

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

**INFLUÊNCIA DO pH E CONCENTRAÇÃO INICIAL DE
GLICOSE NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DO FUNGO
Ganoderma australe (Fr.) Pat.**

ESTELA DE OLIVEIRA NUNES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Projeto FUNCITEC, do Centro Tecnológico, da Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do Grau de **Mestre em Engenharia Química**.

FLORIANÓPOLIS

SANTA CATARINA

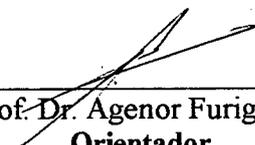
Junho/2001

Influência do pH e Concentração Inicial de Glicose na Produção de Biomassa do Fungo *Ganoderma australe* (Fr.) Pat

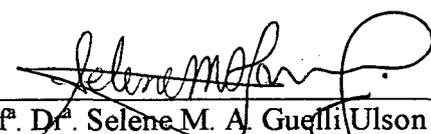
Por

Estela de Oliveira Nunes

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área de concentração **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos** e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.



Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.
Orientador

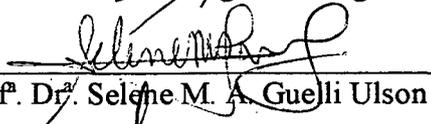


Prof. Dr. Selene M. A. Guelli Ulson de Souza
Coordenadora do CPGENQ

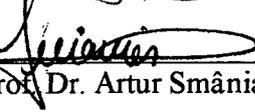
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.



Prof. Dr. Selene M. A. Guelli Ulson de Souza



Prof. Dr. Artur Smânia Jr.

Florianópolis, 28 de Junho de 2001

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

Hawksworth (1991)

AGRADECIMENTOS

A Deus que me deu saúde e está sempre junto comigo, me abençoando e encorajando, em todos os momentos.

Ao meu esposo Domingos que sempre esteve ao meu lado, mesmo nos momentos de maiores dificuldades, meu sincero agradecimento pelos gestos de apoio, compreensão e carinho.

Ao Professor Agenor Furigo Júnior pela confiança, amizade, apoio e orientação durante a realização dessa dissertação.

Ao Professor Arthur Smânia, do Laboratório de Antibióticos da Universidade Federal de Santa Catarina, pela transmissão de conhecimento, incentivo e pela doação da cepa do fungo que possibilitou esse estudo.

Ao meu primo Júlio pelas incansáveis noites de companherismo na elaboração dessa dissertação e pelo incentivo nos momentos de desânimo.

Aos colegas da ENGEBIO, pela amizade e auxílio, especialmente ao amigo Rogério, com quem pude contar diversas vezes durante o desenvolvimento desse trabalho.

A EPAGRI Regional de Videira que gentilmente cedeu seu Laboratório para realização da etapa experimental, através do gerente Edgar Peruzzo e Marco Dal Bó, Chefe da Estação, de quem recebi apoio e colaboração nas situações adversas.

A CASAN Regional de Videira, a equipe do Laboratório, pela compreensão e pelas horas que me foram disponibilizadas para execução deste trabalho.

Às instituições que contribuíram para o desenvolvimento desta dissertação: Universidade do Oeste de Santa Catarina, Coordenadoria de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina, FUNCITEC e a CAPES.

A todos que direta ou indiretamente participaram de mais esta conquista em minha vida, fica meu sincero reconhecimento.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	02
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	05
2.1. Fungo.....	05
2.1.1. Enquadramento taxonômico.....	05
2.1.2. Basidioma.....	05
2.1.3. Morfofisiologia.....	07
2.1.4. Distribuição e Habitat.....	08
2.1.5. Similaridade genotípica.....	09
2.1.6. Sinonímia.....	09
2.1.7. Composição Química.....	09
2.1.8. Importância Biotecnológica.....	10
2.2. Metabolismo Fúngico.....	12
2.2.1. Metabolismo de carbono e energia.....	13
2.2.2. Repressão Catabólica.....	14
2.3. Cinética de Crescimento.....	14
2.4. Cultivo.....	15
2.4.1. Meios de cultivo.....	15
2.4.2. Condições de cultivo.....	16
2.5. Planejamento Experimental.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1. Organismo.....	19
3.1.1. Identificação das culturas dicarióticas	19
3.2. Meios de Cultura.....	20
3.2.1. Meio de manutenção e desenvolvimento do fungo.....	20
3.2.2. Obtenção de biomassa.....	20
3.3. Padronização do Cultivo em Meio Líquido.....	21
3.4. Determinação da Concentração de Glicose.....	21

3.4.1. Princípio do método.....	22
3.4.2. Técnica.....	22
3.4.3. Seqüência experimental.....	23
3.5. Planejamento Experimental.....	23
3.6. Cinética de Crescimento.....	29
3.6.1 Velocidade de crescimento.....	29
3.6.2. Velocidade específica de crescimento.....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1. Organismo.....	32
4.1.1. Características macroscópicas.....	32
4.1.1.1.Cultura em meio sólido.....	32
4.1.1.2.Cultura em meio líquido.....	34
4.1.2. Características microscópicas.....	34
4.2. Planejamento Experimental.....	37
4.3. Otimização das condições de cultivo <i>in vitro</i>	41
4.3.1. Avaliação do modelo estatístico.....	41
4.3.2. Avaliação dos experimentos.....	42
4.4. Ensaio cinéticos.....	45
4.1.1.2 Cultura em meio líquido.....	32
4.1.2. Características microscópicas.....	32
4.2. Planejamento Experimental.....	35
4.3. Otimização das Condições de Cultivo <i>in vitro</i>	39
4.3.1. Avaliação modelo estatístico.....	39
4.3.2. Avaliação do experimento.....	40
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1** - Superfície posterior do basidioma de *Ganoderma australe*.....pág. 06
- Figura 2.2** - Superfície anterior do basidioma de *Ganoderma australe*.....pág. 06
- Figura 3.1** – Reações bioquímicas envolvidas no processo oxidativo da determinação da glicose.....pág. 22
- Figura 4.1** - Cultura de *Ganoderma australe* após o período de cinco dias de incubação a 25°C.....pág. 33
- Figura 4.2** – Cultura do *Ganoderma australe* após o período de doze dias de incubação a 25°C.....pág 33
- Figura 4.3a** – Hifa generativa com fibula em formação na cultura de *Ganoderma australe* (microscópio ótico 1000x).....pág. 35
- Figura 4.3b** - Hifa generativa com fibula formada na cultura de *Ganoderma australe* (microscópio ótico 1000x).....pág. 35
- Figura 4.3c** – Sobreposição de hifas na cultura de *Ganoderma australe* (microscópio ótico 1000x).....pág. 36
- Figura 4.4** – Comparação entre valores preditos e valores observados para o modelo da produção de biomassa.....pág. 40
- Figura 4.5** – Superfície de resposta da produção de biomassa em função do pH e concentração inicial de glicose.....pág. 41
- Figura 4.6** – Curvas de nível da produção máxima de biomassa (massa seca em g).....pág. 42

Figura 4.7 – Cinética de crescimento do *Ganoderma australe*, no período de pré-cultivo em estufa B.O.D. a 25°C.....pág. 45

Figura 4.8 – Velocidade específica de crescimento do *Ganoderma australe*, no período de pré-cultivo em estufa B.O.D.....pág. 45

Figura 4.9 - Cinética de crescimento do *Ganoderma australe*, na etapa de cultivo em *Shaker*.....pág. 49

Figura 4.10 – Velocidade específica de crescimento do *Ganoderma australe*, no período de cultivo em *Shaker*.....pág. 49

LISTA DE TABELAS

- Tabela 3.1** – Valores utilizados para a elaboração do planejamento fatorial 3^2 para estudo da influência do pH e concentração de glicose, a 25°C , sobre o rendimento (massa seca) após quinze dias de cultivo em banho-maria agitado (*Shaker*).....pág. 24
- Tabela 3.2** – Valores relativos aos níveis adimensionais das variáveis independentes.....pág. 24
- Tabela 3.3** – Ensaio realizados no planejamento fatorial 3^2pág. 25
- Tabela 3.4** – Tabela de análise de variância para o ajuste dos parâmetros do modelo pelo método dos mínimos quadrados.....pág. 28
- Tabela 4.1** - Resultados do planejamento fatorial 3^2 para avaliação do efeito do pH e da concentração inicial de glicose, a uma temperatura fixa de 25°C , na produção de biomassa (peso seco).....pág. 37
- Tabela 4.2** - Efeitos das variáveis independentes sobre a biomassa produzidapág. 38
- Tabela 4.3** - Coeficientes de regressão estimados para o modelo quadrático.....pág. 38
- Tabela 4.4** – Análise da variância para verificação da significância estatística do modelo quadrático.....pág. 39
- Tabela 4.5** - Produção de biomassa (massa seca) do fungo *Ganoderma australe*, cultivado em diferentes pHs e concentrações iniciais de glicose, na temperatura de 25°Cpág. 43

Tabela 4.6 - Concentração de glicose e biomassa seca (g/L) produzida em 400 mL de caldo de batata, sem agitação, durante a etapa de pré-cultivo em B.O.D. a 25°C.....pág. 45

Tabela 4.7- Concentração de glicose e massa seca produzida durante a etapa de incubação em Shaker a 25°C.....pág. 48

RESUMO

O desenvolvimento *in vitro* do fungo *Ganoderma australe* estirpe MIP G 98012 cultivado em ágar e caldo de batata foi avaliado, empregando a glicose como principal fonte de carbono no caldo de batata. Para avaliar a influência do pH e da concentração inicial de glicose a uma temperatura fixa sobre a produção de biomassa, um planejamento experimental e análise de superfície de respostas foi realizado. A semeadura da cepa foi em ágar batata dextrose e distribuída em placas de Petry, para seu crescimento. Posteriormente, uma fração do micélio obtido no meio sólido foi transferida para o cultivo em caldo de batata, contendo glicose nas concentrações de 10, 20 e 30 g/L e em pHs de 5,0; 6,5 e 8,0. Após o período de incubação de dez dias a 25°C em estufa de B.O.D. a cultura foi agitada e transferida para porções menores do mesmo meio e incubadas em banho-maria sob agitação. As melhores condições de crescimento em temperatura de 25°C foram obtidas no pH 5,0 e concentração inicial de glicose (30 g/L), onde a produção de biomassa seca atingiu 7,1g/L após quinze dias de incubação em *shaker*. Foi realizado um novo ensaio a partir das condições de melhor desenvolvimento do fungo, a fim de efetuar o monitoramento da concentração de glicose e produção de biomassa no período de um mês. A partir desses dados estabeleceu-se a cinética de crescimento desse organismo. A velocidade de crescimento do fungo apresentou um valor constante e, portanto, a velocidade de crescimento específica foi inversamente proporcional à concentração do organismo. Experimentos em frascos agitados aumentaram a velocidade de crescimento de 0,3441 para 0,4561g.dia⁻¹.L⁻¹, mostrando que o oxigênio pode ser um dos fatores limitantes de crescimento.

ABSTRACT

The development "*in vitro*" of the *Ganoderma australe* race MIP G98012 cultivated in agar – agar and potato extract was evaluated, using glucose as the main source of carbon in potato extract. To evaluate the pH influence and glucose initial concentration in a fixed temperature over the biomass production, an experimental planning and response surface analysis was done. The race cultivation was done in agar - agar potato dextrose and distributed in Petry plates with for its growth. Lately, a micellyum portion from the solid part was transfered to the culture of potato extract with glucose at concentrations of 10, 20 and 30 g/l and pH of 5,0; 6,5 and 8,0. After an incubation period of ten days into 25°C in B.O.D. oven the culture was agitated and transfered in lower portions of the same environment and incubated in shaker. The best growth conditions, at temperature of 25°C, were obtained at pH 5,0 and glucose initial concentration of 30 g/l; where the dried biomass production was about 7.1g/L after an incubation of 15 days in shaker. A new assay was done, starting from the best conditions for the fungus development, to follow up the glucose concentration and biomass production during a mounth period. From these data the growth kinetic of this organism was established. The fungal growth rate showed be constant and, therefore, the specific growth rate was inversely proportional to the organism concentration. The experiments in shaker presented a greater growth rate ($0,4561\text{g}\cdot\text{day}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$) then the B.O.D. static experiments ($0,3441\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$), showing that the oxygen can be one of the limiting growth nutrients.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os fungos do gênero *Ganoderma* apresentam distribuição mundial e são tidos como saprófitas ou decompositores de madeira atuando sobre a degradação da lignina, celulose e hemi-celulose. Espécies de *Ganoderma* possuem histórico milenar na medicina tradicional chinesa no que refere ao seu emprego na terapêutica de várias afecções humanas. Na antiguidade o Gênero era classificado de acordo com a coloração do basidioma, porém, hoje a classificação entre as espécies é feita através de análises macro e micromorfológicas, onde os resultados obtidos são comparados com referências bibliográficas.

Atualmente diversas investigações sobre algumas espécies vêm sendo desenvolvidas, como é o caso do *G. lucidum* e *G. tsugae* com comprovações de atividade biológica. Os efeitos farmacológicos do gênero são atribuídos aos polissacarídeos e triterpenóides. Os polissacarídeos são encontrados dispersos nos diversos gêneros de fungos, enquanto os triterpenóides encontrados no Gênero não são observados em outros fungos (CHEN *et al.* 1999).

O *Ganoderma australe*, espécie de interesse neste estudo, é exclusivo de climas tropicais e subtropicais, sendo bastante comum no Estado de Santa Catarina. Raros são os dados bibliográficos encontrados e dentro desses o enfoque principal está na composição química, identificação de metabólitos produzidos e ação de compostos em seres humanos e microorganismos. Em apenas um trabalho foi encontrado uma citação sobre o cultivo em caldo de batata, mas a otimização do desenvolvimento de biomassa não estava em questão (GERBER 2000).

Vários produtos farmacêuticos apresentam como princípio ativo substâncias obtidas através de plantas, bactérias e fungos. Entre estes fármacos encontram-se as drogas antimicrobianas, porém muitos já não apresentam eficácia frente a diversos tipos de microorganismos. Em decorrência do uso indiscriminado destas drogas, os agentes microbianos vêm sofrendo mutações tornando-se cada vez mais resistentes, em razão disso, o estudo da formulação de novas drogas tem sido uma constante.

