**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Atividade antimicrobiana de extratos e frações do cultivo *in vitro* de *Lentinula edodes* contra *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae*, *Guignardia citricarpa*, *Colletotrichum sublineolum* e Tobacco mosaic virus

Marizete de Fátima Pimentel Godoy

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Agronomia. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2008**

Marizete de Fátima Pimentel Godoy
Farmacêutica-Bioquímica

Atividade antimicrobiana de extratos e frações do cultivo *in vitro* de *Lentinula edodes* contra *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae*, *Guignardia citricarpa*, *Colletotrichum sublineolum* e *Tobacco mosaic virus*

Orientador:
Prof. Dr. **SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI**
Co-orientador:
Prof. Dr. **ÉDSON RODRIGUES FILHO**

Tese apresentada para obtenção do título
de Doutor em Agronomia. Área de
concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2008**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Godoy, Marizete de Fátima Pimentel

Atividade antimicrobiana de extratos e frações do cultivo *in vitro* de *Lentinula edodes* contra *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae*, *Guignardia citricarpa*, *Colletotrichum sublineolum* e *Tobacco mosaic virus* / Marizete de Fátima Pimentel Godoy. - - Piracicaba, 2008.

125 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Agentes antimicrobianos 2. Cogumelos comestíveis 3. Fitopatógenos 4. Mancha bacteriana 5. Mancha preta 6. Vírus de plantas I. Título

CDD 635.8
G589a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Ao meu pai,

Gabriel Rubens Pimentel,

exemplo de integridade, superação, amor, fé, humildade...

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder a vida por mais de uma vez, ensinando-me com sua grande sabedoria, os verdadeiros valores que devem estar presentes em toda nossa caminhada.

Ao meu esposo, Antonio Fernando e meu filho Fernando, pelos momentos felizes, pela paciência, companheirismo e por serem sempre o meu porto seguro.

Aos meus pais, Gabriel e Therezinha, meus primeiros educadores, responsáveis pela sólida formação do meu caráter.

Ao professor Dr. Sérgio Florentino Pascholati, mais que um orientador, um amigo sempre disposto a estender a mão nas horas difíceis, deixo expressa a minha eterna gratidão.

Ao professor Dr. Edson Rodrigues Filho, pela orientação na difícil tarefa de purificação de compostos químicos.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Fitopatológica, Maurício Batista Fialho, Nívea Maria Tonucci Zanardo, Odair José Kuhn, Marisa S.A. Renaud Faulin, Ely O. Garcia, Leonardo Toffano, André B. Beltrame, Silvia Blumer, Fuvia, Luciana Oharomari, Josué, Rodrigo, Nicolas e Fernando, pelos ensinamentos, pela amizade, palavras e por momentos inesquecíveis.

À amiga Juliana Feijó Daniel, sem a qual, não seria possível a realização deste trabalho.

Aos professores Ivan P. Bedendo, Nelson S. Massola, José Otavio Menten, Hiroshi Kimati “*in memoriam*”, Carlos Tadeu, Emanuel Carrilho, Siu Mui Tsai e Marli Fiore, pelo conhecimento transmitido, tão essencial para a conclusão deste trabalho e em especial ao prof. Jorge Rezende, pelas sugestões, orientações, paciência e acima de tudo, o exemplo de dedicação à profissão.

A profa. Marli T. Minhoni, da Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, pelo fornecimento das linhagens do fungo *L.edodes*.

Ao prof. Luis Alberto Beraldo de Moraes, pelas análises de espectrometria de massas.

Aos amigos da Unimep, em especial Margarette e Patrícia, por me apoiarem durante esta turbulenta jornada.

À secretária da PPG Microbiologia agrícola, Giovana, por toda sua dedicação e comprometimento com o curso.

Aos funcionários do setor de Fitopatologia da Esalq, Edvaldo, Heloísa, Fernanda, Jéferson, Linda, Liliane, Pedro, Rodolfo e Sylvia, pelo suporte oferecido.

À funcionária da Biblioteca, Beatriz, pela correção deste trabalho.

A todos que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente, para o desenvolvimento deste trabalho.

“...Todo aquele que quiser tornar-se grande entre vós, se faça vosso servo.” (Mateus, 20, 26).

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 DESENVOLVIMENTO	13
2.1 Revisão bibliográfica	13
2.1.1 Cogumelos comestíveis	13
2.1.2 <i>L. edodes</i>	21
2.1.3 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv <i>passiflorae</i>	28
2.1.4 Vírus do mosaico do fumo (TMV)	31
2.1.5 <i>Guignardia citricarpa</i>	34
2.1.6 <i>Colletotrichum sublineolum</i>	40
2.2 Material e métodos	46
2.2.1 Meios e condições de cultivo em pequena escala.....	47
2.2.2 Extração do filtrado e micélio	47
2.2.3 Bioensaios realizados para seleção das melhores condições de cultivo <i>in vitro</i> para produção de substâncias com potencial antimicrobiano	49
2.2.3.1 Atividade antibacteriana sobre <i>X. axonopodis</i> pv <i>passiflorae</i>	50
2.2.3.2 Influência no crescimento micelial <i>in vitro</i> do fungo <i>G. citricarpa</i>	50
2.2.4 Cultivo dos fungos em grande escala	51
2.2.5 Procedimentos para extração	51
2.2.6 Bioensaios dos extratos obtidos pela metodologia descrita no item 2.2.5.	55
2.2.6.1 Influência no crescimento micelial <i>in vitro</i> do fungo <i>C. sublineolum</i>	55
2.2.6.2 Bioensaio para atividade inibitória de infecção de vírus de planta	55
2.2.7 Purificação e caracterização dos extratos e frações com potencial antiviral	56
2.2.8. Ressonância Magnética Nuclear (RMNH ¹)	58
2.2.9 Cromatografia em Camada Delgada Analítica	59
2.2.10 Espectrometria de Massas	59
2.2.11 Análises Bioquímicas	60
2.2.11.1 Obtenção dos extratos protéicos para determinação de atividade enzimática	60
2.2.11.2 Atividade da peroxidase	60
2.2.11.3 Atividade da quitinase	60
2.2.11.4 Atividade da β -1,3-glucanase	61
2.2.11.5 Atividade da polifenoloxidase	61
2.2.11.6 Atividade de fenilalanina amônia-liase	62
2.2.11.7 Dosagem de proteínas totais	62
2.2.12 Análise estatística	62
2.2.13 Gerenciamento dos resíduos químicos produzidos	63
2.3 Resultados e discussões	63
2.3.1 Produção de biomassa de <i>Lentinula edodes</i> em diferentes condições de cultivo em pequena escala	63
2.3.2 Inibição da <i>X. axonopodis</i> pv <i>passiflorae</i> e <i>G. citricarpa</i> para seleção de melhores condições de cultivo de <i>L. edodes</i>	66

2.3.3 Inibição do crescimento micelial de <i>G. citricarpa</i> com extratos obtidos por nova metodologia	73
2.3.4 Inibição do crescimento micelial de <i>C. sublineolum</i>	76
2.3.5 Redução da infectividade do TMV	83
2.3.6 Atividade das enzimas relacionadas a patogênese.....	98
3 CONCLUSÕES	106
REFERÊNCIAS	107

RESUMO

Atividade antimicrobiana de extratos e frações do cultivo *in vitro* de *Lentinula edodes* contra *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae*, *Guignardia citricarpa*, *Colletotrichum sublineolum* e Tobacco mosaic virus

Os cogumelos comestíveis contêm substâncias funcionais de interesse, tais como proteínas e glucanas, as quais apresentam potencial antimicrobiano contra bactérias, fungos e até mesmo propriedades antivirais. O objetivo deste trabalho foi identificar extratos do cultivo *in vitro* do micélio de *Lentinula edodes* com propriedades contra fitopatógenos. Duas linhagens de *L. edodes* foram cultivadas em pequena escala em três diferentes meios de cultivo e após 0, 20, 40 e 60 dias, o micélio e o filtrado foram extraídos com solventes de diferentes polaridades. Os extratos foram testados contra *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae* e *Guignardia citricarpa*, para verificar as melhores condições de cultivo para a produção de compostos bioativos. Com isso, foram selecionados os meios GPL (glicose, peptona e extrato de levedura) e SML (sacarose, extrato de malte e extrato de levedura) para o cultivo em grande escala de *L. edodes*. Após 60 dias, o micélio foi extraído com etanol, etanol 70% e água. O filtrado foi extraído com acetato de etila através de partição líquido-líquido. Os extratos foram testados contra *G. citricarpa*, *Colletotrichum sublineolum* e o Vírus do mosaico do fumo (TMV). Os extratos etanol e etanol 70% do meio SML foram ativos *in vitro* contra os fungos, constatando-se através de RMNH¹, a presença, nestes extratos, de possíveis açúcares ausentes no meio de cultivo. As suspensões de TMV foram inoculadas mecanicamente em *Nicotiana tabacum* var. TNN (hospedeira de lesão local) cultivadas em casa de vegetação, através do método da meia-folha. Somente o extrato aquoso do micélio da linhagem LE 96/17 inibiu a expressão de sintomas de lesão local pelo TMV e a taxa de inibição foi de 82% na concentração de 0,5 mg/mL. Este extrato ativo foi purificado por coluna de Sephadex, rendendo 16 frações, sendo que as frações ativas 6/7 e 8/9 reduziram a infectividade do TMV em 95,5 % e 79%, respectivamente. Os espectros de RMNH¹ sugeriram que estas frações são constituídas possivelmente por peptídeos e composto aromático. Os resultados de espectrometria de massas revelaram a provável presença de compostos já descritos na literatura e que apresentam conhecida atividade antimicrobiana. Experimentos comprovaram que o extrato bruto ativo não apresentou efeito viricida e, este mesmo extrato e a subfração resultante, não induziram resistência nas plantas de fumo.

Palavras-chave: *Lentinula edodes*; Potencial antimicrobiano; Fitopatógenos; Shiitake

ABSTRACT

Antimicrobial activity of extracts and fractions from culture *in vitro* of *Lentinula edodes* against *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae*, *Guignardia citricarpa*, *Colletotrichum sublineolum* and Tobacco mosaic virus

Edible mushrooms contain functional compounds, such as proteins and glucans, which exhibit antimicrobial potential against bacteria, fungi and antiviral activity. The aim of this work was to identify extracts from submerged mycelium of *Lentinula edodes* with antimicrobial properties against phytopathogens. Two strains of *L. edodes* were grown in small scale in three different culture media and after 0, 20, 40 and 60 days, the mycelium and the filtrate were extracted with solvents of different polarities. Extracts were bioassayed against *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae* and *Guignardia citricarpa* to verify the best condition for growth to produce bioactive compounds. After this, *L. edodes* was grown in large scale in the selected media, GPL (glucose, peptone and yeast extract) and SML (sucrose, malt extract and yeast extract). After 60 days, the mycelium was extracted with ethanol, ethanol 70% and water. The filtrate was extracted through liquid-liquid partition with ethyl acetate. The extracts were bioassayed against *G. citricarpa*, *Colletotrichum sublineolum* and Tobacco Mosaic Virus (TMV). The ethanol and ethanol 70% extracts from medium SML were active *in vitro* against the fungi and it was verified through ^1H NMR, the possible presence of sugars in these extracts, which were absent in the culture medium. The TMV suspensions were mechanically inoculated in *Nicotiana tabacum* TNN (local lesion host) grown in greenhouse, through the half-leaf method. Only the mycelium aqueous extract of strain LE 96/17 inhibited the expression of symptoms of local lesions by TMV and the inhibition ratio was around 82% at 0.5 mg/mL. This active extract was purified by Sephadex column, yielding 16 fractions. Active fractions 6/7 and 8/9 reduced infectivity by 95.5 and 79%, respectively. The ^1H NMR spectra suggested that fractions 6/7 and 8/9 possibly have peptides and aromatic compound. The results of mass spectrometry revealed the possible presence of compounds already described in the literature and exhibiting antimicrobial activity. The experiments showed that the active crude extract did not exhibit viricidal effect and that such extract and its resulting subfraction inhibited the infectivity of TMV and did not induce resistance in tobacco plants.

Keywords: *Lentinula edodes*; Antimicrobial activity; Phytopathogens; Shiitake

1 INTRODUÇÃO

Desde os anos 60 até os dias de hoje, o controle químico na agricultura tem se restringido basicamente ao uso de fungicidas e de alguns antibióticos (estreptomicina e tetraciclina, principalmente). No entanto, existem restrições quanto ao uso destes produtos, pois os mesmos não são 100% eficazes e, além de ter um alto custo, suas aplicações exigem certos cuidados.

Na tentativa de minimizar os riscos ambientais e potencializar o controle de pragas e doenças, tem sido desenvolvido o manejo integrado, combinando técnicas de controle biológico, manipulação do habitat, modificação de práticas culturais e o uso de variedades de plantas resistentes.

Uma associação promissora ao manejo seria o controle químico, utilizando moléculas com maior eficácia antimicrobiana e mínimo impacto ambiental. A busca por tais moléculas tem intensificado a procura por metabólitos secundários produzidos por bactérias e fungos.

Os “cogumelos comestíveis”, entre eles, o Shiitake (*Lentinula edodes*) tornaram-se muito explorados principalmente devido às suas conhecidas propriedades medicinais, tais como antitumorais, aumento do sistema imunológico e outras ainda em pesquisa. Recentemente, têm sido verificado também a sua propriedade antimicrobiana e o seu potencial para o uso em biorremediação, ampliando assim o seu espectro de ação.

Estudos realizados com extratos aquosos do basidiocarpo de *L. edodes* indicaram atividade antimicrobiana contra fitopatógenos, possibilitando o controle de algumas doenças como a antracnose em pepineiro, mancha oleosa do maracujazeiro, a murcha bacteriana do tomateiro, a murcha de feijão-lima, além de doenças fúngicas em sorgo e infecção viral do fumo.

A presença de compostos com atividade antimicrobiana frente à fitopatógenos de relevância econômica no contexto agrícola brasileiro, tem despertado o interesse de pesquisas envolvendo este basidiomiceto, podendo tornar-se uma fonte alternativa para o controle de doenças de plantas.

Neste trabalho, foi possível comparar o crescimento *in vitro* do fungo *L. edodes* em três diferentes meios e tempos de cultivo, sendo realizado um estudo sobre a melhor condição para o cultivo deste fungo, visando à produção de substâncias bioativas, utilizando, além dos extratos aquosos já estudados, extratos de média e baixa polaridade, tanto do micélio como do filtrado do cultivo destes fungos, possibilitando a obtenção de novas moléculas com potencial

antimicrobiano contra os fitopatógenos *Guignardia citricarpa*, *Colletotrichum sublineolum*, *Xanthomonas axonopodis* pv *passiforae* e *Tobacco mosaic virus*.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 Cogumelos comestíveis

Plantas, organismos marinhos e microrganismos são responsáveis pelo maior arsenal de diversidade estrutural em substâncias químicas, possuindo um grande potencial biológico. Assim, os produtos naturais continuam sendo procurados pelas indústrias farmacêuticas e agroquímicas, como fontes de novas substâncias ativas (HARVEY, 2000).

Neste contexto, os cogumelos comestíveis são conhecidos há milhares de anos por suas propriedades nutricionais e medicinais (MOORE, 2001), exercendo também um fascínio devido a sua morfologia típica, ou seja, por possuírem corpo de frutificação característico, o que deu origem a diferentes mitos ao longo dos anos (WANG; NG, 2002). Existem relatos de que os povos egípcios acreditavam que estes fungos se tratavam de um presente do deus Osíris, enquanto que os romanos acreditavam ser um alimento divino, entretanto, proveniente de Júpiter (MANZI et al., 1999).

Na realidade, estes basidiomicetos xilotróficos formam um grupo de fungos superiores que possuem capacidade de degradação de substratos lignocelulósicos, e o interesse por estes basidiomicetos iniciou-se, de modo geral, devido ao seu potencial como degradadores de resíduos agrícolas e produtores de várias enzimas celulolíticas, lignolíticas, proteolíticas, etc (CROAN, 2004).

O uso de métodos de pesquisa contemporâneos tem ampliado as diversas possibilidades de aplicação destes fungos, possibilitando o estudo da atividade biológica de muitos metabólitos destes basidiomicetos e a caracterização de suas estruturas, tornando estas substâncias úteis para o desenvolvimento de suplementos dietéticos e farmacêuticos (CHANG, 1996).

Em 1983, Nizkovskaya publicou uma revisão sobre o desenvolvimento de remédios altamente eficientes e com baixa toxicidade baseados em polissacarídeos de basidiomicetos. Um destes exemplos é o do remédio Befungin®, usado com sucesso para tratamento de úlceras gastroduodenais e gastrite, o qual foi desenvolvido nos anos 60, baseado no fungo *Inonotus obliquus* (Chagi) (LOBANOK et al., 2003).

O número de espécies de cogumelos na Terra está estimado em 140.000 e especialistas sugerem que somente 10% são conhecidas, sendo que destas, cerca de 700 espécies são cogumelos comestíveis sem valor medicinal e mais de 200 com valor medicinal comprovado. Por outro lado, alguns cogumelos medicinais como *Ganoderma* e *Coriolus*, não são comestíveis (CHANG, 1996). Dessa forma, se assumirmos que 5% das espécies ainda desconhecidas podem apresentar cogumelos com atividade biológica, então isto implica que 7.000 espécies ainda não descobertas podem trazer benefícios à humanidade (HAWKSWORTH, 2001).

Estes números revelam que esta linha de pesquisa é promissora e indicam também a sua relevância. Atualmente, dentre os cogumelos com potencial biológico, os mais estudados são *Agaricus bisporus* (champignon), *Armillariella mellea*, *Flammulina velutipes* (enokitake), *Grifola frondosa* (maitake), *Pleurotus ostreatus* (hiratake), *Lyophyllum cinerascens*, *Tricholoma saponaceum*, *Coprinus sp.*, *Irpex lacteus* e *Lentinula edodes* (shiitake) (WANG; NG, 2001).

Entre as espécies de cogumelos comestíveis, apenas 20 são comercialmente produzidas em grande escala, destacando-se entre elas o *A. bisporus*, *Volvariella volvacea* (cogumelo de palha), *P. ostreatus*, *Auricularia auricula* e *L. edodes* (CHANG, 1996).

De qualquer forma, o uso medicinal dos cogumelos tem uma longa tradição nos países Asiáticos, enquanto que o seu uso no hemisfério ocidental tem aumentado somente nas últimas décadas (HAWKSWORTH, 2001). Uma prova disto é o fungo *Ganoderma lucidum*, conhecido como “Lingzhi” na China, “Reishi” no Japão, “Youngzhi” na Coreia e “cogumelo Rei” no Brasil, o qual tem sido tradicionalmente usado na medicina popular oriental. O “Lingzhi” foi citado em *Shen Nong's Herbal Classic* (considerado o livro mais antigo da medicina natural oriental e a base da medicina tradicional chinesa) por seu efeito no aumento da “força vital” e promotor de “longevidade”. Durante as últimas duas décadas, pesquisas modernas têm revelado que o “Lingzhi” contém uma variedade de compostos químicos, como: triterpenos, polissacarídeos, nucleotídeos, esteróis, ácidos graxos, alcalóides, proteínas, peptídeos, aminoácidos e elementos inorgânicos. Dentre estes compostos, triterpenos e polissacarídeos têm recebido grande atenção por possuírem diversas e significantes atividades farmacológicas (JONG; BIRMINGHAM, 1993).

Recentemente, outros cogumelos produzidos na Ásia, têm demonstrado atividade biológica, entre eles, o cogumelo *Auricularia*, conhecido como orelha-de-pau, pode ser responsável pela baixa incidência de arteriosclerose entre os Asiáticos (MOORE, 2001). No entanto, mesmo com

todos estes efeitos terapêuticos relatados sobre os cogumelos de origem asiática, a espécie mais produzida em nível mundial é o *Agaricus bisporus*, um cogumelo comestível de origem Européia. Na década de 70, a sua produção estava em torno de 70% da produção mundial de cogumelos. Nos dias atuais, a produção está em torno de 30%, porém, o seu consumo aumentou mais que o dobro. Isto se deve porque o mercado tem aberto espaço para o consumo de novas espécies de cogumelos comestíveis, como o *L. edodes* e o *Pleurotus* (MOORE, 2001).

A explicação para o aumento da procura por novas espécies de cogumelos justifica-se em parte pela conscientização da população e valorização do consumo de alimentos funcionais, buscando uma melhor qualidade de vida. Neste sentido, está comprovado que os cogumelos são alimentos saudáveis, com baixa caloria, porém, ricos em proteínas vegetais, quitinas, vitaminas e minerais (MANZI et al., 1999). A grande quantidade de proteínas beneficia a nutrição humana, visto que contém aminoácidos essenciais, enquanto que a parede celular composta por quitina, confere uma dieta rica em fibras, além do que é um alimento livre de colesterol (MOORE, 2001).

Devido aos altos níveis de proteínas em cogumelos, seu cultivo tem sido indicado como fonte alternativa de proteína em países em desenvolvimento com altos níveis de deficiência nutricional (CHANG; HAYES, 1980; CHANG, 1996). Atualmente, os cogumelos têm sido incorporados em tônicos, chás, sopas e alimentos funcionais, bem como em fórmulas naturais (TERASHITA et al., 1990).

Em estudo avaliando os nutrientes de espécies de *Pleurotus* e *L. edodes*, foi constatado que potássio é o mineral presente em maior abundância seguido por magnésio, ao passo que sódio foi o de menor concentração, sugerindo que estes cogumelos podem ser utilizados em dietas anti-hipertensivas. Os aminoácidos mais abundantes encontrados foram ácido glutâmico, aspártico e arginina, sendo este último encontrado em menores proporções no *L. edodes* (5,7%). Contudo, o substrato de cultivo influencia na qualidade nutricional do cogumelo, assim como outros fatores como estágio de desenvolvimento, e condições pré e pós-colheita (MANZI et al., 1999).

Além do valor nutricional, a produção de compostos biologicamente ativos também pode variar conforme as condições de cultivo destes fungos. Assim, a produção de algumas proteínas antifúngicas, proteases e proteínas inativadoras de ribossomo, podem ser comprometidas dependendo da metodologia de cultivo (NG, 2004). Além destas proteínas mencionadas, polissacarídeos também já foram isolados dos cogumelos (MANZI; PIZZOFERRATO, 2000). A produção de polissacarídeos dos basidiomicetos tem sido amplamente estudada devido à atividade

antitumoral, antiviral, anticoagulante, entre outras (SMITH et al., 2002). Estas estruturas podem ser isoladas do corpo de frutificação, do esclerócio, do micélio ou de exopolissacarídeos provenientes das culturas em laboratório destes organismos.

No caso da atividade antitumoral, esta é atribuída a uma grande classe, as glucanas, que são os homopolissacarídeos mais freqüentemente encontrados em basidiomicetos, podendo ser lineares ou ramificadas. A maioria destes organismos, estudados quanto à estrutura de polissacarídeos, apresentam uma cadeia principal constituída por unidades de glicose, em configuração β -(1 $\rightarrow$ 3) ligadas, com substituição em O-6 por uma única unidade de glicose a cada três unidades da cadeia principal (Figura 1), como por exemplo, em *Grifola umbellata* (MIYAZAKI et al., 1979). Glucanas contendo o mesmo tipo de cadeia principal, porém podendo ter outros tipos de ligação, também foram relatadas (KATO et al., 1978), assim como também foram descritas α -glucanas para alguns cogumelos (MIZUNO, 1995a; 1995b; CHAKRABORTY et al., 2004).

Sabemos também que cogumelos necessitam de compostos antibacterianos e antifúngicos para sobreviver no seu ambiente natural. Portanto, não é de se surpreender que compostos antimicrobianos, com diferentes potenciais, possam ser isolados de muitos cogumelos e que possam ser benéficos aos humanos (LINDEQUIST et al., 2005). Assim, em estudo conduzido por Ishikawa et al. (2000), foram isolados sesquiterpenos (Figura 2) do cultivo *in vitro* de *Flamulina velutipes*, os quais apresentaram atividade antimicrobiana contra *B. subtilis* e *Cladosporium herbarum*, enquanto que em pesquisa conduzida com espécies de cogumelos coletados na Turquia, o pó do basidiocarpo de *Clitocybe alexandri*, extraído em diferentes solventes, apresentou tanto atividade antifúngica para *Cândida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, como atividade antibacteriana para as bactérias patogênicas *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli* e *Micrococcus luteus* (SOLAK et al., 2006).

Entretanto, o potencial antimicrobiano dos cogumelos tem revelado também um promissor efeito antiviral, não só pelos seus extratos brutos, mas também para os compostos isolados (BRANDT; PIRAINO, 2000). Em pesquisa realizada com o cogumelo *G. lucidum*, treze triterpenos foram isolados (Figura 3) e nove deles demonstraram potencial antiviral, em especial ganoderiol F (6a), ganodermanontriol (7a) e ácido ganodérico B (8a), os quais inibiram o vírus da imunodeficiência tipo 1 (HIV-1) (MEKKAWY et al., 1998). Outros compostos isolados de *G. pfeifferi*, denominados ganodermadiol (1), lucidadiol (2) e ácido aplanoxidico G (3), também apresentaram atividade antiviral, entretanto, contra o vírus influenza tipo A (Figura 4), sendo que

o ganodermediol foi ativo também contra o vírus herpes simplex tipo 1 (MOTHANA et al., 2003).

Em outra pesquisa, o extrato etanólico do fungo *Inonotus hispidus* mostrou atividade antiviral contra vírus influenza tipos A e B, provavelmente devido à presença dos compostos fenólicos hispolon e hispidina (Figura 5) (ALI et al., 2003). Já a atividade antiviral de *Collybia maculata* (Alb.; Schwein.: Fr.) P. Kumm contra o vírus da estomatite vesicular foi atribuída à presença de derivados de purina (LEONHARDT et al., 1987).

Alguns polissacarídeos ligados à proteína (PSK and PSP) de *Trametes versicolor* Pila't (syn. *Coriolus versicolor* Quelet) também apresentaram atividade antiviral *in vitro* contra HIV e citomegalovírus (TOCHIKURA et al., 1987). Em outra pesquisa, a atividade antiviral foi devido à inibição da transcriptase reversa de HIV e foi causada por velutina, uma proteína inativadora de ribossomo também produzida pelo fungo *F. velutipes* (WANG; NG, 2001).

Em pesquisa envolvendo outra espécie de cogumelo, *Grifola frondosa*, Nanba et al. (2000) também relataram atividade antiviral, e neste caso, a responsável foi uma fração, denominada fração D, a qual foi ativa *in vivo*. Neste estudo, a substância ativa foi testada em 35 pacientes portadores do HIV, sendo que 85% dos voluntários relataram um aumento da sensação de bem-estar em relação a vários sintomas e doenças oportunistas causadas pelo vírus e 20 pacientes mostraram um aumento nas células CD4p de 1,4 a 1,8 vezes, enquanto que oito pacientes mostraram uma diminuição de 0,8 a 0,5 vezes.

Em outro caso, uma fração do extrato do corpo de frutificação de *G. frondosa* teve efeito sinérgico em combinação com α -interferon na inibição do vírus da hepatite B (GU et al., 2006).

