



**INFLUÊNCIA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE MADEIRAS
DA CAATINGA NA RESISTÊNCIA AO ATAQUE DE FUNGOS
APODRECEDORES**

MARCELO FONTANA DA SILVEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL

**FACULDADE DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL

**INFLUÊNCIA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE MADEIRAS
DA CAATINGA NA RESISTÊNCIA AO ATAQUE DE FUNGOS
APODRECEDORES**

MARCELO FONTANA DA SILVEIRA

ORIENTADOR: ALEXANDRE FLORIAN DA COSTA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS

PUBLICAÇÃO: PPGEFL.DM – 313/2018

BRASÍLIA/DF: FEVEREIRO/2018

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS**

**“INFLUÊNCIA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE MADEIRAS DA
CAATINGA NA RESISTÊNCIA AO ATAQUE DE FUNGOS APODRECEDORES”**

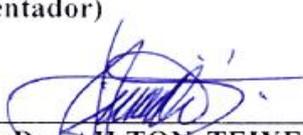
MARCELO FONTANA DA SILVEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS, DO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL, DA FACULDADE DE TECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE.

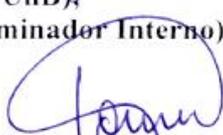
APROVADA POR:



Prof. Dr. ALEXANDRE FLORIAN DA COSTA (Departamento de Engenharia Florestal – EFL/UnB);
(Orientador)



Prof. Dr. AILTON TEIXEIRA DO VALE (Departamento de Engenharia Florestal – EFL/UnB);
(Examinador Interno)



Prof. Dr. FERNANDO NUNES GOUVEIA (Laboratório de Produtos Florestais – LPF/SFB);
(Examinador Externo)

Prof. Dr. JOAQUIM CARLOS GONÇALES (Departamento de Engenharia Florestal – EFL/UnB).
(Examinador Suplente)

Brasília, fevereiro de 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

DA SILVEIRA, MARCELO FONTANA

INFLUÊNCIA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE MADEIRAS DA CAATINGA NA RESISTÊNCIA AO ATAQUE DE FUNGOS APODRECEDORES.

Xiv, 82., 210 x 297 mm (EFL/FT/UNB, Mestre, Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília. Faculdade de Tecnologia.)

Departamento de Engenharia Florestal

1. Metabólitos secundários

2. Madeiras da Caatinga

3. Fungos apodrecedores

4. Durabilidade natural

I. EFL/FT/UNB

II. Título (série)

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

DA SILVEIRA, M. F. (2018). Influência de metabólitos secundários de madeiras da Caatinga na resistência ao ataque de fungos apodrecedores. Dissertação de Mestrado em Engenharia Florestal, Publicação PPGEFL.DM-313/2018. Departamento de Engenharia Florestal. Universidade de Brasília, DF. 82p.

CESSÃO DE DIREITOS

AUTOR: Marcelo Fontana da Silveira.

TÍTULO: Influência de metabólitos secundários de madeiras da Caatinga na resistência ao ataque de fungos apodrecedores.

GRAU: Mestre

ANO: 2018

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva outros direitos de publicação e nenhuma parte dessa dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor.

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas foram importantes para que esse mestrado pudesse se tornar realidade.

À minha família, em especial à minha amada esposa Ana Lígia, minha Coach particular, que sempre me apoiou e me incentivou em todas as principais decisões que tive que tomar na minha vida profissional.

À minha filha Mariana que tornou essa jornada muito mais emocionante e agradável, renovando sempre minhas energias com o seu sorriso e jeito alegre de ser.

Aos meus vários orientadores, Fernando Gouveia, Alessandro, Alexandre e Divino, que tiveram paciência para me ensinar e me ajudaram muito, cada um à sua maneira.

Ao Getúlio e Fernando Ananias por toda a disposição com que me ajudaram em todo o mestrado.

A todos os amigos e colegas do LPF, em especial, Zé Roberto, Sofya, Lopes, Gustavo e Bruno que me auxiliaram em uma ou mais etapas durante essa jornada.

Ao Paulo Fontes e ao Serviço Florestal Brasileiro, por terem acreditado em mim e aceitado a minha vinda para o Laboratório de Produtos Florestais.

Ao meu cachorro Iori Jotaro pelo companheirismo enquanto escrevia essa dissertação.

A todos que me ajudaram de alguma forma nesse projeto, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Influência de metabólitos secundários de madeiras da Caatinga na resistência ao ataque de fungos apodrecedores.

Autor: Marcelo Fontana da Silveira

Orientador: Alexandre Florian da Costa

Programa de Pós-graduação em Ciências Florestais

Brasília, fevereiro de 2018.

Este trabalho avaliou a influência dos metabólitos secundários das espécies de madeiras da Caatinga *Pterodon abruptus*, *Diptychandra aurantiaca*, *Terminalia fagifolia*, *Machaerium acutifolium* e *Aspidosperma multiflorum*, na resistência ao ataque de quatro fungos apodrecedores: *Trametes versicolor*, *Pycnoporus sanguineus*, *Gloeophyllum trabeum* e *Gloeophyllum striatum*. As espécies de madeira foram submetidas ao ensaio de apodrecimento acelerado em laboratório de acordo com ASTM D 2017/05. Em relação ao ataque dos quatro fungos, as espécies *Pterodon abruptus* e *Diptychandra aurantiaca* foram classificadas como altamente resistentes e a espécie *Machaerium acutifolium* foi classificada como resistente. *Terminalia fagifolia* foi classificada como altamente resistente aos fungos *P. sanguineus*, *G. trabeum* e *G. striatum*, e resistente ao *T. versicolor*. *Aspidosperma multiflorum* foi resistente aos fungos de podridão branca e moderadamente resistente aos fungos de podridão parda. De cada espécie madeireira foram obtidos metabólitos secundários pela maceração com metanol, seguida da separação em quatro extratos em razão da polaridade dos solventes utilizados: *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e 1-butanol. Esses extratos foram utilizados para avaliar seu potencial antifúngico em testes de inibição por difusão em placas de Petri. Este teste apresentou resultados semelhantes ao alcançados nos testes de apodrecimento acelerado para todas as espécies, com exceção da *T. fagifolia*. Quanto aos metabólitos secundários, os compostos presentes no extrato metanólico bruto e extrato hexânico apresentaram maior atividade antifúngica. O estudo se mostrou útil para avaliação de metabólitos secundários com potencial antifúngico em cada um dos extratos de diferentes polaridades.

Palavras-chave: Madeiras da Caatinga, extrativos de madeira, metabólitos secundários, fungos apodrecedores, ensaio de apodrecimento acelerado, potencial antifúngico, teste de difusão.

ABSTRACT

Influence of the Caatinga woods secondary metabolites on the resistance of wood decaying fungi.

Author: Marcelo Fontana da Silveira

Advisor: Alexandre Florian da Costa

Forestry Post-Graduation Program.

Brasilia, february of 2018.

This work evaluated the influence of secondary metabolites of the Caatinga wood species *Pterodon abruptus*, *Diptychandra aurantiaca*, *Terminalia fagifolia*, *Machaerium acutifolium* and *Aspidosperma multiflorum*, on the resistance against four wood decaying fungi *Trametes versicolor*, *Pycnoporus sanguineus*, *Gloeophyllum trabeum* and *Gloeophyllum striatum*. The wood species were submitted to the laboratory accelerated rotting test in accordance with ASTM D 2017/05. In relation to the attack of the four wood decaying fungi, the species *Pterodon abruptus* and *Diptychandra aurantiaca* were classified as highly resistant and the specie *Machaerium acutifolium* was classified as resistant. *Terminalia fagifolia* was classified as highly resistant to fungi *P. sanguineus*, *G. trabeum* and *G. striatum*, and resistant to *T. versicolor*. *Aspidosperma multiflorum* was resistant to white rot fungi and moderately resistant to brown rot fungi. From each species, secondary metabolites were obtained by maceration in methanol, followed by separation in four extracts due to the polarity of the solvents used: *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate and 1-butanol. These extracts were used to evaluate their antifungal potential on Petri dishes diffusion inhibition tests. This test presented similar results to those obtained in laboratory accelerated rotting test for all species, except for *T. fagifolia*. For the secondary metabolites, the compounds present in the crude methanolic extract and hexane extract presented higher antifungal activity. The test proved to be useful for the evaluation of secondary metabolites in each one of separated extracts with antifungal potential.

Keywords: Caatinga woods, wood extractives, secondary metabolites, wood decaying fungi, accelerated rotting test, diffusion test.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVO	16
2.1. Objetivo geral.....	16
2.2. Objetivos secundários	16
3. HIPÓTESE	16
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
4.1. Bioma Caatinga	16
4.2. Espécies de madeiras da Caatinga	17
4.2.1. <i>Pterodon abruptus</i> (Moric.) Benth. (Pau Amarelo)	17
4.2.2. <i>Diptychandra aurantiaca</i> Tul. (Birro Branco).....	17
4.2.3. <i>Terminalia fagifolia</i> Mart. (Chapada)	18
4.2.4. <i>Machaerium acutifolium</i> Vogel (Coração de Negro).....	18
4.2.5. <i>Aspidosperma multiflorum</i> A. DC. (Pequiá Cascudo)	18
4.3. Fungos apodrecedores	18
4.3.1. Podridão branca.....	20
4.3.2. Podridão parda.....	22
4.4. Durabilidade natural.....	25
4.5. Metabólitos secundários.....	28
4.7. Processos para remoção do extrativo da madeira	31
4.8. Separação dos extratos em grupos de polaridade distintas	33
4.9. Testes de inibição de crescimento fúngico	35
5. MATERIAIS E MÉTODOS	36
5.1. Coleta das espécies de madeira.....	36
5.2. Durabilidade natural em ensaio acelerado.....	37
5.2.1. Preparo dos frascos de vidro e corpos de prova	37
5.2.2. Cultivo dos fungos	39
5.2.3. Inoculação dos fungos	39
5.2.4. Ensaio acelerado de ataque de fungos apodrecedores.....	40
5.2.5. Perda de massa e durabilidade natural	41
5.3. Remoção dos extrativos e separação com solventes de diferentes polaridades 41	
5.3.1. Processo de secagem e moagem do material	41
5.3.2. Cálculo do teor de umidade das amostras	42
5.3.3. Maceração	43
5.3.4. Particionamento entre solventes imiscíveis.....	45
5.3.5. Separação dos extratos	47
5.4. Testes de inibição do crescimento fúngico.....	51
5.4.1. Inoculação dos extratos nas placas.....	53
5.4.2. Análise do efeito antifúngico dos extratos separados	54
5.5. Análises estatísticas	55
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	56
6.1. Durabilidade natural em ensaio acelerado.....	56
6.1.1. <i>Pterodon abruptus</i>	57
6.1.2. <i>Diptychandra aurantiaca</i>	58
6.1.3. <i>Terminalia fagifolia</i>	59
6.1.4. <i>Machaerium acutifolium</i>	60
6.1.5. <i>Aspidosperma multiflorum</i>	60
6.2. Metabólitos secundários.....	61
6.3. Potencial de inibição	63
6.3.1. <i>Pterodon abruptus</i>	66

