



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS  
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO-SENSU* EM  
BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS - MBT**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MICROBIANO DE CRESCIMENTO E SECREÇÃO  
DE LACASE DO FUNGO AMAZÔNICO**  
*Lentinus crinitus* (L.ex Fr.) Fr

**MANAUS-AM  
2010**



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS  
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO-SENSU* EM  
BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS - MBT**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MICROBIANO DE CRESCIMENTO E SECREÇÃO  
DE LACASE DO FUNGO AMAZÔNICO**  
*Lentinus crinitus* (L.ex Fr.) Fr

**RAFAELLE MARIA PAZ NEPOMUCENA**

**MANAUS-AM  
2010**



**RAFAELLE MARIA PAZ NEPOMUCENA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MICROBIANO DO CRESCIMENTO E DE  
SECREÇÃO DE LACASE DO FUNGO AMAZÔNICO**  
*Lentinus crinitus* (L.ex Fr.) Fr

Dissertação apresentada à Universidade do Estado do Amazonas – UEA, para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais, junto ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biotecnologia e Recursos Naturais. Área de Concentração: Uso Sustentável da Biodiversidade.

**Orientadora:** Dra. Helena Camarão Telles Ribeiro.  
Universidade do Estado do Amazonas – UEA

**Co-orientador:** Dr. Ademir Castro e Silva.  
Universidade do Estado do Amazonas – UEA

**MANAUS-AM  
2010**

## Ficha Catalográfica

N441a Nepomucena, Rafaele Maria Paz.

Avaliação do potencial microbiano do crescimento e de secreção de lacase do fungo amazônico *lentinus crinitus* (L.ex Fr.) F / Rafaele Maria Paz -- Manaus: Universidade do Estado do Amazonas, 2010.

147 p. : il.

DISSERTAÇÃO – Título de Mestrado - Universidade do Estado do Amazonas - UEA, 2010.

Orientadora: Dra. Helena Camarão Telles Ribeiro.

Co-orientador: Dr. Ademir Castro e Silva.

1. Fungos 2. Biomassa fúngica I. Título.

CDU: 5+6

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária  
Sheyla Lobo Mota - CRB 484

Dedico este trabalho a todos aqueles que sabem que contribuíram para a realização do mesmo, que estiveram do meu lado em todas as horas, inclusive nas difíceis, enfim aos amigos de verdade, especialmente a minha família e aos meus pais Antônio e Eva pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço a Deus pela minha existência e por tudo pelo que tem me proporcionado.

A Nosso Senhor Jesus Cristo, Redentor e ao Divino Espírito Santo pela iluminação do meu caminho.

A Nossa Senhora Maria Santíssima, pelo significado de sua existência em minha vida.

A minha família, especialmente aos meus pais Antônio e Eva e minhas irmãs Rayanna e Rayara, pelo apoio e presença.

Aos familiares que em diversos momentos foram privados de atenção e cuidados em detrimento da realização deste trabalho.

Ao meu noivo Rogério Marialva Nunes pelo incentivo e força neste momento de grande importância profissional.

A Prof. Dr<sup>a</sup> Helena Camarão Telles Ribeiro e ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Ademir Castro e Silva, pela orientação, apoio, incentivo e dedicação durante todas as etapas de desenvolvimento desta dissertação.

A Prof. Dr<sup>a</sup> Ormezinda Fernandes Cristo Celeste e ao Prof. Dr<sup>a</sup> Cristovão Alves da Costa, pelo apoio em ceder espaço em seu laboratório para realização da etapa final da dissertação.

Ao funcionário do Laboratório de Biorgânica Emerson Bacellar pela ajuda e suporte no manuseio dos equipamentos e apoio nos momentos decisivos.

Aos amigos e pesquisadores: Andrey Azedo, Dolores Fonseca, Márcia Maciel, Natália Martins, Rafael Lopes e Renah Boanerges pelo apoio, união companheirismo, luta e incentivo durante a realização deste trabalho.

**AGRADEÇO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Universidade do Estado do Amazonas – UEA pelo ensino recebido.

Aos administradores e amigos da Universidade do Estado do Amazonas/UEA, pela amizade e convivência.

Aos Professores do Curso de Mestrado em Biotecnologia, pela dedicação, carinho e conhecimentos transmitidos.

Aos membros da banca de qualificação pela disponibilidade em colaborar para a melhoria deste trabalho.

A amiga Sheila dos Anjos e Glícia da Costa pela amizade, apoio, força e companheirismo sempre prestados.

Ao amigo Ronaldo Antônio pela amizade, apoio, força sempre prestados.

Aos Pesquisadores e Amigos: Ângela, Arianne Pantoja, André Felipe, André Luiz, Daniely Pinheiro, Dannielle Cordeiro, Mauricio Brito, Márcia Seixas, Mirian dos Santos, Nelsília Matos, Patrick Gomes, Rejane de Castro, Reginaldo da Silva, Rosilane Ramos e Tâmara Araújo pela amizade, apoio, força e companheirismo sempre prestados.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Agradeço a todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram para a realização desta dissertação.

**AGRADEÇO**

## EPÍGRAFE

A vida me ensinou...  
A dizer adeus às pessoas que amo, sem tirá-las do meu coração;  
Sorrir às pessoas que não gostam de mim,  
Para mostrá-las que sou diferente do que elas pensam;  
Fazer de conta que tudo está bem quando isso não é verdade, para que eu possa acreditar que tudo vai mudar;  
Calar-me para ouvir; aprender com meus erros.  
Afinal eu posso ser sempre melhor.  
A lutar contra as injustiças; sorrir quando o que mais desejo é gritar todas as minhas dores para o mundo.  
A ser forte quando os que amo estão com problemas;  
Ser carinhoso com todos que precisam do meu carinho;  
Ouvir a todos que só precisam desabafar;  
Amar aos que me machucam ou querem fazer de mim depósito de suas frustrações e desafetos;  
Perdoar incondicionalmente, pois já precisei desse perdão;  
Amar incondicionalmente, pois também preciso desse amor;  
A alegrar a quem precisa;  
A pedir perdão;  
A sonhar acordado;  
A acordar para a realidade (sempre que fosse necessário);  
A aproveitar cada instante de felicidade;  
A chorar de saudade sem vergonha de demonstrar;  
Me ensinou a ter olhos para "ver e ouvir estrelas",  
embora nem sempre consiga entendê-las;  
A ver o encanto do pôr-do-sol;  
A sentir a dor do adeus e do que se acaba, sempre lutando para preservar tudo o que é importante para a felicidade do meu ser;  
A abrir minhas janelas para o amor;  
A não temer o futuro;  
Me ensinou e está me ensinando a aproveitar o presente,  
como um presente que da vida recebi, e usá-lo como um diamante que eu mesmo tenha que lapidar, lhe dando forma da maneira que eu escolher.

*Charles Chaplin*

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Classificação geral dos fungos.....	24
<b>Tabela 2:</b> Divisão dos fungos e seus filos.....	25
<b>Tabela 3:</b> Microrganismos que degradam a lignina da madeira.....	31
<b>Tabela 4:</b> Taxa e percentual de produção de biomassa por <i>L. crinitus</i> após vinte dias de crescimento em diferentes meios de cultura. ....	62
<b>Tabela 5:</b> Taxa de produção de biomassa por <i>L. crinitus</i> em diferentes períodos de crescimento. ....	63
<b>Tabela 6:</b> Parâmetros descritivos da massa micelial dos fungos testados no período de 20 dias.....	65
<b>Tabela 7:</b> Análise de variância do crescimento micelial em diferentes meios de cultura. ....	65
<b>Tabela 8:</b> Análise de Tukey do crescimento micelial em diferentes meios de cultura..	66
<b>Tabela 9:</b> Produção média de biomassa produzida por <i>L. crinitus</i> durante vinte dias de crescimento em meio de cultura suplementado com produto regional.....	67
<b>Tabela 10:</b> Taxa de produção de biomassa por <i>L. crinitus</i> em diferentes períodos de crescimento.....	69
<b>Tabela 11:</b> Análise de variância do crescimento micelial em diferentes meios de cultura sob condição estacionária. ....	70
<b>Tabela 12:</b> Análise de Tukey do crescimento micelial em diferentes meios de cultura sob condição estacionária. ....	70
<b>Tabela 13:</b> Média da atividade de lacase de <i>L. crinitus</i> em meio de cultura líquido sob condição de agitação no período de vinte dias de crescimento.....	74
<b>Tabela 14:</b> Parâmetro descritivo da atividade enzimática do fungo <i>L. crinitus</i> testado em meios de cultura líquida sob condição de agitação.....	77
<b>Tabela 15:</b> Análise de variância da lacase sob condição de agitação em diferentes meios de cultura.....	77
<b>Tabela 16:</b> Média da atividade de lacase de <i>L. crinitus</i> em meio de cultura líquido sob condição estacionária no período de vinte dias de crescimento micelial.....	79
<b>Tabela 17:</b> Análise de variância do crescimento micelial em diferentes meios de cultura sob condição estacionária.....	82
<b>Tabela 18:</b> Análise de Tukey do crescimento micelial em diferentes meios de cultura sob condição estacionária.....	83
<b>Tabela 19:</b> Média da atividade do álcool veratrílico de <i>L. crinitus</i> em meio de cultura líquido sob condição de agitação no período de vinte dias de atividade enzimática.....	87
<b>Tabela 20:</b> Média da atividade de lacase de <i>L. crinitus</i> em meio de cultura líquido, sob condição estacionária com e sem indutor, no período de vinte dias de crescimento.....	93
<b>Tabela 21:</b> Média aritmética do raio do halo de inibição fúngica sobre <i>E. coli</i> .....	100
<b>Tabela 22:</b> Parâmetros descritivos da atividade antimicrobiana do fungo <i>L. crinitus</i> no meio acrescido de pupunha para o período de 20 dias <i>versus E. coli</i> .....	101
<b>Tabela 23:</b> Análise de Tukey da atividade antimicrobiana do fungo <i>L. crinitus</i> no meio acrescido de pupunha para o período de 20 dias <i>versus E. coli</i> .....	101
<b>Tabela 24:</b> Parâmetros descritivos da atividade antimicrobiana do fungo <i>L. crinitus</i> no meio acrescido de pupunha para o período de 20 dias <i>versus E. coli</i> .....	101
<b>Tabela 25:</b> Média aritmética do raio do halo de inibição fúngica sobre <i>S. aureus</i> .....	102
<b>Tabela 26:</b> Análise de variância da atividade antimicrobiana do fungo <i>L. crinitus</i> no meio acrescido de pupunha para o período de 20 dias <i>versus S. aureus</i> .....	103
<b>Tabela 27:</b> Parâmetros descritivos da atividade antimicrobiana do fungo <i>L. crinitus</i> no meio acrescido de pupunha para o período de 20 dias <i>versus S. aureus</i> .....	103

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Principais malefícios causados pelos fungos.....	26
<b>Figura 2:</b> Principais benefícios proporcionados pelos fungos.....	27
<b>Figura 3:</b> Basidiocarpo de <i>Lentinus crinitus</i> .....	37
<b>Figura 4:</b> Mecanismo de ação da lacase.....	39
<b>Figura 5:</b> Corpo de frutificação do fungo <i>Lentinus crinitus</i> .....	50
<b>Figura 6:</b> Isolamento do fungo <i>Lentinus crinitus</i> .....	51
<b>Figura 7:</b> Cultura pura - fungo <i>Lentinus crinitus</i> .....	52
<b>Figura 8:</b> Determinação da massa micelial do fungo amazônico <i>Lentinus crinitus</i> .....	54
<b>Figura 9:</b> Esquema da biomassa fúngica.....	54
<b>Figura 10:</b> Esquema da atividade enzimática - Lacase.....	56
<b>Figura 11:</b> Esquema da atividade enzimática - Álcool Veratrílico (AV).....	56
<b>Figura 12:</b> Corpo de frutificação do fungo <i>Lentinus crinitus</i> .....	57
<b>Figura 13:</b> Obtenção do extrato (alcoólico e aquoso) do fungo <i>Lentinus crinitus</i> .....	58
<b>Figura 14:</b> Padrão de produção de biomassa por <i>L. crinitus</i> em diferentes períodos de crescimento e meio de cultura.....	63
<b>Figura 15:</b> Percentual de diferença entre o meio suplementado com pupunha e os demais meios testados no 10° dia de crescimento.....	64
<b>Figura 16:</b> Percentual de diferença entre o meio suplementado com pupunha e os demais meios testados no 20° dia de crescimento.....	64
<b>Figura 17:</b> Variabilidade da produção de biomassa micelial no período de experimento.....	68
<b>Figura 18:</b> Produção de biomassa micelial no 20° dia de inoculação em comparação com o 15° dia sob condição estacionária.....	68
<b>Figura 19:</b> Diferença entre os meios no período entre 15° e 20° dia sob condição de estacionária.....	69
<b>Figura 20:</b> Comparação da produção de biomassa micelial sob condições de agitação e estacionária no meio de açaí.....	71
<b>Figura 21:</b> Comparação da produção de biomassa micelial sob condições de agitação e estacionária no meio de cará.....	72
<b>Figura 22:</b> Comparação da produção de biomassa micelial sob condições de agitação e estacionária no meio da macaxeira.....	72
<b>Figura 23:</b> Comparação da produção de biomassa micelial sob condições de agitação e estacionária no meio da pupunha.....	73
<b>Figura 24:</b> Atividade de lacase em diferentes meios de cultura e períodos de crescimento sob condição de agitação.....	75
<b>Figura 25:</b> Atividade da lacase do meio açaí sob condição de agitação.....	75
<b>Figura 26:</b> Atividade da lacase do meio cará sob condição de agitação.....	76
<b>Figura 27:</b> Atividade da lacase do meio macaxeira sob condição de agitação.....	76
<b>Figura 28:</b> Atividade da lacase do meio de pupunha sob condição de agitação.....	77
<b>Figura 29:</b> Atividade de lacase em diferentes meios de cultura e período de crescimento sob condição estacionária.....	80
<b>Figura 30:</b> Análise enzimática lacase - meio de açaí sob condição estacionária.....	80
<b>Figura 31:</b> Análise enzimática lacase - meio de cará sob condição estacionária.....	81
<b>Figura 32:</b> Análise enzimática lacase - meio de macaxeira sob condição estacionária.....	81
<b>Figura 33:</b> Análise enzimática lacase - meio de pupunha sob condição estacionária.....	82
<b>Figura 34:</b> Produção enzimática da lacase: condição agitação <i>versus</i> estacionária – Açaí.....	84
<b>Figura 35:</b> Produção enzimática da lacase: condição agitação <i>versus</i> estacionária – Macaxeira.....	85

<b>Figura 36:</b> Produção enzimática da lacase: condição agitação <i>versus</i> estacionária – Pupunha.....	85
<b>Figura 37:</b> Produção enzimática da lacase: condição agitação <i>versus</i> estacionária – Cará.....	86
<b>Figura 38:</b> Atividade enzimática do AV de quatro meios nutricionais sob condição de agitação.....	88
<b>Figura 39:</b> Atividade de lacase no meio de pupunha na presença e sem AV.....	89
<b>Figura 40:</b> Atividade de lacase no meio de açaí na presença e sem AV.....	90
<b>Figura 41:</b> Atividade de lacase no meio de macaxeira na presença e sem AV.....	90
<b>Figura 42:</b> Atividade de lacase no meio de cará na presença e sem AV.....	91
<b>Figura 43:</b> Atividade enzimática do AV de quatro meios nutricionais sob condição estacionária.....	92
<b>Figura 44:</b> Atividade de lacase no meio de cará na presença e sem AV.....	94
<b>Figura 45:</b> Atividade de lacase no meio de açaí na presença e sem AV.....	94
<b>Figura 46:</b> Atividade de lacase no meio de pupunha na presença e sem AV.....	95
<b>Figura 47:</b> Atividade de lacase no meio de macaxeira na presença e sem AV.....	95
<b>Figura 48:</b> Atividade antimicrobiana do extrato aquoso e alcoólico de <i>L. crinitus</i> sobre a linhagem de <i>Escherichia coli</i> . <b>A:</b> Extrato aquoso (1%); <b>B:</b> Extrato aquoso (2%); <b>C:</b> Extrato alcoólico (1%) e <b>D:</b> Extrato alcoólico (2%).....	98
<b>Figura 49:</b> Atividade antimicrobiana do extrato aquoso e alcoólico de <i>L. crinitus</i> sobre a linhagem de <i>Staphylococcus aureus</i> . <b>A:</b> Extrato aquoso (1%); <b>B:</b> Extrato aquoso (2%); <b>C:</b> Extrato alcoólico (1%) e <b>D:</b> Extrato alcoólico (2%).....	99
<b>Figura 50:</b> Atividade antimicrobiana do metabólito do <i>Lentinus crinitus</i> suplementado com pupunha num período de 20 dias sobre a linhagem de <i>E. coli</i> <b>A:</b> Condição agitação e <b>B:</b> Condição estacionária.....	100
<b>Figura 51:</b> Atividade antimicrobiana do metabólito do <i>Lentinus crinitus</i> suplementado com pupunha num período de 20 dias sobre a linhagem de <i>S. aureus</i> . <b>A:</b> Condição agitação e <b>B:</b> Condição estacionária.....	103

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- **µm** – Micrômetro
- **AV** – Álcool Veratrílico
- **BDA** – Batata Dextrose Ágar
- **BDA** – Batata Dextrose Ágar
- **BOD** – Estufa Incubadora
- **C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O** – Álcool
- **cm** – Centímetro
- **CPqLMD/FIOCRUZ v** Instituto Leônidas e Maria Deane – Fundação Oswaldo Cruz
- **DMSO** – Dimetilsulfóxido
- **DNA** – Ácido Desoxirribonucléico
- **HCl** – Acido Clorídrico
- **HCN** – Ácido Cianídrico
- **INPA** – Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
- **Lac** – Lacase
- **LiP** – Lignina Peroxidase
- **MBT** – Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais
- **MH** – Miller Hinton
- **MM** – Massa Micelial
- **mm** – Milímetro
- **Mmol-1** – Mili Mol
- **MnP** – Mangânes Peroxidase
- **NaOH** – Hidróxido de Sódio
- **Pf** – Peso final
- **pH** – Potencial Hidrogeniônico
- **Pi** – Peso inicial
- **RNA** – Ácido Ribonucléico
- **rpm** – Rotação por minuto
- **UEA** – Universidade do Estado do Amazonas

**Avaliação do Potencial Microbiano de Crescimento e Secreção de Lacase do Fungo  
Amazônico *Lentinus crinitus* (L.ex Fr.) Fr**

NEPOMUCENA, Rafaelle M<sup>a</sup> Paz<sup>1, 2, 3</sup>  
CASTRO E SILVA, Ademir<sup>2, 3</sup>  
RIBEIRO, Helena Camarão Telles<sup>2, 3</sup>

- (1) Mestranda em Biotecnologia e Recursos Naturais - MBT.
- (2) Universidade do Estado do Amazonas – UEA.
- (3) Laboratório de Biorgânica e Proteômica – UEA.

**E-mail:** [rafaelle\\_paz@hotmail.com](mailto:rafaelle_paz@hotmail.com)

**RESUMO**

Este trabalho se propôs a estudar a influência de quatro meios nutricionais (açai, cará, macaxeira e pupunha) na produção de biomassa fúngica e secreção de lacase do fungo amazônico *Lentinus crinitus* e analisar seu potencial antimicrobiano frente a cepas bacterianas patogênicas. O *L. crinitus* apresentou maior produção de biomassa no meio suplementado com pupunha tanto sob condição estacionária como na de agitação. Quanto à atividade da enzima lignolítica lacase a máxima atividade foi obtida, no meio suplementado com cará (27,8 U.L<sup>-1</sup>) sob a condição de agitação. Já na condição estacionária o *L. crinitus*, no meio suplementado com macaxeira foi onde apresentou a maior atividade desta enzima (15,16 U.L<sup>-1</sup>). Na presença do indutor álcool veratrílico (AV) *L. crinitus* teve um aumento significativo na produção da lacase tanto na condição estacionária quanto na de agitação em todos os meios testados. No que concerne ao potencial bacteriano o extrato aquoso e alcoólico de carpóforos do *L. crinitus* não apresentaram nenhuma atividade biológica ou antimicrobiana contra as duas cepas *S. aureus* e *E. coli*. Já para os metabolitos fúngicos do *L. crinitus* verificou-se a atividade antimicrobiana contra as bactérias *S. aureus* e *E.coli*.

**Palavras – chave:** Fungo *L. crinitus*, Biomassa Fúngica, Lacase e Antimicrobiana.

**Evaluation of the Microbial Potential of the Growing and Secretion of Laccase of the Amazonic Fungus *Lentinus crinitus* (L.ex Fr.) Fr**

NEPOMUCENA, Rafaelle M<sup>a</sup> Paz<sup>1, 2, 3</sup>  
CASTRO E SILVA, Ademir<sup>2, 3</sup>  
RIBEIRO, Helena Camarão Telles<sup>2, 3</sup>

- (1) Mestranda em Biotecnologia e Recursos Naturais - MBT
- (2) Universidade do Estado do Amazonas – UEA.
- (3) Laboratório de Biorgânica e Proteômica – UEA.

**E-mail:** [rafaelle\\_paz@hotmail.com](mailto:rafaelle_paz@hotmail.com)

**ABSTRACT**

This work was proposed to study the influence of four nutritional culture medium (açai, cará, macaxeira and pupunha ) in the production of fungal biomass, laccase and secretion of the amazonic fungus *Lentinus crinitus* and to analyze the antimicrobial potential opposite bacterial strains pathogenic. *L. crinitus* presented greater production of biomass in medium supplemented with pupunha both under stationary and agitation conditions. About the activity of the ligninolytic enzyme laccase the maximum was obtained in the medium supplemented with cará (27,8 V.L-1) in the agitation condition. Already in stationary condition, the medium supplemented with macaxeira presented the highest activity of this enzyme (15.16 V.L-1). In the presence of inductor veratryl alcohol (VA) *L. crinitus* had a significant increase in the production of laccase both in stationary and agitation condition in all culture medium tested. Concerning the microbial potential, the waterish extract and alcoholic extract of *L. crinitus* body didn't present any bioassay or antimicrobial activity against the two strains *S. aureus* and *E. coli*. But the fungal metabolites of *L. crinitus* was verified the antimicrobial activity against the bacteria *S. aureus* and *E. coli*.

**Keyword :** Fungal *L. crinitus*, Fungal biomass, Laccase , Antimicrobial.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	i
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	iii
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b> .....	v
<b>RESUMO</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	22
<b>2.1. OBJETIVO GERAL</b> .....	22
<b>2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	22
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	23
3.1. Considerações Gerais dos Fungos.....	23
3.1.1. Ecologia dos Fungos na Recuperação Ambiental.....	25
3.1.2. Importância Biotecnológica dos Fungos.....	28
3.1.3. Fungos Deterioradores de Materiais Lignocelulósicos.....	29
3.1.4. Produtos Bioativos Sintetizados por Basidiomicetos Fúngicos.....	32
3.2. Biomassa Fúngica.....	33
3.2.1. Fungos Basidiomycetos e sua Aplicação na Biorremediação.....	34
3.3. Classe Basidiomycetes de Fungos.....	35
3.3.1. Fungos Basidiomicetos - Ordem Agaricales.....	36
3.3.2. Fungos Basidiomicetos - Família Tricholomataceae.....	37
3.4. <i>Lentinus crinitus</i> .....	37
3.4.1. Posição Taxonômica.....	37
3.4.2. Características Morfológicas - <i>Lentinus crinitus</i> .....	37
3.4.3. Ocorrência Natural, Habitat e Considerações sobre a sua Utilização.....	38
3.4.4. Propriedades Terapêuticas - <i>Lentinus crinitus</i> .....	38
3.5. Enzima.....	38
3.5.1. Enzima Fúngica.....	38
3.5.2. Lacase (E.C. 1.10.3.2) .....	39
3.5.3. Lacase Fúngica.....	39
3.5.4. Aplicações Biotecnológicas das Lacases.....	40
3.6. Indutor da Lacase.....	41
3.6.1. Álcool Veratrílico (AV) .....	41
3.7. Bactérias.....	42
3.7.1. Bactérias Gram-Positivas - <i>Staphylococcus aureus</i> .....	42
3.7.2. Bactérias Gram-Negativas - <i>Escherichia coli</i> .....	43
3.7.3. Compostos Antimicrobianos.....	44
3.7.3.1. Produtos Sintetizados por Microrganismos.....	44
3.8. Meios de Cultura.....	45
3.8.1. Fontes de Nutrientes Regionais da Amazônia.....	46
3.8.1.1. Açáí - <i>Euterpe oleracea</i> .....	46
3.8.1.2. Cará - <i>Dioscorea alata</i> .....	47
3.8.1.3. Macaxeira - <i>Manihot esculenta</i> .....	48
3.8.1.4. Pupunha - <i>Bactris gasipaes</i> .....	49
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	50
4.1. PRODUÇÃO DE BIOMASSA FÚNGICA.....	50
4.1.1. Fungo <i>Lentinus crinitus</i> .....	50
4.1.1.1. Obtenção do Material Biológico.....	50
4.1.1.2. Isolamento e Repicagem do Fungo.....	51
4.2. Meios de Cultura para Obtenção de Biomassa.....	52

4.3. Padronização do Cultivo em Meio Líquido.....	53
4.3.1. Meios de Cultura Líquida.....	53
4.3.1.1. Preparo do Inóculo.....	53
4.4. Determinação da Biomassa Micelial.....	53
4.5. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LACASE.....	55
4.6. INFLUÊNCIA DO INDUTOR NA PRODUÇÃO DE LACASE.....	56
4.7. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	57
4.7.1. Fungo <i>Lentinus crinitus</i> .....	57
4.7.1.1. Obtenção do Material Biotecnológico.....	57
4.7.1.2. Isolamento e Repicagem do Fungo.....	57
4.8. Obtenção dos Extratos – Carpóforo do Fungo <i>Lentinus crinitus</i> .....	58
4.9. Material Microbiológico.....	59
4.9.1. Manutenção dos Microrganismos.....	59
4.10. Preparo dos Inóculos.....	59
4.10.1. Bactérias – Reativação e Manutenção dos Microrganismos Testes.....	59
4.11. Obtenção dos Metabólitos Fúngicos – Meio Líquido.....	60
4.12. Teste do Potencial Antimicrobiano.....	60
4.12.1. Extrato Carpóforo e Metabólitos Secundários.....	60
4.13. Análise Estatística.....	61
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>62</b>
5.1. Produção de Biomassa sob Condição de Agitação.....	62
5.2. Biomassa Micelial sob Condição Estacionária.....	67
5.3. Produção de Biomassa Micelial: Condição Estacionária <i>versus</i> Agitação.....	71
5.4. Atividade Enzimática de Lacase sob Condição Agitação.....	74
5.5. Atividade Enzimática de Lacase sob Condição Estacionária.....	79
5.6. Produção Enzimática da Lacase: Condição Agitação <i>versus</i> Estacionária.....	84
5.7. Ação do Álcool Veratrílico (AV) como Indutor da Lacase: Condição Agitação .....	87
5.7.1. Atividade de Lacase com e sem Álcool Veratrílico (AV): Condição de Agitação. ....	89
5.8. Ação do Álcool Veratrílico (AV) como Indutor de Lacase: Condição Estacionária.....	92
5.8.1. Estacionária <i>versus</i> Agitação na Presença do Indutor Álcool Veratrílico (AV) .....	97
5.9. Atividade Antimicrobiana.....	98
5.9.1. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos do Carpóforo fúngico sobre <i>Escherichia coli</i> .....	98
5.9.2. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos do Carpóforo fúngico sobre <i>Staphylococcus aureus</i> .....	99
5.9.3. Avaliação da atividade antimicrobiana dos metabólitos fúngico sobre <i>Escherichia coli</i> .....	100
5.9.4. Avaliação da atividade antimicrobiana dos metabólitos fúngico sobre <i>Staphylococcus aureus</i> .....	102
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>105</b>
6.1. Efeito de diferentes Meios de Cultura na Produção de Biomassa do Fungo <i>Lentinus crinitus</i> , sob Condição Estacionária e Agitação.....	105
6.2. Atividade da Lacase do <i>Lentinus crinitus</i> em Diferentes Meios de Cultura sob Condição Estacionária e Agitação.....	109
6.3. Efeito do Indutor na Atividade da Lacase do <i>Lentinus crinitus</i> .....	111
6.4. Atividade Antimicrobiana do Extrato e Metabólito do Fungo <i>Lentinus crinitus</i> em Amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> .....	113
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>115</b>

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	116
<b>ANEXOS</b> .....	129

## INTRODUÇÃO

A Amazônia é o maior repositório de biodiversidade do mundo. O Brasil detém cerca de 20% desta biodiversidade mundial, principalmente, na floresta Amazônica, a maior do planeta e fonte inestimável de matérias-primas nos mais variados setores. Segundo Petrini, (1991) existem mais de 10 milhões de espécies vivas em toda a floresta, mas o número real é incalculável. Estudos mais recentes mostram que somente 1,7% da biodiversidade global já foram catalogadas, fato que torna necessário o desenvolvimento de novas pesquisas a fim de promover o desenvolvimento sustentável. Apesar da imensa diversidade biológica amazônica, as espécies que a compõem e suas relações filogenéticas são pouco conhecidas, muito menos seus microrganismos e suas interações com outros seres.

O potencial biotecnológico de microrganismos, especialmente aqueles da biodiversidade amazônica, tem despertado grande interesse de pesquisadores de todo o mundo em função do seu potencial industrial. O avanço dos estudos na área da biotecnologia tem contribuído para esse interesse e vêm contribuindo com produtos e processos de importância industrial.

Dentre os mais diversos microrganismos, encontram-se os fungos que desde a antigüidade são utilizados como alimentos, devido ao sabor agradável e às propriedades nutricionais e medicinais sendo importantes agentes em diversos processos industriais, como produção de enzimas, vitaminas, antibióticos, polissacarídeos, pigmentos, lipídeos e glicolipídeos (Borchers et al., 1999; Brenne, 1990; Brizuela et al., 1998; Carvalho et al., 2005; Chang & Buswell, 1996; Souza et al., 2008). É comprovado que estes organismos produzem um elevado número de metabólitos com atividades antitumoral, antiviral, antiinflamatória, antitrombótica, citostática, hipoglicêmica e antimicrobiana (Marinho et al., 2005; Ramos et al., 2009).

Os fungos vêm sendo explorados na medicina e em outros processos biotecnológicos envolvidos na produção de enzimas. Os fungos têm grande importância também no setor agrícola e ecológico, decompondo restos vegetais, degradando substâncias tóxicas e na simbiose com as plantas. Devido a esta grande versatilidade, os fungos vêm sendo estudados, recentemente principalmente quanto à sua aplicabilidade biotecnológica (Azevedo et al., 2009; Esposito & Azevedo, 2004).

Dentre os vários potenciais biotecnológicos, os fungos possuem um metabolismo dinâmico e rápido, sendo que são grandes produtores de metabólitos secundários e altamente eficientes, na degradação de uma gama de substratos, podendo apresentar-se de várias formas. Como biodegradador natural os fungos encontram as substâncias necessárias para o seu desenvolvimento na natureza e devido a esta capacidade são utilizados em um vasto aspecto industrial como na indústria de cosméticos, têxtil, alimentícia e na bioextração de metais do meio ambiente (Boominathan e Reddy, 1994).

A biodegradação dos materiais lignocelulósicos dos fungos é atribuída à ação de uma série de enzimas, uma vez que os componentes dos lignocelulósicos devem ser inicialmente despolimerizados até compostos menores de modo a serem absorvidos pela parede celular (Ferraz, 2004).

Há uma forte tendência em se explorar comercialmente a biomassa fúngica para isolamento de seus componentes celulares e conseqüentemente de seus principais constituintes, tais como enzimas (invertases, glucosidases), nucleotídeos, proteínas (manoproteínas) e principalmente polissacarídeos (glucanas, mananas, galactanas), além de lipídeos, como fosfolipídeos e ergosterol, pois estas substâncias apresentam propriedades específicas de interesse biotecnológico e, conseqüentemente, de grande valor agregado (Belem & Lee, 1998; Berovic et al., 2003; Cameron et al., 1988; Kollár et al., 1992; Pavlova et al., 2005).

Recentemente, a biomassa fúngica tem recebido considerável atenção devido à sua grande capacidade de fixação de metais, podendo ser usada em processos de tratamento de efluentes que podem superar as resinas de troca iônica na qual a remoção de metais pesados por diferentes tipos de biomassa vem suscitando um crescente interesse por parte dos pesquisadores. Ressalta-se, que a produção de biomassa micelial pode estar estreitamente relacionada com os requisitos nutricionais de cada fungo. Neste sentido, é necessário verificar quais meios de crescimento que poderiam contribuir para a maximização da produção da biomassa micelial.

A capacidade de remoção dos metais, assim como os mecanismos de acumulação, podem variar amplamente de acordo com a espécie microbiana, ou até mesmo com a linhagem. Células, produtos excretados, parede celular e polissacarídeos têm potencial para remover metais de solução. Fatores externos como pH, temperatura, ausência ou presença de

nutrientes e outros metais também influenciam no mecanismo atuante e, conseqüentemente, na eficiência e seletividade de acumulação (Cotoras et al., 1992; Crist, 1988; Faison & Kirk, 1990; Kuhn & Pfister, 1990; Nakajima & Sakaguchi, 1986).

O estudo das enzimas fúngicas tem imensa importância prática visto que, em algumas doenças, especialmente nas desordens genéticas herdadas, pode ocorrer, nos tecidos a deficiência ou mesmo a ausência total, de uma ou mais enzimas. Condições anormais também podem ser causadas pelo excesso de atividade de certas enzimas no plasma sanguíneo, eritrócitos ou amostras de tecido que são importantes no diagnóstico de várias doenças (Lehninger, 1995).

As enzimas são os produtos mais explorados na indústria biotecnológica, pois apresentam uma série de vantagens no processamento de alimentos, o que propicia a obtenção de produtos de melhor qualidade e com menor probabilidade de poluição do meio ambiente.

Muitos fungos produzem enzimas extracelulares de importância na degradação e transporte de nutrientes para a célula e no processo de patogênese (Bateman & Basham, 1976), podendo a produção de enzimas extracelulares ser indicativa da característica patogênica desses fungos. Como uma forma de estabelecer o papel funcional dos fungos endofíticos se faz necessário, dentre outros fatores, a detecção de enzimas extracelulares (Carroll & Petrini, 1983).

O mercado mundial de enzimas movimenta milhões de dólares anualmente. Esse mercado é estimado em cerca de US\$ 1,5 bilhões de dólares, com um aumento anual de 12% no volume de enzimas produzidas nos últimos 10 anos (Castro e Silva et al., 2002). Apesar do seu papel nos ecossistemas e suas aplicações na biotecnologia, o conhecimento sobre os fungos amazônicos degradadores de madeira ainda permanece num nível incipiente, sendo que poucos dados na área sobre enzimas com o potencial industrial são disponíveis. A Região Amazônica, apesar de sua grande biodiversidade microbiana, até o presente momento não apresenta nenhuma participação nesse mercado.

Conforme pudemos observar na colocação anterior o potencial enzimático de microrganismos, principalmente fúngico, é grande e de alcance mundial e a Amazônia poderá aumentar sua participação nesse mercado promissor. Não resta dúvida que a nossa biodiversidade micológica é ainda um tanto desconhecida na sua totalidade, e também tem

potencial para inserir a Amazônia no contexto mundial de produção de enzimas para diversas aplicações industriais.

Em face às razões expostas, associado ao fato do *Lentinus crinitus* ser um fungo de desenvolvimento lento surge o interesse no uso da lacase que tem grande potencial na remediação de efluentes originários de vários processos de manufatura de indústrias alimentícias e de papel e celulose. A importância das enzimas estarem imobilizadas consiste na estabilidade térmica, evita inibição enzimática e possibilita a separação e reutilização das enzimas no final da reação.

Lacases são enzimas com um grande interesse industrial. Dentre as várias aplicações da lacase podemos destacar: a descoloração de corantes têxteis, descoloração de polpa em indústrias de papéis e celulose (como clareador, potencial substituto do cloro, que é ambientalmente nocivo devido à geração de compostos clorados altamente tóxicos), síntese de polímeros, biossensores amperométricos para a detecção de fenol e também no processamento de alimentos e bebidas (Gianfreda et al., 1999; Mayer & Staples, 2002; Maciel et al., 2010).

