

THIARA SIQUEIRA BENTO

Atividade antifúngica de extrato de *Casearia sylvestris* Swartz e *Casearia decandra* Jacq e seus efeitos sobre o metabolismo enzimático de três espécies de basidiomicetos deterioradores de madeira

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2013

THIARA SIQUEIRA BENTO

Atividade antifúngica de extrato de *Casearia sylvestris* Swartz e *Casearia decandra* Jacq e seus efeitos sobre o metabolismo enzimático de três espécies de basidiomicetos deterioradores de madeira

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

Orientadora: Prof^a Dr^a VERA LÚCIA RAMOS BONONI

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Bento, Thiara Siqueira

B478a Atividade antifúngica de extrato de *Casearia sylvestris* Swartz e *Casearia decandra* Jacq e seus efeitos sobre o metabolismo enzimático de três espécies de basidiomicetos deterioradores de madeira / Thiara Siqueira Bento -- São Paulo, 2013.
121 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2013

Bibliografia.

1. Basidiomicetos. 2. Fungos ligninolíticos. 3. Enzimas oxidativas. I. Título

CDU: 582.284

“Aqui estão os loucos. Os desajustados. Os rebeldes. Os criadores de caso. Os pinos redondos nos buracos quadrados. Aqueles que vêm as coisas de forma diferente. Eles não curtem regras. E não respeitam o status quo. Você pode citá-los, discordar deles, glorificá-los ou caluniá-los. Mas a única coisa que você não pode fazer é ignorá-los. Porque eles mudam as coisas. Empurram a raça humana para a frente. E, enquanto alguns os vêem como loucos, nós os vemos como geniais. Porque as pessoas loucas o bastante para acreditar que podem mudar o mundo, são as que o mudam.”

Jack Kerouac

*Aos meus pais Clodoaldo e Danubia
e ao meu irmão Thiago, Dedico.*

AGRADECIMENTOS

De todas as etapas da redação de uma dissertação, o item *Agradecimentos* é certamente o mais desafiador, pois, embora não dependa de embasamento científico, experimentação e comprovação estatística, é nele que exercitamos a memória para não nos esquecermos de retribuir em palavras a contribuição particular de cada pessoa.

Assim meus sinceros agradecimentos:

À Dra. Vera Lúcia Ramos Bononi, pela orientação e confiança, durante a iniciação científica e todo o mestrado;

À Dra. Luce Maria Brandão Torres, pela colaboração no projeto e principalmente pela amizade conquistada durante todos esse anos em que me co-orientou. Incomparável a sua infinita bondade que me guiou diante do seu grande conhecimento;

Ao Dr. Mauricio Batista Fialho, pela colaboração no projeto, pelo exemplo profissional, ensinamentos, presença motivadora, valiosas sugestões durante o trabalho e sem dúvida pela paciência.

À todo o pessoal do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, em especial à Mary Monteiro, pelo acolhimento no laboratório, empréstimos de equipamentos e pela disposição em sempre me ajudar.

Ao pessoal do Laboratório de Micologia Aplicada, Marina Bianchini, Luciana Gimenes, William Okada, pelos ensinamentos, conselhos e ajudas. Em especial à Paulinha Paranhos pela grande parceria e amizade.

Às pesquisadoras do Núcleo de Micologia, Dra. Vera Vitali e Dra. Adriana Gugliotta, pela incontestável ajuda sempre que precisei.

Às grande amigas feitas no Alojamento, Michel Colmanetti, Aline Caetano, Raquel Crisma, Tiemi Sakano, Patricia Araújo, Pedro Bond, Guilherme Scotta, Levi Machado, Simone Silva, Gisele Caroline, Viviana Motato, Ana Cristina, Samanta Faustino, Talita Amador, Gustavo Jerônimo, Helisvania Moraes. Enfim, à todos que passaram por lá e que com certeza deixaram um pouquinho de si e levaram um pouquinho de mim.

As grandes amigas “irmãs” que ganhei com a dissertação: Daiane Teixeira, Majoi Nascimento e Julyana Farias. O tempo que passamos juntas foi o suficiente para construirmos uma grande amizade. Certamente não haverão fronteiras que impedirão nossas poucas e boas risadas. Podemos escrever um livro (de comédia, claro!!) com as nossas histórias... Ao Marco Raczka que está sendo injustiçado por ser colocado junto com as “irmãs”, mas que se tornou um grande “irmão”!! Surgiu ao longo desse ano e, mesmo não convivendo no laboratório, de alguma forma, sempre esteve presente no trabalho, principalmente ao acesso aos papers.

Às grandes amigas Vanessa Fuentes, Marina Veronesi e Ana Livia Negrão pelos momentos de descontração, companhia, conselhos e nossas conversas quase sempre produtivas.

Aos amigos do “surf”, Vanessa Fuentes, Danilo Centeno e Rodrigo Cabral, pelos finais de semana engraçadíssimos e pelas conversas nunca produtivas.

Aos meus amigos que mesmo não participando diretamente na produção dessa dissertação com certeza foram indispensáveis, Suzana Macedo, Clarissa Kawakami, Fernando Andrade, Seiko Imai, Ana Teixeira e Ariana Carmona pelo companheirismo, pela amizade, pelos momentos de diversões e risos, e que mesmo não entendendo o que eu faço, escutaram-me inúmeras vezes e ajudaram-me em tudo o que foi possível.

Aos meus pais, Clodoaldo e Danubia, que sempre primaram pela minha educação e por além de me oferecem a oportunidade de estudar, sempre foram presentes e me ensinaram principalmente que a vida é um eterno aprender. Ao meu irmão Thiago que sempre me apoiou em todas as minhas escolhas, e à Cintia Vaz nossa agregada da família.

Ao Instituto de Botânica, pela oportunidade e auxílio.

À Capes pelo auxílio financeiro através da bolsa de mestrado.

RESUMO

Os fungos ligninolíticos são importantes no processo de reciclagem de nutrientes e na manutenção de ecossistemas naturais. Em determinadas condições ambientais, esses fungos podem se tornar fitopatogênicos atacando troncos e raízes de árvores. A flora brasileira possui espécies com grande potencial na prospecção de compostos naturais com atividade antifúngica, os extratos que apresentam essa atividade são de particular interesse no estudo de controle de outros fungos fitopatogênicos, tais como os apodrecedores de árvores urbanas. Esses extratos poderiam ser utilizados, posteriormente, como insumos naturais fungicidas ambientalmente menos agressivos que os biocidas químicos. O objetivo do trabalho foi estudar os efeitos dos extratos vegetais de *Casearia sylvestris* e *Casearia decandra* contra os fungos *Trametes villosa*, *Ganoderma australe* e *Pycnoporus sanguineus*. Os extratos de *C. sylvestris* e *C. decandra* inibiram o desenvolvimento fúngico *in vitro* e alteraram a morfologia (macroscópica e microscópica) dos fungos *T. villosa*, *P. sanguineus* e *G. australe*. Esses fungos foram mais suscetíveis ao extrato de *C. sylvestris* do que ao extrato de *C. decandra*, pela evidente diferença na composição química apresentada entre esses dois extratos. Os prováveis mecanismos de ação na atividade fungistática dos extratos foi a inibição das enzimas extracelulares, MnP, lacase e fenoloxidasas, e das enzimas intracelulares envolvidas na formação do micélio fúngico, como quitinase e β -1,3-glucanase. Além disso, o aumento nos níveis das enzimas catalase e glutathione redutase indicaram que a exposição dos fungos aos extratos desencadeou processos de estresse oxidativo. Portanto, o presente trabalho fornece subsídios para estudos futuros no intuito de elucidar com maiores detalhes como compostos presentes em extratos de plantas nativas, tanto isoladamente como em sinergia, podem afetar a fisiologia e controlar o desenvolvimento de fungos.

Palavras-chave: *Trametes villosa*, *Pycnoporus sanguineus*, *Ganoderma australe*, fungos ligninolíticos, enzimas oxidativas, morfogênese e estresse oxidativo

ABSTRACT

The ligninolytic fungi are important in the process of recycling nutrients and maintaining natural ecosystems. Under certain environmental conditions, these fungi can become pathogenic attacking trunks and roots of trees. The Brazilian flora has species with great potential in prospecting for natural compounds with antifungal activity. The extracts that have activity are of particular interest in the study for the control of some pathogenic fungi, such as the decay of urban trees. These extracts could be used later as inputs natural fungicides that are less environmentally aggressive than chemical biocides. The aim of this study was to evaluate the mechanisms of action from plant extracts of *Casearia sylvestris* and *Casearia decandra* against fungi *Trametes villosa*, *Ganoderma australe* and *Pycnoporus sanguineus*. The extracts of *C. sylvestris* and *C. decandra* inhibited fungal growth in vitro and altered morphology (macroscopic and microscopic) of the fungus *T. villosa*, *P. sanguineus* and *G. australe*. These fungi were more susceptible to the extract of *C. sylvestris* than to extract *C. decandra*, seen by the evident difference in chemical composition between these two extracts presented. The probable mechanism of action working in antimicrobial activity of the extracts the inhibition of extracellular enzymes MnP, laccase and phenoloxidases, and important intracellular enzymes involved in the formation of the fungal mycelium as chitinase and β -1,3-glucanase. Furthermore, increased levels of catalase and glutathione reductase indicated that exposure to fungal extracts triggered increased levels of reactive oxygen species, leading to oxidative stress processes. Therefore, this study may provide insights for future works in order to elucidate in greater detail how these compounds from extracts of native plants, both alone and in synergy with other compounds, can affect the physiology and control the growth of fungi.

Key words: *Trametes villosa*, *Pycnoporus sanguineus*, *Ganoderma australe*, ligninolytic fungi, oxidative enzyme, morphogenesis and oxidative stress

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$ - Oxigênio singlet

ABTS – Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfônico)

ACN – Acetonitrila

ADNS – Ácido 3,5 - dinitrosacílico

ASB – Albumina de Soro Bovino

ASE – Automatic System Extraction

BDA – Batata-Dextrose-Agar

BSTFA – N,O – Bis (Trimetilsilil) trifluoroacetamida

CAT – Catalase

CCIBt – Coleção de Cultura de algas, cianobactérias e fungos do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente

CG – MS – Cromatografia a gás acoplada com espectrômetro de massa

CH₃COOH – ácido acético

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-DAD – Cromatografia de Alta Eficiência acoplada ao detector de arranjos de diodos

Cu⁺ - íon de cobre

Cu²⁺ - íon de cobre (forma reduzida)

Da – Unidade Dalton

DTNB – 2-ácido nitrobenzóico

DTT – Ditioneitol

EAOs – Espécies ativas de oxigênio

EDTA – Ácido etileno diamino tetracético

eV – eletrovolts

FAD – flavina adenina dinucleotídeo (forma oxidada)

Fe³⁺ - íon de ferro (forma oxidada)

Fe⁴⁺ - íon de ferro (forma reduzida)

g – grama

GPx – Glutathione peroxidase

GR – Glutathione reductase

GSH – Glutathione (forma reduzida)

GSSG – Glutathione (forma oxidada)

GST – glutathione S-transferase

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

HO[•] - radical hidroxila

IAF – Índice antifúngico

KOH – Hidróxido de Potássio

LiP- Lignina-peroxidase

M – Molaridade

m/z – massa sobre carga

MeOH – metanol

mL – mililitro

mm – milímetros

mM – Milimolar

Mn⁺² – íon manganês (forma oxidada)

Mn⁺³ - íon manganês (forma reduzida)

MnP – Manganês-peroxidase

N – Normalidade

NAD⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)

NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)

nm – nanômetro

O₂^{•-} - ânion radical superóxido

PM – peso molecular

rpm – rotações por minuto

SOD – Superóxido dismutase

TIC – Cromatograma de íons Totais

Tr – Tempo de retenção

U – Unidade de atividade enzimática

UV – ultravioleta

Vis – visível

ϵ – coeficiente de absorção molar

λ – lâmbida

μm – micrômetro

mg.mL^{-1} – miligrama por mililitro

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Picos majoritários detectados na análise do extrato de <i>C. sylvestris</i> através de CLAE analítico com os seus respectivos tempo de retenção (Tr) e áreas integrais dos picos (%).....	29
Tabela 2 – Picos majoritários detectados na análise do extrato de <i>C. decandra</i> através de CLAE analítico com os seus respectivos tempo de retenção (Tr) e áreas integrais dos picos (%).....	29
Tabela 3 – Picos detectados na análise do extrato de <i>C. sylvestris</i> através de CLAE – DAD com os seus respectivos tempo de retenção (Tr) e abundância relativa (%)..	33
Tabela 4 – Compostos identificados com % de probabilidade de acordo com a biblioteca NIST, Tr (min), pesos e fórmulas moleculares e íons fragmentos (m/z) detectados na ordem decrescente de abundância relativa (%) do extrato de <i>C. sylvestris</i>	36
Tabela 5 – Compostos identificados com % de probabilidade de acordo com a biblioteca NIST, Tr (min), pesos e fórmulas moleculares e íons fragmentos (m/z) detectados na ordem decrescente de abundância relativa (%) do extrato de <i>C. decandra</i>	37
Tabela 6 – Índice antifúngico (IAF%) da colônia dos fungos expostos ao extrato de <i>C. sylvestris</i>	38
Tabela 7 – Índice antifúngico (IAF%) da colônia dos fungos expostos ao extrato de <i>C. decandra</i>	40

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Representação esquemática de uma célula vegetal: Lamela média (LM); Parede primária (P); Parede secundária externa (S1); Parede secundária média (S2); Parede secundária interna (S3); Lúmen (L) (Fengel & Wegener 1989)	3
Figura 2 – Estrutura de um fragmento de celulose	3
Figura 3 – Ação sinérgica das enzimas envolvidas na degradação da celulose.....	6
Figura 4 – Principais enzimas responsáveis pela degradação da hemicelulose.....	7
Figura 5 – Ciclo catalítico da enzima lignina – peroxidase (LiP).....	8
Figura 6 – Ciclo catalítico da enzima peroxidase dependente de manganês (MnP). RH representa um substrato fenólico.....	9
Figura 7 – Ciclo catalítico de lacase. PhOH representa um substrato fenólico. A estequiometria do ciclo envolve 4 Cu ²⁺ (normalmente ligados a uma única proteína ou a 2 cadeias proteicas acopladas), 4 substratos fenólicos, 4 prótons e 1 molécula de O ₂	9
Figura 8 – Estrutura e componentes da parede celular fúngica.....	14
Figura 9 – Algumas vias de formação de EAOs e defesas antioxidantes.....	16
Figura 10 – Fungos <i>Trametes villosa</i> (A); <i>Ganoderma australe</i> (B) e <i>Pycnoporus sanguineus</i> (C).....	18
Figura 11 – Detalhes das folhas de <i>Casearia decandra</i> (A) e <i>Casearia sylvestris</i> (B).....	19
Figura 12 – Esquema ilustrativo do bioensaio antifúngico em meio sólido (BDA, enriquecido com bagaço de cana) utilizando membrana de celofane.....	22
Figura 13 – Regiões da zona de avanço aonde foram analisadas as microestruturas morfológicas dos fungos estudados.....	28
Figura 14 – Cromatograma do extato de <i>C. sylvestris</i> obtido por CLAE analítico, os números de 1 – 15 indicam os picos majoritários apresentados na Tabela 1. Condições cromatográficas: fase móvel composta por 0,1% de ácido acético em água e acetronitrila, fluxo de 0,6 mL/min, coluna C18 Pursuit® (250 mm x 4,6 mm, 5µm) e detector a 254nm.....	30

Figura 15 – Cromatograma do extrato de <i>C. decandra</i> obtido por CLAE analítico, os números de 1 – 7 indicam os picos majoritários apresentados na Tabela 2. Condições cromatográficas: fase móvel composta por 0,1% de ácido acético em água e acetronitrila, fluxo de 0,6 mL/min, coluna C18 Pursuit® (250 mm x 4,6 mm, 5µm) e detector a 254nm.....	31
Figura 16 – Expansão do cromatograma do extrato de <i>C. sylvestris</i> entre os Tr 20 – 48 min obtido através de CLAE – DAD. A fase móvel foi composta de eluente A: 0,1% de ácido acético em água ultrapura, eluente B – metanol e eluente C – acetoneitrila.....	32
Figura 17 – Espectro no UV do pico 10 (Tr = 25,5 min) relativo ao diterpeno no cromatograma do extrato de <i>C. sylvestris</i>	34
Figura 18 – Cromatogramas dos extratos de <i>C. sylvestris</i> (A) e <i>C. decandra</i> (B), obtidos por CG – MS, indicando os picos majoritários. Os números correspondem aos compostos indicados nas Tabelas 4 e 5.....	35
Figura 19 – Efeito dos extratos <i>C. sylvestris</i> e <i>C. decandra</i> no crescimento micelial dos fungos, durante 16 dias de cultivo em meio BDA a 25 °C. O tempo 0 indica o momento em que a colônia fúngica (4 dias de crescimento) foi transferida para novo meio na presença do extrato.....	39
Figura 20 – Efeito dos extratos <i>C. sylvestris</i> e <i>C. decandra</i> na produção de biomassa dos fungos, durante 16 dias de cultivo em meio BDA a 25 °C. O tempo 0 indica o momento em que a colônia fúngica (4 dias de crescimento) foi transferida para novo meio na presença do extrato.....	42
Figura 21 – Efeito dos extratos de <i>C. sylvestris</i> e <i>C. decandra</i> sobre a concentração de proteínas extracelulares presentes no meio de cultivo dos fungos durante os 16 dias em meio BDA a 25 ± 2°C. O tempo 0 indica o momento em que a colônia fúngica (4 dias de crescimento) foi transferida para novo meio na presença do extrato.....	45
Figura 22 – Efeito dos extratos de <i>C. sylvestris</i> e <i>C. decandra</i> sobre a concentração de proteínas intracelulares dos fungos cultivados durante os 16 dias em meio BDA a 25 ± 2°C. O tempo 0 indica o momento em que a colônia fúngica (4 dias de crescimento) foi transferida para novo meio na presença do extrato.....	46
Figura 23 - Efeito dos extratos de <i>C. sylvestris</i> e <i>C. decandra</i> sobre a enzima MnP dos fungos cultivados durante os 16 dias em meio BDA a 25 ± 2°C. O tempo 0 indica o momento em que a colônia fúngica (4 dias de crescimento) foi transferida para novo meio na presença do extrato.....	49
Figura 24 – Efeito dos extratos de <i>C. sylvestris</i> e <i>C. decandra</i> sobre a enzima lacase dos fungos cultivados durante os 16 dias em meio BDA a 25 ± 2°C. O tempo	

0 indica o momento em que a colônia fúngica (4 dias de crescimento) foi transferida para novo meio na presença do extrato.....	50
Figura 25 – Efeito dos extratos de <i>C. sylvestris</i> e <i>C. decandra</i> sobre a enzima fenoloxidasas dos fungos cultivados durante os 16 dias em meio BDA a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. O tempo 0 indica o momento em que a colônia fúngica (4 dias de crescimento) foi transferida para novo meio na presença do extrato.....	51
Figura 26 – Efeito dos extratos de <i>C. sylvestris</i> e <i>C. decandra</i> sobre a enzima quitinase dos fungos cultivados em meio BDA durante 16 dias a $25 \pm 2^\circ\text{C}$	54
Figura 27 – Efeito dos extratos de <i>C. sylvestris</i> e <i>C. decandra</i> sobre a enzima β -1,3-glucanase dos fungos cultivados em meio BDA durante 16 dias a $25 \pm 2^\circ\text{C}$	55
Figura 28 – Efeito dos extratos de <i>C. sylvestris</i> e <i>C. decandra</i> sobre a enzima CAT dos fungos cultivados em meio BDA durante 16 dias a $25 \pm 2^\circ\text{C}$	58
Figura 29 – Efeito dos extratos de <i>C. sylvestris</i> e <i>C. decandra</i> sobre a enzima GR dos fungos cultivados em meio BDA durante 16 dias a $25 \pm 2^\circ\text{C}$	59
Figura 30 – <i>T. villosa</i> com extrato de <i>C. sylvestris</i> (aumento 400x). Tempo 4 – (a) Controle – hifas generativas sem ramificações e ansas; (b) $0,1\text{mg.mL}^{-1}$ – hifas generativas ramificadas com muitas ansas; Tempo 8 – (c) Controle – detalhe de uma hifa generativa com ansa, presença de cristal; (d) $0,1\text{mg.mL}^{-1}$ – hifas tortuosas muito ramificadas com formações de ansas; Tempo 12 – (e) Controle – detalhe de uma hifa generativa com ansa; (f) $0,1\text{mg.mL}^{-1}$ – hifas tortuosas; Tempo 16 – (g) Controle – detalhe das hifas esqueléticas; (h) $0,1\text{mg.mL}^{-1}$ – detalhe das protuberâncias e hifas tortuosas.....	62
Figura 31 – <i>P. sanguineus</i> com extrato de <i>C. sylvestris</i> (aumento 400x). Tempo 4 – (a) Controle – hifas generativas ramificadas com ansas; (b) $0,1\text{mg.mL}^{-1}$ – hifas tortuosas com muitas ramificações e ansas com pequenos intervalos nas hifas; Tempo 8 – (c) Controle – hifas com clamidósporos intercalares e terminais; (d) $0,1\text{mg.mL}^{-1}$ – hifas tortuosas com clamidósporos intercalares, bem ramificadas com formações de ansas; Tempo 12 – (e) Controle – hifas generativas com clamidósporos e hifas esqueléticas; (f) $0,1\text{mg.mL}^{-1}$ – detalhes das hifas tortuosas com ansas e clamidósporos terminais; Tempo 16 – (g) Controle – hifas esqueléticas; (h) $0,1\text{mg.mL}^{-1}$ – detalhe das hifas generativas tortuosas com ansas.....	63
Figura 32 – <i>T. villosa</i> com extrato de <i>C. decandra</i> (aumento 400x). Tempo 4 – (a) Controle – hifas generativas pouco ramificadas com ansas e presença de cristal; (b) $0,1\text{mg.mL}^{-1}$ – hifas pouco ramificadas com ansas e presença de cristal; Tempo 8 – (c) Controle – hifas ramificadas com ansas; (d) $0,1\text{mg.mL}^{-1}$ – detalhe das hifas retas com ansas; Tempo 12 – (e) Controle – hifas generativas geralmente retas com ansas; (f) $0,1\text{mg.mL}^{-1}$ – hifas generativas com ansas; Tempo 16 – (g) Controle –	

detalhe das hifas generativas com ansas **(h)** 0,1mg.mL⁻¹ – hifa reta com detalhe de uma ansa e mostrando a formação de ansas.....

64

Figura 33 - *P. sanguineus* com extrato de *C. decandra* (aumento 400x). Tempo 4 – **(a)** Controle – hifas generativas ramificadas com ansas e presença de cristal; **(b)** 0,1 mg.mL⁻¹ – hifas pouco tortuosas ramificadas com muitas ansas e presença de cristal; Tempo 8 – **(c)** Controle – hifas ramificadas com ansas e clamidósporos intercalares; **(d)** 0,1 mg.mL⁻¹ – hifas retas, ramificadas com ansas; Tempo 12 – **(e)** Controle – hifas generativas com clamidósporos intercalares e hifas esqueléticas; **(f)** 0,1 mg.mL⁻¹ – detalhe mostrando as hifas retas com ansas e presença de cristal; Tempo 16 – **(g)** Controle – hifas generativas e hifas esqueléticas **(h)** 0,1 mg.mL⁻¹ – hifas generativas retas com ansas.....

65

ÍNDICE

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE ABREVIATURAS DE SIGLAS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
1.1.1. Composição química e ultraestrutura da madeira	2
1.1.1.1. Celulose	3
1.1.1.2. Hemicelulose	4
1.1.1.3. Lignina	4
1.1.2. Degradação da madeira por fungos	5
1.1.2.1. Enzimas envolvidas na degradação da madeira	6
1.1.3. Prejuízos econômicos e controle de fungos degradadores de madeira .	10
1.1.4. O gênero <i>Casearia</i> e seus metabólitos secundários	12
1.1.5. Efeito de compostos antifúngicos sobre a biossíntese de componentes celulares	13
1.1.6. Estresse oxidativo e defesas antioxidantes	14
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	18
3.1.1. Fungos	18
3.1.2. Espécies Vegetais e Obtenção dos extratos	18
3.2. ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS DOS EXTRATOS	19
3.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	19
3.2.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de arranjos de diodos (CLAE – DAD)	20
3.2.3. Cromatografia a Gás acoplada com espectrômetro de massa (CG- MS)	20
3.3. BIOENSAIO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA .	21
3.3.1. Preparação dos pré-inóculos	21
3.3.2. Bioensaio da atividade antifúngica dos extratos vegetais	21
3.3.3. Determinação do crescimento micelial e biomassa fúngica	22
3.4. QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	23
3.4.1. Extração enzimática do meio sólido	23

3.4.2. Lacase	23
3.4.3. Fenoloxidase	24
3.4.4. Peroxidases	24
3.4.5. Manganês peroxidase	24
3.5. QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA INTRACELULAR RELACIONADA A MORFOGÊNESE E AO ESTRESSE OXIDATIVO	25
3.5.1. Obtenção do extrato proteico	25
3.5.2. Quitinase	25
3.5.3. β -1,3-glucanase	26
3.6. DETERMINAÇÃO DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES	26
3.6.1. Catalase (CAT)	26
3.6.2. Glutathiona redutase (GR)	27
3.7. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS	27
3.8. ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS FUNGOS POR MICROSCÓPIA ÓPTICA	28
3.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS	28
4. RESULTADOS	29
4.1. Análises dos extratos vegetais em CLAE	29
4.2. Análises dos extratos vegetais em CLAE-DAD	32
4.3. Análises dos extratos vegetais por CG – MS	34
4.4. Efeito dos extratos de <i>C. sylvestris</i> e <i>C. decandra</i> sobre o crescimento micelial e produção de biomassa	38
4.5. Efeito dos extratos de <i>C. sylvestris</i> e <i>C. decandra</i> sobre a síntese de proteínas	43
4.6. Efeito dos extratos de <i>C. sylvestris</i> e <i>C. decandra</i> sobre a atividade das enzimas ligninolíticas	47
4.7. Efeito dos extratos de <i>C. sylvestris</i> e <i>C. decandra</i> sobre a atividade das enzimas associadas à morfogênese	52
4.8. Efeito dos extratos de <i>C. sylvestris</i> e <i>C. decandra</i> sobre a atividade das enzimas associadas ao estresse oxidativo	56
4.9. Efeito dos extratos de <i>C. sylvestris</i> e <i>C. decandra</i> sobre a morfologia microscópica dos fungos	60
5. DISCUSSÃO	66

5.1. Extratos padronizados de <i>C. sylvestris</i> e <i>C. decandra</i> utilizados nos ensaios antifúngicos. Perfis cromatográficos obtidos por CG-MS, CLAE e CLAE-DAD	66
5.2. Efeito dos extratos de <i>C. sylvestris</i> e <i>C. decandra</i> sobre a síntese de proteínas	67
5.3. Efeito dos extratos de <i>C. sylvestris</i> e <i>C. decandra</i> sobre a atividade das enzimas ligninolíticas	70
5.4. Efeito dos extratos de <i>C. sylvestris</i> e <i>C. decandra</i> sobre a atividade das enzimas associadas à morfogênese	72
5.5. Efeito dos extratos de <i>C. sylvestris</i> e <i>C. decandra</i> sobre a atividade das enzimas associadas ao estresse oxidativo	74
5.6. Efeito dos extratos de <i>C. sylvestris</i> e <i>C. decandra</i> sobre a morfologia microscópica dos fungos	77
6. CONCLUSÕES	78
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
8. ANEXOS	95

1. INTRODUÇÃO

A flora brasileira é rica em espécies que podem servir como fonte de novos compostos antifúngicos, naturais e ambientalmente menos agressivos. O potencial de utilização dessas espécies tem sido apontado em diversas publicações e os exemplos de sucesso têm estimulado a busca de novos bioprodutos (Torres *et al.* 2008). Em trabalho prévio “Extratos Vegetais no Controle de Fungos Apodrecedores de Árvores Urbanas” (Processo 2009/02454-3/ FAPESP) foi demonstrado que o extrato de *Casearia decandra* apresentou elevada atividade fungistática contra os fungos deterioradores de madeira *Ganoderma australe* (Fr.) Pat., *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel e *Pycnoporus sanguineus* (L.) Murril, inibindo totalmente o crescimento micelial desses basidiomicetos (Bento *et al.*, dados não publicados).

Estudos realizados no intuito de elucidar os mecanismos envolvidos na inibição de fungos causada por compostos de origem natural são escassos, embora tal conhecimento seja essencial no entendimento do processo e no desenvolvimento de métodos inovativos de controle como a geração de compostos biossintéticos com ação sítio-dirigida. A hipótese do presente trabalho é que os compostos vegetais atuem na inibição das enzimas associadas à morfogênese do micélio dos fungos, tais como quitinases, β -1,3-glucanases, enzimas estas envolvidas na síntese e estabilização da parede celular, na interação planta-patógeno, na defesa contra estresse, na resistência contra fungicidas e na degradação da lignina. Além disso, compostos antifúngicos podem desencadear processos que geram espécies ativas de oxigênio altamente reativas e danosas à célula. O estresse oxidativo provocado por espécies ativas de oxigênio são avaliadas por determinação da atividade das enzimas-chaves envolvidas na resposta de defesa e detoxificação das espécies ativas de oxigênio.

O entendimento dos processos envolvidos na inibição de fungos por compostos naturais irá permitir o desenvolvimento de agentes menos agressivos ao ambiente, capazes de atuar no controle de fungos fitopatogênicos e deterioradores de madeira de importância econômica. O presente trabalho tem como objetivos básicos avaliar o potencial antifúngico do extrato de *Casearia* spp. no controle dos fungos *T. villosa*, *G. australe*. e *P. sanguineus*, bem como estudar os mecanismos de ação envolvidos nos processos enzimáticos de inibição do crescimento fúngico.

1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1. Composição química e ultraestrutura da madeira

A composição química da madeira pode ser dividida em frações de baixa e elevada massas molares. A fração de baixa massa molar é composta por substâncias orgânicas, geralmente denominadas de extrativos (metabólitos secundários), e substâncias inorgânicas, que são sais de íons metálicos. Os extrativos compreendem vários compostos químicos que podem ser extraídos com solventes orgânicos, embora alguns deles também sejam solúveis em água. Estes compostos são responsáveis por características como odor, cor e sabor dos lignocelulósicos e estão presentes em pequenas quantidades, variando entre 2 e 8%. Como exemplos de extrativos, podemos citar: ceras, flavonóides, terpenóides, lignanas e ácidos graxos, que são encontrados livres ou esterificados. Os compostos inorgânicos estão presentes em quantidades ainda menores na madeira (cerca de 1%) (Fengel & Wegener 1989, Sjöström & Wetermark 1999).

As macromoléculas representam a quase totalidade dos tecidos vegetais, que são os polissacarídeos celulose, hemicelulose e a lignina. A integridade estrutural destes tecidos é atribuída à lamela média, uma camada que mantém as células adjacentes unidas entre si, a lamela média é altamente lignificada apresentando substâncias pécticas, principalmente no estágio inicial de formação. Sobre a lamela média depositam-se as primeiras camadas de celulose, formando as microfibras e constituindo a parede celular primária, que é continuamente depositada durante o crescimento em área da célula. A madeira desenvolve em seguida internamente uma parede celular secundária composta principalmente de celulose e lignina. De acordo com as orientações das microfibrilas de celulose, a parede secundária pode ser dividida em três camadas, denominadas S1, S2 e S3. As camadas da parede celular são constituídas de microfibrilas de celulose e da matriz. É interessante ressaltar que todos os constituintes da madeira estão intimamente associados e/ou ligados quimicamente, construindo todo o complexo celular (Higuchi 1985, Fengel & Wegener 1989) (Figura 1).

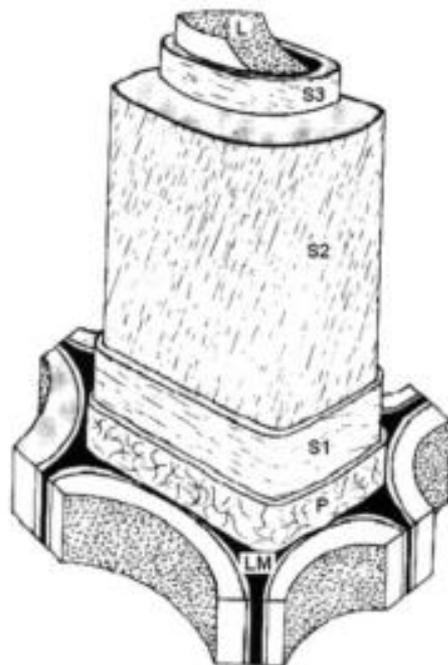


Figura 1 – Representação esquemática de uma célula vegetal: Lamela média (LM); Parede primária (P); Parede secundária externa (S1); Parede secundária média (S2); Parede secundária interna (S3); Lúmen (L) (Fengel & Wegener 1989).

1.1.1.1. Celulose

A celulose é o componente mais abundante na madeira (cerca de 50%), sendo um polímero linear, com regiões amorfas e cristalinas, formado exclusivamente por moléculas de anidroglicose, que se associam por ligações β -(1-4) glicosídicas (Figura 2). Estritamente, a celulose é composta por unidades monoméricas de celobiose que se repetem sempre apresentando o oxigênio que liga os anéis glicosídicos na posição equatorial (Fengel & Wegener 1989, Masarin 2010).

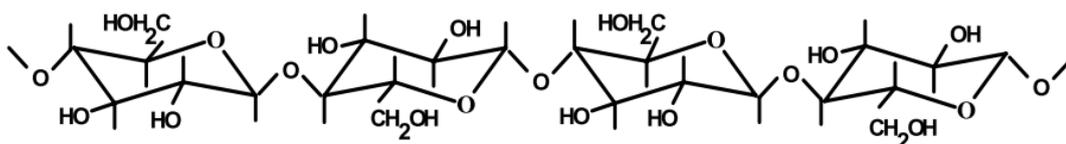


Figura 2 - Estrutura de um fragmento de celulose. (Masarin 2010).

As longas cadeias da celulose se unem lateralmente por pontes de hidrogênio entre grupos hidroxilas e originam as micelas, que unidas formam as fibrilas e irão constituir as paredes dos tecidos do xilema. As fibrilas dão à celulose uma estrutura ordenada e cristalina que é a responsável pela estabilidade térmica e baixa reatividade da madeira (Fengel & Wegener 1989, Gonzaga 2006).

1.1.1.2. Hemicelulose

Cinco açúcares neutros são os constituintes das hemiceluloses (polioses): glucose, manose, galactose, xilose e arabinose e alguns destes contêm adicionalmente ácidos urônicos. As cadeias moleculares das hemiceluloses são muito mais curtas do que as da celulose e podem conter grupos laterais e ramificações. As angiospermas “madeiras duras”, de maneira geral, contêm um maior teor de polioses do que as gimnospermas “madeiras moles” e uma composição diferenciada (Oliveira 1998). As hemiceluloses são polímeros amorfos, constituídos de uma cadeia central na qual se somam cadeias laterais e que atuam como matrizes para a imersão das cadeias de celulose. A associação de um grupo de cadeias de celulose envolvidas por moléculas de hemicelulose pode ser chamada de microfibrila (Fengel & Wegener 1989, Brisolari 2008).

1.1.1.3. Lignina

A lignina é o terceiro componente mais abundante presente na parede celular vegetal, é sintetizada a partir da polimerização dos álcoois hidroxicinâmicos (p-cumarílico, coniferílico e sinapílico). Os grupos hidroxilas reagem mutuamente ou com os grupos acetona ou com o aldeído. Quando a hidroxila reage com outra, forma-se uma ligação do tipo éter, quando ligada a um aldeído, forma-se um hemiacetal e quando se liga a uma acetona, forma-se o cetel (Palonen 2004).

As funções biológicas da lignina são: (1) fornecer suporte estrutural à parede secundária de plantas vasculares (a parede celular lignificada pode ser vista como um complexo, com microfibrilas de celulose e hemicelulose, e a lignina como uma “matriz plástica” conferindo resistência ao material lignocelulósico); (2) tornar a parede celular vegetal hidrofóbica, permitindo

o desenvolvimento eficiente dos tecidos para transporte de água em plantas vasculares; (3) conferir resistência contra ataques microbianos (Kuhad 1997, Lee 2003).

Devido ao processo de polimerização ser aleatório, a macromolécula de lignina possui estrutura bastante complexa. Sua complexidade estrutural apresenta-se como uma barreira à ação das celulasas e hemicelulasas (Oliveira 2009).

1.1.2. Degradação da madeira por fungos basidiomicetos

Os fungos basidiomicetos são reconhecidos como os únicos organismos capazes de mineralizar a molécula de lignina sendo, portanto, essenciais no processo de reciclagem da matéria orgânica e na manutenção dos ecossistemas naturais, sendo capazes de degradar um quinto da produção anual da biosfera terrestre. Baseado na coloração da madeira residual os basidiomicetos ligninolíticos podem ser classificados em dois grupos: os causadores de podridão parda e os de podridão branca. Os fungos de podridão parda removem a celulose e a hemicelulose da madeira, sendo também capazes de causar limitadas mudanças na lignina, dando ao material a cor acastanhada devido à presença da lignina não degradada. Já os fungos causadores de podridão branca, também conhecidos como fungos lignocelulolíticos, possuem a capacidade de metabolizar os principais componentes da madeira (celulose, hemicelulose e lignina) tornando o material esbranquiçado (Gilbertson 1980, Gugliotta 2001, Masarin 2010).

