

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DETECÇÃO DE ANTIMICROBIANOS E ENZIMAS DE
BASIDIOMYCETES DA AMAZÔNIA, BRASIL

HELENIRES QUEIROZ DE SOUZA

MANAUS

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

HELENIRES QUEIROZ DE SOUZA

DETECÇÃO DE ANTIMICROBIANOS E ENZIMAS DE
BASIDIOMYCETES DA AMAZÔNIA, BRASIL

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor(a) em Biotecnologia, área de concentração Agroflorestal.

Orientador: Prof. Luiz Antonio de Oliveira, Ph.D.

MANAUS

2006

Ficha Catalográfica
Catalogação na fonte pela Biblioteca Central da
Universidade Federal do Amazonas

xxx

SOUZA, Helenires Queiroz de,
DETECÇÃO DE ANTIMICROBIANOS E ENZIMAS DE BASIDIOMYCETES DA
AMAZÔNIA, BRASIL/ Helenires Queiroz de Souza. – Manaus: UFAM, 2006.

Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas.

171p. ilustr.

1. Fungos 2. Biotecnologia 3. Bioensaios

I. Título

CDU

HELENIRES QUEIROZ DE SOUZA

DETECÇÃO DE ANTIMICROBIANOS E ENZIMAS DE
BASIDIOMYCETES DA AMAZÔNIA, BRASIL

Tese apresentada ao Programa Multi-Insitucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor(a) em Biotecnologia, área de concentração Agroflorestal.

Aprovada em 31 de maio de 2006.

BANCA EXAMINADORA

1 - Luiz Antonio de Oliveira Ph.D. (INPA)

2 - Dra. Rosalee Coelho Netto (INPA)

3 – Dra. Adriana Sotero Martins

(FIOCRUZ/AM)

4 – Dra. Yamile Benaion Alencar (INPA)

5 – Dr. Ari de Freitas Hidalgo (UFAM)

*Aos meus pais, Flora Queiroz e José Ribamar
e aos meus irmãos, Reinaldo e Reginaldo.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

- ❖ Agradeço a Deus pelo dom da vida e por ter iluminado o meu caminho para que eu pudesse estudar e chegar aqui.

- ❖ A Universidade Federal do Amazonas e ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, pela acolhida para os estudos e desenvolvimento da pesquisa;

- ❖ A Superintendência da Zona Franca de Manaus (SUFRAMA), pela concessão da bolsa de doutorado;

- ❖ Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Antonio de Oliveira, pelo carinho, amizade, apoio e incentivo durante o desenvolvimento da tese;

- ❖ Ao Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela grande dedicação ao nosso Curso.

- ❖ Aos professores e aos meus colegas de turma, pela convivência durante as disciplinas;

- ❖ À secretária do curso, Angela Neiva, pela dedicação;

- ❖ Aos meus colegas do Laboratório de Microbiologia do Solo, Arlem, Aloísio, Andréa, André, Débora, Elisabeth, Auxiliadora, Thana, Mariana, Lorena, Arthur, Anilson, Rodinei e Francisco pela amizade.

- ❖ Aos funcionários do Laboratório D. Benedita Correia, Sr. Aurino Façanha e Sr. Adilson Dantas, pelos cuidados com o material utilizado em laboratório.

- ❖ À Dra. Rosalee Coelho e a Dra. Lúcia Yuyama, pelo fornecimento das bactérias-teste.

- ❖ A Dra. Maria da Paz e as colegas do Laboratório de Química de Produtos Naturais/CPCN, Lyege Magalhães, Darlene Pinto e Loretta Enne pelo auxílio no processo de partição do filtrado de cultura.

- ❖ A Dra. Jerusa Souza da CPCA/INPA, pelo auxílio nos ensaios de amilases e proteases.

- ❖ Ao Prof. Dr. Ari de Freitas Hidalgo, pela orientação no estágio de docência na disciplina Plantas Medicinais (UFAM).

- ❖ À Dra. Rosana Maziero, pelas sugestões e envio de literatura.

- ❖ A minha mãe Flora Queiroz, pelo carinho e apoio na realização dos meus estudos.

- ❖ Enfim, a todas as pessoas que colaboraram para a realização deste trabalho.

*“Concedei-me Senhor, a serenidade necessária,
Para aceitar as coisas que não posso modificar.
Coragem, para modificar aquelas que posso.
Sabedoria, para distinguir umas das outras”.*

Oração da serenidade

RESUMO

A classe Basidiomycetes é formada por aqueles fungos chamados de cogumelos e orelhas-de-pau, além de outros grupos menos conhecidos. Devido à importância deste grupo de fungos, o presente trabalho teve como objetivo investigar o seu potencial biotecnológico quanto à produção de antimicrobianos e enzimas. Os basidiomas dos fungos foram coletados em áreas de floresta do campus da UFAM, do Bosque da Ciência, Campus/V8 e Reserva de Campina do INPA, localizada na BR 174, km 45, Manaus/AM e Urucu em Coari/AM. Após o isolamento micelial, os fungos foram avaliados quanto ao crescimento radial em meio sólido. Para verificar a produção de antimicrobianos, os fungos foram cultivados em meio líquido BD e GPY durante 30 dias, em repouso a 28°C. Após esse período, o micélio foi seco para determinar a biomassa e os filtrados das culturas foram testados contra *Ralstonia solanacearum*, agente da murcha de várias espécies vegetais, *Corynespora* sp., *Colletotrichum* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Salmonella anatum*. Quanto à produção de enzimas, os fungos foram cultivados em meio líquido e testados em meio sólido para proteases, amilases, celulases, pectinases e fenoloxidasas. Em outra etapa, foi estudada a produção de amilases e proteases em diferentes fontes nutricionais. Foram coletados 60 fungos, de fevereiro a junho de 2003, e identificadas as famílias Agaricaceae, Auriculariaceae, Cantharellaceae, Ganodermataceae, Hygrophoraceae, Polyporaceae, Russulaceae, Stereaceae, Tremellaceae e Tricholomataceae. A Reserva de Campina foi a que apresentou maior diversidade de fungos. Todas as 18 amostras de filtrados de cultura dos Basidiomycetes, utilizadas nos bioensaios, apresentaram efeito inibitório contra um ou mais microrganismos-teste. As espécies *E. coli*, *S. anatum* e *B. cereus*, além de halos de inibição, apresentaram halos de estímulo de crescimento. Não foi observado efeito inibitório contra os fungos *Corynespora* sp. e *Colletotrichum* sp. O filtrado do fungo *Trametes* sp., cultivado em meio GPY, foi o que apresentou maior atividade de inibição. O meio de cultura BD favoreceu maior produção de biomassa seca. Dos dez fungos estudados, foi detectada a produção de proteases e celulases por todos os isolados, quatro produziram amilases, cinco fenoloxidasas e um pectinase. Para a produção de amilases, os fungos cultivados em meio acrescido de farelo de trigo apresentaram os maiores halos. Para a produção de proteases, os maiores halos foram observados para os fungos crescidos em meio com farinha de peixe.

Palavras chave: Fungos, Biotecnologia, Bioensaios.

ABSTRACT

The Class Basidiomycetes is formed by those fungi called mushroom and ar-of-wood, beyond others groups less known. Due to the importance of this group of fungi, the biotechnological potential was investigated in this study. The mushroom were collected in forest areas of campus of University of Amazonas (UFAM), Bosque da Ciência and campus V8 (INPA), Reserva de Campina (INPA), located in BR 174, km 45, Manaus, Amazonas and Urucu (Coari/AM). After the isolation micelial, the fungi were evaluated as regards the growth at 28°C, for 30 days in liquid cultures GPY and BD to determine the antimicrobial activity. The samples were filtered and the mycelium was dry to determine the biomass. The culture filtrates had been tested against *Ralstonia solanacearum*, agent of bacterial wilt of several vegetal species, *Corynespora* sp., *Colletotrichum* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Salmonella anatum*. For an enzyme production study, the fungus had been cultivated in liquid culture and tested in solid medium for proteases, amylases, cellulases, pectinases and phenoloxidases. In another stage, the production of amylases and proteases in different nutritives sources was studied. Sixty samples of Basidiomycetes were collected from February to June 2003. The families Agaricaceae, Auriculariaceae, Cantharellaceae, Ganodermataceae, Hygrophoraceae, Polyporaceae, Russulaceae, Stereaceae, Tremellaceae e Tricholomataceae had been identified. The Reserva de Campina was the one that presented greater diversity of fungi. The results demonstrated inhibitory effect of culture filtrates against bacterial strains tested. The species *E. coli*, *S. anatum* and *B. cereus*, beyond inhibition halos, had presented halos of grown stimulus. It was not effect against the fungi *Corynespora* sp. and *Colletotrichum* sp.. The culture filtrate *Trametes* sp. presented greater activity of inhibition. The medium BD favored greater production of dry biomass. The production of protease an amylase was detected for all the isolated ones, four produced amylases, five produced phenoloxidases and one produced pectinase. For production of amylases, fungi cultivated in medium added of wheat bran had gotten biggest halos. For proteases, the biggest halos had been observed for the fungi grown in way with fish flour.

Key words: Fungi, Biotechnology, Biological assays.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Frequência das ordens de Basidiomycetes coletadas.....	25
Figura 2 – Ordens de Basidiomycetes estudadas e locais de coleta.....	26
Figura 3 - Famílias de Basidiomycetes coletadas em floresta de terra-firme.....	26
Figura 4 - Curva de crescimento micelial comparativo entre as linhagens de Basidiomycetes estudadas cultivadas em meio BDA: <i>Trametes</i> sp. 11E4, <i>Pycnoporus sanguineus</i> 12B, <i>Ganoderma applanatum</i> 15B2, <i>Daedalea</i> sp. 1A, <i>Pleurotus</i> sp. 1C4, Stereaceae 22B, <i>Ganoderma</i> sp. 2A2, <i>Cantharellus guyanensis</i> 4B1, <i>Daedalea</i> sp. 4E6, <i>Stereum</i> sp. 6D2.....	52
Figura 5 - Curva de crescimento micelial comparativo entre as linhagens de Basidiomycetes estudadas cultivadas em meio ágar-malte: <i>Trametes</i> sp. 11E4, <i>Pycnoporus sanguineus</i> 12B, <i>Ganoderma applanatum</i> 15B2, <i>Daedalea</i> sp. 1A, <i>Pleurotus</i> sp. 1C4, Stereaceae 22B, <i>Ganoderma</i> sp. 2A2, <i>Cantharellus guyanensis</i> 4B1, <i>Daedalea</i> sp. 4E6, <i>Stereum</i> sp. 6D2.....	52
Figura 6 - Curva de crescimento micelial comparativo entre as linhagens de Basidiomycetes estudadas cultivadas em meio FTA: <i>Pycnoporus sanguineus</i> 12B, <i>Ganoderma applanatum</i> 15B2, <i>Daedalea</i> sp. 1A, <i>Pleurotus</i> sp. 1C4, Stereaceae 22B, <i>Ganoderma</i> sp. 2A2, <i>Cantharellus guyanensis</i> 4B1, <i>Stereum</i> sp. 6D2.....	55
Figura 7 – Aspecto do crescimento micelial radial do isolado <i>Ganoderma</i> sp. 2A2 cultivado em ágar-malte, após sete dias de cultivo.....	56
Figura 8 – Procedimento de riscagem de bactérias em meio sólido.....	67
Figura 9 - Notas aplicadas ao crescimento bacteriano em placas de Petri com meio sólido.....	67

Figura 10 - Efeito de filtrados de cultura de Basidiomycetes sobre bactérias patogênicas: A. Formação de halos duplos de inibição em <i>Staphylococcus aureus</i> ; B. Halo de inibição em <i>S. aureus</i> ; C. Halo de inibição em <i>Escherichia coli</i> ; D. Crescimento diferenciado em <i>E. coli</i> ; E. Halo de inibição em <i>Bacillus cereus</i> ; F. Crescimento diferenciado em <i>Salmonella anatum</i>	74
Figura 11 - Frequência de isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> inibidos por filtrados de cultura de Basidiomycetes cultivados em BD e GPY: Stereaceae 22B, <i>Pleurotus</i> sp. 1C4, <i>Trametes</i> sp. 11E4, <i>Daedalea</i> sp. 4E6, <i>Ganoderma</i> sp. 2A2, <i>Pycnoporus sanguineus</i> 12B, <i>Daedalea</i> sp. 1A, <i>Cantharellus guyanensis</i> 4Bl, <i>Stereum</i> sp. 6D2.	78
Figura 12 - Halo de inibição de <i>Ralstonia solanacearum</i> . Diâmetro do disco de papel de filtro = 6mm.	78
Figura 13 - Frequência do diâmetro de halos de inibição de <i>Ralstonia solanacearum</i> por filtrados de cultura dos Basidiomycetes estudados.	79
Figura 14 – Aspecto do crescimento dos fungos em meio líquido após 30 dias de incubação: A) <i>Trametes</i> sp. 11E4, B) <i>Stereum</i> sp. 6D2, C) <i>Daedalea</i> sp. 1A, D) <i>Daedalea</i> sp. 4E6, E) Stereaceae 22B, F) <i>Pycnoporus sanguineus</i> 12B, G) <i>Ganoderma</i> sp. 2A2, H) <i>Cantharellus guyanensis</i> 4Bl, I) <i>Pleurotus</i> sp. 1C4.	82
Figura 15 - Produção de biomassa seca por Basidiomycetes cultivados em meios líquidos BD e GPY, incubados a 28°C por 30 dias.	83
Figura 16 – Halos de inibição (mm) produzidos por filtrados de cultura de Basidiomycets em culturas de <i>Ralstonia solanacearum</i> utilizando a técnica “cup plate”.....	89
Figura 17 - Produção de biomassa seca pelo fungo durante o cultivo micelial e notas de crescimento bacteriano (nota 1,0 corresponde a ausência visível de crescimento de <i>R. solanacearum</i>).	94
Figura 18 – Efeito do filtrado de cultura de <i>Trametes</i> sp. em cultura de <i>Ralstonia</i>	

solanacearum. A) ausência de crescimento bacteriano (tratamento 8), B) crescimento da bactéria (tratamento 14). 97

Figura 19 - Perfil da cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC) em placas de gel de sílica GF₂₅₄, das frações do filtrado de cultura de *Trametes* sp.: fase acetato de etila 1 (1), fase hexano (2), fase diclorometano (3), fase butanol (4), fase aquosa (5). A) Placa de cromatografia observada sob luz UV 366 nm, B) Placa de cromatografia revelada com vanilina sulfúrica e aquecimento (110°C). Fase móvel: acetato de etila. 100

Figura 20 - Análise por cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC) das frações 2 e 3 (fase hexano e fase diclorometano): A) Fase móvel hexano: acetato de etila 9:1; B) Fase móvel diclorometano; C) Fase móvel diclorometano: acetato de etila 9:1; D) Fase móvel diclorometano: acetato de etila 8:2; E) Fase móvel diclorometano: acetato de etila 1:1. Todas reveladas com vanilina e aquecimento (110°C). 101

Figura 21 - Perfil da cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC) em placas de gel de sílica GF₂₅₄, da fase acetona do filtrado de cultura de *Trametes* sp., revelada com vanilina sulfúrica e aquecimento (110°C). A) Fase móvel diclorometano: acetato de etila 1:1, B) Fase móvel acetato de etila. Notar “spot” azul (↑). 102

Figura 22 - Ensaio das frações FA (1), FH (2), FD (3), FB (4), e Faq (5) contra a linhagem V55 de *Ralstonia solanacearum* crescida em meio sólido LPGA. A e B) Halos de inibição ocasionado pela fração hexânica FH (2); C) Controle: discos com água ou discos secos; D) Controle: discos com solventes metanol e diclorometano. 103

Figura 23 - Espectro de infravermelho da fase acetato de etila 1 (FA1) do filtrado de cultura do isolado *Trametes* sp. 11E4. 105

Figura 24 - Espectro de infravermelho da fase acetato de etila 2 (FA2) do filtrado de cultura do isolado <i>Trametes</i> sp. 11E4.	106
Figura 25 - Espectro de infravermelho da fase butanol (FB) do filtrado de cultura do isolado <i>Trametes</i> sp. 11E4.	107
Figura 26 - Espectro de infravermelho da fase diclorometano (FD) do filtrado de cultura do isolado <i>Trametes</i> sp. 11E4.	108
Figura 27 - Espectro de infravermelho da fase hexano (FH) do filtrado de cultura do isolado <i>Trametes</i> sp. 11E4.	109
Figura 28 - Espectro de infravermelho da fase aquosa (Faq) do filtrado de cultura do isolado <i>Trametes</i> sp. 11E4.	110
Figura 29 - Detecção de enzimas produzidas por Basidiomycetes: A) Celulases, B) Pectinases, C) Proteases, D) Amilases e E) Fenoloxidasas	121
Figura 30 – Halos (zona clara ao redor dos “cup plate”) da amilase produzida pelos Basidiomycetes cultivados em diferentes fontes de carbono.	129

Figura 31 - Correlação entre o diâmetro dos halos e a atividade enzimática para a fonte de carbono amido. *Significativo a 5%. 133

Figura 32 - Correlação entre o diâmetro dos halos e a atividade enzimática: A) Farelo de trigo; B) Maltose. ^{NS} Não significativo a 5%. 134

Figura 33 - Correlação entre o diâmetro dos halos e a atividade enzimática da protease de Basidiomycetes cultivados em meio líquido acrescido de gelatina. ns = Não significativo a 5%..... 140

Figura 34 - Correlação entre o diâmetro dos halos e a atividade enzimática da protease de Basidiomycetes cultivados em meio líquido acrescido de concentrado protéico de peixe. ns = não significativo a 5%. 141

Figura 35 - Correlação entre o diâmetro dos halos e a atividade enzimática da protease de Basidiomycetes cultivados em meio líquido acrescido de farelo de soja. ns = Não significativo a 5%; * Significativo a 5%. 142

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de Basidiomycetes ocorrentes em floresta de várzea, floresta de igapó e campinarana na Amazônia.	02
Tabela 2 - Compostos com atividade biológica produzidos por Basidiomycetes.....	15
Tabela 3 - Basidiomycetes coletados na mata do mini-campus da Universidade Federal do Amazonas em 27/02/03 em Manaus.	27
Tabela 4 - Basidiomycetes coletados na Reserva de Campina (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia) em 12/03/03 em Manaus.	28
Tabela 5 - Basidiomycetes coletados no INPA (Bosque da Ciência e Campus V8). .	30
Tabela 6 - Basidiomycetes coletados em Urucu, Coari/AM (março e abril/2003).....	31
Tabela 7 - Classificação das linhagens de Basidiomycetes de acordo com a velocidade do crescimento micelial (cm por dia) em BDA, FTA e Ágar-malte.....	55
Tabela 8 – Origem dos isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> estudados.....	62
Tabela 9 - Tratamentos realizados para avaliação da produção de antimicrobianos durante oito semanas do cultivo do isolado <i>Trametes</i> sp. 11E4, contra <i>Ralstonia solanacearum</i> V55.	66
Tabela 10 - Tratamentos utilizados para avaliação de filtrados de cultura do isolado <i>Trametes</i> sp. 11E4 sobre o crescimento de <i>Ralstonia solanacearum</i>	68
Tabela 11 - Pontos de ebulição dos solventes utilizados no processo de partição.....	70
Tabela 12 – Média dos halos (diâmetro em mm) produzidos por metabólitos	

extracelulares de Basidiomycetes da Amazônia contra bactérias patogênicas.....	75
Tabela 13 - Isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> (Smith 1896) Yabuuchi et al. 1996 sensíveis a metabólitos antimicrobianos produzidos por Basidiomycetes cultivados em meio líquido BD e GPY.	77
Tabela 14 - Características do micélio e produção de biomassa dos fungos cultivados em meio líquido.	86
Tabela 15 - Média de halos de inibição (mm) de <i>Ralstonia solanacearum</i> produzidos por filtrados de cultura de Basidiomycetes.	88
Tabela 16 - Concentração de glicose e proteína dos filtrados de cultura de Basidiomycetes.	93
Tabela 17 - Avaliação do efeito de diferentes diluições do filtrado de cultura do fungo <i>Trametes</i> sp. sobre o crescimento de <i>Ralstonia solanacearum</i>	96
Tabela 18 – Características das frações obtidas do filtrado de cultura do fungo <i>Trametes</i> sp.	98
Tabela 19 - Atividade enzimática da protease de Basidiomycetes da Amazônia: média de diâmetros de halos (mm) em meio sólido.	122
Tabela 20 - Atividade enzimática das amilases de Basidiomycetes da Amazônia: média de diâmetros de halos (mm) em meio sólido.	123
Tabela 21 - Atividade enzimática das fenoloxidasas de Basidiomycetes da Amazônia: média de diâmetros de halos (mm) em meio sólido.	124
Tabela 22 - Atividade enzimática das celulasas de Basidiomycetes da Amazônia: média de diâmetros de halos (mm) em meio sólido.	126

Tabela 23 - Médias dos diâmetros dos halos (mm) enzimáticos de amilases produzidas por Basidiomycetes cultivados em diferentes fontes de carbono.	131
Tabela 24 - Atividade da amilase dos Basidiomycetes estudados.	132
Tabela 25 - Biomassa produzida por Basidiomycetes cultivados em diferentes fontes de proteína.	135
Tabela 26 - Médias dos diâmetros dos halos (mm) enzimáticos de proteases produzidas por Basidiomycetes cultivados em diferentes fontes de proteína.	137
Tabela 27 - Atividade enzimática (U/mL) da protease de Basidiomycetes a 25°C e a 40°C.	138

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

kDa	Kilo Dalton
mm	Milímetro
APL	<i>Amanita pantherina</i> Lectina
BD	Batata dextrose
BDA	Batata dextrose agar
BSA	Bovine Serum Albumin (Albumina de soro bovino)
BSF	Bactérias solubilizadoras de fosfato
FTA	Farelo de trigo agar
GPY	Glucose peptone yeast extract (glicose peptona extrato de levedura)
LPG	Levedura peptona glicose
LPGA	Levedura peptona glicose agar
PPO	Polyphenoloxidasas (polifenoloxidasas)
PSK	Krestin
PSPC	Polysaccharide-protein complex (complexo proteína-polissacarídeo)
Rf	Fator de retenção
TLC	Thin layer chromatography (cromatografia de camada delgada)
UV	Ultra violeta
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
CCDC	Cromatografia de Camada Delgada Comparativa
IV	Infravermelho

SUMÁRIO

	Páginas
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO	01
REVISAO DE LITERATURA	02
Classe Basidiomycetes.....	02
Características	07
Ciclo de vida.....	07
Potencial biotecnológico dos Basidiomycetes	08
Bioconversão de resíduos lignocelulósicos	08
Produção de enzimas por fungos.....	08
Produção de metabólitos antimicrobianos por Basidiomycetes.....	11
Natureza química de metabólitos de Basidiomycetes.....	14
Proteínas de cogumelos.....	17
Polissacarídeos de cogumelos.....	18
OBJETIVOS	20
CAPÍTULO 1	
COLETA E ISOLAMENTO DE BASIDIOMYCETES DE ÁREAS DE FLORESTA DE TERRA-FIRME NO AMAZONAS	21
Resumo	
1 – Introdução.....	22
2 – Material e Métodos.....	23
3 – Resultados e Discussão.....	25
4 – Conclusões.....	57
CAPÍTULO 2	
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE BASIDIOMYCETES DA AMAZÔNIA	58
Resumo	
1 – Introdução.....	59
2 – Material e Métodos.....	61
3 – Resultados e Discussão.....	73
4 – Conclusões	111

CAPÍTULO 3	
DETECÇÃO DE ENZIMAS PRODUZIDAS POR BASIDIOMYCETES DA	
AMAZÔNIA	113
Resumo	
1 – Introdução.....	114
2 – Material e Métodos.....	116
3 – Resultados e Discussão.....	120
4 – Conclusões.....	143
CONCLUSÕES FINAIS.....	144
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	146
ANEXOS	164

INTRODUÇÃO

Os fungos popularmente chamados de cogumelos e orelhas-de-pau, além de outros grupos menos conhecidos e sem nome popular que são as ferrugens, os carvões, os fungos gelatinosos, e os "gasteromicetos", pertencem à divisão Basidiomycota, classe Basidiomycetes (HAWKSWORTH *et al.*, 1995).

A biotecnologia é baseada na busca e descoberta de recursos biológicos industrialmente exploráveis. As etapas clássicas deste processo passam pela coleta de material biológico adequado, seguida da seleção e triagem de materiais com os atributos desejados, seleção final do melhor ou melhores candidatos e culmina com o desenvolvimento de um produto comercial ou processo industrial (BULL *et al.*, 2000).

A maioria dos processos biotecnológicos utilizando fungos basidiomicetos baseia-se nos seus produtos metabólicos, como enzimas e polissacarídeos. A importância do aparato enzimático dos basidiomicetos está diretamente relacionada com a bioconversão de resíduos lignocelulósicos, tanto para a produção de alimentos como o cultivo de cogumelos comestíveis (MAU *et al.*, 1991; SONG *et al.*, 1991; STURION & RANZANI, 1997), quanto para a produção de polissacarídeos que podem ser utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. Além disso, este mesmo aparato enzimático está relacionado com os processos de biodegradação de compostos xenobióticos, como na biorremediação de solos contaminados e no tratamento de efluentes da indústria papelreira e têxtil (MATHEUS & OKINO, 1998; VOLK, 1997)

Os Basidiomycetes produzem ainda uma variedade de outros produtos naturais, com atividade antitumoral e imunologicamente ativos até agentes antimicrobianos, antifúngicos, antivirais, citostáticos, enzimas, reguladores de crescimento e aromas (BRIZUELA *et al.*, 1998). Vários metabólitos com atividade antibiótica, obtidos a partir de culturas de Basidiomycetes, têm sido isolados (BENEDICT & BRADY, 1972; SMÂNIA *et al.*, 1998; HATVANI, 2001; ISHIKAWA *et al.*, 2001; MCMORRIS *et al.*, 2002).

Devido à grande importância desse grupo de fungos com representantes medicinais, comestíveis, micorrízicos, entre outras propriedades, este trabalho teve como objetivo detectar o potencial biotecnológico de espécies de basidiomicetos oriundas da Amazônia.

REVISÃO DE LITERATURA

Classe Basidiomycetes

A classe Basidiomycetes reúne 32 ordens, 140 famílias, 473 gêneros e 13.857 espécies (HAWKSWORTH *et al.*, 1995). Para a Amazônia ainda não existe uma lista ou estimativa do número de espécies dessa classe de fungos. Vários levantamentos, entretanto, foram realizados em diferentes ecossistemas amazônicos: floresta de terra firme, campina e campinarana (SINGER & ARAUJO, 1979); floresta de várzea (SINGER, 1984); floresta de igapó (SINGER & AGUIAR, 1986) e reservas biológicas (SOUZA, 2002). Na Tabela 1 são apresentadas algumas espécies de Basidiomycetes ocorrentes na Amazônia.

Tabela 1 - Lista de Basidiomycetes ocorrentes em floresta de várzea, floresta de igapó e campinarana na Amazônia.

Basidiomycetes	Local
<i>Amanita nauseosa</i> (Wakefield) Reid.	Várzea (Ilha da Marchantaria)
<i>Auricularia polytricha</i> (Mont.) Sacc.	Várzea (Ilha da Marchantaria)
<i>Cymatoderma caperatum</i> (Mont. & Berk.) Reid.	Várzea (Ilha da Marchantaria)
<i>Cymatoderma dentriticum</i> (Pers.) Reid.	Várzea (Ilha da Marchantaria)
<i>Dacryopinax spathularia</i> (Schwein.) Martin	Várzea (Ilha da Marchantaria)
<i>Entoloma</i> sp.	Várzea (Ilha da Marchantaria)
<i>Ganoderma resinaceum</i> Boud.	Várzea (Ilha da Marchantaria)
<i>Gymnopilus</i> sp.	Várzea (Ilha da Marchantaria)
<i>Gyrodon adisianus</i> Sing.	Várzea (Ilha da Marchantaria)
<i>Hohenbuehelia hydrogeton</i> Sing.	Várzea (Ilha da Marchantaria)
<i>Hohenbuehelia pergelatiosa</i> Sing.	Várzea (Ilha da Marchantaria)
<i>Janauaria amazonica</i> Sing.	Várzea (Ilha da Marchantaria)
<i>Marasmiellus inoderma</i> (Berk.) Sing.	Várzea (Ilha da Marchantaria)
<i>Marasmius wilsonii</i> Murr.	Várzea (Ilha da Marchantaria)
<i>Megaloporoporia cavernulosa</i> (Berk.) Ryv.	Várzea (Ilha da Marchantaria)
<i>Microporellus dealbatus</i> (Berk. & Curt.) Murr.	Várzea (Ilha da Marchantaria)
<i>Mycena polyadelpa</i> (Lasch.) Kuhner	Várzea (Ilha da Marchantaria)
<i>Neoclitocybe byssiseda</i> (Bres.) Sing.	Várzea (Ilha da Marchantaria)
<i>Panus crinitus</i> (L. ex Fr.) Sing.	Várzea (Ilha da Marchantaria)
<i>Panus prancei</i> (Sing.) Sing.	Várzea (Ilha da Marchantaria)
<i>Pleurotus concavus</i> (Berk.) Sing.	Várzea (Ilha da Marchantaria)
<i>Pleurotus flabellatus</i> (Berk. & Br.) Sacc.	Várzea (Ilha da Marchantaria)
<i>Pleurotus ostreaturoseus</i> Sing.	Várzea (Ilha da Marchantaria)
<i>Pleurotus subtilis</i> (Berk.) Sing.	Várzea (Ilha da Marchantaria)
<i>Pluteus varzeicola</i> Sing.	Várzea (Ilha da Marchantaria)
<i>Podoschypha</i> aff. <i>brasiliensis</i> Reid.	Várzea (Ilha da Marchantaria)
<i>Polyporus dermoporus</i> Pers.	Várzea (Ilha da Marchantaria)
<i>Rigidoporus microporus</i> (Sw. ex Fr.) V.Ov. & W.	Várzea (Ilha da Marchantaria)