Diante do exposto, urge a necessidade de estudos referentes à atividade das enzimas lignocelulolíticas, em linhagens do fungo amazônico *Lentinus crinitus*, relacionadas a espécies nutricionais da região, no qual se constitui uma importante linha de pesquisa, não somente para compreender a atividade enzimática e ação antimicrobiana sob determinadas condições de modo a gerar resultados para pesquisas biotecnológicas futuras de modo a contribuir para o conhecimento da diversidade amazônica.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL:

- Avaliar a influência do meio nutricional na produção de biomassa fúngica e secreção de lacase do fungo amazônico *Lentinus crinitus* e analisar seu potencial antimicrobiano frente a microrganismos patogênicos.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Testar o efeito de quatro diferentes meios de cultura da Região Amazônica (Açaí, Cará, Macaxeira e Pupunha) na produção de biomassa do fungo amazônico *Lentinus crinitus* sob condição de agitação e estacionária.

- Analisar a influência dos meios de cultura da Região Amazônica (Açaí, Cará, Macaxeira e Pupunha) nas condições de crescimento agitação e estacionária na produção de lacase do fungo *Lentinus crinitus*.

- Verificar a correlação entre a produção de biomassa micelial e a atividade enzimática nos quatro meios nutricionais da Região Amazônica (Açaí, Cará, Macaxeira e Pupunha).

- Identificar a influência de um indutor na produção de lacase nos quatro meios nutricionais da Região Amazônica (Açaí, Cará, Macaxeira e Pupunha).

- Determinar a atividade antimicrobiana de *L. crinitus* frente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

- Identificar a ação antimicrobiana do metabólito obtido do meio de maior massa micelial sob condição de agitação e estacionária frente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. Considerações Gerais dos Fungos**

Os fungos são seres eucariontes, heterotróficos, aclorofilados, aeróbios, unicelulares ou pluricelulares, com parede celular composta geralmente de quitina ou celulose, além de outros carboidratos complexos, com glicogênio como substância de reserva. A nutrição ocorre de modo geral por absorção, podendo viver como saprófitos, parasitas ou simbioses com outros organismos (Lacaz, 2002; Putzke & Putzke, 2004).

Os fungos constituem o grupo mais diverso de eucariontes em ambiente terrestre, devido à sua ampla distribuição e associação com substratos inorgânicos e orgânicos (Gwein, 2002; Holf et al., 2004). Constituem um grupo muito grande e heterogêneo encontrado em qualquer nicho ecológico. O número de espécies fúngicas espalhadas pelo mundo é estimada em cerca de 1 milhão e 500 mil sendo, que destas apenas foram descritas cerca de 74 mil espécies (Esposito & Azevedo, 2004; Hawksworth, 1991).

Os fungos são organismos com grande variação morfológica, existindo espécies macro e microscópicas que contribuem para existência de muitos sistemas de classificação que ainda hoje sofrem adições e alterações (Putzke & Putzke, 2004).

Em relação ao seu habitat natural, os fungos apresentam-se como cosmopolita, ou seja, encontram-se distribuídos em todas as regiões do planeta, porém de maior incidência em ambientes de clima tropical, quente e úmido. Podem ser encontradas no solo, águas, sobre animais e vegetais, em alimentos naturais e industrializados (Bononi, 1999; Teixeira et al., 2001).

Os fungos são geralmente considerados como uma classe de organismos altamente especializados. Estes organismos, igualmente aos animais, não são capazes de sintetizar açúcar e amido a partir de dióxido de carbono presente na atmosfera, conseqüentemente, devem buscar matérias orgânicos para alimentar-se. Praticamente, qualquer material orgânico obtido de plantas ou animais pode sustentar espécies de fungos (Findlay, 1967).

Na sua grande maioria dos fungos são filamentosos e multicelulares. Possuem o corpo formado por um emaranhado de filamentos, denominados hifas, e seu conjunto recebe o nome

de micélio. As hifas variam no diâmetro, espessura da parede, localização do pigmento, etc. O crescimento é em geral apical, mas normalmente qualquer fragmento hifálico pode dar origem à outra formação micelial quando destacado e colocado em meio apropriado. As estruturas reprodutivas são diferenciadas dos vegetais, o que constitui a base sistemática dos fungos (Putzke & Putzke, 2004).

A Classificação dos fungos está baseada nas diversas formas de corpos frutíferos, que geralmente se desenvolvem na superfície externa do substrato de onde o fungo cresce. O reino fungi está dividido em cinco filós que estão representados na **Tabela 1 e 2**.

**Tabela 1:** Classificação geral dos fungos.

<b>Alexopoulos et al., ( 1996)</b>	<b>Hawkworth et al., (1995)</b>	<b>Hawkworth et al., (1983)</b>
<b>Reino Stramenopilia</b>	<b>Reino Chromista</b>	
Filo Oomycota	Filo Hyphochytridimycota	
Filo Hyphochytridiomycota	Filo Labyrinthulomycota	<b>Reino Fungi</b>
Filo Labyrinthulomycota	Filo Oomicota	Divisão Myxomycota
		Divisão Eumycota
<b>Reino Protistas</b>	<b>Reino Protozoa</b>	
Filo Dictosteliomycota	Filo Acrasiomycota	
Filo Acrasiomycota	Filo Myxomycota	<b>Subdivisões:</b>
Filo Plasmodiophoromycota	Filo Plasmodiophoromycota	Mastigomycotina
		Zygomycotina
<b>Reino Fungi</b>	<b>Reino Fungi</b>	Ascomycotina
Filo Chytridiomycota	Filo Chytridiomycota	Basidiomycotina
Filo Zygomycota	Filo Zygomycota	Deuteromycotina
Filo Ascomycota	Filo Ascomycota	
Filo Basidiomycota	Filo Basidiomycota	

**Fonte:** Modificado de Putzke (2004).

**Tabela 2:** Divisão dos fungos e seus filos.

<b>Tipos de Fungos</b>	<b>Filos</b>
Fungos Terrestres	Oomycota
Fungos Aquáticos	Zygomycota
Bolores verdes, amarelos e vermelhos	Ascomycota
Cogumelos, ferrugens	Basidiomycota
Fungo <i>Penicilium</i>	Deuteromycota

**Fonte:** Modificado de Findlay, 1967.

De acordo com a nutrição os fungos são classificados em duas categorias: saprófitos e parasitas. Os saprófitos se alimentam de matéria orgânica animal ou vegetal morta e os parasitas vivem dentro ou sobre organismos vivos, deles retiram os seus alimentos, secretando enzimas digestivas no substrato. Essas enzimas catalisam a quebra de moléculas grandes em moléculas suficientemente menores para serem absorvidas pela célula fúngica. Por essa razão, os fungos crescem dentro ou sobre os alimentos (Raven, 2001).

Muitos fungos já eram empregados desde a mais longínqua antiguidade, quando o homem descobriu a metodologia e técnica de preparo do pão, do queijo e das bebidas. Durante centenas de anos, várias tribos aprenderam com a natureza que determinadas espécies de fungos eram comestíveis, e de excelente valor nutricional (Putzke & Putzke, 2004).

### **3.1.1. Ecologia dos Fungos na Recuperação Ambiental**

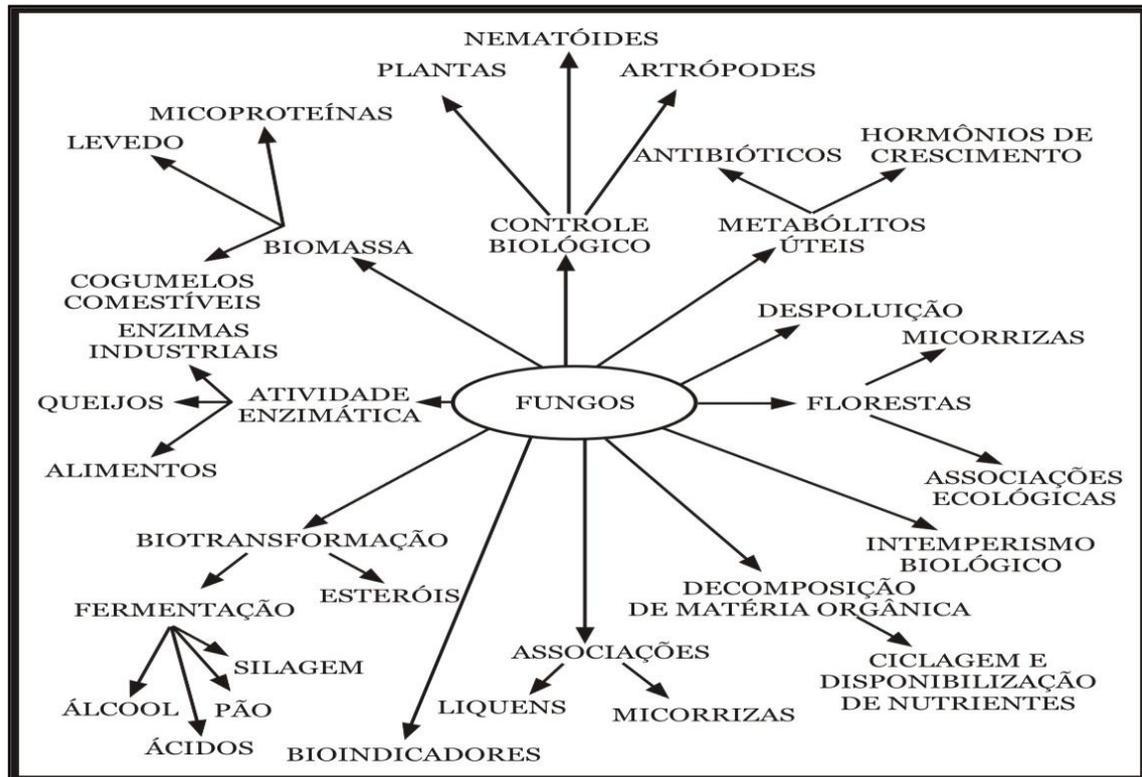
Na cadeia alimentar, os fungos ocupam a posição de decompositores, tendo, portanto, um papel muito importante na manutenção do equilíbrio ambiental. A diversidade fúngica é muito ampla sendo que existem algumas espécies que podem causar doenças aos seres vivos, bem como a deteriorização de vários tipos de materiais causando prejuízos econômicos, no entanto, a maioria das espécies é benéfica para diversas áreas (Songulashvili et al., 2007).

Como organismos saprófitos, decompõem resíduos complexos de plantas e de animais, transformando-os em formas químicas mais simples, que retornam ao solo. Tais substâncias são, então, absorvidas pelas gerações vegetais subseqüentes, deste modo a atividade fúngica é amplamente responsável pela fertilidade do solo (Pointing, 2001). Apesar da utilização milenar dos fungos nos mais diversos ramos ainda é comum serem associados a efeitos prejudiciais (**Figura 1 e 2**).



**Figura 1:** Principais malefícios causados pelos fungos.

Os fungos são os agentes mais importantes de degradação na Terra. A produção de biomassa em um ecossistema florestal é, em grande parte controlada por fungos degradadores de madeira, esses seres determinam as taxas de nutrientes liberados e seu retorno ao ecossistema após a morte das árvores (Cho et al., 2009; Pointing, 2001).



**Figura 2:** Principais benefícios proporcionados pelos fungos.

Um dos grandes problemas que o mundo industrializado vem enfrentando nos dias atuais são a contaminação de solos, lençóis freáticos e sedimentos por compostos orgânicos tóxicos, sendo assim esses poluentes são potenciais ameaça à saúde pública e ao ambiente.

A biorremediação está se tornando muito pesquisada e testada principalmente no caso de poluição por hidrocarbonetos. Os sistemas mais utilizados atualmente para biorremediação são os 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 do solo e da água tem sido um grande desafio. Devido à preocupação ambiental, vem aumentando o interesse por métodos alternativos, tais como emprego dos fungos que apresentam um grande potencial para a biorremediação de áreas contaminadas por metais pesados (Kotrba & Ruml, 2000).

Os Macrofungos são fungos filamentosos com capacidade de produzir corpos de frutificação (Chang et al., 1993) que apresentam um grande potencial na remediação de solos contaminados por metais pesados devido principalmente a sua característica micelial, além do

fato de suportarem a toxidez causada por esses compostos. Os fungos filamentosos têm a capacidade de acumular metais pesados e de translocá-los por meio do micélio. Essa concentração, no caso de basidiomicetos, ocorre nos basidiocarpos. Dessa forma, esses fungos introduzidos em solos contaminados por metais, absorveriam esses metais e, por meio de translocação, os concentrariam nos basidiocarpos, que eventualmente, seriam colhidos e os metais, extraídos e reutilizados, ou ainda, eliminados de maneira apropriada (Anastasi et al., 2009; Gray, 1998; Wen et al., 2009).

### **3.1.2. Importância Biotecnológica dos Fungos**

Os fungos são os principais decompositores de materiais lignocelulósicos da biosfera. Vários fungos estão associados a degradar dejetos de detritos de esgotos até um grau em que possam ser considerado adubo ou substância equivalente. Ecologicamente podem ser considerados os lixeiros do mundo, por degradarem todo tipo de restos orgânicos, independentes da origem, transformando-os em elementos assimiláveis pelas plantas (Neufeld, 1997; Putzke & Putzke, 2002, 2004).

Fungos como *Trametes villosa* e *Trametes versicolor*, tem sido utilizados na degradação de substratos de relevância ambiental como lignina, fenol, clorados, pesticidas, corantes entre outros. Assim, enzima como lacase, lignina e manganês peroxidase tem sido utilizadas na degradação (Peralta-Zamora et al., 2003; Xiao et al., 2003).

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 (Dittmann et al., 2002).

Várias espécies de fungos são usadas em diversos tipos de indústrias, cogumelos como das espécies *Agaricus campestris*, *Morchella hortensis*, *Clavaria fava*, *Pleurotis sp*, *Boletus sp*, são os mais utilizados como alimentos. Dentre as leveduras de maior importância industrial destacam-se as linhagens fermentativas de *Saccharomyces*, empregadas na indústria de panificação, e bebidas alcoólicas: Cerveja (*Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces carlsbergensis*) (Neufeld, 1997).

A produção de moléculas com atividade farmacológica é uma das mais exploradas em Biotecnologia, por empresas de países industrializados. Os antibióticos são os produtos microbianos tradicionalmente mais explorados nesta área, contudo novos compostos têm sido investigados em escala de screening, farmacológico industrial, como agentes antitumorais e anti-câncer, inibidores enzimáticos e agentes cardiovasculares (Esposito & Azevedo, 2004; Maciel et al., 2010).

A aplicação de microrganismos na produção de fármacos teve um desenvolvimento acelerado a partir da descoberta dos antibióticos, na década de 30. A produção de penicilina de *Penicillium notatum* ou o *Penicillium chrysogenum*, revolucionou toda a terapêutica antimicrobiana, possibilitando a descoberta de outras drogas desse tipo, algumas com especificidade para fungos, bactérias, protozoários, etc. (Lacaz, 2002).

A biotecnologia em geral, e as enzimas em particular, ganham um lugar importante na tecnologia da produção de celulose, branqueamento de polpas, na reciclagem de papel e, se utilizadas de maneira ágil e fundamental, muito deverão contribuir para a indústria papelreira em nosso país.

### **3.1.3. Fungos Deterioradores de Materiais Lignocelulósicos**

A madeira é um importante recurso renovável e é utilizada principalmente como material de construção e na fabricação de papel e celulose. A madeira e outros materiais lignocelulósicos são formados por três principais componentes: celulose, lignina e hemicelulose. A decomposição destes polímeros por fungos de decomposição da madeira exerce papel importante no ciclo global do carbono (Carvalho et al., 2009).

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, 2004; Castro e Silva, 1996; Oliveira et al., 1986).

Entre os organismos os fungos são capazes de atacar e degradar a madeira, em seus ecossistemas terrestres naturais e especialmente na classe dos Basidiomycetes que tem demonstrado grande eficiência no processo de biodegradação de materiais lignocelulósicos (Hatakka, 1994; Higuchi, 1990; Ruiz – Dueñas & Martinez, 2009; Soares, 1998). Esses

fungos podem ser saprófitas, parasitas, simbióticos e micorrízicos, sendo usados na indústria alimentícia, na produção de enzimas, na biopolpação, no biobranqueamento de efluentes, etc. (Almeida Filho et al., 1993; Maciel et al., 2010).

Existem três classes de fungos degradadores de madeira: causadores de podridão mole, podridão parda e podridão-branca no qual são particularmente úteis para biopolpação e biodegradação de compostos recalcitrantes. Há dois tipos de degradação realizada por tais fungos: a degradação simultânea de todos os polímeros da madeira, e a degradação seletiva da lignina. Na degradação simultânea, realizada pela maioria de fungos de decomposição branca, há erosão da parede celular no sentido lúmen e lamela média. Na degradação seletiva, há remoção de lignina e polissacarídeos não-celulósicos sem degradação extensiva de celulose e não há erosão da parede celular (Gonçalves et al., 2001).

Os basidiomicetos lignolíticos secretam enzimas que tem a capacidade de converter os polímeros externos em moléculas menores em que são assimiladas e utilizadas como nutrientes. A secreção de proteínas parece ocorrer durante o crescimento apical das hifas, sendo liberadas pela parede celular recém sintetizada (Wessels, 1994). Neste grupo estão bem caracterizados os fungos decompositores da madeira que podem ser classificados em grupos ecofisiológicos: causadores de podridão branca, de podridão parda e de podridão mole. **(Tabela 3).**

Os basidiomicetos lignolíticos atuam na decomposição da matéria orgânica, dinamizando a ciclagem de nutrientes e regulando o equilíbrio energético dos ecossistemas terrestres (Tuomela et al., 2000).

**Tabela 3:** Microrganismos que degradam a lignina da madeira.

MICROORGANISMOS	FILO	DEGRADAÇÃO	AMBIENTE	GÊNERO
Podridão branca	Basidiomycota (Ascomycota)	Mineralização da lignina, deslignificação seletiva ou não seletiva.	Principalmente madeira dura seletiva	<i>Phanerochaete</i> , <i>Phlebia</i> , <i>Trametes</i> .
Podridão Parda	Basidiomycota	Modificação da lignina	Principalmente madeira mole	<i>Poria</i> , <i>Polyporus</i>
Podridão Mole	Ascomycota ou fungos anamorfos	Limitada degradação da lignina	Ambientes aquáticos, madeira com umidade elevada, serapilheira	<i>Fusarium</i> , <i>Paecilomyces</i>
Bactérias	Actinomycetes ou Mixobactéria	Limitada degradação da lignina	Sapwood, madeira saturada de água, madeira em estagio avançado de decomposição serrapilheira	<i>Streptomyces</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Pseudomonas</i>

**Fonte:** (Tuomela et al., 2000).

Os fungos basidiomicetos causadores da podridão branca ou basidiomicetos lignolíticos, atacam a madeira folhosa ou madeira de conífera, enquanto os ascomicetos provavelmente degradam unicamente madeira folhosa. A degradação da lignina pelos basidiomicetos lignolíticos é mais rápida que quaisquer outros organismos e eles são

responsáveis pela maior parte da degradação da lignina na natureza. Entretanto, o substrato de crescimento não é unicamente lignina, mas também hemiceluloses e celulosas (Blanchette, 1995; Kirk & Farrell, 1987; Tuomela et al., 2000).

#### **3.1.4. Produtos Bioativos Sintetizados por Basidiomicetos Fúngicos**

Os basidiomicetos produzem uma ampla gama de produtos naturais, desde componentes estruturais com atividade antitumoral e imunologicamente ativos até agentes antimicrobianos, antifúngicos, antivirais, enzimas, reguladores de crescimento e aromas (Breene, 1990; Brizuela et al., 1998; Chang & Buswell, 1996; Kues & Suay et al., 2000; Maciel et al., 2010; Wasser & Weiss, 1999).

O polissacarídeo antitumoral produzidos por basidiomicetos tem recebido uma atenção crescente, destacando-se a obtenção de  $\beta$ -glucanas solúveis em água, isolados a partir de fungos comestíveis ou medicinais como *Glifola frondosa*, *Polyporus confluens*, *Lentinula edodes* e *Coriolus versicolor*, na qual o mesmo tem atraído o interesse das indústrias farmacêuticas e de pesquisas devido aos seus efeitos benéficos que incluem a estimulação do sistema imune com potencial anti-inflamatório, antimicrobiano, antitumoral (Brooks et al., 2004; Lewis & Ausubel, 2006; Monno et al., 2007).

Os basidiomicetos precisam sintetizar antibacterianos e antifúngicos para a sua própria sobrevivência no ambiente. Sendo assim, compostos com estas atividades passam a ser isoladas a partir destes organismos. Porém, somente compostos produzidos por fungos microscópicos atingiram o mercado (Lindequist et al., 2005).

Os principais metabólicos antimicrobianos isolados destes organismos pertencem às classes de poliacetilenos e terpenóides. O metabolismo dos basidiomicetos é rico em terpenóides, especialmente sesquiterpenóides que apresentam atividade antimicrobiana (Brizuela et al., 1998).

Outros tipos de compostos antimicrobianos, incluindo compostos fenólicos, aromáticos, purinas e pirimidinas têm sido descritos em Basidiomicetos, assim como fenóis, e derivados de quinonas isolados de *Agaricus bisporus* que demonstraram atividade antibacteriana (Brizuela et al., 1998; Kose et al., 2007, Rojas et al., 1992).

### 3.2. Biomassa Fúngica

Os fungos são microrganismos eucariontes que obtém sua energia pela ruptura de moléculas orgânicas, podendo ocupar diversos nichos ecológicos (Tortora et al., 2000). No ambiente terrestre, os fungos tem um papel importante nos ciclos biogeoquímicos do carbono, nitrogênio ou fósforo (Boswell et al., 2003). Como fitopatógenos, esses organismos possuem mecanismos de adesão ao hospedeiro, onde as moléculas de reconhecimento e união são, na maior parte dos casos, de natureza protéica ou glicoprotéica (Xiao et al., 1994) e por isso, a produção de proteínas e polissacarídeos extracelulares tem sido associados à capacidade dos microrganismos causar doenças (Doss, 1999; Gil-Ad et al., 2001; Leite et al., 2001).

Os fungos podem ser considerados como os agentes mais importantes de degradação da Terra, principalmente quando se estuda os ecossistemas florestais, onde esses microrganismos são os principais decompositores de celulose e lignina. A produção de biomassa em um ecossistema florestal é em grande parte controlada por fungos degradadores de madeira, que determinam as taxas dos nutrientes liberados e seu retorno ao ecossistema após a morte das arvores (Esposito & Azevedo, 2004).

Além de sua atuação nos ecossistemas, os fungos também apresentam um grande potencial de aplicação nas diferentes áreas industriais, como alimentos, cosméticos, medicamentos (Sutherland, 1998), assim como na área ambiental, na detoxificação de compostos em ambientes contaminados (Rezende et al., 2005). A utilização desses microrganismos pode ser através de sua biomassa ou então de macromoléculas isoladas.

A biomassa excedente da produção industrial de antibióticos por *Penicillium chrysogenum*, além de ser aproveitada para ração para gado e ou no preparo de fertilizantes (Muzzarelli et al., 2000), também vem se mostrando uma fonte viável de moléculas importantes, como os polissacarídeos do tipo glucanas (Wang et al., 2007), aplicados na área medicinal devido a suas atividades antitumorais e imunomoduladoras.

Durante um processo fermentativo para a produção de exopolissacarídeos (EPS), um grande percentual de biomassa também é obtido. Entretanto, as quantidades de massa micelial e EPS não são necessariamente proporcionais, sendo dependentes dos diferentes fatores utilizados no cultivo, tais como fontes de carbono e de nitrogênio, pH, temperatura, agitação, grau de aeração, entre outros. Estes parâmetros podem interferir tanto na produção

da biomassa quanto dos componentes isolados desse substrato. Segundo alguns autores (Barbosa et al., 2004; Magnelli, 2005; Selbmann et al., 2002) o resultado esperado no final do procedimento, se biomassa ou EPS, determinará como essas variáveis serão aplicadas no cultivo microbiano.

### **3.2.1. Fungos Basidiomycetos e sua Aplicação na Biorremediação**

Os fungos basidiomicetos lignocelulolíticos crescem sobre madeira em decomposição e resíduos de origem vegetal. Algumas espécies apresentam certo grau de especificidade e dependem da ocorrência de um substrato definido. Outras, menos exigentes, ocorrem sobre diversos substratos e possuem ampla distribuição geográfica. Possuem um sistema enzimático capaz de degradar madeira, celulose, hemicelulose e lignina, quebrando esses compostos até sua mineralização (Matheus & Okino, 1998; Pointing, 2001; Tortella et al., 2005; Tuomela et al., 2000).

Os nutrientes absorvidos pelos fungos são convertidos em constituintes celulares e energia. Os nutrientes orgânicos obtidos de carboidratos são oxidados pela respiração e pela fermentação, produzindo reservas energéticas e estruturas de parede celular. A energia química que é liberada nesses processos envolve a perda de elétrons de um composto para reduzir outro, o qual é denominado aceptor de elétrons. Na maioria dos fungos o aceptor final é o oxigênio. Os principais aceptores de elétrons de interesse na biodegradação são: o oxigênio para microrganismos aeróbios e nitrato, manganês, ferro, sulfato, dióxido de carbono e carbono orgânico para anaeróbios (Boopathy, 2000; Matheus et al., 2002).

A capacidade dos fungos de podridão branca em degradar lignina torna-os o grupo mais interessante dentre os fungos para utilização em biorremediação, pois o sistema que degrada extensivamente a lignina também é responsável, pelo menos em parte, pela degradação de alguns compostos poluentes orgânicos como clorofenóis, nitrofenóis e hidrocarbonetos poliaromáticos (Wen et al., 2009).

Esta capacidade de degradar xenobióticos, inicialmente foi relacionada à semelhança entre as estruturas da molécula de lignina e de alguns compostos sintéticos orgânicos, principalmente os aromáticos. Atualmente, sabe-se que a capacidade biodegradativa de fungos de podridão branca deve-se à presença do sistema enzimático ligninolítico inespecífico e extracelular (Eggen & Sveum, 2001; Evans & Hedger, 2001; Häggblom, 1992; Kirk & Farrell, 1987; Matheus & Okino, 1998; Pointing, 2001; Tuomela et al., 2000)

### **3.3. Classe Basidiomycetes de Fungos**

Os fungos deste grupo pertencem ao que há de mais evoluído entre os seus representantes; incluem-se nele os cogumelos, fungos gelatinosos, ferrugens, orelha-de-pau e alguns leveduriformes (Herrera & Ulloa, 1998). O número de espécies de basidiomicetos 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 (Loguercio-Leite, 2004).

A maioria das espécies forma uma frutificação macroscópica, com hifas modificadas que originam pseudo - tecidos e diferem dos demais fungos por produzir esporos chamados de basidiósporos formados nos ápices de prolongamentos chamados basídios (Alexopoulos, 1962; Putzke & Putzke, 2004).

Em ambientes terrestres, os basidiomicetos atuam principalmente como decompositores de madeira, sendo que alguns podem decompor esterco e folhas são conhecidas alguns parasitas de espécies agrícolas importantes ou de árvores. Podem ainda formar associações micorrízicas com vegetais ou algas, formando líquens (Loguercio-Leite, 2004). Algumas espécies são cultivadas comercialmente e outras são coletadas em áreas naturais e utilizadas como alimentos (Herrera & Ulloa, 1998; Loguercio-Leite, 2004; Przybylowicz & Donogue, 1990).

O micélio consiste de hifas septadas, bem desenvolvidas que penetram no substrato e absorvem nutrientes (Alexopoulos, 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 marrons e pretas (Alexopoulos, 1962; Putzke & Putzke, 2004).

#### **3.3.1. Fungos Basidiomicetos - Ordem Agaricales**

Os organismos pertencentes à ordem Agaricales constituem o maior grupo dentro do filo, onde se encontra cerca de 6.000 espécies, 297 gêneros e 17 famílias, em termos mundiais. Para o Brasil são mencionados 136 gêneros e 1011 espécies. Estima-se que 66% das espécies conhecidas, em termos mundiais, ocorrem nos trópicos (Gugliotta & Capelari, 1998; Hawksworth et al., 1995 *apud* Rosa, 2002).

Esta ordem é extensa e diversificada e inclui os cogumelos, inclusive a maioria utilizada para cultivos comerciais (Herrera & Ulloa, 1998; Putzke & Putzke, 2004; Raven, 2001).

Em sua grande maioria, os Agaricales são notórios por apresentarem basidiomas carnosos e efêmeros. São organismos sapróbios que desempenham no meio ambiente, como principal função, a capacidade de decompor matéria orgânica, disponibilizando carbono, hidrogênio e oxigênio, que são assimilados principalmente pelos organismos produtores da cadeia trófica. Por ser um grande grupo, ocorrem em uma gama de habitats, que vai do ártico aos trópicos, e são encontrados colonizando diversos substratos como solo, troncos, galhos, folhas e fezes. Ocupa vários nichos ecológicos como o cerrado onde podem participar de relações sapróbias, mutualistas ou parasíticas (Gugliotta & Capelari, 1998; Rosa, 2002).

### **3.3.2. Fungos Basidiomicetos - Família Tricholomataceae**

Esta família inclui numerosas espécies saprófitas, parasitas e micorrizicas com lamelas aderida ao estípite estrutura semelhante a um caule que suporta o píleo de um cogumelo. O carpóforo é branco na maioria dos casos, podendo ser amarela ou marrom. Compreende espécies comestíveis e tóxicas (Arora, 1986; Herrera & Ulloa, 1998).

### **3.4. *Lentinus crinitus***

#### **3.4.1. Posição Taxonômica do Basidiomiceto *Lentinus crinitus***

Reino.....Fungi  
Divisão (Filo).....Basidiomycetes.  
Classe.....Basidiomycetes.  
Subclasse.....Holobasidiomycetidaea.  
Ordem.....Agaricales  
Família.....Trichomataceae  
Gênero.....*Lentinus*  
Espécie.....*crinitus*

### 3.4.2. Características Morfológicas do - *Lentinus crinitus*

Péleo ou chapéu com 2-5 cm de diâmetro, frutificações castanhas, deprimidos no centro. Apresentam superfície com feixes de pelos de 1 mm de comprimento (Guerrero & Homrich, 1999) (**Figura 3**).



**Figura 3:** Basidiocarpo de *Lentinus crinitus*

### 3.4.3. Ocorrência Natural, Habitat e Considerações sobre a sua Utilização

Estudos de etnomicologia apontam este cogumelo como comestível por algumas tribos indígenas, somente após cozimento na brasa, pois, segundo relatos indígenas ele provoca vômitos se ingerido cru (Fidalgo, 1968; Fidalgo & Hirata, 1979).

### 3.4.4. Propriedades Terapêuticas do *Lentinus crinitus*

Para esta espécie é citada na literatura a atividade antimicrobiana, dada por quatro compostos sesquiterpênicos (Abate & Abrahan, 1994).

### 3.5. Enzima

A palavra enzima, do grego énzymo (em: na; zymos: levedura) foi sugerida por Kuhne, no seu primeiro trabalho, como nome genérico para “fermentos” que atuavam na ausência de organismos ou fora deles. Hoje se sabe que as enzimas são catalizadoras, ou seja, aumento de várias ordens de grandeza e velocidade das reações que catalisam podendo ser de natureza protéica e de RNAs e DNAs catalíticos. As ribozimas que tem como catalisadores moléculas específicas de RNA. Embora algumas enzimas sejam até hoje extraídas de tecidos

animais e vegetais, a grande maioria das enzimas industriais é obtida de microrganismos (fungos e leveduras) (Abate & Abrahan, 1994).

### **3.5.1. Enzima Fúngica**

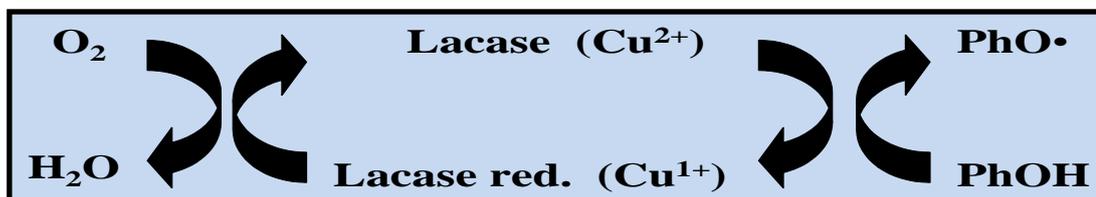
A maioria dos fungos produtores de enzimas necessárias à degradação de materiais lignocelulósicos (madeira, palhas, cascas, etc.) pertencem aos grupos *Ascomycetes*, *Deuteromycetes* e *Basidiomycetes*. Os fungos que vivem em madeiras mortas que preferentemente degradam um ou mais componentes da madeira, causam três tipos de degradação: marron, branca e macia. A maioria destes é capaz de degradar lignina em alguma extensão, embora preferentemente ataquem a celulose na madeira.

São três as principais enzimas diretamente envolvidas na degradação da lignina por basidiomicetos: Peroxidase dependente do manganês (MnP), Peroxidase da lignina (LiP), e Lacases (Lac). Acredita-se ser encontrada agindo na superfície das hifas em contato com as células de parede celular, reagindo com um grande número de compostos fenólicos (Maciel et al., 2010).

### **3.5.2. Lacase (E.C. 1.10.3.2)**

Lacases (E.C.1.10.3.2) são oxiredutases que fazem parte de um grupo de enzimas denominadas enzimas constituídas por cobre que oxida os polifenóis utilizando o oxigênio comoceptor final de elétrons (Mayer & Staples, 2002). As oxiredutases são enzimas que catalisam processos de oxidação e redução, e constituem um grupo que compreende quase um quarto de todas as enzimas conhecidas, entre as quais estão as lacases.

As lacases são principalmente glicoprotéínas extracelulares ligadas ao cobre bivalente, o qual é reduzido durante a oxidação de fenóis (**Figura 4**) e subsequentemente oxidado novamente ao estágio bivalente pelo oxigênio (Klonowska et al., 2002; Mayer & Staples, 2002; Claus, 2004).



**Figura 4:** Mecanismo de ação da lacase.

### 3.5.3. Lacase Fúngica

Lacases fúngicas têm sido encontradas em diferentes gêneros de ascomicetos, alguns deuteromicetos e principalmente basidiomicetos, particularmente aqueles associados com madeira deteriorada ou em estágio terminal de decomposição (Souza et al., 2003). Os melhores produtores de lacase são basidiomicetos pertencentes ao grupo dos fungos de decomposição branca, eficientes degradadores de madeira (Maciel et al., 2010; Mayer & Staples, 2002; Thurston, 1994).

As lacases fúngicas podem ser induzidas ou constitutivas, de acordo com suas diferentes rotas de síntese. As lacases induzidas são dependentes de fatores como condições de nutrição, temperatura, pH, aeração entre outros, para a sua expressão (Xiao et al., 2003).

A grande maioria dos trabalhos publicados refere-se à lacase extracelular de fungos basidiomicetos havendo pouco estudo sobre lacases intracelulares (Leonowicz & Grzywnowicz, 2001).

### 3.5.4. Aplicações Biotecnológicas das Lacase.

A lacase apresenta um importante papel na degradação da lignina, segundo e altamente recalcitrante biopolímero mais abundante na natureza após a celulose. Desta forma, esta enzima apresenta uma considerável aplicação não só na indústria papelreira e de polpa, mas também em diversos processos que se baseiam na utilização de materiais ligninocelulósicos (Mayer & Staples, 2002), como agente branqueador natural para indústria

têxtil e papelaria, na indústria alimentícia onde seu emprego é diversificado como, por exemplo, na produção de bebidas sendo empregado como agente estabilizante de vinhos, sucos de frutas e de cerveja (Maciel et al., 2010).

O uso de enzimas para o tratamento ou remoção de poluentes ambientais tem interesse crescente por causa da alta eficiência e seletividade, além de reações ambientalmente saudáveis. Vários processos biotecnológicos têm sido propostos, sendo que o emprego de fungos de decomposição branca tem apresentado bons resultados na degradação de vários compostos xenobióticos, sob condições aeróbicas (Pointing et al., 2000; Maciel et al., 2010).

A lacase pode ser considerada mais interessante para processos de descontaminação de leitos de água, por exemplo, uma vez que não requer a adição de peróxido de hidrogênio como as peroxidases, e geralmente atuam sobre uma gama maior de substratos que a tirosidase (D'Annibale, et al., 2000).

