

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM AGRONOMIA

TATIANE MARTINAZZO PORTZ

**FORMULAÇÃO DE SUBSTRATO PARA PRODUÇÃO
DE BASIDIOCARPOS DE *Pycnoporus sanguineus***

MARECHAL CÂNDIDO RONDON
JUNHO/2011

TATIANE MARTINAZZO PORTZ

**FORMULAÇÃO DE SUBSTRATO PARA PRODUÇÃO
DE BASIDIOCARPOS DE *Pycnoporus sanguineus***

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Agronomia, para obtenção do título de Mestre.

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Renato Stangarlin

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Roberto Luis Portz

Marechal Cândido Rondon

JUNHO/2011

“Tudo que respira cante glórias ao Senhor. Aleluia!”

(Sl 150,6)

*Com gratidão dedico este trabalho
a Deus, fonte primária de toda capacitação.
Aos meus pais - Severino e Itelvina - e a
meu marido - Márcio - pessoas especiais
que sempre serviram-me de suporte.*

AGRADECIMENTOS

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

A minha família pelo amor, apoio e incentivo. Vocês foram meu estímulo.

Ao meu marido Márcio, presente em todos os momentos, me incentivando e apoiando. Sua presença foi essencial.

Aos professores José Renato e Roberto pela orientação, paciência e dedicação.

Ao professores Odair e Vanda, pelo incentivo e auxílio.

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

Ao CNPQ pelo apoio financeiro concedido.

A colega Cristiane e sua disposição de ajudar em todas as etapas do trabalho e a todos os colegas que contribuíram com apoio ou auxílio.

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

Obrigada!

*"Todos temos momentos brilhantes,
e a maioria deles são graças ao estímulo de outra pessoa."
(George Adams)*

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO	14
CAPÍTULO 1	
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	16
1.1 Fungos.....	17
1.2 Divisão <i>Basidiomycota</i>	20
1.3 <i>Pycnoporus sanguineus</i>	22
1.3.1 Produção de metabólitos secundários	23
1.3.2 Cinabarina.....	25
1.3.3 Aplicação industrial	26
1.3.4 Controle de fitopatógenos	28
CAPÍTULO 2	
<i>Metodologia Empregada</i>	30
2.1 Ensaio <i>in vitro</i>	32
2.1.1 Diâmetro de colônia e velocidade de crescimento	33
2.1.2 Massa fresca do micélio e teor de cinabarina	33
2.2 Ensaio em substrato formulado	34
2.2.1 Diâmetro dos basidiocarpos.....	35
2.2.2 Massa fresca e massa seca dos basidiocarpos	35
2.2.3 Teor de cinabarina dos basidiocarpos.....	36
CAPÍTULO 3	
<i>Resultados e Discussão</i>	37
3.1 Ensaio <i>in vitro</i>	39
3.1.1 Diâmetro final de micélio	39
3.1.2 Velocidade de crescimento do micélio	41
3.1.3 Massa do micélio.....	44
3.1.4 Teor de cinabarina	46
3.2 Ensaio em substrato formulado	48
3.2.1 Diâmetro de basidiocarpos.....	49
3.2.2 Massa fresca dos basidiocarpos	51
3.2.3 Massa seca dos basidiocarpos	53
3.2.4 Teor de cinabarina dos basidiocarpos.....	56
3.2.5 Número médio de basidiocarpos.....	59
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

ANEXOS	73
Anexo 1A	73
Anexo 1B	74
Anexo 1C	75
Anexo 1D	76
Anexo 2A	77
Anexo 2B	78
Anexo 2C	79
Anexo 2D	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição do local de coleta dos isolados de <i>Pycnoporus sanguineus</i> provenientes da Micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), <i>Campus</i> de Marechal Cândido Rondon.....	31
Tabela 2. Teores de nitrogênio total, carbono orgânico e da análise química da serragem de <i>Eucalyptus</i> sp. desenvolvido pelo Laboratório de Química Ambiental e Instrumental da UNIOESTE, Marechal Cândido Rondon – PR.....	38
Tabela 3. Diâmetro final (cm) <i>in vitro</i> dos isolados de <i>Pycnoporus sanguineus</i> em diferentes granulometrias de serragem de <i>Eucalyptus</i> sp. adicionada ao meio de cultura.....	40
Tabela 4. Velocidade de crescimento (mm dia ⁻¹) <i>in vitro</i> dos isolados de <i>Pycnoporus sanguineus</i> em diferentes granulometrias de serragem de <i>Eucalyptus</i> sp. adicionada ao meio de cultura.	42
Tabela 5. Massa do micélio (mg cm ⁻²) <i>in vitro</i> dos isolados de <i>Pycnoporus sanguineus</i> em diferentes granulometrias de serragem de <i>Eucalyptus</i> sp. adicionada ao meio de cultura.....	44
Tabela 6. Teor de cinabarina (mg mL ⁻¹) <i>in vitro</i> dos isolados de <i>Pycnoporus sanguineus</i> em diferentes granulometrias de serragem de <i>Eucalyptus</i> sp. adicionada ao meio de cultura.	46
Tabela 7. Diâmetro médio dos basidiocarpos (mm) em substrato formulado dos isolados de <i>Pycnoporus sanguineus</i> em diferentes granulometrias de serragem de <i>Eucalyptus</i> sp. adicionada ao substrato formulado, para a primeira e a segunda coleta de basidiocarpos.	49
Tabela 8. Massa fresca dos basidiocarpos (mg) dos isolados de <i>Pycnoporus sanguineus</i> em diferentes granulometrias de serragem de <i>Eucalyptus</i> sp. adicionada ao substrato formulado, para as duas coletas de basidiocarpos	51
Tabela 9. Massa seca dos basidiocarpos (mg) dos isolados de <i>Pycnoporus sanguineus</i> em diferentes granulometrias de serragem de <i>Eucalyptus</i> sp. adicionada ao substrato formulado, para as duas coletas de basidiocarpos	54
Tabela 10. Teor de cinabarina dos basidiocarpos (mg mL ⁻¹) dos isolados de <i>Pycnoporus sanguineus</i> em diferentes granulometrias de serragem de <i>Eucalyptus</i> sp. adicionada ao substrato formulado, para a primeira e a segunda coleta de basidiocarpos	57
Tabela 11. Número médio de basidiocarpos por amostra dos isolados de <i>Pycnoporus sanguineus</i> em diferentes granulometrias de serragem de <i>Eucalyptus</i> sp. adicionada ao substrato formulado, para a primeira e a segunda coleta de basidiocarpos	59

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus* coletados no município de Marechal Cândido Rondon/PR. Martinazzo-Portz, fevereiro de 2011. 23
- Figura 2.** Estrutura química da molécula de cinabarina (Fórmula molecular C14 H10 N2 O5). Disponível on-line <pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>..... 26
- Figura 3.** Esquema ilustrativo mostrando o diâmetro de avaliação dos basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*. Martinazzo-Portz, 2011. 35
- Figura 4.** Determinação de açúcares redutores ($\mu\text{g mL}^{-1}$) do caldo de batata acrescido de serragem de *Eucalyptus* sp. nas concentrações de zero, 1, 5, 10 e 15% determinados pelo método descrito por Lever (1972). Valores transformados pela equação $y = 0,0306 + 0,0244x$. Pontos (♦) referem-se à granulometria inferior a 500 micra e pontos (■) referem-se à granulometria entre 500 e 841 micra..... 39
- Figura 5.** Diâmetro final (cm) *in vitro* de colônias dos isolados de *Pycnoporus sanguineus* (isolados Ps04, Ps08, Ps13 e Ps14) em relação à concentração de serragem de *Eucalyptus* sp. adicionada ao meio de cultura. Pontos (♦) com linha contínua referem-se à granulometria inferior a 500 micra e pontos (■) com linha tracejada referem-se à granulometria entre 500 e 841 micra. 41
- Figura 6.** Velocidade de crescimento (mm dia^{-1}) *in vitro* dos isolados de *Pycnoporus sanguineus* (isolados Ps04, Ps08, Ps13 e Ps14) em relação à concentração de serragem de *Eucalyptus* sp. adicionada ao meio de cultura. Pontos (♦) com linha contínua referem-se à granulometria inferior a 500 micra e pontos (■) com linha tracejada referem-se à granulometria entre 500 e 841 micra. 43
- Figura 7.** Massa do micélio (mg cm^{-1}) *in vitro* dos isolados de *Pycnoporus sanguineus* (isolados Ps04, Ps08, Ps13 e Ps14) em relação à concentração de serragem de *Eucalyptus* sp. adicionada ao meio de cultura. Pontos (♦) com linha contínua referem-se à granulometria inferior a 500 micra e pontos (■) com linha tracejada referem-se à granulometria entre 500 e 841 micra. 45
- Figura 8.** Teor de cinabarina (mg mL^{-1}) *in vitro* de micélio dos isolados de *Pycnoporus sanguineus* (isolados Ps04, Ps08, Ps13 e Ps14) em relação à concentração de serragem de *Eucalyptus* sp. adicionada ao meio de cultura. Pontos (♦) com linha contínua referem-se à granulometria inferior a 500 micra e pontos (■) com linha tracejada referem-se à granulometria entre 500 e 841 micra. 47
- Figura 9.** Diâmetro médio dos basidiocarpos (mm) dos isolados de *Pycnoporus sanguineus* (isolados Ps08 e Ps14) em relação à concentração de farelo de arroz adicionado a serragem de *Eucalyptus* sp. para cultivo em substrato formulado referentes a primeira e segunda coleta de basidiocarpos. Pontos (♦) com linha contínua referem-se à

granulometria inferior a 500 micra e pontos (■) com linha tracejada referem-se à granulometria entre 500 e 841 micra. 50

Figura 10. Massa fresca média dos basidiocarpos (mg) dos isolados de *Pycnoporus sanguineus* (isolados Ps08 e Ps14) em relação à concentração de farelo de arroz adicionado a serragem de *Eucalyptus* sp. para cultivo em substrato formulado referentes a primeira e segunda coleta de basidiocarpos. Pontos (♦) com linha contínua referem-se à granulometria inferior a 500 micra e pontos (■) com linha tracejada referem-se à granulometria entre 500 e 841 micra. 52

Figura 11. Massa seca média dos basidiocarpos (mg) dos isolados de *Pycnoporus sanguineus* (isolados Ps08 e Ps14) em relação à concentração de farelo de arroz adicionado a serragem de *Eucalyptus* sp. para cultivo em substrato formulado referentes a primeira e segunda coleta de basidiocarpos. Pontos (♦) com linha contínua referem-se à granulometria inferior a 500 micra e pontos (■) com linha tracejada referem-se à granulometria entre 500 e 841 micra. 55

Figura 12. Gráfico comparativo da produção de massa fresca e massa seca (mg) dos basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus* produzidos em duas granulometrias de serragem de *Eucalyptus* sp. Barras (■) representam a granulometria inferior a 500 micra e barras (■) representam a granulometria entre 500 e 841 micra. 55

Figura 13. Teor de cinabarina dos basidiocarpos (mg mL^{-1}) dos isolados de *Pycnoporus sanguineus* (isolados Ps08 e Ps14) em relação à concentração de farelo de arroz adicionado a serragem de *Eucalyptus* sp. para cultivo em substrato formulado referentes a primeira e segunda coleta de basidiocarpos. Pontos (♦) com linha contínua referem-se à granulometria inferior a 500 micra e pontos (■) com linha tracejada referem-se à granulometria entre 500 e 841 micra. 57

Figura 14. Gráfico comparativo da produção de massa seca e teor de cinabarina dos basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus* produzidos em duas granulometrias de serragem de *Eucalyptus* sp. Barras (■) representam a granulometria inferior a 500 micra e barras (■) representam a granulometria entre 500 e 841 micra. 58

Figura 15. Número médio de basidiocarpos por amostra dos isolados de *Pycnoporus sanguineus* (isolados Ps08 e Ps14) em relação à concentração de farelo de arroz adicionado a serragem de *Eucalyptus* sp. para cultivo em substrato formulado referentes a primeira e segunda coleta de basidiocarpos. Pontos (♦) com linha contínua referem-se à granulometria inferior a 500 micra e pontos (■) com linha tracejada referem-se à granulometria entre 500 e 841 micra. 60

Figura 16. Gráfico comparativo do número e diâmetro médio e número de basidiocarpos por amostra de *Pycnoporus sanguineus* produzidos em duas granulometrias de serragem de *Eucalyptus* sp. Barras (■) representam a granulometria inferior a 500 micra e barras (■) representam a granulometria entre 500 e 841 micra. 61

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Ilustração 1.** Fotos do ensaio *in vitro* para produção de micélio de *Pycnoporus sanguineus* para o isolado P.s. 04 nas concentrações de zero, 1, 5, 10 e 15% de serragem de *Eucalyptus* sp. adicionada ano meio de cultivo CBA para as granulometrias inferior a 500 micra e entre 500 e 841 micra. Martinazzo-Portz, 2011..... 73
- Ilustração 2.** Fotos do ensaio *in vitro* para produção de micélio de *Pycnoporus sanguineus* para o isolado P.s. 08 nas concentrações de zero, 1, 5, 10 e 15% de serragem de *Eucalyptus* sp. adicionada ano meio de cultivo CBA para as granulometrias inferior a 500 micra e entre 500 e 841 micra. Martinazzo-Portz, 2011..... 74
- Ilustração 3.** Fotos do ensaio *in vitro* para produção de micélio de *Pycnoporus sanguineus* para o isolado P.s. 13 nas concentrações de zero, 1, 5, 10 e 15% de serragem de *Eucalyptus* sp. adicionada ano meio de cultivo CBA para as granulometrias inferior a 500 micra e entre 500 e 841 micra. Martinazzo-Portz, 2011..... 75
- Ilustração 4.** Fotos do ensaio *in vitro* para produção de micélio de *Pycnoporus sanguineus* para o isolado P.s. 14 nas concentrações de zero, 1, 5, 10 e 15% de serragem de *Eucalyptus* sp. adicionada ano meio de cultivo CBA para as granulometrias inferior a 500 micra e entre 500 e 841 micra. Martinazzo-Portz, 2011..... 76
- Ilustração 5.** Fotos do ensaio em substrato formulado para produção de micélio de *Pycnoporus sanguineus* para o isolado P.s. 08 na primeira coleta, nas concentrações de zero, 5 e 10% de farelo de arroz adicionado a serragem de *Eucalyptus* sp. para as granulometrias inferior a 500 micra e entre 500 e 841 micra. Martinazzo-Portz, 2011..... 77
- Ilustração 6.** Fotos do ensaio em substrato formulado para produção de micélio de *Pycnoporus sanguineus* para o isolado P.s. 08 na segunda coleta, nas concentrações de zero, 5 e 10% de farelo de arroz adicionado a serragem de *Eucalyptus* sp. para as granulometrias inferior a 500 micra e entre 500 e 841 micra. Martinazzo-Portz, 2011..... 78
- Ilustração 7.** Fotos do ensaio em substrato formulado para produção de micélio de *Pycnoporus sanguineus* para o isolado P.s. 14 na primeira coleta, nas concentrações de zero, 5 e 10% de farelo de arroz adicionado a serragem de *Eucalyptus* sp. para as granulometrias inferior a 500 micra e entre 500 e 841 micra. Martinazzo-Portz, 2011..... 79
- Ilustração 8.** Fotos do ensaio em substrato formulado para produção de micélio de *Pycnoporus sanguineus* para o isolado P.s. 14 na segunda coleta, nas concentrações de zero, 5 e 10% de farelo de arroz adicionado a serragem de *Eucalyptus* sp. para as granulometrias inferior a 500 micra e entre 500 e 841 micra. Martinazzo-Portz, 2011.) 80

RESUMO

MARTINAZZO-PORTZ, T. **Formulação de substrato para produção de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*.**

A composição bioquímica dos fungos pode variar com condições climáticas de cultivo e substrato. Diversas espécies têm mostrado atividades bioquímicas, como o *Pycnoporus sanguineus*, que se destaca pela coloração vermelho-alaranjada de seus basidiocarpos. Embora este fungo possua atividade antimicrobiana estudada em diversas áreas, como farmacêutica, industrial e agrícola, não há nenhum método para cultivo de basidiocarpos descrito na literatura. Este trabalho objetivou desenvolver substrato com resíduos madeireiros de *Eucalyptus* sp. para o cultivo de *P. sanguineus* e produção de basidiocarpos. Realizaram-se dois ensaios, *in vitro* e em substrato formulado, desenvolvidos na UNIOESTE, Campus de Marechal Cândido Rondon. Utilizou-se serragem de madeira de *Eucalyptus* sp., separada em duas granulometrias: inferior a 500 micra (G1) e entre 500 e 841 micra (G2). No ensaio *in vitro* utilizaram-se quatro isolados de *P. sanguineus* (Ps04, Ps08, Ps13 e Ps14), cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura CBA acrescidos de serragem nas proporções de zero, 1, 5, 10 e 15%, para as duas granulometrias. Em cada placa foi repicado um disco de 0,5 cm contendo micélio e mantidos em ambiente escuro a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, até que o primeiro tratamento atingisse a borda da placa de Petri. Avaliou-se diâmetro de colônia, velocidade de crescimento do micélio, a massa fresca do micélio e a produção do pigmento cinabarina. O delineamento experimental foi DIC, em esquema fatorial $4 \times 2 \times 5$, sendo quatro isolados de *P. sanguineus*, duas granulometrias de serragem de *Eucalyptus* sp. e cinco concentrações de serragem acrescidos ao meio de cultivo, ambos com seis repetições. No ensaio em substrato formulado, utilizou-se dois isolados de *P. sanguineus* (Ps08 e Ps14), cultivados em sacos de polipropileno de 28×16 cm, contendo serragem de *Eucalyptus* sp. e farelo de arroz, nas proporções de zero, 5 e 20%, nas granulometrias G1 e G2, com umidade de 75% e compactados a $0,5 \text{ g mL}^{-1}$. Os substratos permaneceram 30 dias em BOD a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e então foram levados a casa de vegetação. Realizaram-se duas coletas de basidiocarpos, a primeira após 90 dias e a segunda após 180 dias do ensaio em casa de vegetação. A cada coleta avaliou-se o diâmetro, as massas fresca e seca, o número médio de basidiocarpos e a produção do pigmento cinabarina. Utilizou-se delineamento experimental DIC, em esquema fatorial $2 \times 2 \times 3$, sendo dois isolados de *P. sanguineus*, duas granulometrias de serragem de *Eucalyptus* sp. e três concentrações de farelo de arroz adicionadas a serragem, ambos com seis repetições. Foi observado que a serragem de *Eucalyptus* sp. é apropriada para formulação de substrato para produção de basidiocarpos de *P. sanguineus*, sendo a que G1 mostrou melhores resultados apenas nos ensaios *in vitro*. Nos ensaios em substrato formulado, as duas granulometrias mostraram bons resultados produtivos para os isolados de *P. sanguineus*. O Ps08, nos ensaios em substrato formulado, teve produção de massa de basidiocarpos, enquanto o Ps14 mostrou maior teor de cinabarina nos basidiocarpos. Pode-se concluir que as características genéticas de potencial biológico dos isolados de *P. sanguineus* estão mais relacionados aos resultados produtivos que as características dos substratos utilizados nesta pesquisa.

Palavras chave: Cinabarina, *Eucalyptus* sp., Basidiomycetes.

ABSTRACT

MARTINAZZO-PORTZ, T. **Formulation of substrate for production of *Pycnoporus sanguineus* basidiocarps.**

The biochemical composition of fungi can vary with climatic conditions and cultivation substrate. Several species have shown biochemical activities, such as *Pycnoporus sanguineus*, which is highlighted by orange to red color of their basidiocarps. Although the antimicrobial activity verified in various fields such as pharmaceutical, industrial and agricultural, there is no method for growing basidiocarps described in the literature. This work aimed to develop a substrate with *Eucalyptus* sp. for the cultivation of *P. sanguineus* and production of basidiocarps. There were two assays, *in vitro* and *in* formulated substrate, developed in the Unioeste, *Campus* of Marechal Cândido Rondon. We used sawdust of *Eucalyptus* sp. Separate in two particle sizes: less than 500 microns (G1) and between 500 and 841 microns (G2). In the *in vitro* assay were used four isolates of *P. sanguineus* (Ps04, Ps08, PS13 and PS14), grown in Petri dishes containing culture medium CBA plus sawdust in the proportions of zero, 1, 5, 10 and 15% for both sizes. In each dish was peaked a 0.5 cm disc containing mycelium and kept in dark at $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, until the first treatment to reach the edge of the Petri dish. Was evaluated the diameter of colony, growth rate of mycelium, the fresh weight of mycelium and production of the pigment cinnabarin. The experiment was DIC in 4x2x5 factorial design, four isolates of *P. sanguineus*, two particle size of sawdust of *Eucalyptus* sp. and five concentrations of sawdust added to the culture medium, both with six repetitions. In the assay with formulated substrate, we used two isolates of *P. sanguineus* (Ps08 and Ps14), grown in polypropylene bags of 28x16 cm, containing sawdust of *Eucalyptus* sp. and rice bran. At zero, 5 and 20%, particle size in G1 and G2, with humidity of 75% and compacted to 0.5 g mL^{-1} . The substrates remained 30 days in BOD at $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, then taken to the greenhouse. Two harvest of basidiocarps were made, at 90 and 180 days. Where were evaluated diameter, fresh and dry weight, the average number of basidiocarps and production cinnabarin. Was used experimental DIC in 2x2x3 factorial design, with two isolates of *P. sanguineus*, two particle size of sawdust of *Eucalyptus* sp. and three concentrations of rice bran added to sawdust, both with six repetitions. Was observed that the sawdust of *Eucalyptus* sp. is suitable for substrate for the production of basidiocarps of *P. sanguineus*, which is G1 showed better results only *in vitro* assays, while on substrate, the two particle sizes showed good results for the production isolates of *P. sanguineus*. The Ps08, produced more mass of basidiocarps, while the Ps14 showed higher content of cinnabarin in the basidiocarps. It can be concluded that the genetic characteristics of the biological potential of the isolates of *P. sanguineus* are more related to productive results that the characteristics of substrates used in this research.

INTRODUÇÃO

Os microrganismos são uma fonte de compostos bioativos ainda com poucos estudos práticos, quando comparados a possibilidade de aplicação das moléculas produzidas. Os fungos, em particular os da divisão *Basidiomycota*, são conhecidos ao longo da história, seja pela sua toxidez ou ainda por suas propriedades nutricionais e medicinais, tornando-os utilizados por diversos povos. Nos últimos anos, houve aumento da sua importância no mercado mundial, pelo fato de muitos terem a capacidade de produzir compostos aplicáveis na área industrial, medicinal e agrícola.

