

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA  
DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA  
QUÍMICA

**JANAINA DUARTE BAUMER**

**Produção do Antibiótico Cinabarina pelo Fungo *Pycnoporus sanguineus* utilizando Resíduos Lignocelulósicos como Substrato**

Florianópolis  
2009



**JANAINA DUARTE BAUMER**

**Produção do Antibiótico Cinabarina pelo Fungo *Pycnoporus sanguineus* utilizando Resíduos Lignocelulósicos como Substrato**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina como parte integrante dos requisitos exigidos para obtenção do título de mestre em Engenharia Química.

Orientadores: Prof. Dr. Ayres F. Morgado.  
Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.

Florianópolis  
2009



JANAINA DUARTE BAUMER

**Produção do Antibiótico Cinabarina pelo Fungo *Pycnoporus sanguineus* utilizando Resíduos Lignocelulósicos como Substrato**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina como parte integrante dos requisitos exigidos para obtenção do título de mestre em Engenharia Química.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof.<sup>o</sup> Dr. Ayres Ferreira Morgado  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>o</sup> Dr. Agenor Furigo Júnior  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>o</sup> Dr. [Antônio Augusto Ulson de Souza](#)  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Lorena B. Ballod Tavares  
Universidade Regional de Blumenau

Data da Aprovação:

Florianópolis  
2009



*“É praticamente uma lei na vida que quando uma porta se fecha para nós, outra se abre. A dificuldade está em que, frequentemente, ficamos olhando com tanto pesar a porta fechada, que não vemos aquela que se abriu.”*

*Andrew Carnegie.*



*Com muito carinho dedico este trabalho  
ao meu pai - Ivo, minha mãe - Cida, meu  
irmão - Xandi e Gilson - meu namorado,  
pessoas especiais que sempre  
incentivaram e apoiaram todas as minhas  
escolhas.*



## AGRADECIMENTOS

A Deus que me deu a vida, a força nos momentos de dificuldade, a companhia nos momentos de solidão e o amor em todas as horas.

Aos meus pais e meu irmão pelo amor, apoio e incentivo. Tudo que sou é graças a vocês.

Ao meu namorado presente em todos os momentos, me incentivando e apoiando.

À professora Giovana Carolina Bazzo por estar sempre disposta a ajudar.

Aos professores Agenor Furigo Júnior e Ayres Ferreira Morgado pela orientação e dedicação.

Às amigas e grandes colaboradoras Sabrina Moro Villela Pacheco e Siannah Maria Mas Diego.

Aos amigos, em especial Felipe A. Retzlaff (Lipe), Simone Krug (Si) e Aline M. Santos (Li), pela amizade acima de tudo.

Ao Edevilson, secretário do departamento de pós-graduação em Engenharia Química, pelo profissionalismo e atenção.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFSC, que contribuíram para minha formação acadêmica e profissional.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro concedido.

À todos que de forma direta ou indireta contribuíram para realização deste trabalho.



## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo estudar o cultivo de *Pycnoporus sanguineus* e a produção do antibiótico cinabarina em meio líquido, e a utilização de resíduos lignocelulósicos como meio de cultivo, em estado sólido, para a produção da cinabarina. Foi realizada a análise do crescimento radial e avaliada a produção de cinabarina de três diferentes cepas de *P. sanguineus* (MIP 95001, MIP 95002 e MIP 20001). O modelo que melhor representou o crescimento das cepas foi o modelo exponencial, sendo selecionada a cepa MIP 20001 como melhor produtora de cinabarina. Foi proposta neste trabalho uma nova metodologia para o doseamento da cinabarina, em sua forma purificada, através de método espectrofotométrico visando obter um método confiável, mais rápido e prático de doseamento. O método espectrofotométrico mostrou-se adequado para a finalidade pretendida, produzindo resultados semelhantes aos obtidos com o método microbiológico. A cinética de crescimento do *P. sanguineus* e a produção de cinabarina foram estudadas em caldo de batata dextrose (CBD) com pH inicial 5,6 e 9,0 e também combinando-se as fontes de carbono (glicose, maltose e glicerol), o CBD e as fontes de nitrogênio (peptona, extrato de levedura e uréia). Os cultivos em CBD com pH inicial 5,6 e 9,0 não apresentaram diferenças quanto a produção de cinabarina, sendo que o fungo apresentou maior crescimento em pH inicial 5,6. O meio contendo glicose e extrato de levedura propiciou a maior produção de biomassa, sendo que o meio em que houve a maior produção de cinabarina foi o meio CBD sem a adição de fontes de nitrogênio. Foi avaliada a produção de cinabarina utilizado como substrato os resíduos lignocelulósicos: serragem de *Pinus sp.* e de *Eucalyptus sp.* e casca de arroz, enriquecidos com farelo de arroz. A utilização da serragem de *Pinus sp.*, devido ao seu elevado teor de lignina, resultou na maior produção de cinabarina, (1,6 vezes mais do que em CBD). A estabilidade da cinabarina foi avaliada até 60 dias após sua extração e os resíduos foram armazenados em geladeira a 2 °C de três maneiras: seco, diluído em DMSO e diluído em DMSO com EDTA. O resíduo armazenado seco manteve sua estabilidade pelo período analisado, o resíduo diluído em DMSO apresentou-se estável por um mês e a adição de EDTA aumentou a estabilidade do resíduo em solução por pelo menos 60 dias.

**Palavras-Chave:** *Pycnoporus sanguineus*, Cinabarina e Resíduos lignocelulósicos.



## ABSTRACT

This work has as main objective to study the growth of *Pycnoporus sanguineus* in liquid medium broth, following their cinnabarin antibiotic production. Besides this, it is aimed to produce the cinnabarin by utilizing wood wastes by growing the broth in solid state of the *Pycnoporus sanguineus*. We performed the radial growth analysis and evaluated the cinnabarin production starting from three different strains of *P. sanguineus* (MIP 95001, MIP 95002 and MIP 20001). Among the strains, those which presented the exponential model growth showed the best results. We choose the strains of MIP 2001 as the better cinnabarin producer. In this work, we proposed a new routine for measuring the cinnabarin content in their pure state via spectrometric method aiming a more reliable, fast and practical method. The spectrometric method fit to the existing procedures, with same results as the microbiological method ones. The *P. sanguineus* kinetic growth and the cinnabarin production were performed in a potato dextrose broth (PDB), having an initial p-H's of 5.5 and 9.0. It is composed of a carbon source as glucose, maltose, and glycerol, the PDB, and the nitrogen source as (peptone, yeast extract and urea). The growing of PDB at initial p-H's of 5.6 and 9.0 presented no differences in cinnabarin production, whereas the yeast presented more rate of growing at initial p-H of 5.6. Most biomass production was obtained with the broth plus glucose and yeast extract; whereas most cinnabarin production was obtained with the PDB without nitrogen addition. Further, the cinnabarin production was evaluated utilizing wood waste as substrate: *Pinus sp.* and *Eucalyptus sp.* sawdust and bark of rice with addition of milled rice. The *Pinus sp.* sawdust, due to its high content of lignin, presented more cinnabarin production than others ones (1.6 times more than in CBD). After the cinnabarin extraction, their stability after drying was evaluated by three methods for periods of time performing a total of 60 days. The extracts were put onto a freezer at temperature of 2 °C in three forms: dried (1) diluted on DMSO (2) and diluted on DMSO plus EDTA (3). The method (1) presented stability for the analyzed period of 60 days, the method (2) the method presented stability for a period of 30 days, and the method (3) presented stability for 60 days. We conclude that the EDTA addition enhanced the stability of the dried cinnabarin extract for at least 60 days.

**Keywords:** *Pycnoporus sanguineus*, Cinnabarin, Wood waste.



## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>23</b> |
| <b>2 OBJETIVOS .....</b>  | <b>25</b> |
| 2.1 Objetivos Gerais .....  | 25        |
| 2.2 Objetivos Específicos .....   | 25        |
| <b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>  | <b>26</b> |
| 3.1 Generalidades sobre os Fungos .....   | 26        |
| 3.2 Fungos - Sua Importância, Biodiversidade e Biotecnologia .....                  | 27        |
| 3.3 A Produção de Metabólitos Secundários por Fungos .....                          | 28        |
| 3.4 Sistema de Classificação dos Fungos .....                                       | 31        |
| 3.4.1 Subdivisão: Basidiomycotina .....   | 31        |
| 3.5 <i>Pycnoporus sanguineus</i> e a Produção de Cinabarina .....                   | 33        |
| 3.6 Antibióticos e a Resistência Bacteriana .....                                   | 36        |
| 3.7 Resíduos Lignocelulósicos .....   | 38        |
| 3.7.1 Pinus e Eucalipto .....   | 39        |
| 3.7.2 Degradação de Materiais Lignocelulósicos .....                                | 40        |
| 3.8 Fungos de Degradação Branca .....   | 41        |
| 3.9 Produção de Metabólitos em Sistemas Sólidos (FES) .....                         | 42        |
| 3.9.1 Produção de Antibióticos em Sistemas Sólidos (FES) .....                      | 43        |
| <b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>   | <b>44</b> |
| 4.1 Organismos .....  | 44        |
| 4.1.1 <i>Pycnoporus sanguineus</i> .....  | 44        |
| 4.1.2 Bactéria .....  | 44        |
| 4.2 Meios de Cultura .....  | 44        |
| 4.3 Seleção das Cepas .....   | 45        |
| 4.3.1 Análise do Crescimento Radial .....   | 45        |
| 4.3.2 Produção de Cinabarina por Diferentes Cepas de <i>P. sanguineus</i> .....     | 46        |
| 4.4 Produção de Biomassa para Extração de Cinabarina .....                          | 46        |
| 4.5 Extração de Cinabarina e Concentração do Extrato .....                          | 47        |
| 4.6 Medida da Biomassa .....  | 47        |
| 4.7 Purificação do Extrato .....  | 47        |
| 4.8 Caracterização do Extrato .....   | 47        |
| 4.9 Estudo de Metodologia Espectrofotométrica para o Doseamento da Cinabarina ..... | 48        |
| 4.9.1 Linearidade .....   | 48        |
| 4.9.2 Intervalo .....   | 48        |
| 4.9.3 Precisão – Repetibilidade .....   | 49        |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.9.4 Exatidão .....  | 49        |
| 4.10 Método Microbiológico para o Doseamento da Cinabarina .....  | 49        |
| 4.10.1 Curva de Calibração.....   | 50        |
| 4.11 Escolha do Tipo de Inóculo a ser utilizado nos Cultivos em Meio Líquido.....   | 50        |
| 4.11.1 Inóculo Preparado em Meio de Cultivo Sólido.....   | 50        |
| 4.11.2 Inóculo Preparado em Meio de Cultivo Líquido.....  | 51        |
| 4.12 Crescimento e Produção de Cinabarina pelo <i>P. sanguineus</i> a Diferentes pHs .....  | 51        |
| 4.13 Produção de Cinabarina em Meio Líquido com Diferentes Fontes de Carbono e Nitrogênio.....  | 51        |
| 4.14 Produção de Cinabarina Utilizando Resíduos Lignocelulósicos...   | 53        |
| 4.15 Estudo da Estabilidade da Cinabarina.....  | 54        |
| 4.16 Análise Estatística.....   | 55        |
| 5.1 Produção de Cinabarina por Cepas de <i>P. sanguineus</i> .....  | 56        |
| 5.1.1 Análise do Crescimento Radial.....  | 56        |
| 5.1.2 Produção de Cinabarina por Cepas de <i>P. sanguineus</i> .....  | 61        |
| 5.2 Produção, Extração e Concentração.....  | 62        |
| 5.4 Caracterização do Extrato .....   | 64        |
| 5.5.1 Linearidade e Intervalo .....   | 65        |
| 5.5.2 Precisão – Repetibilidade.....  | 66        |
| 5.5.3 Curva de Calibração da Cinabarina Obtida pelo Método Microbiológico.....  | 67        |
| 5.5.4 Exatidão .....  | 68        |
| 5.6 Escolha do Tipo de Inóculo a ser Utilizado .....  | 69        |
| 5.7 Crescimento e Produção de Cinabarina pelo <i>P. sanguineus</i> a Diferentes pHs .....   | 70        |
| 5.8 Produção de Cinabarina em Meio Líquido com Diferentes Fontes de Carbono e Nitrogênio.....   | 74        |
| 5.9 Produção de Cinabarina Utilizando Resíduos Lignocelulósicos.....  | 78        |
| 5.10 Estudo da Estabilidade da Cinabarina.....  | 81        |
| <b>6 CONCLUSÃO.....</b>   | <b>83</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>  | <b>85</b> |
| APÊNDICE A - Artigo 1: Comparação entre os Métodos Físico-Químico e Microbiológico para Doseamento do Antibiótico Cinabarina.....                   | 96        |
| APÊNDICE B - Artigo 2: Comparative Study of Mycelial Growth and Production of Cinnabarin by Different Strains of <i>Pycnoporus sanguineus</i> ..... | 106       |

|  |     |
|--|-----|
| APÊNDICE C - Artigo 3*: Produção de Cinabarina por<br><i>Pycnopus sanguineus</i> Utilizando Diferentes Fontes de Carbono<br>e Nitrogênio ..... | 115 |
| APÊNDICE D - Fotos.....  | 125 |



## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 -Foto de <i>Pycnoporus sanguineus</i> (Disponível em:<br>< <a href="http://www.stri.org/english/site_tools/photo_of_the_week/index.php?id=64">http://www.stri.org/english/site_tools/photo_of_the_week/index.php?id=64</a> > acesso em 20.10.2007) ..... | 34 |
| Figura 2 - Estrutura da cinabarina (Disponível em:<br>< <a href="http://chemdb.niaid.nih.gov">http://chemdb.niaid.nih.gov</a> > acesso em 21.09.2007).....  | 35 |
| Figura 3 - Esquema da produção de cinabarina em resíduos<br>lignocelulósicos.....   | 54 |
| Figura 4 - Produção de cinabarina utilizando resíduos lignocelulósicos<br>.....   | 54 |
| Figura 5 - Curva de crescimento radial das cepas de <i>Pycnoporus<br/>sanguineus</i> , MIP 95001, MIP 20001 e MIP 95002.....  | 57 |
| Figura 6- Curva de crescimento linear da cepa MIP 95001 em placas de<br>Petri com BDA.....  | 58 |
| Figura 7- Curva de crescimento exponencial da cepa MIP 95001 em<br>placas de Petri com BDA .....  | 58 |
| Figura 8 - Curva de crescimento linear da cepa MIP 20001 em placas de<br>Petri com BDA.....   | 59 |
| Figura 9 - Curva de crescimento exponencial da cepa MIP 20001 em<br>placas de Petri com BDA .....   | 59 |
| Figura 10 - Curva de crescimento linear da cepa MIP 95002 em placas<br>de Petri com BDA .....   | 60 |
| Figura 11 - Curva de crescimento exponencial da cepa MIP 95002 em<br>placas de Petri com BDA .....  | 60 |
| Figura 12 - Cepas MIP 95001, MIP 95002 e MIP 20001 após 20 dias de<br>incubação em placas de Petri com BDA .....  | 62 |
| Figura 13 - Representação da cromatografia em camada delgada .....  | 63 |
| Figura 14 - Espectro UV-Vis obtido com a cinabarina purificada .....  | 64 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 15 - Curva de calibração da cinabarina obtida através da espectrofotometria UV-Vis em $\lambda = 258$ nm.....                 | 66 |
| Figura 16 - Curva de calibração da cinabarina obtida pelo método microbiológico .....  | 68 |
| Figura 17 - Variação do pH nos meios de cultivos .....   | 71 |
| Figura 18 - Produção de biomassa em CBD a pH inicial 5,6 e 9,0.....  | 72 |
| Figura 19 - Gráfico da produção de cinabarina com o pH inicial do meio de cultivo 9,0 e 5,6.....                                     | 72 |
| Figura 20 - Comparação entre a produção de cinabarina nos meios com pH inicial de 5,6 e 9,0 no tempo 18 de dias .....                | 73 |
| Figura 21 - Produção de biomassa de <i>P. sanguineus</i> utilizando diferentes fontes de carbono e nitrogênio .....                  | 76 |
| Figura 22 - Produção de cinabarina utilizando diferentes fontes de carbono e nitrogênio .....  | 77 |
| Figura 23 - <i>P. sanguineus</i> cultivado em serragem de pinus, serragem de eucalipto e casca de arroz, com 30 dias de cultivo..... | 79 |
| Figura 24 - Comparação entre a produção de cinabarina por <i>P. sanguineus</i> em resíduos lignocelulósicos e em CBD.....            | 80 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 - Produção de cinabarina em meio líquido com diferentes fontes de carbono e nitrogênio .....   | 52 |
| Tabela 2 - Médias das medidas dos raios dos micélios das cepas MIP 95001, MIP 20001 e MIP 95002 nos primeiros 5 dias.....   | 56 |
| Tabela 3 - Velocidade de crescimento radial (VCR) para a regressão linear e velocidade específica de crescimento para o modelo exponencial com seus respectivos coeficientes de correlação ( $R^2$ ) para as diferentes cepas ..... | 57 |
| Tabela 4 - Resultados obtidos na avaliação da linearidade e limite de quantificação pelo método espectrofotométrico.....  | 65 |
| Tabela 5 - Resultados obtidos na avaliação da precisão do método espectrofotométrico .....  | 66 |
| Tabela 6 - Curva de calibração da cinabarina obtida pelo método microbiológico .....  | 67 |
| Tabela 7 - Resultados obtidos pelo doseamento da cinabarina pelo método espectrofotométrico e pelo método microbiológico  | 69 |
| Tabela 8 - Medidas de biomassa obtidas pelo crescimento de <i>P. sanguineus</i> em CBD utilizando inóculo sólido e inóculo líquido .....  | 69 |
| Tabela 9 - Produção de Cinabarina e biomassa por <i>P. sanguineus</i> em CBD com pH inicial 5,6.....  | 70 |
| Tabela 10 - Produção de Cinabarina e biomassa por <i>P. sanguineus</i> em CBD com pH inicial 9,0.....   | 71 |
| Tabela 11 - Produção de cinabarina, pH inicial, pH final e biomassa nos diferentes meios de cultura utilizados .....  | 75 |
| Tabela 12 - Resultados de produção de cinabarina (UI) em resíduos lignocelulósicos.....   | 79 |
| Tabela 13 - Estudos de estabilidade da cinabarina seca, em DMSO e em DMSO com EDTA.....   | 81 |



# 1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos constituem dentro das fontes de produtos naturais, uma das menos estudadas, entretanto oferecem grandes possibilidades para obtenção de novas estruturas com atividade biológica. Cerca de 20% de todas as moléculas bioativas descobertas são provenientes de fungos e estima-se que conhecemos aproximadamente 5% do total de espécies de fungos existentes no planeta (LANGE, 1996).

Comumente, os fungos são conhecidos como bolores, mofos ou cogumelos comestíveis ou alucinógenos. São tratados de forma pejorativa, considerados como venenosos e, no máximo, como alimentos exóticos. São lembrados por seus efeitos prejudiciais, causando moléstias em animais e plantas, ou ainda como sendo responsáveis pela deterioração de frutas, pães e outros alimentos, causando estragos em couros, paredes, etc. Entretanto, o mundo destes organismos é muito amplo e ainda que haja algumas espécies prejudiciais a grande maioria dos fungos é benéfica (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

Os fungos são importantes tanto do ponto de vista ecológico, devido a sua capacidade de degradar todo tipo de matéria orgânica, quanto do ponto de vista industrial, sendo responsáveis pela produção de importantes ácidos orgânicos, pela produção de fármacos, vitaminas e enzimas, pelo controle biológico de insetos-pragas da agricultura, pela produção de etanol, além de serem utilizados no preparo de pães, bolos, vinhos, cervejas, queijos, iogurtes e em muitos outros alimentos (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004; PUTZEL e PUTZEL, 1998).

O *Pycnoporus sanguineus* é um fungo pertencente à família Polyporaceae, o qual é responsável pela podridão branca de madeiras. Este cogumelo é popularmente conhecido por “orelha-de-pau” e é facilmente encontrado em regiões tropicais e subtropicais e de fácil cultivo, podendo desenvolver-se tanto em plantas vivas como mortas (GAMEIRO *et al.*, 2003; SMÂNIA JR. *et al.*, 1995<sup>b</sup>; GERRERO e HOMRICH, 1999).

O *P. sanguineus* é facilmente reconhecível por sua intensa cor laranja avermelhada. Produz cerca de sete pigmentos, sendo o antibiótico cinabarina um deles. Segundo estudos de Smânia Jr. *et al.* (1995<sup>b</sup>) este antibiótico apresenta atividade contra várias bactérias, tendo atividade principalmente sobre as gram-positivas.

Com o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos disponíveis e também das infecções fúngicas, principalmente em pacientes imunocomprometidos, a pesquisa e o desenvolvimento de novos antimicrobianos revela-se crescente e necessária (BAX, 2000; GUPTE, 2002). Neste sentido, os metabólitos produzidos por organismos devem ser amplamente pesquisados como fonte de novos compostos antimicrobianos, pois oferecem uma enorme diversidade química, embora esta diversidade encontrada nos produtos naturais não pode ser igualada, tampouco substituída por bases de dados combinatórias para a síntese de novas moléculas com atividades biológicas (DONADIO *et al.*, 2002).

A utilização de resíduos agroindustriais como substratos para o cultivo de fungos vêm despertando interesse, pois além de fornecer diferentes alternativas de cultivo, ajuda nos problemas de poluição. Estes resíduos, utilizados da maneira adequada podem ser convertidos em produtos de alto valor agregado.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos Gerais

Estudar o cultivo do *Pycnoporus sanguineus* e a produção do antibiótico cinabarina em meio líquido, e a utilização de resíduos lignocelulósicos como meio de cultivo, em estado sólido, para produção de cinabarina.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Analisar o crescimento radial das cepas de *P. sanguineus* MIP 95001, MIP 95002 e MIP 20001 em ágar batata dextrose, selecionar a cepa que produz maior quantidade de cinabarina e verificar a influência do crescimento radial na produção de cinabarina.
- Estudar uma nova metodologia para o doseamento da cinabarina por meio de método espectrofotométrico e compará-la com o método microbiológico.
- Avaliar a influência do tipo de inóculo, sólido ou líquido, na produção de biomassa nas culturas em estado líquido.
- Estudar a produção de cinabarina e o crescimento do *P. sanguineus* em caldo batata dextrose (CBD) a diferentes pHs.
- Avaliar a influência de diferentes fontes de carbono (glicose, maltose e glicerol), do CBD e das fontes de nitrogênio (peptona, extrato de levedura e uréia) na produção de biomassa e do antibiótico cinabarina pelo *P. sanguineus*
- Produzir a cinabarina utilizando resíduos lignocelulósicos (serragem de pinus, serragem de eucalipto e casca de arroz) complementados com farelo de arroz e comparar os resultados com os obtidos na produção de cinabarina em CBD.
- Estudar a estabilidade da cinabarina produzida em resíduos lignocelulósico e o efeito da adição de EDTA na sua estabilidade.

## 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 Generalidades sobre os Fungos

Os fungos são seres vivos eucarióticos com um só núcleo, como as leveduras, ou multinucleados, como os fungos filamentosos ou bolores e os cogumelos (fungos macroscópicos) (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

Os fungos são altamente eficientes na degradação de uma ampla gama de substratos, podendo apresentar-se sob a forma de levuriforme, formar um pseudomicélio ou constituir hifas, que podem agrupar-se ou justapor-se, porém nunca formando um tecido verdadeiro. Constituem um grupo muito grande e heterogêneo. Estima-se que existam cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos, sendo que destas apenas foram descritas cerca de 74 mil espécies. Excluindo-se os insetos, os fungos constituem os mais numerosos seres vivos existentes (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

Os fungos são onipresentes sempre que se saiba buscá-los, encontrando-se em vegetais, em animais, no homem, em detritos e em abundância no solo, participando ativamente do ciclo dos elementos da natureza (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005; GERRERO e HOMRICH, 1999). Encontram-se à disposição do naturalista ou da pessoa interessada, em jardins, parques, bosques, matas, campos, gramados, nas ruas arborizadas das cidades e em locais de queimada. Sempre que haja substrato disponível, as frutificações surgirão sob condições ambientais propícias para seu desenvolvimento. Levando-se em consideração estes fatos, o melhor tempo para a coleta de fungos será em épocas úmidas com temperaturas não muito baixas.

Durante muito tempo, os fungos foram considerados como vegetais e somente a partir de 1969 passaram a ser classificados em um reino à parte denominado fungi. Os fungos apresentam um conjunto de características que permitem sua diferenciação das plantas: não sintetizam clorofila nem qualquer pigmento fotossintético; não tem celulose na parede celular, exceto alguns fungos aquáticos e não armazenam amido como substância de reserva. A presença de substâncias quitinosas na parede da maior parte das espécies fúngicas e a capacidade de armazenar glicogênio os assemelham às células animais (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

Todos os fungos são quimio-heterotróficos, necessitando de componentes orgânicos para energia e fonte de carbono. Os fungos são

capazes de metabolizar carboidratos complexos tais como lignina (madeira), que as bactérias não podem utilizar como nutrientes (TORTORA; FUNKE e CASE, 2000).

### 3.2 Fungos - Sua Importância, Biodiversidade e Biotecnologia

De acordo com Santos (2005) citado por Lopes *et al.* (2008), os fungos, têm se tornado um dos principais colaboradores para a solução simultânea de três problemas sérios que o mundo enfrenta, a escassez de alimentos, a poluição ambiental e a deficiência da saúde humana.

Cogumelos com fins medicinais têm uma longa e rica história de uso. Há mais de 2.000 anos atrás, os povos Paleolíticos já utilizavam os cogumelos como poderosos medicamentos para combater doenças. Embora a ciência já saiba, hoje, que microrganismos patogênicos são responsáveis por muitas doenças, não se sabe se os povos Paleolíticos detinham o conhecimento sobre a natureza da infecção microbiana (STAMETS, 2002).

Os fungos são responsáveis pela produção de importantes ácidos orgânicos, como o ácido cítrico, pela produção de fármacos, como alguns antibióticos, pela produção de enzimas de interesse industrial e elevado valor econômico, pelo controle biológico de insetos-pragas da agricultura, pelo controle de inúmeras moléstias que atacam plantas cultivadas e pela produção de etanol. Mas ainda são eles que tornam a vida no planeta mais agradável, pois sem os fungos não existiriam bebidas fermentadas como as cervejas e vinhos, queijos dos mais diversos tipos e muitos outros alimentos nos quais estes organismos tem papel de destaque em sua produção (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004). Os fungos são utilizados também para produção de vitaminas (como a riboflavina – B2 – e a biotina – B5), esteróides e cortisona (PUTZEL e PUTZEL, 1998)

De acordo com Lange (1996) 65% de todas as moléculas bioativas descobertas são produzidas por *Actinomycetes*, e cerca de 20% de fungos filamentosos, a grande maioria provenientes de apenas três gêneros: *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium*.

De acordo com Brizuela *et al.* (1998), embora as bactérias e leveduras ofereçam vantagens consideráveis em comparação aos fungos em relação às facilidades tecnológicas de cultivo e conhecimento biológico mais completo, os basidiomicetos e fungos miceliares em

geral apresentam potencialidades de biosíntese mais interessantes e numerosas.

A diversidade microbiana constitui uma valiosa fonte de inovação biotecnológica. Algumas estimativas sugerem que, até agora conhecemos apenas aproximadamente 5% do total de espécies de fungos e pode ser tão pouco quanto 0,1% das bactérias. E entre aqueles já descritos, apenas uma pequena fração foi analisada quanto ao perfil metabólito (LANGE, 1996).