Em face às razões expostas, associado ao fato de o *G. australe* ser um fungo de desenvolvimento lento e pela carência de referências bibliográficas sobre o seu cultivo, é que realizou-se este trabalho. O objetivo principal foi a determinação das melhores condições do seu cultivo em laboratório, a partir dos valores de pH e concentração inicial de glicose estabelecidos em um planejamento experimental. Com o direcionamento do processo para uma maior produção de biomassa e a partir da condição ótima de cultivo, efetuou-se o monitoramento da concentração de glicose e da biomassa produzida, a fim de estabelecer-se a cinética de crescimento do *Ganoderma australe* dentro dessas condições.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fungo

2.1.1. Enquadramento taxonômico

De acordo com MONCALVO & RYVARDEN (1997), o fungo *Ganoderma australe* (Fr.) Pat., apresenta o seguinte enquadramento taxonômico:

Reino: Fungi

Divisão: Eumycota

Filo: Basidiomycota

Classe: Basidiomycetes

Ordem: Ganodermatales

Família: Ganodermataceae

Gênero: *Ganoderma*

Espécie: *australe*

2.1.2. Basidioma

Ganoderma australe (Fr.) Pat., produz basidioma macroscópico, bem desenvolvido. Gerber (2000) descreveu algumas características, tais como, a superfície superior do píleo glabra, com sulcos irregulares e cocêntricos, sem laca, de tonalidade marrom-avermelhado a amarelo.

O basidioma apresenta consistência lenhosa, sendo comumente conhecido por "orelha-de-pau". As figuras abaixo representam a forma como o fungo se encontra na natureza. A Figura 2.1 apresenta a superfície posterior do basidioma, enquanto a Figura 2.2 apresenta a superfície anterior. Essas figuras foram gentilmente cedidas pela Dra. Clarice L. Leite, do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina.

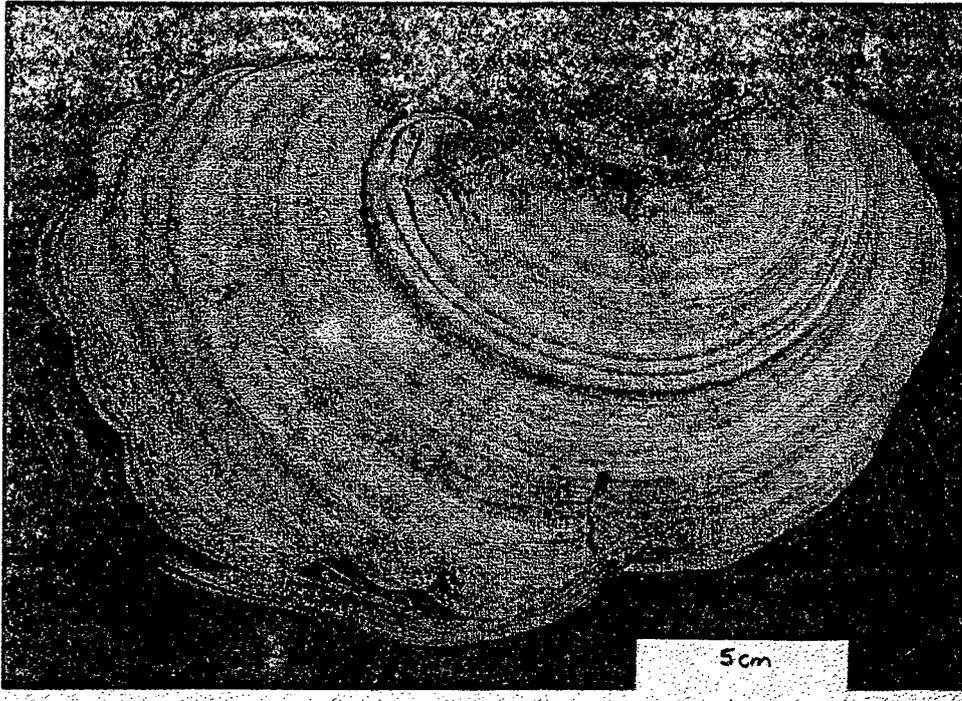


Figura 2.1- Superfície posterior do basidioma de *Ganoderma australe*.

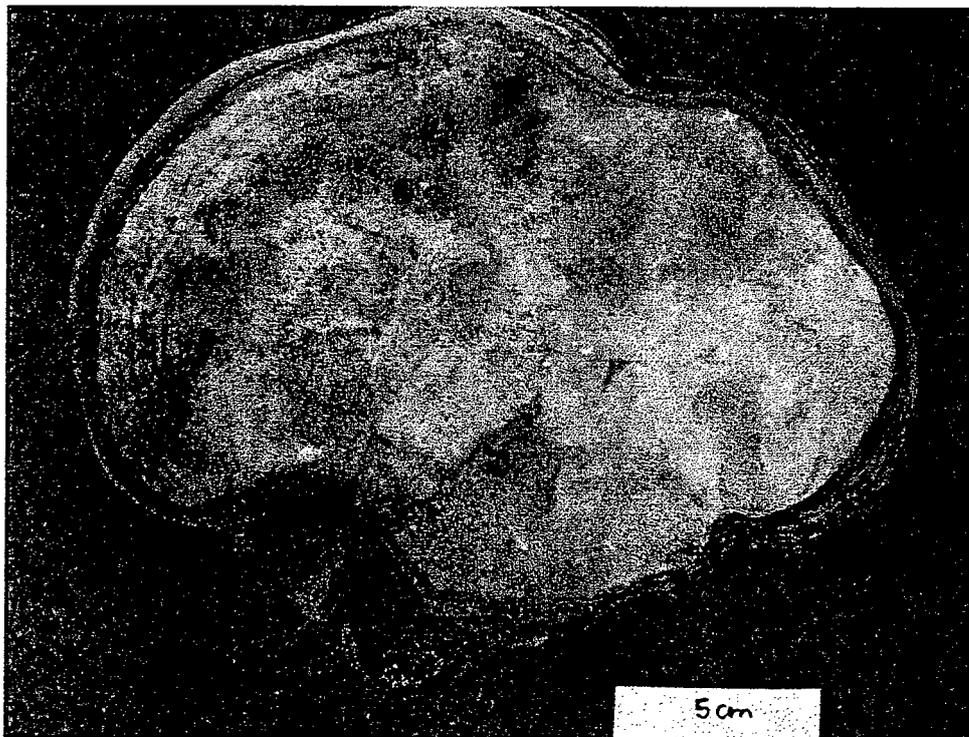


Figura 2.2- Superfície anterior do basidioma de *Ganoderma australe*

2.1.3. Morfofisiologia

Os fungos do gênero *Ganoderma* apresentam talo somático miceliano composto de hifas (filamentos tubulares), e por meio delas fazem a colonização do seu substrato, absorvendo água e nutrientes. Geralmente, as hifas liberam enzimas que são atuantes na degradação de substâncias mais complexas presentes no substrato, permitindo dessa forma a assimilação. O crescimento se dá pelas extremidades e podem se tornar septadas ou não, dependendo de divisões transversais (projeções internas da parede celular), denominadas septos. Após a anastomose das hifas monocarióticas do micélio primário, ocorre uma dicaríofase prolongada (podendo durar meses ou anos), formando o micélio secundário; apresentam ainda um micélio terciário também dicariótico compositor dos tecidos dos basidiomas. As hifas dicarióticas podem conter fíbulas na altura dos septos. Esta pequena projeção é observada ao microscópio ótico, formada durante o crescimento da hifa, com a função de manter a condição dicariótica durante o seu desenvolvimento. O tecido do micélio terciário (basidioma) pode ser composto por hifas generativas (paredes finas, responsáveis pela formação dos basídios), hifas esqueléticas (paredes grossas, estéreis, sem ramificação) e hifas de ligação (paredes grossas, estéreis e ramificadas). O basidioma dispõe de estrutura trimítica quando apresenta os três tipos de hifas (BERGAMIN FILHO *et al.*, 1995).

A característica taxonômica básica do *Ganoderma* é a formação de basidiomas de consistência dura, lenhosa ou coriácea. A distinção do *Ganoderma* dos demais gêneros de políporos é fácil, quando comparada à diferenciação entre suas espécies (MELO, 1986).

Segundo BERGAMIN FILHO *et al.* (1995), o himênio (camada fértil de basídios) dos basidiomas localiza-se na superfície interna de tubos que se comunicam com o exterior, geralmente, na face abaxial. Os basidiosporos são formados de modo exógeno pelo basídio.

O pesquisador RYVARDEN (1991) afirmou que P. Karsten estabeleceu o gênero *Ganoderma* em 1881, a partir do *Polyporus lucidus* W. Curtis:Fr., como sendo a única espécie do Gênero, que tornou-se a espécie modelo. São fungos poróides parasitas ou saprófitas que se desenvolvem sobre madeira, fazendo parte do principal grupo de organismos responsáveis pela degradação da

lignina, celulose e hemicelulose na natureza (ADASKAVEG & GILBERTSON, 1994). A citação de ADASKAVEG & GILBERTSON foi utilizada, porém, com restrições por BERGAMIN FILHO *et al.* (1995), que salientou a existência de dois tipos básicos de podridão de madeira causadas por estes fungos, sendo a podridão parda e podridão branca. Na primeira, o fungo apresenta somente capacidade celulítica, ao passo que, na podridão branca dispõe de atividade celulítica e lignolítica.

2.1.4. Distribuição e Habitat

De acordo com STEYART (1975), o gênero *Ganoderma* apresenta distribuição cosmopolita, tendo algumas espécies com distribuição circunglobal nas zonas tropical e subtropical, como é o caso do *G. australe*. A espécie foi citada pela primeira vez em Santa Catarina por Levillé no ano de 1846 (LOUGUERCIO-LEITE, 1990).

GERBER (2000) cita que coletas de fungos degradadores de madeira têm sido efetuadas de forma sistemática nessa última década na ilha de Santa Catarina, por meio do Laboratório de Micologia do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina, possuindo dessa forma um bom conhecimento sobre espécimes de *Ganoderma australe*, sendo a espécie do Gênero mais encontrado na ilha de Santa Catarina.

O gênero *Ganoderma* é de ocorrência bastante freqüente em árvores de áreas urbanas, sujeitas a diversas formas de estresse fisiológico e de ferimentos (BERGAMIN FILHO *et al.*, 1995). Essa citação foi confirmada por GERBER (2000) que registrou coletas efetuadas em regiões habitadas ou que sofreram desmatamento. As amostras foram encontradas em Dicotiledôneas vivas e mortas, árvores cortadas, franco de *Schizolobium parahyba* em decomposição, trocos de *Pinnus* spp. em decomposição e *Didimapanax angustisserum*.

2.1.5. Similaridade genotípica

MARTINEZ *et al.* (1991) descreveram que uma podridão branca causada pelo gênero *Ganoderma* Karst. foi responsável pela extensiva delignificação de madeira em uma floresta no sul do Chile. Esse basiomiceto foi citado em diferentes estudos como sendo *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat.. Recentemente, basídomas de *Ganoderma* da floresta chilena foram comparados à espécies europeias de *G. australe* e *G. applanatum*, confirmando a similaridade do *G. australe* europeu com os basídiomas chilenos. Através da comparação de ácidos graxos entre o *G. applanatum* e *G. australe* os autores observaram diferenças na composição de ácidos graxos entre as espécies.

Segundo as afirmações de STYEART (1972) & STYEART (1975), as espécies devem ser separadas com base nas suas características macromorfológicas, comentando que o *G. applanatum* dispõe de finas linhas de contexto entre as camadas de tubos, não havendo essa ocorrência no *G. australe*, enquanto substâncias melanóides somente são observadas no último. Os esporos do *G. applanatum* dificilmente atingem a dimensão de 10µm, enquanto os do *G. australe* podem atingir a essa medida.

2.1.6. Sinonímia

A atual definição do *G. australe* inclui *G. adpersum* (S. Schulz Donk, *Ganoderma europaeum* Stey e *Ganoderma tornatum* (Pers.) Bres. Além disso, *Ganoderma annularis* (Fr.) Gilbn também foi considerado como sinônimo (MARTINEZ *et al.*, 1991).

2.1.7. Composição Química

As principais substâncias produzidas pelo gênero *Ganoderma* são polissacarídeos e triterpénoides, mas a primeira é encontrada dispersa nos

fungos, enquanto os triterpenos encontrados no Gênero não foram observados em outros fungos (CHEN *et al.* 1999).

AMOLAK & SUSHIL (1984), citam em seu estudo que o *G. lucidum* produziu 1-manitol, ergosterol e oito ácidos triterpênicos dioxigenados pertencentes à série lanostone [1-2], todos contendo um grupamento carboxílico terminal e alguns deles apresentam atividades citotóxicas *in vitro* em células de hepatoma [2]. O *G. applanatum* produziu ergoste-4,6,8 (14), 22 tetraen-3-on [3], ergoste-7,22-dien 3 β -on [3], ergosterol e ácido palmítico, além de dois triterpenos pentacíclicos: Friedoolean-5-en-3-one e friedelin [5]. Na fração lipossolúvel do *G. australe* encontraram palmitato de ergosterol, ergoste-7,22-dien 3 β -on [3], ergosterol e lanoste-7,9 (11)24-trien-3 β , 21-diol.

Porém, deve-se lembrar que o *G. lucidum* é a espécie mais estudada, mais de 100 diferentes tipos de triterpenoides oxigenados já foram isolados e identificados. (KUBOTA *et al.*, 1982; NISHITOBA *et al.*, 1984).

Foram identificadas por GERBER (2000) algumas substâncias nos extratos dos basidiomas do *Ganoderma australe*, como, metil ésteres de ácidos graxos saturados, ácidos graxos saturados e insaturados, e esteróis de Ga0(5 α -ergost-7-en-3 β -ol), Ga1(5 α -ergost-7,22-dien-3 β -ol) e Ga2(5,8-epidioxi-5 α ,8 α -ergost-6,22-dien-3 β -ol) - padrões de *G. applanatum*; encontrou-se uma mistura de ácidos do tipo aplanoxídico A, C, F e G (triterpenos polioxigenados derivados do lanostano).

CHEUNG *et al.* (2001), descrevem o desenvolvimento do método MECK (cromatografia eletrocínética miceliana), onde determinaram a presença de nucleosídeos (adenosina e uridina) e base (uracil), em amostras preparadas a partir de basidiomas de *G. japonicum* e *G. lucidum* e cápsulas de *Ganoderma* de duas marcas distintas.

2.1.8. Importância Biotecnológica

As manifestações dos fungos vêm sendo observadas há milhares de anos. Porém, o estudo sistemático apresenta apenas 250 anos, trazendo inúmeros benefícios para o avanço da medicina e dos processos

biotecnológicos. Os fungos nos afetam de forma positiva através de biotransformações, produção de metabólitos úteis, atividade enzimática, produção de biomassa, controle biológico e na silvicultura. Mas podem afetar negativamente causando doenças em plantas, micoses em animais e humanos, reações alérgicas, deterioração ou produzem micotoxinas (ALEXOPOLUS *et al.*, 1996).

Conforme ADASKAVEG & GILBERTSON (1991) os fungos do gênero *Ganoderma* se desenvolvem de forma saprófita ou parasita sobre a madeira. Estando inclusos no principal grupo de organismos degradadores de lignina, celulose e hemicelulose na natureza, com significativo interesse biológico na reciclagem de elementos.

