspergílico
<i>Aspergillus flavus, A. giganteus e A. parasiticus</i>	Flavicina
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumigacina (Ácido belvólico)
<i>Cephalosporium salmosynne</i>	Cefalosporina N
<i>Chaetomium cochiodides</i>	Chaetomina
<i>Chaetomium iodinium</i>	Iodinina
<i>Chaetomium violaceum</i>	Violaceína
<i>Gliocadium sp.</i>	Gliotoxina
<i>Micromonospora sp.</i>	Micromonosporina
<i>Penicillium citrinum</i>	Citrinina
<i>Penicillium cyclopium e Penicillium puberulum</i>	Ácido penicílico
<i>Penicillium notatum</i>	Penicilina
<i>Penicillium spinulosum</i>	Espinulosina
<i>Proactinomyces albus e P. violaceus</i>	Proactinilomicina, Actinomicetina
<i>Streptomyces antibioticus</i>	Actinomicina
<i>Streptomyces levendulae</i>	Estreptomicina
<i>Streptomyces griseus</i>	Estreptomicina
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Clortetraciclina
<i>Streptomyces venezuelensis</i>	Cloranfenicol
<i>Streptomyces rimosus</i>	Oxitetraciclina
<i>Streptomyces noursei</i>	Fungicidina
<i>Streptomyces bachijoensis1</i>	Tricomina (Cabimicina)
<i>Streptomyces nodosus</i>	Anfotericina A e B

Fonte: LACAZ, (2002).

Para minimizar o problema da resistência aos antimicrobianos já existem disponíveis no mercado diversas pesquisas usando novos produtos naturais, usados de forma empírica pela população e que, estão em andamento. Entre estes recursos naturais

podem ser citados os fungos, dentre os seres vivos com expressivo potencial para extração de novas substâncias antibióticas (Ishikawa et al., 2001).

3.7. Condições de Cultivo

É importante o estudo das condições de cultivo da espécie fúngica pesquisada, porque pode ocorrer incremento tanto da biomassa micelial, quanto dos metabólitos secundários e exopolissacarídios, importantes em várias atividades biológicas deste fungo (Hwang et al., 2003). As condições ideais para o crescimento micelial podem não ser as mesmas do que aquelas para a produção dos compostos bioativos de interesse.

Com relação aos nutrientes, são o carbono e o nitrogênio os elementos dominantes na fermentação porque estão diretamente ligados à produção de biomassa e dos metabólitos. Também a natureza e a concentração da fonte de carbono podem regular o metabolismo secundário através do fenômeno conhecido como repressão catabólica. A relação C:N é outro fator importante, e na maioria dos fungos, a limitação de nitrogênio diminui o crescimento mas incrementa a produção das substâncias bioativas (Manzoni et al., 1999; López et al., 2003). Pesquisas recentes com várias fontes, e quantidades de carbono e nitrogênio mostraram variações conforme a espécie estudada, e o implemento de biomassa ou metabólito (Kim et al., 2002; Elisashvili et al., 2003; Hwang et al., 2003; Lee et al., 2004; Tang & Zhong 2002; Wu et al., 2003; Wagner et al., 2004).

As temperaturas ótimas para a produção de substâncias bioativas são geralmente mais baixas do que aquelas para o crescimento micelial, mas podem variar

consideravelmente. Também o tempo de incubação é outro ponto importante, e é dependente das condições de cultivo e das características de crescimento do fungo (Jonathan et al, 2004; Knight et al., 2003; Lee et al., 2004; Park et al., 2001).

Aeração e agitação do caldo de fermentação propiciam a demanda de oxigênio no cultivo submerso. A condição de agitação da cultura em caldo é importante, aumentando a biomassa micelial, exopolissacarídeos e outros produtos fúngicos. (Lee et al., 2004)

Portanto, os vários trabalhos comprovam que há diferenças entre os vários fungos, quanto à otimização das condições de cultivo, e o conhecimento destes aspectos pode melhorar a produção de substâncias de interesse econômico (Kim et al., 2002).

3.8. Meios de Cultura

O conhecimento nutricional dos fungos é de grande importância, pois permite o crescimento, desenvolvimento e manutenção de um fungo em laboratório.

Os meios de cultura destinam-se ao cultivo artificial de microrganismos. Estes meios devem fornecer os princípios nutritivos indispensáveis ao seu desenvolvimento sob forma assimilável e em concentração não inibitória ao crescimento. Além disso, todo meio de cultura deve ser submetido a esterilização a fim de eliminar qualquer microrganismo contaminante.

De um ponto de vista geral os meios de cultura podem ser classificados segundo a consistência em sólido, semi-sólido ou líquido; quanto a função podem ser enriquecedores, seletivos, diferenciadores ou de manutenção e quanto a natureza classificam-se em animados ou inanimados.

Os meios de cultura mais utilizados para os fungos são os semi-sólidos (gel) e os líquidos (caldo). O meio semi-sólido é geralmente o mais indicado para a manutenção e crescimento dos fungos, pois os substratos naturais de muitos fungos são sólidos ou semi-sólidos, como é o caso da madeira, tecido animal e vegetal ou solo. Dentre os agentes semi-sólidos, o ágar é o mais indicado, por não se liquefazer antes de atingir 100°C e permanecer líquido até próximo de 45°C, no resfriamento.

Já o meio líquido é muito utilizado para a obtenção de metabólitos secundários uma vez que quando o microrganismo se desenvolve tende a lançar para o meio seus metabólitos secundários e o meio líquido facilita a extração.

No caso de aplicabilidade biotecnológica dos fungos, a fase de crescimento é muito importante para a qualidade do processo, pois de acordo com Donini (2006) a fase de miceliação do substrato possui uma importância fundamental para o crescimento dos basidiomicetos, pois quanto mais rápido ocorrer seu desenvolvimento menor é o risco de contaminação.

O crescimento miceliano pode ser influenciado pela redução na concentração de nutrientes e oxigênio, acúmulo de produtos finais tóxicos, produção de metabólitos

secundários e mudanças de fatores como o pH (Regina, 2001). Assim podemos afirmar que o meio de cultura pode influenciar diretamente no crescimento do fungo e na produção de metabólitos pelo mesmo.

3.8.1. Meio de cultura: Fonte de Nutrientes de Resíduos Agrícolas

Os fungos, em função de suas características de reprodução e crescimento, adaptam-se a uma grande variedade de substratos, entre eles, efluentes de indústrias processadoras de alimentos, resíduos agrícolas e agro-industriais. (Tavares, et al. 1998).

Nos últimos anos, há um interesse crescente no uso eficiente de diversos resíduos agroindustriais e agrícolas (Pandey, et al, 1999; Reddy, et al., 2003).

Neste sentido, vários bioprocessos têm sido desenvolvidos utilizando estes materiais como substratos para a produção de diversas moléculas com alto valor agregado, tais como: proteínas microbianas, ácidos orgânicos, etanol, enzimas e metabólitos secundários biologicamente ativos. O uso de resíduos agrícolas como substratos em bioprocessos, além de poder ser economicamente viável, ajuda a resolver os problemas ambientais decorrentes do seu acúmulo na natureza. (Rosales, et al., 2005; Villas-Bôas, et al., 2002).

Assim podemos afirmar que as principais vantagens advindas desta proposta são a redução do impacto ambiental causado pelo descarte de resíduos in natura no ambiente e a agregação de valor aos mesmos, ou seja, esta etapa da pesquisa visa possibilitar bioprocessos que promovam o desenvolvimento sustentável.

3.8.1.1. Casca de Melancia (*Citrullus lanatus*)

Quadro Taxonômico da Melancia.

Reino: Plantae.

Divisão: Magnoliophyta.

Classe: Magnoliopsida.

Ordem: Cucurbitales.

Família: Cucurbitaceae.

Gênero: *Citrullus*.

Especie: *lanatus*

Nome Binomial: *Citrullus lanatus*

Dentre as frutas que produzem grande quantidade de resíduos, encontra-se a melancia, botanicamente classificada como *Curcubita lanatus*, é originária da Índia, porém introduzida no Brasil, onde se aclimatou muito bem, pelos escravos, da África tropical na época da colonização. (Santana & Oliveira, 2005).

A fruta possui três partes: Casca, polpa e sementes. A casca é espessa (1-4 cm). O exocarpo é verde, claro ou escuro, de uma tonalidade única, listado ou às manchas.(Oliveira, 1989).

Tabela 04 – Composição Centesimal da Casca de Melancia

CONSTITUINTES	CASCA DE MELANCIA
Umidade (%)	96,0 ± 0,9
Cinzas (%)	0,58 ± 0, 04
Lipídeos (%)	0,30 ± 0,02
Proteínas (%N x 6,25)	0,93 ± 0,4
Carboidratos (%)	2,19 ± 0,5
Valor Energético Total (kcal)	15,18 ± 1, 53

Fonte: Adaptado de Santana & Oliveira, 2005

3.8.1.2. "Coroa" de Abacaxi (*Ananas comosus*.)

Quadro Taxonômico do Abacaxi

Reino: Plantae.

Divisão: Magnoliophyta.

Classe: Liliopsida.

Ordem: Poales.

Família: Bromeliaceae.

Gênero: *Ananas*.

Especie: *comosus*.

Nome Binomial: *Ananas comosus*.

A parte do abacaxi chamada de “coroa” compreende a parte da muda localizada no ápice do fruto.

O Brasil é o maior produtor de abacaxi da América do Sul. (Fennema, 1993). Assim o abacaxi pode ser considerado como uma das principais frutas brasileiras e está

presente, praticamente, o ano todo no mercado. Segundo Carvalho e Clemente (1981), o abacaxizeiro é uma planta, da qual apenas 22,5% correspondem à polpa do fruto, comestível e altamente industrializada. Dos 77,5% restantes, a casca contribui com 4,5% e a parte vegetativa com 73%. Segundo vários autores, Carvalho & Clemente (1981), Carvalho (1985), Couto (1985), Tisseu (1986), Costa & Carvalho (1989) e Ritonja et al. (1989), as folhas e o caule possuem composição química rica em carboidratos, proteínas e enzimas proteolíticas. Ao contrário da maioria dos resíduos agrícolas, caule e folhas, os resíduos industriais, casca e cilindro central têm sido pouco estudados.

Neste contexto o abacaxi apresenta-se como um grande fornecedor de resíduos (casca, cilindro central e coroa), os quais possuem em sua composição teores apreciáveis de vitaminas, açúcares, fibra alimentar, entre outros constituintes.

3.8.1.3. Bagaço da Laranja

Quadro Taxonômico da Laranja

Reino: Plantae.

Divisão: Magnoliophyt

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Sapindales

Família: Rutaceae

Gênero: *Citrus*

Especie: *sinensis*

Nome Binomial: *Citrus sinensis*

O fruto da laranja é produzido em uma árvore de porte médio, geralmente com oito metros de altura, seu tronco possui casca castanho-acinzentada, sua copa é densa e de formato arredondado. Folhas longas de textura firme e bordos arredondados, flores pequenas brancas e odorantes e atrativas para abelhas.

O fruto possui forma arredondada, casca fina e fibrosa, alaranjada. Polpa amarelo-avermelhada, com muito suco. Sementes achatadas, verde-esbranquiçadas. Contém quantidades apreciáveis de sais minerais, principalmente cálcio, potássio, sódio e fósforo.

Possui frutificação durante todo o ano. Qualquer tipo de laranja contém quantidades apreciáveis de sais minerais, principalmente cálcio, potássio, sódio e fósforo. A laranja é rica em vitaminas do complexo B, contém um pouco de vitamina A e é considerada a melhor fonte de vitamina C (Abecitrus, 2008).

Um dos principais subprodutos da laranja é a produção de suco. O Brasil produz em torno de 53% da produção mundial de suco de laranja sendo responsável por 80% do comércio internacional desse produto. A laranja representa aproximadamente 49% da produção brasileira de frutas. Em 2007, a produção de laranja foi de 18.500.478 t e no ano de 2008 a safra ultrapassou 18.580.908 t (IBGE, 2006).

A industrialização de citros, em especial da laranja, para a produção de sucos gera grandes quantidades de resíduos, que equivale a 50% do peso da fruta e tem uma umidade aproximada de 82%. Atualmente, os resíduos da laranja são utilizados principalmente como complemento para ração animal (Abecitrus, 2008).

Vários estudos têm proposto outros usos para os resíduos de laranja, incluindo a obtenção de fertilizantes orgânicos, pectina, óleos essenciais, compostos antioxidantes e como substratos para a produção de diversos compostos com alto valor agregado, tais como proteínas microbianas, ácidos orgânicos, etanol, enzimas e metabólitos secundários biologicamente ativos. Essas são excelentes alternativas para evitar a poluição do meio ambiente e agregar valor a essas substâncias até então tratadas como resíduos da indústria de processamento da laranja (Abecitrus, 2008).

Destaca-se ainda que apesar da ampla possibilidade de utilização, existem poucos trabalhos na literatura referindo-se ao uso de resíduos da agroindústria da laranja para fins de produção de meio de cultura e obtenção de metabólitos secundários de interesse econômico.

Os resíduos da laranja subdividem-se em: cascas, sementes e bagaço. A casca da laranja contém 16,9% de açúcares solúveis, 9,21% de celulose, 10,5% de hemicelulose e 42,5% de pectina como o componente mais importante. Devido à sua composição rica em carboidratos solúveis e insolúveis, esse subproduto apresenta grande potencial para ser utilizado em produtos de alto valor agregado obtidos através da hidrólise química ou enzimática e posterior conversão biológica (Rivas et al., 2008).

Os açúcares solúveis da casca de laranja são glicose, frutose e sacarose. Os polissacarídeos insolúveis da parede celular da casca de laranja são compostos de pectina, celulose e hemicelulose. A pectina e as hemiceluloses são ricas em ácido

galacturônico, arabinose, galactose e pequenas quantidades de xilose, ramnose e glicose (Grohmann et al., 1995).

A Composição centesimal do bagaço da laranja em matéria seca mostra que o mesmo é composto por: Proteína $8,38 \pm 0,09$ %; Cinzas $4,41 \pm 0,18$ %; Fibra $69,44 \pm 0,28$ % e Carboidratos %13,62 (Cerqueira, et al, 2003).

3.8.2. Meio de cultura: Fonte de Nutrientes Regionais da Amazônia

3.8.2.1. Cará (*Dioscorea alata*)

Quadro Taxonômico do Cará

Reino: Plantae.

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Liliopsida

Ordem: Dioscoreales

Família: Dioscoreacea

Especie: alata.

Nome Binomial: *Dioscorea alata*.

Sinonímia: Batata de polpa roxa.

O Cará Roxo (*Dioscorea alata*.) é uma hortaliça com expressivo consumo mundial e considerada cultura alternativa em expansão, pois seu consumo ultrapassou a batata-doce, a mandioca e a própria batata portuguesa. Como alimento é rico em carboidratos, proteínas, cálcio, ferro e vitamina B1 e B2 (Abramo, 1990). Os teores de

amido (51,59%) e de proteínas (9,04%) são altos e comparativamente parecidos e até superiores aos de milho (52,32% de amido e 8,28% de proteínas) (Vieira et al. 1999).

O Cará é um alimento feculento muito consumido por habitantes de países tropicais; na culinária pode ser utilizado como substituto da batata inglesa, da batata doce e da macaxeira. É alimento de fácil digestibilidade, indicado para dietas. Algumas espécies têm valor farmacológico. Devido o tubérculo não se deteriorar após a colheita, pode conservar-se à sombra em estado natural por até 90 dias. (Abramo, 1990)

Como alimento, é rico em carboidratos, proteínas, fósforo, cálcio, ferro e vitaminas B1 e B2 (Abramo, 1990; Anuário, 1994).

3.8.2.2. Macaxeira (*Manihot esculenta*)

Quadro Taxonômico da Macaxeira

Reino: Plantae.

Divisão: Magnoliophyta

Família: Euphorbiaceae

Gênero: *Manihot*

Espécie: *esculenta*

Nome Binomial: *Manihot esculenta*

De acordo com a F.A.O, (1991), a macaxeira é uma importante cultura tropical, constituindo-se na principal fonte de calorias para mais de 500 milhões de pessoas na África e América do Sul. O Brasil apresenta uma ampla variedade da cultura da

mandioca, sendo estas, muito utilizadas na indústria de farinha, fécula e para o consumo *in natura* sob forma de raiz fresca. Sua importância como alimento pode ser medida pelo alto consumo *per capita* no país que chega a 50,6Kg/hab/ano (Cardoso et al., 1999)

No Brasil existem cerca de 141 etnovarietades de mandioca e macaxeira, dentre as quais 40 estão distribuídas no Amazonas (Faraldo et al., 2000; Silva et al., 2001).

3.8.2.3. Pupunha (*Bactris gasipaes*)

Quadro Taxonômico da Pupunha

Reino: Plantae.

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Liliopsida

Ordem: Arecales

Família: Areaceae

Gênero: *Bactris*

Espécie: *gasipaes*

Nome Binomial: *Bactris gasipaes*

A pupunheira (*Bactris gasipaes*) é palmeira perene, nativa da região tropical das Américas, sendo utilizada, há séculos, para a produção de frutos que são até hoje a base da alimentação dos habitantes de sua região de origem. Os frutos dessa palmeira são ricos em amido (carboidratos) e vitamina A. (Hernandez et al, 2001).

Essa palmeira possui grande potencial econômico em virtude de seus múltiplos usos de seus frutos e palmito. Os frutos, após o cozimento, são consumidos diretamente ou utilizados na produção de farinha, que poderá ser empregada em diversas receitas culinárias. Da polpa pode ser extraído um óleo comestível e da semente um outro tipo de óleo de uso na indústria de cosméticos. Da extremidade do caule se extrai um palmito de excelente qualidade. A quantidade do óleo do mesocarpo tem sido mais estudada do que a qualidade da proteína e contém tanto ácidos graxos saturados (29,6 – 46,3%) como insaturados (53,3 – 69-9%), e ácido oléico (41 – 50,3%) o mais abundante respectivamente (Lorenzi et al, 1996).

3.8.2.4. Buriti (*Mauritia flexuosa*)

Quadro Taxonômico do Buriti

Reino: Plantae.

Divisão: Magnoliophyt

Classe: Liliopsida

Ordem: Arecales

Família: Arecaceae

Gênero: *Mauritia*

Espécie: *flexuosa*

Nome Binomial: *Mauritia flexuosa*.

Sinonímia: coqueiro-buriti, buritizeiro, miriti, muriti, muritim, muruti, palmeira-dos-brejos, carandá-guaçu, carandaí-guaçu, miriti (PA), moriti, muriti, boriti.

O buriti, *M. flexuosa*, é uma palmeira robusta que atinge 35 metros de altura, com tronco (estipe) solitário e ereto, sem ramificação, liso e com anéis uniformemente espaçados, de 30-60 cm de diâmetro. No ápice do estipe encontra-se uma coroa de 20 folhas de até 4 m de comprimento, em formato de estrela, cresce preferencialmente em terrenos pantanosos. As flores são dispostas em longos cachos de até 3 metros de comprimento e possuem coloração amarelada, é uma planta dióica ou polígamo dióica, ou seja, existem indivíduos com flores masculinas e indivíduos com flores femininas e hermafroditas.

O fruto é uma drupa globoso-alongada de 4-7 cm de comprimento, constituída de epicarpo (casca mais externa) formado de escamas rombóides de cor castanho-avermelhada; mesocarpo (parte comestível) representado por uma massa espessa de cor alaranjada; endocarpo esponjoso que envolve a semente muito dura.

Uma única planta pode conter até 7 cachos de frutos, com uma média anual de produção de 5000 frutos.

Ocorre em toda a Amazônia, Nordeste, Centro Oeste e Brasil Central, atingindo seu limite austral no norte do estado de São Paulo. Também ocorre no norte da América do Sul. É a palmeira mais amplamente distribuída no país, formando populações naturais homogêneas tão amplas que chega a ser detectada por imagens de satélite.

Inúmeros produtos úteis do buritizeiro são aproveitados pelas populações ribeirinhas de sua região de ocorrência, tanto na sua alimentação como em outras

necessidades diárias: bebida natural ou fermentada, sabão caseiro, material para casa, óleo e doces dos frutos, fécula e um líquido potável e açúcar do estipe, etc.

3.8.2.5. Açaí (*Euterpe edulis*)

Quadro Taxonômico do Açaí

Reino: Plantae.

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Liliopsida

Ordem: Arecales

Família: Arecaceae

Gênero: *Euterpe*

Espécie: *edulis*.

Nome Binomial: *Euterpe edulis*.

O açaizeiro é muito semelhante à palmeira juçara (*Euterpe edulis*) da Mata Atlântica, diferenciando-se porque cada planta de juçara tem somente um caule mas os açaís crescem em touceiras de 4 a 8 estipes (truncos de palmeira) cada um de 12 m de altura e 14cm de diâmetro ponto-médio e podendo chegar até uns 20 metros. (Johnson, 1996).

O açaí é considerado alimento de alto valor calórico, com elevado percentual de lipídeos, e nutricional, pois, é ricos em proteínas e minerais. Nas áreas de exploração extrativa, o açaí representa a principal base alimentar da população, notadamente dos ribeirinhos da região do estuário do Rio Amazonas. (Embrapa, 2006).

3.8.3. Meio de Cultura: Controle

Smânia e colaboradores (1995), realizou um estudo sobre o basideomiceto *Pycnoporus sanguineus*. Neste trabalho, foi feito testes com meios sólidos e meios líquidos, para a avaliação do crescimento inicial deste fungo. Utilizou-se o ágar de batata, ágar de celulose, ágar de mostro e ágar de Sabouraud. O melhor desenvolvimento foi obtido em ágar de batata, que em quinze dias cobriu toda a superfície do ágar. Em meio líquido, foi testado caldo de batata, caldo de celulose e extrato de solo, apresentando o melhor crescimento em caldo de batata.

Com base na pesquisa do referido autor, utilizou-se o meio suplementado com batata como meio controle a fim de obter-se um parâmetro comparativo para os resultados obtidos da biomassa, atividade enzimática e atividade antimicrobiana com os demais meios estudados nesta pesquisa.