O modo de ação dos fungos ligninolíticos é evidenciado na distribuição de suas hifas ao penetrarem na parede da célula da madeira através do lúmen, na qual secretam metabólitos que atuam sobre os componentes da madeira. Estes metabólitos são constituídos por enzimas extracelulares específicas e outros compostos de baixa massa molar. Na degradação da celulose, hemicelulose e lignina estes compostos são convertidos em moléculas solúveis susceptíveis ao metabolismo intracelular do fungo que culmina na geração de energia para a célula, CO₂ e água (mineralização) (Faria 2010).

1.1.2.1. Enzimas envolvidas na degradação da madeira

Como mencionado anteriormente, a madeira é biodegradada pela ação de uma grande variedade de enzimas extracelulares e de metabólitos de baixa massa molar que atuam como auxiliares (mediadores) dessas enzimas.

As enzimas responsáveis pela degradação da celulose e das polioses são hidrolases que apresentam uma especificidade muito grande pelo respectivo substrato (Kirk & Cullen 1998). Dessa forma, as enzimas hidrolíticas (celulases e hemicelulases) somente atuam a partir do contato direto com seus respectivos substratos (celulose e hemicelulose).

A degradação da celulose é feita pela ação de três grupos de enzimas que atuam de forma sequencial e sinérgica, causando a hidrólise completa da celulose até glicose (Figura 3) (Watanabe 2010).

. Estes grupos de enzimas são compreendidos por:

- **endo-1,4-β-glicanases**: hidrolizam a molécula de celulose a partir de suas regiões amorfas, gerando fragmentos ainda com grande grau de polimerização;
- **exo-1,4-β-glicanases**: também denominadas celobiohidrolases, este grupo de enzimas é capaz de agir somente nas pontas dos oligômeros de celulose. De sua ação, são gerados principalmente dímeros de glicose (celbiose);
- **1,4-β-glicosidases**: este terceiro e último grupo de enzimas age nos dímeros gerados pelas celobiohidrolases, gerando glicose.

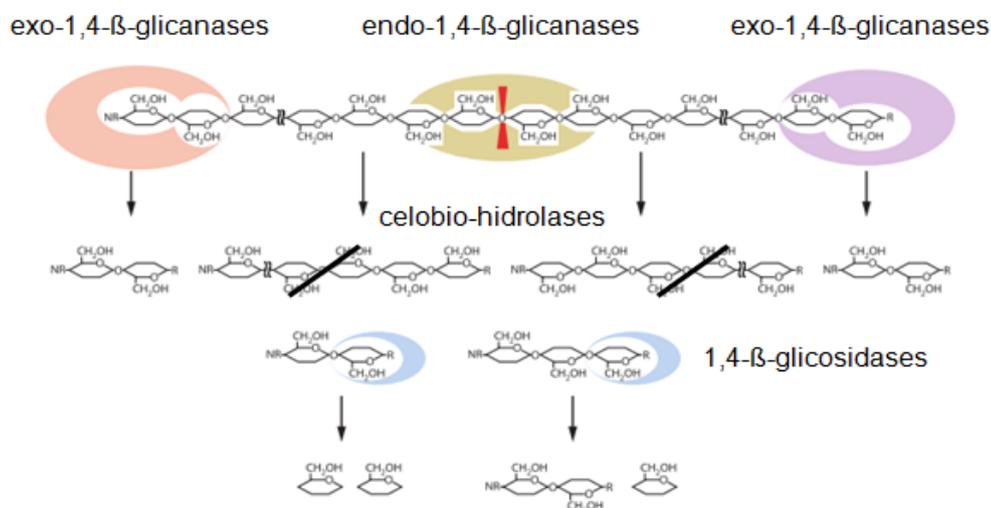


Figura 3 - Ação sinérgica das enzimas envolvidas na degradação da celulose (Watanabe & Tokuda 2010)

Devido à sua natureza heteropolissacarídica a biodegradação das hemiceluloses (polioses) requer um conjunto de enzimas extracelulares mais complexo. O conjunto de enzimas que atua sobre as polioses também são hidrolases específicas para os diferentes tipos de ligação existentes no polímero, e agem de forma semelhante às que atuam sobre a celulose. Destas enzimas, as xilanases rompem ligações glicosídicas entre moléculas de anidroxilose, as mananases entre moléculas de anidromanose e as glucuronidasas atuam sobre ligações de ácidos urônicos com moléculas de açúcares (Figura 4). As hemicelulases também são divididas em 3 grupos que atuam de forma consecutiva e sinérgica: as endo-hemicelulases hidrolisam o polímero ao acaso liberando fragmentos de menor massa molar; exo-hemicelulases hidrolisam os fragmentos gerados pelas endo-hemicelulases gerando principalmente dímeros, e xilosidases hidrolisam os dímeros a xilose (Higuchi 1985, Eriksson *et al.* 1990).

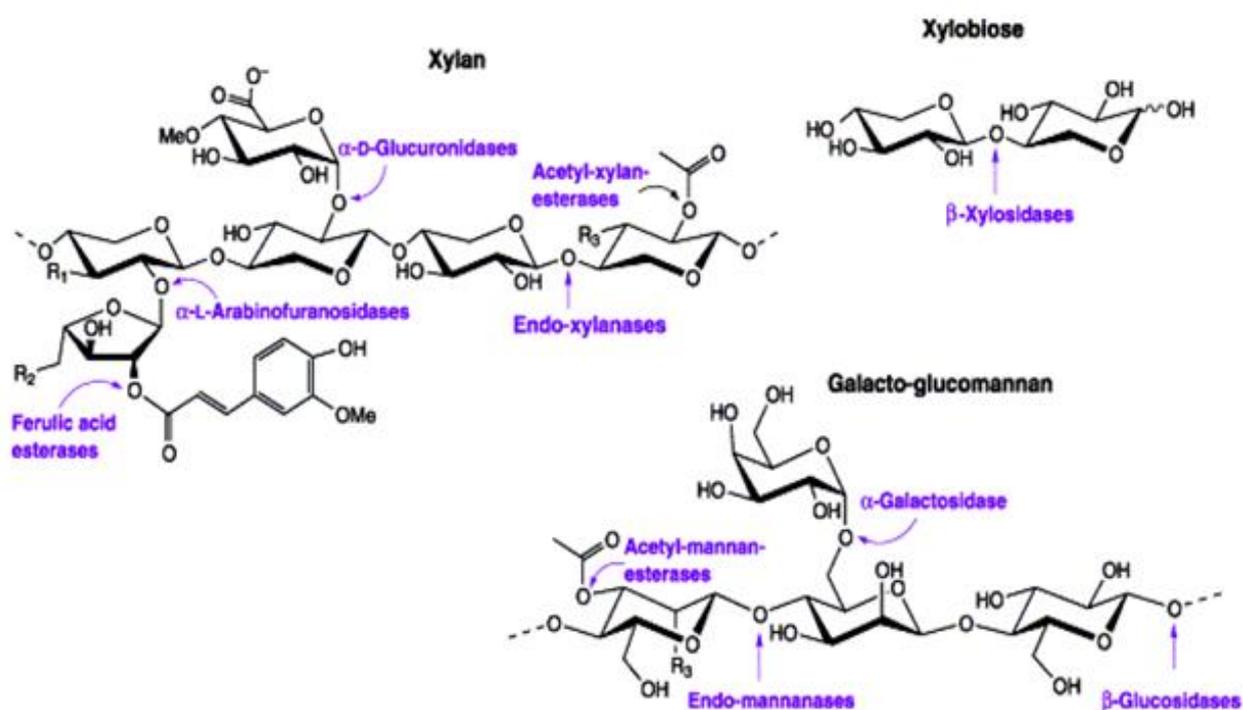


Figura 4 - Principais enzimas responsáveis pela degradação da hemicelulose (Shallom & Shoham 2003)

A degradação da lignina pode ser catalisada por um vasto grupo de enzimas que atuam de forma oxidativa. Destas, as mais amplamente estudadas são: lignina-peroxidase (LiP), manganês-peroxidase (MnP) e Lacase. As LiPs são heme-proteínas que apresentam potencial de oxidação suficientemente elevado para abstrair elétrons de estruturas aromáticas não fenólicas, dando origem a radicais catiônicos. As MnPs também são heme-proteínas, porém apresentam potencial de oxidação suficiente somente para abstrair elétrons de estruturas fenólicas (Cameron *et al.* 2007).

As Figuras 5 e 6 mostram os ciclos catalíticos destas duas enzimas, respectivamente, nos dois casos, a enzima é ativada através de oxidação por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) levando a formação do composto "CI" que é um oxo-complexo deficiente em 2 elétrons. A redução do CI até a enzima nativa se dá através de duas etapas de abstração de 1 elétron de cada vez. No caso das LiPs, a redução de CI a CII e também de CII a C0 pode ocorrer através da oxidação de substratos não fenólicos levando a formação de radicais cation.

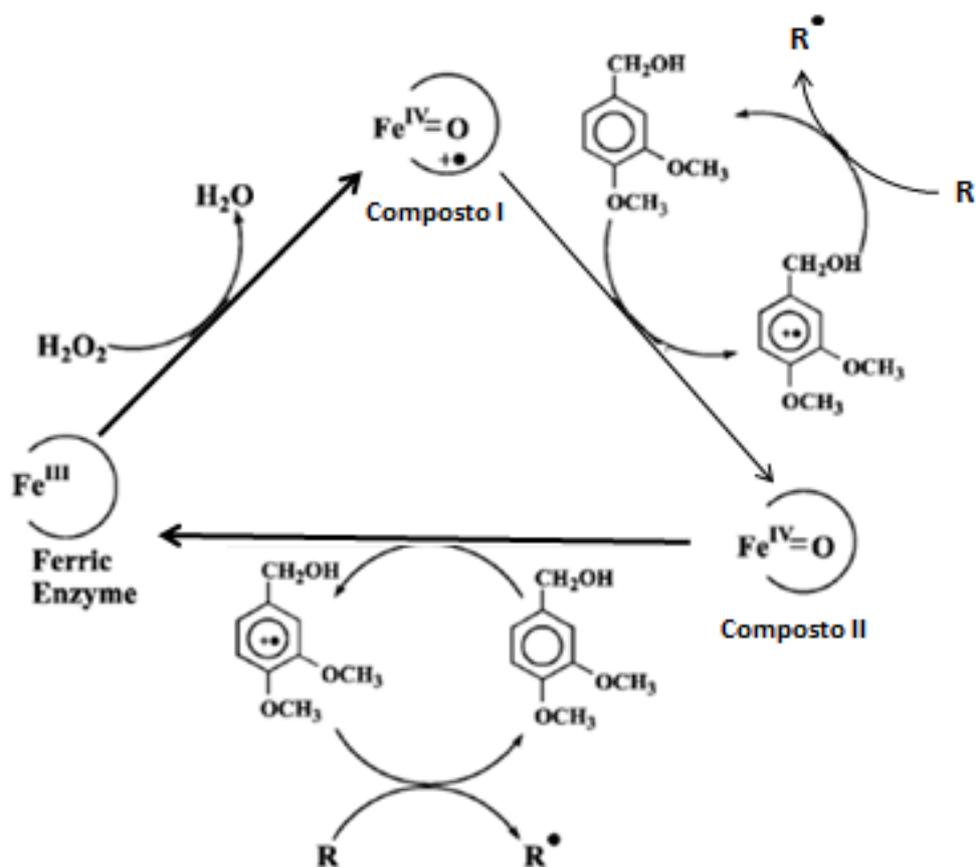


Figura 5 - Ciclo catalítico da enzima lignina-peroxidase (LiP). (Cameron *et al.* 2007)

As MnPs dependem exclusivamente de Mn^{2+} para a redução de CII a C0. O composto CI pode ser reduzido ao composto CII à custa da oxidação direta de uma estrutura fenólica ou de um átomo de Mn^{2+} . Por outro lado, o Mn^{3+} formado é bastante reativo e pode atuar como um mediador da MnP, pois normalmente é estabilizado por quelantes produzidos pelo próprio fungo, como o ácido oxálico (Hofrichter 2002). O complexo organometálico Mn^{3+} -oxalato, por sua vez, pode ser reduzido à custa da oxidação de outra estrutura fenólica.

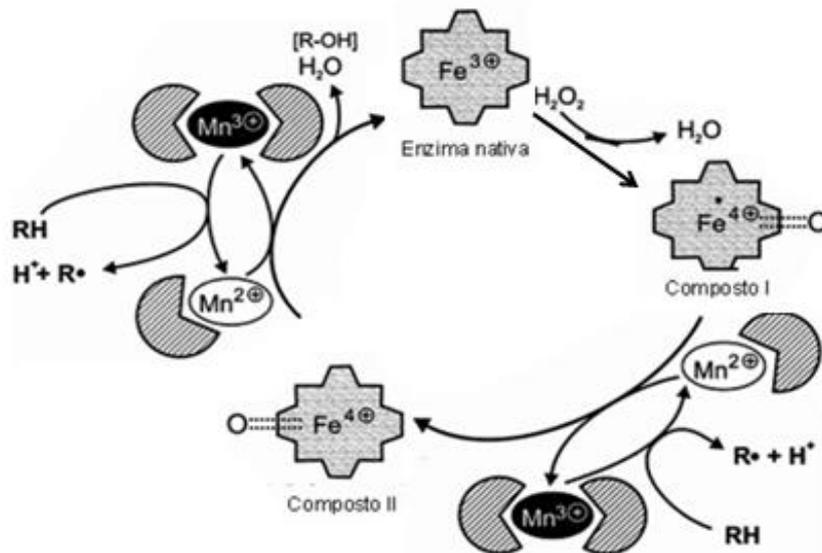


Figura 6 - Ciclo catalítico da enzima peroxidase dependente de manganês (MnP). RH representa um substrato fenólico (modificado Hofrichter 2002)

As lacases são cupro-proteínas e atuam diretamente sobre estruturas fenólicas através da oxidação dos fenóis pela abstração de 1 elétron mediada pela redução de Cu^{2+} a Cu^+ , que por sua vez, reduz O_2 a H_2O , permitindo que a enzima atue de forma cíclica (Ferraz 2004) (Figura 7).

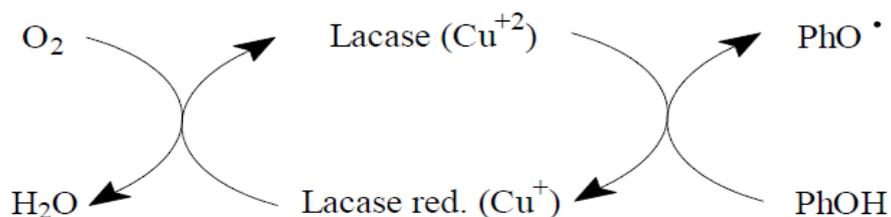


Figura 7 - Ciclo catalítico de lacase. PhOH representa um substrato fenólico. A estequiometria do ciclo envolve 4 Cu^{2+} (normalmente ligados a uma única proteína ou a 2 cadeias proteicas acopladas), 4 substratos fenólicos, 4 prótons e 1 molécula de O_2 (Ferraz 2004).

As enzimas que produzem peróxido de hidrogênio são acessórias as peroxidases, estas enzimas geram peróxido de hidrogênio *in situ* e possibilitam que as peroxidases atuem. As principais enzimas produtoras de peróxido envolvidas na biodegradação de lignina são glicose oxidase e metanol oxidase (intracelulares) que utilizam glicose e metanol como substratos, respectivamente (Kuhad *et al.* 1997, Kirk & Cullen 1998). A glicose é originária da biodegradação da celulose e das poliooses que contêm glicose. O metanol é produzido durante a biodegradação da própria lignina através da remoção de metoxilas ligadas aos anéis aromáticos. A produção de H₂O₂ por enzimas extracelulares também tem sido descrita em alguns fungos de decomposição branca. Entre elas estão a glioxal oxidase e a aril-álcool oxidase (De Jong *et al.* 1994, Ander & Marzullo 1997). Também foi demonstrado que MnP pode gerar H₂O₂ a partir da oxidação de ácidos orgânicos como o malônico e o oxálico (Urzúa *et al.* 1998).

1.1.3. Prejuízos econômicos e controle de fungos degradadores de madeira

Apesar do papel essencial que executam nos ecossistemas, muitas espécies fúngicas sob determinadas condições, podem causar prejuízos econômicos significativos por atuarem na deterioração de postes, dormentes e cercas. Também afetam troncos e raízes de espécies vegetais susceptíveis, utilizadas na arborização urbana em ruas, parques e praças.

Além do prejuízo de caráter paisagístico e ambiental, a atuação de tais fungos pode acarretar na queda das árvores, provocando riscos à população e exigindo medidas de prevenção dos órgãos ambientais.

Luna *et al.* (2004), afirmaram que os fungos *Pycnoporus sanguineus* e *Ganoderma lucidum* são os principais causadores da podridão-branca em madeiras utilizadas pela indústria de celulose na Argentina, causando prejuízos significativos a qualidade do produto. Segundo esses autores, os fungos em condições laboratoriais, degradaram 50-60% da madeira entre 2 e 5 meses. Portanto, são consideradas espécies extremamente destrutivas sob condições favoráveis de temperatura e umidade.

A manutenção da madeira em ótima qualidade é uma preocupação atual da indústria madeireira e o mercado mundial exige produtos com selo de qualidade, ou seja, extraídos ou produzidos sem danos ao ambiente e ao homem, obedecendo aos critérios de sustentabilidade. Atualmente os preservantes químicos oferecem maior eficiência no controle de fungos

deterioradores, embora tais produtos necessitem de certificação para o seu uso. Em geral, os principais preservantes químicos de madeira utilizados são o creosoto, o pentaclorofenol, produtos a base de cobre, cromo e arsênio (CCA) e a base de cobre, cromo e boro (CCB) (Barillari 2002).

O desenvolvimento de produtos alternativos menos tóxicos ao ambiente e à saúde humana, como por exemplo, quinolinolato de cobre-8, está sendo incentivado. O quinolinolato de cobre-8 é considerado um produto de grande importância na área de preservação de madeiras, por ser reconhecido como um produto fungicida eficaz e não tóxico a mamíferos. Por esta razão, é o único produto, entre outros usos similares, aceito no tratamento de madeiras que entrarão em contato direto com gêneros alimentícios, como caixas para transporte de frutas, verduras e legumes. Porém seu uso é restrito devido ao custo do produto ser elevado (Moreschi 2005).

Alguns produtos utilizados como preservantes de madeira agem como inibidores enzimáticos, quando conhecido o mecanismo de ação do fungo sobre a madeira. O N,N-naftaloilhidroxi lamina (NHA), primeiramente usado por Beck (1951), citado por Green III *et al.* (1997), inibe enzimas da via de síntese do ácido oxálico que provoca a hidrólise das polioses da parede celular da madeira, devido à geração de um pH ácido. A hidrólise forma orifícios por onde a entrada das hifas dos fungos é facilitada (Backa *et al.* 1992, Hyde & Wood 1995). Green III *et al.* (1997) menciona que o ácido oxálico está também envolvido na formação de complexos de outros cátions, como Ca^{2+} . O NHA é um composto solúvel em água, capaz de formar complexos com o cálcio, responsável pela formação de cristais de oxalato de cálcio. É eficiente contra fungos de podridão parda e branca, que dependem do mecanismo via ligação do cálcio e interface com o ciclo do cálcio.

Os danos ambientais e à saúde das pessoas que manipulam os produtos preservantes tradicionais têm causado preocupação e despertado o interesse por pesquisas no intuito de desenvolver produtos naturais para o tratamento da madeira (Onuorah 2000).

Atualmente é crescente o número de pesquisas envolvendo substâncias naturais de origem vegetal como uma alternativa na preservação da madeira (Brand *et al.* 2006), que além de economicamente viáveis, apresentem a vantagem de serem menos agressivos ao meio ambiente em relação aos compostos sintéticos utilizados atualmente (Bononi 1998).

As plantas produzem diversos compostos orgânicos (metabólitos secundários) que desempenham um papel fundamental nas suas interações de defesa contra predadores e

patógenos. Muitos destes metabólitos secundários apresentam atividades biológicas e têm sido utilizados na indústria farmacêutica e agroquímica (Hamburger & Hostetmann 1991).

1.1.4. O gênero *Casearia* e seus metabólitos secundários

O gênero *Casearia* é amplamente distribuído no Brasil e suas espécies destacam-se pela aplicação medicinal. *C. sylvestris* Swartz. (guaçatonga) é uma planta medicinal de uso tradicional e estudos farmacológicos têm verificado nos extratos dessa planta atividades antiulcerogênica, antiinflamatória, antiofídica, citotóxica em células tumorais, dentre outras (Sertié 2000, Raslan *et al.* 2002, Esteves *et al.* 2005, Schoenfelder *et al.* 2008, Oliveira *et al.* 2009, Santos *et al.* 2010).

Análises fitoquímicas em espécies do gênero *Casearia* demonstram o predomínio de diterpenos do tipo clerodânico, chamadas casearinas (Basile *et al.* 1990, Itokawa *et al.* 1990, Oberlies *et al.* 2002). Em sua maioria, estes diterpenos apresentam características estruturais marcantes e são encontrados somente em algumas famílias de vegetais. Foram isolados 30 diterpenos clerodânicos de espécies de *Casearia*, sendo que a maioria exibiu atividade citotóxica em células tumorais. Os isolados casearvestrinas e diterpeno 7 (*C. sylvestris*) apresentaram atividades antifúngica contra *Aspergillus niger* (Itokawa *et al.* 1990, Morita *et al.* 1991, Carvalho *et al.* 1998, Oberlies *et al.* 2002, Espindola *et al.* 2004, Tininis 2006, Santos *et al.* 2007).

Além dos diterpenos clerodânicos também foram isolados outros metabólitos com possíveis atividades biológicas como lupeol; α e β -amirina (triterpenos), hesperidina (flavanona), isoquercetina, rutina, quercetina, 4'-O-metileter-canferol e isoramnetina (flavonóis), ácidos cafeico, clorogênico e vanílico (compostos fenólicos) e lapachol (naftoquinona) (Gunasekera *et al.* 1977, Sukumar *et al.* 1982, Junges *et al.* 1985, Raslan *et al.* 2002).

Em trabalhos de triagem de extratos bioativos de plantas do Cerrado, *C. sylvestris* var. *lingua* foi uma das que exibiu atividades biológicas mais significativas. Os extratos hexânicos de folhas, madeira e casca das raízes e caules inibiram o crescimento do protozoário *Plasmodium falciparum* (Mesquita *et al.* 2007). Extratos hexânicos e etanólicos de diferentes partes da planta (folhas, caules, raízes e frutos) apresentaram atividades leishmanicida (*Leishmania donovani*) e tripanossomicida (*Trypanosma cruzi*) (Mesquita *et al.* 2005). Outros extratos exerceram ação larvicida em *Aedes aegypti* (Rodrigues *et al.* 2006) e, ainda, o extrato etanólico das partes aéreas

exibiu ação antifúngica, quando testado em *Candida albicans*, *C. papsitosis* e *C. krusei* (Oliveira *et al.* 2007).

Com relação a *Casearia decandra* Jacq. foram encontrados poucos relatos sobre o estudo químico e farmacológico desta espécie. Nos poucos artigos encontrados *C. decandra* foi estudada quanto ao teor de metais presentes nas folhas (Yamashita *et al.* 2005) e os óleos essenciais das flores e folhas, sendo que os óleos essenciais constituintes majoritários foram: *E* - cariofileno (13,0%) e germacreno D (11,2%) nas folhas, e espatulenol (19,6%) e tumbergol (18,6%) nas flores (Junior *et al.* 2007, (<https://sec.sbg.org.br/cdrom/30ra/resumos/T1163-1.pdf>)). Vieira Junior *et al.* (2010) isolaram o esteroide sitosterol e a hidroquinona a partir do extrato etanólico das folhas de *C. decandra*.

1.1.5. Efeito de compostos antifúngicos sobre a biossíntese de componentes celulares

As plantas podem produzir compostos antifúngicos capazes de protegê-las contra o ataque de agente bióticos, como os fungos. O entendimento do mecanismo inibitório pode prover melhor direcionamento favorável ao desenvolvimento e aplicação eficiente de tecnologias envolvendo antifúngicos naturais de origem vegetal (Quiroga *et al.* 2001).

Os compostos antifúngicos de ocorrência natural podem atuar em diferentes aspectos na defesa vegetal. Os compostos fenólicos e as proteínas específicas de defesa, podem atuar na inibição da biossíntese de β -glucanas e quitinas, principais componentes da parede celular fúngica, que conferem forma e integridade (Figura 8).

Durante o crescimento normal, quitinases degradam a quitina presente na ponta da hifa, com concomitante inserção de oligômeros de quitina pela quitina sintetase (Cabib 1987). De forma similar, β -1,3-glucanases e β -glucana sintetases atuam em conjunto removendo e inserindo oligômeros de glucanas na parede celular durante a extensão da hifa (Gooday, 1995). Portanto, quitinases e β -1,3-glucanases são essenciais na quebra e reconstrução dos polímeros constituintes da parede celular levando ao remodelamento da parede celular durante a divisão celular e processos de morfogênese, tais como crescimento e ramificação das hifas, diferenciação e germinação de esporos (Adams 2004).

Esses compostos antifúngicos também podem atuar na inibição da síntese de ergosterol e esfingolipídios presentes na membrana plasmática, prejudicando a estrutura da bicamada lipídica, e como consequência causando o extravasamento do conteúdo intracelular. Podem também interferir na biossíntese de proteínas, e no transporte de elétrons, inviabilizando a geração de energia (Brul & Klis 1999, Marino *et al.* 2001).

Os antifúngicos químicos exercem mecanismos similares, porém estes tendem a estar em quantidades excedentes e produzir efeito residual tóxico em vista de que a adição nem sempre gera uma atuação específica e eficiente (Velluti *et al.* 2003).

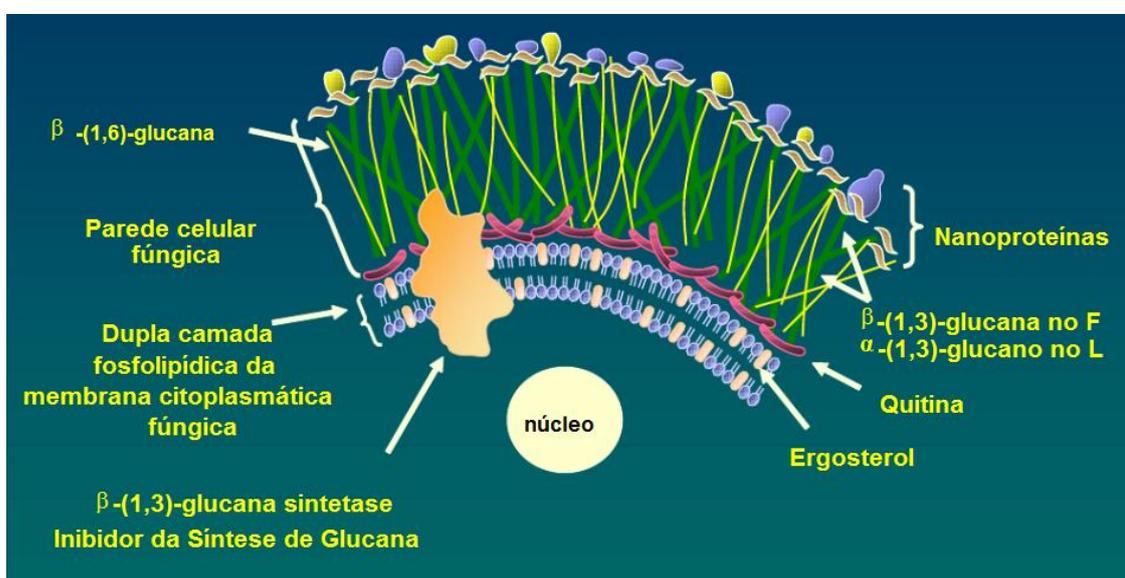


Figura 8 - Estrutura e componentes da parede celular fúngica.
(<http://dc302.4shared.com/doc/0JeFI7KN/preview.html> - acesso em 21/02/2013).

1.1.6. Estresse oxidativo e defesa antioxidante

Durante o metabolismo celular normal, principalmente na cadeia respiratória ou reações catalisadas por oxidases, são geradas espécies ativas de oxigênio (EAOs), as quais incluem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radicais hidroxila (OH^{\cdot}) e oxigênio *singlet* (1O_2) (Scandalios 2005). Estas substâncias são oxidantes muito potentes que reagem de forma muito rápida e inespecífica com diversas macromoléculas causando danos celulares severos como mutações no DNA, oxidação de proteínas e peroxidação de lipídeos da membrana

plasmática (Aguirre *et al.* 2005, Heller & Tudzynski 2011). Além das EAOs geradas normalmente através da respiração celular, no caso de fungos lignolíticos, há geração de grandes quantidades desses compostos oxidantes durante a degradação da lignina (Guillen *et al.* 2000, Hammel *et al.* 2002).

Apesar dos seus efeitos tóxicos, em condições fisiológicas normais, o sistema de defesa antioxidante é normalmente suficiente para manter as EAOs em níveis basais não danosos. As EAOs também participam de processos normais do desenvolvimento fúngico, sinalização intracelular e atuam também nas interações planta-microrganismo (Scott & Eaton 2008, Heller & Tudzynski, 2011). Entretanto, quando os níveis de EAOs excedem a capacidade da célula em reparar os danos celulares, o processo de estresse oxidativo é iniciado. O estresse oxidativo pode ser induzido por fatores externos como, restrição na disponibilidade de nutrientes, dessecação, radiação UV e ionizante, extremos de temperatura, injúria mecânica, metais pesados, antifúngicos, e compostos que geram EAOs como paraquat e H_2O_2 (Angelova *et al.* 2005, Heller & Tudzynski 2011).

Para se defender das EAOs, as células possuem mecanismos antioxidativos não enzimáticos e enzimáticos que mantêm a concentração dessas substâncias em níveis basais não destrutivos. Os mecanismos antioxidativos não enzimáticos englobam moléculas como a glutatona, ascorbato, tocoferol, flavonóides, alcalóides e carotenóides. Já os mecanismos antioxidativos enzimáticos incluem glutatona redutases (GR), glutatona-S-transferases (GST), peroxidases, tais como glutatona peroxidases (GPx), além de superóxido dismutases (SOD) e catalases (CAT), sendo as duas últimas, enzimas chaves na detoxificação do O_2^* , e H_2O_2 , respectivamente (Apel & Hirt 2004, Scandalios 2005, Halliwell & Gutteridge 2007) (Figura 9).

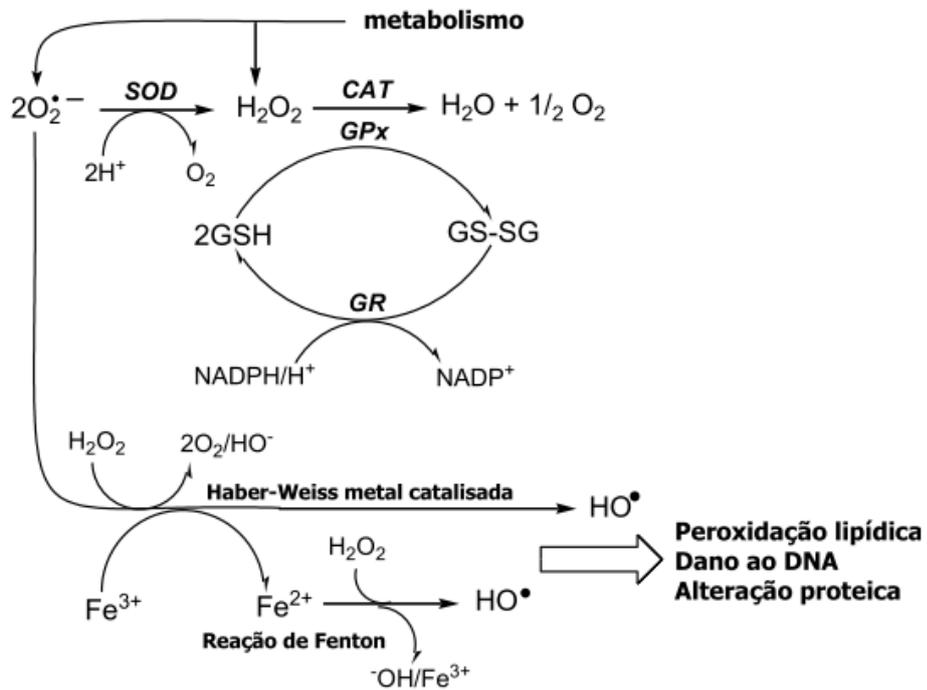


Figura 9 - Algumas vias de formação de EAOs e defesas antioxidantes (Bazito, 2012).

As SODs são metaloproteínas que catalisam a oxidação do $O_2^{\bullet -}$ com concomitante redução de íons hidrogênio à H_2O_2 e oxigênio molecular. O H_2O_2 , produto da SOD é convertido finalmente em água e oxigênio pela CAT, uma metaloproteína constituída por quatro grupos heme. Além das SODs e CATs, enzimas chave do metabolismo antioxidativo, o sistema antioxidativo constituído pelo tripeptídeo glutatona (GSH) e pelas enzimas GR e GPx, também é muito importante no combate às EAOs, em especial H_2O_2 . Nesse sistema a GSH é oxidada pelo H_2O_2 na presença da enzima GPx produzindo uma ponte disulfeto entre duas moléculas de GSH formando a GSSG (glutatona oxidada) (Halliwell & Gutteridge 2007).

A fim de manter o equilíbrio GSH/GSSG na célula a GSSG é oxidada pela GR, uma enzima dependente de NADPH, regenerando assim GSH. Além disso, GSH pode reagir com oxidantes não enzimaticamente devido à presença de um grupo tiol. Já que a GSH é uma molécula que mantém a célula no seu estado reduzido, sendo, portanto um importante agente antioxidante (Stephen & Jamieson 1996, Pocsi *et al.* 2004, Sato *et al.* 2011). Dessa forma, processos de estresse oxidativo em fungos, desencadeados pela exposição a compostos antimicrobianos, podem ser evidenciados pela elevação da atividade das enzimas associadas a mecanismos de detoxificação de EAOs como SOD, CAT e GR.

2. OBJETIVOS

Avaliar o potencial dos extratos de *Casearia sylvestris* e *Casearia decandra* como agentes de controle alternativo dos fungos deterioradores de madeira *Trametes villosa*, *Ganoderma australe* e *Pycnoporus sanguineus*, e elucidar os efeitos desses extratos no processo de inibição dos fungos.

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar a atividade antifúngica dos extratos de *Casearia* spp. sobre os fungos *T. villosa*, *G. australe* e *P. sanguineus*.
- Avaliar a atividade de enzimas associadas aos processos de morfogênese micelial (Quitinase, β 1-3 glucanase).
- Avaliar a atividade das enzimas extracelulares relacionadas a degradação da madeira (Lacase, Fenoxidase e MnP).
- Avaliar as enzimas envolvidas nas defesas contra o estresse oxidativo (Catalase e Glutathione redutase).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1. Fungos

Foram utilizadas as linhagens de fungos basidiomicetos de podridão branca *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel CCIBT 2628, *Ganoderma australe* (Fr.) Pat. CCIBT 3801 e *Pycnoporus sanguineus* (L.) Murrill CCIBT 3732 (Figura 10), pertencentes à Coleção de Cultura de algas, cianobactérias e fungos do Instituto de Botânica da Secretária do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.

As culturas dos fungos foram mantidas a 4°C em meio de cultura Batata-Dextrose-Agar (BDA).

A seleção dos fungos foi baseada na importância econômica e ocorrência em árvores utilizadas na arborização urbana, sendo que os fungos *T. villosa*, *P. sanguineus* e *G. australe* ocorrem com maior distribuição em madeiras no país (Calvacanti 1983, Jesus 1991, 1998).

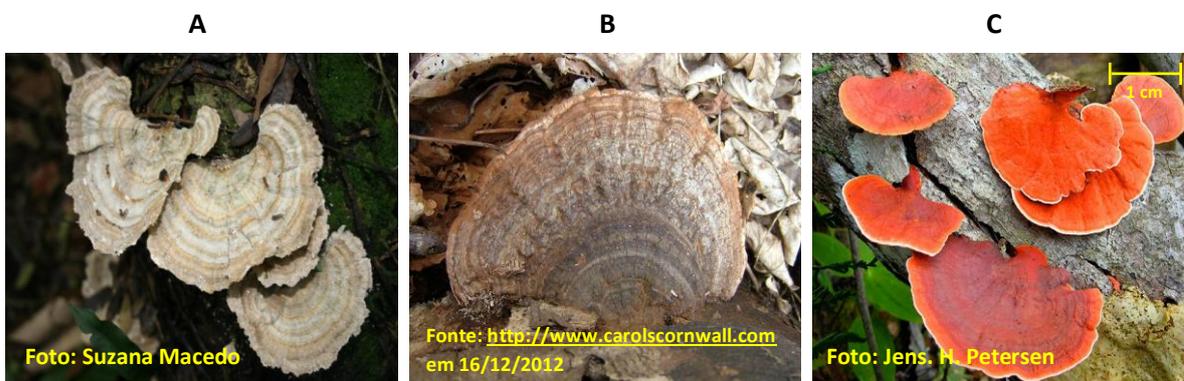


Figura 10 - Fungos *Trametes villosa* (A); *Ganoderma australe* (B) e *Pycnoporus sanguineus* (C).

3.1.2. Espécies Vegetais e Obtenção dos extratos

As espécies vegetais selecionadas para este estudo foram *Casearia sylvestris* Swartz e *Casearia decandra* Jacq. Os extratos de *C. sylvestris* e *C. decandra* foram obtidos do Banco de Extratos (Extratoteca) do Projeto “Conservação e Utilização Sustentável da Diversidade Vegetal do Cerrado e Mata Atlântica: Diversidade Química e Prospecção de Novos Fármacos - FASE I”, localizado no Núcleo de Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica de São Paulo.