Existem, todavia, problemas que dificultam o aproveitamento da biodiversidade para o desenvolvimento de novos medicamentos. O que inclui: 1) falta de leis específicas para o acesso a biodiversidade; 2) grande complexidade das moléculas isoladas a partir de produtos naturais, que às vezes dificulta sua síntese; 3) o tempo necessário para o descobrimento de moléculas líderes às vezes é longo; 4) a descoberta pode ser dispendiosa; 5) poucas bibliotecas de compostos naturais estão disponíveis; 6) existem poucas informações com relação a estrutura-atividade desses compostos; 7) freqüentemente, moléculas já conhecidas com pouco interesse, são isoladas de produtos naturais; 8) os químicos sintéticos muitas vezes são relutantes em trabalhar com produtos naturais (STROHL, 2000).

Em virtude da alta tecnologia, dos elevados custos e dos riscos inerentes para o desenvolvimento de um novo medicamento, alguns poucos países desenvolvidos, liderados pelos Estados Unidos e alguns países europeus, detêm as maiores indústrias farmacêuticas mundiais que dominam as modernas tecnologias na área farmacêutica. Somente para exemplificar esses investimentos e riscos, as estatísticas mostram que de cada 30 mil compostos sintetizados pelas indústrias, 20 mil (6,7%) entram nos estudos pré-clínicos; desses, 200 (0,67%) atingem a fase clínica I; 40 (0,13%) passam para a fase clínica II; e 12 (0,004%) chegam a fase clínica III. Apenas oito deles (0,027%) são aprovados e em geral um (0,003%) consegue obter mercado satisfatório (CALIXTO, 2003).

### **3.3 A Produção de Metabólitos Secundários por Fungos**

Os constituintes químicos de todas as plantas e animais são biossintetizados mediante reações enzimáticas, sendo que essas reações bioquimicamente são classificadas em dois grupos: o de metabólitos primários constituídos de ácidos nucleicos, carboidratos, açúcares,

aminoácidos e ácidos orgânicos e os metabólitos secundários (MANN, 1994).

Diversos microrganismos, como fungos filamentosos, quando cultivados em meio de cultura apropriado produzem algumas substâncias de grande interesse industrial as quais denominamos de metabólitos secundários.

Os metabólitos secundários são aqueles que não são necessários para o crescimento na cultura pura. Sua produção geralmente ocorre quando as taxas de crescimento caem durante a fase estacionária, e algumas vezes associado com a diferenciação e esporulação que pode ser acompanhada pela fase estacionária. Um grande número de metabólitos secundários são produzidos por fungos. Alguns são altamente difundidos, mas muitos são limitados a poucas espécies. Portanto, a varredura de espécies adicionais usualmente induz a descoberta de novos metabólitos secundários (CARLILE e WATKINSON, 1996).

Os metabólitos secundários são compostos especiais formados de estruturas diferentes com aplicações nas áreas farmacêutica, industrial e agricultura. Industrialmente importantes, os metabólitos secundários incluem: rapamicina (imunossupressor), eritromicina (antibiótico), lovastatina (anticolesterolêmico) e apotilona B (anticancerígeno), pigmentos, toxinas, indutores de competição ecológica e simbiose, pesticidas, inibidores de enzimas e promotores de crescimento de animais e plantas (WAWRIK *et al.*, 2005). Alguns dos metabólitos secundários produzidos por fungos, como por exemplo a penicilina, tem grande importância econômica (CARLILE e WATKINSON, 1996).

Segundo Donadio *et al.* (2002), os metabólitos secundários estão sendo obtidos após décadas de extensivas pesquisas envolvendo milhões de microrganismos. Esses compostos representam uma gama enorme de engenhosas estruturas e com potentes atividades biológicas. Assim, novos metabólitos bioativos continuam sendo identificados. A habilidade de produzir um grande número de metabólitos secundários quimicamente diferentes está associada com actinobactérias, mixobactérias, pseudomonades, cianobactérias e fungos filamentosos.

As estruturas químicas dos metabólitos secundários são bastante complexas e diversificadas, variando-se entre si de espécie para espécie ou até mesmo diferindo-se através das cepas, às quais a produção desse metabólito está vinculada (GRIFFIN, 1994).

Diferente do metabolismo primário, os genes envolvidos nas vias biossintéticas do metabolismo secundário apresentam-se, normalmente,

agrupados em um único cromossomo. A regulação destes genes dá-se por genes estruturais que controlam os fatores de transcrição, distinguindo-se os genes relacionados a uma via metabólica específica e uma segunda classe de genes, que são mediadores de fatores de sinalizações ambientais, como pH, fonte de carbono e nitrogênio, temperatura do ambiente e presença de luz. Essa regulação sob diferentes níveis, associadas a fatores de transcrição específicos e fatores de transcrição de grande espectro, garantem que as vias metabólicas do metabolismo secundário sejam respondíveis as demandas gerais do metabolismo celular fúngico (KELLER *et al.*, 2005).

As condições de cultivo, como: tempo de incubação, pH, temperatura, aeração, concentração de substrato e de inócuo influenciam os processos de síntese de substâncias de interesse. Os estudos sobre otimização de condições de cultivo podem além de propiciar incremento na produção de substâncias com atividades biológicas, contribuir para o entendimento de aspectos bioquímicos e fisiológicos desses organismos (RAMOS, 2008).

A produção dos metabólitos secundários frequentemente está relacionada a algum tipo de carência nutricional. Essas substâncias têm sua origem como derivados de diferentes intermediários do metabolismo primário, tendo como precursores principais: aminoácidos, ácido chiquímicos, acetilCoA, ácidos mevalônico, polissacarídeos e peptidospolissacarídeos (GRIFFIN, 1994). Outro fato que deve ser levado em consideração são as exigências nutricionais das diferentes espécies e linhagens, sendo que cada espécie apresenta melhor desenvolvimento e/ou melhor produção em materiais com relação C/N específica (BERNARDI *et al.*, 2007).

De acordo com Sato (2001), o valor da produção de antibióticos para as cepas produtoras não está claro. A produção de antibióticos pode ter significado ecológico para a vida do microrganismo na natureza, mas existem poucas pesquisas sólidas que sustentem esta hipótese. Como metabólitos secundários, os antibióticos poderiam desempenhar papel regulador durante a diferenciação, talvez como agentes inibidores temporários, entretanto, até o presente a maior parte dos novos antibióticos tem sido detectados estritamente mediante métodos empíricos, prestando muito pouca atenção a seus possíveis papéis na cepa produtora.

### 3.4 Sistema de Classificação dos Fungos

Existem muitos sistemas de classificações propostos para fungos, e ainda hoje o sistema sofre adições e alterações. Pode-se considerar que os sistemas mais apropriados surgiram a partir de 1950 com o trabalho de Bessey, que considerou os fungos como pertencentes a 3 classes: Ficomicetos, Ascomicetos e *Basidiomicetos*, além dos fungos imperfeitos. Esta classificação foi muito aceita no Brasil, mas com os avanços nos estudos morfológicos, fisiológicos e de microscopia eletrônica, entre outros, surgiram novas propostas, sempre aceitas por alguns e rejeitadas por outros (PUTZEL e PUTZEL, 1998).

De acordo com Lacaz *et al.* (1998) alguns autores dividem o reino dos fungos em duas grandes divisões: Myxomycota e Eumycota, na primeira estão os fungos gelatinosos, conhecidos pelo nome vulgar de Myxomycetes, e na segunda os fungos filamentosos ou verdadeiros. Entretanto há autores que assumem uma divisão adicional para os fungos: a Mycophycophyta, em que estão inclusos os líquens, organismos formados pela associação simbiótica entre algas e fungos. Os Eumycotas apresentam cinco subdivisões: Mastigomycotina, Zygomycotina, Basidiomycotina, Ascomycotina e Deuteromycotina.

Já Alexopolus e Mins (1979) surgerem um Super-Reino Eukaryonta, com Reino Myceteae e Divisões Gymnomycota, Mastigomycota e Amastigomycota. Sendo a Divisão Amastigomycota dividida em quatro Subdivisões: Zygomycotina, Ascomycotina, Basidiomycotina e Deuteromycotina.

#### 3.4.1 Subdivisão: *Basidiomycotina*

Esta Subdivisão de acordo com Alexopoulus e Mins (1979) contém uma única Classe, os Basidiomicetos, entretanto segundo o sistema de classificação apresentado por Hawkworth *et al.* em 1996 consideram-se três Classes: Basidiomicetos, Teliomicetos e Ustomicetos (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

A primeira investigação do potencial de Basidiomycota como agentes produtores de antibióticos foi realizada por Anchel, Hervey, Wilkins em 1941, observando extratos de basidiomas e cultura de micélios de inúmeras espécies. Dentre estes cabe destacar a atividade antimicrobiana do *Pycnoporus sanguineus*, pertencente a classe do

Basidiomicetos, que tem sido pesquisada desde 1946 (ROSA *et al.*, 2003)

#### 3.4.1.1 Classe: Basidiomicetos

Membros da subdivisão Basidiomycotina, os Basidiomicetos constituem um importante grupo com cerca de 16000 espécies conhecidas (CARLILE e WATKINSON, 1996).

A classe Basidiomicetos inclui os cogumelos comestíveis como os dos gêneros *Agaricus* e *Pleurotus*, os venenosos, os dentiformes e as orelhas-de-pau (RAVEN *et al.*, 2001).

Os Basidiomicetos apresentam corpo de frutificação muito variado (desde alguns milímetros até mais ou menos 50 cm), de formas bastante heterogêneas e apresentam uma grande variedade de cores. Tratando-se de formas maduras, secas ou carnosas putrescentes, a morfologia varia desde bolas frágeis até formas muito complexas. Poucas espécies, quando maduras, são de cores vivas (GERRERO e HOMRICH, 1999).

Os fungos, pertencentes à classe dos Basidiomicetos, usados na medicina popular desde os tempos ancestrais, apresentam grande importância na pesquisa de substâncias antivirais, antifúngicas e antibacterianas a partir de seus metabólitos secundários (HWANG *et al.*, 2003). De acordo com Brizuela *et al.* (1998) os Basidiomicetos produzem uma ampla gama de produtos naturais que compreendem também componentes estruturais com atividade antitumoral, citostáticos (que inibem o crescimento), enzimas, reguladores de crescimento e aromas. A maioria das espécies dessa classe utiliza a madeira como matéria-prima para seu crescimento.

Dentro da classe Basidiomicetos destaca-se a ordem Aphylliphorales, em que se encontram os fungos conhecidos popularmente por orelhas-de-pau, como o *P. sanguineus* (MACEDO e PILIACKAS, 2005)

##### 3.4.1.1.1 Ordem Aphylliphorales

Os fungos Aphylliphorales têm frutificações geralmente de consistência desde coriácea flexível a lenhosa dura e de tamanhos variados, chegando a medir aproximadamente 50 cm de diâmetro. Sua

morfologia inclui desde crostas aderidas ao substrato até formas semelhantes a prateleiras semicirculares que se fixam de um só lado. Salvo algumas exceções suas cores são poucas chamativas. A superfície inferior pode ser lisa, mas frequentemente é dotada de poros, dentes, veias, raramente lamelas (GERRERO e HOMRICH, 1999). É uma ordem muito grande, reunindo cerca de 400 gêneros e 1200 espécies, principalmente saprófitas, que resultam em podridão branca (quando a lignina e celulose estão sendo decompostas) ou marrom (quando a celulose é decomposta restando a lignina que é marrom), mas também algumas parasitas de plantas e outras micorrizas. Muitas crescem no solo, mas a maioria é lignícola (PUTZEL e PUTZEL, 1998).

Dentro da ordem Aphyllophorales encontra-se o *P. sanguineus* pertencente à família Polyporaceae, o qual é responsável pela podridão branca de madeiras (MACEDO e PILIACKAS, 2005).

### 3.5 *Pycnoporus sanguineus* e a Produção de Cinabarina

De acordo com Nobles e Frew (1962) citado por Smânia Jr. (1995<sup>a</sup>) embora sejam descritas diversas denominações para esta espécie e também para outras que compõem o gênero *Pycnoporus*, as evidências morfológicas e genéticas sustentam a subdivisão em apenas 3 espécies: *Pycnoporus cinnabarinus* (Jacq.:Fr) Karst., *Pycnoporus coccineus* (Fr.) Bond. And Sing. e *Pycnoporus sanguineus* (L.:Fr) Murr. As duas primeiras espécies ocorrem em regiões temperadas e o *Pycnoporus sanguineus* em regiões tropicais e subtropicais, sendo a única espécie citada para o Brasil.

Segundo Alexopolus e Mins (1979), o enquadramento taxonômico completo do *Pycnoporus sanguineus* é:

Reino: Myceteeae

Divisão: Amastigomycotina

Subdivisão: Basidiomycotina

Classe: Basidiomicetos

Ordem: Aphyllophorales

Família: Polyporaceae

Gênero: *Pycnoporus*

Espécie: *Pycnoporus sanguineus* (L.: FR.) Murr. Bull. Torrey Bot. Club, 31, 421. 1904.

O *Pycnoporus sanguineus* (Figura 1) é popularmente conhecido por “orelha-de-pau”, tem ocorrência ampla, sendo facilmente

encontrado em regiões tropicais e subtropicais e de fácil cultivo (GAMEIRO *et al.*, 2003; SMÂNIA JR. *et al.*, 1995<sup>b</sup>).

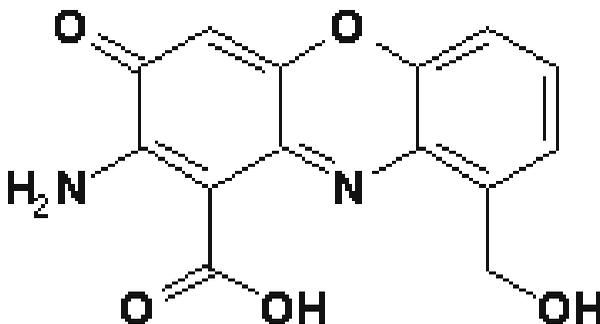


**Figura 1** -Foto de *Pycnoporus sanguineus* (Disponível em: <[http://www.stri.org/english/site\\_tools/photo\\_of\\_the\\_week/index.php?id=64](http://www.stri.org/english/site_tools/photo_of_the_week/index.php?id=64)> acesso em 20.10.2007)

Esta espécie é muito comum no Rio Grande do Sul, ocorre em locais ensolarados, sobre postes, troncos caídos, madeiras de construção, podendo desenvolver-se tanto em plantas vivas como mortas e é facilmente reconhecível por sua intensa cor laranja avermelhada. A madeira tingem-se da mesma cor do píleo, devido à parte vegetativa (micélio) que nela se alastra (GERRERO e HOMRICH, 1999).

Segundo Castilho e Dermoulin (1997) o *P. sanguineus* é muito sensível a salinidade, porém é tolerante a uma ampla variação de temperatura, suportando inclusive temperaturas superiores a 50°C. O *P. sanguineus* é uma espécie eutérmica, o que explica sua ocorrência em todas as estações do ano.

Este fungo sintetiza não menos que sete pigmentos, e o antibiótico cinabarina é um deles. A cinabarina, representada na Figura 2, é um pigmento laranja o qual tem uma estrutura básica fenoxazina-3-um, com um grupo carbonila no C-1, um grupo amino no C-2 e um grupo hidroxila no C-9 (ACHENBACH e BLÜMM, 1991).



**Figura 2** - Estrutura da cinabarina (Disponível em: <http://chemdb.niaid.nih.gov>> acesso em 21.09.2007)

A síntese de substâncias com atividade antimicrobiana ocorre principalmente entre o décimo oitavo e o vigésimo terceiro dia de incubação. Além disso, foi também constatado que os extratos obtidos a partir do fungo somente retiveram a atividade quando mantidos à vácuo (SMÂNIA JR., 1995<sup>a</sup>).

Segundo Smânia *et al.* (1997) as condições para máxima produção de cinabarina pelo *Pycnoporus sanguineus* são a 25°C e na presença de luz.

Estudo de Smânia Jr. *et al.* (1995<sup>b</sup>) e Smânia *et al.* (1997) mostraram que a cinabarina produzida pelo *P. sanguineus* apresenta atividade contra *B. cereus*, *E. fecalis*, *E. faecium*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *L. mesenteroides*, *L. plantarum*, *P. aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *S. typhi*, *S. aureus* e vários *Streptococcus spp.*, tendo atividade principalmente sobre bactérias gram-positivas.

Smânia Jr. *et al.* (2003) estudou a toxicidade da cinabarina em um modelo animal pela administração intraperitoneal em camundongos, sendo que a maior concentração usada (1.000mg/kg) não foi suficiente para matar os animais e nenhuma alteração celular foi observada nos órgãos analisados (fígados e rins).

Oliveira *et al.* (2007) após a avaliação de extratos de *P. sanguineus* através da espectroscopia Raman concluíram que os extratos obtidos com acetato de etila e com metanol possuem composição bastante similar, contendo a cinabarina como componente principal.

O *P. sanguineus* vêm sendo estudado, além de suas propriedades antimicrobianas, também devido a sua capacidade de degradar materiais lignocelulósicos e para produção de enzimas. Arora e Gil (2001),

Pointing *et al.* (2000), Lomascolo *et al.* (2003), Vanhulle *et al.* (2007) e Valeriano *et al.* (2007) estudaram a produção de lacase por *Pycnoporus sanguineus*, Levin *et al.* (2007) estudaram a biodegradação de pinus e Alonso *et al.* (2007) o potencial de degradação de cepas e raízes mortas de eucalipto.

O *P. sanguineus* foi utilizado com sucesso na descoloração de efluente Kraft (DURAN *et al.*, 1991; ESPOSITO *et al.*, 1993), na produção do aroma vanilina (PACHECO *et al.*, 2008) na descoloração de alguns corantes utilizados na indústria farmacêutica (GARCIA, 2006), e na descoloração de diferentes corantes (POINTING *et al.*, 2000).

### 3.6 Antibióticos e a Resistência Bacteriana

Em 1928, foi descoberto o primeiro antibiótico, quando Alexandre Fleming observou que o crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* era inibido na área ao redor de colônias de fungo que haviam contaminado a placa de Petri. O fungo foi identificado como *Penicillium notarium*, e o componente ativo, isolado mais tarde, foi denominado penicilina. Reações inibitórias similares entre colônias em meio sólido são comumente observadas em microbiologia e o mecanismo de inibição é conhecido como antibiose. A partir desta palavra surgiu o termo antibiótico, uma substância produzida por microrganismo que, em pequenas quantidades, inibe o crescimento de outros microrganismos. Portanto, as drogas tipo sulfa totalmente sintéticas, por exemplo, tecnicamente não são antibióticos. Entretanto, esta distinção muitas vezes é ignorada na prática (TORTORA; FUNKE e CASE, 2000).

Apenas dez dos antibióticos fúngicos conhecidos são produzidos comercialmente, e apenas as penicilinas, cefalosporina C, griseofulvina e ácido fusídico são clinicamente importantes (SATO, 2001).

Apesar de décadas de progresso acelerado em seu tratamento e sua prevenção, as doenças infecciosas permanecem uma causa importante de morte e debilidade, e são responsáveis pela piora das condições de vida de muitos milhões de pessoas em todo mundo (BRAUNWALD, 2002).

Desde a segunda guerra mundial centenas de agentes quimioterápicos vêm sendo desenvolvidos, a maioria potente e segura, inclui fármacos eficazes não só contra bactérias, como também contra

vírus, fungos e parasitas. No entanto, percebemos que conforme desenvolvemos agentes antimicrobianos, os microrganismos desenvolveram a capacidade de enganar nossas melhores armas e contra-atacar com novas estratégias de sobrevivência (BRAUNWALD, 2002).

No decorrer dos últimos 60 anos, o desenvolvimento de fármacos eficazes e seguros para lidar com infecções bacterianas revolucionou o tratamento médico, com conseqüente redução drástica na morbidade e mortalidade das doenças microbianas. Lamentavelmente, acompanhando o desenvolvimento das defesas quimioterápicas do homem contra as bactérias, estas também desenvolveram defesas contra os agentes quimioterápicos, com o conseqüente aparecimento da resistência (RANG, DALE e RITTER, 2001).

Este fato não é surpreendente, porquanto reflete o princípio evolutivo de que os organismos podem se adaptar geneticamente a mudanças no seu meio ambiente (RANG, DALE e RITTER, 2001).

Os antibióticos são pesquisados constantemente em decorrência da resistência bacteriana aos diversos compostos produzidos pelas indústrias farmacêuticas. Inclusive, esta resistência já se transformou em um problema de saúde pública dos tempos atuais (RAMOS *et al.*, 2006).

O fenômeno da resistência impõe sérias limitações às opções disponíveis para o tratamento médico de muitas infecções bacterianas (RANG, DALE e RITTER, 2001), e está ocorrendo numa taxa alarmante entre todas as classes de patógenos de mamíferos (BRAUNWALD, 2002).

O desenvolvimento de resistência tem sido mais problemático nos estafilococos, visto que, hoje em dia, muitas cepas tornaram-se resistentes a quase todos os antibióticos disponíveis. As infecções por estes microrganismos tornaram-se um grave problema, particularmente em hospitais, onde podem sofrer rápida disseminação entre pacientes idosos e/ou gravemente imunocomprometidos (RANG, DALE e RITTER, 2001).

O aparecimento inicial de uma bactéria resistente em uma população sensível é muitas vezes causado pela mutação em um único gene bacteriano. A frequência de mutação inicial é baixa e geralmente ocorre em uma proporção de somente uma mutação em uma população de vários milhões de células. Entretanto, outra bactéria pode tornar-se resistente ao antibiótico em uma frequência muito maior, simplesmente adquirindo um gene de uma bactéria que já é resistente. O gene para resistência pode ser transmitido de uma célula resistente para uma

sensível por meio de um processo chamado de conjugação (PELCZAR, CHAN e KRIEG, 1997).

Uma variedade de práticas humanas tem levado à resistência aos antibióticos: (1) o uso extensivo e errôneo dos antibióticos pelos médicos; (2) o uso de antibióticos em pacientes com resfriados e gripes; (3) o uso de antibióticos em pacientes imunodeprimidos para prevenir infecções, (4) a dificuldade dos pacientes em seguir o tratamento prescrito; (5) os tratamentos longos utilizando baixas doses contra acne; (6) o uso de antibióticos na nutrição animal; e (7) o transporte de bactérias resistentes a novas áreas em função das viagens pelo mundo (TORTORA; FUNKE e CASE, 2000).

Na atualidade, muitos países estão empenhando-se na descoberta de novos antibióticos eficazes contra as cepas em rápido crescimento de bactérias resistentes a múltiplos fármacos; no entanto, a natureza dotou os microrganismos de mecanismos adaptativos perversamente eficazes para lidar com nosso instrumental farmacêutico. Até agora, vários deles estão acompanhando sem qualquer esforço o passo de nossas tentativas de erradicá-los (RANG, DALE e RITTER, 2001).

Entretanto, segundo Riverón *et al.* (2003) nos últimos anos a produção de novos antibióticos tem diminuído de forma considerável.

Os antibióticos são claramente um dos grandes triunfos da ciência médica, embora apresente seus problemas e desvantagens. Infelizmente o problema da resistência a antibióticos alcançou agora um ponto crítico, e para solucionar esta crise, será necessário intensificar as campanhas educacionais para promover o uso correto dos antibióticos existentes e redobrar os esforços no sentido de desenvolver novos antibióticos (TORTORA; FUNKE e CASE, 2000).

Inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o intuito de produzir metabólitos a partir de resíduos lignocelulósicos. De acordo com Takahashi e Lucas (2008) o cultivo em estado sólido para a produção de antibióticos tem sido considerado muito vantajoso.

### **3.7 Resíduos Lignocelulósicos**

Desde 1986, existe uma série de pesquisas sendo desenvolvidas no país a fim de agregar valor aos produtos e subprodutos da agricultura, principalmente pelo aumento da geração de resíduos agroindustriais. A utilização de resíduos da agroindústria brasileira, além de fornecer

diferentes alternativas de substratos para cultivos, também ajuda nos problemas de poluição (PANDEY *et al.*, 2000).

Na maioria das vezes, os resíduos lignocelulósicos são dispensados no meio ambiente, provocando um acúmulo excessivo de matéria orgânica. Embora este tipo de poluente seja biodegradável, torna-se necessário um tempo mínimo para ser mineralizado e, em virtude da intensa atividade humana na terra, observa-se a cada dia um aumento na dificuldade de reciclagem natural desses nutrientes (BÔAS e ESPOSITO, 2000).

Significativas quantidades de resíduos agroindustriais são usadas para combustão em diversas partes do mundo, destino que vem sendo alvo de crescente reprovação devido à poluição atmosférica resultante, além da enorme perda de energia (RAJARATHNAM *et al.*, 1992).

Os principais componentes dos resíduos lignocelulósicos são a celulose, a hemicelulose e a lignina. O teor de nitrogênio nesses resíduos é, geralmente, muito baixo. A proporção percentual dos componentes, celulose, hemicelulose e lignina, assim como o teor de nitrogênio depende do tipo de material, idade e estágio vegetativo (RAJARATHNAM *et al.*, 1992). A rigidez das fibras da madeira são primariamente determinadas pela celulose e hemicelulose enquanto a lignina é responsável pela adesão entre as fibras (HAWKES *et al.*, 1993).

A possibilidade de tratamento biológico depende de organismos que possuam complexos enzimáticos lignocelulíticos específicos como: celulasas, hemicelulasas, lacases, manganês e lignina peroxidases, os quais são encontrados apenas em espécies de Basidiomicetos (SANTOS, 2000).

### **3.7.1 *Pinus e Eucalipto***

A partir da década de 80, as indústrias de base florestal no Brasil passaram por uma grande transformação em termos de matéria-prima, produtos e processos produtivos. A base da matéria-prima madeira, que era quase que totalmente oriunda de florestas nativas, passou a ser substituída pelas florestas plantadas de rápido crescimento, especialmente a de pinus e eucalipto (ABIMCI, 2005).

De acordo com Chaves e Correa (2005) a introdução de espécies exóticas no Brasil se deu, principalmente, com os gêneros *Pinus* (madeira de fibra longa) e *Eucalyptus* (madeira de fibra curta). Na maior

parte, tais introduções foram bem-sucedidas, especialmente nas Regiões Sul e Sudeste.

Entre os principais produtores mundiais de celulose e papel, o Brasil é referência internacional nesse setor, por suas práticas sustentáveis. O principal diferencial competitivo é que 100% da produção de celulose e papel no País vem de florestas plantadas, que são recursos renováveis, sendo que o pinus representa 30% das plantações. Ele é importante porque contribui com as fibras longas, imprescindíveis na fabricação de papéis, que exigem mais resistência e melhor absorção de tinta. Em relação aos móveis, a madeira de pinus domina a preferência das indústrias (OLIVEIRA, 2005).

### **3.7.2 Degradação de Materiais Lignocelulósicos**

Os agentes degradadores da madeira podem ser bióticos ou abióticos, sendo os primeiros os mais relevantes, por serem mais efetivos no processo de degradação. Nesse grupo encontram-se insetos, fungos, bactérias, algas e xilófagos marinhos. Já para os fatores abióticos, pode-se citar a ação das chuvas, dos ventos e da radiação solar (TREVISAN *et al.*, 2008).

A atuação dos fungos na degradação da madeira também é intensa, segundo Sgai (2000). Os fungos degradadores mudam as propriedades físicas e químicas das paredes das células ou das cavidades celulares, chamadas traqueídeos, afetando seriamente a resistência da madeira. Esses fungos são os que produzem a decomposição da madeira. Quase todos atacam tão logo a árvore tenha sido cortada ou logo que ela tenha caído. Segundo Paes e Vital (2000), os fungos xilófagos que causam mudanças na composição química da madeira são classificados em fungos de podridão branca, de podridão parda e de podridão mole. A lignina é apenas ligeiramente degradada pelos fungos de podridão parda e, mais intensamente, pelos fungos de podridão branca e de podridão mole.