Todos estes estudos reiteram a importância da pesquisa por novas substâncias provenientes destes cogumelos. Entretanto, além da atividade antimicrobiana, o potencial dos cogumelos têm se estendido a outras atividades, as quais têm beneficiado outras áreas.

Nos últimos anos, o enfoque mundial tem sido a preocupação com as questões ambientais, direcionando novas pesquisas na recuperação ou mesmo diminuição do impacto ambiental. A contribuição dos cogumelos nesta área é a possibilidade do seu uso em bioremediação (MOORE, 2001). Resíduos agrícolas podem servir de substrato para muitos destes fungos, e após o cultivo e a coleta, este material ainda pode ser reaproveitado em ração animal e compostagem de solo, pois o resíduo permanece ainda com alto nível nutricional.

Uma outra utilidade é de absorção de poluentes, já que estes cogumelos têm alto potencial de adsorção de compostos (NAVICHIENE et al., 2007; BOER et al., 2004). Esta propriedade deve ser tratada com cautela, visto que estes cogumelos podem acumular produtos tóxicos como, por exemplo, metais pesados (CHIU et al., 1998). Em pesquisa realizada com o cogumelo comestível *Pleurotus pulmonarius*, foi verificado que a presença de cádmio e manganês em substrato para o cultivo do fungo, provocou a redução do rendimento e do valor nutricional, além de torná-lo inviável para o consumo.

Figura 1 - Estrutura da glucana obtida para a maioria dos basidiomicetos estudados

Figura 2 - Sesquiterpenos antimicrobianos isolados de *Flamulina velutipes* (ISHIKAWA et al., 2000)

Figura 3 - Triterpenos antivirais isolados de *G. lucidum* (MEKKAWY et al., 1998). Ácido ganodérico (1); ácido ganodérico A (2); ácido ganodérico B (3); ácido ganodérico C1 (4); ácido ganodérico H (5); ganoderiol A (6); ganoderiol B (7); ganoderiol F (8); ganodermanontriol (9); ergosterol (10); péroxido de ergosterol (11); cerevisterol (12); 3b-5a-dihidroxi-6b-metoxi-ergosta-7,22-dieno (13).

Figura 4 - Fórmula estrutural de triterpenos com atividade antiviral isolados de *Ganoderma lucidum* (MOTHANA et al., 2003). Ganodermediol (1); Lucidadiol (2); Ácido aplanoxídico G (3)

Figura 5 - Estrutura química do composto antiviral hispolon (a) e hispidina (b) isolados de *Inonotus hispidus*

2.1.2 *Lentinula edodes*

O cogumelo *L. edodes*, assim como outros cogumelos, é conhecido há mais de mil anos, sendo dotado de um alto valor nutricional, cuja importância terapêutica remonta desde os tempos da Dinastia Ming (1368-1644). Este fungo foi cultivado primeiramente na China e posteriormente no Japão, Tailândia, Coréia e Malásia, sendo denominado na China “Hoang-mo” e no Japão “Shiitake” (SASAKI, 2001).

Existem referências sobre o Shiitake desde 1877, sendo o mesmo descrito por vários nomes científicos, mas o mais aceito na atualidade é *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (QUIMIO et al., 1990 apud MAKI, 1999). O termo “Berk” vem de Berkeley, que foi o primeiro a descrever a espécie, porém no gênero *Lentinus*. Pegler foi quem inseriu esta espécie no gênero *Lentinula* (MAKI, 1999). Molina et al. (1992) confirmaram, através de estudos de polimorfismo de fragmentos de restrição de DNA ribossomal (rDNA) seguido de PCR, que o cogumelo Shiitake não pertencia ao gênero *Lentinus*, e sim ao *Lentinula*. Até então, era muito confusa a denominação de Shiitake, e os dois nomes científicos (*Lentinus* e *Lentinula edodes*) eram considerados corretos. Por este estudo, os autores concluíram que o gênero *Lentinula* pertence à família *Tricholomataceae* (Ordem *Agaricales*).

A população japonesa considera-o “o elixir da vida”, em função das suas propriedades terapêuticas e medicinais (JONG; BIRMINGHAM, 1993). Mas, de modo geral, ele é muito consumido em todo o mundo, seja por estas propriedades ou simplesmente por seu paladar, contribuindo assim, para o aumento de seu consumo e produção em mais de sete vezes nos últimos 14 anos (ROYSE; SANCHES-VASQUES, 2003).

Com o melhoramento das técnicas de cultivo, a produção de Shiitake tende a ser realizada sob condições muito diferentes de seu habitat natural. Tradicionalmente, este fungo de podridão branca é produzido na Ásia por inoculação de toras de madeira em um clima favorável para cultivo em campo. Na Europa, o cultivo comercial do Shiitake começou nos anos 60, seguindo o mesmo tradicional método de cultivo em campo em toras de carvalho. Entretanto, como neste método o tempo para o cultivo é muito elevado, houve um interesse em desenvolver métodos alternativos para a produção do cogumelo. Assim, os países europeus e americanos desenvolveram um sistema de cultivo fechado utilizando tronco sintético ou sacos plásticos contendo serragem suplementada com outras fontes de carbono e nitrogênio. Hoje, este sistema

está bem difundido em todo o mundo, fato que pode ser atribuído à vantagem de que o tempo requerido para frutificação é inferior quando comparado com o de troncos de carvalho. Uma desvantagem deste sistema é a obrigatoriedade de se fazer uma esterilização dos substratos, o que requer um alto investimento inicial e um alto consumo de energia para o processo (CHANG; MILES, 1989; DIEHLE; ROYSE 1986). Em alguns casos, tem-se optado pela utilização da pasteurização, devido a sua praticidade (DELPECH; OLIVIER 1991; LEVANON et al. 1993).

Atualmente, Shiitake é o segundo cogumelo mais produzido no mundo, estando atrás somente do Champignon, *Agaricus bisporus* (CHANG, 1996), sendo cultivado principalmente por este método, independente do clima, em diferentes regiões geográficas.

Isto se deve porque o conhecimento milenar dos orientais vem sendo comprovado através de mais de dez anos de pesquisas que demonstram a capacidade deste fungo em produzir substâncias biologicamente ativas com efeitos benéficos ao organismo humano, tais como antioxidantes, antibacterianos, antifúngicos, antimutagênicos, antitumorais, antivirais (HIRASAWA et al., 1999; MORITA; KOBAYASHI, 1967; YASUMOTO et al., 1971), antihelmínticos (BADALYAN, 2004), hepatoprotetores, hipotensores e hipoglicemiantes, bem como na prevenção de doenças coronarianas (WASSER; WEIS, 2003) e no aumento da atividade do sistema imunológico (JONG; BIRMINGHAM, 1993).

Em composição, o Shiitake cru contém cerca de 90% de água e dentre os outros componentes, predominam importantes compostos bioativos como o ergosterol ou pró-vitamina D, seguido por carboidratos, proteínas (26% do peso seco), lipídeos (em especial, ácido linoleico), fibras, minerais, vitaminas B1, B2 e C (MIZUNO, 1995a), sendo amplamente utilizado na produção de suplementos dietéticos (TERASHITA et al., 1990).

Em estudo conduzido por Lobanok et al. (2003), o cultivo submerso de uma linhagem de *L. edodes* apresentou 89% de albuminas e glutelinas, indicando o alto valor nutritivo deste cogumelo quando cultivado nestas condições. Além disso, o micélio submerso continha 8,0 – 9,0% de lipídeos, principalmente ácidos graxos insaturados. Os ácidos graxos saturados totais constituíram 21,2 – 26,6% de lipídeos, enquanto que os insaturados, 73,4 – 78,8%. O alto conteúdo de ácido linoleico na linhagem em estudo (54,8 – 59,8% de lipídeos totais) é uma característica comum de todas as linhagens de *L. edodes*. A linhagem em estudo produziu também até 1,8% de compostos fenólicos, incluindo ácido benzóico e seus derivados e flavonas.

Dentre os carboidratos encontrados nos cogumelos comestíveis e, entre eles o *L. edodes*, estão os polissacarídeos, como as glucanas, mono e dissacarídeos, glicogênio e quitina (KURZMAN JR, 1997). De todos estes, as glucanas têm sido identificadas como o maior componente estrutural entre muitos polissacarídeos com atividade antitumoral, além disso, desempenham importantes papéis na comunicação celular, interação protéica e imunidade. Assim, características estruturais e propriedades físicas, tais como a composição dos monossacarídeos, peso molecular, tipos de ligação do esqueleto e grau de ramificação lateral ligada à cadeia $\beta 1 \rightarrow 6$, conformação helicoidal e solubilidade, são características potencialmente importantes para a determinação das funções biológicas (LO et al., 2007).

Um exemplo de substância ativa biologicamente é a lentinana (Figura 1), uma β -glucana que foi o primeiro composto antitumoral isolado da parede celular do corpo de frutificação do Shiitake (CHIRAHA et al., 1970). Embora seu mecanismo de ação não esteja completamente claro, lentinana inibe tumorigênese principalmente por ativar o sistema imune e induzir a expressão genética de citocinas imunomodulatórias e seus receptores (OOI; LIU, 2000). Efeitos protetores da lentinana no dano ao DNA induzido por agentes antineoplásicos *in vivo* também já foram relatados (MIYAGI et al., 2006). A lentinana pode ser purificada do Shiitake fresco, mas seu conteúdo diminui durante armazenamento após colheita (MINATO et al., 1999). Minato et al. (1999) demonstraram que a lentinana é degradada durante o processo de armazenamento pela $\text{exo-}\beta\text{-1,3-glucanase}$, uma das enzimas líticas da parede celular.

As atividades antitumorais de outros dois compostos, LEM (uma proteína) e KS-2 (uma glicoproteína), ambos extraídos do cultivo do micélio de *L. edodes*, foram também comprovadas utilizando-se ensaios *in vivo* em roedores (FUJII et al., 1978; WASSER; WEISS, 2003). O maior constituinte ativo do extrato micelial KS-2 é uma proteína heteroglicana conjugada contendo 24,6% de proteínas e 44% de monossacarídeos, além de derivados de ácidos nucleicos e vitaminas (LO et al., 2007). A proteína LEM, abreviação para “*Lentinula edodes mycelia*”, além da atividade antitumoral, inibiu a replicação e o efeito citopático do vírus da imunodeficiência humana (TOCHIKURA et al., 1988).

A maioria das substâncias biologicamente ativas de origem fúngica são produtos de simples processamento dos corpos de frutificação ou do micélio cultivado em meio nutritivo, entretanto, a composição química dos cogumelos é dependente das variações geográficas, sazonais e intraespecíficas (STERNER et al., 1982). Sterner et al. (1982) já afirmavam que durante o

processamento dos cogumelos para fins alimentícios, o aquecimento e a conservação dos fungos podem ter uma grande influência na atividade biológica. De fato, Morales et al. (1990) detectaram atividade mutagênica levemente maior em cogumelos congelados do que nos cogumelos frescos, sugerindo que compostos termolábeis ou voláteis poderiam estar envolvidos na mutagenicidade das espécies estudadas. Chang (1996) considera que os cogumelos, em geral, possuem vários compostos com diversas atividades biológicas, as quais podem variar de acordo com o modo de preparo e de consumo.

Alguns estudos recentes têm sido dedicados à eficiência da obtenção de substâncias biologicamente ativas (primeiramente polissacarídeos e glicoproteínas) do micélio submerso de *L. edodes* (SONG et al., 1987). Além disso, existe evidência que substâncias ausentes do corpo de frutificação podem estar presentes no micélio (LOBANOK et al., 2003). Neste contexto, o interesse pelo cultivo *in vitro* do Shiitake tem estimulado a procura de condições ótimas de crescimento em relação aos meios e tempos de cultivo (HATVANI, 2001), uma vez que o conhecimento do requerimento nutricional do fungo é um pré-requisito para seu cultivo em meio líquido (SONG et al., 1987).

Em estudo conduzido por Lobanok et al. (2003), as análises de aminoácidos das proteínas encontradas no micélio de *L. edodes* cultivado *in vitro* em fermentadores utilizando o mosto de cerveja, demonstraram a predominância de arginina, treonina, serina, prolina, glicina, alanina e valina; lisina e metionina foram aminoácidos limitantes. A comparação deste resultado com a composição de aminoácidos relatados dos corpos de frutificação de shiitake (em que os aminoácidos limitantes foram leucina, lisina, serina, valina e metionina) (CHANG; HAYES, 1980), indica que o conteúdo proteico do micélio cultivado *in vitro* é mais completo em aminoácidos.

Diante da possibilidade de obtenção de substâncias com diversas atividades biológicas, têm sido propostas diferentes metodologias e formas de cultivo, todas no intuito de otimizar o isolamento de novas moléculas bioativas deste fungo (CHEUNG et al., 2003; HIRASAWA et al., 1999; ISHIKAWA, 1998; HATVANI, 2001).

Assim sendo, várias substâncias ativas já foram isoladas de *L. edodes* após a lentinana, como o agente redutor do colesterol, que é um alcalóide purínico (Figura 6) designado como eritadenina (lentinacina), ácido 2(R),3(R)-dihidroxi-4-(9-adenil)-butírico (SUZUKI; OSHIMA,

1974), que possui o efeito de reduzir o colesterol sanguíneo, conforme os resultados obtidos em estudos conduzidos com animais e humanos (ENMAN et al., 2007).

Lecitinas são proteínas ligadas a carboidratos ou glicoproteínas de origem não imune que são capazes de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados. As lecitinas encontradas em cogumelos têm apresentado atividade promissora como imunomodulatória e antiproliferativa contra células tumorais. Em *L. edodes*, os estudos conduzidos até o momento revelam que a lecitina isolada do corpo de frutificação possui peso molecular de 43 KDa. Outra característica exclusiva observada, é que ela tem uma interação fraca com carboidratos (WANG et al., 2003). Outros estudos tem buscado a otimização da obtenção e da atividade destas lecitinas (TSIVILEVA et al., 2005; NIKITINA et al., 2007).

Uma lentinana sulfatada de *L. edodes* também foi capaz de prevenir completamente o efeito citopático induzido por HIV (YOSHIDA et al., 1988).

Entre outros compostos isolados de Shiitake, estão os compostos sulfúricos cíclicos, incluindo a lentionina (1,2,3,5,6-pentatietano), o 1,2,4-tritriolano e o 1,2,4,5 tetratiano (Figura 7). A lentionina é responsável pelo aroma característico deste fungo e também pela atividade antibiótica contra inúmeros microrganismos, incluindo muitas bactérias e fungos, entretanto ela é instável quando aquecida a 100° C em 10% de solução alcoólica por 1 hora, em pH maior do que 5,0 (SHIGA et al., 2004).

Em outra pesquisa conduzida por Bender et al. (2003), ficou comprovado que o extrato do cultivo micelial de *L. edodes* em meio de extrato de malte foi ativo contra *Staphylococcus aureus*. A atividade antimicrobiana foi relacionada à presença de ácido oxálico, após a purificação do extrato do cultivo.

Outros compostos antimicrobianos isolados de cultivo líquido de *L. edodes* incluem lentinamicina (octa-2,3-dieno- 5,7 dine-1-ol), um álcool fenil-etílico (Figura 8) (KOMEMUSHI et al., 1996) e lentina, uma proteína antifúngica com massa molecular de 27,5 kDa (NGAI; NG, 2003) .

No entanto, além das propriedades medicinais, pesquisas na área agrícola também se beneficiam dos compostos produzidos por este fungo. Pacumbaba et al. (1999), utilizando o lixiviado micelial de *L. edodes*, observaram a inibição significativa do crescimento de todas as espécies de bactérias fitopatogênicas testadas, entre elas *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, *P.*

syringae pv *tabaci*, *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*, *Erwinia amylovora*, *X. campestris* pv. *campestris*, *Ralstonia solanacearum* e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

Quatro linhagens de *Lentinula edodes* (LE10, 46, K2, Assai) foram testadas por seus efeitos antagonistas em quatro fungos filamentosos de importância agrícola (*Helminthosporium euphorbiae*, *Helminthosporium* sp, *Fusarium solani* e *Phomopsis sojae*) e em vírus da estomatite vesicular sorotipo Alagoas (VSA). As linhagens de *L. edodes* estudadas tiveram efeitos variáveis nos fungos filamentosos e no VSA. As linhagens K2 and Le10 foram antagonistas para os fungos avaliados e 46 e K2 foram eficientes contra o VSA. Os resultados ampliaram a lista de efeitos benéficos de *L. edodes* no controle e prevenção de vírus patogênico animal e fungos filamentosos (SASAKI et al., 2001).

Extratos do corpo de frutificação de *L. edodes* contêm também potentes inibidores de vírus de plantas. Um destes inibidores foi purificado e caracterizado como uma proteína simples básica sem conteúdo de carboidrato (KOBAYASHI et al., 1987) e mostrou-se capaz de reduzir a infectividade do TMV em *Nicotiana tabacum*. Em outra pesquisa, os extratos aquosos do corpo de frutificação de *L. edodes* foram ativos contra o vírus do endurecimento dos frutos (PWV), reduzindo a infectividade em *Chenopodium quinoa* (hospedeira de lesão local) (DI PIERO, 2003).

Alguns trabalhos também têm dado ênfase à capacidade do *L. edodes* em induzir resistência em plantas (SILVA et al., 2007; DI PIERO; PASCHOLATI, 2004), por apresentar substâncias no basidiocarpo capazes de ativar os mecanismos de defesa, tornando-o um promissor candidato à indutor de resistência para uso comercial. O agente indutor não atua diretamente sobre o patógeno, mas ele sensibiliza a planta a ativar seus mecanismos de defesa em resposta à presença de um patógeno (CONRATH et al., 2002). Esses mecanismos podem envolver enzimas como peroxidase, β -1,3-glucanase, quitinase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase (CAVALCANTI et al., 2005).

Figura 6 - Estrutura química da eritadenina (SUZUKI; OSHIMA, 1974)

(I)

(II)

(III)

Figura 7 - Estrutura química da lenthionina, 1,2,3,5,6-pentatiepano (I), o 1,2,4-tritriolano (II) e o 1,2,4,5 tetratiano (III) (CHEN; HO, 1986)

Figura 8 - Estrutura básica de um álcool fenil etílico

2.1.3 *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*

O Brasil se destaca como o principal produtor mundial de maracujá, possuindo uma área plantada de aproximadamente 40.000 hectares (ha). A produção no ano de 2005 foi em torno de 479.000 toneladas. O Nordeste possui a maior produção, no entanto, a região Sudeste tem o maior rendimento médio, em torno de 17 t/ha. Fatores como a qualidade das mudas, clima, fertilidade do solo, tratamentos culturais e doenças, afetam decisivamente esta produção (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2005).

A mancha oleosa do maracujazeiro ou morte precoce do maracujazeiro, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (Pereira) é considerada uma das doenças mais limitantes para a cultura do maracujazeiro (GONÇALVES; ROSATO, 2000). Os sintomas da bactéria manifestam-se de duas formas distintas:

a) lesões locais, as quais são caracterizadas por distribuição bastante desuniforme no limbo foliar e aparência grosseiramente arredondada, bem delimitadas, raramente de formato angular e com pequeno halo clorótico. Sendo a lesão de aparência oleosa, a mesma é facilmente visualizada em contraste com a luz; b) infecções sistêmicas, as quais diferem das locais por apresentarem grandes áreas de tecido infectado, e não se restringirem localmente nas células do ponto de infecção nas folhas, mas se alastrarem através dos feixes vasculares para outras partes da planta como, pecíolos, ramos e frutos (PEREIRA, 1968; TOLEDO, 1992).

Em 2001, Malavolta et al. descreveram também o sintoma de podridão mole, com anasarca, em frutos coletados na região de Valinhos, São Paulo, com o qual associaram posteriormente à presença da bactéria (Figura 9).

A penetração da bactéria no hospedeiro ocorre via aberturas naturais (estômatos, hidatódios, nectários, etc...) ou por ferimento, sendo necessária a presença de água livre na superfície foliar para que a infecção ocorra (FISCHER et al., 2005).

As infecções bacterianas do tipo sistêmicas tendem a afetar toda a planta, sendo o controle da doença impossível de ser feito. Dessa maneira, o controle da mancha oleosa do maracujazeiro pode ser realizado com sucesso somente quando existirem apenas lesões do tipo local (PICCININ et al., 1995; TORRES FILHO; PONTE, 1994).

A doença foi encontrada pela primeira vez em 1967, ocorrendo na região de Araraquara, São Paulo, sendo o primeiro relato desta bactéria no continente americano (PEREIRA, 1968; TOLEDO, 1992). Atualmente, ela ocorre em todas as regiões produtoras do Brasil (FISCHER et al., 2005). Na região do Distrito Federal, esta doença vem reduzindo a produtividade e a longevidade da cultura, assim como outras doenças causadas por demais patógenos (JUNQUEIRA et al., 2003).

O cultivo do maracujazeiro tem sido explorado também no Mato Grosso, principalmente, por pequenos produtores, visando à diversificação de sua produção agrícola. Em outubro de 2000, foi constatada em plantas de maracujá amarelo (*Passiflorae edulis f. flavicarpa* Degner), roxo (*Passiflorae edulis* Sims) e doce (*Passiflorae alata* Ait.), lesões foliares pequenas, encharcadas, oleosas e translúcidas, com halos visíveis. Após análise morfológica e bioquímica do material, ficou comprovado se tratar da *Xanthomonas* (TASSA;DUARTE, 2002).

No mês de junho de 2005, em plantios comerciais no município de Boa Vista, Roraima, foram observadas plantas de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Deg.) com sintomas de anasarca em folhas, evoluindo para queima severa, além de manchas com aspecto oleoso observados em frutos. A identificação da bactéria através de morfologia, utilização de testes bioquímicos e testes de patogenicidade, concluíram se tratar do gênero *Xanthomonas* (HALFED-VIEIRA; NECHED, 2006).

Na região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, a localização de indústrias processadoras de suco favorece a produção do maracujá, entretanto a bacteriose causada pela *Xanthomonas* também é um fator limitante para a cultura (RUGGIERO, 2000).

O controle da bactéria é feito de modo preventivo, evitando a chegada do patógeno nos locais de cultivo, através da aquisição de sementes e mudas saudáveis. A termoterapia das sementes também é utilizada para eliminação do patógeno (FISCHER et al., 2005). Poucos são os bactericidas utilizados no controle químico, talvez devido à preocupação geral causada pelo rápido desenvolvimento de linhagens resistentes dos patógenos bacterianos, como por exemplo, resistência à estreptomicina, a qual tornou-se tão comum que alguns agricultores interromperam seu uso. Entretanto, outra alternativa que tem dado alguns resultados positivos é o uso de combinações de fungicidas à base de cobre e antibióticos, que são aplicados através de pulverizações no campo ou como tratamento de sementes. Desses fungicidas, os mais amplamente utilizados são o oxiclureto de cobre, hidróxido de cobre, óxido cuproso e a calda bordalesa (FISCHER et al., 2005). Entretanto, além dos custos estarem aumentando a cada ano, podendo em breve, tornar essa atividade antieconômica, é cada vez maior o número de consumidores preocupados com o conceito de qualidade mercadológica e com a preservação do ambiente, aumentando a procura por frutas saudáveis, sem resíduos de agrotóxicos ou até mesmo cultivo orgânico (JUNQUEIRA et al., 2003). Outro inconveniente é a resistência ao cobre por bactérias fitopatogênicas, incluindo algumas da família *Xanthomonadaceae*, e o fato do cobre ser fitotóxico para algumas plantas, o que também tem limitado o seu uso.

Uma prova desta resistência foi demonstrada em estudo conduzido por Franco e Takatsu (2004), onde 38 bactérias isoladas de maracujazeiros com os sintomas da doença foram selecionadas da região de Minas Gerais e avaliadas quanto a sua resistência aos fungicidas à base de cobre. Os resultados apontaram que 3 isolados mostraram-se resistentes até uma concentração de 300 ppm de cobre, enquanto que 13 foram resistentes até 200 ppm e 25 até 100 ppm e somente 12 foram resistentes a 50 ppm.

Outra forma de controlar ou mesmo minimizar a incidência da doença é adotar medidas como erradicação das partes vegetais doentes e a desinfecção das ferramentas de poda com bactericidas, as quais têm-se mostrado eficientes no controle da doença (FISCHER et al., 2005).

Figura 9 - Sintomas da podridão dos frutos em maracujá causados por *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae* (MALAVOLTA et al., 2001)

2.1.4 Vírus do Mosaico do Fumo (TMV)

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de fumo, sendo que a produção no ano de 2005 foi de 889.426 toneladas de folhas secas. O Rio Grande do Sul, maior produtor do país, responde por 97% do total nacional, com cerca de 700 municípios produtores. A cultura é típica de pequenas propriedades, e a maior produção está nas proximidades das indústrias de transformação e beneficiamento. O Estado colheu uma safra de 430.347 toneladas, enquanto que Santa Catarina, o segundo maior produtor, produziu 280.045 toneladas e o Paraná, em terceiro lugar, 152.371 toneladas (IBGE, 2005).

O TMV encontra-se distribuído por todas as regiões onde o fumo é cultivado. A redução da produção das plantas infectadas está por volta de 15%, porém a facilidade com que este vírus é transmitido via mecânica e sua elevada incidência torna esta doença uma das mais importantes da cultura do fumo (MASSOLA et al., 2005).

O TMV está classificado em um grupo de vírus de plantas denominado *Tobamovirus* (ZERBINI et al., 2002). Possui partículas filamentosas em forma de haste, resistentes às altas temperaturas, com tamanho de 18x300 nm aproximadamente. É composto de RNA fita simples encapsulado em uma capa protéica, composta por aproximadamente 2130 subunidades idênticas (SANO, 1997), tendo ainda a capacidade de cristalização fora do hospedeiro, podendo assim permanecer viável por muitos anos (ZERBINI et al., 2002).

A planta infectada pelo TMV geralmente apresenta os sintomas de redução na área foliar acompanhada de rugosidade e má formação das folhas, as quais se apresentam mais afiladas e espessas. No limbo foliar, observamos a presença de áreas verdes claras ao lado de áreas verdes normais, dando ao conjunto um aspecto de mosaico, o que dá o nome à doença (Figura 10a). As plantas infectadas com o mosaico podem apresentar o dobro de nicotina que as plantas sadias de mesma variedade. A transmissão por sementes é insignificante, sendo a transmissão mecânica o principal meio de disseminação da doença (MASSOLA et al., 2005).

A movimentação do vírus na planta pode ser célula a célula, através dos plasmodesmas. Neste caso, o RNA do vírus forma um complexo com a proteína 30K e o conjunto é transportado para o plasmodesma. Outra forma é a movimentação sistêmica do vírus, onde a partícula viral completa movimenta-se através do floema das plantas inoculadas (ZERBINI et al., 2002).