A parte do vegetal utilizada neste estudo foram as folhas (Figura 11). As folhas de *C. decandra* foram secas em estufa de circulação forçada a 40°C e posteriormente o material foi pulverizado em moinho de facas. O pó obtido foi submetido à extração com etanol em sistema automático ASE. O solvente foi retirado em evaporador rotatório à temperatura de 40°C, o extrato obtido foi mantido em freezer -20°C.

Para o extrato de *C. sylvestris*, o extrato fluido da planta foi produzido de acordo com a Farmacopéia Brasileira (1926), na qual foi identificada com o nome “herva de bugre”. Assim, para obtenção de tal extrato empregou-se o método de percolação, como descrito a seguir: “100g da folha seca pulverizada foram umedecidas, com uma solução de álcool etílico 99,3° INPM e água destilada na proporção de 1:2 e macerada por 6 horas. Após este procedimento o pó umedecido foi filtrado com a solução hidroalcolica (1L), em filtro buchner, para obtenção do extrato fluido que foi posteriormente colocado em evaporador rotatório à temperatura de 50°C para obtenção do extrato fluido seco. O extrato foi mantido congelado a -20°C.



Figura 11 - Detalhes das folhas de *Casearia decandra* (A) e *Casearia sylvestris* (B)

3.2. ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS DOS EXTRATOS

3.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para verificação do perfil cromatográfico foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) Varian Pro Star 310 (analítico), software Varian star Workstation, coluna cromatográfica C18 Pursuit® (250mm x 4,6mm, 5µm), com loop de 20µL, detecção em luz ultravioleta de (λ) 242nm, fluxo de 0,6mL.min⁻¹ e a fase móvel foi composta de: eluente A- água

milliQ (Millipore) com 0,1% ácido acético (CH₃COOH; Merck); eluente B – metanol grau HPLC (MeOH, Merck) e eluente C - acetonitrila grau HPLC (ACN, J.T.Baker).

As amostras dos extratos foram previamente diluídos em etanol na concentração 1mg/mL e filtrados com filtro Millipore 0,45mm. O volume da injeção foi de 20µl. A eluição foi realizada da seguinte forma: Tempo 0 - 95% de A e 5% de C até 15min com 28% de A. De 16 a 55min com 28% de A até 68% de C e de 56 a 60min até 100% de C, totalizando 60 minutos de tempo total de corrida.

3.2.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de arranjos de diodos (CLAE – DAD)

Foi utilizado sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE – DAD) (Dionex P 680, quaternário, detector PDA UV/VIS), software Chromeleon, coluna analítica (Merck - Hibar® 250mm x 4,6mm, LiChrospher® 100 RP-18 (5µm)). As amostras dos extratos foram previamente diluídos em etanol na concentração 1mg/mL e filtrados com filtro Millipore 0,45mm. O volume da injeção foi de 20µl. A fase móvel foi composta de: eluente A- água milliQ (Millipore) com 0,1% ácido acético (CH₃COOH; Merck); eluente B – metanol grau HPLC (MeOH, Merck) e eluente C - acetonitrila grau HPLC (ACN, J.T.Baker). A eluição foi realizada da seguinte forma: Tempo 0 - 95% de A e 5% de C até 28% de A até 15min, de 16 a 55min de 28% de A até 68% de C e de 56 a 75min até 100% de C, totalizando 75 minutos de tempo total de corrida.

3.2.3. Cromatografia a Gás acoplada com espectrômetro de massa (CG-MS)

Foram pesados 5mg dos extratos brutos e colocados em speedy vac (HETOVAC/ VR-1). O material residual foi submetido a derivatização acrescentando 150mL de piridina, 50mL de N,O-Bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) e 50ml de hidrocloreto de metoxialmina e, em seguida incubado sob agitação durante 1 hora a 75°C.

As amostras foram injetadas em um sistema GC-MS composto por um cromatógrafo a gás Agilent GC 6890 series e um espectrômetro de massas quadrupolo Agilent MSD 5973N (Agilent Technologies, USA). A separação cromatográfica foi realizada com auxílio de uma coluna de 30m HP5 com espessura de 0,25mm e filme de 0,25mm (Supelco, Bellfonte, USA). A temperatura de

injeção foi de 230°C, a interface a 250°C, e a fonte de íons ajustada para 200°C. Hélio foi usado como gás de arraste a uma taxa de 1mL.min⁻¹. A análise foi realizada utilizando o programa: 5min. de aquecimento isotérmico (70°C), gradiente de temperatura de 5°C min⁻¹ até 310°C e um minuto final de aquecimento a 310°C. O sistema foi então equilibrado por 6min a 70°C antes da injeção automática da próxima amostra. O modo de ionização foi por impacto eletrônico (70eV). Os espectros de massas foram gravados a 2 scan s⁻¹ com uma taxa de scans de 50 a 650m/z. Os cromatogramas de íons totais (TIC) e espectros de massas foram avaliados usando o programa Chem Station (Agilent) e picos detectados foram comparados com dados da biblioteca NIST 08 Mass Spectral Library.

3.3. BIOENSAIO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

3.3.1. Preparação dos pré-inóculos

Os pré-inóculos foram previamente crescidos em placas de Petri (n=3). Foi inoculado um disco de 2mm contendo o fungo no centro da placa de Petri sobre um papel celofane estéril (9cm de diâmetro) com meio de cultura BDA suplementado com pó de bagaço de cana-de-açúcar (O pó do bagaço de cana-de-açúcar foi adquirido através do peneiramento do próprio bagaço e autoclavado dentro das próprias placas de Petri utilizadas ($\pm 0,5g$ por placa)), para estimular a atividade das enzimas ligninolíticas, mantidos a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 4 dias, até o micélio ocupar cerca de 3/4 da placa.

3.3.2. Bioensaio da atividade antifúngica dos extratos vegetais

Os extratos etanólicos das folhas foram pesados e diluídos em 10mL de álcool etílico PA. A solução obtida de cada extrato foi homogeneizada em vórtex e adicionada em 290mL de meio de cultura BDA perfazendo uma concentração final de 0,1, 0,01 e 0,001mg.mL⁻¹ para cada extrato e novamente homogeneizada (Jesus 2003, modificado). Da solução meio de cultura e extrato, 20mL foram vertidos em placa de Petri (9cm de diâmetro). Após a solidificação do meio de cultivo os pré-inóculos de micélio fúngico (item 3.3.1) foram transferidos para as novas placas e mantidos a $25^\circ\text{C} \pm 2$ durante 16 dias (Figura 12).

Este mesmo procedimento foi realizado para os bioensaio dos controles, que consistiu na preparação de placas de Petri sem a adição de extrato vegetal e controles com etanol. Todos os tratamentos foram realizados com um controle. A avaliação do bioensaio foi por determinação do crescimento micelial e da biomassa fúngica.

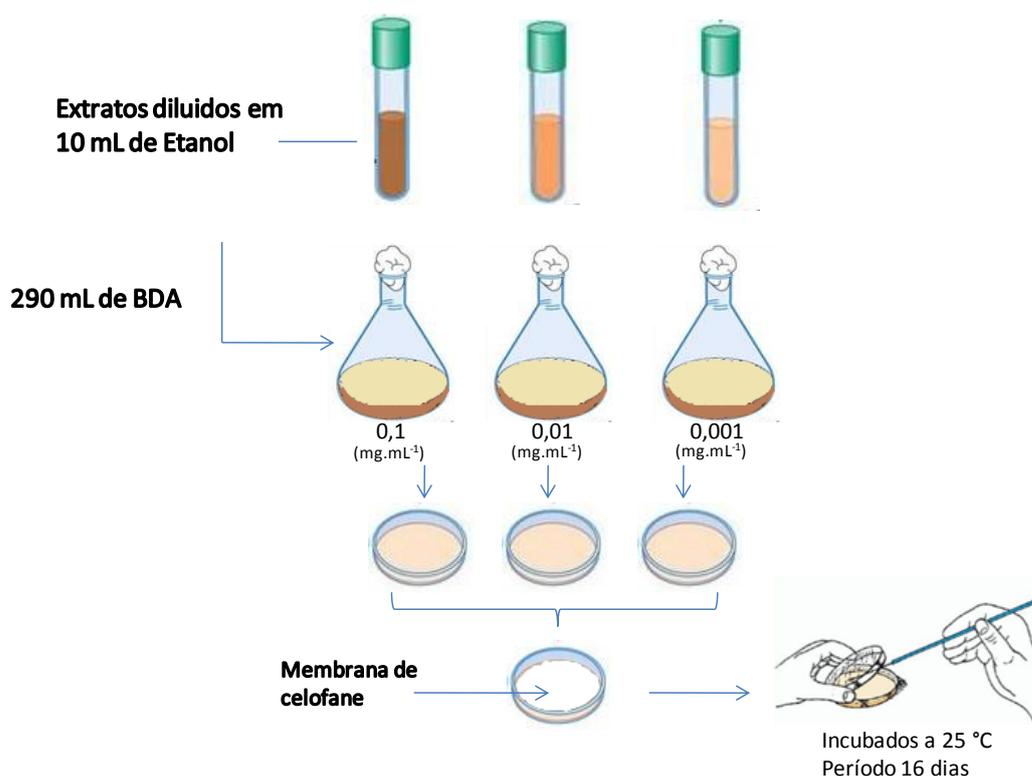


Figura 12 - Esquema ilustrativo do bioensaio antifúngico em meio sólido (BDA, enriquecido com bagaço de cana) utilizando membrana de celofane.

3.3.3. Determinação do crescimento micelial e biomassa fúngica

A determinação do crescimento micelial foi medido em (mm) com um paquímetro manual no sentido horizontal e vertical da colônia nos períodos de incubação. As medidas foram realizadas nos tempos: 0 (considerou-se o dia em que os fungos foram transferidos para o meio de cultura com extrato), 4, 8, 12 e 16 dias após a incubação.

A partir do valor médio do crescimento micelial radial (mm), foi calculada a área (cm²) da colônia do fungo de três repetições. Com base no valor médio das áreas (cm²) das colônias dos fungos, obtido no décimo sexto dia de incubação, foi determinado o índice antifúngico (IAF), expresso em porcentagem, usando a fórmula descrita por Jesus *et al.* (2003).

A biomassa fúngica foi determinada por pesagem do micélio fresco coletado.

$$\text{IAF} = [1 - \{\text{Tratamento/Testemunha}\}] * 100$$

3.4. QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA LIGNINOLÍTICA

3.4.1. Extração enzimática do meio sólido

O extrato enzimático bruto proveniente do cultivo em meio sólido foi obtido com solução tampão acetato de sódio 50mM, pH 4,5 na proporção de 1:3 (p/v) e homogeneizado manualmente com bastão de vidro por 3min., seguida de agitação em mesa agitadora (TECNAL /TE - 140) a 120rpm durante 1 hora (Moreira-Neto 2006, modificado). O material extraído foi filtrado à vácuo sobre papel de filtro em funil de porcelana acoplado a um Kitassato. Foram realizadas extrações enzimáticas nos tempos 0, 4, 8, 12 e 16 dias de incubação. O filtrado foi utilizado para a determinação da atividade enzimática da lacase, fenoloxidase, manganês peroxidase e para a quantificação de proteínas totais extracelulares (item 3.7).

3.4.2. Lacase

A atividade de lacase foi determinada pela oxidação do substrato ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6- sulfônico) ($\epsilon = 36000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) medida pela variação da absorbância a 420nm, durante 10min em espectrofotômetro (HITACHI / U – 2001), a temperatura ambiente, segundo método descrito por Machado & Matheus (2006).

A mistura reacional (1mL) contém:

- 250 μ L de tampão citrato-fosfato 50mM, pH 4,0;
- 600 μ L de substrato (extrato enzimático);
- 50 μ L de água deionizada;
- 100 μ L de solução de ABTS 5mM.

A reação teve início pela adição do ABTS. Uma unidade enzimática correspondeu a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μ mol de substrato por minuto. A atividade enzimática foi calculada segundo a equação:

$$\text{Atividade (UL}^{-1}\text{)} = \Delta A_{420} V_t / \epsilon_{420} V_a dt$$

Onde:

ΔA_{420} : Diferença na intensidade da absorbância no $\lambda = 420\text{nm}$.

V_a : Volume da amostra (mL)

V_t : Volume total dos reagentes (mL)

ϵ_{420} : Coeficiente de absorção molar a 420nm

d: Caminho óptico (cm)

t: tempo de reação (min.)

3.4.3. Fenoloxidase

Determinada pelo mesmo método descrito para lacases (item 3.4.2) com adição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em substituição da água deionizada.

3.4.4. Peroxidases

A determinação das peroxidases totais foi dada pela diferença entre a oxidação total do ABTS e a atividade de lacase (Eggert *et al.* 1996).

3.4.5. Manganês peroxidase (MnP)

Determinada pela oxidação do vermelho de fenol ($\epsilon = 4460\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), segundo método descrito por Kuwahara *et al.* (1984).

A mistura da reação continha em 1mL:

- 300 μL de solução A (tampão succinato de sódio 0,2M pH 4,5; lactato de sódio 0,1M e albumina bovina 0,5%);
- 50 μL de solução de sulfato de manganês (MnSO_4) 2mM;
- 500 μL de extrato enzimático;
- 50 μL de solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 2mM;
- 100 μL de solução de vermelho de fenol 0,1%.

A reação teve início pela adição do peróxido de hidrogênio e foi feito acompanhamento da variação da absorbância a 610nm, em intervalos de 2min. durante 10 min., a temperatura ambiente. A reação foi interrompida com adição de 50µL de solução de hidróxido de sódio 2N. Uma unidade enzimática correspondeu à quantidade de enzima capaz de oxidar 1µMol de substrato por minuto.

A partir das absorbâncias obtidas no intervalo de 10min. foram construídos gráficos para determinação do coeficiente angular da reta. Os gráficos com coeficientes de correlação linear (r^2) maiores ou iguais a 0,90 foram considerados.

3.5. QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA INTRACELULAR RELACIONADAS A MORFOGÊNESE E AO ESTRESSE OXIDATIVO

3.5.1. Obtenção do extrato proteico

Para obtenção do extrato proteico o micélio foi macerado na presença de nitrogênio líquido, seguido pela adição de tampão fosfato de potássio 100mM (pH 7,5) contendo 1mM de EDTA e 3mM de ditioneitol (DTT), na proporção de 5mL.g⁻¹ de micélio fresco. O material foi centrifugado a 4°C durante 30min. a 4.000rpm sendo o sobrenadante (extrato proteico) coletado e armazenado a -20°C (Fialho 2008). Os extratos proteicos foram utilizados para a determinação das atividades enzimáticas intracelulares e quantificação proteínas totais intracelulares.

3.5.2. Quitinase

A atividade da quitinase foi determinada pelo método de Hackman & Goldberg (1964), pela quantificação espectrofotométrica do Remazol Violeta Brilhante liberado de Chitin Azure (SIGMA).

A mistura de reação continha:

- 100µL do extrato proteico;
- 100µL da solução de substrato (tampão fosfato de sódio 100mM (pH 6,8) e chitin azure 2mM).

A reação desenvolveu-se por 2h a 40°C sob agitação, a reação foi paralisada através de resfriamento no gelo por 5min., em seguida foi centrifugada a 10.000g durante 5min. O sobrenadante foi retirado e colocado em microplaca e as leituras foram realizadas em leitor de Elisa à 550nm. A atividade enzimática específica foi expressa em unidades de absorvância $h^{-1}mg^{-1}$ de proteína.

3.5.3. β -1,3-glucanase

A atividade foi determinada pela quantificação colorimétrica da glicose liberada do substrato laminarina pelo método descrito por Abeles & Foence (1970).

A mistura de reação continha:

- 150 μ L de solução de substrato (tampão acetato de sódio 100mM (pH 5,0) e Laminarina 1%);
- 100 μ L do extrato proteico.

Após incubação durante 2h a 40°C, a reação foi paralisada através da adição de 250 μ L do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS), e a solução foi aquecida em banho de água fervente por 5min.. O reagente ADNS é utilizado para a dosagem dos açúcares redutores liberados, conforme descrito por Miller (1959). Após o resfriamento em gelo, o volume da solução foi completado para 1,5mL com água destilada, homogeneizada e determinada a absorvância a 540nm, contra branco apropriado. As leituras de absorvância foram plotadas em curva padrão de glicose, e a atividade enzimática específica foi expressa em mg de glicose liberada $h^{-1} mg^{-1}$ de proteína.

3.6. DETERMINAÇÃO DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

3.6.1. Catalase (CAT)

A atividade foi determinada espectrofotometricamente a 25°C conforme descrito por Beers & Sizer (1952).

A mistura de reação continha:

- 2,9mL de solução de substrato (H_2O_2 0,036% em tampão fosfato de sódio 100mM (pH 6,8));
- 0,1mL de extrato proteico.

A redução da absorbância a 240nm, resultante da decomposição do H_2O_2 , foi monitorada durante 1min.. A atividade enzimática específica foi expressa em unidades (U) mg^{-1} de proteína sendo uma unidade (U) correspondente à decomposição de $1\mu\text{mol}$ de H_2O_2 por min nas condições de ensaio.

3.6.2. Glutathione Redutase (GR)

A atividade da glutathione redutase foi determinada a 30°C como descrito por Azevedo *et al.* (2002) com modificações.

A mistura de reação continha:

- 1mL de tampão fosfato de potássio 100mM (pH 7,5);
- 0,5mL de DTNB 3mM;
- 0,1mL de NADPH 2mM;
- 0,1mL de GSSH 2mM;
- 0,1mL de extrato proteico;

A reação é iniciada pela adição do extrato proteico. A redução da glutathione oxidada foi monitorada a 412nm durante 1 minuto. Os valores de atividade específica foram expressos em U mg^{-1} de proteína, onde uma unidade (U) corresponde a $1\mu\text{mol}$ de GSSG reduzida por min. nas condições de ensaio.

3.7. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

Os extratos obtidos nos itens 3.4.1 e 3.5.1 foram utilizados para a quantificação de proteínas totais extracelulares e intracelulares. A quantificação de proteínas nos extratos foi realizada segundo o método de Bradford (1976). Em microplaca de Elisa, foram adicionados $120\mu\text{L}$ de água destilada, $40\mu\text{L}$ de extrato proteico e $40\mu\text{L}$ de reagente de Bradford (BioRad) e incubados por 5min. Em seguida foi determinada a absorbância a 595nm em leitor de Elisa. Como padrão foi utilizado albumina de soro bovino (ASB).

3.8. ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS FUNGOS POR MICROSCÓPIA ÓPTICA

As microestruturas foram analisadas segundo as recomendações de Teixeira (1995) e coletadas na zona de avanço do micélio (Figura 13). Os cortes foram feitos à mão livre, com o uso de lâmina de metal. O fragmento do fungo a ser examinado foi montado entre lâmina e lamínula em gota de solução de KOH a 3-4%. Para a visualização de estruturas hialinas, difíceis de serem observadas, uma gota de KOH a 3-4%, combinada com uma gota de floxina a 1% foi utilizada para melhor evidenciar as estruturas. Para as observações foi utilizado microscópio óptico Leica DM 1000, utilizando o programa LAS-EZ.

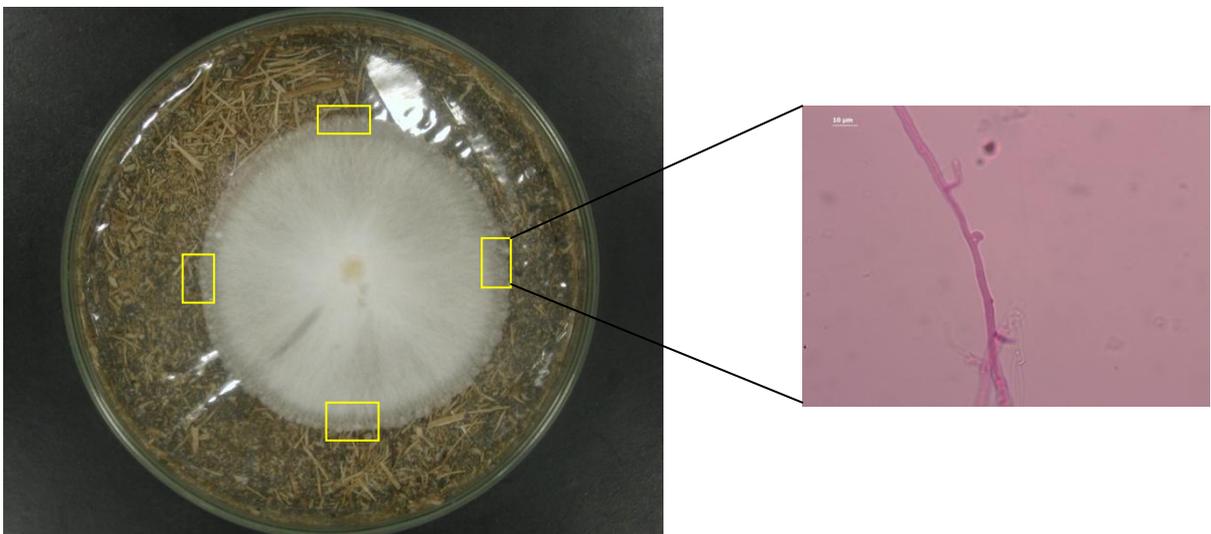


Figura 13 - Regiões da zona de avanço aonde foram analisadas as microestruturas morfológicas dos fungos estudados.

3.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS

Os dados obtidos foram analisados usando o programa estatístico Statistica versão 8.0. Os resultados foram analisados quanto à variância (ANOVA) ($\alpha \leq 0,05$) e nos tratamentos com efeito significativo as médias foram comparadas por teste de Tukey.

4. RESULTADOS

4.1. Análises dos extratos vegetais em CLAE

Os perfis cromatográficos dos extratos brutos de *C. sylvestris* e *C. decandra* são apresentados nas Figuras 14 e 15. Foram observadas diferenças na composição química dos extratos através dos picos majoritários em diferentes tempo de retenção. O extrato de *C. sylvestris* apresentou 15 picos majoritários (Tabela 1), já o extrato de *C. decandra* apresentou 7 picos majoritários (Tabela 2).

Tabela 1 - Picos majoritários detectados na análise do extrato de *C. sylvestris* através de CLAE analítico com os seus respectivos tempo de retenção (Tr) e áreas integrais dos picos (%).

Pico	Tempo de retenção (Tr - min)	Área Integral do pico (%)
1	2,468	2,473
2	22,833	3,166
3	26,599	6,507
4	29,279	1,261
5	29,618	1,403
6	30,043	1,157
7	31,219	2,799
8	33,163	5,291
9	33,738	2,026
10	34,110	3,066
11	34,470	1,215
12	35,683	9,691
13	37,560	6,364
14	38,188	4,728
15	43,351	1,153

Tabela 2 - Picos majoritários detectados na análise do extrato de *C. decandra* através de CLAE analítico com os seus respectivos tempo de retenção (Tr) e áreas integrais dos picos (%).

Pico	Tempo de retenção (Tr - min)	Área Integral do pico (%)
1	10.401	74,794
2	18.442	4,700
3	20.258	3,631
4	21.225	13,403
5	22.705	7,932
6	23.981	5,803
7	33.871	16,742

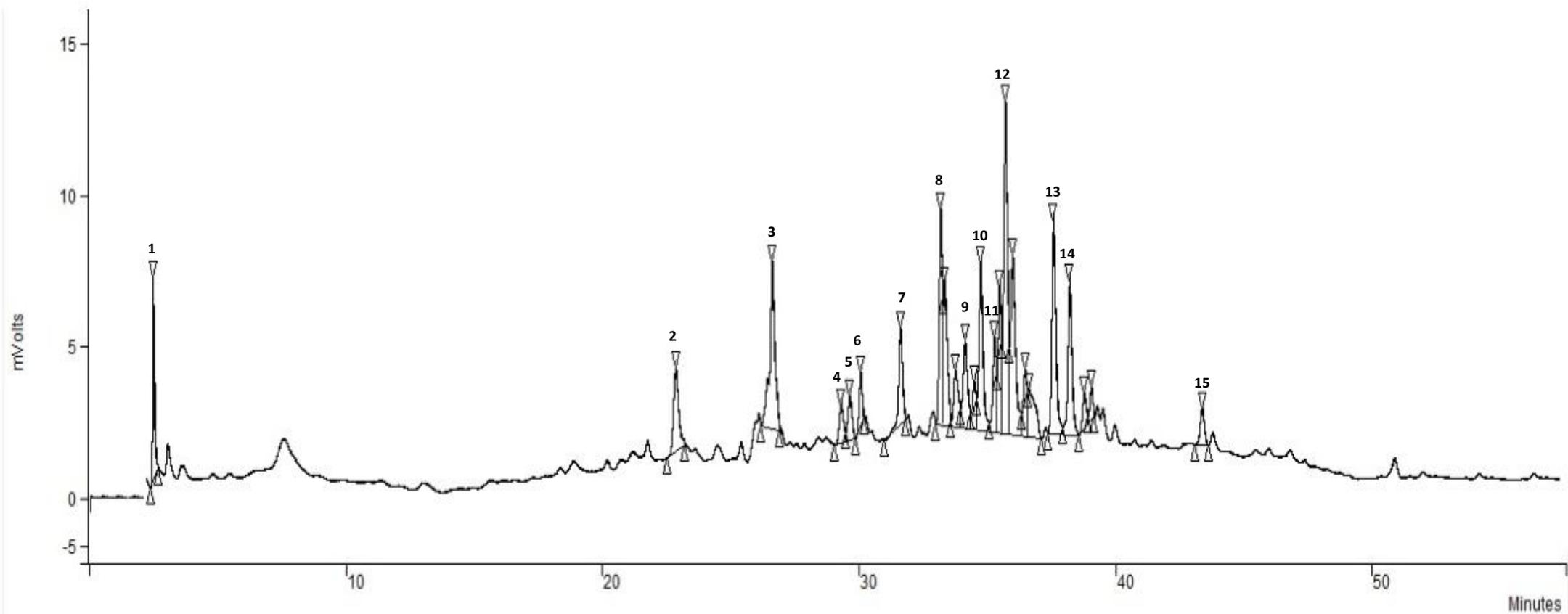


Figura 14 - Cromatograma do extrato de *C. sylvestris* obtido por CLAE analítico, os números de 1 a 15 indicam os picos majoritários apresentados na Tabela 1. Condições cromatográficas: fase móvel composta por 0,1% de ácido acético em água e acetonitrila, fluxo de 0,6 mL/min, coluna C18 Pursuit® (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) e detector a 254 nm.

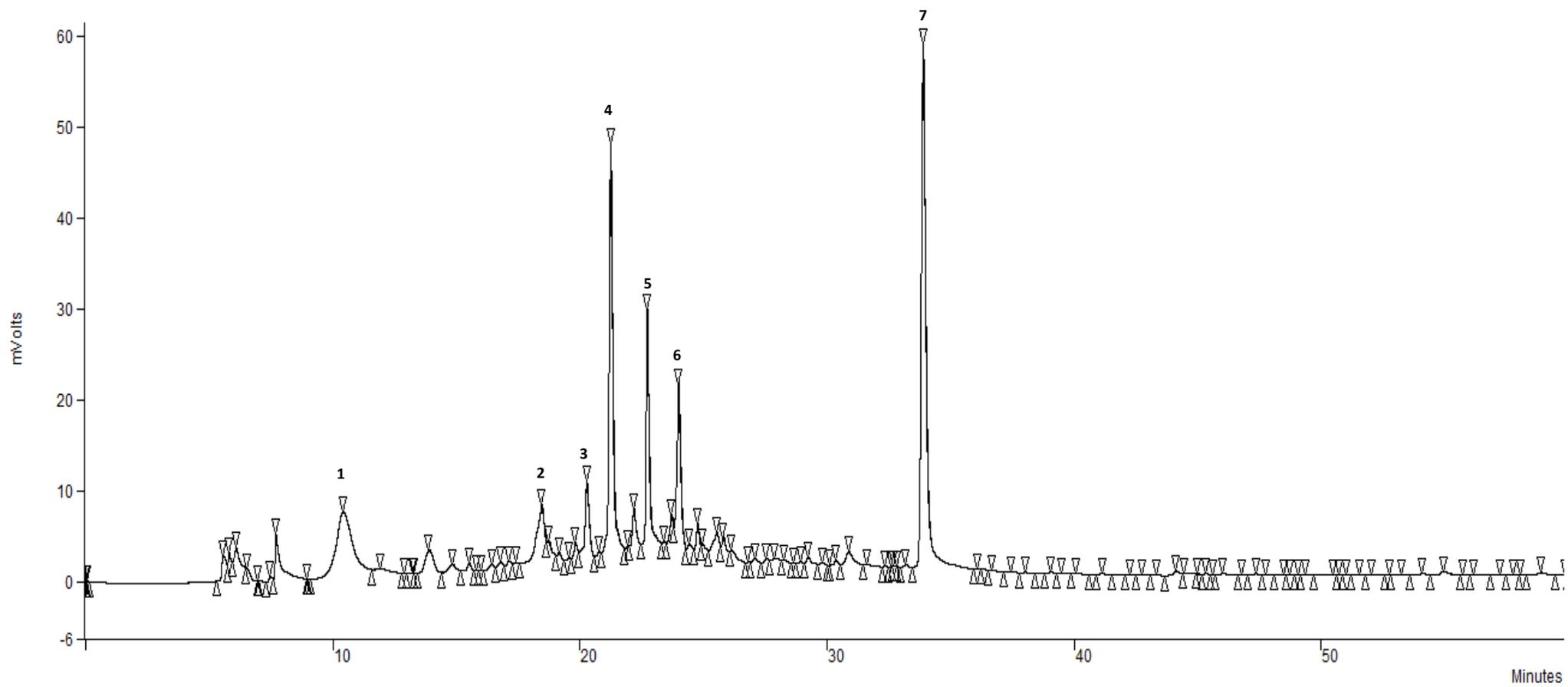


Figura 15 - Cromatograma do extato etanólico de *C. decandra* obtido por CLAE analítico, os números de 1 a 7 indicam os picos apresentados na Tabela 2. Condições cromatográficas: fase móvel composta por 0,1% de ácido acético em água e acetonitrila, fluxo de 0,6 mL/min, coluna C18 Pursuit® (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) e detector a 254 nm.

4.2. Análise dos extratos vegetais em CLAE - DAD

A mesma amostra de *C. sylvestris* foi submetida a análise em CLAE – DAD e os dados são apresentados na Figura 16 e Tabela 3. A Figura 16 mostra a expansão do cromatograma nos Tr entre 20 – 48min., onde foram observados o maior número dos picos cromatográficos e a Tabela 3 mostra todos os picos cromatográficos detectados na análise com Tr e área relativa (%). O pico cromatográfico com maior área relativa (10,79%) ocorreu com Tr de 25,50 min. e o espectro na região de UV ($\lambda_{max} = 242$) (Figura 17) é muito semelhante para diterpenos. Grupos de picos com absorções características para flavonóides foram observados nos Tr (min.) 29,77, 31,19, 32,43 e 33,09 com espectros na região de UV (λ_{max}) na faixa de 303 – 385nm característicos da banda I.

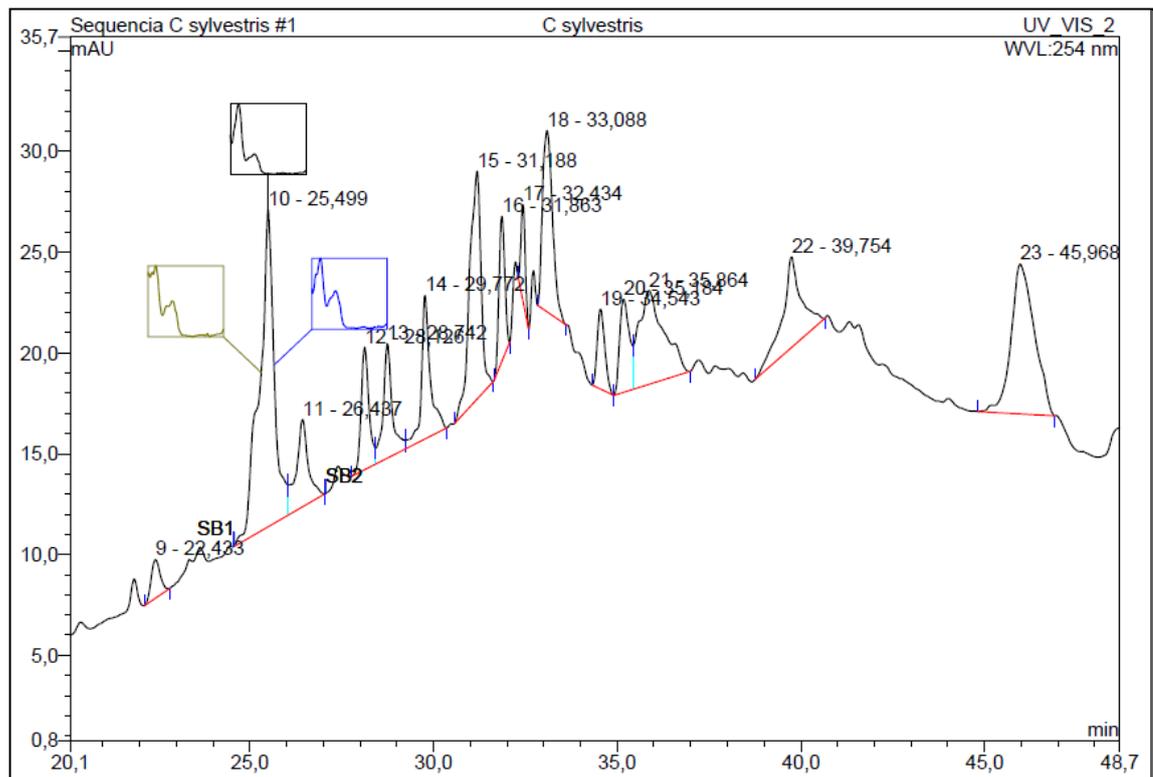


Figura 16 - Expansão do cromatograma do extrato de *C. sylvestris* entre os Tr 20 – 48min obtido através de CLAE – DAD. A fase móvel foi composta de: eluente A - 0,1% de ácido acético em água ultrapura, eluente B – metanol e eluente C - acetonitrila.

Tabela 3 - Picos detectados na análise do extrato de *C. sylvestris* através de CLAE – DAD com os seus respectivos tempo de retenção (Tr) e abundância relativa (%)

Pico	Tempo de retenção (Tr - min)	Rel. Área (%)	Absorção na região do UV (λ_{max})
1	1,72	2,23	na
2	2,19	4,03	340
3	2,46	3,47	na
4	3,20	1,44	264,9
5	3,49	4,10	na
6	5,41	2,12	na
7	10,40	1,64	na
8	15,51	0,83	na
9	22,43	0,80	na
10	25,50	10,79	242,7
11	26,44	2,48	na
12	28,13	2,23	242
13	28,74	2,41	na
14	29,77	2,97	265, 295, 345
15	31,19	5,97	255, 365
16	31,86	1,93	246
17	32,43	0,95	256, 347
18	33,09	4,17	257, 357
19	34,54	1,41	na
20	35,18	2,06	na
21	35,86	5,46	na
22	39,75	3,97	na
23	45,97	8,11	na
24	52,42	1,20	255
25	53,78	2,28	na
26	55,46	2,00	na
27	57,22	0,80	na
28	58,78	0,87	na
29	59,38	1,11	na
30	64,54	9,02	na
31	65,74	3,39	222
32	67,00	3,77	na

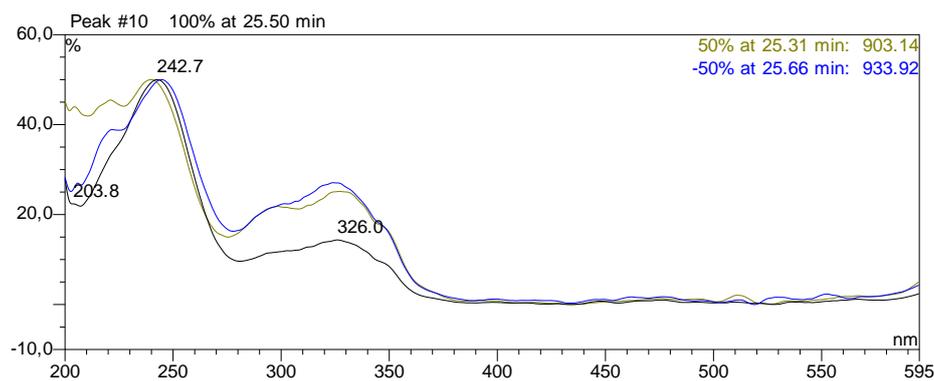


Figura 17 - Espectro no UV do pico 10 ($T_r = 25,5$ min) relativo ao diterpeno no cromatograma do extrato de *C. sylvestris*.

4.3. Análise dos extratos vegetais por GC – MS

Após as análises obtidas por CLAE – UV e CLAE – DAD os extratos foram analisados por GC-MS para obtenção dos espectros de massas e padrão de fragmentação. Comparando os dados das análises com os dados de fragmentação da biblioteca NIST e dados da literatura foi possível sugerir a identificação dos compostos majoritários presentes nos extratos. A Figura 18 mostra os cromatogramas obtidos por GC – MS dos extratos etanólicos e as Tabelas 4 e 5 mostram as características dos compostos identificados. Para o extrato de *C. sylvestris* foram identificados 10 picos majoritários e para o extrato de *C. decandra* foram identificados 14 picos majoritários.