A madeira é uma ótima fonte de carbono, entretanto o nitrogênio e o fósforo são relativamente pouco disponíveis. Para o fungo degradar madeira é necessário a passagem de enzimas para fora das células e para o substrato insolúvel (CARLILE e WATKINSON, 1996).

Os materiais lignocelulósicos são insolúveis em água, implicando na vantagem de sua fermentação sólida. Apesar da necessária hidratação do substrato com uma fina camada de água na superfície das partículas,

o substrato não chega a formar uma mistura fluida. Os teores de água no substrato em fermentações sólidas devem permanecer em 1:1 e 1:10 (substrato:água) (RAJARATHNAM *et al.*, 1992).

A biodegradação, em cultivo em estado sólido, apresenta diversas vantagens em relação aos cultivos submersos, dentre os quais: menor volume de fermentador (sem excesso de água); gastos menores com energia para esterilização; aeração facilitada; menores custos com equipamentos e manutenção para promover a agitação e homogeneização; baixos custos de recuperação do produto e desidratação; meio mais adequado para a degradação fúngica da lignina e meio menos favorável a contaminação microbiana (RAJARATHANAN *et al.*, 1992).

### **3.8 Fungos de Degradação Branca**

Basidiomicetos e Ascomicetos são os principais causadores da podridão branca em madeiras. Os fungos de podridão branca são mais numerosos que os fungos de podridão parda, os quais são formados exclusivamente por Basidiomicetos. Muitos fungos de podridão branca degradam a lignina e a celulose, entretanto alguns removem seletivamente a lignina (CARLILE e WATKINSON, 1996).

A atuação dos fungos de degradação branca leva a um aspecto esbranquiçado da madeira. Aliada a esta alteração de cor ocorre gradual perda do peso e resistência mecânica (ROMAN, MORITZ e MORGADO, 1993).

Os fungos de degradação branca podem ser divididos em dois subgrupos: os que degradam simultaneamente todos os componentes, e os que degradam preferencialmente lignina. Os que degradam seletivamente lignina são designados fungos de bolso brancos ou manchados. Sua habilidade é degradar compostos fenólicos, relacionados à lignina, que quase sempre está associada a enzimas extracelulares lignolíticas, em particular lacases (MELO & AZEVEDO, 1997).

Fungos de degradação branca produzem três principais enzimas extracelulares envolvidas na lignólise: lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase. Nem todos os fungos de podridão branca produzem as três enzimas e a lacase ocupa um lugar importante na lignólise (ARORA e GILL, 2001).

Os fungos de degradação branca são mais comuns em madeiras de fibras curtas de árvores angiospermas, enquanto os fungos de podridão parda são geralmente encontrados em madeiras de fibras longas (coníferas). As madeiras de fibras curtas (folhosas) têm mais lignina do que as madeiras de fibras longas (de 25-35%, comparadas aos 18-25%) (CARLILE e WATKINSON, 1996).

Schmidt (2002) afirmou que durante o crescimento e formação do basidioma, os Basidiomycetes causadores da degradação branca da madeira decompõem enzimaticamente o substrato, solubilizando carboidratos (celulose, hemicelulose), lignina, CO<sub>2</sub> e água do substrato para utilizá-los em seu metabolismo.

### **3.9 Produção de Metabólitos em Sistemas Sólidos (FES)**

De acordo com Rodrigues (2006) a fermentação em estado sólido (FES) tem considerável potencial econômico na indústria produtora de alimentos, farmacêuticos e agricultura em geral. Devido ao grande sucesso da escala industrial da fermentação submersa essa técnica ainda é pouco explorada.

Apesar da antiga utilização da FES, principalmente pelos povos orientais, apenas recentemente a pesquisa científica se desenvolveu e se dedicou ao processo. Enquanto países ocidentais têm desenvolvido o uso da fermentação submersa desde a década de 40, o interesse destes pela FES foi revisada nas últimas duas décadas (BELLON-MARUEL *et al.*, 2003).

Segundo Soccol (1994), nas últimas décadas, pesquisadores ocidentais começaram a se interessar pela FES dando origem a novos processos, bem como a muitas publicações científicas demonstrando as vantagens deste método de fermentação.

Atualmente no Brasil existem grupos de pesquisa que se dedicam ao desenvolvimento da FES, para o aproveitamento de resíduos agroindustriais como os bagaços da mandioca, cana de açúcar, farelos do arroz, milho, trigo etc. para a obtenção de diversos produtos como etanol, enzimas, ácidos orgânicos, antibióticos, biopesticidas, etc. (RABELO *et al.*, 2005).

A FES apresenta algumas vantagens sobre a fermentação submersa: normalmente é um processo simples, de baixo capital de investimento, pouco consumo de energia e fácil controle de contaminação devido ao baixo nível de umidade no sistema. Outras

vantagens da FES são a utilização de substratos de baixo custo e de fácil disponibilidade, tais como os resíduos da agroindústria e a pequena quantidade de água utilizada, que permite a obtenção de metabólitos de forma concentrada, tornando a recuperação dos mesmos mais rápida e econômica (SOCCOL *et al.*, 2003; RAMOS *et al.*, 2005).

Fungos pertencentes a sub-classe dos Basidiomicetos têm sido bastante utilizados na biodegradação dos resíduos agroindustriais e são conhecidos pela capacidade de degradar materiais lignocelulósicos, pela síntese de enzimas hidrolíticas e ligninolíticas que atuam sobre diferentes substratos ricos em celulose, hemicelulose e lignina (DURRANT *et al.*, 2002).

### **3.9.1 Produção de Antibióticos em Sistemas Sólidos (FES)**

A indústria farmacêutica de produção de antibióticos por fermentação nasceu há cerca de 50 anos com a produção da penicilina.

Os antibióticos são produzidos, geralmente, em sistemas submersos (TOMASINI *et al.*, 1997). Entretanto, Robinson *et al.* (2000) relatam a possibilidade da obtenção de antibióticos de forma mais eficiente e econômica utilizando a FES, e indicam que esta tecnologia pode ser empregada, com êxito, em uma escala ampliada.

Ramana Murthy *et al.* (1993) relatam que os microrganismos em FES crescem sob condições mais próximas de seus ambientes naturais e podem estar mais aptos a produzir metabólitos que normalmente não são produzidos em fermentação submersa.

No trabalho de Liebl *et al.* (2005) a produção do antibiótico isodrimenediol em FES mostrou melhores resultados de halos de inibição em comparação ao mesmo antibiótico produzido em sistema submerso.

A cinabarina foi produzida com êxito em FES por Liebl *et al.* (2006) em reator de coluna utilizando resíduos do processamento da palmeira real-da-austrália.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Organismos**

#### **4.1.1 *Pycnopus sanguineus***

No presente trabalho foram utilizadas três cepas de *Pycnopus sanguineus*, denominadas MIP 95001 (Florianópolis – SC), MIP 95002 (Florianópolis – SC) e MIP 20001 (Imbituba – SC). As linhagens dos fungos foram doadas pelo Laboratório de Antibióticos do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) da Universidade Federal de Santa Catarina.

Os isolados foram mantidos em tubos contendo ágar batata dextrose (BDA) inclinado em geladeira ( $4^{\circ}\text{C} \pm 0,1$ ) e foram subcultivados a cada três meses.

#### **4.1.2 Bactéria**

Para avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos e para realizar a curva de calibração da cinabarina foi utilizada a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

A cultura foi mantida em tubos contendo ágar nutriente inclinado em geladeira, sendo repicada mensalmente.

##### **4.1.2.1 Inóculo**

O inóculo foi uma suspensão bacteriana de *Staphylococcus aureus*, diluída em caldo nutriente, com turbidez correspondente a 0,5 na escala de MacFarland, (concentração aproximada de  $1,5 \times 10^6$  UFC/ml). Esse inóculo foi preparado a partir de uma cultura crescida no mesmo meio, por 8 horas a  $35^{\circ}\text{C}$ .

### **4.2 Meios de Cultura**

Foram utilizados os seguintes meios de cultura: ágar batata dextrose (BDA), para o crescimento e manutenção dos fungos; caldo de

batata dextrose (CBD) para inóculo e como meio de cultivo para alguns experimentos; ágar Mueller-Hinton e caldo nutriente para os testes de antibiose, e ainda o ágar nutriente para manutenção da bactéria *S. aureus*. Os meios de cultura utilizados foram obtidos do Laboratório Himedia, exceto o CBD.

Para preparar o CBD foram utilizados 200 g de batatas por litro de água. Após o cozimento das batatas, o caldo foi coado em gaze e adicionado 2% de glicose.

Nos experimentos de produção de cinabarina em meio líquido com diferentes fontes de carbono e nitrogênio foram utilizados: glicose (Nuclear), maltose (Difco), glicerol (Nuclear), peptona (Difco), extrato de levedura (Difco) e uréia (Cinética).

Para o cultivo do *Pycnoporus sanguineus* em resíduos lignocelulósicos foram utilizadas serragem de pinus, provavelmente provenientes das espécies: *Pinus elliottii* ou *P. taeda* ou mistura destas, e serragem de eucalipto, provavelmente provenientes das espécies: *Eucalyptus grandis*, *E. saligna*, *E. viminalis* ou *E. dunnii* ou mistura destas. As serragem foram cedidas pela madeireira Vila Nova (Joinville) e a casca de arroz (*Oryza sativa*) e o farelo de arroz cedidos pela indústria de arroz Vila Nova Ltda. (Joinville).

Todos os meios foram autoclavados a 121°C durante 20 minutos após o seu preparo, exceto os meios com resíduos lignocelulósicos que foram autoclavados por 30 minutos.

## 4.3 Seleção das Cepas

### 4.3.1 Análise do Crescimento Radial

Para a realização dos experimentos foi utilizada a metodologia adaptada de Donini *et al.* (2006). As cepas mantidas em tubos contendo BDA inclinado em geladeira foram inoculadas em placas de Petri durante 20 dias, após este período foi retirado um disco de aproximadamente 13 mm de diâmetro do micélio dos fungos, os quais foram inoculados no centro de placas de Petri de 90 x 15 mm contendo BDA. Nas placas de Petri foram desenhadas três raias transversais, para auxiliar as medições dos micélios dos fungos, as placas foram incubadas a 25° C, na presença de luz, sendo os ensaios desenvolvidos em triplicata.

O crescimento radial foi obtido pela medição diária, com um paquímetro, da distância entre a periferia da colônia e o centro do disco de inoculação, sendo realizada três medições para cada placa, referentes as raias 1, 2 e 3, até que uma das cepas atingisse a borda da placa de Petri.

Com as médias das medidas de crescimento radial a cada dia, das três diferentes cepas, foi possível construir a curva de crescimento das cepas estudadas.

O tempo, em horas, e as médias das áreas de crescimento a cada dia, em  $\text{mm}^2$ , foram distribuídos em uma planilha do Microsoft Office Excel 2003. Foram ajustados dois modelos: linear e o exponencial, a fim de comparar o que melhor descreveu os dados experimentais. A velocidade de crescimento radial (VCR) foi tomada como principal parâmetro para o modelo linear (SOCCOL, 1994) e a velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) para o modelo exponencial (REESLEV e KJOLLER, 1995), considerando a quantidade de biomassa proporcional à área colonizada.

#### ***4.3.2 Produção de Cinabarina por Diferentes Cepas de P. sanguineus***

A produção de cinabarina foi comparada entre as diferentes cepas através da análise visual da coloração dos micélios dos fungos, uma vez que a cinabarina apresenta em sua estrutura um cromóforo que lhe confere a coloração laranja (SMÂNIA *et al.*, 1997), sendo analisada no vigésimo dia (T20) após sua inoculação .

#### **4.4 Produção de Biomassa para Extração de Cinabarina**

Para a obtenção da massa miceliar necessária para a extração da cinabarina o fungo foi cultivado, durante 18 dias, em 3.000 mL de CBD distribuídos em 30 garrafas de Roux, à temperatura ambiente não controlada ( $\pm 25$  °C) e na presença de luz.

A massa miceliar foi separada do meio de cultivo com peneira de malha de 10 mesh.

#### 4.5 Extração de Cinabarina e Concentração do Extrato

A massa miceliar obtida foi dividida em 5 frações, cada fração foi colocada em extrator Soxhlet, e realizada a extração com 100 mL de acetato de etila por 1,5 horas. O solvente presente no extrato foi evaporado em evaporador rotatório Heidolph (modelo Laborota 4000) à temperatura de 50 °C.

#### 4.6 Medida da Biomassa

A medida da biomassa fúngica foi realizada por meio da filtração do conteúdo das garrafas de Roux, e posterior secagem em estufa até massa constante (GIESE *et al.*, 2004).

#### 4.7 Purificação do Extrato

A purificação do extrato de *P. sanguineus* contendo a cinabarina foi realizada através da cromatografia de coluna conforme metodologia adaptada de Smânia Jr. (1995<sup>a</sup>).

O resíduo do extrato foi adsorvido em 15 g de sílica e então cromatografado em coluna de vidro (400 x 200 mm) com 35 g de sílica gel (Carlo Erba) ativada, utilizando-se sistemas com gradiente crescente de polaridade (acetato de etila: metanol: ácido acético 98,5:1:0,5 – 88:1:4). Foram coletados volumes de 15 ml monitorados por cromatografia de camada delgada (CCD) – fase estacionária: placas analíticas de gel sílica 60F<sub>254</sub> com 0,20 mm de espessura, Merk; utilizando como fase móvel acetato de etila: ácido acético (9:1); revelação: luz visível e luz ultravioleta. As frações cujo componente majoritário apresentou valor do fator de retenção (Rf) semelhante ao da cinabarina 0,78 foram agrupadas.

O solvente presente nessas frações foi evaporado em evaporador rotatório.

#### 4.8 Caracterização do Extrato

A cinabarina presente nas diferentes frações, separada por cromatografia em coluna de gel de sílica, foi caracterizada por CCD e por espectrometria na região da luz ultravioleta-Visível (UV-Vis).

Em CCD, comparou-se os valores dos Rf das substâncias das diferentes frações com o Rf da cinabarina (0,78). Utilizando-se o mesmo sistema descrito no item 4.7 para CCD.

No espectro de UV-Vis foram observadas as seguintes absorções máximas características de derivados fenoxazínicos:  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 264 (4,6), 429 (4,41), 450 sh (4,38) nm (GRIPENBERG, 1963; SULLIVAN e HENRY, 1971; ACHENBACH e BLUMM, 1991; citados por SMÂNIA JR., 1995<sup>a</sup>).

#### **4.9 Estudo de Metodologia Espectrofotométrica para o Doseamento da Cinabarina**

Primeiramente foi realizada uma varredura na faixa de 200 a 600nm, em espectrofotômetro SHIMADZU (modelo 1601PC), com uma solução de cinabarina de concentração 0,5 mg/mL para se obter o comprimento de onda de máxima absorção para a cinabarina.

Foram validados os seguintes parâmetros analíticos: linearidade, intervalo, precisão - repetibilidade e exatidão.

##### **4.9.1 Linearidade**

A linearidade do método foi avaliada por meio da construção de uma curva de calibração. Foram preparadas soluções de cinabarina nas concentrações de 0,125; 0,25; 0,50; 1,0 e 1,5 mg/mL, em triplicata.

As absorbâncias das soluções foram medidas ( $\lambda_{\text{máx}} = 458$  nm) e então construída uma curva de calibração e calculados o coeficiente de correlação linear e a equação da reta.

##### **4.9.2 Intervalo**

O intervalo analisado foi o mesmo avaliado no quesito linearidade, tendo como limite de quantificação inferior a concentração equivalente a 0,125 mg/mL de cinabarina, e como limite superior a concentração de 1,50 mg/mL de cinabarina.

### **4.9.3 Precisão – Repetibilidade**

Para avaliação da precisão do método foram medidas as absorbâncias de uma solução contendo 0,5 mg/mL de cinabarina, em sextuplicata. Em seguida, foram calculados o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV). Consideraram-se valores de  $CV \leq 5\%$  para avaliação da precisão (BRASIL, 2003).

### **4.9.4 Exatidão**

A exatidão do método de doseamento da cinabarina por espectrofotometria UV-Visível foi avaliada pela comparação dos resultados obtidos com o método microbiológico de difusão em ágar, utilizando-se as concentrações de 0,5 mg/mL para o método de doseamento por espectrofotometria UV-Visível, e a quantidade de 0,5 mg para o método microbiológico.

As absorbâncias e os valores dos halos de inibição obtidos foram tratados matematicamente a fim de se obter os valores em teor (%) para posterior comparação.

## **4.10 Método Microbiológico para o Doseamento da Cinabarina**

O método microbiológico utilizado para a quantificação da cinabarina foi o de difusão em ágar pelo método do poço adaptado de Costa *et al.* (2008). Para isso, volumes de 20 mL de ágar Mueller-Hinton foram vertidos em placas de Petri (90 x 15 mm). Após solidificação foram feitos 3 orifícios de 7 mm de diâmetro no ágar. O inóculo contendo a bactéria-teste (*S. aureus* ATCC 6538 - preparado de acordo com o item 4.1.2.1) foi semeado uniformemente na superfície do meio com o auxílio de um Swab estéril através de estrias transversais. O resíduo do extrato a ser testado foi ressuspenso e diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) e os orifícios preenchidos com 50  $\mu$ L da diluição. Os sistemas, após terem sido montados, foram incubados por 18 horas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 0,1$ .

As placas foram então analisadas com relação à presença de inibição do crescimento da estirpe indicadora. Em todas as experiências de avaliação da atividade antimicrobiana, foi usado como controle negativo o DMSO.

#### ***4.10.1 Curva de Calibração***

Para a realização da curva de calibração da cinabarina, foi avaliada a atividade antimicrobiana dessa substância pelo teste de difusão em ágar descrito no item anterior. Nessa experiência foram avaliadas 5 quantidades distintas de cinabarina (0,250; 0,500; 1,000, 1,500 e 2,000 mg), com 3 repetições. As quantidades de cinabarina usadas e os diâmetros dos respectivos halos de inibição foram distribuídos em uma planilha do Microsoft Office Excel 2003. Pela regressão linear foi possível obter a relação funcional do tipo  $y = ax + b$ , onde  $y$  corresponde ao diâmetro do halo de inibição (mm) e o  $x$  ao log da quantidade de cinabarina usada (mg). Com a aplicação da fórmula foi possível estimar as concentrações de cinabarina presentes nos extratos em acetato de etila obtidos das amostras miceliares. Essas concentrações foram expressas em UI/L, uma UI corresponde a quantidade (mg) do extrato em acetato de etila que produziu uma inibição equivalente a 1 mg de cinabarina, pelo ensaio microbiológico usado.

#### **4.11 Escolha do Tipo de Inóculo a ser utilizado nos Cultivos em Meio Líquido**

Para os cultivos em meio líquido foram testados dois diferentes tipos de inóculos, um preparado por meio de um meio de cultivo sólido, preparado conforme o item 4.11.1, e outro obtido a partir de um cultivo em meio líquido, conforme o item 4.11.2.

A comparação entre os tipos de inóculo foi realizada por meio através da medida da massa seca de 5 garrafas no décimo oitavo dia de incubação (T18), sendo escolhido como método mais adequado o que apresentou a maior uniformidade, avaliada pelo CV.

##### ***4.11.1 Inóculo Preparado em Meio de Cultivo Sólido***

As cepas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio BDA durante 20 dias. Após este período foram retirados 2 discos de 14 mm de diâmetro do micélio dos fungos, os quais foram inoculados em garrafas de Roux contendo 100 mL de CBD, sendo incubadas por 18 dias, a 25° C e na presença de luz. Então foi realizada a medida da massa seca (biomassa).

#### **4.11.2 Inóculo Preparado em Meio de Cultivo Líquido**

As cepas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio BDA durante 20 dias, após este período foram retirados 2 discos de 14 mm de diâmetro do micélio dos fungos, os quais foram inoculados em garrafas de Roux contendo 100 mL de CBD, sendo incubadas por 14 dias, a 25° C e na presença de luz. Após o período de incubação a cultura foi agitada vigorosamente e alíquotas de 10 mL foram transferidas para garrafas de Roux contendo 100 mL do mesmo meio, sendo incubadas por 18 dias, a 25° C e na presença de luz. Então foi realizada a medida da massa seca (biomassa).

#### **4.12 Crescimento e Produção de Cinabarina pelo *P. sanguineus* a Diferentes pHs**

O inóculo foi preparado conforme o item 4.11.1.

Foram realizados dois experimentos, um deles com o pH inicial do meio de cultivo sendo corrigido para 9,0 após a esterilização e outro sem alterar o pH do meio. O meio de cultivo utilizado nestes experimentos foi o CBD.

As culturas foram incubadas por períodos de tempo variáveis, de 3 a 28 dias. No terceiro dia, e posteriormente a cada 5 dias as culturas foram filtradas com peneira de malha de 10 mesh. Com o líquido obtido foi realizada a leitura do pH, e a partir do resíduo úmido foi determinada a massa micelial seca (biomassa).

No oitavo dia após o início da incubação e posteriormente a cada 5 dias foi realizada a extração da cinabarina e a concentração do extrato conforme o item 4.5. O resíduo foi testado quanto à atividade antimicrobiana frente ao microrganismo *S. aureus*, conforme o item 4.10.

#### **4.13 Produção de Cinabarina em Meio Líquido com Diferentes Fontes de Carbono e Nitrogênio**

Estes experimentos foram divididos em 5 grupos, conforme apresentado na Tabela 1. O primeiro grupo foi formulado utilizando glicose (20 g/L) como fonte de carbono e peptona, extrato de levedura ou uréia como fonte de nitrogênio. Nos grupos 2 e 3 foram utilizados

maltose (20 g/L) e glicerol (20 g/L), respectivamente como fonte de carbono e as mesmas fontes de nitrogênio utilizadas no experimento anterior. O grupo 4 foi formulado somente a partir de caldo de batata. O último grupo, 5, foi formulado utilizando caldo de batata e peptona, extrato de levedura ou uréia como fonte de nitrogênio. Todas as fontes de nitrogênio em todos os experimentos foram adicionadas na concentração de 10 g/L.

Além dos componentes dos meios de cultura avaliados, uma mistura de sais ( $K_2HPO_4$  – 0,2%,  $MgSO_4$  – 0,05%,  $KCl$  – 0,05% e  $FeSO_4$  – 0,001% - p/v) foi acrescentada em todos os experimentos, conforme o utilizado por Obara-Doi *et al.* (2003).

Após a esterilização dos meios foi realizada a inoculação conforme o item 4.11.1.

**Tabela 1** - Produção de cinabarina em meio líquido com diferentes fontes de carbono e nitrogênio

| Grupos | Meio Complexo   | Fonte de C | Fonte de N          |
|--------|-----------------|------------|---------------------|
| 1      |                 | Glicose    | Peptona             |
|        |                 | Glicose    | Extrato de Levedura |
|        |                 | Glicose    | Uréia               |
| 2      |                 | Maltose    | Peptona             |
|        |                 | Maltose    | Extrato de Levedura |
|        |                 | Maltose    | Uréia               |
| 3      |                 | Glicerol   | Peptona             |
|        |                 | Glicerol   | Extrato de Levedura |
|        |                 | Glicerol   | Uréia               |
| 4      | Caldo de Batata |            |                     |
| 5      | Caldo de Batata |            | Peptona             |
|        | Caldo de Batata |            | Extrato de Levedura |
|        | Caldo de Batata |            | Uréia               |

O pH dos meios foi medido logo após sua esterilização e ao décimo oitavo dia de cultivo, momento em que foi também quantificada a produção de cinabarina (conforme os itens 4.5 e 4.10) e medida a massa micelial seca (biomassa) de cada cultivo de acordo com o item 4.6.

#### 4.14 Produção de Cinabarina Utilizando Resíduos Lignocelulósicos

Foi avaliada a produção de cinabarina em 3 diferentes resíduos lignocelulósicos: serragem de pinus, serragem de eucalipto e casca de arroz.

Os resíduos lignocelulósicos serragem de pinus e serragem de eucalipto foram passados em peneiras, sendo utilizados os resíduos que passaram em peneira com malha de 4 mesh e ficaram retidos em peneira de malha de 10 mesh.

Foram pesados o equivalente a 20 g dos resíduos lignocelulósicos utilizados secos, acrescentados 20% de farelo de arroz e em seguida autoclavados por 121 °C por 30 minutos.

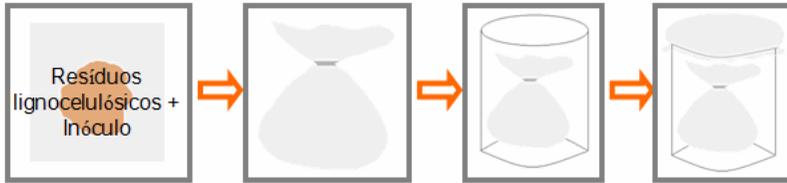
O inóculo utilizado foi proveniente de 1 discos de 14 mm de diâmetro do micélio dos fungos, crescidos por 20 dias em BDA, os quais foram inoculados em Erlenmeyers de 100 mL contendo 25 mL de caldo de batata dextrose, sendo incubadas por 14 dias, a 25° C e na presença de luz. Após o período de incubação a cultura foi agitada vigorosamente, adicionada ao resíduo lignocelulósico utilizado e a umidade do meio de cultivo corrigida para 70%.

Este sistema foi envolvido em um pedaço de tecido de algodão de 25 x 25 cm, amarrado com um elástico e colocado dentro de um vidro de conserva previamente esterilizado, com sua abertura fechada com tecido, conforme as Figuras 3 e 4.

A cada 10 dias com o auxílio de uma seringa foi injetado 5 mL de água destilada estéril aos cultivos.

No trigésimo dia após o início da incubação e posteriormente a cada 10 dias até o septuagésimo dia foi realizada a extração da cinabarina e a concentração do extrato (conforme o item 4.5), e o resíduo foi testado quanto à atividade antimicrobiana frente ao microrganismo *S. aureus*, conforme o item 4.10. Apenas nos cultivos com serragem de pinus foi quantificada a cinabarina também no octogésimo e no nonagésimo dia.

Para realizar a extração da cinabarina o micélio do fungo foi separado do tecido manualmente com o auxílio de uma tesoura, uma pinça e uma espátula.



**Figura 3** - Esquema da produção de cinabarina em resíduos lignocelulósicos.



**Figura 4** - Produção de cinabarina utilizando resíduos lignocelulósicos

#### 4.15 Estudo da Estabilidade da Cinabarina

Na avaliação da estabilidade da cinabarina foram utilizados os resíduos dos extratos provenientes dos cultivos em serragem de pinus.

A estabilidade da cinabarina foi avaliada nos tempos: 0, 7, 15, 30 e 60 dias após sua extração. Os resíduos foram armazenados da seguinte maneira: 1- seco, 2- diluído em DMSO e 3- diluído em DMSO com a adição de um agente quelante, o ácido etilendiaminotetracético (EDTA), na concentração de 30mg/mL. Os resíduos foram armazenados em geladeira à 2 °C.

Após os tempos estabelecidos foi realizada a quantificação da atividade da cinabarina de acordo com a metodologia descrita no item 4.10.

#### **4.16 Análise Estatística**

Os resultados dos experimentos ensaios foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) para um nível de significância de 0,05.

Todos gráficos, exceto o gráfico apresentado na Figura 5 construído utilizando o programa Statistica 6.0, foram construídos utilizando o Microsoft Office Excel 2003.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Produção de Cinabarina por Cepas de *P. sanguineus*

#### 5.1.1 Análise do Crescimento Radial

Na Tabela 2 estão apresentadas as médias das leituras dos raios (mm) das diferentes cepas, a cada dia, com seus respectivos desvios padrão.