Esse fenômeno natural, tem sido estudado como um modelo para processos biotecnológicos de delignificação da madeira. Este basidiomiceto, que transforma diversas madeiras chilenas, em um material usado como ração para gado, foi citado como *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. em diferentes estudos. Outros autores consideram o *G. applanatum*, uma grande espécie, incluindo o *Ganoderma australe* (Fr.) Pat. (MARTINEZ *et al.*, 1990).

Diversos trabalhos são encontrados relacionando a atividade farmacológica das substâncias encontradas no *Ganoderma*. O restabelecimento de respostas imunes em ratos, estimulação da função imunológica celular no ancião, ação antagonista contra a inibição do sistema imune induzida pela morfina, atividade antitumoral e anticarcinogênica *in vivo* e *in vitro*, atuação como estimulante sexual e efeitos terapêuticos em hepatites virais crônicas (LIU, 1999).

Algumas espécies de *Ganoderma*, em especial o *G. lucidum*, são empregadas pela medicina tradicional chinesa, na terapêutica de diversas afecções humanas. Dentre elas estão doenças hepáticas, renais, gástricas, pulmonares, circulatórias, neoplasias, diabetes e em enfermidades crônicas de um modo geral (SHIAO *et al.*, 1994; KIM *et al.*, 1997; CHEN, 1999).

Recentes estudos sobre *G. lucidum* demonstram que a atividade carcinostática do fungo se deve ao polissacarídeo 1,3-β-D-glucano presente em seu basidioma. Essa substância é bastante promissora como um novo agente carcinostático, quanto ao seu uso em imunoterapia (TSENG *et al.*, 1984; MIZUNO *et al.*, 1995).

Polissacarídeos sulfatados têm sido fortes candidatos à possíveis drogas antivirais por exercerem potentes atividades *in vitro* contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da herpes simples (HSV) e outras viroses envolvidas (CHANG *et al.*, 1988). A proteína ácida polissacarídea isolada do basidioma de *G. lucidum* demonstrou potente atividade antiviral contra o vírus da herpes simples do tipo 1 (HSV-1) e do tipo 2 (HSV-2), podendo ser especialmente à inibição da quimiotaxia ou penetração, impedindo a complexa interação do vírus com a membrana plasmática celular. (SEONG-KUG, *et al.*, 2000).

YU *et al.* (1979), observaram redução no nível de aldolase sérica em ratos portadores de miotonia experimental com o emprego do extrato de *Ganoderma*, onde encontrou-se as substâncias uracil e uridina

SHIMIZU *et al.* (1985), citam que a fração hidrossolúvel obtida a partir do basidioma de *Ganoderma japonicum* e *lucidum* suprime a agregação plaquetária a partir de uma substância inibitória identificada como adenosina.

GERBER (2000), confirma a atividade antibacteriana do *G. australe* em seu trabalho mostrando que algumas frações obtidas a partir dos basidiomas de *G. australe* são mais eficientes contra bactérias Gram-positivas do que contra as Gram-negativas.

2.2. Metabolismo Fúngico

O metabolismo exerce duas funções gerais: a Anabólica, que transforma nutrientes em componentes estruturais e funcionais do organismo e a Catabólica, que extrai energia química ou elementos de complexos nutrientes, para produzir energia e materiais para reações anabólicas. Os eventos metabólicos são importantes para o metabolismo dos fungos em culturas puras, são chamados de metabolismo primário e são amplamente distribuídos entre os fungos. Os fungos também produzem muitos compostos, tais como, toxinas, antibióticos e outros de função desconhecida, que podem ser secretados no meio em quantidades consideráveis. Esses metabólitos e enzimas necessárias para a sua formação é que constituem o metabolismo secundário, eles são limitados na sua distribuição e muitas vezes para uma

espécie em particular. O metabolismo secundário depende do metabolismo primário para a obtenção de energia e de intermediários-chave. Dessa forma, a divisão do metabolismo dos componentes primários e secundários são artificiais e dependem primariamente da distribuição dos metabólitos entre os organismos. Na rota catabólica do açúcar, a glicose vai diretamente para o processo de glicólise fluindo para o ciclo do ácido cítrico, produzindo intermediários necessários para a biossíntese de metabólitos primários e secundários. O processo de oxi-redução, fermentação e respiração permite a captura de energia química utilizável na forma de ATP, NADPH e NADH (GRIFFIN, 1994).

Os fungos são heterotróficos e exibem nutrição absorptiva. Isto faz simplesmente com que eles não fixem carbono e que os nutrientes que entram em seus corpos, devam passar pela membrana plasmática e parede celular. Essa característica tem levado alguns autores a escrever os fungos como organismos cujos "estômagos" são externos ao seus corpos. No lugar de ingerir alimentos e então digerí-los, como os animais, os fungos devem primeiro liberar enzimas digestivas para o meio externo. Essas enzimas digestivas quebram moléculas grandes e relativamente insolúveis tais como carboidratos polissacarídeos, proteínas e lipídios em moléculas menores e mais solúveis para então ingerí-las. Água livre deve estar presente como um meio para difusão de nutrientes solúveis para dentro das células. Sem alguma água livre, os fungos não podem realizar o metabolismo normal (ALEXOPOLUS *et al.*, 1996).

2.2.1. Metabolismo de carbono e energia

De acordo com GRIFFIN (1994), o metabolismo dos compostos de carbono oferece uma estrutura básica para a biossíntese de metabólitos intermediários, suprimento da necessidade de energia metabólica e poder de redução. Carboidratos que produzem glicose são os mais abundantes e amplamente utilizados como fontes de carbono e energia para os fungos, por essa razão o metabolismo do carbono é visto inicialmente como o metabolismo da glicose. Outras hexoses podem ser convertidas em glicose, mas as

pentoses podem ser uma rota glicolítica alternativa. Fontes de carbono, tais como, os ácidos graxos, aminoácidos, ácidos orgânicos e álcoois, entram no fluxo da glicose em vários pontos. Quando a única fonte de carbono forem os não-carbohidratos, os mesmos deverão ser convertidos em glicose através da gliconeogênese para formação dos precursores das paredes celulares, glicoproteínas e outros materiais derivados diretamente de hexoses.

Nas culturas de *Ganoderma lucidum* realizadas em *shaker* a adição de óleos ou ácidos graxos demonstrou ter grande influência na produção de massa miceliana e de polissacarídeos. Nesse caso o comprimento da cadeia de carbono e o grau de insaturação dos ácidos graxos determinam a extensão da estimulação ou supressão; a função foi especialmente exposta em termos de estrutura e permeabilidade da membrana (FAN-CHIANG, *et al.*, 2000).

2.2.2 Repressão Catabólica

Repressão catabólica ocorre em concentrações elevadas de glicose, sendo visto, como a repressão da síntese de enzimas mitocondriais e de outras enzimas reduzindo seus níveis. Nestas condições a glicose é metabolizada rapidamente pela glicólise é uma considerável fermentação ocorre nesta condição aeróbica; o NADH gerado durante a glicólise é melhor oxidado por fermentação do que por respiração, mesmo que grande quantidade de oxigênio esteja presente. Outro efeito da repressão da glicose é a repressão de enzimas utilizadas no metabolismo de outros açúcares, resultando na utilização preferencial da glicose.

2.3. Cinética de Crescimento

Os modelos matemáticos são uma descrição simplificada de sistemas reais, uma vez que idealizações e simplificações são consideradas. Os modelos de crescimento microbiano podem ser classificados em estruturados e não estruturados. Os não estruturados consideram, além das variáveis abióticas (pH, temperatura, concentrações extra-celulares, etc.), apenas a

quantidade de biomassa na cultura (em número ou massa celular) suficiente para especificar a atividade do organismo. Portanto, mudanças na composição da biomassa são totalmente ignoradas. O modelo de Monod (1942), é originariamente empírico e representa o crescimento de microorganismos com um único substrato limite sendo considerado um exemplo do sucesso dos modelos não estruturados. Esse modelo e suas modificações, considerando manutenção, inibição, etc., são de fácil descrição matemática e verificação experimental, permitindo a interpolação dos dados experimentais, de crescimento de uma forma satisfatória em muitas situações. Por isso, são amplamente empregados. A equação de Monod, que representa a velocidade de crescimento para reações enzimáticas é expressa tendo a velocidade de crescimento específica em função apenas da concentração de substrato. (FURIGO JR., 1995).

2.4. Cultivo

O crescimento de um organismo é bastante complexo, onde as diversas etapas são acompanhadas para avaliação do aumento ou redução do processo de desenvolvimento e diferenciação. Os fungos micelianos aumentam em volume, número de núcleos e citoplasma; eles não crescem em número de células (GRIFFIN, 1994). —

2.4.1. Meios de cultivo

O meio de cultivo para fungos pode ser semi-sólido (gel) ou líquido (caldo). O meio semi-sólido é muitas vezes considerado o mais indicado, pois os substratos naturais de muitos fungos são sólidos ou semi-sólidos, como é o caso da madeira, tecido animal e vegetal ou solo. Dentre os agentes semi-sólidos, o ágar é o mais indicado, por não se liqüefazer antes de atingir 100°C e permanecer líquido até próximo de 45°C, no resfriamento. Meios líquidos apresentam vantagens e desvantagens em relação aos semi-sólidos. O crescimento miceliano em meio líquido ocorre na forma de tapete bastante

heterogêneo. A camada superior é aeróbia, mas tem pouco contato com o meio, enquanto a camada inferior é anaeróbia, porém, de maior contato com o meio. Essa situação pode resultar em inibição de crescimento e excessiva produção de metabólitos secundários, dependendo das características do fungo. Um melhor sistema de homogeneização, com crescimento submerso é obtido com agitação, que pode ser feito com o uso de um alternador, recipiente com agitação e aeração forçada ou *Shaker* rotatório. Tanto a extensão, quanto pellets não serão formados, todo o sistema hifal pode ser exposto ao ambiente. Portanto, as limitações impostas pela falta de oxigênio e a redução da taxa de difusão de nutrientes, poderão ser superadas (GRIFFIN, 1994).

2.4.2. Condições de cultivo

Estudos realizados por ALEXOPOLUS *et al.* (1996) salientam que à parte da disponibilidade de uma fonte de alimento apropriada, exemplos de outros fatores que influenciam o crescimento do fungo são umidade, temperatura, pH e oxigênio. O pH ótimo que favorece o crescimento de diferentes fungos varia amplamente. Considera-se o ótimo de temperatura para o desenvolvimento desses organismos entre 25 e 30°C.

GERBER (2000), relata o cultivo de *Ganoderma australe* em caldo de batata em pH 6,5 e concentração inicial de glicose em seu experimento.

SMÂNIA JR. (1995) realizou um estudo sobre o basidiomiceto *Pycnoporus sanguineus*, este é um fungo saprófita, degradador de madeira e também conhecido como "orelha de pau". Nesse trabalho, foi realizado testes com meios sólidos e líquidos, para avaliação do crescimento inicial do fungo. Utilizou-se o ágar de batata, ágar de celulose, ágar de mosto e ágar de Sabouraud. O melhor desenvolvimento foi obtido em ágar de batata, que em quinze dias cobriu toda a superfície do ágar. Em meio líquido, foi testado o caldo de batata, caldo de celulose e extrato de solo, tendo o melhor crescimento em caldo de batata.

A produção de micélio e polissacarídeos por algumas espécies de fungos através de culturas submersas tem evoluído muito nos últimos anos no Oriente. Para melhorar a eficiência da produção o controle das condições de

desenvolvimento e/ou a modificação da composição do meio de cultura pode ser fundamental (YANG & LIAU, 1998).

2.5. Planejamento Experimental

A nível mundial, muitos estudos são realizados visando a obtenção de novas substâncias, com atividade farmacológica a partir de plantas ou microrganismos. O alto custo operacional, o baixo rendimento de biomassa e metabólitos, associado ao elevado tempo de cultivo levam, muitas vezes, à inviabilidade da produção do princípio ativo em escala industrial, havendo dessa forma, a necessidade de um delineamento experimental, visando a obtenção de um melhor rendimento, com menores custos operacionais.

Uma das técnicas aplicadas é o Planejamento Experimental, que consiste na simulação de situações que envolvam muitas variáveis, as quais são investigadas ao mesmo tempo objetivando a avaliação de fatores e efeitos que minimizem custos e maximizem qualidade e produtividade.

O primeiro passo para a execução de um planejamento experimental, consiste na escolha das variáveis e respostas de interesse para o estudo em questão. As metas a serem atingidas através do experimento é que irão determinar o tipo de planejamento a ser empregado.

Em um planejamento fatorial é primordial a definição dos níveis, nos quais, cada um dos fatores (variáveis) será avaliado e, para análise dos dados obtidos, além das ferramentas do planejamento experimental, necessita-se de um embasamento sobre o processo (NAVARRO, 1996; TEIXEIRA, 1999).

A Metodologia da Superfície de Respostas (RSM) é uma das técnicas convenientes na obtenção de parâmetros ideais para a otimização de processos. É constituída de duas etapas distintas, sendo a modelagem e o deslocamento. A modelagem ocorre através do ajuste de modelos lineares ou quadráticos aos resultados experimentais obtidos através do planejamento experimental, enquanto o deslocamento acontece na trajetória onde há variação da resposta de forma mais pronunciada (BARROS NETO *et al*, 1995).

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Organismo

O organismo de interesse nesse estudo, foi o fungo *Ganoderma australe*, estirpe MIP-G98012, fornecido pelo Laboratório de Antibióticos, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Segundo GERBER (2.000) o basidoma que deu origem ao isolado MIP-G98012, foi coletado na empresa CELUCAT S.A., tendo como substrato um tronco do *Pinus* em decomposição, no município de Correia Pinto – SC, está depositado no Herbário FLOR, sob o número (FLOR 11741).

Preparo das lâminas para microscopia

Para a análise microscópica, um fragmento do micélio (cultivado nas condições do item 3.3.2), retirado com o auxílio de lupa e agulhas estéreis, foi clarificado com Hidróxido de pótássio a 5% e corado com Floxina a 1%; observando-o, então, ao microscópio ótico, sob lente de imersão.

3.1.1. Identificação das culturas dicarióticas

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

Realizou-se a observação do tipo e características do sistema hifal, a presença ou ausência de fíbulas e basídios.

Utilizou-se uma ocular com escala micrometrada para efetuar a comparação das medições das estruturas observadas nas lâminas preparadas.

3.2. Meios de Cultura

3.2.1. Meio de manutenção e desenvolvimento do fungo

Realizou-se o repique da cepa para o meio de ágar de batata dextrose (ACUMIDEA) em tubos com a base inclinada, foi mantido em estufa B.O.D. a 25°C por quatro a seis dias. Para manutenção da cepa, os tubos foram conservados em geladeira e, repicados a cada quarenta e cinco dias.