3.8.3.1. Batata (*Solanum tuberosum*)

Quadro Taxonômico da Batata

Reino: Plantae.

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Solanales

Família: Solanaceae

Gênero: *Solanum*

Especie: *tuberosum*

Nome Binomial: *Solanum tuberosum*

A batata (*Solanum tuberosum L*) é um alimento de alto valor energético e alto teor de proteínas, sais minerais destacando-se ainda como boa produtora de vitamina C e de vitaminas do complexo B. Existe ainda razoável fonte de ferro, fósforo e magnésio além de uma ótima fonte de potássio. (Bernardi et al. 2008)

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada em três etapas metodológicas, descritas a seguir: 1- Produção de Biomassa Fúngica; 2- Determinação da Atividade Antimicrobiana e 3- Avaliação da produção das enzimas Lacase, Peroxidases e Fenoloxidasas Totais.

4.1. Preparação do Isolado Amazônico do Fungo *Pycnoporus sanguineus*.

Os isolados amazônicos do fungo *Pycnoporus sanguineus*, foram preparados seguindo as seguintes etapas consecutivas: Coleta do Fungo, Identificação, Isolamento, Repicagem e Incubação. Todo o processo de desinfecção foi realizado em Câmara de Fluxo Laminar para evitar possíveis contaminações.

4.1.1 Coleta dos Fungos

A coleta foi realizada no perímetro urbano no Município de Manaus no mês de julho de 2009.

O fungo *Pycnoporus sanguineus* foi coletado juntamente com partes do seu substrato, a fim de que a amostra permanecesse viva por um maior período e o transporte foi realizado com a utilização de sacos de papel para o armazenamento. Em seguida os organismos coletados foram identificados e levados ao Laboratório de

Biorgânica do Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia – MBT/UEA e armazenados em câmara de refrigeração científica em temperatura de (\pm 4°C) até o momento do isolamento, o qual ocorreu aproximadamente 14 horas após a coleta.

4.1.2 Isolamento dos Fungos

Do material coletado foram retiradas amostras de (30 mm) do carpóforo do fungo, utilizando-se um bisturi estéril. As amostras passaram por um procedimento de assepsia, que constou das seguintes etapas: submergir a amostra por aproximadamente 1 segundo em álcool 70% e em seguida em hipoclorito de sódio a 3%, logo após deixou-se o inóculo imerso por 1 minuto em água destilada. A amostra foi colocada sobre papel filtro para absorver o líquido e secá-la.

As placas de Petri foram previamente esterilizadas a 180 °C por 15 minutos. Em cada placa foi pipetado 15 ml do meio de cultura BDA contendo antibiótico a fim de eliminar possíveis bactérias remanescentes nas amostras. Todo o procedimento foi conduzido em câmara de fluxo laminar. Cada placa recebeu quatro amostras de aproximadamente 30 mm do fungo coletado e submetido à assepsia. (Figura. 9).

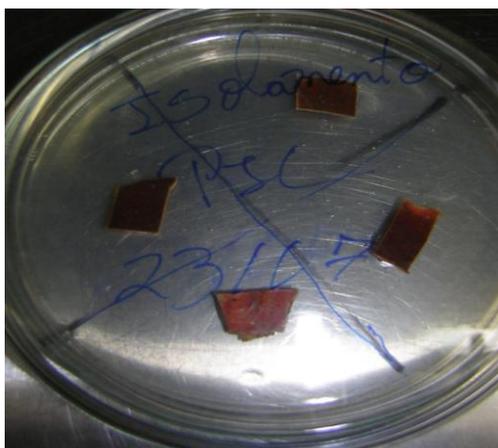


Figura 9 – Isolamento da amostra Amazônica do Fungo *Pycnoporus sanguineus*.

Após este procedimento as placas foram lacradas com fita plástica do tipo Parafilm “M” e devidamente identificadas. Estas foram incubadas em BOD a 30° C (\pm 2°C) e observadas diariamente, por um período de quatro dias, para o desenvolvimento do fungo em volta das amostras. (Figura 10)

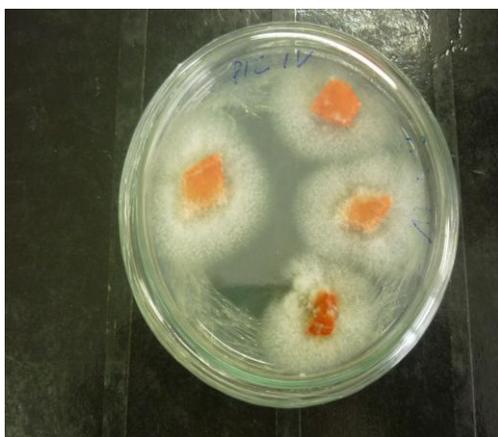


Figura 10 – Crescimento após 4 dias da amostra Amazônica do fungo *Pycnoporus sanguineus*.

Decorrido esse período, foi realizada uma nova repicagem em meio BDA, nesta etapa sem a utilização do antibiótico, para a obtenção de uma cultura pura. As

placas foram novamente incubadas em BOD a 30° C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$), por sete (7) dias para o desenvolvimento do fungo em toda superfície do meio de cultura. Após este período as culturas foram mantidas em câmara de refrigeração científica á temperatura de $\pm 4^{\circ}\text{C}$ até o momento de uso.

A identificação da cultura pura foi baseada na metodologia tradicional, através de análise macro e micromorfológicas do fungo cultivado em meio sólido. Os resultados foram comparados com as referências bibliográficas.

Esta etapa metodológica pode ser resumida como observado na Figura 11:

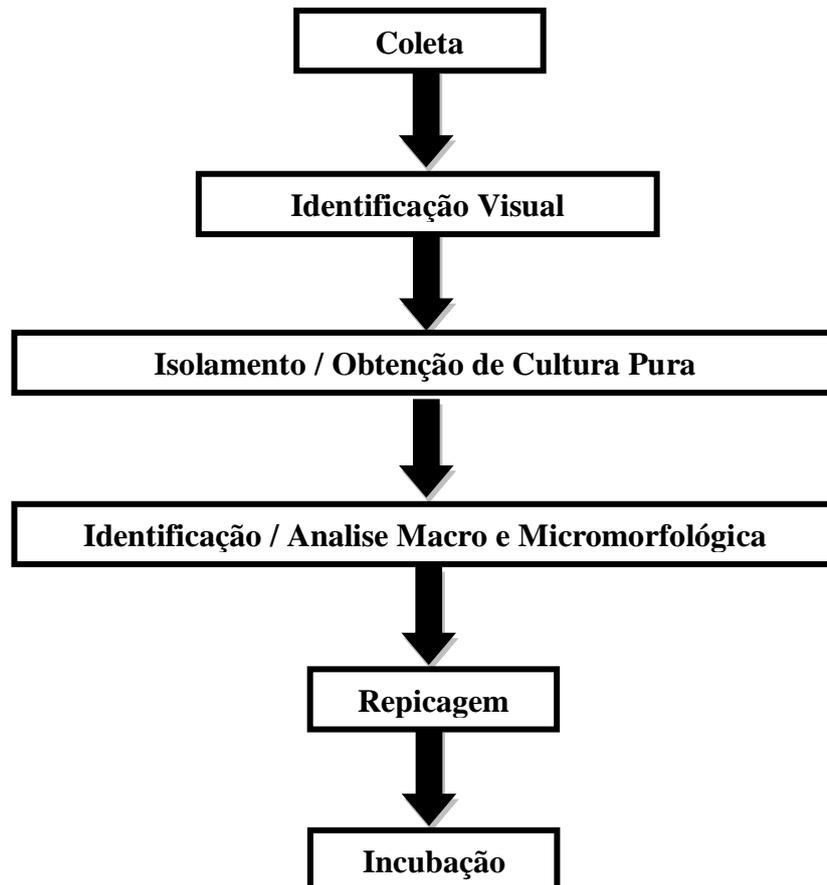


Figura 11: Esquema metodológico da preparação do isolado Amazônico do fungo *P. sanguineus*.

PRIMEIRA ETAPA

4.2. PRODUÇÃO DE BIOMASSA FÚNGICA

Esta etapa da pesquisa foi realizada nos Laboratórios de Biorgânica e Proteômica, ambos na Universidade do Estado do Amazonas-UEA no Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia – MBT/UEA.

4.2.1. Meios de Cultura Líquida

Os fungos precisam para o seu crescimento, de um meio que deve conter uma fonte de carbono e nitrogênio tal como glicose, amido, celulose, além de sais minerais. Outro parâmetro determinante para o crescimento e produção de metabólitos secundários por estes organismos é a condição em que esse microrganismo é cultivado. Assim, quando esses organismos são cultivados e submetidos à agitação ou a condição estacionária, estes podem atingir diferentes níveis de crescimento, assim como diferentes padrões para produção de metabólitos.

Para obtenção de biomassa foram elaborados e testados dez meios de cultura:

- **R1** - Casca de Melancia (*Citrullus lanatus*);
- **R2** - "Coroa" de Abacaxi (*Ananas comosus.*);
- **R3** – Bagaço de laranja moído e seco a 35° C (*C. sinensis*);
- **R4** – Bagaço de laranja com umidade natural (*C. sinensis*);
- **M1** – Cará (*Dioscorea alata*);
- **M2** – Macaxeira (*Manihot esculenta*);

- **M3** – Pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth);
- **M4** – Buriti (*Mauritia flexuosa*);
- **M5** – Açaí (*Euterpe oleracea*);
- **C1** – Meio Controle – Batata (*Solanum tuberosum* L.);

4.2.1.1. Obtenção e Preparo da Matéria-Prima Utilizada para Suplementação dos Meios de Cultura

Todos os suplementos nutricionais foram selecionados, lavados um a um em água corrente e sanitizados por imersão em água clorada contendo 5 ppm de cloro residual livre. Em seguida os suplementos foram cortados em pedaços de aproximadamente 1,5 cm.

Tanto o meio R3 quanto o meio R4 foram suplementados com resíduos da laranja, porém, ambos diferem entre si na umidade. O suplemento nutricional do meio R3 recebeu o tratamento de secagem e moagem. A secagem foi realizada em estufa a temperatura de 35°C até peso constante, período de aproximadamente 36 horas. Após a secagem, os resíduos foram triturados em moinho de facas para obtenção da granulométrica entre 0,354 e 0,595mm. Já o suplemento para o meio R4, não recebeu o tratamento de secagem nem de moagem, sendo portanto, utilizado com umidade natural.

Os meios de cultura utilizados para o estabelecimento das condições de cultivo para a produção de biomassa fúngica foram preparados seguindo os seguintes critérios:

Para cada meio de cultura foi utilizado: 200g do suplemento nutricional (matéria prima regional ou resíduo), 1000 ml de água destilada e 15g de glicose.

Todos os meios de cultura foram autoclavados durante 15 minutos a 121°C. O pH de todos os meios de cultura foram ajustados posteriormente para 5,0, utilizando-se NaOH 1,0 M ou H₂SO₄ 1,0 M.

4.2.2. Semeadura dos Isolados Fúngicos nos Meios de Cultura

Para efetuar semeadura do material fúngico foi utilizada a metodologia proposta por Bettucci e Guerrero (1971). Segundo os autores é necessário aquecer o estilete, molhar com água destilada e cortar amostras sempre próximas á chama do bico de Bunsen.

A semeadura do isolado fúngico nos meios de cultura foi realizada em câmara de fluxo laminar, por meio da transferência direta de um disco de micélio (10 mm de diâmetro), o qual foi retirado da região periférica da placa, pois, o crescimento é restrito a extremidade da hifa, em erlenmeyer de 125ml, contendo 100ml de meio de cultura para os testes realizados sob condição de 180 rpm (agitação) e sob condição de 0 rpm (estacionária).

Todos os experimentos foram mantidos sob regime luminoso de 24 h de claro, a 30°C e mantidos pelo período de 5, 10, 15, 20 e 25 dias. Foi feita a triplicata para cada meio de cultura, e os valores utilizados correspondem à média das triplicatas.

4.2.3. Determinação da Biomassa Fúngica

Para determinação da biomassa fúngica foi utilizado o crescimento em meio líquido. Após 5, 10, 15, 20 e 25 dias de crescimento, 100 ml do meio foi filtrado em papel Watmann com 50 ml de água destilada, e sucessivas lavagens. A biomassa fúngica foi calculada pela diferença em relação ao peso seco em estufa através da seguinte equação:

$$MM (\%) = \frac{Pf - Pi}{Pi} \times 100$$

Onde: Pi = peso seco do papel filtro; Pf = peso seco do papel filtro após filtragem e MM = peso micelial em porcentagem.

Esta etapa metodológica pode ser resumida como observado na Figura 12:

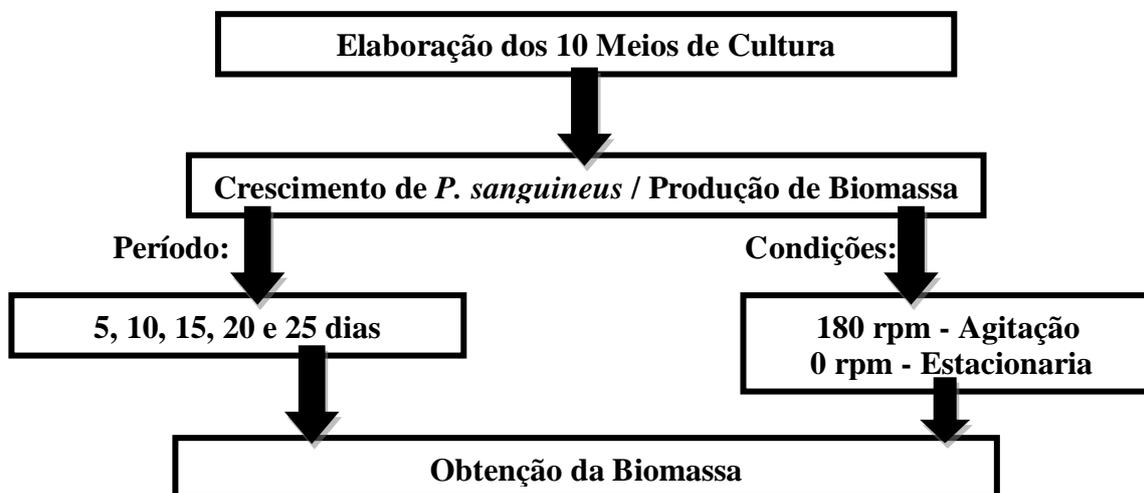


Figura 12: Esquema metodológico da obtenção de biomassa do fungo *P. sanguineus*.

SEGUNDA ETAPA

4.3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Durante os experimentos para a determinação da atividade antimicrobiana foram realizados dois ensaios sendo: 1- Preparação do Líquido-Metabólito; 2- Preparação do Extrato Fúngico.

4.3.1. Preparação do Líquido-Metabólito

A metodologia utilizada foi a do líquido metabólito, também conhecido como método do filtrado ou para a detecção de antibióticos.

A cepa do fungo *Pycnoporus sanguineus* foi cultivada em 3 placas de petri, sendo que cada uma continha um dos três meios nutricionais que apresentaram melhor produção de biomassa fúngica: Placa 01: Meio Suplementado com Cará - *Dioscorea alata* (M1); Placa 02: Bagaço da Laranja moído e seco a 35°C *Citrus sinensis* (R3); Placa 03: Bagaço da Laranja com umidade natural *Citrus sinensis* (R4). Como controle foi utilizado meio suplementado com Batata. - *Solanum tuberosum* (C1). Para o crescimento em placa foi acrescentado ágar aos meios. Todos os meios tiveram o pH ajustado para 5,0. Os experimentos foram mantido por 7 dias a 30°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) em incubadora BOD para o desenvolvimento do fungo em toda superfície do meio de cultura. Após este período as culturas foram mantidas em câmara de refrigeração científica á temperatura de 3.5°C até o momento de uso.

Destas placas de Petri, foram retirados discos de micélio de 10 mm de diâmetro para fermentação em erlenmeyer de 125 ml, contendo 100 ml de cada meio de cultura em incubador shaker a 30°C e 180 rpm, por 25 dias. Decorrido este período, o micélio foi separado do meio por filtração à vácuo em papel Whatman, nº4. Em seguida, o líquido foi novamente filtrado em membrana Millipore (0,22µm ou 0,45µm) e armazenado a (±4°C) para realização dos ensaios antimicrobianos.

4.3.2. Preparação do Extrato Fúngico

A cepa amazônica do fungo *Pycnoporus sanguineus* foi coletada na zona leste do perímetro urbano da cidade de Manaus- AM, esta foi armazenada em saco de papel e transportada para o Laboratório de Biorganica e Proteômica, ambos na Universidade do Estado do Amazonas – UEA. O corpo frutífero do fungo foi triturado em moinho de facas até a obtenção de 100g. Foram preparados dois extratos, para tanto utilizou-se dois solventes de diferentes polaridades: Etanol (extrato alcoólico) e Água (extrato aquoso).

Para o extrato aquoso utilizou-se 100g do material triturado acrescido de 250 ml de solvente (água destilada). Já para o extrato alcoólico foi usado 100g do material triturado com 250 ml de solvente (etanol).

Após adicionar os solventes, o material foi macerado por 10 minutos e incubado por 4 horas. Foi utilizado o extrator Soxhlet para extração à quente, em extração média de 8 horas. Após este período os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo à pressão reduzida, observando-se o ponto de ebulição de cada solvente: Etanol= 78,5°C e Água= 100°C.

Após a concentração no evaporador rotativo os extratos foram mantidos a temperatura de 4°C até o momento da diluição e teste de atividade antimicrobiana.

4.3.3. Teste de Difusão em Ágar

O teste de difusão em ágar foi baseado na Norma M2-A8 do NCCLS (2003).

4.3.3.1 Preparação das placas de Petri com Ágar Mueller-Hinton (MH)

Para cada placa de Petri foi utilizado 15ml de meio de cultura. O meio recém preparado e resfriado foi vertido em placas de Petri de fundo chato, numa superfície horizontal, para garantir uma profundidade uniforme de aproximadamente 4 mm.

Todo o processo de manipulação das placas foi realizada em câmara de fluxo laminar, para evitar possíveis contaminações.

4.3.3.2 Preparação do Inoculo e Teste Antimicrobiano

Os microrganismos testados foram cepas padronizadas cedidas gentilmente pela Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ unidade Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane e cepas gentilmente cedidas pelo Dr. Cristovan Alves da Costa do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA; Laboratório de Virologia. Para a avaliação da atividade antimicrobiana foram utilizadas

bactérias Gram-Positivas *Staphylococcus aureus* (CBAM 026) e bactérias Gram-Negativas e *Escherichia coli* (CBAM 001).

Os microrganismos teste foram cultivados pelo método do crescimento o qual segue os seguintes procedimentos: Três a cinco colônias, bem isoladas, do mesmo tipo morfológico foram selecionadas da placa de ágar. A superfície de cada colônia foi tocada com uma alça, e os microrganismos foram transferidos para um tubo contendo 5 ml de meio de cultura caldo de soja triptica. A cultura foi incubada em caldo, a 35° C, até alcançar ou exceder a turbidez de uma solução padrão de McFarland 0,5 (aproximadamente seis horas).

Após o período de incubação ajustou-se a turbidez da cultura em crescimento com solução salina estéril ou caldo, de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão de McFarland a 0,5. Para o ajuste de turbidez foi utilizado espectrofotômetro, para a solução atingir o padrão de McFarland a 0,5.

A Inoculação das placas de teste e aplicação do líquido-metabólito foi realizada em condições ideais. Para tanto, mergulhou-se um swab de algodão estéril na suspensão ajustada, até 15 minutos após ajustar a turbidez da suspensão de inóculo. O swab foi girado várias vezes e apertado firmemente contra a parede interna do tubo, acima do nível do líquido. Tal procedimento é importante, pois retirou qualquer excesso de inóculo no swab.

A superfície seca da placa de ágar Müeller-Hinton foi inoculada esfregando o swab em toda a superfície estéril do ágar. O procedimento repetiu-se por duas vezes,

girando a placa aproximadamente 60° cada vez, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo.

Após 15 minutos, preparou-se orifícios circulares de 5 mm de diâmetro, formando quatro poços equidistantes, onde foi aplicada uma alíquota de 70 µl do controle negativo (água destilada) e três alíquotas de 70 µl cada uma, com os metabolitos fúngicos. Após este procedimento aguardou-se 30 minutos e incubaram-se as placas em BOD a 37° C por 24 horas.

4.3.3.3. Leitura das Placas e Interpretação dos Resultados

Após 24 horas de incubação, cada placa foi examinada a fim de avaliar se as mesmas foram satisfatoriamente semeadas. Para tanto, observou-se se os halos de inibição resultantes eram uniformemente circulares e existia um tapete confluyente de crescimento. Os diâmetros dos halos de inibição total (julgadas a olho nu) são mensurados, incluindo o diâmetro do disco, que será medido em mm, com o auxílio de um paquímetro.

Todos os testes foram realizados em triplicata, calculando-se ao final a média do diâmetro dos halos de inibição de crescimento bacteriano.

Esta etapa metodológica pode ser resumida como observado nas Figuras 14; 15,16 e 17.



Figura 13: Esquema metodológico da obtenção do líquido metabólito de *Pycnoporus sanguineus*.