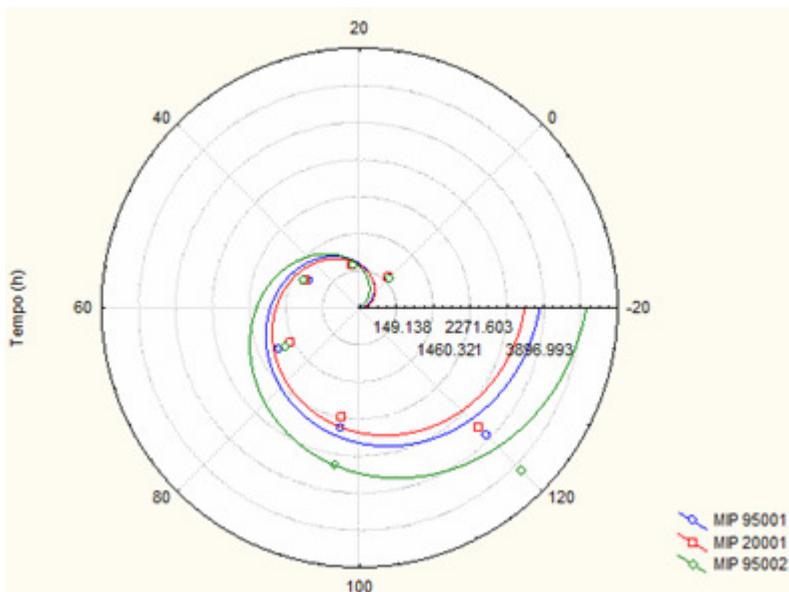
**Tabela 2** - Médias das medidas dos raios dos micélios das cepas MIP 95001, MIP 20001 e MIP 95002 nos primeiros 5 dias

| Tempo (h) | Raios (mm) * |              |              |
|-----------|--------------|--------------|--------------|
|           | MIP 95001    | MIP 20001    | MIP 95002    |
| 0         | 6,89 ± 0,60  | 6,78 ± 0,44  | 6,67 ± 0,50  |
| 24        | 7,78 ± 0,83  | 7,00 ± 0,70  | 7,44 ± 0,53  |
| 48        | 13,22 ± 0,97 | 13,88 ± 0,78 | 14,89 ± 0,60 |
| 72        | 21,56 ± 1,24 | 18,44 ± 1,01 | 20,0 ± 0,50  |
| 96        | 26,89 ± 1,05 | 25,22 ± 1,30 | 32,22 ± 0,67 |
| 120       | 35,22 ± 1,30 | 33,89 ± 0,78 | 40,78 ± 0,83 |

\*Cada resultado é a média das triplicatas ± desvio padrão.

Através da regressão linear foi obtida a velocidade de crescimento radial (VCR). Para o modelo exponencial foi ajustada uma relação funcional do tipo:  $r = r_0 e^{\mu t}$ , onde  $r$  é o raio em mm,  $t$  é o tempo em horas e  $\mu$  é a velocidade específica de crescimento.

Na Figura 5 é possível observar as curvas de crescimento radial das cepas.



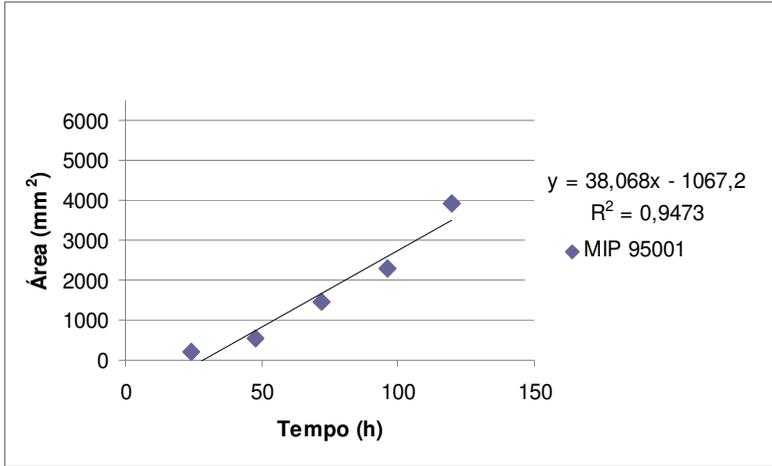
**Figura 5** - Curva de crescimento radial das cepas de *Pycnoporus sanguineus*, MIP 95001, MIP 20001 e MIP 95002.

A Tabela 3 apresenta as equações de regressão com seus respectivos coeficientes de correlação.

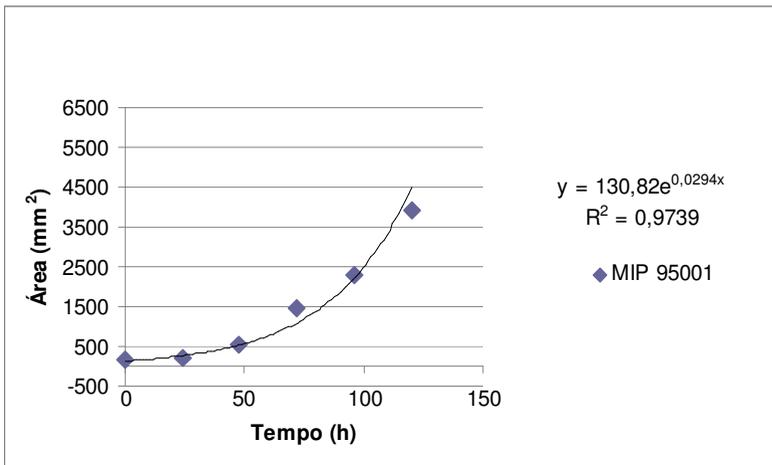
**Tabela 3** - Velocidade de crescimento radial (VCR) para a regressão linear e velocidade específica de crescimento para o modelo exponencial com seus respectivos coeficientes de correlação ( $R^2$ ) para as diferentes cepas

| Cepas     | Modelo Linear                  |        | Modelo Exponencial        |        |
|-----------|--------------------------------|--------|---------------------------|--------|
|           | Vcr ( $\text{mm}^2/\text{h}$ ) | $R^2$  | $\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ ) | $R^2$  |
| MIP 95001 | 38,068                         | 0,9473 | 0,0294                    | 0,9739 |
| MIP 20001 | 34,590                         | 0,9200 | 0,0290                    | 0,9656 |
| MIP 95002 | 52,775                         | 0,9168 | 0,0327                    | 0,9748 |

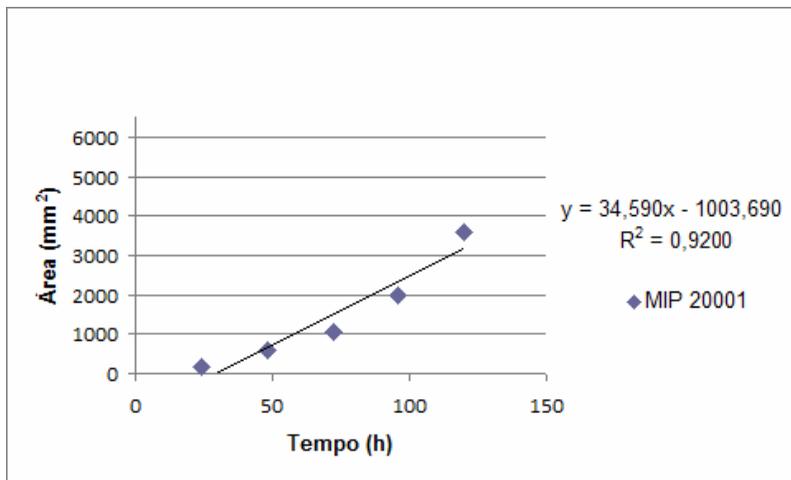
Nas figuras 6 á 11 estão representadas as curvas de crescimento linear e exponencial para as três diferentes cepas, bem como, suas respectivas equações da reta e os coeficientes de correlação.



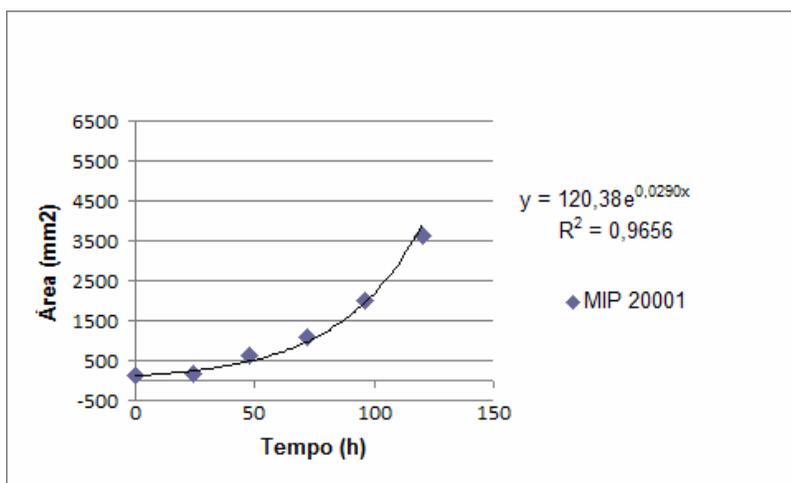
**Figura 6-** Curva de crescimento linear da cepa MIP 95001 em placas de Petri com BDA



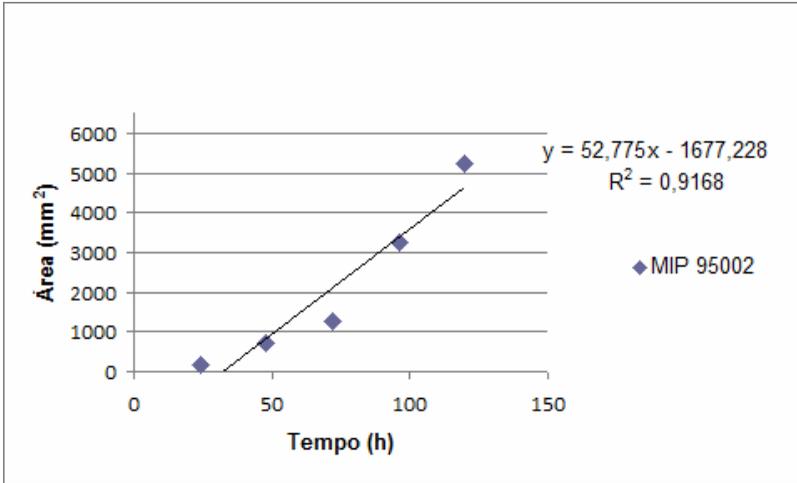
**Figura 7-** Curva de crescimento exponencial da cepa MIP 95001 em placas de Petri com BDA



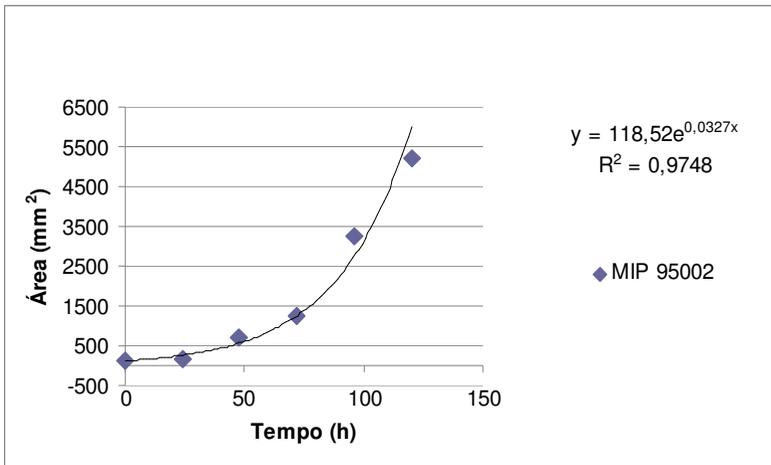
**Figura 8** - Curva de crescimento linear da cepa MIP 20001 em placas de Petri com BDA



**Figura 9** - Curva de crescimento exponencial da cepa MIP 20001 em placas de Petri com BDA



**Figura 10** - Curva de crescimento linear da cepa MIP 95002 em placas de Petri com BDA



**Figura 11** - Curva de crescimento exponencial da cepa MIP 95002 em placas de Petri com BDA

A determinação do crescimento radial dos fungos durou 5 dias, tempo necessário para uma das cepas atingisse as bordas da placa de Petri.

Nas curvas de crescimento linear foi considerado o crescimento somente a partir do tempo de 24 horas, pois antes deste período as cepas apresentaram comportamento semelhante ao correspondente a fase lag, fase em que o microrganismo está se adaptando ao meio. O modelo linear de crescimento apresentou coeficientes de correlação entre 0,9473 e 0,9168.

Os coeficientes de correlação das curvas de crescimento exponenciais obtidos estiveram entre 0,9748 e 0,9656, o que demonstra que este modelo representa adequadamente a variação da área colonizada pelo fungo em função do tempo como sendo uma relação exponencial.

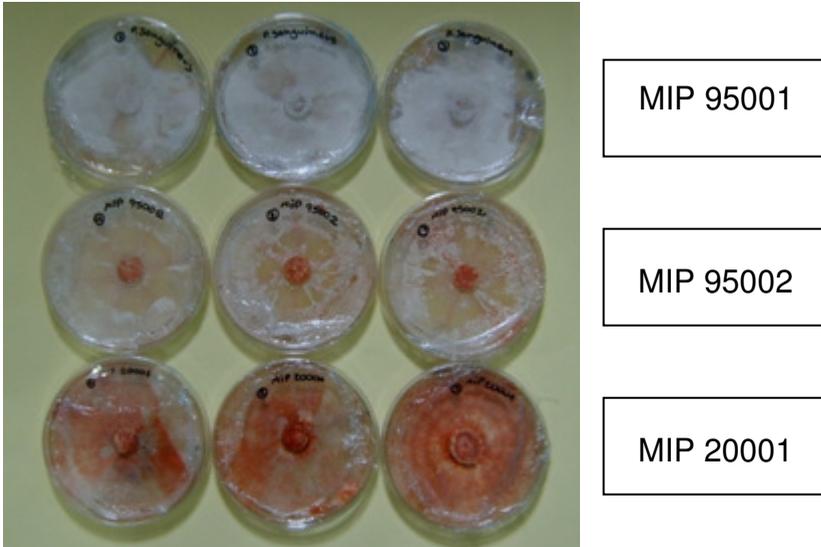
Os dados de crescimentos das cepas de *P. sanguineus* estudadas foram melhores representados pelo modelo exponencial, uma vez que os coeficientes de correlação foram maiores para este modelo, resultado semelhante ao proposto por Pacífico *et al.* (2005) para o crescimento de fungos.

A cepa MIP 95002 apresentou a maior velocidade de crescimento ( $\mu = 0,0327 \text{ h}^{-1}$ ), seguida pelas cepas MIP 95001 ( $\mu = 0,0294 \text{ h}^{-1}$ ) e MIP 20001 ( $\mu = 0,0290 \text{ h}^{-1}$ ), as quais apresentaram velocidades de crescimento estatisticamente semelhantes para um nível de significância de 0,05, e diferentes da cepa MIP 95002.

### **5.1.2 Produção de Cinabarina por Cepas de *P. sanguineus***

O micélio resultante da cepa MIP 20001 apresentou no vigésimo dia de crescimento uma coloração alaranjada nitidamente superior às demais cepas. Devido à cinabarina ser um pigmento laranja e ser a substância majoritária produzida pelo *P. sanguineus*, sua produção pode ser avaliada pela coloração do micélio dos fungos.

Na Figura 12 está apresentada a fotografia das cepas no vigésimo dia após a inoculação (T20).



**Figura 12** - Cepas MIP 95001, MIP 95002 e MIP 20001 após 20 dias de incubação em placas de Petri com BDA

Pela análise visual pode-se constatar que a cepa MIP 20001 apresentou produção de cinabarina muito superior em relação as cepas MIP 95002 e a MIP 95001. Esse resultado corrobora ao trabalho de Rosa *et al.* (2003) que utilizaram seis isolados de *P. sanguineus* e observaram que a produção de cinabarina varia de acordo com as características de cada linhagem.

Foi possível constatar que a cepa que obteve a maior produção de cinabarina não foi a que obteve o maior crescimento, dado este, que coincide com os resultados obtidos por Smânia Jr. (1995<sup>a</sup>) e Ramos *et al.* (2006). De acordo com Smânia Jr. (1995<sup>a</sup>), as melhores condições para o crescimento *in vitro* não estão diretamente relacionadas com a produção de cinabarina e de acordo com Ramos *et al.* (2006) o melhor crescimento não está relacionado ao aumento da produção do metabólito secundário.

## 5.2 Produção, Extração e Concentração

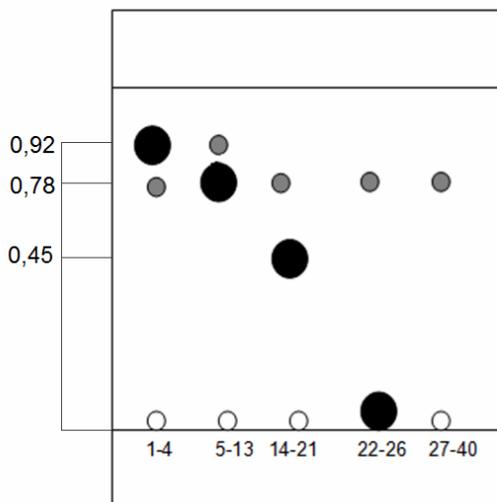
Com a extração de aproximadamente 65g de massa miceliar do *P. sanguineus* foram obtidas cerca de 9,4g de extrato concentrado, rendendo 14,46%.

### 5.3 Purificação do Extrato

O resíduo do extrato cromatografado resultou em 40 frações agrupadas por similaridade dos Rfs. Na Figura 13 está a representação da cromatografia em camada delgada (CCD) das frações obtidas.

As frações 1-4 apresentaram a substância com fator de retenção (Rf) 0,92 como substância majoritária, enquanto as frações 5-13 apresentaram como majoritária a substância de Rf 0,78. As frações 14-21 apresentaram o componente principal de Rf 0,45, as frações de 22-26 apresentaram uma substância que não foi arrastada pelo eluente, e as demais frações (27-40) apresentaram como componente principal a substância de Rf 0,78, entretanto em baixa concentração.

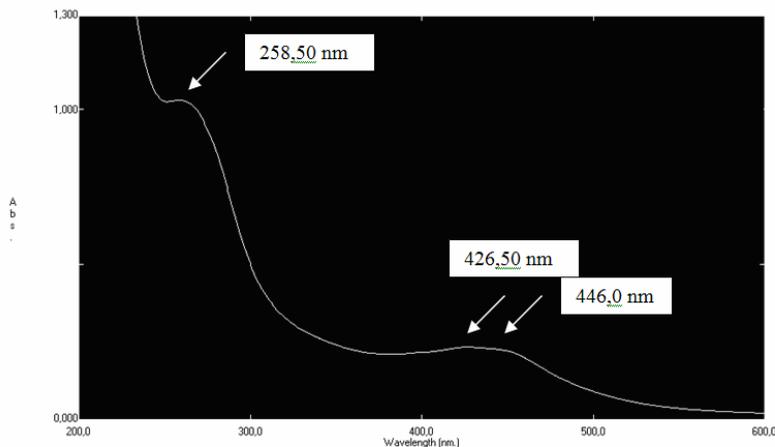
As frações que apresentaram a substância de Rf 0,78 como principal foram agrupadas e o solvente evaporado. Resultando em cerca de 2,3g, o que corresponde a 24,47% do extrato bruto, indicando um rendimento próximo ao obtido por Smânia Jr. (1995<sup>a</sup>) 23,11%.



**Figura 13** - Representação da cromatografia em camada delgada

## 5.4 Caracterização do Extrato

Na Figura 14 está o espectro UV-Vis da cinabarina purificada obtida conforme a metodologia descrita no item 5.3.



**Figura 14** - Espectro UV-Vis obtido com a cinabarina purificada

A caracterização da cinabarina foi realizada pelo valor do Rf encontrado na CCD e pelos picos de absorção no espectro UV-Vis.

O valor do Rf encontrado foi semelhante ao especificado por Smânia Jr. (1995<sup>a</sup>), 0,78, e os picos de absorção no espectro UV-Vis encontrados foram: 258,5 nm, 426,5 nm e 446,0 nm também semelhantes aos indicados na literatura.

A análise dos dados obtidos na CCD e no espectro UV-Vis em confronto com os resultados disponíveis na literatura referentes à característica da cinabarina (SMÂNIA JR., 1995<sup>a</sup>), permitiu deduzir que o componente principal da referida fração trata-se da substância cinabarina.

## 5.5 Estudo de Metodologia Espectrofotométrica para o Doseamento da Cinabarina

Segundo a RE 899/03 (BRASIL, 2003), que estabelece o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, metodologias que

serão empregadas na determinação quantitativa de ativos em matérias-primas ou produtos farmacêuticos devem ser avaliadas quanto aos seguintes parâmetros analíticos: especificidade, linearidade, intervalo, precisão-repetibilidade e exatidão.

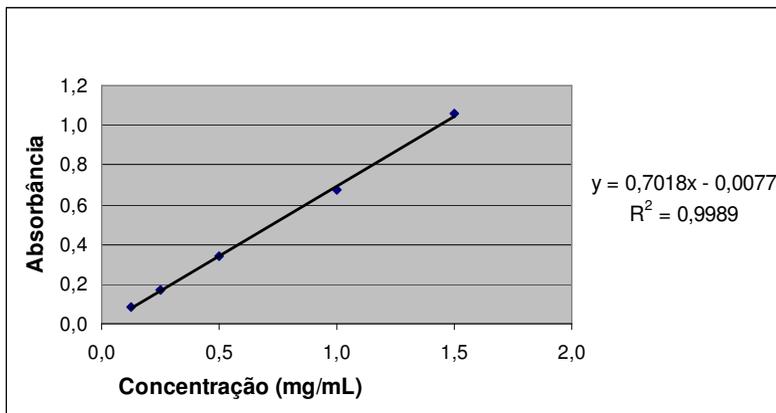
Pela observação do espectro de absorção da cinabarina foi escolhido o comprimento de onda de 258 nm, no qual foi obtida a absorção máxima para a cinabarina.

### 5.5.1 Linearidade e Intervalo

Os resultados obtidos na avaliação da linearidade estão descritos na Tabela 4. Na Figura 15 está representada a curva de calibração obtida, bem como a equação da reta e o coeficiente de correlação linear.

**Tabela 4** - Resultados obtidos na avaliação da linearidade e limite de quantificação pelo método espectrofotométrico

| Teste | Concentração (mg/mL) | Absorbância (nm) | Média | Desvio Padrão (DP%)   |
|-------|----------------------|------------------|-------|-----------------------|
| A     | 0,125                | 0,088            | 0,087 | $5,03 \times 10^{-3}$ |
| B     |                      | 0,082            |       |                       |
| C     |                      | 0,092            |       |                       |
| A     | 0,25                 | 0,176            | 0,171 | $5,56 \times 10^{-3}$ |
| B     |                      | 0,165            |       |                       |
| C     |                      | 0,172            |       |                       |
| A     | 0,5                  | 0,339            | 0,34  | $3,6 \times 10^{-3}$  |
| B     |                      | 0,337            |       |                       |
| C     |                      | 0,344            |       |                       |
| A     | 1,0                  | 0,675            | 0,673 | $2,08 \times 10^{-3}$ |
| B     |                      | 0,674            |       |                       |
| C     |                      | 0,671            |       |                       |
| A     | 1,5                  | 1,069            | 1,058 | 0,02                  |
| B     |                      | 1,032            |       |                       |
| C     |                      | 1,075            |       |                       |



**Figura 15** - Curva de calibração da cinabarina obtida através da espectrofotometria UV-Vis em  $\lambda = 258$  nm

A linearidade do método foi demonstrada pela curva de calibração apresentada na Figura 15. O método mostrou-se linear no intervalo analisado (0,125 a 1,5 mg/mL) apresentando coeficiente de correlação linear igual a 0,9989 e equação da reta igual a  $y = 0,7018 + 0,0077x$ . Os resultados obtidos demonstraram haver correlação linear entre a concentração de cinabarina e a absorbância da solução.

### 5.5.2 Precisão – Repetibilidade

Os resultados obtidos na avaliação da precisão – repetibilidade, estão descritos na Tabela 5.

**Tabela 5** - Resultados obtidos na avaliação da precisão do método espectrofotométrico

| Absorbâncias  |            |                |
|---------------|------------|----------------|
| 0,344         | 0,346      | 0,346          |
| 0,348         | 0,346      | 0,345          |
| Média = 0,346 | DP = 0,001 | CV (%) = 0,289 |

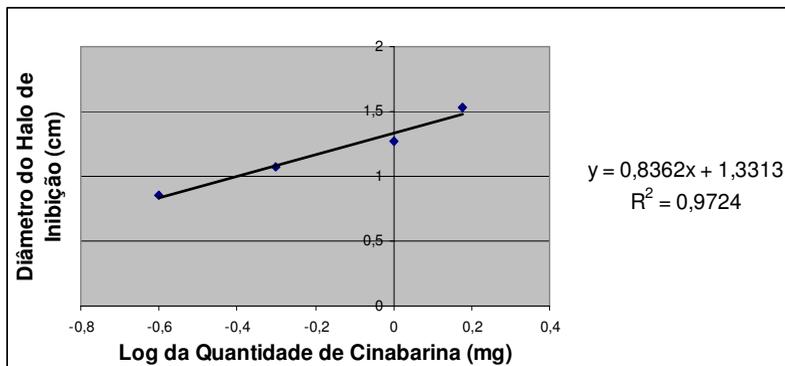
O método se mostrou preciso, visto que o coeficiente de variação percentual (CV) foi  $\leq 5\%$ .

### 5.5.3 Curva de Calibração da Cinabarina Obtida pelo Método Microbiológico

Os resultados obtidos pela curva de calibração da cinabarina obtida pelo método microbiológico estão apresentados na Tabela 6, e representados na Figura 16.

**Tabela 6** - Curva de calibração da cinabarina obtida pelo método microbiológico

| Teste | Qtidade cinabarina (mg) | Diâmetro do halo de inibição (cm) | Média do diâmetro do halo | Desvio padrão (DP %) |
|-------|-------------------------|-----------------------------------|---------------------------|----------------------|
| A     | 0,250                   | > 0,8                             | -                         | -                    |
| B     |                         | > 0,8                             |                           |                      |
| C     |                         | > 0,8                             |                           |                      |
| A     | 0,500                   | 0,90                              | 0,85                      | 0,05                 |
| B     |                         | 0,80                              |                           |                      |
| C     |                         | 0,85                              |                           |                      |
| A     | 1,000                   | 1,00                              | 1,07                      | 0,06                 |
| B     |                         | 1,10                              |                           |                      |
| C     |                         | 1,10                              |                           |                      |
| A     | 1,500                   | 1,30                              | 1,27                      | 0,10                 |
| B     |                         | 1,35                              |                           |                      |
| C     |                         | 1,15                              |                           |                      |
| A     | 2,000                   | 1,50                              | 1,53                      | 0,06                 |
| B     |                         | 1,60                              |                           |                      |
| C     |                         | 1,50                              |                           |                      |



**Figura 16** - Curva de calibração da cinabarina obtida pelo método microbiológico

O método mostrou-se linear no intervalo analisado (de 0,25 a 2,0 mg) apresentando coeficiente de correlação linear igual a 0,9724 e equação da reta igual a  $y = 0,8362x - 1,3313$ . Os resultados obtidos demonstraram haver correlação linear entre o logaritmo da quantidade de cinabarina e o halo de inibição formado.

#### 5.5.4 Exatidão

Os resultados obtidos utilizando-se a concentração de 0,5 mg/mL de cinabarina para o método de doseamento por espectrofotometria UV-Visível foram comparados com os resultados obtidos com 0,5 mg de cinabarina pelo método microbiológico e estão apresentados na Tabela 7.

