

ESTUDO DA NUTRIÇÃO E PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS QUE ABSORVEM NO UV POR FERMENTAÇÃO COM *Aspergillus amstelodami*

Alírio de CARVALHO*
Elenir Aparecida REBOLLA**
Rubens MOLINARI*

RESUMO: Estudou-se as necessidades nutricionais para o crescimento microbiano e o acúmulo de substâncias que absorvem no ultravioleta (S_{260}) pelo *A. amstelodami* em meios de cultura de composição simples. Verificou-se que o crescimento do microrganismo e a produção do material S_{260} são processos simultâneos em todas as fases do desenvolvimento microbiano. Entre as fontes de carbono e energia estudadas observou-se que as mais adequadas são a D-frutose, a maltose, a lactose e a D-manose. Verificou-se que, usando-se D-frutose como fonte de carbono, várias substâncias servem como fonte de nitrogênio para o crescimento microbiano e produção das substâncias S_{260} , destacando-se entre as estudadas a mistura de sulfato de amônio com L-aspartato de potássio, o nitrato de potássio, o L-aspartato de potássio e a mistura de sulfato de amônio com carbonato de cálcio. Constatou-se ainda que a concentração inicial de fósforo é fundamental para a produção do material que absorve no UV. A produção máxima destas substâncias foi obtida em meio contendo, por litro, 50 g de D-frutose, 6,067 g (60 mM) de KNO_3 , 1,421 g (10mM) de $Na_2SO_4 \cdot 0,2g$ de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 mg de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 mg de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 mg de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 5 mg de $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ e 1 g de extrato de levedo. Nesse meio o crescimento e a produção máximos são obtidos após 270 e 290 horas de agitação, respectivamente, usando-se frascos de Erlenmeyer de 125 ml com 40 ml de meio e 1,2 ml de inóculo.

UNITERMOS: *Aspergillus amstelodami*; substâncias que absorvem no UV.

INTRODUÇÃO

O interesse na produção de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos por fermentação microbiana tem sido bastante grande (1-7).

Em nossos laboratórios estudamos o assunto já há alguns anos (8-12).

O objetivo deste trabalho foi continuar nossos estudos estendendo-os ao *Aspergillus amstelodami*, visando à obtenção de informações que nos possibilitem uma melhor compreensão dos motivos que levam o microrganismo à produção e acúmulo destas substâncias.

MATERIAL E MÉTODOS

Inóculo

Preparou-se uma suspensão de esporos da cultura utilizada (*Aspergillus amstelodami*) pela adição de 8 ml de água destilada esterilizada a dois tubos da cultura na forma de agar inclinado. A suspensão de esporos foi obtida raspando-se suavemente a superfície do meio com uma espátula esterilizada.

Inoculou-se 8 frascos de Roux, contendo 200 ml do meio básico 2 com saca-

* Departamento de Química Tecnológica e de Aplicação — Instituto de Química - UNESP — "Campus" de Araraquara.

** Monografia do Instituto de Química — UNESP — "Campus" de Araraquara.

rose como fonte de carbono (50g/l) e solidificado com 2% de agar, com 2 ml da suspensão de esporos acima mencionada, esparramando-se uniformemente o inóculo sobre o meio de cultura e os frascos foram deixados à temperatura ambiente durante 11 dias.

Adicionou-se, então, 130 ml de água destilada esterilizada a cada frasco e a suspensão de esporos foi preparada da forma já descrita. A suspensão obtida foi assepticamente homogeneizada em liquidifica-

Meio básico 1: 3,96 g (30 mM) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1,31 g (7,5 mM) de K_2HPO_4 e 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Meio básico 2: 3,96 g (30 mM) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1,31 g (7,5 mM) de K_2HPO_4 ; 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 10 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 10 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 10 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 5 mg de $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Meio básico 3: Meio básico 2 mais 1 g de extrato de levedo.

Esterilização dos meios de cultura e outros materiais

A esterilização foi feita por aquecimento, em autoclave, mantendo-se o aquecimento efetivo a 121°C durante 30 minutos. A fonte de carbono era esterilizada à parte e depois acrescentada assepticamente ao restante do meio.

O pH dos meios, após a esterilização, era ajustado, quando necessário, pela adição de ácido sulfúrico ou hidróxido de potássio diluídos e esterilizados, de modo a obter-se pH entre 6,5 e 7,0.