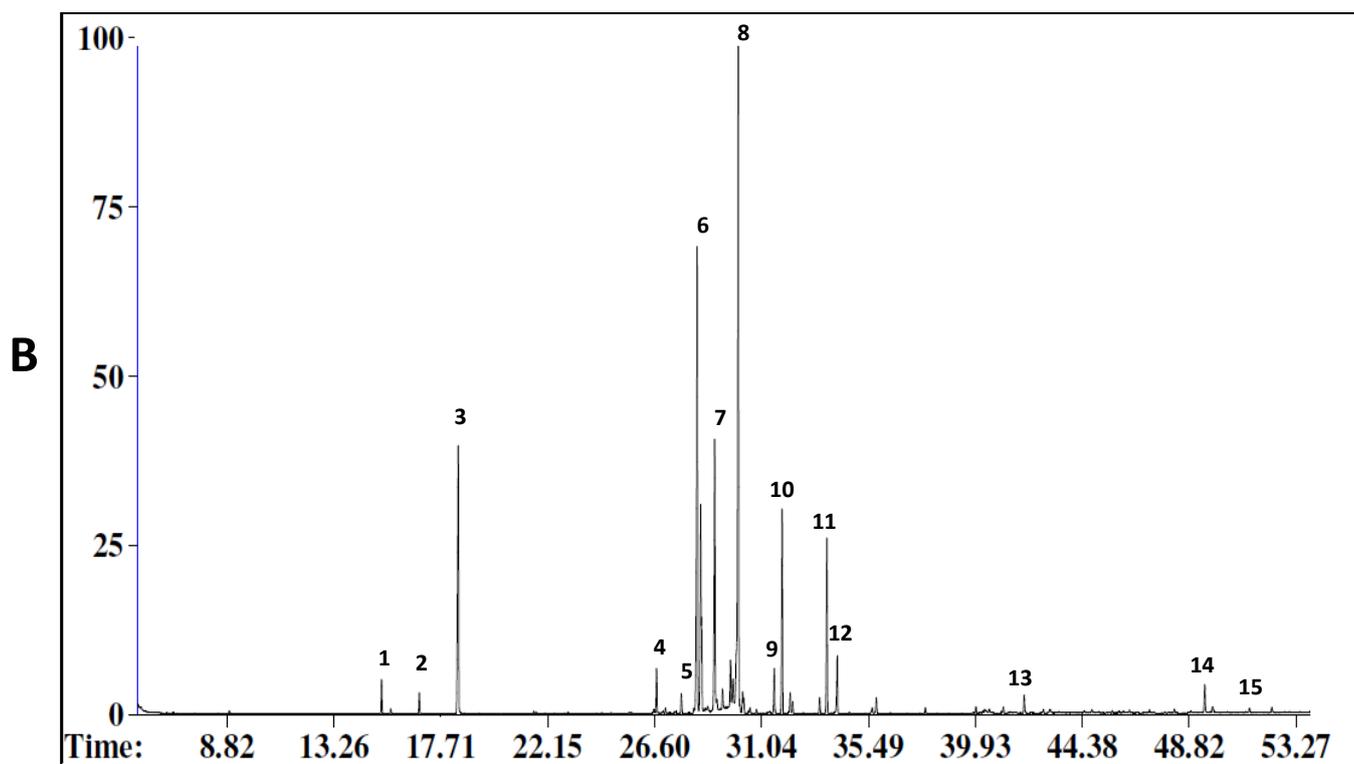
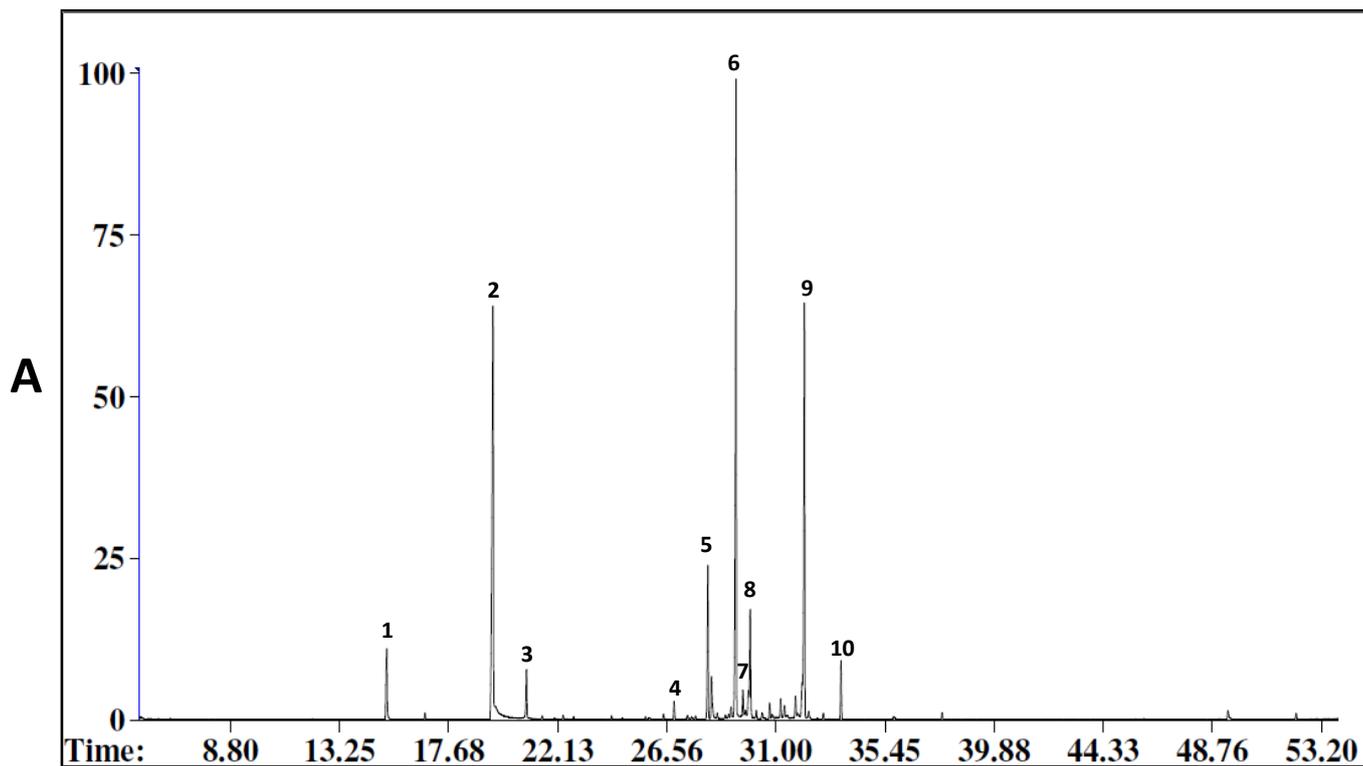


Figura 18 - Cromatogramas dos extratos de *C. sylvestris* (A) e *C. decandra* (B), obtidos por CG – MS, indicando os picos majoritários. Os números correspondem aos compostos indicados nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Compostos identificados com % de probabilidade de acordo com a biblioteca NIST, Tr (min), pesos e fórmulas moleculares e íons fragmentos (m/z) detectados na ordem decrescente de abundância relativa (%) do extrato de *C. sylvestris*.

PICO	COMPOSTO	Probabilidade (%) NIST	Tr =min	PM	FÓRMULA	m/z
1	Trimetilsilil éter de glicerol	85,8	15.165	308	C ₁₂ H ₃₂ O ₃ Si ₃	147 (100), 205, 133, 117, 103, 75, 218, 148, 59
2	não identificado	Ni	19.492	ni	ni	82 (100), 172, 75, 173, 274, 67, 83, 59, 74
3	ácido málico	43,4	20.849	350	C ₁₃ H ₃₀ O ₅ Si ₃	147 (100), 75, 133, 233, 74, 245, 55, 148, 101
4	Arabitol	24,8	26.436	512	C ₂₀ H ₅₂ O ₅ Si ₅	204 (100), 147, 306, 217, 205, 103, 319, 191, 307
5	D-Ribofuranose	23,0	28.384	438	C ₁₇ H ₄₂ O ₅ Si ₄	217 (100), 147, 218, 74, 103, 75, 219, 257, 129
6	D-Ribofuranose	15,0	28.234	438	C ₁₇ H ₄₂ O ₅ Si ₄	217 (100), 147, 218, 74, 103, 75, 219, 257, 129
7	não identificado	Ni	29.387	ni	ni	345 (100), 255, 204, 147
8	glucitol (sorbitol)	17,5	29.947	614	C ₂₄ H ₆₂ O ₆ Si ₆	103 (100), 319, 205, 307, 133, 305, 308, 291, 320
9	ácido D-gluconico	92,6	32.165	628	C ₂₄ H ₆₀ O ₇ Si ₆	147 (100), 333, 292, 205, 103, 217, 305, 319, 204
10	Mio-Inositol	73,2	33.648	612	C ₂₄ H ₆₀ O ₆ Si ₆	147 (100), 305, 217, 318, 204, 291, 191, 306, 74

* o pico [m/z = 73 (CH₃)₂Si] aparece em todos os espectros de massas não foi acrescentado na tabela, porque é um pico característico de fragmentação de compostos silanizados.

Tabela 5 - Compostos identificados com % de probabilidade de acordo com a biblioteca NIST, Tr (min), pesos e fórmulas moleculares e íons fragmentos (m/z) detectados na ordem decrescente de abundância relativa (%) do extrato de *C. decandra*.

PICO	COMPOSTO	Probabilidade (%) NIST	Tr =min	PM	FÓRMULA	m/z
1	Trimetilsilil éter de glicerol	90,3	15.235	308	C ₁₂ H ₃₂ O ₃ Si ₃	147 (100), 205, 133, 117, 103, 75, 218, 148, 59
2	ácido propanóico	89,7	16.806	322	C ₁₂ H ₃₀ O ₄ Si ₃	147 (100), 292, 189, 133, 75, 103, 205, 293, 117
3	Hidroquinona	76,5	18.429	254	C ₁₂ H ₂₂ O ₂ Si ₂	239 (100), 254, 73, 240, 255, 241, 256, 112, 223, 75
4	D-Frutose	38,2	26.764	569	C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ Si ₅	75 (100), 147, 217, 103, 307, 133, 204, 289, 248
5	Arabinofuranose	17,0	27.696	438	C ₁₇ H ₄₂ O ₅ Si ₄	217 (100), 75, 147, 103, 218, 257, 393, 74, 133
6	β-D-Galactofuranose	41,8	28.355	540	C ₂₁ H ₅₂ O ₆ Si ₅	217 (100), 147, 218, 74, 75, 103, 257, 219, 191
7	D-Ribofuranose	21,8	28.501	438	C ₁₇ H ₄₂ O ₅ Si ₄	217 (100), 147, 218, 74, 103, 75, 219, 257, 129
8	d-Erythrotetrofuranose	21,7	29.086	336	C ₁₃ H ₃₂ O ₄ Si ₃	147 (100), 217, 218, 133, 75, 191, 74, 103, 129
9	Arabitol	12,0	30.070	512	C ₂₀ H ₅₂ O ₅ Si ₅	204 (100), 147, 306, 217, 205, 103, 319, 191, 307
10	Glucopiranose	20,3	31.890	540	C ₂₁ H ₅₂ O ₆ Si ₅	204 (100), 147, 191, 217, 205, 74, 74, 206, 129
11	Mio-Inositol	67,8	33.752	612	C ₂₄ H ₆₀ O ₆ Si ₆	147 (100), 305, 217, 318, 204, 291, 191, 306, 74
12	ácido cinamico	98,9	34.185	396	C ₁₈ H ₃₂ O ₄ Si ₃	396 (100), 219, 397, 381, 191, 220, 398, 249, 75
13	Hydroquinona glicosilada	19,3	41.956	560	C ₂₄ H ₄₈ O ₇ Si ₄	182 (100), 254, 167, 75, 89, 183, 74, 255, 181
14	ácido cinamico	90,4	49.791	396	C ₁₈ H ₃₂ O ₄ Si ₃	396(100), 219, 397, 381, 191, 220, 398, 249, 75
15	β-sitosterol	77,0	51.312	486	C ₃₂ H ₅₈ O _{Si}	129(100), 75, 357, 57, 396, 133, 207, 119, 55

* o pico [m/z = 73 (CH₃)₂Si] aparece em todos os espectros de massas não foi acrescentado na tabela, porque é um pico característico de fragmentação de compostos silanizados.

4.4. Efeito dos extratos de *C. sylvestris* e *C. decandra* sobre o crescimento micelial e produção biomassa

Através dos resultados obtidos pelas curvas de crescimento dos fungos degradadores de madeira expostos aos extratos de *C. sylvestris* e *C. decandra* (Figura 19) foi possível determinar os índices antifúngicos conforme apresentado nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

O extrato de *C. sylvestris* inibiu o crescimento das colônias fúngicas. A análise estatística dos dados mostrou que há diferenças significativas entre as médias das áreas das colônias (cm²) dos fungos em relação aos controles ($P = 0,000$).

Tabela 6. Índice antifúngico (IAF%) da colônia dos fungos expostos ao extrato de *C. sylvestris*.

ÍNDICE ANTIFÚNGICO (IAF%)				
Fungo	Tempo (dias)	Concentração (mg/mL)		
		0,1	0,01	0,001
<i>Trametes villosa</i>	4	47,77	46,85	49,89
	8	40,18	44,24	34,93
	12	28,59	32,89	15,64
	16	15,32	18,70	8,78
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	4	77,42	77,20	78,19
	8	76,42	77,48	76,20
	12	71,12	72,50	70,23
	16	71,63	70,12	66,67
<i>Ganoderma australe</i>	4	78,69	79,13	74,39
	8	76,96	75,32	79,02
	12	79,78	79,76	79,67
	16	76,10	76,59	69,56

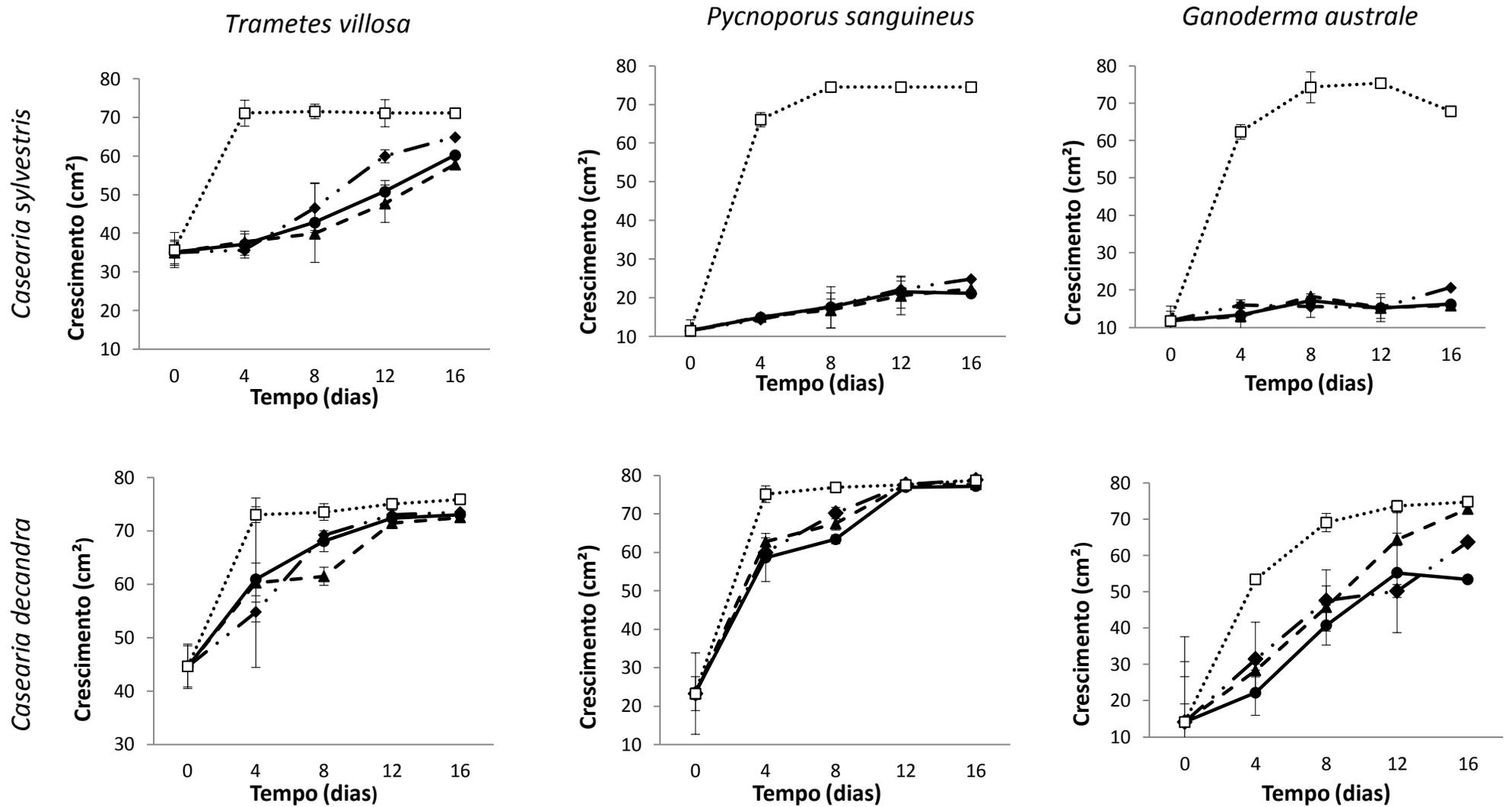


Figura 19 - Efeito dos extratos de *C. sylvestris* e *C. decandra* no crescimento micelial dos fungos, durante 16 dias de cultivo em meio BDA + pó de bagaço de cana-de-açúcar a 25 °C. O Tempo 0 indica o momento em que a colônia fúngica (4 dias de crescimento) foi transferida para novo meio na presença do extrato (...□..... Controle; ---●--- 0,1; -▲- - 0,01; ---◆- - 0,001).

O fungo *T. villosa* apresentou inibição média de 49% no seu crescimento nos primeiros 4 dias após a transferência ao extrato em todas as concentrações avaliadas. Essa taxa de inibição foi sendo reduzida ao longo do período experimental atingindo aproximadamente 14% de média entre as concentrações. O fungo *P. sanguineus* foi consideravelmente inibido durante todo o tempo de cultivo, com índices antifúngicos de quase 80% em todas as concentrações. O fungo *G. australe* também se mostrou altamente susceptível ao extrato de *C. sylvestris* sendo inibido em 77% em todas as concentrações durante os 16 dias de cultivo.

O maior índice de inibição do crescimento micelial dos fungos ocorreu nos primeiros 4 dias de exposição ao extrato, onde se observou a paralização do crescimento de todos os fungos quando expostos ao extrato. Nos tempos seguintes os fungos apresentaram taxa de crescimento consideravelmente reduzida.

Os dados da atividade antifúngica do extrato de *C. decandra* testado frente aos fungos degradadores de madeira é apresentado na Tabela 7. Observou-se nas culturas que o micélio dos fungos expostos ao extrato cresceram mais ralos, com espaçamento entre as hifas, ao contrário dos controles onde o micélio era denso (ANEXOS 6, 7 e 8).

Tabela 7 - Índice antifúngico (IAF%) da colônia dos fungos expostos ao extrato de *C. decandra*.

ÍNDICE ANTIFÚNGICO (IAF%)				
Fungo	Tempo (dias)	Concentração (mg/mL)		
		0,1	0,01	0,001
<i>Trametes villosa</i>	4	16,59	17,45	24,95
	8	7,44	16,39	5,87
	12	3,50	4,81	2,72
	16	3,81	4,47	3,15
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	4	21,96	16,50	20,20
	8	17,57	12,26	8,68
	12	0,69	0,03	0,21
	16	1,89	1,30	0,16
<i>Ganoderma australe</i>	4	58,49	46,96	41,05
	8	40,97	33,74	31,06
	12	24,96	12,48	31,81
	16	28,64	2,70	14,85

O extrato de *C. decandra* inibiu o crescimento micelial dos fungos, no entanto, o efeito inibitório foi menos pronunciado visto que os fungos cresceram e ocuparam a área total da placa após 16 dias de cultivo, embora em velocidade reduzida quando comparado ao controle. A análise estatística mostrou diferenças significativas entre os tratamentos e o controle ($P = 0,000$), mas não houve diferença entre os tratamentos quando comparados entre si. Todos os fungos apresentaram maior índice de inibição do crescimento apenas nos primeiros quatro dias após a exposição ao extrato.

O fungo *T. villosa* e *P. sanguineus* apresentaram a maior taxa de inibição nos primeiros 4 dias de exposição, em média de 20 e 21%, respectivamente, nas três concentrações avaliadas. Já o fungo *G. australe* foi o que mostrou a maior inibição quando exposto ao extrato de *C. decandra*. Após 4 dias o crescimento micelial foi reduzindo em aproximadamente 50% quando comparado ao controle.

O efeito dos extratos de *C. sylvestris* e *C. decandra* sobre a produção de biomassa fúngica também foi avaliado sendo os dados obtidos apresentados na Figura 20. Foi constatada a redução na produção de biomassa, sendo tal efeito mais evidente do que o observado em relação ao crescimento micelial.

Para os três fungos estudados houve diferença estatística entre as diferentes concentrações do extrato de *C. sylvestris* em relação ao controle ($P = 0,000$), no entanto, não houve diferença estatisticamente significativamente entre as três concentrações avaliadas ($P = 1,000$). Com relação ao tempo de cultivo houve diferenças significativas para os controles e os tratamentos ($P = 0,000$). O fungo *T. villosa* apresentou maior inibição da biomassa após 8 dias de cultivo, em média 94% em relação ao controle. O fungo *P. sanguineus* teve maior redução da biomassa após 12 dias sendo observada uma inibição média de 93%. Já para *G. australe* a produção de biomassa foi reduzida em 97% nos quatro primeiros dias de exposição ao extrato.

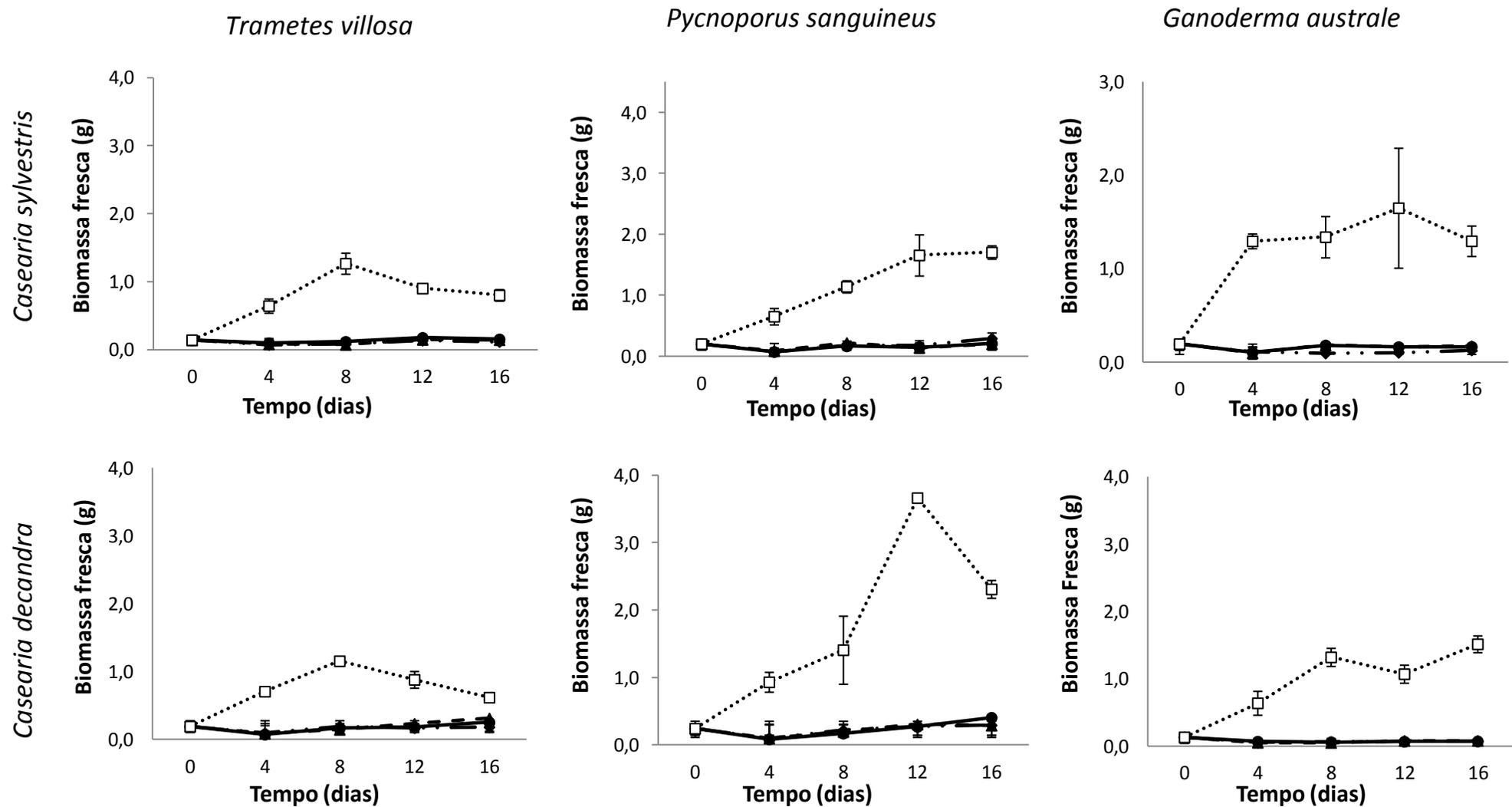


Figura 20 - Efeito dos extratos de *C. sylvestris* e *C. decandra* na produção de biomassa dos fungos, durante 16 dias de cultivo em meio BDA + pó de bagaço de cana-de-açúcar a 25 °C. O Tempo 0 indica o momento em que a colônia fúngica (4 dias de crescimento) foi transferida para novo meio na presença do extrato (....□.... Controle; ----●---- 0,1; -▲- 0,01; -◆- 0,001).

Apesar dos fungos terem colonizado toda a placa até o término do experimento quando expostos ao extrato de *C. decandra*, observado os dados de biomassa fresca, foi verificado altos índices de inibição durante todo o tempo de incubação. Não houve diferenças significativas entre as diferentes concentrações do extrato ($P = 1,000$), mas por outro lado houve diferença em relação ao controle ($P = 0,000$). A biomassa fúngica de *G. australe* foi reduzida em 95% e os fungos *T. villosa* e *P. sanguineus* tiveram a sua biomassa reduzida em 90% durante os 16 dias de cultivo na presença do extrato de *C. decandra*.

4.5. Efeito dos extratos de *C. sylvestris* e *C. decandra* sobre síntese de proteínas

A concentração de proteínas extracelulares presentes no meio de cultivo dos fungos apresentou alterações significativas durante a exposição ao extrato em relação ao controle. A secreção de proteínas para meio extracelular foi maior nos tratamentos em todas as concentrações (Figura 21). O extrato de *C. sylvestris* causou aumento na secreção de proteínas a partir do quarto dia, sendo que para o fungo *P. sanguineus* a maior elevação de secreção ocorreu no Tempo 8 com 82% em média entre as concentrações. Para o fungo *T. villosa* essa secreção só foi evidenciada a partir do Tempo 12 com aumento de 40% nos tratamentos com o extrato em relação ao controle. Com o fungo *G. australe* a maior secreção de proteínas ocorreu no Tempo 12 com aumento em média de 56% entre os tratamentos.

O extrato de *C. decandra* causou aumento na secreção de proteínas extracelulares em relação ao controle de forma evidente nos períodos finais de cultivo dos fungos, o fungo *T. villosa* no Tempo 12 aumentou em média 48% a secreção de proteínas nos tratamentos. Com o fungo *P. sanguineus* a secreção de proteínas só foi maior que no controle no Tempo 8 com média de 32% entre os tratamentos. O fungo *G. australe* em média aumentou 88% no Tempo 16 em todos os tratamentos.

Estatisticamente não houve diferença significativa para nenhum dos fungos quando os dados foram confrontados em relação aos tratamentos ($P = 0,917$) e tempo de incubação ($P = 0,047$).

A quantificação de proteínas intracelulares mostrou que a síntese de proteínas foi reduzida nos tratamentos quando comparados com os controles (Figura 22).

A redução foi de 40 e 80% após os primeiros quatro dias de exposição na presença do extrato de *C. sylvestris* para os fungos *P. sanguineus* e *G. australe*, respectivamente. O fungo *T. villosa* não apresentou redução significativa na síntese de proteínas ($P = 1,000$) em relação ao controle.

Em relação ao extrato de *C. decandra* os fungos *T. villosa* e *G. australe* tiveram inibição de 61 e 53% no Tempo 8 o nível de proteínas intracelulares para esses dois fungos na presença do extrato permaneceram baixos em relação ao controle durante todo o período de cultivo. Já o fungo *P. sanguineus* apresentou leve aumento na síntese proteica entre 4 e 8 dias de tratamento (17 e 25% de aumento, respectivamente).

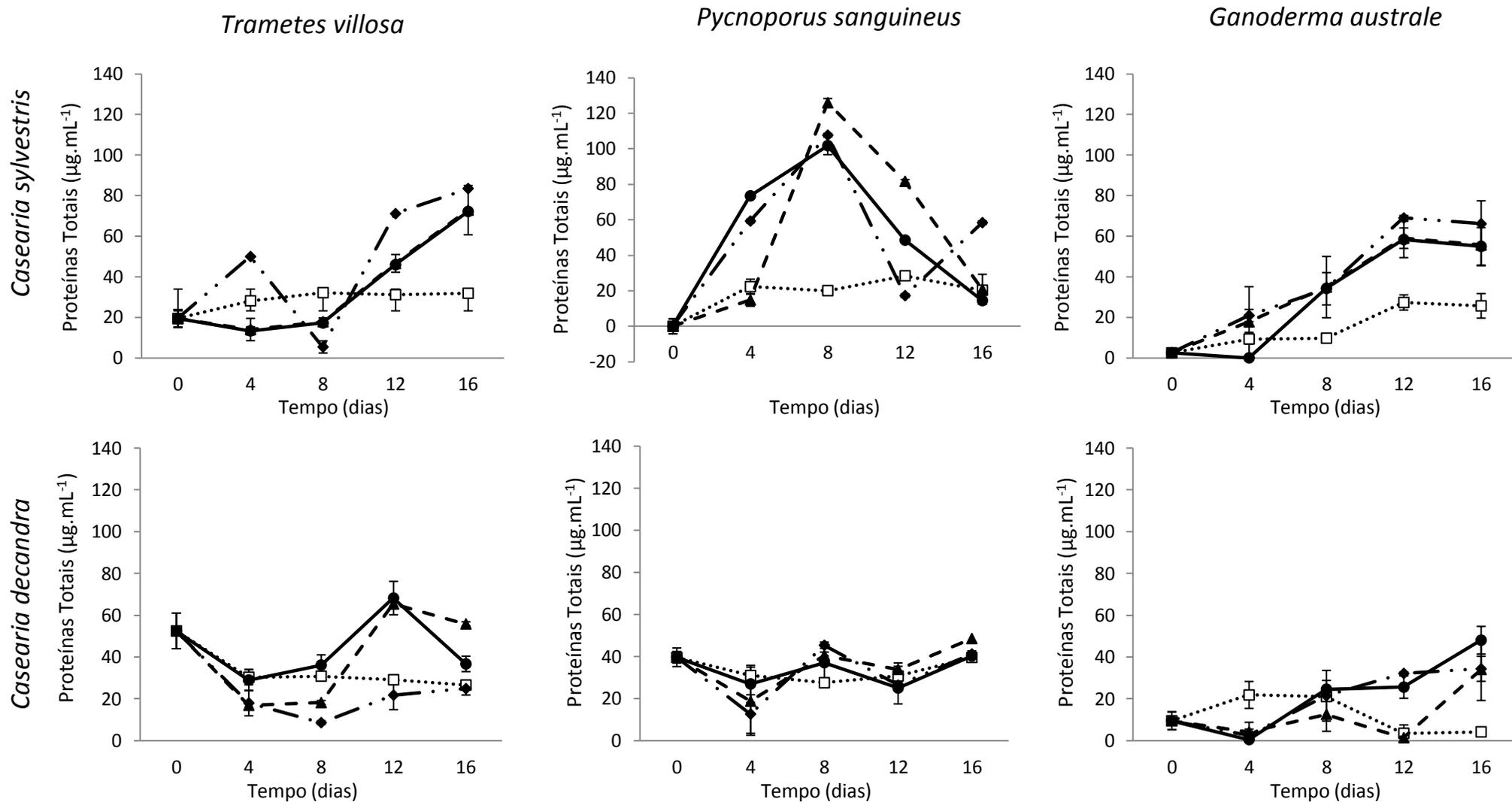


Figura 21 - Efeito dos extratos de *C. sylvestris* e *C. decandra* sobre a concentração de proteínas extracelulares presentes no meio de cultivo dos fungos durante 16 dias em meio BDA + pó de bagaço de cana-de-açúcar a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. O Tempo 0 indica o momento em que a colônia fúngica (4 dias de crescimento) foi transferida para novo meio na presença do extrato (.....□..... **Controle**; ---●--- **0,1**; ---▲--- **0,01**; ---◆--- **0,001**).

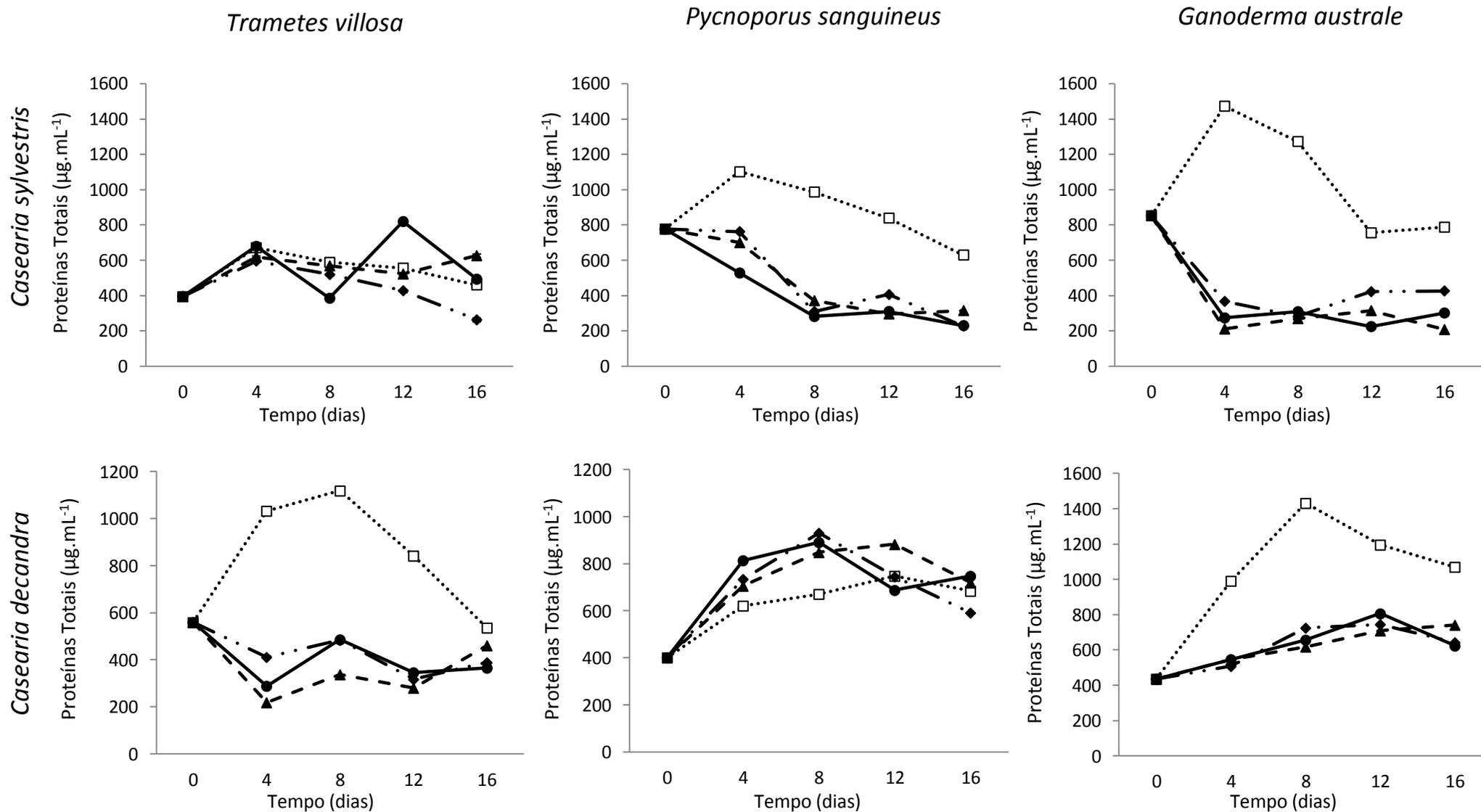


Figura 22 - Efeito dos extratos de *C. sylvestris* e *C. decandra* sobre a concentração de proteínas intracelulares dos fungos cultivados durante 16 dias em meio BDA + pó de bagaço de cana-de-açúcar a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. O Tempo 0 indica o momento em que a colônia fúngica (4 dias de crescimento) foi transferida para novo meio na presença do extrato (.....□..... **Control**; ---●--- **0,1**; -▲- - **0,01**; ---◆- - **0,001**).

4.6. Efeito dos extratos de *C. sylvestris* e *C. decandra* sobre a atividade das enzimas ligninolíticas

Foi determinada no presente estudo a influência dos extratos de *C. sylvestris* e *C. decandra* sobre a atividade das enzimas extracelulares relacionadas à degradação da madeira MnP, lacase, fenoloxidasas e peroxidases, respectivamente (Figuras 23, 24 e 25). Para todas as enzimas estudadas não foi verificada diferença significativa entre as concentrações dos extratos de *C. sylvestris* ($P = 1,000$) e *C. decandra* ($P = 1,000$), nos três fungos avaliados. A atividade de peroxidases não foi detectada nos extratos enzimáticos dos fungos (Anexo 1).