<i>Agaricus silvipluvialis</i> Pegler	Vázea (Lago Janauarí)
<i>Agaricus</i> sp.	Vázea (Lago Janauarí)
<i>Collybia phylladophiloides</i> Sing.	Vázea (Lago Janauarí)
<i>Hohenbuehelia hydrogenton</i> Sing.	Vázea (Lago Janauarí)
<i>Hohenbuehelia pergelatiosa</i> Sing.	Vázea (Lago Janauarí)
<i>Hydropus tricholomatoides</i> Sing.	Vázea (Lago Janauarí)
<i>Hygrocybe mutabilis</i> Sing.	Vázea (Lago Janauarí)
<i>Janauaria amazonica</i> Sing.	Vázea (Lago Janauarí)
<i>Lactocollybia aequatorialis</i> Sing.	Vázea (Lago Janauarí)
<i>Lepiota guatopoensis</i> Dennis	Vázea (Lago Janauarí)
<i>Marasmiellus inoderma</i> (Berk.) Sing.	Vázea (Lago Janauarí)
<i>Marasmius adisii</i> Sing.	Vázea (Lago Janauarí)
<i>Marasmius cladophyllus</i> Berk.	Vázea (Lago Janauarí)
<i>Marasmius haematocephalus</i> (Mont.) Fr.	Vázea (Lago Janauarí)
<i>Marasmius inundabilis</i> Sing.	Vázea (Lago Janauarí)
<i>Marasmius januariensis</i> Sing.	Vázea (Lago Janauarí)
<i>Marasmius wilsonii</i> Murr.	Vázea (Lago Janauarí)
<i>Panus</i> aff. <i>caesariatus</i> Pat.	Vázea (Lago Janauarí)
<i>Pleurotus subtilis</i> (Berk.) Sing.	Vázea (Lago Janauarí)
<i>Psathyrella januariensis</i> Sing.	Vázea (Lago Janauarí)
<i>Psathyrella varzeae</i> Sing.	Vázea (Lago Janauarí)
<i>Pulveroboletus rosaemariae</i> Sing.	Vázea (Lago Janauarí)
<i>Tricholomopsis subdecorosa</i> (Murr.) Sing.	Vázea (Lago Janauarí)
<i>Collybia phylladophiloides</i> Sing.	Várzea (Paraná do Janauacá)
<i>Entoloma</i> sp.	Várzea (Paraná do Janauacá)
<i>Entoloma spadiceum</i> Horak. & Sing.	Várzea (Paraná do Janauacá)
<i>Gymnopilus</i> sp.	Várzea (Paraná do Janauacá)
<i>Lactocollybia aequatoriales</i> Sing.	Várzea (Paraná do Janauacá)
<i>Marasmiellus nigripes</i> (Schwein.) Sing.	Várzea (Paraná do Janauacá)
<i>Marasmiellus potamogeton</i> Sing.	Várzea (Paraná do Janauacá)
<i>Mycena osmundicola</i> Lange	Várzea (Paraná do Janauacá)
<i>Pholiota varzeae</i> Sing.	Várzea (Paraná do Janauacá)
<i>Pluteus varzeicola</i> Sing.	Várzea (Paraná do Janauacá)
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (S. ex Fr.) Murr.	Várzea (Paraná do Janauacá)
<i>Abortiporus miniatus</i> Ryvarden	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Amanita</i> sp.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Austrobletus rionegrensis</i> (Sing. & Araujo) Sing.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Baeospora mundula</i> Sing.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Chalciporus trinitensis</i> (Heinemann) Sing. & Araujo	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Clitopilus hobsonii</i> (Berk. & Br.) Orton	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Crepidotus igapoensis</i> Sing.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Entoloma conspicuocystidiosum</i> Horak & Sing.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Entoloma dragonosporum</i> Sing.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Entoloma spadiceum</i> Horak & Sing.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Entoloma viscoauratium</i> Horak & Sing.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Galerina nautica</i> Araujo	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Gloiocephala</i> aff. <i>epiphylla</i> Mass.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Gloiocephala</i> aff. <i>longicrinita</i> Sing.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Gymnopilus igapoensis</i> Araujo	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Gymnopilus marasmioides</i> (Berk.) Sing.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)

<i>Gymnopilus subdepressus</i> Araujo	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Hemimycena</i> sp.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Hohenbuehelia izonetae</i> Sing.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Hydropus fluvialis</i> Sing.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Hydropus gracilis</i> Sing.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Hydropus lacuster</i> Sing.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Hydropus semimarginellus</i> Sing.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Lactarius gigasporus</i> Sing.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Lactarius igapoensis</i> Sing.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Lactarius mamorensis</i> Sing.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Lactarius reticulatus</i> (Berk.) Sing.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Leucocoprinus fragilissimus</i> (Berk. & Curt.) Pat.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Leucocoprinus</i> sp.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Marasmiellus baeosporoides</i> Sing.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Marasmiellus nigripes</i> (Schwein) Sing.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Marasmius leoninus</i> Berk.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Marasmius rotuloides</i> Dennis	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Marasmius</i> sp.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Mycena igapoensis</i> Sing.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Mycena microxantha</i> Sing.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Pluteus agloeotheles</i> (Berk. & Br.) Sacc.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Pluteus melanopotamicus</i> Sing.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Russula amnicola</i> Sing.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Russula metachromatica</i> subsp. <i>tarumaensis</i> Sing.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Russula pluvialis</i> Sing.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Russula puiggarii</i> (Speg.) Sing.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Tylopilus potamogeton</i> Sing.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Tylopilus potamogeton</i> var. <i>aquarius</i> Sing.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Tylopilus potamogeton</i> var. <i>mitis</i> Sing.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Xerocomus amazonicus</i> var. <i>obscuratus</i> Sing. & Araújo	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Xerocomus chapinii</i> Sing.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Xerocomus inundabilis</i> Sing.	Floresta de igapó (Tarumãzinho)
<i>Amanita campinaranae</i> Bas	Floresta de campinarana
<i>Amanita sulcatissima</i> Bas	Floresta de campinarana
<i>Amanita xerocybe</i> Bas	Floresta de campinarana
<i>Boletellus ananas</i> (Curt.) Murr. var. <i>minor</i>	Floresta de campinarana
<i>Cantharellus guyanensis</i> Mont.	Floresta de campinarana
<i>Cortinarius</i> sp.	Floresta de campinarana
<i>Craterellus orinocensis</i> Pat. & Gaill.	Floresta de campinarana
<i>Fistulinella campinaranae</i> Sing.	Floresta de campinarana
<i>Hebelomina amazonensis</i> Sing.	Floresta de campinarana
<i>Inocybe</i> sp.	Floresta de campinarana
<i>Lactarius amazoniensis</i> Sing.	Floresta de campinarana
<i>Lactarius annulifer</i> Sing.	Floresta de campinarana
<i>Lactarius brasiliensis</i> Sing.	Floresta de campinarana
<i>Lactarius reticulatus</i> (Berk.) Sing.	Floresta de campinarana
<i>Lactarius venezuelanus</i> Dennis	Floresta de campinarana
<i>Phyllobolites miniatus</i> (Rick.) Sing.	Floresta de campinarana
<i>Phylloporus gymnocystis</i> Sing.	Floresta de campinarana
<i>Porphyrellum olivaceus</i> Sing.	Floresta de campinarana

<i>Russula nanella</i> Sing.	Floresta de campinarana
<i>Russula orinocensis</i> Pat.	Floresta de campinarana
<i>Russula pachycystis</i> Sing.	Floresta de campinarana
<i>Russula puiggarii</i> (Speg.) Sing.	Floresta de campinarana
<i>Sarcodon atroviridis</i> (Morg.) Baker	Floresta de campinarana
<i>Strobilomyces pauper</i> Sing.	Floresta de campinarana
<i>Tylopilus arenarius</i> Sing. & Araujo	Floresta de campinarana
<i>Tylopilus potamogeton</i> Sing. & Araujo	Floresta de campinarana
<i>Xerocomus</i> aff. <i>brasiliensis</i> (Rick.) Sing.	Floresta de campinarana
<i>Xerocomus amazonicus</i> Sing. & Araujo	Floresta de campinarana
<i>Xerocomus globulifer</i> Sing.	Floresta de campinarana
<i>Xerocomus scrobiculatus</i> Sing.	Floresta de campinarana

Fonte: Singer & Araujo (1979), Singer (1984), Singer & Aguiar (1986).

Características

A maioria das espécies forma corpos de frutificação macroscópico, o basidioma, com hifas modificadas que originam pseudo-tecidos e estruturas de reprodução características, os basídios.

Estes fungos possuem micélio septado e são assim denominados por apresentarem uma hifa especializada denominada basídio. No basídio é onde a cariogamia e a meiose ocorrem, e também onde os basidiósporos haplóides e exógenos são formados (ALEXOPOULOS, 1962; SILVEIRA, 1995).

A célula dos Basidiomycetes não contém plastídios nem centríolo, as mitocôndrias são constituídas por cristas planas e peroxissomos. A parede celular é constituída principalmente por quitina e β -glucanos e a reserva energética por glicogênio e lipídios (MATHEUS & OKINO, 1998; TRABULSI *et al.*, 2002).

A fase vegetativa é denominada de micélio, que por sua vez é formado por muitos filamentos septados chamados hifas. O septo das hifas pode ser simples ou possuir ansas, uma estrutura característica do grupo, e é conhecido como septo dolipórico em função da estrutura complexa que apresentam (SILVEIRA, 1995).

A maioria destes fungos está capacitada para a reprodução sexual e assexual. Os produtos da reprodução sexual, os basidiósporos, podem ser ativamente ou passivamente liberados. A reprodução assexual pode ocorrer por simples fragmentação do talo, brotamento em espécies leveduriformes, ou produção de vários tipos de esporos (ALEXOPOULOS, 1962). Podem crescer em uma fase de levedura ou uma fase filamentosa (hifas). Muitos são capazes de produzir ambas as fases durante alguma parte do seu ciclo de vida, denominado dimórfico.

Ciclo de vida

O ciclo pode ser resumido da seguinte forma: um esporo haplóide liberado do basídio cai em substrato apropriado e germina sob condições ambientais favoráveis, formando hifas e micélio haplóides, denominado micélio primário. Este micélio pode vir a encontrar uma hifa formada por outro esporo, da mesma espécie e também haplóide, que crescia por perto. Ocorre contato entre as hifas compatíveis e ambas sofrem fusão numa hifa nova (anastomose), mas que agora é dicariótica, isto é, com dois núcleos haplóides, formando o micélio secundário. A hifa pode continuar crescendo indefinidamente, mas sob determinadas condições, pode formar o basidioma ou corpo de frutificação. No basidioma, o micélio

assume um crescimento ordenado para formar estruturas ainda estéreis que servirão de suporte para a formação dos basídios. Neste caso, o micélio é chamado de terciário. Os basídios são formados em camada contínua denominada himênio. Nestes basídios ocorre a cariogamia, os núcleos se fundem formando um único, agora diplóide. Após a cariogamia ocorre a meiose, com a formação de quatro núcleos haplóides. Estes núcleos migram por entre os esterigmas e, em seus ápices, cada um deles vai formar um esporo haplóide, uninucleado. Os esporos são liberados ativamente e levados por diversos agentes de dispersão como o vento, água de chuva ou insetos, e assim que chegarem ao substrato apropriado, germinam e recomeçam o ciclo (PUTZKE & PUTZKE, 2004).

Potencial biotecnológico dos Basidiomycetes

Bioconversão de resíduos lignocelulósicos

Resíduos lignocelulósicos podem ser aproveitados como ração animal após o processo de bioconversão por fungos basidiomicetos. Nestes casos, a fermentação sólida aumenta a digestibilidade dos substratos lignocelulósicos destinados à alimentação de ruminantes. A digestibilidade da palha de trigo, por exemplo, pode ser incrementada utilizando-se *Pleurotus* sp. (MATHEUS & OKINO, 1998).

Outra forma de aproveitamento de resíduos é a bioconversão do bagaço de maçã pelo fungo *Pleurotus ostreatus* var. *roseus* associado à levedura *Candida utilis* (Henneberg) Lodder & Kreger-van Rij. Este processo resulta num produto final que pode ser empregado como farinha na alimentação humana, devido ao seu alto teor de proteínas, vitaminas e sais minerais (VILLAS BOAS & ESPOSITO, 2000).

Produção de enzimas por fungos

Enzimas são catalizadores de reações que ocorrem nos sistemas biológicos. Elas possuem eficiência catalítica, em geral, muito maior que aquela dos catalizadores sintéticos. Têm um alto grau de especificidade por seus substratos, aceleram reações químicas específicas e funcionam em soluções aquosas e em condições muito suaves de temperatura e pH (LEHNINGER *et al.*, 1995)

Dependendo do aparato enzimático que possuem, os fungos lignícolas podem ser classificados em dois grupos: causadores de podridão branca - possuem celulases e ligninases, sendo capazes de quebrar as moléculas dos principais componentes da madeira (celulose,

hemicelulose e lignina) e os causadores da podridão parda – que removem seletivamente a celulose e a hemicelulose da madeira (MATHEUS & OKINO, 1998).

A maioria das espécies de basidiomicetos utiliza os componentes da madeira para seu crescimento. A madeira possui ampla gama de nutrientes e é composta de 40-60% de celulose, 10-30% de hemicelulose e 15-30% de lignina, representando uma fonte altamente energética de carbono. Estes carbonos normalmente apresentam-se polimerizados e, portanto, insolúveis (BAUERMANN & GUERRERO, 1996). Para serem utilizados, estes polissacarídeos devem ser primeiro despolimerizados, sendo necessárias enzimas específicas.

Dentre as enzimas de importância industrial, produzidas por fungos, foram abordadas neste trabalho as celulases, fenoloxidasas, pectinases, amilases e proteases.

a) Celulases

As celulases atuam na hidrólise de substratos celulósicos e compreendem um complexo de enzimas celulolíticas compostas por 1) endoglucanase ou endo-1,4- β -glucanase; 2) exoglucanase ou exo-1,4- β -glucanase; 3) celobiase ou β -glucosidase e 4) exoglucosidase ou exo-1,4- β -glucosidase (DA-SILVA *et al.*, 1997). São as enzimas mais utilizadas na indústria têxtil e de papel e celulose (BON & PEREIRA JR., 1999).

A celulose é o mais abundante polissacarídeo, provavelmente o composto orgânico mais abundante sobre a Terra. Além de sua grande importância no ciclo biológico do carbono, possui enorme potencial como uma fonte alternativa de combustível, matéria-prima para a indústria química e conversão para biomassa alimentícia (MULLINGS, 1985). A celulose consiste de um polímero de forma linear, composto por unidades de anidro-D-glicose associados por ligações β -1,4 glicosídicas. Apresenta como unidade funcional a celobiose, um dissacarídeo.

b) Fenoloxidasas

Dentre as fenoloxidasas estão as maiores famílias de enzimas fúngicas ligninolíticas como lacases, lignina peroxidase-LiP e manganês peroxidase-MnP (D'SOUZA *et al.*, 1999). Os mais efetivos biodegradadores de lignina na natureza são os fungos da podridão branca, pertencentes aos basidiomicetos. A maioria produz lacase, fenoloxidase extracelular com importante papel na degradação da lignina. Estas enzimas são utilizadas principalmente na indústria de biopolpação da madeira, aproveitamento de resíduos lignocelulósicos para ração

animal, degradação de xenobióticos e biorremediação (VALMASEDA *et al.*, 1990; BANERJEE & VOHRA, 1991; MATHEUS & OKINO, 1998; D'SOUZA, 1999).

A lignina é o segundo mais abundante biopolímero renovável na natureza. Devido à importância da madeira e outros compostos lignocelulósicos, como recurso para a produção de papel, ração animal, produtos químicos e combustíveis, pesquisas têm sido feitas enfatizando os fungos degradadores da lignina (D'SOUZA *et al.*, 1999). A lignina dá suporte estrutural para as plantas e é um biopolímero tridimensional com uma estrutura composta por unidades moleculares que não se repetem regularmente (MATHEUS & OKINO, 1998). Consiste de compostos polifenólicos altamente insolúveis formados pela polimerização de três precursores principais: álcool trans-p-coumaril, álcool-coniferil e álcool trans-sinapil (DA-SILVA *et al.*, 1997).

c) Pectinases

São enzimas que catalisam a degradação de substâncias pécnicas. Apesar da pectina conter outros açúcares na sua constituição, normalmente o termo pectinases se refere às enzimas que degradam moléculas constituídas por unidades de ácidos galacturônicos (DA-SILVA *et al.*, 1997). São classificadas em despolimerizantes (poligalacturonase, exopoligalacturonase, pectina-liase, pectato-liase) e desmetoxilantes (pectinesterase). Na indústria, as pectinases são usadas na clarificação de sucos de frutas, reduzindo a viscosidade e eliminando a turbidez (BON & PEREIRA JR., 1999).

As pectinas são os principais componentes da lamela média e um dos principais polímeros da parede celular vegetal. Os polissacarídeos pécnicos são ricos em ácido galacturônico, ramnose, arabinose e galactose (THAKUR *et al.*, 1997).

d) Amilases

As amilases hidrolisam os amidos e são classificadas em várias formas, dependendo de como atuam sobre as moléculas de amido. O amido é composto de dois glucanos, a amilose linear, contendo unidades de D-glicose unidas por ligações $\alpha(1-4)$, e a amilopectina ramificada, que consiste de resíduos de D-glicose unidos por ligações $\alpha(1-4)$ contendo, além disso, ramificações formadas por ligações $\alpha(1-6)$ (FRAZIER & WESTHOFF, 1988). Quanto à natureza das ligações hidrolisadas, as amilases podem ser reunidas em cinco classes, α -amilases, β -amilases, Isoamilases, Glucoamilases, Ciclodextrina-glucoamiltransferase

(CORNELIS, 1987). É o principal grupo de enzimas utilizados na indústria de alimentos, principalmente em panificação e biscoitaria (BON & PEREIRA JR., 1999).

Siqueira *et al.* (1997) identificaram em *Pycnoporus sanguineus* (L. ex Fr.) Murr. (Basidiomycetes), uma nova fonte para a produção de α -amilase. Esporos do fungo foram incubados em sistema submerso usando farelo de trigo como fonte de carbono. Altos níveis de atividade β -glicosidase e de xilanase também foram encontrados.

e) Proteases

As proteases ou enzimas proteolíticas incluem as proteinases, as quais catalisam a hidrólise da molécula de proteína em fragmentos grandes, e as peptidases, que hidrolisam estes fragmentos de polipeptídeos até aminoácidos (FRAZIER & WESTHOFF, 1988).

Estas enzimas são usadas em processos industriais de tratamento do couro e peles, na formulação de detergentes e na indústria de alimentos, como na panificação, juntamente com as amilases, sendo responsáveis pela hidrólise do glúten e no processamento de carnes, conservas e peixes (BON & PEREIRA JR., 1999).

Produção de metabólitos antimicrobianos por Basidiomycetes

Diversos compostos com atividade antimicrobiana têm sido isolados e estudados, a partir da cultura submersa de Basidiomycetes, principalmente do fungo comestível *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (HATVANI, 2001; ISHIKAWA *et al.*, 2001; PACCOLA *et al.*, 2001; SASAKI *et al.*, 2001).

O filtrado de cultura de *L. edodes*, obtido de cultivo micelial submerso, possui atividade bacteriostática contra *Streptococcus pyogenes* Rosenbach 1884, *Staphylococcus aureus* Rosenbach 1884 e *Bacillus megaterium* de Bary 1884 (HATVANI, 2001). As características da substância responsável, por este efeito, sugerem que seja a lentionina, um composto antibacteriano e antifúngico.

Ishikawa *et al.* (2001a) avaliaram a atividade antibacteriana de 35 isolados de *L. edodes* contra *Bacillus subtilis* (Ehrenberg 1835) Cohn 1872, pela técnica de difusão em sobrecamada de ágar semi-sólido. Todos os isolados inibiram o crescimento de *B. subtilis*, sendo que *L. edodes* também inibiu o crescimento de bactérias patogênicas e deterioradoras de alimentos, especialmente as Gram-positivas. Ensaio utilizando o filtrado de cultura de 18 a 25 dias de incubação a 18°C, obtido do cultivo de *L. edodes* em meio líquido, demonstraram maior atividade antibacteriana.

O efeito de extratos obtidos de cogumelos comestíveis, como *L. edodes*, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, *Pholiota nameko* (T.Ito) S.Ito & Imai, *Macrolepiota bonaerensis* (Speg.) Raithelh. e *Agaricus blazei* Murril no crescimento da levedura patogênica *Candida albicans* (Robin) Berkhout foi investigado por Paccola *et al.* (2001). Apenas *L. edodes* apresentou efeito fungistático sobre o patógeno. Foi verificado, ainda, que o composto inibitório foi produzido intra e extracelularmente em cultivo submerso, sendo encontrado também, em basidiomas frescos e desidratados.

Linhagens de *L. edodes* também já foram estudadas quanto ao seu efeito inibitório sobre espécies de fungos fitopatógenos e sobre o vírus da estomatite vesicular (sorotipo Alagoas). Duas linhagens de *L. edodes* foram antagônicas aos fungos estudados, *Helminthosporium euphorbiae* Hansford, *Helminthosporium* sp., *Fusarium solani* (Mart.) Appel & Wr., *Phomopsis sojae* Lehman. Verificou-se também a inibição do vírus por duas linhagens de *L. edode* (SASAKI *et al.*, 2001).

Vários relatos confirmam que compostos isolados do corpo de frutificação de *Flammulina velutipes* (Curt.:Fr.) Sing. possuem atividades antitumor e imunomodulatória. Muitos dos compostos isolados são proteínas, polissacarídeos, glicoproteínas, lecitinas, esteróis e monoterpentrióis (WASSER & WEISS, 1999). Dois novos sesquiterpenos tipo cupareno, os enokipodins C e D foram isolados do meio de cultura do cogumelo comestível *Flammulina velutipes*, com os enokipodins A e B. Os compostos A e B são sesquiterpenos tipo cupareno mais altamente oxigenados do que os C e D. Todos os metabólitos apresentaram atividade contra o fungo *Cladosporium herbarum* (Persoon: Fries) Link e as bactérias gram-positivas *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (ISHIKAWA *et al.*, 2001b).

Vários sesquiterpenos têm sido isolados do Basidiomycetes *Omphalotus illudens* (Schw.) Sacc. , entre estes, iludina S e iludina M, bem como iludol, o qual foi o primeiro desta família a ser identificado. Iludina S e M são altamente citotóxicas e exibem atividade antitumor. Certos derivados destes compostos mostram grande aumento de seletividade em toxidez em direção a células malignas comparadas as células normais (McMORRIS & ANCHEL, 1963). Três sesquiterpenos, illudosona hemiacetal, omphadiona e illudiolona foram isolados do extrato de cultura líquida de *O. illudens*. As estruturas foram elucidadas por técnicas espectroscópicas bem como análises de raio- x cristalográfico (McMORRIS *et al.*, 2002).

Musílek *et al.* (1969) estudaram a produção de metabólitos antimicrobianos por *Oudemansiella mucida* (Schrad.: Fries) Höehnel (Basidiomycota). Foi verificado que

filtrados de cultura submersa e de basidiomas de *O. mucida* inibiram o crescimento dos fungos testados, *C. albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex Hansen, *Penicillium restrictum* JC Gilman & EV Abbott, *Fusarium oxysporum* Schlechtendal:Fries, *Aspergillus niger* van Tieghem. Por outro lado, não inibiu o crescimento das bactérias testadas como, *B. subtilis*, *Escherichia coli* (Migula 1895) Castellani & Chalmers 1919, *Bacillus mycoides* Flügge 1886 e *Proteus vulgaris* Hauser 1885.

Pycnoporus sanguineus (L. ex Fr.) Murr e *Trametes cupreorosea* (Berk.) Lloyd são espécies de basidiomicetos utilizados popularmente como medicinais. A espécie *P. sanguineus* é chamada de *urupê-tauá* pelos índios brasileiros e é empregado, por estes, contra a hemoptise (FIDALGO, 1967). O fungo *T. cupreorosea*, ocorrente no Amazonas e Mato Grosso, é indicado para "doenças próprias do sexo feminino", conforme o conhecimento dos caboclos da região a partir dos ensinamentos indígenas de tribos próximas à Cachoeira de Dois Irmãos, Aripuanã/MT (FIDALGO, 1967). Desta forma, verifica-se a importância de estudos para comprovar a produção de substâncias com atividade biológica pelos fungos Basidiomycetes.

Estudos realizados com extratos de cogumelos, em patologias vegetais, demonstraram possíveis efeitos no controle de fitopatógenos, atuando diretamente no agente causal ou ativando respostas de defesa na planta (PACUMBABA *et al.*, 1999; DI PIERO, 2003; TONUCCI, 2004).

Tonucci (2004) estudou o efeito de extratos aquosos do basidiocarpo e do micélio de *L.edodes* sobre microrganismos fitopatogênicos. Foi observada inibição *in vitro* do crescimento micelial e da germinação de conídios de *Colletotrichum sublineolum*, e redução da multiplicação da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (Pereira 1969) Gonçalves & Rosato 2000. Entretanto, não foi observada inibição em *Alternaria solani* (Ellis & Martin) Sorauer. Os extratos adicionados à suspensão de partículas virais TMV (*Tobacco mosaic virus*) ou (vírus do mosaico do tabaco), reduziram a ocorrência de lesões locais nas folhas de plantas de fumo.

O extrato micelial de *L. edodes* preveniu a murcha bacteriana do tomateiro provocada por *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Yabuuchi *et al.* 1996 e a murcha do feijão-lima provocada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hedges 1922) Collins & Jones 1983, quando aplicados em vasos contendo uma mistura de vermiculita e pro-mix (1:1), previamente infestados com as bactérias patogênicas às culturas em questão (PACUMBABA *et al.*, 1999).

Avaliando o efeito de extratos aquosos do basidiocarpo de *L. edodes* e *A. blazei* em patossistemas agrícolas, Di Piero (2003) observou que os cogumelos estudados possuem compostos que ativam respostas de defesa em plantas, podendo auxiliar no controle de doenças vegetais. Em plantas de pepino, os extratos reduziram a severidade da antracnose, não afetando diretamente o agente causal, mas provocando o acúmulo de peroxidases e quitinases nas folhas tratadas. Em tomateiros, o extrato não atuou sobre o patógeno, mas desencadeou o aumento na atividade de β -1,3- glucanases nas folhas em tratamento.

Natureza química de metabólitos de Basidiomycetes

Os Basidiomicetos produzem uma ampla gama de produtos naturais que incluem desde componentes estruturais com atividade antitumoral e imunologicamente ativos até agentes antimicrobianos, antifúngicos, antivirais, citostáticos, enzimas, reguladores de crescimento e aromas.

Os compostos com atividade biológica produzidos por Basidiomicetos têm sido agrupados de acordo com a sua natureza química (Tabela 2). O metabolismo secundário dos basidiomicetos é rico em terpenóides, especialmente sesquiterpenóides, muitos dos quais possuem estruturas que até o momento só têm sido detectadas nesta classe de microrganismos.

Mycena leaiana é um basidiomiceto de cor laranja-brilhante, pertencente aos Agaricales, do qual não se tem muitas informações a respeito da natureza química dos seus pigmentos. Cultivos miceliais deste fungo produzem um composto com atividade antibiótica e citotóxica que se corresponde com o pigmento alaranjado presente no fungo. Estudos químicos e espectroscópicos revelaram que o composto é um sesquiterpenóide derivado de fulveno, denominando-o leianofulveno (HARTTIG *et al.*, 1990).

Dentro dos compostos com atividade antagonista em fungos superiores, os poliacetilenos são os mais amplamente caracterizados. Mais de 50 destes compostos insaturados com atividade antibiótica têm sido isolados a partir de espécies dos gêneros *Clitocybe*, *Coprinus*, *Cortinelus*, *Daedalea*, *Marasmius*, *Merulius*, *Pleurotus*, *Polyporus* e *Poria* (BRIZUELA *et al.*, 1998).

Ganodermediol, lucidadiol e o ácido applanoxidico G foram os primeiros triterpenos isolados do basidiomiceto europeu *Ganoderma pfeifferi* Bres.. Estes compostos mostram atividade antiviral contra os vírus influenza tipo A e HSV tipo 1 (MOTHANA *et al.*, 2003).

Substâncias antifúngicas produzidas por *L. edodes* foram identificadas como álcool de cadeia linear com 8-9 carbonos, com dupla ou tripla ligações (TOKIMOTO *et al.*, 1987).

O agaridin, composto bioativo isolado de corpos de frutificação de *Agaricus xanthodermus*, apresenta atividade antimicrobiana frente a bactérias tanto gram-positivas como gram-negativas, e foi o primeiro composto diazonio isolado de um Basidiomycetes (DORNBERG *et al.*, 1989).

Muitos outros metabólitos com atividade antibiótica obtidos a partir de Basidiomycetes incluem compostos fenólicos, ácidos fenilglicosídicos, purinas, quinonas, derivados terpênicos, etc. (BENEDICT & BRADY, 1972).

Tabela 2 - Compostos com atividade biológica produzidos por Basidiomycetes.

Natureza química	Microrganismo	Atividade	Produto	Autor
Sesquiterpenos e compostos relacionados	<i>Merullius</i> ,	Antimicrobiana,	Merulidial,	Brizuela <i>et al.</i> (1998)
	<i>Marasmius</i> ,	antifúngica,	Naematolin,	
	<i>Naenatoloma</i> ,	antiviral, citotóxica,	Naematolon,	
	<i>Pleurotellus</i> ,	mutagênica.	Hynophilin,	
	<i>Lentinellus</i> ,		Leianofulveno,	
	<i>Panaelus</i> .		Pleurotello, ácido pleurotético, Omphalone, Fulvoferruginin.	
Diterpenóides	<i>Cyathus</i> ,	Citotóxica,	Estriatin,	Brizuela <i>et al.</i> (1998)
	<i>Crinipelis</i> .	antifúngica, antibacteriana.	Pleuromutilin, Clavipetin.	
Acetilenos	<i>Marasmius</i> ,	Antibacteriana,	Escorodonin	Brizuela <i>et al.</i> (1998)
	<i>Clitocybe</i> ,	antifúngica e		
	<i>Coprinus</i> ,	citotóxica.		
	<i>Pleurotus</i> ,			
	<i>Merulius</i> .			
Glicolipídios	<i>Ustilago</i> ,	Antimicrobiana e	Schizonellina	Brizuela <i>et al.</i> (1998)
	<i>Schizonella</i> .	citotóxica.		

Policetonas	<i>Merulius, Phlebia.</i>	Antimicrobiana e hemolítica.	Ácido merúlico	Brizuela <i>et al.</i> (1998)
Nucleósidos	<i>Clitocybe, Lentinus.</i>	Antibacteriana e antiviral.	Nebularin	Brizuela <i>et al.</i> (1998)
Sais de diazônio	<i>Agaricus xanthodermus Lentinus edodes</i>	Antibacteriana e citotóxica Bacteriostática Fungistática Antiviral	Agaridin Lentionina	Brizuela <i>et al.</i> (1998) Hatvani (2001) Ishikawa <i>et al.</i> (2001a) Paccola <i>et al.</i> (2001).
Sesquiterpenos	<i>Flammulina velutipes Oudemansiella mucida</i>	Antifúngica Antibacteriana Antifúngica	Enokipodins A, B, C, D Filtrados de cultura	Ishikawa <i>et al.</i> (2001b) Musilek <i>et al.</i> (1969)
Sesquiterpenos	<i>Omphalotus illudens</i>	Citotóxica Antitumor	Iludina S e M	McMorris <i>et al.</i> (2002)
Lectina (proteína)	<i>Xerocomus chrysenteron</i>	Inseticida	Lectina XLC	Trigueros <i>et al.</i> (2003)
Proteína	<i>Amanita pantherina</i>	Tóxica	Lectina	Zhuang <i>et al.</i> (1996)
Complexo proteína-polissacarídeo	<i>Tricholoma lobayense</i>	Antitumor	PSPC	Liu <i>et al.</i> (1996)
Polissacarídeos glucanas B-1,6 e B-1,3	<i>Grifola frondosa</i>	Antitumor	Glucanas	Mizuno <i>et al.</i> (1986) Nanba <i>et al.</i> (1987)
Pigmento	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Antibiótica	Cinabarina	Smânia <i>et al.</i> (1998)
Proteína	<i>Ganoderma lucidum</i>	Antifúngica	Ganodermina	Wang & Ng (2005)
	<i>L. edodes</i>	Inibição de	Extrato aquoso	Di Piero (2003)
	<i>Agaricus blazei</i>	microrganismos fitopatógenos	do basidiocarpo	Tonucci (2004)

Proteínas de cogumelos

Proteínas antifúngicas são produzidas por animais, plantas e fungos para combater fungos invasores. Pesquisas revelam muitos tipos diferentes de proteínas antifúngicas incluindo quitinases, glucanases, inibidoras de protease, lectinas, e inativadoras de ribossomos (PATRICK & NGAI, 2003).

Lectinas são proteínas que têm sido isoladas de plantas, animais e microrganismos. Entre os vários papéis que tem sido atribuídos as lectinas de plantas está o da defesa contra insetos. Assim o estudo das lectinas é particularmente interessante na luz do seu potencial de aplicações nas plantas transgênicas resistentes a insetos.

Lectinas de fungos superiores são pouco documentadas e a sua toxidez, ainda não foi bastante estudada, entretanto têm-se alguns exemplos:

O caso da bolesatina, uma lectina de *Boletus satanas*, que é mitogênica para linfócitos humanos (LICASTRO *et al.*, 1993).

Em *Xerocomus chrysenteron* (Bull. Ex St. Amans) Quelet., um cogumelo comestível com propriedade inseticida, foram encontradas proteínas responsáveis por esta toxidez, denominadas XLC, uma lectina de 15kDa. (TRIGUEROS *et al.*, 2003).