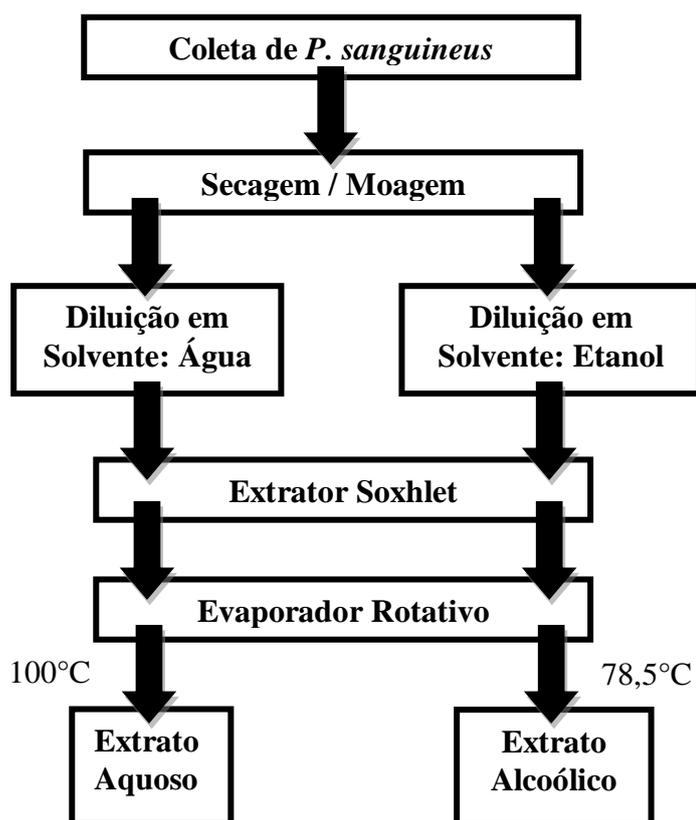


Figura 14: Esquema metodológico da obtenção do extrato de *Pycnoporus sanguineus*.

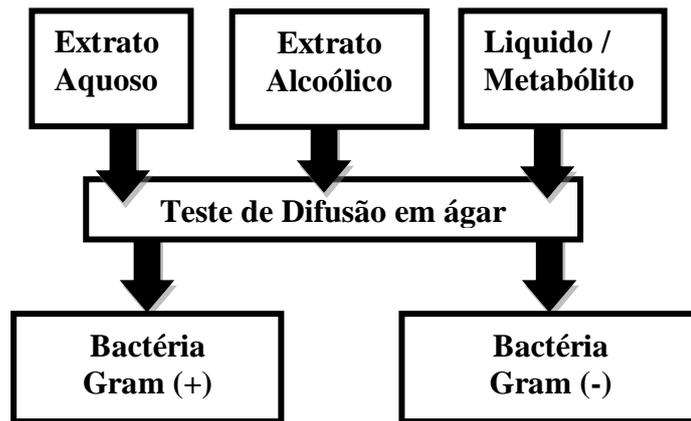


Figura 15: Esquema metodológico da avaliação de atividade antimicrobiana do Fungo *P. sanguineus*.

TERCEIRA ETAPA

4.4. ATIVIDADE ENZIMÁTICA

4.4.1 Amostras para Quantificação de Lacase, Fenoloxidase Totais e Peroxidases

O isolado amazônico do fungo *P. sanguineus* foi cultivado nos dez meios de cultura propostos (R1, R2, R3, R4, M1, M2, M3, M4, M5 e C01). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e sob duas condições distintas: 1- Condição de agitação a 180 rpm; 30°C e pH: 5,0; 2 – Condição Estacionária; 30°C e pH: 5,0.

Amostras de 4 ml de cada meio de cultivo (caldo filtrado dos meio R1, R2, R3.R4, M1, M2, M3, M4, M5 e C01) foram consideradas como fonte enzimática. Essas amostras foram coletadas no 5°, 10°, 15°, 20° e 25° dias para observação da produção enzimática da lacase, peroxidases e fenoloxidases totais.

4.4.2 Lacase (E.C 1.1.0.3.2)

Para a determinação da fenoloxidase tipo lacase foi utilizada a metodologia adaptada de (Szklarz, 1989). O método baseia-se na oxidação do substrato enzimático de siringaldazina para sua forma quinona, que apresenta absorção a 525 nm (ϵ 65.000 $M^{-1} cm^{-1}$). Uma unidade de atividade de lacase corresponde a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μ mol da substrato por minuto.

A preparação dos reagentes consistem em: 0,3 mL tampão citrato fosfato pH 5,0; 0,1 mL solução etanólica de siringaldazina (1,0 mM) solução estoque 5mg/10mL de

etanol; 0,1 mL de água e 0,5 mL de caldo fúngico. Totalizando em volume total de: 1,0 ml.

Os reagentes foram misturados em tubo de ensaio e colocados em cubeta de vidro para espectrofotômetro. O branco para zerar o espectrofotômetro foi feito através de uma mistura contendo todos os reagentes exceto o caldo fungico. A leitura em espectrofotômetro foi realizada por um período de três minutos para cada amostra.

4.4.3 Fenoloxidasas Totais

Para a determinação das fenoloxidasas totais foi utilizada a metodologia da oxidação do substrato enzimático siringaldazine que apresenta absorção a 460nm (ϵ 29.400 $M^{-1} cm^{-1}$). Uma unidade de fenoloxidase correspondente a quantidade de enzimas necessárias para oxidar 1 μ mol de substrato por minuto.

Preparação dos Reagentes: 0,3 mL tampão citrato fosfato pH 5,0; 0,1 mL solução etanólica de siringaldazina (1,0 mM); 0,1 ml de água e 0,5 mL de caldo fúngico. Totalizando em volume total de: 1,0 ml.

Os reagentes foram misturados em tubo de ensaio e colocados em cubeta de vidro para espectrofotômetro. O branco para zerar o espectrofotômetro foi feito através de uma mistura contendo todos os reagentes exceto o caldo de cultura filtrado. A leitura foi realizada por um período de três minutos para cada amostra.

4.4.4 Peroxidases

A determinação das peroxidases foi feita pela diferença entre as fenoloxidasas totais menos a lacase.

A Terceira etapa metodológica pode ser resumida como observado na figura abaixo:

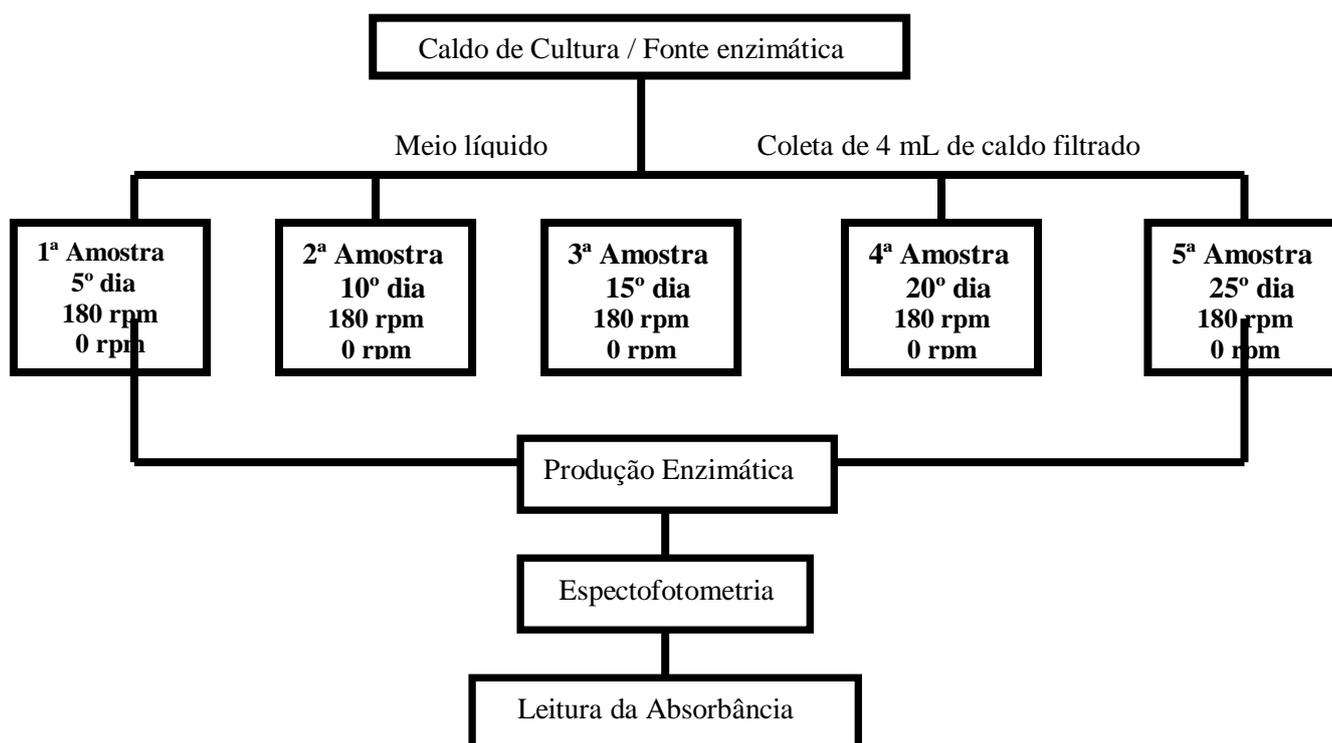


Figura 16: Esquema metodológico da análise de produção enzimática.

4.5 Análises Estatísticas

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o software BioEstat 5.0, onde foi obtido os parâmetros descritivos (média, desvio padrão, variância e coeficiente de

variação) dos dados, teste de correlação entre as variáveis, e o teste ANOVA e de Tukey para contrastes das médias.

5. RESULTADOS

5.1. Produção de Biomassa

5.1.1. Produção de Biomassa em Resíduos Agrícolas

5.1.1.1. Produção de Biomassa em Resíduos Agrícolas sob Condição de Agitação

Nos testes realizados com meios elaborados a base de resíduos agrícolas sob condição de agitação ocorreu produção de biomassa em todos os meios testados para *Pycnoporus sanguineus*.

Conforme o apresentado na (Tabela 05), em termos de valores absolutos a maior média de produção de biomassa do fungo *P. sanguineus* ocorreu no meio suplementado com bagaço da laranja úmido (R4) e a menor produção de biomassa deu-se no meio acrescido de casca de melancia (R1).

Observou-se que com exceção do meio R1, todos os meios apresentaram produção de biomassa média superior a produção média do meio controle (C1) (Tabela 05).

É interessante notar os meios R3 e R4, ambos suplementados com bagaço da laranja, diferindo apenas na forma do preparo do meio de cultura, apresentaram uma diferença entre si de 35,4 % na média de produção de biomassa durante o período de vinte e cinco dias (Tabela 05).

Tabela 05: Atividade média de biomassa produzida por *P.sanguineus* durante vinte e cinco dias de crescimento em meio de cultura suplementado com resíduos agrícolas em comparação ao meio de cultura controle sob condição de agitação.

	Meios de Cultura Suplementados com Resíduos Agrícolas				
	R1 C. Melancia	R2 C. Abacaxi	R3 Bag. Lar. (S)	R4 Bag. Lar. (U)	C1 Batata
x % (Biomassa)	44.2%	45.6%	67.6%	103%	45%
Desvio Padrão	14.3	28.4	42.4	66.4	30.7
Variância	204.7	805.3	1795.3	4415.5	940.5
Coef. Variação%	32.37%	62.23%	62.68%	64.51%	68.15%

Conforme mostra a (Figura 17), observa-se uma produção crescente de biomassa durante os vinte e cinco dias de incubação em todos os meios testados. Os resultados mostram ainda que em vinte e cinco dias de incubação os meios R4 e R3 alcançaram uma maior eficiência na produção de biomassa total em relação ao meio controle (C1), e os meios R1 e R2 obtiveram uma menor produção de biomassa total quando comparados ao meio controle (C1).

De modo geral, os meios R3, R4 e C1 apresentaram um padrão contínuo de produção de biomassa durante todo o período de crescimento. Nota-se ainda que o meio R2 e R1, aos vinte e cinco dias de incubação, começam a reduzir sua taxa de crescimento (Figura 17).

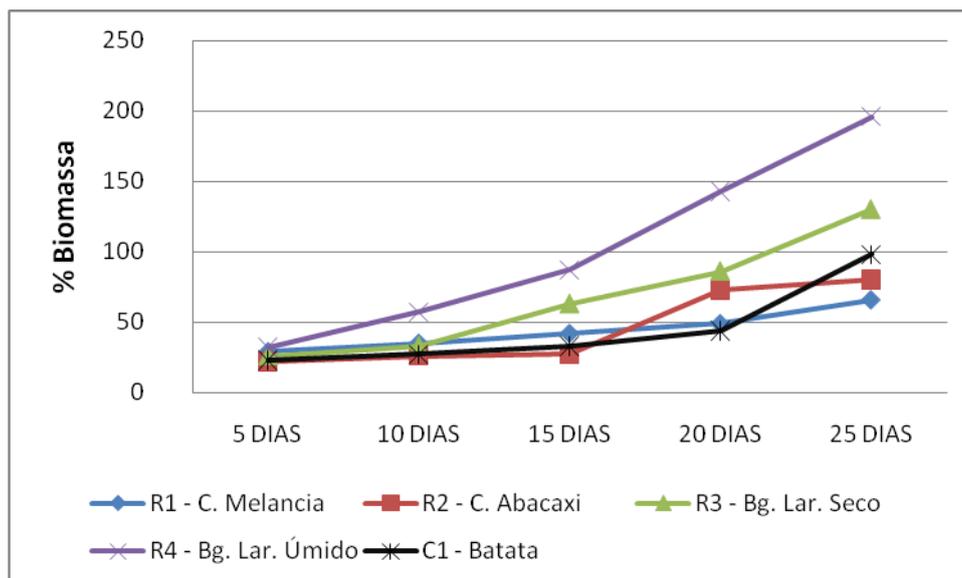


Figura 17 - Variabilidade da produção de biomassa do fungo *P.sanguineus* durante 25 dias sob condição de agitação em meios de cultura suplementados com resíduos agrícolas.

Ressalta-se ainda que, o meio de maior produção final de biomassa R4, apresentou uma produção três vezes maior do que o meio de menor produtividade total R1 como se pode constatar na (Figura 17).

O teste estatístico ANOVA mostrou que ao nível de 95% de probabilidade ($p > 0,05$) não houve diferença estatística significativa na produção de biomassa entre os meios cultivados a base de resíduos sob condição de agitação (Tabela 06).

Tabela 06: Análise de variância (ANOVA) da biomassa produzida em diferentes meios de cultura a base de resíduos sob condição de agitação.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M.	F	(p)
Tratamento	4	12.9 e+03	32.3 e+02	1.978	0.1362*
Resíduo	20	32.6 e+03	16.3 e+02		
Total	24				

*Não significativo ao nível de 95% de probabilidade ($p > 0,05$)

5.1.1.2. Produção de Biomassa em Resíduos Agrícolas sob Condição Estacionária

Em todos os meios de cultura houve produção de biomassa para o fungo *Pycnoporus sanguineus* na condição estacionária. A (Tabela 07) mostra que nos testes realizados com meios elaborados a base de resíduos agrícolas sob condição estacionária a maior media de produção de biomassa do fungo *P. sanguineus* ocorreu no meio suplementado com bagaço da laranja úmido (R4), seguido do meio acrescido de bagaço da laranja seco (R3). Já a menor produção de biomassa deu-se no meio acrescido de casca de melancia (R1).

Tabela 07: Atividade média de biomassa produzida por *P.sanguineus* durante vinte e cinco dias de crescimento em meio de cultura suplementado com resíduos agrícolas em comparação ao meio de cultura controle sob condição de estacionária.

Meios de Cultura Suplementados com Resíduos Agrícolas 0 rpm					
	R1	R2	R3	R4	C1
	C. Melancia	C. Abacaxi	Bag. Lar. (S)	Bag. Lar. (U)	Batata
x % (Biomassa)	22%	25%	54.60%	60.80%	31.80%
Desvio Padrão	4.7	12.1	23.3	27.9	16.2
Variância	22.5	147.5	540.8	776.7	261.2
Coef. Variação%	21.56%	48.58%	42.59%	45.84%	50.82%

O meio de cultura controle (C1) foi superado em percentual de produção média somente pelos meios R3 e R4, destacando-se o meio R4 por apresentar um percentual médio 29% superior ao meio comumente utilizado na maioria dos laboratórios (C1). De modo geral, com exceção para o meio R1, os meios de cultura apresentaram coeficiente de variação superior a 40% (Tabela 07).

Conforme o apresentado na (Figura 18), de modo geral, todos os meios a base de resíduo sob condição estacionária testados apresentaram um padrão contínuo de

produção de biomassa. Ressalta-se que o meio suplementado com casca de melancia (R1) apresentou um aumento de apenas 3% entre o 10º. e o 20º dia de crescimento, diferente dos demais meios os quais apresentaram sempre um crescimento superior a 7% a cada cinco dias de crescimento.

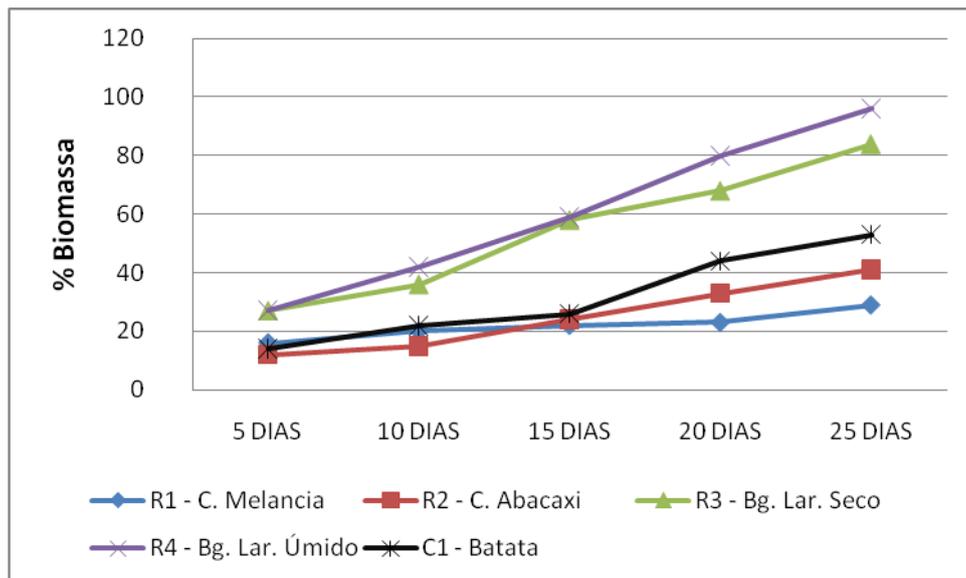


Figura 18 - Variabilidade da produção de biomassa do fungo *P.sanguineus* durante vinte e cinco dias sob condição estacionária em meios de cultura suplementados com resíduos agrícolas.

Com o objetivo de verificar se existe diferença estatística entre os valores observados nos diferentes meios de cultura, suplementados com resíduos sob condição estacionária, foi realizado o teste estatístico ANOVA (Tabela 08) onde ficou evidenciado diferenças entre a produção de biomassa entre os meios testados.

Tabela 08: Análise de variância (ANOVA) da biomassa produzida em diferentes meios de cultura a base de resíduos sob condição de agitação.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M.	F	(p)
Tratamento	4	62.8 e+02	15.7 e+02		
				4.4866	0.0096*
Resíduo	20	69.9 e+02	349.74		
Total	24				

* Significativo ao nível de 95% ($p < 0,05$ significativo)

No teste de Tukey foi realizada a comparação pareada das médias (Tabela 09), onde evidenciou-se diferença estatística superior a 35.5 entre os meios R1 e R4 e entre os meios R2 e R4.

Tabela 09: Análise de Tukey para produção de biomassa em meios de cultura suplementados com resíduos sob condição estacionária.

	R1	R2	R3	R4	C1
	C. Mela.	C. Abac.	Bg. Lar (S)	Bg. Lar (U)	Batata
R1					
R2					
R3					
R4	** (38.8)	** (35.8)			
C1					

** Significativo ao nível de 95 % ($p < 0,05$ significativo)

Valores entre parênteses correspondem a diferença entre os meios

5.1.1.3. Produção de Biomassa em Resíduos Agrícolas: Condição Estacionária versus Condição de Agitação

Para a produção de biomassa em resíduos agrícolas nota-se que durante todos os períodos de crescimento ocorre uma produção de biomassa maior nos ensaios realizados sob condições de agitação quando compara-se com os ensaios realizados sob condição estacionária. Interessante observar que, conforme mostra as Figuras: 19; 21 e 22, independente da condição imposta, para o crescimento de biomassa os meios R1, R3 e R4 apresentam-se sempre com um padrão contínuo crescente para a produção de

biomassa. Enquanto que o meio R2 apresentou uma diminuição da taxa de produção de biomassa no período compreendido entre dez e quinze dias de crescimento (Figura 20).

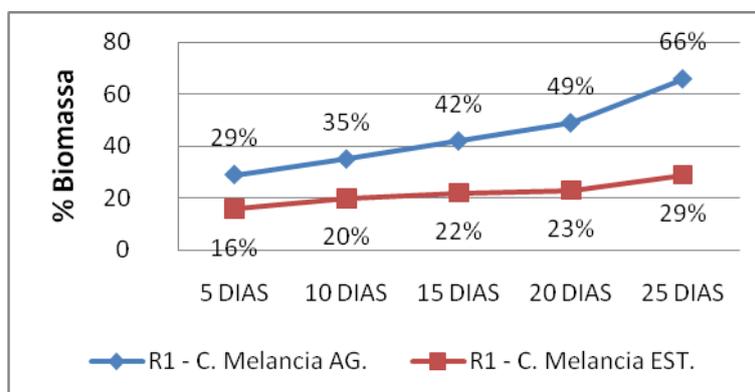


Figura 19 - Variabilidade da produção de biomassa do fungo *P.sanguineus* durante vinte e cinco dias sob condição de agitação *versus* condição estacionária no meio de cultura R1.

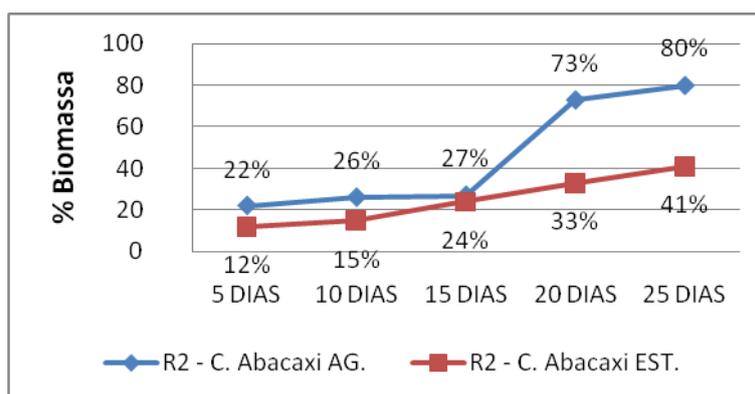


Figura 20 - Variabilidade da produção de biomassa do fungo *P.sanguineus* durante vinte e cinco dias sob condição de agitação *versus* condição estacionária no meio de cultura R2.