O fumo (*Nicotiana tabacum* L.) com o genótipo N é resistente ao TMV (DUNIGAN et al., 1987). A interação incompatível entre fumo e seu patógeno resulta na necrose do tecido que previne a disseminação do TMV por toda a planta, causando sintomas de lesão local (Figura 10b). Esta morte celular coordenada é determinada pela reação de hipersensibilidade (RH) e está associada com o acúmulo inter e intracelular de nove classes distintas de proteínas relacionadas à patogênese (proteína-RP) e o aparecimento de níveis elevados de ácido salicílico (MALAMY et al., 1990). Por sua vez, a aplicação exógena de AS em plantas pode aumentar a resistência à patógenos virais e induzir o aparecimento de proteínas-RP, algumas das quais tem funções relacionadas à defesa (BOL et al., 1990). Além disso, é possível que o AS possa ativar outros mecanismos de resistência, tais como a produção de fitoalexinas, inibidores de proteinase, ou reforço e lignificação da parede celular.

Após a inoculação do TMV, níveis de AS em fumo aumentam sistemicamente (MALAMY et al., 1990; ENYEDI et al., 1992). O primeiro aumento no nível de AS ocorre 36 horas após a inoculação, coincidentemente com o aparecimento da RH (MALAMY et al., 1990). Um aumento mínimo de 50 vezes nos níveis de AS endógenos em folhas inoculadas pode ser detectado após 72 horas após inoculação do TMV (MALAMY et al., 1990). O AS pode ser também detectado no exudato do floema de folhas de fumo retiradas após inoculação com TMV (YALPANI et al., 1991). Os maiores níveis de AS são encontrados nas lesões necróticas induzidas por TMV e em torno das mesmas (ENYEDI et al., 1992). Simultaneamente com o aparecimento de AS no floema, existe um aumento no nível de AS nas folhas não-inoculadas

acima das folhas inferiores inoculadas com o TMV (MALAMY et al., 1990; YALPANI et al., 1991). Nestas mesmas folhas, muitas proteínas-RP também aparecem com o aumento dos níveis de AS. Além do AS, glicosídeos de AS (GAS) e a atividade de enzimas catalizando a síntese de conjugados de AS têm sido identificados em algumas espécies de plantas (UMETANI et al., 1990).

As folhas de fumo rapidamente metabolizam o AS produzido exogenamente ou endogenamente à GAS (ENYEDI et al., 1992). Assim, a maioria do AS em folhas de fumo inoculadas com TMV está presente na forma de GAS (ENYEDI et al., 1992; MALAMY et al., 1990). O GAS foi encontrado somente em folhas que exibiam RH, sendo que a seiva do floema e folhas livres do patógeno de fumo, inoculado com TMV, não continham significantes níveis de GAS (ENYEDI et al., 1992).

As formas de controle da doença incluem desde medidas sanitárias como limpeza e desinfecção dos instrumentos de poda ou rega de mudas, até os cuidados com os hábitos dos agricultores em não fumar durante o trato cultural, pois o vírus presente no fumo do cigarro industrializado ou mesmo no fumo de corda pode contaminar as mãos e roupas dos trabalhadores e disseminá-lo para a cultura. No entanto, a medida mais eficiente é a utilização de variedades resistentes principalmente para os tipos “estufa” e “galpão”. Estudos envolvendo melhoramento genético estão sendo desenvolvidos (MASSOLA et al., 2005).

Outros estudos que estão sendo conduzidos envolvem métodos alternativos de controle, como em uma das pesquisas realizadas com o basidiocarpo de *L. edodes*, onde se obteve uma proteína purificada, a qual recebeu o nome de PCF e foi altamente efetiva contra o TMV, reduzindo em 50% a infectividade desse vírus em *Nicotiana tabacum* var. *xanthi*, quando utilizada em uma concentração de 6,3 ppm (HIRAMATSU et al., 1987).

O potencial deste cogumelo nos possibilita uma alternativa de controle contra este fitopatógeno.

Figura 10 - Sintomas do mosaico do fumo (a) e sintomas de lesão local (b) em *Nicotiana tabacum*, causado pelo vírus do mosaico do fumo (TMV)

2.1.5 *Guignardia citricarpa*

O Brasil é o maior produtor mundial de laranjas, embora na produção do ano de 2005 tenha ocorrido um decréscimo de 2,5% em relação à safra de 2004, entretanto, a produção foi de 17.853.443 toneladas, equivalentes a 437,6 milhões de caixas de 40,8 kg. O estado de São Paulo é o maior produtor com uma produção de 14.366.030 toneladas ou 352,1 milhões de caixas, o equivalente a 80,5% do total colhido no Brasil. O destino principal da fruta é a produção de suco concentrado e congelado para exportação (IBGE, 2005).

No ano de 2005, a principal causa da redução da produção no estado de São Paulo, foi a estiagem (IBGE, 2005), mas muitas doenças já foram motivos de redução drástica da produção desta fruta, entre elas, a tristeza do citrus, clorose variegada, morte súbita, entre outras (GÓES,

1998).

A mancha preta dos frutos cítricos (MPC), cujo agente causal é o fungo *Guignardia citricarpa* Kiely (anamorfo: *Phyllosticta citricarpa* (McAlp.) Van der Aa), tem proporcionado elevados prejuízos à citricultura nos países de sua ocorrência, reduzindo significativamente a produção devido à queda prematura dos frutos. Além disso, deprecia os frutos comercialmente e, por tratar-se de doença quarentenária para países da União Européia e Estados Unidos, onde a tolerância de frutos com sintomas de MPC é zero, limita grandemente a possibilidade de exportação de frutos *in natura* (BALDASSARI et al., 2007).

Esta doença foi constatada pela primeira vez na Austrália, no ano de 1895, causando prejuízos elevados à produção, tanto em plantas em pomares como em frutos pós-colheita (SUTTON; WATERSON, 1966). Foram constatados prejuízos de milhões de dólares em várias regiões produtoras de citros no mundo, com perdas superiores a 80% em várias áreas de produção na Austrália e África do Sul (KLOTZ, 1978). Além destes países, sua ocorrência também já foi relatada em Moçambique, China, Taiwan, Indonésia, Japão, Argentina e Peru (BALDASSARI et al., 2007).

No Brasil, a mancha preta foi descrita, inicialmente, a partir de frutas cítricas de uma feira livre no município de Piracicaba, no Estado de São Paulo, em 1940 (AVERNA-SACCÁ, 1940), sem, no entanto, ter sido mencionada a sua importância em termos de perdas. A doença permaneceu esquecida durante vários anos, certamente devido a uma temporária redução do inóculo, resultante da epidemia da tristeza do citros, que redundou na eliminação aproximada de cerca de 11 milhões de árvores nas décadas de 30 a 40 (GÓES, 1998). Na década de 80, a mancha preta foi relatada no Estado do Rio de Janeiro (Baixada Fluminense), causando perdas consideráveis em tangerina do tipo ‘Rio’ (*Citrus deliciosa* Ten.) (ROBBS et al., 1980) e, posteriormente, em laranjas (*Citrus* spp.) ‘Lima’, ‘Seleta’, ‘Folha Murcha’, ‘Natal’, ‘Pêra-Rio’ e ‘Valência’ (GOES et al., 1990). Em 1992, foram observadas em São Paulo novas ocorrências do fungo, causando severos prejuízos em pomares localizados nos municípios de Conchal e Mogi-Guaçu (GOES; FEICHTENBERGER, 1993). No Estado do Rio Grande do Sul, a doença foi descrita em 1986, no Vale do Caí, onde, atualmente, causa sérios prejuízos para a citricultura desse Estado (FEICHTENBERGER; GOES, 1998). Em 2001, foi também descrita em Minas Gerais e atualmente, a doença está presente nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Espírito Santo, Santa Catarina, Amazonas e Paraná (FEICHTENBERGER

et al., 2005).

Com exceção da laranja azeda (*C. aurantium* L.) e seus híbridos, todas as espécies de *Citrus* são susceptíveis. Os limoeiros também são susceptíveis e grandes perdas podem ocorrer em laranja doce (*C. sinensis*) e pomelo (*C. paradisi* Macf.) (KOTZÉ, 1988), apresentando assim, grande importância econômica.

O fungo causador da mancha preta dos frutos cítricos foi primeiramente descrito por McAlpine, em 1889 (McONIE, 1964) na sua forma assexuada, e recebeu a designação de *Phoma citricarpa* McAlpine. Posteriormente, surgiram duas novas propostas para a recombinação do binômio: *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Petrak. e *Phyllostictina citricarpa* (Mc Alpine) Petrak., ambas, segundo Robbs (1990) adotadas indistintamente pelos fitopatologistas. O estágio sexual do patógeno foi descoberto por Kiely, em 1948, e foi então chamado de *Guignardia citricarpa* Kiely (KOTZÉ, 1988). No ano de 1964, McOnie descreveu duas variantes de *G. citricarpa*, morfologicamente idênticas, que ocorriam em citros, sendo apenas uma delas patogênica, e a outra endofítica. Essas duas formas apresentariam padrões distintos quanto à taxa de desenvolvimento vegetativo em meios de cultura, coloração de colônias e morfologia de conídios, entretanto, atualmente, sabe-se que a forma endofítica é uma outra espécie denominada de *Guignardia mangiferae* (anamófica: *Phyllosticta capitalensis*) (BAAYEN et al., 2002).

O fungo desenvolve-se em folhas de citros caídas no chão, onde são produzidos os ascósporos, principal estrutura de disseminação do patógeno (KIELY, 1948; MCONIE 1964; KOTZÉ, 1988).

Um aspecto da doença é a chamada infecção latente, que permanece invisível por vários meses, sendo que os seus sintomas são expressos principalmente nos frutos maduros, muitas vezes após a colheita, durante o armazenamento e o transporte (FEICHTENBERGER et al., 2005). Porém, as infecções que deram origem aos sintomas podem ter ocorrido em qualquer época desde a queda das pétalas até quatro ou cinco meses depois (BALDASSARI, 2001). O conhecimento da época de infecção é primordial para a definição da melhor estratégia de manejo (BERGAMIM; AMORIM, 2002).

Os diferentes tipos de lesões causadas pelo patógeno ficam restritos ao flavedo e não afetam a qualidade interna dos frutos, mas a MPC pode também causar a queda prematura dos frutos, o que reduz significativamente a produção (KLOTZ, 1978; SPÓSITO, 2004).

Até o momento foram relatados seis tipos de sintomas diferentes (FEICHTENBERGER et al., 2005). Os sintomas mais comuns observados em frutos são os do tipo mancha dura, falsa melanose e mancha sardenta (Figura 11) (KOTZÉ, 1988). O sintoma do tipo mancha dura caracteriza-se por lesões circulares, deprimidas, com bordos salientes de coloração marrom e na maioria das vezes por apresentar pontuações negras no seu interior, que correspondem aos picnídios. Este tipo de sintoma normalmente ocorre no período de mudança da coloração dos frutos. O sintoma do tipo falsa melanose caracteriza-se por minúsculas e numerosas pontuações escuras, dispersas ou agregadas, que normalmente aparecem em frutos ainda verdes (FEICHTENBERGER et al., 2005).

A mancha sardenta aparece em fases mais adiantadas de maturação dos frutos, embora a infecção tenha ocorrido quando o fruto se encontrava ainda jovem. Esse tipo de sintoma faz com que frutos, ainda que assintomáticos, mas contendo infecções quiescentes, manifestem essas infecções típicas nas fases mais adiantadas de maturação, às vezes, no local de destino. Nesses casos, quando se trata de frutos exportados, a carga poderá ser rechaçada, advindo elevados prejuízos aos exportadores. Assim, para o caso de frutos produzidos em áreas de ocorrência da doença e, mesmo sob criterioso programa de controle do patógeno e adoção de cuidados rigorosos nas inspeções no “packing house”, não se descarta a possibilidade do aparecimento de frutos sintomáticos no local de destino. Dessa forma, no caso de frutos destinados à exportação, oriundos de pomares existentes em regiões não indenes, há a necessidade de uma série de cuidados, incluindo-se o uso diferenciado de tratamentos químicos, combinado com uma série de práticas culturais. Além desses cuidados, há ainda a necessidade da realização de medidas adicionais que ampliem o nível de confiança dos exportadores (SPOSITO et al., 2004).

Uma destas medidas pode ser a utilização do etileno, conhecido entre outras funções, por promover o aumento na atividade das enzimas clorofilase e oxidases (YAMAUCHI et al., 1997), responsáveis pela degradação da clorofila e o conseqüente desaparecimento da cor verde, estimulando a carotenogênese, que promove o aparecimento das cores amarela ou laranja. Nos frutos cítricos, a aplicação do etileno proporciona um efeito estético positivo sobre a coloração da epiderme, que passa de verde para amarela ou laranja. Esta particularidade é um fato já conhecido e utilizado há tempos, uma vez que é prática usual para os frutos cítricos destinados ao consumo *in natura*, principalmente à exportação. Essa técnica faz com que os frutos que apresentem casca de cor verde, atinjam tons alaranjados, padronizando toda a carga quanto ao aspecto visual.

Estudos prévios demonstraram que a aplicação de etileno antecipa a maturação dos frutos e pode ser uma alternativa com vistas à indução precoce dos sintomas da MPC (BELLOTTE et al., 2001), podendo redundar em aumento da garantia fitossanitária dos frutos cítricos a serem colhidos em pomares conduzidos com objetivo da sua exportação (BALDASSARI et al., 2007).

O controle da MPC baseia-se, principalmente, no emprego de fungicidas que, dado ao longo período de susceptibilidade dos frutos, por no mínimo 24 semanas, necessitam de várias pulverizações, elevando significativamente o custo de controle, o qual, atualmente está estimado em cerca de 10% a 13,2% do custo de uma caixa de laranja (BALDASSARI et al., 2007).

Os fungicidas registrados e de comprovada eficiência no controle da MPC restringem-se a produtos protetores à base de cobre ou ditiocarbamatos, produtos sistêmicos, principalmente os benzimidazóis e os translaminares como as estrobilurinas (FEICHTENBERGER et al., 2005). Estes produtos podem ser utilizados isoladamente ou em combinação e suas respectivas concentrações e épocas de aplicação encontram-se bem definidas (FEICHTENBERGER; SPÓSITO, 2003).

Os fungicidas protetores apresentam amplo espectro de ação. Por interferirem em diversos processos metabólicos vitais do fungo, esses produtos apresentam baixo risco de resistência pelo patógeno. Os fungicidas de ação sistêmica apresentam maior especificidade. Os benzimidazóis, por exemplo, afetam especificamente a divisão celular, pois apresentam atividade seletiva para a tubulina de fungos, e ligam-se a essa proteína, impedindo que ocorra a polimerização dos microtúbulos formadores do fuso mitótico (KENDALL et al., 1994). Esta especificidade dos benzimidazóis faz com que esse fungicida apresente alto risco de resistência adquirida pelo patógeno.

Devido a essas características, os isolados resistentes aos benzimidazóis geralmente são tão adaptados quanto os sensíveis. Portanto, a alta pressão de seleção causada pelo uso intensivo dos benzimidazóis pode resultar na seleção de isolados resistentes em um curto período de tempo.

Os fungicidas de ação translaminar, como as estrobilurinas, também possuem ação específica sobre o patógeno e apresentam alto risco de resistência. As estrobilurinas interferem na respiração mitocondrial, ao bloquear a transferência de elétrons pelo complexo citocromo bc1 (GHINI; KIMATI, 2000). De modo geral, fungicidas pertencentes a um mesmo grupo químico apresentam resistência cruzada (GHINI; KIMATI, 2000). Entre os benzimidazóis, o carbendazim e o tiofanato metílico são os produtos utilizados para citros e passíveis de resistência cruzada.

Para as estrobilurinas, a resistência cruzada pode ocorrer para a azoxistrobina, trifloxistrobina e piraclostrobina. Essa informação é importante na adoção de estratégias anti-resistência. Devido ao baixo número de fungicidas eficazes no controle da MPC, geralmente usados também no manejo de outras doenças fúngicas na citricultura, tais como a podridão-floral (*Colletotrichum acutatum* Simmonds), verrugose (*Elsinoe* spp.), melanose (*Diaporthe citri* Wolf), torna-se necessária a adoção de estratégias anti-resistência, que contemplem um programa de controle efetivo.

Em estudo conduzido por Rodrigues et al. (2007) constatou-se que muitos isolados de *G. citricarpa* são resistentes aos benzimidazóis, enquanto que a aplicação de carbendazim e piraclostrobina, em folhas infectadas de áreas sem histórico de aplicação destes fungicidas, controla de forma eficiente a produção dos ascósporos. Já em áreas com histórico de aplicação do carbendazim, ficou constatada a presença de isolados resistentes, obtidos em campo, o que é um indício de que também está surgindo resistência a esse fungicida nos pomares citrícolas brasileiros.

Figura 11 - Sintomas de mancha dura (A), mancha sardenta (B), falsa melanose (C) e mancha trincada (D) causadas por *G. citricarpa* em frutos de laranja (TOFFANO, 2005)

2.1.6. *Colletotrichum sublineolum*

O sorgo (*Sorghum bicolor* L Moench) é originário da África Central, região da Etiópia e Sudão, de onde se disseminou para toda a África e Ásia, chegando, posteriormente, ao continente Americano e Austrália (FREDERIKSEN, 2000).

Por mais de três mil anos, o cultivo do sorgo tem sido um dos mais importantes do mundo em regiões áridas e semiáridas. Atualmente, é um dos principais cereais cultivados e consumidos no

mundo e essencial para a vida humana (FREDERIKSEN, 2000), principalmente em regiões pobres que apresentam alta temperatura e baixa precipitação, locais onde a cultura atinge altas produções de grãos e de forragem (GUIMARÃES, 1996).

A produção mundial de sorgo, no ano de 2005, foi de aproximadamente 58 milhões de toneladas, sendo que os cinco principais países produtores foram responsáveis por cerca de 60% desta produtividade (IBGE, 2005). No Brasil, a cultura passou a ter destaque na economia agrária a partir da década de 80 (ROQUE; GUATIMOSIM, 1985) e apesar de contribuir com apenas cerca de 2,5 % da produção mundial, tem apresentado aumentos significativos de produção nos últimos anos, passando de 895.331 toneladas no ano de 2001 para 1.522.839 toneladas no ano de 2005 (IBGE, 2005).

Dentre os patógenos que atacam a cultura do sorgo, a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum sublineolum* Henn Kabat et Bub., é considerada a principal doença no Brasil e também uma das mais importantes doenças dessa gramínea em todas as regiões produtoras no mundo (FREDERIKSEN, 2000), constituindo-se em fator limitante ao desenvolvimento da cultura, por ocasionar perdas severas na produção de grãos e de forragens (GUIMARÃES, 1996), que podem chegar a mais de 50% sob condições de epidemias severas, principalmente quando há alternância de condições secas e úmidas associadas à temperaturas elevadas (CASELA; FERREIRA, 1998). No Brasil, a antracnose do sorgo foi relatada pela primeira vez no estado de São Paulo, em 1934 (PANIZZI et al., 2005) e atualmente está presente em todas as áreas produtoras (CASELA et al., 2001).

Segundo Powell et al. (1977), as reduções na produção devido à antracnose, são consequência do enchimento incompleto de grãos, como demonstrado por reduções no peso e na densidade de sementes por panícula. Reduções superiores a de 80% na produção de grãos têm sido constatadas em cultivares suscetíveis, em anos e locais favoráveis ao desenvolvimento e disseminação da doença (PANIZZI et al., 2005).

O fungo apresenta micélio septado, ramificado, hialino e granular. Culturas desenvolvidas em meio de aveia-ágar produzem grande quantidade de conídios em resposta à luz contínua a uma temperatura em torno de 25°C. Os acérvulos, as estruturas de frutificação do patógeno, apresentam coloração marrom escura, formato circular ou oval, medem de 70-300 µm e são caracterizados pela presença de setas negras e pela grande quantidade de conídios produzidos em massa de coloração rosa a creme tanto em meio de cultura como em tecido do hospedeiro. Os

conidióforos são curtos, eretos, hialinos, não septados e não ramificados, medindo de 1,6–3,3 x 4,9–13,3 μm . As setas são longas e septadas, com comprimento de cerca de 100 μm e são formadas entre os conidióforos (CASELA; FERREIRA, 1998). Os conídios são produzidos isoladamente na extremidade dos conidióforos entre as setas e em massas imersas em um substrato gelatinoso; medem entre 4,9 - 5,2 x 26,1 - 30,8 μm , são hialinos, unicelulares e falciformes. A germinação pode ocorrer em qualquer área do conídio (PANIZZI et al., 2005).

São reconhecidas três fases da doença: a antracnose foliar (Figura 11a), a podridão do colmo (Figura 11b) e a antracnose da panícula e dos grãos (PANIZZI et al., 2005). A fase foliar da antracnose é mais prevalente a partir do desenvolvimento da panícula, podendo, entretanto, ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento da planta. Nesta fase os sintomas iniciais são caracterizados por pequenas lesões elípticas a circulares, com diâmetro em torno de 5 mm. Com a evolução das lesões, elas passam a apresentar centros necróticos de coloração palha, com margens avermelhadas, alaranjadas ou castanhas, variando em função da pigmentação da cultivar. No centro das lesões há formação dos acérvulos, que constituem a principal forma de identificação da doença em condições de campo. A coalescência é observada principalmente sob condições de alta umidade, quando grande parte do limbo foliar apresenta-se tomado por lesões, no centro das quais há formação de grande quantidade de acérvulos (CASELA; FERREIRA, 1998). A infecção na nervura central da folha ocorre de maneira independente da infecção foliar. Nesse caso, os sintomas são caracterizados por lesões elípticas a alongadas, de coloração avermelhada, púrpura ou escura, nas quais podem ser observados os acérvulos do patógeno. A fase de podridão do colmo ocorre principalmente a partir da maturação das plantas e, normalmente, é causada por conídios produzidos na fase foliar da doença. Os sintomas caracterizam-se pela formação de cancrios, com áreas mais claras circundadas por áreas com pigmentação característica da planta hospedeira. As lesões ocorrem no tecido internodal, principalmente no pedúnculo, podendo apresentar-se de forma contínua ou na forma de manchas isoladas. Quando o colmo é seccionado longitudinalmente, observa-se uma coloração avermelhada a escura, equivalente à necrose do tecido vascular (CASELA; FERREIRA, 1998; FREDERIKSEN, 2000).

A infecção da panícula pode ser uma extensão da fase de podridão do colmo. Os sintomas caracterizam-se pela presença, abaixo da epiderme, de lesões que têm, inicialmente, um aspecto encharcado, adquirindo, mais tarde, uma coloração cinza a púrpura – avermelhada. Se o

pedúnculo é seccionado longitudinalmente, verifica-se a presença de uma coloração castanho – avermelhada, alternada com áreas de tecido esbranquiçado. As panículas de plantas infetadas normalmente são menores e amadurecem mais cedo. A antracnose da panícula e dos grãos tem como inóculo conídios produzidos durante a fase foliar da doença, os quais são levados à bainha das folhas pela água de chuva, germinam e penetram o pedúnculo ou a panícula, causando a podridão no interior do colmo (GUIMARÃES, 1996; CASELA; FERREIRA, 1998). A esporulação ocorre na ráquis central, estendendo-se para as demais ramificações, glumas e sementes. Desse modo, a antracnose prejudica não só o desenvolvimento da planta, mas também causa esterilidade parcial e redução da produção (PANIZZI et al., 2005).

A sobrevivência do fungo ocorre tanto em restos da cultura de sorgo como também em sementes, localizando-se freqüentemente no pericarpo, ocasionalmente no endosperma, e raramente no embrião (PANIZZI et al., 2005). O fungo pode sobreviver por até 18 meses na ausência do hospedeiro, como micélio e conídios em restos culturais na superfície do solo, mas não sobrevive quando os restos culturais são incorporados ao solo (CASELA; FERREIRA, 1998). Nos acérvulos há produção de uma mucilagem que protege os conídios da dessecação e da ação de compostos fenólicos produzidos pela planta, os quais impedem a sua germinação (NGUGI et al., 2000).

A disseminação de conídios de *C. sublineolum* ocorre principalmente através de respingos de chuva, e em menor proporção, através do vento, enquanto que a disseminação a longa distância se dá principalmente através de sementes contaminadas (PANIZZI et al., 2005).

Abundante produção de microesclerócios pode ser observada em colmos secos de cultivares suscetíveis, ao final do ciclo da cultura. Estas estruturas desempenham um importante papel como fonte primária de inóculo (CASELA; FREDERIKSEN, 1993).

A medida mais eficiente para o controle da doença envolve o emprego de cultivares resistentes. No entanto, o elevado número de raças desses fungos pode permitir rápida adaptação de uma nova raça do patógeno (CASELA; FERREIRA, 1998), o que tem levado os pesquisadores a buscarem medidas alternativas de controle (PASCHOLATI, 1998). Além disso, muitos dos genótipos suscetíveis apresentam características agrônômicas desejáveis. Esses materiais contêm a informação genética para resistência, porém esta é expressa de forma inadequada, com velocidade e/ou magnitude insuficientes para controlar o agente de infecção (KUC, 1987).

Por ser o Brasil um país tropical, com uma dimensão continental e ambiente altamente heterogêneo, muitas raças fisiológicas de *C. sublineolum* infectando sorgo têm sido identificadas nos campos e novas raças aparecem cada ano (CASELA; FREDERIKSEN, 1993; CASELA et al., 2001).

O conhecimento em relação à diversidade genética de populações de *C. sublineolum* é crucial para o manejo da doença e para estabelecer relações entre variações ambientais e mudanças na agressividade dos patótipos (CASELA; FERREIRA, 1998; CASELA et al., 2001). Contudo, tentativas estão sendo feitas para definir protocolos alternativos baseados nas técnicas moleculares para identificação rápida e eficiente de patótipos de *C. sublineolum*, para serem usados como ferramenta para auxílio aos fitopatologistas (FIGUEIREDO et al., 2006).

Outras estratégias de utilização da resistência genética, como, resistência dilatária e diversificação da população hospedeira têm sido estudadas quanto à sua eficiência na redução da severidade da antracnose (GUIMARÃES et al., 1996; CASELA et al., 2001). Em misturas de genótipos de sorgo, criadas para se avaliar a diversidade do patógeno nestas condições, observa-se, na maioria das vezes, uma tendência à predominância de raças com grau intermediário de complexidade, ao passo que em populações hospedeiras uniformes e suscetíveis, as raças mais simples tendem a predominar em relação às raças mais complexas em relação à virulência. Tais resultados têm servido como base para a avaliação de diferentes estratégias de manejo de genes de resistência e da avaliação da capacidade de resposta do patógeno a estas diferentes situações, na tentativa de se desenvolver uma resistência de maior durabilidade e estabilidade, um aspecto de fundamental importância, considerando-se a alta variabilidade apresentada por este patógeno nas condições brasileiras (CASELA et al., 2001).

A resistência à antracnose foliar e à antracnose dos grãos é, provavelmente, governada por genes diferentes, uma vez que linhagens que são altamente resistentes à antracnose foliar, exibem altos níveis de antracnose nos grãos, tanto no campo quanto em testes de casa de vegetação (CASELA et al., 2001).