A atividade máxima da enzima MnP no fungo *T. villosa* foi verificada no tratamento controle após 16 dias de crescimento. Já na presença do extrato de *C. sylvestris*, a atividade foi significativamente reduzida em 82 e 89%, após 4 e 8 dias de exposição, respectivamente, em todas as concentrações. O fungo *P. sanguineus* exposto ao mesmo extrato também teve sua atividade enzimática inibida. A maior atividade da MnP foi observada aos 12 dias de incubação com $2,91 \text{ UL}^{-1}$ no tratamento controle. Nas diferentes concentrações não houve pico de atividade máxima, mostrando a inibição da enzima durante todo o tempo de incubação. Para o fungo *G. australe* apesar da atividade da MnP ter sido muito baixa, o controle apresentou pico de atividade com 16 dias de incubação de $2,0 \text{ UL}^{-1}$. A atividade da enzima foi inibida na presença do extrato de *C. sylvestris* quando comparado com o controle.

A atividade da enzima lacase também foi reduzida após a exposição ao extrato de *C. sylvestris*. O fungo *T. villosa* mostrou uma redução em média de 89%, em todas as concentrações. O pico de atividade da enzima ocorreu com 8 dias e posteriormente decresceu em relação ao tempo. Com o fungo *P. sanguineus* a atividade da lacase após a transferência para placas com extrato foi reduzida em média 97% nas concentrações a partir do Tempo 8. A cinética de produção da lacase durante o experimento foi exponencial, isto é, não mostrou pico máximo de atividade nas placas controle durante os 20 dias de incubação, com atividade até $303,26 \text{ UL}^{-1}$. Para o fungo *G. australe* a maior produção de lacase ocorreu após 12 dias de tratamento ($801,91 \text{ UL}^{-1}$) na ausência do extrato. No entanto a atividade sofreu inibição superior a 90% durante os 16 dias de cultivo quando na presença do extrato de *C. sylvestris*. Não foram encontradas diferenças significativas ($P = 1,000$) entre as três concentrações do extrato.

A atividade fenoloxidase em *T. villosa* no tratamento controle permaneceu praticamente constante entre 4 e 12 dias com tendência de queda no decorrer do tempo. No entanto, a atividade enzimática foi reduzida em aproximadamente 90% durante os 16 dias de incubação quando na presença do extrato. O efeito do extrato sobre a atividade enzimática em *P. sanguineus* foi mais drástico sendo verificada, em média, 99% de inibição. Em condições fisiológicas normais a atividade enzimática cresce até 12 dias de cultivo e em seguida a atividade decresce significativamente. O fungo *G. australe* também teve a atividade severamente afetada pelo extrato de *C. sylvestris*, A atividade foi reduzida em 97% nos primeiros 4 dias de tratamento. Nas placas controle o pico de atividade ocorreu após 12 dias de incubação.

Os ensaios enzimáticos realizados com o extrato de *C. decandra* mostraram respostas distintas na produção das enzimas. Em relação a MnP em *T. villosa* os dados mostraram que o extrato inibiu a produção da enzima apenas entre 4 e 8 dias. Após 12 dias houve significativo aumento da atividade. Já os fungos *P. sanguineus* e *G. australe* tiveram a produção MnP consideravelmente afetada durante os 16 dias de cultivo, atingindo 100% de inibição no caso de *G. australe*.

A atividade da lacase nos fungos *T. villosa* e *P. sanguineus* apresentou leve tendência de inibição entre 4 e 8 dias, no entanto, após esse período a atividade lacase foi de modo geral estimulada devido ao extrato.. Apenas o fungo *G. australe* teve sua atividade lacase fortemente inibida até o final do período de cultivo. Comportamento bem similar foi observado em relação à análise da atividade fenoloxidase nos três fungos estudados. A produção enzimática se elevou nos períodos finais de cultivo, entre 12 e 16 dias, em *T. villosa* e *P. sanguineus*. Já *G. australe* apresentou maior sensibilidade com relação à produção de fenoloxidases na presença do extrato de *C. decandra*.

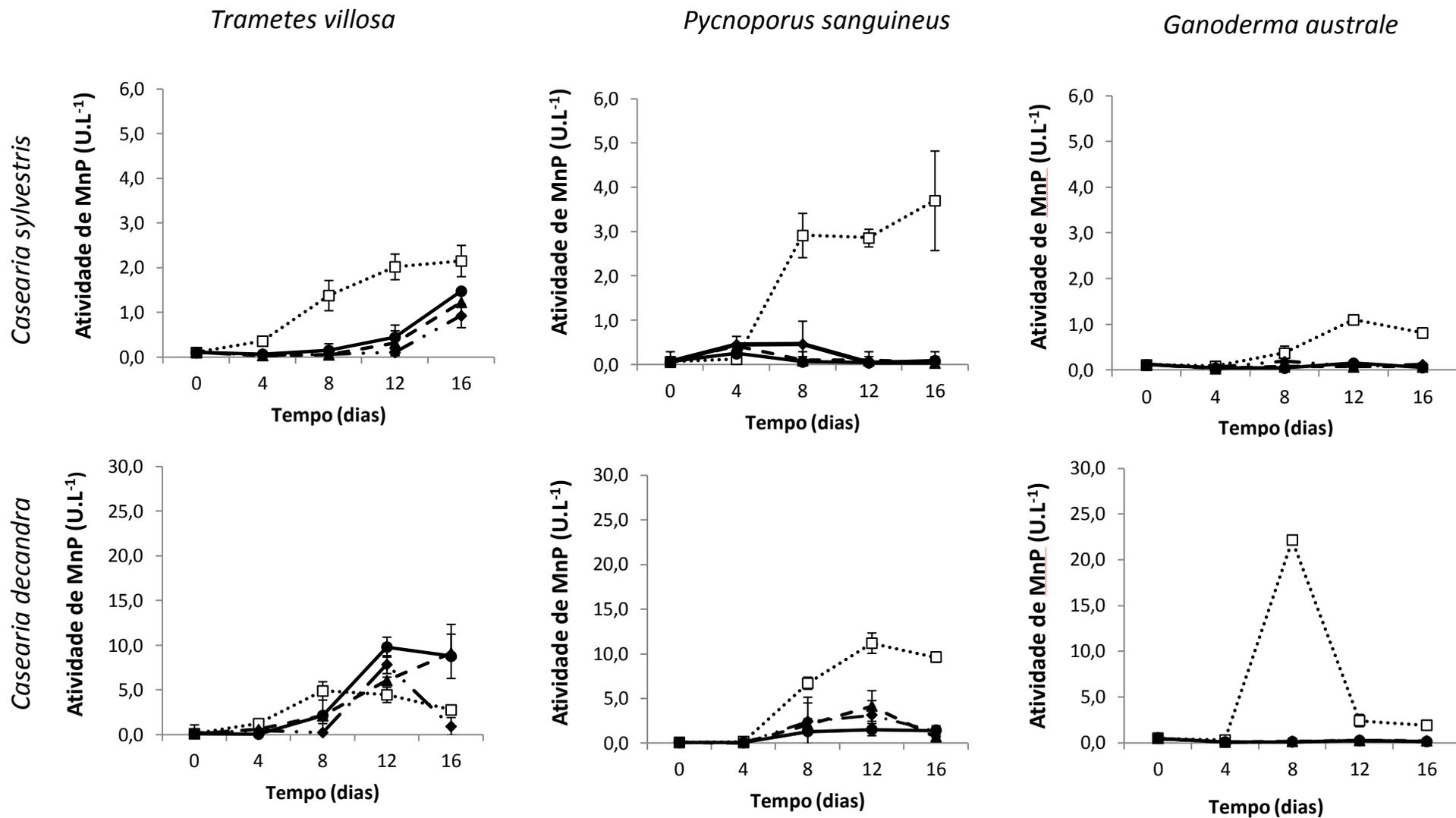


Figura 23 - Efeito dos extratos de *C. sylvestris* e *C. decandra* sobre a enzima MnP dos fungos cultivados em meio BDA + pó de bagaço de cana-de-açúcar durante 16 dias a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. O Tempo 0 indica o momento em que a colônia fúngica (4 dias de crescimento) foi transferida para novo meio na presença do extrato (.... □.. **Controle**; ----●---- 0,1; --▲-- 0,01; ---◆--- 0,001).

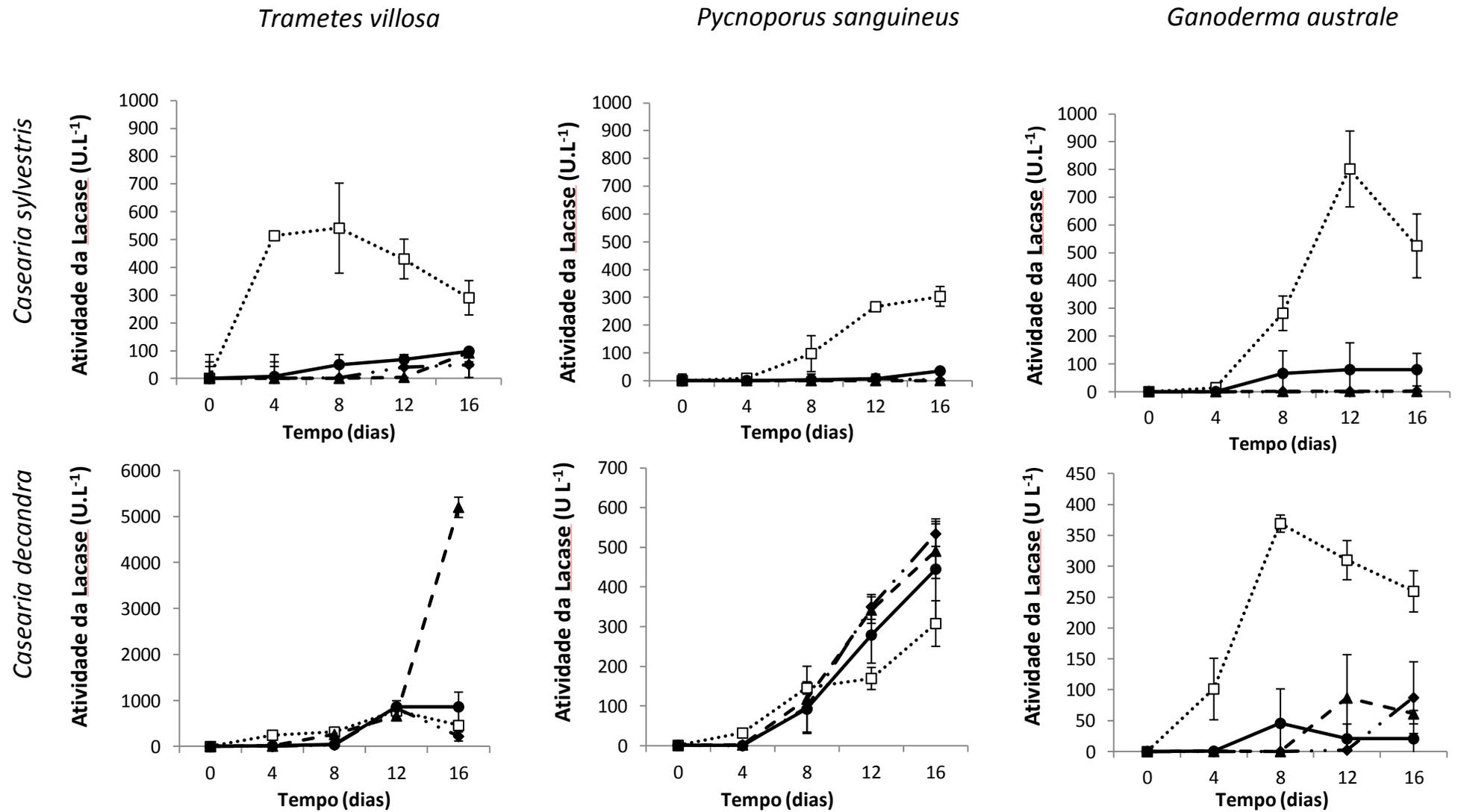


Figura 24 - Efeito dos extratos de *C. sylvestris* e *C. decandra* sobre a enzima lacase dos fungos cultivados em meio BDA + pó de bagaço de cana-de-açúcar durante 16 dias a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. O Tempo 0 indica o momento em que a colônia fúngica (4 dias de crescimento) foi transferida para novo meio na presença do extrato (.... □.. Controle; --- ●--- 0,1; --▲-- 0,01; ---◆-- 0,001).

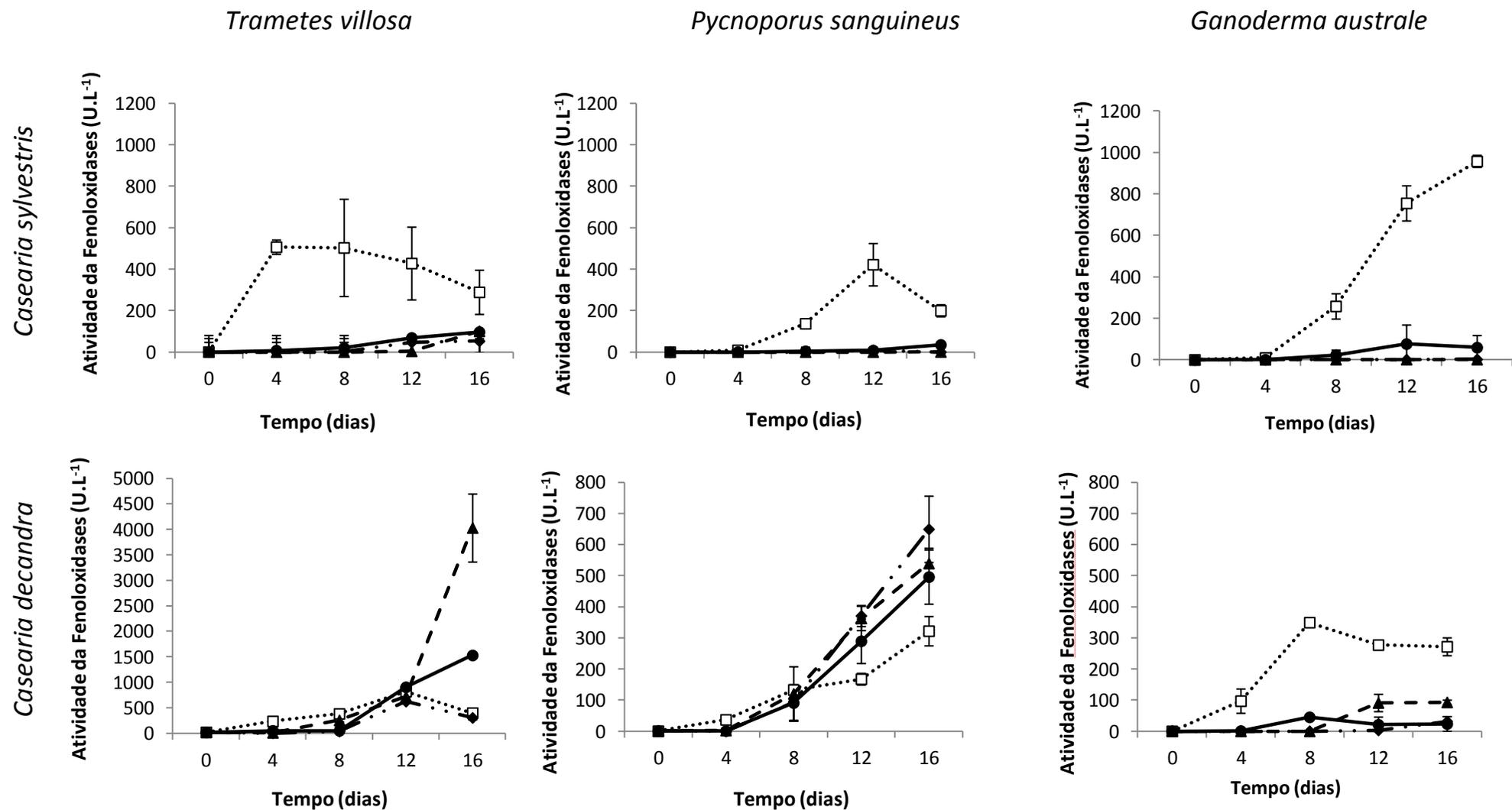


Figura 25 - Efeito dos extratos de *C. sylvestris* e *C. decandra* sobre a enzima fenoloxidasas dos fungos cultivados em meio BDA + pó de bagaço de cana-de-açúcar durante 16 dias a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. O Tempo 0 indica o momento em que a colônia fúngica (4 dias de crescimento) foi transferida para novo meio na presença do extrato (...□..... **Controle**; ---●--- 0,1; -▲- 0,01; -◆- 0,001).

4.7. Efeito dos extratos de *C. sylvestris* e *C. decandra* sobre a atividade das enzimas associadas à morfogênese

Foi determinada no presente estudo a influência dos extratos na concentração $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$, sobre a atividade das enzimas relacionadas ao desenvolvimento fúngico (quitinase e β -1,3-glucanase). Optou-se por avaliar os extratos apenas na concentração $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ em virtude dos resultados obtidos anteriormente não demonstrarem diferenças estatisticamente significativas entre as três concentrações. Portanto, a partir dessa etapa do trabalho o efeito dos extratos foram estudados apenas na concentração $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Conforme pode ser observado na Figura 26, o extrato de *C. sylvestris* inibiu a produção de quitinase nos fungos *T. villosa* e *G. australe*. O fungo *T. villosa* teve sua atividade inibida durante os 16 dias de incubação com média de 76% de inibição. Nas placas controle a atividade máxima da enzima ocorreu com 12 dias, estatisticamente houve diferenças significativas das placas-controle com o tratamento ($P = 0,000$) e os valores da atividade da enzima durante o tempo de cultivo também mostrou diferenças significativas ($P = 0,000$). O fungo *G. australe* também apresentou inibição da enzima durante todo o tempo de cultivo com média de 72%. Em condições fisiológicas normais o fungo manteve a atividade enzimática praticamente constante até 12 dias de cultivo e a partir de então a atividade decresceu, mas ainda mantendo níveis enzimáticos superiores àqueles observados quando o fungo foi exposto ao extrato de *C. sylvestris*. O fungo *P. sanguineus* não teve a atividade quitinase significativamente afetada embora seja possível observar uma tendência de estímulo na atividade enzimática na presença do extrato principalmente nos primeiros 4 dias.

O extrato de *C. decandra* induziu a produção de quitinase nos fungos *T. villosa* e *P. sanguineus*, em média 30 e 48%, respectivamente. No entanto, o pico de estímulo da atividade foi observado após 12 dias de tratamento com o extrato. De modo geral o fungo *G. australe* não teve a atividade quitinase afetada significativamente pelo extrato ($P = 0,4468$). Foi observado grande oscilação no decorrer do tempo, mas ao final de 16 dias, a produção enzimática foi igual em relação ao controle.

Os resultados da determinação da atividade β -1,3-glucanase nos fungos *T. villosa*, *P. sanguineus* e *G. australe* tratados com extrato de *C. sylvestris* e *C. decandra* são apresentados na Figura 27.

O extrato de *C. sylvestris* não alterou significativamente a atividade enzimática em *T. villosa* quando comparado ao controle ($P = 0,1548$). Já os fungos *P. sanguineus* e *G. australe* tiveram a atividade mais elevada em relação ao controle ($P = 0,000$) já nos primeiros 4 dias. Ao final de 16 dias a atividade β -1,3-glucanase era superior a 70% em relação ao controle para ambos os fungos.

A exposição *T. villosa* e *G. australe* ao extrato de *C. decandra* também estimulou a atividade β -1,3-glucanase dos fungos. No entanto, diferentemente de *T. villosa*, que apresentou redução na produção enzimática após 16 dias, o fungo *G. australe* tratado com o extrato apresentou níveis de atividade superiores ao controle durante todo o período de cultivo. Com relação a *P. sanguineus*, a atividade β -1,3-glucanase não foi significativamente afetada pela exposição ao extrato de *C. decandra*.

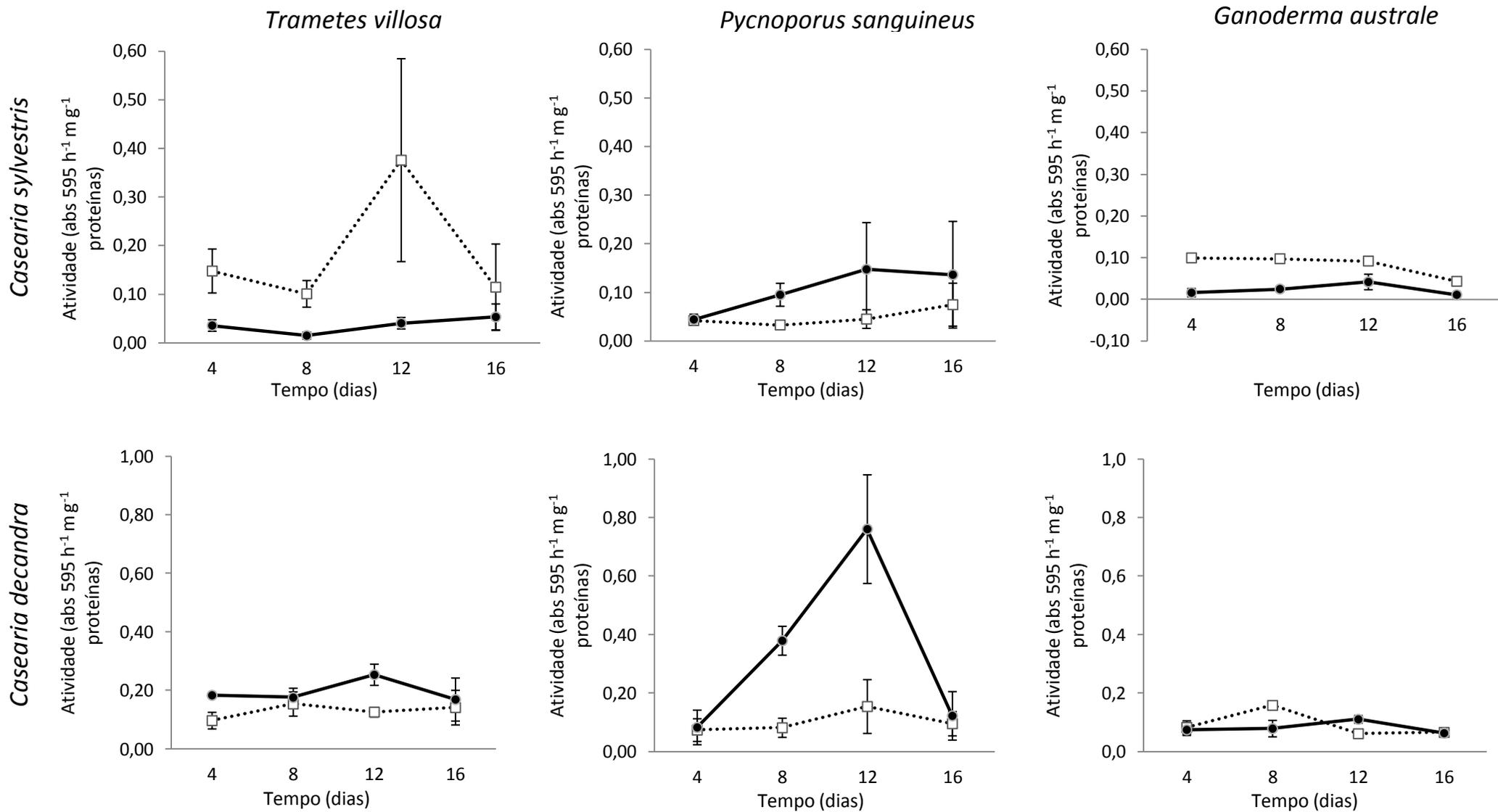


Figura 26 - Efeito dos extratos de *C. sylvestris* e *C. decandra* sobre a quitinase dos fungos cultivados em meio BDA + pó de bagaço de cana-de-açúcar durante 16 dias a 25 ± 2°C (....□..... Controle; ---●--- 0,1).

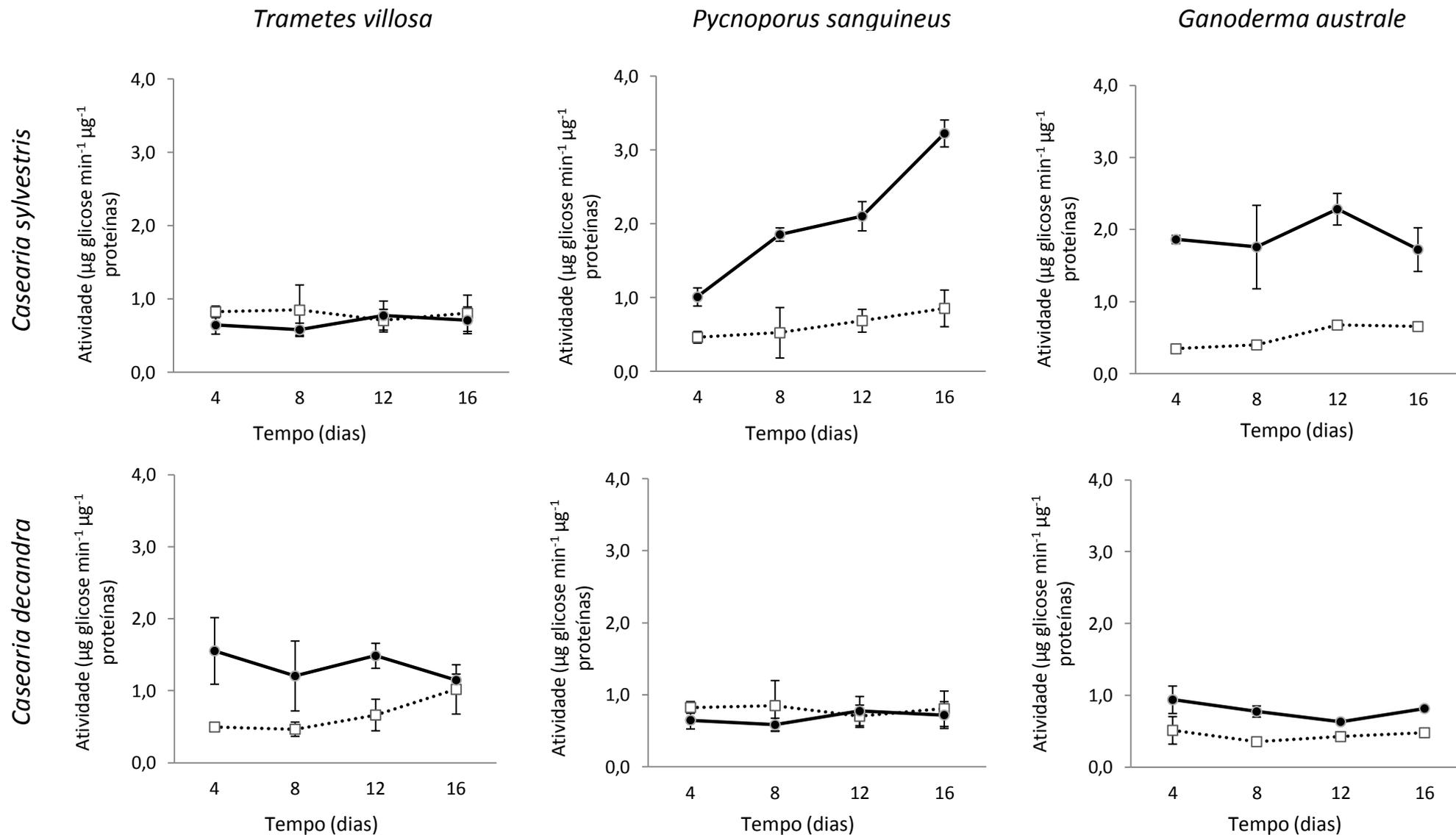


Figura 27 - Efeito dos extratos de *C. sylvestris* e *C. decandra* sobre a β -1,3 glucanase dos fungos cultivados em meio BDA + pó de bagaço de cana-de-açúcar durante 16 dias a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (...□..... Controle; ---●--- 0,1).

4.8. Efeito dos extratos de *C. sylvestris* e *C. decandra* sobre a atividade das enzimas associadas ao estresse oxidativo

A Figura 28 apresenta o efeito dos extratos de *C. sylvestris* e *C. decandra* sobre a atividade CAT nos fungos *T. villosa*, *P. sanguineus* e *G. australe*. Os fungos *T. villosa* e *P. sanguineus*, quando expostos ao extrato de *C. sylvestris*, apresentaram elevação estatisticamente significativa da atividade CAT ($P = 0,000$) no oitavo dia de tratamento (80 e 69% de aumento, respectivamente). No entanto, a atividade da CAT declinou no decorrer do tempo, atingindo níveis compatíveis com aqueles observados nos fungos em condições fisiológicas normais. O fungo *T. villosa* quando não exposto ao extrato apresentou níveis relativamente baixos e constantes no decorrer do tempo. Já no caso de *P. sanguineus*, apesar de também apresentar níveis relativamente baixos de CAT em condições basais, foi observada uma tendência de aumento da atividade (238,2 – 612,2 U mg⁻¹ proteína) com o envelhecimento da cultura.

O fungo *G. australe*, exposto ao extrato de *C. sylvestris*, respondeu ao tratamento produzindo altos níveis de CAT. A produção de CAT elevou-se linearmente até o décimo segundo dia de cultivo e então a atividade decresceu no décimo sexto dia, mas ainda permaneceu elevada em relação ao controle ($P = 0,0000$).

Os fungos tratados com extrato de *C. sylvestris* também foram analisados quanto a produção da enzima GR, sendo os resultados apresentados na Figura 29. O fungo *T. villosa* teve a produção de GR significativamente reduzida ($P = 0,0459$) quando exposto ao extrato, principalmente após 12 dias de cultivo. Diferentemente, *P. sanguineus* respondeu ao tratamento através da elevação níveis de GR entre 8 e 12 dias ($P = 0,000$). O fungo *G. australe* também apresentou maior atividade da GR quando exposto ao extrato de *C. sylvestris*, no entanto, os níveis de GR foram superiores ao controle durante os 16 dias. O pico de produção ocorreu o oitavo dia, um aumento de 70% em relação ao controle. .

As enzimas CAT e GR também foram avaliadas nos fungos tratados com o extrato de *C. decandra* (Figuras 28 e 29). No fungo *T. villosa*, a atividade CAT foi maior no tratamento controle ($P = 0,0000$), apesar de a atividade cair progressivamente durante o envelhecimento da cultura. No Tempo 4 a atividade foi 82% maior do que na cultura fúngica exposta ao extrato, no entanto, nos Tempos 12 e 16 a atividade não diferiu em relação ao tratamento com o extrato. A atividade CAT na cultura tratada com o extrato não variou significativamente ao longo do tempo de

crescimento, mantendo a atividade entre 61,8 – 59,2U mg⁻¹ proteína. O fungo *G. australe* também apresentou menor atividade CAT quando exposto ao extrato de *C. decandra* em relação ao controle, chegando a ser 50% menor ao final de 16 dias de cultivo. No caso de *P. sanguineus* só foi observada alteração significativa após 8 dias, quando a atividade CAT apresentou-se mais elevada (44%) em relação ao controle. Nos demais tempos de exposição não foi possível verificar efeito significativo em relação ao controle.

Os resultados da determinação da atividade GR nos fungos *G. australe*, *T. villosa* e *P. sanguineus* tratados com extrato de *C. decandra* são apresentados na Figura 29. Os resultados demonstraram que esta via antioxidativa é afetada pelo extrato de *C. decandra* nos diferentes períodos de crescimento dos fungos na concentração testada.

O fungo *T. villosa* quando exposto ao extrato apresentou maior atividade da GR quando comparado ao controle, com exceção do período de 8 dias, que não foi significante estatisticamente. Em média os níveis de GR foram 47% maiores que o controle durante os 16 dias de cultivo. O fungo *P. sanguineus* só apresentou alteração da atividade GR após 12 dias de exposição, com aumento de 54% em relação ao controle ($P = 0,0000$), e diminuiu após 16 dias. Não foram observadas diferenças significativas da atividade enzimática com relação ao tempo de tratamento ($P = 0,4395$).

A atividade GR no fungo *G. australe* foi superior nas placas tratadas com o extrato de *C. decandra* em relação ao controle ($P = 0,0000$), sendo que essa diferença de atividade foi mais evidente nos primeiros 4 dias de exposição, com 33% de aumento em relação ao controle. No entanto, ao longo do período de cultivo houve um decréscimo da atividade, e após 16 dias a atividade GR passou a ser semelhante ao controle.

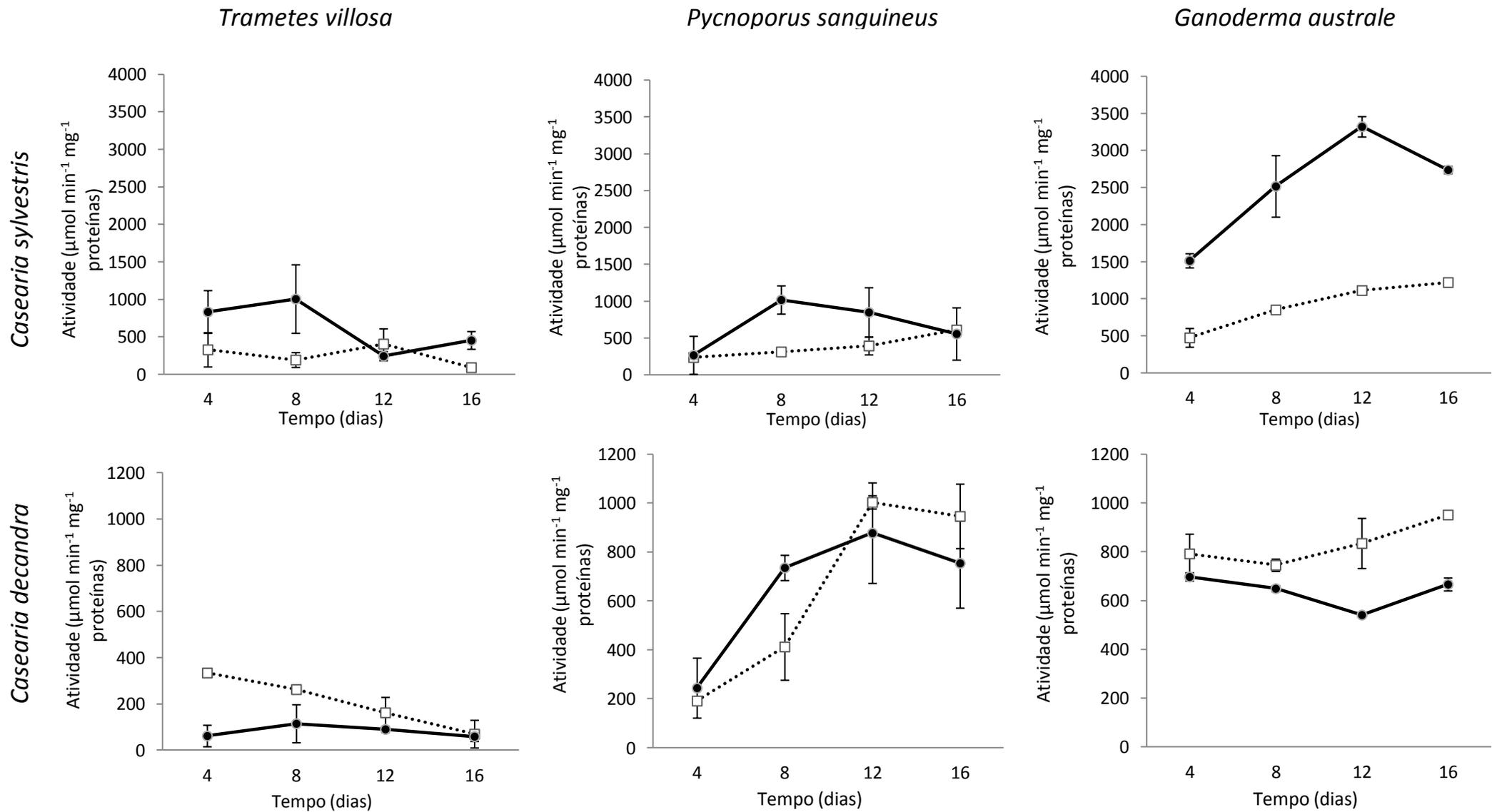


Figura 28 - Efeito dos extratos de *C. sylvestris* e *C. decandra* sobre a CAT dos fungos cultivados em meio BDA + pó de bagaço de cana-de-açúcar durante 16 dias a $25 \pm 2^\circ\text{C}$

(...□..... Controle; ---●--- 0,1).