Pycnoporus sanguineus é um basidiomiceto de decomposição branca, com crescimento lento. É comumente reconhecido pela acentuada tonalidade laranjada de seus corpos de frutificação. Seus extratos foram testados na indústria farmacêutica, como antibiótico, e no setor agrícola têm sido testado para controle de doenças através da indução de resistência em plantas.

Estudos referentes ao potencial de uso de *P. sanguineus* estão sendo aprimorados e apesar das possíveis aplicações, nenhum método de cultivo para produção de basidiocarpos em substrato foi desenvolvido.

Considerando que um terço do peso seco da biomassa das florestas consiste da lignina presente na madeira, fica evidente a importância dos fungos de decomposição branca no processo de reciclagem, já que eles são os únicos organismos eficientes na decomposição deste material, pois apresentam a capacidade de completar a mineralização dos componentes da madeira (REID, 1995; TONINI, 2004; WASSER e WEIS, 1999).

Na natureza, existe uma abundância de substratos que podem ser aproveitados por fungos como fonte nutricional, principalmente resíduo de origem vegetal, que contém grandes quantidades de lignina. Para o cultivo de basidiomicetos pode-se utilizar substratos à base de cana-de-açúcar, palhas de trigo, arroz, gramíneas e serragens, entre outros (EIRA, 2003). A indústria madeireira, durante o processo de usinagem da madeira serrada gera resíduos em grande quantidade. Árvores de eucalipto estão entre as três espécies mais utilizadas nas serrarias da Região Sul do Brasil (HILLIG *et al.*, 2006).

Basidiocarpos de *P. sanguineus* são encontrados comumente na região Oeste do Paraná, porém, restrito a determinada época do ano, entre a primavera e o verão, dificultando a utilização do fungo nas pesquisas. Diante desta necessidade, este trabalho foi realizado com objetivo de desenvolver substrato com resíduos madeireiros de *Eucalyptus* sp. para o cultivo de *P. sanguineus* e produção de basidiocarpos.

Capítulo 1

Pycnoporus sanguineus

1.1 Fungos

1.2 Divisão *Basidiomycota*

1.3 *Pycnoporus sanguineus*

1.3.1 Produção de metabólitos secundários

1.3.2 Cinabarina

1.3.3 Aplicação industrial e agrícola

1.3.4 Controle de fitopatógenos

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Fungos

A árvore filogenética universal da vida defende a existência de um ancestral comum a todas as formas de vida. Fungos, animais e vegetais, embora sejam organismos eucariontes, apresentam singularidades que os diferenciam. Durante muito tempo os fungos foram considerados plantas, mas a partir de 1969 foram classificados como um reino a parte, denominado Reino Fungi (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005). Em sua maioria, são haplóides e potencialmente capazes de crescimento ilimitado, ao contrário de plantas e animais, cujos indivíduos são diplóides e de crescimento limitado (LOGUERCIO-LEITE *et al.*, 2006).

Alguns fatores que influenciam o crescimento fúngico, podem ser a temperatura, os valores de pH do substrato e a presença ou ausência de oxigênio. Para a maioria das espécies, a temperatura ótima varia entre 25 e 30°C. Para o pH o ideal é muito amplo, variando entre 4,0 a 9,0. Grande parte das espécies se desenvolve bem em aerobiose, incluindo as leveduras que são anaeróbias facultativas, porém um grupo restrito necessita de anaerobiose para o crescimento (CARLILE *et al.*, 2001).

O reino Fungi é diferenciado com base em características morfológicas e fisiológicas. São eucariontes, aclorofilados e sem produção de qualquer pigmento fotossintético. Sua parede celular definida é composta por quitina e β -glucanos, em sua maioria isentas de celulose, exceto alguns fungos aquáticos. Utilizam o glicogênio como reserva de nutrientes, o que se assemelha aos animais e difere das plantas, que armazenam amido como substância de reserva. Também possuem esporos como estruturas reprodutivas, que podem ser unicelulares ou pluricelulares (KRUGNER e BACHI, 1995; ALEXOPOULOS *et al.* 1996; TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

Todos os fungos são quimio-heterotróficos, necessitando de componentes orgânicos para energia e fonte de carbono (TORTORA *et al.*, 2000). De forma geral, duas unidades morfológicas básicas na fase vegetativa

dos fungos podem ser encontradas. As unicelulares ou leveduriformes, que se apresentam como células pequenas e delimitadas e, as formas filamentosas, característica para a maioria dos fungos. As hifas são filamentos tubulares que se estendem continuamente pelas extremidades e desempenham importantes funções, como a colonização e a absorção de água e nutrientes (KRUGNER & BACHI, 1995; HARRIS & MOMANY, 2004; LOGUERCIO-LEITE *et al.*, 2006).

O reino Fungi constitui um grupo muito grande e heterogêneo, sendo aceito como o segundo maior grupo de organismos da Terra, com aproximadamente 1,5 milhões de representantes, ficando atrás apenas dos insetos. Estima-se que apenas cerca de 74 mil espécies foram descritas. (HEYWOOD, 1995¹ citado por HAWKSWORTH, 2002; ESPOSITO e AZEVEDO, 2004). Estes podem ser encontrados em diversos locais da natureza, sejam em jardins, parques, bosques, matas, campos, gramados, nas ruas arborizadas das cidades e em locais de queimada (BAUMER, 2009).

O reino Fungi é dividido em sete filos. O filo *Ascomycota*, onde se classificam grande parte das leveduras; o filo *Basidiomycota*, que em sua maioria são fungos macroscópicos; o filo *Chytridiomycota*, que são predominantemente aquáticos; o filo *Neocallimastigomycota*, composto por fungos anaeróbios; o filo *Blastocladiomycota*, que são habitantes de água, solo e parasitos de insetos; o filo *Zigomycota*, que compreende fungos saprofitas de solo e; o filo *Glomeromycota*, que é representado por fungos de micorrizas arbusculares (HIBBET *et al.*, 2007).

Os fungos são de grande importância econômica e social, podendo proporcionar efeitos benéficos ou prejudiciais. Muitos deles, especialmente as leveduras, estão envolvidos nos processos de fermentação industrial, como bebidas, panificados e laticínios, tal qual a produção de medicamentos farmacêuticos, como a penicilina (HOGG, 2005).

Além disso, os fungos produzem compostos bioativos em processos ecológicos, servindo como agentes de biocontrole e sendo essenciais para a sobrevivência de outros organismos (HAWKSWORTH, 2002). De acordo com

¹ HEYWOOD, V. H. (ed) **The Global Biodiversity Assessment**. United Nations Environment Programme. CambridgePe. 1140p. 1995.

Lange (1996)² citado por Baumer (2009) 20% de todas as moléculas bioativas conhecidas são provenientes de fungos filamentosos, a grande maioria produzidas por apenas três gêneros: *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium*. Junto com as bactérias, são responsáveis pela decomposição e reprocessamento de grandes quantidades de matéria orgânica, reciclando complexos para a atmosfera, como o CO₂ (HOGG, 2005).

A variedade microbiana compõe uma preciosa fonte de inovação biotecnológica. Os fungos produzem um vasto número de ácidos orgânicos, como o ácido cítrico, bem como compostos utilizados para a manipulação de fármacos, como antibióticos e, enzimas de interesse industrial e com elevado valor econômico, como a produção de bebidas fermentadas, panificados e alguns tipos de queijos. Além disso, são utilizados para controle biológico de insetos pragas no setor agrícola e outras moléstias (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

Todavia, algumas espécies de fungo trazem efeitos desagradáveis, acarretando doenças em homens e animais, por infecção de alimentos ou problemas de pele, como micoses (KRUGNER e BACHI, 1995). Também no setor agrícola observa-se um grupo numeroso de fungos parasitando plantas e os prejuízos podem causar severos danos às culturas de valor comercial e cultural, assim como a deteriorização precoce de madeira e produtos (AGRIOS, 2005).

Historicamente, as doenças fúngicas nas plantas foram à causa de problemas sociais e econômicos em diversos países. Pode-se citar como mais famosa a catástrofe da Irlanda, entre os anos de 1845 e 1846, onde o fungo *Phytophthora infestans*, causador da doença requeima da batata, ocasionou um dano de até 80% da produção de batata no país, que tinha este tubérculo como principal alimento. A consequência deste fato foram dois milhões de mortos e um milhão de emigrantes (KRUGNER e BACHI, 1995).

Enquanto algumas espécies de fungos causam malefícios, outros grupos de fungos estão sendo estudados no intuito de reduzir os danos causados por outros microrganismos, seja no controle direto ou na indução de resistência. Brizuela *et al.* (1998) citam que embora os basidiomicetos e fungos

² LANGE, L. Microbial Metabolites - an Infinite Source of Novel Chemistry. **Pure & Appl. Chem.**, v. 68, n. 3, p. 745-748, 1996.

miceliares em geral, não possuem descrição do conhecimento biológico tão completo quanto bactérias e leveduras, estes apresentam potencialidades de biossíntese mais interessantes e numerosas.

1.2 Divisão *Basidiomycota*

A divisão *Basidiomycota* possui mais de 25.000 espécies descritas (WASSER e WEIS, 1999) e a maioria são fungos macroscópicos, incluindo desde cogumelos comestíveis até tóxicos, mas também engloba leveduras e fungos que não apresentam frutificações macroscópicas (RAVEN *et al.*, 2001).

A maioria dos fungos desta divisão é saprofítica, porém há uma pequena parte dos basídios que são parasitas e ocasionam doenças em plantas, como é o caso do *Ustilago maydis*, que causa o carvão do milho. Há também um grande número de espécies que se associam simbioticamente, sendo micorrízicos com raízes de plantas, e um número bem restrito que causam doenças em humanos (LUZ, 2008).

Os basidiomicetos superiores, apesar de não ser um grupo taxonômico, possuem estruturas especiais de reprodução, sendo uma característica a presença de basídios asseptados, formados sobre o micélio ou na parte inferior do píleo do corpo de frutificação, o chamado basidiocarpo. Quando o basidiocarpo apresenta estipe é chamado de cogumelo e na sua ausência é conhecido por “orelhas-de-pau” (KRUGNER e BACHI, 1995; CARLILE *et al.*, 2001).

Os corpos de frutificação apresentam tamanhos variados, desde milímetros até aproximadamente 50 cm, com formas heterogêneas e grande diversidade de cores. Quando maduros, podem ser secos, carnosos, lenhosos, o que conferem características de fragilidade ou formas complexas (GUERRERO e HOMRICH, 1999).

Em 1941, Anchel, Hervey e Wilkins realizaram a primeira investigação do potencial de basidiomicetes como agentes produtores de atividade antibiótica, através da observação de mais de 2 mil espécies, utilizando extratos de basidiomas e cultura de micélios de inúmeras espécies

(FLOREY *et al.*, 1949³, citado por VIEIRA, 2005). Segundo Anke (1989) a pesquisa por metabólitos de basidiomiceto desvalorizou-se pelo fato de os estreptomicetos apresentarem uma fonte mais abundante de antibióticos e com maior facilidade de manipulação. Recentemente voltaram a ser pesquisados devido a necessidade de novos compostos bioativos (BRIZUELA *et al.*, 1998).

A composição bioquímica dos macrofungos é modificada de acordo com a espécie e a linhagem do fungo, podendo variar com condições climáticas de cultivo e substrato (DERMIBAS, 2001). Latif *et al.* (1996), com base no peso seco, estudaram os componentes bioquímicos presentes em diversos basidiocarpos e concluíram que, de forma geral, apresentam aproximadamente 40% de carboidrato, 17% de proteínas, 3% de gorduras e o restante constituído por minerais.

Suay *et al.* (2000) avaliaram mais de 200 espécies de macrofungos e cerca de 75% apresentaram grande capacidade de atividade antimicrobiana. Segundo os autores, esta atividade está associada a metabolitos secundários e devido a polissacarídeos de elevado peso molecular presentes na parede celular. Ng (2004) afirma que ainda são contrastantes as publicações referêntes a proteínas antifúngicas produzidas por fungos, quando comparadas com a expressiva quantidade de informações sobre proteínas antifúngicas produzidas por plantas.

Dentro da Divisão Basidiomycota, diversas Ordens tem mostrado atividades bioquímicas de interesse em diversas áreas, como farmacêutica e agrícola. A Ordem Aphyllophorales tem-se destacado por apresentar grande variedade, reunindo cerca de 400 gêneros e 1200 espécies, principalmente saprófitas, mas também algumas parasitas de plantas e outras micorrizas. (MACEDO e PILIACKAS, 2005⁴, citados por BAUMER, 2009). Pode-se citar como exemplo os fungos chamados de orelha-de-pau, como o gênero *Pycnoporus*.

³ FLOREY, H. W., CHAIN, E., HEATLEY, N. G., JENNINGS, M. A., SANDERS, A. G., ABRAHAM, E. P. & FLOREY, M. E. **Antibiotics**, vol. 1, p. 457. 1949.

⁴ MACEDO, A. F.; PILIACKAS, J. M. Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Fungos Pertencentes à Família *Polyporaceae*. **Anais...** XI Simpósio Multidisciplinar da USJT. São Paulo: USJT, 2005.

1.3 *Pycnoporus sanguineus*

Evidências genéticas e morfológicas indicam a presença de três espécies do gênero *Pycnoporus*: *P. cinnabarinus*, que ocorre em zona temperada do Hemisfério Norte; *P. coccineus*, que ocorre na zona temperada do Hemisfério Sul e nos países próximos aos Oceanos Índico e Pacífico; e *P. sanguineus*, encontradas em regiões tropicais e subtropicais dos Hemisférios Norte e Sul (NOBLES e FREW, 1962).

P. sanguineus pertence à divisão *Basidiomycota*, família *Polyporaceae*. Destaca-se pela coloração vermelho-alaranjada de seus basidiocarpos, dada pela presença de pigmentos, como a cinabarina. Nutre-se saprofiticamente de algumas madeiras em regiões de clima ameno (MARQUES, 2001; ESPOSITO *et al.*, 1993; GARCIA, 2006), na forma de decomposição branca seletiva (fungos xilófagos). Isto acontece porque possuem um sistema enzimático que os torna capazes de degradar fontes complexas de carbono como a celulose, a hemicelulose e a lignina (CAPELARI, 1996), diferente dos basidiomicetos de decomposição parda, não capazes de destruir a lignina (TEIXEIRA *et al.*, 1997; BLANCHETTE *et al.*, 1988; WILLE, 2007), demonstrando, dessa forma, a capacidade do fungo em degradar madeiras com diferentes densidades.

P. sanguineus (Figura 1) é um basidiomiceto de crescimento lento e textura lenhosa, conhecido popularmente por orelha-de-pau (SMÂNIA JR. *et al.*, 1995; GAMEIRO *et al.*, 2004). Apresenta uma frutificação semicircular e encontra-se distribuída horizontalmente nos caules das árvores (TOILLIER *et al.*, 2010). Os basidiocarpos possuem uma superfície lisa e ligeiramente concêntrica (LEPP, 2005).



Figura 1. Basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus* coletados no município de Marechal Cândido Rondon/PR. Martinazzo-Portz, fevereiro de 2011.

A ocorrência em quase todas as estações do ano faz de *P. sanguineus* uma espécie eutermica, tolerando uma ampla variação de temperatura, suportando médias superiores a 50°C (CASTILHO e DERMOULIN, 1997). Smânia *et al.* (1997) afirma que as condições de máxima produção de compostos bioativos dá-se a 25°C e na presença de luz.

Segundo Esposito *et al.* (1993) o fungo *P. sanguineus* é amplamente distribuído na natureza, sendo encontrado em grandes quantidade na floresta Amazônica. Gerrero e Homrich (1999) afirmam que esta espécie é comumente encontrada na região sul do Brasil, especialmente no estado do Rio Grande do Sul, ocorrendo em locais ensolarados, sobre postes, troncos caídos e madeiras de construção, podendo ser vistos crescendo em plantas vivas ou mortas.

Baumer (2009) cita que além da capacidade de degradar materiais lignocelulósicos, *P. sanguineus* também vem sendo estudado pelas propriedades antimicrobianas dos metabolitos secundários e produção de enzimas.

1.3.1 Produção de metabólitos secundários

A produção de metabolitos secundários e enzimas degradadoras de materiais lignocelulósicos são importantes para o processo de morfogênese

dos basidiomicetes (RAJARATHNAM *et al.*, 1992).

Os produtos de origem fúngica têm sido reconhecidos como candidatos em potencial para estudos clínicos, pelo fato de apresentarem custos relativamente baixos e podem ser obtidos em boas quantidades (SEO *et al.*, 2003; HAGHBEEN *et al.*, 2004).

A pesquisa sobre a atividade antimicrobiana de *P. sanguineus* iniciou em 1946, quando Bose⁵ isolou poliporin, um componente ativo contra bactérias gram-negativas e gram-positivas (ROSA *et al.* 2003). Estudos recentes com *P. sanguineus* apresentam resultados animadores, uma vez que apresentam características antibacteriana e antifúngica (PEITER-BENINCA *et al.* 2008).

Estudos realizados por Anke (1989) indicam uma diversidade de componentes isolados de basidiomicetos, que promovem a inibição do crescimento de microrganismos. *P. sanguineus* sintetiza pelo menos sete pigmentos, podendo ser citados como mais estudado o antibiótico cinabarina, (ACHENBACH e BLÜMM, 1991) descrito no próximo subitem, além das proteínas fenoloxidasas contendo cobre (GARCIA, 2006), como a lacase e a tirosinase, e as enzimas lignolíticas lignina-peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MgP) (DUARTE, 2009).

As lacases e as tirosinases, subclasses das fenoloxidasas, são oxidoreduases que catalizam a oxidação de compostos aromáticos fenólicos e não fenólicos. As duas reagem com o oxigênio sem a necessidade de cofatores (DURÁN e ESPOSITO, 2000). Agrios (2005) admite que nas plantas, o aumento na atividade das polifenoloxidasas resulte em altas concentrações de produtos tóxicos de oxidação, o que confere maior grau de resistência a infecção.

As lacases catalisam a oxidação de diversos compostos orgânicos e inorgânicos através da transferência de um elétron, utilizando oxigênio molecular comoceptor. A doação de um elétron forma um radical livre instável, que sofre oxidação (BOURBONNAIS e PAICE, 1990). Segundo Souza *et al.* (2004) a função da lacase nos fungos é variada, incluindo desde a regulação da morfologia, controle de virulência e deslignificação de tecidos.

⁵ BOSE, S.R. Antibiotics in a *Polyporus* (*Polystictus sanguineus*). **Nature**, v.158, p .292-296, 1946.

A tirosinase utiliza oxigênio molecular para suas reações, liberando o-quinona, que sofre reações não-enzimáticas com vários nucleófilos que se associam espontaneamente a melanina, pigmento com tonalidade variando entre castanho escuro, vermelho ou preto (ESPÍN *et al.*, 1995). Nos fungos, a melanina está correlacionada com a diferenciação dos órgãos reprodutivos, além de contribuir para a resistência da parede celular, evitando a lise (SEO *et al.*, 2003).

A lignina-peroxidase (LiP) requer peróxido de hidrogênio para sua ação catalítica (BONFÁ *et al.*, 2003), e seu mecanismo de ação baseia-se na captura de um elétron de compostos fenólicos e não-fenólicos da molécula de lignina, que devido a formação de radicais catiônicos são decompostos quimicamente (BAVUTTI, 1997). A manganês-peroxidase (MnP) é muito semelhante à LiP, entretanto, além do peróxido de hidrogênio requer íons Mn^{+2}/Mn^{+3} como par redox intermediário (SILVA *et al.*, 2004).

A LiP tem sido caracterizada por catalizar a oxidação inicial de xenobióticos (VAZQUEZ-DUHALT *et al.*, 1994), que são moléculas orgânicas de difícil degradação, estranhas ao ambiente natural (GAYLARDE *et al.*, 2005).

1.3.2 Cinabarina

A cinabarina é uma substância antibiótica produzida por *P. sanguineus*, um composto com pigmentação laranja, o qual tem uma estrutura básica 1,3-fenoxazina, com um grupo carbonila no C-1, um grupo amino no C-2 e um grupo hidroxila no C-9 (ACHENBACH e BLÜMM, 1991; SMÂNIA *et al.*, 1998), conforme representada na Figura 2.

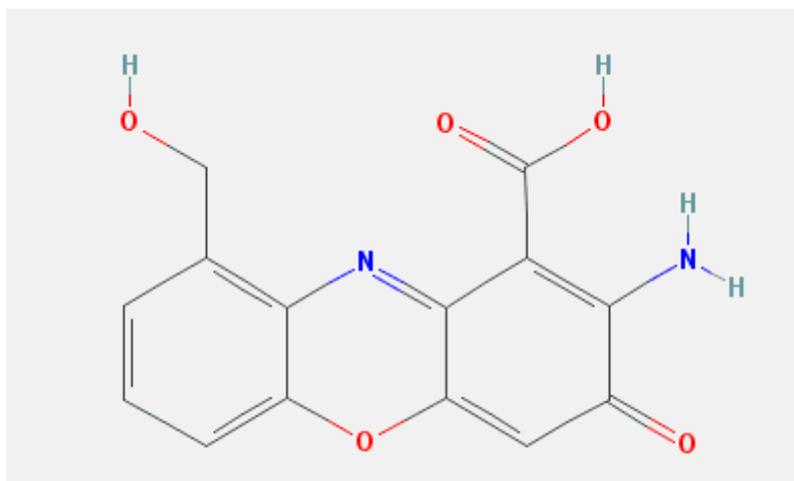


Figura 2. Estrutura química da molécula de cinabarina (Fórmula molecular C₁₄ H₁₀ N₂ O₅). Disponível on-line <pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.

Smânia Jr. *et al.* (1995) observou que a síntese de substâncias com atividade antimicrobiana ocorre principalmente entre o décimo oitavo e o vigésimo terceiro dia de incubação. O autor também constatou que os extratos obtidos por *P. sanguineus* somente mantiveram a atividade quando armazenados a vácuo. Smânia *et al.* (1997) ressaltaram que a temperatura de 25°C, acompanhado de presença de luz, são as condições ideais para máxima produção de cinabarina no cultivo *in vitro*.