Uma nova proteína, a Lentina, com potente atividade antifúngica foi isolada dos corpos de frutificação de cogumelo comestível *Lentinus edodes*. Lentina, uma proteína com peso molecular de 27,5 kDa e seqüência N-terminal com similaridade a endoglucanase, inibiu o crescimento micelial de uma variedade de fungos incluindo *Physalospora piricola*, *Botrytis cinerea* Persoon ex Fries e *Mycosphaerella arachidicola* (PATRICK & NGAI, 2003).

Uma lectina (APL) foi isolada do cogumelo *Amanita pantherina* (D.C.) Secr.. A lectina é composta de duas subunidades idênticas de 22kDa e massa molecular de 43 kDa. Muitas lectinas de cogumelos já têm sido isoladas e caracterizadas. *A. pantherina* é um fungo tóxico, que pode causar câimbras, insanidade e desordem áudio-visual se for ingerida por engano. Sabe-se que os principais compostos tóxicos dos cogumelos são ácido ibotérico, muscimol, muscarina, ácido stizolobico e stizolobinico (ZHUANG *et al.*, 1996).

Polissacarídeos de cogumelos

Os polissacarídeos produzidos por numerosos microrganismos, especialmente cogumelos, vem despertando nos últimos anos o interesse dos pesquisadores, devido suas várias atividades biológicas e farmacológicas. Estas incluem atividades imuno-estimulantes, anti-tumor, hipoglicêmica, assim como suplemento alimentar para aumento da resistência,

como terapêutico para tosse e para problemas circulatórios, ou também promotor de longevidade (KIBO *et al.*, 1993; LEE *et al.*, 1996; KIM *et al.*, 2002).

A maioria dos polissacarídeos produzidos por basidiomicetos que apresentam atividade antitumoral são β -(1-3)-glucanos com ramificações β -(1-6). Os polissacarídeos aumentam a resposta imunológica e apresentam efeito antitumoral e hipoglicêmico. Tem sido relatado que tais efeitos anticancerígenos dos polissacarídeos baseiam-se no aumento da resposta do sistema imune incluindo ativação dos macrófagos, dos linfócitos T citotóxicos e seus produtos de secreção tais como fator de necrose de tumor (MATHEUS & OKINO, 1998).

Um complexo proteína-polissacarídeo (PSPC) foi isolado e caracterizado de filtrados de cultura do cogumelo comestível *Tricholoma* sp. Estudos preliminares sugeriram que PSPC suprime significativamente o crescimento de células tumorais *in vivo*. O complexo proteína-polissacarídeo (PSPC) isolado do filtrado de cultura de *Tricholoma lobayense* Heim apresentou atividade anti-tumor em camundongos. PSPC possui a habilidade de restaurar a função fagocitária de células do exsudato peritoneal (PEC) e a atividade mitogênica de células-T de tumores de camundongos. O estudo mostrou que o PSPC induziu várias respostas imunológicas *in vivo* e exibiu atividade citotóxica contra linhagens de células de tumor nas doses de 30 e 60 μ g/mL *in vitro* (LIU *et al.*, 1996).

Exopolissacarídeos produzidos por Basidiomycetes podem ter potencial em aplicações industriais. Foram estudadas 56 linhagens de Basidiomycetes incluindo fungos nativos brasileiros e linhagens comerciais de cogumelos comestíveis, quanto à produção de exopolissacarídeos e biomassa em cultura submersa. Os melhores produtores de exopolissacarídeos foram *Agaricus* sp. (CCB 280) com 6,01 g/L de peso seco e *Oudemansiella canarii* (Jungh.) Hohn (CCB 179) com 3,54 g/L após sete dias de incubação. Os melhores produtores de biomassa foram *Schizophyllum commune* Fr.:Fr. (CCB 473) com 16,68 g/L em 14 dias de incubação. Às vezes o filtrado de cultura era muito claro, outras vezes turbido e muito viscoso. Em muitas culturas a presença de cristais com diferentes formas foi observada, podendo indicar, em alguns casos, a presença de metabólitos excretados. Também foi observada a formação de uma fração gelatinosa, quando o filtrado de cultura de alguns fungos foi submetido ao congelamento antes da precipitação dos polissacarídeos. Foram selecionadas 12 linhagens para caracterização preliminar dos polímeros isolados e finalmente um estudo da produção, por fermentação, utilizando o fungo *Irpex lacteus* (Fries) Fries (MAZIERO, 1996; MAZIERO *et al.*, 1999).

Grifola frondosa (Dickson:Fries) S.F. Gray é um Basidiomycetes pertencente à ordem Agaricales e família Polyporaceae. O corpo de frutificação deste fungo e o seu micélio cultivado em meio líquido tem sido relatado em conter várias frações de polissacarídeos úteis como anti-tumor. Estes polissacarídeos foram identificados como glucanas (β -1,6- e β -1,3-) (MIZUNO *et al.*, 1986; NANBA *et al.*, 1987). A otimização das condições de cultivo submerso de *Grifola frondosa* para produção de biomassa e exopolissacarídeos tem sido investigada. Os resultados mostraram que a produção em fermentador sob agitação, foi de 16,8 g/L para biomassa e 5,3 g/L para polissacarídeos, sendo que, observou-se também a presença de três grupos de polissacarídeos de variada massa molecular (470-1100 kDa) (LEE *et al.*, 2004).

OBJETIVOS

Geral

O presente estudo teve como objetivo, verificar o potencial biotecnológico de fungos da Classe Basidiomycetes da Amazônia, principalmente quanto à produção de antimicrobianos e enzimas.

Específicos

- Isolar e cultivar *in vitro* exemplares de Basidiomycetes de áreas de floresta de terra-firme da Amazônia;
- Avaliar o crescimento radial dos fungos em meio sólido;
- Detectar o potencial antimicrobiano dos Basidiomycetes isolados contra microrganismos patogênicos e fitopatogênicos;
- Caracterizar o filtrado de cultura do fungo que apresentar melhor atividade antimicrobiana;
- Detectar a produção de enzimas, como amilases, proteases, celulases, pectinases e fenoloxidasas, pelas linhagens dos fungos.

CAPÍTULO 1

COLETA E ISOLAMENTO DE BASIDIOMYCETES DE ÁREAS DE FLORESTA DE TERRA – FIRME NO AMAZONAS

RESUMO

A microbiota da Amazônia, ainda é pouco estudada, principalmente quanto aos Basidiomycetes, apesar dos trabalhos feitos com fungos macroscópicos, de diferentes ecossistemas da região. O presente estudo teve como objetivo, o isolamento e cultivo *in vitro* de exemplares de Basidiomycetes de áreas de floresta de terra-firme da Amazônia, para estudos sobre seu potencial biotecnológico. Os fungos foram coletados na Reserva de Campina do INPA, localizada na BR 174, km 45, na mata do mini-campus universitário da UFAM, no Bosque da Ciência do INPA, no campus do INPA/V8 e em Urucu, município de Coari/AM. Uma parte do material coletado foi utilizada para o isolamento micelial e a outra foi reservada para identificação taxonômica. Para obtenção da cultura do fungo, os esporos ou fragmentos do tecido vivo (cogumelo ou orelha de pau) foram retirados com pinça e colocados em placas de Petri, contendo meio de cultura BDA. Após o desenvolvimento do micélio, este foi transferido para tubos com meio inclinado e estocados a 4°C. Os Basidiomycetes isolados foram avaliados quanto ao crescimento micelial em meio BDA (Batata dextrose agar), FTA (farelo de trigo ágar) e agar malte. Foram coletados 60 fungos da classe Basidiomycetes no período de fevereiro a junho de 2003. Destes, foram identificadas quatro ordens (Agaricales, 53%, Aphyllophorales, 37%, Auriculariales, 8% e Tremellales, 2%), e as famílias Agaricaceae, Auriculariaceae, Cantharellaceae, Ganodermataceae, Hygrophoraceae, Polyporaceae, Russulaceae, Stereaceae, Tremellaceae e Tricholomataceae.

Palavras-chave: Biodiversidade, Cogumelos, Biotecnologia.

1 - INTRODUÇÃO

A floresta amazônica possui alta diversidade biológica, mas ainda pouco se sabe sobre as espécies que a compõem (RIBEIRO *et al.*, 1999). Quanto aos Basidiomycetes, a micobiota da Amazônia, ainda é pouco estudada, apesar dos trabalhos feitos com fungos macroscópicos de diferentes ecossistemas da região (SINGER & ARAUJO, 1979; AGUIAR, 1984; SINGER & AGUIAR, 1986; CAPELARI & MAZIERO, 1988; BONONI, 1992; SOUZA, 2002).

A classe Basidiomycetes propriamente dita, inclui os fungos que possuem basídios, corpos frutíferos que vão de alguns centímetros até quase um metro, todos são visíveis a olho nu, são em sua maioria saprófitos. A sistemática é feita pela morfologia do píleo, lamelas e poros (SILVEIRA, 1995).

O crescimento da indústria biotecnológica aumentou a demanda por novos produtos naturais e genes. A biodiversidade genética amazônica é uma matéria prima valiosa para as indústrias farmacêuticas e de biotecnologia. Entretanto, os países desenvolvidos, onde as empresas agregam valor tecnológico aos produtos naturais e os comercializam, continuam retirando maiores lucros com a prospecção genética do que os países ricos em biodiversidade (SALATI *et al.*, 1998).

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo, o isolamento e cultivo *in vitro* de exemplares de Basidiomycetes de áreas de floresta de terra-firme da Amazônia, para estudos biotecnológicos. Os objetivos específicos foram:

- a) coletar e identificar os grupos de Basidiomycetes nas áreas de floresta estudadas;
- b) realizar o isolamento micelial para obtenção de culturas de Basidiomycetes;
- c) avaliar o crescimento dos isolados em meio de cultura sólido.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta dos Basidiomycetes

Os fungos foram coletados aleatoriamente ao longo de trilhas na Reserva de Campina do INPA, localizada na BR 174, km 45, na mata do mini-campus universitário da UFAM, no Bosque da Ciência do INPA, no campus do INPA/V8 e em Urucu, município de Coari/AM. Os espécimes foram coletados com auxílio de canivete, removendo-se parte do substrato, e acondicionados em recipientes plásticos ou sacos de papel (SOUSA, 1980).

Uma parte do material coletado foi utilizada para o isolamento micelial e a outra foi reservada para identificação taxonômica.

2.2 Análise morfológica dos espécimes

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia do Solo (Cordenação de Pesquisas em Ciências Agrônômicas) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). A análise do basidioma dos fungos foi realizada imediatamente após a coleta, com auxílio de microscópio estereoscópico Lambda (LEB-2). Nos fungos ainda frescos foram observadas características do píleo e estipe (coloração, forma, consistência, himenóforo, volva, anel e véu). As medidas foram realizadas com régua milimetrada. Após anotar as características do material fresco, este foi seco em estufa com temperatura entre 50-60°C. Foram preparados cortes do material a mão livre, utilizando-se lâmina inoxidável, sob estereomicroscópio. Foram utilizadas solução de KOH 3%, reagente de Melzer (Iodo 0,5g; KI 1,5g; cloral hidratado 20g, água destilada 20 mL) e Azul de Algodão (Azul de Algodão 0,05g; ácido láctico 30mL) para verificar as reações de mudança de cor, amiloidia e cianofilia de microestruturas como basidiósporos e hifas (MARTIN, 1934; KOTLABA & POUZAR, 1964; SINGER, 1986). A observação das microestruturas foi realizada em microscópio binocular Zeiss West Germany. A terminologia micológica seguiu os trabalhos de Snell & Dick (1957) e Fidalgo & Fidalgo (1967), e a identificação dos fungos seguiu Dennis (1970), Silveira (1995), Putzke & Putzke (2004).

2.3 Isolamento micelial

Foi selecionado um exemplar de boa qualidade, o qual foi lavado, primeiramente, em água corrente. Em câmara de fluxo laminar foi lavado com água destilada e mergulhado por um minuto em uma solução de hipoclorito de sódio: água destilada (1:10) (BONONI & TRUFEM, 1985) e então lavado com álcool etílico comercial em placa de Petri.

Para obtenção da cultura do fungo, os esporos ou fragmentos do tecido vivo (cogumelo ou orelha de pau) foram retirados com pinça e colocados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (caldo de 200g de batata, 20g/L de dextrose; 15g/L de agar, completando para 1000mL com água destilada), acrescido de antibiótico (100µg/mL de terramicina), e incubados a 28°C por sete a dez dias, onde ocorreu o desenvolvimento do micélio. Fragmentos do micélio da cultura obtidos foram transferidos para tubos de ensaios contendo meio de cultura inclinado BDA, e foram preservados sob refrigeração a 4°C (BONONI & TRUFEM, 1985; STURION & RANZANI, 1997).

2.4 Avaliação do crescimento radial em placas de Petri

Os Basidiomycetes isolados foram avaliados, inicialmente, quanto ao crescimento micelial radial em placas de Petri contendo os seguintes meios de cultura: BDA, Meio FTA (farelo de trigo, 20g/L; Agar, 15g/L; água destilada, 1000 mL) ambos com pH 6,0 e Agar-malte (extrato de malte, 30g/L; Ágar, 15g/L; água destilada, 1000 mL, pH 5,6).

Foi transferido para o centro de cada placa de Petri de 9 cm de diâmetro, um disco de agar com micélio (10 mm de diâmetro). As placas foram divididas em quadrantes para a realização de medidas diárias do crescimento e incubadas a 28°C durante aproximadamente dez dias. O experimento foi realizado em triplicata (PETRY, 1994).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletados 60 corpos de frutificação (basidiomas) de fungos da classe Basidiomycetes no período de fevereiro a junho de 2003. Destes, foram identificadas quatro ordens (Agaricales, 53%, Aphyllorphorales, 37%, Auriculariales, 8% e Tremellales, 2%) (Figura 1), e as famílias Agaricaceae, Auriculariaceae, Cantharellaceae, Ganodermataceae, Hygrophoraceae, Polyporaceae, Russulaceae, Stereaceae, Tremellaceae e Tricholomataceae.

Considerando a frequência das ordens dos Basidiomycetes nos locais de coleta, foi verificado que basidiomas da ordem Aphyllorphorales foram coletados mais frequentemente, estando presente em todos estes locais. Em seguida, basidiomas da ordem Agaricales foram os mais coletados, sendo frequentes na UFAM, INPA e Reserva de Campina. As ordens menos frequentes foram Auriculariales e Tremellales. A Reserva de Campina foi a que apresentou maior diversidade de fungos, com representantes de quatro ordens de Basidiomycetes (Figura 2). É provável que, a diversidade de fungos Basidiomycetes seja maior nestes locais de coleta, pois os fungos mais vistosos, maiores e mais coloridos foram os que chamaram mais a atenção para serem coletados. Fungos menos atrativos ou muito pequenos, podem não ter sido observados no momento da coleta.

As famílias Agaricaceae, Polyporaceae e Tricholomataceae foram as que apresentaram maior frequência dentre os representantes coletados. As famílias menos frequentes foram Cantharellaceae, Hygrophoraceae, Russulaceae e Tremellaceae (Figura 3).

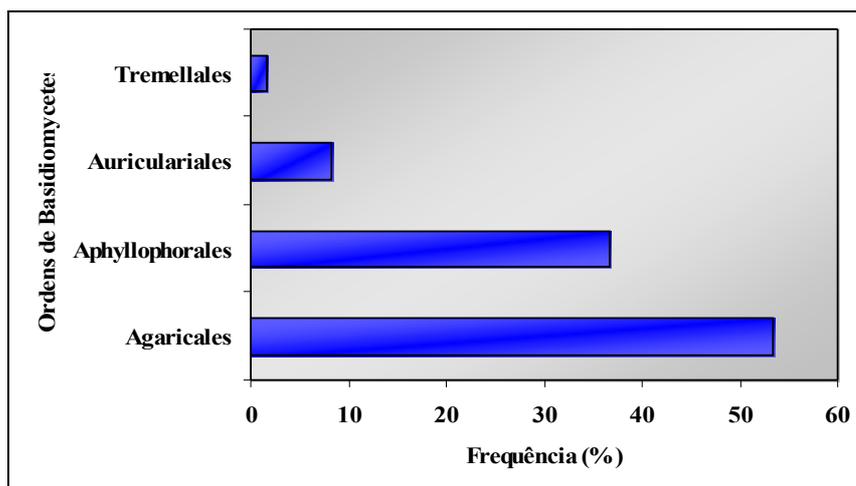


Figura 1 –Frequência de fungos Basidiomycetes coletados no período de fevereiro a junho (2003) em áreas de floresta na Amazônia Central..

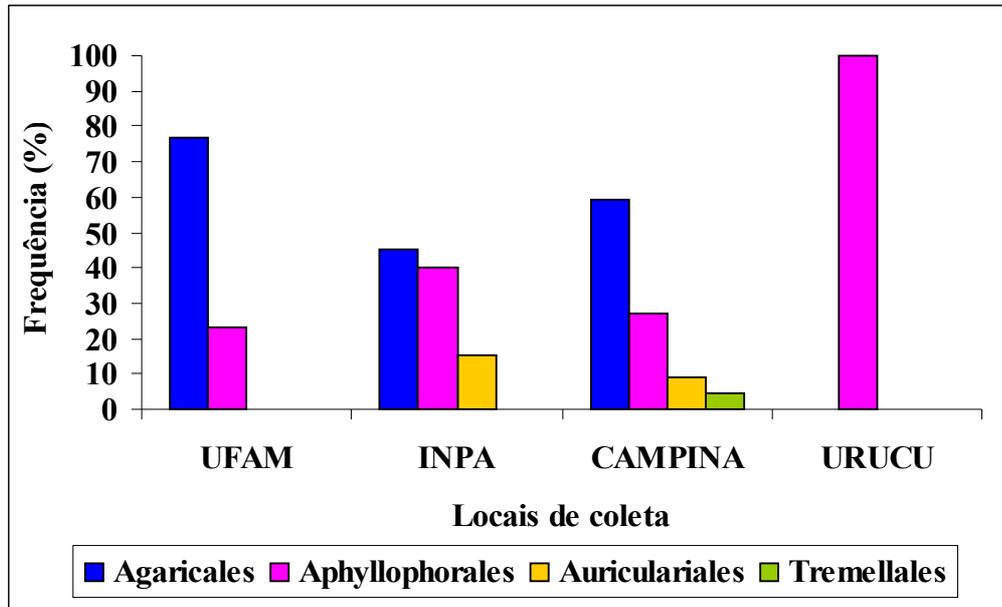


Figura 2 – Frequência de fungos Basidiomycetes coletados em áreas de floresta na UFAM, INPA, Reserva de Campina e Urucu (Coari/AM).

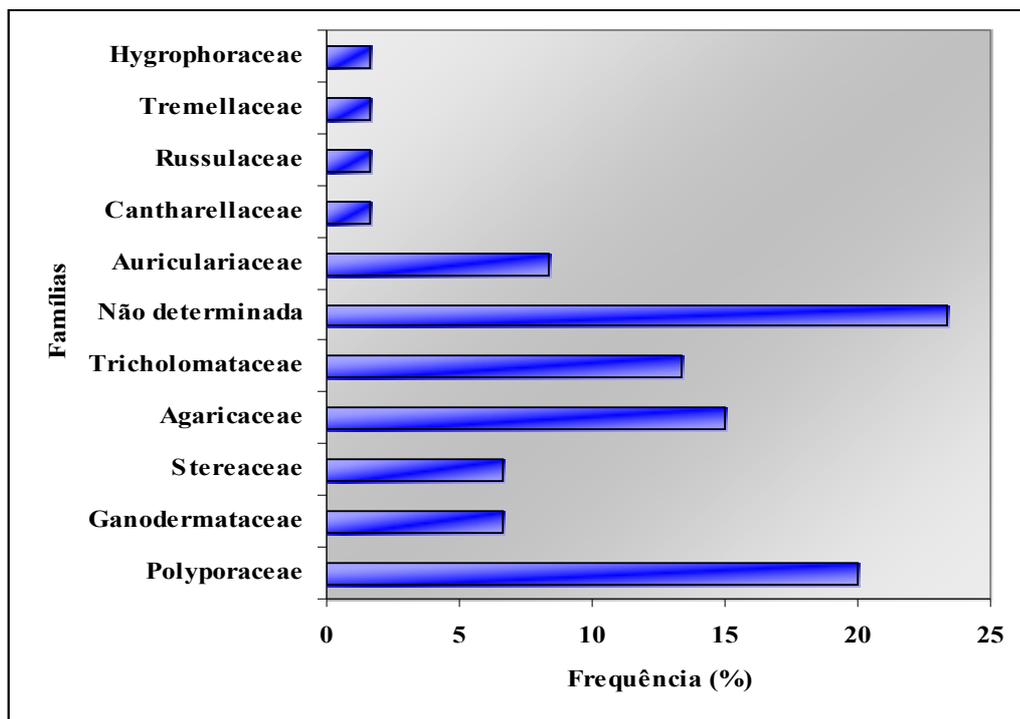


Figura 3 – Frequência de Famílias de Basidiomycetes coletadas em áreas de floresta de terra-firme, Amazonas, Brasil.

Na mata do mini-campus da UFAM foram coletados treze corpos de frutificação de Basidiomycetes. A ordem Agaricales foi predominante, com dez amostras, enquanto que a ordem Aphyllophorales apresentou três. Foi verificada a ocorrência da espécie *Oudemansiella stefenii* (Agaricaceae), e os gêneros *Daedalea* (Polyporaceae), *Ganoderma* (Ganodermataceae), *Agaricus* e *Leucocoprinus* (Agaricaceae) (Tabela 3).

Em área de várzea, Singer (1984) também verificou a ocorrência de fungos do gêneros *Ganoderma* (Ilha da Marchantaria) e *Agaricus* (Lago do Janauari), Careiro da Várzea/AM. Em floresta de igapó no Tarumãzinho, Manaus/AM, Singer & Aguiar (1986) também coletaram fungo do gênero *Leucocoprinus*.

Tabela 3 - Basidiomycetes coletados na mata do mini-campus da Universidade Federal do Amazonas em 27/02/03 em Manaus.

Amostra	Código	Ordem	Família	Espécie
1	1A	Aphyllophorales	Polyporaceae	<i>Daedalea</i> sp.
2	2A	Aphyllophorales	Ganodermataceae	<i>Ganoderma</i> sp.
3	3A	Aphyllophorales	Stereaceae	Não identificada
4	4A	Agaricales	Não identificada	Não identificada
5	5A	Agaricales	Agaricaceae	<i>Agaricus</i> sp.
6	6A	Agaricales	Agaricaceae	<i>Agaricus</i> sp.
7	7A	Agaricales	Não identificada	Não identificada
8	8A	Agaricales	Agaricaceae	<i>Agaricus</i> sp.
9	9A	Agaricales	Tricholomataceae	<i>Oudemansiella stefenii</i>
10	10A	Agaricales	Agaricaceae	<i>Leucocoprinus</i> sp.
11	11A	Agaricales	Agaricaceae	<i>Agaricus</i> sp.
12	12A	Agaricales	Agaricaceae	Não identificada
13	13A	Agaricales	Agaricaceae	<i>Agaricus</i> sp.

Na Reserva de Campina foram coletados 22 corpos de frutificação de fungos Basidiomycetes. Foi verificada a ocorrência das ordens Agaricales, Aphyllorphorales, Auriculariales e Tremellales. A ordem predominante foi a Agaricales, com 13 amostras, seguida da ordem Aphyllorphorales representada por seis. A menos representativa foi a ordem Tremellales, com apenas uma. Foram identificadas as espécies *Auricularia delicata* (Fr.) Henn. (Auriculariaceae), *Cantharellus guyanensis* Mont. (Cantharellaceae), *Pycnoporus sanguineus* (L. ex Fr.) Murr. (Polyporaceae), *Ganoderma applanatum* (Pers.) Patouillard (Ganodermataceae), e os gêneros *Clitocybe* (Tricholomataceae), *Russula* (Russulaceae), *Marasmius* (Tricholomataceae), *Tremella* (Tremellaceae), *Amauroderma*, *Ganoderma* (Ganodermataceae) e *Hygrocybe* (Hygrophoraceae) (Tabela 4).

A espécie *Pycnoporus sanguineus* e os gêneros *Auricularia*, *Ganoderma*, *Marasmius* e *Hygrocybe* também são citados por Singer (1984) para floresta de várzea (Ilha da Marchantaria, Lago do Janauari e Paraná do Janauacá), Careiro da Várzea, Amazonas.

Em área de floresta de igapó no Tarumãzinho, Manaus/AM, Singer & Aguiar (1986) também observaram a ocorrência de fungos dos gêneros *Marasmius* e *Russula*.

Singer & Araujo (1979) também coletaram exemplares da espécie *Cantharellus guyanensis* e do gênero *Russula* em floresta de Campinarana, km 45 da estrada Manaus-Caracará, nas proximidades da Reserva de Campina do INPA.

Tabela 4 - Basidiomycetes coletados na Reserva de Campina (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia) em 12/03/03 em Manaus.

Amostra	Código	Ordem	Família	Espécie
14	1B	Agaricales	Não identificada	Não identificada
15	2B	Auriculariales	Auriculariaceae	<i>Auricularia delicata</i>
16	3B	Agaricales	Não identificada	Não identificada
17	4B	Aphyllorphorales	Cantharellaceae	<i>Cantharellus guyanensis</i>
18	5B	Agaricales	Não identificada	Não identificada
19	6B	Agaricales	Não identificada	Não identificada
20	7B	Auriculariales	Auriculariaceae	<i>Auricularia delicata</i>
21	8B	Agaricales	Tricholomataceae	<i>Clitocybe</i> sp.
22	9B	Agaricales	Russulaceae	<i>Russula</i> sp.
23	10B	Agaricales	Tricholomataceae	<i>Marasmius</i> sp.
24	11B	Tremellales	Tremellaceae	<i>Tremella</i> sp.
25	12B	Aphyllorphorales	Polyporaceae	<i>Pycnoporus sanguineus</i>

26	13B	Agaricales	Não identificada	Não identificada
27	14B	Agaricales	Tricholomataceae	<i>Marasmius</i> sp.
28	15B	Aphylophorales	Ganodermataceae	<i>Ganoderma applanatum</i>
29	16B	Aphylophorales	Ganodermataceae	<i>Ganoderma</i> sp.
30	17B	Agaricales	Não identificada	Não identificada
31	18B	Agaricales	Não identificada	Não identificada
32	19B	Agaricales	Tricholomataceae	Não identificada
33	20B	Agaricales	Hygrophoraceae	<i>Hygrocybe</i> sp.
34	21B	Aphylophorales	Ganodermataceae	<i>Amauroderma</i> sp.
35	22B	Aphylophorales	Stereaceae	Não identificada

Foram coletados 20 basidiomas de fungos Basidiomycetes na área do Bosque da Ciência do INPA. Foi verificada a ocorrência das ordens, Agaricales, Aphylophorales e Auriculariales. A ordem predominante foi a Agaricales, com nove amostras, a ordem Aphylophorales foi representada por oito, enquanto que a Auriculariales apresentou apenas três. As espécies identificadas foram as seguintes: *Auricularia fuscosuccinea* (Mont.) Farl., *A. delicata* (Fr.) Henn., *A. polytricha* (Mont.) Saccardo (Auriculariaceae), e os gêneros *Lepiota* (Agaricaceae), *Stereum* (Stereaceae), *Daedalea* e *Trametes* (Polyporaceae) (Tabela 5).

Fungos da espécie *Auricularia polytricha* e do gênero *Lepiota* também foram coletados por Singer (1984) em área de várzea (Ilha da Marchantaria e Lago Janauari, respectivamente), Careiro da Várzea, AM).

Tabela 5 - Basidiomycetes coletados no Bosque da Ciência do INPA.

Amostra	Código	Local	Data	Ordem	Família	Espécie
36	1D	Bosque	09/04/03	Agaricales	Agaricaceae	<i>Lepiota sp.</i>
37	2D	Bosque	09/04/03	Aphylophorales	Stereaceae	Não identificada
38	3D	Bosque	09/04/03	Agaricales	Tricholomataceae	Não identificada
39	4D	Bosque	09/04/03	Agaricales	Tricholomataceae	Não identificada
		Bosque	09/04/03			<i>Auricularia</i>
40	5D			Auriculariales	Auriculariaceae	<i>fuscosuccinea</i>
41	6D	Bosque	09/04/03	Aphylophorales	Stereaceae	<i>Stereum sp.</i>
42	7D	Bosque	09/04/03	Agaricales	Não identificada	Não identificada
43	8D	Bosque	09/04/03	Agaricales	Tricholomataceae	Não identificada
44	9D	Bosque	09/04/03	Aphylophorales	Não identificada	Não identificada
45	1E	Bosque	25/06/03	Aphylophorales	Polyporaceae	Não identificada
46	2E	Bosque	25/06/03	Agaricales	Agaricaceae	<i>Lepiota sp.</i>
47	3E	Bosque	25/06/03	Aphylophorales	Polyporaceae	Não identificada
48	4E	Bosque	25/06/03	Aphylophorales	Polyporaceae	<i>Daedalea sp.</i>
49	5E	Bosque	25/06/03	Agaricales	Não identificada	Não identificada
50	6E	Bosque	25/06/03	Aphylophorales	Polyporaceae	Não identificada
		Bosque	25/06/03			<i>Auricularia</i>
51	7E			Auriculariales	Auriculariaceae	<i>delicata</i>
52	8E	Bosque	25/06/03	Agaricales	Não identificada	Não identificada
		Bosque	25/06/03			<i>Auricularia</i>
53	9E			Auriculariales	Auriculariaceae	<i>polytricha</i>
54	10E	Bosque	25/06/03	Agaricales	Não identificada	Não identificada
55	11E	INPA/V8	25/06/03	Aphylophorales	Polyporaceae	<i>Trametes sp.</i>

Em Urucu (Coari/AM) foram coletadas cinco amostras de fungos pertencentes a família Polyporaceae (ordem Aphylophorales). Foram identificados fungos da espécie *Pycnoporus sanguineus* (L. ex Fr.) Murr., e o gênero *Pleurotus* (Tabela 6).

Tabela 6 - Basidiomycetes coletados em Urucu, Coari/AM (março e abril/2003)

Amostra	Código	Data	Ordem	Família	Espécie
56	1C	03/03/03	Aphylliphorales	Polyporaceae	<i>Pleurotus</i> sp.
57	1F	14/04/03	Aphylliphorales	Polyporaceae	Não identificada
58	2F	14/04/03	Aphylliphorales	Polyporaceae	Não identificada
59	3F	14/04/03	Aphylliphorales	Polyporaceae	Não identificada
60	4F	14/04/03	Aphylliphorales	Polyporaceae	<i>Pycnoporus sanguineus</i> .

Considerando as áreas de coleta do presente estudo UFAM, INPA, Reserva de Campina e Urucu foi verificado que o gênero *Daedalea* foi comum para a UFAM e para o INPA, o gênero *Auricularia* esteve presente tanto na Campina quanto no INPA, e o gênero *Ganoderma* foi encontrado na UFAM e na Campina.

Singer & Araujo (1979) realizaram um trabalho sobre os fungos macroscópicos de floresta de campina e campinarana, na estrada Manaus-Caracarái, km 45 proximidades da Reserva de Campina do INPA. Foi verificada a ocorrência dos seguintes gêneros: *Amanita*, *Boletellus*, *Cantharellus*, *Cortinarius*, *Craterellus*, *Fistulinella*, *Hebelomina*, *Inocybe*, *Lactarius*, *Phyllobolites*, *Phylloporus*, *Porphyrellus*, *Russula*, *Sarcodon*, *Strobilomyces*, *Tylopilus* e *Xerocomus*. Na presente pesquisa também foram verificados fungos dos gêneros *Cantharellus* e *Russula*, coletados na Reserva de Campina do INPA.