### **3.6. Indutor da Lacase**

Os indutores de lacase têm uma função significativa no aumento da produção e atividade de lacase (Gnanamani et al., 2006). O álcool veratrílico é um dos principais indutores que estimula a produção da lacase fúngica (Barbosa, 2006).

Como as aplicações biotecnológicas requerem grande quantidade de enzima, e normalmente lacases extracelulares são produzidas por pequenas quantidades, para melhorar a produção de lacase, vários indutores têm sido utilizados, destacando-se compostos aromáticos ou fenólicos relacionados à lignina ou derivados da lignina. Bons resultados obtidos com alguns compostos têm estimulado pesquisas para a produção de lacase em larga escala, considerando a vasta aplicabilidade industrial e ambiental desta enzima. Não existe um ótimo indutor de lacase comum a todos os fungos, havendo grande variação do indutor de acordo com o fungo estudado (Garcia, 2006).

#### **3.6.1. Álcool Veratrílico (AV)**

A indústria de enzimas é resultado de um desenvolvimento rápido, alcançado nas últimas quatro décadas, graças à evolução da biotecnologia moderna. O desenvolvimento dos processos de fermentação, ocorrido durante a última metade do século passado, permitiu a produção de enzimas mais puras, bem caracterizadas e em larga escala (Kirk, 2002). O

mercado mundial de enzimas movimentou em 2007 cerca de 2,3 bilhões de dólares e espera-se para 2012 um movimento superior a 2,7 bilhões, com um aumento anual de 4% (Thakore, 2008).

O álcool veratrílico (3,4-Dimetoxibenzílico) é um metabólico secundário que tem importantes funções na degradação da lignina. Este álcool aromático (AV) é sintetizado e excretado por diversos fungos de podridão branca como, por exemplo: *P. chrysosporium*, *Phebia radiata*, *Pycnoporus cinnabarinus* e *Trametes versicolor*. A adição do álcool veratrílico, em concentrações de 0,4 a 1,5 mmol<sup>-1</sup>, no meio nutriente foi relatado por exercer um efeito positivo na síntese de lacase de alguns fungos de podridão branca (Faison & Kirk, 1985; Kantelinen et al., 1989; Lonergan & Baker, 1995; Nerud et al., 1991).

### **3.7. Bactérias**

As bactérias são organismos procarióticos com organização relativamente simples sendo encontrados em ambientes naturais. Esses organismos são formados por várias estruturas, que diferem de uma espécie para outra (Murray et al., 2000).

As bactérias são organismos que apresentam grande diversidade em relação ao tamanho, podendo variar desde esferas medindo cerca de 0,2 µm de diâmetro a espirais com 10µm de comprimento (Walter & Barra, 2001).

Como todas as células, as bactérias têm uma estrutura essencial, a membrana citoplasmática. A maioria das bactérias possui externamente à membrana, uma espessa e rígida camada: a parede celular. Conforme as características da parede celular, as bactérias podem ser classificadas em Gram-positivas ou Gram- negativas. As diferenças entre esses grupos estão baseadas principalmente nas suas propriedades de permeabilidade e nos componentes de superfície (Schaechter et al., 2002).

#### **3.7.1. Bactérias Gram-Positivas – *Staphylococcus aureus***

A parede celular dos microrganismos gram-positivos é uma estrutura relativamente simples, com espessura de 15 a 50 nm. Ela é composta de 50% de peptidoglicanos, que é um composto polimérico que forma uma estrutura rígida ao redor da membrana citoplasmática,

40% à 45% de polímeros ácidos e 5% à 10% de proteínas e polissacarídeos (Walter & Barra, 2001).

*Staphylococcus* são microrganismos amplamente distribuídos na natureza e fazem parte da microbiota normal da pele e da mucosa de mamíferos e aves. A gravidade das suas infecções varia desde uma intoxicação alimentar ou infecção cutânea de pouca importância, até infecções sistêmicas potencialmente fatais (Jawetz, et al., 1998; Murray, et al., 2000; Trabulsi, et al., 1999).

Os *Staphylococcus* são distribuídos em duas categorias: coagulase positiva e negativa. Esta divisão se baseia na capacidade de coagular o plasma, que é uma propriedade considerada, há muito tempo, como importante identificador da patogenicidade dos *Staphylococcus*. O *S. aureus* é a única envolvida em infecções coagulase positiva, visto que as demais são coagulases negativas (Murray, et al., 2000; Trabulsi, et al., 1999).

*Staphylococcus aureus* é o agente mais comum de infecções piogênicas em ambientes hospitalares, estas podem ser localizadas na pele ou regiões mais profundas. Quando na pele, produz uma resposta inflamatória intensa podendo causar foliculite, carbúnculo ou abscessos subcutâneos (Schaechter, et al., 2002). Além de infecções piogênicas o *Staphylococcus aureus* pode causar intoxicação alimentar, provocada pela ingestão de enterotoxinas previamente formadas no alimento contaminado (Trabulsi et al., 1999).

### **3.7.2. Bactérias Gram-Negativas – *Escherichia coli***

As bactérias Gram-negativas são constituídas por estruturas de múltiplas camadas bastante complexas, que não retém o corante quando submetidas a solventes nos quais o corante é solúvel, sendo descoladas e, quando acrescentados outros corantes, adquirem a nova coloração. As bactérias Gram-negativas são constituídas por uma endotoxina, o LPS (Lipopolissacarídeo), que lhes confere a propriedade de patogenicidade (Walter & Barra, 2001).

A família Enterobacteriaceae representa a maior e a família mais heterogênea dentre as bactérias gram-negativas. Os bacilos Gram-negativos apresentam grande importância clínica. Seus gêneros foram classificados com base nas propriedades bioquímicas, sequência dos aminoácidos, etc. São organismos encontrados em diversos ambientes, no solo, nos vegetais,

na água e os mesmos fazem parte da flora intestinal da maioria dos animais incluindo os seres humanos (Murray et al., 2000).

A espécie *Escherichia coli* é um bacilo gram-negativo anaeróbio facultativo mais comumente associado a uma série de infecções que incluem infecções intestinais, septicemias, meningites em neonatos. As manifestações dependem do local da infecção e do tipo de cepa e sítio de ação (Trabulsi et al., 1999).

### **3.7.3. Compostos Antimicrobianos**

As primeiras descrições sobre o uso de antimicrobianos datam de 3.000 anos atrás, quando os médicos chineses usavam fungos para o tratamento de feridas infecciosas. Utilizados de maneira empírica na época, sabe-se que vários destes produtos indicados na Antiguidade e na Idade Média apresentam propriedades terapêuticas devido a compostos sintetizados a partir dos microrganismos utilizados neste tipo de tratamento (Tavares, 1985 e 1999).

Alexandre Fleming, em 1929 publicou um trabalho no qual relata propriedades bactericidas de um microfungo presente no ar, *Penicilium rubrum* na qual mais tarde o mesmo foi reclassificado como *Penicilium notatum* (Lacaz, 1965). Mais tarde foi isolada das culturas de *Penicillium* a penicilina.

Esta descoberta levou a uma busca concentrada por novas drogas antibacterianas durante os 30 anos seguintes e resultaram na descoberta das principais classes de antibióticos conhecidos atualmente, muitas delas derivadas de produtos naturais (Butler & Buss, 2006).

Assim, os primeiros antibióticos descobertos foram a penicilina e estreptomicina. Uma grande quantidade de antibióticos tem sido descoberta, porém, menos de 1% tem valor prático na terapêutica. Portanto, as dificuldades para a obtenção de tal antibiótico são enormes, e aqueles que mais se aproximam destas características apresentam custo elevado, o que torna problemático o seu uso pela população de baixo poder aquisitivo (Tavares, 1999).

### **3.7.3.1. Produtos Sintetizados por Microrganismos**

Grande parte de antibióticos utilizados na prática médica é obtido a partir de microrganismos, dos quais são metabólicos secundários. Estes são caracterizados pela grande diversidade de estruturas químicas liberados para o meio ambiente. Estes compostos conferem uma vantagem seletiva ao organismo produtor (Butler & Buss, 2006; Demain, 1996; Peláez, 2006; Tavares, 1999).

Muitos medicamentos são sintetizados a partir de fermentações de microrganismos, criando assim novas gerações de antibióticos. Novos metabólicos bioativos continuam a ser identificados de fontes microbianas, graças à ampla variedade de cepas existentes. Particularmente, a habilidade em produzir metabólicos quimicamente diferentes, está associada aos actinomicetos, mixobactérias, pseudomonas, cianobactérias e fungos filamentosos (Barrett & Barrett, 2003; Donadio et al., 2002; Peláez, 2006).

Os produtos naturais ainda parecem ser as fontes mais promissoras de futuros antibióticos, tal fato se argumenta na diversidade estrutural encontrada na natureza em meio ao enorme campo de microrganismos de modo a ativar rotas metabólicas manipulando as condições de cultivo (Peláez, 2006).

### **3.8. Meios de Cultura**

Os meios de cultura são utilizados com a finalidade de cultivar e manter microrganismos viáveis no laboratório, sob a forma de culturas puras (Neder, 2004).

Os meios de cultura devem ter na sua composição, os nutrientes indispensáveis ao crescimento do organismo em questão, sob forma assimilável e em concentração não inibitória do crescimento. Além disso, após a sua preparação, cada meio de cultura deve ser submetido a esterilização, para a eliminar qualquer organismo vivo contaminante ( Lima et al., 2005).

Por outro lado, para manter uma cultura pura, é necessário que o meio de cultura que se pretende utilizar seja mantido desprovido de qualquer organismo vivo contaminante. Para a prevenção de contaminações durante a manipulação de culturas puras recorre-se a técnicas de assepsia (Smith, 1985).

De um ponto de vista geral, os meios de cultura podem ser classificados tendo em conta o seu estado físico, a sua composição química e os objetivos funcionais a que se destinam (Cooney, 1981).

A especificidade dos meios de cultura é muito importante, nomeadamente no isolamento e identificação de certos microrganismos (por exemplo, no isolamento de microrganismos do solo) ou em testes de sensibilidade a antibióticos ou na análise microbiológica de águas, de alimentos, etc (Neder, 2004).

### **3.8.1. Fontes de Nutrientes Regionais da Amazônia.**

#### **3.8.1.1. Açaí - *Euterpe oleracea***

O **açaizeiro**, *Euterpe oleracea* é uma palmeira tropical, perene, nativa da Amazônia oriental, predominante ao longo dos igarapés, terrenos de baixada e áreas com umidade permanente. Possuindo farto perfilhamento desde 2 a 3 anos de idade possibilita, teoricamente, uma exploração sustentada de suas populações nativas para palmito. A exploração do palmito açazeiro no estuário amazônico teve início a partir dos anos 60 devido à escassez de palmito na Região Sudeste do País, gerada pela extração indiscriminada e predatória (Watson & Dallwitz, 1994).

O óleo extraído do açaí é composto de ácidos graxos de boa qualidade, com 60% de monoinsaturados e 13% de poliinsaturados. Com relação às proteínas, possui teor superior ao do leite (3,50%) e do ovo (12,49%), enquanto o perfil em aminoácidos é semelhantes ao do ovo (Santos, 2001).

Segundo Rogez (2000), o óleo de açaí, da mesma forma que o óleo de oliva e abacate, é rico em ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados, respectivamente, 60 e 14%. Os óleos de oliva e abacate, por suas características químicas relacionadas com a respectiva composição em matéria insaponificável, são utilizados tanto para consumo in natura quanto na indústria de cosméticos. Esses produtos conquistaram uma fatia nobre do mercado e são, em geral, comercializados com um valor superior ao dos demais óleos vegetais. Diferentemente do óleo de abacate, que já foi avaliado para diferentes variedades cultivadas

no Brasil (Antoniassi, 1998, Freitas et al., 1993; Szpiz et al., 1987), a caracterização do óleo de açaí carece de mais estudos.

O açaí possui elevado teor de antocianinas, contendo cerca de 1/100g de extrato seco. As antocianinas são pigmentos naturais, pertencentes á família dos flavonóides, sendo estes responsáveis pela cor do açaí. Além disto, possuem função antioxidante, que assegura melhor circulação sanguínea e protegem o organismo contra o acúmulo de placas de depósito de lipídios, causadores da arteriosclerose (Dallwitz, 1980; Freitas et al., 1993).

Quanto à ao ponto-de-vista nutricional, o açaí apresenta 65,8 g de lipídios, o que corresponde a 66% da ingestão diária requerida; 31,5 g de fibras alimentares totais, o que equivale a 90% das recomendações diárias e 12,6 g de proteínas, o que corresponde de 25% a 30% da quantidade nutricional diária necessária. O açaí é rico em minerais, principalmente potássio e cálcio e, dentre as vitaminas, pode ser destacada a vitamina E, um antioxidante natural que atua na eliminação dos radicais livres (Dallwitz, 1980).

O **açaí** é consumido há muito tempo pelos indígenas e moradores da região amazônica, devido as suas qualidades nutritivas. É também largamente utilizado para a produção de um refresco (“vinho” de açaí). Nas regiões sul e sudeste vêm sendo popularizado e consumido como complemento alimentar, principalmente pelas pessoas que buscam vigor físico (Santos, 2001).

Atualmente esta espécie *Euterpe oleracea* é responsável por cerca de 90% da produção nacional. Possui palmito do tipo doce, mas de consistência e textura mais rígida do que o das espécies *E. edulis*, *E. precatoria* e *E. spiritosantensis* (Santos, 2001).

### **3.8.1.2. Cará- *Dioscorea alata***

O cará 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. Como alimento, é rico em carboidratos, proteínas, fósforo, cálcio, ferro e vitaminas 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).

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. Por o tubérculo não se deteriorar após a colheita, pode conservar-se à sombra em estado natural por até 90 dias (Vieira et al., 1999).

### **3.8.1.3. Macaxeira - *Manihot esculenta***

A macaxeira (*Manihot esculenta* Crantz), conhecida também como mandioca mansa, doce, de mesa ou aipim, é bastante cultivada no estado do Amazonas, destinada ao consumo "in natura". Apesar das peculiaridades dos ecossistemas, participa de forma significativa nos diversos sistemas de produção, quer isoladamente, em cultivos de fundo de quintal ou em consórcio com outras culturas. Diferencia-se da mandioca brava por apresentar baixos teores de ácido cianídrico (HCN) na polpa crua de raízes frescas, geralmente abaixo de 50 mg/kg de polpa. Esses teores variam de acordo com a variedade, idade e época de colheita e condições ambientais (Fatibello-Filho, 2002).

As mandiocas, tanto mansas como bravas, do ponto de vista nutricional são ricas em carboidratos, e consideradas como ótimas fontes de calorias (132 kcal por 100 gramas da sua parte comestível). Apresenta baixo conteúdo de proteína (1% do peso fresco), níveis aceitáveis de algumas vitaminas do complexo B e C, alguns minerais como cálcio, fósforo, ferro e praticamente não possui gordura (0,20%), mas, no entanto, é rica em fibras (Close et al., 2002).

A macaxeira apresenta nas raízes frescas 50,5 – 70,3% de água, 0,7 – 2,3% de proteína, 0,1 – 0,7% de lipídios, 23 – 41,5% de extrato livre de nitrogênio, de fibra 0,8 – 6,5%. Em relação às proteínas a macaxeira inclui os seguintes aminoácidos: 4,4% de ácido aspártico, 2,1% de treonina, 1,9% de serina, 12,7% de ácido glutâmico, 2,4% de glicina, 4,6% de alanina, 2,6% de valina, 0,6% de cisteína, 1% de metionina, 2% de isoleucina, 2,9% leucina, 1,6% tirosina, 2,3% de fenilalanina, 3,5% lisina, 0,6% tirosina, 0,6% triptofano, 1,2% histidina e 3,7% arginina (Close et al., 2002).

As mandiocas com polpas de coloração amarela e creme são importantes na alimentação humana, porque possuem consideráveis teores de beta-caroteno, precursor da vitamina A. As mandiocas consideradas doces (macaxeiras) contêm naturalmente quantidades

baixas de ácido cianídrico (HCN); são plantas que não diferem visualmente da mandioca brava, considerada venenosa (Fatibello-Filho, 2002).

#### **3.8.1.4. Pupunha - *Bactris gasipaes***

A pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) é uma espécie tropical originária do continente americano, pertencente à família das Arecáceas (Palmáceas) e cultivada há séculos pelas populações indígenas. No Brasil, seu habitat natural é a Região Amazônica, e seus frutos fazem parte da dieta alimentar dos povos da Região Norte. Esta palmeira possui grande potencial econômico em virtude dos múltiplos usos de seus frutos e palmito. Plantios racionais podem produzir 25 t/ha de frutos ou 1 t/ha de palmito (Tonet et al., 1999).

Os frutos são drupas de forma, tamanho e cor variáveis. Quando jovens, são verdes, quando maduros, são amarelos, vermelhos e algumas combinações dessas cores. São encontrados frutos de 20 a 30 g até cerca de 200 g. Apresentam uma enzima tripsina que inibe a digestão de proteínas e um ácido (provavelmente oxálico) que causa irritação na mucosa da boca; por isso, devem ser consumidos cozidos. Os frutos podem ou não conter sementes. As sementes são de cor café ou negra, possuindo endocarpo duro, endosperma branco e oleaginoso semelhante ao do coco quanto ao sabor e textura (Tonet et al., 1999).

O mesocarpo tem cerca de 2,3 - 8,3 % de óleo, 6,1 – 9,8% de proteína, extrato livre de nitrogênio de 59,5 – 79,9%, e fibra 2,8 - 9,3%. A análise da composição da proteína deste mesocarpo mostra que este tem todos os aminoácidos essenciais, embora em níveis mais baixos do que o milho. Os aminoácidos Arginina 7,3 – 9,2%, e o ácido glutâmico 4,7 – 6,3% são os mais abundantes encontrados no mesocarpo da pupunha (Bovi, 1998).

A qualidade 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 (Tonet et al., 1999).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento metodológico da pesquisa foi dividido em três etapas: A 1ª Etapa está relacionada com a Produção de Biomassa Fúngica, 2ª Etapa concerne na Determinação Enzimática (Lacase) e influência de um indutor na produção de lacase e a 3ª Etapa: Avaliação da Atividade Antimicrobiana do fungo *Lentinus crinitus*.

### 1ª ETAPA

#### 4.1. PRODUÇÃO DE BIOMASSA FÚNGICA

Este experimento foi realizado nos Laboratórios de Biorgânica e Proteômica ambos na Universidade do Estado do Amazonas – UEA, no departamento do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais – MBT/UEA.

##### 4.1.1. Fungo *Lentinus crinitus*

##### 4.1.1.1. Obtenção do Material Biológico

Carpóforos do fungo *Lentinus crinitus* (**Figura 5**) com seus respectivos substratos (porção de madeira usada como fonte de nutriente do fungo) foram coletados no perímetro urbano da cidade de Manaus, na qual foram acondicionados em sacos de papel com as devidas informações sobre o local, data de coleta, coletor e tipo de substratos identificados e levados ao Laboratório de Biorgânica e Recursos Naturais da Amazônia – UEA, onde foram armazenados em câmara de refrigeração científica em temperatura de 28°C. No dia seguinte, após a coleta, os fungos foram identificados e secos à temperatura ambiente para que posteriormente possam ser utilizados.

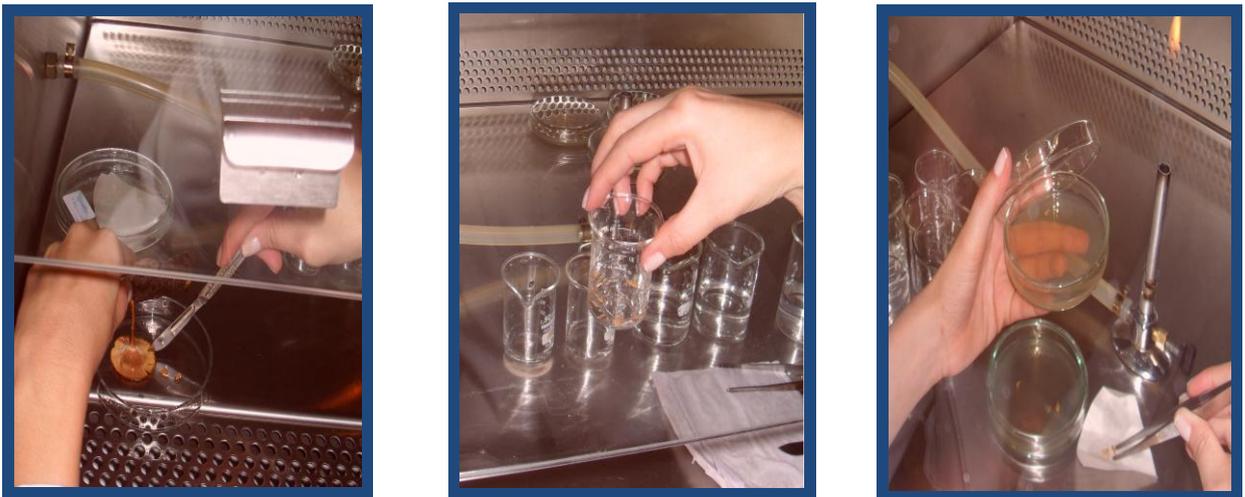


**Figura 5:** Corpo de frutificação do fungo *Lentinus crinitus*.

#### 4.1.1.2. Isolamento e Repicagem do Fungo

Para efetuar a inoculação do material fúngico foi utilizada a metodologia proposta por Bettucci & Guerrero (1971). Utilizou-se um estilete (bisturi) no qual foi retirado de cada carpóforo fúngico pedaços de 3 mm de uma de suas extremidades, a qual passou por um procedimento de assepsia através de lavagens sucessiva em solução de álcool 70% (1 ou 2 minutos), hipoclorito de sódio a 3% (1 ou 2 minutos) e água destilada (2 minutos).

Seguindo a metodologia proposta por Castro e Silva (1996), a inoculação do fungo ocorreu em meio de cultura ágar acrescido de ampicilina (200 g), procedimento este executado em ambiente estéril (Interior da Câmara de Fluxo Laminar). Para evitar contaminação foram armazenadas em estufa incubadora (BOD) à temperatura de 28° C por um período de 7 dias, para o crescimento do fungo ( **Figura 6**).



**Figura 6:** Isolamento do fungo *Lentinus crinitus*.

Após este procedimento, foi realizada uma nova repicagem em meio BDA, para obtenção de uma cultura pura. As placas foram novamente incubadas em BOD por um período de 7 dias para o crescimento do fungo em toda superfície do meio de cultura.



**Figura 7:** Cultura pura - fungo *Lentinus crinitus*.

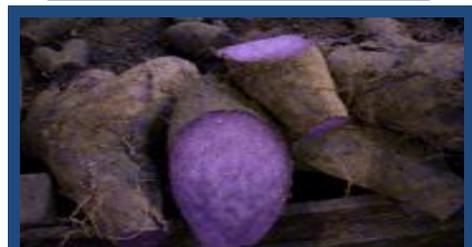
#### 4.2. Meios de Cultura para Obtenção de Biomassa

Para a obtenção de biomassa foi feito o cultivo em meio líquido, no qual foram utilizados 4 (quatro) meios de cultura regionais da Amazônia tais como:

**Açaí**  
(*Euterpe oleracea*)



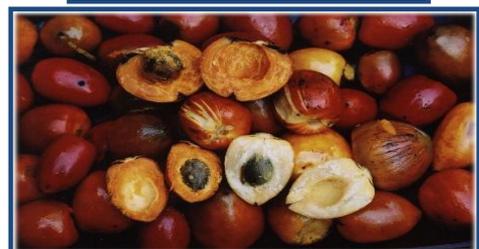
**Cará**  
(*Dioscorea alata*)



**Macaxeira**  
(*Manihot esculenta*)



**Pupunha**  
(*Bactris gasipaes*)



No preparo dos meios de cultura utilizou-se 200 g de polpa regional, adicionado a 700 ml de água destilada e, cozidos durante 30 minutos. O caldo foi coado em papel filtro e a glicose foi adicionada e o volume completado com uma quantidade suficiente (q.s.p) para 1000 ml de água destilada.

Ajustou-se o pH (com NaOH e HCl) com o auxílio de um pHmetro para 5,0 e posteriormente os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C durante um período de 15 minutos.

### **4.3. Padronização do Cultivo em Meio Líquido**

#### **4.3.1. Meios de Cultura Líquida**

##### **4.3.1.1. Preparo do Inóculo**

Foram retiradas frações de 10 mm diâmetro de micélio do fungo e transferidos para 100 ml de caldo do meio regional (Açaí, Cará, Macaxeira e Pupunha) em erlenmeyer com capacidade de 250 ml, no qual posteriormente foram incubadas em estufa BOD sob condição estacionária em uma temperatura padrão de 28°C e em Shaker sob condição de agitação a 28°C a 180 rpm por um período de 5°, 10°, 15° e 20° dias. Foi feita a triplicata para cada meio de cultura tanto em relação a condição estacionária quanto a de agitação.

### **4.4. Determinação da Biomassa Micelial**

A obtenção da biomassa seca foi obtida através do processo de filtração do caldo de cultivo seguido do processo de secagem, após o período de 5°, 10°, 15° e 20° dias. Para a filtração utilizou-se o filtro Watman nº1 previamente pesado e a secagem foi realizada em estufa elétrica com circulação forçada à temperatura de 50°C até peso constante.

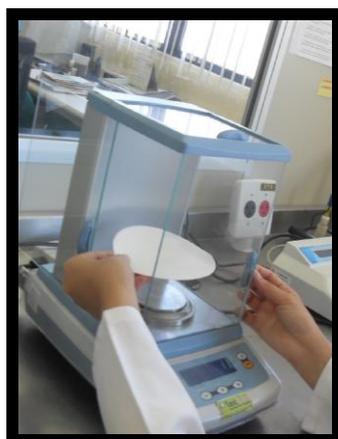
A massa micelial será expressa pela seguinte equação:

$$M m (\%) = \frac{P f - P i}{P i} \times 100 , \text{ onde:}$$

Pi: Peso seco do papel filtro (Peso inicial)

Pf: Peso seco do papel filtro após filtração (Peso final)

Mm: Peso micelial em porcentagem.



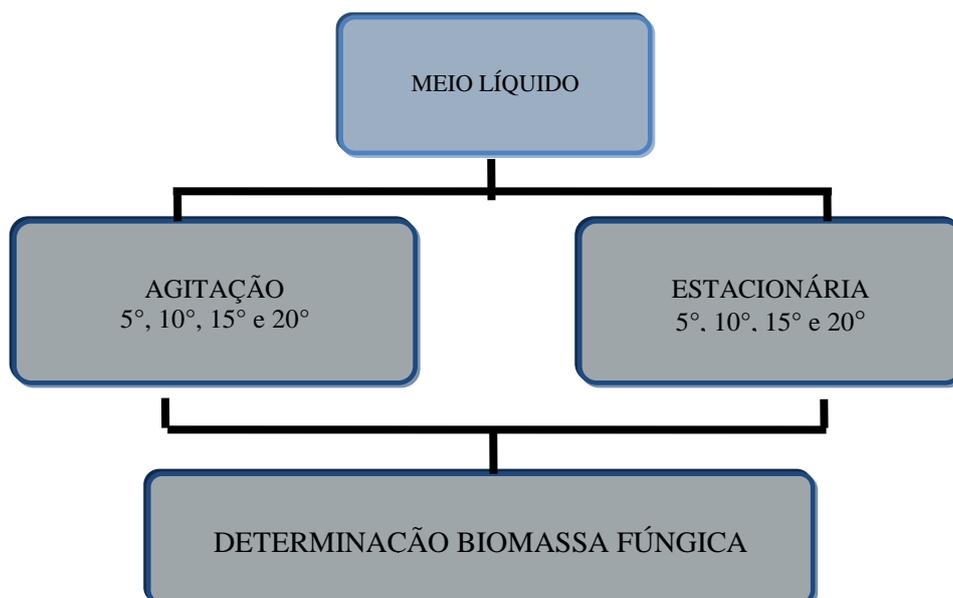
**Pi: Peso Inicial**



**Pf: Peso Final**

**Figura 8:** Determinação massa micelial do fungo amazônico *Lentinus crinitus*.

Esta etapa metodológica é observada de forma resumida abaixo:



**Figura 9:** Esquema da biomassa fúngica.

## 2ª ETAPA

### 4.5. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LACASE

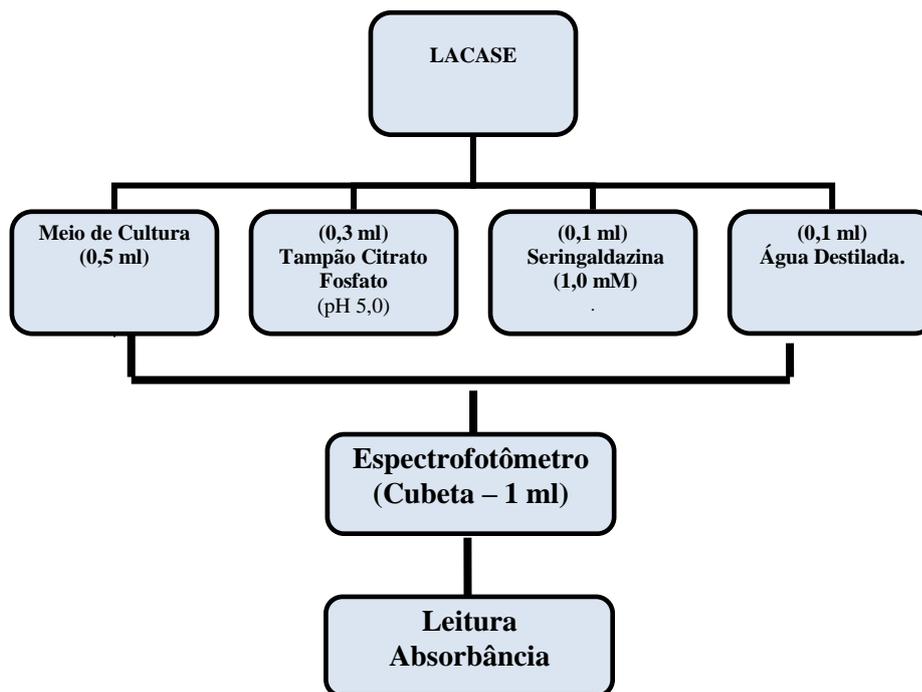
Seguindo a metodologia proposta por Castro e Silva (1996) o meio de cultura líquida utilizado para determinação enzimática foi coletado dos meios testados, o qual foi previamente esterilizado a 121°C por 15 minutos. Em câmara de fluxo laminar foi adicionado em erlemeyer de 125 ml de meio de cultivo. Posteriormente, foi feita a inoculação do fungo utilizando pedaços dos fragmentos do micélio do fungo em erlemeyer, o qual foi retirado da região periférica da placa de petri. O experimento foi realizado em triplicata. Os erlemeyers foram mantidos em posição estacionária em incubadora BOD e agitação em incubadora Shaker a 180 rpm, a temperatura de 28°C. Após 5, 10, 15,20 dias do cultivo dos fungos, foi realizado a determinação enzimática do tipo lacase.

A atividade de lacase foi determinada em alíquotas de 2 ml de cada meio de cultura líquido (caldo filtrado) utilizado para determinação da massa micelial. Cada alíquota será coletada no 5°, 10°, 15° e 20° dias de crescimento.

A atividade da lacase segue metodologia proposta por Szklarz et al.(1989). O método baseia-se na oxidação do substrato enzimático de siringaldazina para sua forma quinona, que apresenta absorção a 525 nm ( $\epsilon$  65.000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). Uma unidade de atividade lacase corresponde à quantidade de enzima necessária para oxidar 1 $\mu$  mol de substrato por minuto. Para determinação da atividade lacase utilizar-se-á: 0,5 ml de caldo de cultura filtrado; 0,3 ml tampão citrato fosfato a pH 5,0; 0,1 ml solução etanólica de siringaldazina (1,0 mM) e 0,1 ml de água destilada.

Em seguida, os reagentes foram misturados em um tubo de ependorf e colocados em uma cubeta de vidro para espectrofotômetro. O branco para zerar o espectrofotômetro deverá conter todos os reagentes exceto o caldo (trocar por água destilada).

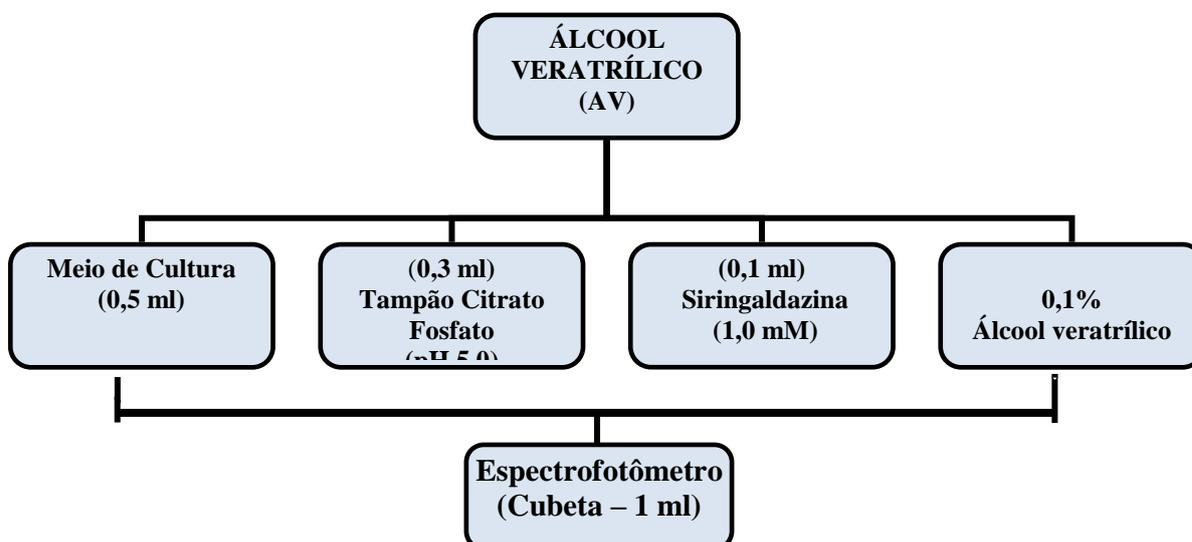
Esta etapa metodológica é observada de forma resumida abaixo:



**Figura 10:** Esquema da atividade enzimática - Lacase.

#### 4.6. INFLUÊNCIA DO INDUTOR NA PRODUÇÃO DE LACASE

Dos meios de cultura testados anteriormente foram reutilizados para se verificar a influência do álcool veratrílico como indutor na secreção de lacase. As mesmas condições da atividade enzimática testada anteriormente foram mantidas para esta fase, sendo a única diferente a inclusão de solução de 0,1% de álcool veratrílico no meio. A determinação da atividade de lacase foi determinada no período de 5°, 10°, 15° e 20° dias de crescimento para a fase estacionária e agitação.



**Figura 11:** Esquema da atividade enzimática - Álcool Veratrílico (AV).

## 3ª ETAPA

### 4.7. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

#### 4.7.1. Fungo *Lentinus crinitus*

##### 4.7.1.1. Obtenção do Material Biológico

O fungo basidiomiceto *Lentinus crinitus* utilizado neste experimento foi coletado nos perímetros urbanos da cidade de Manaus no mês de julho de 2009 e identificado no Laboratório de Biorgânica e Recursos Naturais da Amazônia – UEA



**Figura 12:** Corpo de frutificação do fungo *Lentinus crinitus*.

##### 4.7.1.2. Isolamento e Repicagem do Fungo

Utilizando-se um bisturi, foi retirado do carpóforo do fungo cerca de 3mm de uma de suas extremidades. A amostra do fungo foi submetida à uma seqüência de submersões em soluções na seguinte ordem e tempo como segue nas etapas abaixo: Mergulhou-se a amostra em álcool 70% (1 ou 2 minutos), em hipoclorito de sódio a 3% (1 ou 2 minutos) deixar imerso em água destilada (2 minutos). Colocou-se posteriormente sobre o papel filtro para absorver o líquido e secar a amostra e em seguida inoculou-se em placa com meio de cultura ágar BDA já esterilizada a 121 °C por 15 minutos.