O método de difusão em ágar relaciona o tamanho da zona de inibição com a atividade da substância a ser ensaiada. Este ensaio microbiológico não mede quantidades da substância, e sim respostas que podem ser convertidas em quantidades de substância ativa com o auxílio de uma curva padrão (PINTO *et al.*, 2000). Já, a análise espectrofotométrica quantitativa tem como princípio a relação proporcional existente entre a quantidade de luz absorvida e a concentração da solução da substância. Doseamentos espectrofotométricos na região UV-Vis requerem comparação da absorvância da solução da amostra com padrões de concentração conhecida (FARMACOPÉIA, 1988).

**Tabela 7** - Resultados obtidos pelo doseamento da cinabarina pelo método espectrofotométrico e pelo método microbiológico

|                      | <b>Método Físico-<br/>Químico</b> | <b>Método Microbiológico</b> |
|----------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| <b>Média</b>         | 100,8                             | 98,07                        |
| <b>Desvio Padrão</b> | 0,49                              | 11,78                        |
| <b>CV %</b>          | 0,48                              | 12,01                        |

A análise da variância foi realizada com os valores obtidos pelos dois métodos e demonstrou não haver diferença significativa entre os mesmos, para um nível de significância de 0,05.

A comparação entre o método espectrofotométrico e o método microbiológico para o doseamento da cinabarina mostrou que a espectrofotometria pode ser utilizada para o doseamento deste antibiótico. Entretanto, os estudos foram realizados somente com a substância purificada conforme o item 5.3 e para ser utilizado com segurança nos extratos seriam necessários mais estudos para comprovar que não há nenhuma interferência. Pelo fato de não terem sido realizados mais estudos nos experimentos posteriores foi utilizado o método microbiológico de difusão em ágar.

## 5.6 Escolha do Tipo de Inóculo a ser Utilizado

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados das medidas de biomassa dos experimentos realizados com inóculo sólido e com o inóculo líquido.

**Tabela 8** - Medidas de biomassa obtidas pelo crescimento de *P. sanguineus* em CBD utilizando inóculo sólido e inóculo líquido

|                        | <b>Biomassa (g/L)</b> |      |      |      |      | <b>Média ±<br/>DP</b> | <b>CV %</b> |
|------------------------|-----------------------|------|------|------|------|-----------------------|-------------|
| <b>Inóculo Sólido</b>  | 19,3                  | 21,0 | 22,6 | 18,3 | 22,2 | 20,7 ± 1,8            | 8,9         |
| <b>Inóculo Líquido</b> | 12,5                  | 22,1 | 15,6 | 16,9 | 21,5 | 17,7 ± 4,0            | 22,8        |

Os experimentos realizados com inóculo sólido obtiveram maior uniformidade no crescimento do fungo quando comparados as medidas de biomassa obtidas nos experimentos em que foram utilizados o inóculo líquido. Essa maior uniformidade pode ser facilmente observada comparando o CV% dos experimentos.

O fato de o inóculo líquido ter apresentado resultados pouco uniformes se deve ao fato de o micélio dos fungos tenderem a ficar em suspensão, dificultando a homogeneização das amostras, desta forma as primeiras amostras contêm maior concentração de biomassa fúngica do que as demais.

O tipo de inóculo escolhido para ser utilizado nos experimentos posteriores foi o inóculo sólido.

### 5.7 Crescimento e Produção de Cinabarina pelo *P. sanguineus* a Diferentes pHs

A produção de metabólitos secundários por fungos depende das condições utilizadas para seu crescimento, como: tempo de incubação, composição do meio de cultura, temperatura e pH.

Nas tabelas 9 e 10 estão apresentados os resultados de produção de cinabarina e biomassa pelo *P. sanguineus* em CBD com pH inicial do meio de cultivo inalterado (pH 5,6) e em pH inicial corrigido para 9,0.

**Tabela 9** - Produção de Cinabarina e biomassa por *P. sanguineus* em CBD com pH inicial 5,6

| Tempos (dias) | Cinabarina (UI/L)<br>Média ± DP | pH Inicial | Biomassa (g/L)<br>Média ± DP |
|---------------|---------------------------------|------------|------------------------------|
| 0             | -                               | 5,61±0,05  | -                            |
| 3             | -                               | 5,11±0,10  | -                            |
| 8             | 36 ± 3                          | 4,56±0,04  | 7,99 ± 1,44                  |
| 13            | 149 ± 10                        | 4,17±0,01  | 16,933 ± 1,05                |
| 18            | 457 ± 43                        | 3,99±0,02  | 20,93 ± 1,62                 |
| 23            | 380 ± 28                        | 3,91±0,07  | 26,97 ± 1,72                 |
| 28            | 161 ± 8                         | 3,75±0,05  | 35,16 ± 3,38                 |

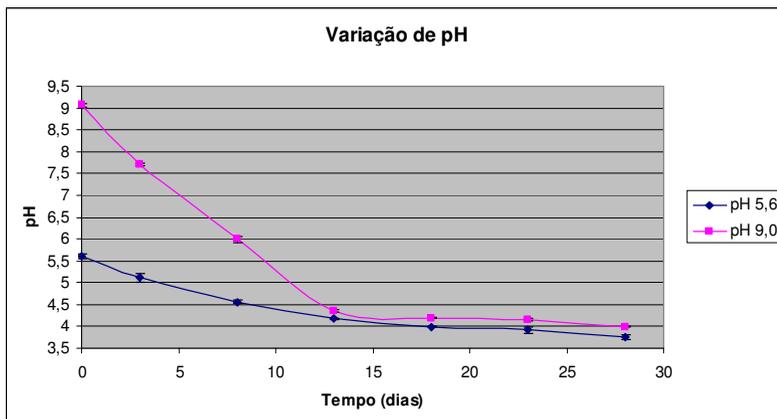
Nos dias 0 e 3 somente foi realizada a medida do pH.

**Tabela 10** - Produção de Cinabarina e biomassa por *P. sanguineus* em CBD com pH inicial 9,0

| Tempos (dias) | Cinabarina (%) <sup>*</sup><br>Média ± DP | pH Inicial  | Biomassa (g/L)<br>Média ± DP |
|---------------|---|-------------|------------------------------|
| 0             | -   | 9,06 ± 0,04 | -                            |
| 3             | -   | 7,71 ± 0,02 | -                            |
| 8             | 25 ± 8                                    | 5,99 ± 0,07 | 5,09 ± 1,72                  |
| 13            | 138 ± 51                                  | 4,34 ± 0,04 | 11,42 ± 2,71                 |
| 18            | 424 ± 76                                  | 4,19 ± 0,02 | 15,86 ± 2,02                 |
| 23            | 339 ± 102                                 | 4,15 ± 0,04 | 21,33 ± 2,70                 |
| 28            | 159 ± 34                                  | 3,99 ± 0,01 | 25,96 ± 3,43                 |

Nos dias 0 e 3 somente foi realizada a medida do pH.

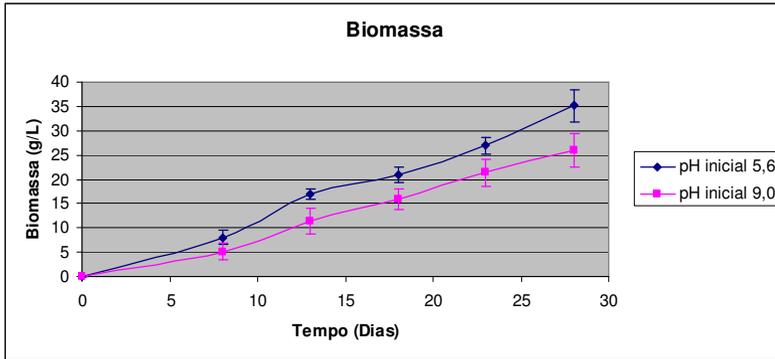
Na figura 17 estão representadas as variações nos pHs dos meios de cultivo.



**Figura 17** - Variação do pH nos meios de cultivos

No terceiro e no oitavo dia de cultivo os meios apresentaram pHs bastante diferentes, entretanto, a partir do décimo terceiro dia os valores de pHs ficaram próximos, o que sugere um efeito tamponante do fungo sobre o meio de cultivo. Ocorreu uma gradativa diminuição dos valores de pH até alcançarem no vigésimo oitavo dia de cultivo pH médio de 3,8 e 4,0 para as culturas com pH inicial de 5,6 e 9,0, respectivamente.

Na Figura 18 estão representados os resultados de produção de biomassa em CBD com pH inicial de 5,6 e 9,0.



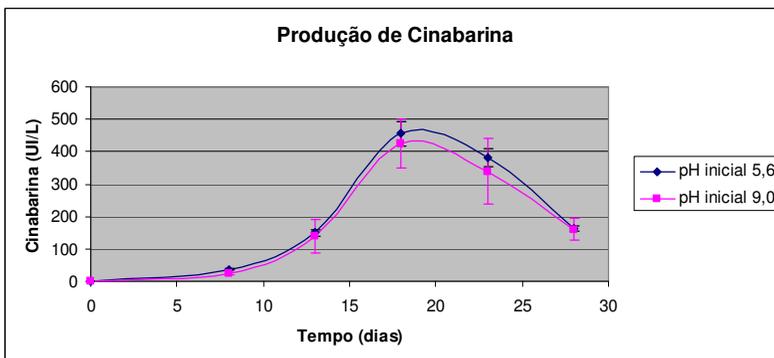
**Figura 18** - Produção de biomassa em CBD a pH inicial 5,6 e 9,0

O *P. sanguineus* cultivado em CBD em pH inicial de 5,6 e de 9,0 apresentou crescimento linear.

O CBD a pH inicial 5,6 mostrou-se ser mais favorável ao crescimento do fungo *P. sanguineus*, do que o CBD a pH inicial 9,0.

Ainda que o pH mais favorável ao desenvolvimento dos fungos geralmente esteja entre 5, 6 e 7, a maioria dos fungos tolera amplas variações de pH (TORTORA, FUNKE e CASE, 2000).

Na Figura 19 está representada a produção de cinabarina dos cultivos com pH inicial de 5,6 e 9,0 nos tempos 5,13,18,23 e 28 dias.



**Figura 19** - Gráfico da produção de cinabarina com o pH inicial do meio de cultivo 9,0 e 5,6

Os cultivos com pH inicial do CBD não alterado (pH 5,6) apresentaram médias de produção de cinabarina maiores em todos os tempos analisados, entretanto os resultados dos dois experimentos não apresentaram diferenças estatística entre si.

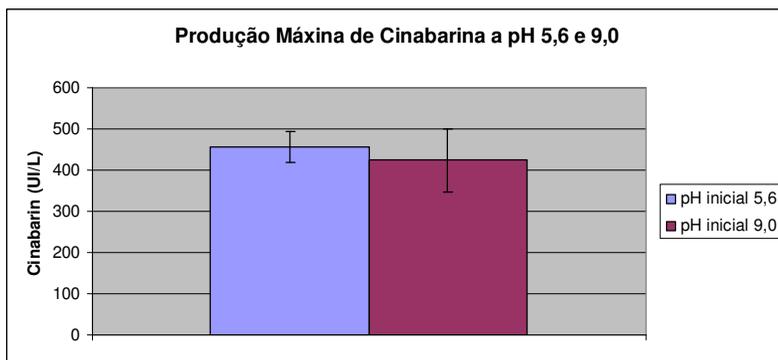
Os cultivos com pH inicial de 5,6 obtiveram resultados mais uniformes de produção de cinabarina, que pode ser notado pelos valores menores nos desvios-padrão.

A alteração do pH inicial do meio de cultivo promoveu um comportamento não muito diferenciado do fungo estudado. As mudanças no comportamento dos microrganismos provavelmente estão correlacionadas com o fato de o pH do meio externo afetar o transporte de certos constituintes através da membrana, tais como fosfatos orgânicos e potássio, e provavelmente assume importância fundamental para a ativação de enzimas que participam de pontos-chave do metabolismo secundário em fungos filamentosos (OROZCO, PEREIRA e KILIKIAN, 2003).

Apesar de o fungo ter apresentado crescimento linear a produção de cinabarina atingiu produção máxima em 18 dias.

De acordo com Espeso *et al.* (1993) na maioria das vezes, os microrganismos respondem às mudanças das condições ambientais, como o pH, variando os padrões de expressão genética.

A Figura 20 compara a produção de cinabarina nos meios com pH inicial de 5,6 e 9,0 no tempo de 18 dias, tempo em que houve a maior produção de cinabarina.



**Figura 20** - Comparação entre a produção de cinabarina nos meios com pH inicial de 5,6 e 9,0 no tempo 18 de dias

A interação entre substratos e fontes nutricionais diferentes pode ser mais propício ao desenvolvimento de uma linhagem do que de outras, bem como fatores externos como temperatura, luminosidade, dentre outros, exercem efeito (BERNARDI *et al.*, 2007).

O cultivo feito em pH inicial 5,6 apresentou produção máxima de cinabarina de 457 UI/L  $\pm$  43 e em pH inicial 4,24 UI/L  $\pm$  76, resultados contrários aos obtidos no trabalho de Smânia *et al.* (1997) em que o *P. sanguineus* apresentou maior produção de cinabarina a pH inicial 9,0. Esta variedade de resultados provavelmente é devido à utilização de diferentes cepas.

### **5.8 Produção de Cinabarina em Meio Líquido com Diferentes Fontes de Carbono e Nitrogênio**

Estudos sobre otimização de condições de cultivo podem além de propiciar incremento na produção de substâncias com atividades biológicas, contribuir para o entendimento de aspectos bioquímicos e fisiológicos desses organismos (RAMOS, 2008).

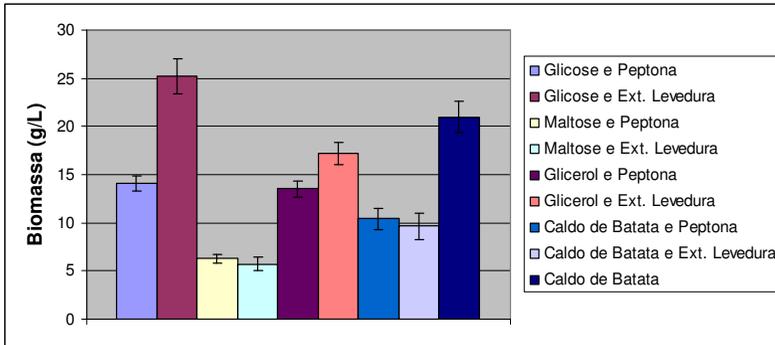
Na Tabela 11 estão apresentados os resultados da quantificação da cinabarina nos diferentes meios de cultivo, realizada em triplicata.

**Tabela 11** - Produção de cinabarina, pH inicial, pH final e biomassa nos diferentes meios de cultura utilizados

|  | <b>Cinabarina<br/>(UI/L)</b> | <b>pH<br/>Inicial</b> | <b>pH<br/>Final</b> | <b>Biomassa<br/>(g/L)</b> |
|--|------------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------------|
| <b>Glicose e Petona</b>                | 146 ± 17                     | 7,05 ± 0,12           | 6,23 ± 1,64         | 14,1 ± 0,8                |
| <b>Glicose e Extrato<br/>Levedura</b>  | 243 ± 40                     | 7,16 ± 0,05           | 5,23 ± 1,87         | 25,2 ± 1,8                |
| <b>Maltose e Peptona</b>               | 281 ± 32                     | 6,64 ± 0,07           | 4,68 ± 0,24         | 6,3 ± 0,4                 |
| <b>Maltose e Extrato<br/>Levedura</b>  | 299 ± 18                     | 6,75 ± 0,8            | 5,03 ± 0,26         | 5,7 ± 0,7                 |
| <b>Glicerol e Peptona</b>              | 132 ± 14                     | 7,35 ± 0,02           | 4,65 ± 0,31         | 13,5 ± 0,9                |
| <b>Glicerol e Extrato<br/>Levedura</b> | 138 ± 28                     | 6,99 ± 0,03           | 4,31 ± 0,7          | 17,2 ± 1,2                |
| <b>CBD</b>                             | 457 ± 43                     | 5,61 ± 0,05           | 3,99 ± 0,05         | 20,9 ± 1,6                |
| <b>CBD e Peptona</b>                   | 373 ± 37                     | 6,67 ± 0,01           | 3,88 ± 0,12         | 10,5 ± 1,1                |
| <b>CBD e Extrato<br/>Levedura</b>      | 281 ± 47                     | 5,53 ± 0,03           | 4,32 ± 0,28         | 9,6 ± 1,33                |
| <b>Glicose e Uréia</b>                 | 0                            | 9,04 ± 0,05           | -                   | *                         |
| <b>Glicerol e Uréia</b>                | 0                            | 9,15 ± 0,06           | -                   | *                         |
| <b>Maltose e Uréia</b>                 | 0                            | 8,34 ± 0,02           | -                   | *                         |
| <b>CBD e Uréia</b>                     | 0                            | 8,43 ± 0,01           | -                   | *                         |

\* Não houve crescimento do fungo.

A Figura 21 representada a biomassa produzida com as diferentes fontes de carbono e nitrogênio estudadas.



**Figura 21** - Produção de biomassa de *P. sanguineus* utilizando diferentes fontes de carbono e nitrogênio

O meio de cultivo que apresentou o maior crescimento de biomassa fúngica foi o meio glicose e extrato de levedura, seguido pelo meio formulado somente com caldo de batata dextrosado e então o meio glicerol e extrato de levedura. Apesar do bom crescimento do *P. sanguineus* em caldo de batata dextrosado o enriquecimento deste meio com peptona e extrato de levedura inibiu o crescimento do fungo.

Os meios em que o *P. sanguineus* obteve o menor crescimento foram os que utilizaram maltose como fonte de carbono, seguido pelos meios em que foram utilizados o caldo de batata combinados com peptona e extrato de levedura. A maltose como única fonte de carbono mostrou-se inadequada para o crescimento do fungo.

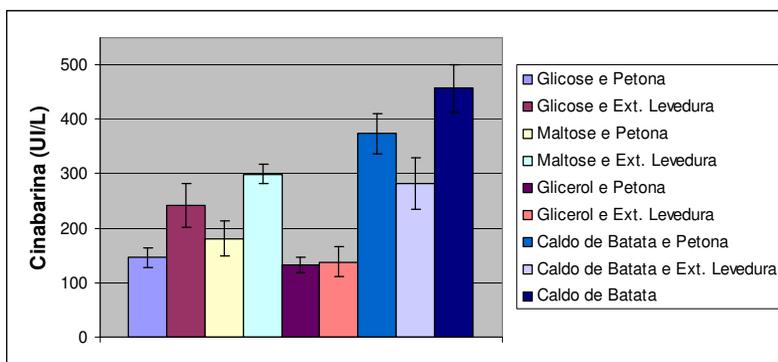
O pH inicial dos meios não apresentou correlação definida com o crescimento do fungo *P. sanguineus*. O fungo teve um bom crescimento em caldo de batata dextrosado em pH 5,6 e também em glicose e extrato de levedura com pH 7,1.

O nitrogênio, constituinte de proteínas e ácidos nucleicos é obtido por várias espécies de fungos a partir de uma grande variedade de compostos nitrogenados. Embora a amônia e glutamina sejam utilizadas preferencialmente, esses microrganismos também utilizam nitrato, nitrito, purinas, proteínas, aminoácidos, uréia e acetamida como fontes de nitrogênio. Para captação e metabolização destas fontes, é requerida a síntese de enzimas específicas ou ativação de enzimas pré-existentis (BONATELLI, 1977).

Nos meios em que foi utilizada uréia como fonte de nitrogênio não houve crescimento do fungo *P. sanguineus*. Estes meios de cultivo apresentaram pHs iniciais mais altos do que os demais meios, acima de

8,3. De acordo com Carlile e Watkinson (1996) a concentração do íon hidrogênio num meio pode afetar o crescimento indiretamente pelo seu efeito na disponibilidade de nutriente e diretamente pela sua ação nas superfícies celulares. Entretanto, com os experimentos anteriores realizados em CBD à pH inicial 9,0, em que o *P. sanguineus* cresceu e produziu o antibiótico cinabarina, pode-se afirmar que o pH básico não é o fator limitante do crescimento. A uréia na concentração de 10 g/L atuou nestes meios como um inibidor do crescimento celular.

A Figura 22 representa a produção de cinabarina nas diferentes fontes de carbono e nitrogênio estudadas.



**Figura 22** - Produção de cinabarina utilizando diferentes fontes de carbono e nitrogênio

As fonte de carbono e nitrogênio exercem papel fundamental na produção de metabólitos secundários (RAMOS, 2008).

O maior rendimento em termos de quantidade de cinabarina produzida foi obtido utilizando o meio de cultivo formulado somente a partir de CBD, com uma produção de  $457 \pm 43$  UI/L de caldo. A adição de peptona e extrato de levedura ao CBD reduziu significativamente a produção de cinabarina pelo *P. sanguineus*. Este resultado corrobora aos estudos feitos por Takahashi e Lucas (2008) que observando as condições utilizadas para a produção de antibióticos por fungos, afirmam que meios de cultura de constituição complexa são mais adequados que meios de cultura de constituição quimicamente definida. Meios de fácil obtenção, como o caldo de batata dextrosado, têm apresentado resultados encorajadores.

O segundo meio em que houve a maior produção de cinabarina foi o CBD e peptona com  $373 \pm 37$  UI/L de cinabarina produzida. Os

meios CBD e CBD e peptona apresentaram resultados, quanto à quantidade de cinabarina produzida, estatisticamente diferentes entre si e diferentes dos demais meios.

O glicerol, fonte de carbono bastante estudada atualmente devido este ser subproduto da produção de biodiesel, teve resultados medianos na produção de biomassa fúngica e baixos na produção de cinabarina quando comparados aos outros meios estudados. De acordo com Colen (1996) o glicerol tem sido relatado como uma ótima fonte de carbono para muitos fungos, entretanto a sua utilização neste trabalho, independente da fonte de nitrogênio utilizada, resultou nas menores médias de produção do metabólito secundário estudado.

A produção de biomassa fúngica e de cinabarina não apresentaram correlação direta, resultado que coincide com os resultados obtidos por Smânia Jr. (1995<sup>a</sup>), que afirma que as melhores condições de crescimento não estão diretamente relacionadas com a produção de cinabarina.

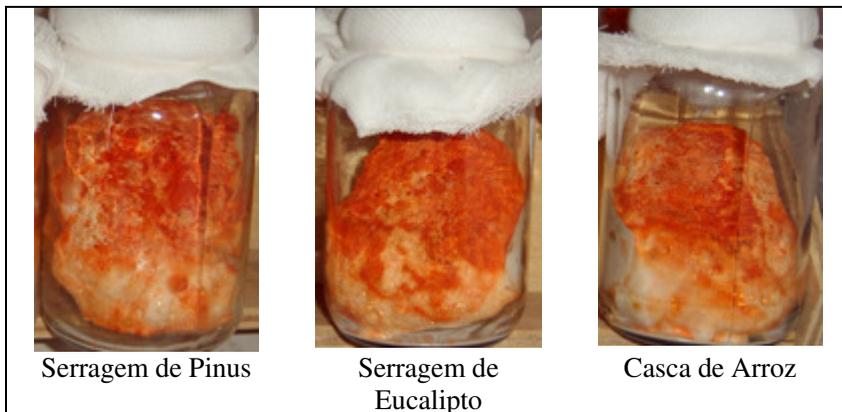
## **5.9 Produção de Cinabarina Utilizando Resíduos Lignocelulósicos**

A produção quali ou quantitativa de metabólitos secundários depende da capacidade biossintética do microrganismo e das condições de cultivo. Assim a manipulação dos parâmetros do cultivo pode alterar a expressão dos metabólitos secundários produzidos (TAKAHASHI e LUCAS,2008).

A suplementação de alguns substratos deve ser realizada principalmente como forma de adequar a relação C/N, onde para isso são utilizados, principalmente, materiais concentrados como farelos, sendo a quantidade a ser utilizada variável conforme o material (BERNARDI *et al.*, 2007). A adição de farelos à serragem de madeira vem sendo relatada como uma importante fonte de nutrientes indispensáveis ao desenvolvimento do fungo.

Devido à relação C/N ser bastante alta torna-se indispensável e correção da serragem com fonte de N, assim, foi realizada a correção da alta relação C/N adicionando-se 20% de farelo de arroz aos resíduos lignocelulósicos utilizados.

O *P. sanguineus* apresentou bom crescimento quando cultivado em serragem de pinus, serragem de eucalipto e em casca de arroz, conforme pode ser observado na Figura 23.



**Figura 23** - *P. sanguineus* cultivado em serragem de pinus, serragem de eucalipto e casca de arroz, com 30 dias de cultivo

Na Tabela 12 estão apresentados os resultados de produção de cinabarina pelo *P. sanguineus* nos resíduos lignocelulósicos estudados.

**Tabela 12** - Resultados de produção de cinabarina (UI) em resíduos lignocelulósicos

| Tempo (dias) | Cinabarina (UI/ Cultivo) |                |                       |
|--------------|--------------------------|----------------|-----------------------|
|              | Serragem de Pinus        | Casca de Arroz | Serragem de Eucalipto |
| 30           | 53 ± 8                   | 40 ± 8         | 34 ± 6                |
| 40           | 60 ± 6                   | 44 ± 6         | 45 ± 7                |
| 50           | 76 ± 6                   | 56 ± 6         | 58 ± 3                |
| 60           | 50 ± 8                   | 41 ± 8         | 44 ± 5                |
| 70           | 45 ± 6                   | 30 ± 5         | 32 ± 3                |
| 80           | 40 ± 3                   | -              | -                     |
| 90           | 39 ± 5                   | -              | -                     |

- Os experimentos feitos com casca de arroz e serragem de eucalipto foram realizados somente até o T70.

Independente do tipo de resíduo lignocelulósico utilizado (serragem de pinus, serragem de eucalipto ou casca de arroz) a produção máxima de cinabarina foi alcançada no tempo de 50 dias.

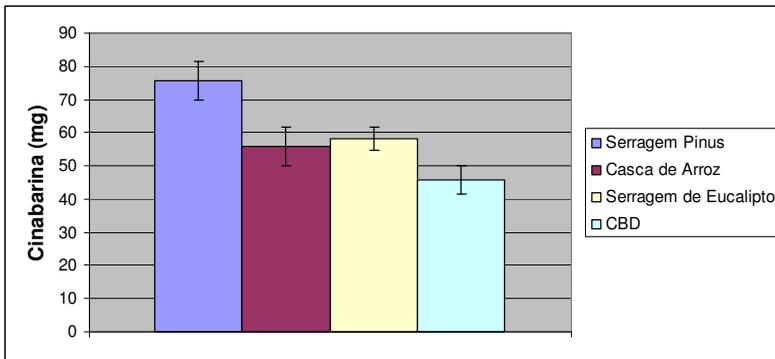
A utilização da serragem de pinus como substrato para o crescimento do *P. sanguineus* resultou nas maiores médias de produção

de cinabarina em todos os tempos analisados, sendo que apenas no tempo de 60 dias a produção de cinabarina neste meio não foi significativamente diferente da produção de cinabarina nos meios formulados com serragem de eucalipto e casca de arroz.

A maior produção de cinabarina em pinus parece ter sido em função do teor maior de lignina apresentado pelas árvores deste gênero. As árvores do gênero *Pinus* são classificadas como coníferas e apresentam um maior teor de lignina em comparação as árvores do gênero *Eucalyptus* classificadas como folhosas.

Os meios em que foram utilizadas a serragem de eucalipto e a casca de arroz apresentaram produção de cinabarina estatisticamente semelhantes em todos os tempos analisados para um nível de significância de 0,05.

A Figura 24 mostra a comparação entre a produção de cinabarina por cultivo pelo *P. sanguineus* utilizando resíduos lignocelulósicos (20 gramas dos resíduos lignocelulósicos secos) e o CBD (100 mL de caldo de batata).