Singer (1984) estudou as adaptações de fungos superiores a condições de várzea na Ilha da Marchantaria, Lago Janauari, Paraná do Janauacá (Careiro da várzea/Amazonas). Dentre os gêneros pertencentes aos Basidiomycetes são citados os seguintes: *Amanita*, *Auricularia*, *Collybia*, *Cymatoderma*, *Dacryopinax*, *Entoloma*, *Ganoderma*, *Gymnopilus*, *Gyrodon*, *Hohenbuehelia*, *Hydropus*, *Hygrocybe*, *Janauaria*, *Lactocollybia*, *Lepiota*, *Marasmiellus*, *Marasmius*, *Megalosporia*, *Microporellus*, *Mycena*, *Neoclitocybe*, *Panus*, *Pholiota*, *Pleurotus*, *Pluteus*, *Podoschypha*, *Polyporus*, *Pycnoporus*, *Rigidoporus*, *Psathyrella*, *Pulveroboletus* e *Tricholomopsis*. No presente trabalho também foram coletados fungos dos gêneros *Auricularia* na Campina e no INPA, *Ganoderma* na UFAM e na Campina, *Lepiota* no INPA, *Hygrocybe*, *Marasmius* e *Pycnoporus* na Campina e *Pleurotus* em Urucu.

Singer & Aguiar (1986) estudaram os Basidiomycetes de uma floresta de igapó próximo a confluência do Rio Tarumã Mirim (Tarumãzinho) e o Rio Negro, Manaus/AM. Foram citadas espécies dos seguintes gêneros: *Abortiporus*, *Amanita*, *Austroboletus*, *Baeospora*, *Chalciporus*, *Clitopilus*, *Crepidotus*, *Entoloma*, *Galerina*, *Gloiocephala*,

Gymnopilus, *Hemimycena*, *Hohenbuehelia*, *Hydropus*, *Lactarius*, *Leucocoprinus*, *Marasmiellus*, *Marasmius*, *Mycena*, *Pluteus*, *Russula*, *Tylopilus* e *Xerocomus*. No presente estudo também foram coletados fungos dos gêneros *Leucocoprinus* (na UFAM) e *Marasmius* e *Russula* (Campina).

São fornecidas a seguir, características morfológicas e ilustrações das espécies estudadas.

3.1 Características morfológicas dos fungos coletados na mata do mini-campus da UFAM



Código: 1A.

Ordem: Aphylophorales. Família: Polyporaceae. Espécie: *Daedalea* sp. Píleo: superfície superior creme com margem branca; superfície inferior branca; dimidiado, 17,0 cm x 9,5 cm. Formato dos poros: irregular. Estipe ou tipo de fixação: sésil. Substrato: árvore morta caída.



Código: 2A

Ordem: Aphylophorales. Família: Ganodermataceae. Espécie: *Ganoderma* sp. Píleo: superfície superior marrom, zonada, contexto escuro; superfície inferior branca; dimidiado, perfil aplanado, 12,0 cm x 10,0 cm. Formato dos poros: circulares. Estipe ou tipo de fixação: sésil a efuso-reflexo. Substrato: sobre tronco de árvore viva.



Código: 3A

Ordem: Aphylophorales. Família: Stereaceae. Píleo: superfície superior creme, margem branca; superfície inferior cinza; 2,5 cm x 3,0 cm. Estipe: subestipitado, excêntrico, 1,0 cm. Substrato: sobre tronco caído na sombra. Esporos: oblongos, marrons.



Código: 4A

Ordem: Agaricales. Píleo: superfície superior creme esverdeado; campanulado, membranáceo, 2,5 cm a 3,0 cm de diâmetro. Lamelas: brancas, largas. Estipe: base concolor ao píleo e ápice branco, filiforme, 2,0 cm a 5,0 cm de comprimento, 3 mm de diâmetro, micélio basal presente. Substrato: sobre tronco morto.



Código: 5A

Ordem: Agaricales. Família: Agaricaceae. Espécie: *Agaricus* sp. Píleo: superfície superior amarronzada; umbonado, carnoso, 5,0 cm a 6,0cm de diâmetro. Lamelas: marrom escuro, livres. Estipe: creme, carnoso, 5,0 cm a 7,0 cm de comprimento, 0,5 cm a 0,8 cm de diâmetro; base alargada, 1,5 cm de diâmetro; anel rudimentar. Substrato: no solo humoso, associado a raízes.



Código: 6A

Ordem: Agaricales. Família: Agaricaceae. Espécie: *Agaricus* sp. Píleo: superfície superior amarronzada, com escamas; umbonado, carnoso, 4,0 cm de diâmetro, jovem. Lamelas: amarronzadas, livres. Cortina ou véu na cor do píleo. Estipe: branco com escamas amarronzadas, 7,0 cm de comprimento, 1,0 cm de diâmetro, base alargada, 1,5 cm de diâmetro, anel rudimentar. Substrato: no solo. Esporos obovados, amilóides (parede), trama inamilóide.



Código: 7A

Ordem: Agaricales. Píleo: superfície superior marrom esverdeada; convexo, membranáceo, 3,0 cm de comprimento. Lamelas: brancas, irregulares. Estipe: creme, cilíndrico, 7,0 cm de comprimento, 0,5 cm de diâmetro. Substrato: sobre tronco morto. Epicútis com células eretas.



Código: 8A

Ordem: Agaricales. Família: Agaricaceae. Espécie: *Agaricus* sp. Píleo: superfície superior marrom com escamas centrais; aplanado, 6,0 cm de diâmetro, odor forte. Lamelas: marrom-escuro a preto, largas, numerosas, livres, algumas já comidas por insetos. Estipe: marrom-claro, cilíndrico, estriado, 7,0 cm de comprimento, 0,7 cm de diâmetro, anel rudimentar, presença de pseudorriza amarela. Substrato: no solo associado a raízes. Esporos marrons, células eretas na superfície da epicútis.



Código: 9A

Ordem: Agaricales. Família: Tricholomataceae. Espécie: *Oudemansiella stefenii*. Píleo: superfície superior cinza-esverdeada; aplanado, 4,0 cm de diâmetro, odor adocicado. Lamelas: brancas, já comidas por mosquitos. Estipe: prateado, cilíndrico, 8,0 cm de comprimento, 0,5 cm de diâmetro, presença de pseudorriza. Esporos equinulados. Substrato: no solo.



Código: 10A

Ordem: Agaricales. Família: Agaricaceae.
Espécie: *Leucocoprinus* sp. Píleo: superfície superior amarelo-escuro, com escamas violeta no centro e alaranjadas na margem; convexo, membranáceo, delicado, 2,3 cm de diâmetro. Lamelas: amarelas, largas, numerosas, livres. Estipe: concolor ao píleo, 4,0 cm de comprimento, presença de anel. Esporos ovais, hialinos, inamilóides. Substrato: no solo sob clareira.



Código: 11A

Ordem: Agaricales. Família: Agaricaceae.
Espécie: *Agaricus* sp. Píleo: superfície superior marrom-escuro; aplanado, 5,0 cm de diâmetro, odor forte. Lamelas: pretas, largas, numerosas, presença de formigas. Estipe: marrom-claro, cilíndrico, 7,0 cm de comprimento, 0,5 cm de diâmetro, base alargada, 1,0 cm de diâmetro. Esporos marrons, obovados, amilóides. Substrato: no solo sob sombra.



Código: 12A

Ordem: Agaricales. Família: Agaricaceae.
Píleo: jovem, 1,0 cm de diâmetro, superfície superior marrom com escamas centrais;
Lamelas: brancas, livres. Estipe: creme, cilíndrico, 3,0 cm de comprimento, 0,3 cm de diâmetro, com escamas marrons na base, anel rudimentar. Substrato: no solo, aderido a folhas.



Código: 13A

Ordem: Agaricales. Família: Agaricaceae.
Espécie: *Agaricus* sp. Píleo: superfície superior marrom com escamas; jovem, 3,5 cm de diâmetro. Lamelas: amarronzadas, largas, livres, presença de véu ou cortina na cor do píleo. Estipe: branco com escamas marrons na base, cilíndrico, 6,0 cm de comprimento, 0,7 cm de diâmetro, anel rudimentar, presença de pseudorriza. Esporos marrons, obovados. Substrato: no solo, sob sombra.

3.2 Características morfológicas dos fungos coletados na Reserva de Campina/INPA

	<p>Código: 1B</p> <p>Ordem: Agaricales. Píleo: laranja-claro, convexo, 4,5 cm de diâmetro. Lamelas: brancas, decurrentes. Estipe: branco, cilíndrico, estriado, 4,0 cm de comprimento, 0,8 cm de diâmetro. Esporos obovados. Substrato: sobre a liteira.</p>
	<p>Código: 2B</p> <p>Ordem: Auriculariales. Família: Auriculariaceae. Espécie: <i>Auricularia delicata</i>. Píleo: cor-de-vinho pálido em ambas as superfícies, formato auricular, gelatinoso, 6,0-12,0 x 4,0-7,5cm. Lamelas venosas. Fixação no substrato: séssil. Substrato: sobre tronco morto.</p>
	<p>Código: 3B</p> <p>Ordem: Agaricales. Píleo: superfície superior laranja-escuro, convexo, 5,0 cm de diâmetro. Lamelas: amarelas, subdecurrentes. Estipe: amarelo, cilíndrico, 6,5 cm de diâmetro. Esporos arredondados, inamilóides. Hifas largas com conteúdo alaranjado. Substrato: sobre a liteira.</p>

	<p>Código: 4B</p> <p>Ordem: Aphyllophorales. Família: Cantharellaceae. Espécie: <i>Cantharellus guyanensis</i>. Píleo: superfície superior alaranjada, depressado, carnoso, 2,5 - 4,0 cm de diâmetro. Lamelas: creme-amareladas, decurrentes. Estipe: concolor as lamelas, carnoso, 3,5 cm de comprimento, 1,5 cm de diâmetro. Esporos obovados. Hifas com grampo de conexão. Substrato: no solo com húmus.</p>
---	---

	<p>Código: 5B</p> <p>Ordem: Agaricales. Píleo: superfície superior alaranjada, jovem, convexo, 1,0 -1,5 cm de diâmetro. Lamelas: amarelas, subdecurrentes. Estipe: amarelo, cilíndrico, 4,0 cm de comprimento, base alargada. Substrato: na liteira.</p>
--	--

	<p>Código: 6B</p> <p>Ordem: Agaricales. Píleo: superfície superior alaranjada, jovem, convexo, 1,0 - 1,5 cm de diâmetro. Lamelas: amarelas, subdecurrentes. Estipe: amarelo, cilíndrico, 4,0 cm de comprimento, base alargada. Substrato: na liteira.</p>
--	---



Código: 7B

Ordem: Auriculariales. Família: Auriculariaceae. Espécie: *Auricularia delicata*. Píleo: superfície superior cor-de-vinho, superfície inferior esbranquiçada, formato auricular, gelatinoso, 9,0 cm x 5,0 cm. Lamelas venosas. Fixação: sésstil. Substrato: sobre tronco morto.



substrato

Código: 8B

Ordem: Agaricales. Família: Tricholomataceae. Espécie: *Clitocybe* sp.. Píleo: superfície superior esverdeada, convexo a umbilicado, 3,5 cm de diâmetro. Lamelas: amarelas, largas, decurrentes. Estipe: amarelo, cilíndrico, 3,0 cm de comprimento. Substrato: sobre galho grosso.



Código: 9B

Ordem: Agaricales. Família: Russulaceae.
Espécie: *Russula* sp. Píleo: superfície superior rosada, infundibuliforme, carnoso, 7,0 cm de diâmetro. Lamelas: rosadas, numerosas, adnatas. Estipe: rosa claro, esbranquiçado, cilíndrico, carnoso, 3,0 cm de comprimento, presença de anel rudimentar. Esporos amilóides, esféricos, punctados, equinulados. Cistídios com ápice afilado. Substrato: no solo húmido.



Código: 10B

Ordem: Agaricales. Família: Tricholomataceae. Espécie: *Marasmius* sp. Píleo: superfície superior vermelho-cobre, campanulado, membranáceo, 0,7 cm de diâmetro. Lamelas: concolor ao píleo. Estipe: branco, filiforme, 2,5 cm de comprimento. Substrato: sobre folha seca.



Códi: 11B

Ordem: Tremellales. Família: Tremellaceae. Espécie: *Tremella* sp. Píleo: alaranjado-escuro, formato de luva, gelatinoso e pegajoso, 1,0 -3,0 cm de comprimento. Lamelas ausentes. Estipe: laranja-escuro, gelatinoso. Substrato: sobre tronco morto.



Código: 12B

Ordem: Aphyllophorales. Família: Polyporaceae. Espécie: *Pycnoporus sanguineus*. Píleo: coriáceo; superfície superior laranja-avermelhada, flabeliforme, 2,0 - 4,0 cm x 1,5 - 3,5cm de diâmetro Formato dos poros: circulares a hexagonais. Estipe: sésstil a subestipitado. Substrato: sobre tronco morto.



Código: 13B

Ordem: Agaricales. Píleo: superfície superior marrom-acinzentado, campanulado, 0,7 cm - 2,0 cm de diâmetro. Lamelas: brancas. Estipe: cinza, filiforme, 1,5 cm - 2,5 cm de comprimento. Camada da epicútis com células himeniformes, eretas. Pleurocistídios numerosos. Substrato: sobre tronco morto.



Código: 14B

Ordem: Agaricales. Família: Tricholomataceae. Espécie: *Marasmius* sp. Píleo: superfície superior branca, campanulado, 1,5 cm de diâmetro. Lamelas: brancas. Estipe: preto, filiforme, 1,5 cm de comprimento. Substrato: sobre folha seca.



Código: 15B

Ordem: Aphyllporales. Família: Ganodermataceae. Espécie: *Ganoderma applanatum*. Píleo: superfície superior cor-de-vinho, aspecto lustroso quando jovem e recoberto por fragmentos de coloração ferrugínea na maturidade, superfície inferior branca com margem ferrugínea, reniforme, 7,0 – 12,5 cm x 4,0 – 7,0 cm de diâmetro. Formato dos poros: circular. Estipe dorsal, cor-de-vinho. Substrato: sobre tronco morto.



Código: 16B

Ordem: Aphyllporales. Família: Ganodermataceae. Espécie: *Ganoderma* sp. Píleo: superfície superior e inferior cor-de-vinho, petalóide, 2,5 cm x 3,0 cm de diâmetro. Formato dos poros: circular. Estipe lateral, 1,0 cm de comprimento, cor-de-vinho. Substrato: sobre tronco morto, no solo.



Código: 17B

Ordem: Agaricales. Píleo: superfície superior amarela, infundibuliforme, carnoso, 4,0 cm de diâmetro. Lamelas: alaranjadas, decurrentes. Estipe: amarelo, estriado, carnoso, cilíndrico, 4,0 cm de comprimento, 0,8 cm de diâmetro. Esporos obovados, inamilóides, amarelos em KOH. Substrato: sobre tronco morto.



Código: 18B

Ordem: Agaricales. Píleo: superfície superior branca, convexo, 1,5 cm de diâmetro. Lamelas: brancas. Estipe: branco, filiforme, 1,3 cm de comprimento. Substrato: sobre tronco morto.



Código: 19B

Ordem: Agaricales. Família: Tricholomataceae. Píleo: superfície superior creme, carnosos, plano-convexo, 1,7 cm de diâmetro. Lamelas: brancas, livres. Estipe: branco, achatado, 1,0 cm de comprimento. Substrato: sobre tronco morto.



Código: 20B

Ordem: Agaricales. Família: Hygrophoraceae. Espécie: *Hygrocybe* sp. Píleo: superfície superior vermelha, convexo, 0,3 cm - 0,5cm de diâmetro. Lamelas: brancas. Estipe: vermelho, filiforme, 3,0 cm de comprimento. Substrato: sobre tronco com raízes em decomposição.



Código: 21B

Ordem: Aphyllophorales. Família: Ganodermatacea. Espécie: *Amauroderma* sp.
Píleo: superfície superior marrom, zonada, superfície inferior marrom-escuro, 2,5 cm de diâmetro. Formato dos poros: irregular, quase liso. Estipe: marrom, filiforme, 2,3 cm de comprimento.



Código: 22B

Ordem: Aphyllophorales. Família: Stereaceae.
Píleo: superfície superior rosa-avermelhada, margem branca, superfície inferior lisa, amarela-esbranquiçada, coriáceo, espatulado, 3,0 cm x 2,5 cm de diâmetro. Fixação: sésil.
Hifas largas com grampos de conexão.
Substrato: tronco morto.

3.3 Características morfológicas dos fungos coletados no Bosque da Ciência e INPA-V8

	<p>Código: 1D</p> <p>Ordem: Agaricales. Família: Agaricaceae.</p> <p>Espécie: <i>Lepiota</i> sp. Píleo: superfície superior branca, com escamas marrons, convexo, 2,9 cm de diâmetro. Lamelas: brancas, numerosas. Estipe: branco, cilíndrico, 3,0 cm de comprimento, presença de anel. Substrato: no solo.</p>
--	---



	<p>Código: 2D</p> <p>Ordem: Aphyllophorales. Família: Stereaceae.</p> <p>Píleo: superfície superior branca, superfície inferior lilás, lisa, forma espiralada, 5,0 cm de diâmetro, odor adocicado. Estipe: branco, cilíndrico, 3,0 cm - 5,0 cm de comprimento. Substrato: no solo humoso.</p>
--	---



	<p>Código: 3D</p> <p>Ordem: Agaricales. Família: Tricholomataceae. Píleo: superfície superior branca, côncavo, 3,0 cm de diâmetro. Lamelas: brancas, largas. Estipe: branco, 6,0 cm de comprimento. Substrato: na liteira. Fungo com larvas de inseto se alimentando do seu micélio.</p>
---	--



Código: 4D

Ordem: Agaricales. Família: Tricholomataceae. Píleo: superfície superior cor-de-vinho, convexo, 2,5 cm - 4,0cm de diâmetro. Lamelas: creme-esverdeadas, largas. Estipe: concolor ao píleo, cilíndrico, 1,5 cm - 2,5 cm de comprimento. Substrato: sobre tronco morto em decomposição.



Código: 5D

Ordem: Auriculariales. Família: Auriculariaceae. Espécie: *Auricularia fuscosuccinea*. Píleo: superfície superior cor-de-vinho, superfície inferior acinzentada, lisa, formato auricular, gelatinoso, 3,5 cm - 4,0 cm de diâmetro. Fixação: séssil. Substrato: sobre tronco morto.



Código: 6D

Ordem: Aphyllophorales. Família: Stereaceae. Espécie: *Stereum* sp. Píleo: superfície superior creme, zonado, margem marrom, superfície inferior laranja-amarronzada, lisa, com margem creme, flabeliforme. 7,0 cm - 9,0 cm de diâmetro. Libera pigmento vermelho quando tocado. Substrato: sobre tronco morto.



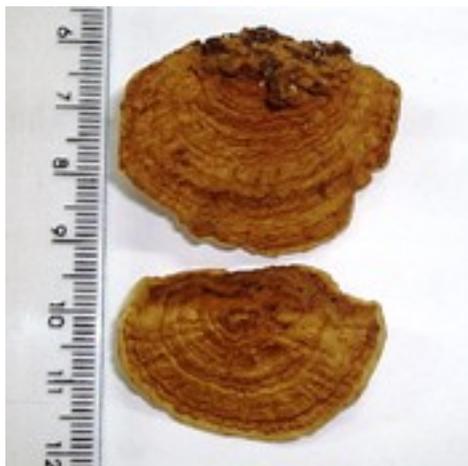
Código: 7D

Ordem: Agaricales. Píleo: superfície superior lilás-claro, infundibuliforme, 0,5 cm - 3,0cm de diâmetro. Odor adocicado. Lamelas: cor lilás, decurrentes. Estipe: concolor ao píleo, forma, micélio na base, 2,0 cm - 3,0 cm de comprimento. Substrato: sobre galho seco, coberto de micélio branco.



Código: 8D

Ordem: Agaricales. Família: Tricholomataceae. Píleo: superfície superior alaranjada, 1,7 cm - 2,0 cm de diâmetro. Lamelas: creme. Estipe: laranja-escuro, achatado, 2,5 cm - 4,0 cm de comprimento. Substrato: na liteira.



Código: 9D

Ordem: Aphyllophorales. Píleo: superfície superior marrom, zonado, margem branca, superfície inferior branca com exsudato alaranjado, carnoso a coriáceo, 3,0 cm x 4,0 cm - 4,0 cm x 7,5 cm de diâmetro. Odor forte. Substrato: sobre tronco morto.



Código: 1E

Ordem: Aphyllophorales. Família: Polyporaceae. Píleo: superfície superior branca, pleurotóide, 1,0 cm - 1,5 cm de diâmetro. Presença de insetos. Estipe: branco, 1,0 cm - 2,0 cm de comprimento. Substrato: sobre tronco morto em decomposição.



Código: 2E

Ordem: Agaricales. Família: Agaricaceae.
Espécie: *Lepiota* sp. Píleo: superfície superior branca, com escamas marrons no centro 4,5 cm de diâmetro. Lamelas: brancas, numerosas. Estipe: branco, 5,5 cm de comprimento, presença de anel. Substrato: no solo.



Código: 3E

Ordem: Aphylophorales. Família: Polyporaceae. Píleo: superfície superior branca, superfície inferior branca, formato de concha, 1,5 cm x 1,5 cm - 3,0 cm x 5,0 cm de diâmetro. Presença de insetos (Diptera) sobre o fungo. Poros angulosos. Estipe: branco, 0,3 cm -2,0 cm de comprimento. Substrato: sobre tronco morto.



Código: 4E

Ordem: Aphylophorales. Família: Polyporaceae. Espécie: *Daedalea* sp. Píleo: superfície superior creme, zonada, margem branca, superfície inferior creme-laranjada, margem clara, 8,0 cm x 4,5 cm de diâmetro. Formato dos poros: irregular. Fixação: sésbil. Substrato: sobre tronco morto.



Código: 5E

Ordem: Agaricales. Píleo: superfície superior branca, higrófono, 0,8 cm - 2,9 cm de diâmetro. Lamelas: brancas. Estipe: branco, lateral, 0,2 cm - 0,8 cm de comprimento, 0,4 cm de diâmetro. Substrato: sobre raiz grossa no solo.



Código: 6E

Ordem: Aphylophorales. Família: Polyporaceae. Píleo: superfície superior marrom e creme, zonada, margem branca, superfície inferior branca, em camadas, carnoso a coriáceo, 4,5 cm x 3,0 cm de diâmetro. Substrato: sobre tronco morto.



Código: 7E

Ordem: Auriculariales. Família: Auriculariaceae. Espécie: *Auricularia delicata*. Píleo: superfície superior rosada, superfície inferior, rosa-esbranquiçada, lamelas venosas, formato auricular, gelatinoso, 2,0 cm x 2,5 cm - 6,0 cm x 4,0 cm de diâmetro. Presença de insetos. Substrato: sobre tronco morto.

	<p>Código: 8E</p> <p>Ordem: Agaricales. Píleo: superfície superior branca, carnoso, 1,5 cm - 3,3 cm de diâmetro.</p> <p>Lamelas: brancas, numerosas, adnata. Estipe: branco, 4,0 cm - 5,0 cm de comprimento.</p> <p>Substrato: sobre folhas na liteira.</p>
	<p>Código: 9E</p> <p>Ordem: Auriculariales. Família: Auriculariaceae. Espécie: <i>Auricularia polytricha</i>. Píleo: superfície superior marrom, aveludada, superfície inferior cor-de-vinho, lisa, formato auricular, gelatinoso, 2,5 cm x 1,5 cm - 4,0 cm x 3,0 cm de diâmetro.</p> <p>Substrato: sobre tronco morto.</p>
	<p>Código: 10E</p> <p>Ordem: Agaricales. Píleo: superfície superior laranja-amarronzado, 2,5 cm - 3,0 cm de diâmetro. Lamelas: creme, largas e distantes.</p> <p>Estipe: concolor ao píleo, carnoso, 3,5 cm - 5,0 cm de comprimento, 0,5 cm de diâmetro.</p> <p>Substrato: sobre liteira.</p>
	<p>Código: 11E</p> <p>Ordem: Aphylophorales. Família: Polyporaceae. Espécie: <i>Trametes</i> sp. Píleo: superfície superior branca, superfície inferior branca, dimidiado, coriáceo, 8,5 cm x 5,0 cm de diâmetro. Odor forte. Presença de insetos.</p> <p>Formato dos poros: circular. Fixação: sésil.</p> <p>Substrato: sobre tronco morto.</p>

3.4 Características morfológicas dos fungos coletados em Urucu (Coari/AM).

	<p>Código: 1C</p> <p>Ordem: Aphylophorales. Família: Polyporaceae. Espécie: <i>Pleurotus</i> sp. Píleo: superfície superior branca, carnoso a coriáceo, 9,5 cm x 5,0 cm de diâmetro. Lamelas: brancas, decurrentes. Estipe: branco, lateral. Presença de insetos. Substrato: sobre tronco morto na água.</p>
<p>Código: 1F</p> <p>Ordem: Aphylophorales. Família: Polyporaceae. Píleo: superfície superior e inferior marrom, coriáceo. Lamelas: marrons. Estipe: lateral. Substrato: sobre tronco morto no solo.</p>	<p>Código: 2F</p> <p>Ordem: Aphylophorales. Família: Polyporaceae. Píleo: Superfície superior zonada. Formato dos poros: circular. Fixação: sésil. Substrato: sobre tronco morto.</p>
<p>Código: 3F</p> <p>Ordem: Aphylophorales. Família: Polyporaceae. Píleo: superfícies superior e inferior brancas, membranáceo a coriáceo. Formato dos poros: hexagonal. Fixação: sésil. Substrato: sobre tronco morto.</p>	<p>Código: 4F</p> <p>Ordem: Aphylophorales. Família: Polyporaceae. Espécie: <i>Pycnoporus sanguineus</i>. Píleo: superfície superior vermelha, flabeliforme. Formato dos poros: circular a hexagonal. Estipe: lateral. Substrato: sobre tronco morto.</p>

3.5 Crescimento radial dos fungos em BDA, FTA e Malte

Os Basidiomycetes isolados foram avaliados quanto ao crescimento radial em meio sólido BDA, Farelo de Trigo e Malte (Figuras 4, 5 e 6).

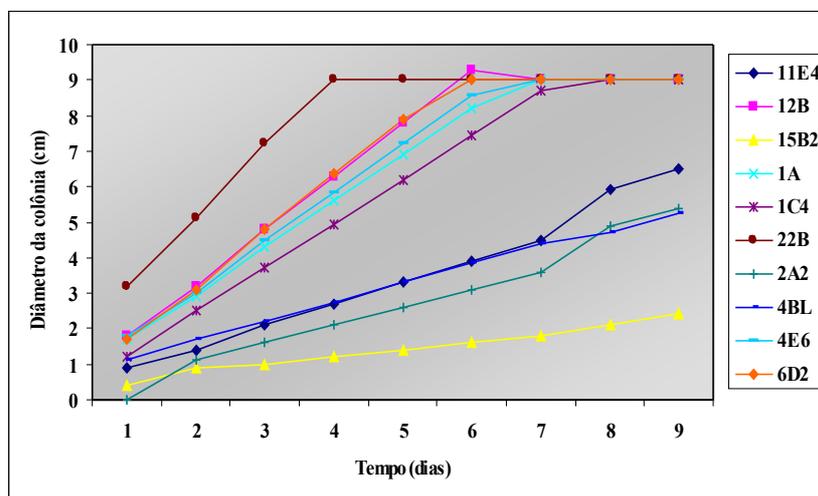


Figura 4 - Curva de crescimento micelial comparativo entre as linhagens de Basidiomycetes estudadas cultivadas em meio BDA: *Trametes* sp. 11E4, *Pycnoporus sanguineus* 12B, *Ganoderma applanatum* 15B2, *Daedalea* sp. 1A, *Pleurotus* sp. 1C4, Stereaceae 22B, *Ganoderma* sp. 2A2, *Cantharellus guyanensis* 4Bl, *Daedalea* sp. 4E6, *Stereum* sp. 6D2.

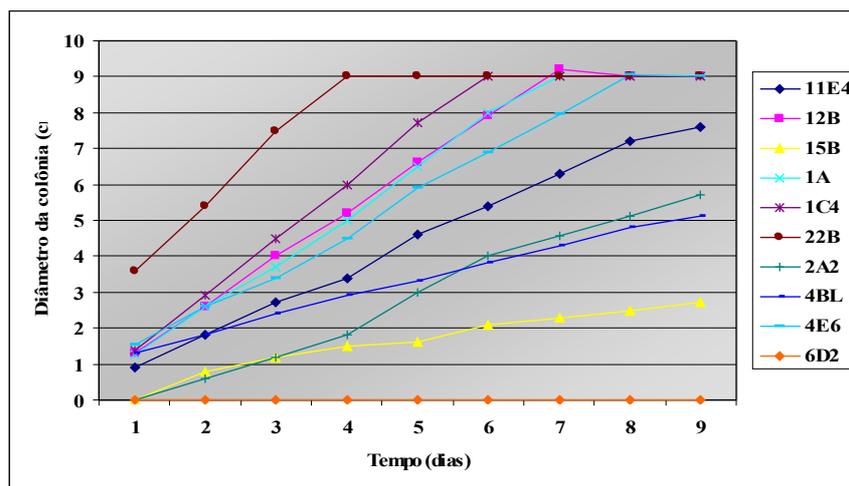


Figura 5 - Curva de crescimento micelial comparativo entre as linhagens de Basidiomycetes estudadas cultivadas em meio agar-malte: *Trametes* sp. 11E4, *Pycnoporus sanguineus* 12B, *Ganoderma applanatum* 15B2, *Daedalea* sp. 1A, *Pleurotus* sp. 1C4, Stereaceae 22B, *Ganoderma* sp. 2A2, *Cantharellus guyanensis* 4Bl, *Daedalea* sp. 4E6, *Stereum* sp. 6D2.

Quando os fungos foram cultivados em **meio BDA**, observou-se que até o quarto dia, o crescimento era bastante lento para a maioria dos isolados; entretanto o fungo Stereaceae 22B apresentou crescimento rápido com média de 2,00 cm por dia. Após dez dias de incubação, seis isolados já haviam crescido por todo o diâmetro da placa de Petri, mas três isolados ainda estavam praticamente na metade da placa (Figura 4).

Para o **meio com malte**, o fungo Stereaceae 22B apresentou crescimento muito rápido logo ao quarto dia de cultivo, enquanto que os demais apresentaram crescimento lento. Ao décimo dia de crescimento, os fungos *Daedalea* sp. 1A, *Daedalea* sp. 4E6, *Pleurotus* sp. 1C4, *P. sanguineus* 12B e Stereaceae 22B atingiram todo o diâmetro da placa (9 cm). Os isolados *Ganoderma* sp. 2A2 e *C. guyanensis* 4Bl estavam na metade do diâmetro da placa e *G. applanatum* apresentou uma colônia de cerca de 4 cm de diâmetro (Figura 5).

Com relação ao crescimento dos fungos em **meio FTA**, observou-se crescimento lento nos quatro primeiros dias, destacando-se o fungo Stereaceae 22B com média de 4,55 cm de diâmetro. No décimo dia, quatro isolados apresentaram crescimento por todo o diâmetro da placa de Petri, *Pleurotus* sp. 1C4, *P. sanguineus* 12B, Stereaceae 22B e *Daedalea* sp. 1A, sendo considerados de crescimento rápido em FTA. Os isolados *Ganoderma* sp. 2A2 e *C. guyanensis* 4BL foram considerados de crescimento lento e *G. applanatum* 15B foi de crescimento muito lento (Figura 6).

Desta forma, os isolados *Stereum* sp. 6D2 e Stereaceae 22B foram classificados de crescimento rápido. Os isolados *Pycnoporus sanguineus* 12B, *Pleurotus* sp. 1C4, *Daedalea* sp. 1A, *Daedalea* sp. 4E6, foram considerados fungos de crescimento moderado. Os isolados *Ganoderma* sp. 2A2 (Figura 7), *C. guyanensis* 4Bl e *Trametes* sp. 11E4 foram considerados de crescimento lento, enquanto que o isolado *G. applanatum* 15B2 apresentou crescimento muito lento (Tabela 7).