A cinabarina obtida a partir de *P. sanguineus* foi testada para avaliar a toxicidade, a partir de um modelo animal utilizando camundongos, pela administração intraperitoneal de diferentes concentrações, realizado por Smânia Jr. *et al.* (2003). Os autores observaram que a maior concentração utilizada (1.000 mg kg⁻¹) não foi suficiente para matar os animais e nenhuma alteração celular foi observada nos órgãos analisados.

A partir destas informações, pode-se inferir que a cinabarina, proveniente de *P. sanguineus*, possui grande potencial de bons resultados em estudos antibióticos.

1.3.3 Aplicação industrial

Os fungos xilófagos têm recebido atenção especial dos pesquisadores nas últimas décadas devido a sua aplicabilidade. O gênero

Pycnopus é relatado como produtor de várias enzimas aplicáveis industrialmente, como xilanase e β -glicosidase, invertase e α -amilase (ESPOSITO *et al.*, 1993; QUIROGA *et al.*, 1995⁶, citado por GARCIA, 2006).

O emprego de enzimas oxidativas de fungos filamentosos como uma solução biológica para o tratamento de efluentes, contendo compostos fenólicos tóxicos, tal qual *P. sanguineus*, tem-se tornado conhecido nos últimos anos (CHIACCHIERINI *et al.*, 2004; HALAOULI *et al.*, 2006).

Os reagentes utilizados na indústria têxtil apresentam composição química bastante variada. Os corantes possuem uma mistura de compostos com estruturas moleculares complexas, proporcionando estabilidade que torna esta molécula de difícil biodegradabilidade (FORGIARINI, 2006). Pointing e Vrijmoed (2000) observaram 60% da descoloração do corante azo, 98% do azul bromofenol e 100% do verde malaquita em cultivos em meio líquido de *P. sanguineus*, indicando que este fungo apresenta grande potencial na redução de corantes em efluentes têxteis.

Extratos de *P. sanguineus* foram testados na indústria farmacêutica, como antibacteriano em produtos alimentares, já que a cinabarina pode transferir sua cor laranja para os produtos alimentares, além de ser ativa contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (SMÂNIA *et al.*, 1998).

Martins *et al.* (2008) confirmaram a utilidade da lacase na área médica, como biossensor para a determinação da quantidade de dopamina no sistema nervoso de mamíferos ao oxidar moléculas fenólicas, concomitante à redução da água em oxigênio. Gil *et al.* (2009) justificaram a produção de *P. sanguineus* como uma excelente alternativa para produção de lacase, para fins de desenvolvimento de novos biossensores utilizados em análise ambiental de compostos fenólicos.

A lacase, produzida por *P. sanguineus* e outros basidiomicetes, possui uma função importante na degradação da lignina, segundo maior biopolímero recalcitrante da natureza, atrás apenas da celulose (GARCIA, 2006). Considerando que um terço do peso seco da biomassa das florestas consiste da lignina presente na madeira, fica evidente a importância dos fungos

⁶ QUIROGA, E. N., VATTUONE, M. A.; SAMPIETRO, A. R. Purification and characterization of the invertase from *Pycnopus sanguineus*. **Biochimica and Biophysica Acta**, v.1251, p.75–80, 1995.

de decomposição branca no processo de reciclagem, já que eles são os únicos organismos eficientes na decomposição deste material, pois apresentam a capacidade de completar a mineralização dos componentes da madeira (REID, 1995; TONINI, 2004; WASSER e WEIS, 1999).

O uso de enzimas produzidas por *P. sanguineus*, tem apresentado alta eficiência e seletividade, além de reações ambientalmente saudáveis. A lacase, assim como outras enzimas, tem a capacidade de transformar compostos tóxicos em metabolitos seguros, o que torna *P. sanguineus* uma alternativa viável para reduzir a poluição ambiental (GIANFREDA *et al.*, 1999; PERALTA-ZAMORA *et al.*, 2003). Amitai *et al.* (1998) relataram o emprego de lacase, produzida por basidiomicetes, na degradação de agroquímicos. Porém ainda faz-se necessário maior estudo sobre formas eficientes aplicação, uma vez que as condições encontradas nos solos ou efluentes podem desnaturar as enzimas.

1.3.4 Controle de fitopatógenos

No setor agrícola, extratos de *P. sanguineus* têm sido usados para controle de doenças através da indução de resistência em plantas, como agente biótico eliciador.

Assi (2005) verificou que o extrato aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus* sobre *Colletotrichum lindemuthianum* em feijoeiro resultou na redução da severidade da antracnose, que pode ter ocorrido tanto por atividade antimicrobiana, através da inibição da germinação de conídios, ou por indução de resistência local ou sistêmica, medida por ativação da enzima peroxidase.

Baldo (2008), complementando os estudos com *C. lindemuthianum*, além da inibição de conídios e ativação de peroxidase, observou a ativação de fenilalanina amônia-liase e β -1,3-glucanase e a indução para formação de espécies reativas de oxigênio (peróxido de hidrogênio e superóxido), que contribuíram para a proteção do feijoeiro ao patógeno.

Pazuch (2007) observou que extratos aquosos de basidiocarpos, micélio e filtrado da cultura de *P. sanguineus* possuem atividade indutora de fitoalexinas em coltiledones de soja e em mesocótilos de sorgo. Peiter-Beninca

et al. (2008) comprovaram que os extratos orgânicos diclorometânico, hexânico e etanólico dos basidiocarpos possuem propriedades elicitoras de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo e em cotilédones de soja.

Sobre o patógeno *Pseudocercospora griseola*, causador da mancha angular no feijoeiro, Viecelli *et al.* (2009) observou que a aplicação de extrato de *P. sanguineus* reduz a severidade da doença, através da atividade antimicrobiana sobre o patógeno e indução da atividade de peroxidases e polifenoloxidasas na planta, de forma localizada e sistêmica.

Toillier *et al.* (2010) verificaram que o extrato aquoso do micélio de *P. sanguineus* estimulou o crescimento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, enquanto que extrato aquoso de basidiocarpo e de filtrado da cultura de *P. sanguineus* reduziram o crescimento da bactéria.

Apesar das promissoras utilidades dos basidiocarpos de *P. sanguineus*, as pesquisas aplicadas a agricultura são recentes e há necessidade de maiores estudos, especialmente quanto a formulações e tecnologias de aplicação que, em nível de campo, mantenham as características antibióticas eficientes.

Capítulo 2

Metodologia Empregada

2.1 Ensaio *in vitro*

2.1.1 Diâmetro de colônia e velocidade de crescimento

2.1.2 Massa fresca do micélio e teor de cinabarina

2.2 Ensaio em substrato formulado

2.2.1 Diâmetro dos basidiocarpos

2.2.2 Teor de cinabarina dos basidiocarpos

2.2.3 Massa fresca e massa seca dos basidiocarpos

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram desenvolvidos na Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), *Campus* de Marechal Cândido Rondon.

O inóculo foi produzido em meio de cultivo CBA (200 mL de caldo de batata, 15 g ágar), em placas de Petri, sendo cultivadas em duplicata durante sete dias, em BOD a $25\pm 2^\circ\text{C}$ (PAZUCH, 2007). Após o crescimento, o fungo foi repicado para placas de Petri contendo o mesmo meio, para multiplicação.

Os isolados de *P. sanguineus* foram provenientes da Micoteca do Laboratório de Fitopatologia da UNIOESTE, com identificação de município de coleta descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição do local de coleta dos isolados de *Pycnoporus sanguineus* provenientes da Micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), *Campus* de Marechal Cândido Rondon.

Isolados de <i>P. sanguineus</i>	Município de Coleta
Ps04	Cascavel - PR
Ps08	Marechal Cândido Rondon - PR
Ps13	Marechal Cândido Rondon - PR
Ps14	Cascavel - PR

Utilizou-se serragem de madeira de *Eucalyptus* sp., proveniente da Serraria Campo Grande, de Marechal Cândido Rondon. A serragem de eucalipto foi seca sob sol por cerca de 2 horas, apenas para desagregar as partículas unidas entre si pela umidade, então separada em peneiras de malha 20 sobre 32 Mesh, utilizando-se duas granulometrias: inferior que 500 micra (G1) e entre 500 e 841 micra (G2), respectivamente, referêntes às porções retidas e transpostas na segunda peneira.

As duas granulometrias foram submetidas à análise da relação carbono/nitrogênio e análise química, ambas desenvolvidas pelo Laboratório de Química Ambiental e Instrumental da UNIOESTE e determinação de açúcares redutores. Os teores de carbono orgânico total foram determinados pelo

método de Nelson e Somers (1982). O nitrogênio total determinado pelo método de Kjeldahl, descrito por Tedesco *et al.* (1995). Para determinação de açúcares redutores adicionou-se serragem de *Eucalyptus* sp. nas concentrações de zero, 1, 5, 10 e 15% a 10 mL de caldo de batata e autoclavados a 120°C e 1 atm por 20 min, sendo quantificados conforme metodologia descrita por Lever (1972).

2.1 Ensaio *in vitro*

Para o ensaio *in vitro* foram utilizados quatro isolados de *P. sanguineus* (Ps04, Ps08, Ps13 e Ps14). Os isolados foram cultivados em placas de Petri de 10 cm de diâmetro, contendo meio de cultura CBA, sendo acrescidos a este meio, serragem nas proporções de zero, 1, 5, 10 e 15%, nas granulometrias inferior a 500 micra (G1) e entre 500 e 841 micra (G2), separadamente. No centro de cada placa foi repicado um disco de 0,5 cm contendo micélio.

As placas contendo o fungo foram mantidos em ambiente escuro e climatizado a 25±2°C, até que as colônias do primeiro tratamento atingisse a borda da placa de Petri. Avaliou-se diâmetro de colônia em função do tempo, com intervalos de 24 horas entre as avaliações, velocidade de crescimento do micélio, a massa fresca do micélio e a produção do pigmento cinabarina.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x2x5, sendo quatro isolados de *P. sanguineus* (Ps04, Ps08, Ps13 e Ps14), duas granulometrias de serragem (G1 e G2) e cinco concentrações de serragem de *Eucalyptus* sp. acrescidos ao meio de cultivo (zero, 1, 5, 10 e 15%), ambos com seis repetições, totalizando 240 amostras.

Os resultados de massa fresca do micélio e teor de cinabarina foram transformados pela equação $\sqrt{x+1}$ apenas para cálculos de análise estatística. Todos os resultados foram submetidos à análise de variância (ANAVA) pelo teste T e as médias comparadas pelo teste Tukey e análise de regressão, ambos com níveis de 5% de significância, com uso do software livre SISVAR 5.3 (FERREIRA 2003).

2.1.1 Diâmetro de colônia e velocidade de crescimento

Nas placas de Petri foram desenhadas quatro raias transversais, para auxiliar as medições do crescimento radial do micélio do fungo. O disco de 0,5 cm contendo micélio foi colocado no centro de cada placa, na interposição das raias. As avaliações foram feitas com intervalos de 24 horas, onde se realizou a marcação do crescimento do micélio nas raias.

O diâmetro final foi obtido pela medição diária, com uma régua, da distância entre a periferia da colônia e o centro do disco de inoculação, sendo realizada quatro medições para cada placa, referentes às raias 1, 2, 3 e 4, até que um dos isolados atingisse a borda da placa de Petri. Com as médias das medidas de crescimento em diâmetro a cada dia, foi possível determinar a velocidade de crescimento dos quatro isolados.

O diâmetro final, em cm, e as médias do diâmetro de crescimento a cada dia, em mm dia^{-1} , foram distribuídos em uma planilha do Microsoft Office Excel 2003, sendo ajustados ao modelo de regressão polinomial de segundo grau.

2.1.2 Massa fresca do micélio e teor de cinabarina

Para determinação da massa fresca, com o auxílio de um disco, marcou-se um círculo sobre o meio CBA no centro da placa de Petri, com área de $19,64 \text{ cm}^2$, e com uma espátula efetuada a raspagem do micélio, pesando-se em balança analítica.

Esta porção foi acondicionada em tubos de ensaio com 3 mL de metanol, sendo armazenados por 72 horas a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ e, após, quantificou-se a cinabarina por espectrofotometria a 258 nm.

Os resultados de massa fresca foram divididos por 19,64, referentes à área onde se coletou o micélio. Os resultados de absorbância foram transformados pela equação $y = 0,7018x - 0,0077$, segundo Baumer (2009), divididos pela massa fresca do micélio e multiplicados por 3, referentes a alíquota de metanol. Na equação, o valor de "x" representa a absorbância

obtida pela leitura em espectrofotômetro ($\lambda=258$ nm), enquanto “y” representa o teor de cinabarina.

Os valores de massa fresca do micélio, em mg cm^{-2} , e teor de cinabarina, em mg mL^{-1} , foram distribuídos em uma planilha do Microsoft Office Excel 2003, sendo ajustados ao modelo de regressão polinomial de segundo grau.

2.2 Ensaio em substrato formulado

Para o ensaio em substrato formulado foram utilizados dois isolados de *P. sanguineus* (Ps08 e Ps14), selecionados dos quatro isolados do ensaio *in vitro*.

Os isolados foram cultivados em sacos de polipropileno de 28x16 cm, contendo serragem de *Eucalyptus* sp. e farelo de arroz, nas proporções de zero, 5 e 20%, nas granulometrias inferior a 500 micra (G1) e entre 500 e 841 micra (G2), separadamente, com umidade de 75% e compactados a $0,5 \text{ g mL}^{-1}$. Para a compactação, os sacos de polipropileno eram colocados dentro de um Becker de 600 mL e a mistura serragem+farelo+água, que somava 210 g, era compactados até o volume de 425 mL. Em cada saco de polipropileno foram repicados três discos de 0,5 cm, contendo micélio, distribuídos de forma eqüidistantes sobre o substrato.

Os substratos contendo *P. sanguineus* permaneceram 30 dias em BOD a $25\pm 2^\circ\text{C}$ sem fotoperíodo, para que o micélio do fungo crescesse sobre a serragem, quando então se realizaram oito cortes superficiais, distribuídos equitativamente na circunferência do saco de polipropileno, a fim de proporcionar o crescimento dos basidiocarpos para o exterior dos sacos.

Os sacos de polipropileno foram levados a casa de vegetação com ambiente climatizado, temperatura de $25\pm 5^\circ\text{C}$ e oito irrigações diárias de 2 minutos cada, permanecendo por 90 dias, até a realização da primeira coleta dos basidiocarpos. A segunda coleta dos basidiocarpos ocorreu após 180 dias do ensaio em casa de vegetação. A cada coleta avaliou-se o diâmetro, a massa fresca e massa seca, o número médio de basidiocarpos e a produção

do pigmento cinabarina.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2x3, sendo dois isolados de *P. sanguineus* (Ps08 e Ps14), duas granulometrias de serragem de *Eucalyptus* sp. (G1 e G2) e três concentrações de farelo de arroz adicionadas a serragem (zero, 5 e 20%), ambos com seis repetições, totalizando 72 amostras.

Todos os resultados foram transformados pela equação $\sqrt{x+1}$ e submetidos à análise de variância (ANAVA) pelo teste T. As médias foram comparadas pelo teste Tukey e análise de regressão, ambos com níveis de 5% de significância, com uso do software livre SISVAR 5.3 (FERREIRA 2003).

2.2.1 Diâmetro dos basidiocarpos

O diâmetro dos basidiocarpos foi avaliado com auxílio de um paquímetro com medições no sentido do maior comprimento perpendicular à base do basidiocarpo, conforme representação da Figura 3.

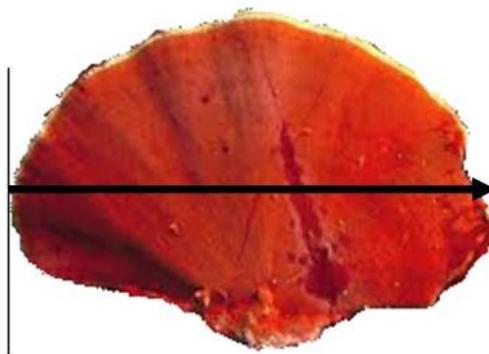


Figura 3. Esquema ilustrativo mostrando a avaliação do diâmetro dos basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*. Martinazzo-Portz, 2011.

Os diâmetros dos basidiocarpos, em cm, foram distribuídos em uma planilha do Microsoft Office Excel 2003, sendo ajustados ao modelo regressão polinomial de segundo grau.

2.2.2 Massa fresca e massa seca dos basidiocarpos

A massa fresca foi avaliada coletando os basidiocarpos, e pesando-os individualmente em balança analítica. Para a massa seca foi realizada a secagem dos basidiocarpos em estufa com circulação forçada a 60°C por 48 horas, então se pesou individualmente em balança analítica.

Os valores de massa fresca e massa seca dos basidiocarpos, em mg, foram ajustados ao modelo regressão polinomial de segundo grau.

2.2.3 Teor de cinabarina dos basidiocarpos

Para avaliação do teor de cinabarina, coletou-se aleatoriamente uma alíquota de massa conhecida dos basidiocarpos, sendo esta porção acondicionada em tubos de ensaio com 3 mL de metanol e armazenados por 72 horas a $4\pm 2^\circ\text{C}$, realizando-se seis amostras por tratamento. Após este período quantificou-se a cinabarina por espectrofotometria a 258 nm. Os resultados de absorvância foram transformados pela equação $y = 0,7018x - 0,0077$ (BAUMER, 2009), divididos pela massa seca dos basidiocarpos e multiplicados por 3, referentes a alíquota de metanol. Na equação, o valor de “x” representa a absorvância obtida pela leitura em espectrofotômetro ($\lambda=258$ nm), enquanto “y” representa o teor de cinabarina.

Os valores para concentração de cinabarina, em mg mL^{-1} , foram ajustados ao modelo regressão polinomial de segundo grau.

Capítulo 3

Resultados e Discussão

3.1 Ensaio *in vitro*

3.1.1 Diâmetro final de micélio

3.1.2 Velocidade de crescimento do micélio

3.1.3 Massa do micélio

3.1.4 Teor de cinabarina

3.2 Ensaio em substrato formulado

3.2.1 Diâmetro de basidiocarpos

3.2.2 Massa fresca dos basidiocarpos

3.2.3 Massa seca dos basidiocarpos

3.2.4 Teor de cinabarina dos basidiocarpos

3.2.5 Número médio de basidiocarpos

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise da relação carbono/nitrogênio e análise química, desenvolvidas pelo Laboratório de Química Ambiental e Instrumental da UNIOESTE, estão representados na Tabela 2.

Tabela 2. Teores de nitrogênio total, carbono orgânico e da análise química da serragem de *Eucalyptus* sp. desenvolvido pelo Laboratório de Química Ambiental e Instrumental da UNIOESTE, Marechal Cândido Rondon – PR.

Amostra	N ¹ P K			Cu Zn Mn Fe				C ²	Relação C/N
	g kg ⁻¹			mg kg ⁻¹				%	
Inferior a 500 micra	1,75	0,16	1,05	5,00	6,00	82,00	911,00	45,88	262/1
500 - 841 micra	1,75	0,09	0,90	2,00	5,00	66,00	690,00	42,88	245/1

¹ Nitrogênio total. ² Carbono orgânico.

A produção e a atividade enzimática no processo de degradação das madeiras por fungos de decomposição branca são dependentes de fatores nutricionais do substrato, e o de maior relevância é a relação carbono/nitrogênio (VANCE e CHAPIN, 2001). Neste ensaio, a relação carbono/nitrogênio da serragem de *Eucalyptus* sp. apresentou o valor de 262:1 para a granulometria inferior a 500 micra (G1) e, 245:1 para a granulometria de 500 a 841 micra (G2).

Os resultados da determinação de açúcares redutores, pela metodologia proposta por Lever (1972), estão representados na Figura 4. Os valores, em µg de açúcares redutores por mL de caldo de batata, acrescido de serragem de *Eucalyptus* sp., variaram de 0,67 a 0,9 µg mL⁻¹ para as duas granulometrias de serragem, sendo semelhantes para todas as concentrações de serragem. Dessa forma, não foi possível correlacionar teor de açúcares redutores encontrados no substrato, com diferenças no desenvolvimento do micélio de *P. sanguineus*.

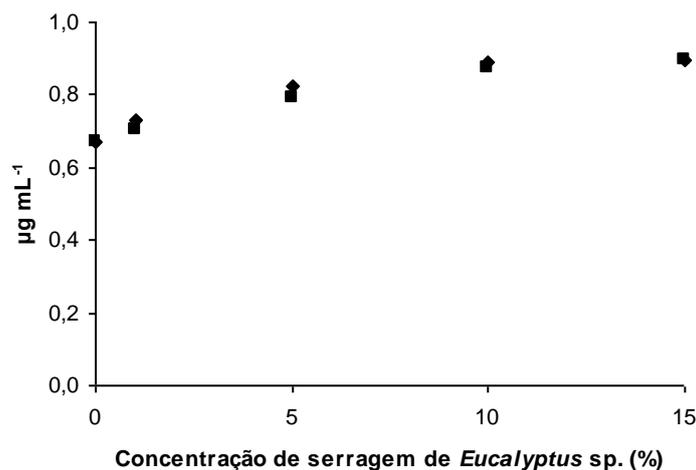


Figura 4. Determinação de açúcares redutores ($\mu\text{g mL}^{-1}$) do caldo de batata acrescido de serragem de *Eucalyptus* sp. nas concentrações de zero, 1, 5, 10 e 15% determinados pelo método descrito por Lever (1972). Valores transformados pela equação $y = 0,0306 + 0,0244x$. Pontos (♦) referem-se à granulometria inferior a 500 micra e pontos (■) referem-se à granulometria entre 500 e 841 micra.

3.1 Ensaio *in vitro*

As ilustrações referentes ao ensaio *in vitro*, dos isolados Ps 04, Ps 08, Ps 13 e Ps 14, estão demonstradas no anexo 1.

3.1.1 Diâmetro final de micélio

O período de avaliação do diâmetro da colônia compreendeu oito dias. No cultivo *in vitro* de *P. sanguineus*, observou-se que o meio CBA, acrescido de serragem de *Eucalyptus* sp., com granulometria inferior a 500 micra (G1), proporcionou diâmetro final significativamente superior que a granulometria entre 500 e 841 micra (G2), para todos os isolados.

Considerando a média de ambas granulometrias, o isolado Ps14 apresentou maior diâmetro médio que os demais isolados, com 3,41 cm, e o isolado Ps04 o menor, com diâmetro de 2,97 cm (Tabela 3). Nas diferentes concentrações de serragem adicionadas ao meio CBA (Figura 5), para todos os isolados, observou-se na granulometria inferior a 500 micra, uma tendência de

maior diâmetro entre as concentrações 5 e 10%. Para a granulometria entre 500 e 841 micra, o diâmetro final tendeu a aumentar nas concentrações de 10 e 15%, sendo inferior nas porcentagens de 1 e 5%. Ambas granulometrias apresentaram ajuste de curva polinomial, em equação de segundo grau.