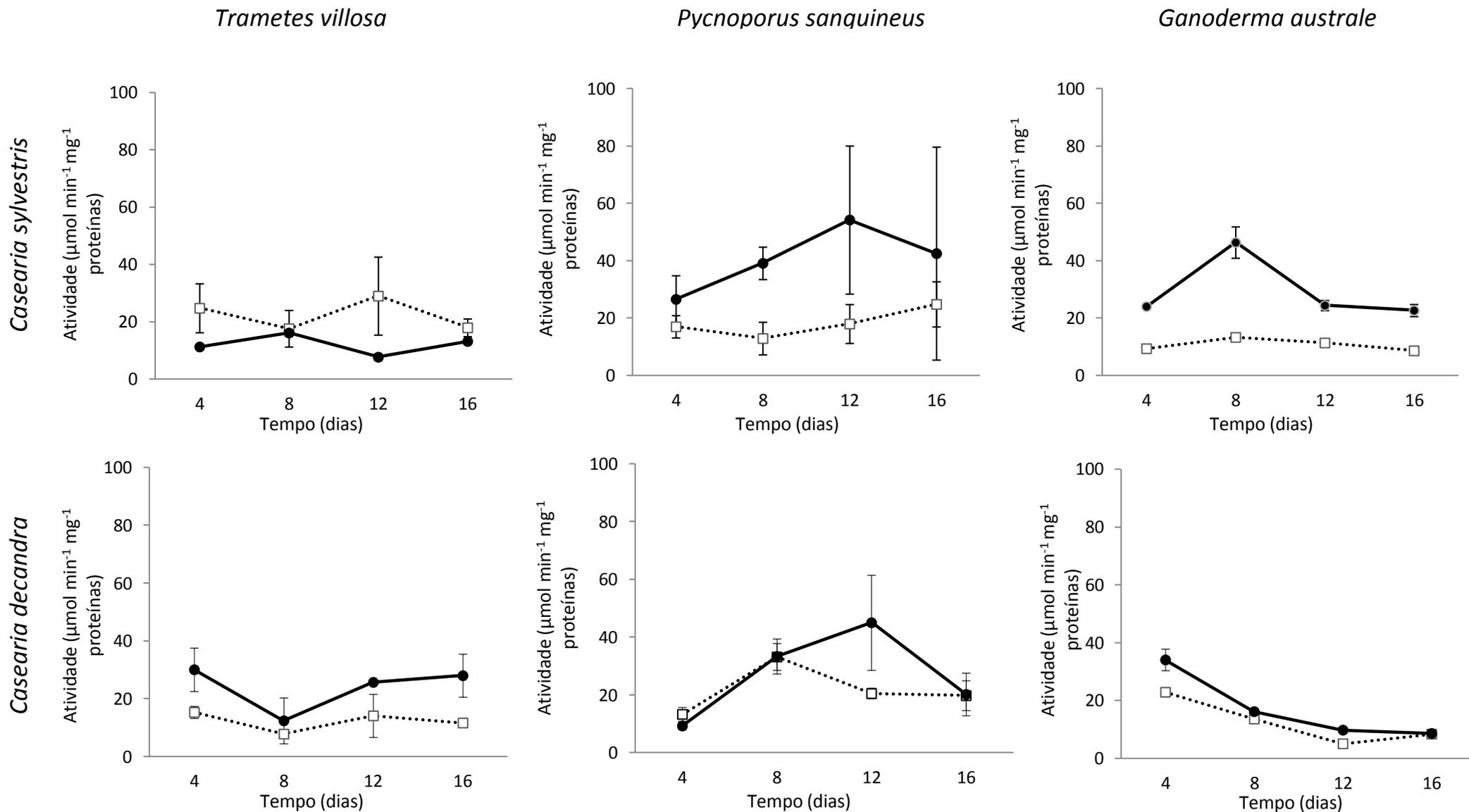


Figura 29 - Efeito dos extratos de *C. sylvestris* e *C. decandra* sobre a GR dos fungos cultivados em meio BDA + pó de bagaço de cana-de-açúcar durante 16 dias a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (...□..... Controle; ---●----- 0,1).

4.9. Efeito dos extratos de *C. sylvestris* e *C. decandra* sobre a morfologia microscópica do fungos

Com o intuito de observar diferenças na morfologia da cultura dos fungos *T. villosa* e *P. sanguineus* foram realizadas análises microscópicas. Sendo assim, foram montadas lâminas do micélio na zona de crescimento ativo da colônia dos fungos cultivados em meio BDA na presença dos extratos de *C. sylvestris* e *C. decandra* na concentração de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$. Como controle foram analisados o micélio dos fungos cultivados na ausência dos extratos.

O fungo *T. villosa* nas placas-controle do Tempo 4 apresentaram hifas generativas sem ramificações de parede fina com ansas, espessura variando de $2,4 - 5 \text{ }\mu\text{m}$, ausência de clamidósporos, artroconídeos ou qualquer outra estrutura reprodutiva (Figura 30A). Nos Tempos 8, 12 e 16 foram observadas as mesmas características com presença de cristais (Figura 30C e 30E), sendo que e no Tempo 16 também observou-se hifas esqueléticas de parede retas com espessura variando de $1,25 - 2,5 \text{ }\mu\text{m}$ (Figura 30G).

A análise de *T. villosa* exposto ao extrato de *C. sylvestris* no Tempo 4 mostrou que as hifas se apresentavam ramificadas com muitas ansas e septadas. Interessante observar que os segmentos das hifas estavam mais curtos e logo formavam ansas (Figura 30B). A espessura da hifa variou de $2,5 - 5 \text{ }\mu\text{m}$. No Tempo 8 as hifas apresentaram possível formação de ansas, mas não foram encontradas tais estruturas (Figura 30D) com segmentos pequenos bem ramificadas e presença de cristais, a espessura variou de $2,5 - 5 \text{ }\mu\text{m}$. Já no Tempo 12 e 16 as hifas eram tortuosas e com protuberâncias, bem ramificadas com ausência de esporos (Figura 30F e 30H).

No fungo *P. sanguineus* não exposto aos extratos, foi observado no Tempo 4 que as haviam hifas generativas ramificadas com ansas com espessura de $5 \text{ }\mu\text{m}$, presença de cristais e ausência de esporos (Figura 31A). No Tempo 8, 12 e 16 observou-se hifas generativas ramificadas com ansas, presença de clamidósporos terminais e intercalares, a partir do Tempo 12 foram observadas hifas esqueléticas, a espessura das hifas foi de $2,5 \text{ }\mu\text{m}$ no Tempo 8 e variou de $1,25$ a $2,5 \text{ }\mu\text{m}$ no Tempo 12 e 16 (Figuras 31C, 31E e 31G).

Na presença do extrato de *C. sylvestris*, no Tempo 4, as hifas de *P. sanguineus* estavam tortuosas bem ramificadas com ansas (ansas não bem formadas), segmentos menores (Figura 31B), com espessura de $2,5 - 5 \text{ }\mu\text{m}$. No Tempo 8 hifas tortuosas, ramificadas com possíveis formações de ansas, presença de clamidósporos intercalares e terminais foram observadas

(Figura 31D). No Tempo 12 e 16 as hifas apresentaram as mesmas características do Tempo 8 (Figura 31F e 31H).

Com extrato de *C. decandra* o fungo *T. villosa* não apresentou diferenças em relação ao controle. Microscopicamente a formação das hifas e as características da cultura não foram alteradas (Figura 32). Macroscopicamente as placas com o extrato os fungos cresceram com o micélio mais espaçado quando comparado com o controle e a borda da cultura ficou bem algodonosa após a linha de crescimento que ficou bem evidente quando transferido para placas com o extrato (ANEXOS 7).

O fungo *P. sanguineus* exposto ao extrato de *C. decandra* apresentou diferença nas características das culturas apenas no Tempo 4, onde foi observado a presença de muitas ansas, com hifas pouco tortuosas (Figura 33B).

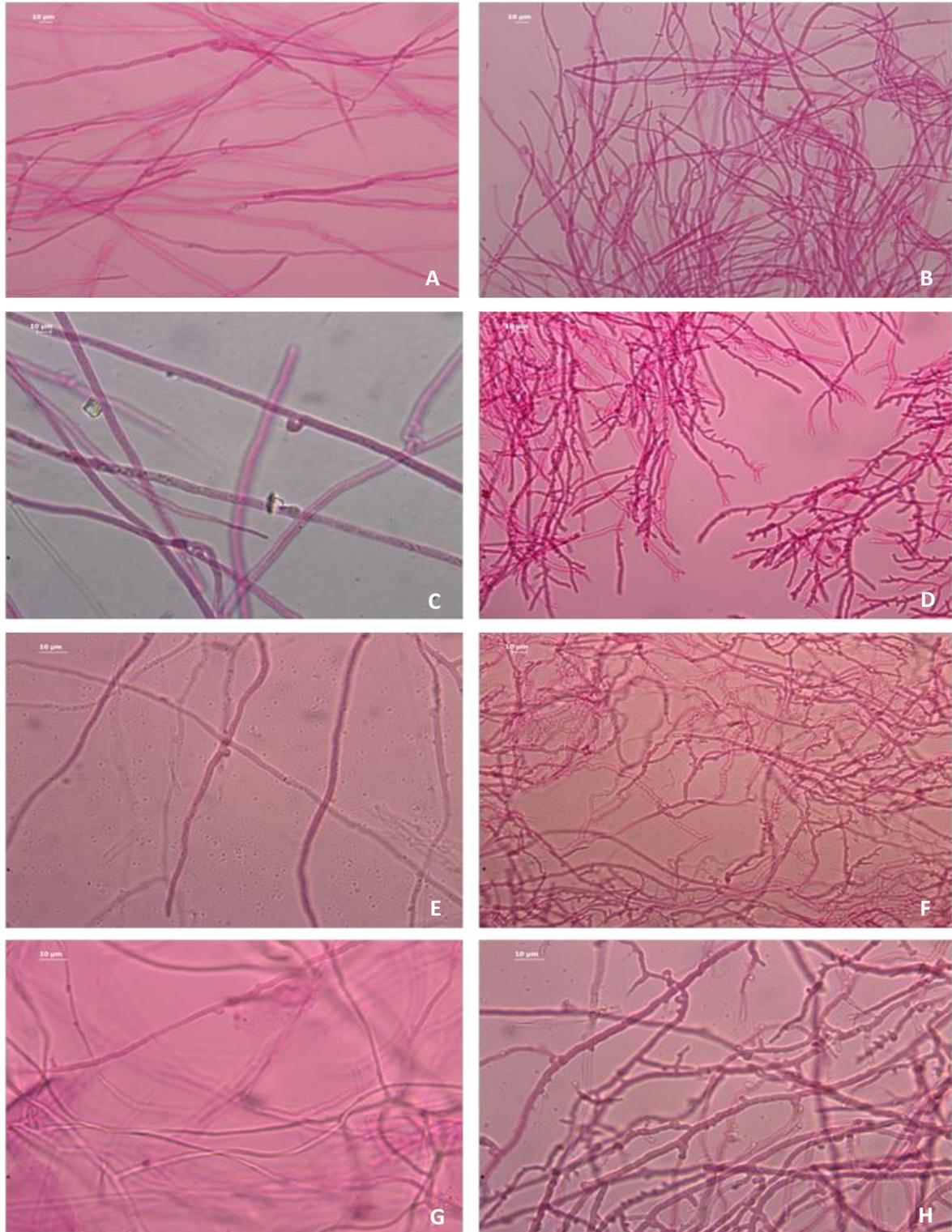


Figura 30 - *T. villosa* com extrato de *C. sylvestris* (aumento 400x). Tempo 4 – **(a)** Controle – hifas generativas sem ramificações e ansas; **(b)** $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ – hifas generativas ramificadas com muitas ansas; Tempo 8 – **(c)** Controle – detalhe de uma hifa generativa com ansa, presença de cristal; **(d)** $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ – hifas tortuosas muito ramificadas com formações de ansas; Tempo 12 – **(e)** Controle – detalhe de uma hifa generativa com ansa; **(f)** $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ – hifas tortuosas; Tempo 16 – **(g)** Controle – detalhe das hifas esqueléticas; **(h)** $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ – detalhe das protuberâncias e hifas tortuosas.

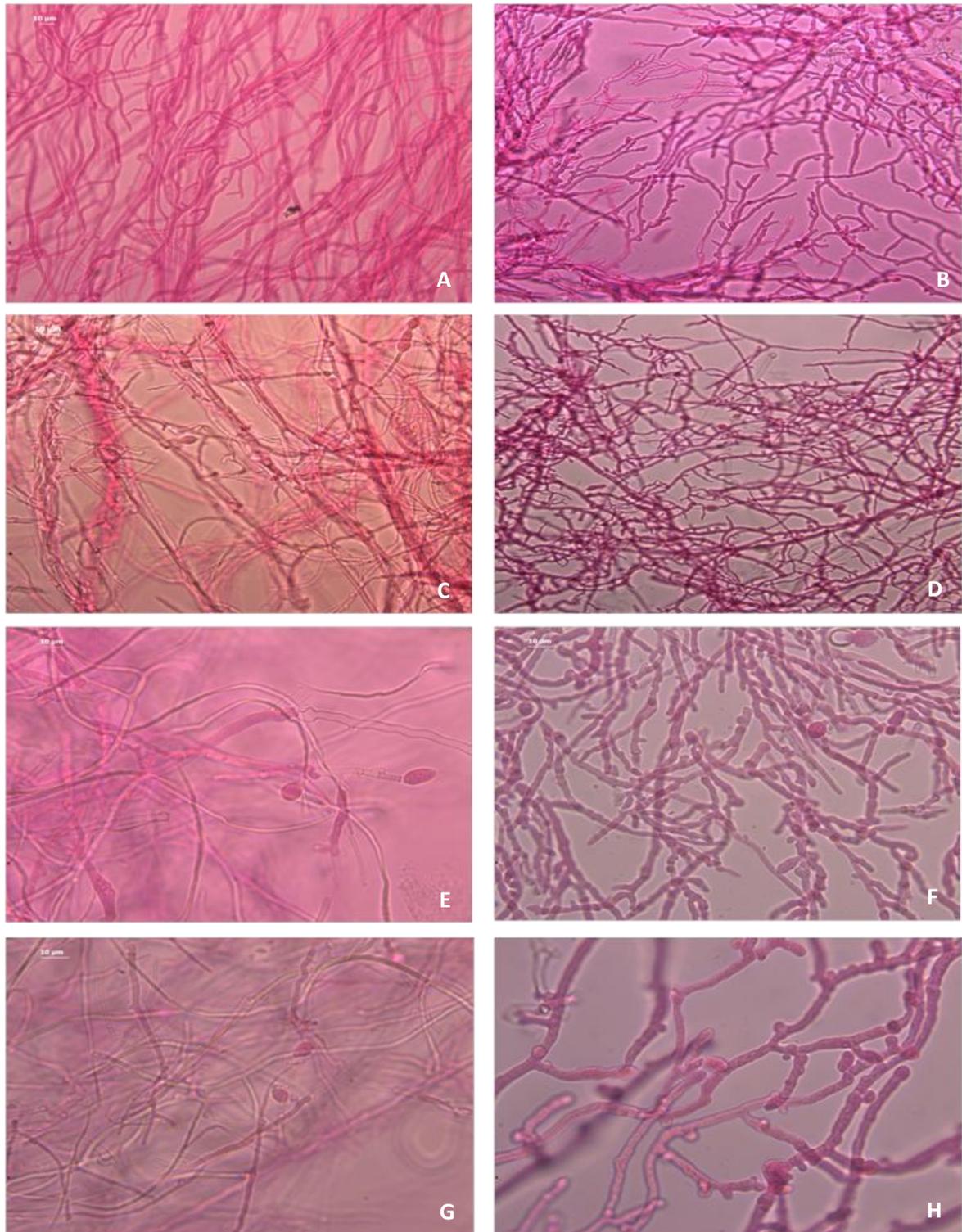


Figura 31 - *P. sanguineus* com extrato de *C. sylvestris* (aumento 400x). Tempo 4 – (a) Controle – hifas generativas ramificadas com ansas; (b) 0,1 mg.mL⁻¹ – hifas tortuosas com muitas ramificações e ansas com pequenos intervalos nas hifas; Tempo 8 – (c) Controle – hifas com clamidósporos intercalares e terminais; (d) 0,1 mg.mL⁻¹ – hifas tortuosas com clamidósporos intercalares, bem ramificadas com formações de ansas; Tempo 12 – (e) Controle – hifas generativas com clamidósporos e hifas esqueléticas; (f) 0,1 mg.mL⁻¹ – detalhes das hifas tortuosas com ansas e clamidósporos terminais; Tempo 16 – (g) Controle – hifas esqueléticas (h) 0,1 mg.mL⁻¹ – detalhes das hifas generativas tortuosas com ansas.

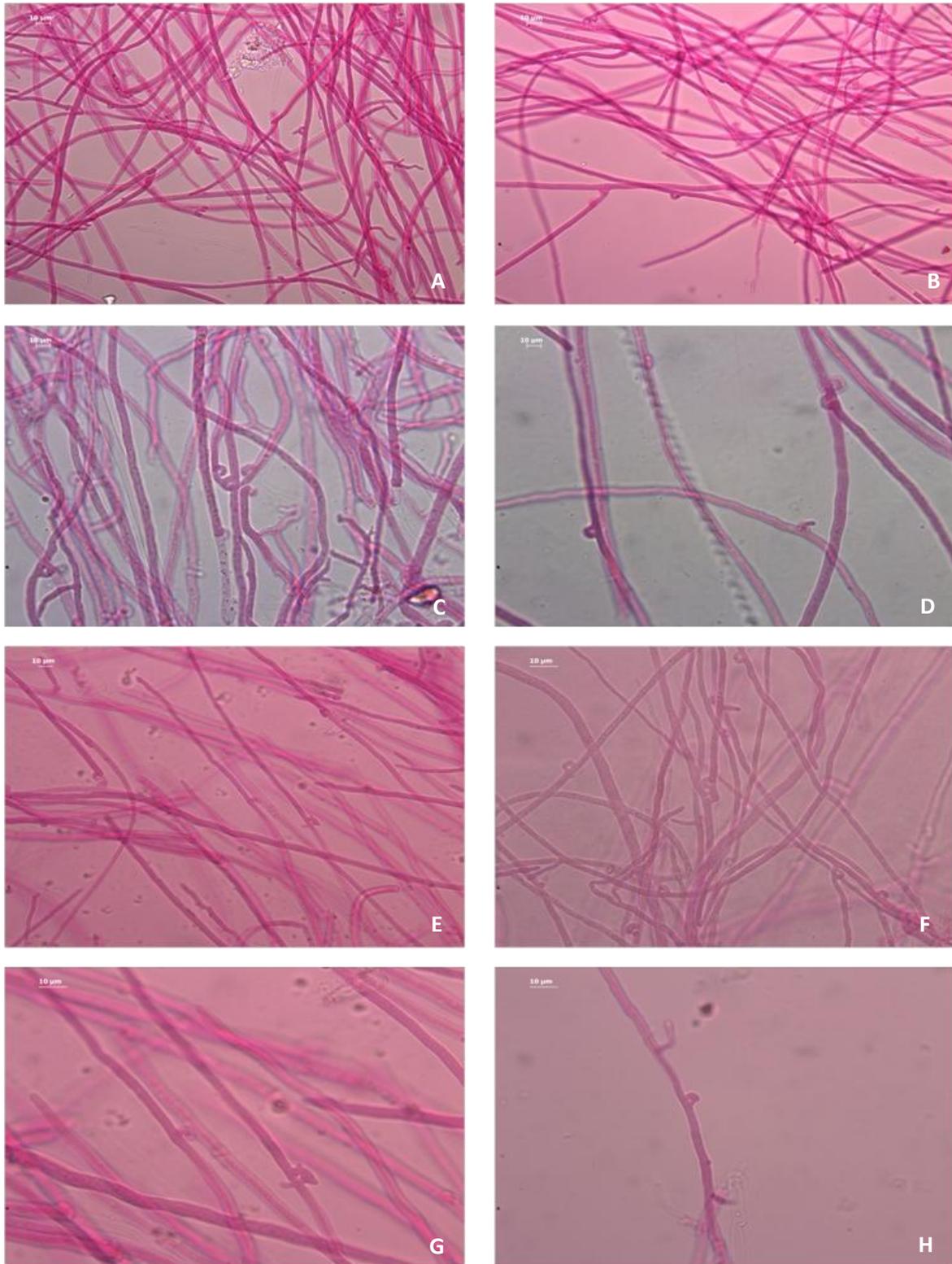


Figura 32 - *T. villosa* com extrato de *C. decandra* (aumento 400x). Tempo 4 – (a) Controle – hifas generativas pouco ramificadas com ansas e presença de cristal; (b) $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ – hifas pouco ramificadas com ansas e presença de cristal; Tempo 8 – (c) Controle – hifas ramificadas com ansas; (d) $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ – detalhe das hifas retas com ansas; Tempo 12 – (e) Controle – hifas generativas geralmente retas com ansas; (f) $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ – hifas generativas com ansas; Tempo 16 – (g) Controle – detalhe das hifas generativas com ansas; (h) $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ – hifa reta com detalhe de uma ansa e mostrando a formação de ansas.

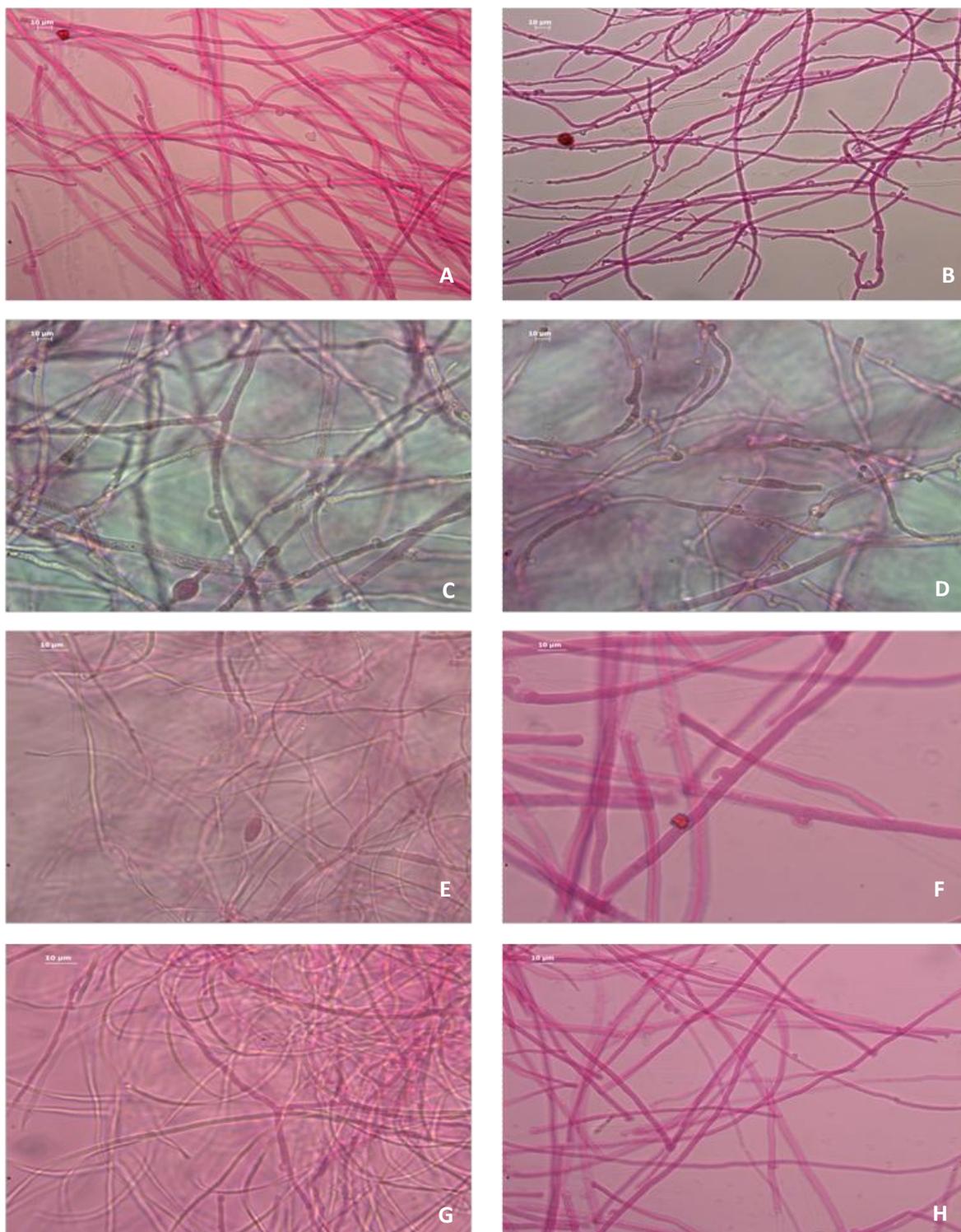


Figura 33 - *P. sanguineus* com extrato de *C. decandra* (aumento 400x). Tempo 4 – (a) Controle – hifas generativas ramificadas com ansas e presença de cristal; (b) $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ – hifas pouco tortuosas ramificadas com muitas ansas e presença de cristal; Tempo 8 – (c) Controle – hifas ramificadas com ansas e clamidósporos intercalares; (d) $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ – hifas retas, ramificadas com ansas; Tempo 12 – (e) Controle – hifas generativas com clamidósporos intercalares e hifas esqueléticas; (f) $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ – detalhe mostrando as hifas retas com ansas e presença de cristal; Tempo 16 – (g) Controle – hifas generativas e hifas esqueléticas (h) $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ – hifas generativas retas com ansas.

5. DISCUSSÃO

5.1. Extratos padronizados de *C. sylvestris* e *C. decandra* utilizados nos ensaios antifúngicos. Perfis cromatográficos obtidos por CG/MS, CLAE e CLAE/DAD

Os extratos de *C. decandra* e *C. sylvestris* foram obtidos de forma diferente e os resultados das análises cromatográficas a gás (GC/MS) e líquida (HPLC/UV e DAD) confirmam que existem diferenças na composição química dos dois extratos (Vieira Júnior 2010).

Os perfis cromatográficos dos extratos *C. sylvestris* e *C. decandra* usando a tecnologia CG/MS (Figura 18) mostraram as semelhanças e diferenças de tempo de retenção e composição química (Tabelas 4 e 5). Os compostos identificados comuns as duas espécies foram os açúcares da classe dos monossacarídeos (D-ribofuranose, glucopinarose, galactofuranose) e os polióis (açúcares reduzidos), arabitol, glucitol e o mio-inositol.

No extrato de *C. decandra* os dois compostos hidroquinona e o β -sitosterol, já isolados e citados na literatura (Vieira Júnior 2010) foram identificados nos tempos de retenção $T_r = 18,4$ (77%) e 51,3 (76%), este detectado com baixa abundância relativa. Os compostos identificados e não citados na revisão da literatura foram: ácido propanóico, ácido cinâmico e a hidroquinona na forma glicosilada. A tecnologia CG/EM foi eficiente para detectar a hidroquinona que pode ser uma sugestão para marcador químico da espécie *C. decandra*.

No extrato de *C. sylvestris* (hidroalcolico, 70% de água e 30% de etanol) a presença da grande quantidade de açúcares é justificada pelo método de extração. O pico cromatográfico 2 no $T_r = 19,492$ não identificado com base na biblioteca NIST. (Tabela 4), tem espectro de massas com dados de $m/z = 82$ (100), 172, 75, 173, 274, 67, 83, 59, 74 que podem ser atribuídos de acordo com a literatura aos íons fragmentos de diterpenos da classe dos clerodânicos com anel furânico β -substituído. O pico base em $m/z = 82$ Da (Bohlmann *et al.* 1973, Wagner *et al.* 1978, Torres 1985) pode ser atribuído a quebra em posição beta (β -fufurila) ao anel furânico. Estes dados sugerem que o composto seja o ácido hardwickiic, sendo necessários dados espectrométricos para a confirmação da presença desse composto no extrato. O pico 8 ($T_r = 29,387$ min.) apresentou dados de massas ($m/z = 345$ (100), 255, 204 e 147) e não foi identificado.

A análise (HPLC – DAD) identificou um pico cromatográfico no $T_r = 25,50\text{min.}$ com cromóforos que absorvem nos comprimentos de onda máximo (λ_{max}) de 242 e 326nm, com a absorção de menor comprimento de onda ($\lambda_{\text{max}}=241$), semelhante a absorção observada para os diterpenos com esqueleto da Caseobliquina A (241 – 280nm), (Figura 17) isolada de *C. obliqua*, e muito diferentes das absorções observadas para os cromóforos das casearinas ($\lambda_{\text{max}} = 233$ e 235nm) isoladas e identificadas para *C. sylvestris* (Carvalho *et al.* 2009, Vieira Júnior 2009).

5.2. Efeito dos extratos de *C.sylvestris* e *C.decandra* sobre o crescimento micelial e produção biomassa

O cultivo dos fungos durante os 4 dias de pré-inoculação permitiu o crescimento fúngico ocupando nesse período 50% da área disponível na placa. Nessas circunstâncias é considerado que os fungos estavam em pleno desenvolvimento e apresentavam todo o sistema enzimático em pleno funcionamento, incluindo enzimas capazes de atuar na degradação de compostos orgânicos.

O extrato de *C. sylvestris* inibiu o crescimento micelial dos fungos, observou-se que houve parada no crescimento dos fungos nos primeiros 4 dias de exposição ao extrato e depois houve diminuição na taxa de crescimento dos fungos em relação ao controle (Figura 19 e Anexos 3,4 e 5).

O extrato de *C. decandra* inibiu o crescimento micelial dos fungos até o oitavo dia de exposição. Apesar do crescimento mais lento em relação ao controle os fungos alcançaram a borda da placa (Figura 19 e Anexos 7 e 8) e apresentaram taxa de crescimento maior do que a observada na presença do extrato de *C. sylvestris*.

As respostas de cálculo de biomassa (g) encontradas para os dois extratos de *Casearia* foram semelhantes, com taxas de inibição em torno de 90% para todos os fungos testados (Figura 20).

A quantificação da biomassa fúngica pode ser mais eficiente porque sua inibição pode ser diretamente ligada como resposta ao estresse, devido os mecanismos que envolvem a produção de biomassa (ex: síntese proteica) e está diretamente envolvida na fisiologia do fungo, já a parada de crescimento é considerada uma resposta mais genérica, porque diversos são os fatores que podem diminuir o crescimento do fungo (ex: deficiência de nutrientes). No presente trabalho

observou-se que apesar do crescimento dos fungos, a inibição da biomassa mostrou que os extratos continuou afetando o metabolismo fúngico, o que não refletiu no crescimento e na morfologia das hifas (Figuras 20, 32 e 33). Poucas pesquisas foram realizadas no sentido de verificar o efeito de compostos com potencial antifúngico na produção de biomassa fúngica e assim há uma necessidade premente de se investigar para contribuir no conhecimento fisiológico destes microrganismos (Andrade 2011).

As três espécies de fungos apresentaram alterações nas características macroscópicas das colônias, tanto para o extrato de *C. sylvestris* como no extrato de *C. decandra* (Anexos). Na presença do extrato de *C. sylvestris* os fungos desenvolveram hifas condensadas, já com o extrato de *C. decandra* desenvolveram-se com micélio ralo e espessado (Anexos 6, 7 e 8).

Na presença do extrato de *C. decandra* os fungos *P. sanguineus* e *T. villosa*, cresceram rapidamente, porém muito rarefeito após o oitavo dia de incubação.

Comportamento semelhante foi verificado por Jesus (2003) estudando os fungos *P. sanguineus* e *T. villosa*, expostos ao extrato etanólico de plantas do gênero *Swartzia*, observou que houve alteração nas características macroscópicas dos fungos e sugeriu que os constituintes desses extratos podem ter sido degradados pelos fungos, propiciando o crescimento dos mesmos. Neste caso, as curvas de crescimento dos fungos devem ser analisadas com cautela, tendo em vista que o crescimento micelial dos fungos em questão poderia ser uma reação de resistência aos extratos e não de sensibilidade (Kamida *et al.* 2005).

O método de difusão em meio sólido tem sido amplamente utilizado na determinação do potencial fungicida de extratos vegetais por ser preciso, econômico e reprodutível e, além disso, a atividade antifúngica pode ser determinada pela simples medição da área (cm²) da colônia, cujos valores podem ser representados em curva de crescimento do fungo (Jesus 2003). A curva de crescimento é um parâmetro que possibilita avaliar os diferentes perfis de desenvolvimento apresentados por fungos sob a influência de diferentes extratos em diferentes concentrações no decorrer do tempo (Archer *et al.* 1995).

Jesus (2003) avaliou a atividade antifúngica dos extratos etanólicos do ritidoma, casca do caule, casca do fruto e da semente de cinco espécies do gênero *Swartzia* frente aos fungos degradadores de madeira, *P. sanguineus*, *T. villosa* e *Lenzites trabea* e observou que os fungos tiveram seu crescimento inibido em até 95% em algumas partes das plantas na concentração de

0,1mg.mL⁻¹. Atividade antifúngica de extratos de cerne, alborno e casca de 11 espécies vegetais da Malásia contra *P. sanguineus*, mostrou que o fungo *P. sanguineus* teve seu crescimento inibido por 9 das 11 espécies avaliadas (Kawamura *et al.* 2010). Extratos orgânicos do cerne de *Juniperus virginiana* inibiram 80% do crescimento micelial dos fungos *T. versicolor* e *G. trabeum* na concentração 2,5mg.mL⁻¹ (Mun *et al.* 2011). A naftoquinona Juglona isolada da casca de noqueira (*Juglans mandshurica*) também foi eficaz contra os fungos *T. versicolor*, *G. trabeum* e *Paecilomyces variottii* na concentração de 8 mg.mL⁻¹ (Yang *et al.* 2009). Ziglio (2010) estudou o efeito da oleoresina de capsaicina extraída de pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*) sobre o fungo *P. variottii*, a oleoresina inibiu o crescimento do fungo em corpos de prova de madeira do gênero *Pinus* sp. (Pinheiro) e *Hymenaea* sp. (Jatobá). A Neolignana (oxo-otobaína) isolada de *Viola molissima* inibiu o crescimento de *T. villosa* e *P. sanguineus* em 100% na concentração 20µg.mL⁻¹ (Teixeira 2007). Estudos com os óleos essenciais timol e borneol demonstraram a inibição do crescimento do fungo *T. versicolor* inoculado em blocos de madeira por 12 semanas (Clausen 2010).

Trabalhos relatando atividade antifúngica de extratos vegetais contra fungos degradadores de madeira são escassos e pouco é conhecido sobre o modo de ação dos compostos isolados de plantas no controle de microorganismos. É provável que esses compostos atuem na repressão de enzimas específicas (Wheatley 2002), podendo refletir no crescimento.

Os extratos de *C. sylvestris* e *C. decandra* afetaram a síntese de proteínas. Verificou-se que os fungos apresentaram inibição na produção de proteínas intracelulares durante todo o tempo de exposição aos extratos (Figura 22). Humphis *et al.* (2002) verificaram a inibição do crescimento micelial e síntese de proteínas em dois isolados do basidiomiceto *Serpula lacrymans* por compostos orgânicos voláteis produzidos por duas espécies de *Trichoderma*. A diminuição no desenvolvimento desencadeada pelos fungos antagonistas, *T. aureoviride* e *T. viride* foi associada à inibição da síntese de proteínas. Estudos com *G. citricarpa* na presença de compostos orgânicos voláteis produzidos por leveduras também relacionou a redução do crescimento fúngico com a inibição da síntese de proteínas (Fialho 2008). De acordo com os dados obtidos no trabalho é possível supor que a síntese de proteínas importantes no metabolismo e crescimento vegetativo dos fungos deve estar sendo afetada.

Contrariamente aos resultados obtidos para as atividades enzimáticas, maiores quantidades de proteína totais extracelulares foram determinadas (Figura 21) e, além disso, o perfil da evolução das proteínas totais extracelulares não coincide com o perfil da produção das enzimas extracelulares. Esses resultados indicam que outras proteínas estão sendo sintetizadas durante o cultivo do fungo e não é possível, desta maneira, fazer uma correlação entre a concentração de enzimas e de proteínas totais no meio de cultura, como salientado por Tavares 2006. A capacidade dos fungos ligninolíticos de acumularem quantidades consideráveis de proteínas extracelulares é relatada na literatura, Galhaup *et al.* (2002), por exemplo, reportaram que a concentração de proteínas extracelulares atingiu 700mg.L^{-1} ao final do cultivo batelada alimentada de *Trametes pubescens* em um reator de mistura de 20L.

5.3. Efeito do extrato de *C. sylvestris* e *C. decandra* sobre a atividade das enzimas ligninolíticas

Apesar dos diversos trabalhos existentes sobre enzimas ligninolíticas, fica difícil uma comparação direta entre os dados da literatura porque vários procedimentos para o ensaio de atividade enzimática têm sido propostos por diferentes grupos de pesquisadores (Ikehata *et al.* 2004). A atividade desses fungos ocorre no metabolismo secundário e o pré-crescimento em materiais lignocelulósicos ativa o sistema de enzimas (Masaphy & Levanon, 1992).

Com exceção da enzima peroxidase, as enzimas MnP, lacases e fenoloxidasas foram detectadas nos três fungos avaliados. Embora não tenha sido detectada atividade de peroxidases no presente estudo, não se pode descartar a sua presença no metabolismo dessas linhagens. Provavelmente algum fator relacionado às condições empregadas no ensaio enzimático pode ter contribuído para a ausência. Outros estudos realizados com essas espécies detectaram a produção de peroxidases. Trabalho utilizando a mesma linhagem de *T. villosa* (CCB 176) mostrou a produção de peroxidases em meio suplementado com Tween 20 (Yamanaka *et al.* 2008). Silva (2010), estudando o fungo *P. sanguineus* também detectou atividade de peroxidases quando cultivado em dez diferentes meios de cultura suplementados com produtos regionais e resíduos agrícolas.

Os fungos expostos ao extrato de *C. sylvestris* tiveram a produção das enzimas MnP, lacases e fenoloxidasas inibidas. Não foram encontrados trabalhos na literatura que relatem a

inibição de enzimas por extratos vegetais, se limitando apenas ao relato da inibição do crescimento micelial (Jesus 2003, Teixeira 2007, Yang *et al.* 2009, Clausen 2010, Kawamura *et al.* 2010, Ziglio 2010), Mun *et al.* 2011).

As atividades das fenoloxidasas, manganês peroxidases e das lacases já estão bem descritas na literatura, principalmente no caso de lacases e fenoloxidasas, que são de fácil ocorrência entre fungos de podridão branca (Srinivasan *et al.* 1995, Okino *et al.* 2000, Okada 2010)

O fungo *T. villosa* é conhecido pela produção de lacase que tem sido relatada por alguns autores. Yamanaka *et al.*, (2008) encontraram atividade de lacase variando de 0,05 a 6 U/L com diferentes concentrações de glicose na cultura líquida, utilizando ABTS como substrato para determinar a atividade enzimática. Songulashvili *et al.* (2007) estudando linhagens de *Trametes versicolor* em fermentação submersa de cascas de tangerina e grãos de trigo encontraram altas atividade de lacase detectadas com ABTS (490 a 20360 U/L). Outros autores também relataram a produção de lacases por *P. sanguineus* (LITTHAUER *et al.*, 2007; HENN, 2009). Para o gênero *Ganoderma* também é relatado na literatura a produção de lacases (SILVA, 2004; COELHO *et al.*; 2010).