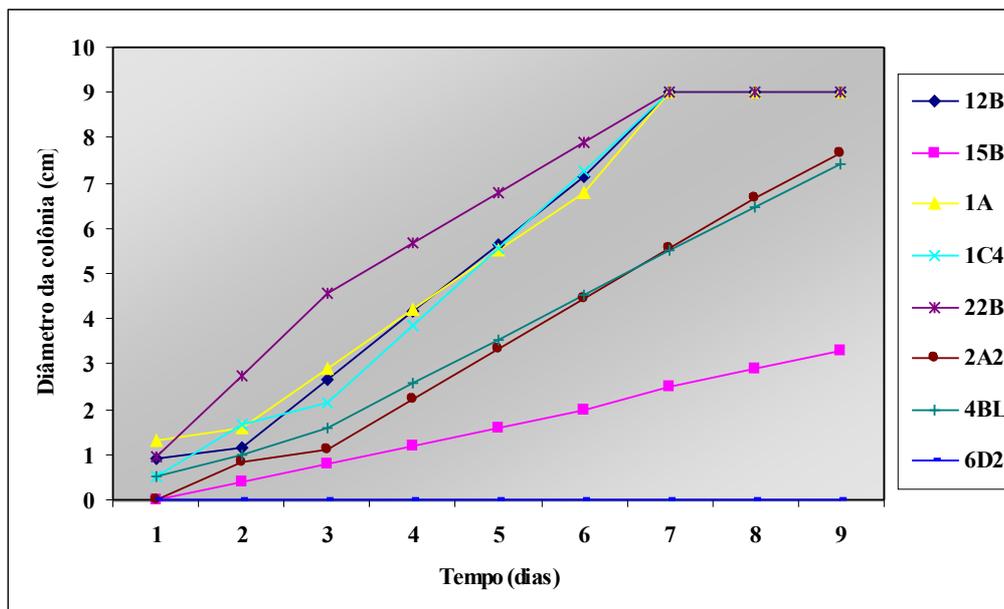


Figura 6 - Curva de crescimento micelial comparativo entre as linhagens de Basidiomycetes estudadas cultivadas em meio FTA: *Pycnoporus sanguineus* 12B, *Ganoderma applanatum* 15B2, *Daedalea* sp. 1A, *Pleurotus* sp. 1C4, Stereaceae 22B, *Ganoderma* sp. 2A2, *Cantharellus guyanensis* 4Bl, *Stereum* sp. 6D2.

Tabela 7 - Classificação das linhagens de Basidiomycetes de acordo com a velocidade do crescimento micelial (cm por dia) em BDA, FTA e Ágar-malte.

Fungo	Velocidade (cm por dia)			Média	Classe de crescimento
	BDA	Malte	FTA		
<i>Cantharellus guyanensis</i> 4B1	0,55	0,50	0,70	0,58	Lento
Stereaceae 22B	2,00	1,80	1,60	1,80	Rápido
<i>Stereum</i> sp. 6D2	1,55	nc	nc	nc	Rápido
<i>Ganoderma</i> sp. 2A2	0,58	0,85	0,68	0,70	Lento
<i>Pleurotus</i> sp. 1C4	1,25	1,52	1,11	1,29	Moderado
<i>Daedalea</i> sp. 1A	1,30	1,35	0,96	1,20	Moderado
<i>G. applanatum</i> 15B2	0,36	0,32	0,40	0,36	Muito lento
<i>Daedalea</i> sp. 4E 6	1,35	1,07	nc	1,21	Moderado
<i>Trametes</i> sp. 11E 4	0,60	0,90	nc	0,75	Lento
<i>Pycnoporus sanguineus</i> 12B	1,50	1,32	1,08	1,30	Moderado

nc= não cresceu, cm = centímetro

Classes: 0 - 0,5= muito lento, 0,51 – 1,0 = lento, 1,1 – 1,5 = moderado, 1,51 – 2,0 = rápido.

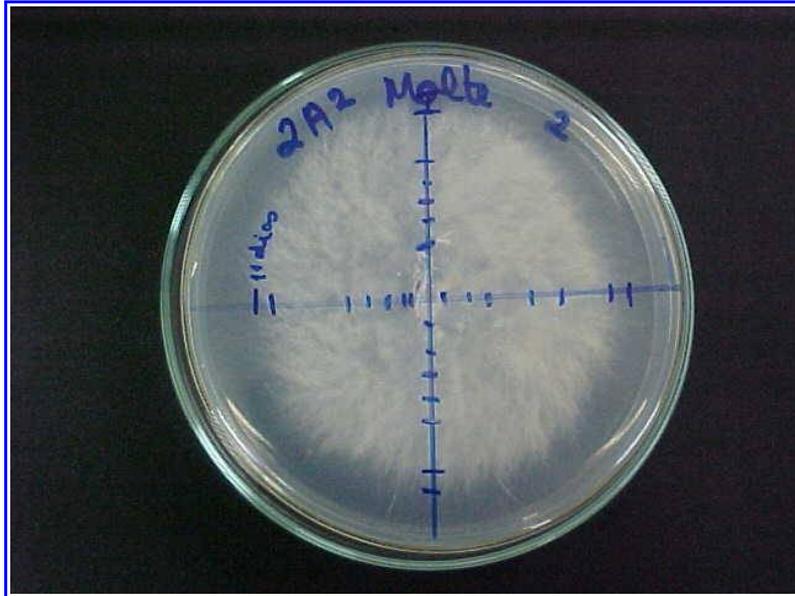


Figura 7 – Aspecto do crescimento micelial radial do isolado *Ganoderma* sp. 2A2 cultivado em agar-malte, após sete dias de cultivo.

4 - CONCLUSÕES

- a) Foi verificada a ocorrência de Basidiomycetes pertencentes às ordens Agaricales, Aphyllophorales, Auriculariales e Tremellales, e às famílias Agaricaceae, Auriculariaceae, Cantharellaceae, Ganodermataceae, Hygrophoraceae, Polyporaceae, Russulaceae, Stereaceae, Tremellaceae e Tricholomataceae, nas áreas de floresta estudadas.
- b) Na mata do mini-campus da UFAM foi observada a ocorrência da espécie *Oudemansiella stefenii* (Agaricaceae), e os gêneros *Agaricus*, *Leucocoprinus* (Agaricaceae), *Daedalea* (Polyporaceae) e *Ganoderma* (Ganodermataceae).
- c) Nos exemplares coletados na Reserva de Campina foram identificadas as espécies *Auricularia delicata* (Auriculariaceae), *Cantharellus guyanensis* (Cantharellaceae), *Pycnoporus sanguineus* (Polyporaceae), *Ganoderma applanatum* (Ganodermataceae), e os gêneros *Clitocybe* (Tricholomataceae), *Russula* (Russulaceae), *Marasmius* (Tricholomataceae), *Tremella* (Tremellaceae), *Amauroderma* (Ganodermataceae) e *Hygrocybe* (Hygrophoraceae).
- d) As espécies identificadas no Bosque da Ciência do INPA foram *Auricularia fuscossuccinea*, *A. delicata*, *A. polytricha* (Auriculariaceae), e os gêneros *Stereum* (Stereaceae), *Daedalea*, *Trametes* (Polyporaceae) e *Lepiota* (Agaricaceae).

CAPÍTULO 3

DETECÇÃO DE ENZIMAS PRODUZIDAS POR BASIDIOMYCETES DA AMAZÔNIA

RESUMO

Fungos têm sido usados extensivamente como produtores de diferentes substâncias de interesse econômico, tais como enzimas, antibióticos, vitaminas, aminoácidos e esteróides. Este estudo teve como objetivo, detectar a produção de enzimas como amilases, proteases, celulasas, fenoloxidasas e pectinases por linhagens de Basidiomycetes, oriundas de áreas de floresta da Amazônia. Para a produção de enzimas, os fungos foram cultivados em meio líquido adicionado de substrato indutor (0,5%), com pH ajustado para cada enzima e incubados a 28°C, sob agitação, 140rpm, durante 96 ou 120 horas. Após este período, as amostras foram filtradas, para a separação da massa micelial. Os filtrados foram inoculados em “cup plates” de 6 mm de diâmetro, perfurados na superfície de meios de cultura sólidos, adequados para a detecção de cada enzima em placa de Petri. As placas foram incubadas à temperatura de 28°C por 24 horas, e reveladas para observação dos halos enzimáticos. Foi verificada a atividade da amilase e protease produzida pelos fungos, crescidos em meio líquido, com diferentes fontes nutricionais. Foi possível detectar a produção de celulasas e proteases por todos os isolados, 40% produziram amilases, 50% produziram fenoloxidasas e 10% produziram pectinases. Quanto a atividade da amilase, o substrato farelo de trigo foi o que proporcionou os maiores halos de degradação, destacando-se os fungos *Daedalea* sp.4E6 e *Daedalea* sp. 1A, Stereaceae 22B e *Pycnoporus sanguineus* 12B. Considerando os substratos testados para produção de proteases, foi observado que o substrato farinha de peixe foi o melhor. Os fungos *P. sanguineus*, Stereaceae e *Cantharellus guyanensis* foram os melhores produtores de protease.

Palavras-chave: Atividade enzimática, Fungos, Biotecnologia.

1 - INTRODUÇÃO

Fungos têm sido usados extensivamente como produtores de diferentes substâncias de interesse econômico, tais como enzimas, antibióticos, vitaminas, aminoácidos e esteróides (BRAGA *et al.*, 1999).

As enzimas são usadas, em grande escala, na indústria têxtil (amilase, celulase), de detergentes (proteases, lipases, celulase), de alimentos (pectinases, proteases, celulases) e de couro (protease, lipase) (NIELSEN & OXENBOLL, 1998).

Amilases, celulases, lipases e lactases de fungos podem ter aplicação farmacêutica, sendo usadas para auxiliar a digestão. Enzimas produzidas por fungos também podem ser utilizadas na produção de ácido cítrico, ácido fumárico e ácido kojico. Para aplicações analíticas, como a álcool desidrogenase para análise do etanol, galactose oxidase, para análise da galactose, glicerol kinase e triacilglicerol lipase, para análise de triglicerídeos, urato oxidase, para análise do ácido úrico (NG, 2004).

A busca contínua de microrganismos versáteis, capazes de degradar de maneira eficiente um grande número de poluentes a um baixo custo operacional tem motivado os estudos de biodegradação.

Estudos têm sido realizados explorando a capacidade de Basidiomycetes em degradar e mineralizar corantes. Estes fungos caracterizam-se por serem bons produtores de lacase, uma fenoloxidase dependente de cobre. Em processos de oxidação de muitos compostos, principalmente fenólicos, a lacase apresenta especificidade para um grande número de compostos xenobióticos e efluentes industriais (DURAN & ESPÓSITO, 2000).

Enzimas hidrolíticas também têm sido estudadas quanto à sua ação de antagonismo contra fungos. Isolados do fungo *Trichoderma*, os quais reduzem a incidência da vassoura-de-bruxa em plantas de cacau atacadas pelo fungo *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, produziram hidrolases, como quitinases, celulases, proteases e amilases, em meio líquido contendo substratos específicos. Há evidências do possível envolvimento destas enzimas na interação antagonista entre estes dois fungos, pela ação na parede celular (DE MARCO *et al.*, 2003).

Desta forma, este estudo teve como objetivos detectar a produção de enzimas, como amilases, proteases, celulasas, fenol oxidases e pectinases pelas linhagens de Basidiomycetes isoladas. Os objetivos específicos foram:

- a) selecionar as linhagens produtoras de enzimas em meios sólidos específicos;
- b) verificar a atividade da amilase produzida pelos fungos crescidos em meio líquido com diferentes fontes de carbono;
- c) verificar a atividade da protease dos fungos cultivados em meio líquido com diferentes fontes de proteína.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE AMILASES, PROTEASES, CELULASES, FENOLOXIDASES E PECTINASES POR BASIDIOMYCETES DA AMAZÔNIA.

Condições de cultivo para produção de enzimas

Para a produção de enzimas, os fungos testados foram previamente cultivados em meio BDA por 10 dias. Três discos de micélio das espécies de Basidiomycetes estudadas foram cultivados em meio líquido *Solução de Manachini* (KH_2PO_4 , 2g/L; $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 1g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1g/L; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,9g/L; Extrato de levedura, 1g/L; Água destilada, 1000 mL), adicionado de substrato indutor (0,5%), com pH ajustado para cada enzima: amilase (amido de milho Maizena®, pH 6,0), celulase (Carboximetilcelulose ou CMC Fluka, pH 5,0), pectinase (Pectina cítrica Vetec, pH 2,5), protease (gelatina, pH 6,9), fenoloxidase (Farelo de trigo, pH 6,0) e incubadas a 28°C, sob agitação a 140rpm, durante 96 ou 120 horas (MANACHINI *et al.*, 1987; TEIXEIRA, 1994). O experimento foi realizado em triplicata.

Ensaio qualitativo “cup plate” para detecção de enzimas

Após o período de incubação em meio líquido, as amostras foram filtradas com gaze esterilizada, para a separação da massa micelial. Foram inoculados 100 µL do filtrado, em “cup plates” de 6 mm de diâmetro perfurados na superfície de meios de cultura sólidos adequados para a detecção de cada enzima em placa de Petri: agar-amido (amilases), agar-CMC (celulases), agar-pectina (pectinases), agar-gelatina-leite (proteases), agar-ácido tânico (fenoloxidases). As placas foram incubadas à temperatura de 28°C por 24 horas. Após este período, foram reveladas: Amilase (Iodo 0,1N), Celulase (Vermelho do Congo 0,1%), Pectinase (Ácido clorídrico 5N), e observada a formação dos halos enzimáticos, os quais foram medidos com paquímetro e expressos em mm (DINGLE *et al.*, 1953; TEIXEIRA, 1994). O ensaio foi realizado em triplicata.

2.2 ATIVIDADE DA AMILASE DE BASIDIOMYCETES DA AMAZÔNIA.

Crescimento em meio líquido

Para a produção de amilases, os fungos estudados foram previamente cultivados em meio BDA por 10 dias. Três discos de micélio das espécies de Basidiomycetes foram cultivados em frascos de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido (constituído de KH_2PO_4 , 5g/L; K_2HPO_4 , 6,7g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1g/L; Água destilada, 1000 mL, pH 7,0), adicionados de diferentes fontes de carbono (40g/L de amido de milho, maltose ou farelo de trigo). Foram incubados a 28°C, sob agitação 140rpm, durante 96 horas. Após este período, as amostras foram centrifugadas em mini centrífuga *Mini Spin Eppendorf* (9000 rpm por 15 minutos) e o sobrenadante foi usado como caldo enzimático bruto (SIQUEIRA *et al.*, 1997).

Deteccção da produção de amilases em meio sólido

O caldo enzimático bruto (100 μL) obtido de cada amostra, foi transferido para “cup plates” de 6 mm de diâmetro perfurados na superfície de meio de cultura sólido agar-amido (Agar, 9g; amido, 5g; tampão citrato-fosfato 0,1M pH 5,0 com volume final de 500 mL), para a deteção da enzima em placa de Petri. As placas foram incubadas à temperatura de 28°C por 24 horas. Após esse período, foram reveladas com solução de Iodo 0,1N e observada a formação dos halos enzimáticos, os quais foram medidos com paquímetro e expressos em mm (DINGLE *et al.*, 1953; TEIXEIRA, 1994). O experimento foi realizado em triplicata.

Ensaio de atividade enzimática

A mistura da reação enzimática contendo 500 μL de tampão acetato de sódio (0,2M, pH 5,0) e 500 μL de solução de amido 0,5% (0,5g de amido em 100mL de água destilada) foi pré-incubada em banho-maria a 37°C por 5 minutos antes da adição de 250 μL de caldo enzimático. As amostras foram incubadas a 37°C por 15 minutos e a reação foi bloqueada pela adição de 250 μL de HCl 5N. Os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método de Somogyi (1945) com referência a uma curva-padrão de glicose. O sistema de quantificação de açúcares foi constituído de 0,1 mL de amostra contendo os açúcares redutores adicionado de 1,9 mL de água destilada e 1 mL de reagente cúprico. Foi incubado em banho-maria fervente por 15 minutos e resfriado imediatamente em banho de gelo. Adicionou-se 1 mL de reativo arsenomolibdico e 6 mL de água destilada. Após

homogeneização as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 510nm. Uma unidade (U) de amilase foi definida como a quantidade de enzima que produz 1 μmol de glicose por minuto nas condições da reação citada (NGUYEN *et al.*, 2002; HAN, 2003).

2.3 ATIVIDADE DA PROTEASE DE BASIDIOMYCETES DA AMAZÔNIA.

Crescimento em meio líquido

Para produção de proteases, os fungos estudados foram previamente cultivados em meio BDA por 10 dias. Três discos de micélio das espécies de Basidiomycetes foram cultivados em frascos de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido *Solução de Manachini*, adicionado de diferentes fontes de proteína (5g/L de gelatina, concentrado protéico de peixe, farinha de soja). Foram incubadas a 28°C, sob agitação de 140rpm, durante 96 horas. Após este período, as amostras foram centrifugadas em mini centrífuga *Mini Spin Eppendorf* (9000 rpm por 15 minutos) e o sobrenadante foi usado como caldo enzimático bruto.

O substrato concentrado protéico de peixe ou “piracuí” (termo regional) foi obtido de pesquisas da Coordenação de Pesquisas em Tecnologia de Alimentos (CPTA/INPA). Este substrato foi feito a partir do filé de piranha, peixe da região, e transformado em farinha. Apresenta a seguinte composição: proteínas (73,52%), lipídios (27,66%), cinzas (1,66%) e umidade (5,23%).

Determinação da biomassa

O micélio oriundo do crescimento dos fungos em meio líquido foi transferido para placa de Petri e seco em estufa a 90°C até peso constante.

Deteção da produção de proteases em meio sólido

O caldo enzimático bruto (100 μL) obtido de cada amostra, foi transferido para “cup plates” de 6 mm de diâmetro perfurados na superfície de meio de cultura sólido agar-gelatina-leite (Agar, 9g; solução de gelatina, 50 mL; solução de leite desnatado, 50 mL; tampão citrato-fosfato 0,1M pH 5,0, 400 mL), para a deteção da enzima em placa de Petri. As placas foram incubadas a temperatura de 28°C por 24 horas. Após este período, foram observadas quanto a formação dos halos enzimáticos, os quais foram medidos com

paquímetro e expressos em mm (DINGLE *et al.*, 1953; TEIXEIRA, 1994). O experimento foi realizado em triplicata.

Ensaio de atividade da protease

Foram colocados 250µL de solução de azocaseína 1% em microtubos estéreis (*Eppendorf*) mais 150µL de caldo enzimático. A mistura foi incubada a 25°C durante uma hora. Para o branco foi utilizado tampão Tris-HCl em vez do caldo enzimático. Após este período foi adicionado 1mL de ácido tricloroacético 10% (TCA) para bloquear a reação enzimática, e deixado em repouso por 15 minutos para precipitação. A seguir foi centrifugado a 17000 rpm por 5 minutos. Foram transferidos 0,5 mL para um tubo limpo, onde foram adicionados 2 mL de NaOH 1M. As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 440 nm. O mesmo procedimento foi realizado, incubando as amostras a 40°C por uma hora (BRAGA *et al.*, 1999; WANG & NG, 2001).

Análise estatística

Os diâmetros dos halos enzimáticos da amilase e da protease foram analisados pelo teste de Tukey, usando o programa ESTAT (Sistema para análises estatísticas, UNESP/Jaboticabal, versão 2.0).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE AMILASES, PROTEASES, CELULASES, FENOLOXIDASES E PECTINASES POR BASIDIOMYCETES DA AMAZÔNIA.

Com a técnica de “cup plate” foi possível detectar a produção de celulases e proteases por todos os isolados: 40% produziram amilases, 50% produziram fenoloxidasas e 10% produziram pectinases (Figura 29).

Revelando-se as placas de Agar-CMC com corante Vermelho do Congo, foi possível visualizar uma zona de clareamento em forma de halos, pela ação enzimática da celulase. A parte não afetada pela enzima cora-se de vermelho (MULLINGS, 1985).

A produção de proteases pode ser observada nas placas de Agar-gelatina-leite sem a necessidade de um revelador; o resultado positivo surge na forma de halos claros.

As amilases podem ser visualizadas revelando-se as placas de Agar-amido com solução de Iodo 1N, tintura de iodo ou vapor de cristais de iodo. O amido cora-se de azul e a área de degradação enzimática apresenta halos translúcidos.

As fenoloxidasas podem ser observadas pela formação de halos marrons, resultantes da oxidação do ácido tânico presente no agar, pela ação das enzimas como Lacases, Manganês-Peroxidasas, Lignina-Peroxidasas.

As pectinases são observadas nas placas com Agar-pectina pelo surgimento de um halo opaco ao redor do “cup plate”, após revelação com HCl 5N.

As Tabelas de 19 a 22 apresentam os dados da produção enzimática dos fungos ensaiados. Todos foram capazes de produzir pelo menos duas das enzimas estudadas. Os maiores halos para protease foram apresentados por *P. sanguineus* 12B (23,78 mm) e *G. applanatum* 15B2 (19,90 mm). Para amilases, foram obtidos os maiores halos pelos isolados *Trametes* sp. 11E4 e *Stereum* sp. 6D2, com 17,53 mm e 17,00 mm, respectivamente. Quanto à produção de fenoloxidasas, 50% dos fungos produziram este grupo de enzimas, destacando-se *P. sanguineus* 12B com halo de 17,87 mm. Todos os fungos estudados foram capazes de produzir celulases, destacando-se o isolado *Pleurotus* sp. com média de halo de 20,43 mm. Foi detectada a produção de pectinases apenas para *P. sanguineus*, com halo de 13,03 mm.

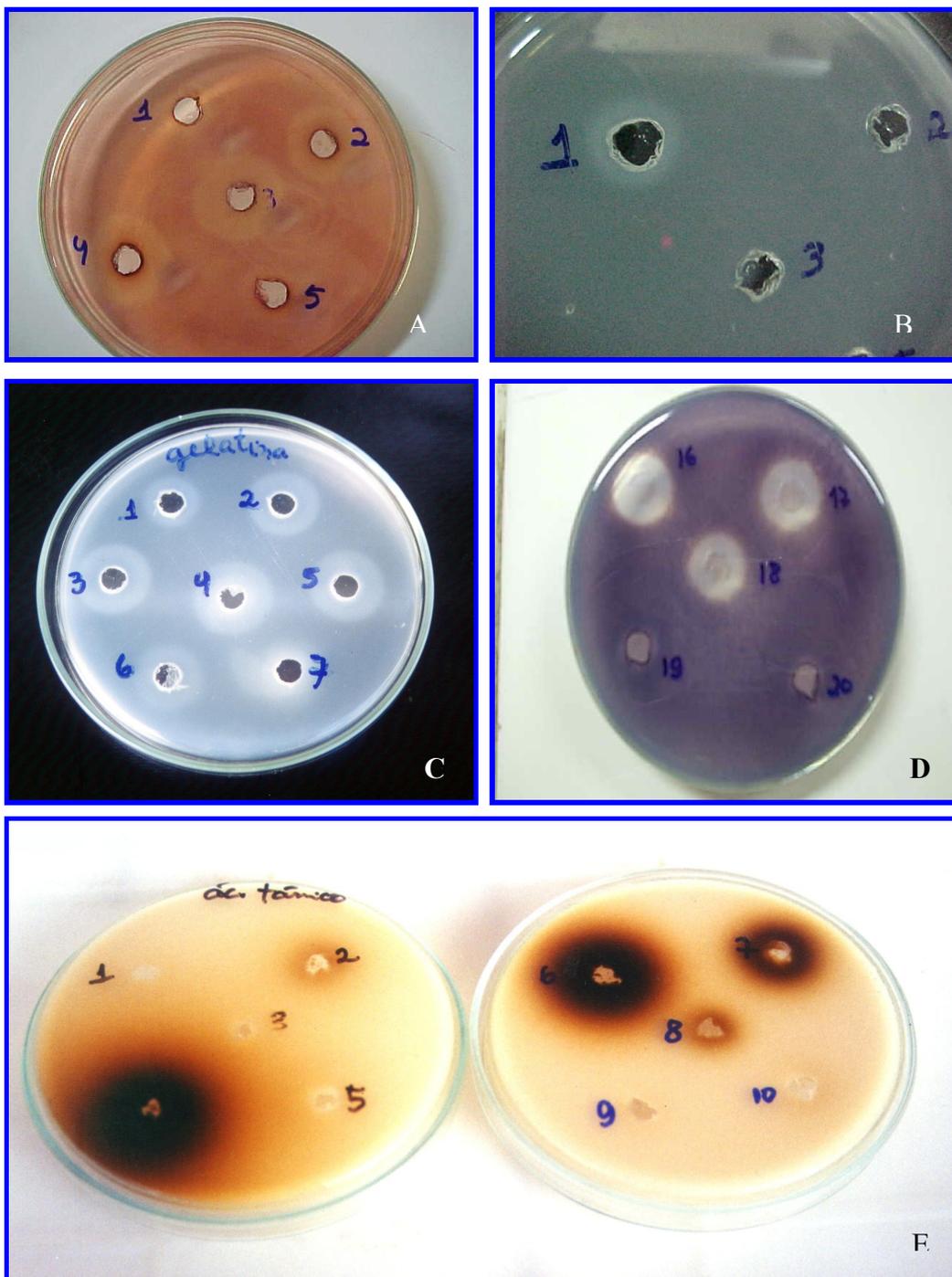


Figura 29 - Detecção de enzimas produzidas por Basidiomycetes: A) Celulases, B) Pectinases, C) Proteases, D) Amilases e E) Fenoloxidas

Tabela 19 - Atividade enzimática da protease de Basidiomycetes da Amazônia: média de diâmetros de halos (mm) em meio sólido.

Amostra	Espécie	Família	Incubação	Halos (mm)
11E 4	<i>Trametes</i> sp.	Polyporaceae	96 h	10,97
2A2	<i>Ganoderma</i> sp.	Ganodermataceae	96 h	12,89
12B	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Polyporaceae	96 h	23,78
6D2	<i>Stereum</i> sp.	Stereaceae	96 h	10,56
22B	Indeterminada	Stereaceae	96 h	17,21
1A	<i>Daedalea</i> sp.	Polyporaceae	96 h	18,67
1C4	<i>Pleurotus</i> sp.	Polyporaceae	96 h	15,95
4E 6	<i>Daedalea</i> sp.	Polyporaceae	96 h	18,25
4BL	<i>Cantharellus guyanensis</i>	Cantharellaceae	96 h	18,72
15B2	<i>Ganoderma applanatum</i>	Ganodermataceae	96 h	19,90

Todos os fungos testados foram capazes de produzir **proteases**. Os halos variaram de 10,56 mm de diâmetro para *Stereum* sp. até 23,78 mm para *Pycnoporus sanguineus* 12B.

As enzimas proteolíticas, proteases ou proteinases pertencem ao grupo das hidrolases, as quais têm em comum o envolvimento da água na formação do produto. Estas enzimas catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas, ocorrendo a transferência de componentes do substrato para a água (WHITAKER, 1994).

O principal papel das enzimas proteolíticas é nutricional, onde grandes cadeias polipeptídicas são hidrolisadas em pequenas moléculas que a célula possa absorver (FEDATTO, 2004).

Proteases são produzidas por vários microrganismos, como vírus, bactérias, protozoários e fungos. As proteases de origem microbiana correspondem a cerca de 40% da venda total mundial de enzimas. Possuem a maioria das características desejadas para aplicação em biotecnologia, e seu custo de produção é menor do que para enzimas de origem vegetal ou animal (SAID & PIETRO, 2002).

Uma nova protease, chamada de Pleurerina, foi produzida pelo fungo comestível *Pleurotus eryngii* (de Candolle): Fries) Quelet, e possui massa molecular de 11,5 kDa. A enzima tem pH ótimo igual a 5,0 e temperatura ótima de 45°C, e foi considerada relativamente estável a mudanças de pH ou temperatura (WANG & NG, 2001).

Outras proteases de cogumelos tendem a ser menos estáveis e apresentam massa molecular maior. A protease aspártica de *Irpex lacteus* (Fries) Fries possui massa molecular de 35kDa, as metaloendopeptidases de *Armillariella mellea* (Vahl: Fr.) Kummer, *P. ostreatus*

e *Tricholoma Saponaceum* (Fr.) Kummer apresentam massa molecular de 18,5kDa a 20kDa (KIM & KIM, 1999, KIM & KIM, 2001).

Alves *et al.* (2002) verificaram a produção de proteases por diferentes espécies de *Mucor* spp. cultivadas em meio sólido durante 96 horas. As colônias apresentaram halos que variaram de 3 a 6,4 cm.

Tabela 20 - Atividade enzimática das amilases de Basidiomycetes da Amazônia: média de diâmetros de halos (mm) em meio sólido.

Amostra	Espécie	Família	Incubação	Halos (mm)
22B	Não identificada	Stereaceae	120 h	0,0
12B	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Polyporaceae	120 h	9,0
2A2	<i>Ganoderma</i> sp.	Ganodermataceae	120 h	7,0
11E 4	<i>Trametes</i> sp.	Polyporaceae	120 h	17,5
6D2	<i>Stereum</i> sp.	Stereaceae	120 h	17,0
1A	<i>Daedalea</i> sp.	Polyporaceae	120 h	0,0
4E 6	<i>Daedalea</i> sp.	Polyporaceae	120 h	0,0
1C4	<i>Pleurotus</i> sp.	Polyporaceae	120 h	0,0
4BL	<i>Cantharellus guyanensis</i>	Cantharellaceae	120 h	0,0
15B2	<i>Ganoderma applanatum</i>	Ganodermataceae	120 h	0,00

Foi possível detectar a produção de **amilases** pelos fungos *P. sanguineus* 12B, *Ganoderma* sp. 2A2, *Trametes* sp. 11E4 e *Stereum* sp. 6D2. Os halos variaram de 7,00 a 17,53 mm de diâmetro.

As amilases são enzimas que hidrolisam moléculas de amido para formar diversos produtos incluindo dextrinas e polímeros menores compostos de moléculas de glicose (REDDY *et al.*, 2003). Estas enzimas constituem uma classe de enzimas industriais com aproximadamente 25% do mercado de enzimas (SINDHU *et al.*, 1997; RAO *et al.*, 1998).

Cinco variedades de cogumelos, *Absidia blakesleeana*, *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach, *Lentinus edodes*, *Peziza auburouniv* e *Polyporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Fr., foram testados quanto à habilidade em hidrolisar o amido. O fungo *L. edodes* foi a linhagem mais promissora para produção de amilases, a atividade amilolítica atingiu seu máximo (621 U/mL) após sete dias de incubação (EL-ZALAKI & HAMZA, 1979).

Foi verificada a produção de amilases por espécies de *Mucor* spp. crescidas em meio sólido acrescentado de amido solúvel. Após 72 horas de incubação, foram visualizados halos de 4,6 a 8,5 cm de diâmetro (ALVES *et al.*, 2002).

Tabela 21 - Atividade enzimática das fenoloxidasas de Basidiomycetes da Amazônia: média de diâmetros de halos (mm) em meio sólido.

Amostra	Espécie	Família	Incubação	Halos (mm)
2A2	<i>Ganoderma</i> sp.	Ganodermataceae	96 h	0,0
6D2	<i>Stereum</i> sp.	Stereaceae	96 h	0,0
11E 4	<i>Trametes</i> sp.	Polyporaceae	96 h	0,0
12B	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Polyporaceae	96 h	17,9
22B	Não identificada	Stereaceae	96 h	12,5
1C4	<i>Pleurotus</i> sp.	Polyporaceae	96 h	0,0
4BL	<i>Cantharellus guyanensis</i>	Cantharellaceae	96 h	10,4
1A	<i>Daedalea</i> sp.	Polyporaceae	96 h	10,7
15B2	<i>Ganoderma applanatum</i>	Ganodermataceae	96 h	0,0
4E 6	<i>Daedalea</i> sp.	Polyporaceae	96 h	11,9

Quanto à produção de **fenoloxidasas**, os diâmetros dos halos variaram de 10,44 a 17,87 mm, destacando-se o fungo *P. sanguineus* 12B.