**Figura 24** - Comparação entre a produção de cinabarina por *P. sanguineus* em resíduos lignocelulósicos e em CBD

O cultivo feito com serragem de pinus produziu cerca de 1,6 vezes mais cinabarina do que o cultivo feito em CBD. É importante salientar também que o cultivo em resíduos lignocelulósicos pelo método proposto ocupa menos espaço do que o cultivo em garrafas de Roux.

Nos últimos anos o cultivo em estado sólido tem recebido maior atenção por parte dos pesquisadores, pois tem mostrado que pode ofertar maior produtividade ou produtos com melhores características do que o cultivo submerso. Além disso, há a possibilidade de utilização de

substratos de baixo valor agregado, diminuindo assim o custo da produção (ROBINSON e NIGAM, 2003).

### 5.10 Estudo da Estabilidade da Cinabarina

Um dos problemas apresentados pela cinabarina é sua baixa estabilidade, principalmente em solução.

A decomposição de fármacos pode ocorrer por reações de hidrólise, oxidação, racemização, descarboxilação, fotólise, entre outras, das quais as mais frequentes são as reações de hidrólise e oxidação (LINTNER, 1995; LACHMAN, 2001).

De acordo com Smânia Jr. (1995<sup>a</sup>) é possível que a perda da atividade seja uma consequência da oxidação do princípio ativo.

Para fármacos oxidáveis, os traços de metais são uma fonte constante de dificuldade para preparar soluções estáveis. É preciso muito cuidado para eliminar esses traços das preparações lábeis, por meio da purificação completa da fonte de contaminação ou pela ligação química do metal com o uso de agentes que o tornam não-disponíveis para participar do processo oxidativo, como a adição de agentes quelantes (ANSEL *et al.*, 2000). Com o intuito de evitar a oxidação da cinabarina foi adicionado o EDTA.

A maior parte dos fármacos oxidáveis tem sua degradação acelerada pelo aumento da temperatura, sendo aconselhável mantê-los em local fresco (ANSEL *et al.*, 2000), desta forma, os resíduos contendo a cinabarina foram armazenados em refrigerador a temperatura de 2 °C.

Os resultados do estudo de estabilidade estão apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13** - Estudos de estabilidade da cinabarina seca, em DMSO e em DMSO com EDTA

| Tempo     | Seco         | Cinabarina (%)* |               |
|-----------|--------------|-----------------|---------------|
|           |              | DMSO            | DMSO com EDTA |
| <b>0</b>  | 100,0 ± 13,0 | 100,0 ± 9,4     | 100,0 ± 9,9   |
| <b>7</b>  | 102,6 ± 10,2 | 105,7 ± 8,9     | 108,9 ± 13,7  |
| <b>15</b> | 94,45 ± 11,9 | 102,6 ± 4,9     | 102,7 ± 8,6   |
| <b>30</b> | 91,72 ± 8,6  | 100,0 ± 9,4     | 100,0 ± 9,9   |
| <b>60</b> | 89,12 ± 7,5  | 74,4 ± 10,7     | 94,5 ± 7,9    |

\* Foi utilizada como 100% a atividade da cinabarina presente no T0 de cada experimento.

A alta variação nos resultados pode estar relacionada a diversos fatores que afetam a suscetibilidade do método de difusão em ágar. Entre os aspectos importantes a serem considerados estão a espessura do ágar e a concentração de inóculo que foi padronizado visualmente pela comparação da turvação da cultura de *S. aureus* com a do tubo 0,5 da escala de MacFarland.

Nos estudos de Smânia Jr. (1995<sup>a</sup>) a cinabarina armazenada em meio aquoso manteve a estabilidade por apenas 24 horas, enquanto a cinabarina quanto exposta ao ar mostrou-se estável por 30 dias e a cinabarina liofilizada e á vácuo manteve-se estável por 12 meses.

O resíduo armazenado seco, apesar de apresentar a média de percentagem de atividade menor no tempo de 60 dias não é significativamente ( $p=0,05$ ) diferente dos resultados obtidos no tempo zero. Pode-se dizer, então, que este resíduo manteve sua estabilidade pelo período analisado.

O resíduo do extrato diluído em DMSO apresentou-se estável apenas até um mês após sua extração.

A adição de EDTA aumentou a estabilidade do resíduo do extrato em solução, mantendo-o estável pelo tempo analisado, 60 dias.

## 6 CONCLUSÃO

O crescimento radial do fungo *Pycnoporus sanguineus* em placas de Petri contendo meio BDA é melhor representado pelo modelo de crescimento exponencial do que o linear. A produção do metabólito secundário cinabarina não está diretamente relacionada com o crescimento do fungo, já que a maior velocidade de crescimento foi obtida pela cepa MIP 95002 e a maior produção do antibiótico cinabarina pela cepa MIP 20001.

A espectrofotometria de absorção UV-Visível pode ser utilizada para o doseamento do antibiótico cinabarina em sua forma purificada, tendo desta forma um método de quantificação mais simples e rápido do que o método normalmente utilizado, o microbiológico. A espectrofotometria de absorção na região UV-Visível, mostrou-se linear no intervalo analisado, tendo como limite de quantificação inferior 0,125 mg/mL e limite superior de 1,5 mg/mL, apresentando precisão - analisada pela repetibilidade, e exatidão, quando comparado ao método microbiológico.

O inóculo sólido mostrou-se mais adequado do que o inóculo líquido, para a utilização em culturas líquidas, apresentando resultados para produção de biomassa mais uniformes.

Os cultivos com pH inicial do CBD não alterado (pH 5,6) e a pH inicial 9,0 não apresentaram diferenças quanto a produção de cinabarina, entretanto o CBD a pH inicial 5,6 mostrou-se mais adequado para utilização por ter apresentado resultados mais uniformes em todos os tempos analisados.

O meio composto apenas por CBD foi o meio mais propício para a produção de cinabarina, sendo que a adição de fontes de nitrogênio a este meio diminuiu a produção do antibiótico. O meio de cultivo que propiciou a maior produção de biomassa do *P. sanguineus* foi o meio contendo glicose e extrato de levedura, não apresentando, portanto, nenhuma relação entre a produção de biomassa e a produção de cinabarina. A utilização de maltose como fonte de carbono resultou nas menores produções de biomassa e a utilização de glicerol como fonte de carbono nas menores produções de cinabarina. A utilização de uréia nos meios de cultivo inibiu o crescimento do *P. sanguineus*.

Devido a sua maior concentração de lignina, a utilização da serragem de pinus como substrato para o crescimento do *P. sanguineus* resultou na maior produção de cinabarina, seguida pelos substratos serragem de eucalipto e casca de arroz que apresentaram produção de cinabarina semelhantes. O cultivo utilizando serragem de pinus produziu

cerca de 1,6 vezes mais cinabarina do que o cultivo em garrafas de Roux com CDB.

O resíduo armazenado seco manteve sua estabilidade pelo período analisado, 60 dias, já o resíduo do extrato diluído em DMSO apresentou-se estável apenas por um mês após sua extração e a adição de EDTA aumentou a estabilidade do resíduo do extrato em solução mantendo-o estável por 60 dias.

## REFERÊNCIAS

ABINSI. Associação Brasileira da Indústria da Madeira Processada Mecanicamente. **Estudo Setorial 2004**. Curitiba, 2005. 50 p.

ACHENBACH, H.; BLÜMM, E. Investigation of the Pigments of *Pycnoporus sanguineus* - Pinosanguin and New Phenoxazin-3-ones. **Arch. Pharm.**, Weinheim, n. 324, 1991, p. 3-6.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W. **Introductory Mycology**. 3. ed. Nova York: John Wiley & Sons, 1979. 632p.

ALONSO, Sandra Kunieda de; SILVA, Aderlan Gomes da; KASUYA, Maria Catarina Megumi; BARROS, Nairam Félix de; CAVALLAZZI, José Renato Pereira; BETTUCCI, Lina; ALFENAS, Acelino Couto. Isolamento e Seleção de Fungos Causadores da Podridão-Branca da Madeira em Florestas de *Eucalyptus* spp. com Potencial de Degradação de Cepas e Raízes. **Ver. Árvore**, Viçosa, v. 31, n.1, p. 145-155, jan./fev. 2007.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN Jr., L. V. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. São Paulo: Editorial Premier, 2000. 568 p.

ARORA, Daljit Singh; GILL, Paramjit Kaur. Effects of Various Media and Supplements on Laccase Production by Some White Rot Fungi. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 1, p. 89-91, mar. 2001.

BAX, R.; MULLAN; N.; VERHOEF, J. The Millenium Bugs – the Need for and Development of New Antibacterials. **Int J Antimicrob Agents**, v. 16, n.1, p. 51-59, 2000.

BELLON-MARUEL, V.; ORLIAC, O.; CHRISTEN, P. Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. **Process Biochemistry**, v.38, p.881-896, 2003.

BERNARDI, E.; DONINI, L. P. ; MINOTTO, E. ; NASCIMENTO, J. S. Utilização de Diferentes Substratos para a Produção de Inóculo de *Pleorotus ostreatoroseus*. **Ver. Ciênc. Agron.**, v. 38, n. 1, p .84-89, 2007.

BÔAS, S. G. V.; ESPOSITO, E. Bioconversão do Bagaço de Maçã. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, ano 3, n. 14, p. 38-42, maio./jun. 2000,

BONATELLI, R. J. **Estabilidade e Produção de Ácido Cítrico em *Aspergillus Níger***. 1977. 126 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas), IB/UNICAMP, Campinas-SP, 1977.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Ssanitária. **Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003**. Determina a publicação do “Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos”. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>> acesso em 27 de ago. 2007.

BRAUNWALD, Eugene. **Manual de Medicina**. 15. ed. Rio de Janeiro: McGrall-Hill, 2002. 1132 p.

BRIZUELA, M. A.; GARËIA, L.; PËREZ, L.; MANSUR, M. Basidiomicetos: Nueva Fuente de Metabolitos Secundários. **Ver. Iberoam. Micol.**, v. 15, p. 69-74, 1998.

CALIXTO, João B. Biodiversidade como Fonte de Medicamentos. **Revista Ciência e Cultura Temas e Tendências SBPC**, v. 55, n. 3, p. 37-39, jul./ago./set. 2003.

CARLILE, Michael John; WATKINSON, Sarah C. **The Fungi**. London: Academic Press, 1996. 482 p.

CASTILHO, G.; DERMOULIN, V. NaCL Salinity and Temperature Effects on Growth of Three Wood-rotting Basidiomycetes from a Papua New Guinea Coastal Forest. **Mycological Research**, v. 101, n. 3, p. 341-344, 1997.

CHAVES, R. de Q.; CORRÊA, G. F. Macronutrientes no Sistema Solo - *Pinus caribaea Morelet* em Palntios Apresentando Amarelecimento das Acículas e Morte de Plantas. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 5, set./out. 2005.

COLEN, Gecernir. **Isolamento e Seleção de Fungos Filamentosos Produtores de Lípases**. 1996. 206 f. Dissertação (Doutor em Ciências

de Alimentos), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1996.

COSTA, Edja M. M. B.; ESMERALDO, Mabel R. A.; CARVALHO, M. G. F.; DANIEL, Rosângela. L. A. P.; PASTRO, M. F.; SILVA, F. L. Avaliação da Ação Antimicrobiana da Própolis e de Substâncias Utilizadas em Endodontia sobre o *Enterococcus faecalis*. **Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integ.**, João Pessoa, v. 8, n. 1, p. 21-25, jan/abril 2008.

DONADIO, S.; CARRANO, L.; BRANDI, L. Targets and Assays for Discovering Novel Antibacterial Agents. **J Biotechnol.**, v. 99, p. 175-185, 2002.

DONINI, L. P.; BERNARDI, E.; MINOTTO, E. NASCIMENTO J.S. Efeito da Suplementação com Farelos no Crescimento *in vitro* de *Pleorotus ostrestus* em Meios à Base de Capim-elefante (*Pennisetum* spp.). **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 73, n.3, p.303-309, jul./ set. 2006.

DURAN, N.; DEZOTTI, M.; RODRIGUEZ, J. Biomasa Photochemistry XV: Photobleaching and Biobleaching of Kraft Effluent. **Journal Photochemistry and Photobiology, A, Chemistry**, v. 62, p. 269-279, 1991.

DURRANT, L. R., SILVA E. R., VICENTE, N. E. V., RANZANI, M. R. T. C., Produção de Resíduos Agroindustriais por lignocelulases fúngicas. 5., 2002, Brasília (DF). **Anais do ENZITEC 02**. Brasília (DF), 2002.

ESPESO, E. A.; TILBUM, J.; ARST, H. N.; PENÁLVA, M. A. pH Regulation is a Major Determinant in Expression of a Fungal Penicillin Biosynthetic Gene. **The EMBO Journal**, v. 12, p. 3947-3956, 1993.

ESPOSITO, Elisa; AZEVEDO, João L. **Fungos uma Introdução a Biologia Bioquímica e Biotecnológica**. Caxias do Sul: Educs, 2004. 510 p.

ESPOSITO, E.; INNOCENTINI-MEI, L. H.; FERRAZ, A.; CANHOS, V. P.; DURAN, N. Phenoloxidases and Hydrolases from *Pycnoporus sanguineus* (EUC-2050 strain): Applications. **Journal Biotechnology**, v. 29, p. 219-228, 1993.

**Estrutura da Cinabarina.** Disponível em: [http://chemdb.niaid.nih.gov/structs\\_search/all/url\\_search.asp?aidsno=012119](http://chemdb.niaid.nih.gov/structs_search/all/url_search.asp?aidsno=012119)> acesso em 21 set 2007.

**Farmacopéia Brasileira.** 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. nv.

**Foto de *Pycnopus sanguineus*.** Disponível em: [http://www.stri.org/english/site\\_tools/photo\\_of\\_the\\_week/index.php?id=64](http://www.stri.org/english/site_tools/photo_of_the_week/index.php?id=64)> acesso em 20 out 2007.

GAMEIRO, P. H.; BERNARDI, Eduardo; ARMAS, R. D.; NASCIMENTO, J. S. Levantamento de Fungos Macroscópicos na Região de Pelotas – RS. **Anais do XII Congresso de Iniciação Científica.** Pelotas: UFPel, 2003.

GARCIA, Telma Alves. **Purificação e Caracterização das Lacases de *Pycnopus sanguineus*.** 2006. 126 f. Dissertação (Doutor em Biologia Molecular) - Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

GERRERO, Rosa; HOMRICH, Maria M. **Fungos Macroscópicos Comuns no Rio Grande do Sul – Guia para Identificação.** 2. ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, p. 07-17, 1999.

GIESE, Ellen C.; COVIZZI, Luiz G; DEKKER, Robert F.; BARBOSA, Aneli M. Influência de Tween na Produção de Lacases Constitutivas e Indutivas pelo *Botryosphaeria. sp.* **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 26, n.4, p. 463-470, 2004.

GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology.** 2. ed. New York, John Wiley & Sons, 1994. 458p.

GUPTE, M.; KULKARNI, P.; GANGULI, B.N. Antifungal Antibiotics. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 58, p. 46-57, 2002.

HAWKES, G. E.; SMITH, C. Z.; UTLEY, J. H. P.; VARGAS, R. R.; VIERTLER, H. A Comparison of Solution and Solid-state C-13 NMR Spectra of Lignin Model Compounds. **Holzforschung**, Inglaterra, v. 47, n. 4, p.302-312, 1993.

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNET, J. W. Fungal Secondary Metabolism – from Biochemistry to Genomics. **Nature Reviews**. v.3, p. 937-947, 2005.

LACAZ, Carlos da Silva *et al.* **Fungos, Actinomicetos e Algas de Interesse Médico**. São Paulo: Sarvier, p. 03-17, 1998.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANING, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. 1489 p.

LANGE, Lene. Microbial Metabolites - an Infinite Source of Novel Chemistry. **Pure & Appl. Chem.**, v. 68, n. 3, p. 745-748, 1996.

LEVIN, L.; VILLALBA, L.; DA RE, V.; FORCHIASSIN, F.; PAPINUTTI, L. Comparative Studies of Loblolly Pine Biodegradation and Enzyme Production by Argentinean White Rot Fungi Focused on Biopulping Processes. **Process Biochem.**, 2007.

LIEBL, M.; RAMOS, R. C.; BORDERES, J.; VIEIRA, G. R. T.; GUEDES, A.L.; VALE, R. C. S. C.; TAVARES, L. B. B. Avaliação do desempenho de *Pycnoporus sanguineus* em Reator de Coluna com Sistema Sólido como organismo modelo para produção de compostos antibacterianos. **XVI Cobeq**. Santos, 2006.

LIEBL, M.; VIEIRA, G. R. T.; GUEDES, A.; ENDER, L.; TAVARES, L. B. B. Produção de Antibióticos em Reatores de Coluna em Sistema Sólido utilizando *Polyporus tricholoma*. **Sinaferm 2005 - XV Simpósio Nacional de Bioprocessos**. Recife, 2005.

LINTNER, C. J. In: **Remington: The Science and Practice of Pharmacy**. 19.ed. Easton: Mack Publishing, v. 2, cap. 81, 1995.

LOMASCOLO, A.; RECORD, E.; HERPOEL-GIMBERT, I.; DELATTRE, M.; ROBERT, J. L.; GEORIS, J.; DAUVIRIN, T.; SIGOILLOT, J. – C.; ASTHER, M. Overproduction of Laccase by a Monokaryotic Strain of *Pycnoporus cinnabarinus* Using Ethanol as Inducer. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 618–624, 2003.

LOPES, C. B.; SCHEMBERGER, A.; TRINDADE, J. L. F. Biotecnologia e Bioconversão de Resíduos Agroindustriais - Uma Revisão. **VI Semana de tecnologia em alimentos**, UTFPR, 2008.

MACEDO, Amanda F.; PILIACKAS, José M. Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Fungos Pertencentes à Família *Polyporaceae*. **Anais do XI Simpósio Multidisciplinar da USJT**. São Paulo: USJT, 2005.

MANN, J. **Chemical Aspects of Biosynthesis**. New York: Oxford University Press, 1994. 92 p.

MELO, I. S.; AZEVEDO J. L. **Microbiologia Ambiental**. CNPMA/EMBRAPA, Jaguariúna, 1997. 440 p.

OBARA-DOI, Suely M.; DEKKER, Robert F. H.; CASTRO-GÓMEZ, Raul J. H. Otimização da Produção de Dextranase de *Fusarium* SP. Utilizando Metodologia de Superfície de Resposta. **Anais do XIV SINAIFERM**, Florianópolis, 2003.

OLIVEIRA, L. F. C.; HYARIC, M. L.; BERG, M. M.; ALMEIDA, M. V.; EDWARDS, H. G. M. Raman Spectroscopic Characterization of Cinnabarin Produced by the Fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. **Vibrational Spectroscopy**, v.38, n. 12, p. 1628-1632, 2007.

OLIVEIRA, Marcos de. **Plantio e Exploração do Pínus Abre Novos Mercados e Reduz a Extração de Espécies Nativas**. Edição Impressa 115 - Setembro 2005. Disponível em: <http://www.revistapesquisa.fapesp.br/?art=2831&bd=1&pg=1&lg=>> acesso em 15 de abr. 2009.

OROZCO, S. F. B.; PEREIRA, D. G.; KILIKIAN, B. V. Influência do pH na Produção de Pigmentos Vermelhos e na Micromorfologia de *Monascus purpureus* CCT 3802 em cultivo submerso. **Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações CR ROM**, Florianópolis, 2003.

PACIFICO, D. G. P.; FERREIRA, E. C.; KILIKIAN, B. V. Influência da Velocidade Específica de Crescimento de *Monascus purpureus* ATCC 36928 na Produção de Pigmentos Vermelhos. **Anais do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos – SINAIFERM**, v. 15, p. 1-7, 2005.

- PACHECO, S. M. V.; MORGADO, A. F.; FURIGO JÚNIOR, A. F. Biosíntese de Vanilina por Três Isolados de *Pycnoporus sanguineus*. **Anais do XVII COBEQ**, Recife, v. 1, p. 1-7. 2008
- PAES, J. B.; VITAL, B. R. Resistência Natural da Madeira de Cinco Espécies de Eucalipto a Cupins Subterrâneos, em Teste de Laboratório. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 24, p. 97-104, 2000.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New Developments in Solid State Fermentation: I-Bioprocesses and Products. **Process Biochem.**, 35, p.1153-1169, 2000.
- PELCZAR, Michael J. Jr.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, Noel R. **Microbiologia – Conceitos e Aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1997. 524 p.
- PEREIRA NETO, J. T. Tratamento, Reciclagem e Impacto Ambiental de Dejetos Agrícolas. **Conferência Sobre Agricultura e Meio Ambiente**, Viçosa, p.61-75. 1992.
- PINTO, Terezinha de Jesus Andreoli; KANEKI, Telma Mary; OHARA, Mitsuko Taba. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. Sao Paulo: Atheneu, 2000. 309 p.
- POINTING, S. B.; JONES, E. B. G.; VRIJMOED, L. L. P. Optimization of Laccase Production by *Pycnoporus sanguineus* in Submerged Liquid Culture. **Mycologia**, v. 92 n. 1, p. 139-144. 2000.
- PUTZEL, Maria T. Lopes; PUTZEL, Jair. **O Reino dos Fungos**. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 1998. p. 14-371.
- RABELO, Gustavo S.; DREIER, Luciano A.; SANTOS, Jaqueline P.; HASAN, Salah D. M. Estudo da Extração de Proteases Fúngicas obtidas por Fermentação em Estado Sólido. **IV COBEQ**. Campinas, 2005.
- RAJARATHNAM, S.; SHASHIREKA, M. N.; BANO, Z. Biopotentialites of the Basidiomacromycetes. **Advances in Applied Microbiology**, v.37, p.223-361. 1992.

RAMANA MURTHY, M. V.; KARANTH, N. G.; RAO, K. S. M. S. R. Biochemical Engineering Aspects of Solid-State Fermentation. *Advances in Applied Microbiology*, v.38, p. 99 – 147, 1993.

RAMOS, R. C.; LIEBL, M.; VIEIRA, G. R. T.; GUEDES, A.; TAVARES, L. B. B.; FURIGO JR, A. Cinética de Crescimento de *Pycnoporus sanguineus* em Sistema Submerso Para Produção de Compostos Antibacterianos. **XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 2006.

RAMOS, H. P. **Otimização das Condições de Cultivo do Fungo Endofítico *Arthrinium state of Apiospora montagnei* Sacc. para Produção de Metabólitos Secundários com Atividades Biológicas**. 2008. 60 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

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

RAVEN, Peter. H.; EVERT, Ray F.; EICHHORN, Susan E. **Biologia Vegetal**. 6<sup>a</sup> ed. Rio Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2001. 906 p.

Reeslev, M.; Kjoller, A. Comparison of Biomass Dry Weights and Radial Growth Rates of Fungal Colonies on Media Solidified with Different Gelling Compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, p. 4236-4239, 1995.

RIVERÓN, Fernandez F.; HERNÁNDEZ, Jorge L.; MARTÍNEZ, Laida P.; BETARTE, Caridad M. Resistência Bacteriana. **Rev. Cubana Med Milit**, v. 32 n. 1, p. 44-48, 2003.

ROBINSON, T.; MCMULLAN, G.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. Remediation of Dyes in Textile Effluent: a Critical Review on Current Treatment Technologies with Proposed Alternative. *Biol Res Technol*. 2000.

ROBINSON, T.; NIGAM, P. Bioreactor Desing for Protein Enrichmente of Agricultural Residues by Solid State Fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 197-203, 2003.

RODRIGUES, Cristine. **Desenvolvimento de Bioprocesso para Produção de Ácido Cítrico por Fermentação no Estado Sólido utilizando Polpa Cítrica**. (2006). 107 f. Dissertação (Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

ROMAN, Huberto R.; MORITZ, Carlos A.; MORGADO, Ayres F. **Manutenção e Preservação de Habitações**. 1993

ROSA, L. H. *et al.* Screening os Brazilian Basidiomycetes for Antimicrobial Activity. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 7, p. 967-974, 2003.

SANTOS, Vera Maria Carvalho Silva. **Contribuição ao Estudo da Produção de *Pleurotus spp* em Resíduos Lignocelulósicos**. 2000. 149f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

SATO, S. Produção de Antibióticos. *In*: Lima UA, Aquarone E, Borzani, W, Schmidell W. **Biotecnologia Industrial - Processos Fermentativos e Enzimáticos**. Editora Edgard Blücher Ltda: São Paulo, p.101-124, 2001.

SCHMIDT, P. **Efeito da Incubação com Uréia ou Inoculação com *Pleurotus ostreatus* no Valor Nutritivo do Feno de Braquiária**. 2002. 83 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Univesrsidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2002.

SGAI, D. R. **Fatores que Afetam o Tratamento para Preservação de Madeiras**. 2000. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Setor de Engenharia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

SMÂNIA JR, Arthur. **Estudo da Atividade Microbiana do *Pycnoporus sanguineus* (L:FR.) MURR**. 1995. 91 f. Dissertação

(Doutor em Ciências – Microbiologia), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1995<sup>a</sup>.

SMÂNIA JR, A.; SMÂNIA, Elza de Fátima Albino ; MONACHE, Franco Delle ; CRUZ, F. S. ; BENCHETRIT, L. C. Growth And Production Phases Of *Pycnoporus Sanguineus*. **Rev. Microbiol.**: São Paulo, 26, p. 302-306, 1995<sup>b</sup>.

SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA JR, A.; LOGUERCIO-LEITE, C.; GIL, M.L. Optimal Parameters for Cinnabarin Synthesis by *Pycnoporus sanguineus*. **J Chem Techn Biotechnol.**, v. 70, p. 57-59, 1997.

SMÂNIA JR, Artur ; MARQUES, Carolina J S ; SMANIA, E. F. A. ; ZANETTI, Carlos R ; CAROBREZ, Sonia G ; TRAMONTE, Ricardo ; LOGUERCIO-LEITE, Clarice . Toxicity and Antiviral Activity of Cinnabarin Obtained from *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. **Phytotherapy Research**, Estados Unidos, v. 17, p. 1069-1072, 2003

SOCCOL, C.R. **Contribuição ao Estudo da Fermentação no Estado Sólido em Relação com a Produção de Ácido Fumárico**. Biotransformação de Resíduo Sólido de Mandioca por *Rhizopus* e *Basidiomacromicetos* do Gênero *Pleurotus*. 1994. 228 f. Tese de Livre-Docência. UFPR, 1994.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p. 205-218 2003.

STAMETS, Paul. **Novel Antimicrobials from Mushrooms**. HerbalGram, v. 54, p 1-6, 2002.

STROHL, W. R. The Role of Natural Products in a Modern Drug Discovery Program. **Drud Discobery Today**, v.5, n. 2, p. 39-4, 2000.

TAKAHASHI, Jaqueline A.; LUCAS, Esther M. F. Ocorrência e Diversidade Estrutural de Metabólitos Fúngicos com Atividade Biológica. **Química Nova**, v. 31, p. 1807-1813, 2008.

TOMASINI, A.; FAJARDO, C.; BARRIOS-GONZALES, J. Gibberellic Acid Production using Different Solid State Fermentation Systems. *World J Microbiol Biotechnol*, v. 13, p. 203-206, 1997.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2000. 827p.

TRABULSI, Luis Rachid; ALTERTHUM, Flávio. **Microbiologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 718 p.

TREVISAN, H.; MARQUES, F. M. T.; CARVALHO, A. G. de. Degradação Natural de Toras de Cinco Espécies Florestais em Dois Ambientes. **FLORESTA**, Curitiba, PR, v. 38, n. 1, p.33-41. jan./mar. 2008.

VALERIANO, V. S.; SILVA, A. M. F.; SANTIAGO, M. F.; GARCIA, T. A. Estudo de Indutores para a Produção de Lacase por *Pycnoporus sanguineus*. **Anais da XV Semana Científica de Farmácia-UFG**, Goiânia, 2007. p. 140-143

VANHULLE, Sophie; RADMAN, Romeo; PARRA, Roberto; CUI, Tingting; BOLS, Christian-Marie; TRON, Thierry; SANNIA, Giovanni; KESHAVARZ, Tajalli. Effect of Mannan Oligosaccharide Elicitor and Ferulic Acid on Enhancement of Laccases Production in Liquid Cultures of *Basidiomycetes*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1712-1718, jun. 2007.