As enzimas ligninolíticas não estão apenas caracterizadas como produtos secundários do metabolismo fúngico, ou seja, a produção delas também pode estar relacionada ao processo de colonização dos fungos (Papinutti *et al.* 2003, Hakala *et al.* 2005, Moreira-Neto 2006, Ballaminut 2007, Okada 2010).

Diferentemente do que foi observado para o extrato de *C. sylvestris*, os fungos *T. villosa* e *P. sanguineus*, quando expostos ao extrato de *C. decandra*, induziram a produção de lacase e fenoloxidasas, enquanto que o fungo *G. australe* inibiu a produção dessas enzimas.

Os basidiomicetos produzem enzimas ligninolíticas de forma constitutiva, porém elas podem ser induzidas pelas condições de cultivo. Diversas substâncias, incluindo compostos aromáticos e fenólicos tem sido utilizados como indutores enzimáticos (Moreira-Neto 2006). Terron *et al.* (2004), observaram aumento da produção de lacase por *Trametes* sp. I-62 com a adição de diversos compostos fenólicos (ácido *p*-cumárico, ácido ferrúlico, guaiacol, siringol, *p*-metoxifenol, pirocatecol, ácido 3,5-dihidroxibenzóico e siringaldazina). Basidiomicetos exibem grande variedade de respostas aos efeitos dos compostos aromáticos sobre a produção de lacases. Assim, um

composto aromático, individualmente, pode aumentar a atividade de lacases sem alterar suas isoenzimas, induzir novas isoformas ou não ter efeito indutor. Segundo Chen *et al.* (2003), a indução é considerada uma resposta protetora para compostos tóxicos produzidos durante a oxidação da lignina de resíduos lignocelulósicos, os quais servem como substratos naturais para o crescimento de fungos ou agentes antimicrobianos secretados por competidores microbianos.

Thadeo (2009), em estudos histoquímicos de folhas de *Casuarina decandra* observou tecidos fundamentais como sítios de síntese e/ou acúmulo de compostos fenólicos.

Alguns autores sugerem que a produção de lacase pode estar relacionada com a regulação da atividade da enzima catalase. Por exemplo, a adição do herbicida paraquat nas culturas de *Trametes versicolor* e *Abortiporus biennis* estimulou significativamente a atividade de lacase em associação com uma evidente diminuição tanto da superóxido dismutase e catalase, marcadores conhecidos de estresse oxidativo (Jaszek *et al.* 2006) . Com os resultados obtidos neste trabalho não foi possível correlacionar a atividade enzimática lignolíticas com a produção de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, como mais um elemento de respostas ao efeito do estresse em geral.

Embora o estudo de atividades de enzimas extracelulares possa gerar muitas informações a respeito do desenvolvimento dos fungos em substratos lignocelulósicos, esses resultados ainda são escassos e há necessidade de se integrar os dados de enzimologia com a cinética do crescimento em substratos sólidos (Zervakis *et al.* 2001).

5.4. Efeito dos extratos de *C. sylvestris* e *C. decandra* sobre a atividade das enzimas associadas à morfogênese

As quitinases são responsáveis pela degradação da quitina, principal componente da parede celular de fungos, liberando resíduos de *N*-acetilglicosamina e estão envolvidas diretamente na autólise e morfogênese das hifas em fungos filamentosos. Devido à integridade estrutural que a quitina provê a parede celular, a síntese da quitina tem sido um excelente alvo para agentes antifúngicos (Bowman & Free, 2006).

O extrato de *C. sylvestris* inibiu a produção de quitinase nos fungos *T. villosa* e *G. australe*, nas placas-controle a atividade da quitinase decresceu a partir do 12º dia de incubação (Figura 26). As quitinases são encontradas no micélio fúngico em fase ativa de crescimento juntamente

com a quitina sintetase (Gooday *et al.* 1986, Hearn *et al.* 1997). Quando o gene *CHIA*, codificante de uma quitinase em *A. fumigatus*, é interrompido, a frequência de esporulação e a taxa de crescimento micelial são reduzidas (Takaya *et al.* 1998).

O extrato de *C. sylvestris* paralisou o crescimento dos fungos durante os 16 dias de exposição com o extrato, causando aglomeração das hifas nas suas extremidades impedindo o crescimento micelial. Em estudos com inibidores de quitinases fúngicas, Sami *et al.* (2001) mostraram que o trisacarídeo allosamidina, teve ação fungistática sobre *P. chrysogenum*, inibindo o desenvolvimento da extremidade das hifas.

Apesar do extrato de *C. sylvestris* impedir o crescimento do fungo *P. sanguineus*, sua atividade quitinolítica não foi inibida, na presença do extrato essa atividade foi superior ao controle, esse comportamento pode ser explicado pelo processo de autólise, endoquitinases podem também afetar a integridade estrutural da parede celular de fungos (Wessels 1993) e tornar substâncias incorporadas na parede da célula ou no interior da hifa disponíveis para degradação enzimática e absorção.

Com o extrato de *C. decandra* a atividade da quitina também foi maior para os fungos *T. villosa* e *P. sanguineus*. Apesar do crescimento dos fungos, essa resposta enzimática também pode ter sido responsável pela autólise da parede celular, uma vez que, apesar do crescimento na placa, os fungos tiveram sua biomassa inibida e a característica da cultura mostrou um crescimento das hifas mais espessadas. Lindahl *et al.* (2006) indicam que a presença dessas áreas de colonização esparsa pode realmente ser o resultado da autólise causada pelas enzimas quitinolíticas. A capacidade de basidiomicetos em degradar os tecidos da planta é bem reconhecida, mas a sua participação na degradação de tecidos microbianos, incluindo o seu próprio micélio, não recebeu tanta atenção (Lindahl *et al.* 2006).

O micélio fúngico pode responder à presença de um substrato por regulação na produção enzimática nas pontas das hifas ou através da produção de respostas morfológicas que levam a uma maior densidade nos locais de pontas das hifas (Lindahl *et al.* 2006). Neste estudo, não foram observadas diferenças nas espessuras das hifas dos fungos analisados microscopicamente.

A atividade da 1,3 β -glucanases exposta ao extrato de *C. sylvestris* foi maior nos fungos *P. sanguineus* e *G. australe*, enquanto que com o extrato de *C. decandra* essa atividade foi maior nos fungos *T. villosa* e *G. australe*. A enzima β -1,3-glucanase é essencial na quebra e reconstrução

dos polímeros constituintes da parede celular levando ao remodelamento da parede celular durante a divisão celular e processos de morfogênese, tais como crescimento e ramificação das hifas (Adams 2004).

Esse aumento da atividade nos fungos pode ser explicado pelo processo de autólise. Durante a autólise a atividade de enzimas líticas se eleva substancialmente, particularmente as 1,3 β -glucanases (White *et al* 2002). A autólise pode ocorrer devido a fatores intrínsecos como o envelhecimento da cultura e a diferenciação da hifa (Fialho 2011).

O fungo *G. australe* na presença do extrato de *C. decandra* mostrou que a atividade da enzima 1,3 β -glucanases foi inversamente proporcional a atividade da quitinase. Alguns autores sugerem esse comportamento como mecanismo compensatório para alguns fungos como *Aspergillus fumigatus* (Verwer *et al.* 2012) utilizando os antifúngicos caspofungina inibidor da síntese de β -glucanas e nikkomycina Z inibidor da síntese de quitina, foi observado que a diminuição do conteúdo de β -1,3 glucana devido a ação da caspofungina é compensada pelo aumento do conteúdo de quitina na parede celular, e o mesmo acontece quando utilizado um inibidor da síntese de quitina, o conteúdo de β -1,3 glucana é elevado. Bizerra (2010) também observou esse comportamento com o fungo *Candida* sp. utilizando equinocandinas, e comentou que esse fenômeno complexo pode representar um mecanismo de “escape” como uma tentativa de suprir a carência de algum dos componentes para manter a integridade da parede celular, envolvendo a regulação das vias responsáveis pela síntese da parede celular, em resposta a exposição a algum inibidor.

5.5. Efeito dos extratos de *C. sylvestris* e *C. decandra* na atividade de enzimas associadas ao estresse oxidativo

No presente trabalho foi possível observar elevação nos níveis das enzimas CAT e GR devido à exposição dos fungos ao extrato de *C. sylvestris*, indicando um processo de estresse oxidativo. No caso da exposição ao extrato de *C. decandra* os fungos apresentaram indução da enzima GR. Já a enzima CAT foi reprimida em função do tratamento com o extrato de *C. decandra*.

Mesmo em seu estado fisiológico normal os fungos estudados no presente trabalho produziram altos níveis de CAT. No entanto, estas atividades enzimáticas são similares quando

comparadas com as de outras espécies de fungos basidiomicetos de podridão branca como os fungos *T. versicolor* e *Phanerochaete chrysosporium* (500-2500 U/mg proteína) (Kwon & Anderson 2001, Belinky *et al.* 2006, Jaszek *et al.* 2006). Bazito (2012), estudando fungos basidiomicetos bioluminescentes também observou altos índices de atividade CAT (1300-2500 U/mg proteína) para os fungos *Gerronema viridilucens* e *Mycena lucentipes* (680-1600 U/mg proteína). A alta produção de CAT é comum aos fungos basidiomicetos ligninolíticos em seu estado fisiológico normal visto que o H₂O₂ tem papel fundamental na degradação da madeira.

Analisando o perfil da atividade CAT dos fungos *P. sanguineus* e *G. australe*, observa-se que essa atividade nos controles apresentou uma tendência a aumentar nos dois extratos testados ao longo do tempo de incubação (Figura 28), Ferreira (2009) estudando o fungo *Pleurotus sajor-caju* inoculado em meio de cultura com vinhaça durante 12 dias de crescimento, observou a mesma elevação, ele sugere que essa atividade pode estar relacionada com o envelhecimento da cultura (escassez nutricional), bem como pela presença de compostos recalcitrantes e dos produtos de degradação por enzimas ligninolíticas.

O fungo *T. villosa* apresentou um perfil inverso da atividade CAT nos controles, essa atividade diminuiu ao longo do tempo. Silva (2009), estudando estágios de diferenciação do basidioma do fungo *Pleurotus ostreatus*, observou que a atividade de CAT caiu de 1,5 a 0,5 mmol.g⁻¹ de proteína em amostras do estipe, esta diminuição observada pode estar relacionada com a senescência do *P. ostreatus*. Bazito (2012), com o fungo *M. lucentipes* observou que a atividade CAT diminuiu significativamente com o envelhecimento de 2475 a 1344 U.mg⁻¹ de proteína durante os 16 dias de incubação.

Interessante observar que entre 4 e 8 dias de exposição ao extrato de *C. decandra* houve inibição do crescimento dos fungos (Figura 19), aumento na secreção de proteínas extracelulares (Figura 21) e inibição na produção das enzimas ligninolíticas (Figuras 23, 24 e 25). Após o oitavo dia, os fungos voltaram a crescer e colonizam toda a placa. Algumas das características do estresse oxidativo em fungos são oxidação de proteínas, com a sua degradação subsequente, glicosilação, carbonilação e liberação de radicais livres de ferro durante a oxidação de grupos desidrogenase. Esse rearranjo metabólico leva à parada do crescimento e da síntese de metabólitos secundários nas células fúngicas (Belozerskaya & Gessler 2007).

O sistema antioxidante é composto por enzimas e compostos não-enzimáticos que atuam contra o estresse oxidativo. A manutenção do estado redox do citoplasma é uma condição importante para a vida da célula, sendo que a enzima glutationa-redutase (GR), bem como a glutationa peroxidase (GPx), têm papel fundamental na manutenção desta homeostase. Esse sistema catalisa a transformação do H₂O₂ em água, sendo que a glutationa opera em ciclos entre sua forma oxidada (GSSH) e sua forma reduzida (GSH). A GSH reduz o H₂O₂ a água na presença da GPx e, em seguida, a GSSH é regenerada pela GR (Apel & Hirt 2004).

Os resultados demonstraram que esta via antioxidativa é afetada pelo extrato de *C. decandra* nos diferentes períodos de crescimento dos fungos e em todas as concentrações testadas.

Mesmo tendo sido observado uma resposta inicial da GR frente a possível geração de EAOs, os fungos não tiveram seu crescimento inibido, isso pode ocorrer devido à capacidade do basidiomiceto em manter a defesa antioxidativa, de tal modo, que mantenha a homeostase sobre as consequências do acúmulo intracelular de EAOs.

Foi observado durante os experimentos que a atividade GR dos fungos *P. sanguineus* e *G. australe* expostos aos extratos foi contrária a atividade da CAT, com o fungo *T. villosa* esse comportamento só foi observado quando exposto ao extrato de *C. decandra* indicando que os fungos podem ter utilizado outro sistema que não o da CAT como resposta ao estresse causado pelos extratos.

Quando um estresse oxidativo é provocado, espera-se que o fungo tenha como funções prioritárias a respiração e a proteção do organismo.

Estudos sobre a via da glutationa envolvendo fungos filamentosos são escassos e os resultados não são claros ou contraditórios quando comparados aos estudos com leveduras (Ferreira 2009, Li *et al.* 2008). Foi demonstrado em *A. niger* que a GPx, enzima pertencente ao ciclo da glutationa, não é importante na defesa contra o estresse oxidativo (Bai *et al.* 2003). Em *Penicillium chrysogenum*, a atividade da GPx, GR e o ciclo da glutationa foram induzidos por altas concentrações de H₂O₂ exógeno, no entanto, a concentração de GSH teve fraco aumento, enquanto GSSH aumentou significativamente resultando no desequilíbrio da homeostase da glutationa (Emri *et al.* 1997).

Por outro lado a baixa atividade de CAT paralela à significativa produção de H₂O₂ poderia indicar coadjuvância de outras peroxidases, por exemplo, a via da glutatona com a enzima GPx, cuja a atividade não foi determinada no presente trabalho.

De modo geral o aumento da atividade nos controles e a regulação nos níveis de atividade das enzimas sugere que os mecanismos de defesa antioxidantes desses fungos são certamente adequados para o reparo de danos celulares e manutenção das EAOs em um nível basal não destrutivo (Angelova *et al.* 2005), uma vez que houve o aumento nos níveis das enzimas catalase e glutatona redutase indicando que a exposição aos extratos desencadeou processos de estresse oxidativo devido ao acúmulo de espécies ativas de oxigênio.

5.6. Microscopia da cultura dos fungos sobre o efeito dos extratos de *C. sylvestris* e *C. decandra*

Muitos agentes antifúngicos que interferem com a parede celular fúngica, causam malformações na parede que podem ser observadas microscopicamente (Gunji *et al.* 1983). As mudanças na morfologia podem sugerir o possível alvo ou o modo de ação dos inibidores de parede celular (Zacchino 2003).

Neste estudo, observaram-se grandes alterações morfológicas nos fungos *T. villosa* e *P. sanguineus*, quando expostos ao extrato de *C. sylvestris* na concentração 0,1 mg.mL⁻¹, o exame microscópico do micélio do controle (células não tratadas) de *T. villosa* e *P. sanguineus* mostrou hifas geralmente retas, ramificadas com presença de ansas. O micélio, cultivado em meio adicionado do extrato de *C. sylvestris*, apresentou algumas alterações morfológicas com distorções das hifas. As alterações morfológicas encontradas foram: desenvolvimento distorcido das hifas, hifas bem ramificadas com segmentos pequenos e má formação de ansas ao longo de toda a sua estrutura.

Souza (2010) estudando os possíveis mecanismos de ação dos óleos essenciais em cepas do fungo *A. flavus* também observou alterações morfológicas como desenvolvimento distorcido de hifas e hifas vazias. As hifas tornaram-se distorcidas com intumescimento ao longo de toda a sua estrutura e também foram observados, brotamentos apicais. O óleo essencial ainda causou uma clara ausência de conidiação. Carmo *et al.* (2008) relataram que essas modificações podem

também estar relacionadas à interferência dos componentes do extrato, em relação às reações de síntese da parede celular de fungos, afetando o crescimento e a morfogênese.

6. CONCLUSÕES

A padronização dos extratos de *C. sylvestris* e *C. decandra* através de métodos cromatográficos permitiu verificar que os diferentes compostos identificados em cada extrato podem ser responsáveis pelas diferentes respostas obtidas nas análises das atividades antimicrobianas testadas no presente trabalho contra os fungos *T. villosa*, *P. sanguineus* e *G. australe*. Sugere-se como marcador químico para o extrato de *C. decandra* o composto hidroquinona.

Os extratos de *C. sylvestris* e *C. decandra* inibiram o crescimento fúngico *in vitro* e alteraram a morfologia (macroscópica e microscópica) dos fungos basidiomicetos degradadores de madeira *T. villosa*, *P. sanguineus* e *G. australe*. Esses fungos foram mais suscetíveis ao extrato de *C. sylvestris*.

O provável mecanismo de ação atuante na atividade antimicrobiana dos extratos é a inibição das enzimas extracelulares MnP, lacase e fenoloxidase, e enzimas intracelulares importantes na formação do micélio fúngico, quitinase e β -1,3-glucanase. Além disso, o aumento nos níveis das enzimas catalase e glutatona redutase indicaram que a exposição aos extratos desencadeou processos de estresse oxidativo.

Portanto, o presente trabalho mostrou que produtos naturais de plantas possuem compostos com capacidade antifúngica, sendo necessário estudos futuros no intuito de elucidar em maiores detalhes como compostos antimicrobianos presentes em extratos de plantas nativas podem afetar a fisiologia e controlar o desenvolvimento de fungos, com destaque as espécies que causam prejuízos ao homem.

7. REFERÊNCIAS

- Abelles, F.B., Foence, I.E.** 1970. Temporal and hormonal control of β -1,3-glucanase in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology*, 45: 395-400.
- Adams, D.J.** 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*, Reading, 150: 2029-2035.
- Aguirre, J., Ríos-Momberg, M., Hewitt, D., Hansberg, W.** 2005. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends in Microbiology*, 13: 111-118.
- Ander, P., Marzullo, L.** 1997. Sugar oxidoreductases and veratryl alcohol oxidase as related to lignin degradation. *Journal of Biotechnology*, 53: 115-131.
- Andrade, A.L.C.** 2011. Aspectos do Crescimento e Influência de Parâmetros Físicos na Atividade da Lacase Fungo Amazônico, *Trametes lactinea* (Berk). Dissertação de Mestrado, Universidade do Estado do Amazonas, 116 p.
- Angelova, M. B., Pashova, S. B., Spasova, B. K., Vassilev, S. V., Slokoska, L. S.** 2005. Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. *Mycological Research*, 109: (2)150-158.
- Apel, K., Hirt, H.** 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction, *Annual Review of Plant Biology*, 55: 373-399.
- Archer, K., Nicholas, D.D., Schultz, T.P.** 1995. Screening of wood preservatives: comparison of the soil-block, agar-block, and agar-plate tests. *Forest Products Journal*, 45: (1) 86-89.
- Azevedo, R.A., Alas, R.M., Smith, R.J, Lea, P.J.** 2002. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiologia Plantarum*, 104: 280-292.
- Backa, S., Grirer, J., Reitberger, Y., Nilsson, T.** 1992. Hydroxyl radical activity in brown-rot fungi by a new chemiluminescence method. *Holzforschung*, 46: 61-67.
- Bai, Z., Harvey, L. M., Mcneil, B.** 2003. Elevated temperature effects on the oxidant/antioxidant balance in submerged batch cultures of the filamentous fungus *Aspergillus niger* B1-D. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 83: 772-779.

Ballaminut, N. 2007. Caracterização fisiológica do inóculo de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. CCB 274 empregado em biorremediação de solo. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 176 p.

Barillari, C.T. 2002. Durabilidade da madeira do gênero *Pinus* tratada com preservantes: avaliação em campo de apodrecimento. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Esalq-USP-Piracicaba. 68 p.

Basile, A. C., Sertie, J. A. A., Pannizza, S., Oshiro, T. T., Azzolini, C. 1990. A pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 30: 185-197.

Bazito, O. D. 2012. Estresse oxidativo e bioluminescência nos fungos *Gerronema viridilucens* e *Mycena lucentipes*. Tese de Doutorado. IQ/USP – São Paulo. 115 p.

Beck, S. 1951. Oxydimetrische titrationen in Alkalischen losungen mit kaliumcupri-3-perjodat (Percuprimetric). *Microchemica Acta*, 36/37: 245-250.

Beers, R.F., Sizer, I.W. 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *The Journal of Biological Chemistry*. 195: 133-140.

Belinky, P. A., Flikshtein, N., Dosoretz, C. G. 2006. Induction of lignin peroxidase via reactive oxygen species in manganese-deficient cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39: (2) 222-228.

Belozerskaya, T. A., Gessler, N. N. 2007. Reactive oxygen species and the strategy of antioxidant defense in fungi: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 43: (5) 506-515.

Bizerra, F.C. 2010. Efeito paradoxal da caspofungina em *Candida* spp.: Mecanismos moleculares e aspectos morfológicos. Tese de doutorado, Unifesp, São Paulo, 142 p.

Bohlmann, F., Grenz, M. & Schwarz, H. 1973. Naturally Occuring Terpene Derivatives, XXV. New Diterpenes from *Hinterhubera imbricata* Cuatr. *Chemische Berichte*, 106(8): 2479-2484.

Bononi, V.L.R. (org.). 1998. Zigomicetos Basidiomicetos e Deuteromicetos: Noções Básicas de Taxonomia e Aplicações Biotecnológicas. Instituto de Botânica/Secretaria do Meio Ambiente, 184 p.

Bowman, S. M., Free, S. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, 28: 799 – 808.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-257.

Brand, M.A., Anzaldo, J., Moreschi, J.C. 2006. Novos Produtos para o tratamento preservante da madeira. "Perspectivas da pesquisa e utilização. Floresta, Curitiba, PR, v. 36, n. 1, jan./abr.

Brisolari, A. 2008. Estudo da molhabilidade em madeiras tropicais ou de reflorestamento por medidas de ângulo de contato e de permeabilidade. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia dos Materiais) – Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 98p.

Brul, S., Klis, F. M. 1999. Mechanistic and Mathematical Inactivation studies of food spoilage fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 27: 199-208.

Cabib, E. 1987. The synthesis and degradation of chitin. *In: Meisler, A. (Ed.). Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, New York: Willey, p. 59 - 101.

Cameron, M. D., Tomifeevski, S., Aust, D.S. 2007. Enzimology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 751-758.

Carmo, E. S.; Lima, E. O.; Souza, E. O. 2008. The potential of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39: 362-367.

Carvalho, E.S.; Santos, A.G.; Cavalheiro, A.J. 2009. Identificação de diterpenos clerodânicos em diferentes órgãos de *Casearia sylvestris* Swartz. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 30(3):277-284.

Carvalho, P. R. F., Furlan, M., Young, M. C. M., Kingston, D. G. I.; Bolzani, V. da S. 1998. Acetylated DNA-damage clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. *Phytochemistry*, 49: (6) 1659-1662.

Cavalcante, M. S. 1983. Deterioração biológica e preservação de madeiras. São Paulo: IPT, Pesquisa e Desenvolvimento, 8: 40p.

Chen, S., Ma, D., Ge, W., Buswell, J.A. 2003. Induction of laccase activity in the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. *FEMS Microbiology Letters*, 218: 143-148.

Clausen, C.A., Bessie, M., Vina, Y.W. 2010. Antifungal Essential Oil Metabolites. 41st Annual Meeting Biarritz, France, 10 p.

Coelho, J. S.; Oliveira, A. L.; Souza, C. G. M.; Bracht, A.; Peralta, R. M. 2010. Effect of the herbicides bentazon and diuron on the production of ligninolytic enzymes by *Ganoderma lucidum*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64(2): 156–161.

De Jong, E., Field, J., De Bond, J. 1994. Aryl alcohols in the physiology of ligninolytic fungi. *FEMS Microbiology*, 13: 153-188.

Eggert, C., Temp, U., Eriksson, K. E. L. 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (4): 1151-1158.

Emri, T., Pocsí, I., Szentirmai, A. 1997. Glutathione metabolism and protection against oxidative stress caused by peroxides in *Penicillium chrysogenum*. *Free Radical Biology and Medicine*, New York, 23: 809-814.

Eriksson, K. E. L., Blanchette, R. A., Ander, P. 1990. Biodegradation of lignin. *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*, Springer-Verlag, Berlin.

Espindola, L. S., Vasconcelos Junior, J. R., De Mesquita, M. L., Marquie, P., De Paula, J. E., Mambu, L., Santana, J. M. 2004. Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* var. lingua. *Planta Medica*, 70: (11) 1093-1095.

Esteves, I.; Souza, I. R.; Rodrigues, M.; Cardoso, L. G. V.; Santos, L. S.; Sertiè, J. A. A.; Perazzo, F. F.; Lima, L. M.; Schneedorf, J. M.; Bastos, J. K.; Carvalho, J. C. T. 2005. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. *Journal of Ethnopharmacology*, 101: 191-196.

Evans, C. S. Dutton, M.V., Guillén, F. Veness, R.G. 1994. Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. *FEMS Microbiology Review*, 13: 235-239.

Faria, R.A. 2010. Estudo da produção de enzimas ligninolíticas por *Ceriporiopsis subvermispora*. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo. 102 p.

Farmacopéia Brasileira. 1926. 1º ed. Disponível em:
<http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeia/farmacopeia.htm>. Acesso em: 5 maio de 2012.

Fengel, D., Wegener, G. 1989. Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 613 p.

Ferraz, A. 2004. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia, *In: Espósito, Azevedo.* Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. Caxias do Sul, EDUCS, p. 215-242.

Ferreira, L. F.R. 2009. Biodegradação de vinhaça proveniente do processo industrial de cana-de-açúcar por fungos. Tese de doutorado. ESALQ/USP – Piracicaba. 135 p.

Fialho, M.B. 2008. Mecanismos de ação de compostos orgânicos voláteis antimicrobianos produzidos por *Saccharomyces cerevisiae* sobre o desenvolvimento de *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros. Tese de Doutorado. Esalq-USP-Piracicaba. 141 p.

Fialho, M.B., Ferreira, L.F.R., Monteiro, R.T.R., Pascholati, S.F. 2011. Antimicrobial volatile organic compounds affect morphogenesis-related enzymes in *Guignardia citricarpa*, causal agent of citrus black spot. *Biocontrol Science and Technology*, 21: 797-807.

Galhaup, C., Wagner, H., Hinterstoisser, B., Haltrich, D. 2002. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology*, 30: 529-536.

Gilbertson, R. L. 1980. Wood – rotting fungi of North America. *Mycologia*, 72: 1 – 49.

Gonzaga, A.L. 2006. Madeira: uso e conservação. Brasília: IPHAN/MONUMENTA, 246p.

Gooday, G.M. 1995. Cell walls. *In: Gow, N.R.; Gadd, G.M. (Ed.).* The growing fungus. London: Chapman and Hall, p. 43-62.

Gooday, G.W.; Humphreys, A.M.; McIntosh, W. H. 1986. Roles of chitinases in fungal growth. *In: Muzzarelli, R.A.A.; Jeuniaux, C.; Gooday, G.W. (Ed.).* Chitin in Nature and Technology, New York: Plenum Press, p. 83 - 91.

Green III, F., Kuster, T. A., Ferge, L., Highley, T. L. 1997. Protection of Southern Pine from fungal decay and termite Damage with N,N-Naphthaloylhydroxylamine. *International Biodeterioration e Biodegradation*, 39: n. 2/3, p 103-111.

Gugliotta, A. M. 2001. Utilização de basidiomicetos nativos na remoção de corantes em efluentes da indústria têxtil. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.

Guillen, F., Gomez-Toribio, V., Martinez, M. J., Martinez, A. T. 2000. Production of Hydroxyl Radical by the Synergistic Action of Fungal Laccase and Aryl Alcohol Oxidase. Archives of Biochemistry and Biophysics, 383: (1) 142-147.

Gunasekera, S. P., Sultanbawa, M. U. S., Balasubramaniam, S. 1977. Triterpenes of some species of *Flacourtiaceae*. Phytochemistry, 16: (6) 788-789.

Gunji, S., Arima, K., Beppu, T. 1983. Screening of antifungal antibiotics according to activities inducing morphological abnormalities. Agricultural and Biological Chemistry, v.47, p.2061-2068.

Hackman, R.H. & Goldberg, M. 1964. New substrates for use with chitinases. Analytical Biochemistry 8: 397 – 401.

Hakala, K. T., Lundell, T., Galkin, S., Maijala, P., Kalkkinen, N., Hatakka, A. 2005. Manganese peroxidases, laccases and oxalic acid from the selective white-rot fungus *Physisporinus rivulosus* grown on spruce wood chips. Enzyme and Microbiol. Technology 36: 461-468.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. 2007. Free Radicals in Biology and Medicine. 4th. ed. Oxford: Clarendon Press, 2007.

Hamburger, M., Hostettmann, K. 1991. Bioactivity in plants; the link between Phytochemistry and medicine. Phytochemistry, 30: p. 3864.

Hammel, K. E., Kapich, A. N., Jensen, K. A., Ryan, Z. C. 2002. Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. Enzyme and Microbial Technology, 30: (4) 445-453.

Hearn, V.M.; Escott, G.M.; Evans, E.G.V.; Adams, D.J. 1997. Intracellular and wall-associated chitinases of *Aspergillus fumigatus*. In: Suzuki, S.; Suzuki, M. (Ed.). Fungal cells in biodefense mechanism. Tokyo: Saiken Publishing Co., p. 247- 252.

Heller, J.; Tudzynski, P. 2011. Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: Signaling, development, and disease. Annual Review of Phytopathology, 49: 369-390.

Henn, C. 2009. Seleção de linhagens de basidiomicetos resistentes aos herbicidas atrazina e diurom – produção de enzimas ligninolíticas e degradação dos compostos. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 117f.

Higuchi, T. 1985. Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components, Orlando: Academic Press, 679 p.

Hofrichter, M. 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*, 30: 454-466.

Humphris, S.N., Bruce, A., Buultjens, T.E.J., Wheatley, R.E. 2002. The effects of volatile secondary metabolites on protein synthesis in *Serpula lacrymans*. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, 210: 215-219.

Hunt, G.M., Garrat, G.A. 1953. Wood preservation. New York: MacGraw-Hill, 3ed. 417p.

Hyde, S.M., Wood, P.M. 1995. A model for attack at a distance from the hyphae based on studies with the brown rot *Coniophora puteana*. The International Research Group on Wood Preservation. Document nº IRG/WP 95-10104.

Ikehata, K., Buchanan, I., Smith, D. W. 2004. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. *Journal Environmental Engineering Science*, 3: 1 – 19.

Itokawa, H., Totsuka, N., Morita, H., Takeya, K., Iitaka, Y., Schenkel, E. P., Motidome, M. 1990. Antitumor principles from *Casearia sylvestris* Sw. (*Flacourtiaceae*) structure elucidation of new clerodane diterpenes by 2-D NMR spectroscopy. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 38: (12) 3384-3388.

Jaszek, M., Grzywnowicz, K., Malarczyk, E., Leonowicz, A. 2006. Enhanced extracellular laccase activity as a part of the response system of white rot fungi: *Trametes versicolor* and *Abortiporus biennis* to paraquat-caused oxidative stress conditions. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 85: (3) 147-154.

Jesus, M. A. 2003. Efeitos dos Extratos Obtidos de *Swartzia argenta* Spruce ex Benth. *S. laevicarpa* Amshoff, *S. panacoco* (Aublet) Cowan, *S. polyphylla* DC. E de *S. seriacea* Vogel da Amazônia Central sobre fungos degradadores de Madeira. Tese de Doutorado, UNESP, Rio Claro, 99p.

Jesus, M. A. 1991. Contribution to the knowledge of wood-rotting fungi in Brazil: Occurrence and distribution of fungi on different substrates from the Manaus region. Amazonas States. International Research Group on Wood Preservation, Stockholm, p. 21.

Jesus, M. A., Moraes, J. M., Souza-Breu, L., Cardias, F. C. 1998. Durabilidade natural de 46 espécies de madeiras amazônicas em contato com o solo em ambiente florestal. *Scientia Florestalis*, Piracicaba, 54: 79-89.

Junges, M. J., Schenkel, E. P., Simões, C. M. O. 1985. Flavonóides da *Casearia sylvestris* Sw. (erva de bugre). *Caderno de Farmácia*, 1: (2) 95-101.

Kamida, H. M., Durrant, L. R., Monteiro, R. T. S. T., Armas, E. D. 2005. Biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. *Química Nova*, 28: (4) 629-632.

Kawamura, F., Mahamud, A., Sulaiman, O., Hashim, R. 2010. Antifungal activities of extracts from heartwood, sapwood and bark of 11 malaysian timbers against *Gloeophyllum trabeum* and *Pycnoporus sanguineus*. *Journal of Tropical Forest Science* 22(2): 170–174.

Kirk, T. K., Cullen, D. 1998. Enzimology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. *In: Young, R.; Akhtar, M.* Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry. New York: John Wiley and Sons, p. 273-308.

Kuhad, R. C., Singh, A., Eriksson, K. E. L. 1997. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. *In: Eriksson, K.E.L.* Biotechnology in the pulp and paper industry. Berlin: Springer-Verlaq, p. 45-126 (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology).

Kuwahara, M, Glenn, J.L, Morgan, M.A; Gold, M.H. 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.*, 169: 247-250.

Kwon, S. I., Anderson, A. J. 2001. Catalase activities of *Phanerochaete chrysosporium* are not coordinately produced with ligninolytic metabolism: Catalases from a white- rot fungus. *Current Microbiology*, 42(1): 8-11.

Lee, K., Moon, S.H. 2003. Electroenzymatic oxidation of veratryl alcohol by lignin peroxidase. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, 102: 261-268.

Li, Q., Mcneil, B., Harvey, L. M. 2008. Adaptive response to oxidative stress in the filamentous fungus *Aspergillus niger* B1-D. *Free Radical Biology and Medicine*, New York, 44: 394 - 40.

Lindahl, B. D. and Finlay, R. D. 2006. Activities of chitinolytic enzymes during primary and secondary colonization of wood by basidiomycetous fungi. *New Phytologist* 169: 389–397.

Litthauer, D.; Van Vuuren, M. J.; Van Tonder, A.; Wolfaardt, F. W. 2007. Purification and kinetics of a thermostable laccase from *Pycnoporus sanguineus* (SCC108). *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 563-568.

Luna, L. M., Murace, M. A., Keil, G. D., & Otaño, M. E. 2004. Patterns of decay caused by *Pycnoporus sanguineus* and *Ganoderma lucidum* (Aphyllphorales) in Popular wood. *IAWA Journal*, 25 (4): 425–433.

Machado, K.M.G., Matheus, D.R. 2006. Biodegradation of Remazol Brilliant Blue R by ligninolytic enzymatic complex produced by *Pleurotus ostreatus*., **Brazilian Journal of Microbiology**, 37: 468-473.

Marino, M.; Bersani, C.; Comi, G. 2001. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. *International Journal of Food Microbiology*, 67: 187-195.

Masaphy, S., Levanon, D. 1992. The effect of lignocellulose on lignocellulolytic activity of *Pleurotus pulmonaris* in submerged culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, 36: 828-832.

Masarin, F. 2010. Estudo da degradação de lignina iniciada por metabólitos extracelulares extraídos de cultivos de *Ceriporiopsis subvermispora*. Dissertação de Mestrado. EEL/USP – Lorena. 108 p.

Mesquita, M. L.; Desrivot, J.; Bories, C.; Fournet, A.; Paula, J. E.; Grellier, P.; Espindola, L. S. 2005. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100 (7): 783-787.

Mesquita, M. L.; Grellier, P.; Mambu, L.; Paula, J. E.; Espindola, L. S. 2007. *In vitro* antiplasmodial activity of brazilian cerrado plants used as traditional remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 110: 165-170.

Miller, G.H. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. ***Analytical Chemistry***, 31: 426-429.

Miller, R.W. 1997. *Urban Forestry: Planning and Managing Urban Greenspaces*. 2nd ed. New Jersey, Prentice Hall,. 502 p.

Moreira-Neto, S. L. 2006. Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 124p.

Moreschi, J.C. 2005. Produtos preservantes de madeira. Manual Didático do Curso de Pós-graduação em Engenharia Florestal da Universidade Federal do Paraná. 31p. Disponível em <<http://www.madeira.ufpr.br/moreschi/ppm.pdf>>. Acesso em 17 de Janeiro de 2011.

Morita, H.; Nakayama, M.; Kojima, H.; Takeya, K.; Itokawa, H.; Schenkel, E. P.; Motidome, M. 1991. Structures and cytotoxic activity relationship of casearins, new clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris* Sw. Chemical Pharmaceutical Bulletin, 39(3): 693-697.

Mun, S.P.; Prewiit, L. 2011. Antifungal Activity of Organic Extracts from *Juniperus virginiana* Heartwood against Wood Decay Fungi. Forest Products Journal, 61(6): 443-449.

Oberlies, N. H.; Burgess, J. P.; Navarro, H. A.; Pinos, R. E.; Fairchild, C. R.; Peterson, R. W.; Soejarto, D. D.; Farnsworth, N. R.; Kinghorn, A. D.; Wani, M. C.; Wall, M. E. 2002. Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*. Journal of Natural Products, 65 (2): 95-99.

Okada, W. S. 2010. Otimização da produção de inóculo fúngico de *Psilocybe castanella* CCB 444 para biorremediação de solos. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 138 p.

Okino, L. K., Machado, K. M. G., Fabris, C. & Bononi, V. L. R. 2000. Ligninolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes. World Journal of Microbiology & Biotechnology 16: 889-893.