Os fungos capazes de produzir fenoloxidasas foram *P. sanguineus* 12B, Stereaceae 22B, *C. guyanensis* 4BL, *Daedalea* sp. 1A e *Daedalea* sp. 4E6.

As fenoloxidasas estão amplamente distribuídas em muitas espécies de plantas e fungos (ROBLES *et al.*, 2000).

Vários trabalhos de “screening” de enzimas ligninolíticas têm sido realizados principalmente com fungos Basidiomycetes da podridão branca. Entretanto, outros fungos, representantes de diferentes grupos taxonômicos e ecofisiológicos são capazes de degradar substratos lignocelulósicos, e produzir enzimas ligninolíticas (SAPARRAT *et al.*, 2002).

A lignina é um heteropolímero recalcitrante formado de unidades de fenilpropanóides presentes nos tecidos vegetais, que conferem rigidez e resistência ao ataque biológico. Para despolimerizar a lignina, fungos da podridão branca desenvolveram um sistema oxidativo e não específico, incluindo enzimas extracelulares. Por não ser específico este sistema, Basidiomycetes da podridão branca e suas enzimas estão sendo estudados para sua aplicação na degradação de poluentes aromáticos causadores de problemas ambientais (FIELD *et al.*, 1993).

As enzimas de fungos têm se mostrado úteis na degradação de uma variedade de persistentes poluentes ambientais. Muitas destas enzimas são extracelulares e, na natureza, provavelmente estão envolvidas na degradação da madeira (MAYER & STAPLES, 2002).

A degradação da lignina é um processo complexo envolvendo vários tipos de enzimas oxidantes: 1) Lignina peroxidases catalizam a quebra de cadeias de arilpropano, pontes de éter e abertura de anéis aromáticos; 2) Manganês peroxidases, oxidam os componentes fenólicos da lignina em um processo que requer Mn e H₂O₂; 3) Lacases, oxidam uma variedade de compostos fenólicos num processo que não requer peróxido de hidrogênio ou íons de manganês; 4) outras enzimas como oxidases, fornecem H₂O₂.

Lacases são polifenoloxidasas que catalisam a oxidação de compostos fenólicos com redução simultânea de oxigênio a água. São tipicamente glicoproteínas contendo quatro átomos de cobre por molécula e são amplamente distribuídas nas plantas, fungos, insetos e bactérias. Na natureza, lacases estão envolvidas na biosíntese da parede da célula vegetal, degradação da lignina, detoxificação, esclerotização e virulência. Lacases de fungos têm implicações na esporulação, formação de rizomorfias, patogênese e formação de corpos de frutificação de fungos, bem como degradação da lignina. Fungos da podridão branca são conhecidos como os melhores organismos ligninolíticos, produtores de lacase e a maior fonte destas enzimas (KLONOWSKA *et al.*, 2001).

Estudos em meio de cultura líquido comprovaram a degradação de 2,4,6-triclorofenol pelos fungos da podridão branca *Panus tigrinus* (Bulliard: Fries) Singer e *Coriolus versicolor*, pelas enzimas MnP e lacase, respectivamente (REGINA & BROETTO, 2005)

As polifenoloxidasas (PPO) são responsáveis pelo escurecimento de frutos estragados e vegetais por catalizar a hidroxilação de monofenóis para o-difenóis e dehidrogenação de o-difenóis para o-quinonas na presença de oxigênio (GOMES & LEDWARD, 1996).

Tabela 22 - Atividade enzimática das celulases de Basidiomycetes da Amazônia: média de diâmetros de halos (mm) em meio sólido.

Amostra	Espécie	Família	Incubação	Halos (mm)
4BL	<i>Cantharellus guyanensis</i>	Cantharellaceae	120 h	10,6
4E 6	<i>Daedalea</i> sp.	Polyporaceae	120 h	19,5
1A	<i>Daedalea</i> sp.	Polyporaceae	120 h	19,6
11E 4	<i>Trametes</i> sp.	Polyporaceae	120 h	21,4
22B	Não identificada	Stereaceae	120 h	13,4
6D	<i>Stereum</i> sp.	Stereaceae	120 h	20,1
1C4	<i>Pleurotus</i> sp.	Polyporaceae	120 h	20,4

15B2	<i>Ganoderma applanatum</i>	Ganodermataceae	120 h	12,0
2A2	<i>Ganoderma</i> sp.	Ganodermataceae	120 h	13,4
12B	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Polyporaceae	120 h	18,6

Todos os fungos estudados foram capazes de produzir **celulases**. O diâmetro dos halos variou de 10,65 mm para *C. guyanensis* até 20,43 mm para *Pleurotus* sp.

A celulose, dentre os materiais naturais, é o biopolímero mais abundante do mundo e pode ser hidrolisada, com ácidos, a glicose. A hidrólise da celulose por celulases resulta na produção final de glicose (BAYER & LAMED, 1992)

Os fungos que decompõem substâncias celulósicas, em geral, ocorrem no solo, colonizando vegetais, suas raízes e resíduos, com importante função de reciclagem de nutrientes. Geralmente, fungos celulolíticos produzem um grande número de celulases, muitas são usadas para degradação de polissacarídeos da parede da célula vegetal (AKIN & BORNEMAN, 1990, DEHORITY, 1991; BAUCHOP, 1993).

Endoglucanase, celobiohidrolase e B-Glicosidase são os três maiores tipos de enzimas celulolíticas. Endoglucanases hidrolizam pontes 1,4- β ao longo da cadeia de celulose. Celobiohidrolases clivam unidades de celobiosil de terminações não redutoras de cadeias de celulose. B-Glicosidases clivam unidades glicosil de terminações não redutoras de celooligossacarídeos (NG, 2004).

As enzimas celulolíticas de fungos têm sido estudadas devido o seu potencial em biotecnologia, incluindo uso em alimento e bebida, detergente, indústria têxtil, polpa e papel. Sua função nutricional é evidente para a degradação da fibra vegetal servindo como fonte de carbono. Em geral, fungos celulolíticos produzem um grande número de celulases; muitos as usam para degradação de polissacarídeos da parede celular vegetal (DEHORITY, 1991).

Na indústria alimentícia, as celulases são usadas em vários processos, principalmente, na extração de componentes do chá verde, proteína de soja, óleos essenciais, aromatizantes e do amido de batata doce (ORBERG, 1981).

A produção de celulose e papel no Brasil é baseada principalmente no cultivo de eucalipto. Geralmente, apenas os troncos são usados, as cascas, folhas e ramos são deixados na floresta. Linhagens do cogumelo shiitake, *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, foram avaliadas quanto ao crescimento micelial e enzimas, no cultivo em resíduos de eucalipto. As enzimas envolvidas na bioconversão do substrato foram xilanases, celulases, B-glicosidases, B-xilosidase e Mn-peroxidase (SILVA *et al.*, 2005).

Quanto à produção de **pectinases**, os fungos foram cultivados em meio líquido acrescido de pectina, sob agitação, por 120 horas. Foi detectada a presença da enzima em meio sólido, apenas para *P. sanguineus*, com média de halo de 13,03 mm.

Pectinases compreendem um grupo heterogêneo de enzimas que catalizam a quebra de substratos contendo pectina. As pectinases de fungos são enzimas extracelulares, que degradam substâncias pécticas e possuem aplicação considerável na indústria de utilização de frutas.

Atualmente, a aplicação de enzimas pectinolíticas desempenha um importante papel na tecnologia de alimentos para a maceração de frutos e vegetais, bem como para a extração, concentração e clarificação de sucos, para dar estabilidade ao néctar de frutas. Na produção industrial de sucos de frutas é necessário eliminar a pectina liberada durante o processamento da fruta para reduzir o tempo de filtração e aumentar a produção ao término do processo (SOUZA *et al.*, 2003).

Foi estudada a habilidade do Basidiomycetes *Polyporus squamosus* (Hudson: Fr.) Fries em crescer e produzir pectinases em meio aquoso de duas fases composto de polietileno glicol e dextrana bruta. O fungo foi capaz de produzir simultaneamente dois produtos, 1) as pectinases e 2) biomassa, como fonte de proteína para nutrição animal, quando em cultivo submerso (ANTOV & PERICIN, 2001).

Espécies de *Mucor* spp. são capazes de produzir pectinases em meio sólido acrescido de pectina cítrica. Após 72 horas de crescimento das colônias, foram observados halos de 3,7 a 8,8 cm (ALVES *et al.*, 2002).

Lana (2004) observou baixa produção de pectinases por isolados do cogumelo *C. perniciosus*. Poucos isolados apresentaram relação halo/colônia maior que dois, enquanto que cinco fungos não produziram quantidades detectáveis desta enzima.

Além da utilização destas enzimas na indústria alimentícia, pesquisas confirmaram que, endoPGase podem degradar a parede da célula vegetal liberando oligômeros pécticos, os quais podem estimular uma variedade de respostas de defesa na planta. Bai *et al.* (2004) testaram a pectinase produzida por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido como elicitor de resistência de doenças de plantas. Foi verificado que a pectinase extraída do material em fermentação está envolvida na resistência a doenças em plantas de tomate e pepino.

3.2 ATIVIDADE DA AMILASE DE BASIDIOMYCETES DA AMAZÔNIA.

Foram estudados, fungos da classe Basidiomycetes quanto à sua habilidade em produzir amilases em diferentes fontes de carbono. Na Figura 30 pode-se observar a presença de halos de degradação do amido, pela atividade da amilase (zona mais clara), enquanto que o amido não hidrolisado cora-se de azul pela ação do iodo.

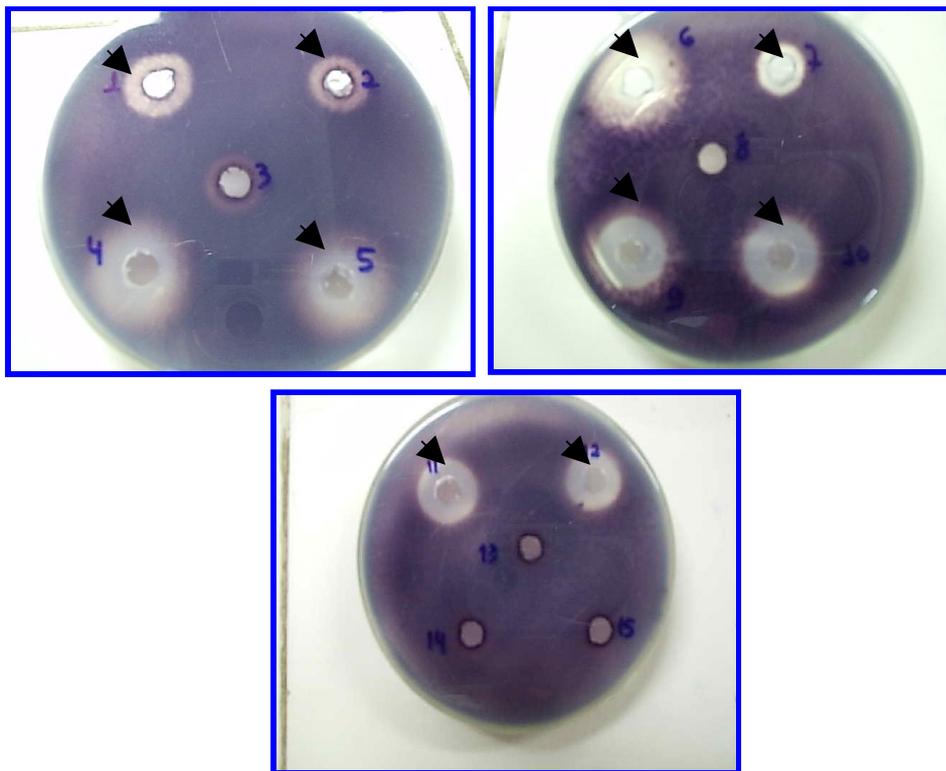


Figura 30 – Halos (zona clara ao redor dos “cup plate”) da amilase produzida pelos Basidiomycetes cultivados em diferentes fontes de carbono.

Na Tabela 23 são apresentados os valores dos halos enzimáticos produzidos pela amilase dos Basidiomycetes cultivados em variadas fontes de carbono.

Quando o **amido de milho** (Maizena®) foi utilizado como fonte de carbono, foi detectada a produção de amilases em sete isolados. Os halos enzimáticos variaram de 6,20 a 22,30 mm de diâmetro, sendo que os fungos *Daedalea* sp. 4E6 e *Daedalea* sp. 1A apresentaram os maiores halos estatisticamente. Não foi detectada a produção de amilases pelos fungos *G. applanatum* 15B2, *Ganoderma* sp. 2A2 e *C. guyanensis* 4Bl.

O substrato **farelo de trigo** como fonte de carbono induziu a produção de amilases por seis isolados. Os diâmetros dos halos variaram de 11,70 a 27,50 mm, destacando-se *Daedalea* sp. 4E6. Os fungos *Daedalea* sp. 4E6, *Daedalea* sp. 1A, Stereaceae 22B e *P. sanguineus* 12B foram considerados, estatisticamente, bons produtores da enzima. Não houve detecção de amilase nos isolados *Stereum* sp. 6D2, *G. applanatum* 15B2, *Ganoderma* sp. 2A2 e *C. guyanensis* 4Bl.

Seis isolados apresentaram produção de amilases quando **maltose** foi utilizada como fonte de carbono. Os halos variaram de 11,60 a 16,70 mm de diâmetro e não diferiram estatisticamente. Os fungos *P. sanguineus* 12B, *Stereum* sp. 6D2, *G. applanatum* 15B2 e *C. guyanensis* 4Bl não apresentaram produção de amilase.

Sugere-se que a produção da enzima seja regulada pela fonte de carbono ou substrato utilizado.

Considerando a preferência dos fungos pelos três substratos testados, amido de milho e farelo de trigo proporcionaram os melhores resultados para o fungo *Daedalea* sp. 4E6. Por outro lado, os isolados *Daedalea* sp. 1A e *Trametes* sp. 11E4 apresentaram-se bem nos três substratos. O fungo Stereaceae 22B foi melhor em farelo de trigo. O isolado *Pleurotus* sp. 1C4 teve preferência por farelo de trigo e maltose. *P. sanguineus* 12 B foi melhor em farelo de trigo do que em amido, sendo que em maltose não produziu a enzima.

Foi verificado que as amilases produzidas pelos fungos crescidos em meio líquido acrescentado de farelo de trigo proporcionaram os maiores halos de degradação do amido (Tabela 23).

Tabela 23 - Médias dos diâmetros dos halos (mm) enzimáticos de amilases produzidas por Basidiomycetes cultivados em diferentes fontes de carbono.

Amostras	Fungos	Fonte de carbono			Média
		Amido	Farelo de trigo	Maltose	
4E 6	<i>Daedalea</i> sp.	22,3Aa	27,5Aa	14,1Ab	21A
1A	<i>Daedalea</i> sp.	19,7ABa	23,1ABa	16,7Aa	20AB
22B	Stereaceae	13,2BCb	21,9ABa	11,6Ab	16BC
1C4	<i>Pleurotus</i> sp.	10,8Cb	17,7BCa	11,6Aab	13CD
12B	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	10,5Cb	19,1ABCa	0,0Bc	10DE
11E 4	<i>Trametes</i> sp.	8,7CDa	11,7Ca	12,8Aa	11CD
6D2	<i>Stereum</i> sp.	6,2CDa	0,0Da	0,0Ba	2F
15B2	<i>Ganoderma applanatum</i>	0,0Da	0,0Da	0,0Ba	0F
2A2	<i>Ganoderma</i> sp.	0,0Db	0,0Da	14,7Aa	5EF
4BL	<i>Cantharellus guyanensis</i>	0,0Da	0,0Da	0,0Ba	0F
	Média	9,2b	12,1a	8,1b	10

As médias seguidas de mesma letra maiúscula, na vertical, ou minúscula na horizontal, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 1%.

Foram selecionadas dez amostras de extrato enzimático que apresentaram os melhores resultados em meio sólido para realizar ensaios de atividade enzimática.

A atividade da amilase dos Basidiomycetes variou de 0,46 U/mL para o fungo *Stereaceae* 22B, cultivado em meio com farelo de trigo, até 9,12 U/mL para *Stereum* 6D2, crescido em meio com amido de milho. Os maiores valores de atividade da amilase foram obtidos por aqueles fungos que utilizaram amido e maltose como fonte de carbono (Tabela 24).

Tabela 24 - Atividade da amilase dos Basidiomycetes estudados.

Amostra	Fungo	Fonte de carbono	Glicose ($\mu\text{mol/mL}/15\text{min.}$)	Atividade (produto/tempo) U/mL
4E 6	<i>Daedalea</i> sp.	Amido	73,8	4,9 E
6D2	<i>Stereum</i> sp.	Amido	136,8	9,1 A
22B	Stereaceae	Amido	78,1	5,2 E
1A	<i>Daedalea</i> sp.	Amido	114,8	7,6 B
1A	<i>Daedalea</i> sp.	Maltose	100,4	6,7 CD
4E 6	<i>Daedalea</i> sp.	Maltose	105,7	7,1 BC
2A2	<i>Ganoderma</i> sp.	Maltose	90,5	6,0 D
4E 6	<i>Daedalea</i> sp.	Farelo de trigo	24,1	1,6 F
22B	Stereaceae	Farelo de trigo	6,9	0,5 G
12B	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Farelo de trigo	19,4	1,3 F

As médias seguidas de mesma letra maiúscula, na vertical, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 1%.

Para o substrato amido, foi observada uma correlação inversa e significativa ($p < 0,05$) pelo coeficiente de Pearson, ou seja, a amilase que produziu os maiores halos apresentou baixa atividade enzimática e vice e versa (Figura 31). Para o substrato farelo de trigo foi observada correlação positiva, os maiores halos proporcionaram as maiores atividades enzimáticas, entretanto não foi considerada significativa ($p < 0,05$) (Figura 32). Para o substrato maltose não foi observada correlação (Figura 32).

Ruegger & Tauk-Tornisielo (2004), estudando atividade da celulase em fungos, verificaram que as colônias com menor diâmetro proporcionaram os maiores índices enzimáticos para celulase. Souza *et al.* (2003) realizaram uma seleção de fungos com atividade pectinolítica e observaram correlação positiva entre o ensaio qualitativo para pectinases pela técnica de “cup plate” e a atividade da endopoligalacturonase.

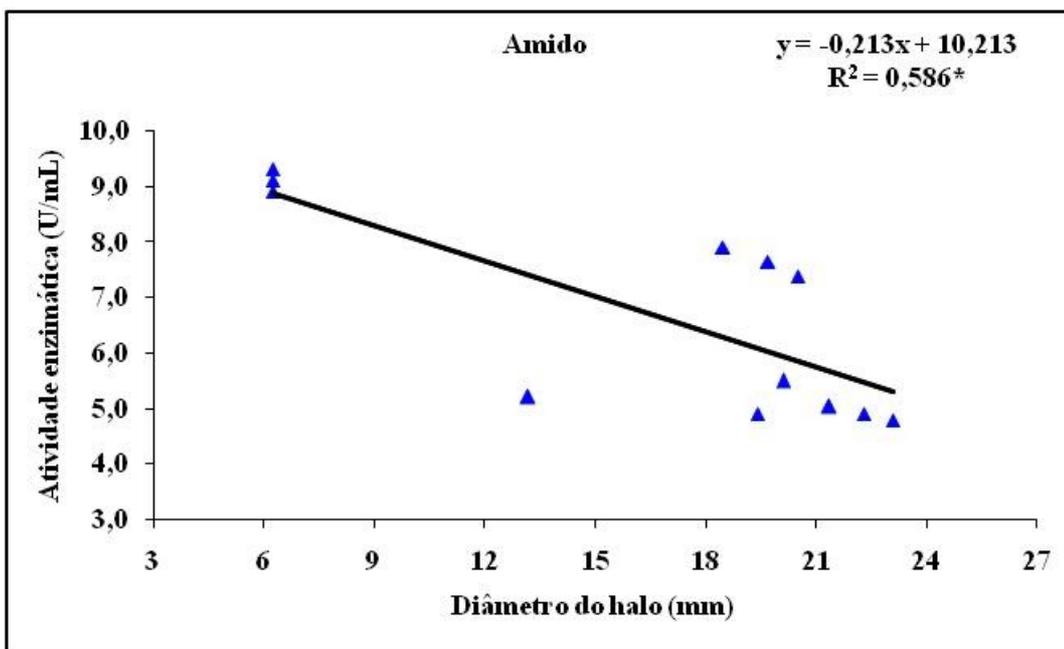


Figura 31 - Correlação entre o diâmetro dos halos e a atividade enzimática para a fonte de carbono amido. *Significativo a 5%.

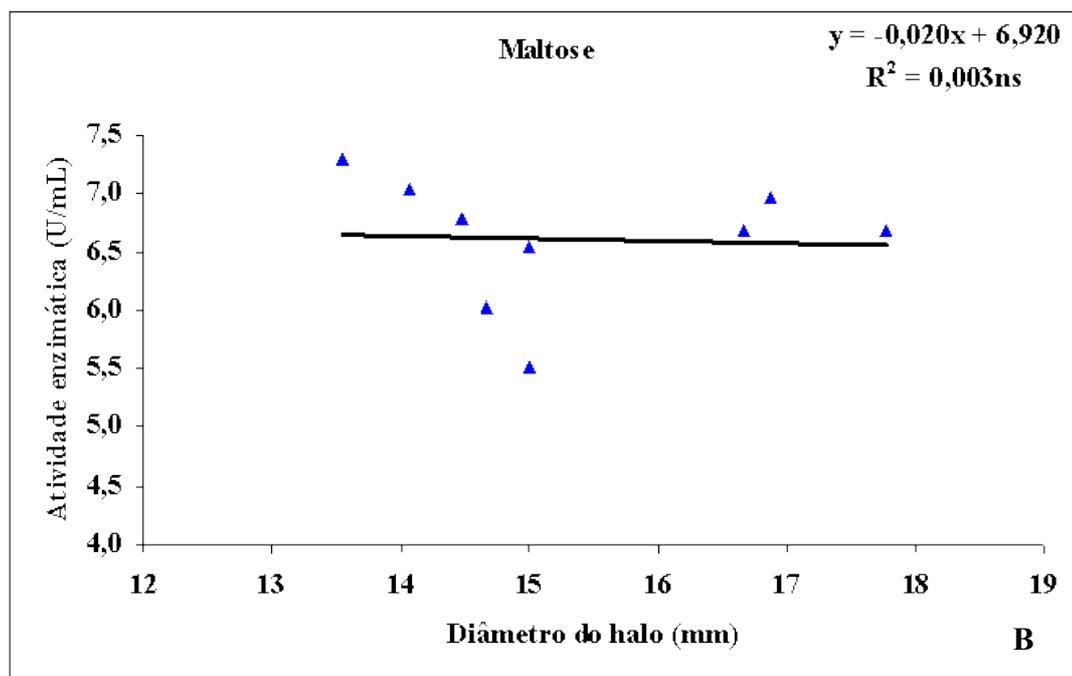
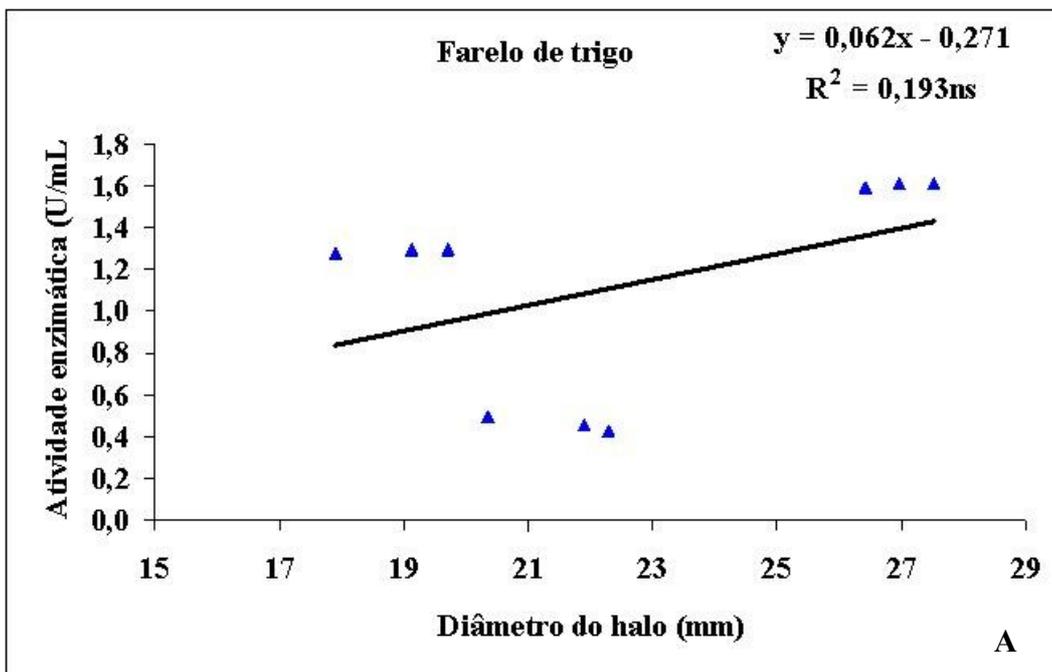


Figura 32 - Correlação entre o diâmetro dos halos e a atividade enzimática:

A) Farelo de trigo; B) Maltose. ^{ns} Não significativo a 5%.

3.3 ATIVIDADE DA PROTEASE DE BASIDIOMYCETES DA AMAZÔNIA.

A produção de biomassa seca dos Basidiomycetes crescidos em diferentes meios de cultura para produção de protease é apresentada na Tabela 25.

Tabela 25 - Biomassa produzida por Basidiomycetes cultivados em diferentes fontes de proteína.

Amostra	Fungos	Gelatina		Concentrado de peixe		Farelo de soja		Média
		g/50mL	g/L	g/50mL	g/L	g/50mL	g/L	
6D2	<i>Stereum</i> sp.	0,030	0,560	0,040	0,860	0,060	1,280	0,043
11E 4	<i>Trametes</i> sp.	0,040	0,800	0,040	0,700	0,060	1,280	0,047
4BL	<i>C. guyanensis</i>	0,070	1,380	0,080	1,580	0,190	3,880	0,113
15B	<i>G. applanatum</i>	0,050	1,060	0,040	0,800	0,030	0,660	0,040
12B	<i>P. sanguineus</i>	0,050	0,920	0,170	3,380	0,150	3,060	0,123
22B	Stereaceae	0,040	0,860	0,120	2,480	0,120	2,440	0,093
1C4	<i>Pleurotus</i> sp.	0,080	1,660	0,170	3,360	0,090	1,860	0,113
2A2	<i>Ganoderma</i> sp.	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1A	<i>Daedalea</i> sp.	0,050	0,980	0,080	1,600	0,050	0,920	0,060
4E 6	<i>Daedalea</i> sp.	0,110	2,260	0,080	1,520	0,150	2,960	0,113
	Média	0,052	1,048	0,082	1,628	0,09	1,834	

O meio com farelo de soja proporcionou maior produção de biomassa, com média de 1,83 g/L de matéria seca, seguido do meio com farinha de peixe, com 1,63 g/L.

Dos dez isolados testados, o fungo *P. sanguineus* foi o que apresentou maior produção de biomassa, com média de 2,45 g/L, sendo que o maior rendimento foi no meio com concentrado de peixe, obtendo até 3,38 g/L de biomassa seca.

A maior produção de biomassa no meio de cultura com **gelatina** foi 2,26 g/L para o fungo *Daedalea* sp. 4E6, seguido de *Pleurotus* sp. com 1,66 g/L.

Para o meio de cultura com concentrado **de peixe**, a maior produção de biomassa seca foi de 3,38 g/L para *P. sanguineus* e 3,36 g/L para *Pleurotus* sp.

O meio com **farelo de soja** obteve a produção de biomassa de até 3,88 g/L para o fungo *C. guyanensis*, em seguida ficou o fungo *P. sanguineus* com produção de 3,06 g/L.

Os fungos *Stereum* sp., *Trametes* sp., *C. guyanensis* e *Daedalea* sp. 4E6 apresentaram maior afinidade para produção de biomassa pelo meio com farelo de soja. As espécies *P. sanguineus*, *Pleurotus* sp., *Daedalea* sp. 1A mostraram mais afinidade pelo meio com farinha de peixe. Apenas o fungo *G. applanatum* teve preferência por meio com gelatina. O

fungo Stereaceae 22B apresentou a mesma afinidade para os meios com farelo de soja ou concentrado de peixe.

Os diâmetros dos halos enzimáticos da protease dos Basidiomycetes são apresentados na Tabela 26.

Considerando os três substratos testados, gelatina, farelo de soja e concentrado de peixe, para produção de proteases, foi observado que o substrato concentrado de peixe foi o melhor, proporcionando halos com média de 12,96 mm de diâmetro. O segundo melhor substrato foi a gelatina, com média de halo de 11,20 mm.

Dos dez fungos testados, *P. sanguineus* e Stereaceae 22B foram considerados os melhores produtores de protease, com média de halos de 17,15 mm e 18,01 mm de diâmetro, respectivamente. *C. guyanensis* ficou em segundo lugar, obtendo a média de halos de 14,74 mm, seguido de *Stereum* sp. com média de 13,48mm de diâmetro.

Tabela 26 - Médias dos diâmetros dos halos (mm) enzimáticos de proteases produzidas por Basidiomycetes cultivados em diferentes fontes de proteína.

Amostra	Fungos	Gelatina	Farelo de soja	Concentrado de peixe	Média
6D2	<i>Stereum</i> sp.	14,11BCa	12,61Ba	13,70Ba	13,48BC
11E 4	<i>Trametes</i> sp.	0,00Da	0,00Ea	0,00Da	0,00G
4BL	<i>C. guyanensis</i>	13,09Cb	19,11Aa	12,00BCb	14,74B
15B	<i>Ganoderma applanatum</i>	13,53Ca	11,33BCa	12,74BCa	12,30CD
12B	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	16,79ABa	16,85Aa	17,80Aa	17,15A
22B	Stereaceae	18,07ABa	17,33Aa	18,64Aa	18,01A
1C4	<i>Pleurotus</i> sp.	12,95Ca	9,45Cb	10,43Cb	10,94D
2A2	<i>Ganoderma</i> sp.	0,00	0,00	0,00	0,00
1A	<i>Daedalea</i> sp.	11,56Cab	9,60BCb	12,99BCa	11,39D
4E 6	<i>Daedalea</i> sp.	11,93Ca	3,13Db	11,87BCa	8,97E
	Média	11,20b	9,94c	12,96a	11,30

As médias seguidas de mesma letra maiúscula, na vertical, ou minúscula na horizontal, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 1%.

Quando **gelatina** foi utilizada como substrato, Stereaceae 22B e *P. sanguineus* foram considerados os melhores produtores de protease, com halos de 18,07mm e 16,79mm de diâmetro, respectivamente. O segundo melhor foi *Stereum* sp. com 14,11mm, seguido de *C.*

guyanensis, *G. applanatum*, *Pleurotus* sp., *Daedalea* sp. 1A e *Daedalea* sp. 4E6, que apresentaram resultados semelhantes.

Para o substrato **farelo de soja**, foi observada melhor produção de protease para *C. guyanensis*, Stereaceae 22B e *P. sanguineus*, com halos de 19,11mm, 17,33mm e 16,85mm de diâmetro, respectivamente. O fungo *Stereum* sp. foi o segundo melhor com halo de 12,61mm, seguido de *G. applanatum* e *Daedalea* sp. 1A.

Os diâmetros dos halos da protease dos fungos cultivados em meio com concentrado **de peixe** variou de 10,43mm a 18,64mm. Os melhores produtores da enzima foram Stereaceae 22B e *P. sanguineus* com halos de 18,64 e 17,80 mm de diâmetro, respectivamente. O fungo *Stereum* sp. ficou em seguida com halo de 13,70mm.