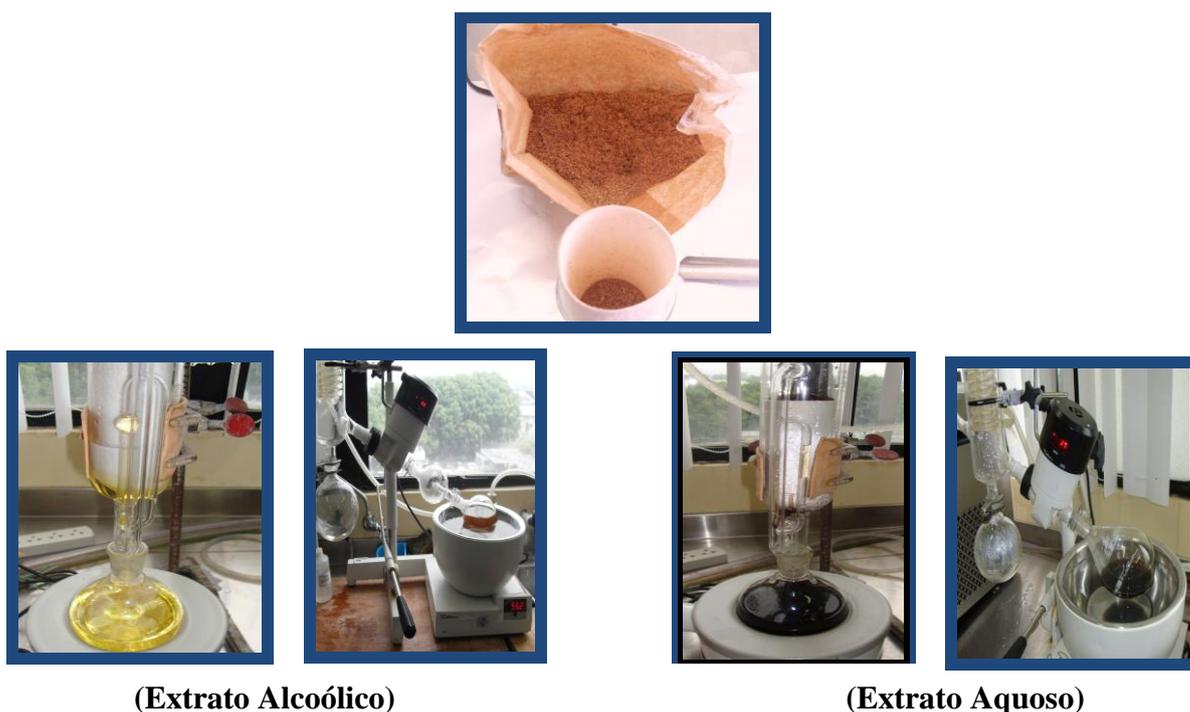
#### 4.8. Obtenção dos Extratos – Carpóforo do Fungo *Lentinus crinitus*

Após o processo de assepsia o material biológico foi exposto em bancada em temperatura ambiente, triturado e macerado à temperatura ambiente por sete dias. Para cada 100 g do material triturado foi acrescido 250 ml do solvente. Foram utilizados dois solventes de diferentes polaridades para cada extrato.

- **Extrato 1** - Alcoólico ( $C_2H_6O$ );
- **Extrato 2** - Água (Extrato Aquoso).

Posteriormente, o material foi filtrado e o solvente removido em Soxhlet e em evaporador rotativo, para obtenção dos extratos brutos.

Após a concentração no evaporador rotativo os extratos foram pesados e mantidos à vácuo até o momento da diluição (**Figura 13**).



**Figura 13:** Obtenção do extrato (alcoólico e aquoso) do Fungo *Lentinus crinitus*.

## **4.9. Material Microbiológico**

Os microrganismos utilizados como cepas padrões para a realização dos ensaios de atividade antimicrobiana foram às bactérias: *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, que foram fornecidas gentilmente pela Prof<sup>a</sup> Ormezinda Fernandes do Instituto Leônidas e Maria Deane – CPqLMD/FIOCRUZ – AM e pelo Prof<sup>o</sup> Cristóvão Alves da Costa do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.

### **4.9.1. Manutenção dos Microrganismos**

As bactérias foram mantidas em ágar nutriente e conservadas sob refrigeração à 4 °C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) no Laboratório de Pesquisas do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, sendo repicadas para manter as colônias viáveis para posterior utilização.

## **4.10. Preparo dos Inóculos**

### **4.10.1. Bactérias - Reativação e Manutenção dos Microrganismos Testes**

Para o preparo dos inóculos bacterianos foram utilizados Bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*).

Foi realizado a reativação de bactérias patogênicas pertencentes a Coleção Biológica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, para padronização da técnica e dimensionamento do inóculo. Foi retirado uma alçada de cada cepa bacteriana de 4 a 5 colônias da bactéria ativada em ágar Mueller – Hinton e feito a seguir a sua semeadura em 10 ml de cultura líquida MH (Muller Hinton) e incubadas a 28 °C por 24 horas sob microaeração.

As suspensões de microrganismos foram ajustadas de acordo com a escala de MacFarland, expressa em número de bactérias  $\text{mL}^{-1}$  de meio de cultura (aproximadamente de  $6,0 \times 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ ). Posteriormente, foi removido 100  $\mu\text{L}$  de cada uma das suspensões bacterianas com o auxílio de uma alça de platina e foi transferida para um tubo de ensaio de maneira a obter uma suspensão com turvação entre 0,5 e 1,0 da escala MacFarland. E o volume de uso nas microplacas foi de 25 $\mu\text{L}$ .

#### **4.11. Obtenção dos Metabólitos Fúngicos – Meio Líquido**

Para a produção e a extração dos metabólitos secundários fúngicos, estes foram efetuadas em condições assépticas (Câmara de Fluxo Laminar), e com o auxílio de uma lâmina de bisturi foi realizada a inoculação do fungo em Erlenmeyer de 125 ml, contendo 100 ml do meio de pupunha e em seguida a sua incubação no shaker sob agitação de 150 rpm a 28°C.

Os extratos foram filtrados (Filtração Simples – Kitassato á Vácuo) em membrana de malha 0,45µm no período de maior produção de biomassa micelial de crescimento e foram armazenados em Erlenmeyer devidamente identificados e lacrados.

#### **4.12. Teste do Potencial Antimicrobiano**

##### **4.12.1. Extrato Carpóforo e Metabólitos Secundário**

Para avaliação da atividade antimicrobiana ‘*in vitro*’ do extrato do fungo amazônico *Lentinus crinitus* foi utilizado o método de difusão em ágar (Nunan et al., 1985; NCCLS, 2003), utilizando discos estéreis de 6 mm de diâmetro. O inóculo foi padronizado, transferindo os microrganismos com 24 horas de cultivo a 37 °C em crescimento para um tubo de ensaio esterilizado com 10 ml de água destilada para obter uma turbidez equivalente na escala MacFarland entre 0,5 e 1,0 de transmitância em espectrofotômetro a 580 nm.

Em placas de Petri contendo 25 ml do meio de ágar MH foram inoculados 100 µL da suspensão da bactéria e com um *swab* estéril a inoculação foi feita em forma de estrias na superfície do ágar em três direções, girando a placa após cada estria. Posteriormente, a tal procedimento prepara-se 4 (quatro) orifícios circulares de 1cm de diâmetro, formando três poços equidistantes e um no centro da placa para o controle negativo.

Uma alíquota do extrato (100 µL) e negativo Dimetilsulfóxido – DMSO foi depositado na cavidade e após 30 minutos será incubado. Após 18 a 24 horas de incubação, as placas foram examinadas para verificar o crescimento, a presença de contaminantes e a definição do halo de inibição.

#### **4.13. Análise Estatística**

Para análise estatística dos dados coletados foi usado o software Bioestat 5.0 para obter os parâmetros descritivos (Média, desvio padrão, variância) e correlação entre as variáveis. Para a inferência sobre a relação entre as variáveis a serem mensuradas foi utilizado o teste ANOVA e para contraste das médias o teste de Tukey.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. PRODUÇÃO DE BIOMASSA SOB CONDIÇÃO DE AGITAÇÃO

Em valores absolutos *L. crinitus* apresentou a maior produção média de biomassa no meio suplementado com pupunha no período de vinte dias de crescimento, seguido dos meios de cará e macaxeira como demonstrado na **tabela 4**. Ressalta-se, entretanto, que no teste de Tukey para diferença mínima significativa entre as médias, verificou-se que ao nível de 95% de probabilidade não há diferença na produção de biomassa entre esses meios analisados.

**Tabela 4**

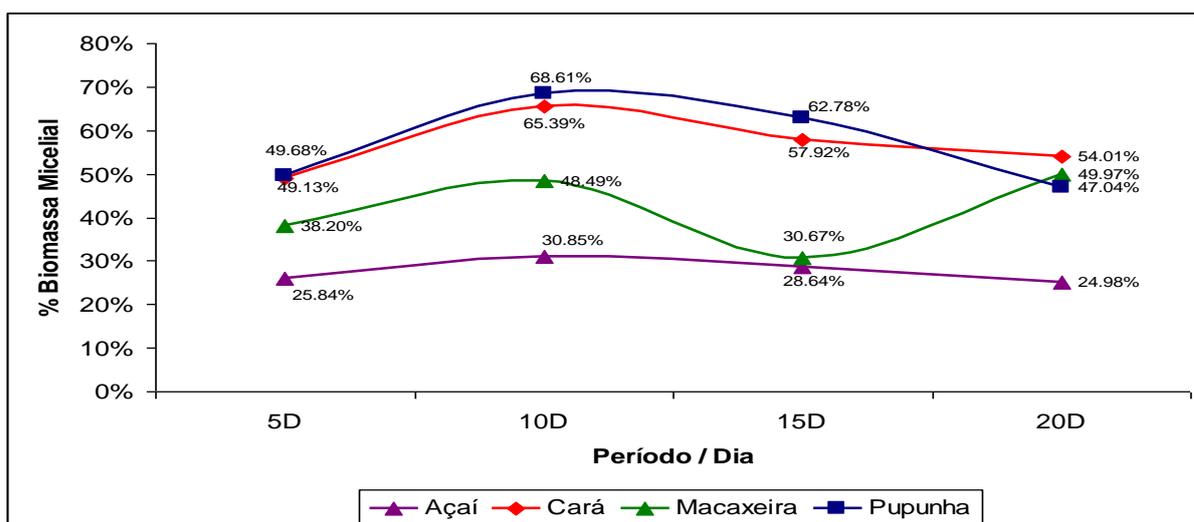
Taxa e percentual de produção de biomassa por *L. crinitus* após vinte dias de crescimento em diferentes meios de cultura.

	Meios de Cultura			
	Açaí	Cará	Macaxeira	Pupunha
Taxa Média	1,38	2,83	2,09	2,85
x (% biomassa)	27,6 <sup>(a)</sup>	56,6 <sup>(b)</sup>	41,8 <sup>(b)</sup>	57,0 <sup>(b)</sup>

\* Letras iguais significam que não há diferença estatística ao nível de 95% de probabilidade.

Em todos os meios *L. crinitus* apresentou pico máximo de produção de biomassa no 10º dia de crescimento, seguindo um padrão de decréscimo até o final do experimento. Exceção ocorreu para o meio suplementado com macaxeira onde houve um acréscimo na produção de biomassa no final do período do experimento (**Figura 14**).

A taxa média de produção de biomassa, definida como a razão entre a média da produção e o período total de crescimento, foi maior nos meios suplementados com pupunha e cará, com taxas de 2,85 e 2,83 respectivamente na **Tabela 4**. O meio suplementado com açaí foi o que apresentou a menor taxa média de produção de biomassa no período de vinte dias de crescimento.



**Figura 14:** Padrão de produção de biomassa por *L. crinitus* em diferentes períodos de crescimento e meio de cultura.

Por outro lado, a taxa de produção de biomassa mensurada em diferentes intervalos no período total do experimento, mostrou-se maior no 5º dia para todos os meios testados mostrando a partir desse ponto um decréscimo até o final do experimento, com exceção do meio acrescido de macaxeira onde ocorreu um aumento na taxa de produção de biomassa no 20º dia de crescimento (**Tabela 5**).

**Tabela 5**

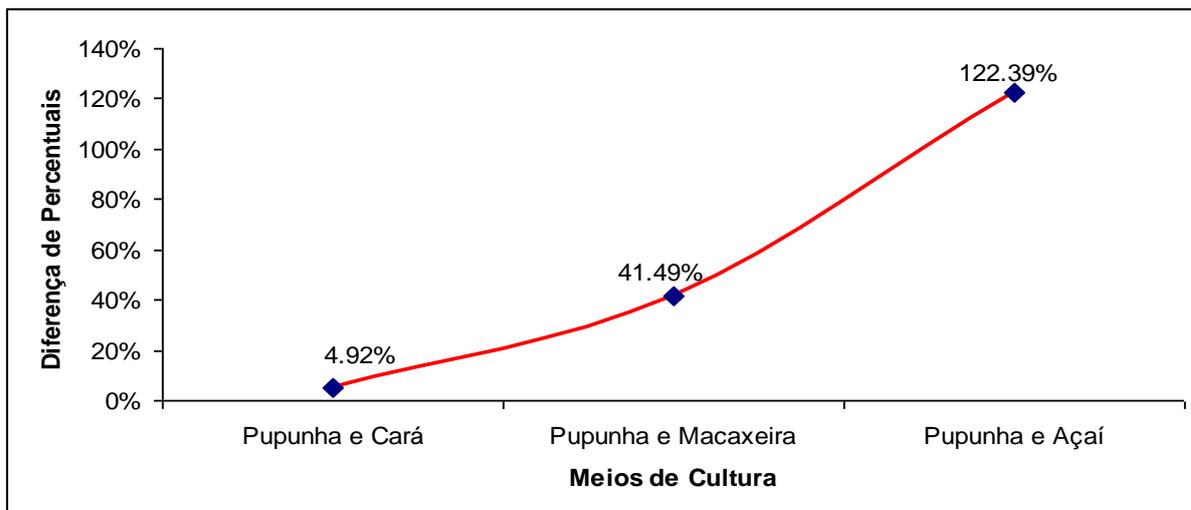
Taxa de produção de biomassa por *L. crinitus* em diferentes períodos de crescimento.

Meio de Cultura	Período / Dia			
	5 D	10 D	15 D	20 D
Açai	5,1	3,0	1,9	1,24
Cará	9,8	6,5	3,8	2,7
Macaxeira	7,6	4,8	2,0	2,5
Pupunha	9,9	6,8	4,2	2,4

Constata-se ainda na **tabela 5** que, em todos os meios testados *L. crinitus* apresentou maior produção de biomassa no 5º dia de crescimento, decrescendo após esse período até o final do experimento. Contrário ao padrão da taxa de produção, para o meio suplementado com macaxeira que apresentou um acréscimo de produção de biomassa no final do período do experimento.

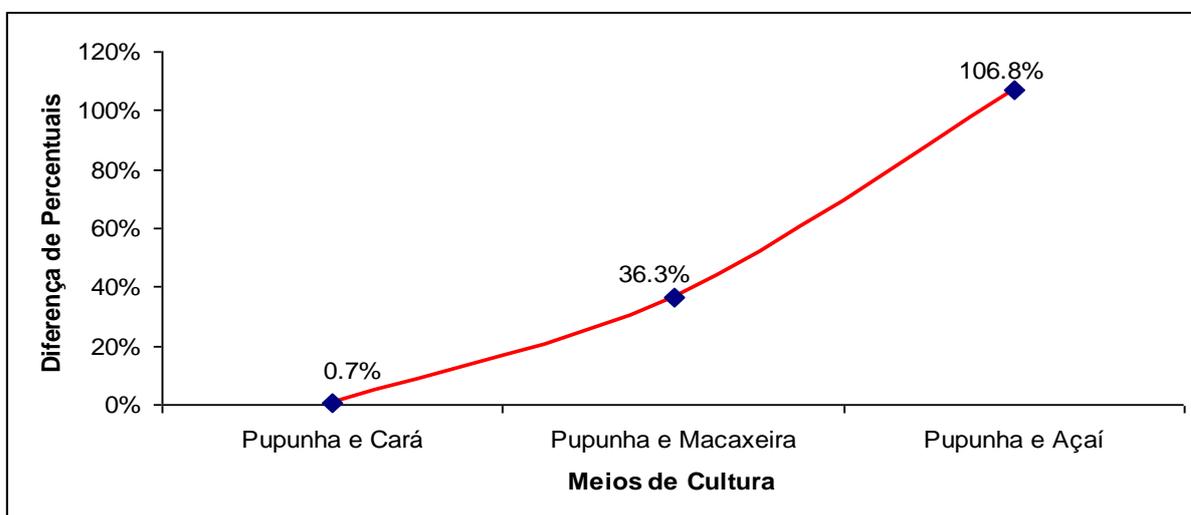
A **Figura 15** mostra a diferença, em porcentagem, da produção de biomassa no meio suplementado com pupunha em relação aos outros meios testados. De modo geral, a produção de biomassa média da pupunha foi apenas 4.92 % maior do que no meio suplementado com

cará. Por outro lado, a biomassa média da pupunha apresentou um percentual bem maior em relação ao meio de macaxeira e açaí, 41.49% e 122.39 % respectivamente.



**Figura 15:** Percentual de diferença entre o meio suplementado com pupunha e os demais meios testados no 10º dia de crescimento.

O percentual de diferença na média da produção de biomassa por *L. crinitus* para o período de vinte dias de crescimento em meio suplementado com pupunha em relação ao meio de açaí, cará e macaxeira foi de 106 %, 0.7% e 36.6 % respectivamente como pode se observar na (Figura 16).



**Figura 16:** Percentual de diferença entre o meio suplementado com pupunha e os demais meios testados no 20º dia de crescimento.

A porcentagem de massa micelial produzida foi determinada no final do experimento a cada cinco dias de incubação. Em termos de valores absolutos verificou-se que a menor produção observada foi no meio de açaí (Tabela 6).

**Tabela 6**

Parâmetros descritivos da massa micelial dos fungos testados no período de 20 dias.

Meio de Cultura	Média Aritmética	Desvio Padrão	Variância	Coefficiente de Variação
<b>Açaí</b>	27,57	2,68	7,19	9,73%
<b>Cará</b>	52,02	6,86	47,17	12,13%
<b>Macaxeira</b>	41,82	9,09	82,74	21,75%
<b>Pupunha</b>	56,61	10,34	106,96	18,14%

O teste estatístico ANOVA foi feito para verificar se existe diferença entre os meios suplementados com açaí, cará, macaxeira e pupunha. Os resultados mostraram que ao nível de 95% de probabilidade os meios com açaí/cara e açaí/pupunha apresentaram diferença estatística entre si. O Teste de Tukey para verificar diferença mínima significativa mostra que esta diferença ocorre entre os meios de cultura testados (**Tabela 7 e 8**).

**Tabela 7**

Análise de variância do crescimento micelial em diferentes meios de cultura.

Fontes de Variação	G.L	S.Q	Q.M	F	(p)
<b>Tratamento</b>	3	23.6 e <sup>+02</sup>	787.706	12.9089	0.0007*
<b>Resíduo</b>	12	732.242	61.02		

\*Significativo ao nível 99% (p<0,05 significativo).

**Tabela 8**

Análise de Tukey do crescimento micelial em diferentes meios de cultura.

<b>Meios de Cultura</b>	<b>Diferença</b>	<b>Q</b>	<b>(p)</b>
<b>Açaí/ Cará</b>	29.03	7.43	< 0.01*
<b>Açaí/Pupunha</b>	29.44	7.53	< 0.01*
<b>Açaí/Macaxeira</b>	14.2525	3.6491	ns
<b>Cará/Macaxeira</b>	14.785	3.7854	ns
<b>Cará/Pupunha</b>	0.41	0.105	ns
<b>Macaxeira/Pupunha</b>	15.195	3.8904	ns

\*Significativo ao nível 95% (p&lt;0,05 significativo)

ns – Não significativo.

Os dados indicaram que na condição de agitação, o meio suplementado de Pupunha foi o que apresentou o melhor resultado e o meio suplementado de Açaí mostrou a menor produção de biomassa micelial do fungo *L. crinitus*, nos experimentos realizados.

## 5.2. BIOMASSA MICELIAL SOB CONDIÇÃO ESTACIONÁRIA

Em valores absolutos a produção média de biomassa micelial do fungo *L. crinitus* foi maior no meio suplementado com pupunha e menor naquele acrescido de açai como mostrado na tabela (**Tabela 9**). Teste de Tukey, por outro lado, para a diferença mínima significativa das médias, evidenciou ao nível de 1% de significância que não existe diferença em porcentagem de biomassa produzida no meio suplementado com açai em relação àquele com cará e macaxeira. Entretanto, a produção de biomassa em meio suplementado com pupunha é estatisticamente maior em relação aos outros suplementos testados.

**Tabela 9**

Produção média de biomassa produzida por *L. crinitus* durante vinte dias de crescimento em meio de cultura suplementado com produto regional.

	Meios de Cultura			
	Açai	Cará	Macaxeira	Pupunha
x (% biomassa)	12.64 <sup>(a)</sup>	20.48 <sup>(a,c)</sup>	22.83 <sup>(a,c,d)</sup>	59.40 <sup>(b,e,f)</sup>
D.P	3,13	3,14	5,22	9,82

\*Letras iguais significam que não existe diferença estatística ( $p>0,01$ ) ao nível de 1% de significância.

O meio de cultura suplementado com pupunha foi o que apresentou maior produção de biomassa fúngica para o período de 20 dias de incubação seguido daquele suplementado com cará, apresentado na (**Tabela 9**), com pico máximo de produção 46 % maior do que aquele acrescido de cará.

De modo geral, os meios de pupunha e de açai apresentaram um padrão contínuo de produção de biomassa micelial durante o período de crescimento, contrário àquele suplementado com macaxeira onde após o décimo quinto dia de crescimento ocorreu um decréscimo na produção de biomassa demonstrado na (**Figura 17**). Dentre os suplementos testados o açai foi o que apresentou menor produção de biomassa.

Ressalta-se, que no meio suplementado com pupunha após cinco dias de crescimento *L. crinitus* apresentou produção de biomassa 2 vezes maior do que aquele com cará e macaxeira e 5,4 vezes maior em relação aquele suplementado com açaí como pode-se constatar na (Figura 17).

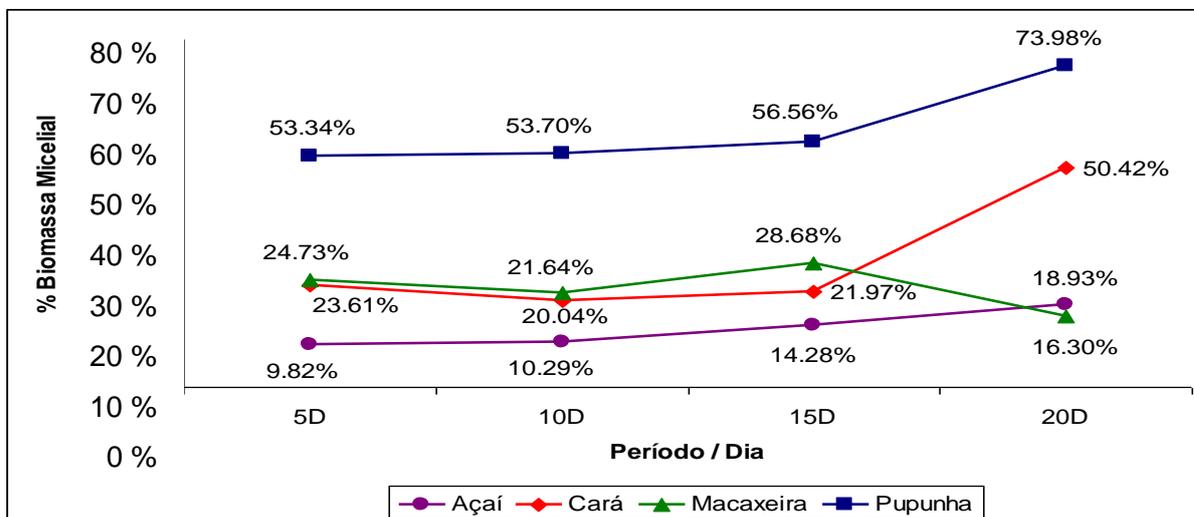


Figura 17: Variabilidade da produção de biomassa micelial no período de experimento.

A taxa de produção de biomassa mensurada em diferentes intervalos do período total do experimento mostrou-se maior no quinto dia de crescimento para todos os meios testados mostrando a partir desse ponto um decréscimo até o final do experimento, com exceção do meio acrescido de cará que apresentou um acréscimo no seu crescimento de 2,5% de produção de biomassa no período de 20 dias de produção como se pode constatar na (Figura 18 e 19).

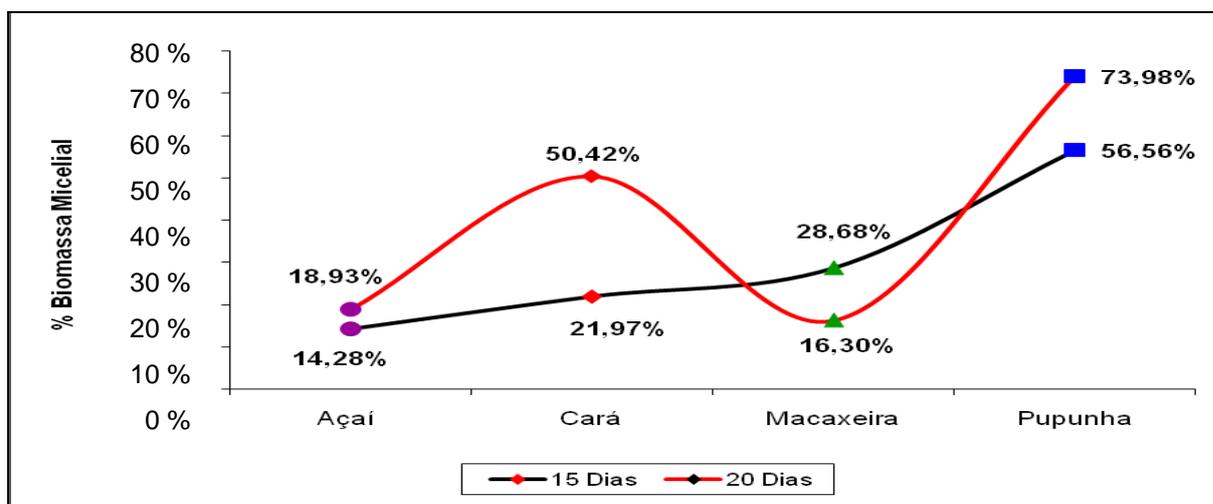
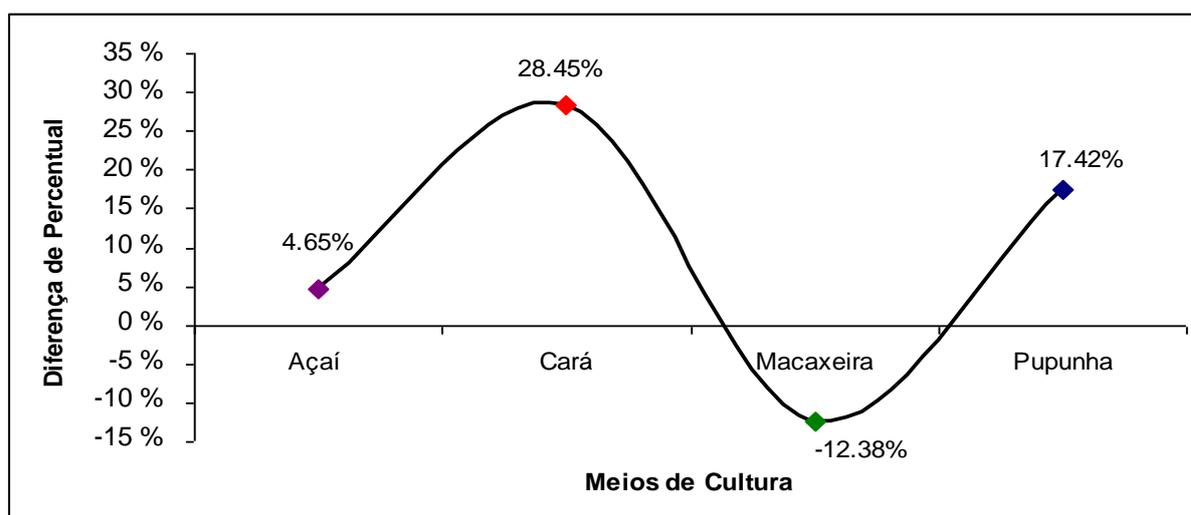


Figura 18: Produção de biomassa micelial no 20º dia de inoculação em comparação com o 15º dia sob condição estacionária.



**Figura 19:** Diferença entre os meios no período entre 15º e 20º dia sob condição de estacionária.

Constata-se na **Tabela 10**, que em todos os períodos testados o fungo *L. crinitus* apresentou maior produção de biomassa no meio suplementado com pupunha, sob a condição estacionária. Verifica-se ainda nesta tabela que a produção da biomassa de *L. crinitus* suplementado com pupunha apresentou um decréscimo a partir do 5º dia ao 20º dia testado.

**Tabela 10**

Taxa de produção de biomassa por *L. crinitus* em diferentes períodos de crescimento.

Meio de Cultura	Período / Dia			
	5 D	10 D	15 D	20 D
Açaí	1,9	1,0	0,9	0,9
Cará	4,7	2,0	1,4	2,5
Macaxeira	4,9	2,1	1,9	0,8
Pupunha	10	5,3	3,7	3,6

O teste estatístico ANOVA foi feito para verificar se existe diferença entre os meios suplementados com açaí, cará, macaxeira e pupunha. Os resultados mostraram que ao nível de 95% de probabilidade os meios com açaí/pupunha, cará/pupunha e macaxeira/pupunha apresentaram diferença estatística entre si. O teste para verificar diferença mínima significativa (Tukey) mostra que esta diferença ocorre entre os meios de cultura testados (**Tabela 11 e 12**).

**Tabela 11**

Análise de variância do crescimento micelial em diferentes meios de cultura sob condição estacionária.

Fontes de Variação	G.L	S.Q	Q.M	F	(p)
<b>Tratamento</b>	3	47.6 e+02	15.9 e+02		
				18,2319	0,0002*
<b>Resíduo</b>	12	10.4 e+02	86,953		

\*Significativo ao nível 99% ( $p < 0,05$  significativo).

**Tabela 12**

Análise de Tukey do crescimento micelial em diferentes meios de cultura sob condição estacionária.

Meios de Cultura	Diferença	Q	(p)
<b>Açaí/Pupunha</b>	46,065	9,88	< 0.01*
<b>Cará/Pupunha</b>	30,385	6,517	< 0.01*
<b>Macaxeira/Pupunha</b>	36,5567	7,8407	< 0.01*

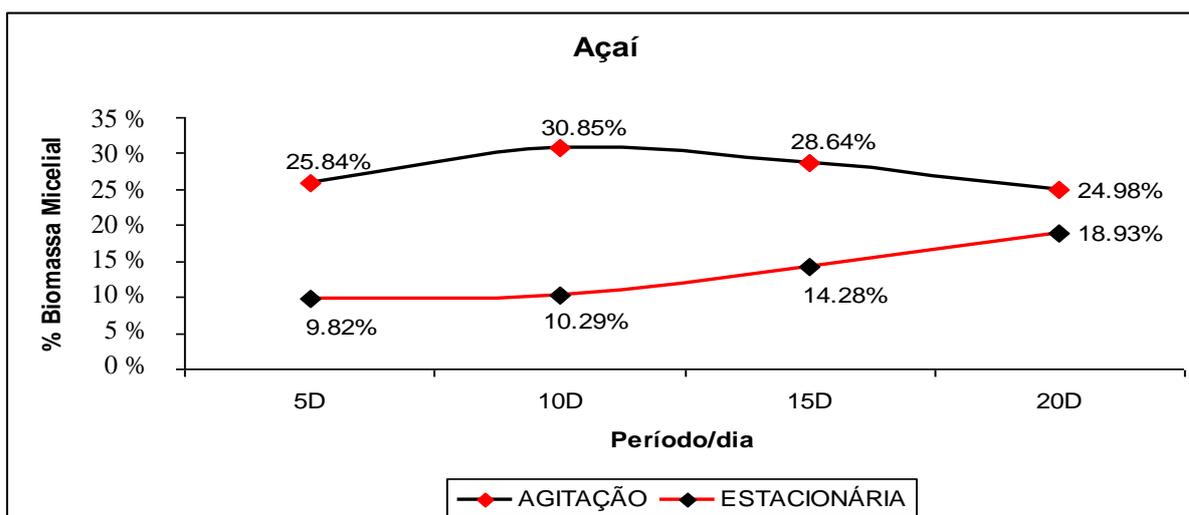
\*Significativo ao nível 95% ( $p < 0,05$  significativo)

Em meio à análise realizada os dados indicaram que na condição estacionária, o meio suplementado com pupunha foi o que apresentou o melhor resultado em oposição ao meio suplementado com o açaí que obteve a menor produção de biomassa micelial do fungo *L. crinitus* no período testado.

### 5.3. PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICELIAL: CONDIÇÃO ESTACIONÁRIA *versus* AGITAÇÃO

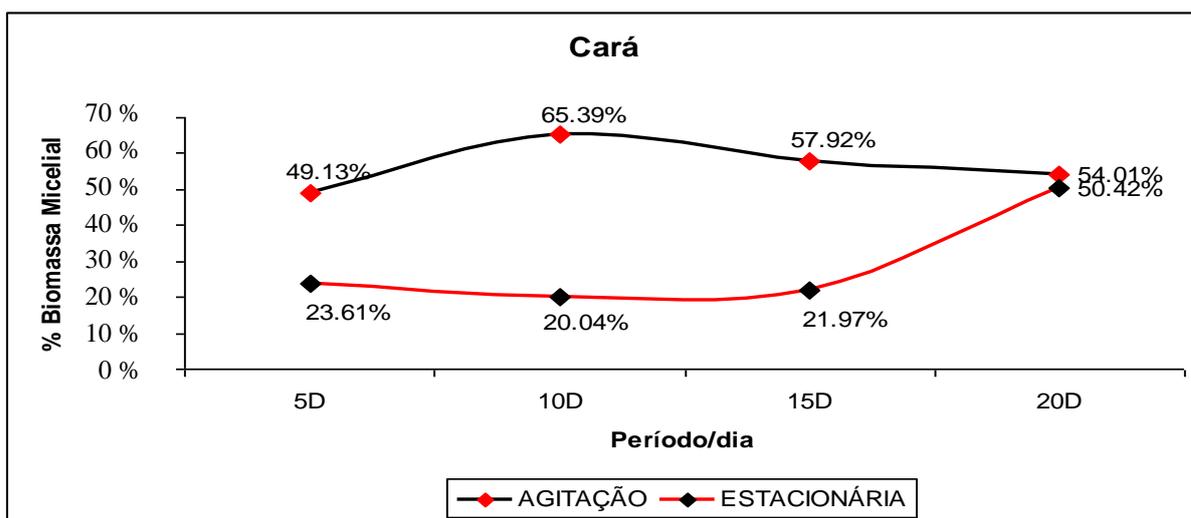
De modo geral, a produção de biomassa mostrou-se diferenciada nas condições de crescimento testadas, sendo que sob agitação ocorreu à maior produção de biomassa fúngica. Sob condição de agitação, por exemplo, o meio suplementado com açaí e cará a biomassa produzida foi maior do que sob condição estacionária. Ressalta-se, entretanto, que após o período de 15 dias de crescimento ambos os meios apresentaram decréscimo na produção de biomassa sob condição de agitação, enquanto que para a condição estacionária ocorreu o inverso.

Após cinco dias de crescimento, a produção de biomassa no meio suplementado com açaí sob condição de agitação foi 163% maior do que naquele estacionário mantendo percentual similar até o décimo quinto dia, quando esse percentual decresce até alcançar 31,9% no último dia de crescimento como mostrado na (Figura 20).