WAWRIK, B.; KERKHOF, L.; ZYLSTRA, J.; KUKOR, J. J. Identification of Unique Type II Polyketide Synthase Genes in Soil. **Applied and environmental microbiology**, Baltimore, v. 71, p. 2232-2238, 2005.

## **APÊNDICE A**

### **Artigo 1: Comparação entre os Métodos Físico-Químico e Microbiológico para Doseamento do Antibiótico Cinabarina**

Baumer, Janaina D.; Villela, Sabrina; Bazzo, Giovana ; Morgado, Ayres  
F.; Furigo, Agenor Jr.

XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Recife, set. 2008

## Comparação entre os Métodos Físico-Químico e Microbiológico para Doseamento do Antibiótico Cinabarina

Baumer, Janaina D.<sup>1\*</sup>; Villela, Sabrina<sup>1</sup>; Bazzo, Giovana<sup>2</sup>; Morgado, Ayres F.<sup>1</sup>; Furigo, Agenor Jr.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Engenharia Química – Universidade Federal de Santa Catarina.

Campus Universitário, – CEP: 88040-900 – Florianópolis – SC - Brasil  
Telefone: (xx-48) 3721-9715 – Fax: (xx-48) 3721-9687 – Email:  
[janabaumer@yahoo.com.br](mailto:janabaumer@yahoo.com.br).

\*Bolsista do Cnpq-Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Farmácia – Universidade da Região de Joinville  
Campus Universitário s/n. - Bom Retiro-Caixa Postal 246 - CEP 89.201-972

Telefone: (xx-47) 3461-9000 - Fax: (xx-47) 3473-0131 – Email:  
[gbazzo@uol.com.br](mailto:gbazzo@uol.com.br).

**RESUMO** – Este trabalho teve como objetivo comparar o método microbiológico e um método físico-químico, no caso a espectrofotometria de absorção na região do UV-Visível, para o doseamento do antibiótico cinabarina produzido pelo fungo *Pycnoporus sanguineus*, com a finalidade de obter um método de doseamento mais rápido e prático para facilitar pesquisas futuras sobre este antibiótico. A resistência bacteriana vem se tornando um problema de grandes dimensões devido ao uso abusivo dos antibióticos e a capacidade que muitas bactérias possuem em desenvolver resistência aos antibióticos com os quais já tiveram contato. Desta forma, a pesquisa e o desenvolvimento de novos agentes antibióticos é de extrema importância e, os métodos analíticos utilizados devem ser confiáveis. Foram realizadas curvas de calibração da cinabarina com o método microbiológico e físico-químico, e avaliados os seguintes parâmetros analíticos para o método espectrofotométrico: linearidade, intervalo, precisão – repetibilidade e exatidão. O método espectrofotométrico

mostrou-se confiável para a finalidade pretendida, produzindo resultados estatisticamente semelhantes aos obtidos com o método microbiológico.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cinabarina; metodologias analíticas; espectrofotometria UV-Visível.

**ABSTRACT** – This study aimed to compare the microbiological and physical-chemical methods, in the case of UV-Visible spectrophotometry, for the determination of antibiotic cinnabarin produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus*, targeting a method to obtain reliable, faster and practical of determination to facilitate future research on this antibiotic. The bacterial resistance is becoming a great difficulty largely due to the misuse of antibiotics and the ability that many bacteria have developed resistance to antibiotics which have had contact. Thus, the research and development of new antibiotic agents is extremely important, and analytical methods used must be reliable. Calibration curves of cinnabarin were conducted with the microbiological and physical-chemical methods, and evaluated the following analytical parameters for the spectrophotometric method: linearity, range, precision - repeatability and accuracy. The spectrophotometric method proved to be reliable for the purpose intended, producing results statistically similar to those obtained with the microbiological method.

**KEY-WORDS:** Cinnabarin, comparison, spectrophotometry UV-Visible.

## 1 INTRODUÇÃO

Os antibióticos são substâncias produzidas por diversas espécies de microrganismos, entre eles as bactérias e fungos e que, em baixas concentrações, são capazes de impedir o crescimento ou eliminar seletivamente outros microrganismos. Esta definição exclui os compostos sintéticos que, juntamente com os compostos naturais e seus derivados, são denominados antimicrobianos (GOODMAN et al., 1996).

Os fungos, pertencentes à classe dos *Basidiomicetos*, usados na medicina popular desde os tempos ancestrais, apresentam grande importância na pesquisa de substâncias antivirais, antifúngicas e antibacterianas a partir de seus metabólitos secundários (HWANG et al., 2003). Dentro da classe *Basidiomicetos* destaca-se a ordem *Aphyllophorales*, em que se encontram os fungos conhecidos

popularmente por orelhas-de-pau, como o *Pycnoporus sanguineus*, pertencente à família *Polyporaceae* (MACEDO e PILACKAS, 2005).

Este fungo sintetiza não menos que sete pigmentos, e o antibiótico cinabarina é um deles (ACHENBACH e BLÜMM, 1991).

A cinabarina é um pigmento laranja, o qual tem uma estrutura básica fenoxazina-3-um, com um grupo carbonila no C-1, um grupo amino no C-2 e um grupo hidroxila no C-9 (ACHENBACH e BLÜMM, 1991).

Estudos realizados por Smânia (1995<sup>b</sup>, 1997) mostraram que a cinabarina produzida pelo *P. sanguineus* apresenta atividade contra *B. cereus*, *E. fecalis*, *E. faecium*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *L. mesenteroides*, *L. plantarum*, *P. aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *S. typhi*, *S. aureus* e vários *Streptococcus spp.*, tendo atividade principalmente sobre bactérias gram-positivas.

De acordo com Oliveira et al. (2007) após a avaliação de extratos de *P. sanguineus* através da espectroscopia Raman, concluiu-se que os extratos obtidos com acetato de etila e com metanol possuem composição bastante similar, contendo a cinabarina como componente principal.

Até o presente momento, não existem descritas na literatura metodologias oficiais para doseamento da cinabarina. No caso de antibióticos, diversos métodos podem ser utilizados, sendo o ensaio microbiológico de difusão em ágar um dos mais empregados. No entanto, este método é demorado e envolve várias etapas, ao contrário do método de espectrofotometria de absorção na região do UV-Vis, que é rápido, simples e eficiente.

Toda metodologia analítica que não se encontra descrita em compêndios oficiais deve ser validada. A validação do método analítico é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (NBR ISO/IEC 17025, 2001).

Segundo a RE 899/03 (BRASIL, 2003), que estabelece o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, metodologias que serão empregadas na determinação quantitativa de ativos em matérias-primas ou produtos farmacêuticos, devem ser avaliadas quanto aos seguintes parâmetros analíticos: especificidade, linearidade, intervalo, precisão-repetibilidade, exatidão e robustez.

O presente trabalho teve como objetivo comparar o método microbiológico de doseamento do antibiótico com o método de espectrofotometria de absorção na região do UV-Visível, visando obter

um método confiável, rápido e prático para o doseamento da cinabarina, com o objetivo de facilitar pesquisas futuras sobre este antibiótico.

## 2 METODOLOGIA

A cinabarina utilizada neste trabalho foi isolada e purificada a partir do extrato de uma cultura de *Pycnoporus sanguineus* (cepa MIP 20001 - doada pelo Laboratório de Antibióticos do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina), conforme a metodologia descrita por Smânia (1995<sup>a</sup>).

### 2.1 Método físico-químico

Primeiramente foi realizada uma varredura na faixa de 200 a 600 nm, em espectrofotômetro SHIMADZU (modelo 1601PC), com uma solução na concentração de 0,5 mg/mL de cinabarina, para se obter o comprimento de onda de máxima absorção para o antibiótico. Em seguida, foram avaliados os seguintes parâmetros analíticos: linearidade, intervalo, precisão -repetibilidade e exatidão.

#### Linearidade

A linearidade do método foi avaliada através da construção de uma curva de calibração. Foram preparadas soluções de cinabarina nas concentrações de 0,125; 0,25; 0,50; 1,0 e 1,5 mg/mL, em triplicata. As absorbâncias das soluções foram medidas ( $\lambda_{\text{máx}} = 458 \text{ nm}$ ) e então construída uma curva de calibração e calculados o coeficiente de correlação linear e a equação da reta.

#### Intervalo

O intervalo analisado foi o mesmo avaliado no quesito linearidade, tendo como limite de quantificação inferior a concentração equivalente a 0,125 mg/mL de cinabarina, e como limite superior a concentração de 1,50 mg/mL de cinabarina.

#### Precisão -Repetibilidade

Para avaliação da precisão do método foram medidas as absorbâncias de uma solução contendo 0,5 mg/mL de cinabarina, em sextuplicata. Em seguida, foram calculados o desvio padrão e o coeficiente de variação

percentual (CV%). Consideraram-se valores de  $CV \% \leq 5$  para avaliação da precisão (BRASIL, 2003).

### Exatidão

A exatidão do método de doseamento da cinabarina por espectrofotometria UV-Visível foi avaliada pela comparação dos resultados obtidos com o método microbiológico de difusão em ágar, utilizando-se as concentrações de 0,5 mg/mL para o método de doseamento por espectrofotometria UV-Visível, e a quantidade de 0,5 mg para o método microbiológico.

As absorbâncias e os valores dos halos de inibição obtidos foram tratados matematicamente a fim de se obter os valores em teor (%) para posterior comparação.

## **2.2 Método microbiológico**

O método microbiológico utilizado foi o de difusão em ágar. Para o preparo do inóculo foi utilizado uma suspensão bacteriana de *Staphylococcus aureus* padronizada pela comparação com o padrão 0,5 da escala de Macfarland, resultando em uma concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. Para preparação das placas, volumes de 20 mL de ágar Mueller-Hinton foram vertidos em placas de Petri (13 x 100 mm). Após solidificação foram feitos 4 orifícios de 7 mm de diâmetro no ágar. O inóculo contendo a bactéria-teste (*S. aureus* ATCC 6538) foi semeado uniformemente na superfície do meio com o auxílio de um Swab estéril através de estrias transversais. O resíduo do extrato a ser testado foi ressuspensão e diluído em DMSO e os orifícios preenchidos com 50  $\mu$ L da diluição. Os sistemas, após terem sido montados, foram incubados por 18 horas a  $35^\circ\text{C} \pm 0,1$ , e então foram realizadas as leituras dos halos de inibição.

### Curva de Calibração

Foram avaliadas 5 quantidades distintas de cinabarina (0,125; 0,250; 0,500; 1,000 e 1,500 mg), com 3 repetições. As quantidades de cinabarina usadas e os diâmetros dos respectivos halos de inibição foram distribuídos em uma planilha do Microsoft Excel 5.0. Através da regressão linear foi possível obter a relação funcional do tipo  $y = ax + b$ , onde  $y$  corresponde ao diâmetro do halo de inibição (cm) e o  $x$  ao logaritmo da quantidade de cinabarina (mg).

### 3 RESULTADOS

Através da observação do espectro de absorção foi escolhido o comprimento de onda de 258 nm, no qual foi obtida a absorção máxima para a cinabarina. O gráfico da curva-padrão, o coeficiente de correlação e a equação da reta obtidos estão demonstrados na Figura 1.

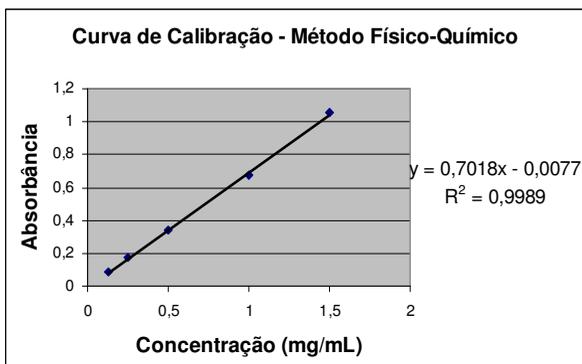


Figura 1 - Curva de calibração da cinabarina pelo método físico-químico.

O método mostrou-se linear no intervalo analisado (de 0,125 a 1,5 mg/mL) apresentando coeficiente de correlação linear igual a 0,9989 e equação da reta igual a  $y = 0,7018x - 0,0077$ . Os resultados obtidos demonstraram haver correlação linear entre a concentração de cinabarina e a absorbância da solução.

Os resultados obtidos na avaliação da precisão - repetibilidade estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Avaliação da precisão – repetibilidade do método.

|               |            |                |
|---------------|------------|----------------|
| 0,344         | 0,346      | 0,346          |
| 0,348         | 0,346      | 0,345          |
| Média = 0,346 | DP = 0,001 | CV (%) = 0,289 |

O método se mostrou preciso, visto que o coeficiente de variação percentual (CV%), foi  $\leq 5$ .

Os resultados obtidos pela curva de calibração da cinabarina pelo método microbiológico estão demonstrados no gráfico 2.

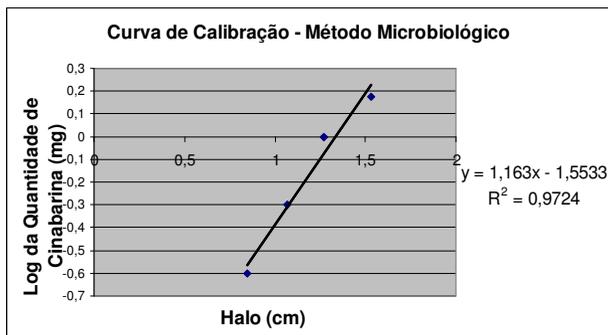


Figura 2 - Curva de calibração obtida pelo método microbiológico.

O método mostrou-se linear no intervalo analisado (de 0,125 a 1,5 mg) apresentando coeficiente de correlação linear igual a 0,9724 e equação da reta igual a  $y = 1,163x - 1,5533$ . Os resultados obtidos demonstraram haver correlação linear entre o logaritmo da quantidade de cinabarina e o halo de inibição formado.

Os resultados obtidos através do método espectrofotométrico foram comparados com os resultados obtidos pelo método microbiológico e estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2- Resultados obtidos do doseamento da cinabarina pelos métodos físico-químicos e microbiológico.

|                | Método Físico-Químico | Método Microbiológico |
|----------------|-----------------------|-----------------------|
| Teor (%) n = 3 | 100,8                 | 98,07                 |
| DP             | 0,49                  | 11,78                 |
| CV %           | 0,48                  | 12,01                 |

A análise da variância (ANOVA) foi realizada com os valores obtidos pelos dois métodos e demonstrou não haver diferença significativa entre os mesmos, para um nível de significância de 0,05 (Valor de F calculado = 0,107; valor de F tabelado = 7,708).

## 4 CONCLUSÃO

O método físico – químico estudado, a espectrofotometria de absorção na região UV-visível, mostrou-se linear no intervalo analisado, tendo como limite de quantificação inferior 0,125 mg/mL e limite superior de 1,5 mg/mL, apresentando precisão - analisada pela repetibilidade, e exatidão, quando comparado ao método microbiológico.

De acordo com os resultados obtidos, a espectrofotometria de absorção UV-visível pode ser utilizada para o doseamento do antibiótico cinabarina, tendo desta forma um método de quantificação mais simples e rápido do que o método normalmente utilizado, o microbiológico.

## REFERÊNCIAS

ACHENBACH, H.; BLÜMM, E. Investigation of the pigments of *Pycnoporus sanguineus* – pycnosanguin and new phenoxazin – 3 – ones. Arch. Pharm., Weinheim, v. 324, p.3-6, 1001.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância sanitária. Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>> acesso em 27 de ago de 2007.

BARROS, Cleide Bassani de. Validação de métodos analíticos. *Biológico*, São Paulo, v.64, n.2, p.175-177, jul./dez., 2002.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

MACEDO, Amanda F.; PILIACKAS, José M.. Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Fungos Pertencentes à Família *Polyporaceae*, 2005

NBR ISO/IEC 17025. Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Calibração e de Ensaios. 2001 ABNT. RJ. Brasil

OLIVEIRA, L. F. C.; HIARYC, M. L.; BERG, M. M.; ALMEIDA, M. V.; EDWARDS, H. G. M.. Raman Spectroscopic Characterization of Cinnabarin Produced by the Fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr.. *Vibrational Spectroscopy*, v. submet, p. 1-8, 2007.

PINTO, T.J.A.; KANETO, T.M.; OHARA, M.T. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

SMÂNIA JR, Arthur. Estudo da Atividade Microbiana do *Pycnoporus sanguineus* (L:FR.) MURR. Dissertação (Doutor em Ciências – Microbiologia), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1995<sup>a</sup>.

SMÂNIA Jr, A.; MONACHE, F.D.; SMÂNIA, E.F.A.; GIL, M.L.; BENCHETRIT, L.C.; CRUZ, F.S. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *J Ethnopharm.*, p.177-181, 1995<sup>b</sup>.

SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA Jr, A.; LOGUERCIO-LEITE, C.; GIL, M.L. Optimal parameters for cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus*. *J Chem Techn Biotechnol.*, 1997.

HWANG, H.J. et al. Morphological and rheological properties of the three different species of basidiomycetes *Phellinus* in submerged cultures. *Journal of Applied Microbiology*, v.96,p.1296-1305, 2004.

## **APÊNDICE B**

### **Artigo 2:**

#### **Comparative Study of Mycelial Growth and Production of Cinnabarin by Different Strains of *Pycnoporus sanguineus***

Baumer, Janaina D.; Mas Diego, Siannah Maria; Pacheco, Sabrina M. V.; Morgado, Ayres F.; Furigo, Agenor Jr.

Revista de Biologia e Farmácia – Biofar, 2008

## Comparative Study of Mycelial Growth and Production of Cinnabarin by Different Strains of *Pycnoporus sanguineus*.

Baumer, Janaina Duarte<sup>1</sup>; Mas Diego, Siannah Maria; Pacheco, Sabrina M. V.; Morgado, Ayres F. M. <sup>1</sup>; Furigo, Agenor F. Jr<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Engenharia Química – Universidade Federal de Santa Catarina. Campus Universitário, – CEP: 88040-900 – Florianópolis – SC – Brasil.

Email: [janabaumer@yahoo.com.br](mailto:janabaumer@yahoo.com.br).

Tel: (55-48) 3721-9715 – Fax: (55-48) 3721-9687

**ABSTRACT:** This work aimed to study the radial growth of three different strains of *Pycnoporus sanguineus* (MIP 20001, MIP 95001 and MIP 95002), and to qualitatively compare the production of cinnabarin. Growth data, obtained by the measure of mycelium of fungi every 24 hours, were adjusted to two different models: linear and exponential. The model that best represents the data obtained from growth was the exponential model. The strain MIP 95002 ( $\mu = 0,0164 \text{ h}^{-1}$ ) had the highest rate of growth, followed by strains MIP 95001 ( $\mu = 0,0147 \text{ h}^{-1}$ ) and MIP 20001 ( $\mu = 0,0145 \text{ h}^{-1}$ ), now the largest production of cinnabarin strain was obtained by the MIP 20001, followed by strains MIP 95001 and MIP 95002.

**KEYWORDS:** Radial growth, *Pycnoporus sanguineus*, cinnabarin.

**RESUMO:** O presente trabalho teve como objetivo estudar o crescimento radial de três diferentes cepas de *Pycnoporus sanguineus* (MIP 20001, MIP 95001 e MIP 95002), e comparar qualitativamente a produção de cinabarina pelas mesmas. Os dados de crescimento, obtidos pela medida do micélio dos fungos a cada 24 horas, foram ajustados a dois diferentes modelos: linear e o exponencial. O modelo que melhor representou os dados obtidos de crescimento foi o modelo exponencial. A cepa MIP 95002 ( $\mu = 0,0164 \text{ h}^{-1}$ ) apresentou a maior velocidade de crescimento, seguida pelas cepas MIP 95001 ( $\mu = 0,0147 \text{ h}^{-1}$ ) e MIP 20001 ( $\mu = 0,0145 \text{ h}^{-1}$ ), entretanto a maior produção de cinabarina foi obtida pela cepa MIP 20001, seguida pelas cepas MIP 95002 e MIP 95001.

**PALAVRAS-CHAVE:** Crescimento radial, *Pycnoporus sanguineus*, cinabarina.

## INTRODUCTION

The fungi belonging to the class of Basidiomycetes, used in popular medicine since ancient times, have great significance in the search for antiviral, antibacterial and antifungal substances from its secondary metabolites (Hwang et al., 2004).

*Pycnoporus sanguineus*, fungus belonging to the class of Basidiomycetes, is a popularly known white-rot fungi of wide occurrence in tropical and subtropical countries.

*Pycnoporus sanguineus* is being intensively studied because of the metabolites produced by it. In addition to produce several extracellular enzymes belonging to the category of oxyredutases and known to be the main responsible for the degradation process of lignocellulosic waste, the fungus produces an important secondary metabolite, the cinnabarin. Cinnabarin is an orange pigment that has in its basic structure phenoxazine-3-one, with a carbonyl group at C-1, an amine group at C-2 and a hydroxyl group at C-9 (Achenbach and Blümm 1991).

Studies by Smânia (1995, 1997) illustrated that the cinnabarin produced by *P. sanguineus* has activity against *B. cereus*, *E. fecalis*, *E. faecium*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *L. mesenteroides*, *L. plantarum*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* sp., *S. typhi*, *S. aureus* and several *Streptococcus* spp., mainly gram-positive bacteria.

On a biotechnological process, modeling is the first step in order to describe the process. The growth cells can be viewed from various perspectives and with varying degrees of complexity (Blanch and Clark, 1997). Modeling of fungal growth has been done using linear (Soccol, 1994), exponential (Panagou et al., 2007), and complex models (Hamidi-Esfahani et al. 2007), being the two first the simpler and easier to adjust.

In this context, the objective of this work was to analyze radial growth of three different strains of *Pycnoporus sanguineus* and to compare qualitatively the cinnabarin production.

## METHODOLOGY

### Microorganisms

The microorganisms used in this study were: *Pycnoporus sanguineus* MIP 20001 (isolated from Florianópolis – Santa Catarina, Brazil), MIP 95001 (Florianópolis - SC) and MIP 95002 (Imbituba -

SC). The strains of fungi were donated by the Antibiotics Laboratory of Microbiology at Parasitology Department of the Federal University of Santa Catarina, Brazil.

### **Analysis of radial growth**

To carry out experiments used the methodology adapted from Donini et al. 2006. The strains kept in tubes containing potato dextrose (PDA) agar slant culture tubes in refrigerator were inoculated in Petri dishes with PDA for 20 days, after this period was withdrawn a circle of approximately 14 mm diameter of the mycelium of fungi, which were inoculated in the center of a Petri dishes with PDA. In Petri dishes were designed three cross lines, to help the measurements of mycelium of fungi. Plates were incubated at 25 ° C in the presence of light, and the tests were developed in triplicate.

The radial growth was measured daily (every 24 hours), with a milimetric paquimeter (Starfer, China). The measure was held starting from the center of the disk to the periphery of the colony, being held three measures for each plate concerning the lines 1, 2 and 3, until one of the strains reached the edge of the Petri dish.

Time (hour) and average of every day radial growth measures (mm), were processed using Microsoft Excel (v. 5.0). Two models were adjusted: linear and Monod's type exponential regression in order to compare which one best described the experimental data. Radial growth rate ( $V_{cr}$ ) was taken as a main parameter for the linear model (Soccol, 1994) and the specific growth rate ( $\mu$ ) for the exponential model (Reeslev and Kjoller, 1995). An analysis of variance (ANOVA) for a significance level of 0.05 was performed in order to assess whether there was a significant difference between the specific growth rates of the different strains.

### **Comparison of cinnabarin production by different strains of *P. sanguineus***

The production of cinnabarin was compared among different strains through visual analysis of the coloration of the fungus mycelium, since the cinnabarin presents chromophores in its structure that gives it the orange color (Smânia, 1997). It was examined in the twentieth (T20) days after inoculation, a period in which, according Smânia (1995) is the largest production of cinnabarin occurs.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Analysis of Radial Growth

In Table 1 shows the mean of the radius readings (mm), with their standard deviations for each strain along culturing time.

Table 1: Medium measures of strains' halos during the first five days

|           | Radius (mm) * |              |              |
|-----------|---------------|--------------|--------------|
|           | MIP 95001     | MIP 20001    | MIP 95002    |
| <b>T0</b> | 6,89 ± 0,60   | 6,78 ± 0,44  | 6,67 ± 0,50  |
| <b>T1</b> | 7,78 ± 0,83   | 7,00 ± 0,70  | 7,44 ± 0,53  |
| <b>T2</b> | 13,22 ± 0,97  | 13,88 ± 0,78 | 14,89 ± 0,60 |
| <b>T3</b> | 21,56 ± 1,24  | 18,44 ± 1,01 | 20,0 ± 0,50  |
| <b>T4</b> | 26,89 ± 1,05  | 25,22 ± 1,30 | 32,22 ± 0,67 |
| <b>T5</b> | 35,22 ± 1,30  | 33,89 ± 0,78 | 40,78 ± 0,83 |

- Each result is the mean for the three replicate plates (three measurements each) ± the standard error.

Figure 3 shows the values of the radial growth of the three strains cultured.

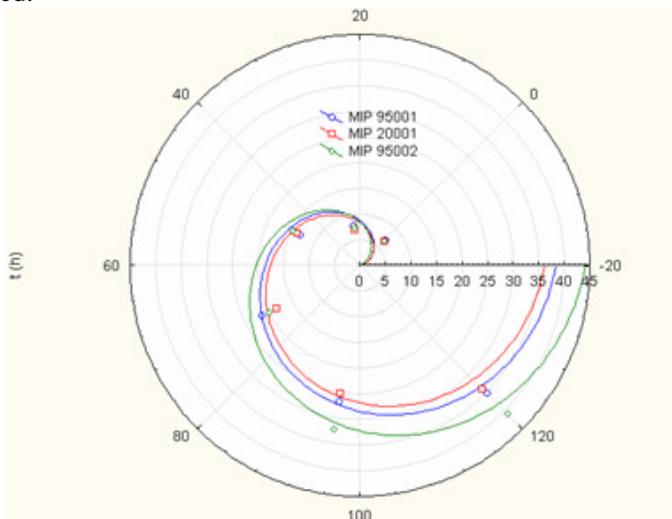


Figure 3: Radial growth curve of strains: MIP 95001, MIP 20001 and MIP 95002.

By linear regression was obtained the radial growth rate ( $V_{cr}$ ) as the slope of the model. For the exponential model it was adjusted a functional relationship of the type  $r = r_0 e^{\mu t}$ , where  $r$  is the radius in mm,  $t$  is the time in hours and  $\mu$  is the specific growth rate.

The table 2 presents the regression equations, with their coefficients of correlation.

Table 2: Parameters for the linear and exponential regression equations and the correlation coefficient (R) for the strains MIP 95001, MIP 95002 and MIP 20001.

| Strains   | Linear model |                | Exponential model    |                |
|-----------|--------------|----------------|----------------------|----------------|
|           | Vcr (mm/h)   | R <sup>2</sup> | □ (h <sup>-1</sup> ) | R <sup>2</sup> |
| MIP 95001 | 0,2468       | 0,9642         | 0,0147               | 0,9739         |
| MIP 95002 | 0,2976       | 0,9478         | 0,0164               | 0,9748         |
| MIP 20001 | 0,2319       | 0,9552         | 0,0145               | 0,9656         |

The analysis of radial growth of the mycelium of fungi lasted 5 days, a time to the strains reach the edges of the Petri dish.

Growth data for *P. sanguineus* are better represented by exponential model, since the correlation coefficients were higher for this model, which is consistent with what was proposed by Pacífico et al. (2005) for the growing of fungi. It is possible to obtain the linear growths values by multiplying the specific growth rate by the diameter of the colony (Reeslev and Kjoller, 1995).