Considerando a afinidade de cada fungo por cada substrato testado, os fungos *Stereum* sp., *G. applanatum*, *P. sanguineus* e Stereaceae 22B apresentaram a mesma afinidade para os três substratos. O fungo *C. guyanensis* apresentou maior afinidade para farelo de soja. *Pleurotus* sp. teve maior afinidade por gelatina. Os fungos *Daedalea* sp. 4E6 e *Daedalea* sp. 1A optaram por gelatina e concentrado de peixe.

Os fungos *Trametes* sp. e *Ganoderma* sp. 2A2 não apresentaram halos enzimáticos e, também não mostraram crescimento micelial no meio de cultura líquido.

A atividade do ensaio enzimático da protease dos Basidiomycetes a 25°C e a 40°C é apresentada na Tabela 27.

Tabela 27 - Atividade enzimática (U/mL) da protease de Basidiomycetes a 25°C e a 40°C.

Fungo	Taxa	Gelatina		Concentrado de peixe		Farelo de soja		Média
		25°C	40°C	25°C	40°C	25°C	40°C	
6D2	<i>Stereum</i> sp.	0,187	0,020	0,053	0,020	0,067	0,033	0,380
11E 4	<i>Trametes</i> sp.	0,187	0,013	0,033	0,007	0,040	0,013	0,293
4BL	<i>C. guyanensis</i>	0,060	0,260	0,040	0,033	0,333	0,800	1,527
15B	<i>G. applanatum</i>	0,053	0,067	0,033	0,040	0,047	0,020	0,260
12B	<i>P. sanguineus</i>	0,107	0,220	0,000	0,347	0,000	0,420	1,093
22B	Stereaceae	0,107	0,067	0,333	0,140	0,247	0,167	1,060
1C4	<i>Pleurotus</i> sp.	0,053	0,013	0,027	0,020	0,047	0,033	0,193
2A2	<i>Ganoderma</i> sp.	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1A	<i>Daedalea</i> sp.	0,033	0,027	0,213	0,053	0,240	0,040	0,607
4E 6	<i>Daedalea</i> sp.	0,040	0,187	0,067	0,053	0,040	0,013	0,400
	Média	0,083	0,087	0,080	0,071	0,106	0,154	

Considerando a atividade enzimática (U/mL) da protease obtida dos Basidiomycetes cultivados em diferentes substratos, o substrato farelo de soja obteve a maior atividade, com média de 0,15 U/mL.

Os fungos que apresentaram os melhores resultados foram *C. guyanensis*, *P. sanguineus* e Stereaceae 22B. A temperatura de 40°C proporcionou melhor atividade enzimática do que aos 25°C.

As melhores atividades enzimáticas dos fungos cultivados em gelatina foram para *Stereum* sp. e *Trametes* sp. quando a enzima foi incubada a 25°C, e *C. guyanensis* e *P. sanguineus*, incubada a 40°C.

A protease dos fungos cultivados em meio com farinha de peixe foi melhor para Stereaceae 22B, quando incubada a 25°C e para *P. sanguineus*, a 40°C.

Para os fungos crescidos em meio com farelo de soja, a melhor atividade foi para *C. guyanensis* a 25°C e a 40°C, com maior desempenho a 40°C.

Apesar da protease do fungo *Trametes* sp. não ter formado halo em meio sólido foi detectada atividade da enzima no ensaio quantitativo. O fungo *Ganoderma* sp. 2A2 não formou halo em meio sólido e não apresentou atividade no ensaio em meio líquido.

As correlações entre os diâmetros dos halos e a atividade da protease em meio líquido são observadas nas Figuras 33 a 35.

Não foi observada correlação significativa ($p < 0,05$) entre os resultados dos diâmetros dos halos e a atividade enzimática da protease obtida do cultivo dos fungos em gelatina e concentrado de peixe (Figuras 33 e 34). Por outro lado, foi observada correlação significativa ($p < 0,05$) pelo coeficiente de Pearson entre o diâmetro dos halos e atividade enzimática, quando os fungos foram cultivados em meio com farelo de soja, e a reação enzimática realizada a 40°C (Figura 35).

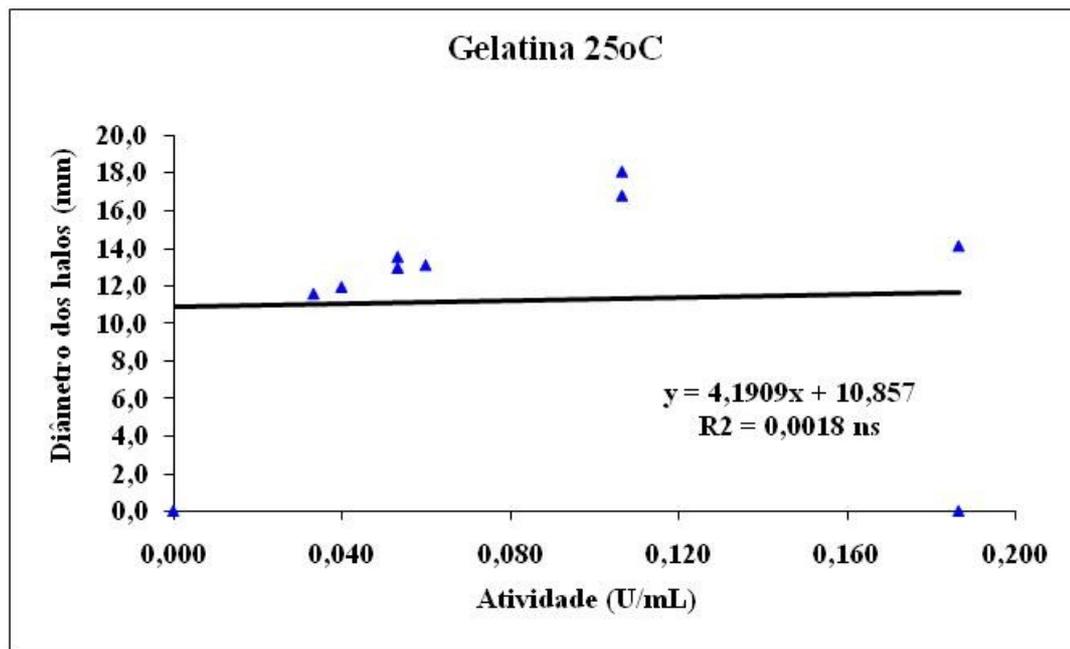
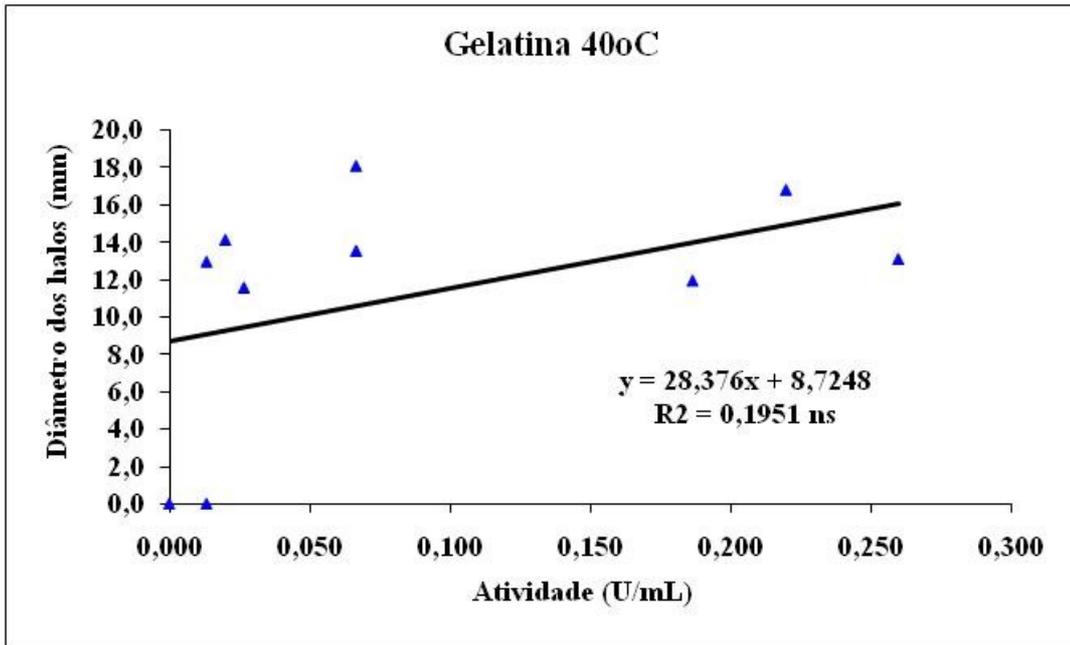


Figura 33 - Correlação entre o diâmetro dos halos e a atividade enzimática da protease de Basidiomycetes cultivados em meio líquido acrescido de gelatina. ns = Não significativo a 5%.

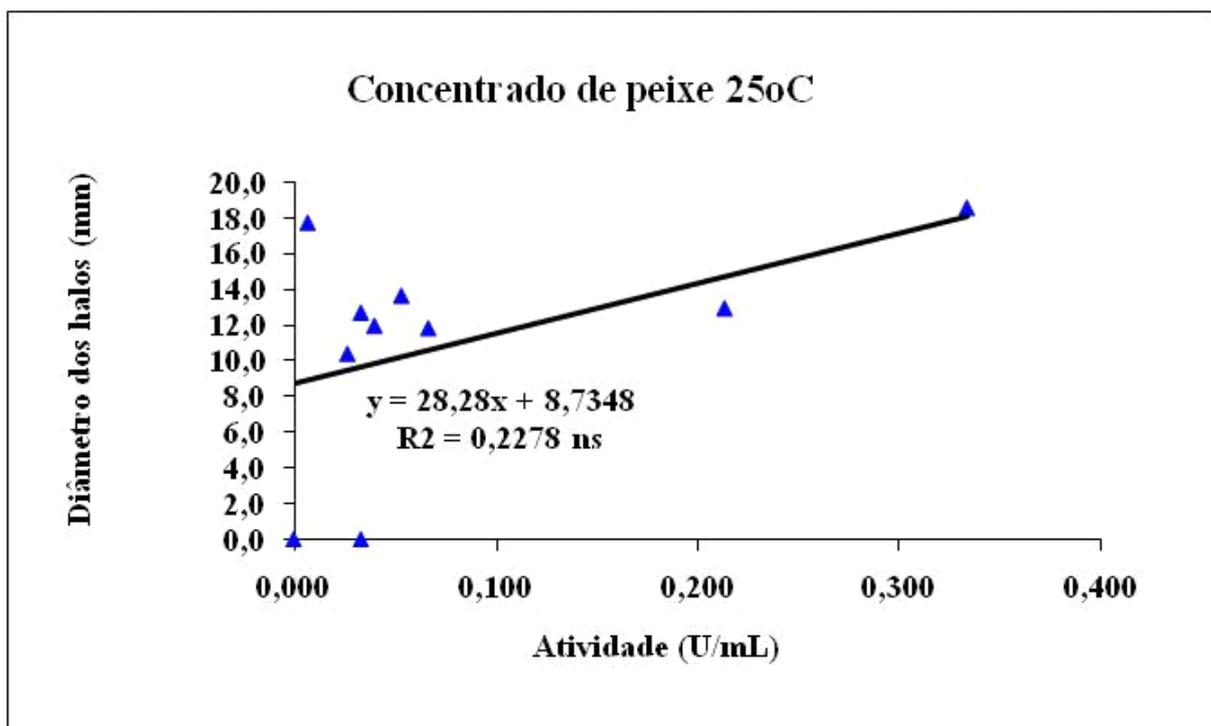
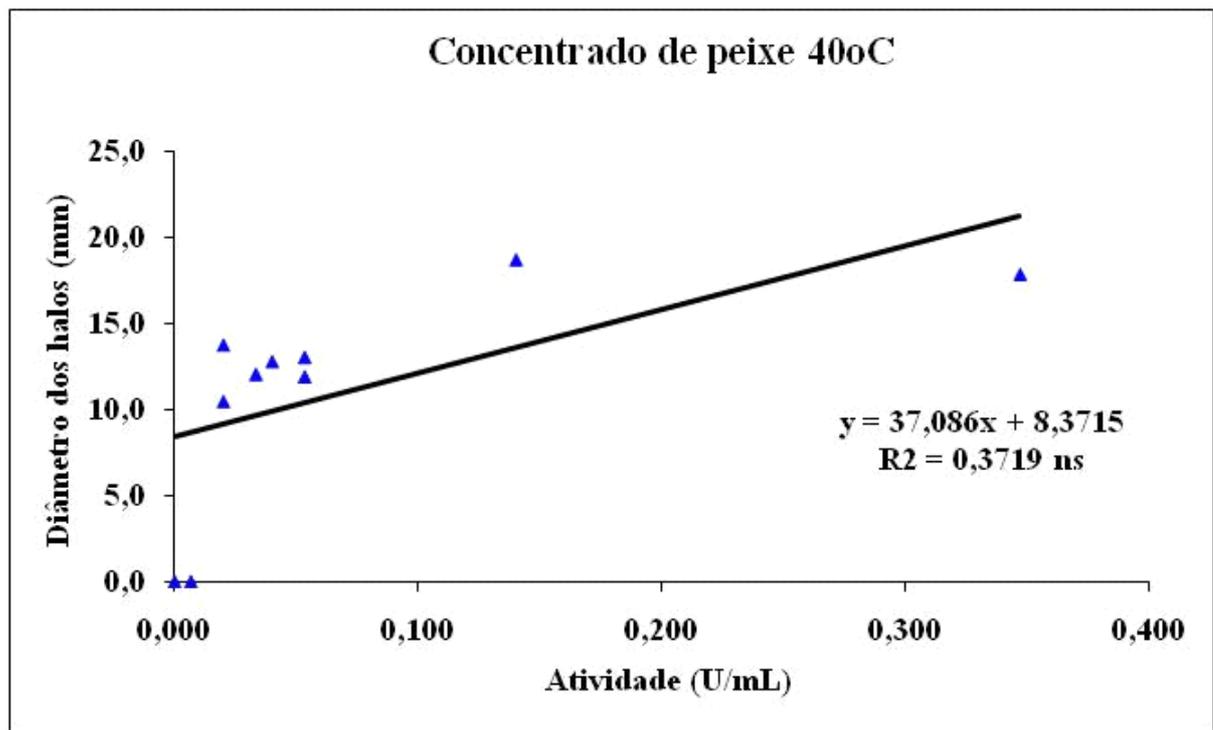


Figura 34 - Correlação entre o diâmetro dos halos e a atividade enzimática da protease de Basidiomycetes cultivados em meio líquido acrescido de concentrado de farinha protéica de peixe. ns^{NS} = Não significativo a 5%.

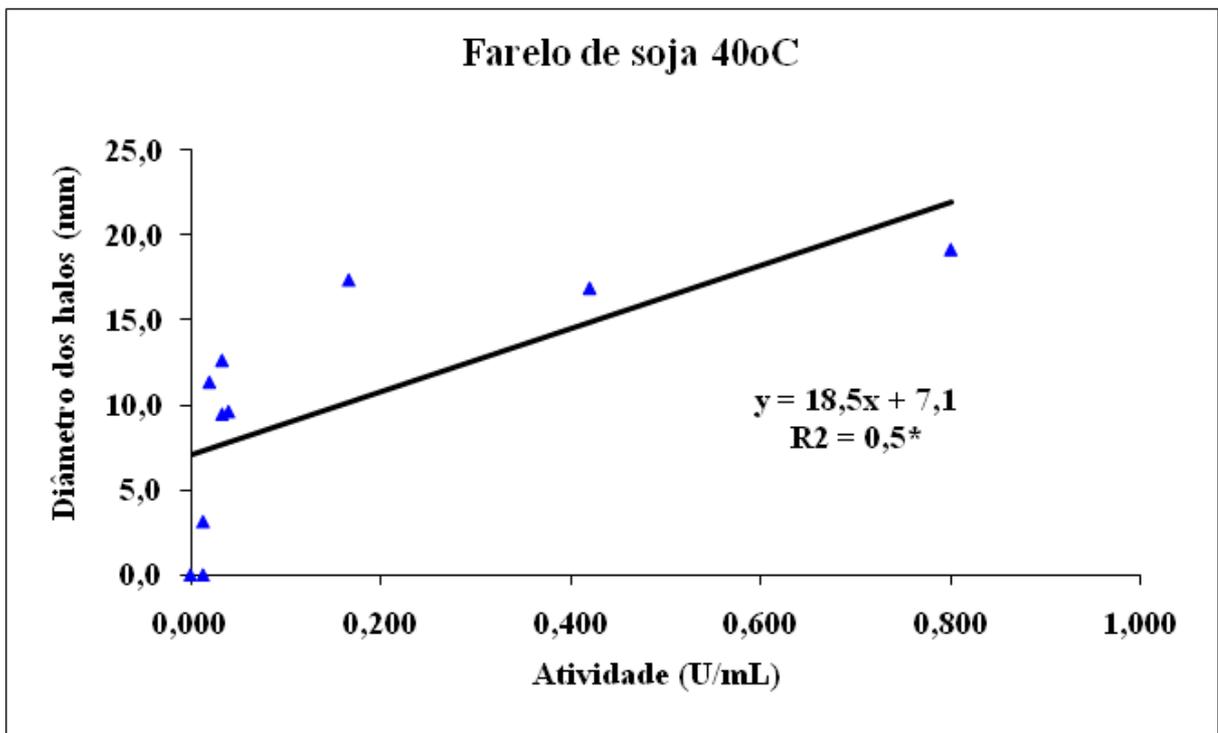
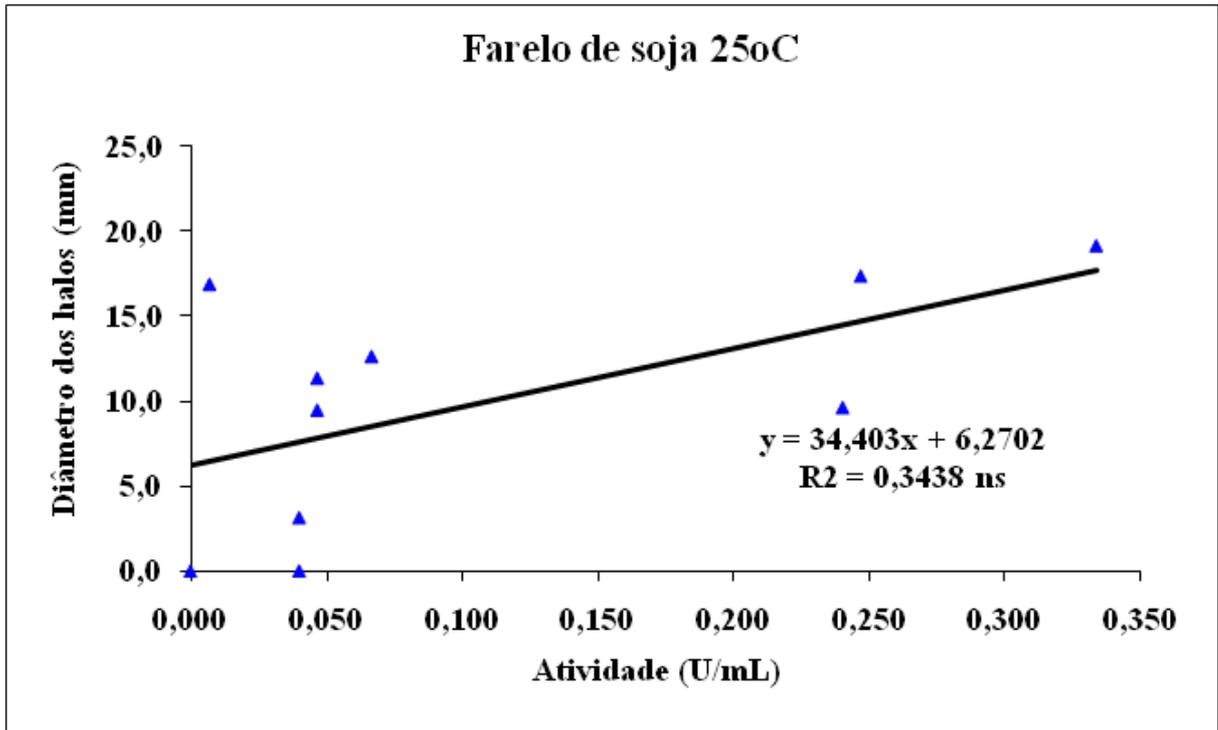


Figura 35 - Correlação entre o diâmetro dos halos e a atividade enzimática da protease de Basidiomycetes cultivados em meio líquido acrescido de farelo de soja. ns = Não significativo a 5%; * Significativo a 5%.

4 - CONCLUSÕES

- a) Todos os isolados de Basidiomycetes estudados foram capazes de produzir pelo menos duas das enzimas pesquisadas. Foi detectada pela técnica “cup plate” a produção de proteases e celulasas por todos os fungos isolados. As espécies *P. sanguineus*, *Ganoderma* sp., *Trametes* sp. e *Stereum* sp. apresentaram resultado positivo para amilases. Os fungos Stereaceae 22B, *P. sanguineus*, *C. guyanensis*, *Daedalea* sp. 1A e *Daedalea* sp. 4E6 formaram halos para a detecção de fenoloxidasas. O isolado *P. sanguineus* produziu pectinases.
- b) As amilases produzidas pelos fungos, cultivados em meio líquido, acrescido de farelo de trigo, proporcionaram os maiores halos de degradação do amido presente em meio sólido. Os fungos *Daedalea* sp.4E6 e *Daedalea* sp. 1A, Stereaceae 22B e *P. sanguineus* 12B produziram os maiores halos.
- c) O meio líquido acrescido de farelo de soja favoreceu maior produção de biomassa pelos fungos isolados, quando comparado aos meios com concentrado de peixe e gelatina, para produção de protease. As proteases obtidas do cultivo dos fungos, cultivados em meio com concentrado de peixe, apresentaram os maiores halos enzimáticos em meio sólido. Os melhores produtores da enzima foram os fungos *P. sanguineus* e Stereaceae 22B. Os isolados *P. sanguineus*, Stereaceae 22B e *C. guyanensis* produziram as proteases que apresentaram as melhores atividades enzimáticas.

CONCLUSÕES FINAIS

Toda pesquisa nasce da necessidade de se buscar uma resposta, mas sabe-se que nenhuma pesquisa é de fato conclusiva, sempre haverá um leque de novas perguntas, originando outras pesquisas com novos resultados.

- Com o presente estudo foi possível conhecer um pouco mais sobre a diversidade de Basidiomycetes da região Amazônica, principalmente aqueles que ocorrem em áreas de floresta da UFAM, INPA e Reserva de Campina. O objetivo das coletas realizadas nesta pesquisa foi a obtenção de exemplares para o isolamento “in vitro”. Sugere-se que sejam feitas novas coletas, periódicas, nestes locais para um estudo de sazonalidade destes fungos.
- A técnica de isolamento micelial foi mais eficiente para os fungos com basidiomas de consistência carnosa ou coriácea, do que para os exemplares mais membranáceos e delicados. Para o estudo destas espécies é necessário o desenvolvimento de novas metodologias. A extração de metabólitos diretamente dos basidiomas é uma sugestão.
- Neste trabalho foi possível detectar a produção de substâncias antimicrobianas, aromáticas e enzimas como, amilases, proteases, celulasas, pectinases e fenoloxidasas. Tais propriedades possuem importância biotecnológica e utilização industrial, além de agregar valor aos fungos da região.
- Dentre os microrganismos-teste utilizados nesta pesquisa, *R. solanacearum* destacou-se pela sensibilidade aos metabólitos antimicrobianos de um dos Basidiomycetes isolados. Esta bactéria é agente da murcha de várias espécies de importância agrônômica, sendo que na região amazônica esta doença é um fator limitante para a cultura do tomate (*Lycopersicon esculentum*). Desta forma, os resultados deste trabalho podem servir de apoio para futuros estudos de controle da murcha-bacteriana.

- O fungo *P. sanguineus* destacou-se como um dos isolados que foi capaz de produzir todas as enzimas testadas. Além disso, a literatura reporta para esta espécie a produção da cinabarina, um composto antimicrobiano. Verifica-se assim, dados promissores para novos trabalhos de potencial biotecnológico desta espécie de fungo.
- Alguns isolados apresentaram habilidade na produção de enzimas extracelulares em diferentes fontes nutritivas. A pesquisa pode ser continuada utilizando outros substratos ou realizando a purificação destas enzimas.
- As análises em cromatografia em camada delgada (CCDC) e IV tiveram como finalidade, verificar as prováveis classes químicas presentes nas frações bioativas do filtrado de cultura do fungo. Esta pesquisa terá continuidade objetivando a determinação das substâncias antimicrobianas, produzidas pelo fungo *Trametes* sp., para isso verifica-se a necessidade de proteção deste estudo por meio de patente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHENBACH, H.; BLUMM, E. Investigation of the pigments of *Pycnoporus sanguineus* - picnosanguin and new phenoxazin-3-ones. **Arch. Pharm.** (Weinheim), v.324, p.3-6. 1991.

AGUIAR, I.J.A. **Contribuição ao conhecimento da família Cortinariaceae Roze ex Heim (Agaricales) na Amazônia Brasileira.** Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade do Amazonas. Manaus, AM, 212p., 1984.

AKIN, D.E., BORNEMAN, W.S. Role of rumen fungi in fiber degradation. **J. Dairy Sci.**, v.73, p.3023-3032, 1990.

ALENCAR, Y.B. **Potencial biotecnológico, taxonomia e distribuição de fungos Trichomycetes (Zygomycota) associados às larvas de Simuliidae (Diptera: Nematocera) em igarapés da Amazônia Central, Brasil.** Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Amazonas. 193p. 2003.

ALEXOPOULOS, C.J. **Introductory Mycology.** 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1962, 613p.

ALVES, M.H.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; PORTO, A.L.F.; MILANEZ, A.I. Screening of *Mucor* sp. For the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p.325-330, 2002.

ANTOV, M.G., PERICIN, D.M., Production of pectinases by *Polyporus squamosus* in aqueous two-phase system. **Enzyme and Microbial Technology**, v.28, p.467-472, 2001.

BAI, Z.H., ZHANG, H.X., QI, H.Y., PENG, X.W., LI, B.J. Pectinase production by *Aspergillus niger* using wastewater in solid state fermentation for eliciting plant disease resistance. **Bioresource Technology**, article in press, 2004.

BANERJEE, U.C.; VOHRA, R.M. Production of lacase by *curvularia* sp.. **Folia Microbiol.**, v.36, n.4, p.343-346, 1991.

BAUCHOP, T. Biology of gut anaerobic fungi. **Biosystems**, v.23, p.53-64, 1993.

BAUERMANN, S.G.; GUERRERO, R.T. Processos ecológicos envolvidos na colonização e degradação de madeira por fungos. **Acta Biologica Leopoldensia**, v.18, n.2, p.21-29, 1996.

BAYER, E.A.; LAMED, R. The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource? **Biodegradation**, v.3, p.171-188, 1992.

BENEDICT, R.G.; BRADY, L.R. Antimicrobial activity of mushroom metabolites. **J. Pharm. Sci.**, v.61, p.1820-1822, 1972.

BERGER, R.G. NEUHAUSER, K.; DRAWERT, F. Biotechnological production of flavour compounds: III. High productivity fermentation of volatile flavours using a strain of *Ischnoderma benzoinum*. **Biotech. Bioeng.**, v.30, p. 987-990, 1987.

BERGER, R.G. NEUHAUSER, K.; DRAWERT, F. Characterization of the odour principles of some Basidiomycetes: *Bjerkandera adusta*, *Poria aurea*, *Tyromyces sambuceus*. **Flavour Fragrance J.**, v.1, p.181-185, 1986.

BERNAL, G.; ILLANES, A.; CIAMPI, L. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. with antibiotic activity against plant pathogenic agents. **E.J.B. Electronic Journal of Biotechnology**, v.5, n.1, 2002.

BON, E.P.S.; PEREIRA, JR, N. **Tecnologia enzimática**. Rio de Janeiro, 110p., 1999.

BONONI, V.L.R. Fungos macroscópicos de Rio Branco, Acre, Brasil. **Hoehnea**, v.19, n1/2, p.31-37, 1992.

BONONI, V.L.R.; TRUFEM, S.F.B. **Cogumelos comestíveis**. 2.ed. São Paulo: Editora ícone, 83p.1985.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p.248-254, 1976.

BRAGA, G.U.L.; DESTÉFANO, R.H.R.; MESSIAS, C.L. Protease production during growth and autolysis of submerged *Metarhizium anisopliae* cultures. **Revista de Microbiologia**, v.30, p.107-113, 1999.

BREHERET, S.; TALOU, T.; RAPIOR, S.; BESSIÉRE, J.M. Monoterpenes in the aromas of fresh wild mushrooms (Basidiomycetes). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.831-836, 1997.

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

BULL, A.T.; WARD, A.C.; GOODFELLOW, M. Search and Discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, n.3, p.573-606, 2000.

CAPELARI, M.; MAZIERO, R. Two new species of Agaricales from Brazil. **Mycotaxon**, v.33, p.191-196, 1988.

CHEN, C.C.; CHEN, S.D.; CHEN, J.J.; WU, C.M. Effect of pH value on the formation of volatiles of shiitake (*Lentinus edodes*), an edible mushroom. **J. Agric. Food Chem.**, v.32, p.99-101, 1984.

COELHO NETTO, R.A.; PEREIRA, B.G.; NODA, H.; BOHER, B. Caracterização de isolados de *Ralstonia solanacearum* obtidos de tomateiros em várzea e em terra firme, no Estado do Amazonas. **Fitopatol. bras.**, v.28, n.4, p.362-366, 2003.

CORNELIS, P. Microbial amylases. **Microbiological Sciences**, v.4, n.11, p.342-343, 1987.

CRAWFORD, D.L.; LYNCH, J.M.; WHIPPS, J.M.; OUSLEY, M.A. Isolation and characterization of actinomycete antagonistic of fungal root pathogen. **Applied and environmental microbiology**. v.59, p.3899-3905, 1993.

D'SOUZA, T.M.; MERRIT, C.S.; REDDY, C.A. Lignin-modifying enzymes of the White rot basidiomycetes *Ganoderma lucidum*. **Applied and environmental Microbiology**, v.65, n.12, p.5307-5313, 1999.

DA-SILVA, R.; FRANCO, C.M.L.; GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: revisão. **Bol. SBCTA**, v.31, n.2, p.249-260, 1997.

DE MARCO, J.L., VALADARES-INGLIS, M.C., FELIX, C.R. Production of hydrolitic encimes by *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches broom of cocoa. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p.33-38, 2003.

DEHORITY, B.A. Effects of microbial synergism on fibre digestion on fibre digestion in the rumen. **Proc. Nutr. Soc.**, v.50, p.149-159, 1991.

DENNIS, R.W.G. Fungus flora of Venezuela and adjacent countries. **Kew Bull. Add. Ser.** London. v.3, 531p., 1970.

DI PIERO, R.M. **Potencial dos cogumelos *Lentinula edodes* (Shiitake) e *Agaricus blazei* (Cogumelo-do-Sol) no controle de doenças em plantas de pepino, maracujá e tomate, e a purificação parcial de compostos biologicamente ativos.** Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba, São Paulo. 157p., 2003.

DINGLE, J.; REID, W.W.; SOLOMONS, G.L. The enzymic degradation of pectin and other polysaccharides. II Application of the "cup-plate" assay to the estimation of enzymes. **J. Sci. Food Agric.**, v.4, p.149-155, 1953.

DONG, C.; ZENG, X.; LIU, Q. Biological control of tomato bacterial wilt with avirulent bacteriocinogenic strain of *Ralstonia solanacearum*. **J.S. China Agric. Univ.**, v.20, p.1-4, 1999.

DORNBERG, K.; LICH, H.; ZURECK, A. Antibiotics from Basidiomycetes. The 4-hydroxy-benzenediazonium ion, an antimicrobial, cytotoxic and antineoplastic metabolite from the Basidiomycetes *Agaricus xanthodermus* (Agaricales). **Progr. Ind. Microbiol.**, v.27, p. 67-77, 1989.

DURAN, N.; ESPÓSITO, E. Oxidative enzymes application in waste treatment. **Applied Catalyses B. Environment, USA**, v.28, n.1, p.83-99, 2000.