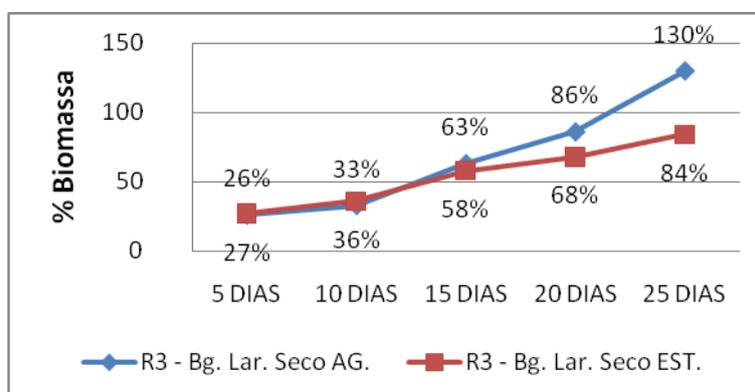


Figura 21 - Variabilidade da produção de biomassa do fungo *P.sanguineus* durante vinte e cinco dias sob condição de agitação *versus* condição estacionária no meio de cultura R3.

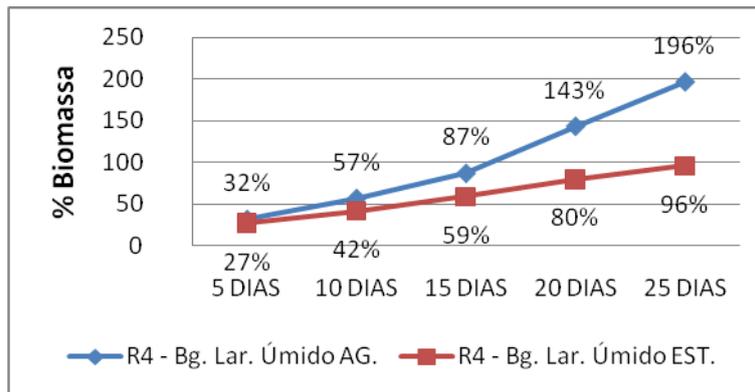


Figura 22 - Variabilidade da produção de biomassa do fungo *P.sanguineus* durante vinte e cinco dias sob condição de agitação *versus* condição estacionária no meio de cultura R4.

Importante destacar que em todos os ensaios realizados com meios de cultura a base de resíduo a maior taxa de crescimento ocorre entre vinte e vinte e cinco dias de crescimento.

5.1.2. Produção de Biomassa em Meios Regionais

5.1.2.1. Produção de Biomassa em Meios Regionais sob Condição de Agitação

Todos os meios suplementados com matéria prima regional e submetidos à condição de agitação (180 rpm) apresentaram produção de biomassa.

O meio de cultura acrescido de buriti (M4), apresentou a maior produção média de biomassa (173.4%) para o período de vinte e cinco dias de crescimento. Já o meio suplementado com açaí (M5) desenvolveu a menor produção média de biomassa (32.4%) para o mesmo período de crescimento (Tabela 10).

Conforme apresentado (Tabela 10), observa-se ainda que com exceção do meio acrescido de açaí (M5), todos os meios apresentaram produção média de biomassa superior a produção do meio controle (C1).

Tabela 10: Parâmetros Descritivos da produção média de biomassa produzida por *P.sanguineus* durante vinte e cinco dias de crescimento em meio de cultura suplementado com produto regional e no meio de cultura controle a 180rpm e 30 °C.

	Meios de Cultura Suplementados com Produtos Regionais					
	180 rpm					
	M1	M2	M3	M4	M5	C1
	Cará	Macaxeira	Pupunha	Buriti	Açaí	Batata
x % (Biomassa)	47.4%	49.2%	77.0%	173.4%	32.4%	45.0%
Desvio Padrão	36.4	20.2	39.9	22.6	8.9	30.7
Variância	1327.3	409.7	1594	510.8	78.8	940.5
Coef. Variação%	76.86%	41.14%	51.85%	13.03%	27.40%	68.15%

O teste estatístico ANOVA (Tabela 11) evidenciou diferenças estatísticas ao nível de 95% entre a produção de biomassa nos meios suplementados com produtos regionais sob condição de agitação testados.

Tabela 11: Análise de variância (ANOVA) da biomassa produzida em diferentes meios de cultura a base de produtos regionais sob condição de agitação.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M.	F	(p)
Tratamento	5	68.6 e+03	15.7 e+02		
				16.9338	< 0.0001*
Resíduo	24	19.4 e+03	810.183		
Total	29				

* Significativo ao nível de 95 % (p<0,05 significativo).

No teste de Tukey foi realizada a comparação pareada das médias (Tabela 12), a fim de saber onde está a diferença estatística e em quanto consiste esta diferença. A análise dos dados mostra que existe diferença estatística entre os meios: (M1 – M4); (M2 – M4); (M3 – M4); (M4 – M5) e (M4 – C1), enquanto que para os demais meios não há diferença significativa ao nível de 95 % (p<0,05 significativo).

Tabela 12: Análise de Tukey para produção de biomassa em meios de cultura a base de produtos regionais sob condição de agitação.

	M1	M2	M3	M4	M5	C1
	Cará	Macaxeira	Pupunha	Buriti	Açaí	Batata
M1						
M2						
M3						
M4	** (126)	** (124.2)	** (96.4)		** (141)	** (128.4)
M5						
C1						

** Significativo ao nível de 95 % ($p < 0,05$ significativo)

Valores entre parênteses correspondem a diferença entre os meios

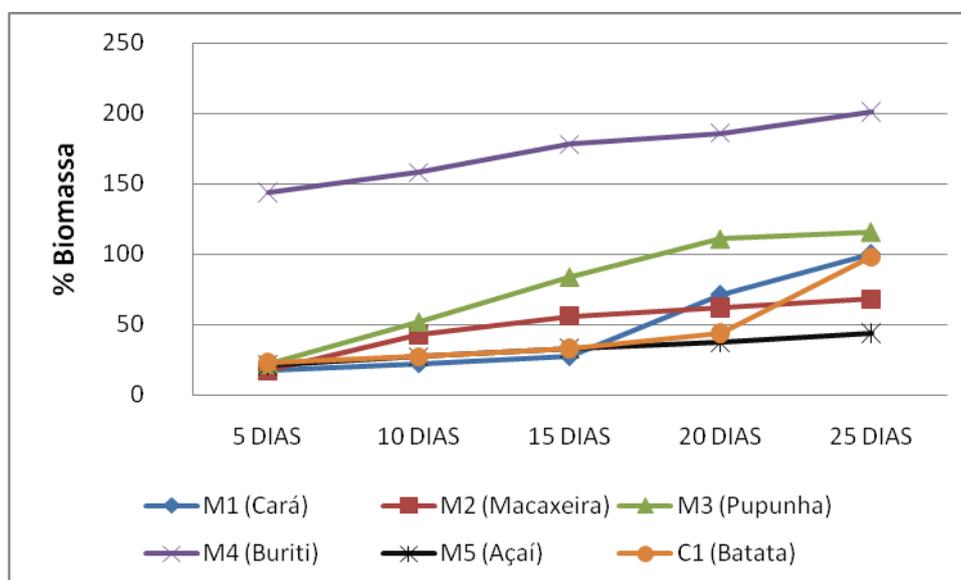


Figura 23 - Variabilidade da produção de biomassa do fungo *P.sanguineus* durante vinte e cinco dias sob condição de agitação em meios de cultura suplementados com produtos regionais.

Analisando-se a curva de produção de biomassa em diferentes intervalos de tempo pode-se verificar que o meio suplementado com buriti (M4), apresentou produção de biomassa superior a todos os demais meios durante todos os intervalos de tempo testados. Destaca-se que os meios, M2, M3, M4 e M5 iniciaram um processo de estabilização de crescimento entre vinte e vinte e cinco dias de cultivo, ao contrário do

que ocorreu com os meios C1 e M1 que apresentaram um aumento na taxa de produção de biomassa neste período (Figura 23).

5.1.2.2. Produção de Biomassa em Meios Regionais sob Condição de Estacionária

Todos os meios suplementados com matéria prima regional e submetidos à condição de agitação estacionária apresentaram produção de biomassa.

Conforme o apresentado na (Tabela 13), em termos de valores absolutos a maior média de produção de biomassa do fungo *P. sanguineus* ocorreu no meio suplementado com buriti (M4) e a menor produção de biomassa deu-se no meio acrescido de macaxeira (M2).

Tabela 13: Produção média de biomassa por *P.sanguineus* durante vinte e cinco dias de crescimento em meio de cultura suplementado com produto regional e no meio de cultura controle na condição estacionária.

	Meios de Cultura Suplementados com Resíduos Agrícolas					
	M1 Cará	M2 Macaxeira	M3 Pupunha	M4 Buriti	M5 Açaí	C1 Batata
x % (Biomassa)	28.40%	27.80%	54.80%	70.40%	31.80%	31.80%
Desvio Padrão	9.8	10.2	26.8	20	16.2	16.2
Variância	95.3	103.7	716.7	399.8	261.2	261.2
Coef. Variação%	34.37%	36.63%	48.85%	28.40%	50.82%	50.82%

Interessante notar que o meio acrescido de buriti (M4), apresentou produção média 42.6% superior ao meio suplementado com macaxeira (M2). Em valores absolutos somente os meios M4 e M3, apresentaram produção média de biomassa superior a produção do meio controle (C1). (Tabela 13)

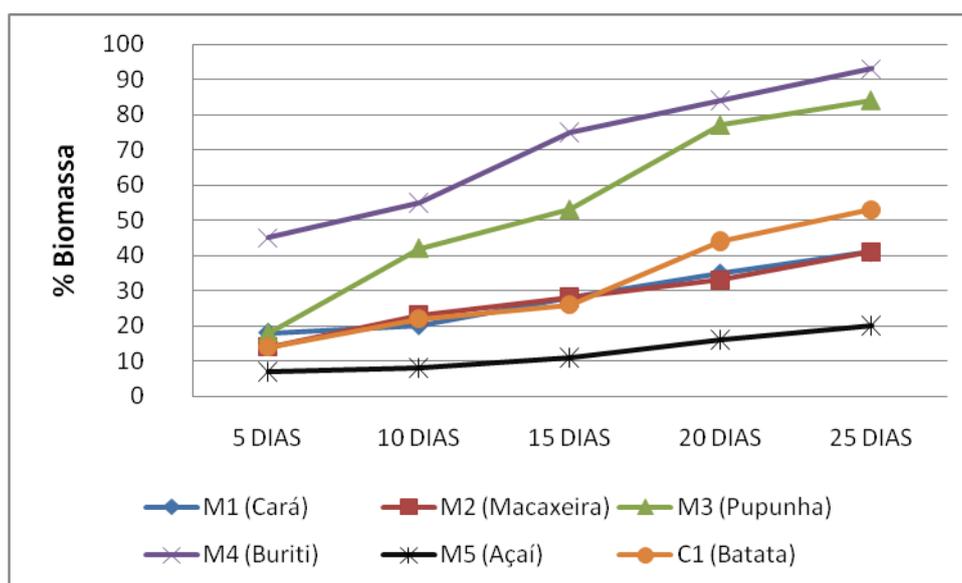


Figura 24 - Variabilidade da produção de biomassa do fungo *P.sanguineus* durante vinte e cinco dias sob condição estacionária em meios de cultura suplementados com produtos regionais.

Durante todo o período de crescimento a produção de biomassa apresentou-se crescente para todos os meios testados. Analisando-se a curva de crescimento de biomassa é interessante notar que a partir de quinze dias de experimento apenas os meios acrescidos de pupunha (M3) e o meio suplementado com Buriti (M4), apresentaram produção de biomassa superior ao meio controle (C1) (Figura 24).

O teste estatístico ANOVA, mostrou que existe diferença estatística ao nível de 95% entre os diferentes meios suplementados a base de produtos regionais e sob condição estacionária (Tabela 14).

A comparação pareada das médias, análise de Tukey, mostra que houve variação estatística significativa ao nível de 95%, entre os três diferentes meios e o meio acrescido de buriti (M4) e entre o meio (M4) e o meio controle (C1) conforme mostra a (Tabela 15).

Tabela 14: Análise de variância (ANOVA) da biomassa produzida em diferentes meios de cultura a base de produtos regionais sob condição estacionária.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M.	F	(p)
Tratamento	5	77.8 e+02	15.6 e+02		
				5.0827	0.0029*
Resíduo	24	73.5 e+02	306.317		
Total	29				

* Significativo ao nível de 95 % (p<0,05 significativo)

Tabela 15: Análise de Tukey para produção de biomassa em meios de cultura a base de produtos regionais sob condição estacionária.

	M1	M2	M3	M4	M5	C1
	Cará	Macaxeira	Pupunha	Buriti	Açai	Batata
M1				** (42)		
M2				** (42.6)		
M3						
M4						
M5				** (38.6)		
C1				** (38.6)		

** Significativo ao nível de 95 % (p<0,05 significativo)

Valores entre parênteses correspondem à diferença entre os meios

5.1.2.3. Produção de Biomassa em Meios Regionais: Condição Estacionária *versus* Condição de Agitação.

Durante todos os ensaios realizados com meios acrescidos de produtos regionais, notou-se que em todos os períodos de crescimento ocorre uma produção de biomassa maior nos ensaios realizados sob condições de agitação quando compara-se com os ensaios realizados sob condição estacionária. É interessante observar que os meios M2, M3, M4 e M5 apresentaram sempre um padrão contínuo de produção de biomassa, com taxas de amplitude superiores a 3% entre os meios mantidos sob condição de agitação e

os meios mantidos sob condição estacionária. Dado contrário ao observado no meio M1, o qual apresentou amplitude mínima na taxa de produção entre as condições de agitação e a condição de estacionária para o período compreendido entre cinco e dez dias de crescimento.

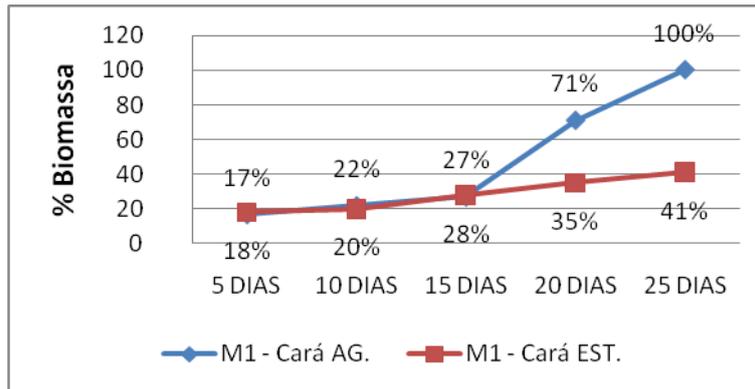


Figura 25 - Variabilidade da produção de biomassa do fungo *P.sanguineus* durante vinte e cinco dias sob condição de agitação *versus* condição estacionária no meio de cultura M1.

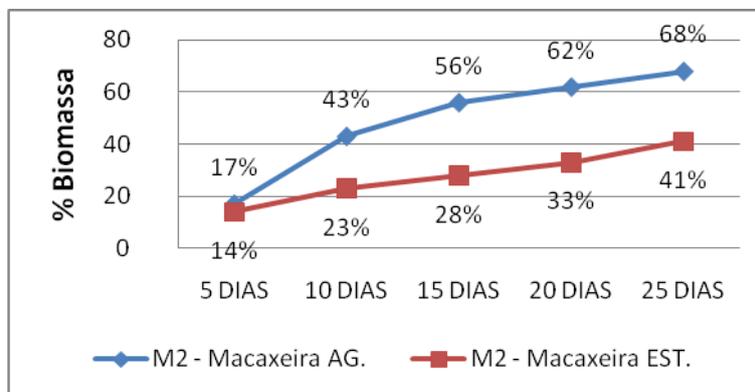


Figura 26 - Variabilidade da produção de biomassa do fungo *P.sanguineus* durante vinte e cinco dias sob condição de agitação *versus* condição estacionária no meio de cultura M2.

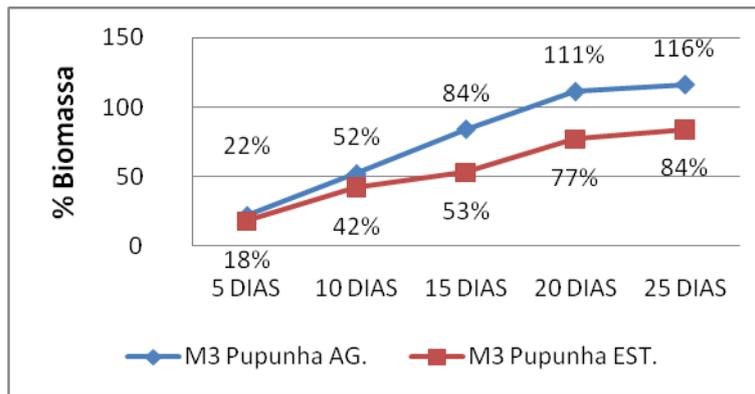


Figura 27 - Variabilidade da produção de biomassa do fungo *P.sanguineus* durante vinte e cinco dias sob condição de agitação *versus* condição estacionária no meio de cultura M3.

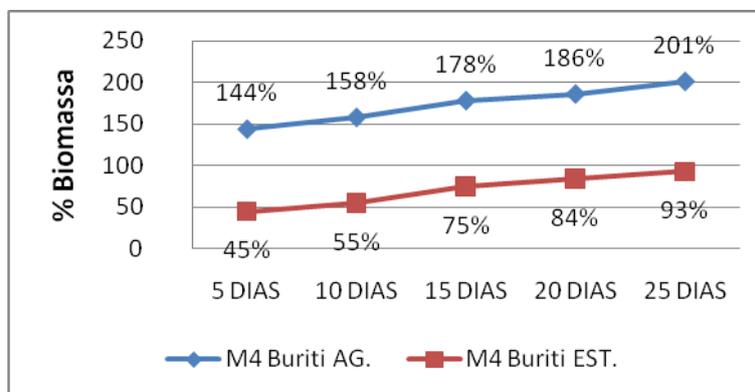


Figura 28 - Variabilidade da produção de biomassa do fungo *P.sanguineus* durante vinte e cinco dias sob condição de agitação *versus* condição estacionária no meio de cultura M4.

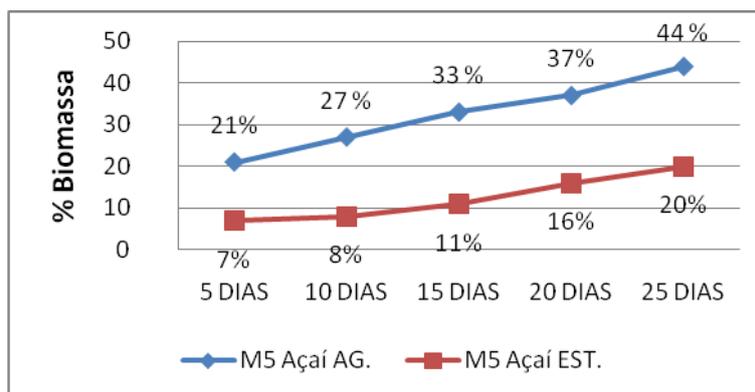


Figura 29 - Variabilidade da produção de biomassa do fungo *P.sanguineus* durante vinte e cinco dias sob condição de agitação *versus* condição estacionária no meio de cultura M5.

5.2. Atividade Antimicrobiana

5.2.1. Atividade antimicrobiana de metabólitos do fungo *Pycnoporus sanguineus*.

Todos os metabólitos testados apresentaram atividade antimicrobiana para pelo menos uma das cepas testadas. Os metabólitos produzidos no meio M4 e R4 apresentaram halos de inibição superiores aos halos produzidos pelo meio controle (C1). para a cepa de *S. aureus* (CBAM 001). Já para a cepa de *E. coli* (CBAM 001) apenas o meio R4, obteve atividade antimicrobiana comparável ao controle, sendo que os demais meios apresentara-se com atividade inferior a apresentada pelo meio C1. (Tabela 16)

Ainda analisando a tabela 16, é interessante observar que, os meios R3 e R4, ambos suplementados com a mesma matéria prima, diferem muito entre si quanto ao potencial antimicrobiano.

Ressalta-se que, em alguns ensaios a atividade antimicrobiana dos metabólitos mostrou-se alta, de forma que os halos de inibição de crescimento uniram-se formando uma zona única de inibição de crescimento bacteriano (Figura 30). Neste contexto existe a necessidade de realizar ensaios complementares com o objetivo de determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para estes metabólitos em estudos posteriores.

Tabela 16: Atividade antimicrobiana dos metabólitos de *Pycnoporus sanguineus*, em diferentes meios de cultura, frente a *S. aureus* e *E.coli* determinada a 37 °C por 24 horas, em ágar Müeller-Hinton (halo = mm).

Meio + <i>P.sanguineus</i> 25 Dias / Agitação	Média dos Halos de Inibição de Crescimento dos Microrganismos testes (mm)	
	<i>S. aureus</i> (CBAM 001)	<i>E.coli</i> (CBAM 001)
M4 – Buriti	+++	21mm
R3 – Bagaço de Laranja. (Seco)	8mm	Ø
R4 – Bagaço de Laranja. (Úmido)	15mm	+++
C1 - Batata / Controle	13mm	+++

(+++) Halos de inibição de crescimento uniram-se; Ø Não houve halo de inibição.



Figura 30 - Determinação da atividade antimicrobiana de *P.sanguineus*, quando cultivado em meio de cultura suplementado com buriti (M4), contra *S. aureus*.