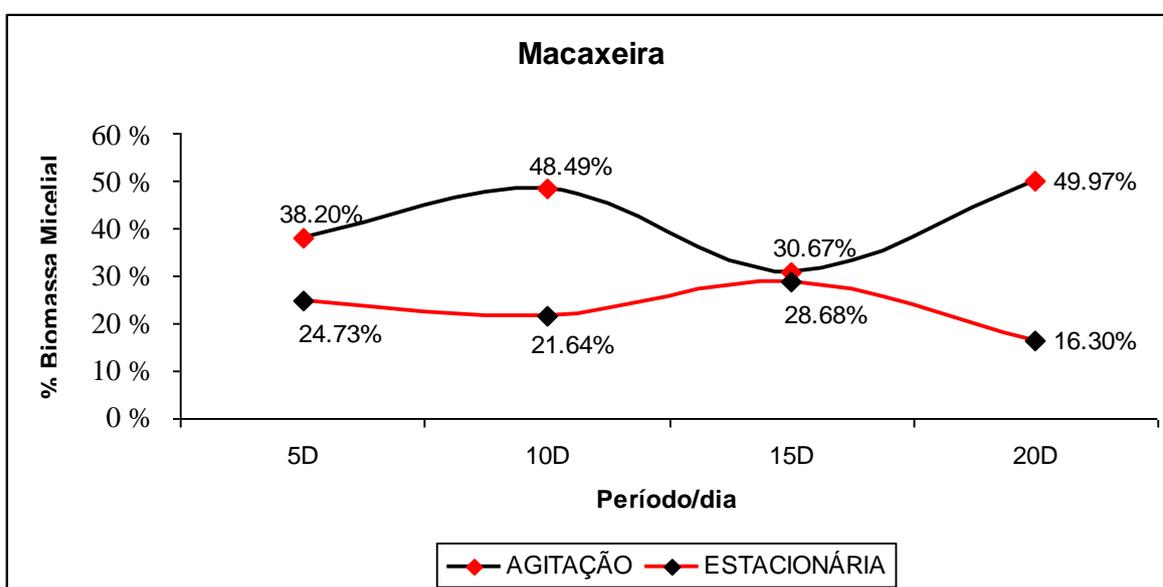
**Figura 20:** Comparação da produção de biomassa micelial sob condições de agitação e estacionária no meio de açaí.

Comportamento similar ocorreu para o meio suplementado com cará sendo que neste caso a diferença na produção de biomassa mensurada no último dia do experimento mostrou um percentual menor (7%) entre as duas condições quando comparado o mesmo período para o meio suplementado com açaí (Figura 21).



**Figura 21:** Comparação da produção de biomassa micelial sob condições de agitação e estacionária no meio de cará.

Em relação ao meio de macaxeira o padrão de produção de biomassa mostrou-se similar àquele do açaí e cará, exceção ocorrendo após o período de quinze dias de crescimento, onde se observou um aumento de (62%) na produção sob agitação e um decréscimo de (43%) sob condição estacionária (**Figura 22**).

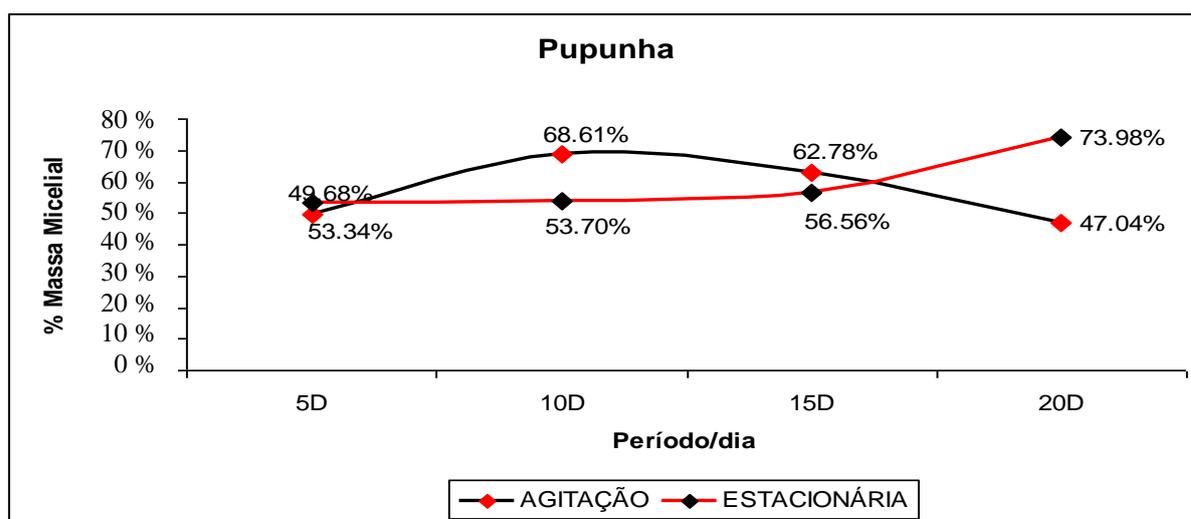


**Figura 22:** Comparação da produção de biomassa micelial sob condições de agitação e estacionária no meio da macaxeira.

De modo geral, no meio suplementado com pupunha e sob agitação foi onde ocorreu o maior percentual de biomassa quando comparado com os outros meios testados. A produção de biomassa neste meio seguiu o mesmo padrão dos outros meios tanto sob agitação quanto sob condição estacionária, exceção do meio de macaxeira após o décimo quinto dia (**Figura 23**).

No meio suplementado com pupunha, diferentemente dos outros meios, a maior produção de biomassa (73.9%) ocorreu no fim do período do experimento (vintes dias) na condição estacionária.

Em síntese, de todos os meios testados *Lentinus crinitus* apresentou maior produção de biomassa em meio suplementado com pupunha crescendo bem tanto sob condição de agitação como na estacionária. Nesta, a maior produção de biomassa ocorreu no vigésimo dia de crescimento enquanto que sob condição de agitação ocorreu no décimo dia.



**Figura 23:** Comparação da produção de biomassa micelial sob condições de agitação e estacionária no meio da pupunha.

Em todos os experimentos constatou-se que o meio suplementado com pupunha foi o que mais produziu biomassa tanto sob a condição estacionária como agitação para o período de 20 dias.

#### 5.4. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LACASE SOB CONDIÇÃO DE AGITAÇÃO

O resultado da **tabela 13** mostra a média da atividade de lacase de *Lentinus crinitus* em fermentação sob condição de agitação. O meio de cará foi onde ocorreu em média a maior atividade de lacase seguido do meio de açaí, macaxeira e pupunha, nesta seqüência. A maior atividade ( $27,8 \text{ U.L}^{-1}$ ) também ocorreu no meio de cará, no 15º dia de crescimento enzimático.

**Tabela 13**

Média da atividade de lacase de *L. crinitus* em meio de cultura líquido sob condição de agitação no período de vinte dias de crescimento.

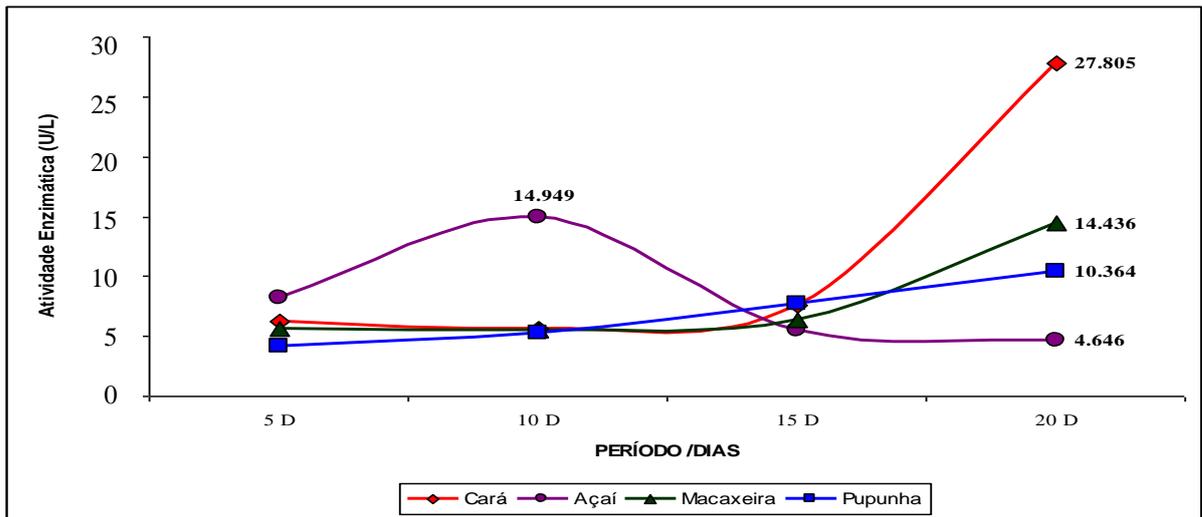
Meio de cultura	Atividade de lacase (U/L)
Cará	<b>11,812</b> (5,63 – 27,8)
Açaí	<b>8,344</b> (4,64 – 14,94)
Macaxeira	<b>7,981</b> (5,52 – 14,43)
Pupunha	<b>6,867</b> (4,19 – 10,36)

(Valores em parênteses indicam o mínimo e o máximo).

Nos primeiros 5 dias de incubação o meio de açaí apresentou uma atividade enzimática 24.13% maior em relação ao meio de cará e 49% e 31.3 % maior do que o meio de pupunha e macaxeira, respectivamente ( **Figura 24**).

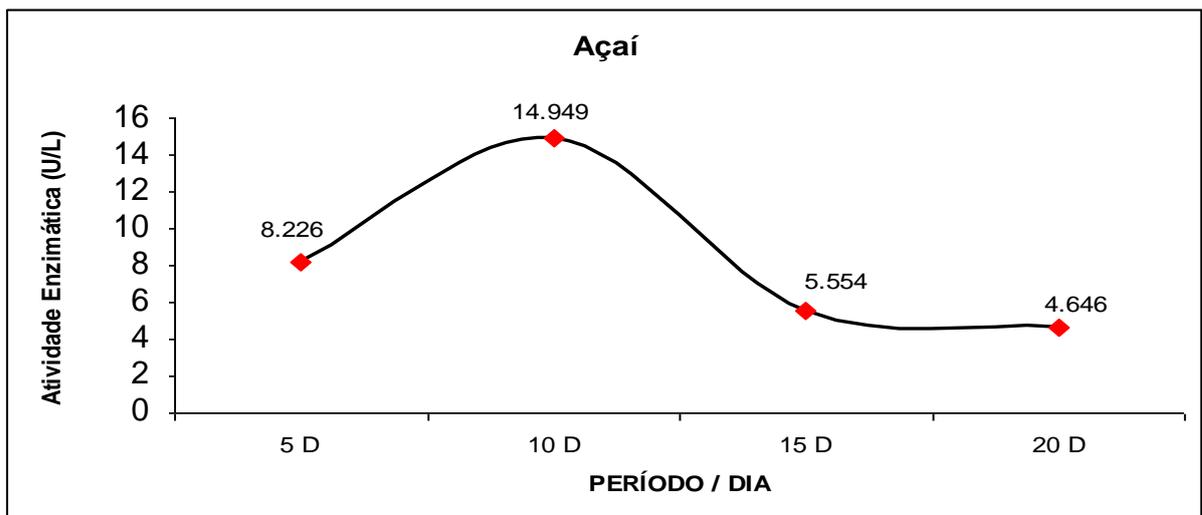
No período do 10º dia de ensaios realizados verificou-se que o meio de açaí apresentou uma progressão de 6.72 U/L de atividade em relação aos 5 dias iniciais de incubação e que os demais meios mantiveram-se entre 5.20 U/L ~ 5.62U/L não demonstrando assim uma diferença significativa na produção enzimática.

Por outro lado, no 15º e 20º dia a atividade enzimática da Lacase, o meio de açaí apresentou um decréscimo na sua produção respectivamente de 9.39 U/L e 0.91 U/L



**Figura 24:** Atividade de lacase em diferentes meios de cultura e períodos de crescimento sob condição de agitação.

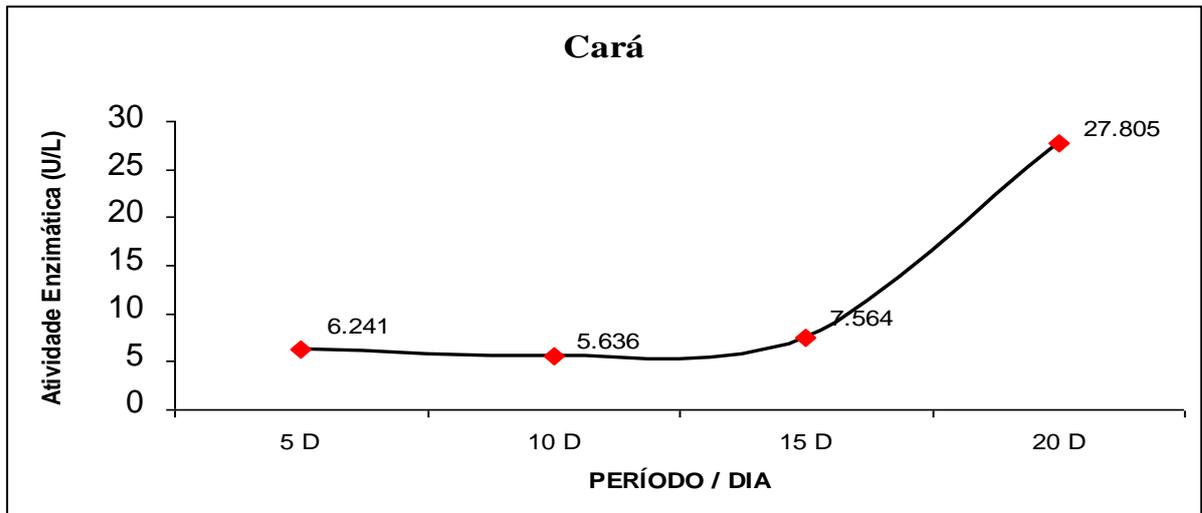
De modo geral, a atividade de lacase durante o período de experimento mostrou um padrão crescente para todos os meios com exceção do meio de açai (**Figura 25**).



**Figura 25:** Atividade da lacase do meio açai sob condição de agitação.

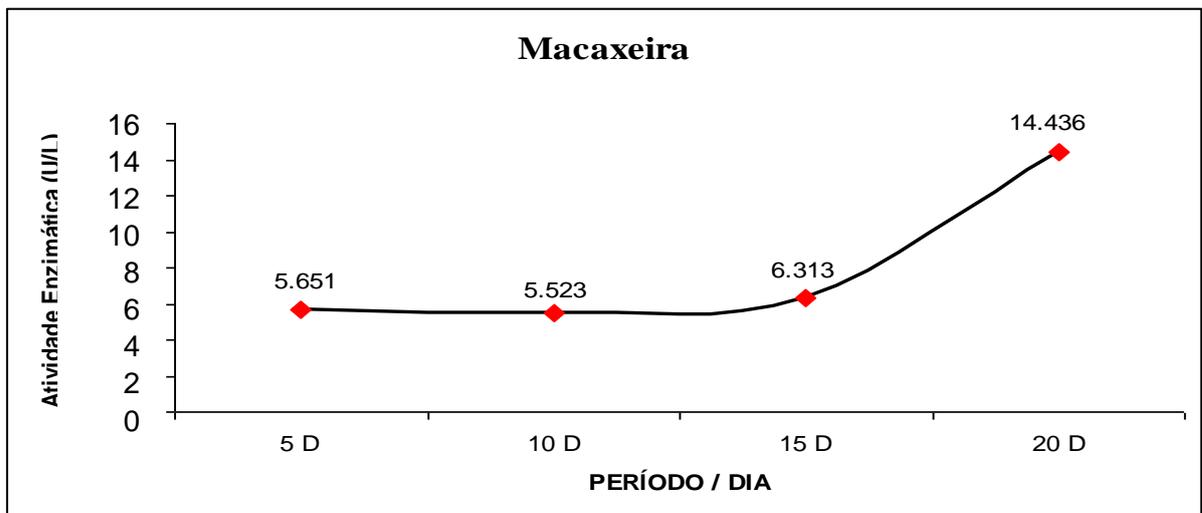
Ressalta-se por outro lado, que no meio suplementado de açai após cinco dias de crescimento o fungo *L. crinitus* apresentou um pico enzimático no décimo dia, sendo seguido por um decréscimo até o final do experimento.

Conforme comentado anteriormente, sob condição de agitação o meio de cará foi o que apresentou a maior atividade de lacase após vinte dias de crescimento. Nesse meio de cultura, *Lentinus crinitus* mostra uma atividade enzimática quase que constante até o décimo-quinto dia, quando a partir de então ocorre um aumento de 3,6 vezes na atividade enzimática de lacase nos últimos cinco dias do experimento (**Figura 26**).

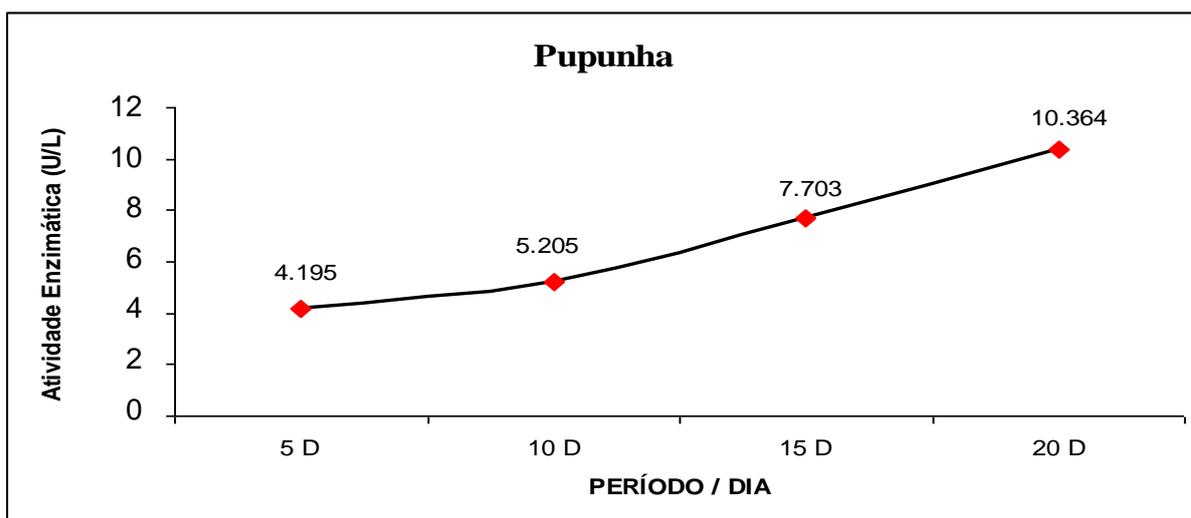


**Figura 26:** Atividade da lacase do meio cará sob condição de agitação.

Nos outros meios testados, com exceção do meio de açaí, o crescimento após o 15º dia foi de 2,3 e 1,3 vezes maior para o meio de macaxeira e pupunha respectivamente (**Figura 27 e 28**).



**Figura 27:** Atividade da lacase do meio macaxeira sob condição de agitação.



**Figura 28:** Atividade da lacase do meio de pupunha sob condição de agitação.

**Tabela 14**

Parâmetro descritivo da atividade enzimática do fungo *L. crinitus* testado em meios de cultura líquida sob condição de agitação.

Meio de Cultura	Média Aritmética	Desvio Padrão	Variância	Coefficiente de Variação
Açaí	8.344	4.6583	21.7	55.83%
Cará	11.812	10.6927	114.334	90.53%
Macaxeira	7.981	4.3174	18.64	54.10%
Pupunha	6.867	2.7586	7.6099	40.17%

**Tabela 15**

Análise de variância da lacase sob condição de agitação em diferentes meios de cultura.

Fontes de Variação	G.L	S.Q	Q.M	F	(p)
Tratamento	3	54.705	18.235		
				0.4495	0.7251*
Resíduo	12	486.849	40.571		

\*Não significativo ao nível 95% ( $p < 0,05$  significativo).

O teste estatístico ANOVA foi feito para verificar se existe diferença entre os meios suplementados com açaí, cará, macaxeira e pupunha. De modo geral, não houve diferença estatística na atividade da lacase entre os meios testados (**Tabela 14 e 15**).

## 5.5. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LACASE SOB CONDIÇÃO ESTACIONÁRIA

A **tabela 16** mostra a média da atividade de lacase de *Lentinus crinitus* em fermentação sob condição estacionária de crescimento. O meio de macaxeira foi onde ocorreu em média a maior produção de lacase seguido do meio de açaí, pupunha e cará nesta seqüência de produção enzimática. A maior atividade enzimática (**15.16 U.L<sup>-1</sup>**) também ocorreu no meio de macaxeira no décimo quinto dia de crescimento enzimático.

**Tabela 16**

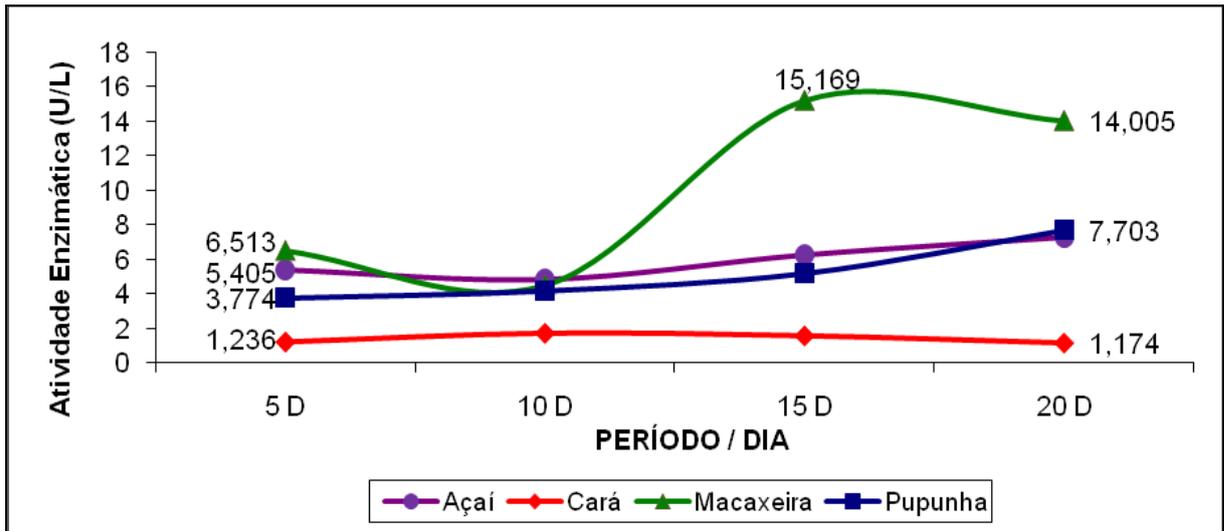
Média da atividade de lacase de *L. crinitus* em meio de cultura líquido sob condição estacionária no período de vinte dias de crescimento micelial.  
(Valores em parênteses indicam o mínimo e o máximo).

Meio de cultura	Atividade de lacase (U/L)
Macaxeira	<b>10,05</b> (4,51 – 15,16)
Açaí	<b>5,94</b> (4,85 - 7,27)
Pupunha	<b>5,21</b> (3,77 – 7,70)
Cará	<b>1,43</b> (1,17 – 1,73)

Nos primeiros 5 dias de incubação o meio de macaxeira apresentou uma atividade enzimática 17,01 % maior em relação ao meio de açaí 42,05 % e 81,02 % maior do que o meio de pupunha e cará, respectivamente (**Figura 29**).

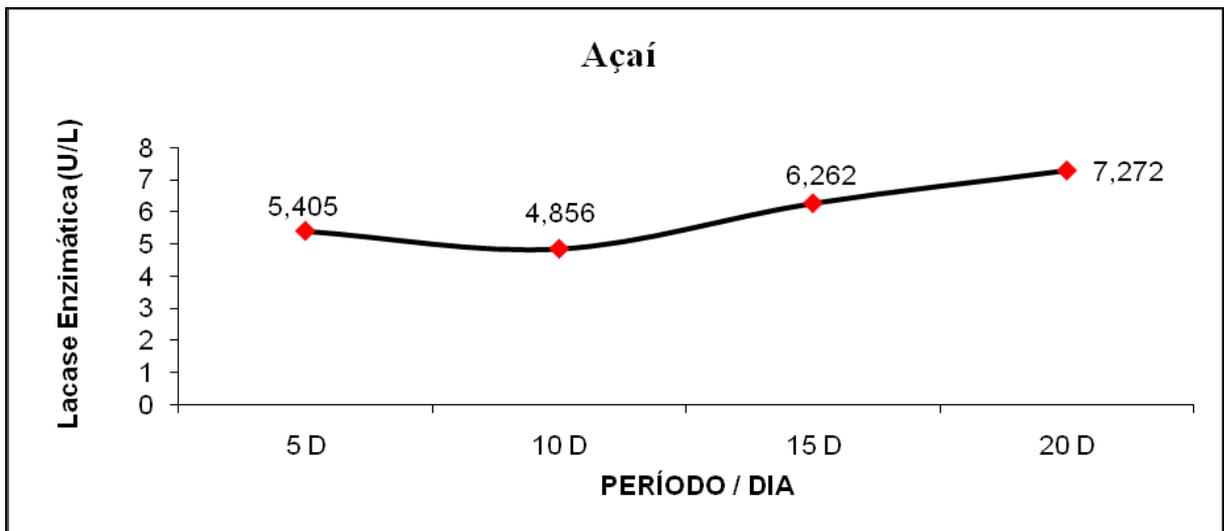
No período do 10º dia de ensaios realizados verificou-se que o meio de pupunha apresentou uma progressão de 0,42 U/L de atividade em relação aos 5 dias iniciais de incubação seguido do meio de cará com 0,49 U/L. Em relação aos demais meios observou-se um decréscimo de produção enzimática respectivamente de -1,99U/L para o meio de macaxeira e -0,54 U/L para o meio de açaí.

Por outro lado, no 15º dia a atividade enzimática da lacase, no meio de macaxeira apresentou um acréscimo na sua produção respectivamente de 10.65 U/L sendo esse o melhor resultado de produção enzimática para esse meio neste período. Vale ressaltar que no 20º dia de atividade este meio apresentou um decréscimo de -1,16U/L (**Figura 29**).

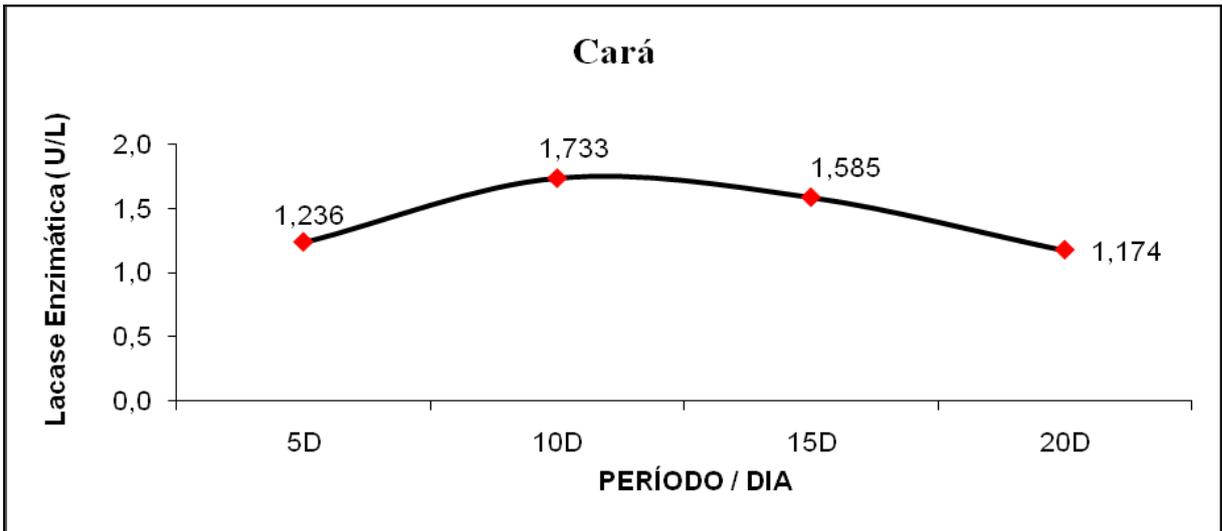


**Figura 29:** Atividade de lacase em diferentes meios de cultura e período de crescimento sob condição estacionária.

De modo geral, a atividade de lacase durante o período de experimento mostrou um padrão crescente para os meios de açai e pupunha com exceção do meio de cará e macaxeira que apresentou variações na sua produção enzimática (**Figura 30 e 31**).

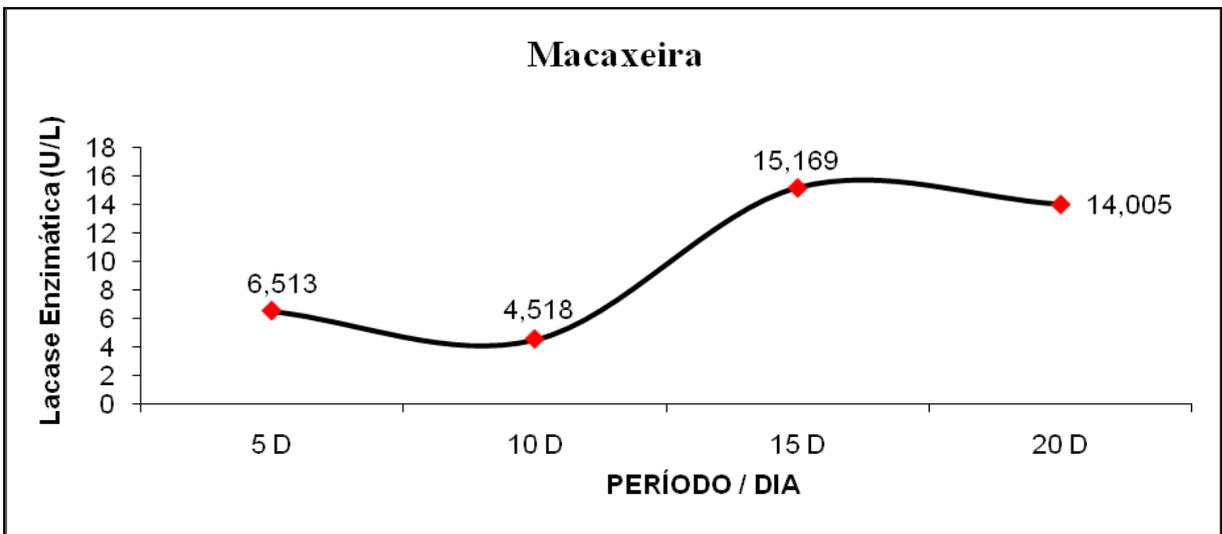


**Figura 30:** Análise enzimática lacase - meio de açai sob condição estacionária.

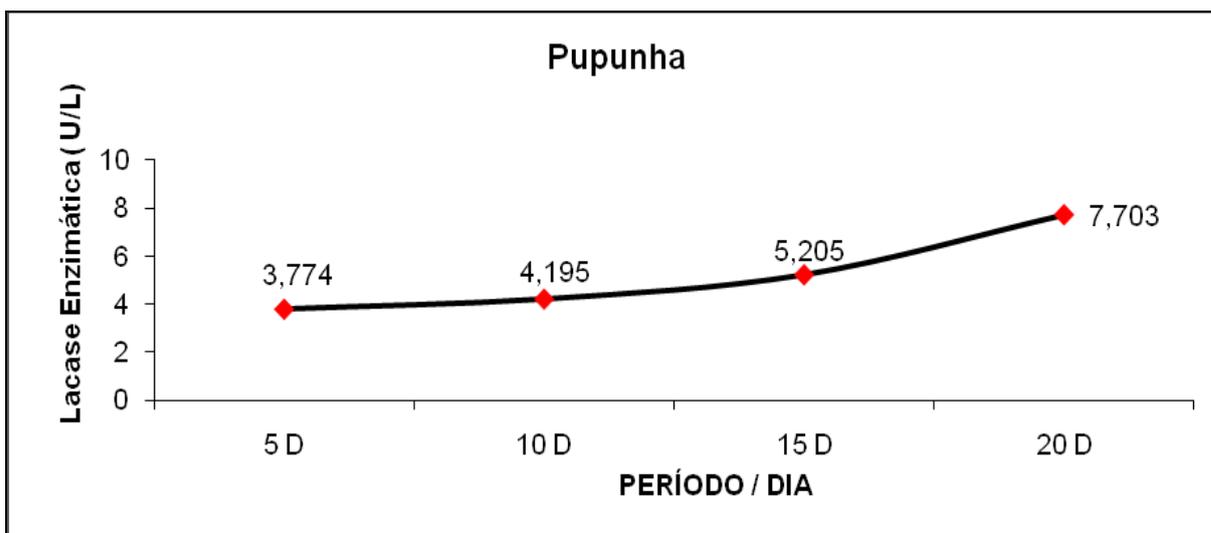


**Figura 31:** Análise enzimática lacase - meio de cará sob condição estacionária.

Ressalta-se por outro lado, que no meio suplementado de macaxeira após cinco dias de crescimento o fungo *L. crinitus* apresentou um pico enzimático no décimo quinto dia, sendo seguido por um decréscimo no final do experimento (**Figura 32**), em relação ao meio de pupunha nas mesmas condições apresentou um crescimento constante (**Figura 33**).



**Figura 32:** Análise enzimática lacase - meio de macaxeira sob condição estacionária.



**Figura 33:** Análise enzimática lacase - meio de pupunha sob condição estacionária.

O teste estatístico ANOVA foi feito para verificar se existe diferença entre os meios suplementados com açaí, cará, macaxeira e pupunha. Os resultados mostraram que ao nível de 95% de probabilidade os meios de cará/macaxeira apresentaram diferença estatística entre si. O Teste de Tukey foi feito para verificar diferença mínima significativa mostra que esta diferença ocorre entre os meios de cultura testados (**Tabela 17 e 18**).

**Tabela 17**

Análise de variância do crescimento micelial em diferentes meios de cultura sob condição estacionária.

Fontes de Variação	G.L	S.Q	Q.M	F	(p)
<b>Tratamento</b>	3	149.73	49.91	6.1223	0.0092*
<b>Resíduo</b>	12	97.825	8.152		

\*Significativo ao nível 99% (p<0,05 significativo).

**Tabela 18**

Análise de Tukey do crescimento micelial em diferentes meios de cultura sob condição estacionária.

<b>Meio De Cultura</b>	<b>Diferença</b>	<b>Q</b>	<b>(p)</b>
<b>Cará/Macaxeira</b>	8,6188	6,0373	< 0.01*
<b>Açaí/Cará</b>	4,5163	3,1635	ns
<b>Açaí/Pupunha</b>	0,7295	0,511	ns
<b>Cará/Pupunha</b>	3,7868	2,6525	ns
<b>Macaxeira/Pupunha</b>	4,832	3,3847	ns
<b>Açaí/Macaxeira</b>	4,1025	2,8737	ns

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

Os dados apresentados nas tabelas 14 e 15 demonstraram que apenas ocorreu diferença significativa entre meios suplementados com cará e macaxeira, já os demais meios não apresentaram diferenças significativas quando utilizado o teste de tukey.

## 5.6. PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DA LACASE: CONDIÇÃO AGITAÇÃO *versus* ESTACIONÁRIA

De modo geral, a produção enzimática da lacase mostrou-se diferenciada nas condições de crescimento testadas, como mostra a (Figura 34). O meio suplementado com açaí sob condição de agitação, o fungo *L. crinitus* obteve pico de produção enzimática de 14.94 U/L no período do 10º dia, sendo que a partir do 15º dia de observação até o período final do experimento a produção enzimática deste fungo sob condição estacionária mostrou-se mais eficaz mantendo um ritmo de crescimento produtivo contínuo.