Tabela 3. Diâmetro final (cm) *in vitro* dos isolados de *Pycnoporus sanguineus* em diferentes granulometrias de serragem de *Eucalyptus* sp. adicionada ao meio de cultura.

Isolados de <i>P. sanguineus</i>	Diâmetro Final (cm)		
	Granulometria		Médias dos isolados
	< 500 micra	500 - 841 micra	
Ps04	3,58 c A	2,35 b B	2,97 c
Ps08	4,09 a A	2,10 c B	3,10 b
Ps13	3,77 b A	2,38 b B	3,07 bc
Ps14	4,22 a A	2,59 a B	3,41 a
Médias das granulometrias	3,91 A	2,36 B	

CV: 8,21%

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O diâmetro final de *P. sanguineus* em placas de Petri, atingido depois de 8 dias de incubação, foi semelhante ao observado por Wille (2007), quando observou o crescimento em meio de cultivo a base de serragem de *Eucalyptus grandis* e *Acácia meansii* e, superior ao encontrado por Silva *et al.* (2010), que observaram a colonização total do meio de cultivo, enriquecido com serragem de diferentes clones de eucalipto, em três dias.

A estrutura física da serragem de *Eucalyptus* sp. proporcionou desenvolvimento mais acelerado dos isolados no meio de cultivo acrescido de serragem na G1, com tendência a maior diâmetro entre as concentrações de 5 e 10%. Resultado contrário foi observado na G2, uma vez as concentrações de 1 e 5% apresentaram os menores valores, havendo incremento de diâmetro final nas concentrações 10 e 15%, porém, ainda significativamente inferior a G1. Possivelmente, as partículas de serragem menores propiciaram ao meio de cultivo características que deram ao fungo maior capacidade de expansão, enquanto as partículas maiores permitiram ao *P. sanguineus* formação de maior massa micelial, como será observado adiante.

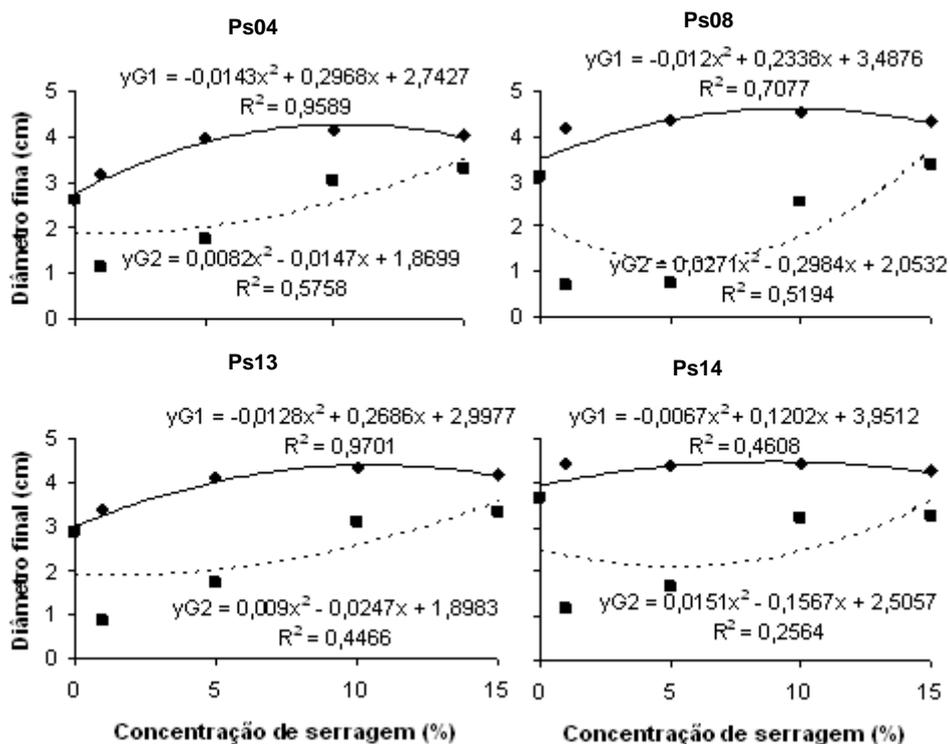


Figura 5. Diâmetro final (cm) *in vitro* de colônias dos isolados de *Pycnoporus sanguineus* (isolados Ps04, Ps08, Ps13 e Ps14) em relação à concentração de serragem de *Eucalyptus* sp. adicionada ao meio de cultura. Pontos (◆) com linha contínua referem-se à granulometria inferior a 500 micra e pontos (■) com linha tracejada referem-se à granulometria entre 500 e 841 micra.

Segundo afirma Mata *et al.* (2001), a capacidade do fungo colonizar e produzir basidiocarpos em substratos lignocelulósicos está relacionada com o vigor do micélio e com a capacidade de ativar mecanismos fisiológicos, necessários para utilizar os nutrientes do meio de cultura. Entretanto, não é possível afirmar que a granulometria inferior a 500 micra seja a mais adequada para a formulação de substratos a base de serragem, uma vez que fatores nutricionais e ambientais, aqui não inferidos, são responsáveis por características importantes do desenvolvimento de *P. sanguineus*.

3.1.2 Velocidade de crescimento do micélio

Os resultados médios de velocidade de crescimento do micélio de *P. sanguineus* (Tabela 4), apontam que a G1 foi significativamente superior a G2. Para a G1, os isolados Ps14 e Ps08 diferiram estatisticamente (Tukey, $p < 0,05$)

dos demais, com 5,09 mm dia⁻¹ e 4,83 mm dia⁻¹, respectivamente, enquanto na G2, apenas o isolado Ps08 apresentou diferença significativa, com 3,26 mm dia⁻¹.

Tabela 4. Velocidade de crescimento (mm dia⁻¹) *in vitro* dos isolados de *Pycnoporus sanguineus* em diferentes granulometrias de serragem de *Eucalyptus* sp. adicionada ao meio de cultura.

Isolados <i>P. sanguineus</i>	Velocidade de Crescimento (mm dia ⁻¹)			Médias dos isolados
	Granulometria			
	< 500 micra	500 - 841 micra		
Ps04	4,06 c A	2,86 b B	3,46 c	
Ps08	4,83 a A	3,00 b B	3,91 b	
Ps13	4,20 b A	2,91 b B	3,56 c	
Ps14	5,09 a A	3,26 a B	4,17 a	
Médias das granulometrias	4,54 A	3,01 B		

CV: 10,38%

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Em diferentes concentrações de serragem adicionadas ao meio de cultivo, os resultados de velocidade de crescimento (Figura 6) mostraram tendência semelhante ao diâmetro final. O ajuste das curvas foi polinomial com equações de segundo grau. A velocidade de crescimento do micélio variou de 1,86 mm dia⁻¹, para o isolado Ps08, a 5,57 mm dia⁻¹, para o mesmo isolado.

A velocidade de crescimento está intimamente ligada a diversos fatores, como pH, temperatura, luminosidade, relação carbono/nitrogênio e disponibilidade de nutrientes (ALEXOPOULOS *et al.* 1996). Silva *et al.* (2010) observaram velocidade média de crescimento de *P. sanguineus* de 12,8 mm dia⁻¹, ou seja, a observada no isolado Ps14, com 4,17 mm dia⁻¹, foi 68% inferior, porém, os autores não avaliaram as relações de carbono/nitrogênio nas amostras de eucalipto.

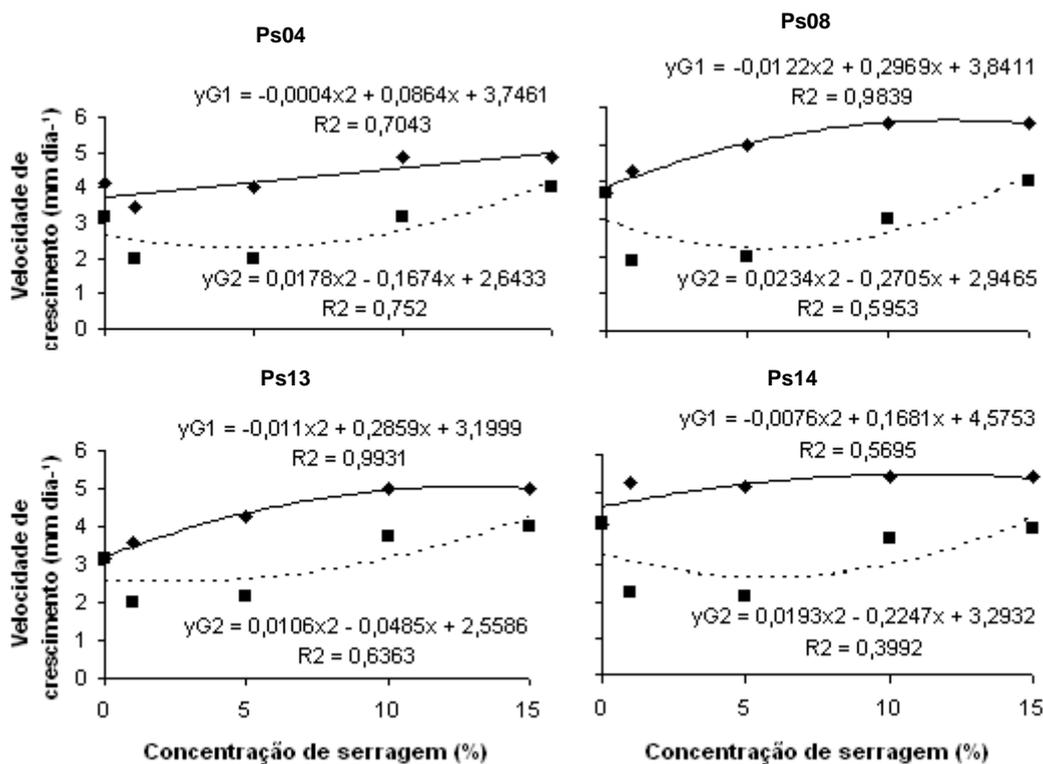


Figura 6. Velocidade de crescimento (mm dia^{-1}) *in vitro* dos isolados de *Pycnoporus sanguineus* (isolados Ps04, Ps08, Ps13 e Ps14) em relação à concentração de serragem de *Eucalyptus* sp. adicionada ao meio de cultura. Pontos (♦) com linha contínua referem-se à granulometria inferior a 500 micra e pontos (■) com linha tracejada referem-se à granulometria entre 500 e 841 micra.

Pointing *et al.* (2000) indicaram que altos níveis de carbono e baixos níveis de nitrogênio, presentes no meio, proporcionam a *P. sanguineus* maior produção de lacase, enzima que atribui aos fungos a capacidade de desestabilizar a estrutura da lignina (BONFÁ *et al.* 2003). As relações de carbono/nitrogênio encontradas nas amostras de serragem de *Eucalyptus* sp. neste ensaio, foram superiores a encontrada por Abreu *et al.* (2007) de 103:1, ao estudar a degradação da madeira de *Eucalyptus* sp. por basidiomicetos de podridão branca.

Castro e Silva *et al.* (2006) afirmam que em meio de cultivo contendo material lignocelulósico, *P. sanguineus* é capaz de produzir fenoloxidase, peroxidase e lacase. A baixa concentração de nitrogênio no substrato é pré-requisito para produção de lacase e degradação da lignina, por ser um elemento crítico para microrganismos, uma vez que participa da composição das proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos, enzimas e co-enzimas necessárias para o crescimento celular (GIANFREDA *et al.* 1999, TUOMELA *et*

al. 2000). Provavelmente componentes solúveis estejam relacionados à maior velocidade de crescimento micelial na granulometria inferior a 500 micra, no entanto, para comprovação desta hipótese, seriam necessários estudos enzimáticos.

3.1.3 Massa do micélio

O peso médio de micélio (Tabela 5) foi superior na G2, com 2,24 mg cm⁻², em relação a granulometria inferior a 500 micra, com 1,75 mg cm⁻². Em ambas granulometrias, os isolados Ps08 e Ps13 apresentaram massa superior aos demais, com médias de 2,21 mg cm⁻² e 2,37 mg cm⁻², respectivamente.

Tabela 5. Massa do micélio (mg cm⁻²) *in vitro* dos isolados de *Pycnoporus sanguineus* em diferentes granulometrias de serragem de *Eucalyptus* sp. adicionada ao meio de cultura.

Isolados <i>P. sanguineus</i>	Massa do micélio (mg cm ⁻²)		
	Granulometrias		Médias dos isolados
	< 500 micra	500 - 841 micra	
Ps04	1,51 c A	1,86 b B	1,68 b
Ps08	1,84 abA	2,58 a B	2,21 a
Ps13	2,15 a A	2,59 a B	2,37 a
Ps14	1,52 bcA	1,94 b B	1,73 b
Médias das granulometrias	1,75 A	2,24 B	

CV: 24,44%

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Nas diferentes concentrações de serragem (Figura 7), na G1, as médias dos isolados não diferiram estatisticamente entre si, pelo teste T ($p < 0,05$). Para a G2, houve um acréscimo contínuo nas concentrações 5, 10 e 15%, sendo que o isolado Ps08 apresentou maior massa do micélio entre os isolados observados.

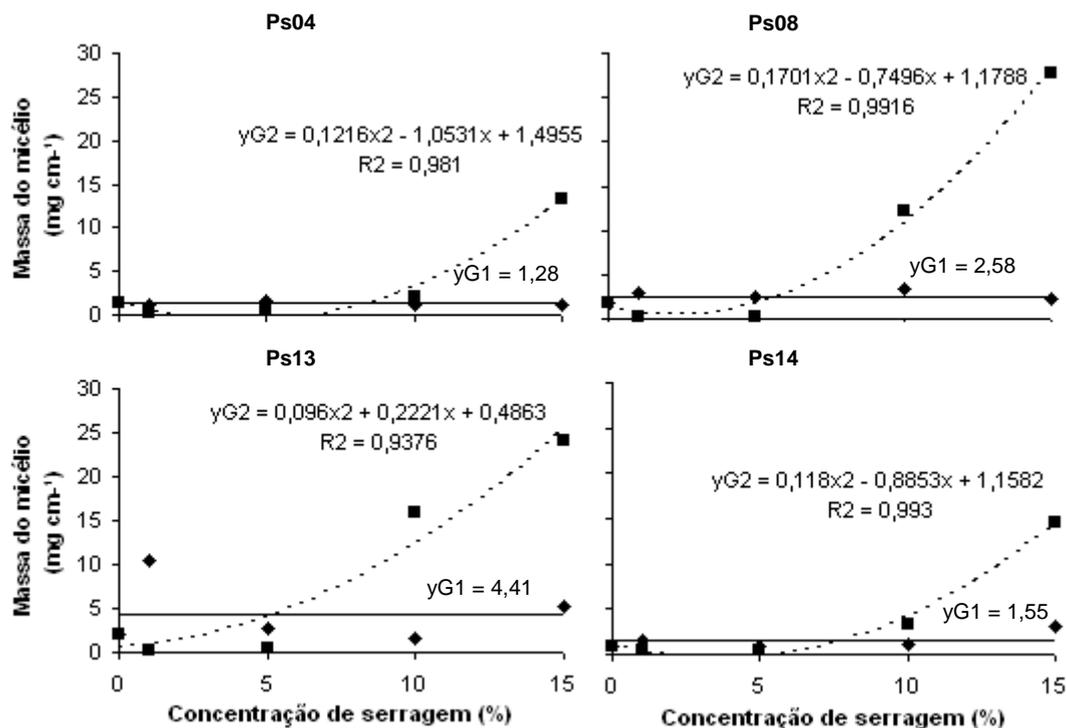


Figura 7. Massa do micélio (mg cm^{-1}) *in vitro* dos isolados de *Pycnoporus sanguineus* (isolados Ps04, Ps08, Ps13 e Ps14) em relação à concentração de serragem de *Eucalyptus* sp. adicionada ao meio de cultura. Pontos (◆) com linha contínua referem-se à granulometria inferior a 500 micra e pontos (■) com linha tracejada referem-se à granulometria entre 500 e 841 micra.

A massa do micélio apresentou ajuste de curva polinomial com equação de segundo grau. O coeficiente de determinação (R^2) mínimo das amostras foi 0,931, mostrando ajuste satisfatório dos dados obtidos pelo ensaio.

O crescimento radial reflete a exploração do substrato, enquanto que a produção de biomassa é uma medida do acúmulo de carbono e nutrientes (JONGBLOED e BORST-PAUWELS, 1990). A massa do micélio apresentou tendência contrária aos resultados encontrados para diâmetro final e velocidade de crescimento, de forma que diferenças estatísticas puderam ser notadas apenas na G2. Nesta granulometria, a produção de massa foi maior nos isolados Ps08 e Ps13. Este resultado pode ser explicado pelo fato desta granulometria ter apresentado menor diâmetro final, sendo que a densidade do isolado no meio de cultivo tendeu a aumentar, resultando em maior massa fúngica, uma vez que a velocidade de crescimento micelial é inversamente correlacionada com a densidade do micélio (WU *et al.*, 2004; MARINO, 2007).

Fato semelhante também foi verificado por Silva *et al.* (2010), que observaram o crescimento de *P. sanguineus* e outros fungos de podridão branca em clones de eucalipto.

Para Gutierrez *et al.* (1995) a formação de um micélio adensado pode ser decorrência de liberação de substâncias que estimulem o crescimento micelial. Os autores citam que durante a fase de crescimento, *Pycnoporus cinnabarinus* liberou polissacarídeos relacionados ao aumento da densidade micelial, que poderiam contribuir para resistência do fungo em condições de campo. Neste sentido, é necessário um estudo mais profundo de determinação bioquímica das substâncias liberadas por *P. sanguineus*, durante o crescimento fúngico.

3.1.4 Teor de cinabarina

O teor de cinabarina, produzido pelos isolados de *P. sanguineus*, apresentou média significativamente superior (Tukey, $p < 0,05$) na G2, com $1,32 \text{ mg mL}^{-1}$, comparativamente a G1, com $0,83 \text{ mg mL}^{-1}$ (Tabela 6). Entre as médias gerais dos isolados, o Ps14 e Ps13, com $1,44$ e $1,23 \text{ mg mL}^{-1}$, respectivamente, foram significativamente superiores aos isolados Ps04 ($0,94 \text{ mg mL}^{-1}$) e Ps08 ($0,69 \text{ mg mL}^{-1}$).

Tabela 6. Teor de cinabarina (mg mL^{-1}) *in vitro* dos isolados de *Pycnoporus sanguineus* em diferentes granulometrias de serragem de *Eucalyptus* sp. adicionada ao meio de cultura.

Isolados <i>P. sanguineus</i>	Teor de Cinabarina (mg mL^{-1})		
	Granulometrias		Médias dos isolados
	< 500 micra	500 - 841 micra	
Ps04	0,77 b B	1,11 ab A	0,94 b
Ps08	0,54 b A	0,84 b A	0,69 b
Ps13	0,51 b B	1,94 a A	1,23 a
Ps14	1,49 a A	1,38 ab B	1,44 a
Médias das granulometrias	0,83 B	1,32 A	

CV: 13,67%

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Nas diferentes concentrações de serragem adicionadas ao meio de

cultivo (Figura 8), o teor de cinabarina apresentou diferença estatística significativa apenas para a G2, cujos resultados variaram entre os isolados com valor máximo de até $3,82 \text{ mg mL}^{-1}$ para Ps13. Em todos os isolados houve um acréscimo contínuo no teor de cinabarina a partir da concentração 5%, na G2.

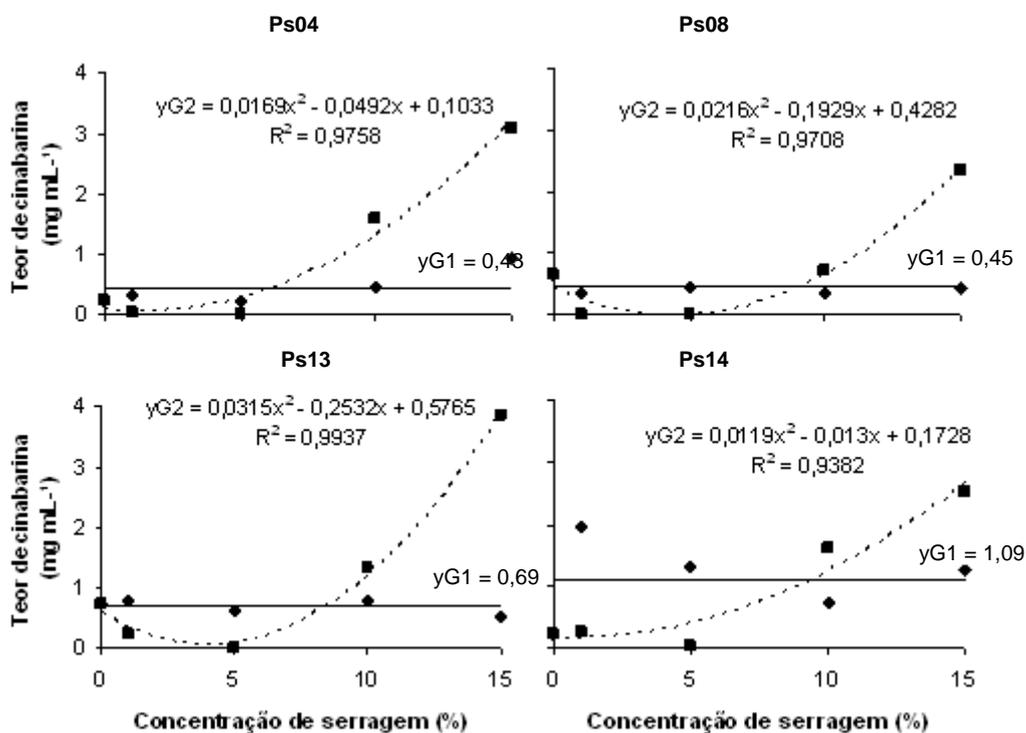


Figura 8. Teor de cinabarina (mg mL^{-1}) *in vitro* de micélio dos isolados de *Pycnoporus sanguineus* (isolados Ps04, Ps08, Ps13 e Ps14) em relação à concentração de serragem de *Eucalyptus* sp. adicionada ao meio de cultura. Pontos (♦) com linha contínua referem-se à granulometria inferior a 500 micra e pontos (■) com linha tracejada referem-se à granulometria entre 500 e 841 micra.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que, a granulometria de serragem G2, apresentou teor de cinabarina e produção de massa do micélio, proporcionalmente superiores a granulometria inferior a 500 micra. Isso contraria os resultados obtidos por Baumer (2009) e Smânia Jr. *et al.* (1995) que afirmam não haver há relação direta entre a produção de biomassa fúngica e a produção de cinabarina.