6.3.2.	<i>Diptychandra aurantiaca</i>	67
6.3.3.	<i>Terminalia fagifolia</i>	68
6.3.4.	<i>Machaerium acutifolium</i>	69
6.3.5.	<i>Aspidosperma multiflorum</i>	70
7.	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	73
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
	ANEXO	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 5. 1. Espécies de madeira da Caatinga avaliadas.....	37
Tabela 5. 2. Classes de resistência natural das espécies de madeiras submetidas aos fungos apodrecedores em razão da média de perda de massa.....	41
Tabela 5. 3. Propriedades físico-químicas de alguns solventes utilizados na extração de produtos naturais.	47
Tabela 5. 4. Número de repetições por placa utilizada em cada extrato.	52
Tabela 5. 5. Porcentagem separada de cada extrato e concentração utilizada no teste de difusão em placas.....	53
Tabela 6. 1. Valores médios de perda de massa e classe de resistência das cinco espécies de madeiras da Caatinga submetidas ao ataque de quatro fungos apodrecedores.....	57
Tabela 6. 2. Teores de umidade e extrativos das cinco espécies de madeiras da Caatinga.	61
Tabela 6. 3. Percentual separado em cada extrato ao final do processo.....	62
Tabela 6. 4. Valores médios de inibição do crescimento das hifas e perda de massa no ensaio de apodrecimento acelerado dos fungos de podridão branca <i>Trametes versicolor</i> e <i>Pycnoporus sanguineus</i> para as cinco espécies de madeiras da Caatinga.....	64
Tabela 6. 5. Valores médios de inibição do crescimento das hifas e perda de massa no ensaio de apodrecimento acelerado dos fungos de podridão parda <i>Gloeophyllum trabeum</i> e <i>Gloeophyllum striatum</i> para as cinco espécies de madeiras da Caatinga.	65
Tabela 6. 6. Valores totais de inibição promovidos pelos diferentes extratos nas cinco espécies de madeiras da Caatinga submetidos aos quatro fungos apodrecedores.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 4. 1. Basidioma do <i>Trametes versicolor</i> (L.) Lloyd.....	21
Figura 4. 2. Basidioma do <i>Pycnoporus sanguineus</i> (L.) Murrill.....	22
Figura 4. 3. Basidioma do <i>Gloeophyllum trabeum</i> (Pers.) Murrill.....	24
Figura 4. 4. Basidioma do <i>Gloeophyllum striatum</i> (Fr.) Murrill.....	24
Figura 4. 5. Transformação da célula do alburno em cerne e visualização do extrativo em uma fibra da madeira.....	27
Figura 4. 6. Processo de separação dos extratos por meio da partição líquido-líquido.....	34
Figura 4. 7. Metabólitos secundários encontrados nos diferentes extratos obtidos por meio da partição sucessiva com solventes de diferentes polaridades.....	34
Figura 4. 8. Testes para análise da atividade antimicrobiana de compostos químicos. (A) Teste de difusão em ágar. (B) Teste de diluição em ágar. Os sombreados nas placas e tubos correspondem à concentração do agente antimicrobiano.....	35
Figura 5. 1. Espécies da Caatinga avaliadas nesse estudo. (A) <i>P. abruptus</i> ; (B) <i>D. aurantiaca</i> ; (C) <i>T. fagifolia</i> ; (D) <i>M. acutifolium</i> e (E) <i>A. multiflorum</i>	37
Figura 5. 2. Placa suporte introduzida nos frascos de vidro já preparados para a inoculação do fungo.....	38
Figura 5. 3. Esterilização dos frascos (A) e inoculação do fungo (B).....	40
Figura 5. 4. Processo de obtenção de partículas para a remoção do extrativo. (A) passagem na plaina; (B) moinho de facas; (C) agitador de peneiras.....	42
Figura 5. 5. Processo de maceração das partículas de madeira com metanol.....	43
Figura 5. 6. (A e B) Filtragem da mistura metanol-madeira; (C) evaporador rotativo com pressão reduzida; (D) evaporação do solvente e obtenção do extrativo no balão.....	44
Figura 5. 7. Balões com o EMB na estufa a vácuo para evaporação completa do metanol.....	45
Figura 5. 8. Esquema de separação do EMB para formação dos diferentes extratos.....	46
Figura 5. 9. (A) Formação das duas camadas imiscíveis no funil de separação (camada hexânica acima e metanólica embaixo); (B) filtração do sulfato de sódio utilizado para retirada da água presente no extrato hexânico; (C) extrato hexânico pronto para a evaporação do solvente no evaporador rotativo.....	48
Figura 5. 10. (A) evaporação do solvente no evaporador rotativo; (B) extrato sem o solvente no balão; (C) extrato hexânico reservado após raspagem do balão.....	49
Figura 5. 11. Formação de emulsão durante a separação com o diclorometano.....	50
Figura 5. 12. Mapa de posicionamento na placa de Petri. (A) micélio; (B) local de deposição do extrato particionado.....	52
Figura 5. 13. (A) aplicação do extrato na placa já inoculada; (B) placas com os diferentes extratos na incubadora.....	54
Figura 5. 14. Processo de transformação da imagem: (A) imagem original; (B) imagem em 8 bits; (C) imagem limiarizada. Efeito do EMB na primeira linha e do extrato butanólico na segunda linha da espécie <i>D. aurantiaca</i> sobre o fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i>	55
Figura 6. 2. Gráfico box plot da perda de massa dos quatro fungos para a espécie <i>P. abruptus</i>	58
Figura 6. 3. Gráfico box plot da perda de massa dos quatro fungos para a espécie <i>Diptychandra aurantiaca</i>	58
Figura 6. 4. Gráfico box plot da perda de massa dos quatro fungos para a espécie <i>Terminalia fagifolia</i>	59

Figura 6. 5. Gráfico box plot da perda de massa dos quatro fungos para a espécie <i>Machaerium acutifolium</i>	60
Figura 6. 6. Gráfico box plot da perda de massa dos quatro fungos para a espécie <i>Aspidosperma multiflorum</i>	61
Figura 6. 7. Extratos obtidos da espécie <i>Machaerium acutifolium</i> . Da esquerda para a direita: EMB; extrato hexânico; extrato diclorometânico; extrato do acetato de etila e extrato butanólico	63
Figura 6. 8. Valores médios de inibição fúngica dos diferentes extratos da espécie <i>P. abruptus</i>	66
Figura 6. 9. Valores médios de inibição fúngica dos diferentes extratos da espécie <i>D. aurantiaca</i>	68
Figura 6. 10. Valores médios de inibição fúngica dos diferentes extratos da espécie <i>Terminalia fagifolia</i>	69
Figura 6. 11. Valores médios de inibição fúngica dos diferentes extratos da espécie <i>Machaerium acutifolium</i>	70
Figura 6. 12. Valores médios de inibição fúngica dos diferentes extratos da espécie <i>Aspidosperma multiflorum</i>	71
Figura 6. 13. Efeito inibitório dos diferentes extratos para os quatro fungos testados.....	72

LISTA DE SÍMBOLOS, NOMENCLATURA E ABREVIACÕES

AcEtl – Extrato do acetato de etila

Bits – dígito binário

But – Extrato butanólico

CIM – Concentração Inibitória Mínima

cm – centímetros

cm² – centímetro quadrado

Dcl – Extrato diclorometânico

EMB – Extrato Metanólico Bruto

g – gramas

g/cm³ – gramas por centímetro cúbico

GS – *Gloeophyllum striatum*

GT – *Gloeophyllum trabeum*

Hex – Extrato hexânico

h – hora

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

JPEG – método de compressão de imagens

LPF – Laboratório de Produtos Florestais

m – metros

mL – mililitro

mm – mililitro

m/m – relação massa-massa

pH – potencial hidrogeniônico

ppm – parte por milhão

PM – perda de massa

PS – *Pycnoporus sanguineus*

RGB – cores aditivas

RPM – Rotações por minuto

SFB – Serviço Florestal Brasileiro

spp – espécie

TUE – Teor de Umidade de Equilíbrio

TV – *Trametes versicolor*

μL – microlitro

°C – graus Celsius

% – porcentagem

± – mais ou menos

1. INTRODUÇÃO

A natureza tem sido uma inesgotável fonte de compostos químicos por milhares de anos, e um expressivo número desses compostos são descobertos e isolados a todo o momento por sua relevância industrial, econômica, mas principalmente por suas atividades biológicas. Existem diversas iniciativas no sentido de expandir a utilização de compostos naturais como produtos preservativos de madeiras.

Há algum tempo já existem cepas de fungos resistentes a esses fungicidas, no entanto, a substituição desses compostos não é simples, uma vez que são amplamente estabelecidos no mercado, produzidos em larga escala e com preços atrativos ao consumidor (MEDEIROS, 2014).

A demanda mundial por biocidas segue em crescimento desde 2006 e em contraponto à essa demanda, países desenvolvidos estão sendo regidos por legislações cada vez mais exigentes em relação a estes produtos, restringindo ou proibindo o uso de alguns preservativos tradicionalmente utilizados, como o CCA e creosoto (BRAND et al., 2006).

Atualmente, vários estudos estão sendo realizados com o objetivo de encontrar produtos de proteção da madeira menos tóxicos para o homem e o meio ambiente. Um ramo que merece destaque e com resultados encorajadores acerca do potencial de inibição e eficiência em organismos xilófagos tem sido os compostos naturais, como os óleos essenciais e os metabólitos secundários, presentes nos extrativos de madeiras. Estes são compostos químicos produzidos pelas células vegetais e estão correlacionados com a função de proteção da planta ou atração de polinizadores (SARKER et al., 2012).

Cada planta produz os seus próprios metabólitos secundários, e alguns destes compostos químicos podem possuir propriedades antifúngicas que influenciam na durabilidade natural das madeiras ao ataque de fungos apodrecedores mais que o teor total de extrativos ou a densidade da madeira.

O bioma Caatinga, considerado um dos mais ameaçados e menos estudados cientificamente (IBAMA, 2011), possui grande número de espécies capazes de fornecer substâncias com potencial bioativo, sendo, de extrema urgência o desenvolvimento de pesquisas nessa área.

Assim, este trabalho abre caminho para a pesquisa de compostos químicos que tenham atividade antifúngica, por meio da avaliação do efeito dos metabólitos secundários contidos nos extrativos de madeiras sobre os fungos apodrecedores.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a relação entre a inibição promovida pelos extratos obtidos com diferentes polaridades em cinco espécies de madeiras da Caatinga e a sua durabilidade natural ao ataque de fungos apodrecedores.

2.2. Objetivos secundários

São objetivos secundários deste trabalho:

- Avaliar a durabilidade natural de cinco espécies de madeiras de Caatinga submetidas ao ataque de quatro fungos apodrecedores em um ensaio de apodrecimento acelerado em laboratório;
- Avaliar a quantidade total de extrativos obtidos da madeira por meio da maceração a frio com metanol, bem como a quantidade total separada com o *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e 1-butanol;
- Avaliar o potencial de inibição de cada um dos extratos submetidos aos fungos apodrecedores *Trametes versicolor*, *Pycnoporus sanguineus*, *Gloeophyllum trabeum* e *Gloeophyllum striatum*, por meio do teste de difusão em placas de Petri.
- Avaliar a relação entre as classes de metabólitos secundários e a durabilidade natural obtida através de ensaio de apodrecimento acelerado para cada uma das espécies de madeiras.