5.2.2. Atividade antimicrobiana do extrato de *Pycnoporus sanguineus*.

Os ensaios realizados a partir dos extratos alcoólicos e aquosos obtidos do corpo frutífero *P. sanguineus*., apresentaram ausência do halo de inibição de crescimento bacteriano. Assim podemos concluir que os extratos não apresentaram atividade

antimicrobiana para bactérias Gram-Positivas *Staphylococcus aureus* (CBAM 026), e bactérias Gram-Negativas *Escherichia coli* (CBAM 001) nas condições testadas.

5.3. Atividade Enzimática

5.3.1 Produção de Lacase

5.3.1.1. Produção de Lacase em Resíduos Agrícolas

5.3.1.1.1. Produção de Lacase em Resíduos Agrícolas sob Condição de Agitação

Nos testes realizados com meios elaborados a base de resíduos agrícolas sob condição de agitação ocorreu produção da enzima lacase em todos os meios testados para *Pycnoporus sanguineus*.

Conforme o apresentado na (Tabela 17), em termos de valores absolutos a maior média de produção de lacase em meios de cultura acrescidos de resíduos e mantidos sob condição de agitação ocorreu no meio suplementado com bagaço da laranja úmido (R4) e a menor produção de lacase deu-se no meio acrescido de casca de melancia (R1).

De modo geral com exceção para o meio R1, os meios de cultura apresentaram percentual médio de produção de lacase superior a 30U/L. Observa-se ainda que com exceção do meio R1, todos os meios apresentaram produção de biomassa média superior a produção média do meio controle (C1) (Tabela 17).

É interessante notar que os meios R3 e R4, ambos suplementados com bagaço da laranja, diferindo apenas na forma do preparo do meio de cultura, apresentaram uma diferença entre si na média de produção de biomassa durante o período de vinte e cinco dias (Tabela 17).

Tabela 17: Atividade de lacase produzida por *P.sanguineus* durante vinte e cinco dias de crescimento em meio de cultura suplementado com resíduos agrícolas e no meio de cultura controle.

	Meios de Cultura Suplementados com Resíduos Agrícolas – 180 rpm				
	R1 C. Melancia	R2 C. Abacaxi	R3 Bag. Lar. (S)	R4 Bag. Lar. (U)	C1 Batata
Lacase (média U/L)	13.11	31.88	32.42	36.72	32.17
Desvio Padrão	3.0	1.8	4.7	5.2	1.8
Variância	9.2	3.4	22.5	27.2	3.2
Coef. Variação%	23.12%	5.78%	14.63%	14.21%	5.54%

A análise de variância (ANOVA), mostra que existe diferença estatística significativa entre as médias de produção da lacase em meios de cultura acrescidos de resíduos sob condição de agitação (Tabela 18). Os dados oferecidos pelo teste de Tukey confirmam que para as condições testadas, o meio suplementado com bagaço da laranja úmido (R4) apresentou melhor resultado para a produção de lacase em oposição ao meio suplementado com casca de melancia que obteve a menor resultado (Tabela 19).

Tabela 18: Análise de variância (ANOVA) da produção de lacase em diferentes meios de cultura a base de resíduos sob condição de agitação (180 rpm).

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M.	F	(p)
Tratamento	4	17.1 e+02	427.325	32.6261	< 0.0001*
Resíduo	20	261.953	13.098		
Total	24				

* Significativo ao nível de 95 % ($p < 0,05$ significativo).

Tabela 19: Análise de Tukey para produção de lacase em meios de cultura a base de resíduos sob condição de agitação.

	R1	R2	R3	R4	C1
	C. Mela.	Abacaxi	Bg. Lar (S)	Bg. Lar (U)	Batata
R1		** (18.76)		** (23.61)	** (19.06)
R2					
R3	** (19.30)				
R4					
C1					

** Significativo ao nível de 95 % ($p < 0,05$ significativo)

Valores entre parênteses correspondem à diferença entre os meios

A produção de lacase apresentou-se variável durante os vinte e cinco dias de experimento. Ressalta-se que entre vinte e vinte e cinco dias somente os meios R3 e R4 apresentaram produção de lacase superior ao meio controle (C1). Verifica-se ainda que ocorreu um decréscimo na produção de lacase em todos os meios no período entre dez e quinze dias de crescimento (Figura 31).

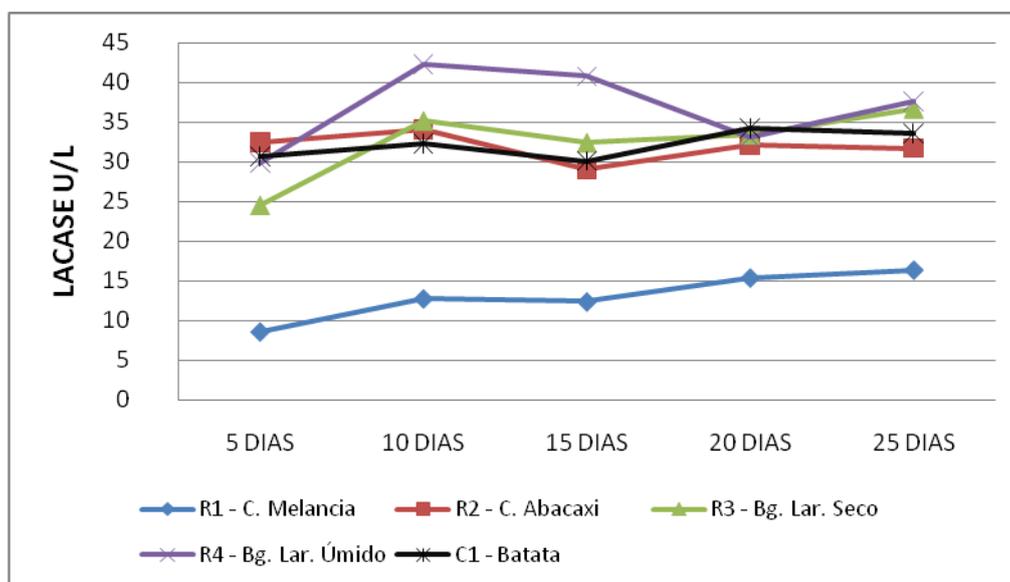


Figura 31 - Variabilidade na produção de lacase pelo fungo *P. sanguineus* durante vinte e cinco dias sob condição de agitação em meios de cultura suplementados com resíduos agrícolas.

5.3.1.1.2 Produção de Lacase em Resíduos Agrícolas sob Condição Estacionária

Nos testes realizados com meios elaborados a base de resíduos agrícolas sob condição estacionária ocorreu produção da enzima lacase em todos os meios testados.

Dados obtidos através da análise estatística (Tabela 20) mostram que o meio de cultura R3 apresentou a maior produção média de lacase nas condições testadas enquanto que o meio R1 apresentou a menor produção desta enzima, fato este confirmado através da análise de variância ANOVA (Tabela 21), e do teste de Tukey, onde foi realizada a comparação pareada das médias (Tabela 22), onde evidenciou-se diferença estatística superior a 12 entre os meios R1 e R3

Destaca-se que os meios R4 e R3 apresentaram produção da enzima lacase superior ao meio controle C1 (Tabela 20).

Tabela 20 - Parâmetros Descritivos da produção média de lacase produzida por *P.sanguineus* durante vinte e cinco dias de crescimento em meio de cultura suplementado com resíduos agrícolas e no meio de cultura controle a 0rpm e 30 °C.

	Meios de Cultura Suplementados com Resíduos Agrícolas – 0 rpm				
	R1	R2	R3	R4	C1
	C. Melancia	C. Abacaxi	Bag. Lar. (S)	Bag. Lar. (U)	Batata
Lacase (média U/L)	10.00	12.28	22.75	21.91	18.03
Desvio Padrão	1.4	2.1	3.4	2.5	1.9
Variância	2.1	4.4	11.8	6.2	3.6
Coef. Variação%	14.43%	17.12%	15.09%	11.37%	10.49%

Tabela 21: Análise de variância (ANOVA) da produção de lacase em diferentes meios de cultura a base de resíduos sob condição de estacionária.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M.	F	(p)
Tratamento	4	647.806	161.952		
				28.8528	< 0.0001*
Resíduo	20	112.261	5.613		
Total	24				

* Significativo ao nível de 95 % ($p < 0,05$ significativo)

Tabela 22: Análise de Tukey para produção de lacase em meios de cultura a base de resíduos sob condição estacionária.

	R1	R2	R3	R4	C1
	C. Mela.	Abacaxi C.	Bg. Lar (S)	Bg. Lar (U)	Batata
R1					
R2				** (9.63)	** (5.75)
R3	** (12.75)	** (10.47)			** (4.72)
R4	** (11.90)				
C1	** (8.03)				

** Significativo ao nível de 95 % ($p < 0,05$ significativo)

Valores entre parênteses correspondem a diferença entre os meios

Verificou-se que durante o período de vinte e cinco dias, sob condição estacionária de cultivo houve uma oscilação na produção da enzima lacase. Interessante observar que os meios R3 e R4, apresentaram produção superior de lacase em relação ao meio controle C1 durante todas as fases do experimento. Comportamento contrário aos meios R1 e R2 que apresentaram concentração de lacase inferior a concentração do meio controle (C1), durante todos os períodos do experimento (Figura 32).

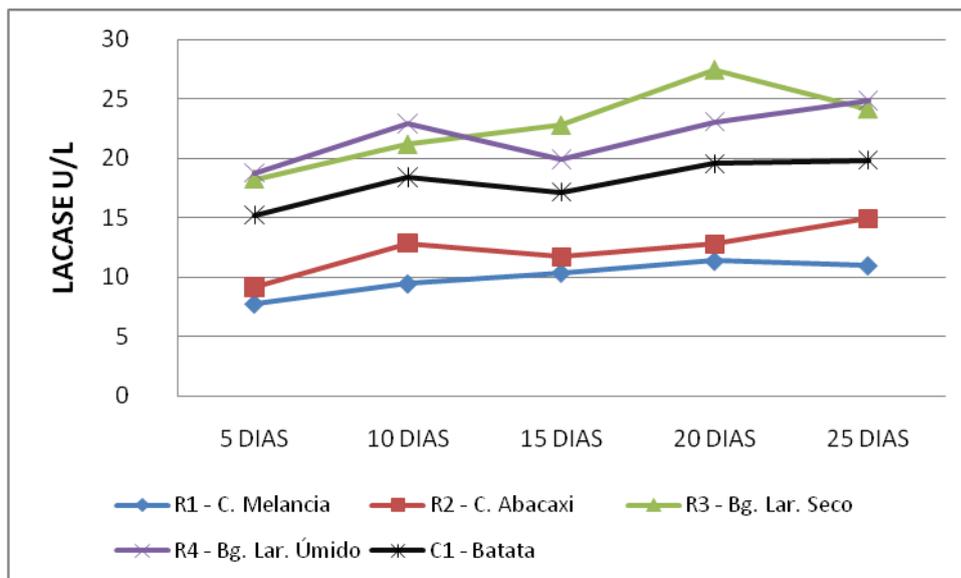


Figura 32 - Variabilidade na produção de lacase pelo fungo *P. sanguineus* durante vinte e cinco dias sob condição de estacionária em meios de cultura suplementados com resíduos agrícolas.

5.3.1.1.3 Produção de Lacase em Resíduos Agrícolas: Condição de Agitação versus Condição Estacionária

Durante todos os ensaios realizados com meios suplementados com resíduos, é interessante notar que em todos os períodos de crescimento ocorreu uma produção da enzima lacase maior nos ensaios realizados sob condições de agitação quando comparado-se com os ensaios realizados sob condição estacionária. O meio acrescido de coroa de abacaxi (R2), destacou-se por apresentar a maior diferença de atividade da lacase entre as condições de agitação e estacionária para todos os meios testados sob condição de agitação e condição estacionária (Figuras: 33, 34, 35 e 36).

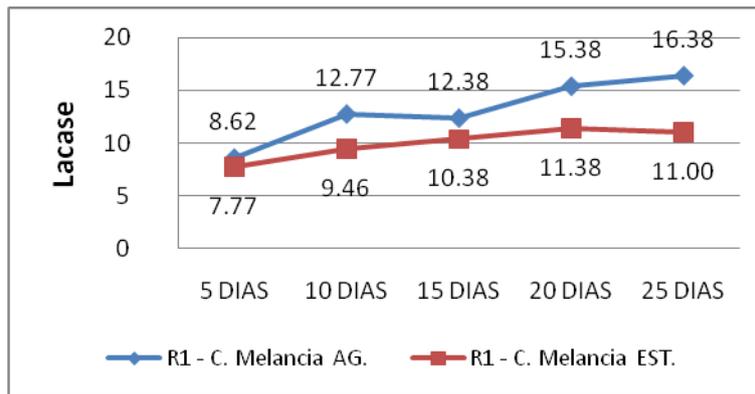


Figura 33- Variabilidade na produção de lacase pelo fungo *P.sanguineus* durante vinte e cinco dias sob condição de agitação *versus* condição estacionária no meio de cultura R1.

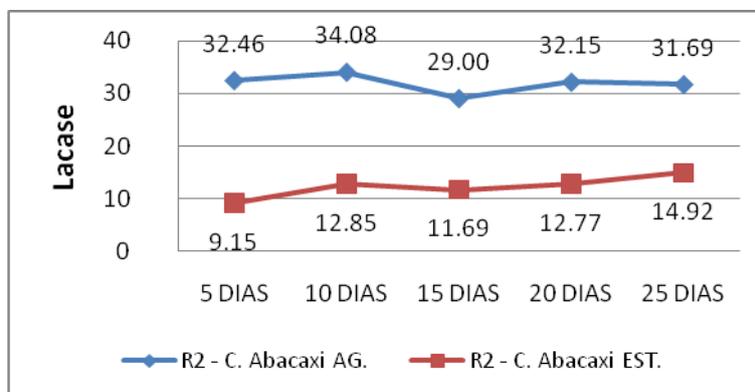


Figura 34- Variabilidade na produção de lacase pelo fungo *P.sanguineus* durante vinte e cinco dias sob condição de agitação *versus* condição estacionária no meio de cultura R2.

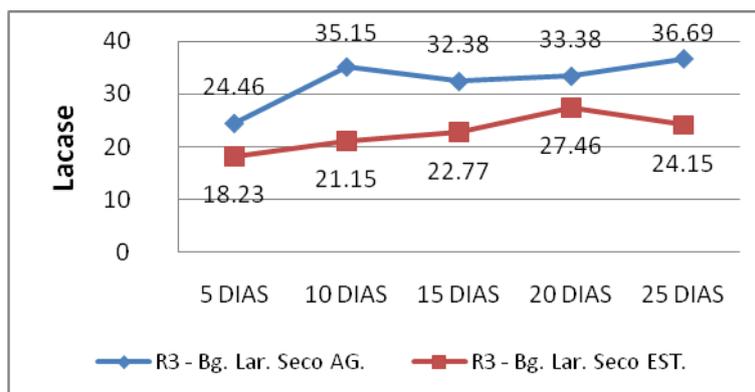


Figura 35- Variabilidade na produção de lacase pelo fungo *P.sanguineus* durante vinte e cinco dias sob condição de agitação *versus* condição estacionária no meio de cultura R3.

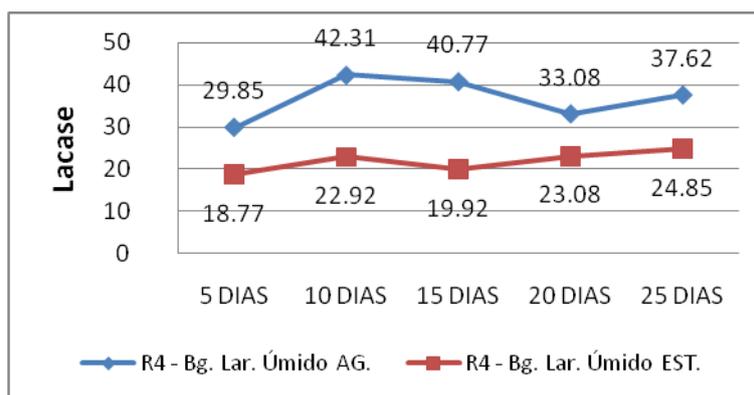


Figura 36- Variabilidade na produção de lacase pelo fungo *P.sanguineus* durante vinte e cinco dias sob condição de agitação *versus* condição estacionária *versus* no meio de cultura R4.

5.3.1.2. Produção de Lacase em Meios Regionais

5.3.1.2.1. Produção de Lacase em Meios Regionais sob Condição de Agitação

Todos os meios suplementados com matéria prima regional e submetidos à condição de agitação apresentaram produção de lacase.

O meio de cultura acrescido de buriti (M4), apresentou a maior produção média de lacase (37.75) para o período de vinte e cinco dias de crescimento. Já o meio suplementado com açaí (M5) desenvolveu a menor produção média de biomassa (18.83) para o mesmo período de crescimento (Tabela 23).

Conforme apresentado na Tabela 23, observou-se ainda que com exceção do meio acrescido de açaí (M5), todos os meios apresentaram produção média de lacase superior a 29%, porém apenas os meios M3 e M4 superaram em valores absolutos a produção média da enzima lacase em relação ao meio controle (C1).

Tabela 23: Parâmetros Descritivos da produção média de lacase produzida por *P.sanguineus* durante vinte e cinco dias de crescimento em meio de cultura suplementado com produto regional e no meio de cultura controle.

	Meios de Cultura Suplementados com Resíduos Agrícolas					
	M1 Cará	M2 Macaxeira	M3 Pupunha	M4 Buriti	M5 Açaí	C1 Batata
Lacase (média U/L)	30.00	29.02	35.09	37.65	18.83	32.17
Desvio Padrão	3.8	2.8	4.8	6.7	4.0	1.8
Variância	14.5	7.7	23.4	44.4	15.7	3.2
Coef. Variação%	12.71%	9.58%	13.79%	17.70%	21.04%	5.54%

Para verificar se as diferenças existentes entre os meios eram estatisticamente significativas realizou-se o teste ANOVA, o qual mostrou que existe diferença estatística ao nível de 95% entre as diferentes produções de lacase nos meios suplementados a base de produtos regionais e sob condição de agitação (Tabela 24).

Tabela 24: Análise de variância (ANOVA) da produção de lacase em diferentes meios de cultura a base de produtos regionais sob condição de agitação.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M.	F	(p)
Tratamento	5	10.7 e+02	213.565		
Resíduo	24	435.759	18.157	11.7624	< 0.0001*
Total	29				

* Significativo ao nível de 95 % ($p < 0,05$ significativo).

A comparação pareada das médias, análise de Tukey, mostra que houve variação estatística significativa ao nível de 95%, e confirma que a maior variação na produção de lacase está entre os meios M4 e M5, conforme mostra a (Tabela 25).

Tabela 25: Análise de Tukey para produção de lacase em meios de cultura a base de produtos regionais sob condição de agitação.

	M1	M2	M3	M4	M5	C1
	Cará	Macaxeira	Pupunha	Buriti	Açaí	Batata
M1						
M2					** (10.18)	
M3						
M4		** (8.63)			** (18.81)	
M5	** (11.16)		** (16.26)			** (13.33)
C1						

** Significativo ao nível de 95 % ($p < 0,05$ significativo)

Valores entre parênteses correspondem a diferença entre os meios

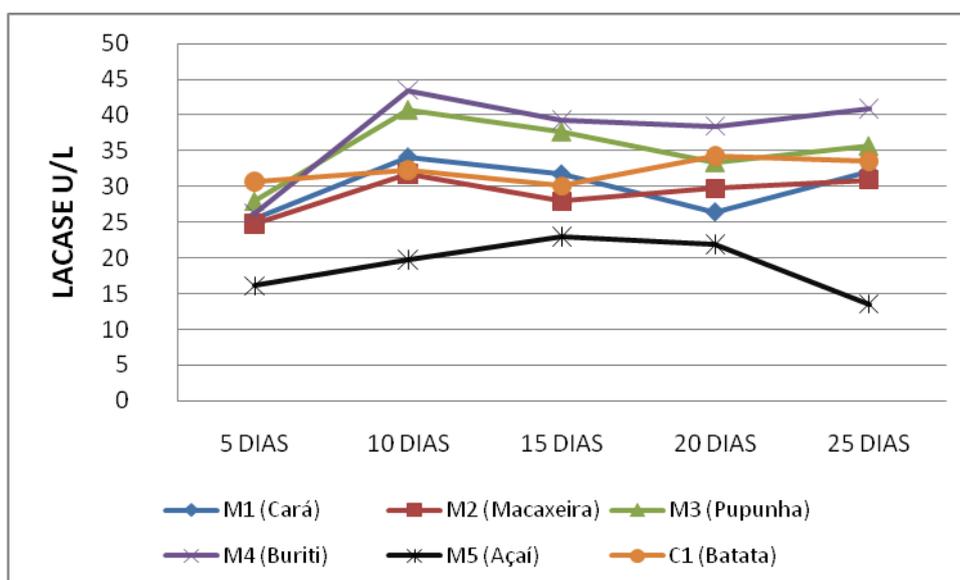


Figura 37 - Variabilidade na produção de lacase pelo fungo *P. sanguineus* durante vinte e cinco dias sob condição de agitação em meios de cultura suplementados com produtos regionais.

A curva de produção de lacase (Figura 37) mostra que durante todos os intervalos de produção enzimática o resultado mais baixo para a produção de lacase deu-se no meio acrescido de açaí M5. Observou-se que, no período de dez a quinze dias todos os meios, com exceção do meio M5, sofreram uma queda na produção de lacase.

No meio M5, verificou-se que a partir de vinte dias de produção este sofre diminuição constante na concentração da enzima lacase.

5.3.1.2.2 Produção de Lacase em Meios Regionais sob Condição Estacionária

Todos os meios suplementados com matéria prima regional e submetidos à condição de estacionária apresentaram produção de lacase

A análise estatística (Tabela 26) mostrou que, o meio de cultura acrescido de buriti M4 apresentou a maior concentração média de lacase nas condições testadas enquanto que o meio suplementado com açaí M5 apresentou a menor atividade de lacase nas condições testadas. Tais dados foram confirmados através da análise de variância ANOVA (Tabela 27), e teste de Tukey, onde foi realizada a comparação pareada das médias (Tabela 28).