Utilizou-se ágar batata dextrose (ACUMIDEA) em placas de Petry, para o desenvolvimento das culturas dicarióticas em estufa B.O.D. a 25°C. necessárias para a padronização do cultivo em meio líquido e para o teste de pureza da cultura.

3.2.2. Obtenção de biomassa

Para a obtenção de biomassa foi feito o cultivo em meio líquido, empregando o caldo de batata preparado no laboratório.

No preparo do caldo de batata utilizou-se 200g de batatas (Monalisa) descascadas, adicionado a 700mL de água deionizada e, cozido durante 25 minutos. O caldo foi coado em gaze, a glicose foi adicionada e, o volume completado q.s.p. 1000mL com água deionizada.

Ajustou-se o pH (com NaOH N/10 e HCl N/10) com o auxílio de um pHmetro HANNA, obedecendo os valores abaixo:

- ⇒ pH 5,0: nas concentrações de glicose a 10, 20 e 30g/L
- ⇒ pH 6,5: nas concentrações de glicose a 10, 20 e 30g/L
- ⇒ pH 8,0: nas concentrações de glicose a 10, 20 e 30g/L

Os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C, durante 15 minutos e, conservados em geladeira.

. Biomassa seca

A biomassa seca foi obtida através do processo de filtração do caldo de cultivo seguido do processo de secagem . Para a filtração utilizou-se o filtro Watman nº1 previamente pesado e a secagem foi realizada em estufa na temperatura de 45°C. A pesagem foi efetuada com o auxílio de balança analítica SARTORIUS.

3.3. Padronização do Cultivo em Meio Líquido

Preparo do Inóculo:

Foram retiradas frações de 2,0cm² de micélio do fungo, obtido através do cultivo citado no item 3.3.2 e transferidos para 400mL de caldo de batata (em pHs e glicose, conforme item 3.3.3), em erlenmeyer com capacidade de 500mL . E, incubados em estufa B.O.D., a 25°C, por dez dias.

Inóculo:

Após o período de incubação, a cultura foi vigorosamente agitada e retiradas alíquotas de 15mL; estas foram transferidas para 150mL dos mesmos meios nos correspondentes pHs e concentrações iniciais de glicose, em erlenmeyer com capacidade de 250mL ,e incubados em banho-maria agitado (*Shaker*), a 25°C, por quinze dias.

3.4. Determinação da Concentração de Glicose

A dosagem de glicose foi realizada pelo método enzimático colorimétrico conforme o manual do fornecedor (BIO DIAGNÓSTICA – Enz Color).

3.4.1. Princípio do método

Essa metodologia envolve duas etapas de reação, estando baseada na oxidação da D-Glicose a Ácido glucônico e Peróxido de hidrogênio pela ação da enzima *Glucose oxidase*. O Peróxido de hidrogênio por sua vez reage com o Hidroxibenzoato de sódio e 4-aminofenazona formando complexo-quinona. A intensidade de cor formada é proporcional a concentração de glicose na amostra.

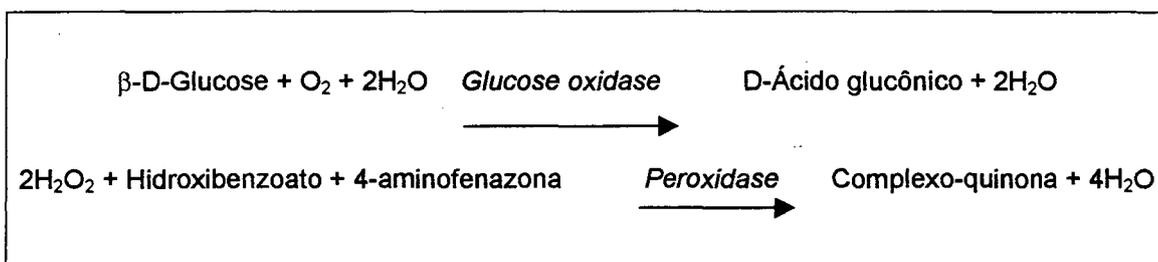


Figura 3.1 – Reações bioquímicas envolvidas no processo oxidativo da determinação da glicose

3.4.2. Técnica

O método é linear até 4,0g/L, por essa razão as amostras foram diluídas a 1:2, com água destilada, repetidas e confirmadas. Para a análise preparou-se quatro tubos contendo 2,0mL de reagente de cor, sendo respectivamente, branco, padrão e amostras (01 e 02), no tubo padrão adicionou-se 20μL do reagente padrão e nos tubos de amostra adicionou-se 20μL da amostra diluída. Os tubos foram homogeneizados e incubados a 37°C, por dez minutos.

As amostras foram lidas no espectrofotômetro (Analisador semi-automático Bio Plus), em um comprimento de ondas de 500nm.

O cálculo da determinação de glicose foi efetuado pela seguinte fórmula:

$$[\text{Glicose}] \text{ em g/L} = \frac{\text{absorbância amostra} * \text{diluição}}{\text{absorbância padrão}} \quad (3.7)$$

3.4.3 - Seqüência experimental

A determinação das concentrações de glicose foi efetuada a partir de um novo ensaio, realizado a partir das condições ótimas de cultivo, definida pela maior produção de biomassa.

As análises foram realizadas em duas séries, de acordo com as etapas de cultivo em meio líquido, conforme o ítem 3.4; porém, na segunda etapa o tempo de cultivo foi superior a quinze dias.

As medições da glicose foram efetuadas no filtrado do caldo de cultivo, que foi obtido a partir de ensaios destrutivos.

Preparo do inóculo: Determinou-se a concentração inicial de glicose, imediatamente após a inoculação, nos três dias subseqüentes, no quinto, no sétimo e décimo dia de cultivo em B.O.D..

Desenvolvimento do inóculo: Determinou-se a concentração inicial de glicose, imediatamente após a adição do inóculo, no primeiro dia após e, finalmente, a cada cinco dias a partir da inoculação, durante um período de 31 dias de cultivo em Shaker.

3.5. Planejamento Experimental

O desenvolvimento *in vitro* do fungo *G. australe* nesse trabalho foi avaliado a uma temperatura fixa de 25°C ($\pm 0,1$), com a variação de outros dois parâmetros, as variáveis independentes, que foram o pH (x_1) e a concentração inicial de glicose (x_2), obtendo-se como resposta uma variável dependente, que foi a produção de biomassa representada em massa seca (y).

Na Tabela 3.1 estão apresentados os valores utilizados para a elaboração de um planejamento fatorial 3^2 para avaliar os efeitos de pH e concentração inicial de glicose na produção de biomassa (massa seca).

Tabela 3.1 – Valores utilizados para a elaboração do planejamento fatorial 3^2 para estudo da influência do pH e concentração de glicose, a 25°C, sobre o rendimento (massa seca) após quinze dias de cultivo em banho-maria agitado (*Shaker*).

Ensaio	pH do meio	Concentração de glicose (g/L)
1	5,0	10
2	5,0	20
3	5,0	30
4	6,5	10
5	6,5	20
6	6,5	30
7	8,0	10
8	8,0	20
9	8,0	30

Na Tabela 3.2 são apresentados os níveis adimensionais relacionados aos valores utilizados para as variáveis independentes neste planejamento.

Tabela 3.2 – Valores dos níveis adimensionais das variáveis independentes.

Variáveis independentes	Símbolo	Código de níveis		
		-1	0	+1
pH do meio	x_1	5,0	6,5	8,0
concentração inicial de glicose (g/L)	x_2	10	20	30

De acordo com SANTOS (1998), o número de experimentos e as condições experimentais são conceitos diferentes, devendo-se, assim, adicionar um certo número de réplicas ao número de condições experimentais para a obtenção do número total de experimentos.

Elaborou-se um planejamento fatorial 3^2 dispondo-se de dois fatores estudados em três níveis (-1, 0 e +1). Foram realizados nove ensaios em duplicata, resultando num total de dezoito ensaios. As réplicas são de fundamental importância para a estimativa do erro experimental.

A Tabela 3.3 contém os ensaios realizados no planejamento fatorial completo 3^2 .

Tabela 3.3 – Ensaios realizados no planejamento fatorial 3^2

Ensaio	x_1	x_2
1	-1	-1
2	-1	0
3	-1	+1
4	0	-1
5	0	0
6	0	+1
7	+1	-1
8	+1	0
9	+1	+1
10	-1	-1
11	-1	0
12	-1	+1
13	0	-1
14	0	0
15	0	+1
16	+1	-1
17	+1	0
18	+1	+1

O modelo estatístico obtido pelo planejamento é representado genericamente pela Equação 3.1.

$$y(x_1, x_2) = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b'_{11} x_1^2 + b'_{22} x_2^2 + b_{12} x_1 x_2 + b'_{12} x_1^2 x_2 + b''_{12} x_1 x_2^2 + b'''_{12} x_1^2 x_2^2 \quad (3.1)$$

onde:

\hat{y} = estimativa dos valores populacionais das respostas

b_0, b_1, b_2, b_{12} = coeficientes de regressão relativos aos efeitos principais lineares (x_1, x_2) e efeitos de interação (x_1x_2)

$b'_1, b'_2, b'_{12}, b''_{12}, b'''_{12}$ = coeficientes de regressão relativos aos efeitos principais quadráticos (x_1^2, x_2^2) e efeitos de interação ($x_1^2x_2, x_1x_2^2, x_1^2x_2^2$)

De acordo com BARROS NETO (1996), a avaliação da eficiência do modelo pode ser realizada com relação à média global, a partir dos desvios das observações.

$$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2 \quad (3.2)$$

onde:

SQ_T = soma quadrática total

n_i = número de repetições do nível i

m = número dos diferentes níveis

\bar{y} = média global das respostas

y_{ij} = respostas observadas

A soma dos quadrados devido à regressão (SQ_R) e ao resíduo (SQ_r) é correspondente:

$$SQ_T = SQ_R + SQ_r \quad (3.3)$$

A SQ_r é correspondente à soma dos quadrados dos resíduos deixados em todas as repetições e em todos os níveis, obtendo a soma quadrática residual, demonstrada na equação a seguir:

$$SQ_r = SQ_{ep} + SQ_{faj} \quad (3.4)$$

onde:

SQ_{ep} : soma quadrática devido ao erro puro, que mede o erro aleatório que afeta a resposta (BARROS NETO *et al*; 1995).

SQ_{faj} : soma quadrática devido a falta de ajuste do modelo em relação às respostas observadas (BOX *et al*; 1978).

O teste F de significância, segundo FERREIRA (1996), tem seu maior emprego nas análises de variância dos delineamentos experimentais, definindo-se o F calculado como sendo o quociente da média dos quadrados devido à regressão pela média dos quadrados do resíduo. Assim:

$$F = \frac{MQ_R}{MQ_r} \quad (3.5)$$

onde:

MQ_R : média dos quadrados da regressão

MQ_r : média dos quadrados do resíduo

O valor de F calculado pela equação (3.5) é então comparado ao valor de F tabelado, no nível de confiança desejado pelo método, de forma que:

$$F_{v_1, v_2} \approx \frac{MQ_R}{MQ_r} \quad (3.6)$$

onde:

F_{v_1, v_2} : F tabelado, no nível de confiança desejado

v_1 : graus de liberdade da regressão

v_2 : graus de liberdade do resíduo

Para que a regressão tenha fins preditivos e não possua unicamente significância estatística, o valor de F calculado deve exceder, no mínimo, quatro vezes o valor de F tabelado, estabelecido a partir do intervalo de confiança aceito pelo método utilizado (BARROS NETO *et al.*, 1995; FERREIRA, 1996).

Para o ajuste dos parâmetros do modelo pelo método dos mínimos quadrados faz-se a análise da variância, conforme o exposto na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Tabela de análise de variância para o ajuste dos parâmetros do modelo pelo método dos mínimos quadrados

Fonte de variação	Soma Quadrática	Número de Graus de Liberdade	Média Quadrática
Regressão	$SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$p - 1$	$MQ_R = \frac{SQ_R}{p - 1}$
Resíduos	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_i - \hat{y}_i)^2$	$n - p$	$MQ_r = \frac{SQ_r}{n - p}$
Falta de ajuste	$SQ_{faj} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	$m - p$	$MQ_{faj} = \frac{SQ_{faj}}{m - p}$
Erro puro	$SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$n - m$	$MQ_{ep} = \frac{SQ_{ep}}{n - m}$
Soma Quadrática Total	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	$n - 1$	

% de variação explicada: $\frac{SQ_R}{SQ_T}$

% máxima de variação explicada: $\frac{SQ_T - SQ_{ep}}{SQ_T}$

onde:

p: número de parâmetros do modelo

n: número total de observações (ensaios)

\hat{y} : valor estimado pelo modelo

MQ_{faj} : média quadrática da falta de ajuste

MQ_{ep} : média quadrática do erro puro

3.6. Cinética de Crescimento

A cinética foi estabelecida a partir dos resultados obtidos no novo ensaio realizado conforme o ítem 3.5, onde determinou-se paralelamente a produção de biomassa (massa seca). Esses dados serviram como subsídio para a realização dos seguintes cálculos:

3.6.1. Velocidade de crescimento

A velocidade de crescimento do organismo corresponde ao coeficiente angular da curva de crescimento do fungo, conforme apresenta a Equação 3.8.

$$r_x = \frac{dX}{dt} \quad (3.8)$$

onde:

r_x = velocidade de crescimento ($g \cdot h^{-1} \cdot L^{-1}$)

X = concentração de biomassa (g/L)

t = tempo (dias)

3.6.2. Velocidade específica de crescimento

A velocidade específica de crescimento do fungo foi determinada a partir da curva de produção de biomassa, conforme a Equação 3.9.

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (3.9)$$

onde:

μ_x = velocidade específica de crescimento (h^{-1})

X = concentração de biomassa (g/L)

t = tempo (dias)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Organismo

A identificação do fungo foi feita a partir da observação e avaliação macroscópica e microscópica da cultura nos meios sólido e líquido. A caracterização do *Ganoderma australe* nos diferentes meios e a avaliação do grau de pureza nos diversos estágios do cultivo, foram as razões desse procedimento.

4.1.1. Características macroscópicas

4.1.1.1. Cultura em meio sólido

O crescimento do isolado MIP-G98012 ocorreu de modo uniforme na superfície do ágar, e de forma radial, confirmando a descrição de LEITE (2000) que o micélio (talo somático) do fungo é constituído de hifas que se ramificam em todas as direções, estendendo-se sobre ou dentro de qualquer substrato que seja utilizado como alimento.

O micélio formado apresentou, aspecto algodinoso, coloração branca e base coriácea, a cultura manteve essas características até o final do cultivo em placa de Petry.