A produção de metabólitos secundários possui grande dependência das fontes de carbono e nitrogênio (RAMOS, 2008⁷, citado por BAUMER, 2009). Para alguns fungos, o complexo enzimático é estimulado pela deficiência de nitrogênio em relação ao carbono, enquanto que em outros ocorre inibição (ZAFAR *et al.*, 1996).

De um modo geral, teores altos de N no substrato estimulam o crescimento micelial (PHILIPPOUSSIS *et al.*, 2001), porém o excesso de N orgânico pode inibir a síntese de enzimas (BISARIA *et al.*, 1997). Neste sentido, a maior síntese de cinabarina da G2 pode ser justificada por uma relação carbono/nitrogênio menor que a G1. Entretanto, pode-se inferir que fatores nutricionais, aqui não avaliados, estejam mais relacionados a síntese de cinabarina que fatores físicos, servindo de hipótese para futuros estudos.

3.2 Ensaio em substrato formulado

Com base nos resultados do ensaio *in vitro*, selecionaram-se dois isolados para execução do ensaio em substrato formulado. O isolado Ps14 apresentou melhor valor médio para a maioria dos parâmetros avaliados, assim inferiu-se que os resultados em substrato formulado também seriam satisfatórios. O isolado Ps08 apresentou boa produção de biomassa fúngica, entretanto baixa produção de cinabarina. Neste sentido, buscou-se selecionar dois extremos de resultados entre os isolados, a fim de observar se as condições de cultivo *in vitro* são passíveis de extrapolação para resultados semelhantes em ensaios em substrato formulado.

As ilustrações referentes ao ensaio em substrato formulado, dos isolados Ps08 e Ps14, estão demonstradas nos anexos 2.

⁷ RAMOS, H. P. **Otimização das condições de cultivo do fungo endofítico *Arthrinium state of Apiospora montagnei* Sacc. para produção de metabólitos secundários com atividades biológicas.** 60 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

3.2.1 Diâmetro de basidiocarpos

O diâmetro médio dos basidiocarpos (Tabela 7) está dividido em duas coletas distintas.

Para a primeira coleta, os resultados dos isolados de *P. sanguineus* não apresentaram diferença estatística significativa (Tukey, $p < 0,05$) entre a granulometria G1 e G2. Entretanto, na média dos isolados, o Ps08 apresentou diâmetro médio de basidiocarpos superior ao isolado Ps14, com 8,27 e 3,34 mm, respectivamente.

Para a segunda coleta, as granulometrias apresentaram diferença estatística (Tukey, $p < 0,05$) apenas para o isolado Ps14, com 14,65 mm na G1 e 8,56 na G2. Na média dos isolados, o Ps08, com 36,99 mm, foi superior ao isolado Ps14, com 11,60 mm de diâmetro médio de basidiocarpos.

Tabela 7. Diâmetro médio dos basidiocarpos (mm) em substrato formulado dos isolados de *Pycnoporus sanguineus* em diferentes granulometrias de serragem de *Eucalyptus* sp. adicionada ao substrato formulado, para a primeira e a segunda coleta de basidiocarpos.

Isolados <i>P. sanguineus</i>	Diâmetro médio dos basidiocarpos (mm)					
	Primeira coleta			Segunda coleta		
	Granulometrias		Médias dos isolados	Granulometrias		Médias dos isolados
< 500 micra	500 - 841 micra	< 500 micra		500 - 841 micra		
Ps08	7,53 a A	9,01 a A	8,27 a	38,50 a A	35,47 a A	36,99 a
Ps14	3,41 b A	3,28 b A	3,34 b	14,65 b A	8,56 b B	11,60 b
Médias das granulometrias	5,47 A	6,15 A		26,58 A	22,02 A	
	CV*: 16,34%			CV*: 18,08%		

*Coeficiente de variação calculado pela transformação de $\sqrt{x+1}$.

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Para o diâmetro de basidiocarpos em função das diferentes concentrações de farelo adicionados a serragem de *Eucalyptus* sp. (Figura 9), a diferença estatística significativa (Teste T, $p < 0,05$) foi verificada apenas para a primeira coleta de basidiocarpos, para ambas as granulometrias para o isolado Ps08 e apenas para a G1 no isolado Ps14. Nas duas coletas o isolado Ps08 apresentou maior diâmetro médio de basidiocarpos que o isolado Ps14.

A composição do substrato e a adaptação dos isolados ao substrato influenciam o vigor e a velocidade de crescimento dos

basidiocarpos (RAGUNATHAN *et al.*, 1996). A adaptação dos microrganismos aos meios de cultivo ocorre em função da disponibilidade de nutrientes e do potencial genético (MARINO, 2007). O menor diâmetro médio final de basidiocarpos no isolado Ps14, em comparação ao Ps08, pode ser resultado de um menor vigor de desenvolvimento frente a adaptação do isolado ao substrato, assim como capacidade genética de crescimento de basidiocarpos diante dos fatores nutricionais.

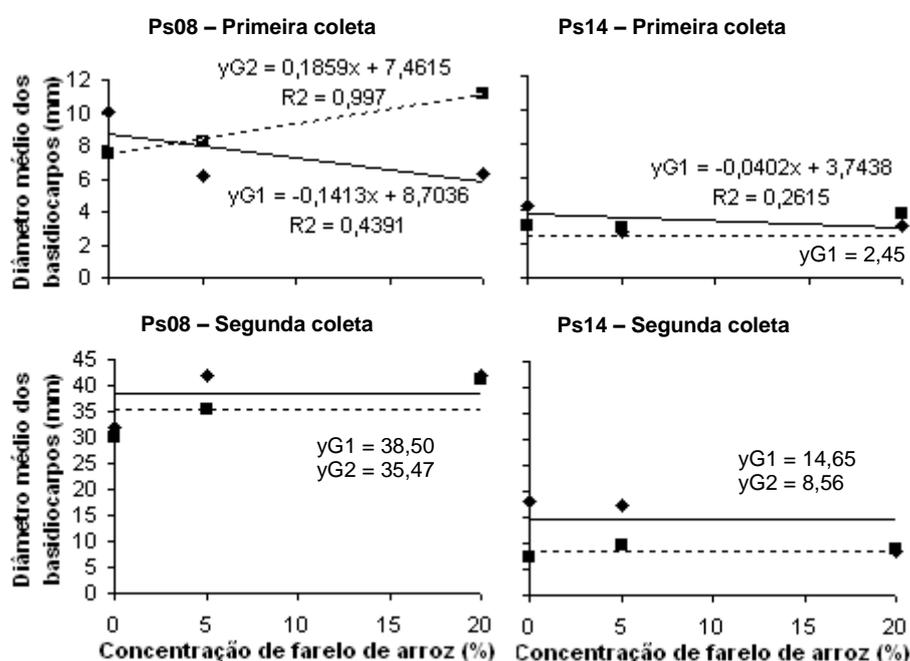


Figura 9. Diâmetro médio dos basidiocarpos (mm) dos isolados de *Pycnoporus sanguineus* (isolados Ps08 e Ps14) em relação à concentração de farelo de arroz adicionado a serragem de *Eucalyptus* sp. para cultivo em substrato formulado referentes a primeira e segunda coleta de basidiocarpos. Pontos (♦) com linha contínua referem-se à granulometria inferior a 500 micra e pontos (■) com linha tracejada referem-se à granulometria entre 500 e 841 micra.

A suplementação do substrato de cultivo com fontes de N, neste caso o farelo de arroz, promove melhor taxa de crescimento micelial do fungo, como conseqüência há uma melhora na eficiência biológica do fungo (SALES-CAMPOS *et al.*, 2008).

Neste ensaio, a suplementação com farelo de arroz influenciou o tamanho final dos basidiocarpos apenas para a G2 na primeira coleta do isolado Ps08. Para a granulometria G1 na primeira coleta, a suplementação

apresentou resultados negativos no diâmetro médio de basidiocarpos. Para a segunda coleta, a suplementação com farelo de arroz não influenciou no diâmetro médio final de basidiocarpos de *P. sanguineus*.

3.2.2 Massa fresca dos basidiocarpos

A massa fresca dos basidiocarpos para as duas coletas estão descritos na Tabela 8. Os resultados expressam que, em ambas as coletas, o isolado Ps08 apresentou média geral dos isolados significativamente superior (Tukey, $p < 0,05$) ao isolado Ps14, com 64,61 e 568,47 mg para o isolado Ps08 e, 3,26 e 63,45 mg para o isolado Ps14, na primeira e segunda coleta, respectivamente.

Nas médias das granulometrias, somente foi verificada diferença estatística significativa na massa fresca dos basidiocarpos da segunda coleta, sendo que para o substrato com G1 a massa fresca foi superior em comparação a massa fresca de basidiocarpos produzidos em substrato com G2. As médias da primeira coleta foram cerca de 75% inferiores as médias da segunda coleta.

Tabela 8. Massa fresca dos basidiocarpos (mg) dos isolados de *Pycnoporus sanguineus* em diferentes granulometrias de serragem de *Eucalyptus* sp. adicionada ao substrato formulado, para as duas coletas de basidiocarpos

Isolados <i>P. sanguineus</i>	Massa fresca dos basidiocarpos (mg)					
	Primeira coleta			Segunda coleta		
	Granulometrias		Médias dos isolados	Granulometrias		Médias dos isolados
< 500 micra	500 - 841 micra	< 500 micra		500 - 841 micra		
Ps08	58,27 a A	70,94 a A	64,61 a	652,28 a A	484,66 a B	568,47 a
Ps14	3,37 b A	3,15 b A	3,26 b	84,48 b A	42,42 b A	63,45 b
Médias das granulometrias	30,82 A	37,05 A		368,38 A	236,54 B	
	CV*: 49,38%			CV*: 32,93%		

*Coeficiente de variação calculado pela transformação de $\sqrt{x+1}$.

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Os resultados de massa fresca dos basidiocarpos em função das diferentes concentrações de farelo adicionados a serragem de *Eucalyptus* sp.

estão apresentados na Figura 10. Os valores não tiveram diferença estatística significativa (Teste T, $p < 0,05$), com exceção os tratamentos com G1 para o isolado Ps08 na primeira coleta. Para este, a curva de ajuste da massa fresca foi negativa, semelhantemente ao diâmetro final dos basidiocarpos, de forma que, com o maior incremento de farelo de arroz junto a serragem de *Eucalyptus* sp., os valores médios de massa fresca tenderam a reduzir.

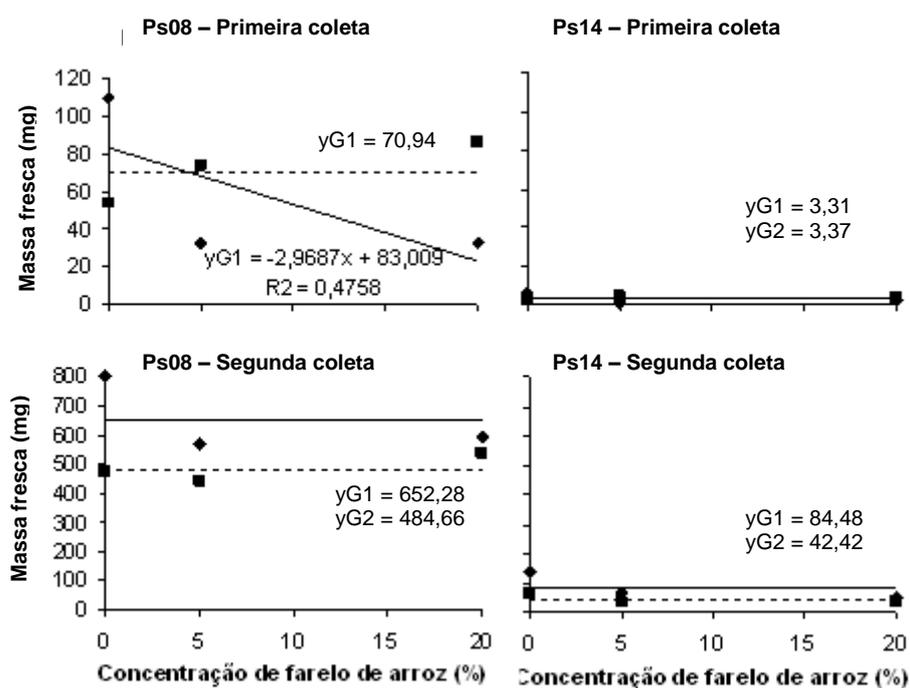


Figura 10. Massa fresca média dos basidiocarpos (mg) dos isolados de *Pycnoporus sanguineus* (isolados Ps08 e Ps14) em relação à concentração de farelo de arroz adicionado a serragem de *Eucalyptus* sp. para cultivo em substrato formulado referentes a primeira e segunda coleta de basidiocarpos. Pontos (♦) com linha contínua referem-se à granulometria inferior a 500 micra e pontos (■) com linha tracejada referem-se à granulometria entre 500 e 841 micra.

Philippoussis *et al.* (2003) afirmam que a porosidade do substrato influencia na taxa de resposta de crescimento dos fungos, devido a variações na oxigenação. Ohga⁸ (1990) citado por Royse *et al.* (2002) ao observar o crescimento do fungo *Lentinula edodes*, considerou que partículas de menor tamanho causam um esgotamento de oxigênio no substrato, em decorrência disso, há menor desenvolvimento de biomassa micelial e o crescimento de basidiocarpos torna-se mais demorado. Na avaliação da massa fresca dos basidiocarpos, pode-se afirmar que as partículas menores da serragem de

⁸ OHGA, S. Growth rate of mycelium of shiitake, *Lentinus edodes*, in relation to water potential of medium. *J Fac Agric Kyushu Univ*, v.34, p.413-420. 1990.

Eucalyptus sp., da G1, não prejudicaram o desenvolvimento de *P. sanguineus*.

O tamanho dos poros presentes no substrato pode ser influenciado pela escolha do coadjuvante, sendo o farelo de arroz muito utilizado na suplementação de substratos (SINGH, 2000), de forma que a adição de farelos a serragens de madeira tem sido relatada como fonte de nutrientes indispensáveis a desenvolvimento fúngico (ROYSE, 1996⁹ citado por PEDRA e MARINO, 2007).

Neste contexto, a mistura de farelo de arroz a serragem de *Eucalyptus* sp. visava um acréscimo na produção de basidiocarpos. Entretanto, a G1, para o isolado Ps08, na primeira coleta, produziu basidiocarpos menores e com menor massa fresca, enquanto os demais tratamentos não apresentaram incremento significativo. Mantovani (2008), estudando os basidiomicetos *Pleurotus* sp e *Lentinula edodes*, observou crescimento inferior destes fungos lignocelulósicos nos meios de cultivo com adição de farelo de arroz.

Neste caso, presume-se que a adição de farelo de arroz a serragem de *Eucalyptus* sp. atuou como “agente cimentante”, tornando a G1 menos porosa e atrasando o desenvolvimento biológico do isolado Ps 08. Provavelmente, na segunda colheita, a maior decomposição da serragem alterou a compactação do substrato, disponibilizando nutrientes, aumentando a oxigenação e proporcionando maior desenvolvimento da massa fresca dos basidiocarpos.

3.2.3 Massa seca dos basidiocarpos

Os resultados de massa seca dos basidiocarpos de *P. sanguineus*, produzidos nas granulometrias G1 e G2, com duas coletas, estão especificados na Tabela 9.

Na primeira coleta de basidiocarpos, as médias da massa seca das granulometrias não apresentaram diferença estatística significativa (Tukey, $p < 0,05$), com valores de 13,69 mg para basidiocarpos produzidos em substrato

⁹ ROYSE, D. J. Specialty mushrooms. In: JANICK, J. (Ed.). **Process in new crops**. Arlington: ASH Press, p.464-475. 1996.

com G1 e 19,18 mg para produzidos em substratos com G2. Para os isolados, o Ps08 foi significativamente superior ao isolado Ps14, para as duas granulometrias, sendo a média geral do Ps14 em torno de 93% inferior ao isolado Ps08.

Na segunda coleta de basidiocarpos de *P. sanguineus*, a G1 apresentou média semelhante a G2, com massa seca de basidiocarpos de 266,68 mg e 226,94 mg, respectivamente. As médias dos isolados foram estatisticamente diferentes (Tukey, $p < 0,05$), sendo o isolado Ps14, com média de 50,50 mg, cerca de 89% inferior ao isolado Ps08, com 443,11 mg.

Tabela 9. Massa seca dos basidiocarpos (mg) dos isolados de *Pycnoporus sanguineus* em diferentes granulometrias de serragem de *Eucalyptus* sp. adicionada ao substrato formulado, para as duas coletas de basidiocarpos

Massa seca dos basidiocarpos (mg)						
Isolados <i>P. sanguineus</i>	Primeira coleta			Segunda coleta		
	Granulometrias		Médias dos isolados	Granulometrias		Médias dos isolados
	< 500 micra	500 - 841 micra		< 500 micra	500 - 841 micra	
Ps08	25,11 a B	36,43 a A	30,77 a	468,85 a A	417,38 a A	443,11 a
Ps14	2,27 b A	1,93 b A	2,10 b	64,51 b A	36,49 b A	50,50 b
Médias das granulometrias	13,69 A	19,18 A		266,68 A	226,94 A	
CV*: 39,72%				CV*: 31,26%		

*Coeficiente de variação calculado pela transformação de $\sqrt{x+1}$.

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Os resultados de massa seca média dos basidiocarpos de *P. sanguineus* em relação à concentração de farelo de arroz adicionado a serragem de *Eucalyptus* sp. (Figura 11) apresentaram diferenças estatísticas (Teste T, $p < 0,05$) apenas para o isolado Ps08, na G2, na primeira coleta, com curva de tendência positiva.

Observando as médias de massa fresca e massa seca em substrato formulado (Figura 12) é possível comparar as produções nas duas coletas. Os resultados obtidos na segunda coleta proporcionaram maior produção de basidiocarpos de *P. sanguineus*, para os dois isolados, mas em maior número no isolados Ps08, confirmando a boa produção de biomassa encontrada na avaliação do ensaio *in vitro* para produção de micélio.

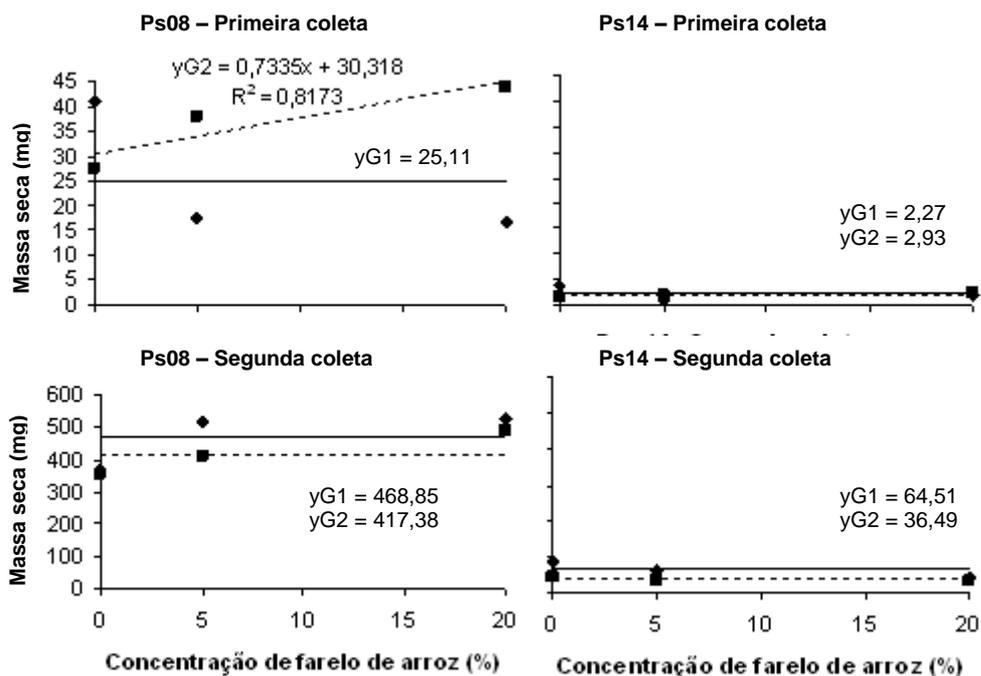


Figura 11. Massa seca média dos basidiocarpos (mg) dos isolados de *Pycnoporus sanguineus* (isolados Ps08 e Ps14) em relação à concentração de farelo de arroz adicionado a serragem de *Eucalyptus* sp. para cultivo em substrato formulado referentes a primeira e segunda coleta de basidiocarpos. Pontos (♦) com linha contínua referem-se à granulometria inferior a 500 micra e pontos (■) com linha tracejada referem-se à granulometria entre 500 e 841 micra.

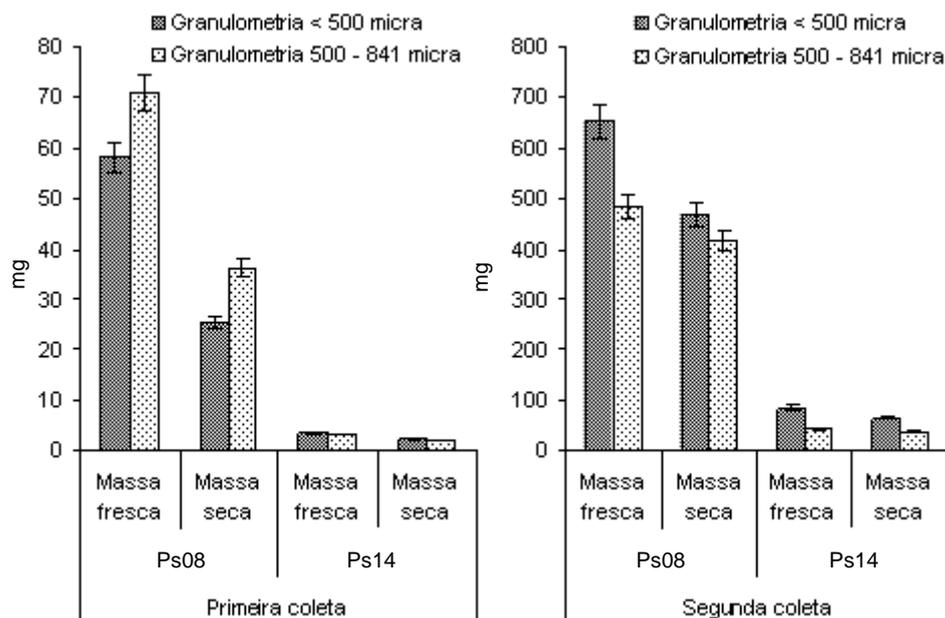


Figura 12. Gráfico comparativo da produção de massa fresca e massa seca (mg) dos basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus* produzidos em duas granulometrias de serragem de *Eucalyptus* sp. Barras (■) representam a granulometria inferior a 500 micra e barras (▨) representam a granulometria entre 500 e 841 micra.