Fermentação

O processo empregado para permitir o crescimento do microrganismo, em condições de produzir o material S_{260} , foi o de "frascos agitados". Com tal técnica a atividade microbiana ocorreu em cultura submersa em frascos de Erlenmeyer submetidos à rotação. Foram utilizados frascos de 125 ml, contendo 40 ml de meio de cultura e 1,2 ml de inóculo, colocados na plataforma oscilante da máquina agitada, onde descreveriam círculos de 3 cm de diâmetro na velocidade de 250 rotações por minuto.

dor de copo de alumínio, estéril, e transferida, em porções de 10 a 30 ml, para frascos estéreis de 50 ml. Após serem fechados com tampa de borracha e proteção de alumínio, os frascos foram congelados e mantidos em congelador (-30°C) até serem usados.

Meios básicos

As composições dos meios básicos utilizados no estudo das fontes de carbono foram, por litro, as seguintes:

Os resultados, média dos pares, são apresentados como micélio por mililitro de caldo fermentado (mg/ml), referidos ao volume inicial de meio e desprezando-se a contribuição do inóculo.

TABELA I — Influência da fonte de carbono na produção das substâncias S_{260} e no crescimento microbiano

| Fonte de Carbono | Meio Básico (n.º) | pH Final | A_{260} Final | Massa Micelar (mg/ml) |
|------------------|-------------------|----------|-----------------|-----------------------|
| D-Frurose | 3 | 3,4 | 4,4 | 3,3 |
| Maltose | 3 | 4,6 | 4,3 | 3,4 |
| Lactose | 2 | 5,6 | 2,1 | 0,4 |
| D-Manose | 3 | 3,4 | 1,4 | 2,1 |
| Amido | 3 | 4,0 | 1,0 | 0,8 |
| Lactose | 1 | 6,5 | 0,8 | 0,4 |
| Sacarose | 1 | 3,8 | 0,5 | 0,3 |
| D-Glicose | 3 | 4,1 | 0,4 | 2,3 |
| Sacarose | 3 | 5,1 | 0,3 | 2,8 |
| Lactose | 3 | 5,0 | 0,3 | 1,4 |
| Amido | 2 | 4,3 | 0,3 | 1,0 |
| Maltose | 1 | 4,6 | 0,3 | 0,1 |
| Maltose | 2 | 4,0 | 0,2 | 0,1 |
| D-Glicose | 1 | 4,5 | 0,1 | 0,2 |
| D-Glicose | 2 | 4,4 | 0,1 | 0,1 |
| D-Manose | 1 | 4,7 | 0,1 | 0,1 |

Fonte de nitrogênio

Os resultados obtidos indicam que, entre as combinações usadas, as maiores produções de S_{260} são obtidas com D-frutose ou maltose, como fonte de carbono, no meio básico 3.

As Tabelas II e III mostram os resultados obtidos pela substituição do sulfato de amônio, no meio básico 3, por várias outras fontes de nitrogênio, usando-se D-frutose e maltose, respectivamente, como fonte de carbono.

Quando o meio de cultura continha carbonato de cálcio, o micélio era lavado com ácido perclórico 0,1M antes de ser lavado com água, para a remoção daquele sólido.

RESULTADOS

Fonte de carbono

O crescimento microbiano foi avaliado pela determinação da massa micelar do microrganismo filtrado e lavado com água destilada. O micélio lavado era transferido, com auxílio de um mínimo de água, para copos de 50 ml previamente secos e pesados. Eliminava-se a maior parte da água de transferência por aquecimento dos copos em chapa quente (não se permitindo ebulição), seguindo-se aquecimento em estufa a 105°C durante 15 horas.

A Tabela I mostra os resultados obtidos das dezesseis melhores combinações quando são comparados vários açúcares, na concentração de 50 g/l, como fonte de carbono e energia nos três meios básicos.