Notou-se que, os meios M3 e M4, apresentaram produção média de lacase superior a produção do meio controle C1 (Tabela 26)

Tabela 26: Parâmetros Descritivos da produção média de lacase produzida por *P.sanguineus* durante vinte e cinco dias de crescimento em meio de cultura suplementado com produto regional e no meio de cultura controle sob condição de agitação.

	Meios de Cultura Suplementados com Resíduos Agrícolas					
	M1	M2	M3	M4	M5	C1
	Cará	Macaxeira	Pupunha	Buriti	Açaí	Batata
Lacase (média U/L)	16.31	10.94	18.94	24.74	5.62	18.03
Desvio Padrão	1.9	1.9	2.7	4.2	2.0	1.9
Variância	3.7	3.6	7.2	17.9	3.8	3.6
Coef. Variação%	11.83%	17.45%	14.13%	17.12%	34.94%	10.49%

Tabela 27: Análise de variância (ANOVA) da produção de lacase em diferentes meios de cultura a base de produtos regionais sob condição estacionária.

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M.	F	(p)
Tratamento	5	11.1 e+02	222.334		<
				33.4437	0.0001*
Resíduo	24	159.552	6.648		
Total	29				

* Significativo ao nível de 95 % ($p < 0,05$ significativo)

Tabela 28: Análise de Tukey para produção de lacase em meios de cultura a base de produtos regionais sob condição estacionária.

	M1 Cará	M2 Macaxeira	M3 Pupunha	M4 Buriti	M5 Açaí	C1 Batata
M1				** (8.43)		
M2					** (5.32)	** (7.09)
M3	** (5.36)	** (8.00)		** (5.79)		
M4		** (13.80)				** (6.70)
M5	** (10.69)		** (13.32)	** (19.12)		
C1					** (12.41)	

** Significativo ao nível de 95 % ($p < 0,05$ significativo)

Valores entre parênteses correspondem à diferença entre os meios

A curva de produção da enzima lacase mostra que houve uma variação na produção desta enzima durante os períodos testados. Constatou-se que apenas o meio acrescido de buriti (M4), apresentou-se sempre com produção de lacase superior ao meio controle (C1), resultados opostos ao observado na concentração de lacase obtida nos meios acrescidos de açaí (M5) e macaxeira (M2), os quais apresentaram, em todos os períodos testados, concentração inferior a do meio controle (C1) (Figura 38).

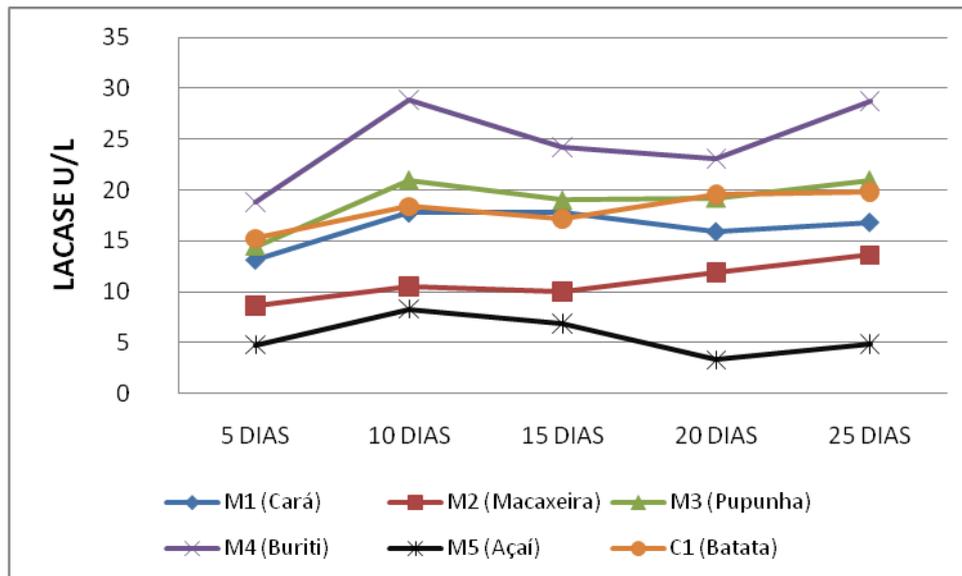


Figura 38 - Variabilidade na produção de lacase pelo fungo *P. sanguineus* durante vinte e cinco dias sob condição estacionária em meios de cultura suplementados com produtos regionais.

5.3.1.2.3 Produção de Lacase em Meios Regionais: Condição de Agitação versus Condição Estacionária

Durante todos os ensaios realizados com meios suplementados com produtos regionais, notou-se que em todos os períodos de crescimento ocorreu produção da enzima lacase maior nos ensaios realizados sob condições de agitação quando comparado com os ensaios realizados sob condição estacionária. Observou-se ainda que, o comportamento na curva de produção da enzima lacase, mostrou-se semelhante nas condições de agitação e na condição estacionária.. (Figura 39,40,41,42 e 43).

O maior pico de produção da enzimática lacase ocorreu aos dez dias de cultivo para todos os meios com exceção, ao meio acrescido de açaí (M5), o qual apresentou pico máximo de produção enzimática aos vinte dias sob agitação e aos dez dias sob condição estacionária (Figura 43).

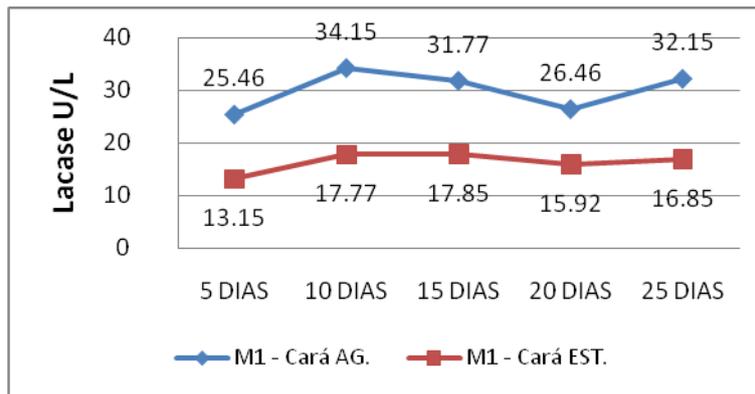


Figura 39 - Variabilidade na produção de lacase pelo fungo *P.sanguineus* durante vinte e cinco dias sob condição de agitação *versus* condição estacionária no meio de cultura M1.

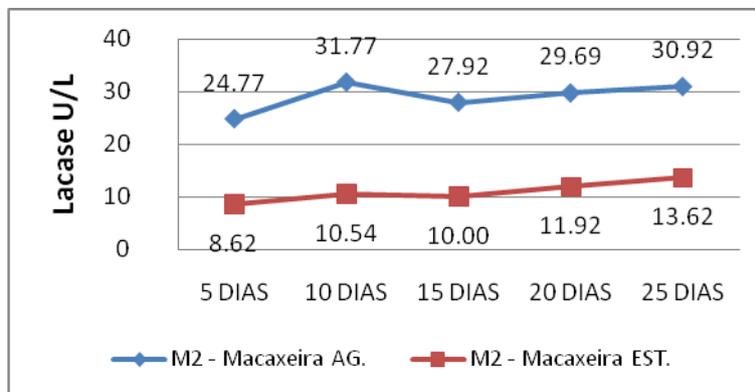


Figura 40 - Variabilidade na produção de lacase pelo fungo *P.sanguineus* durante vinte e cinco dias sob condição de agitação *versus* condição estacionária no meio de cultura M2.

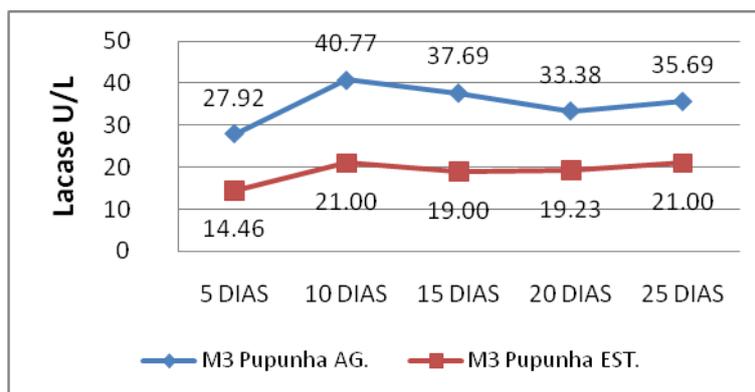


Figura 41 - Variabilidade na produção de lacase pelo fungo *P.sanguineus* durante vinte e cinco dias sob condição de agitação (180rpm) x condição estacionária (0rpm) no meio de cultura M3.

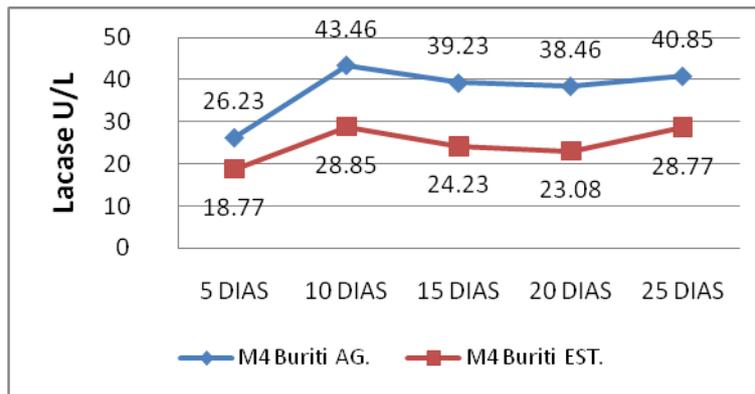


Figura 42 - Variabilidade na produção de lacase pelo fungo *P.sanguineus* durante vinte e cinco dias sob condição de agitação *versus* condição estacionária no meio de cultura M4.

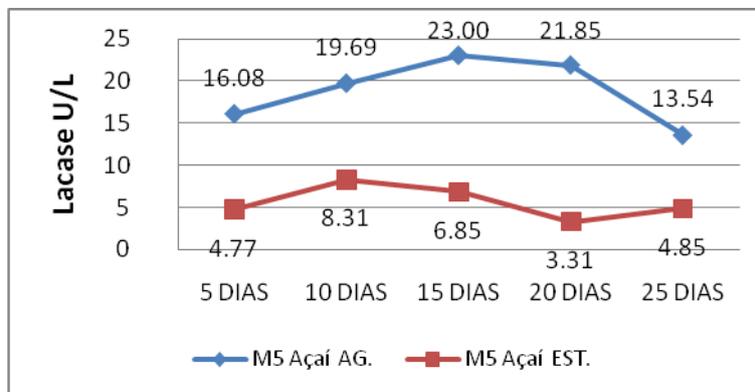


Figura 43 - Variabilidade na produção de lacase pelo fungo *P.sanguineus* durante vinte e cinco dias sob condição de agitação *versus* condição estacionária no meio de cultura M5.

5.3.3. Produção de Fenoloxidas Totais

Ocorreu detecção de fenoloxidas em todos os meios de cultura, tanto em condição estacionária quanto em condição agitação. Entretanto a condição de agitação apresentou os melhores resultados na produção destas enzimas. Durante o período de vinte e cinco dias de experimento, a cepa amazônica de *P.sanguineus* apresentou uma produção variável das enzimas fenoloxidas nos dez meios avaliados.

Em condição de agitação o padrão de produção destas enzimas mostrou-se crescente até atingir o seu nível máximo aos dez dias de cultivo e com posterior decréscimo, com flutuações, até o final do período de medição. Notou-se que até cinco dias de crescimento o meio controle C1, obteve a maior produção de fenoloxidasas entre os meios testados. Resultado contrário aos demais intervalos de tempo onde pelo menos três dos meios testados superou a produção de fenoloxidasas do meio controle C1 (Figura 44).

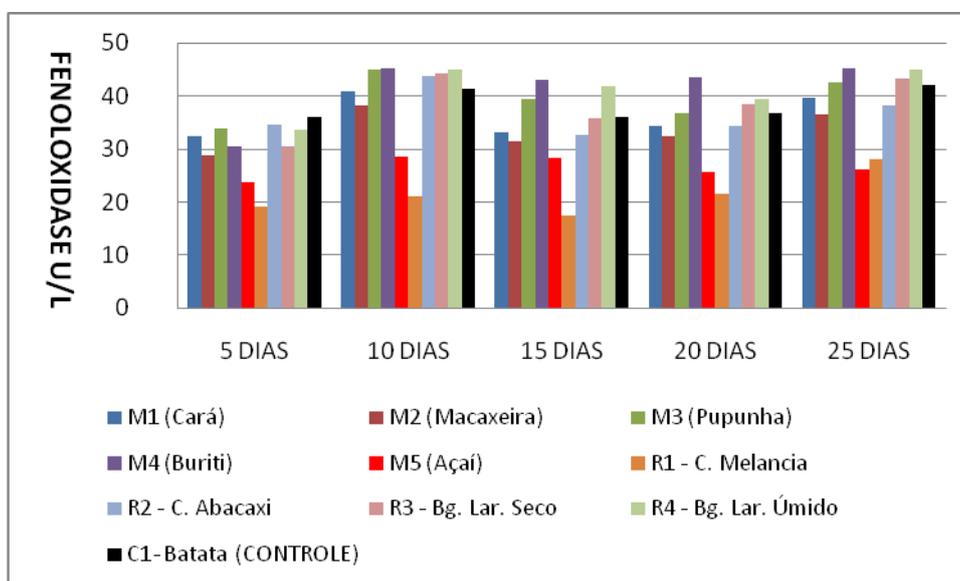


Figura 44 - Variabilidade na produção de fenoloxidase pelo fungo *P.sanguineus* durante vinte e cinco dias sob condição de agitação em dez meios de cultura.

Em valores absolutos a maior produção média de felonoxidasas, em meios acrescidos de resíduos sob condição de agitação ocorreu no meio suplementado com bagaço de laranja com umidade natural (R4), enquanto que a menor produção destas enzimas ocorreu no meio acrescido de casca de melancia (R1). Verificou-se que os meios R4 e R3, obtiveram produção de fenoloxidasas igual ou superior a produção do meio controle (C1) (Tabela 29).

Tabela 29: Parâmetros Descritivos da produção média de fenoloxidasas produzida por *P.sanguineus* durante vinte e cinco dias de crescimento em meio de cultura suplementado com resíduos e no meio de cultura controle sob agitação.

Meios de Cultura Suplementados com Resíduos					
Agrícolas					
	R1	R2	R3	R4	C1
	C. Melancia	C. Abacaxi	Bag. Lar. (S)	Bag. Lar. (U)	Batata
Fenoloxidase (U/L)	21.4	36.8	38.4	41.0	38.4
Desvio Padrão	4.0	4.5	5.7	4.7	3.0
Variância	16.4	19.9	32.2	22.1	8.9
Coef. Variação%	18.88%	12.15%	14.77%	11.48%	7.77%

Em valores absolutos a maior produção média de felonoxidasas, em meios acrescidos de resíduos sob condição estacionária ocorreu também no meio suplementado com bagaço de laranja com umidade natural (R4), enquanto que a menor concentração destas enzimas ocorreu também no meio acrescido de casca de melancia (R1) (Tabela 30).

Tabela 30: Parâmetros Descritivos da produção média de fenoloxidasas produzida por *P.sanguineus* durante vinte e cinco dias de crescimento em meio de cultura suplementado com resíduos e no meio de cultura controle sob condição estacionária

Meios de Cultura Suplementados com Resíduos					
Agrícolas					
	R1	R2	R3	R4	C1
	C. Melancia	C. Abacaxi	Bag. Lar. (S)	Bag. Lar. (U)	Batata
Fenoloxidase (U/L)	20.26	26.38	31.17	34.35	28.35
Desvio Padrão	7.0	4.6	5.5	3.9	3.9
Variância	49.5	21.5	30.6	15.4	14.8
Coef. Variação%	34.74%	17.55%	17.73%	11.43%	13.59%

Nos meios suplementados com produtos regionais verificou-se que em condições de agitação e em condições estacionária a maior produção média de fenoloxidasas ocorreu no meio acrescido de buriti M4, enquanto que a menor produção destas enzimas ocorreu no meio suplementado com açaí M5 (Tabela 31 e 32)

Tabela 31: Produção média de fenoloxidasas por *P.sanguineus* durante vinte e cinco dias de crescimento em meio de cultura suplementado com produtos regionais e no meio de cultura controle sob agitação.

	Meios de Cultura Suplementados com Resíduos Agrícolas					
	M1 Cará	M2 Macaxeira	M3 Pupunha	M4 Buriti	M5 Açai	C1 Batata
Fenoloxidase (U/L)	36.09	33.49	39.45	41.52	26.49	38.42
Desvio Padrão	3.9	3.8	4.4	6.3	2.0	3.0
Variância	15.4	14.5	19.8	39.2	3.8	8.9
Coef. Variação%	10.88%	11.37%	11.27%	15.09%	7.37%	7.77%

Tabela 32: Produção média de fenoloxidasas por *P.sanguineus* durante vinte e cinco dias de crescimento em meio de cultura suplementado com produtos regionais e no meio de cultura controle sob condição estacionária.

	Meios de Cultura Suplementados com Resíduos Agrícolas					
	M1 Cará	M2 Macaxeira	M3 Pupunha	M4 Buriti	M5 Açai	C1 Batata
Fenoloxidase (U/L)	27.68	22.85	30.35	37.03	20.78	28.35
Desvio Padrão	2.8	2.2	5.5	5.2	4.4	3.9
Variância	8.0	4.7	30.6	27.2	19.4	14.8
Coef. Variação%	10.23%	9.53%	18.23%	14.08%	21.17%	13.59%

Em valores brutos, a melhor condição para produção de fenoloxidasas ocorreu no meio acrescido de buriti (M4) e mantido sob condição estacionária (180rpm).

5.3.2. Produção de Peroxidases

Em todos os dez meios testados houve produção de peroxidases. O padrão de atividade destas enzimas no período de vinte e cinco dias mostrou-se similar para todos os meios testados. O Teste ANOVA para os tratamentos da atividade das enzimas peroxidases mostrou que para os dez meios testados em condição de agitação (180rpm) e em condição estacionária (0rpm), não existe diferença estatística significativa ao nível de 95% de probabilidade.

6. DISCUSSÃO

6.1. Efeito de diferentes meios de cultura na produção de biomassa do fungo *P.sanguineus*, sob condição de agitação e estacionária.

A produção de crescimento micelial de *Pycnoporus sanguineus* apresentou diferenças significativas sob a condição de agitação e estacionária nos dez meios de cultura testados. Segundo Papagianne e colaboradores (2001), a agitação constante dos meios de cultivo líquidos proporciona um aumento significativo na produção de biomassa pelos microrganismos em geral. Nesta pesquisa, em concordância com estes autores, a melhor produção de biomassa do *Pycnoporus sanguineus* ocorreu na condição de agitação em todos os meios utilizados. Os nossos dados estão ainda de acordo com o relatado na literatura para vários tipos de fungos (Nepomucena, 2010; Papagianni et al., 2001).

Em oposição aos nossos dados, a produção de biomassa fúngica de *Pleurotus ostreatus* não apresentou nenhuma influência na condição de agitação nos meios de cultivo, sendo igual a aproximadamente 1,22g/l, tanto na condição estática como na de agitação (Rezende et al.,2005). Destaca-se que para alguns fungos a condição de agitação pode afetar negativamente a produção de biomassa para isolados de *Colleotrichum* spp e para os basidiomicetos *Hexagonia glaba* e *Trametes lactinea* (Martinez et.al., 2009; Santos,2009).

Tanto sob a condição de agitação como sob a condição estacionária a produção de biomassa de *Pycnoporus sanguineus* apresentou melhores resultados no meio de cultura líquido acrescido de buriti (M4).

Os resultados para a produção de biomassa indicam que houve diferença na velocidade de crescimento entre os diferentes meios testados. Observou-se ainda que entre os dez meios testados sete apresentaram crescimento de biomassa superior a produção do meio controle acrescido de batata (C1), vários autores constataram também diferenças no crescimento de massa micelial (Bernardi, et al.; 2008; Bilay, et al.; 2000; Nemopucena, 2010; Santos 2009.). Com base nos resultados obtidos, verificou-se que a velocidade de crescimento micelial do *Pycnoporus sanguineus* é diretamente afetada por fatores nutricionais e condições de crescimento, tais como aeração. De acordo com Bernardi e colaboradores (2008), a velocidade de crescimento em diferentes meios de cultura é muito importante nas etapas de produção, onde o conhecimento do melhor meio para o fungo testado é um fator que estabelecerá o maior crescimento deste microrganismo.

Segundo Santos, (2009), os requisitos nutricionais de qualquer organismo são determinados pelo seu metabolismo energético característico e pela capacidade Biosintética. No caso específico dos fungos a adaptação evolutiva à diferentes situações ecológicas, conduziu a um alto grau de especialização com referência à forma química particular em que certos elementos podem ser usados como nutrientes.

Para o fungo *P. sanguineus* todos os meios nutricionais utilizados mostraram-se eficientes para o crescimento deste basidiomiceto. Assim pode-se afirmar que todos os meios testados possuíam nutrientes adequados ao crescimento deste organismo. Como mencionado anteriormente a melhor produção de biomassa para o fungo *P.sanguineus*, nas duas variáveis testadas (estacionária e agitação) obteve melhor crescimento micelial no meio suplementado com buriti (M4). De acordo com Castro e Silva, (1996) e Santos (2009), os fungos amazônicos crescem melhor em meio ácido. Por este fato todos os meio foram testados em pH 5,0 o qual é considerado ótimo para *Pycnoporus sanguineus* (Garcia, 2006).

Cada fungo tem suas exigências nutricionais específicas como relatado na literatura (Castro e Silva, 1996; Nepomucena, 2010 e Santos, 2009). Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a composição do meio de cultivo foi fator interferente no desenvolvimento miceliano.