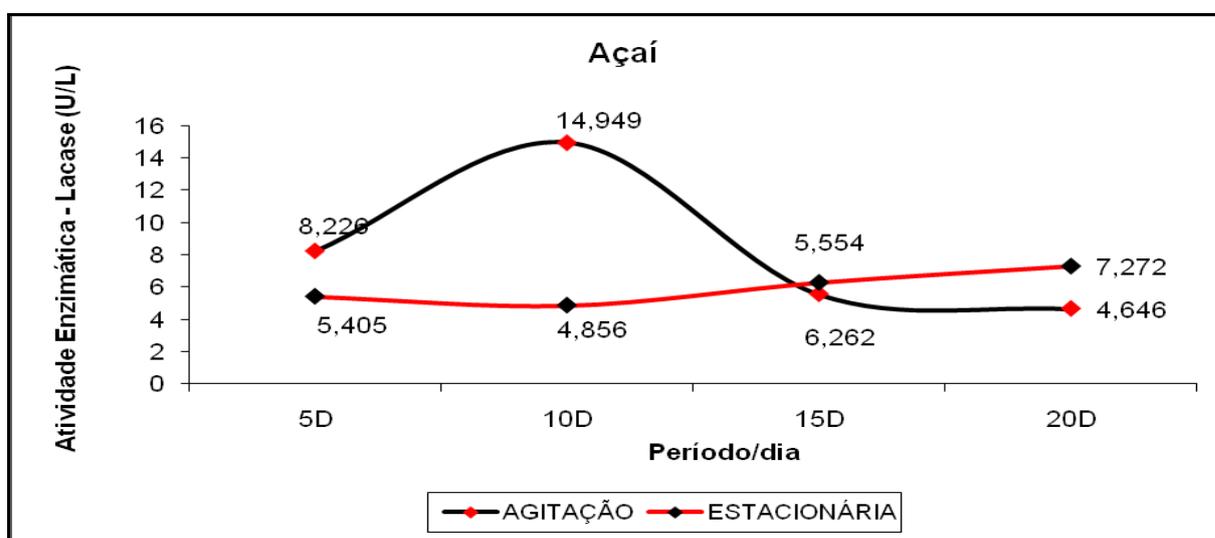
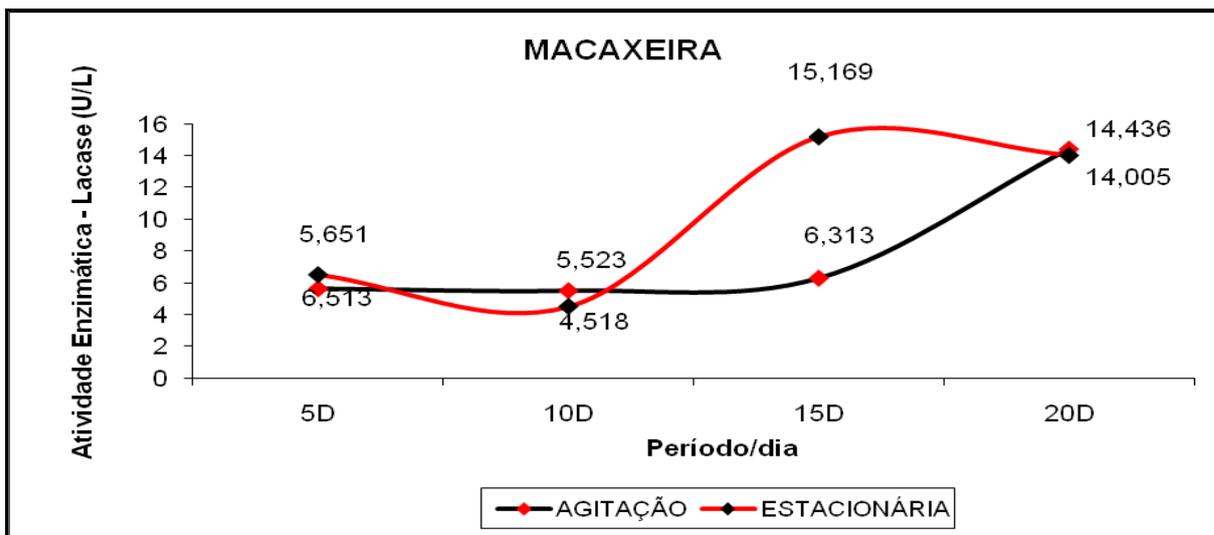


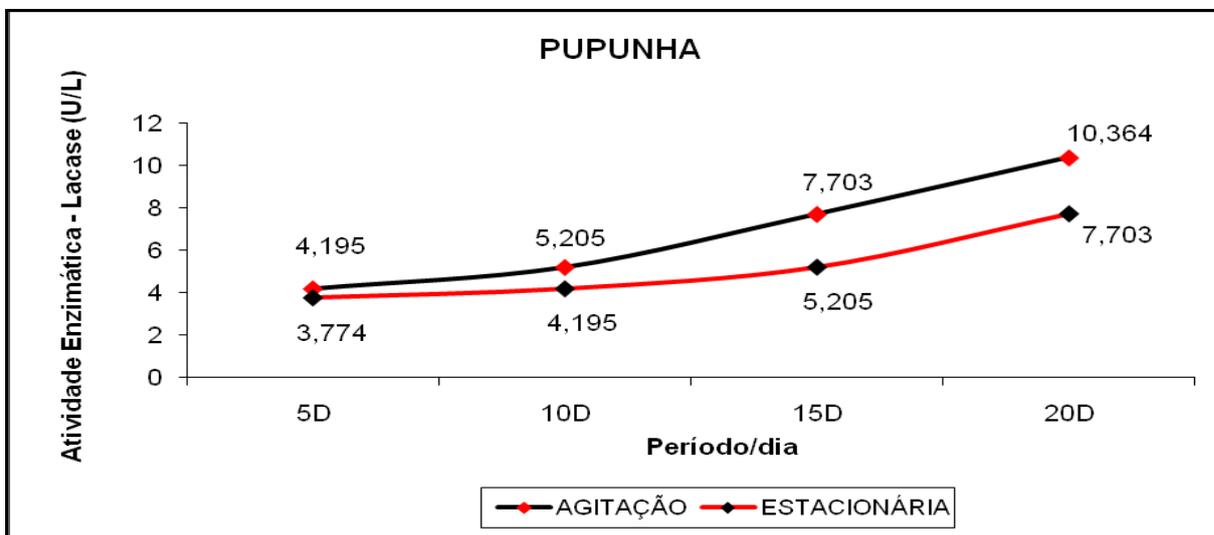
Figura 34: Produção enzimática da lacase: condição agitação *versus* estacionária – Açaí.

Verifica-se na (Figura 35) que no meio suplementado com macaxeira ocorreu resultado eficaz sob a condição estacionária somente no 15º dia de produção enzimática com um pico produtivo de 15,16 U/L. Já sob a condição de agitação o crescimento enzimático manteve-se crescente com tendência a superar a condição estacionária até o término do experimento.



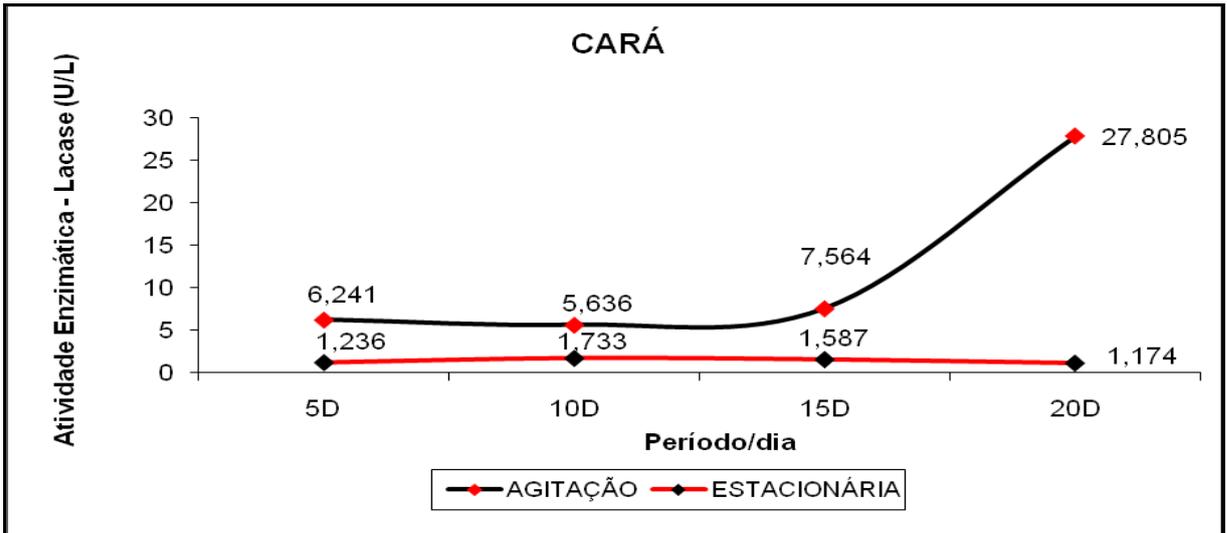
**Figura 35:** Produção enzimática da lacase: condição agitação *versus* estacionária – Macaxeira.

Comportamento similar de produção enzimático sob condição de agitação foi observado no meio suplementado com pupunha, onde se manteve superior sob a condição estacionária, durante todo o período de experimento, obtendo uma diferença máxima de 2,66 U/L entre as duas condições no período do 20º dia de observação, como mostra na (Figura 36).



**Figura 36:** Produção enzimática da lacase: condição agitação *versus* estacionária – Pupunha.

Em relação ao meio de cará o padrão de produção enzimática sob a condição agitação mostrou-se crescente e similar ao meio de pupunha e macaxeira. Contudo, no 20º dia o suplemento de cará apresentou uma síntese enzimática de 26,63 U/L a mais em relação à condição estacionária, o qual obteve durante todo o período do experimento uma média de 1,43 U/L na sua produção como observa-se na (Figura 37).



**Figura 37:** Produção enzimática da lacase: condição agitação *versus* estacionária – Cará.

## 5.7. AÇÃO DO ÁLCOOL VERATRÍLICO (AV) COMO INDUTOR DA LACASE: CONDIÇÃO AGITAÇÃO

A **tabela 19** mostra o valor médio mensurada para a atividade de lacase do fungo amazônico *L. crinitus* em fermentação sob condição de agitação na presença do álcool veratrílico (AV). O meio acrescido de açaí apresentou a maior atividade enzimática na presença desse indutor seguido do meio de pupunha, cará e macaxeira nessa ordem. Em média, o meio de açaí apresentou uma atividade enzimática 44% maior em relação ao de macaxeira. Ressalta-se, entretanto, que o maior valor de pico para atividade enzimática foi observado no meio de pupunha após vinte dias de crescimento (**Tabela 19**).

**Tabela 19**

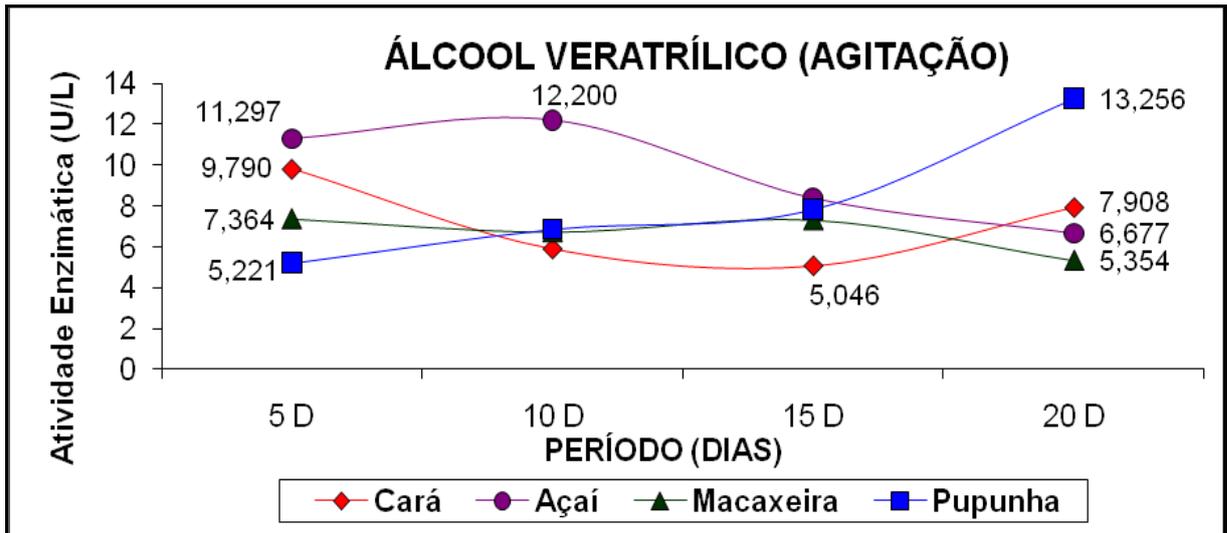
Média da atividade de lacase de *L. crinitus* em meio de cultura líquido, sob condição agitação com e sem indutor, no período de vinte dias de crescimento.  
(Valores em parênteses indicam o valor mínimo e máximo respectivamente).

Meio de Cultura	Atividade Enzimática (U/L) com AV	Atividade Enzimática (U/L) sem AV
Açaí	<b>9,641</b> (6,67 – 12,2)	<b>8,344</b> (4,64 – 14,94)
Pupunha	<b>8,303</b> (5,22 – 13,256)	<b>6,867</b> (4,19 – 10,36)
Cará	<b>7,155</b> (5,04 – 9,79)	<b>11,812</b> (5,63 – 27,8)
Macaxeira	<b>6,691</b> (5,35 – 7,364)	<b>7,981</b> (5,52 – 14,43)

Análise de variância (ANOVA) para verificar a existência de diferenças na atividade enzimática de lacase com diferentes meios na presença de AV mostrou que ao nível de 99% de probabilidade não existe diferença estatística ( $p>0,05$ ) na atividade enzimática entre os meios testados.

Em relação ao padrão da atividade enzimática em diferentes períodos de crescimento do fungo *L. crinitus*, com exceção do meio suplementado com cará que mostra um padrão decrescente de atividade enzimática até o décimo - quinto dia na presença de AV, todos os demais mostraram um padrão crescente de atividade de lacase até o décimo dia na presença desse indutor.

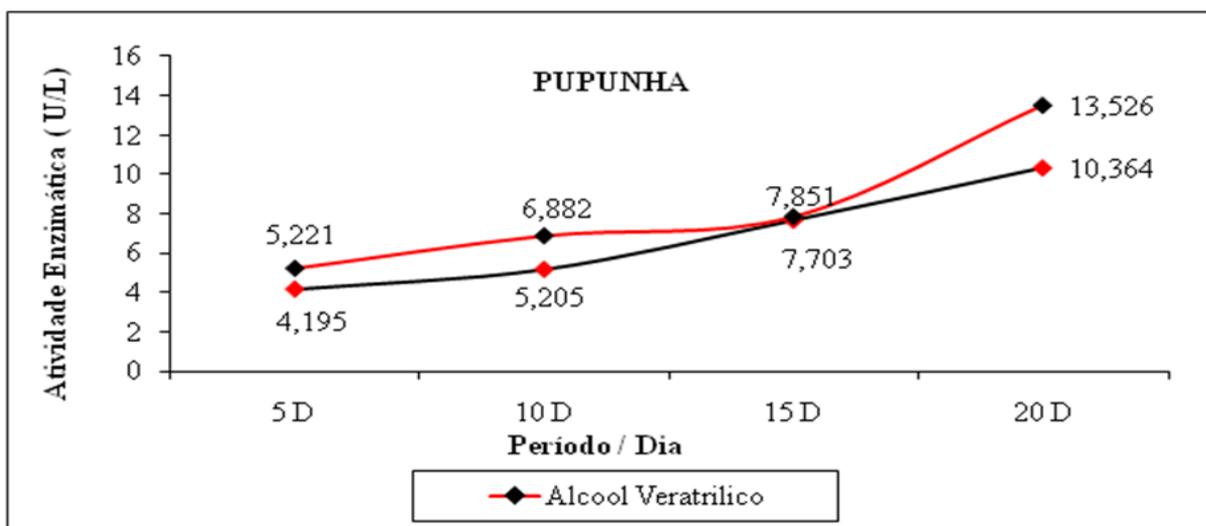
De um modo geral, no meio de cultura suplementado com açaí quando acrescido de AV ocorreu maior atividade em relação aos demais até o 10º dia de crescimento, quando a partir de então decresce a atividade até o período final do experimento. Por outro lado, o meio de cultura acrescido de pupunha obteve um padrão de atividade enzimática crescente atingindo sua máxima atividade no 20º dia de experimento (**Figura 38**).



**Figura 38:** Atividade enzimática do AV de quatro meios nutricionais sob condição de agitação.

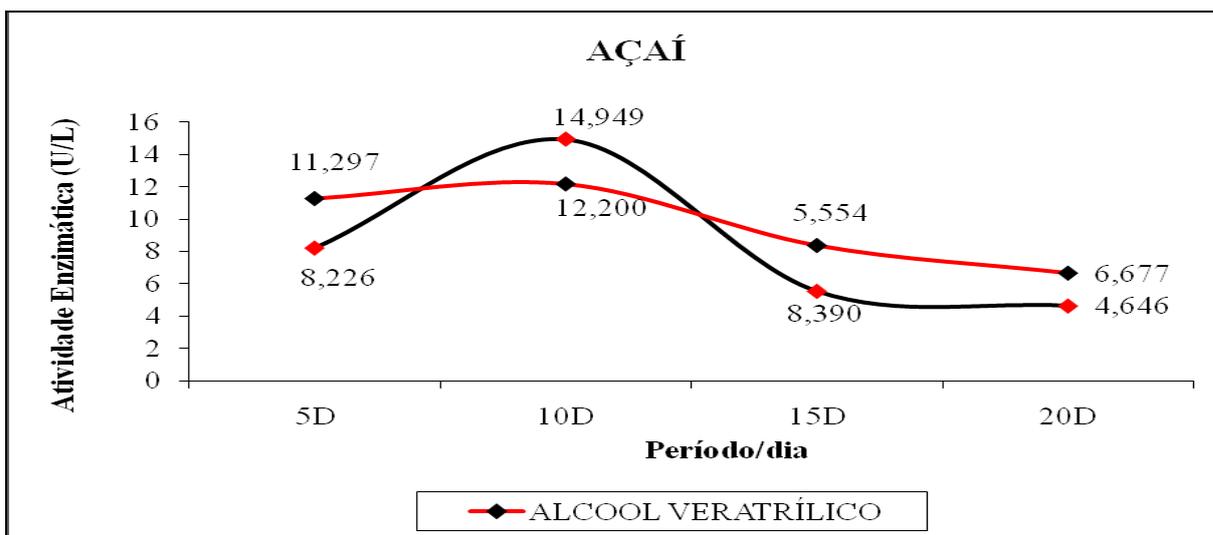
### 5.7.1. ATIVIDADE DE LACASE COM E SEM ALCOOL VERATRÍLICO (AV): CONDIÇÃO AGITAÇÃO.

A **figura 39** mostra a atividade de lacase no meio de pupunha na presença e sem AV. A atividade enzimática foi maior no meio com AV durante todo o período de crescimento. No vigésimo dia a atividade de lacase foi 21,81% maior no meio com a presença de AV.



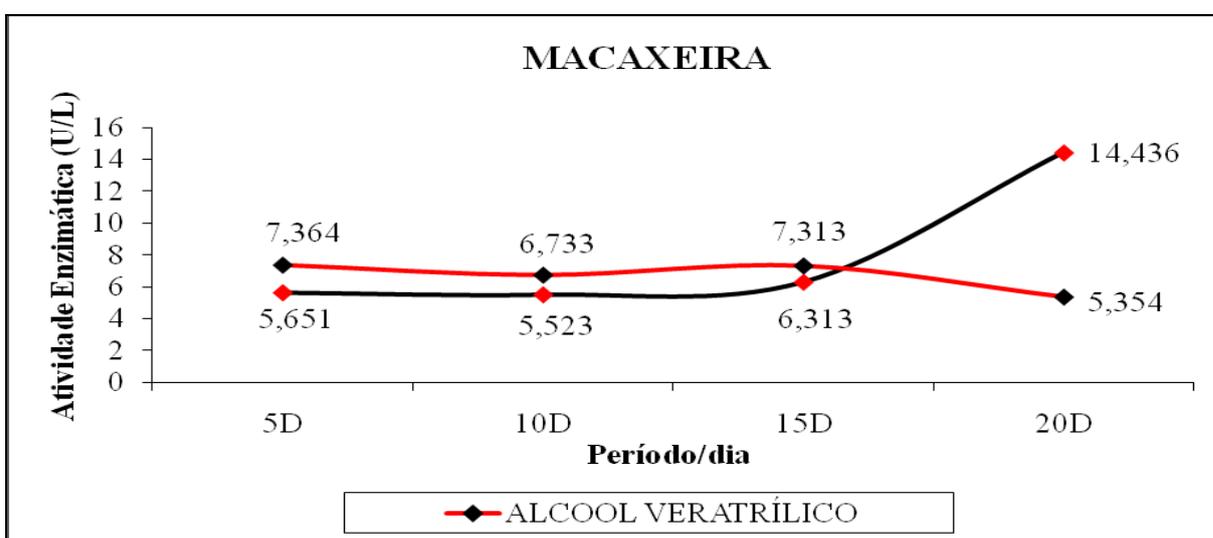
**Figura 39:** Atividade de lacase no meio de pupunha na presença e sem AV.

No meio de açai, tanto na presença como sem AV, o padrão de crescimento foi similar mostrando-se crescente até o décimo dia, e decrescente a partir desse período até o final do experimento (**Figura 40**). Ressalta-se, entretanto, que no quinto dia de crescimento a atividade de lacase mostrou-se 27,2% maior na presença de AV. A partir desse período e até décimo dia de crescimento, onde alcança o pico máximo de atividade enzimática, a presença de AV não aumenta a atividade de lacase, sendo maior no meio sem a presença desse indutor. O decréscimo na atividade enzimática a partir desse período, entretanto, é mais acentuado no meio sem a presença do AV.



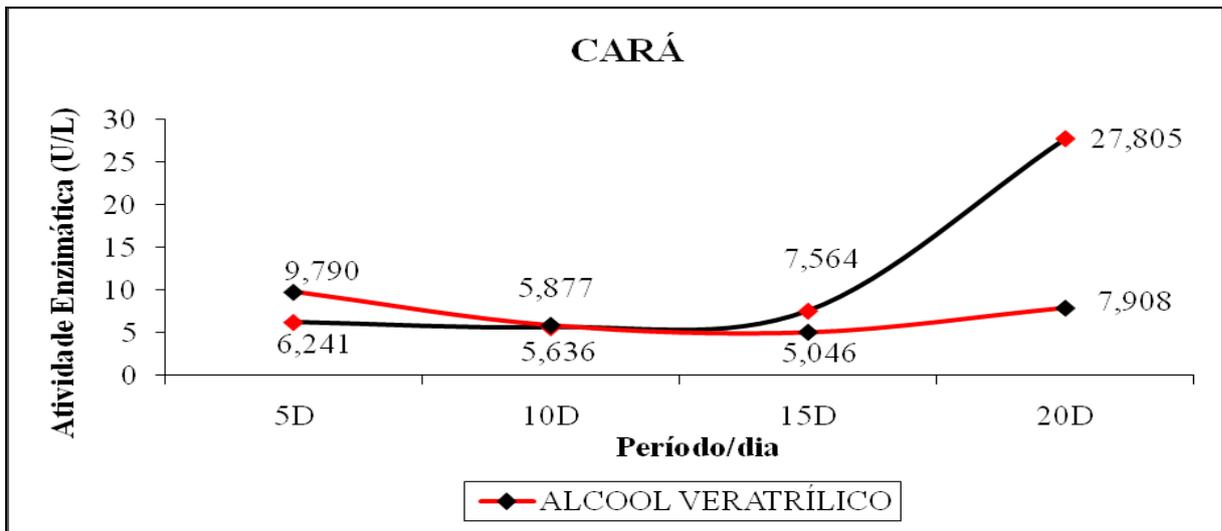
**Figura 40:** Atividade de lacase no meio de açaí na presença e sem AV.

No meio de macaxeira, a presença de AV aumentou a atividade enzimática num percentual de 23,3%, 17,9% e 13,6% , no período de 5, 10 e 15 dias respectivamente (**Figura 41**). A partir desse ultimo período a atividade de lacase aumentou cerca de 62% no meio sem acréscimo de AV, alcançando seu máximo no vigésimo dia de crescimento.



**Figura 41:** Atividade de lacase no meio de macaxeira na presença e sem AV.

Comportamento similar ocorreu no meio de cará onde após cinco dias de crescimento a atividade enzimática foi 36,3% maior na presença de AV (**Figura 42**) mantendo uma pequena diferença até o décimo - quinto dia. Após esse período, entretanto, a atividade de lacase no meio sem a presença de AV mostra um crescimento maior, alcançando uma atividade enzimática 72% maior no vigésimo dia.



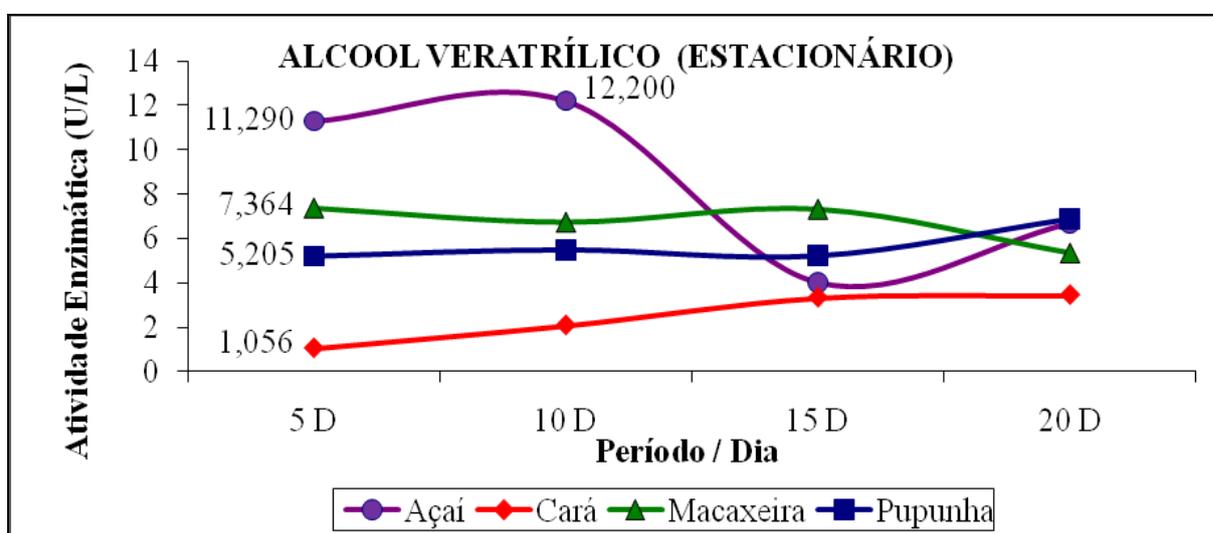
**Figura 42:** Atividade de lacase no meio de cará na presença e sem AV.

Os resultados indicaram, de modo geral, que para todos os meios testados o indutor Álcool Veratrílico (AV) aumentou a atividade da lacase, na condição de agitação no período de até 15 dias, com exceção do meio suplementado com açaí que só teve sua atividade de lacase aumentada com este indutor após 5 dias.

Após o período de 15 dias, tanto o meio suplementado com cará, como o meio suplementado com macaxeira, na condição de agitação, ocorreu uma maior produção de lacase sem o indutor. Já o meio suplementado com pupunha, ao contrário dos outros meios, teve sua produção de lacase aumentada com este indutor no período de até 20 dias. Ou seja, para o meio suplementado com pupunha a lacase aumentou a sua atividade, na condição de agitação, com o indutor álcool veratrílico quanto maior o período testado.

## 5.8. AÇÃO DO ÁLCOOL VERATRÍLICO (AV) COMO INDUTOR DE LACASE: CONDIÇÃO ESTACIONÁRIA

Nesta condição estacionária o meio de açaí foi o que apresentou, em valor absoluto, maior atividade enzimática nos dez primeiros dias de crescimento (**Figura 43**). O padrão de atividade enzimática para o meio de açaí mostrou inicialmente crescente até o décimo dia decrescendo até o final do experimento. Todos os outros meios apresentaram padrão similar, com exceção do meio de cultura acrescido de cará que mostrou uma atividade enzimática crescente, atingindo valor máximo de atividade no final do experimento. Ressalta-se, por outro lado, que o meio de cará foi onde *Lentinus crinitus* apresentou menor valor de atividade enzimática.



**Figura 43:** Atividade enzimática do AV de quatro meios nutricionais sob condição estacionária

A maior atividade média de lacase do fungo amazônico *Lentinus crinitus* ocorreu no meio de açaí (**Tabela 20**) em fermentação sob condição estacionária e presença do álcool veratrílico (AV) como um indutor. O meio de cará foi onde *L. crinitus* apresentou a menor atividade média enzimática.

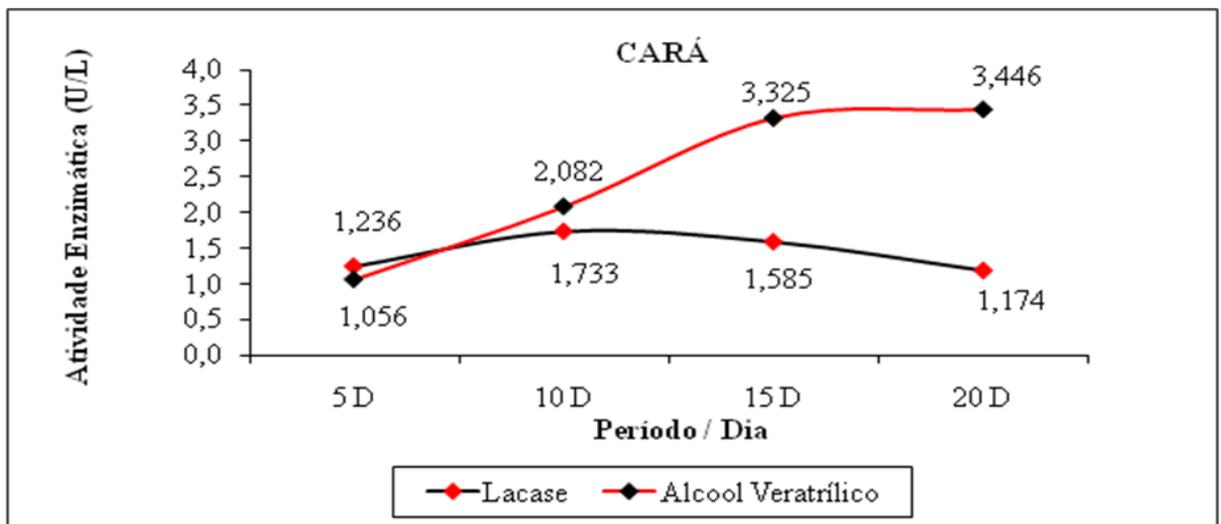
**Tabela 20**

Média da atividade de lacase de *L. crinitus* em meio de cultura líquido, sob condição estacionária com e sem indutor, no período de vinte dias de crescimento.  
(Valores em parênteses indicam o valor mínimo e máximo respectivamente).

Meio de Cultura	Atividade Enzimática (U/L) com AV	Atividade Enzimática (U/L) sem AV
Açaí	<b>8,543</b> (4,005 - 12,2)	<b>5,94</b> (4,85 – 7,27)
Macaxeira	<b>6,691</b> (5,354 - 7,364)	<b>10,05</b> (4,51 – 15,16)
Pupunha	<b>5,700</b> (5,205 - 6,882)	<b>5,21</b> (3,77 – 7,70)
Cará	<b>2,477</b> (1,056 - 3,446)	<b>1,43</b> (1,17 – 1,73)

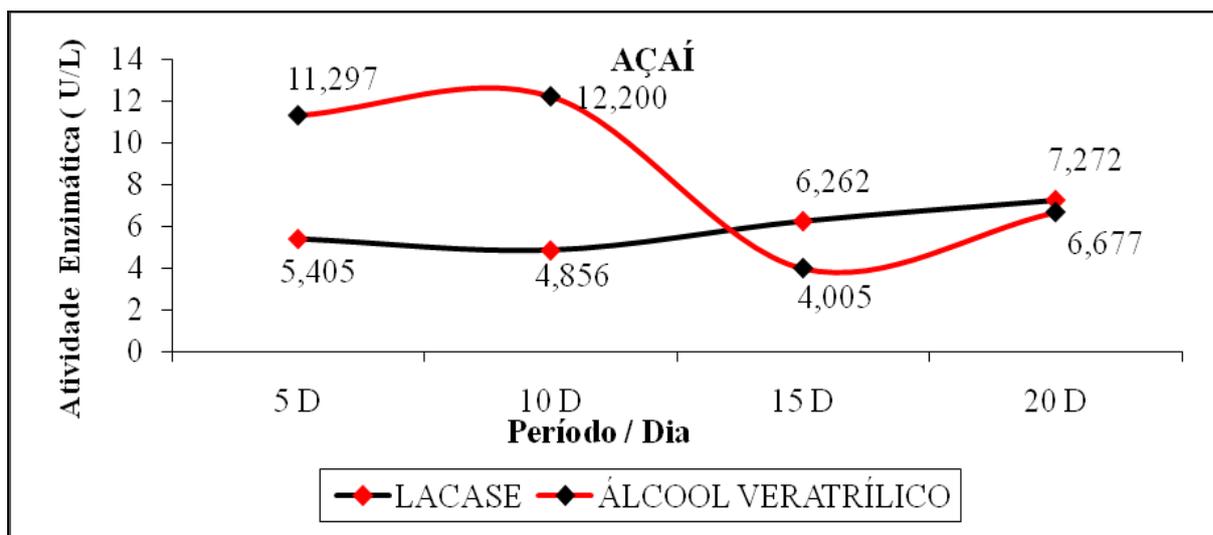
Comparando-se os resultados de produção enzimática da lacase sem a presença de indutor e com o indutor álcool veratrílico (AV), o meio suplementado com cará obteve uma atividade enzimática média 42,2% maior na presença do AV, seguido do meio de açaí e pupunha com 30,4% e 8,4% respectivamente (**Tabela 20**). No meio de macaxeira a atividade enzimática foi maior no meio sem a presença do indutor AV.

Analisando-se o padrão de crescimento, com e sem a presença do AV, ao longo do período de estudo verifica-se algumas particularidades. O meio de cará acrescido do AV, por exemplo, apresentou uma atividade enzimática superior, em comparação ao meio sem AV, a partir do décimo dia de crescimento (**Figura 44**).



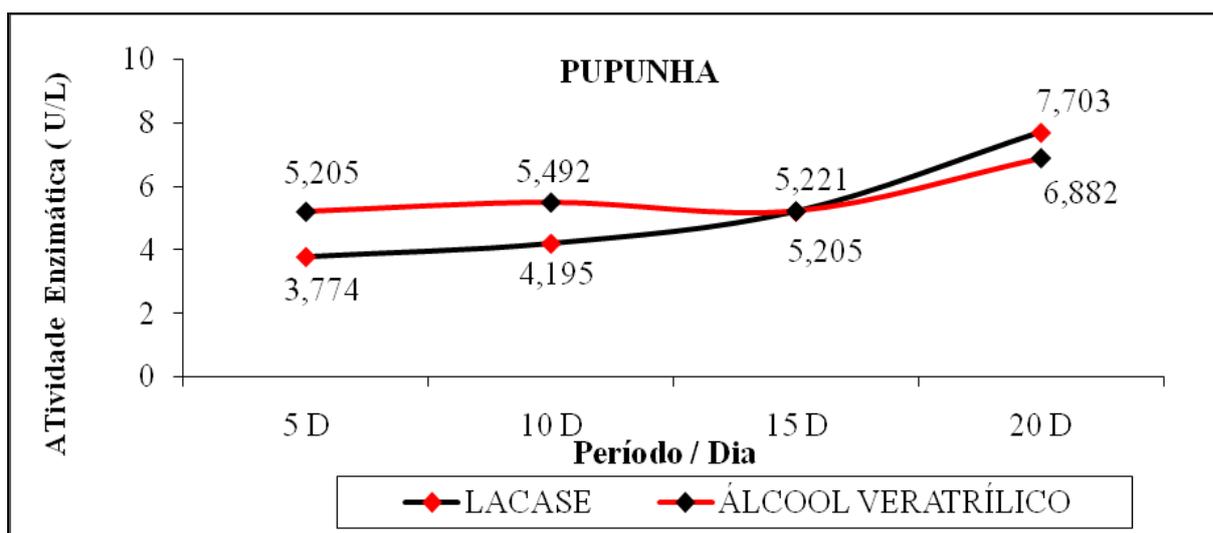
**Figura 44:** Atividade de lacase no meio de cará na presença e sem AV.

No meio de açaí a presença do AV contribuiu para a maior atividade enzimática até o décimo dia, quando a partir de então ocorre um decréscimo na atividade de lacase no meio com presença do indutor. A atividade enzimática no meio sem a presença do indutor mostrou-se crescente até o fim do experimento (**Figura 45**).