3. HIPÓTESE

Os metabólitos secundários presentes em cada um dos extratos separados possuem atividade antifúngica contra o ataque de fungos apodrecedores de madeira.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Bioma Caatinga

Segundo IBAMA (2011) o termo Caatinga é de origem Tupi e significa “mata branca”, referindo-se ao aspecto da vegetação durante a estação seca, quando caem as folhas da maioria das árvores e os troncos aparecem esbranquiçados e brilhantes, dominando a paisagem.

Este bioma ocupa aproximadamente 11% do território nacional, abrangendo uma área aproximada de 845.000 km² compreendendo dez estados brasileiros, sendo uma vegetação exclusiva do Brasil. A Caatinga ocorre em uma região semiárida com chuvas irregulares e concentradas em poucos meses do ano, com média de temperatura entre 25 a 30°C, com média de chuva anual de 250-500 mm (BENEVIDES et al., 2007; TRENTIN et al., 2011).

Este bioma é constituído por várias formações vegetais dominantes, com espécies lenhosas, herbáceas, cactáceas e bromeliáceas, totalmente adaptadas ao clima seco e à disponibilidade variável de água (ASSOCIAÇÃO CAATINGA, 2012; IBAMA, 2011).

A Caatinga é o bioma menos estudado cientificamente no Brasil, apesar de ser um dos mais ameaçados. Grande parte das madeiras presentes na região é utilizada apenas como lenha e carvão, uma vez que a rigidez do clima inviabiliza a maioria das tentativas agrícolas e pecuárias. Esse descaso com as espécies madeireiras da região leva ao desconhecimento das diferentes propriedades dessas espécies, bem como ao subaproveitamento do potencial de uso de cada uma delas (BENEVIDES et al., 2007).

4.2. Espécies de madeiras da Caatinga

São apresentadas a seguir algumas informações sobre as características das cinco espécies de madeiras da Caatinga.

4.2.1. *Pterodon abruptus* (Moric.) Benth. (Pau Amarelo)

Segundo o (JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO, 2017) a *P. abruptus* é uma árvore nativa e endêmica no Brasil, pertencente à família Fabacea e distribui-se nas regiões norte, nordeste e sudeste do Brasil. Possui cerne, alborno e anéis de crescimento distintos a olho nu, grã entrecruzada ou reversa. É considerada uma madeira de textura fina que varia de dura a moderadamente dura ao corte transversal manual¹.

4.2.2. *Diptychandra aurantiaca* Tul. (Birro Branco)

É uma espécie não endêmica no país e encontrada no norte, nordeste, centro-oeste e sudeste do Brasil (JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO, 2017). Possui cerne e alborno distintos visualmente, sendo considerada uma madeira moderadamente pesada, dura e resistente. Possui grã que varia entre direita, entrecruzada ou reversa e com textura fina¹. A madeira tem excelente utilização em usos externos, tais como moirões, postes,

¹ Informação fornecida pelo setor de Anatomia e Morfologia do Laboratório de Produtos Florestais – LPF.

cruzetas e dormentes, mas também é utilizada na construção civil e para o paisagismo em geral (LORENZI, 1992).

4.2.3. *Terminalia fagifolia* Mart. (Chapada)

Pertencente à família das Combretaceae, a *T. fagifolia* é uma espécie nativa do Brasil. A madeira pode ser empregada na marcenaria e na construção civil, sendo também utilizada como árvore ornamental (JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO, 2017). Possui cerne, alborno e anéis de crescimento distintos pela cor. A textura situa-se entre fina a média, porém dura ao corte transversal manual e com grã entrecruzada ou revessa¹. Na medicina popular, a casca é usada no combate a aftas e tumores (SOUSA et al., 2007).

4.2.4. *Machaerium acutifolium* Vogel (Coração de Negro)

É uma árvore nativa do Brasil e não endêmica, apesar da grande distribuição por todo o território brasileiro (JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO, 2017). Possui cerne e alborno distintos pela cor, com anéis de crescimento variando entre distintos a pouco distintos. É considerada uma madeira dura ao corte transversal manual, com textura fina e grã entrecruzada ou revessa¹.

4.2.5. *Aspidosperma multiflorum* A. DC. (Pequiá Cascudo)

Pertencente à família das Apocynaceae, a espécie apresenta cerne e alborno indistintos, porém com visualização dos anéis de crescimento. É considerada uma madeira dura a moderadamente dura ao corte transversal manual. Possui textura fina e grã variável entre direita, entrecruzada ou revessa².

A madeira do Pequiá Cascudo é comumente empregada na construção civil, marcenaria de luxo e confecção de peças que exijam resistência, sendo também muito utilizada para paisagismo em áreas urbanas (JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO, 2017; LORENZI, 1992).

4.3. Fungos apodrecedores

Os fungos apodrecedores fazem parte de um importante ciclo ecológico dentro dos sistemas florestais. Eles desenvolveram um mecanismo eficiente de desconstrução das paredes celulares da madeira por meio da ação de suas enzimas em um processo digestivo capaz de quebrar moléculas mais complexas e gerar energia para suas funções vitais,

² Informação fornecida pelo setor de Anatomia e Morfologia do Laboratório de Produtos Florestais – LPF.

produzindo substâncias húmicas ligadas ao solo, dióxido de carbono e água (CULLEN, 2014).

Entretanto, os fungos apodrecedores, por esse mesmo motivo, causam grandes perdas econômicas, atacando e destruindo, em todo o mundo, a madeira utilizada para os mais diversos fins, como em construções, móveis e pequenos objetos.

O Basidiomicota é o maior grupo de fungos deterioradores de madeira, com aproximadamente 22.000 espécies conhecidas, sendo a maior parte dos fungos visíveis em campos e árvores. Para crescer, os fungos apodrecedores necessitam ser capazes de tolerar certos estresses físico-químicos associados à madeira, como, por exemplo, a presença da lignina, bem como dos diferentes metabólitos secundários no extrativo (CARLILE et al., 2001; ZABEL; MORRELL, 1992).

Os fungos que causam apodrecimento são um grupo particular de organismos heterotróficos que retiram os nutrientes da madeira e, por isso, são denominados de fungos xilófagos. A anatomia da espécie hospedeira e a estrutura da parede celular dos diferentes tipos de células são fatores decisivos na determinação do padrão de deterioração que esses fungos promovem. Essa deterioração altera funções fisiológicas, físico-químicas, mecânicas, entre outras, da madeira, e resultam do efeito das enzimas e toxinas produzidas pelos fungos sobre as células e parede celular, visando a utilização destes componentes como nutrientes (BARI et al., 2015; SILVA et al., 2001; STANCHEVA et al., 2009; ZABEL; MORRELL, 1992).

O processo de deterioração geralmente começa quando esporos ou micélios, dispersos pelo ar, se aderem à superfície da madeira, tornando-a mole, descolorida, e metabolizando-a completamente com o passar do tempo. Os tipos de enzimas e toxinas produzidas por cada fungo determinam as características do apodrecimento da madeira, bem como a classificação entre fungos de podridão branca e parda (STANCHEVA et al., 2009; ZABEL; MORRELL, 1992). Esses fungos se distinguem por possuírem mecanismos distintos na quebra da celulose e lignina presente na parede das células vegetais.

Com relação ao pH, os fungos apodrecedores possuem preferência por um ambiente ligeiramente ácido, sendo 6 o pH ótimo para o seu crescimento. Durante o ataque, os fungos de podridão parda reduzem o pH da madeira para níveis menores que os fungos de podridão branca, e talvez por esse motivo, tenham menor tolerância para ambientes com um pH mais elevado (GOODELL, 2003).

O crescimento fúngico em condições ideais de umidade e temperatura ocorre em poucos dias. A madeira com teor de umidade inferior a 20% impede o crescimento de

fungos, acima disso, torna-se extremamente suscetível ao ataque. Já a maioria dos fungos apodrecedores apresenta um crescimento ótimo entre 20 e 36°C, sendo que, em valores fora deste intervalo, a ação dos fungos apodrecedores é inibida ou fortemente retardada (GABRIEL; SVEC, 2017; NICHOLAS; MILITZ, 2003; SILVA et al., 2001).

4.3.1. Podridão branca

Os basidiomicetos de podridão branca possuem a capacidade única de deteriorar completamente a lignina, um heteropolímero extremamente complexo e sem regularidade estereoquímica que incrusta as paredes celulares e serve como uma barreira protetora dificultando o ataque. Esta habilidade dos fungos de podridão branca é geralmente vista como uma estratégia para ganhar acesso aos polímeros dos carboidratos da parede celular e usá-los como fonte de energia e está relacionada com a produção de enzimas de carboidrato-ativo (“enzimas CAZY”) como as peroxidases, lacases e enzimas oxidativas adicionais que deterioram os oligo e polissacarídeos. Além disso, geram radicais aromáticos quebrando diversas ligações da lignina através de reações não enzimáticas (VALETTE et al., 2017; CULLEN, 2014; SCHWARZE, 2007; AUST, 1995).

Os fungos de podridão branca são organismos robustos que possuem alta tolerância a ambientes tóxicos, uma vez que suas enzimas conseguem deteriorar a maioria dos anéis aromáticos. Estes por sua vez estão presentes, por exemplo, na lignina, organopoluentes e em preservantes de madeira como o pentaclorofenol, fazendo com isso, a reciclagem de compostos de difícil deterioração (MOORE et al., 2011).

Dix e Webster (1995) afirmam que a metabolização dos carboidratos e lignina da madeira não acontece sem o metabolismo concomitante de alguma celulose ou outro carboidrato da madeira. Os mesmos autores, Eaton e Hale (1993) e Cullen (2014) afirmam que existem dois tipos diferentes de fungos de podridão branca, aqueles que deterioram simultaneamente a lignina e a celulose da madeira, e os que priorizam a lignina e a hemicelulose antes de começar a decomposição da celulose.

A grande maioria das espécies de fungos de podridão branca deteriora principalmente madeira de angiospermas, em função da preferência pelo tipo de substrato dessas espécies, em especial, pelas células do parênquima. Essa preferência pode ser ocasionada pelo alto teor de lignina presente no espaço intercelular das angiospermas (SCHWARZE, 2007; TUOR et al., 1995).