TABELA II — Efeito da fonte de nitrogênio na produção do material S₂₆₀ e no crescimento do microrganismo, usando-se D-frutose como fonte de carbono no meio básico 3.

| Fontes de Nitrogênio | pH Final | A ₂₆₀ Final | Massa Micelar (mg/ml) |
|--|----------|------------------------|-----------------------|
| (NH ₄) ₂ SO ₄ (15 mM) com L-asp. de potássio (30 mM) | 5,7 | 15,1 | 6,2 |
| KNO ₃ (60 mM) | 5,5 | 14,3 | 5,5 |
| L-aspartato de potássio (60 mM) | 5,7 | 14,2 | 5,9 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ (30 mM) com CaCO ₃ (4g/l) | 6,2 | 13,8 | 3,9 |
| DL-alanina (60 mM) | 5,8 | 13,4 | 5,0 |
| Glicina (60 mM) | 5,4 | 12,3 | 4,8 |
| Uréia (30 mM) | 6,5 | 12,3 | 5,0 |
| Trietanolamina (60 mM) | 7,5 | 8,2 | 5,8 |
| Gelatina (5 g/l) | 6,5 | 6,8 | 0,8 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ (30 mM) | 5,1 | 4,4 | 4,4 |
| Nenhuma das citadas* | 5,3 | 2,7 | 1,8 |

* Todos os meios contém ainda 1 g/l de extrato de levedo (11% nitrogênio total).

Esta Tabela mostra que quando se usa D-frutose como fonte de carbono, com exceção da gelatina que é má fonte de nitrogênio para o crescimento microbiano, as substâncias utilizadas, isoladamente ou em misturas, servem como fonte de nitrogênio para a produção das substâncias S₂₆₀ e para o crescimento do microrganismo.

Os resultados indicam a mistura de sulfato de amônio com L-aspartato de potássio, o nitrato de potássio, o L-aspartato de potássio e a mistura de sulfato de amônio com carbonato de cálcio co-

mo as melhores fontes de nitrogênio, entre as estudadas, para a produção do material S₂₆₀.

Observa-se ainda na Tabela II que a adição de carbonato de cálcio promove um aumento de 213% na produção do material, quando se usa sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. Este fato está relacionado com o pH final mais favorável. Fato semelhante é observado pela adição de L-aspartato de potássio, quando houve aumento de 242% na produção das substâncias que absorvem no ultravioleta.

TABELA III — Efeito da fonte de nitrogênio na produção do material S₂₆₀ e no crescimento do microrganismo, usando-se maltose como fonte de carbono no meio básico 3.

| Fontes de Nitrogênio | pH Final | A ₂₆₀ Final | Massa Micelar (mg/ml) |
|---|----------|------------------------|-----------------------|
| Uréia (30mM) | 5,1 | 14,7 | 5,5 |
| DL-alanina (60mM) | 3,8 | 14,6 | 6,7 |
| L-aspartato de potássio (60 mM) | 4,2 | 11,5 | 5,8 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ (30 mM) com CaCO ₃ (4g/l) | 3,8 | 10,7 | 5,8 |
| Glicina (60mM) | 4,1 | 10,6 | 8,1 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ (15mM) com L-asp. de potássio (30 mM) | 4,2 | 9,5 | 7,0 |
| KNO ₃ (60mM) | 4,1 | 6,4 | 5,4 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ (30 mM) | 3,0 | 4,3 | 5,8 |
| Trietanolamina (60 mM) | 8,1 | 3,5 | 1,2 |
| Nenhuma das citadas* | 4,6 | 1,4 | 4,3 |
| Gelatina (5 g/l) | 3,6 | 0,8 | 6,9 |

* Todos os meios contém ainda 1 g/l de extrato de levedo (11% nitrogênio total)

Esta Tabela mostra que quando se usa maltose como fonte de carbono, com exceção da gelatina e da trietanolamina, as demais substâncias utilizadas, isoladamente ou em misturas, permitem maiores produções do material que o sulfato de amônio isoladamente.

Observa-se novamente o estímulo da produção pela adição de carbonato de cálcio (148%) ou L-aspartato de potássio (119%) ao sulfato de amônio.

Os resultados indicam a uréia, a DL-alanina, o L-aspartato de potássio e a mistura de sulfato de amônio com carbonato de cálcio como as melhores fontes de nitrogênio, entre as estudadas, para a produção de S₂₆₀, quando se usa maltose como fonte de carbono.