Folhas de plantas jovens de sorgo raramente exibem sintomas de infecção por *C. sublineolum* por acumularem um complexo de compostos fenólicos considerados como fitoalexinas e produzidos em resposta à invasão pelo patógeno e outros organismos não patogênicos. Nas células invadidas, esses compostos se acumulam em inclusões no citoplasma, que, em cerca de 24 h após a inoculação, migram para o local de penetração onde aumentam

gradualmente, coalescem e tornam-se progressivamente mais pigmentadas (avermelhadas), quando se rompem e liberam seu conteúdo no citoplasma, provocando a morte da célula e restringindo o desenvolvimento do patógeno (SNYDER; NICHOLSON, 1990; WHARTON et al., 2001).

Em interações compatíveis (hospedeiro suscetível), também ocorre acúmulo de fitoalexinas durante a fase necrotrófica de infecção; nesse caso, porém, o acúmulo é mais lento e as concentrações alcançadas são insuficientes para impedir o desenvolvimento do patógeno. Existem evidências de que compostos acumulados em cultivares suscetíveis são menos fungitóxicos do que aqueles observados em interações incompatíveis (SNYDER; NICHOLSON, 1990).

O manejo adequado de doenças requer, não apenas o desenvolvimento de cultivares mais resistentes, mas também que se encontrem formas de se aumentar a durabilidade e a estabilidade desta resistência. Alguns dos pontos discutidos anteriormente são avanços nesta direção, mas outras possibilidades podem e devem ser exploradas.

O controle químico da fase foliar da antracnose não é uma prática comum na cultura do sorgo, devido ao baixo retorno financeiro por hectare plantado, ausência de informações relativas à sua eficiência e custo da operação (MUGHOGO, 1982). As sementes infectadas comumente exibem redução na germinação, na emergência de plântulas e no vigor, resultando em baixa população de plantas no campo (PINTO, 1999). Segundo esse mesmo autor, alguns fungicidas podem ser utilizados com eficiência para o controle do *Colletotrichum* associado a sementes de sorgo. Outras práticas culturais como rotação de culturas e eliminação de restos culturais e hospedeiros alternativos são importantes por auxiliarem na redução do inóculo primário (FREDERIKSEN, 2000).

O trabalho de controle biológico envolvendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* também abre caminho para uma fonte alternativa de controle (PICCININ et al., 2005). Neste trabalho, foi avaliada a produtividade de duas cultivares de sorgo tratadas com a levedura no controle da antracnose. As aplicações semanais de *S. cerevisiae* na concentração de 25 mg/ml reduziram significativamente a antracnose em sorgo cv. Tx-398B e melhoraram a produtividade da mesma.

Figura 12 - Sintomas da antracnose foliar (a) e no colmo (b) em sorgo (*Sorghum bicolor*), causados por *Colletotrichum sublineolum* (COSTA et al., 2003)

2.2 Material e métodos

Até a execução deste trabalho, algumas linhagens de *L. edodes* já haviam sido testadas quanto às atividades biológicas. Com base em trabalhos prévios, as linhagens selecionadas para esta pesquisa foram LE 96/22, proveniente de Botucatu, a qual apresenta atividade antimutagênica (SUGUI et al., 2003), além da atividade antimicrobiana contra os fitopatógenos *G. citricarpa* (*in vivo*), *C. sublineolum*, *C. lagenarium* e *X. axonopodis* pv *passiflorae* (TOFFANO, 2005; DI PIERO; PASCHOLATI, 2004; TONUCCI; PASCHOLATI, 2005) e a linhagem LE 96/17, proveniente de Israel, com potencial antimutagênico (MIYAGI et al., 2006; LIMA et al., 2001), antigenotóxico (MIYAGI et al., 2004) e antimicrobiano contra os fitopatógenos *C. sublineolum*, *C. lagenarium*, *X. axonopodis* pv *passiflorae* e TMV (DI PIERO; PASCHOLATI, 2004; TONUCCI; PASCHOLATI, 2005).

Os isolados LE 96/22 e LE 96/17 de *L. edodes* foram obtidos junto a Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu (UNESP), Departamento de Defesa Fitossanitária. O fungo foi mantido em placas contendo meio batata-dextrose-água (BDA) e incubados à 21°C na ausência de luz.

2.2.1 Meios e condições de cultivo dos fungos em pequena escala

Meio 1: Meio BD (g/L): batata, 200; dextrose, 20.

Meio 2: Meio GPL (HATVANI, 2001) (g/L): glicose, 20; peptona, 10; extrato de levedura, 2.

Meio 3: Meio SML (HIROTANI et al., 2002) (g/L): sacarose, 10; extrato de malte, 30; Extrato de levedura, 5.

Os meios foram distribuídos em frascos erlenmeyer de 250 mL (100 mL de meio/frasco). Três discos de 10 mm, provenientes de placas com 20 dias de cultivo do fungo, foram distribuídos nos frascos, com exceção dos controles dos meios. Para cada meio foram analisados 4 tempos diferentes de cultivo: tempo 0 (logo após o repique), tempo 20 (após 20 dias de cultivo), tempo 40 (após 40 dias de cultivo) e tempo 60 (após 60 dias de cultivo). Para cada tempo e meio foram feitos controles sendo que, para cada condição de cultivo, foram utilizadas 3 repetições. Os erlenmeyers foram mantidos a 21 °C, sob agitação constante em ausência de luz.

2.2.2 Extração do filtrado e micélio

Após os tempos determinados, os meios foram filtrados em funil de Buchner, utilizando papel de filtro Whatman nº 1. O micélio foi mantido à temperatura ambiente por aproximadamente 3 dias até peso constante, calculando, dessa forma, a biomassa fúngica, sendo em seguida triturado em almofariz e suspenso em aproximadamente 9 mL de água. Essa suspensão foi extraída com clorofórmio (3x 10 mL), utilizando-se um funil de separação. A fração orgânica foi evaporada originando assim o extrato clorofórmio do micélio. A fração aquosa foi posteriormente extraída com acetato de etila (3x 10 mL) em funil de separação. A camada inferior da fração presente no funil foi retirada e posteriormente liofilizada, originando o extrato aquoso. A camada superior foi evaporada originando o extrato acetato de etila.

As respectivas extrações repetiram-se para os filtrados dos diferentes meios, conforme esquema apresentado na Figura 13. Os extratos obtidos foram nomeados em siglas, conforme exemplo descrito na Tabela 1.

Figura13 - Obtenção dos extratos brutos LE 96/17 e LE 96/22 de *Lentinula edodes* cultivados em pequena escala

Tabela 1 - Relação dos extratos brutos dos fungos LE 96/22 e LE 96/17, obtidos do cultivo em pequena escala e suas respectivas siglas*

Meio de Cultivo	Material	Tempo de cultivo (dias)	Extrato bruto	Sigla do extrato
Meio 1 (BD)	Micélio	20	clorofórmio	MM1T20cl
			acetato	MM1T20ac
			aquoso	MM1T20aq
	Filtrado		clorofórmio acetato aquoso	FM1T20cl FM1T20ac FM1T20aq
Meio 2 (GPL)	Micélio	20	clorofórmio	MM2T20cl
			acetato	MM2T20ac
			aquoso	MM2T20aq
	Filtrado		clorofórmio acetato aquoso	FM2T20cl FM2T20ac FM2T20aq
Meio 3 (SML)	Micélio	20	clorofórmio	MM3T20cl
			acetato	MM3T20ac
			aquoso	MM3T20aq
	Filtrado		clorofórmio acetato aquoso	FM3T20cl FM3T20ac FM3T20aq

* Para os demais tempos de cultivo, T0, T40 e T60, os respectivos números substituíram o T20 na sigla.

2.2.3 Bioensaios realizados para seleção das melhores condições de cultivo *in vitro* para produção de substâncias com potencial antimicrobiano

Os bioensaios visando a seleção das melhores condições de cultivo para obtenção de substâncias com atividade antimicrobiana, seguiram as metodologias descritas abaixo.

2.2.3.1 Atividade antibacteriana sobre *X. axonopodis pv passiflorae*

A sensibilidade da *X. axonopodis pv. passiflorae* aos extratos de *L. edodes* foi avaliada pela metodologia de difusão utilizando pocinhos no ágar, conforme descrito a seguir: através de um “swab” esterilizado, uma suspensão da bactéria, com turvação comparada à escala Mc Farland 0,5, foi espalhada por toda a superfície de uma placa de Petri contendo meio nutrient ágar (NA). Cinquenta microlitros (50 µL) das amostras dos extratos, solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO), foram depositados em pocinhos de 6 mm de diâmetro (12 por placa), sendo que dois deles foram destinados aos controles, respectivamente, contendo 50 µL de solução de antibiótico (estreptomicina ou cloranfenicol a 24 µg/mL) e 50 µL de DMSO (controle do solvente), conforme metodologia anteriormente padronizada (GODOY et al., 2002a; GODOY et al., 2002b). Após 48 horas de incubação à 28°C, os halos de inibição foram medidos. Em função de observações em experimentos anteriores, a bactéria foi considerada sensível às substâncias quando houve a formação de halo de inibição ≥ 8 mm.

Para cada tratamento foram realizadas 5 repetições e o bioensaio foi repetido 3 vezes.

2.2.3.2 Influência no crescimento micelial *in vitro* do fungo *G. citricarpa*

Foram retiradas alíquotas de 50 µL dos extratos, as quais foram adicionadas “pour plate” em placas de Petri de 5,0 x 5,0 cm contendo 7,0 mL de meio BDA. Em seguida, após 24 horas, discos de micélio de 0,5 cm de diâmetro do patógeno (cultivado em BDA) foram transferidos para o centro destas placas. Placas controles foram feitas contendo 7,0 mL de meio BDA. Placas controle do solvente (DMSO) e placas com um antifúngico (cicloheximida 70 µg/mL), também foram feitas de acordo com o procedimento já descrito. As placas foram incubadas a 25 °C, sob luz fluorescente, com alternância de luminosidade (12 h claro e 12 h escuro), sendo determinado o diâmetro das colônias a cada dois dias, utilizando-se um paquímetro. Foram utilizadas 5 placas por repetição e a análise estatística foi realizada tomando-se como base os valores obtidos no último dia de avaliação, ou seja, após 18 dias de cultivo. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado e a taxa de inibição foi calculada pela fórmula:

$$\text{Taxa inibição (\%)} = 1 - \frac{\text{Diâmetro da unidade experimental}}{\text{Diâmetro médio da testemunha}} \times 100$$

2.2.4 Cultivo dos fungos em grande escala

Após a seleção prévia das condições de cultivo que favoreceram a produção de compostos bioativos, foram selecionados para cultivo em grande escala, os meios M2 e M3 para a linhagem LE 96/17 e o M2 para LE 96/22. O procedimento de cultivo foi o mesmo descrito no item 2.2.1, sendo que o tempo de cultivo foi de 60 dias para a linhagem LE 96/17 e 40 dias para a linhagem LE 96/22.

2.2.5 Procedimentos para extração

Como a metodologia de extração anterior originou vários extratos, mas poucos deles com atividade antimicrobiana, principalmente no que se refere aos extratos obtidos do micélio dos fungos, optou-se por uma mudança na metodologia de obtenção dos mesmos. A nova metodologia está descrita a seguir:

Após o cultivo, o micélio foi separado por filtração em papel de filtro Whatman nº1 e posteriormente homogeneizado em triturador Omni-Mixer Sorvall, sendo macerado com etanol por 24 horas. O etanol foi então separado por filtração e evaporado em evaporador rotativo, originando o extrato **ET**. O micélio foi percolado com etanol 70% por 48 horas, evaporado em evaporador rotativo, resultando no extrato **ET70**. O micélio foi novamente percolado, desta vez com água acidificada com tampão citrato/ácido cítrico (pH 4,0) por 24 horas, visando com esta extração ácida, a obtenção de macromoléculas. O extrato aquoso resultante (**AqM**) foi liofilizado. Por outro lado, o filtrado foi extraído através de partição líquido-líquido com acetato de etila (**Fac**) e o extrato aquoso restante (**AqF**) foi liofilizado.

As extrações, as respectivas massas e siglas dos extratos estão esquematizadas nas Figuras 14, 15 e 16.

Figura 14 - Cultivo do fungo *Lentinula edodes* linhagem LE 96/17 em 4200 mL de meio GPL (Meio2) . Tempo de cultivo: 60 dias

Figura 15 - Cultivo do fungo *Lentinula edodes* linhagem LE 96/17 em 3300 mL de meio SML (Meio 3). Tempo de cultivo: 60 dias

Figura 16 - Cultivo do fungo *Lentinula edodes* linhagem LE 96/22 em 6000 mL de meio GPL (Meio 2). Tempo de cultivo: 40 dias

2.2.6 Bioensaios dos extratos obtidos pela metodologia descrita no item 2.2.5.

Após nova metodologia de obtenção dos extratos, novos bioensaios de inibição foram realizados com *G. citricarpa*, utilizando-se a metodologia descrita no item 2.2.3.2. Além disso, bioensaios utilizando *C. sublineolum* e TMV foram realizados conforme metodologias descritas abaixo:

2.2.6.1 Influência no crescimento micelial *in vitro* do fungo *C. sublineolum*

Os experimentos foram realizados conforme descrito para *G. citricarpa*, no item 2.2.3.2, com exceção das alíquotas das amostras, as quais foram 100 µL, adicionadas em placas de Petri de 9,0 x 9,0 cm contendo 15 mL de meio. As placas foram incubadas a 25 °C, sob luz constante. A análise estatística foi realizada tomando-se como base os valores de crescimento micelial após 7 dias de cultivo.

2.2.6.2 Bioensaio para atividade inibitória de infecção de vírus de planta

O TMV foi propagado em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*), purificado de acordo com o método de Sherwood e Fulton (1982) e armazenado em eppendorfs à - 20°C

Foram plantadas sementes de fumo (*Nicotiana tabacum*) cv. TNN em bandejas de isopor contendo substrato plantmax (Eucatex), sendo que aos 60 dias de idade, as mesmas foram transferidas para vasos com capacidade para 2,5 Kg, sendo mantidas 2 plantas por vaso. Quando as plantas apresentaram 5 folhas expandidas e aproximadamente 35-40 cm de altura, foram feitos os tratamentos colocando-se a partícula viral em contato com os respectivos extratos obtidos (1 mL da suspensão viral à 0,02 mg/mL, para 9,0 mL das amostras ou controle, ficando assim a concentração final de inóculo de 2 µg/mL e a concentração dos extratos em 500 µg/mL), para se verificar a inibição do TMV através do método da meia-folha (CHEN, 1990 *apud* AN et al., 2001).

As preparações descritas acima foram inoculadas mecanicamente em ½ folha, as quais foram posteriormente lavadas com água destilada. Cada tratamento foi repetido pelo menos 5 vezes em

cada diferente posição na folha, totalizando 20 repetições por tratamento. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e a avaliação foi realizada pela contagem do número de lesões locais encontradas em cada meia folha, dois dias após a inoculação. A taxa de inibição foi determinada de acordo com Sun et al. (2003):

$$\text{Taxa inibição (\%)} = 1 - \frac{\text{Número de lesões do tratamento}}{\text{Número de lesões do controle}} \times 100$$

Para verificar se o tratamento utilizado inativou ou apenas inibiu a partícula viral, ao final dos testes de infectividade, as meias-folhas foram congeladas e retirou-se discos de 1 mm da lesão formada na meia-folha onde foi inoculado o vírus + o extrato ativo (TL) e também da lesão formada na meia-folha do controle com água (CL). O mesmo foi feito para uma área correspondente sem lesão na meia-folha contendo o tratamento do extrato ativo e do controle (TD e CD, respectivamente), para comprovar que na área onde não houve lesão, não havia vírus latente (CHEN et al., 1993). Os discos de folhas foram pulverizados em almofariz e posteriormente misturados com tampão pH 7,0 para extrair os vírus presentes. Os quatro tratamentos foram reinoculados conforme procedimento já descrito.

2.2.7 Purificação e caracterização dos extratos e frações com potencial antiviral

O extrato que apresentou atividade contra o TMV foi solubilizado em metanol/água, na proporção de 1:1, purificado em coluna de Sephadex LH-20 (φ 75 mm e 50 cm de altura) e eluído primeiramente com água e, na sequência com metanol e finalmente acetona, obtendo-se 16 frações. O esquema da purificação do extrato está representado na Figura 17.

As frações obtidas foram comparadas por cromatografia em camada delgada analítica, conforme descrito no item 2.2.9. As frações 1 à 5, compostas somente pelo eluente da coluna, foram descartadas, enquanto que as demais frações, que continham substâncias com os mesmos

fatores de retenção (RF) nas placas de TLC, foram reunidas em uma única fração para novos bioensaios com o TMV.

Dessa forma, as frações 6/7, 8/9, 10/11, 12, 13, 14 e 15/16 do extrato aquoso (AqMM2), foram testadas de acordo com o item 2.2.6.2, na concentração de 250 µg/mL, para biomonitorar o composto com atividade antiviral.

Após o bioensaio, as frações 6/7, 8/9 e 10/11 foram novamente reunidas, no intuito de se aumentar a quantidade de massa e foram novamente fracionadas em coluna de ODS (octadecil-silano) (φ 25 mm e 160 mm de altura) e eluídas em metanol/água 50%, metanol/água 30%, metanol/água 10% e metanol 100%. As subfrações resultantes foram novamente fracionadas em cartucho de ODS (φ 7 mm e 20 mm de altura).

A fração 15/16 foi também refracionada em coluna de Silica (70-230 mesh), com eluente acetato de etila/metanol 9:1 (v/v), rendendo 12 subfrações. As subfrações 1 a 4 e a subfração 12 foram descartadas por conterem somente o eluente, enquanto que as subfrações 5 e 6 foram reunidas em uma única subfração, assim como as subfrações 7 à 10. A subfração 11 apresentou uma única substância na placa de TLC, com RF diferente das demais subfrações.

Figura 17 - Esquema da obtenção das frações e subfrações do extrato AQMM2 de *Lentinula edodes*

2.2.8 Ressonância Magnética Nuclear (RMN¹H)

Aproximadamente 10 mg de cada extrato bruto, fração ou subfração foi solubilizada com pequena quantidade de solvente deuterado (DMSO, clorofórmio, metanol ou água). Com uma pipeta Pasteur, os extratos solubilizados foram colocados dentro do tubo de ressonância até preencher aproximadamente 2 cm de altura. Os tubos foram colocados no aparelho da marca Bruker modelo ARX 200 - 4,7 Tesla, 200 MHz ou 400 MHz para frequência de hidrogênio e o espectro foi analisado.

2.2.9 Cromatografia em Camada Delgada Analítica

A técnica de cromatografia em camada delgada analítica (CCD) foi utilizada para monitoramento das frações existentes nos extratos.

As amostras foram solubilizadas em metanol, e quando necessário, foi também adicionado clorofórmio na dissolução. Foi utilizada uma pequena quantidade de cada amostra (cerca de 10 mg) com aproximadamente 1 mL do solvente. As substâncias foram aplicadas nas placas de TLC (5x7 cm) por meio de um capilar de vidro. As placas foram colocadas em cubas de vidro previamente saturadas com a fase móvel (diferentes gradientes de solventes).

Após o solvente percorrer entre 5,2 à 5,5, cm, as placas foram retiradas das cubas e submetidas à luz UV nos comprimentos de onda 254 e 365 nm. Posteriormente, as placas foram reveladas com vanilina em ácido sulfúrico, anisaldeído sulfúrico ou ninidrina e o Fator de Retenção (RF) das substâncias (manchas) foi anotado.

Cálculo do RF:

$$RF = Dr/Dm$$

Dr = Distância de retenção do soluto (componente da amostra)

Dm = distância percorrida pelo solvente

2.2.10 Espectrometria de Massas

As amostras ativas foram solubilizadas em metanol:água 1:1 (v/v) com 0,1% de ácido fórmico e analisadas em espectrometro de massa (Q-TOF, Micromass, Manchester, UK) híbrido de alta resolução (7000) e alta precisão (5 ppm) equipado com fonte de ionização electrospray. Os espectros foram obtidos na faixa de 100 a 1400 KDa em modo positivo (ESI +). A identificação dos compostos presentes nas amostras foi feita através da comparação de suas massas utilizando uma base de dados online, o ChemnetBase (CHAPMAN;HALL/CRC), disponível em <http://dnp.chemnetbase.com>.

2.2.11 Análises Bioquímicas

2.2.11.1 Obtenção dos extratos protéicos para determinação de atividade enzimática

As substâncias utilizadas para esta etapa foram: o extrato aquoso do micélio, o controle do meio de cultivo e a subfração 4-9 (testados sozinhos e com a suspensão viral). Os tratamentos foram inoculados em *N. tabacum* TNN e após 03 dias, 0,5 g das folhas inoculadas foram coletadas, congeladas e trituradas em nitrogênio líquido. O pó resultante foi homogeneizado em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0). A suspensão foi centrifugada a 20000g por 4 min a 4°C. Os sobrenadantes foram armazenados a -20°C e utilizados na avaliação de proteínas totais e atividades enzimáticas.

2.2.11.2 Atividade da peroxidase

A atividade da peroxidase foi determinada a 30°C, pelo método espectrofotométrico direto, através da medida da conversão de guaiacol em tetraguaiacol a 470 nm (LUSSO; PASCHOLATI, 1999). A reação foi conduzida utilizando-se 50 µL de extrato proteico e 2,95 mL de solução contendo 250 µL de guaiacol e 306 µL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0). Na cubeta de referência havia 3 mL da solução com 250 µL de guaiacol e 306 µL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0). A atividade da peroxidase foi expressa em unidades de absorbância.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína (U.A. min⁻¹.mg⁻¹ prot).

2.2.11.3 Atividade da quitinase

Para a determinação espectrofotométrica da quitinase foi utilizado como substrato uma solução de carboximetilquitina-remazol violeta brilhante (CM-chitin-RBV), a partir de quitina carboximetilada com remazol brilhante violeta (STANGARLIN et al., 2000). Assim, 80 µL de extrato proteico foram misturados com 1620 µL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) e 300 µL do substrato CM-Chitin-RBV (2,0 mg.mL⁻¹, Loewe Biochemica GmbH). Estas amostras

foram incubadas a 40 °C em banho-maria durante 20 min, interrompendo a reação com 400 µL de HCl 1,0 M. Após este tempo, as amostras foram colocadas em congelador por 10 min e, em seguida centrifugadas a 10000g por 5 min a 4 °C seguindo-se a leitura da absorbância do sobrenadante em 550 nm, tendo-se tampão de extração na cubeta de referência.

Os resultados foram expressos em U.A. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína, descontando-se os valores de absorbância do controle (1700 µL de tampão de extração + 300 µL de CM-chitin-RBV).

2.2.11.4 Atividade da β -1,3-glucanase

A atividade da β -1,3-glucanase foi também avaliada de acordo com Wirth; Wolf (1992), utilizando-se 400 µL de extrato proteico misturados com 1200 µL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) e 400 µL do substrato carboximetilcurdlan-remazol brilhante azul (CM-Curdlan-RBB 4,0 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, Loewe Biochemica GmbH). As amostras foram incubadas por 20 min a 40°C, a reação foi paralisada com a adição de 400 µL de solução de HCl 1 M, seguida de resfriamento em gelo por 10 min e centrifugação a 10000g por 5 min. A absorbância a 550 nm do sobrenadante foi determinada tendo-se tampão de extração na cubeta de referência. Os resultados também foram expressos em U.A. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína, descontando-se os valores de absorbância do controle (1600 µL de tampão de extração + 400 µL de CM-curdlan-RBB).

2.2.11.5 Atividade da polifenoloxidase

A polifenoloxidase (PPO) foi determinada de acordo com Duangmal; Apenten (1999), pela medida da conversão de catecol em quinona, reação esta mediada pela enzima em estudo. O substrato usado foi catecol 20 mM solubilizado em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,8). A reação ocorreu a 30 °C misturando-se 1800 µL do substrato e 200 µL de extrato protéico (item 2.2.12.1). A leitura da absorbância foi feita de forma direta por um período de 2 minutos em 420 nm. A diferença entre a última e a primeira leitura foi utilizada para determinar a atividade. Os resultados foram expressos em U.A. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína.

2.2.11.6 Atividade de fenilalanina amônia-liase

A atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL) foi determinada por quantificação colorimétrica do ácido trans-cinâmico liberado do substrato L-fenilalanina (UMESHA, 2006). A mistura da reação, incubada por 2 h a 40 °C, continha 200 µL de extrato proteico misturados com 800 µL de tampão Tris-HCl 25 mM (pH 8,8) e 1000 µL de L-fenilalanina (50 mM em tampão Tris HCl 25 mM, pH 8,8). A reação foi paralisada através da adição de 200 µL de HCl 1 M. A absorbância das amostras foi determinada a 290 nm contra tampão de extração. O valor do controle foi subtraído do valor de cada amostra (controle = 200 µL de extrato protéico + 1800 µL de tampão Tris-HCl 25 mM, pH 8.8). A atividade enzimática foi expressa em µg de ácido transcinâmico.min⁻¹.mg⁻¹ proteína, utilizando-se uma curva padrão para o ácido.

2.2.11.7 Dosagem de proteínas totais

O teste de Bradford (1976) foi empregado para a quantificação do conteúdo total de proteínas nas amostras. Para tanto, foram adicionados a cada 40 µL do sobrenadante, sob agitação, 2 mL do reagente de Bradford. Após 5 min, foi efetuada a leitura da absorbância a 595 nm em espectrofotômetro. A concentração de proteínas, expressa em termos de equivalentes µg de albumina de soro bovino (BSA) em um mL de amostra (µg.proteína.mL⁻¹), foi determinada utilizando-se a curva padrão de concentrações de BSA, variando de 0 a 1000 µg.mL⁻¹.

2.2.12 Análise estatística

Para a comparação da biomassa em função do tempo e meio de cultivo das linhagens LE 96/17 e LE 96/22, o delineamento experimental foi o aleatório em blocos (DAB), enquanto que nos bioensaios de inibição da bactéria e dos fungos e das análises bioquímicas, o delineamento experimental foi o inteiramente aleatório (DIA). Já no bioensaio com o TMV, devido a fatores de variabilidade das plantas, utilizou-se o delineamento quadrado latino. Os resultados obtidos de todos os bioensaios foram submetidos a análise de variância e teste de comparação de médias Tukey, com nível de significância de 5%.

O software utilizado foi SAS System for Windows.

2.2.14 Gerenciamento dos resíduos químicos produzidos

Os resíduos químicos produzidos durante a execução desta pesquisa foram coletados e classificados de acordo com sua composição e periculosidade. Após a rotulagem e o armazenamento, os mesmos foram encaminhados para o Laboratório de Resíduos Químicos da Esalq, onde os solventes são recuperados por destilação e os resíduos originados das análises bioquímicas, tratados ou incinerados, conforme o caso. Durante a execução da pesquisa, foram tomados os cuidados de se tentar minimizar a geração destes resíduos, inclusive em determinada fase da pesquisa, optou-se por substituir o uso de composto clorado (clorofórmio) por outro solvente de menor toxicidade (etanol).