A Figura 4.1 mostra a cultura após cinco dias de incubação a 25°C em estufa B.O.D., apresentando cobertura parcial do meio.

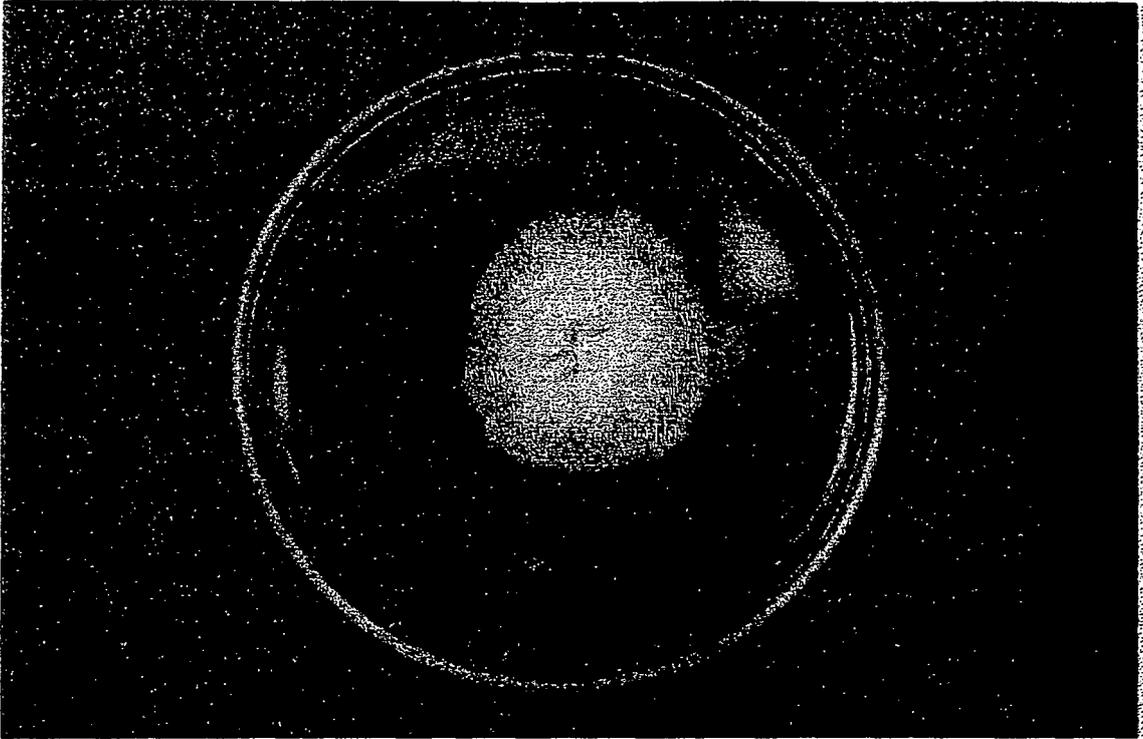


Figura 4.1 – Cultura de *Ganoderma australe*, após o período de cinco dias de incubação a 25°C.

Após doze dias a cultura expandiu por toda a superfície do ágar (contida em placa de Petry com 100 mm de diâmetro) de maneira homogênea, conforme a Figura 4.2.

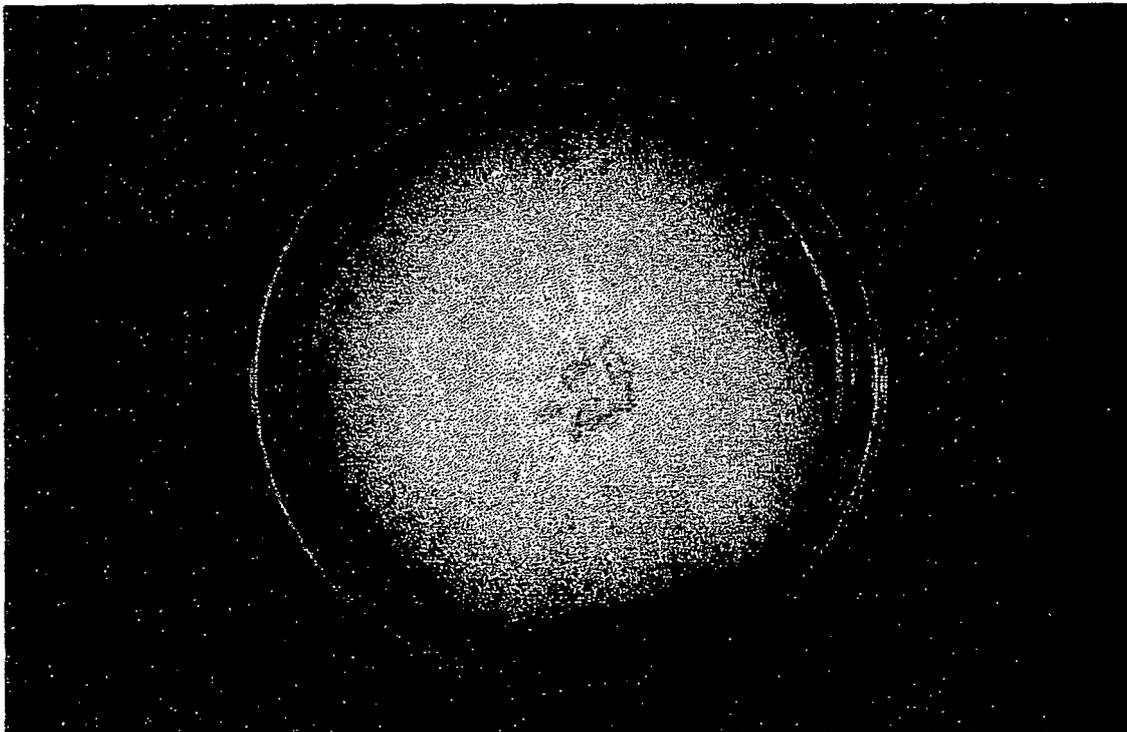


Figura 4.2- Cultura de *G. australe*, após o período de doze dias de incubação. a 25°C

4.1.1.2. Cultura em meio líquido

A cultura em meio líquido comportou-se de maneira distinta, quando comparou-se as duas etapas de seu cultivo nesse meio, ou seja, a preparação do inóculo em estufa B.O.D e o desenvolvimento do inóculo. em *Shaker*.

No preparo do inóculo, a incubação foi efetuada sem agitação e com maior volume de meio. O desenvolvimento ocorreu principalmente na superfície, formando um tapete branco de base coriácea e superfície algodonosa.

No desenvolvimento do inóculo, o volume do meio foi menor e com agitação contínua. O crescimento iniciou-se de modo submerso, onde uma massa miceliana de consistência gelatinosa foi formada. Não houve formação de depósitos no fundo do frasco de cultivo e o restante do meio permaneceu límpido, dando a essa massa um aspecto nebuloso. Somente após o sexto dia, é que alguns pontos começaram a aparecer na superfície do meio, com características semelhantes à incubação em estufa B.O.D.

Amostras dos dois processos foram mantidas à temperatura ambiente e sem agitação. Após o vigésimo dia foi possível a observação de regiões de primórdios de frutificação e ao final de sessenta dias, ambas já haviam adquirido forma semelhante à encontrada na natureza, ou seja, porção externa com textura lenhosa, em diferentes tonalidades de marrom centrípeta e irregularmente sulcada. A porção posterior permaneceu com coloração branca, porém, perdeu o aspecto algodonoso, passando a apresentar textura fibrosa.

4.1.2. Características microscópicas

O principal objetivo da observação microscópica das culturas foi a avaliação do grau de pureza da cepa fornecida, bem como, para o monitoramento dos ensaios, no controle de possíveis contaminações.

As Figuras 4.3a, 4.3b e 4.3c, mostram algumas das estruturas visualizadas na microscopia ótica, observadas em lente de imersão representando um aumento de mil vezes.



Figura 4.3a - Hifa generativa com fibula em formação na cultura de *Ganoderma australe* –(microscópio ótico -1000x)

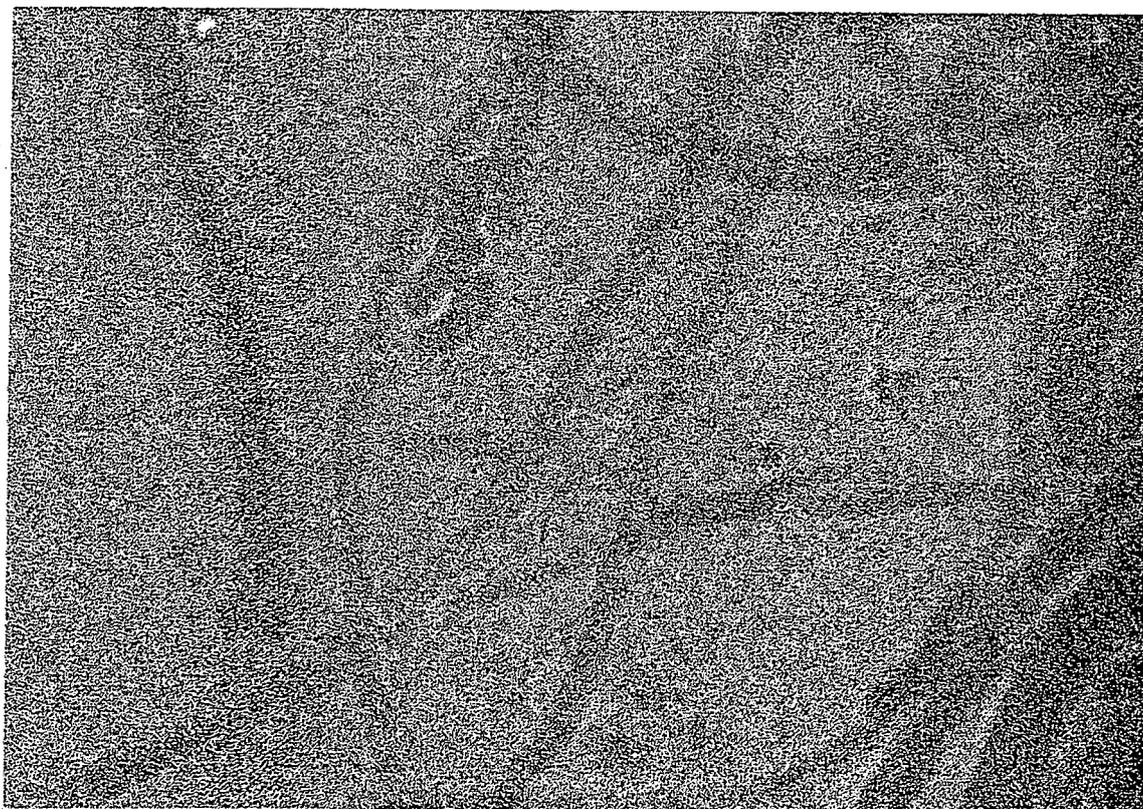


Figura 4.3b- Hifa generativa com fibula formada na cultura de *Ganoderma australe* (microscópio ótico -1000x).

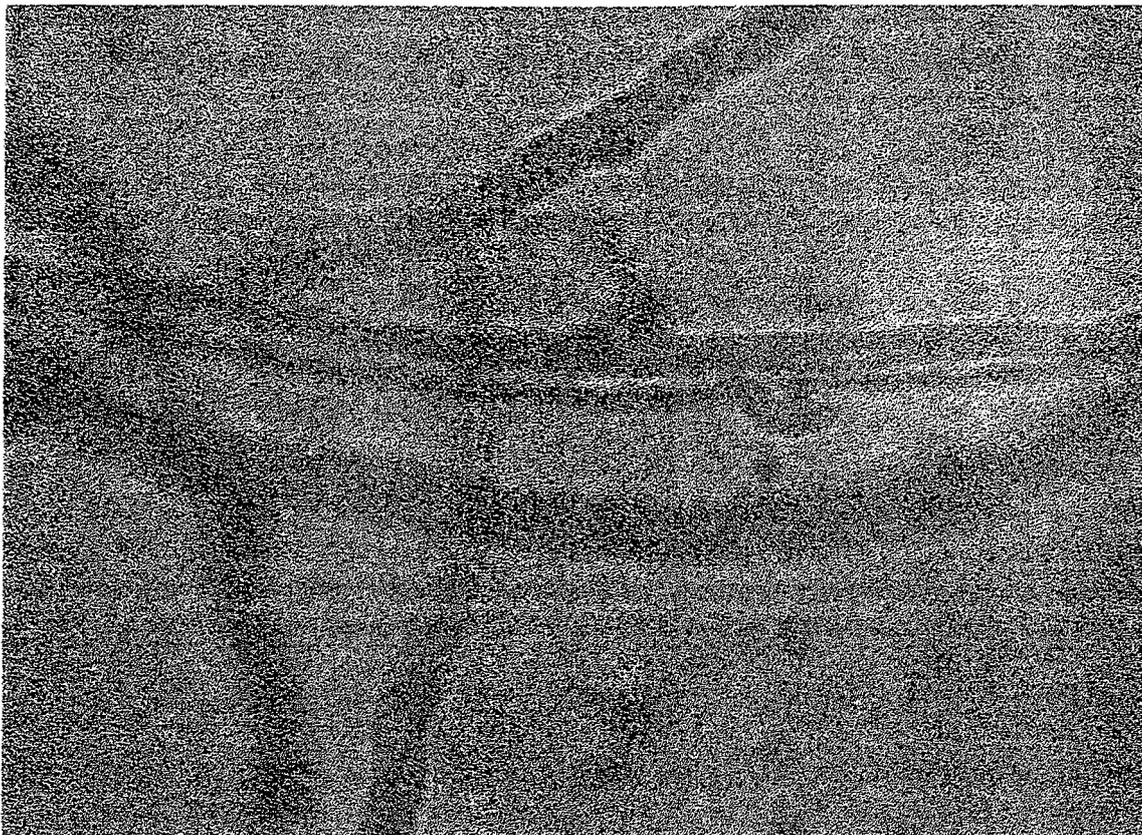


Figura 4.3c – Sobreposição de hifas na cultura de *Ganoderma australe* (microscópio ótico - 1000x).

Através da microscopia ótica, foi possível observar a presença do sistema hifal trimítico (responsável pela formação do micélio terciário), onde encontrou-se hifas generativas, de paredes finas e hialinas com cerca de $3,0\mu\text{m}$ de diâmetro; hifas esqueléticas, de paredes espessas e sem ramificação, com diâmetro de $2,5$ a $6,0\mu\text{m}$ e hifas de ligação, de paredes espessas e hialinas e com ramificações com diâmetro de $1,2$ a $3,5\mu\text{m}$. As medidas não foram registradas com exatidão pois o objetivo principal foi de comparação com a literatura.. Constatou-se a presença de fíbulas na altura dos septos das hifas dicarióticas. Não foram observados basidiosporos.