Comparando-se os resultados das Tabelas II e III verifica-se que as maiores produções são obtidas quando se usa D-frutose como fonte de carbono, com exce-

TABELA IV — Influência da concentração da fonte de fósforo

| K ₂ HPO ₄ (x10 ⁴ M) | K ₂ SO ₄ (x10 ⁴ M) | pH Final | A ₂₆₀ Final | Massa Micelar (mg/ml) | A ₂₆₀ Massa Micelar |
|--|---|----------|------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| 0,0 | 100,0 | 5,9 | 20,9 | 6,9 | 3,0 |
| 5,0 | 95,0 | 5,8 | 17,6 | 6,6 | 2,7 |
| 15,0 | 85,0 | 5,5 | 11,9 | 6,0 | 2,0 |
| 45,0 | 55,0 | 5,6 | 11,5 | 5,7 | 2,0 |
| 75,0 | 25,0 | 5,5 | 11,9 | 6,0 | 2,0 |
| 100,0 | 0,0 | 5,5 | 7,4 | 5,2 | 1,4 |

Esta Tabela mostra que a concentração inicial de fósforo é fundamental para a produção das substâncias em estudo, pois a produção do material aumenta ao se reduzir a concentração inicial do ortofosfato dipotássico e é máxima na ausência deste sal. Este fato evidencia que, neste caso, o extrato de levedo atua também como fonte de fósforo.

TABELA V — Influência da concentração de sódio

| Na ₂ SO ₄ (x10 ⁴ M) | Sódio (x10 ⁴ eq. g/l) | pH Final | A ₂₆₀ Final | Massa Micelar (mg/ml) |
|--|----------------------------------|----------|------------------------|-----------------------|
| 0,0 | 0,0 | 5,4 | 20,0 | 6,1 |
| 100,0 | 200,0 | 5,5 | 24,3 | 6,6 |
| 200,0 | 400,0 | 5,4 | 23,1 | 6,4 |
| 300,0 | 600,0 | 5,6 | 24,9 | 6,5 |

ção da uréia e da DL-alanina para as quais a maltose, como fonte de carbono, permite maiores produções.

Para a continuação do trabalho foi escolhida a D-frutose como fonte de carbono e, como fonte de nitrogênio, o nitrato relativamente ao L-aspartato, permite também a obtenção de meio onde ocorre boa produção das substâncias S₂₆₀ e bom crescimento do *A. amstelodami*.

Concentração da fonte de fósforo

A Tabela IV contém os resultados obtidos ao se estudar a influência da concentração da fonte de fósforo na produção do material S₂₆₀ e crescimento microbiano em meio contendo D-frutose como fonte de carbono e energia e nitrato de potássio como fonte de nitrogênio. A concentração de potássio foi mantida constante pela adição de sulfato de potássio.

Influência da concentração de sódio

A Tabela V contém os resultados obtidos ao se estudar o efeito da adição de sódio, na forma de sulfato de sódio, no crescimento do *A. amstelodami* e produção das substâncias S₂₆₀ no meio básico 3 contendo D-frutose como fonte de carbono, nitrato de potássio como fonte de nitrogênio, e sem o ortofosfato dipotássico.

Esta Tabela mostra que a presença de sódio estimula a produção do material S_{260} e o crescimento do bolor, conseguindo-se aumento da ordem de 22% na produção e de 8% no crescimento, na presença de 0,020 eq. g/l deste cátion. Maiores concentrações de sódio praticamente não alteram o estímulo inicial.

A Figura 1 mostra as curvas de produção do material S_{260} e crescimento do *A. amstelodami* no meio desenvolvido, ou seja, contendo por litro: 50 g de D-frutose, 6,067 g (60mM) de KNO_3 , 1,421 g (10mM) de Na_2SO_4 , 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 mg de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 mg de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 mg de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 5 mg de $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ e 1 g de extrato de levedo.