Os fungos de podridão branca crescem principalmente no lúmen das células vegetais da madeira, podendo inicialmente possuir numerosas hifas. O início da

colonização nas angiospermas ocorre via parênquima dos raios e por meio das pontuações nos vasos, enquanto que nas gimnospermas, afeta o parênquima dos raios e os canais resiníferos. A passagem das hifas entre as células ocorre inicialmente por meio das pontuações, mas posteriormente, via perfurações e fendas na parede da célula em função do avançado estado de decomposição. Os padrões de ataque à madeira podem variar entre as diversas cepas de fungos de podridão branca, mas em geral, a oxidação da lignina por estes fungos faz com que a madeira adquira uma aparência esbranquiçada e amolecida nos estágios tardios de deterioração (EATON; HALE, 1993)

4.3.1.1. *Trametes versicolor* (L.) Lloyd

É um dos fungos mais difundidos e documentados em todo o mundo, sendo por causa de suas características físicas conhecido popularmente como “rabo de peru” em alguns países, podendo ser observado durante todo o ano. O *T. versicolor* é um fungo muito estudado por causa das suas diversas possibilidades de uso, podendo ser utilizado na pesquisa de compostos antitumorais e antimicrobianos, bem como na micorremediação e filtração de ambientes poluídos ou tóxicos, uma vez que tem a capacidade de promover a quebra de diferentes compostos químicos, como por exemplo, o mercúrio (GRYCZKA, 2009).

Os basidiomas são variáveis e sua forma e coloração dependem do hospedeiro e do ambiente em que se encontram. Causam uma deterioração uniforme e ocorrem em árvores feridas ou mortas (Figura 4.1). São comumente observados em cavacos de madeira para celulose, em madeiras de minas, dormentes e em madeiras em serviço sem contato com o solo (STANCHEVA et al., 2009; EATON; HALE, 1993).



Figura 4. 1. Basidioma do *Trametes versicolor* (L.) Lloyd. Fonte: Gryczka (2009).

4.3.1.2. *Pycnoporus sanguineus* (L.) Murrill

Este fungo é encontrado em regiões tropicais e subtropicais, possuindo distribuição por quase todo o Brasil (GRYCZKA, 2009; JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO, 2017). Cresce principalmente em madeira morta ou em decomposição, e caracteriza-se especialmente pela sua coloração avermelhada, conforme observado na Figura 4.2. Segundo Stancheva et al. (2009) o *P. sanguineus* forma basidiomas no verão e outono, e ataca troncos de espécies de árvores decíduas em decomposição que possuem rachaduras ou ferimentos nas cascas.



Figura 4. 2. Basidioma do *Pycnoporus sanguineus* (L.) Murrill. Fonte: Gryczka (2009).

4.3.2. Podridão parda

O apodrecimento causado pelos fungos de podridão parda é o mais prevalente e destrutivo tipo de deterioração das madeiras em países de clima temperado. Este por sua vez pode ser ocasionado pela preferência que o fungo tem pelo substrato de madeira de coníferas, que possui maior teor de lignina do que nas angiospermas, tornando-os assim, mais eficientes em obter energia para crescimento e reprodução do que os fungos de podridão branca. Esta estratégia favorece sua sobrevivência e propagação em regiões mais frias e marcadas com poucas estações propícias ao crescimento (CULLEN, 2014; SCHWARZE, 2007; CLAUSEN et al., 2003; GOODELL, 2003; DIX; WEBSTER, 1995; TUOR et al., 1995).

As perdas causadas por esses fungos são difíceis de quantificar, mas estima-se que aproximadamente 10% da madeira coletada nos Estados Unidos é usada para substituir peças de madeira deterioradas em serviço (FOREST PRODUCTS LABORATORY, 2017)

Os basidiomicetos de podridão parda são relativamente poucos numerosos quando comparados com os fungos apodrecedores, correspondendo a menos de 10% de todos os

basidiomicetos deterioradores de madeira (DIX; WEBSTER, 1995). Estes fungos não produzem enzimas para digestão da lignina, mas possuem mecanismos que resultam na modificação e pequena depleção da lignina durante o processo de decomposição. Estudos sugerem que agentes de baixo peso molecular produzidos pelo fungo são responsáveis pelos estágios iniciais de despolimerização da parede celular, através da produção de radicais livres, o Sistema Fenton, esse mecanismo é favorecido pela diminuição do pH durante o ataque (GOODELL, 2003).

Após a remoção da celulose e hemicelulose da madeira para obtenção de energia pelos fungos de podridão parda, a massa de lignina resultante permanece como um resíduo polimérico, que contribui para o *pool* de carbono em solos húmicos, típicos de florestas (CULLEN, 2014).

Os fungos de podridão parda iniciam a deterioração pela deposição de esporos ou fragmentos miceliais carreados pelo vento, água, insetos ou vetores animais até a superfície da madeira. O modo como esses fungos atacam peças e estruturas de madeira é considerado mais problemático do que na podridão branca, pois promovem rapidamente a perda de resistência da madeira em uso (GOODELL, 2003).

Inicialmente, o fungo invade a madeira passando pelo lume das células vegetais e coloniza a superfície longitudinal via raios. Na sequência, as hifas penetram nas fibras e traqueídeos do sistema axial da madeira e as pontuações são facilmente destruídas. O fungo atravessa de uma célula para outra por meio de fendas formadas na parede celular durante o ataque (GOODELL, 2003; ZABEL; MORRELL, 1992).

A madeira atacada pela podridão parda apresenta-se nos estágios iniciais ligeiramente escurecida, e conforme progride o ataque, adquire uma coloração pardo-escura com pequena resistência residual. Nos estágios finais de deterioração, a madeira apresenta rachaduras profundas, com um aspecto cúbico típico, em função de rachaduras longitudinais e transversais, torna-se friável, e tende a colapsar devido ao encolhimento causado pela perda de carboidratos da parede celular. O tamanho e profundidade das rachaduras variam conforme o fungo e a espécie de madeira (EATON; HALE, 1993; LEPAGE et al., 1986).

4.3.2.1. *Gloeophyllum trabeum* (Pers.) Murrill

Fungo com ocorrência em diversos países e que promove uma rápida deterioração, atacando tanto madeiras de folhosas, quanto de coníferas (Figura 4.3). Ocorre em árvores em pé, toras derrubadas, tocos, toras em contato com o solo, peças utilizadas em telhados,

postes, dormentes, pontes, torres, barcos de madeira e peças de madeira armazenadas. O fungo possui certa tolerância ao processo de secagem, bem como ao arsênio e cobre (EATON; HALE, 1993).



Figura 4. 3. Basidioma do *Gloeophyllum trabeum* (Pers.) Murrill. Fonte: Gryczka (2009).

4.3.2.2. *Gloeophyllum striatum* (Fr.) Murrill

Possui distribuição Pantropical, isto é, está presente em toda a faixa tropical ao redor do globo terrestre, sendo encontrado também em regiões subtropicais e temperadas. O *G. Striatum* é um fungo conhecido há bastante tempo, mas possui poucas informações a respeito na literatura, podendo ser visto na Figura 4.4 (BI et al., 1993; ROBERT et al., 2005).



Figura 4. 4. Basidioma do *Gloeophyllum striatum* (Fr.) Murrill. Fonte: Gryczka (2009).

4.4. Durabilidade natural

A resistência natural da madeira, também conhecida como durabilidade natural, é a capacidade das espécies de madeira resistirem por um determinado período de tempo à deterioração biológica. A durabilidade natural é avaliada em testes de campo ou em ensaios laboratoriais com madeira de cerne ou de cerne e alborno, caso sejam indistintos, e esses procedimentos categorizam a madeira em classes de durabilidade (WONG et al., 2005). Os testes de laboratório criam uma situação que pode ser definida como não natural, uma vez que os corpos de prova são submetidos a somente um tipo de ataque e, portanto, os resultados devem ser usados comparativamente (CHARIFO et al., 2011).

A durabilidade natural das espécies de madeira é um dos principais fatores de desempenho utilizados comercialmente para avaliar a adequação de uma espécie a um uso específico com base no grau de risco a que é submetida (SUNDARARAJ et al., 2015).

Segundo Wong et al. (2005), a madeira naturalmente durável é um importante material, não apenas na construção civil, mas em outros usos, pois nem todas as espécies podem ser tratadas quimicamente. Com o aumento da consciência ambiental, muitos consumidores estão preferindo comprar e utilizar madeiras não tratadas, uma vez que os custos e a mão-de-obra com a troca de madeiras não-duráveis fazem o consumidor perceber o valor de uma espécie de madeira com alta durabilidade.

Normalmente, uma espécie de madeira tende a apresentar um comportamento padrão ao ser submetida a um determinado tipo de ataque, porém, é possível observar pequenas diferenças no grau de resistência natural entre diferentes árvores da mesma espécie e até mesmo entre peças de madeira retiradas em diferentes posições dentro de uma mesma árvore (EATON; HALE, 1993; SCHEFFER; HOPP, 1949).

Em geral, a resistência de cada espécie e o grau de risco a que está submetida são dois fatores principais que influenciam a performance da madeira em uso. Estes fatores podem ser classificados em endógenos e exógenos. Fatores endógenos estão relacionados com os aspectos físico-químicos da madeira, como o teor de umidade, densidade, composição química, concentração de extrativos, idade da árvore, tamanho, presenças de tiloses nos vasos e aspectos genéticos. Os fatores exógenos são aqueles relacionados à área de uso da madeira, como as condições climáticas, local de uso e presença de organismos xilófagos. Esses fatores controlam ou estimulam fortemente os organismos decompositores de madeira, como fungos e insetos, e dessa forma aceleram o processo de decomposição (MOYA; BERROCAL, 2015; SUNDARARAJ et al., 2015; SEHLSTED-PERSSON; KARLSSON, 2010; WONG et al., 2005; SCHEFFER; HOPP, 1949)

Segundo Amorim et al. (2016) a densidade é um fator amplamente correlacionado com a resistência natural da madeira, uma vez que existem vários estudos que afirmam que a densidade influencia a durabilidade natural. De acordo com Kamiński e Laurow (1974), citado por Andres et al. (2015) e Yamamoto e Hong (1994) citado por Antwi-Boasiako e Pitiman (2009) a densidade está ligada intimamente às propriedades físicas e mecânicas da madeira. Assim, uma madeira com alta densidade possui uma espessura considerável de parede celular e baixa difusão de gases e água dentro das células da madeira, constituindo assim, uma barreira natural contra a propagação de fungos, sendo considerada uma madeira muito resistente. Para Sehlsted-Persson e Karlsson (2010) essa maior durabilidade natural de madeiras mais densas pode ser explicada simplesmente porque estão em um bloco mais sólido, com menor porosidade, o que dificulta o ataque de organismos deterioradores durante os curtos ensaios de laboratório.

Segundo Wong et al. (1983), essa relação entre densidade e durabilidade natural ocorre em certas coníferas do hemisfério norte, pois nessas espécies, os extrativos não são um fator primordial para o aumento da resistência à deterioração, uma vez que o clima temperado é muito menos favorável aos agentes de deterioração do que o clima tropical (MOYA; BERROCAL, 2015).

Em contraste, a tendência dos pesquisadores é de que a densidade isoladamente não é o principal fator que agrega durabilidade natural à madeira, e se torna claro conforme a durabilidade de espécies de madeiras com diferentes densidade são comparadas. Essa resistência natural estaria muito mais correlacionada com o tipo de composto químico presente nos extrativos da madeira, teor de lignina, bem como a sua distribuição nos tecidos vegetais (microdistribuição), que, por consequência, acabam influenciando na densidade da madeira (CORASSA et al., 2013; ANTWI-BOASIAKO; PITIMAN, 2009; WONG et al., 2005).