EL-ZALAKI, M.E. & HAMZA, M.A. Edible mushrooms as producers of amylases. **Food Chemistry**, v.4, n.3. p: 203-211, 1979.

FEDATTO, L.M. **Caracterização de proteases extracelulares produzidas por *Xylella fastidiosa* de citros e videira**. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo – curso Interunidades ESALQ/CENA-USP, Piracicaba, São Paulo, 2004.

FIDALGO, O. Conhecimento Micológico dos Índios Brasileiros. **Revista de Antropologia**, v.15 e 16, p.27-34, 1967.

FIDALGO, O.; FIDALGO, M.E.P.K. Dicionário Micológico. **Rickia**, supl. v.2, p.12-32, 1967.

FIELD, J.A., JONG, E., FEIJOO-COSTA, G., BONT, J.A.M. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. **Trends Biotechnol.**, v.11, p.44-49, 1993.

FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. **Food Microbiology**. 4.ed. McGraw-Hill International Edition. p.390-397, 1988.

GMELIN, R.; LUXA, H.H; ROTH, K.; HOFLE, G. Dipeptide precursor of garlic odour in *Marasmius* species. **Phytochemistry**, v.15, p.1717-1721, 1976.

GOMES, M.R.A., LEDWARD, D.A. Effect of high-pressure treatment on the activity of some polyphenoloxidase. **Food Chemistry**, v.56, p.1-5, 1996.

GROSS, B.; ASTHER, M. Aromes de Basidiomycetes: caractéristiques, analyses et productions. **Sciences des aliments**, v.9, p. 427-454, 1989.

GUO, J.H.; GUO, Y.H.; ZHANG, L.X.; QI, H.Y.; FANG, Z.D. Screening for biocontrol agents against cayenne pepper bacterial wilt. **Chin. J. Biol. Control**, v.17, p.101-106, 2001.

HALOS, P.M.; ZORILLA, R.A. Vesicular-arbuscular mycorrhizae increase growth and yield of tomatoes and reduce infection by *Pseudomonas solanacearum*. **Philipp. Agric.**, v.62, p.309-315, 1979.

HAN, J. Solid-state fermentation of cornmeal with the basidiomycete *Hericium erinaceum* for degrading starch and upgrading nutritional value. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, p.61-66, 2003.

HARTTIG, U.; ANKE, T.; SCHERER, A.; STEGLICH, W. Leianafulvene, a sesquiterpeoid fulvene derivative from cultures of *Mycena leiana*. **Phytochemistry**, v.29, p.3942-3944, 1990.

HATVANI, N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. **International Journal of antimicrobial agents**, v.17, n.1, p. 71-74, 2001.

HAWKSWORTH, D.L., et al. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi (including the Lichens)**. 8. ed. Kew: International Mycological Institute, 1995, 616p.

ISHIKAWA, K. MAJIMA, T.; EBINA, T. Antitumor effect of a *Coriolus* preparation, PSK: Induction of macrophage factor (MCF) in spleen of tumor-bearing mice., **Biotherapy**, v.5, p.251-258, 1992.

ISHIKAWA, N.K.; FUKUSHI, Y.; YAMAJI, K.; TAHARA, S.; TAKAHASHI, K. Antimicrobial cuparene-type sesquiterpenes, enokipodins C and D, from a mycelial culture of *Flammulina velutipes*. **J. Nat. Prod.**, v.64, p. 932-934, 2001b.

ISHIKAWA, N.K.; KASUYA, M.C.M.; VANETTI, M.C.D. Antibacterial activity of *Lentinula edodes* grown in liquid medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.206-210, 2001a.

ISHIKAWA, N.K.; YAMAJI, K.; TAHARA, S.; KUKUSHI, Y.; TAKAHASHI, K. Highly oxidized cuparene-type sesquiterpenes from a mycelial culture of *Flammulina velutipes*. **Phytochemistry**, v.54, p. 777-782, 2000.

JANSSENS, L.; DEPOOTER, H.L.; SCHAMP, N.M.; VANDAMME, E.J. Production of flavours by microorganisms. **Proc. Biochem.**, v.27, p.195-215, 1992.

JESUS, M.A. **Efeito dos extratos obtidos de *Swartzia argentea* Spruce ex Benth. *S. laeviscarpa* AMSHOFF, *S. panacoco* (AUBLET) COWAN, *S. polyphylla* DC. e de *S. sericea* VOGEL da Amazônia Central sobre fungos degradadores de madeira.** Tese de doutorado. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Rio Claro, São Paulo, 99p., 2003.

JONATHAN, S.G.; FASIDI, I.O. Antimicrobial activities of two Nigerian edible macro-fungi- *Lycoperdon pusillum* (Bat. Ex) and *Lycoperdon giganteum* (Pers.). **African Journal of Biomedical Research**, v.6, p.85-90, 2003.

JONG, S.C.; BIRMINGHAM, J.M. Medicinal and therapeutic value of the shiitake mushroom. **Advances in Applied Microbiology**, v.39, p.153-184, 1993.

KAWAGISHI, H.A.; NOMURA, T.; YUMEN, T.; MIZUNO, T.; HAGWARA, A.; NAKAMURA, T. Isolation and properties of lectin from the fruiting bodies of *Agaricus blazei*. **Carbohydrate Research Nov.** v.15, p.150-154, 1988.

KIBO, T.; HUI, J.; YAMANE, A.; UKAI, S. Polysaccharides in fungi. XXXII. Hypoglycemic activity and chemical properties of a polysaccharide from the cultural mycelium of *Cordyceps sinensis*. **Biol. Pharm. Bull.** v.16, p.1291-1293, 1993.

KIKUMOTO, S.; MIYAJIMA, T.; KIMURA, K.; OKUBO, S.; KOMATSU, N. Polysaccharide produced by *Schizophyllum commune*, Part II Chemical structure of an extracellular polysaccharide. **Nogei Kagaku**, v.5, p.162-168, 1971.

KIM, D.H.; YANG, B.K.; JEONG, S.C.; PARK, J.B.; CHO, S.P.; DAS, S.; YUN, J.W.; SONG, C.H. Production of a hypoglycemic, extracellular polysaccharide from the submerged culture of the mushroom *Phellinus linteus*. **Biotechnol. Lett.** v.23, p.513-517, 2002.

KIM, J.H.; KIM, Y.S. A fibrinolytic metalloprotease from the fruiting bodies of an edible mushroom *Armillariella mellea*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.63, p.2130-2136, 1999.

KIM, J.H.; KIM, Y.S. Characterization of a metal enzyme from a wild mushroom, *Tricholoma saponaceum*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.65, p.356-362, 2001.

KIMURA, X.; TANIGUCHI, M.; BABA, K. Antitumor and antimetastatic effects on liver of triterpenoid fractions of *Ganoderma lucidum*: mechanism of action and isolation of an active substance. **Anticancer Res.** v.22, p.3309-3318, 2002.

KLONOWSKA, A.; PETIT, J.L.; TRON, T. Enhancement of minor laccases production in the Basidiomycete *Marasmius quercophilus* C30. **FEMS Microbiology Letters**, v.200, p.25-30, 2001.

KOSAKA, A.; YAMASHITA, A. Lentinan as an effective immunomodulator against breast cancer, with special reference to clinical applications. **Int. J. Immunother.**, v.9, p.111-116.

KOTABLA, F.; POUZAR, K. Preliminary results on the staining of spores and other structures of Homobasidiomycetes in cotton blue and its importance for taxonomy. **Feddas Report**, v. 69, n. 2, p.131-142, 1964.

LANA, T.G. **Caracterização genética e fisiológica de *Crinipellis pernicios***. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 106p., 2004.

LEE, B.C.; BAE, J.T.; PYO, H.B.; CHOE, T.B.; KIM, S.W.; HWANG, H.J.; YUN, J.W. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycetes *Grifola frondosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 369-376, 2004..

LEE, J.H.; CHO, S.M.; KIM, H.M.; HONG, N.D.; YOO, I.D. Immunostimulating activity of polysaccharides from mycelia of *Phellinus linteus* grown under different culture conditions. **J. Microbiol Biotechnol.**, v. 6, p. 52-55, 1996.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

LICASTRO, F.; MORINI, M.C.; KRETZ, O; DIRHEIMER, G.; CREPPY, E.E.; STIRPE, F. Mitogenic activity and immunological properties of bolesatine, a lectin isolated from the mushroom *Boletus satanas* Lenz. **Int. J. Biochem.**, v.25, p.789-792, 1993.

LIU, F.; OOI, V.E.C; LIU, W.K.; CHANG, S.T. Immunomodulation and antitumor activity of polysaccharide-protein complex from the culture filtrates of a local edible mushroom, *Tricholoma lobayense*. **Gen. Pharmac.**, v.27, n.4, p.621-624, 1996.

LOPES, W.A.L.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Quím. Nova**, v.27, n.4, 2004.

MANACHINI, P.L.; FORTINA, M.G.; PARINI, C. Purification and properties of an endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. **Biotechnol. Lett.**, v.9, n.3, p.219-224, 1987.

MARTIN, G. W. Three new Heterobasidiomycetes. **Mycologia**, v. 25, p.261-265, 1934.

MATHEUS, D.C.; OKINO, L.K. Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos. *In*: BONONI, V.L.R.; GRANDI, R.A. P. (Eds.). **Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos**: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. São Paulo: Instituto de Botânica, p. 107-139, 1998.

MAU. J.; BEELMAN, R.B.; ZIEGLER, G.R.; ROYSE, D.J. Effect of nutrient supplementation on flavor, quality, and shelf life of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. **Mycologia**, v.83, n. 2, p.142-149, 1991.

MAYER, A.M.; STAPLES, R.C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v.60, p.551-565, 2002.

MAZIERO, R. **Produção de exopolissacarídeos por basidiomicetos em cultura submersa: screening, caracterização química preliminar e estudo de produção utilizando *Irpex lacteus* (Fr.:Fr.) Fr.** Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 181p. 1996.

MAZIERO, R.; CAVAZZONI, V.; BONONI, V.L.R. Screening of Basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. **Revista de Microbiologia**, v.30, p.77-84, 1999.

McMORRIS, T.C.; ANCHEL, M.J. The structures of the basidiomycetes metabolites illudin S and illudin M. **Journal of the American Chemical Society**, v.85, p.831, 1963.

MCMORRIS, T.C.; KASHINATHAM, A.; LIRA, R.; RUNDGREN, H.; GANTZEL, P.K.; KELNER, M.J.; DAWE, R. Sesquiterpenes from *Omphalotus illudens*. **Phytochemistry**, v.61, p.395-398, 2002.

MIZUNO, T. Bioactive biomolecules of mushrooms: food function and medicinal effect of mushroom fungi. **Food Review International**, v.11, n.1, p.7-21, 1995.

MIZUNO, T.; OHSAWA, K.; HAGIWARA, N.; KUBOYAMA, R. Fractionation and characterization of antitumor polysaccharides from Maitake, *Grifola frondosa*. **Agric. Biol. Chem.** v.50, p.1679-1688, 1986.

MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the fungi**. 2. ed. Englewood cliffs: Prentice-Hall, 1982, v.8, 578p.

MOTHANA, R.A.A.; AWADH ALI, N.A.; JANSEN, R.; WEGNER, U.; MENTEL, R.; LINDEQUIST, U. Antiviral lanostanoide triterpenes from the fungus *Ganoderma pfeifferi*. **Fitoterapia**, 74: 177-180, 2003.

MOURA, A.B.; ROMEIRO, R.S. Avaliação *in vitro* de actinomicetos como antagonistas a *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896). **Ciênc. e Agrotec.**, v.23, n.2, p.281-288, 1999.

MOURA, A.B.; ROMEIRO, R.S.; NEVES, M.C. Bioensaios para avaliação massal de actinomicetos antagonistas a *Ralstonia solanacearum*, em tomateiro. **Pesq. Agropec.bras.**, v.33, n.12, p. 2065-2072, 1998.

MULLINGS, R. Measurement of saccharification by cellulases. **Enzyme Microb. Technol.**, v.7, p.586-591, 1985.

MUSÍLEK, V.; CERNÁ, J.; SASEK, V.; SEMERDZIEVA, M.; VONDRACEK, M. Antifungal antibiotic of the Basidiomycete *Oudemansiella mucida*. **Fol. Microbiol.** v.14, p.377-387, 1969.

NANBA, H.; HAMAGUCHI, A.; KURODA, H. The chemical structure of an antitumor polysaccharide in fruti bodies of *Grifola frondosa* (Maitake). **Chem. Pharm. Bull.**, v. 35, p. 1162-1168, 1987.

NG, T.B. Peptides and proteins from fungi. **Peptides**, v.25, p.1055-1073, 2004.

NGUYEN, Q.D.; REZESSY-SZABÓ, J.M.; CLAEYSSSENS, M.; STALS, I.; HOSCHKE, A. Purification and characterisation of amylolytic encimes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, p.345-352, 2002.

NIELSEN, R.I.; OXENBOLL, K. Enzymes from fungi: their technology and uses. **Mycologist**, v., p.12: 69-71, 1998.

OFODILE, L.N.; UMA, N.U.; KOKUBUN, T.; GRAYER, R.J.; OGUNDIPE, O.T.; SIMMONDS, M.S.J. Antimicrobial activity of some *Ganoderma* species from Nigeria. **Phytother. Res.**, v.19, p.310-313, 2005.

OLIVEIRA, L.A.; MAGALHÃES, H.P. Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. **Rev. Microbiologia**, n.30, p.203-208, 1999.

ORBERG, P.K. *Studies on cellulases production from annual ryegrass straw by Trichoderma reesei*. Dissertação de mestrado, Oregon State University, Oregon, 1981.

PACCOLA, E.A.S.; MAKI, C.S.; NOBREGA, G.M.A.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D. Antagonistic effect of edible mushroom extract on *Candida albicans* growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, n.32, p.176-178, 2001.

PACUMBABA, R.P.; BEYL, C.A.; PACUMBABA, R.O. Shiitake mycelial leachate supresses growth of some bacterial species and symptoms of bacterial wilt of tomato and lima bean *in vitro*. **Plant Disease**, v.83, n.1, p.20-23, 1999.

PATRICK, H.K.; NGAI, T.B. Lentin, a novel and potent antifungal protein from shitake mushroom with inhibitory effects on activity of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase and proliferation of leukemia cells. **Life Sciences**, v.73, p.3363-3374, 2003.

PETRY, M.F.G. **Production of xylanase by basidiomycetes in medium with wheat bran**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 77p., 1994.

PRADHANANG, P.M.; MOMOL, M.T.; OLSON, S. M.; JONES, J.B. Effects of plant essential oils on *Ralstonia solanacearum* population density and bacterial wilt incidence in tomato. **Plant Diseases**, v.87, (in press), 2003.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. **Os reinos dos fungos**. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, v.1, 2002, 829p.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. **Os reinos dos fungos**. 2.ed., Santa Cruz do Sul: EDUNISC, v.1, 2004, 605p.

RAO, M.B.; TANKSALE, A.M.; GATHE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.62, n.3, p.597-635, 1998.

REDDY, N.S.; NIMMAGADDA, A.; RAO, K.R.S. An overview of the microbial α -amylase family. **African Journal of Biotechnology**, v.2,n.12, p.645-648, 2003.

REGINA, M., BROETTO, F. Atividade de enzimas oxidativas do *Lentinula edodes* em meio de cultura líquida de subprodutos energéticos. **Energ. Agric.**, v.20, n.1, p. 47-61, 2005.

RIBEIRO, J.E.L. et al. **Flora da Reserva Ducke**: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: INPA, 1999, 816p.il.

ROBLES, A, LUCAS, R., CIENFUEGOS, G.A., GÁLVEZ, A. Phenol-oxidase (laccase) activity in strains of the Hyphomycete *Chalara paradoxa* isolated from olive mill wastewater disposal ponds. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, p.484-490, 2000.

RUEGGER, M.J.S.; TAUKE-TORNISIELO, S.M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasil. Bot.**, v.27, n.2, p.205-211, 2004.

SAID, S. PIETRO, R. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico**. Eventos Ed., 2002, 121p.

SALATI, E.; SANTOS, A.A.; LOVEJOY, T.E.; KLABIN, I. **Porque salvar a floresta amazônica**. Manaus: INPA, 1998, 114p.

SAPARRAT, M.C.N.; MARTÍNEZ, M.J.; CABELLO, M.N.; ARAMBARRI, A.M. Screening for ligninolytic enzymes in autochthonous fungal strains from Argentina isolated from different substrata. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.19, p.181-185, 2002.

SASAKI, S.H.; LINHARES, R.E.C.; NOZAWA, C.M.; MONTÁLVAN, R.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D. Strains of *Lentinula edodes* suppress growth of phytopathogenic fungi and inhibit alagoas serotype of vesicular stomatitis virus. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.52-55, 2001.

SILVA, E.M.; MACHUCA, A.; MILAGRES, A.M.F. Evaluating the growth and enzymes production from *Lentinula edodes* strains. **Process Biochemistry**, v.40, p.161-164, 2005.

SILVEIRA, E.B.; MARIANO, R.; MICHEREFF, S.J. Antagonism of *Bacillus* spp. against *Pseudomonas solanacearum* and effect on tomato seedling growth. **Fitopatol. Bras.**, v.20, p.605-612, 1995.

SILVEIRA, V.D. **Micologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Âmbito cultural, 1995, 336p.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**, 5th ed., John Wiley & Sons: New York, 1991.

SINDHU, G.S.; SHARMA, P.; CHAKRABARTI, T.; GUPTA, J.L.K. Strain improvement for the production of a thermostable α -amylase. **Enzyme Microb. Technol.**, v.24, p.584-589, 1997.

SINGER, R. Adaptation on higher fungi to varzea conditions. **Amazoniana**, v.8, n.3, p.311-319, 1984.

SINGER, R. **The Agaricales in Modern Taxonomy**. 4.ed. Koeltz Scientific Books. 1986, 981p.

SINGER, R.; AGUIAR, I.J..A. Litter Decomposing and Ectomycorrhizal Basidiomycetes in an Igapó Forest. **Pl. Sy.st. Evol.**, v.15, p.107-117, 1986.

SINGER, R.; ARAUJO, I.J.A. Litter decomposition and Ectomycorrhiza in Amazonian forests I. A comparison of litter decomposing and ectomycorrhizal Basidiomycetes in latosol-terra-firme rain forest and white podzol campinarana. **Acta Amazonica**, v.9, n.1, p. 25-41, 1979.

SIQUEIRA, E.M.A.; MIZUTA, K.; GIGLIO, J.R. *Pycnoporus sanguineus*: a novel source of a-amylase. **Mycol. Res.**, v.101, n.2, p.188-190, 1997.

SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA, A. JR.; LOGUERCIO-LEITE, C. Cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus* strains and antimicrobial activity against bacteria from food products. **Rev. Microbiol.**, v. 29, n.4, p.317-320, 1998.

SMITH, B.J.; SIVASITHAMPARAM, K. Morphological studies of *Ganoderma* (Ganodermataceae) from the Australasian and pacific regions. **Aust. System Bot.**, v.16, p.487-503, 2003.

SNELL, W.H.; DICK, E.A. **A glossary of mycology**. Cambridge. 1957, 170p.

SOMOGYI, M.A. A new reagent for the determination of sugars. **J. Biol. Chem.**, v. 160, p. 61-68, 1945.

SONG, C.H.; CHO, K.Y.; NAIR, N.G. Effect of low temperature shock treatment on sporophore initiation, lipid profile and nutrient transport in *Lentinula edodes*. **Mycologia**, v. 83, n. 1, p. 24-29, 1991.

SOUSA, M.A. **O gênero *Phellinus* Otréler (Hymenomycetes) na Amazônia Brasileira**. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, 190p., 1980.

SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A.D.L.; ASTOLFI FILHO, S.; PINHEIRO, M.L.B.; SARQUIS, M.I.M.; PEREIRA, J.O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Bentham. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p.185-195, 2004.

SOUZA, H.Q. **Agaricales da Reserva Biológica Walter Alberto Egler, Amazonas, Brasil**. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Amazonas, 173p., 2002.

SOUZA, J.V.B.; SILVA, E.S.S.; MAIA, M.L.S.; TEIXEIRA, M.F.S. Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *Paecilomyces clavissporus* 2A.UMIDA.1. **Process Biochemistry**, v.39, p.455-458, 2003.

STURION, G.L.; RANZANI, M.R.T.C. Produção do cogumelo comestível *Pleurotus*: Opção promissora, especialmente na região do Vale do Ribeira. **Série Produtor Rural**, n. 2, 44p., 1997.

SWANEPOEL, A.E. Survival of South African strains of biovar-2 and biovar-3 of *Pseudomonas solanacearum* in the roots and stems of weeds. **Potato Res.**, v.35, p.329-332, 1992.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos para estudante de medicina**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1982, 374p.

TEIXEIRA, M.F.S. **Obtenção de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* termofílicas e termotolerantes na Amazônia e caracterização de suas enzimas de interesse na indústria de alimentos**. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, 85p., 1994.

THAKUR, B.R.; SINGH, R.K.; HANDA, A.K. Chemistry and uses of pectin - a review. **Crit. Rev. Food Sci. Nutrit.**, v.37, p.47-73, 1997.

TIE,Z.; HUANG, X. **Dictionary of chinese medicine**. Comercial Press: Hong Kong. 1988.

TODA, M.; OKUBU, S.; IKIGAI, H.; SUZUKI, T.; SUZUKI, Y.; SHIMAMURA, T. The protective activity of tea against infection by *Vibrio cholerae*. **J. Appl. Bacteriol.** v.70, p.109-112, 1991.

TOKIMOTO,K.; FUJITA, T.; TAKEDA, Y.; TAKAISHI, Y. Increased or induced formation of antifungal substances in cultures of *Lentinus edodes* by attack of *Trichoderma* spp. **Proc. Japan Acad. Series B. Phys. and Biol. Sciences**, v.63, p.277-280, 1987.

TONUCCI, N.M. Efeito de extratos aquosos do basidiocarpo e micélio de *Lentinula edodes* (Shiitake) sobre *Colletotrichum sublineolum*, *Alternaria solani*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e Tobacco mosaic virus (TMV). Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, São Paulo. 87p.:il., 2004.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 3.ed., São Paulo: Editora Atheneu, 2002, 586p.

TRIGUEROS, V.; LOUGARRE, A.; ALI-AHMED, D.; RAHBÉ, Y.; GUILLOT, J.; CHAVANT, L.; FOURNIER, D.; PAQUEREAU, L. 2003. *Xerocomus chrysenteron* lectin: identification of a nem pesticidal protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1621, p.292-298, 2003.

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

VILLAS BOAS, S.G.; ESPOSITO, E. Bioconversão do bagaço de maçã. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, ano III, n.14, p. 38-42, 2000.

VINCENT, V.M.; MEW, T.W. Effect of a soil amendment on the survival of *Ralstonia solanacearum* in different soils. **Phytopathology**, v.88, p.300-305, 1998.

VOLK, T. *Tom Volk's Fungus of the Month for May 1997: This month the fungus is **Phanerochaete chrysosporium***. Disponível em:<<http://www.wisc.edu/botany/fungi/may97.html>>Acesso em: 01 jun. 2000.

WANG, H.; NG, T.B. Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. **Peptides**, doi:10.1016/j.peptides.2005.06.009.

WANG, H.; NG, T.B. Pleureryn, a novel protease from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.289, p.750-755, 2001.

WANG, H.X.; NG, T.B.; OOI, V.E.C. A protein with inhibitory activity on cell-free translation from cultured mycelia of the edible mushroom *Tricholoma lobayense*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v.125, p.247-253, 2000.

WASSER, S.P.; WEISS, A.L. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushroom: a modern perspective. **Critical Reviews in Immunology**, v.19, p.65-96., 1999.

WHITAKER, J.R. **Principles of enzymology for the food science**. 2.ed., New York: Marcel Dekker, Inc., 1994, 625p.

WOOD, W.F.; DESHAZER, D.A.; LARGENT, D.L. The identity and metabolic fate of volatiles responsible for the odor of *Hydnellum suaveolens*. **Mycologia**, v.80 p. 252-255, 1988.

ZARBIN, P.H.G.; FERREIRA, J.T.B.; LEAL, W.S. Metodologias gerais empregadas no isolamento e identificação estrutural de feromônios de insetos. **Quím. Nova**, v.22, n.2, 1999.

ZHUANG, C.; MURATA, T.; USUI, T.; KAWAGISHI, H.; KOBAYASHI, K. Purification and characterization of a lectin from the toxic mushroom *Amanita pantherina*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1291, p.40-44, 1996.

ANEXOS

MEIOS DE CULTURA

Batata-Dextrose-Ágar

Caldo de batatas.....	500 mL
Dextrose.....	10g
Ágar.....	15g
Água destilada.....	1000 mL

1. Cozinhar 200g de batatas descascadas em 500 mL de água destilada durante 1 hora;
2. Filtrar o caldo através de gaze e completar o volume final para 1000 mL com água destilada;
3. Adicionar a dextrose e o ágar;
4. Fundir completamente o ágar em banho-maria;
5. Distribuir e autoclavar a 120°C durante 15 minutos.

Agar farelo de trigo

Farelo de trigo.....	20 g
Agar.....	15g
Água destilada	1000 mL

- Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

Agar malte

Extrato de malte	30g
Agar	15g
Água destilada	1000 mL

- Ajustar pH para 5,6 e esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Meio GPY

Glicose	20g
Peptona	10g
Extrato de levedura	2g
Agar	15g
Água destilada	1000 mL

- Ajustar o pH para 6,6 e autoclavar a 121°C por 15 minutos.

Meio LB (Luria Bertane)

Peptona de caseína.....	10g
NaCl.....	5g
Extrato de levedura.....	10g
Água destilada.....	1000 mL
Ágar.....	15g

- Ajustar o pH para 7,0 com NaOH e autoclavar a 120° C por 15 minutos.

Meio LPGA para *Ralstonia solanacearum*

Extrato de levedura	5g
Peptona	5g
Glicose	5g
Agar	15g
Água destilada	1000 mL

- Ajustar para o pH 7,0 e esterilizar a 120°C por 15 a 20 minutos.

Ágar Amido

Ágar	9g
Amido solúvel.....	5g
Tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 5.0.....	500 mL

- Dissolver o amido e o ágar em tampão e esterilizar à 120° C por 15 minutos.

Ágar gelatina-leite

Ágar	9g
Gelatina.....	5g
Leite desnatado.....	5g
Tampão citrato fosfato 0,1M pH 5,0.....	400 mL

1. Misturar o ágar com 400 mL de tampão e esterilizar à 120° C por 15 minutos;
2. Solução de gelatina 10%: Adicionar 5g de gelatina a 50 mL de tampão, deixar em repouso por 3 minutos e homogeneizar. Aquecer a solução em banho-maria para dissolução da gelatina e esterilizar à parte à 120°C por 15 minutos.
3. Solução de leite desnatado 10%: Dissolver 5g de leite em 50 mL de água destilada estéril (40-50°C). Esterilizar em autoclave por 30 minutos sob vapor fluente.
4. Misturar as soluções de ágar, gelatina e leite obtendo-se volume de 500 mL.

Ágar Pectina

Ágar	9g
Pectina cítrica.....	5g
Tampão acetato de Na 0,1 M pH 5.0.....	500 mL

- Dissolver a pectina em 500 mL de tampão em agitador, adicionar o ágar e esterilizar à 120°C por 15 minutos.

Agar Celulose

Agar	9g
Carboximetilcelulose	5 g
Tampão acetato de Na ⁺ 0,1M pH 5,0	500 mL

- Dissolver a carboximetilcelulose em 200 mL de tampão em agitador. Após a dissolução da CMC, adicionar o restante do tampão e o agar. Esterilizar o meio à 120°C por 15 minutos.

Agar ácido tânico

Agar	9g
Tampão citrato fosfato 0,1M pH 5,0	500 mL
Ácido tânico	2,5g

- Dissolver o ácido tânico no tampão e acrescentar o agar. Esterilizar o meio à 120°C por 15 minutos.

SOLUÇÕES E TAMPÕES

Iodo 0,1 N

Iodo.....	2,54g
Álcool etílico PA ou comercial.....	5 mL

- Misturar tudo antes de usar. Serve para revelar amilases.

Ácido Clorídrico 5N

Serve para revelar pectinases.

Solução de Hipoclorito de Sódio

Hipoclorito de sódio 12%.....125 mL

Completar para 500 mL com água destilada

Solução de MgSO₄ 2%

MgSO₄ 2g

Água destilada 100 mL

- Esterilizar a 121°C por 20 minutos.

Tampão Acetato de Na⁺ 0,2M pH 5.0

Solução A

Ácido acético.....5,7 mL

Adicionar 5,7 mL de ácido acético em 400 mL de água, homogeneizar e em seguida completar o volume para 500 mL.

Solução B

Acetato de sódio.....13,6g

Dissolver 13,6g de acetato de sódio em 150 mL de água sob agitação, completar o volume para 500 mL.

Solução de Uso

Retirar 148 mL da solução A+ 352 mL da solução B, homogeneizar sob agitação, em um Erlenmeyer, e completar para 1000 mL com água destilada, homogeneizar novamente, e ajustar o pH para 5,0.

Usar para pectinases e celulases.

Tampão Citrato-Fosfato 0,2M pH 5,0

Solução A

Ácido cítrico.....21,01g/L

Dissolver o ácido cítrico em 200 mL de água destilada, após dissolução completar o volume para 1000 mL com água destilada.

Solução B

Fosfato de sódio dibásico PA

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53,61 g/L

Dissolver o fosfato de sódio em 100 mL de água destilada, completar o volume para 1000 mL homogeneizar completamente.

Solução de Uso

Retirar 243 mL da solução A + 257 mL da solução B, homogeneizar a mistura em agitador magnético; completar o volume para 1000mL. Medir o pH, e se necessário, ajustar para pH 5,0.

Usar para proteases, amilases e fenoloxidasas.

Solução de KOH 3%

KOH 3g
Água destilada100 mL

- Para verificar as reações de mudança de cor das microestruturas dos fungos.

Reagente de Melzer

Iodo0,5g
KI1,5g
Cloral hidratado20g,
Água destilada20 mL

- Para observar reação amilóide de basidiosporos e outras estruturas.

Corante Azul de Algodão

Azul de Algodão 0,05g
Ácido láctico30mL

Solução de Manachini

KH_2PO_4 2,0g
 $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 1,0g
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1g
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,9g
Extrato de levedura1,0g
Água destilada 1000 mL

1. Diluir as substâncias em água destilada na seqüência acima;

2. Adicionar o substrato adequado (0,5%) para a indução da enzima a ser estudada: amido de milho (amilase), pectina cítrica (pectinase), gelatina (protease), farelo de trigo (fenoloxidase) e CMC (celulase).
3. Ajustar o pH para cada enzima: amilase (6,0), pectinase (2,5), protease (6,9), fenoloxidase (6,0) e celulase (5,0).
4. Distribuir em Erlenmeyers e autoclavar a 121°C por 15 minutos.

Método somogyi

Reativo A

Dissolver, separadamente, 25g de carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3), 25g de tartarato duplo de sódio e potássio (sal de Rochelle, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 20g de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), 200g de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e completar o volume para 1000 mL com água destilada.

Reativo B

Dissolver 15g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) em água destilada, adicionar duas gotas de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado e completar para 100 mL.

Reativo cúprico

Misturar 25 mL do reativo A e 1 mL do reativo B.

Preparar na hora do uso.

Reativo Arsenomolibdico

Dissolver 25g de molibdato de amônio mono hidratado $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot\text{H}_2\text{O}$ em 750 mL de água destilada. Adicionar 21 mL de ácido sulfúrico H_2SO_4 concentrado e homogeneizar. Juntar uma solução de 3g de arseniato de sódio $\text{Na}_2\text{HAsO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dissolvido em 25 mL de H_2O destilada. Homogeneizar e colocar em banho-maria a 56°C por 25 minutos, resfriar e completar para 1000 mL e deixar em frasco escuro a 37°C por um ou dois dias.