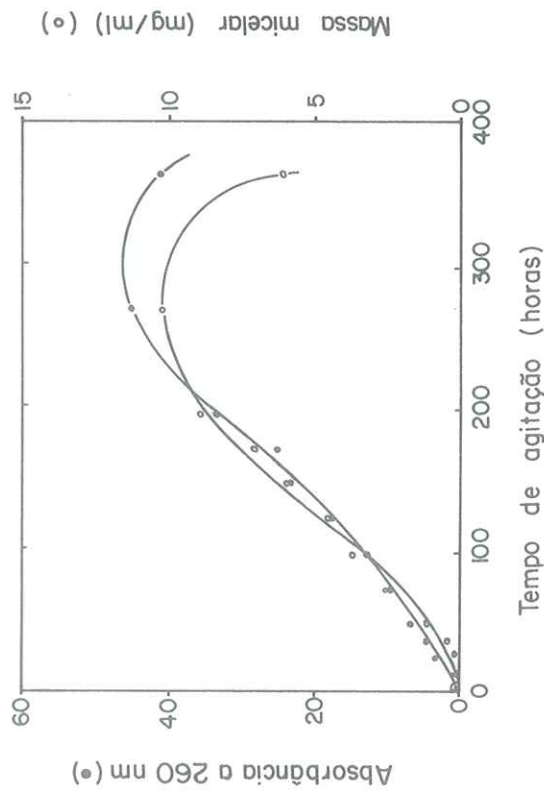


FIG. 1 — Curvas de crescimento do *Aspergillus amstelodami* e produção do material S_{260} no meio desenvolvido.

Observa-se nesta Figura que o crescimento máximo é obtido após 270 horas de agitação e a produção máxima das substâncias que absorvem no UV após 290 horas.

DISCUSSÃO

A Figura 1 indica que o crescimento do *A. amstelodami* e o aparecimento do material S_{260} no caldo fermentado são processos simultâneos em todas as fases do desenvolvimento microbiano. Este fato confirma resultados anteriores obtidos com o *Streptomyces aureofaciens* (8) e o *Aspergillus niger* (10) e mostra novamente

Esta Figura indica ainda que o crescimento máximo é obtido após 270 horas de agitação e a produção máxima após 290 horas, com aumento de 55% no crescimento e de 91% na produção quando comparados com os valores obtidos em experimento de 170 horas de agitação.

A Tabela 1, que contém os resultados obtidos ao se estudar a influência da fonte de carbono e energia no crescimento do

bolor e na produção do material S_{260} , indica que vários açúcares servem como fonte daquele elemento químico, sendo a D-frutose e a maltose os mais adequados entre os estudados. Esta Tabela mostra ainda a influência de vitaminas, encontradas no extrato de levedo, como estimulantes do crescimento microbiano e da produção das substâncias S_{260} . Este fato reforça a observação inicial de que a produção está diretamente relacionada ao crescimento do microorganismo.

Tendo-se constatado a equivalência da D-frutose e da maltose tanto para a produção do material S_{260} quanto para o crescimento do *A. amstelodami*, quando se usa o meio básico 3, optou-se pela D-frutose ao se fazer o estudo das melhores fontes de nitrogênio, Tabelas II e III, quando se constatou que as maiores produções são obtidas com este glicídio como fonte de carbono, quando se usa a mesma exceções apenas a uréia e a DL-alanina com as quais a maltose permite maiores produções do material S_{260} .

A Tabela II mostra que, ao se usar D-frutose como fonte de carbono, várias substâncias servem como fonte de nitrogênio para o crescimento microbiano e produção do material, destacando-se a mistura de sulfato de amônio com L-aspartato de potássio, o nitrato de potássio, o L-aspartato de potássio, a mistura de sulfato de amônio com carbonato de cálcio e outras substâncias com menor produção.

Esta Tabela ainda mostra que ao se substituir o sulfato de amônio por misturas deste sal com L-aspartato de potássio ou carbonato de cálcio há aumento na produção do material S_{260} , superior a 200% em ambos os casos, fato este relacionado com o pH final mais favorável e já observado anteriormente (8 e 10).

A Tabela III mostra que, ao se usar maltose como fonte de carbono e energia, substâncias como a uréia, a DL-alanina, o L-aspartato, a glicina, o nitrato de potássio e misturas como o sulfato de amônio com carbonato de cálcio e o sulfato de amônio com L-aspartato de potássio permitem produções do material S_{260} bem superiores à produção obtida com o sulfato de amônio isoladamente.

Nesta Tabela observa-se novamente estímulo na produção do material, no caso superior a 100%, quando a fonte de nitrogênio é constituída por misturas de sulfato de amônio com carbonato ou L-aspartato, ao invés de unicamente o sulfato de amônio.

Com relação à influência de fosfato, a Tabela IV indica, através da "produção específica", razão entre a A_{260} e a massa micelar, que diminui conforme aumenta a concentração inicial de fosfato, que o *Aspergillus amstelodami* secreta para o meio de cultura precursores de ácidos nucleicos devido à deficiência de fosfato para a produção de nucleosídeos trifosfatos, necessários à síntese destas macromoléculas. Fatos idênticos já haviam sido observados com o *Streptomyces aureofaciens* (8) e com o *Aspergillus niger* (10).