A madeira é formada por células de sustentação mecânica e condução de água, que abrangem entre 60 a 90% do seu volume e que morrem na maturidade funcional da árvore. Estas células mortas apresentam paredes rígidas e uma cavidade denominada lume. O lume destas células, particularmente o das fibras presentes na madeira, são frequentemente preenchidos com extrativos, que atravessam as paredes celulares nas pontuações e em seus estreitos canais, restringindo fortemente o avanço de agentes invasores, bem como a deterioração, conforme pode ser observado na Figura 4.5 (KLOCK et al., 2005; NILSSON et al., 1992).

Com o avanço nas ferramentas analíticas de química da madeira, vários estudos demonstram interesse em investigar o potencial inibitório dos extrativos de espécies com alta resistência natural. Nzokou e Kamdem (2003), Thevenon et al. (2001) e Rudman (1992), citados por Wong et al. (2005), bem como Rodrigues et al. (2012) promoveram a retirada de extrativos do cerne de madeiras duráveis da Malásia e da amazonia, respectivamente, com diferentes solventes e transferiram para madeiras não-duráveis, constatando um aumento na resistência das madeiras tratadas.

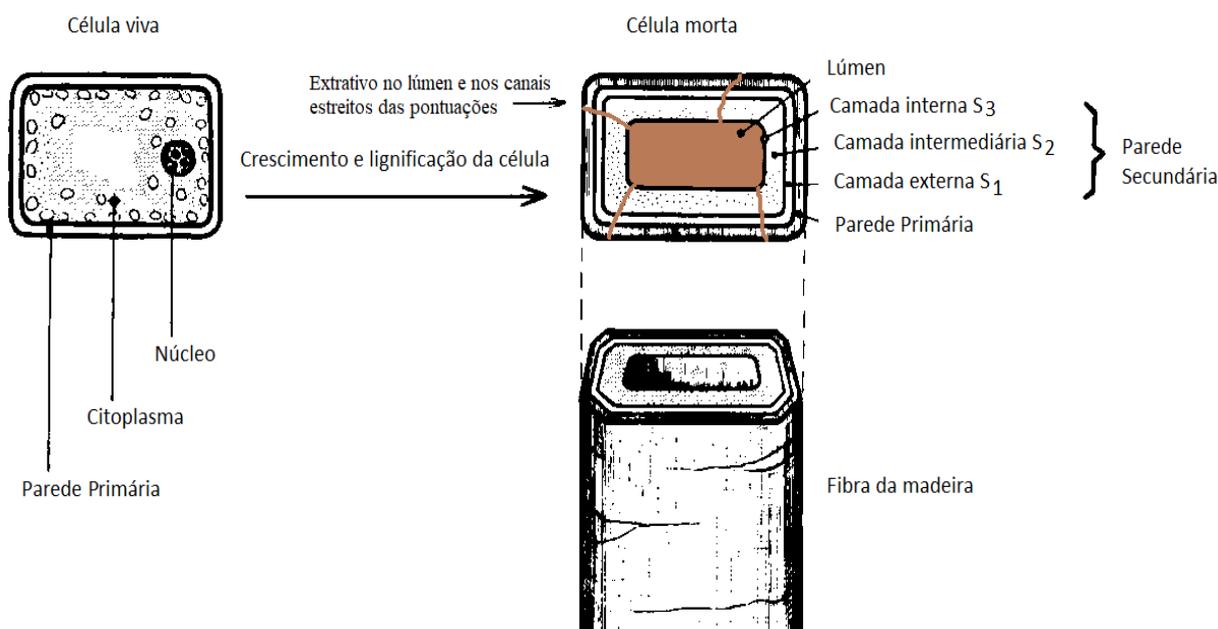


Figura 4. 5. Transformação da célula do alburno em cerne e visualização do extrativo em uma fibra da madeira. Fonte: Adaptado de Sjöström (1993).

Segundo Brocco et al. (2017) em algumas espécies os altos teores de extrativos são um indicativo de maior durabilidade natural, contudo, deve-se avaliar com cuidado somente esse valor, uma vez que a natureza dos compostos pode ser mais importante que o teor total de extrativos, conforme observado por Kirker et al. (2013) e Ribera e Zuñiga (2012).

Paes et al. (2015) e Abu-Zaharin (2013) testaram os efeitos dos extrativos e da densidade de seis espécies de madeiras ao ataque de cupins xilófagos. Esses estudos demonstraram que o teor total de extrativos e a densidade não obtiveram uma correlação significativa com a perda de massa. Para Sundararaj et al. (2015), Charifo et al. (2011), Dix e Webster (1995), apesar de espécies com maior densidade e teor de extrativo serem mais resistentes, o principal fator para uma maior durabilidade natural da madeira seria a

presença de compostos químicos tóxicos aos organismos xilófagos, mesmo em pequenas quantidades.

4.5. Metabólitos secundários

A madeira é composta por substâncias macromoleculares e micromoleculares e entre as substâncias macromoleculares, encontramos a celulose, as polioses (hemicelulose) e a lignina que estão presente em todas as madeiras. As substâncias micromoleculares são compostas por componentes de baixo peso molecular, formados de matéria orgânica e inorgânica. Os componentes orgânicos de baixo peso molecular da madeira são denominados de extrativos. Estes por sinal são compostos por metabólitos secundários, e embora não sejam necessariamente essenciais ao organismo produtor, garantem vantagens para a sua sobrevivência e perpetuação da espécie. Por fim, as substâncias minerais compõem a matéria inorgânica da madeira (SIMÕES et al., 2006; KLOCK et al., 2005).

O local de síntese dos metabólitos secundários não é o local de acumulação. Dessa forma, os composto hidrofílicos geralmente são armazenados nos vacúolos celulares, enquanto os compostos lipofílicos são geralmente retidos nos dutos resiníferos, laticíferos, células produtores de óleos, tricomas ou nas cutículas (RIBERA; ZUÑIGA, 2012).

Os metabólitos secundários podem ser encontrados no cerne da madeira, mas também em maiores quantidades nas cascas, folhas, espinhos, galhos, frutos e sementes, e geralmente, sendo encontrados mais nesses órgãos do que na madeira (PAIVA et al., 2010). Os extrativos da madeira não fazem parte da estrutura da parede celular e lamela média, sendo por isso classificados como compostos químicos acidentais (KLOCK et al., 2005).

A soma de todas as reações químicas que ocorrem em um organismo é chamada de metabolismo. Os metabólitos primários são usualmente descritos como substâncias fundamentais nas unidades químicas das células vegetais, como ácidos nucléicos, proteínas e polissacarídeos. Os metabólitos secundários são todos os compostos produzidos por um organismo e que não são essenciais para o funcionamento celular, esses compostos dotam a madeira com suas cores, matizes, perfumes e beleza (OBST, 1998).

A distinção entre os metabólitos primários e secundários nem sempre é tão fácil, uma vez que ao nível de biossíntese, metabólitos primários e secundários dividem muitas das rotas metabólicas intermediárias (ÖRDÖG; ZOLTÁN, 2011)

As plantas têm sido fonte de uma grande variedade de compostos biologicamente ativos por muitos séculos e para os mais variados fins, uma vez que são matrizes

complexas, produzindo uma gama de metabólitos secundários com diferentes polaridades e grupos funcionais. Segundo Arif et al. (2011) aproximadamente 13.000 metabólitos secundários haviam sido isolados até o ano de 2011, o que corresponde a menos de 10% do total. Em muitos casos, essas substâncias servem como mecanismo de defesa contra a predação por microrganismos, insetos e herbívoros devido às suas propriedades repelentes. Em outros casos, os metabólitos secundários podem atrair espécies polinizadoras, em virtude das características sensoriais de alguns compostos, como odor, sabor e textura (PAIVA et al., 2010).

Segundo Vinale et al. (2014) os metabólitos secundários apresentam várias atividades biológicas e um importante papel na regulação entre os organismos, sendo possivelmente relacionados às funções de sobrevivência como a competição contra outros micro e macrorganismos, assim como na simbiose. Alguns destes metabólitos podem modificar o crescimento e metabolismo das plantas, enquanto outros parecem priorizar em processos fúngicos específicos, como a esporulação e o crescimento das hifas. O desenvolvimento dos metabólitos secundários pode tanto ser parte do programa normal de crescimento de uma planta, como acontecer em resposta ao ataque de um organismo patogênico (HOLM FREIESLEBEN; JÄGER, 2014). Dessa forma, a habilidade das plantas em competir e sobreviver é profundamente afetada pelas funções ecológicas dos metabólitos secundários (ÖRDÖG; ZOLTÁN, 2011)

Apesar da existência de fatores genéticos na produção dos metabólitos secundários, sua expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos. Os metabólitos secundários representam a interface química entre as plantas e o meio ambiente, e a sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais, idade e desenvolvimento da planta, gerando mudanças tanto na quantidade dos metabólitos secundários, quanto na natureza dos compostos. (GOBBO-NETO; LOPES, 2007)..

Paiva et al. (2010) afirmam que diferentes tipos de metabólitos secundários têm sido identificados como princípio ativo de extratos antimicrobianos obtidos com solventes orgânicos. Embora um certo número de publicações tenha focado no isolamento e identificação de compostos bioativos, é importante ter em mente que um simples composto pode não ser responsável pela atividade observada, mas sim a combinação de vários compostos, interagindo de modo sinérgico entre si. Assim, os vários metabólitos secundários presentes no extrativo da madeira podem ter efeito sinérgico ou antagonista entre si.

As categorias de compostos químicos comumente encontrados incluem ceras, ácidos gordurosos, poliacetilenos, terpenoides (monoterpenoides, iridoides, sesquiterpenoides, diterpenoides, triterpenoides), esteróides, óleos essenciais (terpenoides inferiores e fenilpropanóides), compostos fenólicos (fenóis simples, fenilpropanoides, flavonóides, taninos, antocianinas, quinonas, cumarinas, lignanas), alcalóides e derivados glicosídicos (saponinas, glicosídeos cardíacos, glicosídeos de flavonóides), além de substâncias aromáticas, nitrogenadas, dentre outros (SARKER et al., 2012; CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Vários trabalhos têm documentado a atividade antifúngica dos metabólitos secundários utilizando as mais diferentes metodologias (SILVA; SOUZA, 2016; HOLM FREIESLEBEN; JÄGER, 2014; SHENTU et al., 2014; PAIVA et al. 2010; WINK; SCHIMMER, 2010). Holm Freiesleben e Jäger (2014) encontraram correlação entre o tipo de composto presente no extrativo e seu potencial antifúngico. Essa atividade antifúngica promovida pelos metabólitos secundários pode ser obtida com pelos menos seis mecanismos de diferentes ações, como a inibição da formação da parede celular; rompimento da membrana celular; disfunção da mitocôndria do fungo; inibição da divisão celular; inibição da síntese de RNA/DNA ou de proteínas essenciais e inibição das bombas de efluxo que fazem o transporte das substâncias tóxicas produzidas nos diversos procedimentos metabólicos para fora da célula (HOLM FREIESLEBEN; JÄGER, 2014).