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Produção de biomassa de *Lentinula edodes* em diferentes condições de cultivo em pequena escala

Os resultados indicando o crescimento micelial das linhagens LE 96/17 e LE 96/22 do fungo *L. edodes* em função do tempo e dos diferentes meios de cultivo estão expressos na Figura 18. Sabe-se que uma curva de crescimento de microrganismos pode ser dividida em fases distintas: fases lag, exponencial (ou tropofase), estacionária e declínio (ou idiofase) (MADIGAN et al., 2004). Nota-se, portanto, pouca diferença na curva de crescimento para as diferentes linhagens de *L. edodes*, sendo que a fase de crescimento exponencial de LE 96/17 seguiu até 40 dias de cultivo para os três meios testados. No entanto, nos cultivos em Meio 1 e Meio 2, após este tempo, o crescimento entrou na fase de declínio, enquanto que para o cultivo em Meio 3, a fase exponencial continuou até os 60 dias de cultivo. A maior produção de biomassa foi obtida com 40 dias de cultivo em meio contendo glicose, peptona e extrato de levedura (Meio 2). O Meio 1, contendo apenas batata e dextrose, proporcionou um rendimento menor na biomassa em relação aos demais meios para ambas as linhagens.

Nota-se na curva de crescimento de LE 96/22, que a fase exponencial continuou até os 60 dias para os cultivos em Meio 2 e Meio 3, apresentando fase de declínio somente para o Meio 1

após 40 dias de cultivo. Semelhante à linhagem LE 96/17, a maior produção de biomassa também foi obtida para o cultivo em Meio 2, no entanto, após 60 dias de incubação.

Figura 18 - Produção da biomassa pelas linhagens de *Lentinula edodes* LE 96/22 (vermelho) e LE 96/17 (azul) em função do tempo e meio de cultivo. Barras indicam a média $\pm$ desvio padrão

Essas diferenças de rendimentos na biomassa do fungo podem ser atribuídas à presença de alguns compostos no meio de cultura (ROYSE; SANCHES-VAZQUES, 2003). Leatham (1985) observou rápida taxa de crescimento de *L. edodes* entre 15 e 30 dias de cultivo e constatou que nitrogênio (N) foi um nutriente limitante para o crescimento do fungo. A importância do nitrogênio no crescimento micelial também foi observada por Kim et al. (2003), que concluíram que fontes orgânicas de N são melhores para aumentar a produção de biomassa e exopolissacarídeos em relação às fontes inorgânicas. O efeito estimulante do crescimento observado com o uso das fontes orgânicas de nitrogênio, como o extrato de malte, pode ser atribuído à presença simultânea de carbono e nitrogênio (JONATHAN et al., 2004). Ao contrário,

as fontes inorgânicas, como os íons nitrato, têm sido relacionados a efeitos inibitórios de crescimento para alguns basidiomicetos (GRIFFIN, 1994).

Em pesquisa conduzida por Faria et al. (2003), fontes inorgânicas de N diminuíram a velocidade de crescimento de *L. boryana* e *L. edodes*, enquanto que, o meio suplementado com extrato de malte mostrou ser o melhor para a produção de biomassa destes fungos. Em estudos envolvendo outras espécies de fungos, também podemos comprovar a eficiência do uso das fontes orgânicas de nitrogênio. Em pesquisa com *Aspergillus terreus*, a utilização de substratos como peptona de soja e extrato de levedura, além de favorecer o crescimento micelial, possibilitou também a produção do metabólito lovastatina (LÓPEZ et al., 2003). Nesta mesma linha, a produção máxima de massa micelial e polissacarídeos extracelulares do fungo *Tremella mesenterica* ocorreu quando foram utilizados peptona ou extrato de milho, como fontes de nitrogênio (ELISASHVILI et al., 2003).

Outro cogumelo, *Psathyrella atroumbonata*, apresentou crescimento significativo quando cultivado em meio contendo extrato de malte e L-triptofano, enquanto que com a suplementação do meio com nitrato de sódio e sulfato de amônio, a produção micelial apresentou o pior resultado. Também para *Phellinus linteus*, o extrato de malte foi fonte adequada de nitrogênio para produção de biomassa e exopolissacarídeos (WANG et al., 2003).

Boyle (1998), considerando alguns fatores nutricionais que limitaram o crescimento de duas linhagens de *L. edodes*, constatou que a presença de carboidratos, micronutrientes e vitaminas no meio de cultivo não interferiram no crescimento dos fungos em relação ao controle, enquanto que fontes de nitrogênio (hidrolisado de caseína e glutamato) aumentaram as taxas de crescimento de ambas as linhagens.

Estas pesquisas reafirmam a vantagem de se trabalhar com microrganismos, pois é possível controlar os processos operacionais de maneira simples, além de apresentarem rápido crescimento. A vantagem de se trabalhar com o cultivo micelial dos basidiomicetos é que, além da redução do tempo de cultivo, inferior aos 2 a 3 meses necessários para obtenção do corpo de frutificação, há a possibilidade de otimização das condições para a produção de substâncias bioativas (KIM et al., 2003).

Geralmente, as curvas de crescimento dos microrganismos guardam uma relação com os processos metabólicos do fungo. Obviamente que as fases de crescimento dependem diretamente

das condições de cultivo, podendo afetar quali e quantitativamente o metabolismo destes microrganismos, porém, o que se conhece até o momento é que a fase estacionária ou idiofase tem sido relacionada com a interrupção do crescimento dos microrganismos e o início da produção de metabólitos secundários (DEMAIN, 2000). Portanto, é importante o estudo das condições de cultivo desta espécie fúngica, pois o mesmo pode contribuir para a otimização tanto da produção da biomassa micelial, quanto dos metabólitos secundários e exopolissacarídeos, importantes substâncias com diversas atividades biológicas produzidas por basidiomicetos, entre eles, o *L. edodes* (WANG et al., 2003).

Os resultados obtidos neste trabalho indicam a resposta das duas linhagens frente a fatores nutricionais, tais como o nitrogênio. Sugere-se que provavelmente compostos presentes no Meio 2, como os aminoácidos encontrados na formulação da peptona e do extrato de levedura, e o extrato de malte presente no Meio 3, proporcionaram um aumento no rendimento da biomassa do fungo em comparação com o Meio 1. Dessa forma, confirmou-se que o nitrogênio é um nutriente limitante ao crescimento deste fungo, pois sua presença pode estar influenciando na concentração celular, já que o mesmo está envolvido na síntese de proteínas (ADRIO; DEMAIN, 2003). Portanto, os vários trabalhos apresentados nesta discussão comprovam que há diferenças entre os vários fungos, quanto à otimização das condições de cultivo, e o conhecimento destes aspectos pode melhorar a produção de substâncias de interesse (KIM et al., 2003), já que o objetivo principal deste trabalho é a obtenção de substâncias antimicrobianas e não a produção de biomassa.

2.3.2 Inibição da *X. axonopodis* pv. *passiflorae* e *G. citricarpa* para seleção das melhores condições de cultivo de *L. edodes*

Com relação ao bioensaio contra *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, dos extratos obtidos do cultivo do fungo LE 96/22 em Meio 1, somente o extrato MM1T20ac apresentou atividade inibitória. Em relação aos demais meios, as amostras MM2T20ac, FM2T40ac, MM3T20cl, MM3T60ac, FM3T60cl e FM3T20ac apresentaram potencial antibacteriano (Tabela 2). Por outro lado, dos extratos da linhagem fúngica LE 96/17, somente os obtidos do filtrado tiveram atividade contra a bactéria (Tabela 3). Os resultados dos diâmetros dos halos de inibição das amostras ativas não diferiram significativamente entre si, mas apresentaram diferença

significativa em relação aos controles, pois o DMSO não inibiu a bactéria enquanto que os antibióticos tiveram um maior potencial de inibição mesmo em concentrações muito menores.

Embora o extrato aquoso e frações do corpo de frutificação de *L. edodes* já demonstraram inibição *in vitro* de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em experimentos conduzidos por Tonucci e Pascholati (2005), neste trabalho, para ambas as linhagens, os extratos ativos foram os obtidos através da extração com os solventes de baixa e média polaridade, clorofórmio e acetato de etila, enquanto que os extratos aquosos não apresentaram potencial antibacteriano.

Com relação aos ensaios de inibição de *G. citricarpa*, devido a pouca quantidade de amostra, somente foram testados os extratos obtidos da linhagem LE 96/17. Os resultados foram divididos em dois gráficos, sendo que o gráfico da Figura 19 expressa a inibição dos extratos do micélio enquanto que na Figura 20 observa-se os resultados obtidos com os extratos do filtrado do cultivo de *L. edodes*. Assim, pode-se constatar que os extratos obtidos do micélio apresentaram pouca inibição do crescimento micelial de *G. citricarpa*, sendo que a única atividade significativa (em torno de 18%) foi do extrato do micélio cultivado em Meio 2 por 60 dias e extraído com acetato de etila (MM2T60ac).

Em relação aos extratos obtidos do filtrado, a porcentagem de inibição foi maior comparada com os extratos do micélio, pois o extrato do filtrado do Meio 2, extraído com acetato de etila após 60 dias de cultivo (FM2T60ac) e o extrato obtido do filtrado do Meio 3, extraído com acetato de etila após 60 dias de cultivo (FM3T60ac) inibiram significativamente, em torno de 50%, o crescimento micelial *in vitro* do patógeno.

Entretanto, assim como nos bioensaios com a bactéria, os extratos aquosos obtidos tanto do micélio como do filtrado não apresentaram atividade antifúngica. Os extratos obtidos dos três meios no tempo 0 de cultivo, também não foram ativos, conforme esperado.

Tabela 2 - Diâmetro dos halos de inibição de *X. axonopodis* pv *passiflorae* em presença dos extratos brutos de *Lentinula edodes* (LE 96/22)

Extrato bruto* [4,5 mg/mL]	Halo de inibição (mm)**
MM1T20ac	09 ^b
MM2T20ac	09 ^b
FM2T40ac	12 ^b
MM3T20cl	09 ^b
MM3T60ac	09 ^b
FM3T60cl	09 ^b
FM3T20ac	10 ^b
Estreptomicina [24 µg/mL]	27 ^a
DMSO 99% puro	0 ^c

* Siglas dos extratos brutos, conforme descrito na Tabela 1, pág.48.

**Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey 5%

Tabela 3 - Diâmetro dos halos de inibição de *X. axonopodis* pv *passiflorae* em presença dos extratos brutos de *Lentinula edodes* (LE 96/17)

Extrato bruto* [4,5 mg/mL]	Halo de inibição (mm)**
FM1T40ac	08 ^b
FM2T40cl	11 ^b
FM2T60cl	12 ^b
FM2T60ac	14 ^b
FM3T60cl	10 ^b
FM3T40ac	13 ^b
FM3T60ac	12 ^b
Cloranfenicol [24 µg/mL]	26 ^a
DMSO 99% puro	0 ^c

* Siglas dos extratos brutos, conforme descrito na Tabela 1, pág. 48.

**Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey 5%

Figura 19 - Inibição do crescimento *in vitro* de *Guignardia citricarpa* com extratos obtidos do micélio de *Lentinula edodes* LE 96/17

Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey 5%

*As siglas dos extratos estão descritas na Tabela 1, página 48, a saber: MM – micélio do meio; t- tempo de cultivo; cl – clorofórmio; ac – acetato; DMSO - dimetilsulfóxido

Concentração dos extratos = 500 µg/mL

Figura 20 - Inibição do crescimento *in vitro* de *Guignardia citricarpa* com extratos obtidos do filtrado de *Lentinula edodes* LE 96/17

Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey 5%

*As siglas dos extratos estão descritas na Tabela 1, página 48, a saber : FM – filtrado do meio; T- tempo; cl- clorofórmio; ac – acetato; DMSO – dimetilsulfóxido.

concentração dos extratos = 500 µg/mL

ciclo = cicloheximida = 70 µg/mL;

Existem diferentes metodologias para se conduzir a extração de compostos ativos, podendo ser utilizado o fungo fresco, recém-coletado, ou após a secagem do material coletado, no entanto, vários estudos já utilizaram o micélio e o filtrado do cultivo líquido, após isolamento do fungo. Uma das justificativas para esta preferência está no fato de que pesquisas sobre o cultivo de cogumelos para produção de compostos bioativos mostraram que as maiores atividades biológicas ocorrem nos exudatos metabólicos liberados no caldo do cultivo, pois nem sempre os metabólitos extraídos do corpo de frutificação correspondem àqueles obtidos nas culturas miceliais para uma mesma espécie fúngica (ANKE, 1997).

Esse fato pode explicar a inatividade dos extratos aquosos obtidos do cultivo em diferentes condições, enquanto que alguns trabalhos envolvendo extrato aquoso do corpo de frutificação do Shiitake relataram a atividade contra fungos e bactérias fitopatogênicas (DI PIERO, PASCHOLATI, 2004; TONUCCI; PASCHOLATI, 2005). Além disso, a metodologia

envolvendo a partição com solventes de diferentes polaridades pode ter extraído o composto responsável pela atividade antimicrobiana.

Atualmente, existem vários procedimentos para a retirada das substâncias antibióticas do meio de cultura, através de métodos fundamentais, como precipitação, adsorção ou extração com solvente imiscível, sendo este último o mais utilizado para a maioria dos antibióticos (ROBBERS et al., 1997). Dependendo do tipo de solvente usado na extração, diferentes quantidades e tipos de produtos podem ser obtidos. O emprego de solventes apolares como o clorofórmio ou solventes altamente polares como metanol e água, são seletivos para certos grupos de compostos (VERPOORTE, 1998).

Hirasawa et al. (1999), utilizando o corpo de frutificação de *L. edodes* e extraíndo com clorofórmio e acetato de etila, obteve extratos que inibiram diversas bactérias em concentrações variando de 0,05 mg/mL a 50 mg/mL. Foi verificado que o extrato aquoso apresentou menor potencial de inibição para todas as bactérias testadas. O autor também relatou que provavelmente estejam presentes nos extratos orgânicos, substâncias como lentionina, derivados dissulfito e lentinana.

Além das diferentes metodologias de extração, uma das formas de se aumentar a produção dos metabólitos secundários é através do controle fisiológico, o que inclui a regulação das fontes de carbono, nitrogênio e fósforo (SPIZEK; TICHY, 1995). Como já vimos que fatores nutricionais são limitantes para o crescimento micelial, eles também influenciam no metabolismo da espécie cultivada e devemos também levar em consideração que as condições ideais para o crescimento micelial podem não ser as mesmas do que aquelas para a produção dos compostos bioativos de interesse (LUCHESE; HARRIGAN, 1993). Neste sentido, pesquisas recentes mostraram que para a maioria dos fungos, a limitação de nitrogênio diminui o crescimento, entretanto, aumenta a produção das substâncias bioativas (MANZONI et al., 1999; LÓPEZ et al., 2003). Se fossemos levar em consideração somente este fator, então as condições onde houve maior produção de biomassa não originariam extratos ativos, entretanto, o Meio 1, onde houve menor crescimento micelial, não produziu substâncias com alto potencial de inibição dos microrganismos testados.

Obviamente, outros fatores também podem influenciar na produção das substâncias bioativas, como por exemplo, a temperatura. As temperaturas ótimas para produção de metabólitos têm sido consideradas as mais baixas do que aquelas para o crescimento micelial,

mas podem variar consideravelmente. Também o tempo de incubação é outro ponto importante, e é dependente das condições de cultivo e das características de crescimento do fungo (LEE et al., 2004).

De acordo com Kim et al. (2003), o pH também pode ser um fator importante, mas está relacionado com a espécie do fungo, tanto que um pH levemente ácido (pH= 6,0) foi ótimo tanto para o crescimento micelial como para a produção de exopolissacarídeos por *Paecilomyces sinclairii*. No entanto, para *Pycnoporus sanguineus*, a produção de um metabólito antibacteriano, cinabarina (SMÂNIA et al., 1995), ocorreu em pH alcalino (pH = 9,0).

A condição de agitação da cultura em caldo também é importante, aumentando a biomassa micelial, exopolissacarídeos e outros produtos fúngicos (KIM et al., 2003). A aeração do meio torna-se importante também, pois em cultivo submerso costuma ocorrer um aumento da viscosidade do caldo e mudanças na morfologia celular, afetando o suporte de oxigênio, consequentemente, diminuindo o crescimento e a produção de metabólitos (XU; YUN, 2004).

A maioria dos basidiomicetos apresenta duas morfologias distintas quando em cultivo em meio líquido: formas filamentosas livres e “*pellets*” (que são massas miceliais densamente agrupadas e arredondadas). Muitos genes e mecanismos fisiológicos estão envolvidos no processo de morfogênese fúngica, sendo que em cultivo submerso, a natureza do inóculo, assim como as condições químicas (constituintes do meio) e físicas (temperatura, pH, forças mecânicas), contribuem para uma forma particular exibida (PAPAGIANNI, 2004). A agitação aplicada durante o cultivo cria forças que podem afetar os organismos de várias maneiras, como danificar a estrutura celular, mudar a morfologia ou, ainda, variar a taxa de crescimento e formação de metabólitos (XU; YUN, 2004). Portanto, a condição de agitação a 100 rpm, implementada como uma das variáveis de cultivo deste trabalho, resultou na alteração da morfologia, levando a formação de “*pellets*”.

Alguns autores relacionam a formação de “*pellets*” com a melhor produção de antibióticos e outros metabólitos. Como exemplo, a produção de ácido cítrico e itacônico por *Aspergillus niger* é aumentada quando o fungo apresenta-se na forma de “*pellets*” (EL-ENSHASY et al., 1999). Também foi observado para *Paecilomyces japonica*, que os “*pellets*” representaram a morfologia mais produtiva para a produção de exo-biopolímeros (SINHA et al., 2001). Ao contrário, o tipo de crescimento disperso mostrou melhores resultados para outros fungos, como a produção de

penicilina por *Penicillium chrysogenum* (SMITH et al., 1990), e cefalosporina por *Cephalosporium acremonium* (QUEENER; ELLIS, 1975).

Neste trabalho, para se estabelecer as melhores condições de cultivo para a produção de substâncias bioativas, foram mantidos fatores importantes como agitação, ausência de luminosidade e temperatura. Foram avaliados os substratos e o tempo de incubação, os quais revelaram que as condições para melhor produção de biomassa realmente diferem das condições para produção de metabólitos ativos. Assim, constatou-se que para a linhagem LE 96/22, o Meio 2 com 40 dias de cultivo foi a melhor condição para produção de substância antimicrobiana. Neste tempo de incubação, o microrganismo ainda estava em crescimento exponencial. Para LE 96/17, os Meios 2 e 3, com 60 dias de cultivo, foram as condições ideais selecionadas. No caso do Meio 2, neste tempo de incubação, a curva de crescimento do microrganismo estava na fase de declínio, enquanto que no Meio 3, o crescimento ainda era exponencial. Assim, não se pode afirmar que a produção de substâncias bioativas está relacionada somente à idiofase.

Com relação a pouca atividade expressa pelos extratos do micélio, pode-se deduzir que as substâncias potencialmente antimicrobianas foram liberadas extracelularmente e posteriormente extraídas pelos solventes orgânicos, entretanto, outra possibilidade para esta baixa atividade seria devido à ineficiência da metodologia de extração. O uso dos solventes, principalmente o clorofórmio que é altamente apolar, poderia estar comprometendo a eficiência da extração devido à imiscibilidade com o conteúdo de água intracelular ainda presente no micélio.

Assim, além de se estabelecer as melhores condições para o cultivo em grande escala, estabeleceu-se também uma nova metodologia de extração, no intuito de otimizar a obtenção de compostos ativos presentes no micélio.

2.3.3 Inibição do crescimento micelial de *G. citricarpa* com extratos obtidos por nova metodologia

Os resultados de inibição do crescimento micelial de *G. citricarpa*, utilizando nova metodologia de extração, estão expressos na Figura 21. Observa-se que o micélio da linhagem LE 96/17, extraído com etanol e etanol 70% cultivado no Meio 3, apresentou maior potencial antifúngico (Figura 22). Por esta nova metodologia, os extratos obtidos do filtrado de LE 96/17, mantiveram a atividade antifúngica, inibindo em torno de 30 e 40% o crescimento micelial do

fungo (AqM2 e AqM3). Pela metodologia anterior, os extratos do micélio cultivados em M2 (MM2T60ac) e M3 (MM3T60cl) tiveram um potencial inibitório de cerca de 20% e menos que 10%, respectivamente. Pela nova metodologia, o potencial de inibição aumentou para cerca de 30% e 70%, respectivamente, nas mesmas condições de cultivo, ou seja, o aumento do potencial destes extratos é devido à eficiência da nova metodologia de extração (percolação).

O processo de percolação tem como característica a extração exaustiva das substâncias ativas, sendo indicada na extração de substâncias presentes em pequenas quantidades ou pouco solúveis (SIMÕES et al., 2002) e tem sido utilizada com sucesso na obtenção de compostos ativos de plantas (HEIDARI et al., 2007; KUCINSKAITE et al., 2007).

Para a linhagem LE 96/22, entretanto, o extrato aquoso obtido do filtrado foi mais ativo que os do micélio, inibindo em torno de 40% o crescimento *in vitro* do patógeno.

O efeito inibitório do cogumelo *L. edodes* sobre o agente causal da MPC já havia sido observado *in vivo*, utilizando o extrato aquoso do corpo de frutificação em tratamentos pós-colheita dos frutos, reduzindo o aparecimento das lesões em mais de 50% em relação ao controle (TOFFANO, 2005).

A quitosana, um biopolímero de alta massa molecular, também inibiu tanto o crescimento micelial *in vitro* de *G. citricarpa*, como o aparecimento de lesões nos frutos em tratamento pós-colheita (RAPUSSI, 2006).

Em pesquisa envolvendo o controle biológico de *G. citricarpa*, verificou-se que a levedura *S. cerevisiae* inibiu o crescimento *in vitro* deste fungo, entretanto, a inibição foi atribuída à produção de compostos voláteis produzidos pela levedura durante o crescimento em placas contendo ambos microrganismos. Por outro lado, o filtrado do cultivo da levedura não apresentou efeito sobre o crescimento micelial do patógeno (FIALHO, 2004). Além da levedura, o potencial de fungos filamentosos também já foi testado quanto à eficiência no controle biológico desta doença (RODRIGUES, 2006). Contudo, ainda existem poucos trabalhos envolvendo o controle biológico de *G. citricarpa*.

A busca por alternativas de controle para este patógeno faz-se importante devido ao alto custo empregado no uso de fungicidas para o controle da doença e principalmente pela constatação de isolados resistentes aos produtos atuais (RODRIGUES et al., 2007).

Figura 21 - Inibição do crescimento micelial *in vitro* de *Guignardia citricarpa* por diferentes extratos de *Lentinula edodes* cultivados em grande escala

* Indica diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%

Barras representam a média $\pm$ desvio padrão

As siglas dos extratos estão descritas nas Figuras 14, 15 e 16, a saber: Et – extrato etanólico do micélio; Et70 – extrato etanólico 70% do micélio; AqM – extrato aquoso do micélio; AqF – extrato aquoso do filtrado; Fac – extrato acetato do filtrado; DMSO – dimetilsulfóxido.

A sigla 96/22 indica a linhagem LE 96/22; nos extratos da linhagem LE 96/17 foi suprimida esta identificação.

Concentração dos extratos = 500 $\mu\text{g/mL}$

Ciclo = cicloheximida 70 $\mu\text{g/mL}$

Figura 22 - Inibição do crescimento micelial de *G. citricarpa*. ETM3 – extrato etanólico do micélio do cultivo em Meio 3 (LE 96/17); ET70M3 - extrato etanólico 70% do micélio do cultivo em Meio 3 (LE 96/17); DMSO – Dimetilsulfóxido. Foto tirada 18 dias após repicagem

2.3.4 Inibição do crescimento micelial de *C. sublineolum*

A atividade antifúngica contra *C. sublineolum* também foi observada principalmente com os extratos obtidos da linhagem LE 96/17. Assim como para a *G. citricarpa*, o extrato mais ativo foi o EtM3, entretanto a taxa de inibição ficou em torno de 40%. Por sua vez, o extrato Et70M3 não inibiu significativamente esta espécie de fungo. Os extratos aquosos do micélio e os do filtrado também não apresentaram inibição significativa (Figura 23).

Os extratos obtidos da linhagem LE 96/22 apresentaram pouca ou nenhuma atividade inibitória, sendo que a maior taxa de inibição obtida foi em torno de 20%.

Figura 23 - Inibição do crescimento micelial *in vitro* de *Colletotrichum sublineolum* por diferentes extratos de *Lentinula edodes* cultivados em grande escala

* Indica diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%

Barras representam a média $\pm$ desvio padrão

As siglas dos extratos estão descritas nas figuras 14, 15 e 16, a saber: Et – extrato etanólico do micélio; Et70 – extrato etanólico 70% do micélio; AqM – extrato aquoso do micélio; Faq – extrato aquoso do filtrado; Fac – extrato acetato do filtrado; DMSO – dimetilsulfóxido.

A sigla 96/22 indica a linhagem LE 96/22; nos extratos da linhagem LE 96/17 foi suprimida esta identificação.

concentração dos extratos = 500 μ g/mL

ciclo = cicloheximida 70 μ g/mL;

Pelos resultados obtidos, verificou-se novamente a eficiência da metodologia de extração de compostos do micélio e a superioridade da linhagem LE 96/17 em termos de potencial antimicrobiano.

Paccola et al. (2001) já haviam relatado a presença de um composto fungistático presente tanto no micélio, como no corpo de frutificação e no filtrado do cultivo de *L. edodes*. O composto

inibiu a multiplicação de células de *Candida albicans*. Ngai e Ng (2003) também isolaram uma proteína, a lentina, que inibiu os fungos *Pysalospora piricola*, *Botrytis cinerea* e *Mycosphaerella arachidicola*, no entanto, o isolamento foi a partir do corpo de frutificação de *L. edodes*.

Em relação ao *C. sublineolum*, Tonucci e Pascholati (2005) realizaram bioensaios com o extrato aquoso do corpo de frutificação de *L. edodes* e verificou que as linhagens LE 96/17 e LE 96/22 não inibiram a germinação de esporos, entretanto reduziram a formação de apressórios do fungo. Em relação aos ensaios do crescimento micelial, somente o extrato obtido da linhagem LE 96/22 foi ativo, reduzindo em cerca de 80% o crescimento do micélio em relação ao controle.

Embora experimentos anteriores tenham relatado maior potencial antimicrobiano da linhagem LE 96/22 em relação à LE 96/17 (TONUCCI; PASCHOLATI, 2005; TOFFANO, 2005), principalmente em se tratando de controle de fitopatógenos, neste trabalho observou-se o oposto. Possivelmente, as condições de cultivo tenham influenciado negativamente a produção de metabólitos ativos deste fungo, ou mesmo a metodologia de extração. O fato é que tanto para *G. citricarpa*, quanto para *C. sublineolum*, a linhagem LE 96/17 foi a que apresentou os melhores resultados e a atividade para ambos os patógenos se concentrou basicamente no mesmo extrato (ETM3), reforçando a presença de algum composto com potencial fungicida ou fungistático.