O isolado Ps14 não teve boa produção de basidiocarpos, quando

comparado ao isolado Ps08, apresentando massa média inferior nas duas coletas realizadas. Neste caso, pode-se coligir que a baixa eficiência biológica frente a baixa adaptação as condições nutricionais do substrato, causaram redução no crescimento dos corpos de frutificação, também observado por Marino (2002)¹⁰ citado por Pedra e Marino (2006), ao mencionar que isolados de *Pleurotus sajor-caju* necessitavam de um maior tempo para indução de primórdios, devido a redução da eficiência biológica.

3.2.4 Teor de cinabarina dos basidiocarpos

Os resultados do teor de cinabarina dos basidiocarpos (Tabela 10) para a primeira coleta mostraram-se significativamente superiores (Tukey, $p < 0,05$) para a G2, com média de $0,07 \text{ mg mL}^{-1}$, para $0,03 \text{ mg mL}^{-1}$ da G1. As médias dos isolados Ps08 e Ps14 não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

Na segunda coleta de basidiocarpos, as médias do teor de cinabarina entre as granulometrias foram semelhantes. Entre os isolados, o teor médio do isolado Ps14 foi superior ao isolado Ps08, com valores de $0,67$ e $0,43 \text{ mg mL}^{-1}$, respectivamente.

O teor de cinabarina dos basidiocarpos de *P. sanguineus* em função da concentração de farelo de arroz adicionada ao meio de cultivo, conforme descrição da Figura 13, mostraram resultados significativos apenas para o isolados Ps14 na segunda coleta. Para este tratamento, a G1 apresentou redução da concentração na média em que houve aumento da concentração de farelo de arroz. Fato inverso ocorreu na G2, apresentando aumento no teor de cinabarina com maiores adições de farelo de arroz.

¹⁰ MARINO, R.H. **Produtividade do *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing. em função dos métodos de isolamento e produção de inoculantes.** 1997. 134p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1997.

Tabela 10. Teor de cinabarina dos basidiocarpos (mg mL^{-1}) dos isolados de *Pycnoporus sanguineus* em diferentes granulometrias de serragem de *Eucalyptus* sp. adicionada ao substrato formulado, para a primeira e a segunda coleta de basidiocarpos

Teor de cinabarina dos basidiocarpos (mg mL^{-1})						
Isolados <i>P. sanguineus</i>	Primeira coleta			Segunda coleta		
	Granulometrias		Médias dos isolados	Granulometrias		Médias dos isolados
	< 500 micra	500 - 841 micra		< 500 micra	500 - 841 micra	
Ps08	0,03 a A	0,05 a A	0,04 a	0,46 a A	0,40 b A	0,43 b
Ps14	0,02 a A	0,09 a B	0,06 a	0,57 a B	0,77 a A	0,67 a
Médias das granulometrias	0,03 A	0,07 B		0,51 A	0,59 A	

CV*: 3,23%

CV*: 5,85%

*Coeficiente de variação calculado pela transformação de $\sqrt{x+1}$.

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

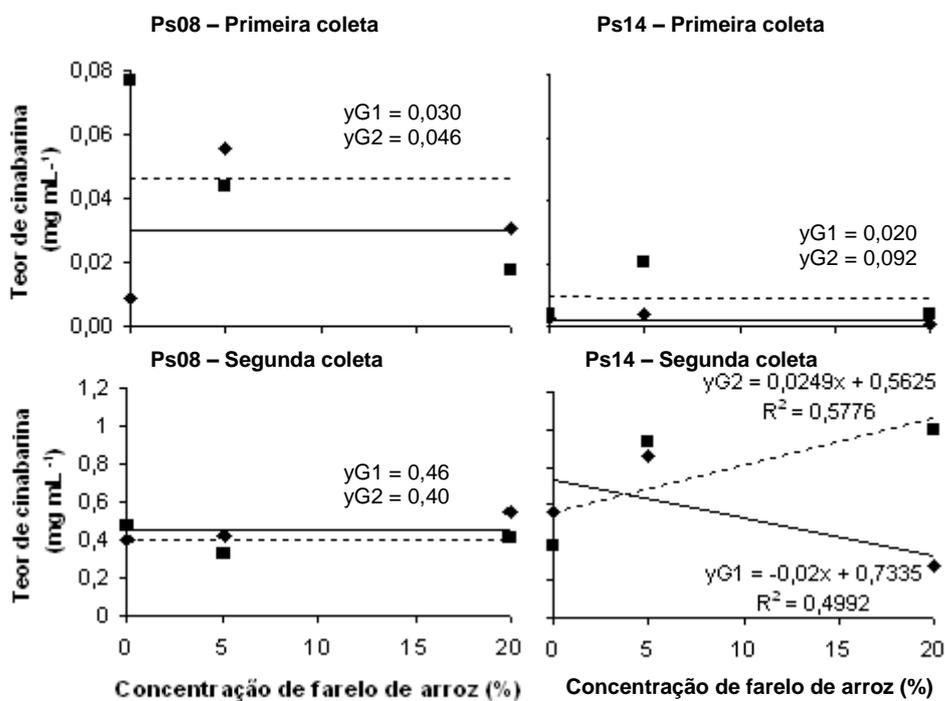


Figura 13. Teor de cinabarina dos basidiocarpos (mg mL^{-1}) dos isolados de *Pycnoporus sanguineus* (isolados Ps08 e Ps14) em relação à concentração de farelo de arroz adicionado a serragem de *Eucalyptus* sp. para cultivo em substrato formulado referentes a primeira e segunda coleta de basidiocarpos. Pontos (◆) com linha contínua referem-se à granulometria inferior a 500 micra e pontos (■) com linha tracejada referem-se à granulometria entre 500 e 841 micra.

Ramos *et al.* (2006) afirmam que a produção de metabolitos secundários não está relacionada a produção de massa em *P. sanguineus*. Embora com maiores produções de massa fresca e seca, o ensaio em substrato formulado confirmou que o teor de cinabarina produzido pelo isolado

Ps08 foi inferior ao produzido pelo isolado Ps14, conforme demonstra a Figura 14. Esta variação pode ser verificada com maior ênfase na segunda coleta de basidiocarpos. Provavelmente a produção de massa exigiu do fungo maior custo metabólico, como conseqüência a síntese do antibiótico cinabarina foi reduzida.

Outra ponderação pode ser quanto as características genéticas de cada isolado. Ao estudar seis isolados de *P. sanguineus*, Rosa *et al.* (2003) consideraram que a produção de cinabarina no fungo varia em função das características de cada linhagem. Baumer (2009) também ponderou que, tanto características qualitativas, como quantitativas dos metabólitos secundários, dependem da capacidade biosintética do fungo e das condições de cultivo.

Neste sentido, abre-se uma lacuna nas pesquisas para produção de basidiocarpos de *P. sanguineus*, devido a necessidade de adaptação de substratos em função do objetivo de cultivo, uma vez que diferentes metabólitos são produzidos pelo fungo e as exigências nutricionais que estimulem esta produção também são variáveis. Este fato é afirmado por Rosa *et al.* (2003), que julgam importante manter diferentes isolados da mesma espécie de basidiomicetos na coleção de amostras, uma vez que o potencial bioativo na produção de metabólitos é diferente em cada cepa.

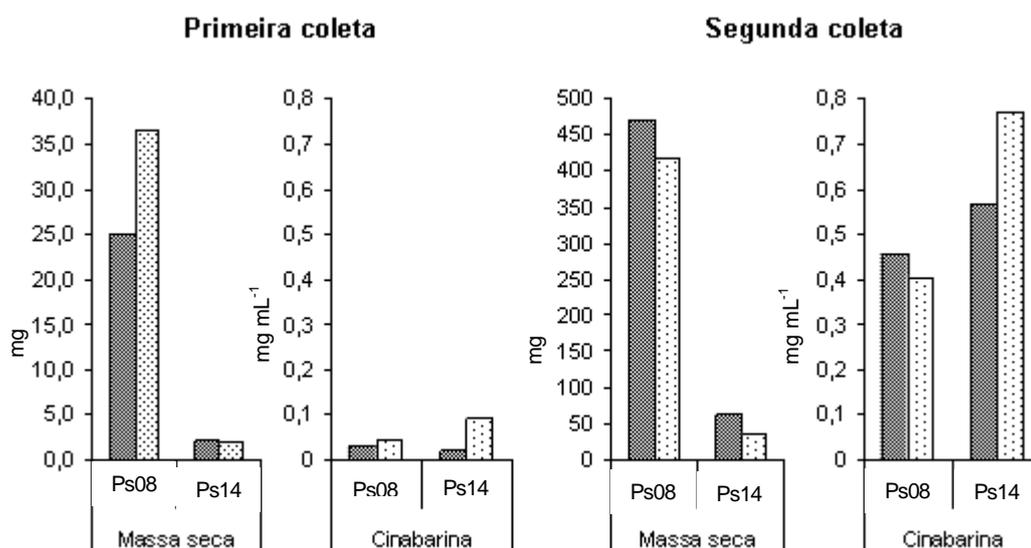


Figura 14. Gráfico comparativo da produção de massa seca e teor de cinabarina dos basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus* produzidos em duas granulometrias de serragem de *Eucalyptus* sp. Barras (■) representam a granulometria inferior a 500 micra e barras (▨) representam a granulometria entre 500 e 841 micra.

3.2.5 Número médio de basidiocarpos

O número médio de basidiocarpos de *P. sanguineus* por amostra (Tabela 11) para as duas granulometrias, nas duas coletas, não apresentaram diferença estatística. Na média geral dos isolados da primeira coleta, o Ps08 foi superior ao isolado Ps14, entretanto mas médias dos isolados dentro das granulometria os resultados foram semelhantes.

Na segunda coleta, o número médio de basidiocarpos dos isolados mostraram-se diferentes significativamente, sendo o isolado Ps14, com 0,72 basidiocarpos por amostra, cerca de 73% menor que a média do isolado Ps08.

Tabela 11. Número médio de basidiocarpos por amostra dos isolados de *Pycnoporus sanguineus* em diferentes granulometrias de serragem de *Eucalyptus* sp. adicionada ao substrato formulado, para a primeira e a segunda coleta de basidiocarpos

Isolados <i>P. sanguineus</i>	Número médio de basidiocarpos por amostra					
	Primeira coleta			Segunda coleta		
	Granulometrias		Médias dos isolados	Granulometrias		Médias dos isolados
< 500 micra	500 - 841 micra	< 500 micra		500 - 841 micra		
Ps08	4,61 a A	4,33 a A	4,47 a	2,78 a A	2,56 a A	2,67 a
Ps14	3,89 a A	3,78 a A	3,83 b	0,94 b A	0,50 b A	0,72 b
Médias das granulometrias	4,25 A	4,06 A		1,86 A	1,53 A	

CV*: 14,08%

CV*: 17,55%

*Coeficiente de variação calculado pela transformação de $\sqrt{x+1}$.

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A produção de basidiocarpos por amostra, na primeira e na segunda coleta, em função da concentração de farelo de arroz adicionado a serragem de *Eucalyptus* sp. (Figura 15), apresentou diferença estatística significativa (Teste T, $p < 0,05$) apenas para o isolado Ps14 na G2 da segunda coleta. Os resultados mostraram curva linear positiva, de forma que, para este tratamento, o aumento na concentração de farelo de arroz proporcionou um maior número médio de basidiocarpos produzidos por amostra.

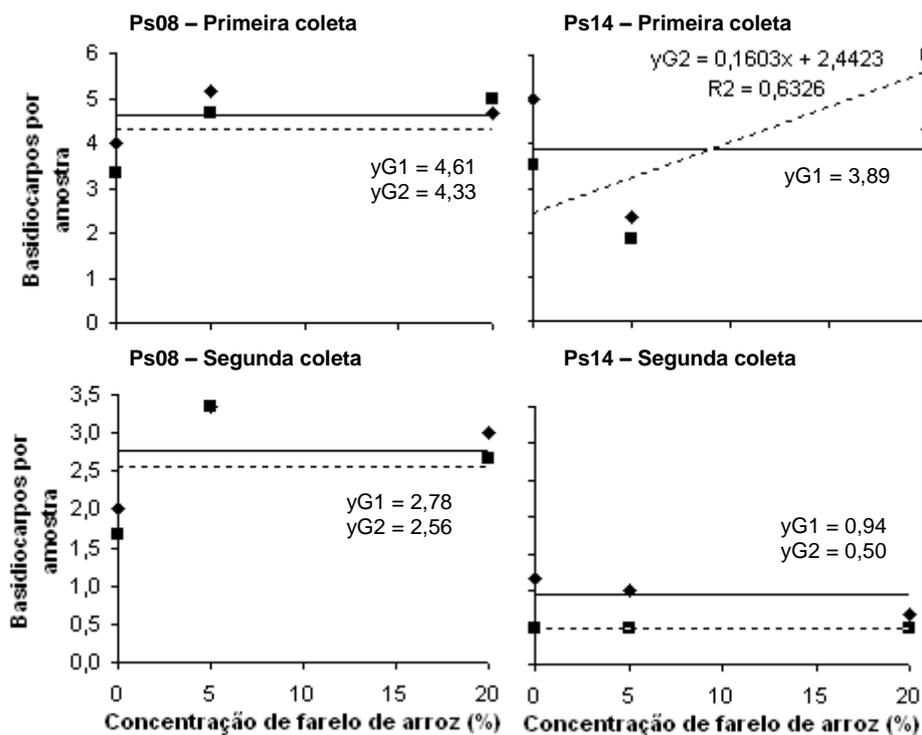


Figura 15. Número médio de basidiocarpos por amostra dos isolados de *Pycnoporus sanguineus* (isolados Ps08 e Ps14) em relação à concentração de farelo de arroz adicionado a serragem de *Eucalyptus* sp. para cultivo em substrato formulado referentes a primeira e segunda coleta de basidiocarpos. Pontos (◆) com linha contínua referem-se à granulometria inferior a 500 micra e pontos (■) com linha tracejada referem-se à granulometria entre 500 e 841 micra.

Observa-se que na primeira coleta, o número médio de basidiocarpos produzidos por amostra foi superior a segunda coleta, entretanto, a produção de massa foi menor. Isso significa que ocorreram mais basidiocarpos com menor massa, conforme pode ser verificado na Figura 16.

Nesta figura, nota-se a capacidade do isolado Ps08 em produzir basidiocarpos de maior diâmetro e número, frente ao isolado Ps14. Colauto *et al.* (2010), estudando o crescimento de basidiocarpos de *Agaricus brasiliensis*, também constataram que, apesar da boa produção de massa média de cogumelo, o número de basidiocarpos foi menor, como efeito obtiveram menor produtividade e eficiência biológica.

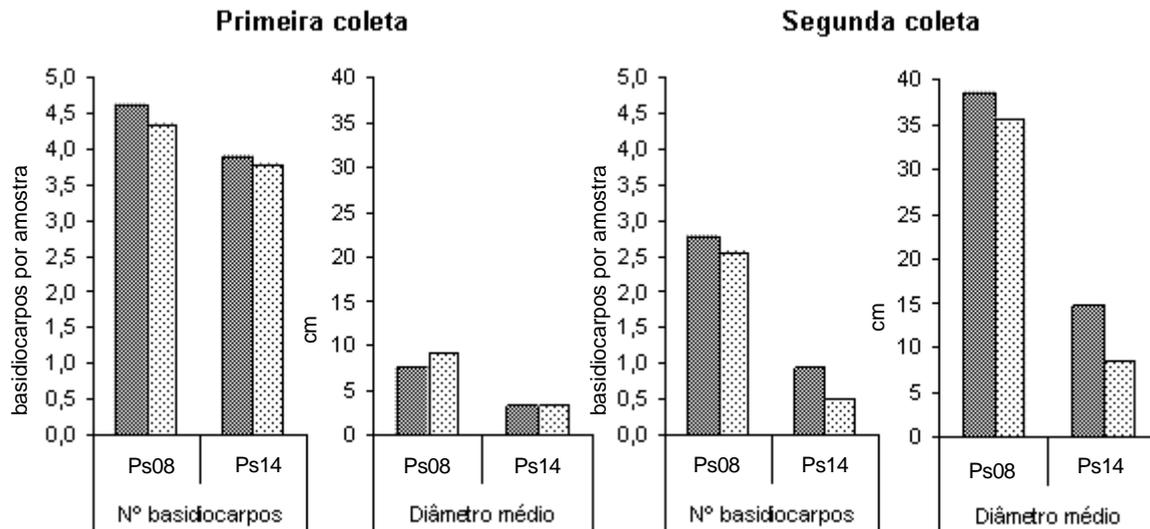


Figura 16. Gráfico comparativo do número e diâmetro médio e número de basidiocarpos por amostra de *Pycnoporus sanguineus* produzidos em duas granulometrias de serragem de *Eucalyptus* sp. Barras (▒) representam a granulometria inferior a 500 micra e barras (▤) representam a granulometria entre 500 e 841 micra.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A serragem de *Eucalyptus* sp. é apropriada para formulação de substrato para produção de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*.

A granulometria inferior a 500 micra, da serragem de *Eucalyptus* sp. mostrou melhores resultados apenas nos ensaios *in vitro*. Nos ensaios em substrato formulado, as duas granulometrias mostraram bons resultados produtivos para os isolados de *Pycnoporus sanguineus*.

A adição de farelo de arroz a serragem de *Eucalyptus* sp., como suplementação, é indicada apenas para acelerar a colonização micelial do substrato, não representando resultados significativamente superiores na média final de diâmetro, número, massa de basidiocarpos e teor de cinabarina.

O isolado Ps08, nos ensaios em substrato formulado, mostrou maior produção de massa de basidiocarpos, enquanto o isolado Ps14 mostrou maior teor de cinabarina nos basidiocarpos. Pode-se concluir que as características genéticas de potencial biológico dos isolados de *Pycnoporus sanguineus* estão mais relacionados aos resultados produtivos que as características dos substratos utilizados nesta pesquisa.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹¹

ABREU, L.D.; MARINO, R.H.; MESQUITA, J.B.; RIBEIRO, G.T. Degradação da madeira de *Eucalyptus* sp. por basidiomicetos de podridão branca. **Revista Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.74, n.4, p.321-328, 2007.

ACHENBACH, H.; BLÜMM, E. Investigation of the pigments of *Pycnoporus sanguineus* - picnosanguin and new phenoxazin-3-ones. **Archiv der Pharmazie** (Weinheim), n. 324, p. 3-6, 1991.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. San Diego. Academic Press. 5 ed. 2005. p. 922.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W. & BLACKWELL, M. 1996. **Introductory Mycology**. New York: John Wiley & Sons, Inc. 865p.

AMITAI, G. ADANI, R.; SOD-MORIAH, G.; RABINOVITZ, I.; VINCZE, A.; LEADER, H.; CHEFETZ, B.; LEIBOVITZ-PERSKY, L.; FRIESEM, D.; HADAR, Y. Oxidative biodegradation of phosphorothiolates by fungal laccase. **Federation of European Biochemical Societies - FEBS Letters**. v.438, p.195-200, 1998.

ANKE, T. Basidiomycetes: a source for new bioactive secondary metabolites. **Progress in Industrial Microbiology**, v. 27, p. 51-66, 1989.

ASSI, L. **Controle de *Colletotrichum lindemuthianum* na cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris*) pelo extrato do cogumelo *Pycnoporus sanguineus***. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Marechal Cândido Rondon, 2005.

BALDO, M. **Aspectos histológicos e bioquímicos da indução de resistência em feijoeiro e atividade antifúngica por derivados de *Pycnoporus sanguineus***. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Marechal Cândido Rondon, 2008.

BAUMER, J. D. **Produção do antibiótico cinabarina pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* utilizando resíduos lignocelulósicos como substrato**. Florianópolis/SC, Brasil. 127p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. 2009.

BAVUTTI, H. R. F. **Síntese de valinina a partir de derivados fenólicos da lignina**. Tese de mestrado. (Faculdade de Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1997.

¹¹ Baseado na NBR-6023 de ago. de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

BISARIA, R.; MADAN, M.; VASUDEVAN, P.; Utilization of agro-residues as animal feed through bioconversion. **Bioresource Technology**, v.59, p. 5-8, 1997.

BLANCHETTE, R. A. *et al.* Selection of whit-rot fungi for biopulping. **Biomass**, England, v.15, p 93-101, 1988.

BONFÁ, M. R. L.; XAVIER-SANTOS, S.; CARVALHO, C. C. de; SILVA, R. da; GOMES, E. Produção de ligninases por fungos de degradação branca em resíduos agroindustriais. In: XIV SINAFERM (Simpósio Nacional de Fermentações) **Anais...**, Florianópolis, 2003.

BOURBONNAIS R, PAICE MG. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. **FEBS Lett.** n.267, v.1, p.99-102, 1990

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

CAPELARI, M. **Atividade biodegradadora e cultivo de três espécies comestíveis de basidiomicetos: *Pleorotus* spp. e *Agrocybe perfecta* (Rick) Sing.** São Paulo: Universidade de São Paulo, 1996. Tese (Doutorado em Botânica) Universidade de São Paulo, 154p. 1996.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. **The fungi.** 2. ed. London: Academic Press, 2001. 587 p.

CASTILHO, G.; DERMOULIN, V. NaCl salinity and temperature effects on growth of three wood-rotting basidiomycetes from a papua new guinea coastal forest. **Mycological Research**, v. 101, n. 3, p. 341-344, 1997.

CASTRO E SILVA, A.; FERREIRA; F da S.; FONSECA, M. D. P; ROLAND, I. A. Efeito da fonte de carbono na atividade enzimática dos fungos degradadores de madeira *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes* sp. em cultura sob agitação. **Anais...** 58ª Reunião Anual da SBPC - Florianópolis, SC - Julho/2006.