The strain MIP 95002 ( $\mu = 0,0164 \text{ h}^{-1}$ ) had the highest growth rate, followed by strains MIP 95001 ( $\mu = 0,0147 \text{ h}^{-1}$ ) and MIP 20001 ( $\mu = 0,0145 \text{ h}^{-1}$ ), which showed growth rate statistically similar for a significance level of 0.05, and both presented statistically significative differences with MIP 95002.

### Comparison of Production of Cinnabarin by Different isolates of *P. sanguineus*

The figure 5 shows a photograph of the strains on the twentieth day after inoculation (T20).

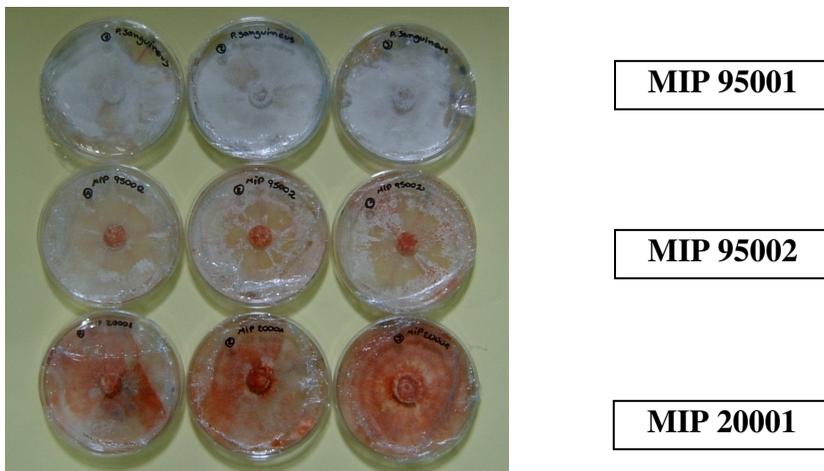


Figure 5: Strains MIP 95001, MIP 95002 and MIP 20001 after 20 days.

The mycelium resulting from the strain MIP 20001 presented at the twentieth day of growth a much more intense orange color than the other strains. Due to cinnabarin being an orange pigment and being the major substance produced by *P. sanguineus*, its production can be judged by the color of fungal mycelium.

Through visual analysis it can be noted that the strain MIP 20001 presented a much higher cinnabarin production than the strains MIP 95002 and 95001. This result supports the work of Rosa et al. (2003) which used six isolates of *P. sanguineus* and the inhibition observed in the growth of *S. aureus* by only one of the strains isolated, indicating that the production of cinnabarin varies depending on the characteristics of each lineage.

It was possible to see that the strain which received the largest production of cinnabarin does not have the largest growth, which coincides with the results obtained by Smânia (1995) and Ramos et al. (2006). According to Smânia (1995), the best conditions for "in vitro" growth are not directly related to the production of cinnabarin and according to Ramos et al. (2006) the best growth is not always related to increased production of secondary metabolite.

## CONCLUSION

The study of the growth of three different strains of *P. sanguineus* showed that the growth of this fungus is better represented by the exponential than linear model.

The MIP 95002 strain that had higher growth rate followed by strains MIP 95001 and MIP 20001, which had statistically similar growth rates among them, for a significance level of 0.05.

Among the strains examined, the MIP 20001 showed the higher production of the antibiotic cinnabarin with the conditions of cultivation used.

The production of secondary metabolite cinnabarin is not directly related to the fungal growth.

## REFERENCES

- Achenbach, H.; Blümm, E. Investigation of the pigments of *Pycnoporus sanguineus* - picnosanguin and new phenoxazin-3-ones. Arch. Pharm., 1991. 324: 3-6.
- Blanch, H. W.; Clark, D. S. Biochemical Engineering. Marcel Dekkee, New York 702, 1997.
- Donini, L. P.; Bernardi, E.; Minotto, E.; Nascimento, J. S. Efeito da Suplementação com Farelos no Crescimento *in vitro* de *Pleurotus ostreatus* em Meios à Base de Capim-elefante (*Pennisetum* spp.). Arq. Inst. Biol 73: 303-309, 1997.
- Hamidi-Esfahani, Z.; Hejazi, P.; Shojaosadati, S. A.; Hoogschagen, M.; Vasheghani-Farahani, E.; Rinzema, A. A two-phase kinetic model for fungal growth in solid-state cultivation. Biochemical Engineering Journal 36:100–107, 1997.
- Hwang, H. J.; et al. Morphological and rheological properties of the three different species of basidiomycetes *Phellinus* in submerged cultures. Appl Microbiol Biotechnol 96: 1296-1305, 2004.
- Pacifico, D. G. P.; Ferreira, E. C.; Kilikian, B. V. Influência da velocidade específica de crescimento de *Monascus purpureus* ATCC

36928 na produção de pigmentos vermelhos. Anais do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos – SINAFERM 2005 15:1-7, 2005.

Panagou, E. Z.; Kodogiannis, V.; Nychas, GJ-E. Modelling fungal growth using radial basis function neural networks: The case of the ascomycetous fungus *Monascus ruber* van Tieghem. International Journal of Food Microbiology 117: 276-286, 2007.

Rosa, L. H.; et al. Screening of Brazilian Basidiomycetes for Antimicrobial Activity. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98:967-974. 2003.

Ramos, R. C.; et al. Cinética de Crescimento de *Pycnoporus sanguineus* em Sistema Submerso Para Produção de Compostos Antibacterianos. XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2006.

Reeslev, M.; Kjoller, A. Comparison of Biomass Dry Weights and Radial Growth Rates of Fungal Colonies on Media Solidified with Different Gelling Compounds. Applied and Environmental Microbiology 61:4236-4239, 1995.

Smânia, A. Jr.; Smânia, E. F. A.; Monache, F. D.; Cruz, F. S.; Benchetrit, L. C. Growth And Production Phases Of *Pycnoporus Sanguineus*. Rev. Microbiol 26: 302-306, 1995.

Smânia, E. F. A.; Smânia, A. Jr.; Loguercio-Leite, C.; Gil, M. L. Optimal parameters for cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus*. J Chem Techn Biotechnol 70: 57-59, 1997.

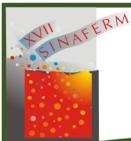
Soccol, C. R. Contribuição ao estudo da fermentação no estado sólido em relação com a produção de ácido fumárico. Biotransformação de resíduo sólido de mandioca por *Rhizopus* e Basidiomacromicetos do gênero *Pleurotus*. Tese de Livre-Docência. UFPR, 1994. 228p.

## **APÊNDICE C**

### **Artigo 3\*: Produção de Cinabarina por *Pycnopus sanguineus* Utilizando Diferentes Fontes de Carbono e Nitrogênio**

Baumer, Janaina D.; Pacheco, Sabrina M. V.; Bazzo, Giovana C.;  
Morgado, Ayres F.; Furigo, Agenor Jr.; Mas Diego, Siannah Maria.

XVII Sinaferm – Simpósio Nacional de Bioprocessos, Natal, ago. 2009.



XVII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS

Natal / RN

02 a 05 de agosto

2009

## **Produção de Cinabarina por *Pycnoporus sanguineus* Utilizando Diferentes Fontes de Carbono e Nitrogênio**

**Baumer, Janaina D.<sup>1\*</sup>; Pacheco, Sabrina M. V.<sup>2</sup>; Bazzo, Giovana C.<sup>3</sup>; Morgado, Ayres F.<sup>1</sup>; Furigo Jr., Agenor<sup>1</sup>; Mas Diego, Siannah Maria<sup>4</sup>.**

<sup>1</sup>Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos – Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Universitário– CEP: 88040-900 – Florianópolis – SC – Brasil – Email:

[janabaumer@yahoo.com.br](mailto:janabaumer@yahoo.com.br).

\*Bolsista do CNPQ-Brasil.

<sup>2</sup>Instituto Federal de Santa Catarina – Campus Araranguá - Av. XV de Novembro, s/n. Cidade Alta – CEP: 88900-000 – Araranguá – SC – Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Farmácia – Universidade da Região de Joinville Campus Universitário s/n. - CEP 89.201-972 – Bom Retiro – Joinville – SC – Brasil.

<sup>4</sup>Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA) – Universidad de Oriente. A.P. 4078. CP. 90400 – Cuba.

### **RESUMO**

*O presente trabalho teve como objetivo estudar a influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção do antibiótico cinabarina por *Pycnoporus sanguineus* e também da produção de biomassa. Foram formulados 13 meios de cultivos, 9 deles obtidos da combinação das fontes de carbono: glicose, maltose e glicerol com as fontes de nitrogênio: peptona, extrato de levedura e uréia, sendo formulados também 4 meios a partir de caldo de batata dextrosado, sendo um apenas com o caldo de batata dextrosado e os outros 3 adicionando-se as fontes de nitrogênio. O meio de cultivo que propiciou a maior produção de biomassa de *Pycnoporus sanguineus* foi o meio*

*glicose e extrato de levedura, e o meio em que houve a maior produção de cinabarina foi o meio formulado somente com caldo de batata dextrosado.*

**Palavras-chave:** *Pycnoporus sanguineus*, Cinabarina, Biomassa.

## INTRODUÇÃO

O *Pycnoporus sanguineus* é um fungo pertencente à classe dos *Basidiomicetos*, popularmente conhecido como “orelha-de-pau”, e tem ampla ocorrência em países tropicais e subtropicais (GAMEIRO *et al.*, 2003; SMÂNIA JR. *et al.*, 1995).

O *P. sanguineus* sintetiza não menos que sete pigmentos sendo que o antibiótico cinabarina é um deles (ACHENBACH e BLÜMM, 1991). As condições para produção máxima de cinabarina, segundo estudos de SMÂNIA *et al.* (1997), são a temperatura de 25°C e a presença de luz, sendo que a síntese desta substância ocorre principalmente entre o décimo oitavo e o vigésimo terceiro dia de incubação (SMÂNIA JR. *et al.*, 1995).

Um fator muito importante e que deve ser levado em consideração para o desenvolvimento fúngico e para produção de metabólitos secundários são as exigências nutricionais das diferentes espécies e linhagens, sendo que cada espécie apresenta melhor desempenho em materiais com relação C/N específica (BERNARDI *et al.*, 2007). Dessa forma, este trabalho objetivou estudar a influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção de biomassa e do antibiótico cinabarina por *P. sanguineus*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Preparo dos meios de cultivo e inoculação

No presente trabalho foi utilizada a cepa MIP 20001 (Imbituba – SC) de *Pycnoporus sanguineus*, doadas pelo Laboratório de Antibióticos do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (MIP) da Universidade Federal de Santa Catarina. O isolado foi mantido em tubos contendo ágar de batata dextrose (BDA) inclinado em geladeira (4°C ± 0,1) os quais foram subcultivados a cada três meses.

As cepas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio BDA durante 20 dias. Após este período, foram retirados 2 discos de 14 mm de diâmetro do micélio dos fungos, os quais foram inoculados em

garrafas de Roux contendo 100 mL do caldo de cultivo, sendo incubadas por 20 dias, a 25° C e na presença de luz.

Os experimentos foram divididos em 5 grupos. O primeiro grupo foi formulado utilizando glicose (20 g/L) como fonte de carbono e peptona, extrato de levedura ou uréia como fonte de nitrogênio. Nos grupos 2 e 3 foram utilizados maltose (20 g/L) e glicerol (20 g/L), respectivamente, como fonte de carbono e peptona, extrato de levedura ou uréia como fonte de nitrogênio. O grupo 4 foi formulado somente a partir de caldo de batata dextrosado. O último grupo, 5, foi formulado utilizando caldo de batata dextrosado e peptona, extrato de levedura ou uréia como fonte de nitrogênio. Todas as fontes de nitrogênio em todos os experimentos foram adicionadas na concentração de 10 g/L.

Além dos componentes do meio de cultura avaliados, uma mistura de sais ( $K_2HPO_4$  – 0,2%,  $MgSO_4$  – 0,05%,  $KCl$  – 0,05% e  $FeSO_4$  – 0,001% - p/v) foi acrescentada em todos os experimentos, conforme utilizado por OBARA-DOI *et al.* (2003).

O pH dos meios foi medido logo após seu preparo e ao vigésimo dia de cultivo, momento em que também foi quantificada a produção de cinabarina e a biomassa de cada cultivo.

### **Extração da Cinabarina**

A massa micelial foi separada do meio de cultivo por filtração e na seqüência, adicionada em extrator Soxhlet para a realização do processo de extração com 100 mL de acetato de etila por 1,5 horas. O solvente presente no extrato foi evaporado em evaporador rotativo.

### **Quantificação da Cinabarina**

Para a quantificação da cinabarina foi utilizada a difusão em ágar pelo método de poço adaptado de COSTA *et al.* (2008). Para isso, volumes de 20 mL de ágar Mueller-Hinton foram vertidos em placas de Petri (13 x 100 mm). Após solidificação foram feitos 3 orifícios de 7 mm de diâmetro no ágar. O inóculo contendo a bactéria-teste (*S. aureus* ATCC 6538.- preparado na concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) foi semeado uniformemente na superfície do meio com o auxílio de um Swab estéril através de estrias transversais. O resíduo do extrato a ser testado foi ressuspensão e diluído em dimetilsulfóxido e os orifícios preenchidos com 50 µL da diluição. Os sistemas, após terem sido montados, foram incubados por 18 horas a  $35^\circ C \pm 0,1$ , e então foram realizadas as leituras dos halos de inibição.

### Curva de Calibração

Foram avaliadas 5 quantidades distintas de cinabarina (0,250; 0,500; 1,000, 1,500 e 2,000 mg) com o objetivo de traçar uma curva de calibração que demonstre a relação entre o diâmetro dos halos de inibição e a potência do antimicrobiano. As quantidades de cinabarina usadas e os diâmetros dos respectivos halos de inibição foram distribuídos em uma planilha do Microsoft Excel 5.0. Através da regressão linear foi possível obter a relação funcional do tipo  $y = ax + b$ , onde  $y$  corresponde ao diâmetro do halo de inibição (mm) e o  $x$  ao log quantidade de cinabarina usada (mg). Com a aplicação da fórmula foi possível estimar as concentrações de cinabarina presentes nos extratos em acetato de etila obtidos das amostras miceliarias.

### Produção de Biomassa

A medida da biomassa fúngica foi realizada através da filtração do conteúdo das garrafas de Roux e posterior secagem em estufa até massa constante (GIESE *et al.*, 2004).

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Através da construção da curva de calibração, mostrada na Figura 1, foi possível obter a equação da reta e o coeficiente de correlação.

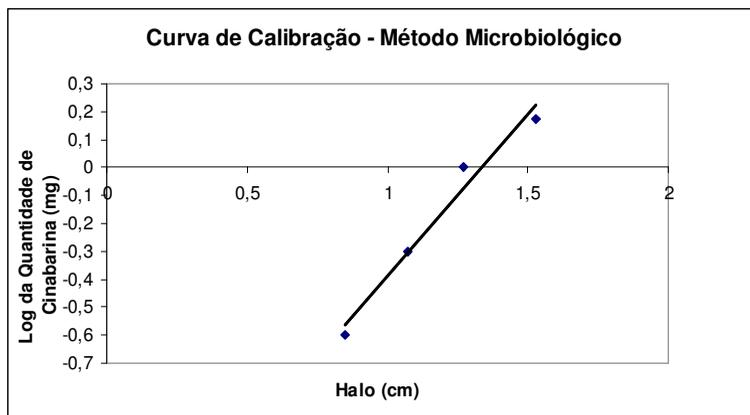


Figura 1: Curva de calibração da cinabarina.

O método mostrou-se linear no intervalo analisado (de 0,25 a 2,0 mg) apresentando coeficiente de correlação linear igual a 0,9724 e equação

da reta igual a  $y = 1,163x - 1,5533$ . Os resultados obtidos demonstraram haver correlação linear entre o logaritmo da quantidade de cinabarina e o halo de inibição formado.

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados da quantificação da cinabarina nos diferentes meios de cultivo, realizada em triplicata.

Tabela 1: Produção de cinabarina, pH inicial, pH final e biomassa nos diferentes meios de cultura utilizados.

|  | <b>Concentração de Cinabarina (mg/L)</b> | <b>pH Inicial</b> | <b>pH Final</b> | <b>Biomassa (g/L)</b> |
|--|--|-------------------|-----------------|-----------------------|
| <b>Glicose e Petona</b>                              | 146 ± 17                                 | 7,048             | 6,232           | 14,1 ± 0,8            |
| <b>Glicose e Extrato Levedura</b>                    | 243 ± 40                                 | 7,161             | 5,231           | 25,2 ± 1,8            |
| <b>Maltose e Peptona</b>                             | 281 ± 32                                 | 6,645             | 4,684           | 6,3 ± 0,4             |
| <b>Maltose e Extrato Levedura</b>                    | 299 ± 18                                 | 6,750             | 5,032           | 5,7 ± 0,7             |
| <b>Glicerol e Peptona</b>                            | 132 ± 14                                 | 7,349             | 4,651           | 13,5 ± 0,9            |
| <b>Glicerol e Extrato Levedura</b>                   | 138 ± 28                                 | 6,995             | 4,311           | 17,2 ± 1,2            |
| <b>Caldo de Batata Dextrosado</b>                    | 457 ± 43                                 | 5,606             | 3,986           | 20,9 ± 1,6            |
| <b>Caldo de Batata Dextrosado e Peptona</b>          | 373 ± 37                                 | 6,674             | 3,879           | 10,5 ± 1,1            |
| <b>Caldo de Batata Dextrosado e Extrato Levedura</b> | 281 ± 47                                 | 5,527             | 4,318           | 9,6 ± 1,33            |
| <b>Glicose e Uréia</b>                               | 0  | 9,041             | -               | *                     |
| <b>Glicerol e Uréia</b>                              | 0  | 9,149             | -               | *                     |
| <b>Maltose e Uréia</b>                               | 0  | 8,342             | -               | *                     |
| <b>Caldo de Batata Dextrosado e Uréia</b>            | 0  | 8,429             | -               | *                     |

\* Não houve crescimento do fungo.

O meio de cultivo que apresentou o maior crescimento de biomassa fúngica foi o meio glicose e extrato de levedura, seguido pelo meio formulado somente com caldo de batata dextrosado e então o meio glicerol e extrato de levedura. Apesar do bom crescimento do *P.*

*sanguineus* em caldo de batata dextrosado o enriquecimento deste meio com peptona e extrato de levedura inibiu o crescimento do fungo.

Os meios em que o *P. sanguineus* obteve o menor crescimento foram os que utilizaram maltose como fonte de carbono, seguido pelos meios em que foram utilizados o caldo de batata combinados com peptona e extrato de levedura. A maltose como única fonte de carbono mostrou-se inadequada para o crescimento do fungo.

O pH inicial dos meios não apresentou correlação definida com o crescimento do fungo *P. sanguineus*. O fungo cresceu bem em caldo de batata dextrosado em pH 5,6 e também em glicose e extrato de levedura com pH 7,1.

O nitrogênio, constituinte de proteínas e ácidos nucleicos é obtido por várias espécies de fungos a partir de uma grande variedade de compostos nitrogenados. Embora a amônia e glutamina sejam utilizadas preferencialmente, esses microrganismos também utilizam nitrato, nitrito, purinas, proteínas, aminoácidos, uréia e acetamida como fontes de nitrogênio. Para captação e metabolização destas fontes alternativas, é requerida a síntese de enzimas específicas ou ativação de enzimas pré-existentes (BONATELLI, 1977).

Nos meios em que foi utilizada uréia como fonte de nitrogênio não houve crescimento e nem a produção de cinabarina. Estes meios de cultivo apresentaram pHs iniciais mais altos do que os demais meios, acima de 8,3. De acordo com CARLILE e WATKINSON (1996) a concentração do íon hidrogênio num meio pode afetar o crescimento indiretamente pelo seu efeito na disponibilidade de nutriente e diretamente pela sua ação nas superfícies celulares. Entretanto, de acordo com SMÂNIA *et al.* (1997), o *P. sanguineus* apresenta sua máxima produção de cinabarina em caldo de batata dextrosado à pH 9,0 o que sugere que o pH básico não seja o fator limitante do crescimento, e sim a ausência ou inativação da enzima urease, responsável pela hidrólise da uréia.

O maior rendimento em termos de quantidade de cinabarina produzida foi obtido utilizando o meio de cultivo formulado somente a partir de caldo de batata, com uma produção de  $457 \pm 43$  mg/L de cinabarina. A adição de peptona e extrato de levedura ao caldo de batata reduziu significativamente a produção de cinabarina pelo *P. sanguineus*. Este resultado corrobora aos estudos feitos por TAKAHASHI e LUCAS (2008) que observando as condições utilizadas para a produção de antibióticos por fungos, afirmam que meios de cultura de constituição

complexa são mais adequados que meios de cultura de constituição quimicamente definida. Meios de fácil obtenção, como o caldo de batata dextrosado, têm apresentado resultados encorajadores.

O segundo meio em que houve a maior produção de cinabarina foi o caldo de batata e peptona, com  $373 \pm 37\text{g/L}$  de cinabarina produzida. Os meios caldo de batata dextrosado e caldo de batata dextrosado e peptona apresentaram resultados, quanto a quantidade de cinabarina produzida, estatisticamente diferentes entre si e diferentes dos demais meios.

O glicerol, fonte de carbono bastante estudada atualmente devido este ser subproduto da produção de biodiesel, teve resultados medianos na produção de biomassa fúngica e baixos na produção de cinabarina quando comparados aos outros meios estudados. De acordo com COLEN (1996) o glicerol tem sido relatado como uma ótima fonte de carbono para muitos fungos, entretanto a sua utilização neste trabalho, independente da fonte de nitrogênio utilizada, resultou nas menores médias de produção do metabólito secundário estudado.

A produção de biomassa fúngica e de cinabarina não apresentaram correlação direta, resultado que coincide com os resultados obtidos por SMÂNIA JR. *et al.* (1995). Segundo este autor, as melhores condições de crescimento não estão diretamente relacionadas com a produção de cinabarina.

## CONCLUSÕES

O meio de cultivo que propiciou a maior produção de biomassa do *Pycnoporus sanguineus* foi o meio contendo glicose e extrato de levedura, sendo que o meio em que houve a maior produção de cinabarina foi o meio de caldo de batata dextrosado, não apresentando, portanto, nenhuma relação entre a produção de biomassa e a produção de cinabarina.

Os meios em que houve a menor produção de biomassa foram os que utilizaram maltose como fonte de carbono, e os meios que produziram a menor quantidade de cinabarina foram os que utilizaram como fonte de carbono o glicerol. A utilização de uréia nos meios de cultivo não promoveu o crescimento do *Pycnoporus sanguineus*.

## REFERÊNCIAS

- Achenbach, H.; Blümm, E. (1991), Investigation of the pigments of *Pycnoporus sanguineus* - picnosanguin and new phenoxazin-3-ones. *Arch. Pharm.: Weinheim*, 324.
- Bernardi, E. *et al.* (2007), Utilização de diferentes substratos para a produção de inóculo de *Pleurotus ostreatus*. *Ver. Ciênc. Agron.*, v.38, n.1, p.84-89.
- Bonatelli, R. J. (1977), Estabilidade e produção de ácido cítrico em *Aspergillus Niger*. *Dissertação de mestrado*, IB/UNICAMP, Campinas-SP, Brasil.
- Carlile, M. J.; Watkinson, S. C. (1996), *The Fungi*. London: Academic Press, 482 p.
- Colen, G. (1996), Isolamento e Seleção de Fungos Filamentosos Produtores de Lípases. *Tese de doutorado*, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.
- Costa, E. M. M. B.; Esmeraldo, M. R. A.; Carvalho, M. G. F.; Daniel, R. L. A. P.; Pastro, M. F.; Silva, F. L. (2008), Avaliação da Ação Antimicrobiana da Própolis e de Substâncias Utilizadas em Endodontia sobre o *Enterococcus faecalis*. *Pesq. Brás. Odontoped. Clin. Integr.*, João Pessoa, v. 8, n. 1, p. 21-25.
- Gameiro, P. H.; Bernardi, E.; Armas, R. D.; Nascimento, J. S. (2003), Levantamento de Fungos Macroscópicos na Região de Pelotas – RS. *Anais do XII Congresso de Iniciação Científica*. Pelotas: UFPel.
- Giese, E. C.; Covizzi, L. G.; Dekker, R. F.; Barbosa, A. M. (2004), Influência de Tween na Produção de Lacases Constitutivas e Indutivas pelo *Botryosphaeria. sp.* *Acta Scientiarum Biological Sciences*, v. 26, n.4, p. 463-470.
- Obara-Doi, S. M.; Dekker, R. F. H.; Castro-Gómez, R. J. H. (2003), Otimização da Produção de Dextranase de *Fusarium SP.* Utilizando Metodologia de Superfície de Resposta. *Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações*, Florianópolis.

Smânia Jr, A.; Smânia, E. F. A.; Monache, F. D.; Cruz, F. S. ; Benchetrit, L. C. (1995), Growth And Production Phases Of *Pycnoporus Sanguineus*. *Rev. Microbiol.*, v. 26.

Smânia, E. F. A.; Smânia JR, A.; Loguercio-Leite, C.; Gil, M. L. (1997), Optimal parameters for cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus*. *J Chem Techn Biotechnol*. v. 70.

Takahashi, J. A.; Lucas, E. M. F. (2008), Ocorrência e Diversidade Estrutural de Metabólitos Fúngicos com Atividade Antibiótica. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p. 1807-1813.

## **APÊNDICE D**

### **Fotos**



Cultivo de *P. sanguineus* em CBD e em resíduos lignocelulósicos



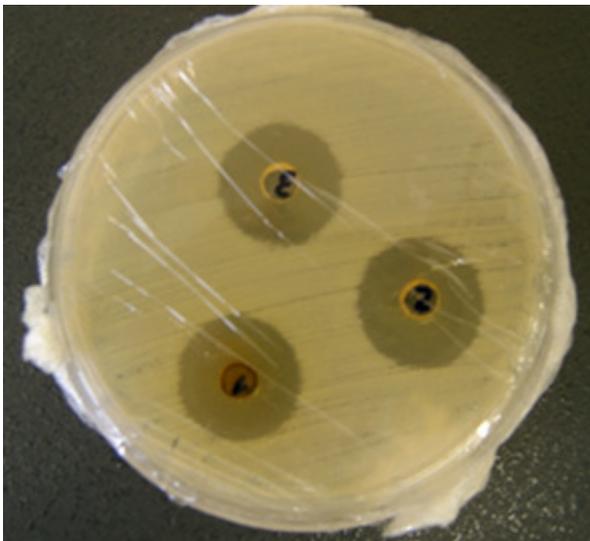
Extração da cinabarina em extrator do tipo soxhlet.



Concentração do extrato em evaporador rotatório.



Resíduo do extrato de *P. sanguineus*.



Teste de difusão em ágar pela técnica de poço.



Cultivo em garrafas de Roux com CDB em pH inicial 5,6 no tempo de 18 dias.



Cultivo de *P. sanguineus* utilizando como substrato serragem de pinus enriquecida com farelo de arroz com 7 dias de cultivo.



Cultivo de *P. sanguineus* utilizando como substrato serragem de pinus enriquecida com farelo de arroz com 15 dias de cultivo.



Cultivo de *P. sanguineus* utilizando como substrato serragem de pinus enriquecida com farelo de arroz com 30 dias de cultivo.



Cultivo de *P. sanguineus* utilizando como substrato serragem de pinus enriquecida com farelo de arroz com 45 dias de cultivo.



Cultivo de *P. sanguineus* utilizando como substrato serragem de pinus enriquecida com farelo de arroz com 60 dias de cultivo.



Amostra de serragem de pinus utilizada nos experimentos.