Comparando-se os resultados obtidos nos meios acrescidos de produtos regionais com os de resíduos agrícolas verificou-se que o segundo melhor resultado para a produção de biomassa deu-se no meio acrescido de bagaço de laranja com umidade natural (R4). Segundo Alexandrino et al, (2007) o desenvolvimento da biomassa fúngica é fortemente afetada pela umidade dos substrato. Os nossos dados estão de acordo com o relatado por este autor, visto que os meios R3 e R4 ambos suplementados com bagaço da laranja, apresentaram maior eficiência na produção de biomassa aqueles acrescidos de substrato com maior teor de umidade. Destaca-se ainda que a utilização de resíduos agrícolas com umidade inicial alta e sem a necessidade de secagem reduziriam os custos de produção de bioprocessos.

Os resultados obtidos nos ensaios com resíduos agrícolas sustentam ainda o uso destes com finalidade de produção de biomassa, obtenção de metabólitos secundários e indústria de processamento de alimentos

Segundo Garcia (2006), as quantidades de Carbono e Nitrogênio apresentam variações conforme a espécie e o meio estudado. Carbono e nitrogênio são os elementos essenciais para o crescimento dos fungos. No caso específico do *Pycnoporus sanguineus* o meio suplementado com buriti promoveu o desenvolvimento de maior crescimento de massa miceliana nas duas variáveis testadas. Tal resultado deve-se provavelmente pelo fato que buriti possui maior teor de carbono, que acreditamos ser o elemento químico essencial para o crescimento de *Pycnoporus sanguineus*. Esta sugestão contraria a literatura na qual há diversos relatos indicando que os melhores meios para produção de biomassa são aqueles que apresentam maiores teores de nitrogênio (Pointing et al., 2000; Santos, 2009).

Devido à diferença muito significativa entre o meio suplementado com buriti (M4), em comparação com aos demais meios testados, sugere-se estudos posteriores com a finalidade de identificar o(s) elemento(s) responsáveis pela maior produção de biomassa de *Pycnoporus sanguineus*.

A possibilidade de utilização da biomassa em processos biotecnológicos tais como: absorção de metais pesados, remoção de substâncias xenobióticas e outros processos industriais torna o estudo de otimização da produção de biomassa de significativa importância.

6.2. Atividade Antimicrobiana

Os extratos obtidos a partir do corpo frutífero de *Pycnoporus sanguineus*, não apresentaram atividade antimicrobiana contra nenhum dos microrganismos testados. Segundo Smânia e colaboradores (2003) a cinabarina é o principal composto com atividade antimicrobiana secretado por *P.sanguineus*. Porém segundo Weissbach e Katz (1960) a produção da cinabarina depende da presença do seu precursor o ácido cinabaríco, o qual pode ser específico de algumas linhagens ou pode variar conforme as condições de cultivo ou estado no corpo frutífero. Sendo assim a utilização do corpo frutífero pode ter influenciado na ação do precursor ácido cinabaríco, e conseqüentemente na produção da cinabarina e atividade antimicrobiana.

Todos os metabólitos de *Pycnoporus sanguineus* apresentaram atividade antimicrobiana contra pelo menos um dos microrganismos testados. A análise dos dados mostrou que todos os metabólitos apresentaram atividade antimicrobiana mais ativa para as cepas de *S. aureus* (Bactéria gram-positiva), quando comparada com a atividade exercida contra *E.coli* (Bactérias grã-negativas). Segundo Demain (1996), os fungos podem produzir uma variedade muito grande de metabólitos secundários. Smânia e colaboradores (1997) afirmam que o fungo *Pycnoporus sanguineus* produz a cinabarina, um composto com atividade antimicrobiana comprovada, o mesmo autor afirma ainda que a cinabarina é mais ativa contra bactérias gram-positivas do que contra bacterias gram-negativas, dados estes que vão de acordo com os resultados desta pesquisa.

Estes resultados confirmaram que os microrganismos produzem um arsenal de substâncias químicas, portanto possuem um grande potencial biológico para serem estudados pelas indústrias farmacêuticas como fontes de novas substâncias ativas. Destacando-se ainda que o meio de cultura influencia diretamente na produção de metabólitos destes organismos.

6.3. Atividade enzimática de *Pycnoporus sanguineus* em diferentes meios de cultura sob condição de agitação e estacionária.

Em todos os meios de cultura testados ocorreu atividade da enzima lacase de *Pycnoporus sanguineus* na condição estacionária e de agitação. Segundo Garcia, (2006) diversos fatores influenciam a produção de lacase, tais como: composição do meio de cultura, razão carbono/nitrogênio, tempo de cultivo e aeração.

Neste estudo, verificou-se que os melhores resultados para produção de lacase ocorreram sob condição de agitação. Os resultados desta pesquisa estão em concordância com a literatura a qual relata que a agitação é um fator fundamental na produção de lacases fúngicas (Dekker et al, 2001; Garcia, 2006; Nepomucena, 2010; Papagianni, et al., 2001; Pointing, 2000). Em oposição a estes dados, para alguns fungos a agitação reprime a produção de lacase (Martinez, et al., 2009; Niku – Paavola et al., 1990; Regina 2001).

Dentre os dez meios de cultura testados a maior produção de lacase deu-se no meio acrescido de buriti (M4) nas duas variáveis analisadas. Verificou-se que a

produção de lacase pode ser aumentada significativamente dependendo dos nutrientes presentes que influenciam sua produção. Tais resultados estão de acordo com os relatos de Dekker e colaboradores 2007.

Nos meios suplementados com resíduos agrícolas a maior produção de lacase foi observada no meio acrescido de bagaço de laranja com alto teor de umidade (entre 75 e 80%) – (R4). Estes dados indicam que a atividade da lacase é fortemente afetada pela umidade dos substratos em concordância com o relatado por Alexandrino e colaboradores, (2007). O respectivo autor afirma ainda que é promissor o uso de resíduos da laranja como substrato adequado para o cultivo de fungos e produção das enzimas lacases e peroxidases, ambas com grande potencial de uso em diferentes processos industriais.

Os níveis de carbono e de nitrogênio também são fatores críticos para produção de lacase no meio de cultivo. Especificamente para o *Pycnoporus sanguineus* foi mostrado que a melhor produção de lacase se deu em meios contendo altos níveis de carbono e baixos níveis de nitrogênio (Pointing et al., 2000), em concordância com os nossos resultados. De maneira oposta, a produção de lacase por outros fungos como: *P. cinnabarinus*, *T. versicolor*, *T. gallica* e *L. crinitus*) foi aumentada em culturas com altos níveis de nitrogênio. (Garcia, 2006 e Nepomucena 2010).

Outro aspecto constatado através dos nossos resultados é o efeito do período de incubação na produção de lacase. Para a maioria dos meios testados a maior produção de lacase ocorreu em dez dias de cultivo, apresentando um decréscimo de produção entre onze e vinte dias de cultivo e um posterior aumento da atividade após vinte dias.

Segundo Arora e Gill (2000), o aumento na quantidade de lacase após vinte dias de cultivo pode ter sido devido à autólise do fungo a qual liberou lacase intracelular para o meio.

Em todos os meios testados ocorreu produção de fenoloxidasas e peroxidases para o fungo *Pycnoporus sanguineus* tanto em condição de agitação quanto em condição estacionária. Poucos trabalhos foram realizados com o objetivo de estudar a atividade enzimática de fenoloxidasas e peroxidases, assim pesquisas complementares serão necessárias para melhor compreensão destas enzimas.

Com base nos resultados obtidos destaca-se que o “pool” enzimático da cultura de *Pycnoporus sanguineus* indica-o como potencial para usos biotecnológicos, tais como: Biopolpação, descoloração de efluente Kraft, indústria alimentícia, farmalocógica entre outras. (Espósito et al., 1991; Duran, 1992; Castro e Silva et al., 1993).

Lacases, Fenoloxidasas e Peroxidases, compreendem um grupo de enzimas altamente versátil na natureza e possui várias aplicações industriais. O significado biotecnológico destas enzimas leva a um aumento significativo na demanda das mesmas. As enzimas lignolíticas utilizadas nesta pesquisa são promissoras para substituir os processos químicos convencionais de muitas indústrias. Portanto, a um grande campo de investigação que está inteiramente aberto para novos achados e aplicações em um futuro próximo.

CONCLUSÕES

- O crescimento sob condição de agitação é onde se obtém a maior produção de biomassa do fungo *Pycnoporus sanguineus*.
- Os meios suplementados a base de buriti (M4); pupunha (M3); cará (M1); coroa de abacaxi (R2); bagaço da laranja –seco- (R3) e bagaço da laranja –úmido- (R4) apresentaram produção de biomassa superior a produção do meio controle (batata – C1);
- Em todos os meios de cultura testados a produção de biomassa apresentou-se crescente durante todos os intervalos de tempo.
- Resíduos agrícolas possuem potencial para elaboração de meios de cultura para produção de biomassa, enzimas e metabólitos úteis de *Pycnoporus sanguineus*.
- Os extratos de *Pycnoporus sanguineus* testados, não apresentaram atividade antimicrobiana sob as cepas de *S.aureus* e *E.coli* testadas.
- Todos os metabólitos de *Pycnoporus sanguineus* testados apresentaram atividade antimicrobiana à pelo menos um dos microrganismos teste;
- Os metabólitos produzidos nos meios, buriti (M4) e bagaço da laranja (R4) apresentaram atividade antimicrobiana superior à atividade apresentada pelos metabólitos produzidos no meio controle em pelo menos um dos microrganismos teste dependendo do meio de cultivo testado.
- A produção das enzimas lacase, fenoloxidase e peroxidases obteve melhores resultados sob condição de agitação;

- Em todos os meios testados houve produção de lacase, fenoloxidade e peroxidase;
- A melhor condição para atividade enzimática ocorreu em vinte e cinco dias, sob condição de agitação no meio suplementado com buriti (M4).

7. PERSPECTIVAS

- Verificar o período total de produção de biomassa, enzimas e compostos antimicrobianos por *Pycnoporus sanguineus*;
- Buscar o aproveitamento de resíduos agrícolas para suplementação de meios de cultura a fim de maximizar a produção de biomassa, atividade enzimática e biomoléculas com ação antimicrobiana;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os meios que obtiveram atividade antimicrobiana positiva;
- Realizar testes para detecção e identificação de substâncias bioativas nos metabólitos secundários de *Pycnoporus sanguineus* em diferentes meios de cultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABECITRUS, **História da Laranja e Subprodutos da Laranja**, <http://www.abecitrus.com.br/>, acessado em Janeiro/2010.

ABRAMO, M. A. **Taioba, cará e inhame: o grande potencial inexplorado**. São Paulo: Editora Ícone, 1990. 80 p.

ADOLPHO, L. O.; SILVA, V. S.; STUCKER, C; DALCOL, I. **Atividade Antimicrobiana e Antioxidante das Frações de *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae)**. In: XIV Jornada de Jovens Pesquisadores da AUGM – Empreendedorismo, Inovação Tecnológica e Desenvolvimento Regional – UNICAMP – Campinas, 2006:

ALEXOPOULOS, C.J. **Introductory Mycology**, 2a. ed, p.613, 1962.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W., BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4.ed. Nova York:John Wiley & Sons, 1996, p.509–681, 1996.

AMARANTE, J. Prevalência de ESBL pode chegar até 100% das bactérias isoladas em hospitais. **Revista Fato Hospitalar**, n. 7, p. 24-26, 2002.

ANUÁRIO A GRANJA DO ANO. São Paulo: Centaurus, 1994. Cará e inhame, p. 30-35.

ARCHER, David B.; MACKENZIE, D.A & JEENES, D.J. 2001. **Genetic engineering: yeasts and filamentous fungi**. IN.: Basic Biotechnology, Edited by Colin Ratledge and Bjorn Kristiansen, Cambridge University Press. Cambridge, UK. pp 96-126.

BARR, D.P. & AUST, S.D. 1994. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. **Environmental Science and Technology**. 28 (2): 78-87.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2001, 230 p.

BERNARDI, E.; DONINI, L.P., MINOTTO, E.; NASCIMENTO, J.S. **Diferentes meios de cultivo e condições de luz no crescimento e massa miceliana de *Agaricus brasiliensis*** S.Wasser et al. *Arq. Inst. Biol.* São Paulo, vol. 75, N°3, p. 375-378, 2008.

BETTUCI, L. & GUERREO, R. T. **Hongos Xilófagos: Estúdio de Cultivos.** Bol. Univ. De la Rep. Montivideo, n. 188, p. 3-40, 1971.

BILAY, V.T.; SOLOMKO, E.F.; BUCHALO, A.S. Growth of edible and medicinal mushrooms on commercial agar media. In.: VAN GRIENSVEN, L.J.L.D. (Ed.) *Science and cultivation of edible fungi.* Rotterdam: Balkema, 2000. P.779-782.

BLANCHETTE, R. A. **Wood decomposition by *Phellinus pini*: a scanning electron microscopy study.** *Can. J. Bot.* 58: 1496-1503. 1980.

BLANCHETTE, R. A. **Delignification by Wood-Decay Fungi** *Annual Reviews Phytopatology* 29: 381-398. 1991.

BON, E. P. S.; PEREIRA, N.; GOTTSCHALK, M.F.; SÁ-PEREIRA, P; ROSEIRO, J.C.; FERRARA, M.A. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado.** Rio de Janeiro: Interciência: UFRJ: CAPES: FAPERJ: FCT [Portugal], 2008, 532p.

BONONI, V. L. R. **Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos. Noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas.** Instituto de Botânica, Secretaria de Estado de Meio Ambiente. São Paulo/SP. 1999.

BRIZUELA, M. A.; GARCIA, L. ; PEREZ, L. ; MANSUR, M. **Basidiomicetos : nueva fuente de metabolitos secundários.** *Rev. Iberoam. Micol.*, v. 15 p. 69-74, 1998.

BUCKLAND, B.C. E LILLY, M.D. (1993) Fermentation: An Over View. In: *Biotechnology vol.3 Bioprocessing*, Rhem, H.-J. & Reed, G., Verlag Chemie, Basel.

BUSWELL, J. A., CAI, Y.J., CHANG, S.T., PEBERDY, J.F., FU, S.Y., YU, H. S. Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, n. 12: p. 537 – 542, 1998.

BUTLER, M.S & BUSS, A.D. **Natural products – The future scaffolds for novel antibiotics.** *Biochemical Pharmacology*, v.71, p.919-929, 2006.

CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A. **Plantas Medicinais sob a ótica da moderna química medicinal.** Editora Argos, Chapecó, 2003.

CAPELARI, M. & MAZIERO, R. 1988. **Fungos macroscópicos do Estado de Rondônia: região dos rios Jaru e Ji-Paraná.** *Hoehnea* 15: 28-36.

CARDOSO, E.M.R.; NASCIMENTO JÚNIOR, J.D.B. **Processo Industrial para Beneficiamento da Macaxeira.** *Novos Cadernos NAEA*, vol.2, n°2, p.177-184, 1999.

CARVALHO, V.D. de. Utilização dos resíduos agrícolas do abacaxizeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.11, n.130, p.73-76, out. 1985.

CARVALHO, V.D. de; CLEMENTE, P.R. Qualidade, colheita, industrialização e consumo de abacaxi. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.7, n.74, p.37-42, fev.1981.

CARVALHO, S. M. S. **Análise das enzimas amilolíticas produzidas por microrganismos isolados do Tarubá**. Tese de Mestrado. Manaus – Amazonas. 1997.

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. **Biotechnology: A textbook of industrial microbiology**. 2.nd ed. Sunderland: Sinauer Associates,1990.

CASTRO e SILVA, A; ESPOSITO, E.; FERRAZ, A : DURÁN, N. 1993. **Decay of *Parqkia oppositifolia* in Amazonian by *Pycnopus sanguineus* and Potential Use for Effluent Decolorization**. *Holzforschung* 47(5): 361-368. 1993

CASTRO E SILVA, A. **Micromorfologia da degradação de madeira da espécie amazônica *Hura creptans* L. Por fungos lignolíticos pertencentes a classe *Hymenomyces***. Tese de doutorado. Manaus: INPA/FUA. 1996.

CASTRO e SILVA, A. e AGUIAR, I. J. A. **Micromorfologia da Degradação da Madeira da Espécie Amazônica *Hura crepitans* L. Por Fungos Lignolíticos Pertencentes à Classe *Hymenomyces*** . *Acta Amazônia*, V 31, nº 3, p397 – 418, 2001.

CASTRO E SILVA, A. **Madeiras da Amazônia: características gerais, nome vulgar e usos**. Manaus: Edição SEBRAE. 2002.

CERQUEIRA, D.P.; FRANCISCO, N.L.; CRUZ, S.H., CANNIATTI BRAZACA ,S.G. **Estudo da composição centesimal de bagaço de laranja visando a produção de etanol**. 2003.

<http://www.usp.br/siicusp/Resumos/16Siicusp/5065.pdf>./acessado em Julho/2010.

CHANG,S.T.,PEBERDY BUSWELL, J. A., CAI,Y.J., , J.F.,FU, S.Y.,YU,H.S.Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, n. 12: p. 537 – 542, 1998.

CORAZZA, M.; RODRIGUES, D.G.; NOZAKI, J. **Quim. Nova**, 24(4): 449-452, 2001.

COSTA, L.; CARVALHO, V.D. de. Efeito da época de colheita do abacaxizeiro nos rendimentos e atividades das bromelinas do caule. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.24, n.6, p.717-721, jun. 1989.

COUTO, F.A.A. Aspectos tecnológicos da abacaxicultura mineira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.11, n.130, p.8-12, out. 1985.

DAVIS, S; BURNS, R.G. Decolorization of phenolic effluents by soluble and Immobilized phenol oxidases. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 32:721-729. 1978.

DEKKER,R.F.H.; BARBOSA, A.M.; GIESE, E. C.; GODOY,S.D.S.; COVIZZI,L.G. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycetes *Botryosphaeria* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v. 28, n.1, p. 81-88,2001.

DEKKER,R.F.H.; BARBOSA, A.M.; GIESE, E. C.; GODOY,S.D.S.; COVIZZI,L.G. "Influence of nutrients on enhancing laccase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05". *International Microbiology*, Barcelona, v.10, p. 177-186, 2007.

DEMAIN, A. L. Fungal secondary metabolism: regulation and functions. In: SUTTON, B. **A Century of Mycology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. p. 233-254.

DEMAIN, A. L. Fungal secondary metabolism: regulation and functions. In: SUTTON, B. **A Century of Mycology**. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. p. 124-126.

DONNINI, L.P. **Cultivo de Shimeji [*Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer] em Capim-Elefante (*Pennisetum purpureum* Schum) suplementado com farelos**. 2006, 80p., Dissertação (Programa de Pós graduação em Agronomia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

D`SOUZA, T. M.; MERRIT, C. S.; REDDY, C. A. **Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycetes *Ganoderma lucidum***. Applied and environmental Microbiology, v. 65, n. 12, p. 5307-5313, 1999.

EGGERT, C., TEMP, U., DEAN, J.F.D. & ERIKSSON, K. E. L. **A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase**. FEBS Letters, v. 391, p.144-148, 1996.

ELISASHVILI, V.; WASSER, S. P.; TAN, K. K. Effects of carbon and nitrogen sources in the medium on *Tremella mesenterica* Retz.:Fr. (Heterobasidiomycetes) growth and polysaccharide production. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 5, n. 1, p.48-56, 2003.

EMBRAPA. **Sistema de Produção do Açaí**. Mercado e comercialização, 2006.

ERIKSSON, K.E. **Swedish developments in biotechnology related to the pulp and paper industry**. TAPPI 68: 46-77. 1985.

ESPOSITO, E. **Processos Envolvidos no Tratamento Biológico de Efluentes: Utilização de um Biorreator de Leito Recheado**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas-SP. 1992.

FAO. **Production yearbook**. Rome, 1991. p.94-95.

FARALDO, M. I. F., SILVA, ANDO, R.M da, Akihiko *et al.* **Variabilidade genética de etnovarietades de mandioca em regiões geográficas do Brasil.** *Sci. agric.*. jul./set. 2000, vol.57, no.3, p.499-505.

FENGEL, D. e WEGENER, G. 2003. In Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions. **Water de Gruyter**, Berlin pp 66-75. 613p.

FENNEMA, O.R. **Química de los alimentos.** 2.ed. Zaragoza: Acribia, 1993. 1095 p. MARQUES, L.A. **Isolamento e caracterização do amido do caule do abacaxizeiro.** 1989. 126 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.

FERRAZ, A. L. Fungos Decompositores de Materiais Lignocelulósicos. in: **Fungos: uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia** /Orgs. Elisa Espósito e João Lúcio de Azevedo. Caxias do Sul: Educ. 2004.

FIDALGO, O. **Conhecimento micológico dos índios brasileiros.** Revista de Antropologia, v.15/15, p.27-34, 1968.

FRIES, E. M. 1821. **Systema Mycologicum.** Vol. 1. Johnson Reprint Corporation, Nova York, 520p.

FORSS, K.; JOKINEN, K.; SAVOLANEN, M; WILLIANSO, H. Utilization of enzymes for effluent treatment in the pulp and paper industry. **Paperi Ja Puu** 10:1108-1110. 1989.

GARCIA, T. A. **Purificação e caracterização das lacases de *Pycnoporus sanguineus*.** 2006. Tese de Doutorado, Programa de pós graduação em biologia celular, Universidade Nacional de Brasília, Brasília DF, 110.p

GERBER, A.L. 1996. **Fungos xilófilos poróides (Aphyllophorales) no Morro da Lagoa da Conceição, Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil.** *Insula* 25: 3-68.

GIBERTONI, T.B., RYVARDEN, L. & CAVALCANTI, M.A.Q. 2004 **Poroid fungi (Basidiomycota) of the Atlantic Rain Forest in Northeast Brazil.** *Synopsis Fungorum* 18: 33-43.

GLENN, J.K; GOLD, M.H.1985. Purification and characterization of extracellular Mn (II)- Dependent Peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Arch. Biochem. Biophys.** 242:329-334.