CHIACCHIERINI, E., RESTUCCIA, D., VINCI, G. bioremediation of food industry effluents: recent applications of free and immobilised polyphenoloxidases. **Food Science and Technology International.** v.10, p.373-382, 2004.

COLAUTO, N. B.; SILVEIRA, A. R. da; EIRA, A. F. da; LINDE, G. A. Pasteurização de turfa brasileira para o cultivo de *Agaricus brasiliensis*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, sup.1, p.1331-1336, 2010.

DERMIBAS, A. Heavy metal bioaccumulation by mushrooms from artificially fortified soils. **Food Chemistry**, v. 74, p. 293-301, 2001.

DUARTE, L. T. **Produção e caracterização da atividade de tirosinase no extrato bruto de *Pycnoporus sanguineus* CCT-4518**. Dissertação de Mestrado. (Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2009.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environmental**, v.28, p.83-99, 2000.

EIRA, A. F. da. **Cultivo do "cogumelo-do-sol" *Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinemann**. Viçosa, 2003. 203p.

ESPIN, J. C.; MORALES, M.; VARÓN, R.; TUDELA, J.; GARCÍA-CANOVAS, F. A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. **Analytical Biochemistry**. n.231, p.237-246, 1995.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos uma Introdução a Biologia Bioquímica e Biotecnológica**. Caxias do Sul: EducS, 2004. 510 p.

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

FERREIRA, D.F. (2003). **Sisvar versão 5.3**. DEX/UFLA.

FORGIARINI, E. **degradação de corantes e efluentes têxteis pela enzima horseradish peroxidase (HRP)**. 2006, 110f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

GAMEIRO, P. H.; NASCIMENTO, J. S.; RIBEIRO, G. A. Avaliação presuntiva da atividade antimicrobiana de *Pycnoporus sanguineus*. **XIII Congresso de Iniciação Científica**. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2004.

GARCIA, T. A. **Purificação e caracterização das lacases de *Pycnoporus sanguineus***. Tese (Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular), Universidade Nacional de Brasília, Brasília DF. 2006.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. de L.; MANFIO, G. P. Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. n.34, p.35-43. 2005.

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

GIANFREDA, L.; XU, F.; BOLLAG, J.M. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. **Bioremediation Journal**. v. 3, p. 1-25. 1999.

GIL, E. S.; MULLER, L.; SANTIAGO, M.F.; GARCIA T.A. Biosensor based on brut extract from laccase (*Pycnoporus sanguineus*) for environmental analysis of phenolic compounds. **Portugaliae Electrochimica Acta**. v.27, n.3, p.215-225, 2009.

GUTIERREZ, A.; MARTINEZ, M.J.; ALMENDROS, G.; GONZAGA-VILA, F.J.; MARTINEZ, A.T. Hyphal-sheath polysaccharides in fungal deterioration. **Science of the Total Environment**. v.167, p.315-328. 1995.

HAGHBEEN, K.; JAZII, F. R.; KARKHANE, A. A.; BOROJERDI, S. S. Purification of tyrosinase from edible mushroom. **Iranian Journal of Biotechnology**. v.2, n.3, p.189-194. 2004.

HALAOULI, S.; ASTHER, M.; SIGOILLOT, J. C.; HAMDY, M.; LOMASCOLO, A. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. **Journal of Applied Microbiology**. v.100, n.2, p.219-232, 2006.

HARRIS, S. D.; MOMANY, M. Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm. **Fungal Genetics and Biology**, v.41, p.391–400, 2004.

HAWKSWORTH D.L. Why Study Tropical Fungi? In: WATLING, R.; FRANKLAND, J. C.; AINSWORTH, A. M.; ISAAC, S.; ROB, C. H. **Tropical mycology: micromycetes**, v.2, 208 p., 2002.

HIBBETT, D. S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J. F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P. F.; ERIKSSON, O. E.; HUHDORF, S.; JAMES, T.; KIRK, P. M.; LÜCKING, R.; LUMBSCH, T.; LUTZONI, F.; MATHENY, P. B.; MCLAUGHLIN, D. J.; POWELL, M. J.; REDHEAD, S.; SCHOCH, C. L.; SPATAFORA, J. W.; STALPERS, J. A.; VILGALYS, R.; AIME, M. C.; APTROOT, A.; BAUER, R.; BEGEROW, D.; BENNY, G. L.; CASTLEBURY, L. A.; CROUS, P. W.; DAI, Y.-C.; GAMS, W.; GEISER, D. M.; GRIFFITH, G. W.; GUEIDAN, C.; HAWKSWORTH, D. L.; HESTMARK, G.; HOSAKA, K.; HUMBER, R. A.; HYDE, K.; IRONSIDE, J. E.; KÖLJALG, U.; KURTZMAN, C. P.; LARSSON, K.-H.; LICHTWARDT, R.; LONGCORE, J.; MIĄDLIKOWSKA, J.; MILLER, A.; MONCALVO, J.-M.; MOZLEY-STANDRIDGE, S.; OBERWINKLER, F.; PARMASIO, E.; REEB, V.; ROGERS, J. D.; ROUX, C.; RYVARDEN, L.; SAMPAIO, J. P.; SCHÜßLER, A.; SUGIYAMA, J.; THORN, R. G.; TIBELL, L.; UNTEREINER, W. A.; WALKER, C.; WANG, Z.; WEIR, A.; WEIß, M.; WHITE, M. M.; WINKA, K.; YAO, Y.-J.; ZHANG, N. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**. v.111, p.509-547, 2007.

HILLIG, E.; SCHNEIDER, V. E.; WEBER, C.; TECCHIO, R. D. Resíduos de madeira da indústria madeireira – caracterização e aproveitamento. **Anais... XXVI ENEGEP** - Fortaleza, CE. Outubro de 2006.

HOGG, S. The Fungi. In: **Essential Microbiology**. 1ed. Wiley. 481 p. Nova Iorque: 2005.

JONGBLOED, R. H.; BORST-PAUWELS, G. W. F. H. Effects of ammonium and pH on growth of some ectomycorrhizal fungi *in vitro*. **Acta botanica neerlandica**. v.39, p.349-358. 1990.

KRÜGNER, T. L.; BACCHI, L. M. A. (1995). Fungos. In: BERGAMIN FILHO, A. et al. (Eds). **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 3.ed. São Paulo: Ceres, v.1.

LATIF, L. A.; DARAN, A. B. M.; MOHAMED, A. B. Relative distribution of minerals in the pileus and stalk of some selected edible mushrooms. **Food Chemistry**, v. 56, p. 115-121, 1996.

LEPP, H. **Cosmopolitan and pan-tropical species**. Australian National Botanic Gardens. 2005. Disponível on-line <www.anbg.gov.au/fungi/mycogeography-cos-pan.html> acesso em abril de 2011.

LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, v.47, p.273-279, 1972.

LOGUERCIO-LEITE, C.; GROPOSO, C.; DRESCHLER-SANTOS, E. R.; FIGUEIREDO, N de F.; GODINHO, P. da S.; ABRÃO, R. L. A particularidade de ser um fungo – I. Constituintes celulares. **Revista Biotemas**, v.19, n.2, 2006.

LUZ, W. C. da. Micologia avançada: Taxonomia de Basidiomicetos. v.1, 1. ed. Passo fundo: **Revista Anual de Patologia de Plantas – RAPP**, 2008. 400 p.

MANTOVANI, T. R. A. **Criopreservação de fungos lignocelulósicos e otimização de substratos a partir de resíduos agroindustriais**. Dissertação de Mestrado. Universidade Paranaense – UNIPAR. Umuarama, 2008.

MARINO, R. H. Produtividade do *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing. em função dos métodos de isolamento e produção de inoculantes. **Revista de Biologia Neotropical**. v.4, n.1, p.76-77. 2007.

MARQUES, C. J. S. **Atividades biológicas de produtos naturais e sintéticos Estudo das atividades antibacteriana, antiparasitária e antiviral de extratos, frações e substâncias puras obtidas de plantas, fungos e animais, bem como de substâncias sintéticas**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2001.

MARTINS, V. L.; CORTES, A. P.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; DALL'ANTONIA, L. H. Biossensor de compósitos de Botriosferana/Lacase para determinação de Dopamina. **XVI Encontro de Química da Região Sul** (16-SBQSul). FURB, novembro de 2008.

MATA, G.; DELPECH, P.; SAVOIC, J.M. Selection of strains of *Lentinula edodes* and *Lentinula boryana* adapted for efficient mycelial growth on wheat straw. **Revista Iberoamericana de Micología**. v. 18, p. 118-122. 2001.

NELSON, E.W. & SOMMERS, L.E. Total carbon, organic carbon, and organic matter. p. 539-579. In: PAGE, A.L., ed. **Methods of Soil Analysis**. 2. ed. Part 2. Madison, 1982.

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

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

PAZUCH, D. **Potencial indutor de fitoalexinas do filtrado de cultura e extratos de basidiocarpo e de micélio de *Pycnoporus sanguineus* em sorgo e soja**. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Agronomia). Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Marechal Cândido Rondon, 2007.

PEDRA, W. N.; MARINO, R. H. Cultivo axênico de *Pleurotus* spp. em serragem da casca de coco (*Cocos nucifera* Linn.) suplementada com farelo de arroz e/ou trigo. **Revista Arquivos do Instituto Biológico**., v.73, n.2, p.219-225, 2006.

PEITER-BENINCA, C.; FRANZENER, G.; ASSI, L.; IURKIV, L.; ECKSTEIN, B.; COSTA, V.C.; NOGUEIRA, M.A.; STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Indução de fitoalexinas e atividade de peroxidases em sorgo e soja tratados com extratos de basidiocarpos *Pycnoporus sanguineus*. **Revista Arquivos do Instituto Biológico**. v.75, n.3, p.285-292, 2008.

PERALTA-ZAMOTRA, P.; KUNZ, A.; MORAES, S. G.; DURÁN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 78-82, jan. /fev. 2002.

PHILIPPOUSSIS, A.; DIAMANTOPOULOU, P.; ZERVAKIS, G. Correlation of the properties of several lignocellulosic substrates to the crop performance of the shiitake mushroom *Lentinus edodes*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.19, p.551–557. 2003.

PHILIPPOUSSIS, A.; ZERVAKIS, G.; DIAMANTOPOULOU, P. Bioconversion of agricultural lignocellulosic wastes through the cultivation of the edible

mushrooms *Agrocybe aegerita*, *Volvariella volvacea* and *Pleurotus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.17, p.191-200, 2001.

POINTING, S. B.; VRIJMOED, L. L. P. Decolorization of azo and triphenylmethane dyes by *Pycnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenoloxidase. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 16, n.3, p.317-318, 2000.

RAGUNATHAN, R.; GURUSAMY, R.; PALANISWAMY, M.; SWAMINATHAN, K. Cultivation of *Pleurotus* spp. on various agro-residues. **Food Chemistry**, v.55, n.2, p.139-144, 1996.

RAJARATHANAM, S; SHASHIREKA, M. N; BANO, Z. Biopotentialities of the basidiomycetes. **Advances in Applied Microbiology**, v.37, p223-361, 1992.

RAMOS, R. C.; LIEBL, M.; VIEIRA, G. R. T.; GUEDES, A.; TAVARES, L. B. B.; FURIGO JR, A. Cinética de crescimento de *Pycnoporus sanguineus* em sistema submerso para produção de compostos antibacterianos. **Anais... XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 2006.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6ª ed. Rio Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 906 p., 2001.

ROYSE, D. J.; RHODES, T. W.; SANCHEZ, J. E. Vacuum-soaking of wood chip shiitake (*Lentinula edodes*) logs to reduce soak time and log weight variability and to stimulate mushroom yield. **Applied Microbiology and Biotechnology**., v.58, p. 58-62, 2002.

REID, I. D. Biodegradation of lignin. **Canadian Journal of Botany**. v.73, suppl.1, p,1011-1018, 1995.

ROSA, L. H.; GOMES, M. K. M.; JACOB, C. C.; CAPELARI, M. C.; ROSA, A.; ZANI, C. L. Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.98, n.7, 2003.

SALES-CAMPOS, C.; EIRA, A. F. da; JESUS, M. A. de; CAMPAGNOLLI, F.; ANDRADE, M. C. N. de. Crescimento micelial de *Pleurotus ostreatus* em resíduo de *Simarouba amara*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. vol.43, n.11, p. 1633-1635. 2008.

SEO, S.; SHARMA, V. K.; SHARMA, N. Mushroom tyrosinase; recent prospects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. n.51, p.2837- 2853, 2003.

SILVA, C. M. de S.; MELO, I. S. de; OLIVEIRA, P. R. **Produção de enzimas ligninolíticas por fungos isolados de solos sob cultivo de arroz irrigado**.

Embrapa Meio Ambiente. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 18 - Embrapa Meio Ambiente. 18p. Jaguariúna, 2004.

SILVA, G. A. da; MARINO, R.H.; LOPES, M.E.G.; ALMEIDA, T.Á.; COSTA, Â.C.F.; MARTINS, M.V.G. Avaliação do potencial de degradação de fungos causadores de podridão branca. **Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, v. 5, n.2, 2010.

SINGH, M. P. Biodegradation of lignocelulosic waste through cultivation of *Pleurotus sajor-caju*. **Mushroom Science**, v.15, p.517-521, 2000.

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

SMÂNIA, A. Jr.; SMÂNIA, E. F. A.; MONACHE, F. D.; CRUZ, F. S.; BENCHETRIT, L. C. Growth and production phases of *Pycnoporus sanguineus*. **Revista de Microbiologia**. São Paulo, v.26 p.302-306, 1995.

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

SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA, A. Jr.; LOGUERCIO-LEITE, C.; GIL, M. L. Optimal parameters for cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. v.70 p.57-59, 1997.

SOUZA, C.G.M.; TYCHANOWICZ, G.K.; SOUZA, D.F.; PERALTA, R.M. Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. **Journal of Basic Microbiology**. n.2, p.129-136, 2004.

SUAY, I. et al. Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 78, p. 129-139, 2000.

TEDESCO, M.J.; VOLKWEISS, S.J. & BOHNEN, H. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. Boletim Técnico, 5. Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia, UFRGS. Porto Alegre, 1995. 188p.

TEIXEIRA, D. E.; COSTA, A. F. DA; SANTANA, M. A. E. Aglomerados de bagaço de cana-de-açúcar: resistência natural ao ataque de fungos apodrecedores. **Revista Scientia Forestalis**. n. 52, p. 29-34, dez. 1997.

TOILLIER, S. L.; IURKIV, L.; MEINERZ, C. C.; BALDO, M.; VIECELLI, C. A.; KUHN, O. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R. Controle de

crestamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) e alterações bioquímicas em feijoeiro induzidas por *Pycnoporus sanguineus*. **Revista Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.1, p.99-110, 2010.

TONINI, R. C. G. **Utilização da bainha mediana de palmito (*Euterpe edulis* Mart. - *Arecaceae*) como substrato para cultivo de *Lentinula edodes* (Beck.) Pegler**. Dissertação de Mestrado. Universidade Regional de Blumenau. Blumenau, 2004.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2000. 827p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 718 p.

TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKA, A.; ITÄVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, v.72, p.169-183. 2000.

VANCE, E. D.; CHAPIN, F. S. Substrate limitations to microbial activity in taiga forest floors. **Soil Biology and Biochemistry**. v.33, p.173-188, 2001.

VAZQUEZ-DUHALT, R.; WESTLAKE, D. W. S.; FEDORAK, P. M. lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvents. **Applied and Environmental Microbiology**. v.60, n.2, p.459-466, 1994.

VIECELLI, C. A.; STANGARLIN, J. R.; KUHN O. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. REGINA F. Indução de resistência em feijoeiro por filtrado de cultura de *Pycnoporus sanguineus* contra *Pseudocercospora griseola*. **Tropical Plant Pathology**, v.34, n.2, p.87-96, 2009.

VIEIRA, G. R. T. **Otimização das condições de cultivo de *Polyporus tricholoma* mont. visando a produção de substâncias antibacterianas**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2005.

WASSER, P. S.; WEIS, A. L. Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives (review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 1, p. 31-62, 1999.

WILLE, C. N. **Potencial do fungo *Pycnoporus sanguineus* na biopolpação de *Eucalyptus grandis* e *Acácia mearnsii***. Monografia de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2007.

WU, J. Z.; CHEUNG, P. C. K.; WONG, K. H.; HUANG, N. L. Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer. Part 2: effect of carbon-to-nitrogen ratio of the culture medium on the content and composition of the mycelial dietary fibre. **Food Chemistry**, v.85, n.1, p.101-105, 2004.

ZAFAR, S. I.; ABDULLAH, N.; IQBAL, M.; SHEERAZ, Q. Influence of nutrient amendment on the biodegradation of wheat straw during solid state fermentation of *Trametes versicolor*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.38, p.83-87, 1996.

ANEXOS

Anexo 1A

Fotos do ensaio *in vitro* para produção de micélio de *Pycnoporus sanguineus* para o isolado P.s. 04.

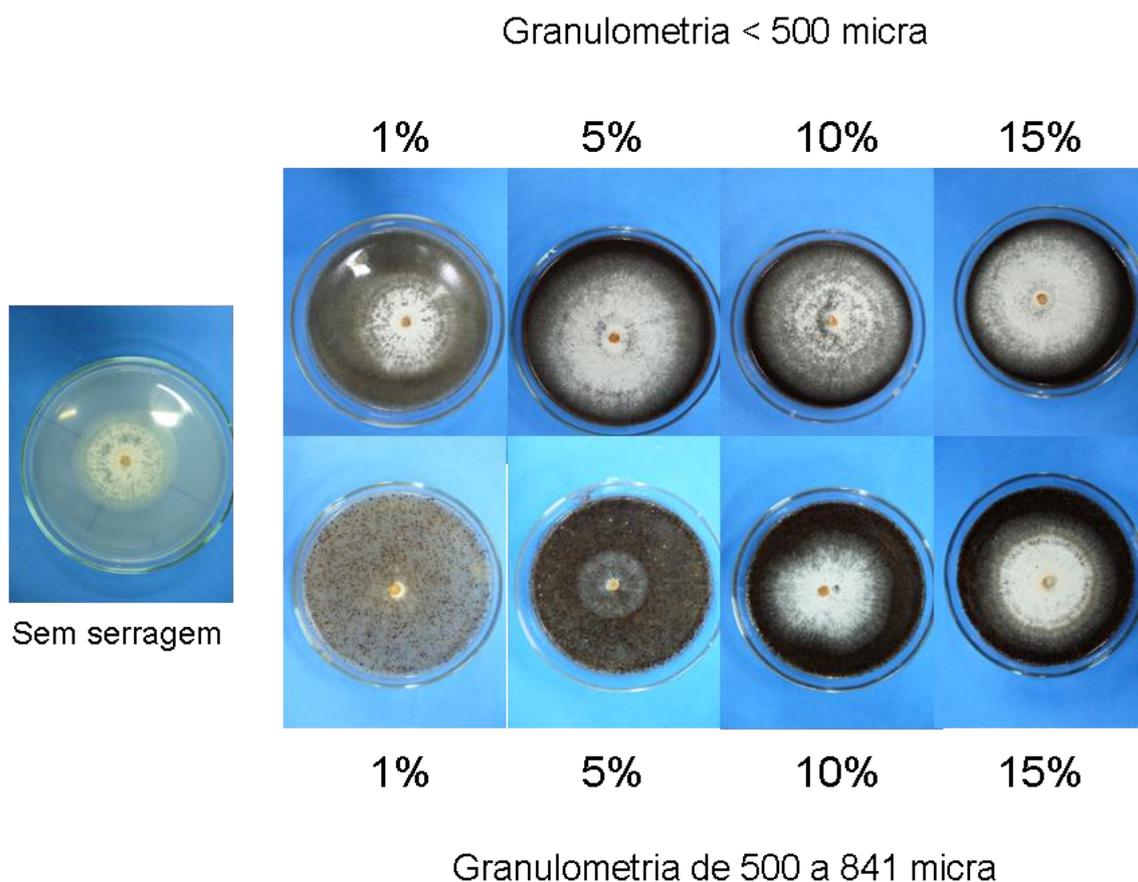


Ilustração 1. Fotos do ensaio *in vitro* para produção de micélio de *Pycnoporus sanguineus* para o isolado P.s. 04 nas concentrações de zero, 1, 5, 10 e 15% de serragem de *Eucalyptus* sp. adicionada ao meio de cultivo CBA para as granulometrias inferior a 500 micra e entre 500 e 841 micra. Martinazzo-Portz, 2011.

Anexo 1B

Fotos do ensaio *in vitro* para produção de micélio de *Pycnoporus sanguineus* para o isolado P.s. 08.

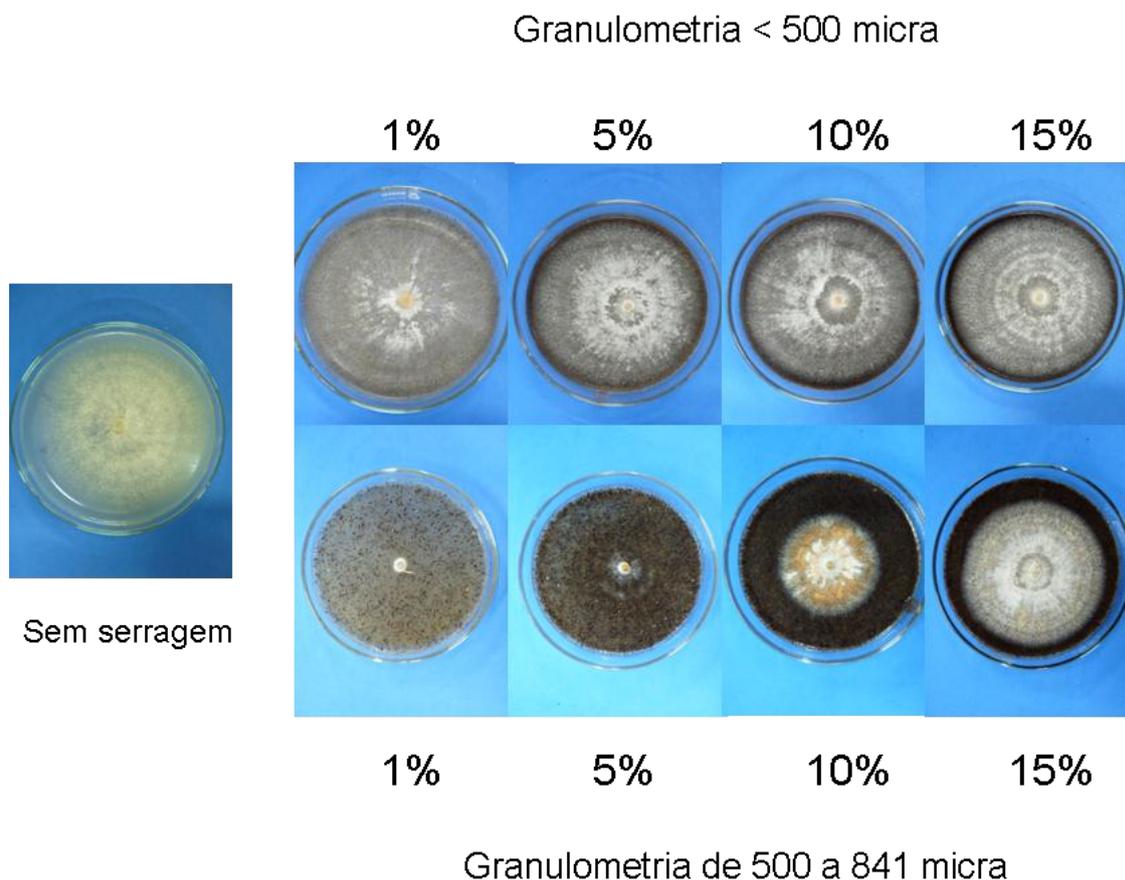


Ilustração 2. Fotos do ensaio *in vitro* para produção de micélio de *Pycnoporus sanguineus* para o isolado P.s. 08 nas concentrações de zero, 1, 5, 10 e 15% de serragem de *Eucalyptus* sp. adicionada ao meio de cultivo CBA para as granulometrias inferior a 500 micra e entre 500 e 841 micra. Martinazzo-Portz, 2011.