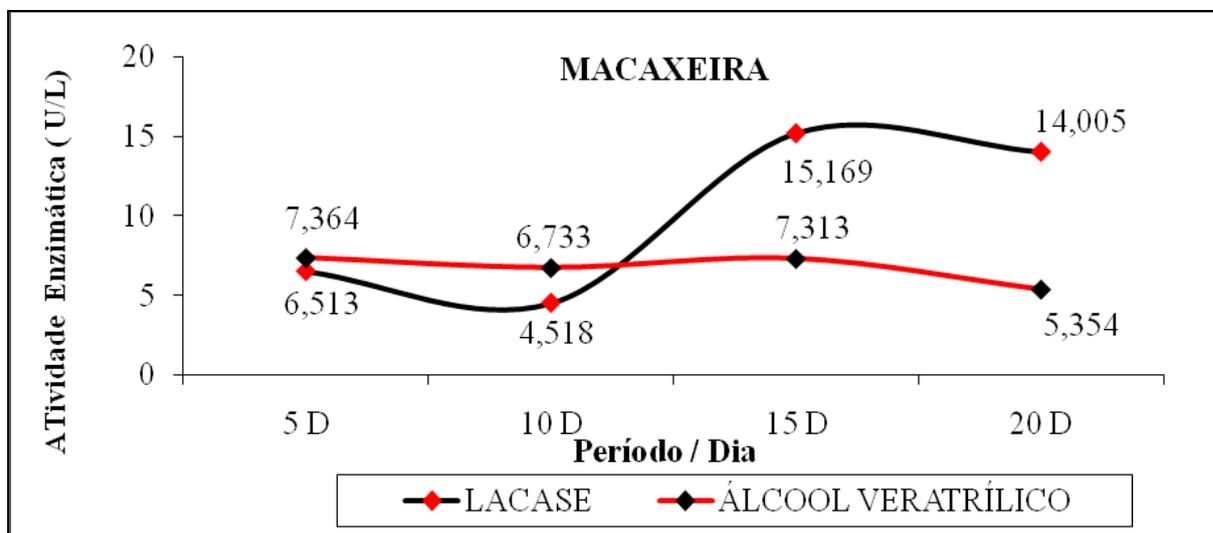
**Figura 45:** Atividade de lacase no meio de açaí na presença e sem AV.

A produção enzimática do experimento em meio suplementado de pupunha e induzido com AV obteve resultados superiores a lacase sem o indutor de até 27,49% (**Figura 46**).



**Figura 46:** Atividade de lacase no meio de pupunha na presença e sem AV.

No meio de macaxeira, inicialmente a presença de AV influenciou numa atividade enzimática ligeiramente maior até o décimo dia de crescimento. A partir desse ponto mostrou uma atividade decrescente até o final do experimento (**Figura 47**).



**Figura 47:** Atividade de lacase no meio de macaxeira na presença e sem AV.

Os resultados demonstraram que para os meios suplementado com açaí e macaxeira, na condição estacionária, a atividade da lacase foi maior com a adição do indutor álcool veratrílico no período de até 10 dias, ocorrendo após esse período um nítido decréscimo da enzima testada.

Já o meio suplementado com pupunha, teve sua produção de lacase aumentada, na condição estacionária, quanto maior o período de fermentação testado com este indutor. O meio suplementado com cará, ao contrario dos demais meios até o 10º dia testado a atividade da lacase foi mais eficiente sem a presença do indutor Álcool Veratrílico. A partir deste período é que a atividade da lacase começou a aumentar com a presença deste indutor.

### **5.8.1. ESTACIONÁRIA *versus* AGITAÇÃO NA PRESENÇA DO INDUTOR ALCOOL VERATRÍLICO (AV)**

Os resultados indicaram que tanto na condição estacionária como na agitação, a maior produção de lacase foi obtido no meio suplementado com açaí na presença do indutor Álcool Veratrílico (AV).

Comparando-se os dados da condição estacionária versus agitação na presença ou ausência do indutor álcool veratrílico para o fungo *Lentinus crinitus* verificou-se que o período de ação do indutor na atividade da lacase foi menor na condição estacionária do que na de agitação.

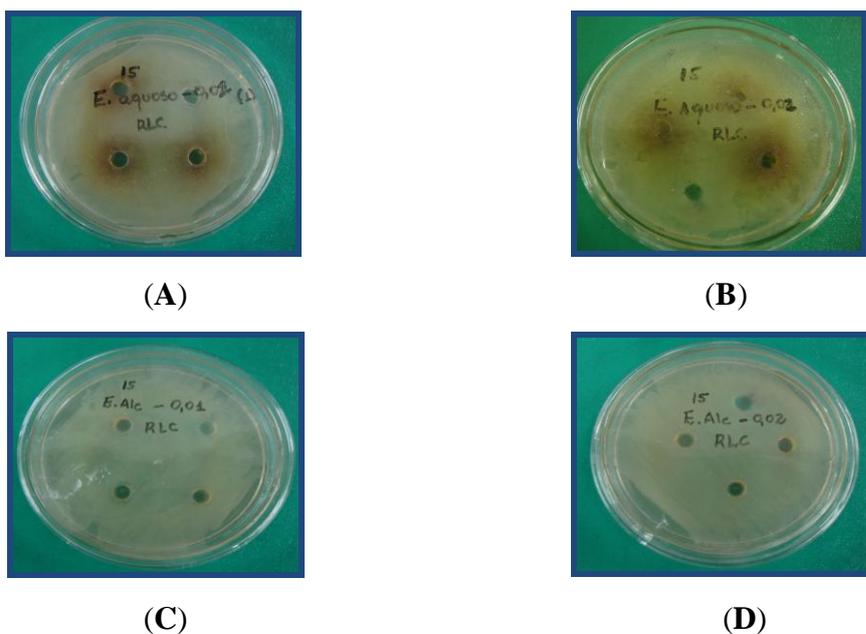
De modo geral, na condição estacionária o período de ação do indutor foi de apenas 10 dias, já na de agitação foi de 15 dias para todos os meios testados. No meio suplementado com pupunha, tanto na condição estacionária como a de agitação, a produção de lacase foi maior quanto maior o período testado na presença do indutor Álcool Veratrílico.

## 5.9. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

### 5.9.1. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos do Carpóforo fúngico sobre *Escherichia coli*.

De acordo com os ensaios realizados, as duas cepas testadas não foram sensíveis ao extrato do *L. crinitus*.

Na **figura 48** mostra a ausência da ação antimicrobiana do extrato aquoso obtido por rotoevaporação do carpóforo do fungo *L. crinitus* nas duas concentrações testadas frente à bactéria patogênica *Escherichia coli*. Resultados semelhantes foram obtidos, com o extrato alcoólico do carpóforo fúngico, na qual o mesmo não apresentou ação inibitória sob o microrganismo patogênico estudado.



**Figura 48:** Atividade antimicrobiana do extrato aquoso e alcoólico de *L. crinitus* sobre a linhagem de *Escherichia coli*. **A:** Extrato aquoso (1%); **B:** Extrato aquoso (2%); **C:** Extrato alcoólico (1%) e **D:** Extrato alcoólico (2%).

### 5.9.2. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos do Carpóforo fúngico sobre *Staphylococcus aureus*.

As **figuras 49** mostra a ausência da atividade antimicrobiana do extrato aquoso obtido por rotoevaporação do carpóforo do fungo *L. crinitus* frente à bactéria patogênica *Staphylococcus aureus*. Resultados semelhantes foram obtidos, com o extrato alcoólico do carpóforo fúngico, na qual o mesmo não apresentou ação inibitória sob o microrganismo patogênico estudado.



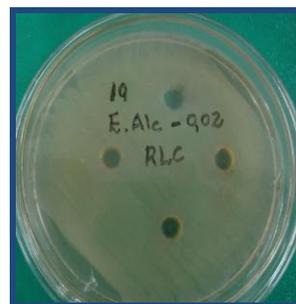
(A)



(B)



(C)



(D)

**Figura 49:** Atividade antimicrobiana do extrato aquoso e alcoólico de *L. crinitus* sobre a linhagem de *Staphylococcus aureus*. **A:** Extrato aquoso (1%); **B:** Extrato aquoso (2%); **C:** Extrato alcoólico (1%) e **D:** Extrato alcoólico (2%).

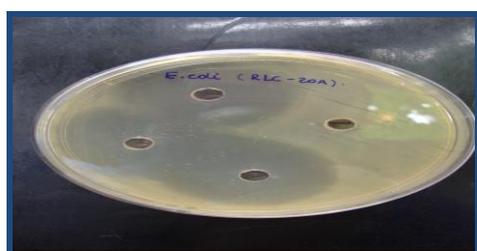
### 5.9.3. Avaliação da atividade antimicrobiana dos metabólitos fúngico do *Lentinus crinitus* sobre *Escherichia coli*.

A **tabela 21** apresenta o comportamento da cepa de *E. coli* frente ao metabólito secundário do fungo *L. crinitus*, em função do tamanho do halo de inibição de crescimento. Neste estudo, foi considerado, produto ativo, aquele com atividade antimicrobiana em relação à presença do halo de inibição, medido em milímetros.

De acordo com os resultados verificou-se que o meio acrescido de pupunha sob a condição de agitação mostrou-se mais eficaz produzindo um halo de inibição frente à bactéria Gram-Negativa *E. coli* com média em torno de 14,3 mm de raio. Por outro lado, o mesmo meio sobre condição estacionária demonstrou-se inferior quanto ao raio de inibição apresentando 4.7 mm de crescimento como mostra também a **figura 50**.

**Tabela 21**  
Média Aritmética do raio do halo de inibição fúngica sobre *E. coli*.

Meio de Cultura Pupunha	Halo de Inibição (mm)
Agitação	14.3
Estacionária	4.7



(A)



(B)

**Figura 50:** Atividade antimicrobiana do metabólito do *Lentinus crinitus* suplementado com pupunha num período de 20 dias sobre a linhagem de *E. coli* **A:** Condição agitação e **B:** Condição estacionária.

O teste estatístico ANOVA foi feito para verificar se existe diferença entre a condição de agitação e a estacionária no meio suplementado com pupunha. Os resultados mostraram

que ao nível de 95% de probabilidade que as condições apresentaram diferença estatística entre si. O Teste de Tukey verificou a diferença mínima significativa que ocorreu entre as duas variáveis testadas (**Tabela 22, 23 e 24**).

**Tabela 22**

Análise de variância da atividade antimicrobiana do fungo *L. crinitus* no meio acrescido de pupunha para o período de 20 dias versus *Escherichia coli*.

Fontes de Variação	G.L	S.Q	Q.M	F	(p)
Tratamento	1	140.167	140.167		
				420.5000	0.0004*
Resíduo	4	1.333	0.333		

\*Significativo ao nível 99% ( $p < 0,05$  significativo).

**Tabela 23**

Análise de Tukey da atividade antimicrobiana do fungo *L. crinitus* no meio acrescido de pupunha para o período de 20 dias versus *Escherichia coli*.

Fontes de Variação	Diferença	Q	(p)
Agitação / Estacionária	9,66	29.00	< 0,01 *

\*Significativo ao nível 99% ( $p < 0,05$  significativo).

**Tabela 24**

Parâmetros descritivos da atividade antimicrobiana do fungo *L. crinitus* no meio acrescido de pupunha para o período de 20 dias *versus* *Escherichia coli*.

Meio de Cultura Pupunha	Média Aritmética	Desvio Padrão	Variância	Coefficiente de Variação
Agitação	14.33	0.57	0.33	4.03 %
Estacionária	4.66	0.57	0.33	12.37 %

Em meio à análise realizada os dados indicaram que o metabólito secundário do fungo *L. crinitus* suplementado com pupunha na condição de agitação, apresentou potencial inibitório frente à bactéria Gram-Negativa *E. coli*.

#### **5.9.4 Avaliação da atividade antimicrobiana dos metabólitos fúngico do *Lentinus crinitus* sobre *Staphylococcus aureus*.**

A **tabela 25** apresenta o comportamento da cepa de *S. aureus* frente ao metabólito secundário do fungo *L. crinitus*, em função do tamanho do halo de inibição de crescimento. Neste estudo, foi considerado, produto ativo, aquele com atividade antimicrobiana em relação à presença do halo de inibição, medido em milímetros.

De acordo com os resultados verificou-se que o meio acrescido de pupunha sob a condição de agitação mostrou-se mais eficaz produzindo um halo de inibição frente à bactéria Gram-Positiva *S. aureus* com média em torno de 5,3 mm de raio. Por outro lado, o mesmo meio sobre condição estacionária demonstrou-se inferior quanto ao raio de inibição apresentando 4.3 mm de crescimento como mostra a **figura 51**.

**Tabela 25**Média Aritmética do raio do halo de inibição fúngica sobre *S. aureus*.

Meio de Cultura Pupunha	Halo de Inibição (mm)
Agitação	5.3
Estacionária	4.3

**(A)****(B)**

**Figura 51:** Atividade antimicrobiana do metabólito do *Lentinus crinitus* suplementado com pupunha num período de 20 dias sobre a linhagem de *S. aureus*. **A:** Condição agitação e **B:** Condição estacionária.

O teste estatístico ANOVA foi feito para verificar se existe diferença entre a condição de agitação e a estacionária no meio suplementado com pupunha. Os resultados mostraram que ao nível de 95% de probabilidade que as condições não apresentaram diferença estatística entre si. O Teste de Tukey verificou a diferença mínima significativa que ocorreu entre as duas variáveis testadas (**Tabela 26 e 27**).

**Tabela 26**Análise de variância da atividade antimicrobiana do fungo *L. crinitus* no meio acrescido de pupunha para o período de 20 dias versus *S. aureus*

Fontes de Variação	G.L	S.Q	Q.M	F	(p)
Tratamento	1	1.5	1,5		
				4,5	0,1007*
Resíduo	4	1.333	0.333		

\*Não Significativo ao nível 99% ( $p < 0,05$  significativo).

**Tabela 27**

Parâmetros descritivos da atividade antimicrobiana do fungo *L. crinitus* no meio acrescido de pupunha para o período de 20 dias versus *S. aureus*

<b>Meio de Cultura Pupunha</b>	<b>Média Aritmética</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Variância</b>	<b>Coefficiente de Variação</b>
<b>Agitação</b>	5.3	0.3	0.6	10,83 %
<b>Estacionária</b>	4.3	0.3	0.6	13,32 %

Em meio à análise realizada os dados indicaram que o metabólito secundário do fungo *L. crinitus* suplementado com pupunha na condição de agitação, apresentou potencial inibitório frente à bactéria Gram-Positiva *S. aureus*.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DO FUNGO *Lentinus crinitus*, SOB CONDIÇÃO ESTACIONÁRIA E AGITAÇÃO.

É fundamental o estudo das condições de cultivo de espécies fúngicas, porque pode ocorrer incremento tanto de biomassa, quanto nos metabólicos secundários e exopolissacarídeos importantes em várias atividades biológicas dos fungos (Hwang et al. 2003). Constata-se, por outro lado, que as condições ideais para o crescimento micelial podem não ser as mesmas do que aquelas para a produção dos compostos bioativos de interesse (Luchese; Harrigan, 1993). Neste contexto, o meio utilizado para fermentação e a aeração são fatores que contribuem para o crescimento. Ressalta-se que a maioria dos processos de fermentação emprega-se organismos aeróbios que requerem O<sub>2</sub> (Oxigênio) para seu crescimento rápido. Por outro lado, tanto na fermentação aeróbica, como na anaeróbica, a taxa de crescimento também depende da taxa de transferência de nutrientes através da membrana celular, e a agitação da cultura pode acelerar esse processo. Aeração e agitação do caldo de fermentação propiciam a demanda de oxigênio no cultivo submerso (Kim et al. 2003). Na presente pesquisa a condição de agitação da cultura em caldo de *Lentinus crinitus* foi importante para aumentar a biomassa micelial.

No presente estudo a produção de biomassa fúngica do *Lentinus crinitus* foi influenciada, diferentemente sob a condição de agitação e estacionária nos meios de cultura testados. De modo geral, a produção de biomassa sob a condição de agitação produziu maior crescimento micelial do que na condição estacionária para todos os meios utilizados neste trabalho. Ao contrário dos nossos resultados, a agitação dos meios de cultivo afetou negativamente a produção de biomassa pelos isolados de *Colleotrichum* e dos Basidiomicetos *Hexagonia glaba* e *Trametes lactinea* (Martinez et.al., 2009; Santos, 2009). Os nossos dados, entretanto estão de acordo com o relatado na literatura para vários tipos de fungos (Papagianni et al., 2001; Martins da Silva, 2010). E, já a produção de biomassa fúngica pelo *Pleorotus* não foi influenciada nem pela agitação nem pela condição estacionária dos cultivos, uma vez que nestas a produção foi igual a aproximadamente 1,22g/l, tanto nos cultivos estáticos como nos agitados (Rezende et al., 2005).

Segundo Papagianni e colaboradores (2001), a agitação constante dos meios de cultivo líquidos proporciona um aumento significativo na produção de biomassa, pelos

microrganismos em geral. Quanto à produção de biomassa pode ser constatada pelos resultados obtidos que o meio de cultura líquido suplementado com pupunha foi o que maior produziu maior crescimento micelial do fungo *Lentinus crinitus* tanto na condição de agitação como na condição estacionária.

Verificaram-se nos experimentos que para o fungo *Lentinus crinitus* ocorreram diferentes resultados de velocidade de crescimento diante dos diferentes meios de cultivo, demonstrando que a composição do meio de cultivo foi fator interferente no desenvolvimento micelial. Os resultados desse trabalho, a respeito das diferenças, de crescimento e biomassa micelial, também corrobora com o de outros autores (Bernard, et al., 2008; Bilay, et al., 2000; Fonseca, 2009; Santos, 2009; Martins Silva, 2010). Cada meio de cultura testado nesse trabalho apresentou maior crescimento do micélio dependendo das condições o qual estava submetido, dependente da condição estacionária ou de agitação avaliado. A velocidade de crescimento é fundamental na seleção de linhagens para a produção de fungos em processos biotecnológicos ou industrial.

De acordo com Bernardi e colaboradores (2008), a velocidade de crescimento em diferentes meios de cultivo 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.

As diferenças nutricionais fornecidas pelos meios de cultivo também foram observadas por Silva e colaboradores, 2004, os quais utilizando resíduos de frutas como substrato adicionado ao meio mineral observaram que as maiores médias de biomassa micelial seca foram encontradas quanto utilizaram bagaço de cana-de-açúcar, casca de maracujá, casca e coroa de abacaxi.

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 (Santos, 2009).

Para o fungo *Lentinus crinitus*, todos os meios nutricionais utilizados mostraram-se eficientes para o crescimento deste basidiomiceto. Provavelmente, todos os meios continham a presença de macromoléculas requerida por esses organismos para o seu crescimento. A

produção de biomassa nas duas variáveis testadas (estacionária e agitação) teve melhor crescimento no meio de pupunha como mencionado anteriormente. Este meio foi testado, em pH 5,0 pois com base na literatura este é o pH ótimo para este fungo e, de modo geral os fungos amazônicos crescem melhor em meio ácido (Castro e Silva, 2006; Santos, 2009).

Vários trabalhos comprovam que cada fungo tem suas exigências nutricionais específicas. Todos os organismos precisam encontrar em seu ambiente, unidades estruturais bem como fontes de energia para a construção e manutenção de sua estrutura e organização. Alguns elementos são essenciais para o crescimento dos fungos. Carbono e Nitrogênio são elementos dominantes na fermentação porque estão diretamente ligados à produção de biomassa. As quantidades de Carbono e Nitrogênio necessárias mostram variações conforme a espécie e o meio estudado (Garcia, 2006). Segundo Fonseca (2009), a limitação de Nitrogênio ou a sua presença não afeta a produção de biomassa e a velocidade de crescimento do fungo *L. crinitus*, mas sim o pH do meio. Nossos dados, entretanto, mostram que o pH utilizado neste experimento, não interferiu na produção da biomassa do *Lentinus crinitus* e sim o meio de cultivo, ao contrário do relatado por aquela autora. Isto demonstra que diferentes cepas do mesmo fungo podem apresentar exigências nutricionais específicas.

No caso específico do *Lentinus crinitus* todos os meios testados mostraram-se eficientes para a produção de biomassa, sendo que o meio de pupunha nas duas condições testadas foi o que obteve maior sucesso. Provavelmente, o meio suplementado com pupunha foi o mais eficiente na produção de biomassa devido ao seu alto teor de N (59,5–79,9%), que acreditamos que seja o elemento químico essencial para o desenvolvimento do *Lentinus crinitus*. Pesquisas recentes mostram que os melhores meios para a produção de biomassa são aqueles que apresentam maiores teores de N em sua composição química (Fonseca, 2009; Pointing et al., 2000; Santos, 2009). Para vários fungos a limitação de nitrogênio diminui o crescimento mas incrementa a produção de substâncias bioativas (Manzoni et al., 1999; López et al., 2003).

As diferenças observadas na produção de biomassa e na velocidade de crescimento nos substratos distintos, provavelmente ocorreram devido à diferente composição química dos mesmos.

Poucos trabalhos tem sido feito com relação a produção de biomassa fúngica. Atualmente, em função da possibilidade de se utilizar a biomassa na tecnologia de

biorremediação para absorção de metais pesados, remoção de substâncias xenobióticas e outros processos industriais e biotecnológicos o interesse por esta pesquisa tem aumentado significativamente.

## **6.2. ATIVIDADE DA LACASE DO *Lentinus crinitus* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA SOB CONDIÇÃO ESTACIONÁRIA E AGITAÇÃO.**

Quanto à produção de lacase, pode ser observado pelos resultados obtidos que o basidiomiceto *L. crinitus* produziu lacase tanto nos cultivos líquidos estáticos quanto sob agitação. Constatou-se um nítido aumento na produção da lacase do *L. crinitus* quando este foi submetido à condição de agitação nos diferentes meios testados.

Os nossos dados estão de acordo com a literatura que relatam que a agitação, é um fator fundamental na produção de lacases fúngicas (Dekker & Barbosa, 2001; Papagianni, et al., 2001; Pointing, 2000; Martins Silva, 2010). Porém, alguns trabalhos relatam uma maior atividade da lacase em meios de cultivos estáticos (Martinez, et al., 2009; Niku – Paavola et al., 1990). Segundo Santos (2005), o efeito negativo do processo de agitação tem sido documentado como inibidor da produção de lacases em fungos, que não foi o constatado nos nossos experimentos.

O fungo *L. crinitus* mostrou-se capaz de produzir enzima lignolítica lacase em todos os meios de cultura testados em relação às duas variáveis utilizadas. Dependendo da variável testada, o *L. crinitus* produziu diferença na sua atividade enzimática em relação ao meio de cultura utilizado.

Sob a condição de agitação a maior produção de lacase do *L. crinitus* foi verificada no meio suplementado com “cará”. Já, na condição estacionária este basidiomiceto teve sua maior produção de lacase no meio de cultura suplementado com “macaxeira”.

Constata-se também que a produção de lacase pode ser aumentada significativamente dependendo dos nutrientes presentes que influenciam sua produção. Estes dados estão de acordo com os descritos por Dekker e colaboradores, (2007). Os níveis de carbono e nitrogênio presentes no meio de crescimento do fungo são fatores de extrema importância para a produção de lacase e cujos valores ótimos são bastantes variáveis, dependendo do fungo em estudo (Fonseca, 2009; Garcia, 2006; Martins da Silva, 2010). Os resultados demonstraram que a produção de lacase foi aumentada em meios de cultivos com altos níveis de nitrogênio, nos meios suplementados de macaxeira e cará (Na condição estacionária e agitação) deste trabalho. A atividade da lacase teve um efeito positivo em culturas com alto nível de nitrogênio por outros fungos como *Pycnoporus cinnabarinus*, *Trametes versicolor* e

*T. gallita* (Garcia, 2006). Já para Pointing e colaboradores (2000) de maneira oposta a produção de lacase para o *Pycnoporus sanguineus* se deu em baixos níveis de nitrogênio.

A lacase de basidiomicetos é uma enzima altamente versátil na natureza e ela encontra grandes aplicações numa grande variedade de setores industriais (Maciel et al., 2010). Recentemente, a importância biotecnológica desta enzima conduz a um aumento drástico na produção da mesma, sendo assim este trabalho contribui para a elucidação de fatores que afetam a sua produção.

### 6.3. EFEITO DO INDUTOR NA ATIVIDADE DA LACASE DO *Lentinus crinitus*

Os nossos resultados constataram que o indutor álcool veratrílico tem um papel significativo no aumento da produção e atividade da lacase do *Lentinus crinitus*.

O indutor álcool veratrílico aumentou a atividade da lacase em comparação ao tratamento controle em todos os meios utilizados na condição tanto estacionária quanto a de agitação para o fungo *L. crinitus*. Estes resultados indicam que este indutor apresentou um efeito positivo como indutor da lacase para o fungo *Lentinus crinitus* em todos os meios testados e nas duas variáveis analisadas. Segundo Barbosa e colaboradores (1996), a produção de lacase aumentou significativamente na presença do álcool veratrílico para os isolados fúngicos de *Botryosphaeria* sp, como os nossos dados.

Os resultados indicaram que tanto na condição estacionária como na agitação, a maior produção de lacase de *L. crinitus* foi obtido no meio suplementado com açaí na presença deste indutor. De modo geral, na condição estacionária o período de ação do indutor foi menor (cerca de 10 dias) do que na condição de agitação (cerca de 15 dias). No meio suplementado com pupunha, tanto na condição estacionária como a de agitação, a produção de lacase foi maior quanto maior o período testado na presença do indutor álcool veratrílico. Resultados semelhantes foram obtidos por Cavallazi e colaboradores (2005), quando constataram que a ação do indutor testado aumentou a atividade da enzima lacase num período superior a 20 dias, em cerca de 67U/mL ao controle testado.

Há relatos na literatura de que a presença do AV no meio de cultivo aumentou a produção de lacase pelo *Botryosphaeria* sp, sendo que a produção de biomassa fúngica deste microrganismo diminuiu consideravelmente na presença deste indutor (Giese et al.,2004).

Comparando-se os resultados neste trabalho com o de Santos (2009), verificou-se que esta autora obteve uma menor produção de lacase mesmo na presença de um surfactante (Twen 80), na utilização de outros meios de cultura para o fungo *L. crinitus*. Provavelmente, este fato se deve aos nutrientes diferentes dos usados neste trabalho, que foram mais eficientes para a atividade da lacase e também do surfactante testado.

Os dados obtidos neste trabalho sugerem que dependendo da espécie fúngica e das condições testadas o álcool veratrílico pode agir como indutor positivo ou negativo. De

acordo com Garcia (2006), não existe um ótimo indutor de lacase comum a todos os fungos testados, os resultados deste trabalho estão de acordo com o relatado por esta autora. Os fungos de composição branca respondem de maneira distinta frente aos supostos indutores de lacase (Necochea et al,2005).

Como as aplicações biotecnológicas requerem grande quantidade de enzima, e normalmente lacases extracelulares são produzidas em pequenas quantidades (Garcia, 2006), faz-se necessário o estudo de indutores para melhorar a produção desta enzima, visto que a mesma tem uma vasta aplicabilidade industrial e ambiental.

#### **6.4. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO E METABÓLITO DO FUNGO**

*Lentinus crinitus* EM AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus* E *Escherichia coli*.

O extrato bruto tanto aquoso como alcoólico obtido do carpóforo do fungo *Lentinus crinitus* não inibiram o crescimento das duas cepas (*S. aureus* e *E. coli*) testadas. Os nossos resultados estão de acordo com o obtido recentemente por Peres de Carvalho (2007), que não conseguiu atividade antimicrobiana com os extratos testados. Para este basidiomiceto não há relatos na literatura de atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas de extratos obtidos de carpóforo fúngico. Acreditamos que tal resultado negativo advém da inibição de antimicrobianos durante o procedimento do processo de obtenção do extrato. Estudos posteriores devem ser realizados no sentido de providenciar uma nova metodologia que não interfira na atividade biológica do microrganismo analisado.

Foi verificada a ação antibiótica dos metabólitos do fungo *L. crinitus* contra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*) no meio suplementado com pupunha (Meio de cultura mais eficiente para produção de biomassa do *Lentinus crinitus*). Para esta espécie é citada na literatura a atividade antimicrobiana, dada por quatro compostos sesquiterpênicos (Abate & Abraham, 1994). Além disso estudos de etnomicologia apontam este cogumelo como comestível por algumas tribos indígenas, somente após cozimento na brasa, pois segundo relatos indígenas ele provoca vômitos se ingerido cru (Fidalgo, 1965; Fidalgo & Hirata, 1979), provavelmente devido a alguma toxina que em geral são constituídas por substâncias antimicrobianas (Peres de Carvalho, 2007). Comparando os resultados negativos obtidos pelos extratos de carpóforos e positivos dos metabólitos fúngicos do *L. crinitus*, enfatiza-se ainda mais o problema da metodologia mencionada anteriormente no logro eficiente da atividade antimicrobiana.

Os produtos naturais são uma alternativa extremamente viável, uma vez que sempre foram importantes para o descobrimento de novas drogas, sendo fornecedoras de princípio ativo e por ser também uma alternativa mais econômica no controle de doenças para países em desenvolvimento, onde a maioria das drogas é importada (Fidalgo & Hirata, 1979). A resistência bacteriana aos antimicrobianos é considerada como um problema inerente à terapia antimicrobiana, por este motivo é preciso sempre a busca de novas fontes terapêuticas os quais sejam mais eficientes para o tratamento de infecções, como as bacterianas.

## CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos na presente pesquisa pode concluir que:

- O fungo *Lentinus crinitus* apresentou a maior produção de biomassa no meio suplementado com pupunha tanto na condição estacionária como na de agitação.
- A produção de biomassa micelial do fungo *L. crinitus* foi maior no meio suplementado com pupunha e menor naquele acrescido de açaí sob a condição estacionária.
- A agitação dos meios de cultivo afetou positivamente a produção de biomassa do fungo *L. crinitus*.
- Todos os 4 meios testados mostraram-se eficientes para a produção de biomassa do basidiomiceto *L. crinitus*.
- Os processos de agitação têm um efeito positivo na produção de lacase do *L. crinitus* em todos os meios testados.
- Sob a condição de agitação a maior produção de lacase do *L. crinitus* foi no meio suplementado com “cará” e já na condição estacionária foi no meio suplementado com “macaxeira”.
- Tanto para a produção da biomassa como para a atividade da lacase a condição de agitação tem efeito positivo em todos os meios testados para *L. crinitus*.
- O indutor álcool veratrílico (AV) aumentou a atividade da lacase em todos os meios usados na condição tanto estacionária quanto a de agitação para o basidiomiceto *L. crinitus*.
- O álcool veratrílico agiu como indutor positivo para *L. crinitus*.
- Tanto a produção da biomassa como a atividade da lacase são influenciadas pelos nutrientes presentes nos meios de cultivo do fungo *L. crinitus*.
- O extrato alcoólico e aquoso do *L. crinitus* não produziu atividade antimicrobiana *in vitro* sobre as linhagens *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

- O metabólito secundário do fungo *L. crinitus* em meio de maior produção de massa micelial tanto sob a condição de agitação como na estacionária (Pupunha) apresentou potencial antimicrobiano frente as linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABATE, D; ABRAHAM, W.R. Antimicrobial metabolites from *Lentinus crinitus*. **Journal of Antibiotics**, Tokyo, Japan, v.47, p. 1348 – 1350, 1994.
- ABRAMO, M.A. 1990. Taioba, cará e inhame: o grande potencial inexplorado. Editora Ícone, São Paulo. 80p.
- ALEXOPOULOS C. J. Introductory Mycology, 2<sup>a</sup> ed, p. 613, 1962.
- ALMEIDA FILHO, O. M.; BUENO, R.; BONONI, V. L. R. 1993. Algumas espécies de fungos basidiomicetos dos manguezais do estado de São Paulo. **Hoehnea**, **20**: 87-92.
- ANASTASI, A.; COPPOLA, T.; PRIGIONE, V; VARESE. G.C. **Pyrene degradation and detoxification in soil by a consortium of basidiomycetes isolated from compost: Pole of lacases and peroxidases.** J. Hazardous. Nat, vol. 165, n° 13, p. 1229 – 1233, 2009.
- ANTONIASSI, R.; PEÇANHA, B.R. B; LAGO, R.C.A. Efeito da adição de óleo de abacate na estabilidade oxidativa de óleos de soja e girassol. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 16., 1998, Rio de Janeiro. Anais... Campinas-SP, UNICAMP, 1998.
- ARORA, D. Mushrooms Demystified. Ten Speed Press, Berkeley. 2<sup>a</sup> ed, 1986.
- AZEVEDO J., RAMOS I., OLIVEIRA C., HENRIQUES I., CORREIA A. (2009) Unraveling differences between bacterioplankton and bacterioneuston: universal or specific primers? **10th Symposium on Bacterial Genetics and Ecology**. June, Uppsala, Sweden.
- BARBOSA, A. M.; CUNHA, P. D. T.; PIGATTO, M.M.; SILVA, M. L. C. da . Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina, v. 25, n. 1, p. 29-42, 2004.
- BARBOSA, T.P. (2006) **Derivados nitrogenados do norlapachol: síntese e atividade biológica**, Dissertação de Mestrado, LTF-UFPB, 152 pp.
- BARRETT, C.T. & BARRETT, J.F. Antivacterials: are the new entries enough to deal with the emerging resistance problems? *Current Opinion in Biotechnology*. Oxford, USA, v.14, p.621-626, 2003.
- BATEMAN, D.F. & BASHAM, H.G. (1976). Degradation of plant-cell walls and membranes by microbial enzymes. **Physiological and molecular plant pathology** **4**: 316-355.
- BELEM, M.A.F., LEE, B.H. Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v.38, n.7, p.565-598, 1998.
- BERNARD, M.; MOUYNA, I.; DUBREUCQ, G.; DEBEAUPUIS, J.P.; FONTAINE, T.; VORGIAS, C.; FUGLSANG, C.; LATGÉ, J.P. Characterization of a cell-wall acid phosphatase (phoap) in *Aspergillus fumigatus*. **Microbiology**. v. 148, p. 2819-2829, 2008.
- BEROVIC, M et al. (2003). Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. **Journal of Biotechnology**. 103:77-86.

BETTUCCI, L. & GUERRERO, R.T. (1971). Hongos xilófagos: estudio de cultivos. Bol. Fac. Agron. 118:1-40.

BILAY, V.T.; SOLONKO, 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. v.2, p.779-782.

BLANCHETTE, R. A., B. W. HELD, J. A. Jurgens and J. E. Haight. 2004. Wood deterioration in Chacoan great houses of the southwestern United States. **Conservation and Management of Archaeological Sites** 6:204-212.

BLANCHETTE, R.A. 1995. Degradation of lignocellulose complex in Wood. Can. J. Bot. 73: S999 – S1010. *Apud* Tuomela, M. Vikman, M., Hatakka, A. & Itavaara, M. 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology** 72: 169-183.

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

BOOMINATHAN K, REDDY C.A (1994). **Fungal degradation of lignin: biotechnological applications**, Arora DK, Elander RP, Mukerji KG (ed)., In handbook of applied mycology, Vol. 4. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 763-822.

BOOPATHY, R. 2000. Review: Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology* 74: 63-67.

BORCHERS, A. T. et al. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 221, n.4, p. 281 – 293, 1999.

BOSWELL, G. P.; JACOBS, H.; DAVIDSON, F. A.; GADD, G. M.; RITZ, K. Growth and Function of Fungal Mycelia in Heterogeneous Environments. **Bulletin of Mathematical Biology**, Elmsford, v. 65, n. 3, p. 447-477, 2003.

BOVI, M.L.A. Palmito pupunha: informações básicas para cultivo. Campinas: IAC, 1998. 50p. (IAC. Boletim Técnico. 173).

BREENE, W. M. **Nutritional value of speciality mushrooms**. *Journal of Food Protection*, v. 53, p. 883-894, 1990.

BREENE, W.N. **Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms**. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v.10, n.53, p.883-94, 1990.

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

BROOKS, F.B.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A. JAWETZ, MELNICK & ADELBERG'S. *Medical microbiology*; Graw-Hill Education: Singapore, 2004; pp. 252-254.

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

CAMERON, D.R., COOPER, D.G., NEUFELD, R.J. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v.54, n.6, p.1420-1425, 1988.

CARROLL, G. & PETRINI, O. (1983). Patterns of substrate utilization by some fungal endophytes from coniferous foliage. **Mycologia** **75**: 53-63.