4.6. Potencial de uso dos metabólitos secundários

Os preservativos de madeira atualmente são formados por substâncias como o arsênio, cromo, cobre e boro. Estas substâncias tornam o processo de proteção da madeira relativamente caro e perigoso para o ser humano e para o meio ambiente, além de trazer transtornos ao final da vida útil de uma madeira tratada, representando um perigo o descarte e reutilização desse material.

Com a gradual retirada da maioria dos produtos químicos preservantes de madeiras como o arseniato de cobre cromatado (CCA), a tendência tem sido a busca por produtos ambientalmente amigáveis ou produtos alternativos livres de substâncias químicas nocivas. Existe uma grande demanda por novos fungicidas naturais, os quais estão presentes em grande quantidade nos extrativos das espécies madeireiras. Nessa perspectiva abre-se caminho para a pesquisa e inovação dos produtos feitos à base de metabólitos secundários. Ribera e Zuñiga (2012) demonstraram a efetiva atividade antifúngica promovida pelos metabólitos secundários quando comparados com alguns fungicidas comerciais.

As plantas são uma rica fonte de material biológico, possuem ainda, a capacidade quase ilimitada de sintetizar substâncias aromáticas de diferentes grupos funcionais, disponibilizando nesse caso uma ampla variedade de metabólitos para a seleção da molécula com a atividade desejada (ARIF et al., 2011). Estima-se que entre 1-10% das plantas são usadas pelo homem de um total estimado entre 250.000 a 500.000 espécies de plantas existentes na Terra. Muitas pesquisas estão sendo feitas com metabólitos secundários que possuem propriedades antifúngicas (RODRIGUES et al., 2012; COLEMAN et al., 2011; XU et al., 2009; SCHULZ et al., 2002). Isso demonstra o potencial da descoberta de novos metabólitos secundários na natureza e que podem ser utilizados para os mais diversos fins. Um forte motivo para a preservação da natureza ser extremamente importante para a humanidade (CRAGG; NEWMAN, 2001).

A descoberta de novos compostos químicos biologicamente ativos obtidos de plantas passa por diversas etapas (seleção da espécie a ser pesquisada, extração dos metabólitos secundários, isolamento, caracterização do composto ativo, avaliação do efeito inibitório e produção do composto em escala industrial) em longos processos que se estendem por anos (SASIDHARAN et al., 2011).

Esse campo de pesquisa apresenta resultados muito promissores, apesar da produção dos metabólitos secundários pelas plantas não ser sempre satisfatória. Por essas razões, diferentes ferramentas biotecnológicas podem ser usadas com o objetivo de alavancar essa produção: obtenção de compostos bioativos a partir de uma cultura de células vegetais, métodos alternativos de cultivo, melhoramento genético e metabólico das células produtoras (RIBERA; ZUÑIGA, 2012).

Para DiCosmo e Masanaru (1995), uma barreira significativa à comercialização destes produtos é que a produção de metabólitos bioativos em culturas de células vegetais, somente se torna plausível, caso o preço de venda esteja acima de mil dólares por quilo. Esse fato torna a competição com indústrias químicas e petroquímicas muito difícil e, segundo o autor, o nicho destes metabólitos seria a utilização como subprodutos e/ou em aplicações de alto valor, geralmente em pequenos volumes.

4.7. Processos para remoção do extrativo da madeira

Existem diversos processos para remover os extrativos da madeira, bem como para separar e identificar seus metabólitos secundários. Esta técnica é baseada no princípio da polaridade química em que "semelhante dissolve semelhante". Para Simões et al. (2006), a escolha entre os diversos métodos varia de acordo com o objetivo de cada trabalho e se os

metabólitos de interesse são conhecidos ou não. A remoção inicial do extrativo pode ser feita por métodos a quente, tais como: ebulição, infusão, sublimação, Soxhlet, destilação a vapor, extração sob refluxo e extração com fluidos supercríticos, e métodos à frio: maceração, turbolização e percolação.

A extração é o passo fundamental na análise do potencial inibitório dos compostos químicos, uma vez que é necessária a remoção dos componentes químicos desejados do material vegetal para posterior separação e caracterização (SASIDHARAN et al., 2011). No processo de maceração, a extração ocorre com a utilização de um solvente em temperatura ambiente, em um recipiente fechado por horas ou dias. O solvente escolhido deve extrair a maior quantidade possível das substâncias desejadas. A escolha dos solventes depende da sua polaridade e da polaridade do grupo de substâncias que se deseja extrair (SIMÕES et al., 2006). A proporção entre a quantidade de madeira e solvente utilizados na maceração pode variar na literatura de 1:1 a 10:1, e o tempo de maceração podendo ser de poucas horas a vários dias (BORGES et al., 2012; DELLAVALLE et al., 2011; SASIDHARAN et al., 2011; MOREIRA et al., 2010; SILVÉRIO et al., 2006; NOLDIN et al., 2003; HE et al., 2002).

Segundo Sarker et al. (2012), as extrações podem ser seletivas ou totais. Na extração total, um solvente orgânico polar, por exemplo, etanol, metanol ou uma mistura alcoólica aquosa, é utilizado na maceração para tentar extrair o máximo de compostos possíveis da madeira. Já a extração seletiva utiliza várias abordagens para remoção e separação do extrativo, em que solventes orgânicos, com polaridades distintas, são utilizados de forma a explorar as diversas polaridades dos constituintes da planta (MAHDI; ALTIKRITI, 2010). Assim, os solventes apolares retiram compostos apolares, os de polaridades intermediárias retiram compostos com polaridade intermediária, e os de alta polaridade, retiram compostos muito polares.

No processo de remoção do extrativo, o solvente se difunde para dentro da célula para dissolver os compostos afins. Um equilíbrio é estabelecido com o soluto dentro das células e o solvente envolvendo o fragmento da planta a ser extraído, sendo que a velocidade com que esse equilíbrio é estabelecido depende da temperatura, pH, tamanho da partícula e do movimento do solvente (MAHDI; ALTIKRITI, 2010).

Surpreendentemente, a água não é o melhor solvente para a extração inicial de compostos solúveis em água, visto que muitos dos compostos a serem extraídos estão intimamente associados a estruturas lipofílicas como as membranas, dificultando sua extração. Dessa forma, o metanol ou etanol são as melhores escolhas inicialmente, sendo

os mais utilizados no processo de extração inicial (SEIDEL, 2012; COLEGATE; MOLYNEUX, 2008). Phrompittayarat et al. (2007) compararam vários métodos de extração com diferentes solventes, sendo que o metanol foi o que obteve o maior rendimento, removendo quase o dobro de material quando comparado com o etanol.

4.8. Separação dos extratos em grupos de polaridade distintas

O extrato bruto de um produto natural geralmente é uma mistura extremamente complexa de vários compostos de diferentes características físico-químicas e polaridades. Dessa forma, a separação destes compostos ainda permanece um grande desafio no processo de identificação e caracterização de compostos bioativos (SASIDHARAN et al., 2011). A estratégia fundamental para fazer a separação dos compostos do extrato bruto se baseiam nessas duas propriedades, por esse motivo, torna-se difícil aplicar uma única técnica de separação para isolar compostos individuais a partir da mistura bruta, sendo necessário a utilização de mais de um solvente (SARKER et al. (2012; COLEGATE; MOLYNEUX, 2008).

Para a separação dos compostos químicos de interesse podem ser utilizadas várias técnicas, tais como o particionamento líquido-líquido, cromatografia de camada delgada preparativa, cromatografia em coluna, cromatografia flash, Sephadex ou a cromatografia líquida de alta eficiência (SASIDHARAN et al., 2011).

O método de partição líquido-líquido é amplamente utilizado para separação dos extratos, e essa metodologia exige na maioria das vezes que os dois solventes envolvidos no processo sejam imiscíveis, ou seja, que não se misturem. Este método requer muito contato entre os dois solventes, utilizando-se um funil de separação para a realização da mistura. Após mexer vigorosamente o funil, ocorre a mistura entre os dois solventes e posterior separação em duas camadas (Figura 4.6).

Esse processo envolve a transferência do soluto, nesse caso os metabólitos secundários, de um líquido para o outro, por meio da afinidade entre o solvente e os compostos químicos presentes no extrato (GHOSH, 2006). Durante o particionamento, o líquido mais denso fica por baixo, saindo na primeira retirada

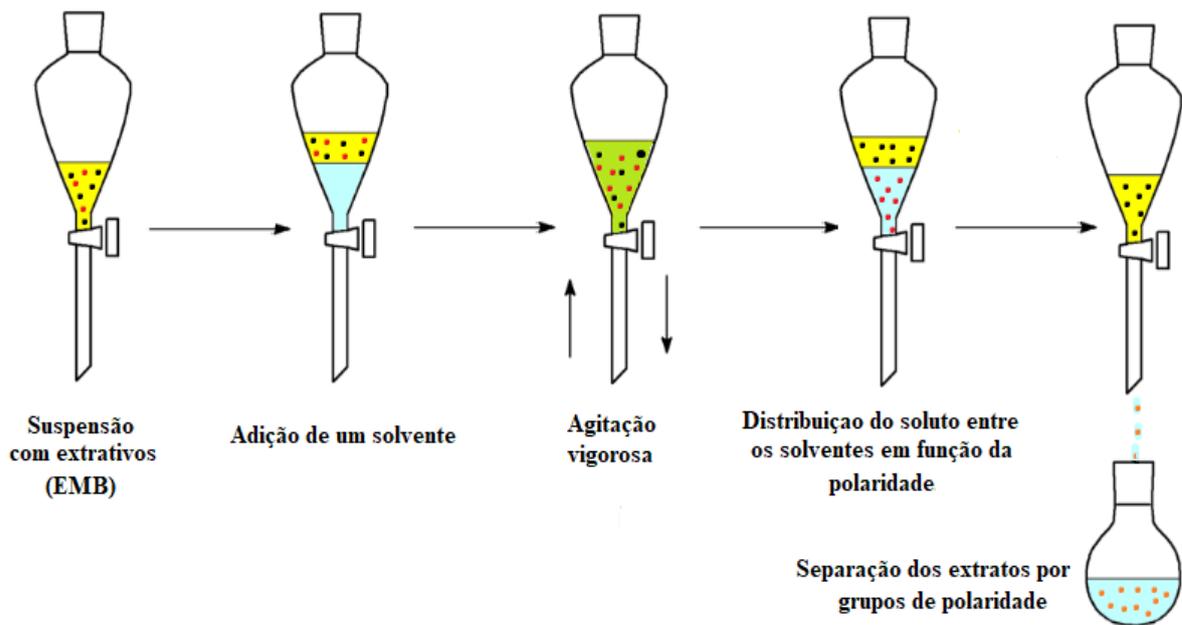


Figura 4. 6. Processo de separação dos extratos por meio da partição liquido-liquido.

Esse método de partição sucessiva por meio de solventes com polaridades diferentes resulta na obtenção de diferentes extratos, um para cada solvente utilizado na separação. Seguindo a metodologia proposta por Cechinel Filho e Yunes (1998) obtêm-se primeiramente o extrato hexânico, em seguida, o extrato diclorometânico, o extrato do acetato de etila e extrato butanólico. Em cada um dos extratos separados existem compostos com polaridades similares e que podem ou não possuir efeito inibitório contra microrganismos xilófagos, seja de forma individual ou em sinergia conforme apresentado na Figura 4.7.