4.2. Planejamento Experimental

O planejamento fatorial 3^2 , conforme apresentado no item 3.1.1, resultou em nove experimentos, que foram efetuados em duplicata e em ordem aleatória. Os resultados obtidos para avaliação do efeito do pH e da concentração inicial de glicose, a uma temperatura fixa de 25°C, na produção de biomassa (massa seca) encontram-se na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Resultados do planejamento fatorial 3^2 considerando as variações de pH e da concentração inicial de glicose, na temperatura de 25°C, na produção de biomassa (massa seca).

Ensaio	pH	[glicose]	Biomassa (massa seca em g)
1	-1	-1	0,355
2	-1	0	0,440
3	-1	+1	1,080
4	0	-1	0,235
5	0	0	0,267
6	0	+1	0,256
7	+1	-1	0,087
8	+1	0	0,176
9	+1	+1	0,260
10	-1	-1	0,349
11	-1	0	0,465
12	-1	+1	1,060
13	0	-1	0,246
14	0	0	0,254
15	0	+1	0,269
16	+1	-1	0,099
17	+1	0	0,192
18	+1	+1	0,288

As estimativas dos efeitos principais e de interação das variáveis independentes (pH e glicose) sobre a resposta (biomassa) expressa em massa seca, são apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Efeitos das variáveis independentes sobre a biomassa produzida

Variáveis independentes	Efeito sobre a biomassa	Desvio padrão
pH – (x_1)	-0,441167**	0,007076
pH – (x_1^2)	-0,149750**	0,006128
[glicose] – (x_2)	0,307000**	0,007076
[glicose] – (x_2^2)	-0,083000**	0,006128
pH x [glicose] – (x_1x_2)	-0,268500**	0,008667
pH x [glicose] – ($x_1x_2^2$)	0,129500**	0,007506
pH x [glicose] – ($x_1^2x_2$)	-0,213750**	0,007506
pH x [glicose] – ($x_1^2x_2^2$)	0,069000**	0,006500

**efeitos significativos em um intervalo de 99% de confiança

Na Tabela 4.3 estão listados os coeficientes de regressão estimados para o modelo quadrático proposto.

Tabela 4.3 - Coeficientes de regressão estimados para o modelo quadrático

Variáveis independentes	Coeficientes de regressão	Desvio padrão
Média	0,260500**	0,008667
pH – (x_1)	-0,134250**	0,006128
pH – (x_1^2)	0,057750**	0,010614
[glicose] – (x_2)	0,011000	0,006128
[glicose] – (x_2^2)	-0,009000	0,010614
pH x [glicose] – (x_1x_2)	-0,134250**	0,004333
pH x [glicose] – ($x_1x_2^2$)	-0,129500**	0,007506
pH x [glicose] – ($x_1^2x_2$)	0,213750**	0,007506
pH x [glicose] – ($x_1^2x_2^2$)	0,138000**	0,013000

**efeito significativo num intervalo de 99% de confiança

O coeficiente de regressão estimado para o termo [glicose] – (x_2) resultou num valor muito próximo ao desvio padrão observado; no caso do termo [glicose] – (x_2^2), o desvio padrão foi maior que o coeficiente estimado. Assim, os citados coeficientes não foram considerados significativos e, conseqüentemente, tais termos não necessitam ser incluídos na equação do modelo.

A análise de variância efetuada para averiguar se o modelo quadrático apresenta significância estatística na predição da produção de biomassa consta na Tabela 4.4

Tabela 4.4 – Análise da variância para verificação da significância estatística do modelo quadrático

Causa da variação	SQ	GL	MQ	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	1,311558	8	0,5738613	3820,1	5,47
Resíduos	0,001352	9	0,00015		
Total	1,31291	17	0,5740116		

* variação explicada: 99,90%

* nível de significância: 99%

Conforme observa-se na Tabela 4.4, o teste F foi aplicado para análise de variância do planejamento experimental, sendo que o valor de F calculado mostrou ser consideravelmente superior ao valor de F tabelado, no intervalo de 99% de confiança.

Substituindo-se na Equação (3.1), anteriormente apresentada, os coeficientes de regressão estimados e, considerando-se apenas os efeitos estatisticamente significativos, obtém-se a Equação (4.1)

$$P_{\text{Biomassa}} = 0,26050 - 0,134250x_1 + 0,057750x_1^2 - 0,134250x_1x_2 - 0,129500x_1x_2^2 + 0,213750x_1^2x_2 + 0,138000x_1^2x_2^2 \quad (4.1)$$

A Figura 4.4 mostra os valores preditos pelo modelo em função dos valores observados. Pode-se observar que não há um desvio muito grande entre os dados previstos pelo modelo e os dados obtidos experimentalmente.

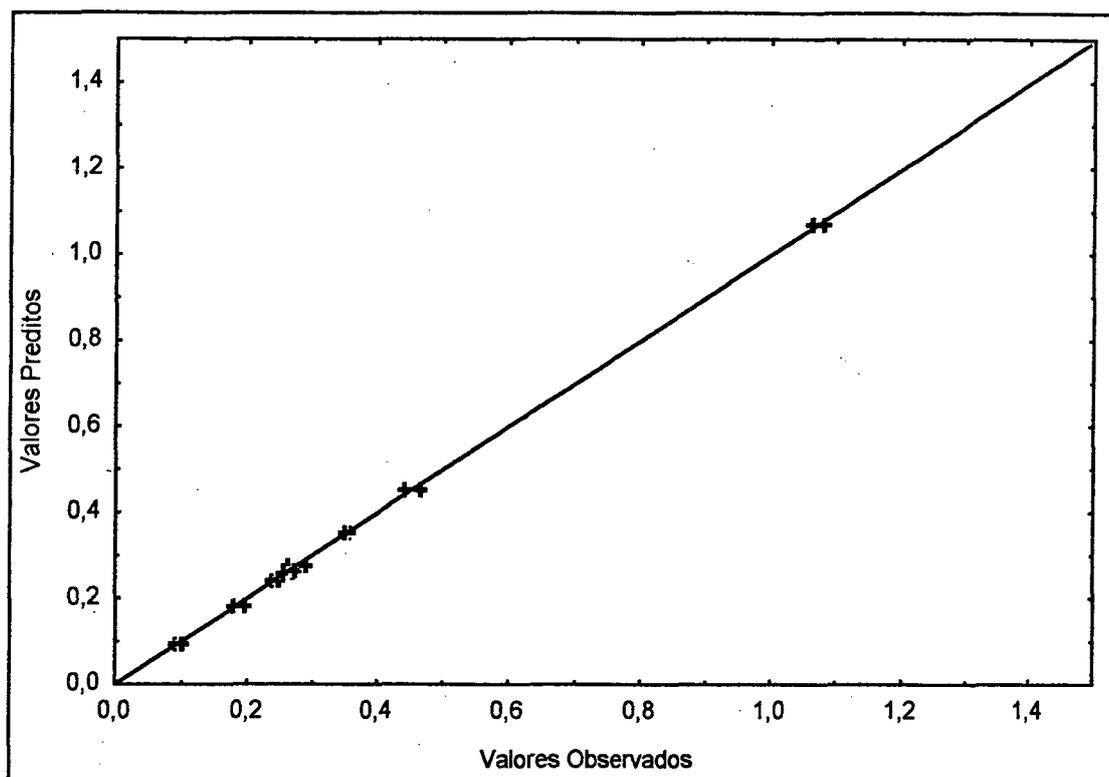


Figura 4.4 – Comparação entre os valores preditos e valores observados para o modelo da produção de biomassa

A Figura 4.5 apresenta a superfície de resposta gerada pelo modelo, em valores reais, ou seja, dimensionado a uma temperatura fixa de 25°C.

Analisando-se a superfície de resposta demonstrada, verifica-se que a produção de biomassa é favorecida quando se utiliza maiores concentrações de glicose em todas os valores de pH.

Porém, constata-se que a medida que o valor de pH decresce a produção de biomassa é aumentada.

De acordo com o modelo obtido, a produção de biomassa é melhor favorecida quando faz-se a correlação ,entre pH 5,0 e concentração inicial de glicose a 30g/L.

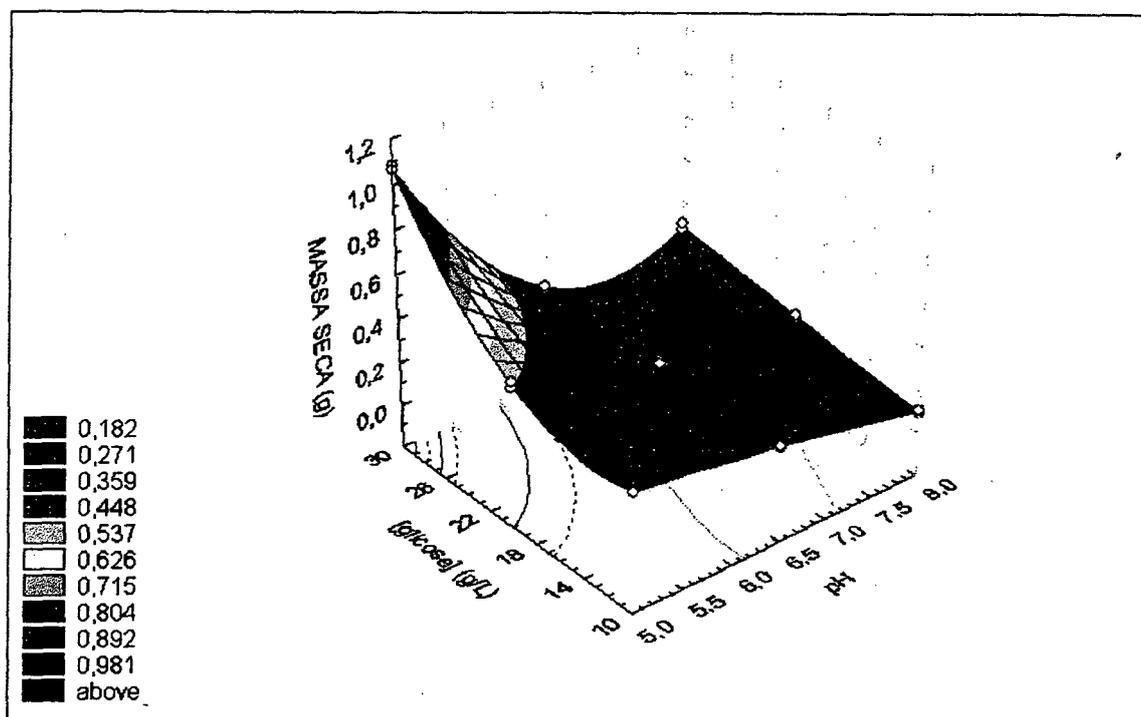


Figura 4.5 – Superfície de resposta da produção de biomassa em função do pH e concentração inicial de glicose

4.3. Otimização das Condições de Cultivo *in vitro*

A otimização das condições de cultivo do *Ganoderma australe* em ambiente controlado levou em consideração principalmente a avaliação do modelo estatístico, avaliação dos experimentos e a contaminação do meio.

4.3.1. Avaliação do modelo estatístico

Para que fosse possível a definição do ponto ótimo dos parâmetros, ou seja, com significância estatística, foi necessária a determinação do ponto de

máximo de produção de biomassa através da Equação (4.1), onde se fez a correlação com cada uma das variáveis independentes. Utilizou-se valores adimensionais para substituição na referida equação.

A partir da Equação (4.1), para os parâmetros pH e concentração inicial de glicose, obteve-se os respectivos valores adimensionais -1 e $+1$, para escala de pH e concentração inicial de glicose, que em valores reais correspondem a pH 5,0 e glicose a 30g/L, para uma máxima produção de biomassa de 1.07g em massa seca, sendo melhor demonstrado na Figura 4.6, através das curvas de níveis.

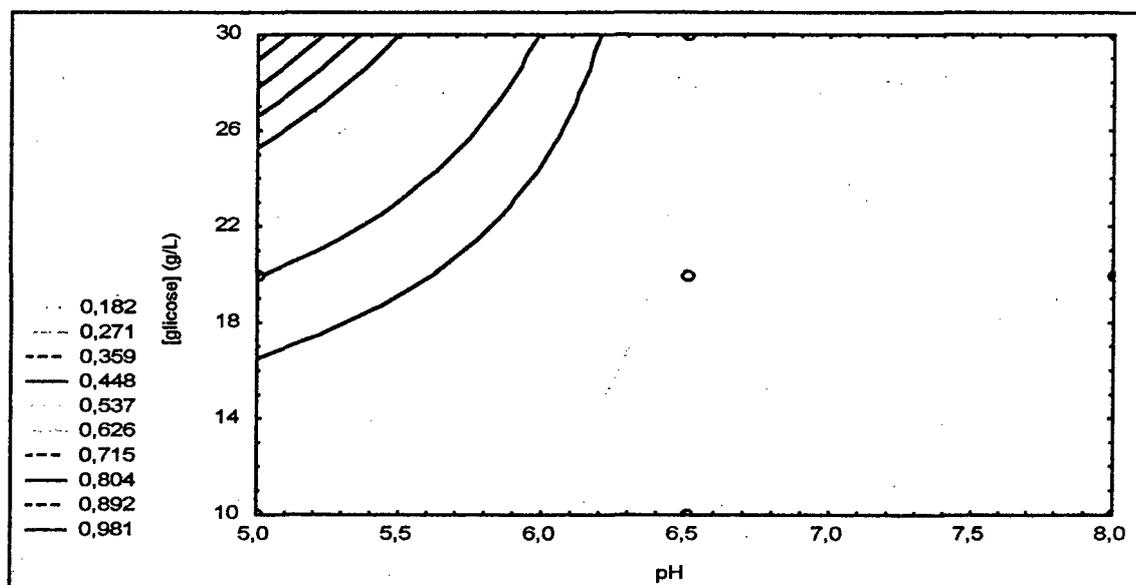


Figura 4.6 – Curvas de nível da produção máxima de biomassa (massa seca em g).

4.3.2. Avaliação dos Experimentos

GERBER (2000), apresentou um trabalho sobre o cultivo do fungo *Ganoderma australe*, utilizando como fonte de carbono o caldo de batata em pH 6,5 e concentração inicial de glicose a 20 g/L, com 25°C de temperatura, para o crescimento do fungo *in vitro*. Sendo essa a razão pela qual fixou-se a

temperatura em 25°C e os valores de pH foram definidos em 5,0, 6,5 e 8,0, sendo a concentração inicial de glicose em 10, 20 e 30 g/L, respectivamente.