CARVALHO, D.C.O; ALBINO, L.F.T.; ROSTAGNO, H.S. Composição química e energética de amostras de milho submetidas a diferentes temperaturas de secagem e períodos de armazenamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.2, p.358-364, 2005.

CARVALHO, W; CANILHA, L; FERRAZ, A; MILAGRES, A. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Quim. Nova**. vol 34, p 1-5, 2009.

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, 2001b.

CASTRO E SILVA, A. Micromorfologia da Degradação de Madeira da espécie Amazônica *Hura crepitans* L. por fungos ligninolíticos pertencentes a classe Hymenomyces ( Tese de Doutorado), Manaus: INPA/FUA, 1996.

CASTRO E SILVA, A.; SILVA, M. B. C.; CAVALCANTI, M.A. **FUNGOS: O inexplorado potencial enzimático da biodiversidade amazônica**. 2002 Disponível em: <http://www.geocities.com.br/biodiversidade2002/fungos>. Acesso em 10/02/2008.

CAVALLAZZI, J.R.P. et al. Screening of inducers for laccase production by *Lentinula edodes* in liquid medium. *Braz. J. Microbiol.*, São Paulo, n. 36, p. 383-387, 2005.

CHANG, H.M; JOYCE, T.W; KIRK, T.K. 4<sup>th</sup> Intein symp wood Pulping chem. Paris, 159, 1993.

CHANG, S. T. & BUSWELL, J. A. **Mushrooms nutraceuticais**. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 12, n.5, p. 473 – 476, 1996.

CHO, N. S; WILKOLAZKA, A; STASZCZAC, M; CHO, H.Y; OHGA, S. **The role of lacase from white rot fungi to stress conditions**. *J. F. Agric.*, Vol. 54, nº 1, p.81 – 83, 2009.

CLAUS, H. 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron.*, 35: p. 93-96.

CLOSE, J. E. L; ADRIENS, S.; MOORE, E. J.; BIGWOOD, J. Contribution à compost environment: a review. *Bioresour. Technol.*, 169-183 (2002).

COONEY, C.L. Growth of microorganisms. In: REHM, H.J. and REED. G. *Biotechnology – a Comprehensive Treatise*. 1981, v.1: 75 – 112.

COTORAS, D. et. al. **Scorption of metal ions by whole cells of Bacillus and Micrococcus**. *Environ. Technol.*, v. 13, pp. 551-559, 1992.

CRIST, R. H. **Interactions of metals and prótons with algae**. *Env. Sci. Technol. USA*. V. 22, 755 – 760, 1988.

- D'ANNIBALE, A; STAZI, S.R; VINCIGUERRA, V. (2000). Oxiraneimmobilized *Lentinus edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. *J. Biotechnol.* 77:265-273.
- DALLWITZ, M.J. A General system for coding taxonomic descriptions. *Taxon*, 29, 41-46, 1980.
- DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *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, n. 3, 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.
- DITTMANN, J.; HEYSER, W.; BUCKING, H. 2002. Biodegradation of aromatic compounds by white rot and ectomycorrhizal fungal species and the accumulation of chlorinated benzoic acid in ectomycorrhizal pine seedling. **Chemosphere**. v. 49, n.3, p. 297 – 306.
- DONADIO, S. et.al. Targets and assay for discovering novel antibacterial agents. *Journal of Biotechnology*. v.99, p. 175-185, 2002.
- DOSS, R. P. Composition and Enzymatic Activity of the Extracellular Matrix Secreted by Germlings of *Botrytis cinerea*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 2, p. 404-408, 1999.
- EGGEN, T. & SVEUM, P. 2001. DDT degradation by chemical oxidation and white rot fungi. *In: Ex situ biological treatment technologies*. Magar, V.S., von Fahnestock, F.M., Leeson, A. (eds.). Columbus: Battelle Press 157-164.
- ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. (2004). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS.
- EVANS, C. S. & HEDGER, J. N. 2001. Degradation of plant cell wall polymers. *In: Fungi in bioremediation*, Gadd, G. M. (ed.). University Press, Cambridge, British Mycological Society, 1-24.
- FAISON, B.D. and KIRK, T.K. (1985) Factors involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 49, 299-304.
- FAISON, B.D. Binding of dissolved strontium by *Micrococcus luteus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56(12), 2.649 – 3.656, 1990.
- FATIBELLO-FILHO, Orlando. VIEIRA, Iolanda da Cruz. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. *Química Nova*, Vol. 25, No. 3, 455-464, 2002.

- 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. & HITARA, J.M. Etnomicologia caiabi, txicão e txucurramãe. *Rickia*, v.8, p. 1-5, 1979.
- FIDALGO, O. Conhecimento micológico dos índios brasileiros. *Revista de Antropologia*, v. 15/15, p. 27-34, 1968.
- FINDLAY, W. P. K. The nature and durability of wood. In: FINDLAY, W. P. K. (Ed). **Preservation of timber in the tropics**. Dordrecht: Martinus Nijhoff/ Dr. W. Junk Publishers, 1967. p. 1-13.
- FONSECA, M. D. P., Enzimas Oxidativas produzidas pelo Fungo Amazônico *Cookeina tricholoma* (Ascomiceto). (Dissertação de Mestrado), 2009.
- FREITAS, S.P.; LAGO, R.C.A.; JABLONKA, F.H.; HARTMAN, L. Extraction aqueuse enzymatique de l'huile d'avocat a partir de la pulpe fraîche. *Revue Française des Corps Gras*, Paris, v.41, p. 365-371, 1993.
- GARCIA, T. A. Purificação e caracterização das lacases de *Pycnoporus sanguineus*. 2006. Tese (Programa de pós - graduação em biologia celular), Universidade Nacional de Brasília, Brasília DF.
- GIANFREDA, L.; XU, F.; BOLLAG, J.M. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. **Bioremediation J.**, 3, 1-25, 1999.
- GIESE, E.C.; COVIZZI, R.F.H.; DEKKER, A.M.; Influência de Tween na produção de lacases constitutivas e indutivas pelo *Botryosphaeria sp.* *Acta Scientiarum Biological Sciences*, 2004.
- GIL-AD, N. L.; BAR-NUN, N.; MAYER, A. M. The possible function of glucan sheath of *Botrytis cinerea*: Effects on the distribution of enzyme activities. **Microbiology Letters**, Oxford, v. 199, n. 1, p. 109-113, 2001.
- GONÇALVES G. V. C.; LOGUERCIO-LEITE, C. 2001; Biodiversidade de fungos poróides xilófilos (Basidiomycetes) na Unidade de Conservação Desterro (UCAD), Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Insula**, 30: 01-19.
- GRAY, S. N. 1998. **Fungi as potencial bioremediation agents in soil contaminated with heavy or radioactive metals**. *Biochem . Soc. Trans.* 26: 666 – 70.
- GUERRERO, R. T.; HOMRICH, M. H. 1999. **Fungos macroscópicos comuns no Rio Grande do Sul**. 2ª ed. Editora da UFRGS, Porto Alegre, Brasil, 124pp.
- GUGLIOTTA, A.M; CAPELARI, M. 1998. Taxonomia de Basidiomicetos. In: Bononi, V. L. R.; Grandi, R.A.P. (Eds.). **Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas**. Instituto de Botânica, São Paulo, SP. p.68-105.
- GWEIN, V. 2002. All living things, online. **Nature**. 418:362- 363.

HÄGGBLUM, M. M. 1992. Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds. *FEMS Microbiology Reviews* 103: 29-72.

HATAKKA, A. (1994). Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13:125– 135.

HAWKSWORTH, D. L, P. M. KIRK. B. C. SUTTON & D. N. 1995. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi. CAB International, Cambridge, Univ. Press.

HAWKSWORTH, D. L. **The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation.** *Mycol. Res.*, 95: 641 – 655, 1991.

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

HIGUCHI, T. (1990). Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci Technol.* 24: 23-63.

HOLF, J. A; KLOPFENSTEIN, N.B; TONN, JR; MCDONALD, GI; ZAMBINO, PJ; ROGERS JD; PEEVER TL, CARRIS LM. 2004. Roles of Woody Root-Associated Fungi in Forest Ecosystem Processes: Recent Advances in Fungal Identification. USDA Forest Service RMRS – RP-47, **Rocky Mountain Research Station.**

HWANG, H.J., KIM, S.W., XU, C.P., CHOI, J.W. AND YUN, J.W. Production and molecular characteristics of four groups of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus gilvus*. *Journal of Applied Microbiology* 94: 708 – 719, 2003.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. *Microbiologia Médica.* 2 ed. São Paulo: Premier, 1998.

KANTELINEN, A., HATAKKA, A. and VIIKARI, L. (1989) Production of lignin peroxidase and laccase by *Phlebia radiata*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 31, 234 – 239.

KIM, S. W., HWANG, H. J., XU, C. P., CHOI, J. W. AND YUN, J. W.. Effect of aeration and agitation on the production of mycelial biomass and exopolysaccharides in an entomopathogenic fungus *Paecilomyces sinclairii*. *Letters in Applied Microbiology* 36 : 34 - 321 – 326, 2003.

KIRK, O., BORCHERT, T.B., FUGLSANG, C.C. Industrial enzyme applications. *Curr. Op. Biotechnol.* v. 13, p.345-351. 2002.

KIRK, T. K. & FARRELL, R. L. 1987. Enzymatic “combustion”: The microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology* 41: 465-505.

KLONOWSKA, A.; GAUDIN, C.; FOURNEL, A.; ASSO, M.; PETIT, J.L.; GIORGI, M. & TRON, T. 2002. Characterization of a low potential laccase from the basidiomycete C30. *European Journal of Biochemistry.* V.269, p. 6119 – 6125.

KOLLAR, R., STURDIK, E., SAJBIDOR, J. Complete fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* biomass. *Food Biotechnology*, New York, v.6, n.3, p.225-237, 1992.

- KOSE, Y.; ABASIYANIK, F.M.; SALIH, B.A. Antibiotic Resistance Rates of *Escherichia coli* Urinary Tract Isolates in Rize Province, Turkey. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2007, 1, 147-150.
- KOTRBA, P. RUMML, T. 2000. **Bioremediation of heavy metal pollution exploiting constituents, metabolites and metabolic pathways of livings.** A review. Coll. Czech. Chem. Comm., 65: 1205 – 1247.
- KÜES, U. & SUAY, I. Fruiting body production in Basidiomycetos. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, Germany, v.54, n. 2, p.141-152, 2000.
- KUHN, S.P., PFISTER, R. M. Accumulation of cadmium by immobilized *Zoogloea ramigera* 115. *J. Ind. Microbiol.*, v.6, 123-138, 1990.
- LACAZ, C. L. 2002. **Tratado de Micologia Médica.** 9<sup>a</sup> ed. São Paulo: ARVIER.
- LACAZ, C. S. Antibióticos, 1<sup>a</sup> Ed., São Paulo: Fundo Editorial Prociencx, p.459, 1965.
- LEHNINGER, A. L. Princípios de Bioquímica. 2 ed. São Paulo. Ed. Sarvier, 797p. 1995.
- LEITE, B.; PASCHOLATI, S. F.; KITAJIMA, W.; ISHIDA, M. L. Mecanismos de adesão de bactérias e fungos às plantas hospedeiras. In: Wilmar, C. L.(Org.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas.** Passo Fundo: RAPP, 2001. v. 9, p. 119-157.
- LEONOWICZ, A; GRZYWNOWICZ, K. (2001). Quantitative estimation of laccase form in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate. *Enzyme Microb. Technol.* 3:55-58.
- LEWIS, K.; AUSUBEL, F.M. Prospectus for Plant-derived Antibacterials. *Nat. Biotech.* 2006, 24, 1504-1507.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Biotecnologia Industrial, Vol.3, 2005, São Paulo: Ed. Edgard Bliicher LTDA, pg: 593.
- 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.
- LONERGAN, G and BAKER, W.L. (1995) Comparative study of substrates of fungal laccase. *Letters in Applied Microbiology* 21, 31-33.
- 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** 33: 270-277, 2003.
- LOQUERCIO-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.
- LUCHESE, R; HARRIGAN, W. Biosynthesis of aflatoxin – the role of nutritional factors. **Journal of Applied Bacteriology** 74: 5-14, 1993.
- MACIEL, M. J. M; CASTRO E SILVA, A; RIBEIRO, H.C.T. **Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: a review.** *Journal Elect. Biotech.*, em prelo, 2010.

MAGNELLI, P. E.; CIPOLLO, J. F.; ROBBINS, P. W. Glucanase-driven fractionation allows redefinition of *Shizoccharomyces pombe* cell wall composition and structure: assignment of diglucan. *Analytical Biochemistry*, New York, v. 336, n. 2, p. 202-212, 2005.

MANZONI, M et. Al. Production of stations by filamentous fungi. *Biotechnology Letters* 21: 253 – 257, 1999.

MARINHO, A.M.R.; RODRIGUES-FILHO, E.; MOITINHO, M.L.R.; SANTOS, L.S. Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. **Journal of the Braziliam**. Chemical Society 16(2): 280-283, 2005.

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 como produtores de lacases utilizando uma metodologia simplificada. *Ciencias Agrarias*, Londrina, v.30, n.2, p. 397-406, abr./jun.2009.

MARTINS DA SILVA, N. Avaliação do Potencial Antimicrobiano, Enzimático e Crescimento de um Isolado Amazônico do Fungo *Pycnoporus sanguineus*. (Dissertação de Mestrado), Universidade do Estado do Amazonas – UEA, 2010, 180p.

MATHEUS, D. R. & OKINO, L. K. 1998. **Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos**. In: Bononi, V. L. R. e Grandi, R. A. P. (eds.). 1998. Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos – noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria de Estado de Meio Ambiente. 184p.

MATHEUS, D. R., BONONI, V. L. R. & MACHADO, K. M. G. 2002. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soil contaminated with industrial residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16 (5): 415-421.

MAYER, A.M; STAPLES, R.C. (2002) Lacase: New functions for an old enzyme phytochemistry. V. 60, p. 551-565.

MONNO, R.; RIZZO, C.; DE, V.D.; NUCLEO, E.; MIGLIAVACCA, R., PAGANI, L.; RIZZO, G. Prevalence, Antimicrobial Resistance, and Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases Characterization of *Salmonella* Isolates in Apulia, Southern Italy (2001–2005). *Microb. Drug Resist.* 2007, 13, 124-129.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PHALLER M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H.; *Manual of Clinical Microbiology*. 7 ed. Washington: ASM Press, 2000.

MUZZARELLI, R. A. A.; MILIANI, M.; CARTOLARI, M.; Tarsi, R.; TOSI, G.; MUZZARELLI, C. Polyuronans obtained by regiospecific oxidation of polysaccharides from *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei* and *Saprolegnia* sp. *Carbohydrate Polymers*, Barking, v. 43, n. 1, p. 55-61, 2000.

NAKAJIMA, A.; SAKAGUSHI, T. Selective accumulation of heavy metals by microorganism. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 24, 59-64, 1986.

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.

- NEDER, R.N. Microbiologia: Manual de Laboratório. São Paulo: Nobel, 2004, 138p.
- NERUD, F., ZOUCHOVA, Z and MISURCOVA, Z. (1991) Ligninolytic properties of different white-rot fungi. *Biotechnology Letters* 13, 657 – 660.
- NEUFELD, P. 1997. Micologia. **Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro - RJ.
- NIKU-PAAVOLA, M.L., KARHUNEN, E., KANTELINENE, A., VIIKARI, L., LUNDELL, T., HATAKKA A. (1990), The effect of culture conditions on the production of lignin modifying enzymes by the white rot fungus *Phlebia radiata*. **J. Biotechnol.**, 13, 211-221.
- NUNAN, E.A. et al. Estudo da atividade antimicrobiana de extrato de folha de *Aristolochia gigantea* Mart. E Zucc. **Revista de Farmácia e Bioquímica**, Belo Horizonte, v.6, n.1, p.33-40, 1985.
- OLIVEIRA, R.F.M., FONTES, C.A.A., SILVA, J.F.C. (1986). Estudo da recuperação fecal do Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e dos indicadores internos CIA, CIDA e lignina em períodos de coleta de dois a sete dias, em bovinos. **R. Soc. Bras. Zootec.**, 20 (5): 522-531.
- 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**, Zagreb, v. 39, n. 4, p. 319-326, 2001.
- PAVLOVA, M., SOKOLOV, A, STAUDT, M., MARCONATO, F., BIRBAUMER, N., & KRÄGELOH-MANN, I. (2005). **Recruitment of periventricular parietal regions in processing cluttered point-light biological motion**. *Cerebral Cortex*, 15, 594-601.
- PELÁEZ, F. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products. *Biochemical pharmacology*. V.71,p. 981 – 990, 2006.
- PERALTA-ZAMORA, P.; KUNZ, A.; MORAES, S. G.; PELEGRINI, R.; MOLEIRO, P. C.; REYES, J.; DURÁN, N. Degradation of reactive dyes I: a comparative study of ozonation, enzymatic and photochemical processes. **Chemosphere**, [S.l.], v. 38, n. 4, p. 835-852, Feb. 2003.
- PERES DE CARVALHO, M. Avaliação da atividade antimicrobiana dos basidiomicetos *Lentinula edodes*, *Lentinus crinitus*, *Amauroderma sp.* e *Pycnoporus sanguineus*. (Dissertação de Mestrado), 2007.
- PETRINI, O. (1991). **Fungal endophytic of tree leaves**. In: Andrews J. and Hirano SS (eds) *Microbial ecology of leaves*. Spring Verlag, pp. 179-197.
- POINTING, S.B.; JONES, E. B.G.; VRIJMOED. L.L.P. Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture. *Mycologia*, 92(1); 139 – 144, 2000.
- POINTING, S.B.; VRIJMOED, L.L.P. Decolorization of azo and triphenylmethane dyes by *Pycnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenoloxidase. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. Volume 16, Number 3 / April, 2000.
- POINTING, S.G. **Feasibility of bioremediation by white rot fungi**. *Appl. Microb. Biotech*, Vol 57, p.20 – 23, 2001.

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. 2002. **Os Reinos dos Fungos. Vol. 2.** 2ed. Santa Cruz do Sul: EDUNISC.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. 2004. **Os Reinos dos Fungos. Vol. 1** 2ed. Santa Cruz do Sul: EDUNISC.

RAMOS I., AZEVEDO J., CORREIA A., HENRIQUES I. (2009) Is there a specific bacterial community within the sea surface microlayer? – Insights from culture-dependent approaches. **VIII Post-Graduation Symposium on Biosciences**. Maio, Aveiro, Portugal.

RAVEN, P.H.; et al., 2001. **Biologia Vegetal**. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara KOOGAN.

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.

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 médium contaning the herbicide, Scepter (imazaquin). *Journal of Basic Microbiology*, Berlin, v. 45, n. 6, p. 460 - 469, 2005.

ROGEZ, H. Açaí: preparo composição e melhoramento da conservação. Belém: Universidade Federal do Pará, 2000.

ROJAS, A.; HERNANDEZ, L.; PEREDA-MIRANDA R.; MATA, R. Screening for Antimicrobial Activity of Crude Drug Extracts and Pure Natural Products from Mexican Medicinal Plants. *J. Ethnopharmacol.* 1992, 35, 275-283.

ROSA, L. H. et al. Screening of brazilian Basidiomycetes for antimicrobial activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.98,n.7, p. 1-8, 2002.

RUIZ-DUEÑAS, F.J and MARTINEZ, A. T. Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is take advantage of this (Review). **Micro. Biotch**, vol 2, p. 164 – 177, 2009.

SANTOS, G.B. Açaí (*Euterpe oleracea*): Aspectos Químicos e Farmacológicos. Tese de Mestrado. Faculdade de Farmácia, UFRJ, 151p. 2001.

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, 2009, 100p.

SCHAECHTER, M. E.; ENGLEBERG, N. C.; EISENSTEIN, B. I.; MEDOFF, G. *Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SELBMANN, L.; CROGNALE, S; PETRUCCIOLI, M. Exopolysaccharide production from *Sclerotium glaucanicum* NRRL 3006 and *Botryosphaeria rhodina* DABAC-P82 on raw and

hydrolysed starchy materials. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v. 34, n. 1, p. 51-55, 2002.

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

SILVA, V.V.; CAMPANHA, F.G., PERALTA, R.M. Otimização do crescimento micelial do cogumelo comestível *Pleurotus sajor-caju* utilizando resíduos de frutas como substrato. In: CONGRESSO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE CASCAVEL E 1. SIMPÓSIO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS DO MERCOSUL, 1., 2004, Cascavel. *Resumos*. Cascavel: 2004. p.124.

SMITH, J.E. *Biotechnology Principles: Aspects of Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, 1985, 119 pp.

SOARES, C.H.L. 1998. Estudos mecanísticos da degradação de efluentes de indústrias de papel e celulose por fungos basidiomicetos degradadores de madeira. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas – SP.

SONGULASHVILI, G; ELISANSHVILI, V; WASSER, S; NEVO, E; HADAR, Y. **Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes**. *Enz. Micr. Tech*; Vol 41, nº 2, p. 57-61, 2007.

SOUZA, M.F.; SATO & A.P. TAKEMATSU. Suscetibilidade do ácaro rajado proveniente de videira de Pilar do Sul, SP, a diversos acaricidas. *Pesq. Agropec. Bras.* 29: 1187-1192, 2008.

SOUZA, R. F.; GOMES, R. C.; COELHO, R. R. R.; ALVIANO, C. S.; SOARES, R. M. A. Purification and characterization of an endochitinase produced by *Colletotrichum gloeosporioides*. *FEMS Biotechnology Letters*, Holanda, v. 222, n. 1, p. 45-50, 2003.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 41-46, 1998.

SZKLARZ, G.D.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A. Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. *Mycologia*. v.81, p.234-240, 1989.

SZPIZ, R.R; JABLONKA, F.H.; PEREIRA, D.A. **Avaliação do óleo de cultivares de abacate provenientes da região do cerrado**. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CTAA, 1987. (Boletim de Pesquisa, 16).

TANG, Y.J.; ZHONG, J. J.; Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of *Ganoderma* polysaccharide and ganoderic acid. **Enzyme and Microbial Technology**, 32: 478 – 484, 2003.

TAVARES, W. *Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Anti- infecciosos*. 2ª ed, São Paulo: Editora Atheneu, 1999.

TAVARES, W. **Pequena história sobre os antimicrobianos**. *Arquivos Brasileiros de Medicina*. V. 59, p.153 – 158, 1985.

- TEIXEIRA, M. F. S.; PORTO, A. L. F., ROCHA, W.C. & FERNANDES, O. C.C. 2001. **Produção de Compostos Bioativos de Interesse Industrial**. Universidade do Amazonas. Fundação UNISOL. Manaus – AM.
- THAKORE, Y.B. Enzymes for Industrial Applications. BBC RESEARCH. BIO030 Published: January 2008.
- THURSTON C.F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140:19-26.
- TONET, R.M; FERREIRA, L.G. de S.; OTOBONI, J.L. de M. **A cultura da pupunha**. Campinas: CATI, 1999. 44p. (Boletim Técnico, 237).
- TORTELLA, G. R.; DIEZ, M. C. & DURÁN, N. 2005. Fungal Diversity and Use in Decomposition of Environmental Pollutants. *Critical Reviews in Microbiology* 31: 197–212.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999.
- TUOMELA, M., VIKMAN, M., HATAKKA, A., ITAVAARA, M. 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**. **72**: 169 – 183.
- VIEIRA, M. C.; HEREDIA Z., N. A.; GRACIANO, J. D.; RIBEIRO, R. Uso de matéria seca de cará e de mandioquinha- salsa substituindo parte do milho na ração para frangos de corte. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.17, n.1, p.34-38, 1999.
- WALTER, R.; BARRA, C. R. *Microbiologia, Imunologia e Parasitologia*. Curitiba: Século XXI, 2001.
- WANG , T.; DENG , L.; LI, S.; TAN , T. Structural characterization of a water-insoluble (1→3)- $\alpha$ -D-glucan isolated from the *Penicillium chrysogenum*. *Carbohydrate Polymers*, Barking, v. 67, n. 1, p. 133–137, 2007.
- WASSER, S. P. & WEIS, A. L. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. **Critical Reviews in Immunology**, New York, USA, v.19, p. 65-96, 1999.
- WATSON, L. e DALLWITZ, M.J. The families of Angiosperms: automated description, with interactive identification and information retrieval. *Aust. Syst. Bot.*, 4, 681-695, 1994.
- WEN, X; JIA, Y. LI, J. Degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude lignin peroxidase prepared from Phanerochate chrysosporium – a white rot fungus. **Chemosphere**, vol. 75, nº 8, p. 1003 – 1007, 2009.
- WESSELS, J.G.H. 1994. Development regulation of fungal cell wall formation. *Annual Review Phytopathology*. 32: 413- 437. *Apud* Pessoni, R. 2002. Isolamento e caracterização de enzimas extracelulares e de parede celular do fungo *Penicilliu janczewskii*, crescidos em diferentes fontes de carbono. **Tese de Doutorado**, Universidade de São Paulo, São Paulo, 163p.

XIAO, J.; OHSHIMA, A.; KAMKURA, T.; ISHIYAMA, T.; YAMAGUSHI, I. Extracellular glycoprotein(s) associated with cellular differentiation in *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-microbe Interactions**, Saint Paul, v. 7, n. 5, p. 639-644, 1994.

XIAO, Y.Z., TU, X.M., WANG, J., ZHANG, M., CHENG, Q., ZENG, W.Y. & SHI, Y.Y. 2003. Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a lacase from basidiomycete *Trametes* sp. Strain AH28 – 2. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 60: 700 – 707.

XU, C. P.; YUN, J.W. Influence of aeration on the production and the quality of the exopolysaccharides from *Paecilomyces tenuipes* C240 in a stirred-tank fermenter. **Enzyme Microbial Technology** 35: 33 – 39, 2004.

## **ANEXOS**



Área: **Fermentação e Biotecnologia ( Divisão J )**

## **PRODUÇÃO DE BIOMASSA DO FUNGO AMAZÔNICO *LENTINUS CRINITUS* EM DIFERENTES MEIOS NUTRICIONAIS**

**Rafaelle Maria Paz Nepomucena (UEA); Natália Martins da Silva (UEA); Helena Camarão Telles Ribeiro (UEA); Ademir Castro E Silva (UEA)**

### **Resumo**

Os metais pesados representam o maior resíduo industrial contaminante de solos, plantas e animais no ecossistema, causando graves efeitos tóxicos ao homem. Pesquisadores preocupados com problemas associados à poluição ambiental por metais pesados iniciaram estudos com técnicas de biorremediação utilizando microrganismos, dentre os quais se destacam os fungos na degradação desses agentes tóxicos. Dentre os vários processos utilizados na remediação, um dos sistemas mais promissores é a bioissorção de metais pesados. Para otimização do crescimento do fungo foram testados seis diferentes meios de cultura líquida, os quais tiveram como fonte de carbono M1-*Bactris gasipaes* (Pupunha); M2- *B. gasipaes* (Pupunha) com *M. esculenta* (Macaxeira) na proporção de 1:1; M3 - *Manihot esculenta* (Macaxeira); M4-*Ipomoea batatas* (Batata doce); M5- *Daucus carota* (Cenoura) e M6- Cascas de *D. carota* (Cenoura) com cascas de *I. batatas* (Batata doce) na proporção de 1:3. Foram utilizadas amostras de carpóforo do fungo *Lentinus crinitus* obtidas do material micológico do laboratório de Biorgânica da UEA. As amostras foram analisadas no período de 7 e 14 dias de incubação sob agitação. A massa micelial foi obtida após filtração através do peso seco em estufa a 70° C até peso constante, sendo posteriormente calculada através da equação:  $MM (\%) = (\text{peso final} - \text{peso inicial}) / (\text{peso inicial}) \times 100$ . Os resultados demonstraram uma diferença significativa a nível de 99% de confiança nos meios de culturas testados entre os períodos de 7 e 14 dias de incubação. Em valores absolutos o fungo *L. crinitus* M2, foi o que apresentou maior percentual de massa fúngica cerca de 20% em relação aos outros meios para o período de 7 dias. Quando retiramos o elemento nutricional macaxeira do meio a produção se reduz a 41%. No período de 14 dias o meio M2 teve uma produção de 52,23%. Pode-se inferir que tal resultado tenha como influência uma proporção de diferentes fontes de carbono e nitrogênio. Os resultados indicam que o fungo *L. crinitus* M2 teve melhor crescimento no meio de cultura de Pupunha + macaxeira no período de 7 e 14 dias. Podemos concluir que existe a necessidade de realizar novos estudos no que se refere a massa micelial do *L. crinitus* para testar o potencial de diferentes fontes de carbono de espécies vegetais da região amazônica para possível aplicação em estudos de bioissorção de metais pesados.

**Palavras-chave:** *Lentinus crinitus*, Fontes de carbono, Massa Micelial

Área: **Microbiologia Clínica ( Divisão A )**

**AVALIAÇÃO 'IN VITRO' DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DO FUNGO AMAZÔNICO *LENTINUS CRINITUS* CONTRA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* E *ESCHERICHIA COLI***

**Rafaelle Maria Paz Nepomucena (UEA); Natália Martins da Silva (UEA); Helena Camarão Telles Ribeiro (UEA); Ormezinda Celeste Cristo Fernandes (UEA); Ademir Castro E Silva (UEA)**

**Resumo**

O potencial biotecnológico de microrganismos especialmente aqueles da biodiversidade amazônica, tem despertado grande interesse de cientistas do mundo todo em função do seu grande potencial industrial. Apesar da disponibilidade de um grande número de antibióticos, é fundamental buscar compostos que possam atuar como novas drogas principalmente após o surgimento de novas bactérias multiresistentes. O interesse por testes biológicos com fungos basidiomicetos é crescente, principalmente na produção de novos fármacos, responsáveis pela inibição de microrganismos. Metabólicos do fungo amazônico degradador de madeira *Lentinus crinitus* foram cultivadas em meio de cultura sólido e líquida submersas em BDA (Potato dextrose agar) na qual foram obtidos da micoteca do Laboratório de Biogênica /MBT da UEA. Para a realização dos testes antimicrobianos o extrato bruto foi obtido a partir da cultura líquida incubada em Shaker, após este período a cultura foi filtrada e fracionada por cromatografia em camada delgada sendo utilizado Acetato de Etila, Hexano, Metanol e Ácido Fórmico 3:3:3:1 (v:v:v:v) como eluentes. As bactérias selecionadas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foram testadas frente aos metabólicos empregando-se o método de difusão em ágar pelo sistema de discos e o método bioautográfico. Após 24 horas de inibição em meio as condições testadas num período de 7 dias, constatou-se em meio a análise em placa a ausência de halos de inibição porém nos testes bioautográficos foram observados moléculas com ação contra os microrganismos testes analisados. Face aos resultados obtidos as amostras bacterianas ensaiadas tiveram seu crescimento inibido na presença do metabólico produzido pelo fungo *Lentinus crinitus* sugerindo uma possível atividade antimicrobiana deste metabólico.

**Palavras-chave:** Atividade antimicrobiana, Bioautografia, *Lentinus crinitus*

Área: Fermentação e Biotecnologia (Divisão J)

## EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA, DO FUNGO AMAZÔNICO *PYCNOPORUS SANGUINEUS* SOB AGITAÇÃO

**Natália Martins da Silva** (UEAMBT); **Rafaelle Maria Paz Nepomucena** (UEAMBT); **Ademir Castro E Silva** (UEAMBT); **Ormesinda Celeste Cristo Fernandez** (CPqLMD/FIOCRUZ); **Helena Camarão Telles Ribeiro** (UEAMBT)

### Resumo

O potencial biotecnológico de microrganismos especialmente aqueles da biodiversidade amazônica, tem despertado grande interesse de pesquisadores de todo o mundo, tal fato deve-se a grande biodiversidade de microrganismos existentes e aos poucos estudos realizados com a finalidade de aproveitar o potencial desses microrganismos para auxiliar no desenvolvimento sustentável, e para a implantação de bioindústrias. Dentre os microrganismos que contribuem para a nossa megadiversidade estão os fungos que se destacam pelo poder de degradação da matéria orgânica. Os fungos são capazes de degradar a madeira, sendo os da classe Basidiomycetes os mais eficientes degradadores, possuindo a mais efetiva capacidade de biodegradação de materiais lignocelulósicos na natureza. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes fontes de carbono na produção de massa micelial, do Fungo Amazônico *P. sanguineus*. Foram testados seis meios de cultura líquida sob agitação de 180 rpm e temperatura de 30°C, os quais tiveram como fonte de carbono: 1- *Bactris gasipaes* (pupunha), 2- *Manihot esculenta* (macaxeira), 3- *Ipomoea batatas* (batata doce), 4- *Daucus carota* (cenoura), 5- *B. gasipaes* (pupunha) com *M. esculenta* (macaxeira) na proporção de 1:1 e 6- Cascas de *D. carota* (cenoura) com cascas de *I. batatas* (batata doce) na proporção de 1:3 respectivamente. A massa micelial foi medida em 7, 14 e 21 dias de incubação e 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. Em 7 e 14 dias de incubação, a maior produção de massa micelial ocorreu no meio 04 (Batata Doce), em 21 dias de incubação a maior produção foi no meio 01 (Pupunha). O período de maior produção de massa micelial nas condições testadas foi o de 21 dias. Dentre os experimentos realizados a maior média de crescimento micelial ocorreu no meio 01 (Pupunha). Desta forma, pode-se concluir que existe a necessidade da realização de novos estudos com a finalidade de aperfeiçoar a produção de massa micelial, uma vez que o fungo em questão tem potencial biotecnológico.

**Palavras-chave:** Massa Micelial, Meios de Cultura, *Pycnoporus sanguineus*, Fungo

Área: Fermentação e Biotecnologia ( Divisão J )

**EFEITO DE DIFERENTES MEIOS NUTRICIONAIS NA PRODUÇÃO DA ENZIMA LACASE APARTIR DE UM ISOLADO AMAZÔNICO DO FUNGO *PYCNOPORUS SANGUINEUS*.**

**Natália Martins da Silva (UEA); Rafaelle Maria Paz Nepomucena (UEA); Ademir Castro E Silva (UEA); Helena Camarão Telle Ribeiro (UEA)**

**Resumo**

Entre os organismos vivos, que apresentam um grande potencial enzimático estão os fungos. Dentre estes, destaca-se o fungo *Pycnoporus sanguineus*. As enzimas são os produtos microbianos mais explorados na indústria biotecnológica, pois apresentam uma série de vantagens no processamento de alimentos e em muitos outros ramos da indústria. Outras vantagens da aplicação de enzimas estão relacionadas com o custo de produção relativamente baixo e susceptibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de seis diferentes meios de cultura na produção da enzima lacase a partir de um isolado amazônico do fungo *P. sanguineus*. Foram testados seis meios de cultura líquida, os quais tiveram como fonte de carbono e nitrogênio: M1- *Bactris gasipaes* (Pupunha); M2- *B. gasipaes* (pupunha) com *M. esculenta* (macaxeira) na proporção de 1:1; M3 – *M. esculenta* (macaxeira); M4- *I. batatas* (batata doce); M5- *D. carota* (cenoura) e M6- Cascas de *D. carota* (cenoura) com cascas de *I. batatas* (batata doce) na proporção de 1:3 respectivamente. Os meios de cultura com o disco de micélio foram mantidos em incubador Shaker a 180 rpm (28 °C) pelos períodos de 7 e 14 dias para a obtenção do caldo de cultura fúngica. Para determinação da enzima lacase foi utilizado: 0,3 mL tampão citrato fosfato (pH= 5,0), 0,1 mL solução etanólica siringaldazina, 0,1 mL água destilada e 0,5 mL do caldo fúngico. Todos os reagentes foram, depositados em cubeta de vidro e levados para o espectrofotômetro para leitura por 3 minutos a absorbância de 525nm. Em 7 e 14 dias de incubação, a maior produção da enzima lacase deu-se nos meios de cultura M1 (Pupunha) e M4 (Batata Doce), tendo ambos igualado-se em absorbância 3,00 nos dois períodos de incubação. O meio que se apresentou menos eficiente foi o meio M2 (Pupunha+Macaxeira), em 7 e 14 dias de crescimento. Os resultados mostraram uma diferença significativa na produção de lacase do fungo amazônico *P. sanguineus* 04, nos diferentes meios testados, sendo que a melhor produção de lacase deu-se no meio M1 em 7 e 14 dias.

**Palavras-chave:** Biotecnologia, Fermentação, Meio de Cultura, Enzima