Figura 4. 7. Metabólitos secundários encontrados nos diferentes extratos obtidos por meio da partição sucessiva com solventes de diferentes polaridades. Fonte: Adaptado de Cechinel Filho e Yunes (1998).

4.9. Testes de inibição de crescimento fúngico

Uma ampla variedade de metodologias para inibição de microrganismos são usadas por vários laboratórios em todo o mundo. A seleção do melhor método leva em consideração vários fatores, como performance, flexibilidade, adaptabilidade a sistemas automatizados ou semi-automatizados, custos, reprodutibilidade, confiabilidade, precisão e condições de cada laboratório (WHITE et al., 2001)

Os metabólitos secundários são objetos de vários estudos, dessa forma, testes acerca da sua atividade antimicrobiana são frequentes. Os principais testes para avaliação do potencial inibitório *in vitro* são os testes de difusão ou diluição em ágar (Figura 4.9) e a bioautografia. Os testes de difusão ou diluição em ágar são comumente usados em laboratórios de diagnósticos (SAAD et al., 2013). No teste de difusão em ágar, os compostos a serem testados são colocados em cima da superfície do meio de cultura, previamente inoculado com uma cultura pura da cepa de fungo estudada, podendo ser feito de duas maneiras: colocado em cima de um disco ou tiras de papel; ou em um orifício feito no meio de cultura (PAULI; SCHILCHER, 2010).

Existem diversos estudos para avaliar o potencial antifúngico dos metabólitos secundários, todos eles utilizando o teste de difusão em ágar com resultados positivos (SILVA; SOUZA, 2016; TEOH; DON, 2013; COLEMAN et al., 2011; HARA KISHORE et al., 2007). Kawamura et al. (2010) testou o potencial inibitório dos extratos de cerne, alburno e casca de espécies de madeiras da Malásia em diferentes concentrações contra os fungos *G. Trabeum* e *P. sanguineus*. As três partes da madeira apresentaram atividade inibitória, apesar de haver diferenças no grau de inibição promovido.

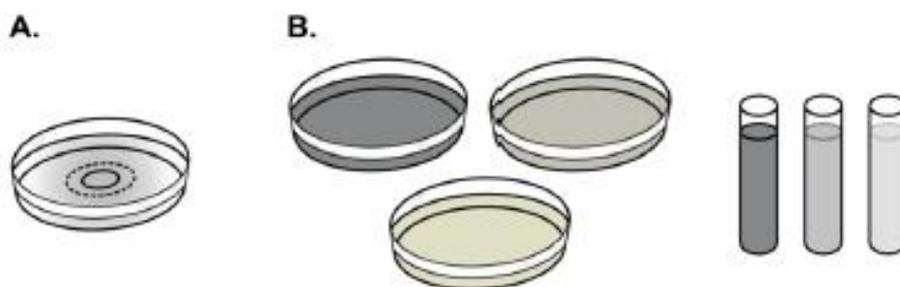


Figura 4. 8. Testes para análise da atividade antimicrobiana de compostos químicos. (A) Teste de difusão em ágar. (B) Teste de diluição em ágar. Os sombreados nas placas e tubos correspondem à concentração do agente antimicrobiano. Fonte: (SAAD et al., 2013).

No teste de difusão, o extrato atua do reservatório no centro da placa para as extremidades desta, que contém um meio de cultura inoculado com o microrganismo a ser

avaliado. Caso possua algum composto inibitório forma-se uma zona de inibição ao redor do reservatório durante a incubação, e geralmente em situações padronizadas, o diâmetro da zona de inibição dependerá somente da sensibilidade do microrganismo (SAAD et al., 2013). Medeiros et al. (2016) conseguiram obter resultados quantitativos do teste de difusão em ágar, por meio do cálculo da área de inibição com o auxílio de um *software* de tratamento de imagens.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi dividido em três partes:

1. Ensaio de apodrecimento acelerado das cinco espécies de madeiras da Caatinga;
2. Execução do processo de remoção do extrativo da madeira e sua separação com solventes orgânicos de diferentes polaridades;
3. Avaliação da influência das classes de metabólitos secundários dos diferentes extratos na ação dos fungos apodrecedores, realizado por meio do teste de difusão em placas de Petri em meio de extrato de malte, de modo a verificar quais porções possuem componentes com efeito antifúngico.

5.1. Coleta das espécies de madeira

Para a realização desse estudo, cinco espécies de madeiras foram obtidas de Planos de Manejo Florestal comunitário apoiados pelo Serviço Florestal Brasileiro – SFB, em áreas de assentamentos rurais localizados no município de Lagoa do Sítio, região centro-norte do estado do Piauí. Esta região possui uma área com cobertura florestal do tipo Caatinga.

Foram abatidas cinco árvores de cada espécie, que foram reduzidas a toretes de aproximadamente 1,5 m de comprimento, visando facilitar o transporte até o Laboratório de Produtos Florestais – LPF. Posteriormente, foi feito o corte dos toretes em pranchas e a seleção daquelas que não apresentavam rachaduras ou defeitos para a confecção dos corpos de prova na marcenaria do LPF. A Tabela 5.1 apresenta as espécies estudadas, bem como sua densidade básica, propriedade determinada pelo setor de Engenharia e Física do LPF.

Tabela 5. 1. Espécies de madeira da Caatinga avaliadas.

Nome comum	Nome científico	Densidade básica (g/cm ⁻³)	Família
Amarelo	<i>Pterodon abruptus</i>	0,75	Fabaceae-Mim.
Birro Branco	<i>Diptychandra aurantiaca</i>	0,80	Fabaceae-Caes.
Chapada	<i>Terminalia fagifolia</i>	0,96	Combretaceae
Coração-de-negro	<i>Machaerium acutifolium</i>	0,90	Fabaceae-Fab.
Pequiá Cascudo	<i>Aspidosperma multiflorum</i>	0,64	Apocynaceae Juss.

As cinco espécies de madeiras da Caatinga avaliadas no presente estudo e suas características físicas são apresentadas na Figura 5.1.

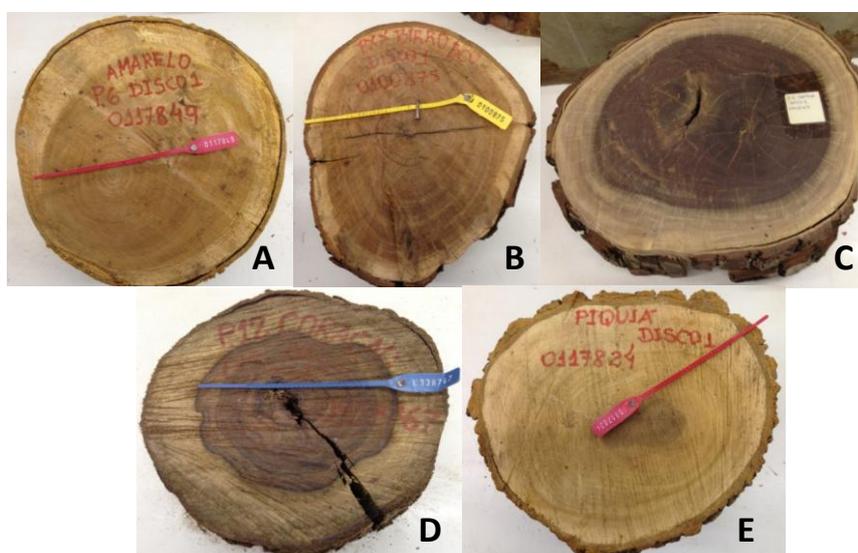


Figura 5. 1. Espécies da Caatinga avaliadas nesse estudo. (A) *P. abruptus*; (B) *D. aurantiaca*; (C) *T. fagifolia*; (D) *M. acutifolium* e (E) *A. multiflorum*. Foto: Autor.

5.2. Durabilidade natural em ensaio acelerado

Para determinação da durabilidade natural das madeiras da Caatinga ao ataque de fungos apodrecedores foi realizado o ensaio de apodrecimento acelerado no Laboratório de Fungos da Área de Biodegradação e Preservação de Madeiras do LPF. Este ensaio foi realizado de acordo com a norma padronizada da American Society For Testing Materials – ASTM D 2017 (2005), adaptada pelo LPF.

5.2.1. Preparo dos frascos de vidro e corpos de prova

O preparo do solo e dos frascos foram conduzidos de acordo com a norma ASTM D 1413 (1999), utilizando frascos de vidro com tampa rosqueável e capacidade de 250 ml em volume líquido. Em cada frasco foram adicionados 130 g de solo de horizonte B,

proveniente da Fazenda Água Limpa da Universidade de Brasília. Este solo foi peneirado com malha de aproximadamente 30 mm de abertura, o pH foi corrigido para ficar entre 5 e 8 e foram utilizados 65 ml de água destilada, observando-se o preconizado pela norma em relação à capacidade de retenção de água e teor de umidade do solo para cada frasco.

Em cada frasco foi adicionada uma placa suporte visando o adequado desenvolvimento micelial. Estas placas possuíam dimensões de 3 x 29 x 35 mm e foram dispostas sobre o solo, sendo utilizada uma placa de Pinus (*Pinus* sp.) para os fungos de podridão parda e Embaúba (*Cecropia* sp.) para os fungos de podridão branca (Figura 5.2). A *Cecropia* sp. é considerada uma espécie de madeira leve e reconhecidamente suscetível ao ataque de fungos de podridão branca (TEIXEIRA et al., 2015).



Figura 5. 2. Placa suporte introduzida nos frascos de vidro já preparados para a inoculação do fungo. Foto: Autor.

Os frascos então foram autoclavados à 120°C durante 45 minutos, e acondicionados em uma incubadora com umidade de $75 \pm 2\%$, e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 10 dias, para verificação de eventuais contaminações.

Os corpos de prova utilizados no ensaio de apodrecimento acelerado foram retirados das pranchas de madeira de cada espécie, e mediam 2,5 x 2,5 x 0,9 cm, sendo a menor dimensão no sentido da grã. Essas amostras foram lixadas para remoção de rebarbas e pequenas farpas, para então serem colocadas em uma sala climatizada com umidade relativa do ar de $63 \pm 2\%$ e temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, até atingirem o teor de umidade de equilíbrio de 12%.

Para avaliar quando as amostras atingiram a estabilização da massa foi utilizada uma amostragem de 20% dos corpos de prova, os quais foram pesados a cada dois dias até atingirem massa constante, quando a variação entre as pesagens era inferior a 0,01g. Neste ponto, todas as demais amostras foram pesadas, os corpos de prova colocados em um dessecador com sílica-gel por aproximadamente 15 minutos, sendo em seguida pesados em balança eletrônica da marca SHIMADZU, modelo AY220, com sensibilidade de 0,0001g.

Foram utilizados 30 corpos de prova para cada fungo, livres de defeitos, preferencialmente de cerne, retirados da parte central da madeira, sendo esta livre de medula. Algumas espécies apresentaram cerne indistinto e em outras de pouca espessura.