A partir destes resultados, procedeu-se então às análises químicas dos extratos ETM3 e ET70M3. A revelação dos extratos em placas de TLC com vanilina e sob luz UV, indicou que as substâncias presentes possuíam RF semelhantes. Assim, deu-se seqüência à análise do extrato ETM3, por apresentar maior quantidade de biomassa que o extrato ET70M3 (1,9 gramas e 330 mg, respectivamente). De acordo com os espectros de RMNH¹, observa-se intensos sinais na região entre 3.0 e 5.0 ppm (Figura 24), enquanto que no espectro do controle do Meio 3 (CM3) estes sinais estão ausentes (Figura 25). Estes sinais característicos nesta região condizem com a presença de polissacarídeos, inclusive as glucanas, que possuem perfil muito próximo ao obtido no espectro (LO et al., 2007), entretanto, para a confirmação desta substância, outras análises são necessárias, como a RMNC¹³. O fato é que estes compostos não estão presentes no meio de cultivo, indicando que podem ter sido produzidos durante o cultivo *in vitro* do fungo e podem estar relacionados com a atividade antifúngica verificada.

Etanol/70-meio 3

Figura 24 - Espectro em RMN¹H do extrato etanólico obtido do micélio de *Lentinula edodes* cultivado em Meio 3 (ETM3) (200 Hz)

Figura 25 - Espectro em RMN¹H do extrato controle do meio de cultivo de *Lentinula edodes* (Meio 3) (200 Hz)

Os resultados da análise do espectro de massa do extrato e do controle do meio correspondente estão mostrados na Figura 26. Cada um dos picos que se observa nos espectros representa um composto, cuja massa molecular está apontada acima do pico. Eliminando os picos semelhantes de ambos os extratos (grifados em vermelho), verifica-se a presença ainda de muitos compostos que provavelmente foram produzidos ou podem ser constitutivos do fungo. Segundo a análise feita, conseguiu-se detectar compostos com massa molecular de até 830 m/z. Alguns

destes compostos se destacam por estar em maior quantidade, enquanto outros devem estar presentes em quantidades ínfimas. Destes compostos presente em baixas quantidades, observa-se os picos 157 e 262, que condizem com substâncias de peso molecular semelhante e que já foram isoladas de *L. edodes*. Trata-se do 1,2,4,5-tetratiano (Figura 27), cujo peso molecular é 156,318 e do n- γ -glutamil-ornitina (Figura 28), com peso molecular de 261,227. Para a confirmação da presença destes compostos já descritos, e de possíveis novos compostos, é necessária a fragmentação destes espectros para a elucidação estrutural das moléculas. Portanto, não foi possível associar os resultados da RMNH¹ com os dados do espectro de massa. O 1,2,4,5-tetratiano foi isolado do cogumelo *L. edodes* fresco após ser extraído com água em pH alcalino, e purificado em coluna de sílica eluída com hexano/éter. Este composto sulfúrico, assim como outros 18 compostos isolados, estão relacionados ao odor característico do fungo (CHEN; HO, 1986).

Dentre os peptídeos isolados deste cogumelo, estão certos γ -glutamil peptídeos, como o ácido lentínico, a n- γ -glutamil-ornitina, γ -glutamil-histidina, γ -glutamil-a-lisina, γ -glutamil-cistina, γ -glutamyl-nicotinamida e γ -glutamil-ácido glutâmico. Estes peptídeos foram isolados do extrato etanólico do cogumelo seco. Durante os procedimentos de extração e purificação, envolvendo eluição em coluna com diferentes resinas, extrações em diferentes condições, os compostos foram monitorados através da revelação em placas de TLC com ninidrina. Os autores consideram que estes compostos são pouco citados na literatura devido a dificuldade no procedimento de extração e não pela ausência destes peptídeos, os quais podem já foram isolados de cérebro bovino e urina humana (AOYAGI et al., 1982).

Figura 26 - Espectro de Eletrospray (ESI) do extrato etanólico obtido do micélio de *Lentinula edodes* cultivado em Meio 3 (ETM3) (A) e o respectivo controle do meio de cultivo CM3 (B) em modo positivo. Setas indicam os picos 157 e 262

Figura 27 - Estrutura química do 1,2,4,5-tetratiano

Figura 28 - Estrutura química do n-γ-glutamyl-ornitina

2.3.5 Redução da infectividade do TMV

Para o bioensaio realizado com o TMV, o único extrato não testado foi o Et70M2 da linhagem LE 96/17, pois a quantidade obtida não foi suficiente para os testes. Todos os demais extratos foram ensaiados duas vezes para a atividade inibitória.

O extrato que reduziu significativamente o número de lesões foi o extrato aquoso do micélio de LE 96/17, cultivado em M2 (AqMM2). O número médio de lesões de dois bioensaios para este tratamento foi de 18 por meia-folha, enquanto que a média de lesões do controle (água) foi de 100 e para o controle do meio (CM2aq) o número médio foi de 93 lesões (Tabela 3). Dessa

maneira, observa-se na Figura 29 que a taxa de inibição foi cerca de 82% em relação à água e cerca de 80% em relação ao controle CM2aq. Todos os outros tratamentos não inibiram significativamente a infectividade do TMV. Alguns tratamentos (FacLE96/22, EtM3LE96/17, AqMM3LE96/17, FacM3LE96/17), ao contrário, estimularam a infectividade, aumentando o número de lesões em relação ao controle.

Tabela 4 - Número de lesões em folhas de fumo e porcentagem de inibição da infectividade do TMV em resposta a diferentes tratamentos

Extrato bruto¹	Nº lesões*
ETLE96/22	98,2 ± 11,3 ^{abc}
Et7096/22	88,1 ± 6,5 ^{abc}
Fac96/22	112,1 ± 11,3 ^{ab}
AqM96/22	90,1 ± 7,8 ^{abc}
AqF96/22	79,6 ± 8,9 ^{bc}
EtM2LE96/17	87,6 ± 8,1 ^{abc}
FacM2LE96/17	83 ± 8,7 ^{abc}
AqMM2LE96/17	18 ± 3,0 ^d
AqFM2LE96/17	69,2 ± 6,1 ^c
EtM3LE96/17	120,1 ± 9,9 ^a
Et70M3LE96/17	89,8 ± 6,25 ^{abc}
FacM3LE96/17	102,2 ± 9,6 ^{abc}
AqMM3LE96/17	113,2 ± 10,0 ^{ab}
AqFM3LE96/17	91,6 ± 10,67 ^{abc}
CONTROLEM2ac	86,3 ± 14,5 ^{abc}
CONTROLEM3ac	80,5 ± 10,5 ^{abc}
CONTROLEM2aq	93,1 ± 3,9 ^{abc}
CONTROLEM3aq	94 ± 9,5 ^{abc}
Água	100,4 ± 8,6 ^{abc}

* Letras diferentes nas linhas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey 5%.
Média ± erro padrão

¹As siglas dos extratos correspondem às siglas da figura 29.

Figura 29 - Inibição da infectividade do TMV em folhas de fumo, por diferentes extratos de *Lentinula edodes*

* Indica diferença significativa pelo teste de Tukey 5%

Barras representam a média $\pm$ erro padrão

As siglas dos extratos estão descritas nas figuras 14, 15 e 16, a saber: Et – extrato etanólico do micélio; Et70 – extrato etanólico 70% do micélio; AqM – extrato aquoso do micélio; Faq – extrato aquoso do filtrado; Fac – extrato acetato do filtrado;

CM2ac, CM3ac, CM2aq e CM3aq = Controles (acetato e aquoso) dos meios 2 e 3, respectivamente.

Embora a metodologia de extração deste trabalho, utilizando diferentes solventes, tenha buscado ampliar o espectro de substâncias com potencial antimicrobiano, essa atividade somente foi encontrada no extrato aquoso do micélio. Observa-se que este extrato ativo contra o vírus não apresentou atividade antifúngica significativa contra *G. citricarpa* e *C. sublineolum*, o mesmo ocorrendo para o extrato ativo contra os fungos, sendo que o extrato ETM3 até estimulou o

aparecimento das lesões em relação ao controle. Chen et al. (1993) conseguiram isolar uma proteína inativadora de ribossomo, a partir da planta *Phytolacca americana*, a qual também inibiu o TMV, mas da mesma forma que os resultados deste experimento, a proteína não foi ativa contra as bactérias e fungos testados. Dessa forma, os autores atribuíram a inatividade provavelmente ao mecanismo de ação da substância ativa.

Os mecanismos de inibição viral podem envolver a competição entre o vírus e o inibidor pelo receptor dos hospedeiros, a agregação da partícula viral ou inibição de enzimas virais envolvidas em processos como replicação ou síntese de ácido nucléico viral (LINDEQUIST et al., 2005). Estes efeitos diretos antivirais são exibidos especialmente por moléculas menores. Efeitos antivirais indiretos são o resultado da atividade imunoestimulante de polissacarídeos ou outras moléculas complexas (BRANDT; PIRAINO, 2000).

Os primeiros registros da atividade antiviral de *L. edodes* foram obtidos por Kobayashi et al. (1987), que, ao pesquisarem o corpo de frutificação deste cogumelo, encontraram uma proteína identificada como FBP, a qual reduziu em 96% a infectividade do TMV na concentração de 20 ppm, entretanto o mecanismo de ação desta proteína permanece desconhecido (HIRAMATSU et al., 1987). Em outra pesquisa com o corpo de frutificação de *L. edodes*, Tochikura et al. (1987) isolaram uma glucana nomeada lentinana, a qual também mostrou atividade antiviral em bioensaios *in vitro* contra HIV e outros vírus animais.

Lecitina, uma proteína inativadora de ribossomo (RIP), tem sido relatada inibir infecção viral. Este tipo de proteína pode estar presente no corpo de frutificação dos cogumelos comestíveis, mas não no micélio vegetativo (YATOHGO et al., 1988), como no caso de glucanas, que estão presentes em ambos (TOMATI et al., 2004). Recentemente, uma proteína do corpo de frutificação de *L. edodes*, chamada lentina, mostrou atividade antiviral contra HIV-1 devido à inibição da transcriptase reversa (NGAI; NG, 2003).

Sano (1999), pesquisando substâncias com potencial antiviral, testaram a inibição da infectividade do TMV com alginato, um polissacarídeo aniônico, e observaram que na concentração de 3mg/mL, houve uma inibição da infectividade do TMV em torno de 80%. Di Piero et al. (2000) estudaram a inibição da infectividade do TMV com tratamentos a partir de suspensões celulares e o filtrado do cultivo de cianobactérias. Os autores relataram inibições na faixa de 54 e 70%, aproximadamente.

Tomando como base estas pesquisas, pode-se considerar que, em termos de concentração (500 µg/mL) e atividade (cerca de 80% de inibição), o extrato AqMM2 mostrou um resultado promissor. Sendo assim, iniciaram-se os processos de purificação deste extrato, na tentativa de se caracterizar o composto ativo. O primeiro fracionamento originou frações que foram novamente bioensaiadas com o TMV, juntamente com o extrato bruto ativo, para comparação dos resultados. Assim, verifica-se na Figura 30 que a atividade do extrato AqMM2 foi novamente confirmada em relação à redução da infectividade do TMV. Quanto às frações, avaliadas na concentração de 250 µg/mL, apresentaram diferentes valores de inibição, sendo que as frações 6/7, 8/9 e 10/11, inibiram significativamente o vírus em 95,5 %, 79 % e 34,4 %, respectivamente. Novamente, o número médio de lesões do extrato bruto foi cerca de 18 por meia-folha, enquanto que na fração 6/7, o número médio foi de 5. Portanto, esta fração mostrou-se mais ativa em relação ao extrato bruto, mesmo em menor concentração.

O aumento da atividade na fração originada pode ser devido a separação bem sucedida do composto ativo. No extrato bruto, estão presentes diversos compostos em diferentes concentrações, enquanto que na fração, o número de compostos é menor e provavelmente o composto ativo esteja presente em maior quantidade.

Com estes resultados, procedeu-se à análise de RMNH¹ destas frações. Observa-se na Figura 31, os espectros resultantes destas análises e pode-se verificar a presença de um sinal na região de 7,5 ppm e muitos sinais na região de 1,0 à 5,0 ppm, embora a intensidade dos mesmos seja diferente nas frações, mostrando-se mais intenso na fração mais ativa. Este fato pode estar relacionado diretamente com a atividade da fração, ou seja, as substâncias que produzem tais sinais podem ser as substâncias ativas. O sinal apresentado em 7,5 ppm é característico de composto aromático, enquanto que os demais sinais podem ser referentes à peptídeos, oligossacarídeos, aminoácidos, não revelando com certeza a natureza das substâncias presentes.

Em placas de TLC de sílica, após vários testes de eluição com diferentes proporções de solventes, comprovou-se a presença de composto revelado em UV e vanilina, e a presença de substâncias que revelam com ninhidrina. O RF dos compostos indicou que uma separação em coluna poderia ser bem sucedida.

Figura 30 - Inibição da infectividade do TMV em folhas de fumo pelo extrato aquoso do micélio de *Lentinula edodes* (AqMM2) e suas frações (Fr)

* Indica diferença significativa pelo teste de Tukey 5%. Barras representam a média $\pm$ erro padrão

Figura 31 - Espectro em RMN¹H da fração 6/7 (A), 8/9 (B) e 10/11 (C) do extrato aquoso do micélio de *Lentinula edodes* (400 Hz). Setas indicam sinal em 7,5 ppm

Como o perfil do espectro das frações ativas era semelhante e a massa da fração mais ativa era de apenas 16 mg, optou-se por reunir novamente as três frações ativas e refractioná-las, na tentativa de separar os compostos. Dessa forma, 40 mg da fração foram aplicadas em coluna contendo ODS, obtendo-se 16 subfrações, das quais, nas subfrações 4 à 9, observou-se ainda a presença das mesmas manchas em placas de TLC (Figura 32). As subfrações 10 à 12 e 13 à 16 apresentaram somente a mancha com maior RF, a qual não revelou com ninhidrina. Um novo fracionamento das subfrações 4 à 9 foi realizado, no entanto, sem sucesso. Como a quantidade de massa destas subfrações era bem reduzida, o fracionamento foi feito em cartucho de ODS, mas os compostos com diferentes RF continuaram a aparecer. Dessa forma, optou-se, pela realização de um novo bioensaio com as subfrações reunidas (4-9 e 10-12), para comparar a atividade (com e sem o composto que revela em ninidrina) na infectividade do TMV.

Figura 32 - Cromatografia em TLC das subfrações 4 à 9 e 10 à 12, reveladas com vanilina (A) e reveladas com ninidrina (B), indicando a presença de possíveis compostos peptídicos

Na Figura 33 estão expressos os resultados de redução da infectividade do TMV com as subfrações 4-9 e as subfrações 10-12, testadas na concentração de 100 µg/mL. Novamente, o extrato bruto foi testado como parâmetro de referência, bem como o controle do meio de cultivo do fungo. Observa-se uma redução na % de inibição do AQMM2 de 80 para 60%.

Provavelmente, o tempo e as condições de armazenagem podem ter influenciado na perda da atividade. Enquanto o controle (água) apresentou um número médio de lesões de 95,9 (de dois experimentos), o controle do meio estimulou o aparecimento das lesões (média de 114,5). As subfrações, assim como o extrato bruto, inibiram significativamente a infectividade do TMV em relação ao tratamento com água (Figura 34). Dessa forma, admite-se que ambas subfrações contêm o composto ativo.

Figura 33 - Inibição da infectividade do TMV em folhas de fumo pelo extrato aquoso do micélio de *Lentinula edodes* (AqMM2) e suas subfrações (subf.)

* Indica diferença significativa pelo teste de Tukey 5%

Barras representam a média ± erro padrão

Figura 34 - Sintomas de lesão necrótica local (seta) em folha de *N. tabacum* TNN (metodologia da meia-folha). Tratamento 9 – AQMM2; Tratamento 8 – Água. Foto tirada 03 dias após a inoculação

Em pesquisas envolvendo estudo químico visando o isolamento de compostos naturais, nem sempre se consegue chegar à identificação de uma substância pura, devido a sua complexidade. Assim, alguns trabalhos têm relatado a atividade biológica de frações parcialmente purificadas (KIM et al., 2003; PIRAINO; BRANDT, 1999; LAVI et al., 2006) ou mesmo a atividade dos extratos brutos, conforme descrito por Solak et al. (2006). Estes autores publicaram os resultados de uma seleção (screening) para a atividade antimicrobiana de extratos brutos de dois cogumelos comestíveis, *Clitocybe alexandri* e *Rhizopogon roseolus*.

No entanto, estas publicações fornecem informações relevantes como a atividade biológica, a metodologia de cultivo e extração, os parâmetros envolvidos na purificação, orientando novos trabalhos ou mesmo trazendo novas perspectivas. Um exemplo desta importância pode se constatar através de uma publicação recente, onde Gu et al. (2006) avaliaram o efeito sinérgico de uma fração do extrato aquoso do basidiocarpo de *Grifola frondosa* com interferon- α , na inibição do vírus da hepatite B (HBV vírus). Os resultados encontrados pelos autores são

promissores no tratamento da hepatite B crônica, indicando a relevância deste trabalho. Os autores não isolaram a substância ativa, mas sugerem que tal atividade pode estar relacionada à presença de polissacarídeos ou proteínas presentes na fração, necessitando, portanto, de um estudo químico mais detalhado.

Neste trabalho, como não foi possível isolar o composto ativo, procedeu-se a uma análise mais detalhada tanto do extrato bruto como das subfrações ativas, utilizando-se espectro de massa (Q-TOF) no modo positivo. Pelos resultados expressos nas Figura 35 e 36, observa-se que estão presentes muitos compostos nos extratos brutos e nas subfrações. Alguns deles se destacam, como o caso do pico 189, presente na subfração 4-9 (Figura 36) e presente também em menor expressão no extrato bruto (Figura 35). Outro pico presente nestas duas amostras, porém em menor quantidade, é o 207. Verifica-se também que alguns picos estão presentes tanto na subfração 4-9 como na subfração 10-12 (destaque em vermelho), indicando que esses compostos merecem um estudo mais detalhado, pois têm grande chance de estarem relacionados à atividade apresentada por estas subfrações.

Em pesquisa realizada na literatura sobre os compostos produzidos pelo *Lentinula edodes*, *Lentinus edodes* ou Shiitake, de massa molecular semelhantes aos encontrados nos espectros, encontramos as massas aproximadas 188 e 206 que correspondem respectivamente às substâncias lentionina (Figura 37) e hexatiepano (Figura 38).

Figura 35 - Espectro de Eletrospray (ESI) do extrato aquoso do micélio de *Lentinula edodes* (AqMM2), destacando a presença de picos com massa molecular 189 e 207 m/z

Figura 36 - Espectro de Eletrospray (ESI) da subfração 4-9 (A) e subfração 10-12 (B) do extrato aquoso do micélio de *Lentinula edodes*. Em destaque, os picos correspondentes às massas moleculares 189 e 207 m/z e um pico presente em ambas subfrações (301,1584 m/z)

Figura 37 - Estrutura química do 1,2,3,5,6-pentatiepano (lentionina)

Figura 38 - Estruturas química do 1,2,3,4,5,6-hexatiacicloheptano (hexatiepano)

A lenthionina, cuja massa molecular é 188,38, é conhecida por conferir o odor característico do shiitake e foi primeiramente isolada a partir do cogumelo seco (MORITA;KOBAYASHI, 1967). Além de conferir o odor, a lenthionina também já mostrou atividade antimicrobiana para diversas espécies de bactérias e fungos (WRATTEN; FAULKNER, 1976), mas não existem relatos de sua atividade na inibição de vírus. Este composto também foi isolado de uma alga vermelha, a *Chondria californica*, conhecida por apresentar propriedades antimicrobianas (WRATTEN; FAULKNER, 1976). A literatura relata

ainda que a extração deste composto sulfúrico é otimizada em pH em torno de 9.0 (CHEN;HO, 1986). Quanto ao hexatiepano, de massa molecular 206,42, este também é um composto sulfúrico já isolado do shiitake e reconhecido como um constituinte minoritário deste cogumelo.

Para confirmação da presença desses compostos, novas análises devem ser realizadas por espectrometria de massa, fragmentando o composto para se elucidar a sua estrutura.

Muitas das massas moleculares presentes nas amostras não foram encontradas na literatura, abrindo um caminho para novas descobertas. Por esta pesquisa em base de dados de produtos naturais, não foi possível identificar o composto revelado com ninidrina e o composto que apresenta sinal em torno de 7,0 ppm no espectro de RMNH¹.

Em relação às demais frações obtidas do extrato bruto ativo, a fração 15/16, embora tenha sido inativa, foi fracionada e a subfração 5/6 resultante também foi avaliada quanto à redução da infectividade do TMV na concentração de 200 µg/mL. No entanto, não apresentou atividade inibitória significativa em relação ao controle (água).

Muitas espécies de basidiomicetos produzem substâncias com potencial antiviral (MLINARIC et al., 2005) e muitas destas substâncias foram identificadas como peptídeos ou proteínas (GUO et al., 2005; CHU et al., 2005; SUN et al., 2003; NGAI et al., 2003; CHAN; YEUNG, 2006; HYUN et al., 2006; LEE et al., 2004). Outras, entretanto, pertencem à classe dos terpenos (MOTHANA et al., 2003).

As substâncias antivirais podem atuar como inibidores da infecção ou da multiplicação viral. Os inibidores da infecção previnem a infecção de ocorrer, quando inoculada nas folhas simultaneamente com os vírus. Os inibidores de multiplicação são substâncias que retardam a taxa de multiplicação do vírus infectante (SANO, 1997). Para verificar se o extrato bruto exerceu efeito na infectividade ou na multiplicação viral, foram conduzidos os ensaios conforme descrito no item 2.2.6.2.

Os resultados expressos na Figura 39 revelam que as preparações obtidas das lesões provocadas pela partícula viral e extraídas tanto do controle (CL) como do extrato bruto (TL), quando reinoculadas em plantas de fumo, novamente manifestaram as lesões necróticas, sem diferença estatística entre os tratamentos. Isto indica que, o extrato bruto não está inativando o vírus, ou seja, quando o extrato não está em contato com a partícula viral, a multiplicação volta a ocorrer normalmente.

Com este experimento também pode-se afirmar que onde não ocorreu a formação de lesões necróticas nas folhas, não existem partículas virais latentes, pois da mesma maneira, foram feitos extratos destes locais sem lesão que, quando reinoculados, não ocasionaram o aparecimento de sintomas de lesão local na planta.

Figura 39 - Número médio de lesões em folhas de fumo, resultantes da inoculação do extrato das lesões ocasionadas pela suspensão viral em água (CL) e pela suspensão viral em extrato bruto AQMM2 (TL).

Barras indicam média $\pm$ erro padrão

Ho et al. (2000), pesquisando a atividade antimicrobiana de antibióticos peptaibols, aplicaram o composto em folhas de fumo após a inoculação do TMV (2 horas e mais) e verificaram que houve inibição da infectividade do TMV. Os autores sugeriram que a inibição podia ser devida à formação de um complexo vírus-inibidor. Eles relataram também que o tratamento das folhas antes da inoculação diminuiu a eficácia da inibição do TMV.

No presente trabalho, a inoculação do TMV antes do extrato ativo e das subfrações poderia ser uma alternativa para se confirmar a atividade destas amostras.

2.3.6 Atividade das enzimas relacionadas a patogênese

Conforme já mencionado, Piccinin (2000) confirmou o potencial da lentinana e do extrato do corpo de frutificação do shiitake na redução da infectividade do TMV. No experimento conduzido pelo autor, as folhas de *Nicotiana tabacum* foram tratadas dois dias antes da

inoculação com o TMV. Neste caso, utilizando o pré-tratamento das folhas seguidas pela inoculação com o vírus, sugeriu-se que a redução da infectividade pode ter sido devido à indução de resistência na planta. Entretanto, no presente trabalho, o fato de se inocular o extrato bruto e suas frações simultaneamente com a suspensão viral e se avaliar o número de lesões após 2 à 3 dias da inoculação, os resultados sugerem que a inibição ocorreu diretamente na partícula viral.

Alguns trabalhos têm verificado que o extrato aquoso do basidiocarpo de *L. edodes* atua como um indutor de resistência biótico em tomateiro e pepineiro (SILVA et al., 2007; DI PIERO; PASCHOLATI, 2004) e podem contribuir para o aumento da atividade das enzimas relacionadas à indução de resistência no terceiro dia após o tratamento da planta (SILVA et al., 2007). Dessa forma, optou-se por realizar análises das enzimas relacionadas à indução de resistência, para confirmar se esta hipótese é verdadeira.

Quitinases são enzimas com atividade hidrolítica sobre a quitina e outros polímeros, que são produzidas pelas plantas em diferentes situações. Uma das atividades relacionadas a esta enzima é a sua resposta em defesa da planta na presença de um patógeno. As β -1-3-glucanases são enzimas que hidrolisam polímeros de β -1-3-glucana e também estão relacionadas à indução de resistência em plantas, principalmente quando expostas à patógenos fúngicos (KASPRZEWSKA, 2003), entretanto já foi comprovado que a infecção por TMV também pode causar o aumento de algumas destas glucanases (ORI et al., 1990).

Na Figura 40, observa-se os resultados da atividade das enzimas quitinase e glucanase em plantas tratadas com o extrato bruto. No ensaio envolvendo a quitinase, a inoculação do extrato bruto nas folhas de fumo não promoveu o aumento da atividade desta enzima em relação ao tratamento com água, no entanto, houve uma diminuição da atividade da quitinase nas folhas inoculadas com o extrato bruto e vírus. O fato deste tratamento ter reduzido o número de lesões na planta, mas não ter aumentado a produção da quitinase, não relaciona a inibição da infectividade do TMV com a indução desta enzima específica. Ainda na Figura 40, em relação à glucanase, observa-se um aumento significativo da atividade da enzima somente nas folhas tratadas com o controle do meio, sendo que os demais tratamentos não diferiram do controle (água). Por sua vez, na Figura 41, temos a determinação da atividade destas enzimas para a subfração ativa (Subf. 4-9). Verifica-se também uma redução na atividade da quitinase em todos os tratamentos em relação ao controle (água + vírus).

Com relação à glucanase, houve um pequeno aumento na atividade nos tratamentos em relação às folhas inoculadas com água apenas. Entretanto, os tratamentos não diferiram do controle (água + vírus), confirmando novamente que a atividade da subfração na redução da infectividade do TMV não está relacionada ao aumento da atividade das enzimas quitinase e glucanase.

Figura 40 - Atividades da quitinase e β -1,3-glucanase em folhas de fumo, sob diferentes tratamentos

* Indica diferença significativa pelo teste de Tukey 5%

Barras representam a média $\pm$ erro padrão

Figura 41 - Atividade da quitinase e β -1,3-glucanase em folhas de fumo, sob diferentes tratamentos

* Indica diferença significativa pelo teste de Tukey 5%
Barras representam a média $\pm$ erro padrão

Na Figura 42 estão apresentados os resultados da atividade da enzima fenilalanina amoníase (FAL) em relação aos tratamentos com o extrato bruto + vírus e o extrato bruto sem o vírus, além dos controles. A FAL está envolvida na rota de síntese de fitoalexinas (BONALDO et al., 2005). Observa-se com os resultados que, o controle do meio + vírus e o controle do meio sem o vírus aumentaram a atividade da FAL. Contudo, a ativação deste mecanismo de resistência da planta não foi suficiente para conter o aparecimento de lesões nos ensaios de infectividade do TMV, ao contrário, vimos pelos experimentos anteriores que o controle do meio chegou a estimular o aparecimento das lesões em relação ao controle (água).