Comprovou-se experimentalmente, os resultados previstos pelo modelo estatístico. Em menor pH e maior concentração inicial de glicose houve o melhor rendimento de biomassa, estabelecida em valores de massa seca, conforme é apresentado na Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Produção de biomassa (massa seca) do fungo *Ganoderma australe*, cultivado em diferentes pHs e concentrações iniciais de glicose, na temperatura de 25°C.

pH do meio	Concentração de Glicose (g/L)	Biomassa (massa seca em g)
5,0	10	0,3520
5,0	20	0,4525
5,0	30	1,0700
6,5	10	0,2405
6,5	20	0,2605
6,5	30	0,2625
8,0	10	0,0930
8,0	20	0,1840
8,0	30	0,2740

Para os experimentos realizados no pH 5,0, a produção de biomassa aumentou significativamente com o aumento da concentração inicial de glicose para 30 g/L. Neste intervalo de pH, não houve problemas de contaminação de quaisquer tipo de microorganismos.

Nos ensaios efetuados em pH 6,5, a produção de biomassa só teve um aumento considerável com a elevação da concentração inicial de glicose até 20g/L. A biomassa produzida foi inferior quando comparada aos ensaio realizados em pH 5,0. Essa foi a série que apresentou maiores problemas de contaminação por fungos anemófilos, onde a intensidade foi diretamente proporcional ao aumento da concentração inicial de glicose. A produção de biomassa foi menos representativa quando os experimentos foram realizados em pH 8,0, mas houve aumento de biomassa com a elevação da concentração

inicial de glicose, nessa etapa também houve contaminação, porém, menos representativa.

Portanto, confirma-se a citação de LOUGUERCIO-LEITE (2000) de que a maioria dos fungos parecem crescer melhor a níveis de pH de 4,0 a 7,0. Observou-se de modo geral, que quanto maior a concentração inicial de glicose disponível no meio, maior foi a produção de biomassa.

A glicose é uma fonte de carbono amplamente utilizada. A maioria dos fungos que têm sido testados mostram-se capazes de utilizar a glicose como única fonte de carbono e energia, por essa razão é o material de escolha quando se deseja desenvolver um meio de rotina para crescimento rápido (GRAFFIN, 1994).

As contaminações foram constatadas na cultura em meio sólido e nas duas etapas do cultivo em meio líquido, na estufa B.O.D. e no *Shaker*.

Os fungos responsáveis pelas contaminações foram *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp.; esses estão classificados como os principais fungos contaminantes em culturas *in vitro*, segundo os trabalhos realizados por (NUNES *et al.*, 1995). Esses contaminantes instalaram-se facilmente nos meios de pH 6,5 e em menor proporção nos meios de pH 8,0. Porém, em ambos os casos o grau de contaminação foi diretamente proporcional ao aumento de concentração inicial de glicose.

Para o meio líquido várias foram as medidas necessárias para que fosse possível a eliminação completa dos agentes contaminantes.

Inicialmente, as rolhas que eram de algodão hidrófilo e protegidas por papel Kraft e utilizou-se água destilada no banho-maria. O material das rolhas foi substituído por algodão hidrófobo, efetuou-se a vedação das mesmas com filme de PVC transparente, manteve-se a água destilada no banho-maria.

Porém, percebeu-se que conjuntamente com a turvação da água do banho-maria, as contaminações voltaram a manifestar-se nas culturas.

Foi necessária a aplicação de Hipoclorito de sódio na água do banho-maria, em uma concentração de 0,3 ppm (parte por milhão) e substituição do filme de PVC por fita de enxertia (Aglis), constituída por material degradável a luz solar. A partir disso nenhum tipo de contaminação foi observado.

As contaminações que estavam ocorrendo durante o cultivo em estufa e B.O.D., tanto do meio sólido, quanto do meio líquido, foram sanadas após a vedação com a fita de enxertia.

Finalmente, após a execução de todas as modificações acima citadas, todo o processo de cultivo foi testado em ambiente contaminado, não havendo a constatação de qualquer tipo de contaminação com nenhuma das culturas.

4.4. Ensaio Cinéticos

Realizou-se um ensaio destrutivo a partir da melhor condição de desenvolvimento do fungo obtida, ou seja, em pH 5,0 e concentração inicial de glicose a 30g/L. O objetivo foi o monitoramento da concentração de glicose livre no caldo de cultura e da produção de biomassa (massa seca), nas etapas de pré-cultivo e cultivo em meio líquido.

A Tabela 4.6 demonstra a variação da concentração de glicose no caldo de batata e a produção de biomassa do fungo durante o período de cultivo do pré-inóculo realizado em estufa B.O.D. a 25°C.

Tabela 4.6- Concentração de glicose e biomassa seca (g/L) produzida em 400mL de caldo de batata, sem agitação, durante a etapa de pré-cultivo realizada em B.O.D. a 25°C

Período (dias)	[Glicose]g/L	[Massa Seca] (g/L)
0	26,80	0,725
1	23,30	1,000
2	27,20	1,175
3	23,60	1,625
5	24,80	2,425
7	26,30	3,200
10	24,00	4,000

Através da análise dos dados obtidos e demonstrados na Tabela 4.6, verifica-se uma oscilação na concentração de glicose durante o período de avaliação, sendo possível inferir-se ter havido concomitante produção e consumo de glicose, com intervalos de maior consumo intercalados a outros de maior produção, havendo um aumento de biomassa de forma constante.

Em decorrência da produção de glicose pelo fungo a partir do desdobramento da segunda fonte de carbono (caldo de batata), não foi possível estimar o consumo de glicose; no entanto, observou-se a concentração média de glicose no meio de 25,14 g/L, mantida pelo organismo.

A Figura 4.7 apresenta a cinética de crescimento do *Ganoderma australe*, nas condições apresentadas na Tabela 4.6.

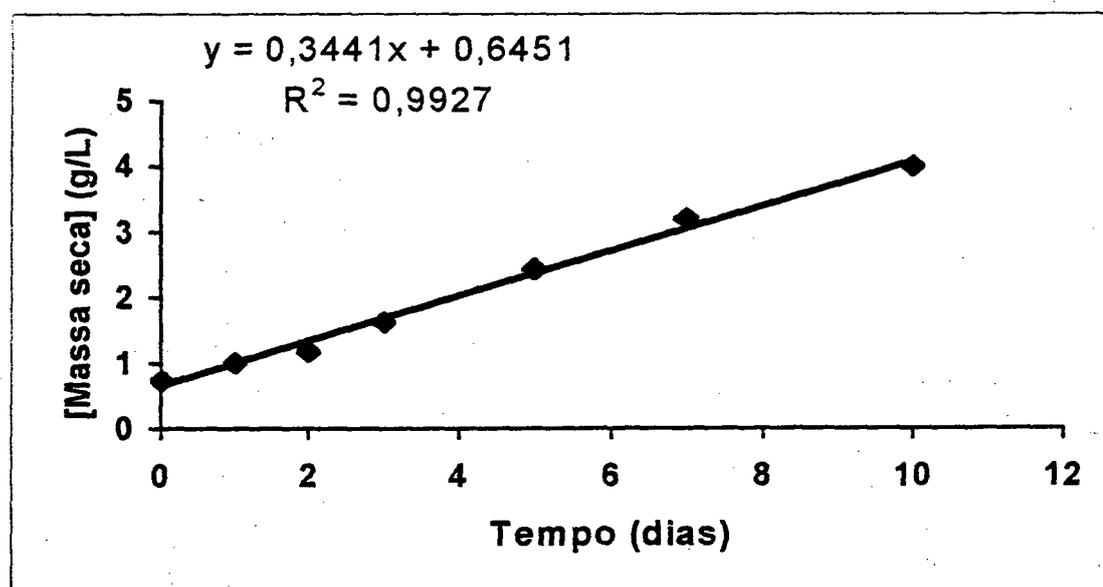


Figura 4.7 – Cinética de crescimento do *Ganoderma australe*, no período de pré-cultivo em estufa B.O.D a 25°C.

Percebe-se que o crescimento ocorreu de forma linear e não exponencial como poderia ter ocorrido. Não foi possível a visualização da fase de adaptação do *Ganoderma australe* ao substrato, fato que confirma a citação de GRIFFIN (1994), quando relata o sistema enzimático e de transporte de glicose, como constitutivos nos fungos.

O crescimento linear implica em uma redução da velocidade específica de crescimento do organismo. Essa constatação pode ser melhor observada na Figura 4.8.

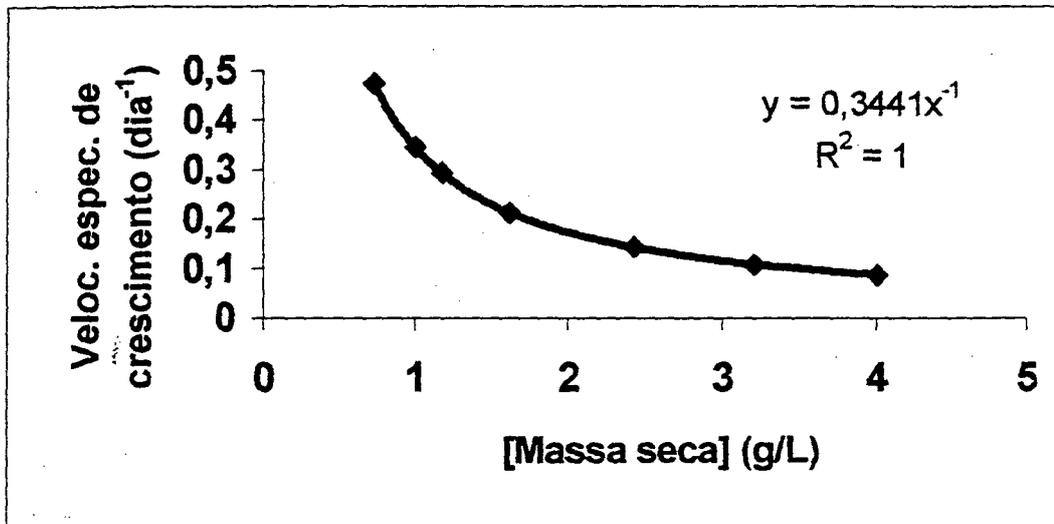


Figura 4.8- Velocidade específica de crescimento do *Ganoderma australe*, no período de cultivo em estufa B.O.D.

A velocidade específica de crescimento é assim inversamente proporcional à concentração da biomassa.

Para confirmar a consistência dos dados obtidos nos ensaios em B.O.D., avaliar o estudo cinético em um período de tempo superior a 10 dias e também, fazer o cultivo em condições de agitação que promovesse maior oxigenação, realizou-se ensaios cinéticos em *Shaker* por um período de 31 dias. Foram usadas as mesmas condições de temperatura (25 °C), pH (5,0) e glicose (30g/L) dos ensaios anteriores, estabelecidas pelo planejamento experimental. Como inóculo do cultivo em *Shaker*, utilizou-se alíquotas retiradas no décimo dia da cultivo em estufa B.O.D..

Os valores de concentração de glicose e biomassa, obtidos na etapa de cultivo do inóculo em *Shaker*, estão expressos na Tabela 4.7.

Tabela 4.7- Concentração de glicose e biomassa (massa seca) produzida em 150mL de caldo de batata, durante a etapa de incubação em *Shaker*, a 25°C.

Período (dias)	[Glicose] g/L	[Massa Seca] (g/L)
0	23,00	1,333
1	23,80	1,533
6	30,00	2,133
11	28,50	5,533
16	28,00	7,000
21	24,40	9,200
26	28,40	11,000
31	30,00	16,666

Analisando a Tabela 4.7, constata-se um comportamento semelhante ao ocorrido com a cultura na primeira etapa, ou seja, oscilação na concentração de glicose, sugerindo a produção e consumo de glicose, ocorrendo de modo paralelo.

O cultivo do pré-inóculo realizado em estufa B.O.D., representado pela Tabela 4.6 apresentou comportamento semelhante ao observado durante o cultivo do inóculo em *shaker* demonstrado na Tabela 4.7, não havendo novamente a possibilidade de estimar o consumo de glicose pelo fungo, pela mesma razão anteriormente exposta. Observou-se porém, um discreto aumento, para 27,01g/L, na concentração média de glicose mantida pelo fungo no meio.

Utilizou-se além da glicose, o caldo de batata como outra fonte de carbono para o fungo. GRIFFIN (1994), cita que carboidratos que produzem glicose são amplamente utilizados como fonte de carbono e energia para fungos, sendo por essa razão, o metabolismo do carbono visto inicialmente como o metabolismo da glicose. Segundo ALEXOPOLUS *et al.* (1996), os fungos possuem nutrição absorptiva e não fixam carbono, portanto, para quebrarem moléculas grandes e relativamente insolúveis, como os carboidratos, liberam enzimas digestivas no meio. Dessa forma, justifica-se o aumento da concentração de glicose observada durante os ensaios cinéticos.

A cinética de crescimento do *Ganoderma australe*, para as condições expressas na Tabela 4.7, é demonstrada pela Figura 4.9.

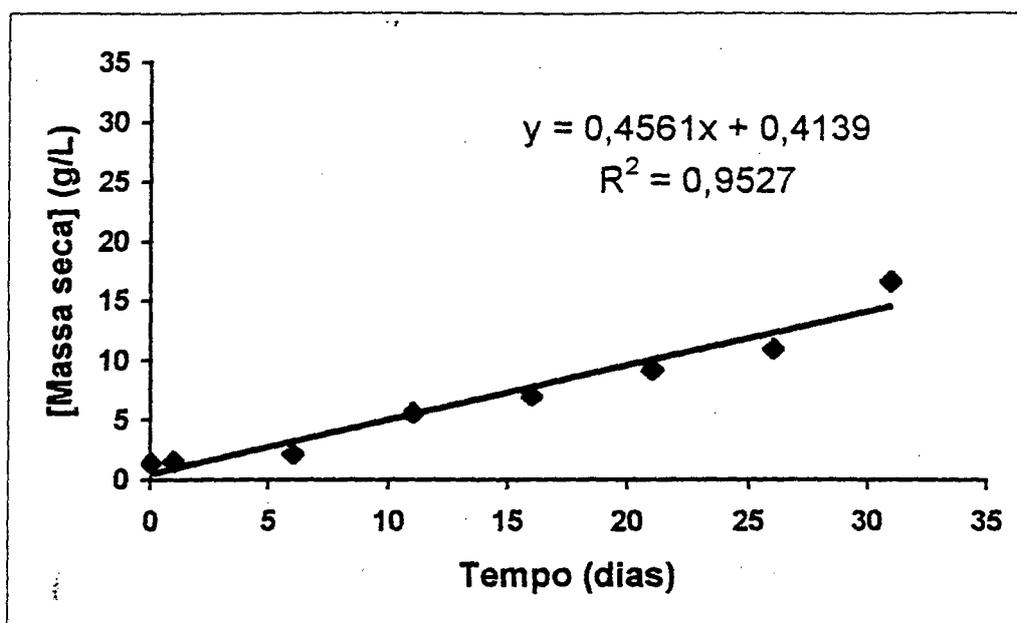


Figura 4.9- Cinética de crescimento do *Ganoderma australe*, na etapa de cultivo em Shaker.