GÓES NETO, A. 1999. **Polypore diversity in the State of Bahia, Brazil: a historical review.** *Mycotaxon* 72: 43-56.

GRAY, S.N. 1998. **Fungi as potential bioremediation agents in soil contaminated with heavy or radioactive metals.** *Biochem. Soc. Trans.* 26:666 – 70. Guanabara Koogan, 2000.

GROHMANN, K; CAMERON, R. G; BUSLIG, B. S., 1995. **Fractionation and pretreatment of orange peel by dilute acid hydrolysis**, *Bioresource Technology*. 54, 129-141.

GROPOSO, C. & LOGUERCIO-LEITE, C. 2002. **Fungos poliporóides xilófilos (Basidiomycetes) da Reserva Biológica Tancredo Neves, Cachoeirinha, Rio Grande do Sul, Brasil**. *Iheringia, série botânica*, 57: 39-59.

GUGLIOTTA, A.M. & BONONI, V.L.R. 1999. **Polyporaceae do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, São Paulo, Brasil**. *Boletim do Instituto de Botânica* 12: 1-112.

GUGLIOTTA, A.M. & CAPELARI, M. 1995. **Polyporaceae from Ilha do Cardoso, SP, Brazil**. *Mycotaxon* 56: 107-113.

GUERRERO, R.T. & HOMRICH, M.H. 1999. **Fungos macroscópicos comuns no Rio Grande do Sul – Guia para Identificação**. 2 ed. Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. 10^a. ed. Rio de Janeiro: MacGraw-Hill, 2003

HATAKKA, A. et al. **Modification of Lignin by Laccase and Manganese Peroxidase. Proceedings of the 6th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry Advances in Applied and Fundamental Research**, Austria. 1994.

HAWKSWORTH DL. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 105(12): 1422-1432.

HWANG, H. J. *et al.* Production and molecular characteristics of four groups of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus gilvus*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 94, p. 708-719, 2003.

HERRERA, T. & ULLOA, M. **El reino de los hongos: Micología básica y aplicada**. Universidad nacional autónoma de México 552p. 1998.

HERNANDEZ, F.B.T.; JÚNIOR, J.A.; LOPES, A.S. **Irrigação na cultura da pupunha. In: Curso sobre cultivo processamento e comercialização de palmito pupunha**, 2001, Londrina, IAPAR, p.107-126.

IBGE, Censo Agropecuário 2006, <http://www.ibge.gov.br/home/mapasite/mapasite.php#download>, acessado em Junho/2009.

ISHIKAWA, N.K. *et al.* Antimicrobial Cuparene-Type Sesquiterpenes, Enokipodins C e D, from a mycelial culture of *Flamulina velutipes*. *Journal of Natural Products*, v. 64, n. 7, p.932-934, 2001.

KIRK, T.K.; FARRELL, R.L. Enzimática "combustion": The microbial degradation of lignin. **Ann. Rev. Microbiol.** 41:465-505. 1987.

KIM, S.W. *et al.* Influence of nutritional conditions on the mycelial growth and exopolysaccharide production in *Paecilomyces sinclairii*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, p. 389-393, 2002.

KIRK, T.K.; CHANG, H.M. **Potential applications of biolignolytic systems.** *Enzyme Microb. Technol.* 3: 189-196. 1981.

KIRK, T.K., CULLEN, D. 1998. Enzymology and molecular genetics of Wood degradation by white-rot degradation by white-rot fungi. In: **Environmentally**

KNIGHT, V. *et al.* Diversifying microbial natural products for drugs discovery. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 62, p. 446-458, 2003.

KOTRBA, P. RUMIL T. 2000. **Bioremediation of heavy metal pollution exploiting constituents, metabolites and metabolic pathways of living.** A review. *Coll. Czech. Chem. Comm.*, 65: 1205-1247.

JOHNSON, DENNIS V. 1996. "**Manejo Sostenible de Asaí (Euterpe precatoria) para la Producción de Palmito en la Concesión Forestal Taruma, Provincia Velasco, Santa Cruz - Bolivia**"; *Documento Técnico* 31. Proyecto BOLFOR.

JONATHAN, S. G.; FASIDI, I. O.; AJAYI, E. J. Physico-chemical studies on *Volvariella esculenta* (Mass) Singer, a Nigerian edible fungus. **Food Chemistry**, v. 85, p. 339-342, 2004.

LACAZ, C. S., MINANI, P. F., PURSHIO, A. **O grande mundo dos fungos.** Ed. Universidade de São Paulo. 248 p. 1970.

LACAZ, C.L. *et al.*; **Tratado de Micologia Médica.** 9ª ed. São Paulo: ARVIER. 2002

LEE, B. C. *et al.* Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible basidiomycete *Grifola frondosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 369-376, 2004.

LEPP, H. **Cosmopolitan and pan-tropical species.** Australian National Botanic Gardens, Fungi. 2005 Web site: <http://www.anbg.gov.au/fungi/mycogeography-cos-pan.html> Acesso em: 13/04/2010.

LEHNINGER, Albert Lester *et al.* **Princípios de bioquímica.** 2 edição. São Paulo: SARVIER, 1995.

LEONOWICZ, A., ACHO, N. -S., LUTEREK, J., WILKOLAZKA, A. WOJTAS-WASILEWSKA, M., MATUSZEWSKA, A., HOFRICHTER, M. WESENBERG, D. & ROGALSKI, J. Fungal laccase: properties and activity on lignin. **Journal Basic Microbiology**, 41 (3-4): 185-227, 2001.

LINDEQUIST U.; NIERDERMEYER, T. H.J.; JULICH, W.D. **The pharmacological potential of mushroom. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.** V.2, p. 285-99,2005.

LOMASCOLO, A. et al. Overproduction of laccase by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarius* using ethanol as inducer. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p.618-624, 2002.

LOWE, D. A . **Production of enzymes.** IN.: Basic Biotechnology, Edited by Colin Ratledge and Bjorn Kristiansen, Cambridge University Press. Cambridge, UK. pp 392-408. 2001.

LODGE DJ, CANTRELL S. 1995. Fungal communities in wet tropical forest: variation in time and space. **Canadian Journal Botany** 73(1): 1391-1398.

LODGE DJ. 2001. Diversidad Mundial y regional de hongos. 291-304, in Hernández HM, Aldrete HAF, Álvarez F, Ulloa M. **Enfoques contemporâneos para el estudio de la biodiversidad.** México, Instituto de Biología, UNAM.

LOGUÉRCIO LEITE, C. Revisão histórica sobre fungos poliporóides Aphyllophorales xilófilos de Santa Catarina, Brasil. **Insula**, n. 20, p. 3-10, 1998.

LOGUÉRCIO LEITE, C. **Taxonomia dos fungos, In: Espósito, E. & Azzevedo, J. L. Fungos: uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia.** Educ: Caxias do Sul, p. 47 – 90, 2004.

LÓPEZ, J. L. C. *et al.* Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 270-277, 2003.

LOGUERCIO-LEITE, C. & WRIGHT, J.E. 1991. **Contribution to a biogeographical study of the Austro-American xylophilous polypores (Aphyllophorales) from Santa Catarina Island, SC, Brazil.** Mycotaxon 41: 161-166.

LORENZI, Harri; SOUZA, Hermes Moreira de; MEDEIROS-COSTA, Judas Tadeu de; CERQUEIRA, Luiz Sérgio Coelho de; BEHR, Nikolaus von (1996). **Palmeiras do Brasil: nativas e exóticas.** Nova Odessa: Editora Plantarum. p. 55.

MANFIO, G.P. **Biodiversidade : Perspectivas e oportunidades tecnológicas. Microrganismos e aplicações industriais.** Base de Dados Tropical, 2002. Disponível em: <http://www.bdt.fat.org.br> . Acesso em: 10 maio 2010.

MANZONI, M. *et al.* Production of statins by filamentous fungi. **Biotechnology Letters**, v. 21, p. 253-257, 1999.

MACIEL, M.J.M; CASTRO E SILVA, A.; RIBEIRO,H.C.T. **Industrial and biochnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review.** Electronic Journal of biotechnology, em prelo, 2010.

MARTINEZ,G.C; GIESE,E.C; PEREIRA,J.O;DEKKER R.F.H.;BARBOSA, A.M.; **Seleção de Isolados de *Colletotrichum* da biodiversidade da Amazônia comoprodutores de lacases utilizando metodologia simplificada.** Semina: Ciências agrárias, Londrina, v.30, n.2, 397-406, 2009.

MICHEL, FC; DASS, B; GRULKE, E.A et al. Role of manganese peroxidases and lignin peroxidases of *Phanerochaetes chrysosporium* in the decolorization of craft bleach plant effluent. **Appl. Env. Microbiol.** 57(8) : 2368-2375. 1991

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard— Eighth Edition.** NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.)

NEPOMUCENA,R.M.P.; **Avaliação do potencial microbiano, do crescimento e de secreção de lacase do fungo amazônico *Lentinus crinitus*.** Dissertação de Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais, Universidade do Estado do Amazonas UEA, Manaus-AM, 2010, p.110.

NEUFELD, P. **Micologia.** Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro - RJ. 1997.

NIKU-PAAVOLA, M.-L. KARHUNEN, E., KANTELINEN, A., VIIKAVI, L. LUNDELL,T. & HATAKKA,A. The effect of culture conditions on the productions of lignin midifying enzymes by the white-rot fungus *Phebia radiate*. **Journal of Biotechnology**, 13:211-221,1990.

NIELSEN, R. I.; OXENBOLL, K. **Enzymes from fungi: their technology and uses.** **Mycologist**, p. 69-71, 1998.

NOBLES, M.K.; FREW; B.P. **Studies in wood-inhabiting hymenomycetes.** The genus *Pycnoporus* Karst. Canadian Journal of Botany, v.40, p. 987-1016, 1962.

OLIVEIRA, A.M. *et al.* **Agentes destruidores da Madeira** In: IPT Manual de Preservação da Madeira. Vol. I. São Paulo, p 99 – 165, 1986.

OKUNADE, A. L.; ELVIN-LEWIS, P. F. ; LEWIS W. H. **Natural antimycobacterial metabolites: current status.** Phytochemistry v. 65, p. 17-32, 2004.

OLIVEIRA, E. M. **Melancia:** como plantar e colher. São Paulo: Icone, 1989. 70p. (Coleção Brasil Agrícola).

PANEK, A.D. (1993) Yeast – 100 years of contribution to Biochemistry. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 26, 337-341.

PANDEY, A. et al. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Curr. Sci.**, v. 77, n. 2, p. 149-162, 1999.

PEARCE C. (1997) Biologically Active Fungal Metabolites. *Advances in Applied Microbiology*, 44, 1-80.

PAPAGIANNI, M.; NOKES, S.E.; FILER, K. Submerged and solid-state phytase fermentation by *Aspergillus niger*: Effects of agitation and medium viscosity on phytase production, fungal morphology and inoculums performance. *Food Technology and Biotechnology*, Zegreb, v. 39, n.4, p.319-326, 2001.

PARK, J. P. *et al.* Optimization of submerged culture conditions for the mycelial growth and exo-biopolymer production by *Cordyceps militaris*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 76-81, 2001.

PELÁEZ, F. **The historical delivery of antibiotics from microbial natural products. Biochemical pharmacology.** v.71, p.981-990, 2006.

PÉREZ-SILVA, E., E. AGUIRRE-ACOSTA Y C. PÉREZ-AMADOR. **Aspectos sobre el uso y La distribución de *Pycnoporus sanguineus* (Polyporaceae) em México.** *Revista Mexicana de Microbiología*, v.4, p.137-144, 1988.

POINTING, S.B., JONES, E.B.G. & VRIJMOED, L.L.P. Optimization of laccase productions by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture. **Mycologia**, 92 (1): 139-144, 2000.

PRZYBYLOWICZ, P e DONOGHUE, J. **Shiitake Growers Handbook: the art and science of mushroom cultivation.** Iowa: Kendall/Hunt publishing company, 1990.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T.L. 1998. **Os Reinos dos fungos.** Santa Cruz do Sul, Rs: EDUNISC.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. 2004. **Os Reinos Dos Fungos. Vol. 2.** 2ed . Santa Cruz do Sul: EDUNISC.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. 2002. **Os Reinos Dos Fungos. Vol. 1.** Santa Cruz do Sul: EDUNISC.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia.** 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 703 p.

RAVEN, P., EVERT, R., CURTIS, H. *Biology of Plants.* Traduzido por Patrícia Voyeux, Irene Rizzini, C. T. Rizzini, Vera L. B. de Souza, Beatriz Rizzini. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1978.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal.** 6ª. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001.

REDDY, G. V. *et al.* Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor caju*). **Proc. Biochem.**, v. 38, n. 10, p. 1457-1462, 2003.

REGINA, M. **Cinética do crescimento miceliano de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler em bagaço de cana-de-açúcar e serragem de eucalipto.** 2001. 87p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

REZENDE, M.I.; BARBOSA, A.M.; VASCONCELOS, A.F.D.; HADDAD, R.; DEKKER, R.F.H. Growth and production of laccases by the ligninolytic fungi, *Pleurotus ostreatus* and *Botryosphaeria rhodina*, cultured on basal medium containing the herbicide, Scepter (imazaquin). *Journal of Basic Microbiology*, Berlin, v. 45, n.6, p.232-240, 2005.

RIVAS, B.; TORRADO, A.; TORRES, P.; CONVERTI, A.; DOMINGUÉX, J.M., 2008. **Submerged Citric Acid Fermentation on Orange Peel Autohydrolysate**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56.

RITONJA, A.; ROWAN, D.A.; BUTTLE, D.J.; POWLINGS, M.D.; TURK, V.E.; BACRET, J.A. Stem bromelain, aminoacids sequence and implications for weak binding of cystactin. **FEBS LETTERS**, Cambridge, v.247, n.2, p.419-424, Apr. 1989.

RYVARDEN, L. & JOHANSEN, G.J. 1980. **A preliminary polypore flora of East Africa.** *Fungiflora*, Oslo.

RYVARDEN, L. & MEIJER, A.A.R. 2002. Studies in neotropical polypores 14. **New species from the State of Paraná.** Brazil. *Synopsis Fungorum* 15: 34-69.

ROSALES, E.; COUTO S. R.; SANROMÁN, M. A. Reutilisation of food processing wastes for production of relevant metabolites: application to laccase production by *Trametes hirsuta*. **J. Food Eng.**, v. 66, n. 4, p. 419-423, 2005.

RODWEL. et alli **Bioquímica de Harper**, 13ª ed., s.d. 1985.

ROY-ARCAND, L; ARCHBALD, F.S. Direct Dechlorination of chlorophenolic compounds by laccase from *Trametes (Coriolus) versicolor*. **Enzyme Microb. Technol.** 13:194-201. 1991

SANTANA, A.F., & OLIVEIRA, L.F. **Aproveitamento da casca de melancia (*Curcubita citrullus*, *Shrad*) na produção artesanal de doces alternativos.** *Rev. Alim. Nutr.*, Araraquara v.16, n.4, p. 363-368, out./dez. 2005

SANTOS, J.C.; **Atividade Enzimática Oxidativa dos fungos Amazônicos *Pleurotus* sp (F-31), *Lentinus crinitus* e *Hexagonia glabra*.** Dissertação de Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus-AM, 2009, p.100.

SHLEEV, S.V.; MOROZOVA, O.V.; NIKITINA, O.V.; GORSHINA, E.S.; RUSINOVA, T.V.; SEREZHENKOV, V.A.; BURBAEV, D.S.; GAZARYAN, I.; YAROLOPOV, A. **Comparison of physico characteristics of laccases from different basidiomycetes.** *Biochimie*. Vol.86, p.693-703, 2004.

SILVA, R. M. da, BANDEL, G., FARALDO, M.I. *F.et al.* **Biologia reprodutiva de etnovarietades de mandioca.** *Sci. agric.* jan./mar. 2001, vol.58, no.1, p.101-107.

SILVEIRA, Verlande Duarte. **Micologia**. 4^o Ed. Rio de Janeiro: Ed. Interamericana, 1981.

SILVA, M., ESPOSITO, E. **O papel dos fungos na recuperação ambiental** In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. (Coords.) **Fungos: uma introdução á biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Su: EDUCS, 2004, P.337-369.

SILVEIRA, R.M.B. & GUERRERO, R.T. 1991. **Aphylophorales poliporóides (Basidiomycetes) do Parque Nacional de Aparados da Serra, Rio Grande do Sul**. Boletim do Instituto de Biociências 48: 1-127.

SMÂNIA, A. JR.; DELLE MONACHE, F.; SMÂNIA, EFA; GIL, ML; BENCHETRIT, LC; CRUZ, FS **Antibacterial actividade de uma substância produzida pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. J. Ethnopharmacil.** 45.177-181, 1995.

SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA, A. Jr.; LOGUÉRCIO LEITE, C. Cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus*. **Journal of Chemistry and Technical Biotechnology**. v. 70, p.57-59, 1997.

SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA, A. Jr.; LOGUÉRCIO LEITE, C. Cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus* strains and antimicrobial activity against bacteria from food products. **Revista de Microbiologia**, v. 29, n. 4, p. 1-7, 1998.

SMITH, G.M. **Botânica Criptogâmica: Algas e Fungos**. 4^a. Ed. Fundação Calouste Gulberkian, p.527, 1987.

SOTÃO, H.M.P., CAMPOS, E.L., GUGLIOTTA A.M. & COSTA, S.P.S.E. 2003. **Fungos macroscópicos: Basidiomycetes. In: M.E.B. Fernandes (org.). Os manguezais da costa norte brasileira**. Fundação Rio Bacanga, São Luís, pp. 45-59.

STROHL, W. R. The role of natural products in a modern drug discovery program. **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 2, p. 39-41, 2000.

SOUZA, Helenires Queiroz de; OLIVEIRA, Luiz Antonio de and ANDRADE, Jerusa Souza. **Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico**. *Ciênc. Technol. Aliment.* [online]. 2008, vol.28, suppl., pp. 116-124. ISSN 0101-2061.

SOUZA, C. G. M. TYCHANAWICZ G.K., SOUZA, D. F. & PERALTA, R. M. Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. **Journal Basil Microbiology**, 44 (2): 129 – 136, 2004.

SUBICK, J. *et al.* Mode of action of Mucidin, a new antifungal antibiotic produced by the basidiomycete *Oudemansiella mucida*. **Biochemistry and Biophysical Acta**, v. 343, p. 363-370, 1974.

SUNDARAMOORTHY, M; KISHI,K; GOLD, M.H et al. 1994. Preliminary crystallographic analysis of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Mol. Biol.** 238:845-848.

SZKLARZ, G.D. 1989. Production of phenol oxidases and peroxidases end peroxidases by wood fungi. **Micology.** **81**: 234-240.

SUGIE, Y.; HIRAI, H.; INAGAKI, T.; ISHIGURO, M. ; KIM, Y-J. ; KOMIJA, Y.; SARAKIBARA, T.; BRENNAN, L. A **New antibiotic CJ-17,665 from *Aspergillus ochraceus***. The journal of antibiotics, v.54 (11) p.911- 916, 2001.

TANAKA, A .;TOSA, T.; KOBAYASHI, T (eds.). **Industrial Applications of Immobilized Enzymes**. Marcel Dekker, New York. 1993.

TANG, Y. J.; ZHONG, J. J. Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 20-28, 2002.

TAVARES, Valquíria Barco et al. **Utilização do resíduo líquido de indústria de processamento de suco de laranja como meio de cultura de *Penicillium citrinum*: depuração biológica do resíduo e produção de enzima**. *Quím. Nova* [online]. 1998, vol.21, n.6, pp. 722-725. ISSN 0100-4042. doi: 10.1590/S0100-40421998000600010.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 3. ed. São Paulo. Atheneu, 2001.

THURSTON, F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology.** 140 19-26. 1994.

TISSEU, R. Nolonisation de déchets de conservene d'ananas. Possibilitér d'extraction de bromeline. **Fruits**, Paris , v.41, n.11, p.703-708, dec. 1986.

TRABULSI, L.R. **Microbiologia**. 2^a ed. Editora Atheneu. São Paulo. SP. 1998.

UZEDA, M. **Microbiologia Oral - Etiologia da Cárie, Doença Periodontal e Infecções Endodônticas**. Rio de Janeiro: MEDSI, 1 ed. 2002.

VALMASEDA, M.; ALMENDROS, G.; MARTÍNEZ, A. T. **Substrate-dependent degradation patterns in the decay of wheat straw and beech wood by ligninolytic fungi**. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 33, p. 481-484, 1990.

VIEIRA, M. C.; HEREDIA Z.N.A.; GRACIANO,J.D.; RIBEIRO, R. **Uso de matéria seca de cará, mandioquinha-salsa subsidio parte do milho na ração para frangos de corte**. Horticultura Brasileira, Brasília, v.17, n°. 1, p.34.-38, 1999.

VILLAS-BÔAS, S.L.; ESPOSITO, E.; MITCHELL, D. A. Microbial conversion of lignocellulosic residues for production of animal feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 98, n. 1, p. 1-12, 2002.

VINHA, P.C. 1988. **Fungos macroscópicos do Estado do Espírito Santo depositados no Herbário Central da Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil.** Hoehnea 15: 57-64.

WAGNER, R. *et al.* Links between morphology and physiology of *Ganoderma lucidum* in submerged culture for the production of exopolysaccharide. **Journal of Biotechnology**, v. 114, p. 153-164, 2004.

WEISSBACH, H & KATZ, E. Studies on the Biosynthesis of Actinomycin: Enzimic Synthesis of the Phenoxazone Chromophore. **The journal of biological Chemistry**. V. 236, n.3, 1960.

WILCOX, W.W. **Changes in wood microstructure through progressive stages of decay.** USDA Forest Service. Research Paper FPL 70. 1968. 72p.

WU, J. Z. *et al.* Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer. Part 2: effect of carbon-to-nitrogen ratio of the culture medium on the content and composition of the mycelial dietary fibre. **Food Chemistry**, v. 85, p. 101-105, 2003.

ANEXOS