Na Tabela V observamos que a presença de sódio estimula o crescimento do microorganismo (8%) e a produção das substâncias S_{260} (22%) quando na concentração de 20 meq. g/l. Observou-se ainda que maiores concentrações deste cátion praticamente não alteram o estímulo inicial.

A análise do caldo fermentado pelo *A. amstelodami*, através de cromatografia de troca-iônica, cromatografia em papel e espectrofotometria ultravioleta, indica, de maneira semelhante aos trabalhos com *Streptomyces aureofaciens* (8) e *Aspergillus niger* (10), a presença de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos, como será visto em publicação posterior.

CARVALHO, A. de et alii. UV absorbing substances production by *Aspergillus amstelodami* in relation to media composition. *Ecl. Quim.*, São Paulo, 6:21-28, 1981.

ABSTRACT: Simple, undefined, liquid media suitable for *A. amstelodami* growth with accumulation of UV absorbing substances, were investigated and established. Growth and material secretion were found to be simultaneous on all growth phases. The most suitable carbon and energy sources, in the media, are: D-fructose, maltose, lactose and D-mannose.

With D-fructose, as C-source, several assimilable nitrogen compounds were convenient for both growth and UV-substances accumulation, with prevalence of ammonium sulfate-potassium L-aspartate, potassium nitrate, potassium L-aspartate and ammonium sulfate buffered with calcium carbonate.

Phosphate concentration is the important variable controlling the UV absorbing substances accumulation.

The medium giving maximal production have the following composition, per liter: D-fructose 50g; KNO_3 6,067g (60mM); Na_2SO_4 1,421 g (10mM); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10 mg; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 mg and yeast extract 1,0 g. Growth and accumulation maxima occurred at 170 and 290 hours, respectively.

KEY-WORDS: *Aspergillus amstelodami*; UV-absorbing substances.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SCHWARTZ, J.; MARGALITH, P. — *Biotechnol. Bioeng.*, 1973, 15 (1), 85-91.
2. MISAWA, M.; NARA, T.; KINOSHITA, S. — *Agr. Biol. Chem.*, 1970, 34 (4), 617-626.
3. NAKAYAMA, K.; SATO, Z.; TANAKA, H.; KINOSHITA, S. — *Agr. Biol. Chem.*, 1968, 32 (11), 1331-1336.
4. ISHII, K.; SHIHO, I. — *Agr. Biol. Chem.*, 1973, 37 (2), 287-300.
5. DEMAIN, A.L.; JACKSON, M.; VITALI, R.A.; HENDLIN, D.; JACOB, T.A. — *Appl. Microbiol.*, 1966, 14 (5), 821-825.
6. NARA, T.; MISAWA, M.; KINOSHITA, S. — *Biotechnol. Bioeng.*, 1968, 10 (3), 277-289.
7. MAGASANIK, B.; BROOKE, M. — *J. Biol. Chem.*, 1954, 206, 83-87.
8. CARVALHO, A.; MOLINARI, R. — *Rev. Bras. Tecnol.*, 1976, 7 (3), 289-296.
9. CARVALHO, A.; OLIVEIRA, P.L.C.; MOLINARI, R. — *Ecl. Quim.*, 1977, 2, 47-60.
10. CARVALHO, A.; FARIA, C.R.; MOLINARI, R. — *Ecl. Quim.*, 1978, 3, 55-67.
11. CARVALHO, A.; MOLINARI, R. — *Ecl. Quim.*, 1979, 4, 65-69.
12. CARVALHO, A.; SITA, W.; MOLINARI, R. — *Ecl. Quim.*, 1980, 5, 63-70.
13. BENDICH, A. — Methods for characterization of nucleic acids by base composition. In: COLOWICK, S.P.; KAPLAN, N.O., — *Methods in enzymology*; Academic Press, New York, 1957; v.3, pp. 715-723.
14. HERBST, E.J.; DOCTOR, B.P. — *J. Biol. Chem.*, 1959, 234 (6), 1497-1500.
15. SIMUTH, J.; ZELINKA, J. — *J. Antibiot.*, 1970, 23 (5), 242-249.