Anexo 1C

Fotos do ensaio *in vitro* para produção de micélio de *Pycnoporus sanguineus* para o isolado P.s. 13.

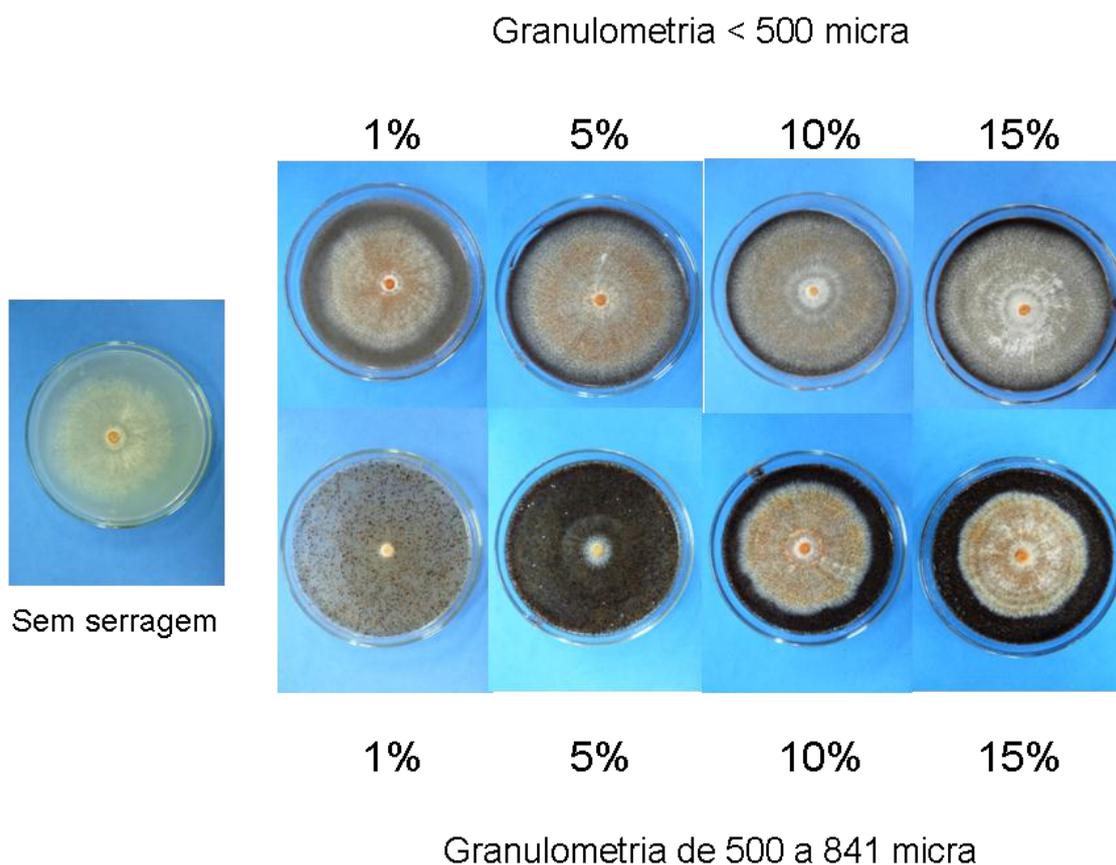


Ilustração 3. Fotos do ensaio *in vitro* para produção de micélio de *Pycnoporus sanguineus* para o isolado P.s. 13 nas concentrações de zero, 1, 5, 10 e 15% de serragem de *Eucalyptus* sp. adicionada ao meio de cultivo CBA para as granulometrias inferior a 500 micra e entre 500 e 841 micra. Martinazzo-Portz, 2011.

Anexo 1D

Fotos do ensaio *in vitro* para produção de micélio de *Pycnoporus sanguineus* para o isolado P.s. 14.

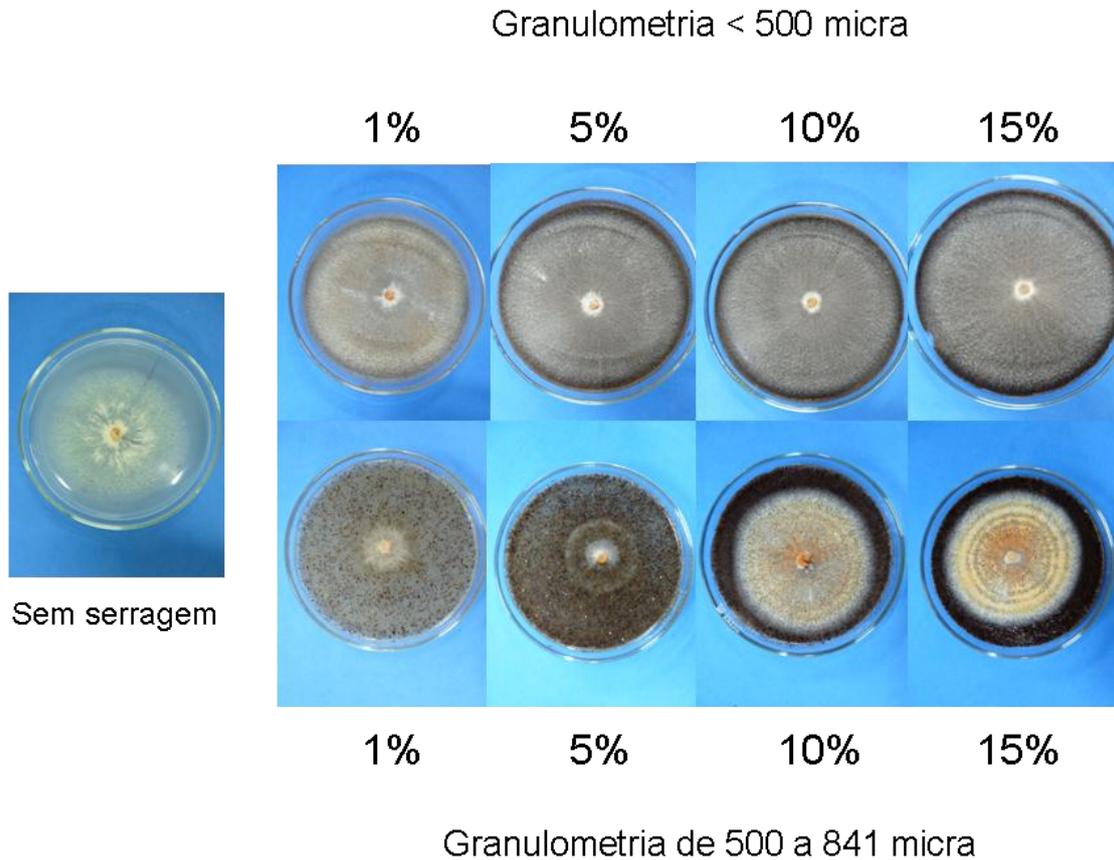


Ilustração 4. Fotos do ensaio *in vitro* para produção de micélio de *Pycnoporus sanguineus* para o isolado P.s. 14 nas concentrações de zero, 1, 5, 10 e 15% de serragem de *Eucalyptus* sp. adicionada ao meio de cultivo CBA para as granulometrias inferior a 500 micra e entre 500 e 841 micra. Martinazzo-Portz, 2011.

Anexo 2A

Fotos do ensaio em substrato formulado para produção de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus* para o isolado P.s. 08 na primeira coleta.

Isolado P.s. 08 – Primeira coleta

Granulometria < 500 micra

Granulometria 500-841 micra

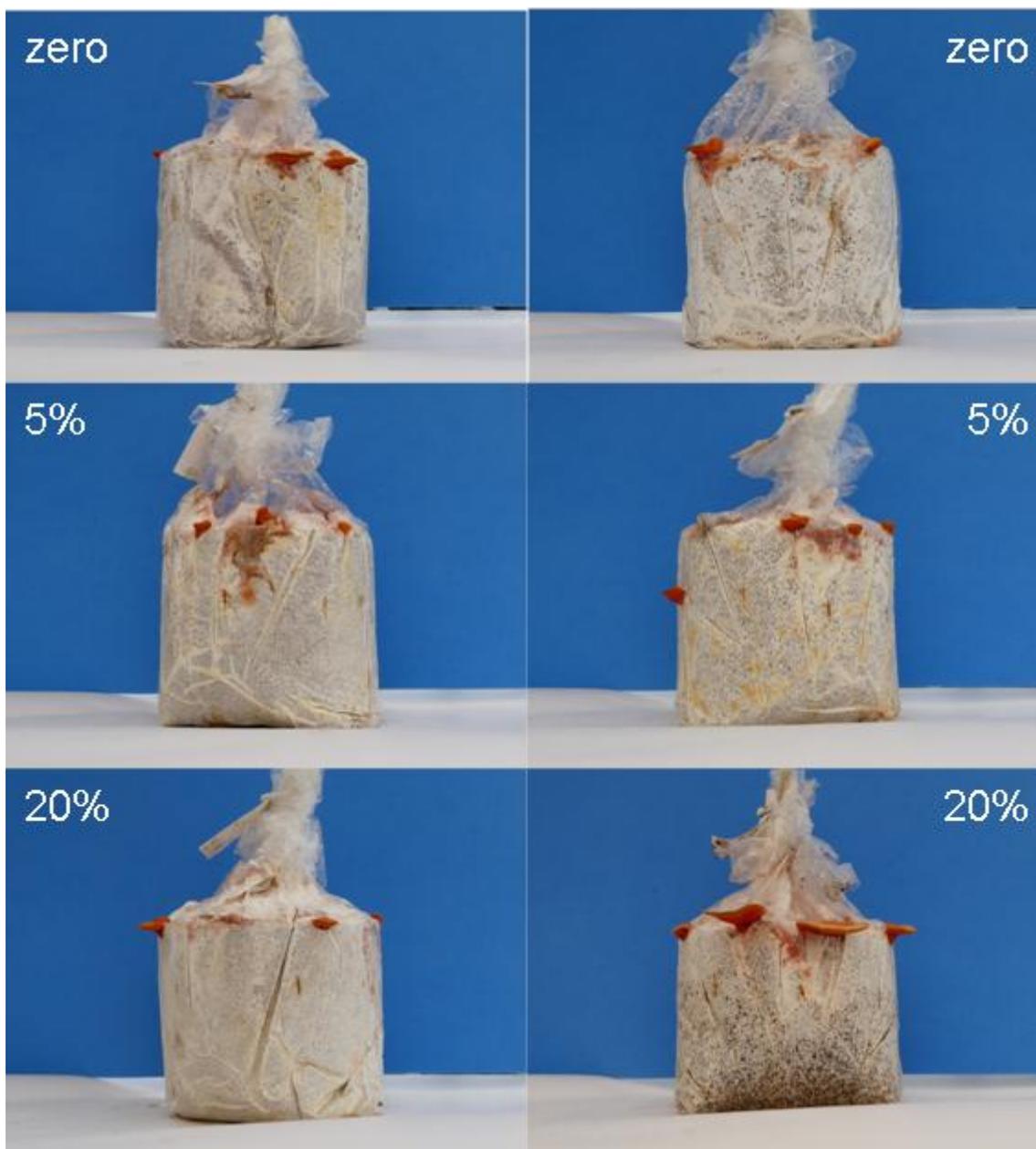


Ilustração 5. Fotos do ensaio em substrato formulado para produção de micélio de *Pycnoporus sanguineus* para o isolado P.s. 08 na primeira coleta, nas concentrações de zero, 5 e 20% de farelo de arroz adicionado a serragem de *Eucalyptus* sp. para as granulometrias inferior a 500 micra e entre 500 e 841 micra. Martinazzo-Portz, 2011.

Anexo 2B

Fotos do ensaio em substrato formulado para produção de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus* para o isolado P.s. 08 na segunda coleta.

Isolado P.s. 08 – Segunda coleta

Granulometria < 500 micra

Granulometria 500-841 micra



Ilustração 6. Fotos do ensaio em substrato formulado para produção de micélio de *Pycnoporus sanguineus* para o isolado P.s. 08 na segunda coleta, nas concentrações de zero, 5 e 20% de farelo de arroz adicionado a serragem de *Eucalyptus* sp. para as granulometrias inferior a 500 micra e entre 500 e 841 micra. Martinazzo-Portz, 2011.

Anexo 2C

Fotos do ensaio em substrato formulado para produção de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus* para o isolado P.s. 14 na primeira coleta.

Isolado P.s. 14 – Primeira coleta

Granulometria < 500 micra

Granulometria 500-841 micra

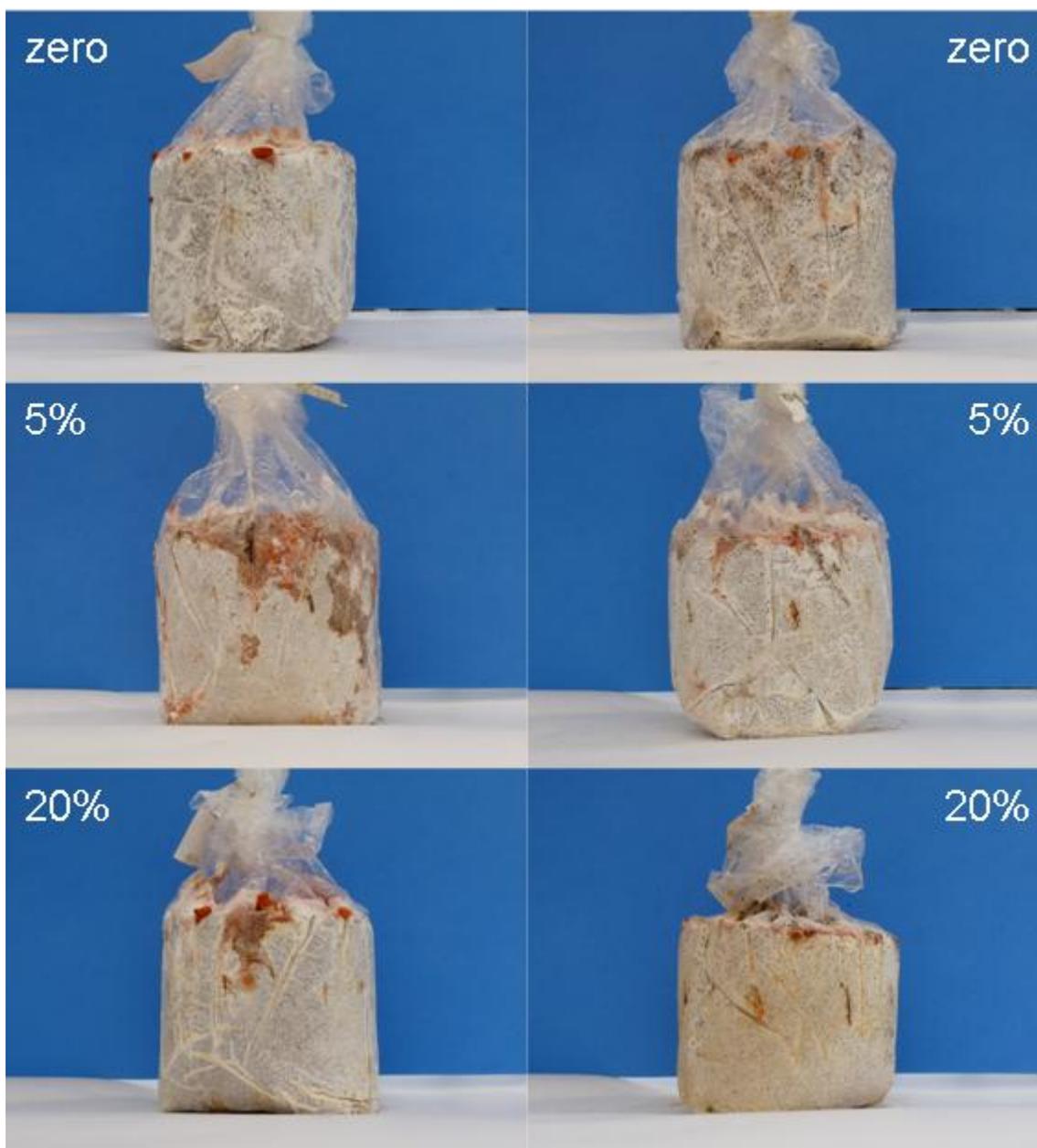


Ilustração 7. Fotos do ensaio em substrato formulado para produção de micélio de *Pycnoporus sanguineus* para o isolado P.s. 14 na primeira coleta, nas concentrações de zero, 5 e 20% de farelo de arroz adicionado a serragem de *Eucalyptus* sp. para as granulometrias inferior a 500 micra e entre 500 e 841 micra. Martinazzo-Portz, 2011.

Anexo 2D

Fotos do ensaio em substrato formulado para produção de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus* para o isolado P.s. 14 na segunda coleta.

Isolado P.s. 14 – Segunda coleta

Granulometria < 500 micra

Granulometria 500-841 micra

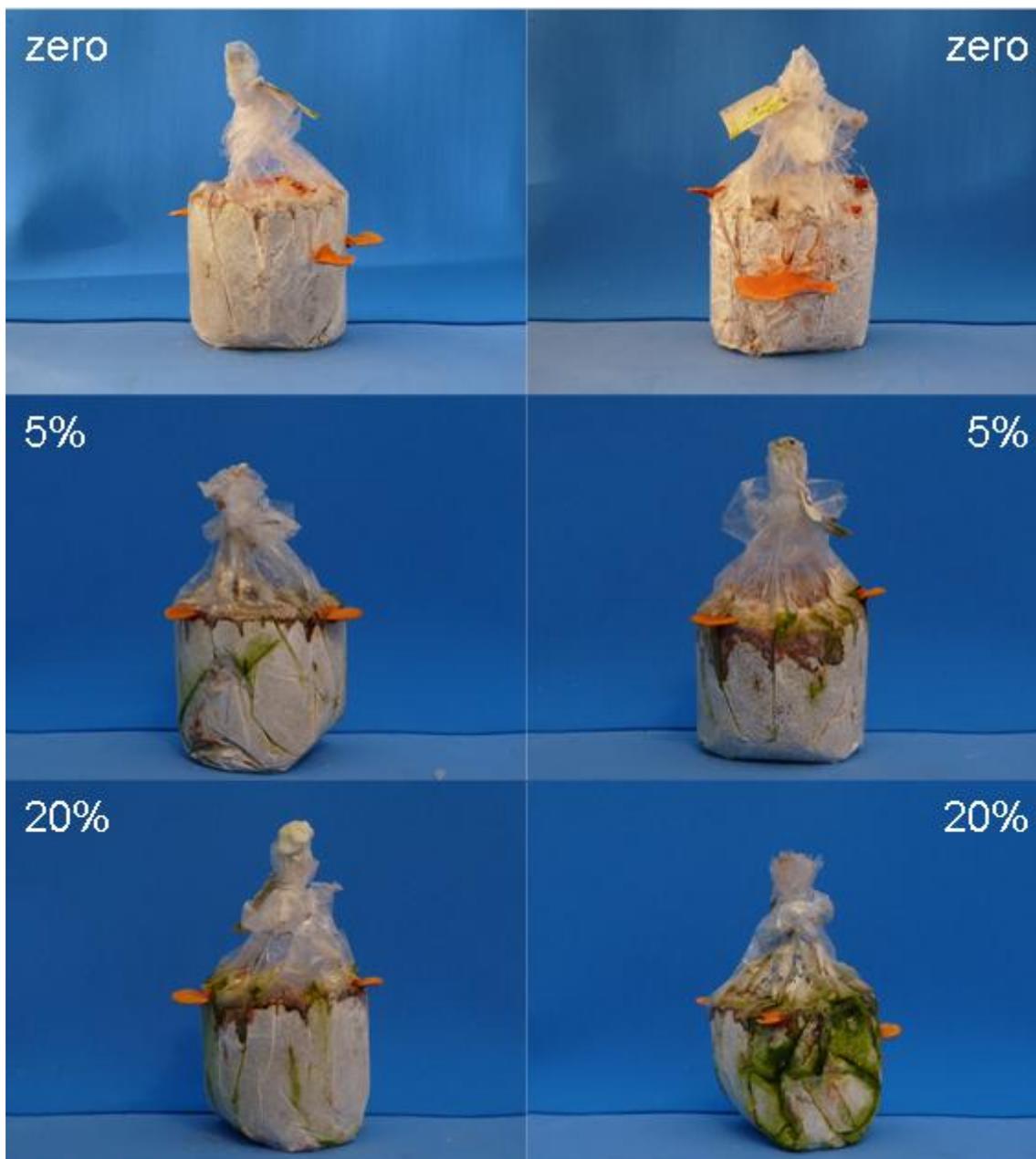


Ilustração 8. Fotos do ensaio em substrato formulado para produção de micélio de *Pycnoporus sanguineus* para o isolado P.s. 14 na segunda coleta, nas concentrações de zero, 5 e 20% de farelo de arroz adicionado a serragem de *Eucalyptus* sp. para as granulometrias inferior a 500 micra e entre 500 e 841 micra. Martinazzo-Portz, 2011.)