Oliveira, A. M.; Santos, A. G.; Santos, R. A.; Csipak, A. R.; Olivato, C.; Silva, I. C.; Freitas, M. B.; Bassi, C. L.; Cavalheiro, A. J.; Bolzani, V. S. Silva, D. H. S.; Sakamoto-Hojo, E. T.; Takahashi, C. S.; Soares, C. P. 2009. Ethanolic extract of *Casearia sylvestris* and its clerodane diterpen (caseargrewiin F) protect against DNA damage at low concentrations and cause DNA damage at high concentrations in mice's blood cells. Mutagenesis, 24(6): 501-506.

Oliveira, J.T.S. 1998. Características da madeira de eucalyptus para a construção civil. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 429p.

Oliveira, P. V. A.; Rosseti, E. S.; Fachin, A. P.; Franca, S. C.; Pietro, R. C. L. R.; Pereira, P. S.; Fusco-Almeida, A. M. 2007. Ação de extrato etanolico de *Casearia sylvestris* contra leveduras do gênero *Candida*. Jornal Brasileiro de Fitoterapia, 5: 3.

Oliveira, R. M. 2009. Utilização de técnicas de caracterização de superfícies de madeiras tratadas termicamente. Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos. 118p.

Onuorah, E. O. 2000. The wood preservative potentials of heartwood extracts of *Milicia excelsa* and *Erythrophleum suaveolens*. *Bioresource Technology*, 75: 171-173.

Palonen, H. 2004. Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. VTT: Espoo, 80 p.

Papinutti, V. L., Diorio, L. A. & Forchiassin, F. 2003. Production of laccase and manganese peroxidase by *Fomes sclerodermeus* grown on wheat bran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30: 157-160.

Pocsi, I., Prade, R. A., Penninckx, M. J. 2004. Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Advances in Microbial Physiology*, 49: 1-76.

Quiroga, E. N.; Sampietro, A. R.; Vattuone, M. A. 2001. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 74: 89-96.

Raslan, D. S.; Jamal, C. M.; Duarte, D. S.; Borges, M. H.; Lima, M. E. 2002. Anti- PLA2 action test of *Casearia sylvestris* Sw. *Bolletín Chimie et Farmacie*, 141(6): 457-460.

Rodrigues, A. M. S.; Paula, J. E.; Degallier, N.; Molez, J. F.; Espíndola, L. S. 2006. Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Association*, 22: 314- 317.

Sami, L.; Pusztahelyi, T.; Emri, T.; Varcza, Z.; Fekete, A.; Grallert, Á.; Karányi, Z.; Kiss, L.; Pócsi, I. 2001. Autolysis and aging of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: Chitinase production and antifungal effect of allosamidin. *Journal of General and Applied Microbiology*, Tóquio, 47: 201 – 211.

Santos, A. G.; Ferreira, P. M. P ; Vieira Júnior, G. M.; Perez, C. C.; Tininis, A. G.; Bolzani, V. S.; Lotufo, L. V.; Pessoa, C. O.; Cavalheiro, A. J. 2010. Casearin U, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumour human cells. *Chemistry & Biodiversity*, 7: 205-215.

Santos, A. G.; Perez, C. C.; Tininis, A. G.; Bolzani, V. S.; Cavalheiro, A. J. 2007. Clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Swartz. *Química Nova*, 30(30): 1100-1103.

Sato I, Shimatani K, Fujita K, Abe T, Shimizu M, Fujii T, Hoshino T, Takaya N. 2011. Glutathione reductase/glutathione is responsible for cytotoxic elemental sulfur tolerance via polysulfide shuttle in fungi. *Journal of Biological Chemistry*, 286(23): 20283-2029.

Scandalios, J.G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Ribeirão Preto, 38: 995-1014.

Schoenfelder, T.; Pich, C. T.; Geremias, R.; Ávila, S.; Daminelli, E. N.; Pedrosa, R. C.; Bettiol, J. 2008. Antihyperlipidemic effect of *Casearia sylvestris* methanolic extract. *Fitoterapia*, 79: 465-467.

Scott, B., Eaton, C. J. 2008. Role of reactive oxygen species in fungal cellular differentiations. *Current Opinion in Microbiology*, 11(6): 488-493.

Sertié, J. A. A.; Carvalho, J. C. T.; Panizza, S. 2000. Antiulcer activity of the crude extract from the leaves of *Casearia sylvestris*. *Pharmaceutical Biology*, 38(2): 112-119.

Shallom, D.; Shoham, Y. 2003. Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology*, 6: 219–228.

Silva, C. M. M. S., Melo, I. S. M., Oliveira, P. R. 2004. Ligninolytic enzyme production by *Ganoderma* spp. *Enzyme and Microbial Technology*, 37: 324–329.

Silva, N.M. 2010. Avaliação do potencial antimicrobiano, enzimático e crescimento de um isolado amazônico do fungo *Pycnoporus sanguineus*. Dissertação de Mestrado, UEA, Manaus, 157 p.

Silva, T.P. 2009. *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.: defesas antioxidantes em diferentes estágios de diferenciação do basidioma. Trabalho de Conclusão de Curso. UFSC – Florianópolis.

Sjöstrom, E.; Westermark. U. 1999. Chemical composition of wood and pulps: basic constituents and their distribution. *In*: Eds. Sjöström E.; Alén R. *Analytical methods in wood chemistry, pulping and papermaking*. Helsinki: Springer Series in Wood Science; p. 1-20.

Songulashvili, G., Elisashvili, V., Wasser, S. P., Nevo, E., Hadar, Y. 2007. Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, 41: 57-61.

Souza, N.A.B. 2010. Possíveis mecanismos de atividade antifúngica de óleos essenciais contra fungos patogênicos. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa/PB. 150f.

Srinivasan, C., D'Souza, T. M., Boominathan, K. & Reddy, C. A. 1995. Demonstration of laccase in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. *Applied Environmental Microbiology*, 61: 4274-4277.

Stephen, D.W.; Jamieson, D.J. 1996. Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, 141: 207-212.

Sukumar, D.; Nambi, R. A.; Swarnalakshmi, T.; Sulochana, N.; Bhaskar, E. A. 1982. Chemical and pharmacological studies on the leaves of *Casearia tomentosa*. *Fitoterapia*, 53(5-6): 163-165.

Takaya, N.; Yamazaki, D.; Horiuchi, H.; Ohta, A.; Takagi, M. 1998. Cloning and characterization of a chitinase-encoding gene (*chiA*) from *Aspergillus nidulans*, disruption of which decreases germination frequency and hyphal growth. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, Tokio, 62: 60 – 65.

Tavares, A.P.M. 2006. Produção de lacase para potencial aplicação como oxidantes na indústria papeleira. Tese de Doutorado, Universidade de Aveiro, Aveiro – Portugal, 190 p.

Teixeira, A. F. 2007. Metabólitos secundários de frutos da *Virola molissima* (Poepp. ex. A. DC.) Warb.: Neolignanas e atividade antifúngica. Tese de Doutorado, USP, São Paulo, 158 p.

Teixeira, A.R. 1995. Método para estudo das hifas do basidiocarpo de fungos poliporáceos. São Paulo, Instituto de Botânica. 20p.

Terrón, M.C., Gonzalez, T., Carbajo, J.M., Yague, S., Arana-Cuenca, A., Téllez, A., Dobson, A.D.W., Gonzalez, A. E. 2004. Structural close-related aromatic compounds have different effects on laccase activity and on *lcc* gene expression in the ligninolytic fungus *Trametes* sp. I-62. *Fungal Genetics and Biology* 41: 954-962.

Thadeo, M., Alves Meira, R. M. S., Azevedo, A. A., Araújo, J. M. 2009. Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras da folha de *Casearia decandra* Jacq. (Salicaceae). *Revista Brasileira Botânica*, 32(2): 329-338.

Tininis, A. G. 2006. Desenvolvimento, otimização, validação e utilização de métodos de extração e análise de casearinas em *Casearia sylvestris* Sw. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 182 f.

Torres, L.M.B., Young, M.C.M., Cardoso-Lopes, E.M. 2008. Bioensaios de bancada: seleção, importância e Limitações dos ensaios de bancada na Busca de Bioprodutos de Plantas Brasileiras. In A Botânica no Brasil pesquisa, ensino e políticas públicas ambientais, 58º Congresso de Botânica Luís Mauro & Nelson dos Santos Junior Organizadores, Imprensa Oficial do Estado, 660p.

Torres, L.M.B. 1985. Estudo químico da espécie *Solidago microglossa* D. C.. Tese de Doutorado, Instituto de Química – Universidade de São Paulo, São Paulo. 175 p.

Urzúa, U.; Kersten, P.J.; Vicuña, R. 1998. Manganese peroxidase-dependent oxidation of glyoxilic and oxalic acids synthesized by *Ceriporiopsis subvermispota* produces extracellular hydrogen peroxide. Applied and Environmental Microbiology, 64: 68-73.

Velutti, A.; Sanchis, V.; Ramos, A.J.; Egidio, J.; Marín, S. 2003. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. International Journal of Food Microbiology, 89: 145-154.

Verwer, P.E.B.; van Duijn, M. L.; Tavakol, M.; Bakker-Woudenberg, I.A.J.M.; van de Sande, W.W.J. 2012. Reshuffling of *Aspergillus fumigatus* Cell Wall Components Chitin and β -Glucan under the Influence of Caspofungin or Nikkomycin Z Alone or in Combination. *Antimicrob. Agents Chemother*, 56(3): 1595 – 1598.

Vieira Júnior, G. M. 2010. Contribuição ao estudo dos metabólitos secundários do gênero *Casearia* e de algumas de suas atividades biológicas. Tese de Doutorado – Instituto de Química de Araraquara (UNESP), Araraquara – SP. 406 f.

Vieira Júnior, G. M.; Gonçalves, T. O.; Ragasini, L. O.; Ferreira, P. M. P.; Pessoa, C. do Ó.; Lotufo, L. V.; Torres, R. B.; Boralle, N.; Bolzani, V. S.; Cavalheiro, A. J. 2009. Cytotoxic clerodane diterpenoids from *Casearia obliqua*. Journal of Natural Products, 72: 1847-1850.

Vukojevic, J.; Stajic, M.; Duletic-Lausevic, S.; Simonic, J. 2006. Effect of medium pH and cultivation period on mycelial biomass, polysaccharide, and lygninolytic enzyme production by *Ganoderma lucidum* from Montenegro. Archives of Biology Science, Belgrade, 58(31): 179 – 182.

Wagner, H., Seitz, R., Lotter, H. & Herz, W. J. 1978. New furanoid ent-clerodanes from *Baccharis tricuneata*. The Journal of Organic Chemistry, 43 (17): 3338 – 3346.

Watanabe, H.; Tokuda. G. 2010. Cellulolytic Systems in Insects. Annual Review of Entomology, 55:609–32.

Wessels, J.G.H. 1993. Wall growth, protein excretion and morphogenesis in fungi. New Phytologist, 23: 397 - 413.

Wheatley, R.E. 2002. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. Antonie van Leeuwenhoek, Dordrecht, 81: 357-364.

White, S.; Mcintyre, M.; Berry, D.R.; Mcneil, B. 2002. The autolysis of industrial filamentous fungi. Critical Review in Biotechnology, London, 22: 1-14.

Wilkinson, J.G. 1979. Industrial timber preservation. London: Associates Business Press. 531 p.

Yamanaka, R. Soares, C. F.; Matheus, D. R.; Machado, K. M. G. 2008. Lignolytic enzymes produced by *Trametes villosa* CCB176 under different culture conditions. Brazilian Journal of Microbiology, 39: 78-84.

Yamashita, C. I.; Saikia, M.; Vasconcellos, M. B. A.; Sertié, J. A. A. 2005. Characterization of trace elements in *Casearia* medicinal plant by neutron activation analysis. Applied Radiation Isotopes, 63: 841-846.

Yang, D.; Li, S.; Li, S.; Li, J.; Sun, M.; Jin, Y. 2009. Effect of juglone from *Juglans mandshurica* bark on the activity of wood decay fungi. Forest Products Journal, 59(9): 79-82.

Zacchino, S., Yunes, R., Cechinel, V., Enriz, R. D., Kouznetsov, V., Ribas, J. C. 2003. The need for new antifungal drugs: Screening for antifungal compounds with a selective mode of action with emphasis on the inhibitors of the fungal cell wall. In: Mahendra Rai, Donatella Mares (Eds.) Plant Derived Antimycotics, Haworth Press (New York); 1-47

Zervakis, G.; Philipoussis, A.; Ioannidou, S.; Diamantopoulou, P. 2001. Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosics substrates. Folia Microbiologica, 46: 231–234.

Ziglio, A. C. 2010. Uso da capsaicina como preservante de madeiras ao ataque de fungo apodrecedor. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 80 f.

ANEXO 1

Atividade das peroxidases dos fungos com extrato de *C. sylvestris*

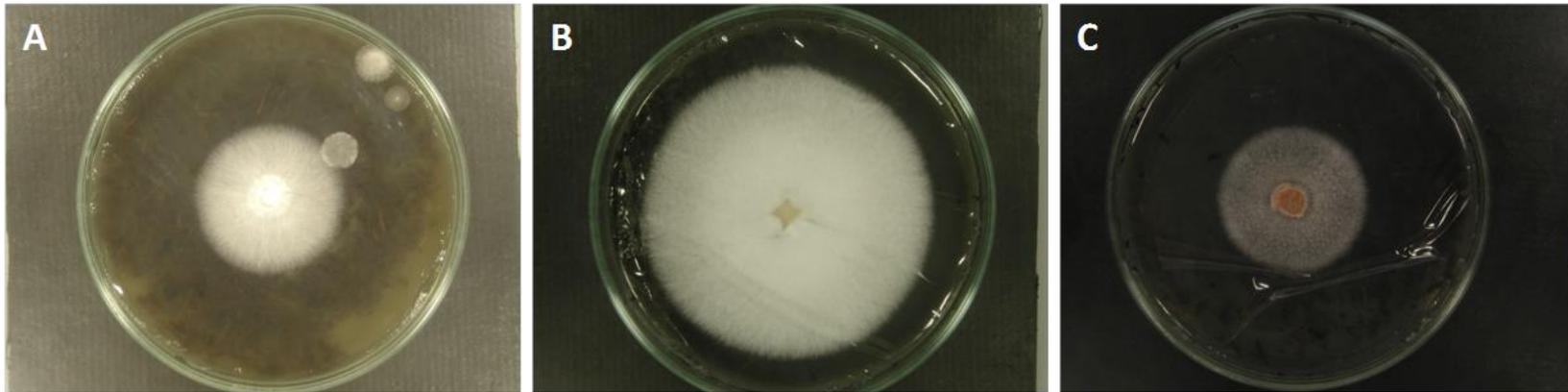
Fungo	Tempo (dias)	Concentração (mg/mL)			
		Controle	0,1	0,01	0,001
		Atividade da Peroxidases (U.L⁻¹)			
<i>Trametes villosa</i>	4	7,41	-0,17	0,02	0,00
	8	38,27	30,37	0,00	0,00
	12	0,00	0,00	0,00	-5,85
	16	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	4	0,00	-0,01	0,00	0,00
	8	0,17	0,01	0,00	0,00
	12	0,00	0,00	0,00	0,00
	16	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Ganoderma australe</i>	4	-5,45	-0,03	0,00	0,00
	8	-24,77	-42,98	0,00	0,00
	12	0,00	0,00	0,00	0,00
	16	0,00	0,00	0,00	0,00

Atividade das peroxidases dos fungos com extrato de *C. decandra*

Fungo	Tempo (dias)	Concentração (mg/mL)			
		Controle	0,1	0,01	0,001
		Atividade da Peroxidases (U.L⁻¹)			
<i>Trametes villosa</i>	4	-12,96	9,38	0,31	0,00
	8	2,70	-4,15	-0,23	3,63
	12	0,00	0,00	0,00	-37,04
	16	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	4	4,35	0,09	0,00	0,00
	8	-12,99	-1,85	2,24	-3,70
	12	0,00	0,00	0,00	20,37
	16	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Ganoderma australe</i>	4	-4,52	0,12	-0,32	0,00
	8	-20,22	-0,77	-0,14	-0,26
	12	0,00	0,00	0,00	0,54
	16	0,00	0,00	0,00	0,00

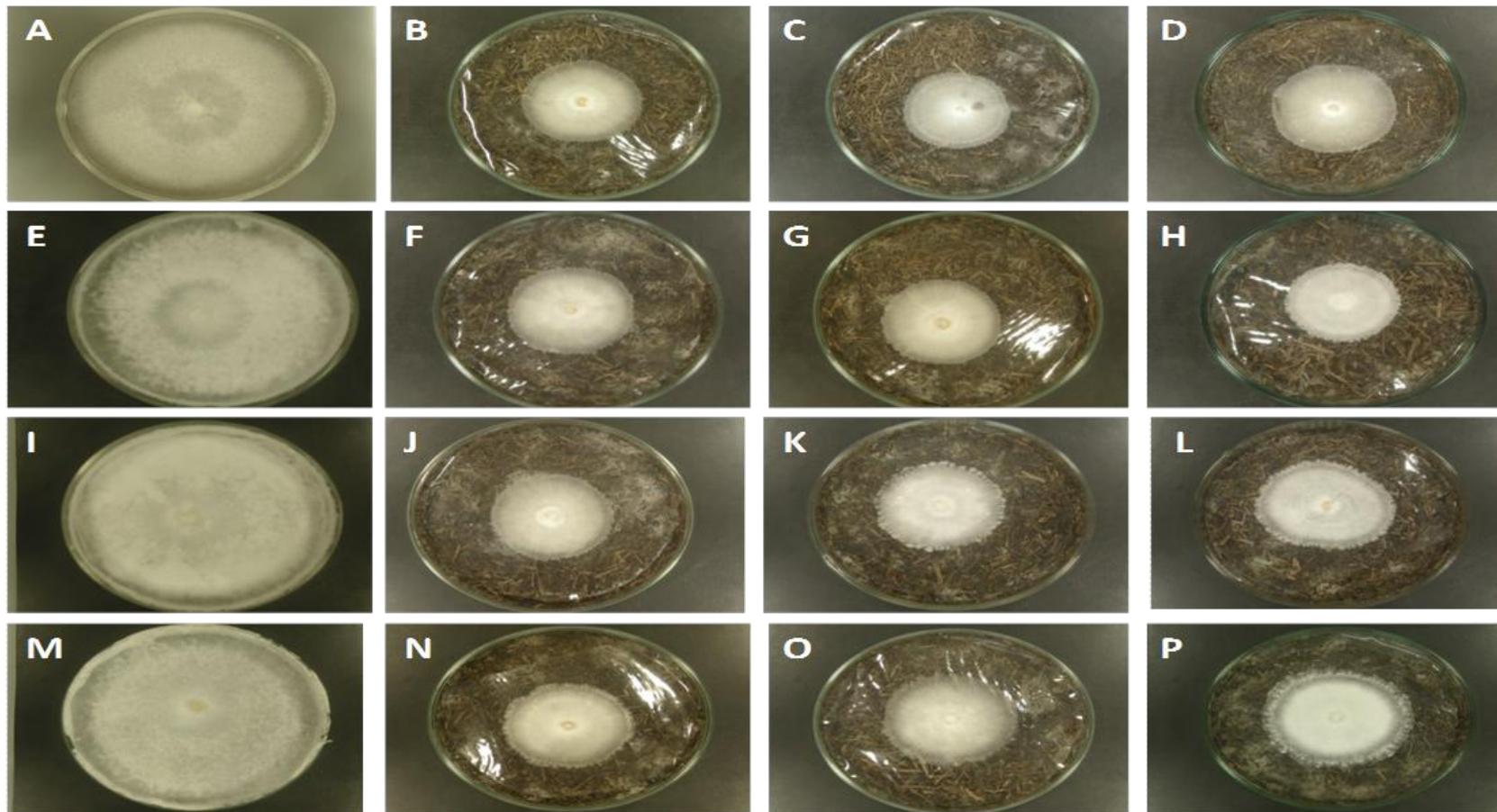
ANEXO 2

Placas com 4 dias de incubação antes da exposição com os extratos. Cultura de *G. australe* (A); *T. villosa* (B) e *P. sanguineus* (C)



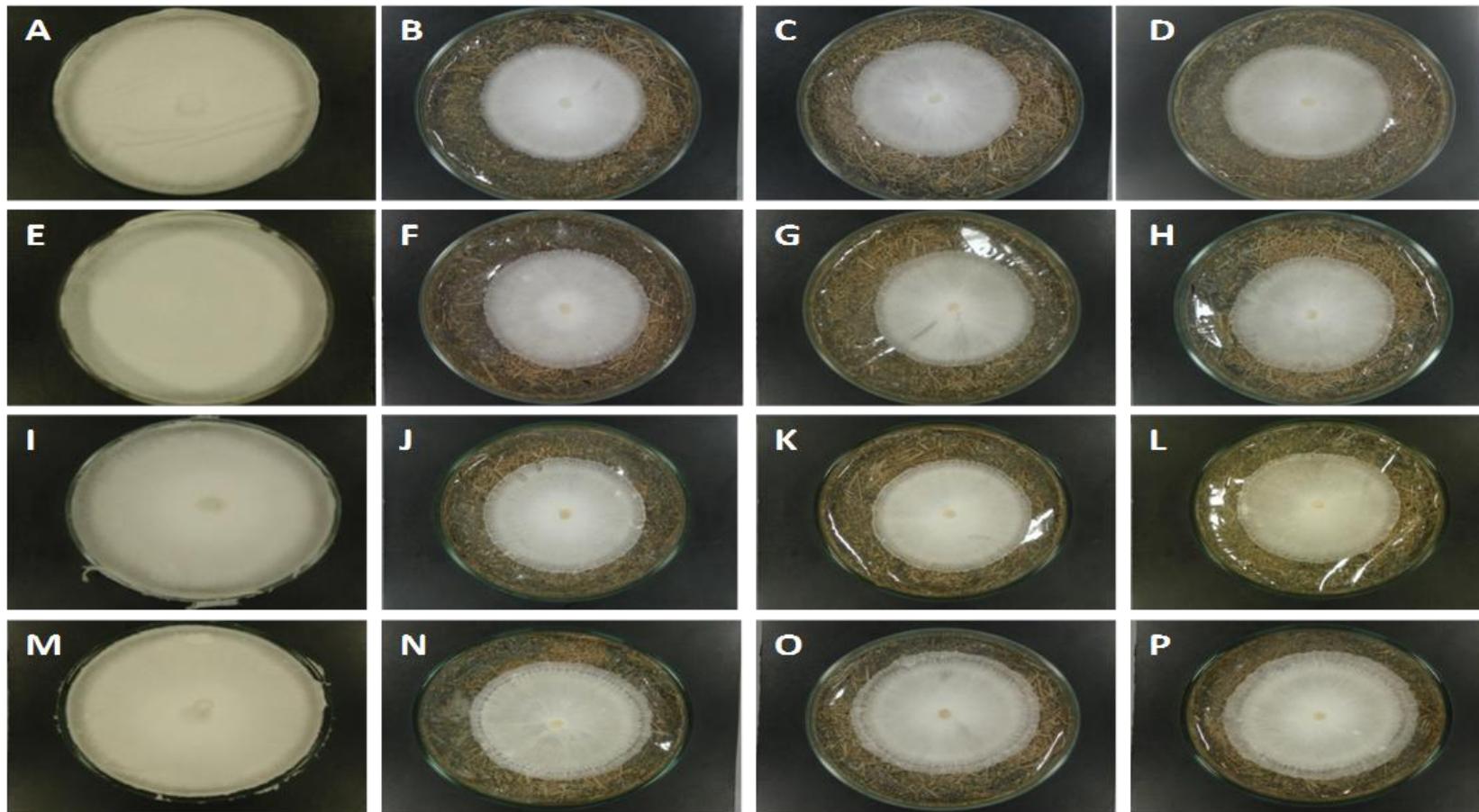
ANEXO 3

Características da cultura do fungo *G. australe* exposto ao extrato de *C. sylvestris*. Tempo 4: A – Controle; B – 0,1; C – 0,01; D – 0,001. Tempo 8: E – Controle; F – 0,1; G – 0,01; H – 0,001. Tempo 12: I – Controle; J – 0,1; K – 0,01; L – 0,001. Tempo 16: M – Controle; N – 0,1; O – 0,01; P – 0,001.



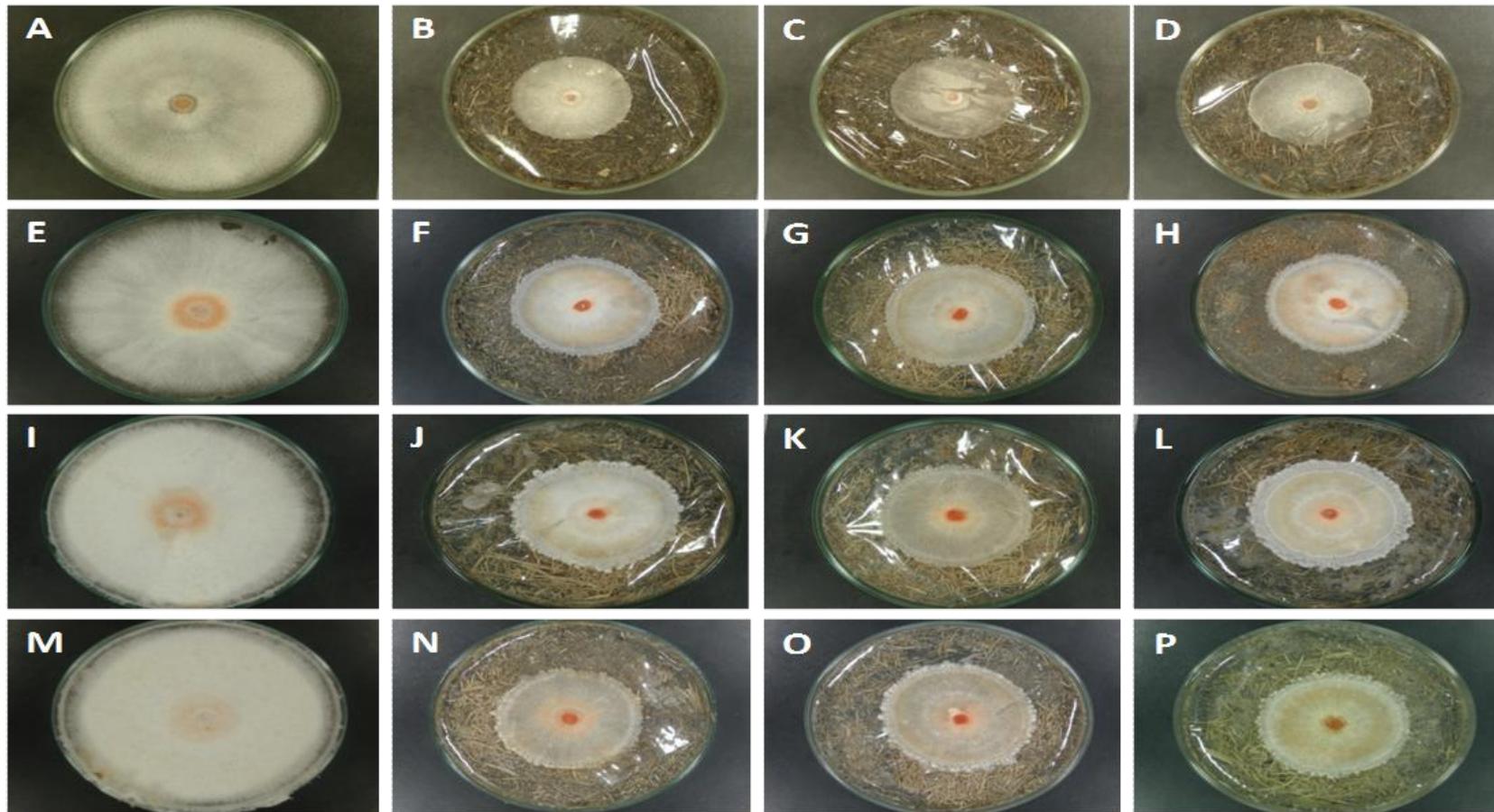
ANEXO 4

Características da cultura do fungo *T. villosa* exposto ao extrato de *C. sylvestris*. Tempo 4: A – Controle; B – 0,1; C – 0,01; D – 0,001. Tempo 8: E – Controle; F – 0,1; G – 0,01; H – 0,001. Tempo 12: I – Controle; J – 0,1; K – 0,01; L – 0,001. Tempo 16: M – Controle; N – 0,1; O – 0,01; P – 0,001.



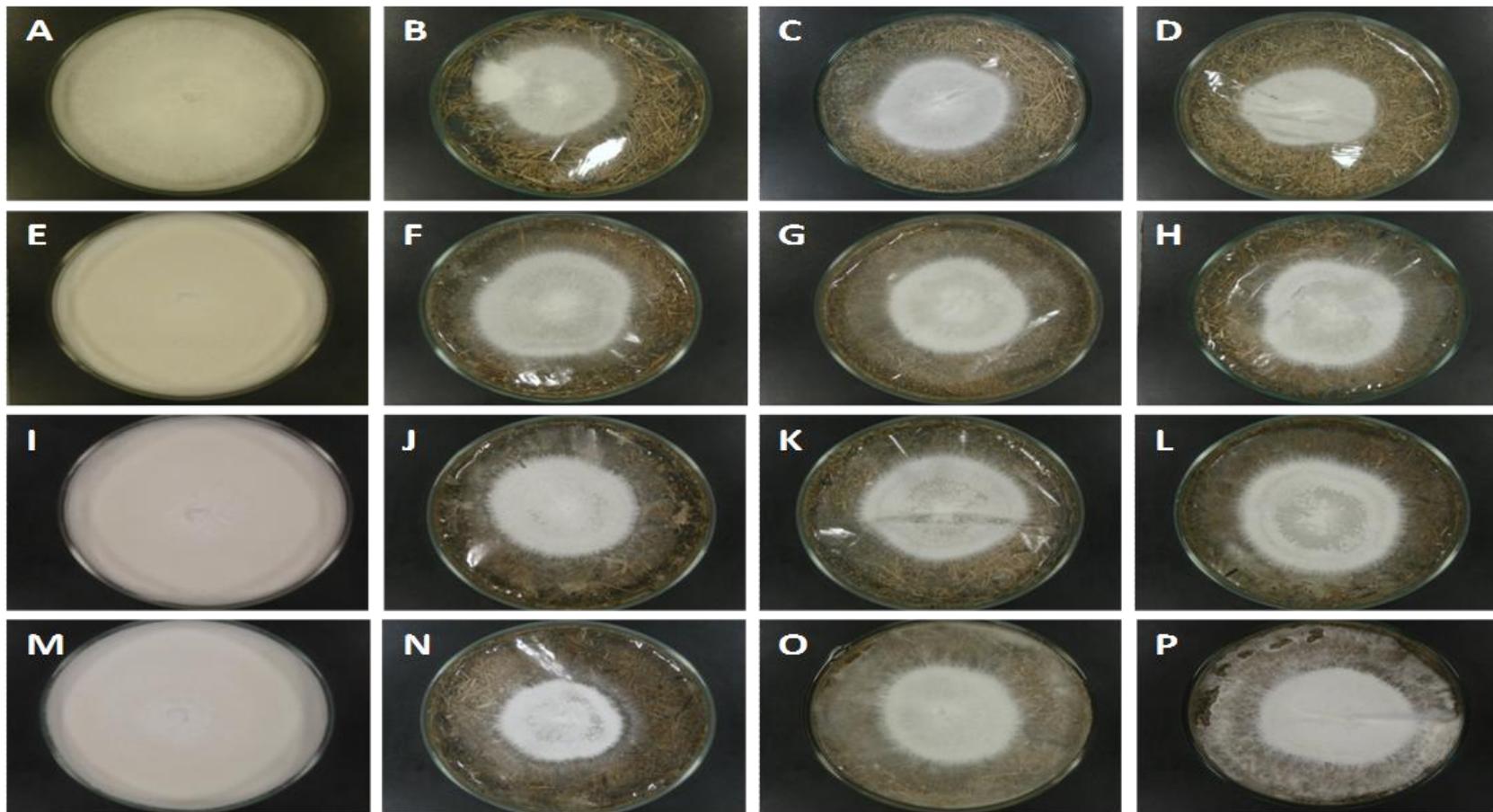
ANEXO 5

Características da cultura do fungo *P. sanguineus* exposto ao extrato de *C. sylvestris*. Tempo 4: A – Controle; B – 0,1; C – 0,01; D – 0,001. Tempo 8: E – Controle; F – 0,1; G – 0,01; H – 0,001. Tempo 12: I – Controle; J – 0,1; K – 0,01; L – 0,001. Tempo 16: M – Controle; N – 0,1; O – 0,01; P – 0,001.



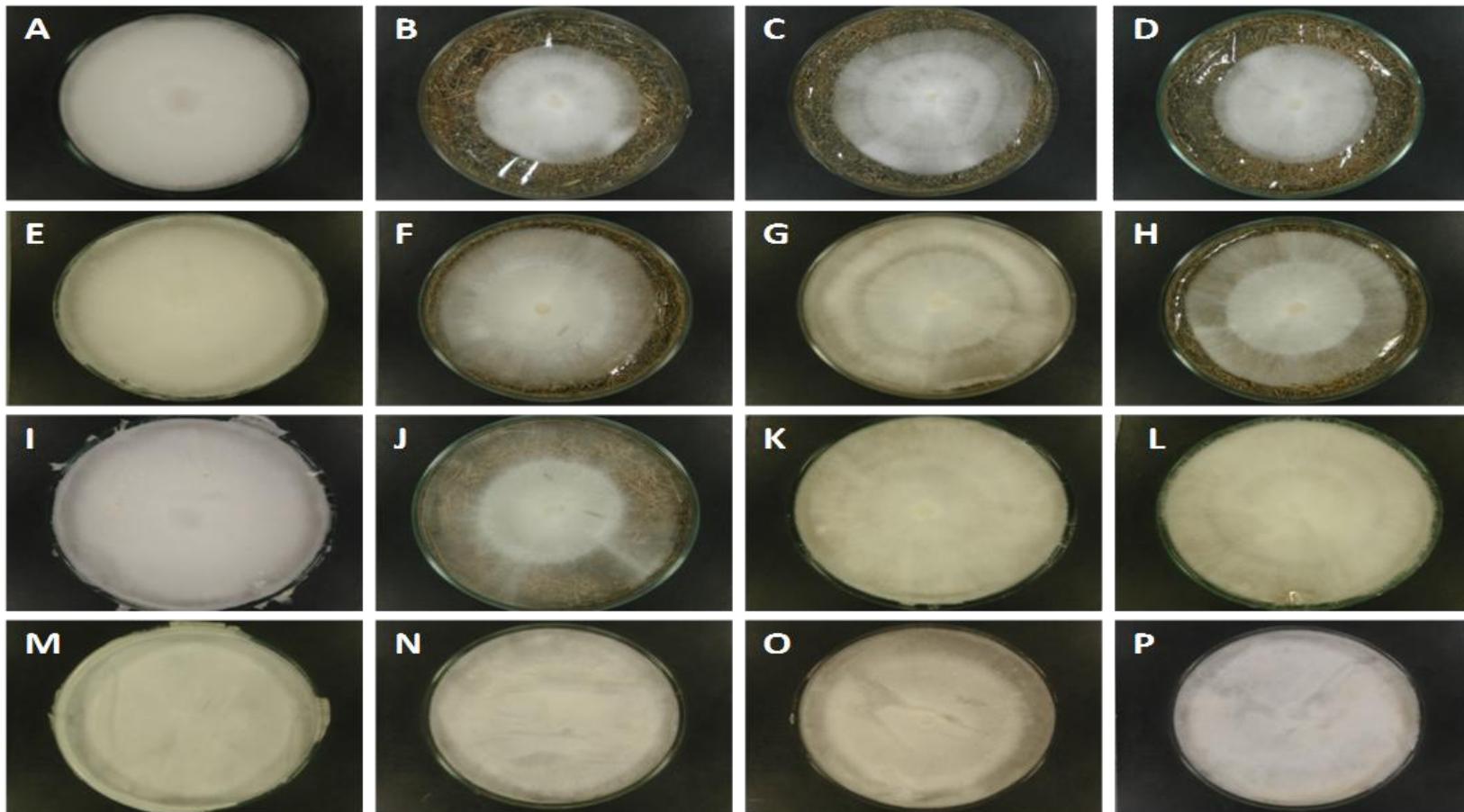
ANEXO 6

Características da cultura do fungo *G. australe* exposto ao extrato de *C. decandra*. Tempo 4: A – Controle; B – 0,1; C – 0,01; D – 0,001. Tempo 8: E – Controle; F – 0,1; G – 0,01; H – 0,001. Tempo 12: I – Controle; J – 0,1; K – 0,01; L – 0,001. Tempo 16: M – Controle; N – 0,1; O – 0,01; P – 0,001.



ANEXO 7

Características da cultura do fungo *T. villosa* exposto ao extrato de *C. decandra*. Tempo 4: A – Controle; B – 0,1; C – 0,01; D – 0,001. Tempo 8: E – Controle; F – 0,1; G – 0,01; H – 0,001. Tempo 12: I – Controle; J – 0,1; K – 0,01; L – 0,001. Tempo 16: M – Controle; N – 0,1; O – 0,01; P – 0,001.



ANEXO 8

Características da cultura do fungo *P. sanguineus* exposto ao extrato de *C. decandra*. Tempo 4: A – Controle; B – 0,1; C – 0,01; D – 0,001. Tempo 8: E – Controle; F – 0,1; G – 0,01; H – 0,001. Tempo 12: I – Controle; J – 0,1; K – 0,01; L – 0,001. Tempo 16: M – Controle; N – 0,1; O – 0,01; P – 0,001