Outra enzima analisada foi a polifenoloxidase (POL), que representa um conjunto de enzimas responsáveis pela oxidação de compostos fenólicos. Estão presentes em plantas na forma inativa, mas são ativadas no momento do rompimento das células por invasão de um patógeno ou insetos (THYPYAPONG; STEFFENS, 1997). A Figura 43 expressa o resultado da atividade desta

enzima, mostrando que não houve diferença estatística entre os tratamentos, comprovando que a inibição da infectividade do TMV não estava relacionada à sua atividade.

As peroxidases são enzimas relacionadas à defesa celular, pois participam da lignificação, suberização e metabolismo da parede celular. São ativadas em resposta a ferimentos, para restaurar tecidos danificados e em resposta a presença de patógenos e insetos (HIRAGA et al., 2001). Em estudos de indução de resistência, tem-se associado o seu aumento com a redução da severidade de doenças (MADI; KATAN, 1998). Na Figura 44 estão expressos os resultados da atividade da peroxidase em relação aos tratamentos utilizando o extrato bruto e os controles. Observa-se que, assim como ocorreu para a quitinase, houve uma diminuição da atividade nas folhas tratadas com o extrato bruto + vírus. O aumento desta enzima ocorreu somente no tratamento controle do meio + vírus, novamente o tratamento que estimulou o aparecimento das lesões em relação ao controle. Nos ensaios com a subfração 4-9, não se observou diferença estatística em nenhum dos tratamentos utilizados (Figura 45).

Figura 42 - Atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL) em folhas de fumo, sob diferentes tratamentos. A unidade da FAL é dada em concentração de ácido *trans*-cinâmico.min⁻¹.mg⁻¹.prot

* indica diferença significativa pelo teste de Tukey 5%
Barras representam a média ± erro padrão

Figura 43 - Atividade da polifenoloxidase (PPO) em folhas de fumo, sob diferentes tratamentos
Barras representam a média $\pm$ erro padrão.

Figura 44 - Atividade da peroxidase em folhas de fumo, sob diferentes tratamentos

* indica diferença significativa pelo teste de Tukey 5%

Barras representam a média $\pm$ erro padrão

Figura 45 - Atividade da peroxidase em folhas de fumo, sob diferentes tratamentos
Barras representam a média $\pm$ erro padrão

Assim sendo, não houve diferença estatística nas atividades da PPO, FAL, peroxidase, quitinase e glucanase que possam comprovar que a inibição da infectividade do TMV pelo extrato aquoso de *L. edodes* e pela subfração 4-9 está relacionada à indução de resistência nas plantas de fumo. Embora alguns estudos envolvendo a indução de resistência em plantas e produção de fitoalexinas, tenham demonstrado ser possível a redução da atividade da PPO, FAL, quitinase e glucanase mesmo em contato com indutores (OSWALD et al., 2004; SILVA et al, 2007), a atividade da peroxidase, nestes trabalhos, respondeu como esperado, aumentando após 3 dias do tratamento com ASM e outros indutores. Dessa forma, sugere-se que a peroxidase pode ser um marcador mais eficiente da indução de resistência em plantas em relação às demais enzimas.

Em ensaios conduzidos por Silva et al. (2007) em tomateiro, a atividade da peroxidase foi aumentada em relação ao controle após 03 dias do tratamento com ASM e outros indutores bióticos. Portanto, com estes resultados, pode-se afirmar que a hipótese de ação dos mecanismos de defesa da planta inibindo a infectividade do TMV não é válida. Contudo, obteve-se resultados interessantes, pois pode-se observar que nos tratamentos onde ocorreu um estímulo no

aparecimento das lesões, houve um aumento na atividade da peroxidase e quitinase. Por sua vez, o aumento da FAL pelo tratamento controle do meio (Cont.meio e Cont. meio + vírus) pode estar relacionado à presença de alguma substância no meio de cultivo.

É conhecido que os vírus podem induzir a resistência sistêmica adquirida (RSA), o acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (Proteínas-RP) e as reações de hipersensibilidade em muitas plantas (MALAMY et al., 1990). No caso de plantas de fumo contendo o gene N de resistência e infectadas pelo TMV, ocorre a morte programada das células e o aparecimento das lesões necróticas. Esta resposta de hipersensibilidade tem sido atribuída à proteínas presentes na capa protéica do vírus (CULVER, 2002). A resposta de hipersensibilidade está associada a um aumento de AS endógeno e conseqüente indução de proteínas-RP (MALAMY et al., 1990), entretanto também tem-se observado aumentos de β -glucanases e quitinases decorrentes da formação de lesões necróticas em *N. tabaccum* TNN inoculadas com o TMV (ROSS, 1961). Algumas peroxidases aniônicas, localizadas nos espaços intercelulares, também foram induzidas nestas condições, sendo que, altos níveis de peroxidase nas folhas podem culminar com lesões necróticas de menor área (MUR et al., 1997). Pesquisas afirmam que a produção de AS inicia-se 38 horas após a inoculação com o TMV (MALAMY et al., 1990). Outros autores acreditam que esse tempo é menor, em torno de 30 horas (HUANG et al., 2006). O fato é que esse intervalo de tempo entre a inoculação e o aumento do AS endógeno sugere que a infecção viral é responsável pela ativação dos mecanismos de resistência mediados pelo AS, antes da ocorrência da morte celular e conseqüente aparecimento das lesões necróticas.

Dessa forma, pode-se sugerir de acordo com os resultados dos experimentos controles do presente trabalho que, como o controle do meio não inibiu o TMV, a quantidade do vírus na folha tornou-se muito alta, e a presença do TMV pode estar ativando os mecanismos de defesa da planta. Por outro lado, como o extrato bruto inibiu a partícula viral em altos níveis (60%), a quantidade do vírus pode não ter sido suficiente para estimular a defesa da planta a níveis detectáveis pelas análises bioquímicas. Esta hipótese justifica a redução da produção das enzimas em relação ao controle, conforme observado nas Figuras 40 e 41, onde a atividade da quitinase foi menor nas folhas tratadas com o extrato e a subfração ativa do que quando comparada com o tratamento (controle meio + vírus e água + vírus, respectivamente). O mesmo observou-se na Figura 44, onde ocorreu uma redução da atividade da peroxidase no extrato bruto + vírus em relação ao controle + vírus.

3 CONCLUSÕES

Com este trabalho pode-se concluir que:

- Fontes orgânicas de nitrogênio podem ser um fator limitante na produção de biomassa de *L. edodes*;
- As melhores condições de cultivo para obtenção de biomassa de *L. edodes* não são as mesmas para a produção de substâncias antimicrobianas por este fungo;
- Extratos obtidos do cultivo *in vitro* de *L. edodes* possuem potencial antimicrobiano para os fitopatógenos *X. axonopodis pv passiflorae*, *Colletotrichum sublienum*, *Guignardia citricarpa* e *Tobacco mosaic virus*;
- A metodologia de extração utilizando a percolação permitiu que substâncias bioativas do micélio fossem extraídas;
- Os extratos que apresentaram atividade antifúngica contêm compostos que não estão presentes no meio de cultivo;
- Algumas substâncias que podem estar presentes no extrato e na fração ativa são compostos sulfúricos, como a lenthionina e o hexatiopano;
- O extrato ativo contra a partícula viral não exibiu atividade viricida;
- A redução da infectividade do TMV não está relacionada à indução de resistência nas plantas.

REFERÊNCIAS

- ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Fungal Biotechnology. **International Microbiology**, Heidelberg, v. 6, n. 3, p. 191-199, 2003.
- ALI, N.A.A.; MOTHANA, R.A.A.; LESNAU, A.; PILGRIM, H.; LINDEQUIST, U. Antiviral activity of *Inonotus hispidus*. **Fitoterapia**, Milano, v. 74, p. 483-485, 2003.
- AN, T.; HUANG, R.; YANG, Z. Alkaloids from *Cynanchum komarovii* with inhibitory activity against the tobacco mosaic virus. **Phytochemistry**, Oxford, v. 58, p. 1267-1269, 2001.
- ANKE, T. **Fungal biotechnology**. London: Chapman and Hall, 1997.
- AOYAGI, Y.; SUGAHARA, T.; HASEGAWA, T.; SUZUKI, T. γ -Glutamyl derivatives of basic aminoacids in *Lentinus edodes*. **Agricultural Biological Chemistry**, Tóquio, v. 46, p. 1939 - 1940, 1982.
- AVERNA-SACCÁ, R. Pústulas pretas sobre laranjas doces produzidas pelo *Phoma citricarpa*. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 15, p. 668-674, 1940.
- BAAYEN, R.P.; BONANTS, P. J. M.; VERKLEY, G.; CARROLL, G. C.; VAN der Aa, H. A.; WEERDT, M. de; VAN BROUWERSHAVEN, I.R.; SCHUTTE, G.C.; MACCHERONI Jr., W.; de BLANCO, C.G.; AZEVEDO, J.L. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of wood plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, Lancaster, v. 92, p.464-477, 2002.
- BADALYAN SM. Antiprotozoal activity and mitogenic effect of mycelium of culinary-medicinal shiitake mushroom *Lentinus edodes* (Berk.) Singer (*Agaricomycetidae*). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Washington, v. 6, p. 131-138, 2004.
- BALDASSARI, R.B. **Influência de frutos sintomáticos de uma safra na incidência de *Guignardia citricarpa* na safra subsequente e período de suscetibilidade de frutos de laranjeiras ‘Natal’ e ‘Valência’**. 2001. 120 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2001.
- BALDASSARI, R.B.; MARTE, I.B.; ANDRADE, A.G.; SOUZA, D.C.G.; MORETO, C.; GOES, A. Indução da expressão precoce de sintomas de *Guignardia citricarpa* em frutos de laranja ‘pêra-rio’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, p. 269-275, 2007.
- BELLOTTTE, J.A.M.; ANDRADE, A.G. de; CARVALHO, C.R.B.; BALDASSARI, R.B.; GOES, A. de. Desenvolvimento precoce de sintomas da mancha preta causada por *Guignardia citricarpa* em frutos de laranja ‘Pêra-Rio’ através do tratamento com ethephon. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, p.397S, 2001.

BENDER S.; DUMITRACHE-ANGHEL, C. N.; BACKHAUS, J.; CHRISTIE, G.; CROSS, R.F.; LONERGAN, G. T.; BAKER, W. L. A case for caution in assessing the antibiotic activity of extracts of culinary-medicinal Shiitake mushroom [*Lentinus edodes* (Berk.)Singer] (*Agaricomycetidae*). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Washington, v. 5 p. 31–35, 2003.

BERGAMIM FILHO A.; AMORIM, L. Doenças com período de incubação variável em função da Fenologia do hospedeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 561-565, 2002.

BOER, C.G.; OBICI, L.; SOUZA, C.G.M.; PERALTA, R.M. Decolorization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula (Lentinus) edodes* producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme **Bioresource Technology**, Essex, v. 94, p. 107–112, 2004.

BOL, J. F.; LINTHORST, H. J. M; CORNELISSEN, B. J. C. Plant Pathogenesis-Related Proteins Induced by Virus Infection. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, 113-138, 1990.

BONALDO, S.M.; PASCHOLATI, S.F.; ROMEIRO, R.S. Indução de resistência: Noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P. PASCHOLATI, S.F.; REZENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas à patógenos e insetos**. Piracicaba: Fealq, 2005. p. 11-28.

BOYLE, D. Nutritional factors limiting the growth of *Lentinula edodes* and other white-rot fungi in wood. **Soil Biology and Biochemistry**, Queensland, v. 30, p. 817-823, 1998.

BRADFORD, M.A. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Maryland, v. 72, p.248-254, 1976.

BRANDT CR; PIRAINO F. Mushroom antivirals. Recent Res Dev **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, New York, v. 4, p. 11–26, 2000.

CASELA, C.R.; FERREIRA, A.S. **Antracnose do sorgo (*Colletotrichum graminicola*)**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS.1998. (Circular Técnica, 28).

CASELA, C.R.; FREDERIKSEN, R.A. Survival of *Colletotrichum graminicola* sclerotia in sorghum stalk residue. **Plant Disease**, St. Paul, v. 77, p. 825-827. 1993.

CASELA, C.R., FERREIRA, A.S; SANTOS, F.G. Differences in competitive ability among races of *Colletotrichum graminicola* in mixtures. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 217-219, 2001.

CAVALCANTI, L.S.; BRU NELLI, K.R.; STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P. PASCHOLATI, S.F.; REZENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas à patógenos e insetos**. Piracicaba: Fealq, 2005. p. 81-124

- CHAKRABORTY, I. MODAL, S.; PRAMANIK, M.; ROUT, D.; ISLAM, S.S. Structural investigation of a water-soluble glucan from an edible mushroom, *Astraeus hygrometricus*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 339, p. 2249-2254, 2004.
- CHANG, R. Functional properties of edible mushrooms. **Nutrition Reviews**, New York, v.54, n.11, p.91-93, 1996.
- CHANG, S.T.; HAYES, W.A. **The biology and cultivation of edible mushrooms**. New York: Academic Press, 1980.
- CHANG, S. T.; MILES, P. G. **Edible mushrooms and their cultivation**. Boca Raton: CRC Press, 1989. p. 189-223.
- CHAN, S.L.; YEUNG, J.H.K. Polysaccharide peptides from COV-1 strain of *Coriolus versicolor* induce hyperalgesia via inflammatory mediator release in the mouse. **Life Sciences**, London, v. 78, p. 2463 – 2470, 2006.
- CHEN, C.C.; HO, C.T. Identification of Sulfurous Compounds of Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes* Sing.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 34, p. 830-833, 1986.
- CHEN, Z.C.; ANTONIW, J.F.; WHITE, R.F. A possible mechanism for the antiviral activity of pokeweed antiviral protein. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 42, 249-258, 1993.
- CHEUNG, L.M.; CHEUNG, P.C.K.; OOI, V.E.C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. **Food Chemistry**, Wageningen, v. 81, p. 249-255, 2003
- CHIHARA, C.; MAEDA, Y.; HAMURO, J.; SAZAKI, T.; FUKUOKA, W. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. **Nature** London, v. 222, p. 687–688, 1970.
- CHIU, S.W.; CHAN, Y.H.; LAW, S.C.; CHEUNG, K.T.; MOORE, D. Cadmium and manganese in contrast to calcium. **Mycological Research** Cambridge, v. 102, p. 449-457, 1998.
- CHU, T.K.; XIA, L.; NG, T.B. Pleurostrin, an antifungal peptide from the oyster mushroom. **Peptides**, Los Angeles, v. 26, p. 2098–2103, 2005.
- CONRATH, U.; PIETERSE, C.M.J.; MAUCH-MANI, B. Priming in plant-pathogens interactions. **Trends in Plant Science**, Kidlington v. 7, p. 210-216, 2002.
- CROAN, S. C. Conversion of conifer wastes into edible and medicinal mushrooms. **Forest Products Journal**, Madison, v. 54, p. 68-76, 2004
- CULVER, J.N. Tobacco Mosaic virus assembly and disassembly: Determinants in Pathogenicity and Resistance. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 287–308, 2002.

DELPECH, P.; OLIVIER, J.M. Cultivation of shiitake on straw based pasteurized substrates. **Mushroom Science**, Pennsylvania, v.13, p. 523-528, 1991.

DEMAIN, A.L. Microbial biotechnology. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v.18, p. 26-31, 2000.

DI PIERO, R. M. **Potencial dos cogumelos *Lentinula edodes* (shiitake) e *Agaricus blazei* (cogumelo-do-sol) no controle de doenças em plantas de pepino, maracujá e tomate, e a purificação parcial de compostos biologicamente ativos**. 2003.157 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

DI PIERO, R. M.; PASCHOLATI, S.F. Indução de resistência em plantas de pepino contra *Colletotrichum lagenarium* pela aplicação de extratos de basidiocarpos de *Lentinula edodes* e de *Agaricus blazei*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, p. 243-250. 2004.

DI PIERO, R. M.; PASCHOLATI, S.F.; REZENDE, J.A.M. Efeito das cianobactérias *Synechococcus leopoliensis* e *Nostoc sp* na infectividade do vírus do mosaico do fumo (TMV). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 26, p. 261-266, 2000.

DIEHLE, D.A; ROYSE, D.J. Shiitake cultivation on sawdust: evaluation of selected genotypes for biological efficiency and mushroom size. **Mycologia** Lancaster, v.78, p. 929-933, 1986.

DUANGMAL, K. APENTEN, R.K.O. A comparative study from polyphenoloxidases from Taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum*) var.Romano. **Food Chemistry**, Wageningen, v. 64, p. 351-359, 1999.

DUNINGAN, D.D.; GOUER BOSKI, D.B.; ZAITUM, M. Analysis of the N gene of *Nicotiana*. In: EVERED, D.; HARNETT, S. (Org.) **Plant resistance to viruses**. Chichester: John Wiley & Sons, 1987. p. 120-135. (Ciba Foundation Symposium 133).

EL-ENSHASY, H.; HELLMUTH, K.; RINAS, U. Fungal morphology in submerged cultures and its relation to glucose oxidase excretion by recombinant *Aspergillus niger*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 81, p. 1-11, 1999.

ELISASHVILI, V.; WASSER, S. P.; TAN, K. K. Effects of carbon and nitrogen sources in the medium on *Tremella mesenterica* Retz.:Fr. (Heterobasidiomycetes) growth and polysaccharide production. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Washington, v. 5, p. 48-56, 2003.

ENMAN, J.; ROVA, U.; BERGLUND, K.A. Quantification of the Bioactive Compound Eritadenine in Selected Strains of Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes*) **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, p. 1177 - 1180, 2007.

ENYEDI, A.J; YALPANI, N.; SILVERMAN, P. Localization, conjugation, and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. **Proceedings of National Academic Science**, Washington, v. 89, p. 2480-2484, 1992.

FARIA, R. O.; MITCHELL, D. A.; AMAZONAS, M. A. L. Cinética de crescimento micelial de *Lentinula boryana* (Berk & Mont.) Pegler em comparação com *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 2003, Florianópolis. **Programa/Trabalhos Completos...** Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2003. 1 CD-ROM.

FEICHTENBERGER, E.; GOES, A. **Manual técnico sobre pinta preta**. Araraquara: Fundecitrus, 1998.

FEICHTENBERGER, E.; SPÓSITO, M.B. Tratamentos com fungicidas no controle de mancha preta (*Guignardia citricarpa*) em laranjeiras 'Valência'. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, p. 310S, 2003.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE JR, J. Doenças dos citros (*Citrus* spp). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2. p. 239-269.

FIALHO, M.B. **Efeito *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros**. 2004. 60 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

FIGUEIREDO, J.E.F.; DEPAOLI, H.C.; COELHO, V.T.S.; CASELA, C.R.; FERREIRA, A.C.; GUIMARÃES, C.T.; GOMES, E.A.; BRESSAN, W. Genetic diversity among *Colletotrichum sublineolum* pathotypes isolated from sorghum (*Sorghum bicolor*). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.5, p.304-318, 2006.

FISCHER, L.H.; KIMATI, H. REZENDE, J.A.M. Doenças do Maracujazeiro (*Passiflora*) In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2, p. 467-474.

FRANCO, M.M.; TAKATSU, A. Sensibilidade de *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae* a cobre. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 20, p.207-210, 2004.

FREDERIKSEN, R. A. **Compendium of sorghum diseases**. 3th ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 2000. 78p.

FUJII, T.; MAEDA, H.; SUZUKI, F.; ISHIDA, N. Isolation and characterization of a new antitumor polysaccharide, KS-2, extracted from culture mycelia of *Lentinus edodes*. **Journal of Antibiotics**, Toquio, v.31, p. 1079–1090, 1978.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78p.

GODOY, M.F.P.; FACCHINI, P.H.; PAGNOCCA, F.C. Atividade antimicrobiana de *Conchocarpus longifolius* (Rutaceae). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17., 2002, Cuiabá. **Anais ...** Cuiabá: Centro de Eventos do Pantanal, 2002a.1 CD-Rom.

GODOY, M.F.P.; FACCHINI, P.H.; PAGNOCCA, F.C. Atividade antimicrobiana de *Protium heptaphyllum* (Burseraceae). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17. 2002, Cuiabá. **Anais ...** Cuiabá: Centro de Eventos do Pantanal, 2002b.1 CD-Rom.

GÓES, A. Controle da mancha-preta dos frutos cítricos. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 9, p. 293-304, 1998.

GÓES, A; FEICHTENBERGER, E. Ocorrência da mancha preta causada por *Phyllosticta citricarpa* (McAlp) Van der Aa (*Guignardia citricarpa* Kiely) em pomares cítricos do Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, p.318. 1993 (Resumo).

GÓES, A; GRAÇA, J.; BARROS, J.C. S.M.; PINHEIRO, J.E. Controle da pinta preta em frutos de tangerina 'Rio' (*Citrus deliciosa*), ocasionada por *Phyllosticta citricarpa* (*Guignardi citricarpa* Kiely). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.15, p.73-75, 1990.

GONÇALVES, E.R.; ROSATO, Y.B. Genotypic characterization of *xanthomonad* strains isolated from passion fruit plants (*Passiflora spp.*) and their relatedness to different *Xanthomonas* species **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 50, p. 811. 2000.

GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. 2 th ed. New York: John Wiley & Sons. 1994. 458 p.

GU, C.; LI, J.; CHAO, F. Inhibition of hepatitis B virus by D-fraction from *Grifola frondosa*: Synergistic effect of combination with interferon- α . **Antiviral Research**, Birmingham, v. 72, p.162–165, 2006.

GUO, L. Q.; LIN, J. Y.; LIN, J. F. Non-volatile components of several novel species of edible fungi in China. **Food Chemistry**, London, v.100, p. 643-649, 2007.

GUIMARÃES, F.B. **Resistência dilatória à antracnose (*Colletotrichum gaminicola* (Ces.) Wilson) do sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)**. 1996. 52 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1996.

HALFED-VIEIRA, B.A.; NECHET, K.L. Ocorrência da mancha bacteriana do maracujazeiro em Roraima. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p.214, 2006.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drugs Discovery Today**, Cambridge, v.5, p. 294-300. 2000.

HATVANI, N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinula edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Tokio, v. 17, p. 71-74, 2001.

HAWKSWORTH DL. Mushrooms: the extent of the unexplored potential. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Washington, v. 3, p.333–337, 2001.

HEIDARI, M.R.; MEHRABANI, M.; PARDAKHTY, A. ; KHAZAELI, P.; ZAHEDI, M.J.; YAKHCHALI, M. ; VAHEDIAN, M. The analgesic effect of *Tribulus terrestris* extract and comparison of gastric ulcerogenicity of the extract with indomethacine in animal experiments. **Annals of the New York Academic Science**, New York, v.1095, p.418-427, 2007.

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, Tokio .v. 42, p. 462-468, 2001.

HIRAMATSU, A.; KOBAYASHI, N.; OSAWA, N. Properties of two inhibitors of plant virus infection from fruiting bodies of *Lentinula edodes* and from leaves of *Yucca recurvifolia* Salisb. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tókió v, 51, p. 897-904, 1987.

HIRASAWA, M; SHOUJI, N.; NETA, T. Three kind of antibacterial substances from *Lentinula edodes* (Berk.) Sing. (Shiitake, an edible mushroom). **International Journal of Antimicrobial Agents**, Tokio, v.11, p. 151-157, 1999.

HIROTANI, M.; SAI, K.; NAGAI, R. Blazeispirane and protoblazeispirane derivatives from the cultured mycelia of the fungus *Agaricus blazei*. **Phytochemistry**, Oxford, v.61, p. 589-595, 2002.

HO, K.Y; YEO, W.Y.; KIM, Y.S.; CHAE, S.Y.; KIM, K.S. Antiviral activity of antibiotics peptaibols, chrisospemins B and D, produced by *Apiocrea sp.*, 14T, against TMV infection. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Soul, v 10, p. 522- 528, 2000.

HUANG, W.E.; HUANG, L.; PRESTON, G.M.; NAYLOR, M.; CARR, J.P.; LI, Y. SINGER, A.C.; WHUTELEY, A. S.; WANG, H. Quantitative in situ assay of salicylic acid in tobacco leaves using a genetically modified biosensor strain of *Acinetobacter sp.* ADP1. **The Plant Journal**, Gainesville, v. 46, p.1073–1083, 2006.

HYUN, K.W. Isolation and characterization of a novel platelet aggregation inhibitory peptide from the medicinal mushroom, *Inonotus obliquus*. **Peptides**, Los Angeles, v. 27, p. 1173 – 1178, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. 2005. Disponível em <www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/>: Acesso: 21 jul. 2005.

ISHIKAWA, N.K. **Atividade antibacteriana em *L. edodes***. 1998. 33 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.

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

JONATHAN, S. G. ; FASIDI, I. O.; AJAYI, E. J. Physico-chemical studies on *Volvariella esculenta* (Mass) Singer, a Nigerian edible fungus. **Food Chemistry**, London, v. 85, p. 339-342, 2004.

JONG, S. C.; BIRMINGHAM, J. M. Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*. **Advances in Applied Microbiology**, New York, v. 37, p. 101-134, 1993.

JUNQUEIRA, N.T.V.; ANJOS, J.R.N.; SILVA, A.P.O.; CHAVES, R.C.; GOMES, A.C. Reação às doenças e produtividade de onze cultivares de maracujá-azedo cultivadas sem agrotóxicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, p. 1005-1010, 2003.

KASPRZEWSKA, A. Plant chitinases-regulation and function. **Cellular & Molecular Biology Letters**, Wroclaw, v. 8, p. 809-824, 2003.

KATO, K.; MUTOH, K.; EGASHIRA, T.; HIURA, M.; UENO, Y. Chemical heterogeneity of β -D-glucan in sclerotia of *Grifora umbellata* (Fr.) Pilát. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tóquio v. 42, p. 1073-1074, 1978.

KENDALL, S.; HOLLOMON, D.W.; ISHII, H.; HEANEY, S.P. Characterization of benzimidazole-resistant strains of *Rhynchosporium secalis*. **Pesticide Science**, London, v.40, p.175-181, 1994.

KIELY, T.B. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* n. sp. The ascigenous stage of *Phoma citricarpa* McAlp. and its relation to black spot of citrus. **Proceedings of the Linnean Society of New South**, Wales, v. 73, p.249-92. 1948.

KIM, J.M; RA, K.S.; NOH, D.O.; SUH, H.J. Optimization of submerged culture conditions for the production of angiotensin converting enzyme inhibitor from *Flammulina velutipes*, **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** Berlim, v.29, p. 292-295, 2003

KLOTZ, L.J. Fungal, bacterial, and nonparasitic diseases and injuries originating in the seedbed, nursery and orchard. In: REUTHER, W.; CALAVAN, E.C.; CARMAN, G.E. (Ed.) **The citrus industry**. Riverside:University of California. 1978. p.1-66.