A Figura 4.9 demonstra que o fungo continuou apresentando um crescimento linear, similar ao crescimento ocorrido na primeira etapa (Figura 4.7). Novamente, não foi possível verificar o período de adaptação do organismo ao substrato, pelas mesmas razões citadas anteriormente.

A redução da velocidade específica de crescimento está melhor representada pela Figura 4.10.

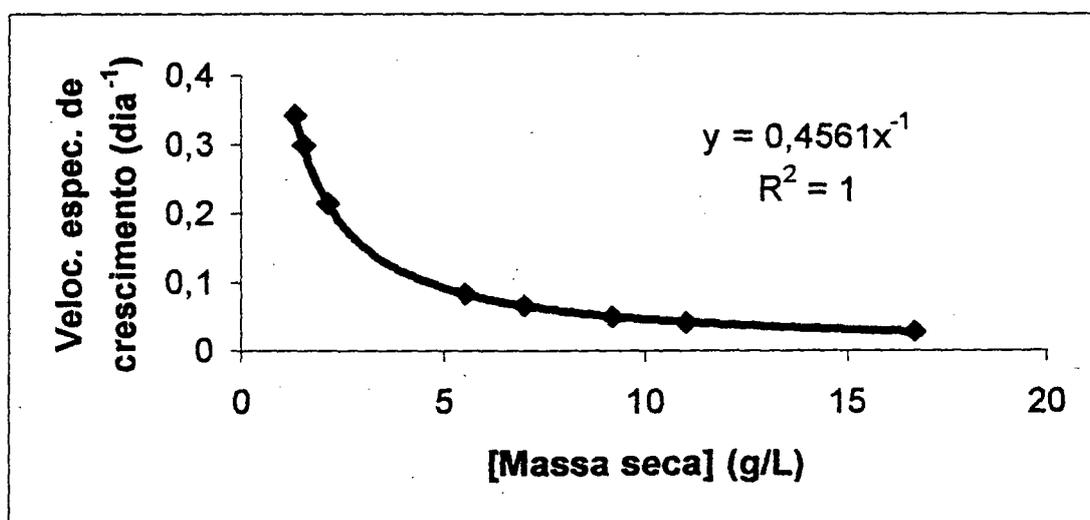


Figura 4.10 - Velocidade específica de crescimento do *Ganoderma australe*, no período de cultivo em Shaker.

Conforme verifica-se nas Figuras 4.9 e 4.11, a redução da velocidade de crescimento ocorre de forma constante. Isto pode indicar que o nutriente limitante está sendo oferecido ao fungo à uma velocidade constante, ou ainda, que esteja ocorrendo um processo de limitação do crescimento do fungo.

Para o experimento em *Shaker* (Figura 4.12) encontrou-se uma velocidade específica de crescimento ($0,4561 \text{ g.dia}^{-1}.\text{L}^{-1}$) superior àquela encontrada para o ensaio em estufa B.O.D (Figura 4.10) onde a velocidade específica foi de $0,3441 \text{ g.dia}^{-1}.\text{L}^{-1}$.

O experimento em *Shaker* tem capacidade de suprir a cultura com maior aeração e difusão de nutrientes que os experimentos em B.O.D. que foram conduzidos de forma estática.

Assim, há uma grande possibilidade de que o oxigênio seja um dos fatores limitantes que impede que o organismo cresça de maneira exponencial. Isto confirma a referência de GRIFFIN (1994) de que o efeito inibitório decorrente da limitação de oxigênio pode ser minimizado pela agitação da cultura, o que também favorece a difusão de nutrientes no meio.

Apesar do aumento da aeração nos ensaios em *Shaker* ter favorecido o crescimento do organismo, esta ainda foi insuficiente para que o oxigênio não fosse o nutriente limitante do crescimento, pois observou-se uma redução na velocidade específica de crescimento. Seria interessante aumentar a velocidade de transferência de oxigênio utilizando biorreatores que ofereçam baixa tensão de cisalhamento, uma vez que o *Ganoderma australe* é um fungo filamentosos e de desenvolvimento lento. Essa condição de alta velocidade de transferência de oxigênio e baixa tensão de cisalhamento pode ser obtida através do cultivo em biorreator não convencional do tipo *loop-reactor*.

A limitação física pode ter sido outro fator importante, pois o fungo, por possuir nutrição absorviva, utiliza o processo de colonização do substrato.

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

A partir da análise dos resultados obtidos no presente trabalho chegou-se às seguintes conclusões:

- ⇒ Todas as variáveis independentes e suas interações apresentaram significância estatística, no planejamento experimental (fatorial 3^2);
- ⇒ A melhor condição de desenvolvimento do isolado de *Ganoderma australe* (cepa ALE 012) ocorreu em pH 5,0 e concentração inicial de glicose em 30 g/L, para a temperatura de 25°C. Nessas condições obteve-se 16,67 g/L de biomassa seca em 30 dias de cultivo;
- ⇒ Constatou-se uma oscilação na concentração de glicose livre no caldo de cultivo, através do monitoramento realizado no período de incubação, inferindo-se uma concomitante produção e consumo de glicose pelo fungo;
- ⇒ O crescimento do fungo ocorreu de forma linear, onde a fase de adaptação do *Ganoderma australe* ao substrato não pode ser visualizada;
- ⇒ A velocidade específica de crescimento do *Ganoderma australe* foi inversamente proporcional à concentração de biomassa, indicando um processo de inibição ou de limitação do crescimento;
- ⇒ A velocidade de crescimento do organismo foi maior no ensaio realizado sob agitação. Experimentos em frascos agitados aumentaram a velocidade de crescimento de 0,3441 para 0,4561g.h⁻¹.L⁻¹, mostrando que o oxigênio pode ser o fator limitante de crescimento.

Sugestões:

- ⇒ Utilizar glicose como única fonte de carbono, a fim de obter parâmetros estequiométricos como a conversão de substrato em biomassa;
- ⇒ Realizar novos ensaios em pHs inferiores a 5,0 e concentrações de glicose superiores a 30 g/L visando um maior ganho na produção de biomassa, uma vez que o ponto de maior produção obtido foi em uma condição de extremidade;
- ⇒ Avaliar a produção de biomassa e estabelecer a cinética de crescimento do *Ganoderma australe* em biorreatores não convencionais "loop-reactors", que oferecem alta transferência de oxigênio com baixa tensão de cisalhamento, uma vez que foi detectado uma possível limitação de oxigênio;
- ⇒ Determinar as concentrações de esteróides e triterpenos produzidos, a partir das condições de desenvolvimento aqui estabelecidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADASKAVEG, J. E. & GILBERTSON, R. L. – Wood decay caused by *Ganoderma* species in the *G. lucidum* complex. In: SIMPOSIUM 59 A, B#. INTERNATIONAL MYCOLOGICAL CONGRESS **Proceedings**, p.79-93, 1994.
- ALEXOPOULUS, C.J; MIMS, C.W. & BLACWELL, M. (1996). **Introductory mycology**. Ed. John Wiley & Sons, New York, 865p.
- AMOLAK, C. J. AND SUSHIL, K. G. – The isolation of Lanosta-7,9(11),24-trien-3 β ,21-diol from the fungus *Ganoderma australe*. **Phytochemistry**, **26**, p.686-687, 1984.
- AGOSIN, E.; BLANCHETTE, R. A.; SILVA, H.; LAPIERRE, C.; CEASE, K. R.; IBACH, R. E.; ABAD, A. R. & MUGA, P. – Characterization of palo podrido, a natural process of delignification in wood. **Applied and Environmental Microbiology**, **56**: 65- 74, 1990.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S. and BRUNS, R.E. (1996). **Planejamento e Otimização de Experimentos**, 2ª edição, Ed. Unicamp, Campinas, SP, 299p.
- BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, AMORIN, L.. (1995). **Manual de Fitopatologia**, Vol. II, 3ª Ed., Editora Agronomica CERES LTDA. São Paulo, SP, 919p.
- BOX, G.E.P. HUNTER, W.G. AND HUNTER, J.S. (1978). **Statistics for Experiments**. An introduction to design, data analysis and model building, 653p.

CHANG, R.S.; TABBA, H.D.; SMITH, K.M. Dextran sulfate as an inhibitor against the human immunodeficiency virus. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, **189**: 304-309, 1988.

CHEN, D.H.; SHION, W.Y.; WANG, K.C.; HUANG, S.Y.; SHIE, Y.T.; TSAI, C.M.; SHIE, J.F.; CHEN, K.W. Chemotaxonomy of triterpenoid pattern of HPLC of *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, **46**: 47-51, 1999.

CHEUNG, H.Y.; NG, C.W.; HOOD, D.J. Identification and quantification of base and nucleoside markers in extracts of *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma japonicum* and *Ganoderma* capsules by electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, **911**: 119-126, 2001.

FERREIRA, P.V. (1996). **Estatística Experimental aplicada à Agronomia**. 2ª Ed. Editora da Universidade Federal de Alagoas. Maceió, Al, 606p.

FURIGO, A. JR. (1995). Estudo do Processo de Obtenção de Proteínas celulares a partir de Gás Natural. **Tese de Doutorado** (Engenharia Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ.

GERBER, A.L. (2000). Esteróis e triterpenos de *Ganoderma australe* (Fr.) Pat. com perspectivas de uso medicinal. **Dissertação de Mestrado** (Biotecnologia) Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.

GRIFFIN, D.H. (1994). **Fungal physiology**. 2ª Ed. Editora Wiley-Liss, New York, USA, 458p.

KIM, H. W.; SHIM, M. J.; CHOI, E. C.; KIM, B. K. – Inhibition of cytopathic effect of human immunodeficiency virus – 1 by water soluble extract of *Ganoderma lucidum*. **Archives of Pharmacal Research**, **19** (suppl. 6), p.447- 449, 1996.

KUBOTA, T.; ASAKA, Y.; MIURA, I.; MORI, I. –62: Structures of ganoderic acid A and B, two new lanostane type bitter triterpenes from *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. **Helvetica Chimica Acta**, **65** (suppl.2): 6111-619, 1982.

LEITE, C. L. – **Classificação dos principais grupos taxonômicos de fungos**. Florianópolis, SC. 38p, 2000. (Fermentation Technology – módulo II)

LIU, G.T. Recent Advances in research of pharmacology and clinical applications of *Ganoderma* P. Karst species (Aphyllphoromycetideae) in China. **International Journal of Medicinal mushrooms**. Vol 1, p.63-67, 1999.

LOUGUERCIO-LEITE, C. - Revisão histórica sobre fungos poliporoides (Aphyllphorales) xilófios de Santa Catarina, Brasil. **Insula**, **20**:3-10, 1999.

MARTINEZ, A. T.; BARRASA, J. M.; ALMENDROS, G & GONZALEZ, A. E. – Fungal transformation of lignocellulosics as revealed by chemical and ultrastructural analyses. **Advances in Biological Treatment of Lignocellulosic Materials**. p.129-147, 1990.

MARTINEZ, A. T.; BARRASA, A.; PRETO, A. AND BLANCO, M. N. – Fatty acid composition and taxonomic status of *Ganoderma australe* from Southern Chile. **Mycol. Res.** **95**, (7), p.782-784, 1991.

MELO, I. – Studies on the Aphyllphorales of Portugal: the genus *Ganoderma* P. Karst. **International Journal of Mycology and Lichenology**, **2** (suppl.2-3), p.183-204, 1986.

MIZUNO, T.; WANG, G.; ZHANG, J.; KAWAGISHI, H.; NISHITOBA, T.; LI, J. Reishi, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*: bioactive substances and effects medicinal. **Food Reviews International**, **11**(1): 151-166, 1995.

- NAVARRO, C. (1996). Otimização de um meio de cultura para produção de *Candida utilis* a partir de glicerol. **Dissertação de Mestrado** (Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.
- NISHITOBA, T.; SATO, H.; KASAI, T.; KAWAGISHI, H.; SAKAMURA, S. **Agric. Biol. Chem.** **48**, 2095, 1984.
- NUNES, J.C.O.; PERETTI, R. E FORTES, G.R.L. – Controle de contaminações *in vitro*, na propagação da batata (*Solanum tuberosa*). **REDBIO**, Puerto Iguazú, Argentina, 1995.
- RYVARDEN, L. – **Gênero de Polypores: nomenclature and taxonomy**. Oslo, Fungiflora, 1991. 363p. (Sinopsis Fungorum 5)
- SANTOS, F. (1998). Obtenção de cebola seca utilizando pré-tratamento por desidratação osmótica em mistura de solutos. **Dissertação de Mestrado** (Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.
- SEONG-KUG, EO; YOUNG-SO, KIM; CHONG-KIL, LEE; SEONG-SUN, HAN. Possible mode antiviral activity of acidic protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* on herpes simplex viruses. **Journal of Ethnopharmacology**, **72**: 475-481, 2000.
- SHIAO, M. S.; LEE, K. R.; LIN, L. J.; WANG, C. T. – Natural products and biological activities of the chinese medicinal fungus *Ganoderma lucidum*. **Food phytochemicals for cancer prevention II: teas , spices and herbs**. Washington DC, American Chemical Society, p.342-354, 1954.
- SHIMIZU, A.; YANO, T.; SAITO, Y.; INADA, Y. **Chemical Pharmacology**. **Bull.33**: 3012, 1985.

- SMÂNIA, A. JR. (1995). Estudo da atividade antimicrobiana do *Pycnoporus sanguinius* (L.:Fr.) Murr. **Tese de Doutorado** (Microbiologia), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ.
- STEYART, R. L. – The concept and circumscription of *Ganoderma tornatum* (Pers.) Bres. **Transactions British Mycological Society**, **65** (suppl.3), p.451-567, 1975.
- TEIXEIRA, R.M. (1999). Otimização das condições de cultura para produção de acetoina por *Hanseniospora guilliermondii*. **Dissertação de Mestrado** (Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.
- TSENG, T.C.; SHIAO M.S.; SHIEH, Y.S.; HAO, Y.Y. Study on *Ganoderma lucidum* 1. Liquid culture and chemical composition of mycelium. **Botanical Bull Academia Sinica**, **25**: 149-157, 1984.
- YANG, F.C. & LIAU, C.B. The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. **Process Biochem**, **33**:547-553, 1998.
- YEH, Z. Y. & CHEN, Z. C. – Preliminary investigations of *Ganoderma australe* (Subg. *Elfvigia*) in Taiwan. **Taiwanla**, **35** (suppl. 2), p.127-141, 1990.
- YU, J.G.; ZHAI, Y.F. Yao Hseuh Pao **14**: 374, 1979.