KOBAYASHI, N.; HIRAMATSU, A.; AKATSUKA, T. Purification and chemical properties of an inhibitor of plant virus infection from fruiting bodies of *Lentinus edodes*. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tóquio v. 51, p. 883-890, 1987.

KOMEMUSHI, S.; YAMAMOTO, Y. and FUJITA, T.T. Purification and identification of antimicrobial substances produced by *Lentinus edodes*. **Journal of Antibacterial and Antifungal Agents**, Tokio, v.24, p. 21-25, 1996.

KOTZÉ, J. M. Black spot. In:WHITESIDE, J.O.; GARNSEY, S.M; TIMMER, L.W. (Ed). **Compendium of citrus disease**. St Paul: APS Press, 1988. p.10-12.

KUC, J. Plant immunization and its applicability for disease control. In: CHET, I. (Ed.) **Innovative approaches to plant disease control**. New York: John Wiley & Sons. 1987. p.255-274.

KUCINSKAITE, A.; POBOCKA-OLECH, L.; KRAUZE-BARANOWSKA, M. Evaluation of biologically active compounds in roots and rhizomes of *Rhodiola rosea* L. cultivated in Lithuania. **Medicina** (Kaunas), Kaunas, v. 43, p. 487-494, 2007.

KURZMAN Jr, R.H. Nutrition from mushrooms, understanding and reconciling available data. **Mycoscience**, Tokio, v. 38, p. 247 – 253, 1997.

LAVI, I.; FRIESEM, D.; GERESH, S.; HADAN, Y.; SCHWARTZ, B. An aqueous polysaccharide extract from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects on HT-29 colon cancer cells. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 244, p. 61-70, 2006.

LEATHAM, G. F. A chemically defined medium for the fruiting of *Lentinus edodes*. **Mycology**, Lancaster, v. 75, p. 859-867, 1985.

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

LEONHARDT, K ; ANKE, T.; HILLEN-MASKE, T.; STEGLICH, W. 6-Methylpurine, 6-methyl-9-b-D-ribofuranosyl-purine, and 6-hydroxymethyl-9-b-D-ribofuranosyl- purin as antiviral metabolites of *Collybia maculate* (basidiomycetes). **Zeitschrift fur Naturforsch C**, Tubingen, v.42, p. 420–424, 1987.

LEVANON, D.; ROTSCCHILD, N.; DANAI, O; MASAPHY, S. Bulk treatment of substrate for the cultivation of shiitake mushroom. **Bioresource Technology**, Essex, v. 45, p. 63-64, 1993.

LIMA, P.L.A.; DELMANTO, R.D.; SUGUI, M.M.; EIRA, A.F.; SALVADORI, D.M.F.; SPEIT, G.; RIBEIRO, L.R. *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (Shiitake) modulates genotoxic and mutagenic effects induced by alkylant agents in vivo. **Mutation Research** Amsterdam, v. 496, p. 23–32, 2001.

LINDEQUIST, U.; NIEDERMEYER, T.H.J.; JULICH, W.D. The pharmacological potential of Mushrooms. **eCam**, Oxford v.2, p.285-299, 2005. Disponível em: <http://ecam.oxfordjournals.org/cgi/content/short/2/3/285>. Acesso em : 18 de ago. de 2008.

LO, C.T.; KANGA, M.W.; WANG, B.C.; CHANG, C.A. Glycosyl linkage characteristics and classifications of exo-polysaccharides of some regionally different strains of *Lentinula edodes* by amplified fragment length polymorphism assay and cluster analysis. **Analytica Chimica Acta** Amsterdam, v. 92, p. 146–153, 2007.

LOBANOK, A.G.; BABITSKAYA, V. G.; PLENINA, L. V.; PUCHKOVA, T. A.; OSADCHAYA, O. V. Composition and biological activity of submerged mycelium of the xylotrophic basidiomycete *Lentinus edodes*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 39, p. 60–64, 2003.

LÓPEZ, J.; PEREZ, J.A.S.; SEVILLA, J.M.F.; FERNANDEZ, F.G.A.; GRIMA, E.M.; CHISTY, Y. Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production. **Enzyme and Microbial Technology**, Atlanta, v. 33, p. 270-277, 2003.

LUCHESI, R.; HARRIGAN, W. Biosynthesis of aflatoxin- the role of nutritional factors. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 74, p. 5-14, 1993.

LUSSO, M.F.G.; PASHCOLATI, S.F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in mayze tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 25, 244-249, 1999.

MADI, L.; KATAN, J. *Penicillium janczewski* and its metabolites, applied to leaves, elicit systemic acquired resistance to stem rot caused by *Rhizoctonia solani*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 53, p. 163-175, 1998.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**, 10. ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2004.

MAKI, C. S. **Avaliação da inibição de *Candida albicans* pelo cogumelo comestível *Lentinula edodes* (Shiitake)**. 1999. 89p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1999.

MALAMY, J.; CARR, J. P.; KLESSIG, D. F.; RASKIN, I. Salicylic Acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. **Science**, Washington, v. 250, p. 1002-1004, 1990.

MALAVOLTA JR, V.A.; BERIAM, L.O.S.; RODRIGUES NETO, J. Podridão do fruto, novo sintoma relacionado a *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.68, p.121-123, 2001.

MANZI, P.; GAMBELLI, L.; MARCONI, S.; VIVANTI, V.; PIZOFERRATO, L. Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study **Food Chemistry**, London, v. 65, p. 477 - 482, 1999.

MANZI, P.; PIZOFERRATO, L. Beta-glucans in edible mushrooms. **Food Chemistry**, London v. 68, p. 315-318, 2000.

MANZONI, M.; BERGOMI, S.; ROLLINI, M.; CAVAZZONI, V. Production of statins by filamentous fungi. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 21, p. 253-257, 1999.

MASSOLA JR., N.S.; PULCINELLI, C.E.; JESUS JR, W.C.; GODOY, C.V. Doenças do Fumo. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2. p. 361-371.

McONIE, K.C. Source of inoculum of *Guignardia citricarpa*, the citrus black spot pathogen. **Phytopathology**, Lancaster, v.54, p. 64-67, 1964

MEKKAWY S.; MESELHY, M.R.; NAKAMURA, N.; TEZUKA, Y.; HATTORI, M.; KAKIUCHI, N. Anti-HIV-1 and anti-HIV-1-protease substances from *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**, Oxford, v 49, p. 1651–1657, 1998.

MINATO K. MIZUNO, M.; TERA, H.; TSUCHIDA, H. Autolysis of lentinan, an antitumor polysaccharide, during storage of *Lentinus edodes*, Shiitake mushroom. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 47, p. 1530–1532, 1999.

MIYAGI, C.K.; JORDÃO, B.Q.; RIBEIRO, L.R.; EIRA, A.F.; COLUS, I.M.S. Genotoxicity and antigenotoxicity assessment of shiitake (*Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler) using the Comet assay. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.27, p. 108-114, 2004.

MIYAGI, C.K.; POERSCH, A.; RIBEIRO, L.R.; EIRA, A.F.; COLUS, I.M.S. Shiitake (*Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler) extracts as a modulator of micronuclei induced in HEp-2 cells. **Toxicology in Vitro** Oxford, v.20, p. 1555–1559, 2006.

MIYAZAKI, T.; OIKAWA, N.; YADOMAE, T.; YAMADA, H. Relationship between the chemical structure and antitumor activity of glucans prepared from *Grifora umbellata*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 69, p. 165-170, 1979.

MIZUNO, T. Shiitake, *Lentinus edodes*: functional properties for medicinal and food purposes. **Food Reviews International**, New York v.11, p.111-128, 1995a.

_____. Biactive biomolecules of mushrooms: food function and medicinal effects of mushroom fungi. **Food Reviews International**, New York, v.11, p. 7-21, 1995b.

MLINARIC, A. KAC, J.; POHLEVEN, F. Screening of selected wood-damaging fungi for the HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. **Acta Pharmaceutica** Zagreb, v 55, p. 69–79, 2005.

MOLINA, F.; SHEN, P.; JONG, S. C.; ORIKONO, K. Molecular evidence supports the separation of *Lentinula edodes* from *Lentinus* and related genera. **Canadian Journal of Botany**, Toronto, v.70, p.2446-2452, 1992.

MOORE D. Fungal products as food. In: POITING, S.B.; HYDE, K.D. (Ed.). **Bio-exploitation of filamentous fungi**. Hong Kong: Fungal Diversity Press, 2001. Chap. 10, p. 223-251.

MORALES, P.; BERMUDEZ, E.; SANZ, B.; HERNANDEZ, P.E. A study of the mutagenicity of some commercially canned Spanish mushrooms. **Food and Chemical Toxicology**, London v.9, p.607-611, 1990.

MORITA, K.; KOBAYASHI, S. Isolation, structure, and synthesis of lenthionine and its analogs. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, Tokio, v.15 p. 988-993, 1967.

MOTHANA R.A.A.; AWADH, N.A.A.; JANSEN, R.; WEGNER, U., MENTEL, R., LINDEQUIST, U. Antiviral lanostanoid triterpenes from the fungus *Ganoderma pfeifferi* BRES. **Fitoterapia**, Milano, v, 74, p.177–180, 2003.

MUGHOGO, L.K. Strategies for sorghum disease control. House, L.R., Mughogo L.K. & Peacock, J.M. (Ed.) **Sorghum in the Eighties**. Hyderabad: International Crops Research Institute for the Semi-arid Tropics, 1982. p. 273-282.

MUR, L.A.J.; BI, Y.M.; DARBY, R.M.; FIREK, S.; DRAPER, J. Compromising early salicylic acid accumulation delays the hypersensitive response and increases viral dispersal during lesion establishment in TMV-infected tobacco. **The Plant Journal**, New York, v. 12, p.1113-1126, 1997.

NANBA H, KVEZESODAMA N, SCHAR D, TURNER D. Effects of maitake (*Grifola frondosa*) glucan in HIV-infected patients. **Mycoscience**, Amsterdam, v.41, p.293–295, 2000.

NAVICKIENE, S.; AMARANTE JR., O.P.; BRITO, N.M.; GRACIOLLI, A.; RIBEIRO, M.L. Determination of Benomyl Residues in Shiitake Mushrooms (*Lentinula edodes*) by Liquid Chromatography with UV Detection **Journal of Chromatographic Science**, Niles, v. 45, p. 340-344, 2007.

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

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

NGAI, P.H.; WANG, H.X.; NG, T.B. Purification and characterization of a ubiquitin-like peptide with macrophage stimulating, antiproliferative and ribonuclease activities from the mushroom *Agrocybe cylindracea*. **Peptides**, Los Angeles, v. 24, p. 639– 645, 2003.

NGUGI, H.K., JULIAN, A.M., KING, S.B.; PEACOCKE, B.J. Epidemiology of sorghum anthracnose (*Colletotrichum sublineolum*) and leaf blight (*Exserohilum turcicum*) in Kenya. **Plant Pathology**, Singapore, v. 49, p.129-140, 2000.

NIKITINA, V.E.; TSIVILEVA, O.M.; PANKRATOV, A.N.; BYCHKOV, N.A. *Lentinula edodes* Biotechnology – From Lentinan to Lectins. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 45, p. 230–237, 2007.

OOI, V. E. C.; LIU F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide- protein complexes. **Current Medicinal Chemistry**, Karachi v. 7, p. 715-729, 2000.

ORI, N. ORI.; SESSA, G.; LOTAN, T.; HIMMELHOCH, S.; FLUHR, R. A major stylar matrix polypeptide (SP41) is a member of pathogenesis-related protein superclass. **EMBO Journal**, Oxford, v. 9, p. 3429-3436, 1990.

OSSWALD, W.F.; STANGARLIN, J.R.; NICHOLSON, R.L.; BRUMMER, M.; WULFF, N.A.; DI PIERO, R.M.; PICCININ, E.; DI CIERO, L.; HOTO, F.V.; PASCHOLATI, S.F. The effect of acibenzolar-S-methyl on phytoalexin and PR-protein induction on sorghum mesocotyls and on *Colletotrichum sublineolum*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, p. 415-420, 2004.

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

PAPAGIANI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, Ontario v. 22, p. 189-259, 2004.

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

PANIZZI, R.C.; FERNANDES, N.G.; CAMARGO, N. Doenças do Sorgo. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2. p. 597-606.

PASCHOLATI, S.F. **Potencial de *Saccharomyces cerevisiae* e outros agentes bióticos na proteção de plantas contra patógenos**. 1998. 140 p. (Tese de Livre-docência). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

PEREIRA, A.L.G. **Contribuição ao estudo da etiologia da mancha oleosa da folha de maracujá (*Passiflora edulis* Sims.) causada por *Xanthomonas passiflora* n.sp.** 1968. 91p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - USP, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1968.

PICCININ, E. **Potencial de preparações do cogumelo comestível shiitake (*Lentinula edodes*) no controle de fitopatógenos fúngicos, bacterianos e virais em sorgo, maracujá e fumo**. Piracicaba, 2000. 162 p. Tese (Doutorado em Agronomia)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2000.

PICCININ, E.; DI PIERO, R.M.; PASCHOLATI, S.F. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na Produtividade de Sorgo e na Severidade de Doenças Foliares no Campo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p.5-9, 2005.

PICCININ, E.; MALAVOLTA JUNIOR, V.A.; PASCHOLATI, S.F. Efeito da concentração de inoculo e da temperatura na severidade de *Xanthomonas campestris* pv *passiflora* em folhas de maracujazeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 323, 1995. Resumo.

PINTO, N.F.J.A. Controle químico de *Colletotrichum graminicola* associado a sementes de sorgo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 25, p. 349- 352, 1999.

PIRAINO F.; BRANDT, C.R. Isolation and partial characterization of an antiviral, RC-183, from the edible mushroom *Rozites caperata* **Antiviral Research**, Birmingham v. 43, p. 67–78, 1999.

POWELL, P., ELLIS, M., ALAMEDA, M. & SOTOMAYOR, A. Effect of natural anthracnose epiphytotics on yield, grain quality, seed health, and seed borne fungi in *Sorghum bicolor*. **Sorghum Newsletter**, v. 20, p.77-78, 1977.

QUEENER, S. W.; ELLIS, L. F. Differentiation of mutants of *Cephalosporium acremonium* in a complex médium: the formation of unicellular arthrospores and their germination. **Canadian Journal of Microbiology**, Toronto, v. 21, p. 1981-1996, 1975.

RAPUSSI, M.C.C. **Efeito da quitosa e da radiação UV-C no controle da *Guignardia citricarpa* em laranjas pós-colheita**. Piracicaba, 2006. 82 p. Tese (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier, 1997. 372 p.

ROBBS, C.F., PIMENTEL, J.P.; RIBEIRO, R.L.D. A mancha preta dos frutos cítricos causada por *Phoma citricarpa*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 13., 1980, Itaguaí. **Anais ... Itaguaí**, 1980. p.45.

RODRIGUES, M.B.C. **Controle de *Guignardia citricarpa*, agente causal da mancha preta dos citros**. 2006. 115 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz , Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

RODRIGUES, M.B.C.; ANDREOTE, F.D.; SPOSITO, M.B. Resistência a benzimidazóis por *Guignardia citricarpa*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.3, p.323-327, 2007.

ROQUE, P.; GUATIMOSIM, P. Sorgo: muitas alternativas numa só agricultura. **Agricultura de Hoje** Rio de Janeiro, v.10, p.44-49, 1985.

ROSS, F. A. Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. **Virology**, New York, v. 14, p. 329-339, 1961.

ROYSE, D.J.; SANCHEZ-VAZQUEZ, J.E. Influence of precipitated calcium carbonate (CaCO₃) on shiitake (*Lentinula edodes*) yield and mushroom size. **Bioresource Technology**, Essex, v.90, p. 225-228, 2003.

RUGGIERO, C. Situação da cultura do maracujazeiro no Brasil. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, p. 05-09, 2006.

SANO, Y. Antiviral activity of chondroitin sulfate against infection by tobacco mosaic virus. **Carbohydrate Polymers**, Bromsgrove, v.33, p. 542 - 549, 1997.

_____. Antiviral activity of alginate against infection by tobacco mosaic virus. **Carbohydrate Polymers**, Bromsgrove, v.38, p. 183 - 186, 1999.

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

SHERWOOD, J.L.; FULTON, R.W. The specific involvement of coat protein in tobacco mosaic virus cross protection. **Virology**, New York, v. 119, p. 150-158, 1982.

SHIGA, H.; YOSHII, H.; OHE, H.; YASUDA, M.; FURUTA, T.; KUWAHARA, H.; OHKAWARA, M.; LINKO P. Encapsulation of Shiitake (*Lentinula edodes*) flavors by spray drying. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, New York, v. 68, p. 66-71, 2004.

SILVA, R.F.; PASCHOLATI, S.F.; BEDENDO, I.P. Indução de resistência em tomateiros por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 189-196, 2007.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4. ed. Florianópolis: Editora da UFSC; Porto Alegre: Editora da UFRS, 2002.

SINHA, J.; BAE, J.T.; PARK, J.P. ; SONG, C.H.; YUN, J.W. Effect of substrate concentration on broth rheology and fungal morphology during exo-biopolymer production by *Paecilomyces japonica* in a batch bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, Atlanta v. 29, p. 392-399, 2001.

SMANIA, A.; MONACHE, F. D.; SMÂNIA, E. F. A.; GIL, M. L.; BENCHETRIT, L. C.; CRUZ, F. S. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr.. **Journal of Ethnopharmacology**, London, v. 45, p. 177-181, 1995.

SMITH, J. E.; ROWAN, N. J.; SULLIVAN, R. Medicinal mushrooms: a rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. **Biotechnology Letters**, Hull, v. 24, p. 1938-1845, 2002.

SMITH, J. J.; LILLY, M. D.; FOX, R. I. The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. **Biotechnology & Engineering**, New Castle, v. 35, p. 1011-1023, 1990.

SNYDER, B.A.; NICHOLSON, R.L. Synthesis of phytoalexins in sorghum as a site specific response to fungal ingress. **Science**, Washington, v. 248, p.1637- 1639, 1990.

SOLAK, M.H.; KALMIS, E.; SAGLAM, H. KALYONCU, F. Antimicrobial Activity of two wild mushrooms *Clitocybe alexandri* (Gill.) Konr. and *Rhizopogon roseolus* (Corda) T.M. Fries collected from Turkey. **Phytotherapy Research**, London, v. 20, p. 1085–1087, 2006.

SONG, C.H., CHO, K.Y.; NAIR, N.G. A synthetic medium for the production of submerged cultures of *L. edodes*. **Mycologia**, Lancaster, v. 79, p. 866-876, 1987.

SPÍZEK, J.; TICHY, P. Some aspects of overproduction of secondary metabolites. **Folia Microbiologica**, Heidelberg, v. 40, p. 43-50, 1995.

SPOSITO, M.B.; AMORIM, L.; BELASQUE JR., J.; BASSANEZI, R.B.; AQUINO, R. Elaboração e validação de escala diagramática para avaliação da severidade da mancha preta em frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 81-85, 2004.

STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F.; LABATE, C.A. Efeito de *Phaeoisariopsis griseola* na atividade de ribulose 1,5-bifosfato –carboxylase-oxigenase, clorofilase, β -1,3-glucanase e quitinase em cultivares de *Phaeolus vulgaris*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 59-66, 2000.

STERNER, O.; BERGMAN, R.; FRANZÉN, C.; KESLER, E.; NILSSON, L. Mutagens in larger fungi. I. 48 species screened for mutagenic activity in the Salmonella/microsome assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v.101, p.269-281, 1982.

SUGUI, M.M.; P.L. LIMA, A.R.D.; DELMANTO, A.; EIRA; SALVADORIA, D.M.F.; RIBEIRO, A. Antimutagenic effect of *Lentinula edodes* (BERK.) Pegler mushroom and possible variation among lineages **Food and Chemical Toxicology**, Londres, v. 41, p. 555–560, 2003.

SUN, H.; ZHAO, C.G.; TONG, X.; QI, Y.P. A lectin with mycelia differentiation and antiphytovirus activities from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, New Jersey, v.36, p. 214-222, 2003.

SUTTON, B. C.; WATERSON, J. M. *Guignardia citricarpa*. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1966. 2 p. (Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, 85).

SUZUKI, S.; OHSHIMA, S. Influence of shiitake (*Lentinus edodes*) on human serum cholesterol. **Mushroom Science**, Pennsylvania, v. 9, p. 463-467, 1974.

TASSA, S.O.M.; DUARTE, V. Ocorrência de mancha bacteriana causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, em maracujazeiro no estado de Mato Grosso **Fitopatologia Brasileira**, Brasília v. 27, p. 647 , 2002.

TERASHITA, T.; KONO, M.; MISHIMA, N.; OBATA, T.; YAMAUCHI, M. The proximate components, free and protein bound amino acids in protein and 5 GMP in fruit bodies of *Lentinus edodes* Singer Shiitake mushroom grown on artificial bed blocks. **Journal of the Japanese Society of Food Science and Technology**, Tóquio, v. 37, p. 528–532, 1990.

THYPYAPONG, P. STEFFENS, J.C. Tomato polyphenol oxidase: differential reponse of polyphenoloxidase F promoter to injuries and wound signals. **Plant Physiology**, Rockville, v. 115, p.409-418, 1997.

TOCHIKURA TS, NAKASHIMA H, OHASHI Y, YAMAMOTO N. Inhibition (in vitro) of replication and of the cytopathic effect of human immunodeficiency virus by an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. **Medical Microbiology and Immunology** Berlin, v.177, p. 235–244, 1988.

TOCHIKURA TS, NAKASHIMA H, HIROSE K, YAMAMOTO N. A biological response modifier, PSK, inhibits human immunodeficiency virus infection in vitro. **Biochemical Biophysical Research Communications**, New York, v.148, p.726–733. 1987.

TOFFANO, L. **Doenças pós-colheita em citrus: potencial de *Lentinula edodes* *Agaricus blazei*, ácido jasmônico, albedo (*Citrus sinensis* var. Valencia) e flavedo (*Citrus aurantifolia* var. Tahiti) no controle e na indução de resistência.** 2005. 85 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

TOLEDO, C. (Coord.) **Pragas e doenças do maracujá.** Campinas: CATI, 1992. 9p. (Comunicado Técnico, 96).

TOMATI, U.; BELARDINELLI, M.; GALLI, E.; IORI, V.; CAPITANI, D.; MANNINA, L.; VIEL, S.; SEGRE, A. NMR characterization of the polysaccharidic fraction from *Lentinula edodes* grown on olive mill waste waters. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 339, p. 1129-1134, 2004.

TONUCCI, N. M.; PASCHOLATI, S. F. Frações de extratos aquosos de basidiocarpos de *Lentinula edodes* (Shiitake) inibem o crescimento *in vitro* de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e *Colletotrichum sublineolum* In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 27., 2005, Campinas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.30. p.91 – 91, 2005. Resumo.

TORRES FILHO, J.; PONTE, J. Estudo sobre o controle da bacteriose ou “morte precoce” (*Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*) do maracujá amarelo (*Passiflorae edulis* f. *flavicarpa*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19 , p. 34-38, 1994.

TSIVILEVA, O.M.; NIKITINA, V.E.; GARIBOVA, L.V. Effect of culture medium composition on the activity of extracellular lectins of *Lentinus edodes*, **Applied Biochemistry and Microbiology**, Moscow, v.41, p. 174–176, 2005.

UMETANI, Y.; KODAKARI, E.; YAMAMURA, T.; TANAKA, S.; TABATA, M. Glucosylation of salicylic acid by cell suspension cultures of *Mallotus japonicus*. **Plant Cell Report**, Heidelberg, v. 9, p. 325-327, 1990.

UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 34, p. 68-71, 2006.

VERPOORTE, R. Exploration of nature chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. **Drug Discovery Today**, Cambridge v. 3, p. 232-238, 1998.

XU, C. P.; YUN, J. W. Influence of aeration on the production and the quality of the exopolysaccharides from *Paecilomyces tenuipes* C240 in a stirred-tank fermenter. **Enzyme & Microbial Technology**, Atlanta, v. 35, p. 33-39, 2004.

WANG H.X.; NG, T. B. Ascalin, a new anti-fungal peptide with human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase-inhibiting activity from shallot bulbs. **Peptides**, Los Angeles, v.231, p. 25-29, 2002.

_____. Isolation and characterization of velutin, a novel low-molecular-weight ribosome-inactivating protein from winter mushroom (*Flammulina velutipes*) fruiting bodies. **Life Science**, London, v. 68 p. 2151-2158. 2001.

WANG, H.X.; NG, T. B.; LIU, Q. A novel lectin from the wild mushroom *Polyporus adusta*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 307, p. 535-539, 2003.

WASSER, S.P.; WEIS, A.L. Medicinal properties of substances occurring in Higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives. **International Journal of Medicinal Mushrooms** Washington, v. 1, p.31-62, 2003.

WHARTON, P.S.; JULIAN, A.M.; O'CONNELL, R.J. Ultrastructure of the infection of *Sorghum bicolor* by *Colletotrichum sublineolum*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 91, p.149-158. 2001.

WIRTH, S.J.; WOLF, G.A. Microplate colorimetric assay for endo-acting cellulose, xylanase, chitinase, β -1,3-glucanase, and amylase extracted from forest soils horizons. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 24, p.511-519, 1992.

WRATTEN, S. J.; FAULKNER, D. J. Cyclic polysulfides from red algae *Chondrica californica*. **Journal of Organic Chemistry**. Baltimore, v. 41, 2465- 2467, 1976.

YALPANI, N.; SILVERMAN, N.; WILSON, M.A.; KLEIER, D.A.; RASKIN, I. Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. **Plant Cell**, Baltimore, v. 3, p. 809-818, 1991.

YAMAUCHI, N.; AKIYAMA, Y. KAKO, S.; HASHINAGA, F. Chlorophyll degradation in Wase satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) fruit with on-tree maturation and ethylene treatment. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.71, p.35-42, 1997.

YATOHGO, T. NAKATA, M.; TSUMURAYA, Y.; HASHIMOTO, Y.; YAMAMOTO, S. Purification and properties of a lectin from the fruit bodies of *Flammulina velutipes*. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tóquio v.52, p. 1485-1493, 1988.

YASUMOTO,K.; IWAMI, K.; MITSUDA,H. A new sulphur-containing peptide from *Lentinus edodes* acting as precursor for lenthionine. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tóquio v. 35, p. 2059-2069, 1971.

YOSHIDA, O.; NAKASHIMA, H.; YOSHIDA, T.; KANEKO, Y.; YAMAMOTO, I.; MATSUZAKI, K.; URYU, T.; YAMAMOTO, N. Sulfation of the immunomodulating polysaccharide lentinan: a novel strategy for antivirals to human immunodeficiency virus (HIV). **Biochemical Pharmacology**, Kansas, v. 37, p. 2887–2891, 1998.

ZERBINI Jr., F.M. CARVALHO, M.G.; ZAMBOLIM, E.M. **Introdução a virologia vegetal**. Viçosa : Universidade Federal de Viçosa, 2002. 145p.