Foram também confeccionados 16 corpos de prova de amostras controle por fungo, de *Pinus sp.* e *Cecropia sp.*, totalizando 184 amostras (120 corpos de prova + 64 controles) para cada um dos fungos utilizados, e um total de 920 corpos de prova.

5.2.2. Cultivo dos fungos

Para este experimento foram utilizados dois fungos de podridão branca (*Trametes versicolor* (L.) Lloyd e *Pycnoporus sanguineus* (L.) Murrill) e dois de podridão parda (*Gloeophyllum trabeum* (Pers.) Murrill e *Gloeophyllum striatum* (Fr.) Murrill), provenientes da coleção de fungos da Área de Biodegradação e Preservação de Madeiras do LPF.

O meio de cultura utilizado para o crescimento dos fungos foi preparado com água deionizada e extrato de malte (30g do extrato para cada 1000 mL de água). A solução foi esterilizada em autoclave à 121°C por 30 minutos e, posteriormente, levada à incubadora por sete dias com o intuito de verificar a ocorrência de contaminação.

A repicagem dos fungos foi realizada assepticamente em capela de fluxo laminar após a ação da luz ultravioleta por 5 minutos. Inóculos de aproximadamente 1 cm², contendo micélios, foram adicionados ao meio de cultura e encaminhados para uma mesa agitadora a 100 rpm durante 72h. Em seguida, os fungos permaneceram na incubadora por quatro semanas até seu completo desenvolvimento.

5.2.3. Inoculação dos fungos

Previamente à inoculação dos fungos, os frascos foram limpos, externamente, com etanol absoluto e depositados na capela de fluxo laminar, onde permaneceram por 5 minutos sob a ação da luz ultravioleta. Em seguida foi feita a flambagem da região entre a tampa e o frasco, a fim de evitar contaminação. O fungo já desenvolvido no meio de

cultura foi homogeneizado em liquidificador e 3 mL desta mistura foram inoculados na placa suporte e no solo, com o auxílio de um pipetador automático (Figura 5.3).

Depois de inoculados, os frascos voltaram à incubadora por um período de quatro semanas, tempo necessário para os fungos pudessem se desenvolver adequadamente na placa suporte até o início do experimento.

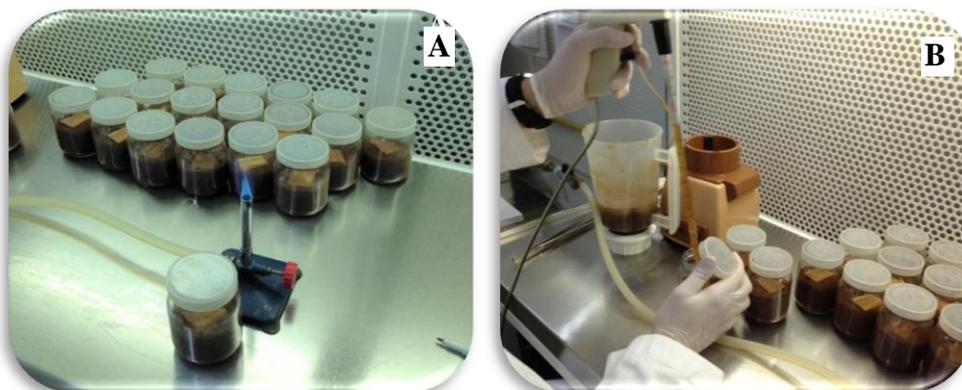


Figura 5. 3. Esterilização dos frascos (A) e inoculação do fungo (B). Foto: Autor.

5.2.4. Ensaio acelerado de ataque de fungos apodrecedores

Antes do ensaio, os corpos de prova e os controles foram envoltos em papel alumínio e colocados em tubos metálicos adequados à esterilização em autoclave por 30 minutos a 120°C e, então, resfriados naturalmente. Antes de receber os corpos de prova, os frascos foram novamente esterilizados externamente com etanol absoluto e flambados na capela de fluxo laminar. Os corpos de prova e os controles foram então colocados com o auxílio de uma pinça sobre a placa suporte colonizada pelo fungo. Posteriormente, os frascos retornaram à incubadora onde permaneceram por um período de até 16 semanas.

A partir 8ª semana, dois corpos de prova das amostras controle foram pesados semanalmente para avaliação da perda de massa. Quando esta perda atingia mais que 50% da massa inicial, finalizava-se o experimento para aquele fungo. Entretanto, caso a perda de massa destas amostras fosse inferior a 50%, os corpos de prova permaneciam até a pesagem dos outros dois controles na semana seguinte e assim sucessivamente até a 16ª semana, quando então o experimento foi encerrado.

Após a retirada dos frascos, os corpos de prova foram limpos utilizando escova de dente com cerdas macias e encaminhados à sala de climatização, onde permaneceram até a estabilização da massa, quando então foi realizada a pesagem final para determinação da perda de massa em razão do ataque fúngico.

5.2.5. Perda de massa e durabilidade natural

A durabilidade natural das cinco espécies de madeira da Caatinga avaliadas neste estudo foi classificada a partir da perda de massa de cada corpo de prova, sendo calculada pela diferença entre a massa inicial, que ocorre antes do ataque, e a massa final, após o ataque dos fungos, conforme a Equação 5.1.

$$PM = \frac{Mi - Mf}{Mi} \times 100 \quad (\text{Equação 5.1})$$

Em que: PM = perda de massa (%);

Mi = massa inicial (g);

Mf = massa final (g).

As espécies foram classificadas quanto a sua durabilidade natural com base na média de perda de massa dos corpos de prova, segundo metodologia estabelecida pela norma ASTM D 2017 (2005), e apresentadas na Tabela 5.2.

Tabela 5. 2. Classes de resistência natural das espécies de madeiras submetidas aos fungos apodrecedores em razão da média de perda de massa.

Classe de resistência	Perda de massa (%)
Altamente resistente (AR)	0 - 10
Resistente (R)	11 - 24
Resistência moderada (RM)	25 - 44
Não resistente (NR)	≥ 45

Fonte: ASTM D 2017-05 (2005)

5.3. Remoção dos extrativos e separação com solventes de diferentes polaridades

5.3.1. Processo de secagem e moagem do material

Os ensaios químicos foram feitos no setor de Química, Adesivos e Borracha Natural do LPF. Para este procedimento foram utilizados discos com 10 cm de espessura, retirados de cada uma das cinco árvores e coletados a 1 metro do solo. Esses discos foram mantidos em sala climatizada com umidade relativa do ar de $63 \pm 2\%$ e temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ até estabilização da massa.

De cada disco sem casca foi retirado uma cunha de um quarto do seu diâmetro para determinação das propriedades químicas. Cada cunha foi aplainada sucessivamente e o resíduo obtido deste procedimento foi triturado em um moinho de facas para reduzir, mecanicamente, a madeira em pequenos fragmentos. O material triturado foi peneirado em um agitador de peneiras marca Bertel, utilizando duas peneiras com aberturas de 4,75 e 0,5

mm, conforme indicado por Simões et al. (2006). O material utilizado nos ensaios foi aquele recolhido na peneira de malha 0,5 mm após cinco minutos em velocidade máxima no agitador (Figura 5.4).

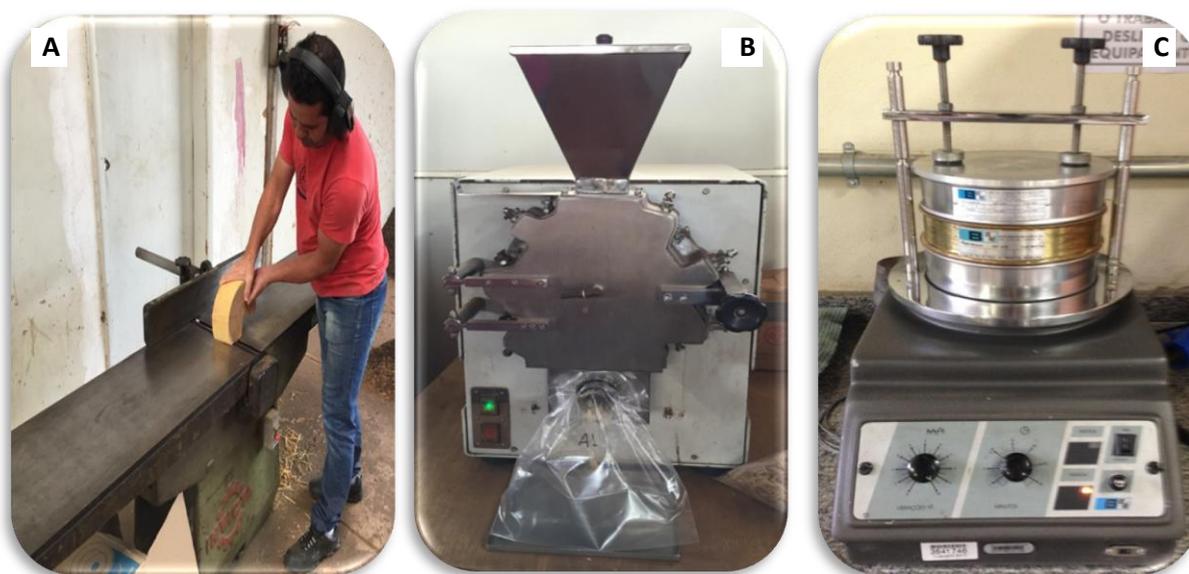


Figura 5. 4. Processo de obtenção de partículas para a remoção do extrativo. (A) passagem na plaina; (B) moinho de facas; (C) agitador de peneiras. Foto: Autor.

5.3.2. Cálculo do teor de umidade das amostras

O teor de umidade do material particulado de cada espécie foi determinado em estufa, marca Nova Ética modelo 400/6ND, a $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ antes do processo de remoção dos extrativos, pesando-se inicialmente após 2 horas e mais duas vezes de hora em hora, de forma que a umidade da madeira não fosse fonte de erro no cálculo do teor de extrativos. Foram utilizados 2 g do material particulado de madeira para cada uma das triplicatas, conforme fórmula expressa na Equação 5.2.

$$TU = \frac{PV-PS}{PS} \times 100 \quad (\text{Equação 5.2})$$

Em que: TU = Teor de umidade da amostra (%);

PV = Peso verde da amostra (g);

PS = Peso seco da amostra (g).

5.3.3. Maceração

O processo de maceração foi feito em triplicata, sendo depositados em um erlenmeyer de 1000 mL, 120 g do material particulado e 600 mL de metanol, obtendo-se uma proporção (v/m) de 5:1 entre o solvente e a madeira.

O tempo de mistura na mesa agitadora foi baseado na metodologia proposta por Sasidharan et al. (2011). Os erlenmeyer contendo a solução de madeira e solvente foram tampados e fixados com fita adesiva impermeável, para evitar a perda de solvente durante o processo de maceração, uma vez que o metanol é altamente volátil. A mistura metanol-madeira em maceração permaneceu em uma mesa agitadora, marca TECNAL modelo TE-140, durante 120 horas ininterruptas a 130 rpm, com o objetivo de retirar o máximo possível de extrativo da madeira (Figura 5.5).

Os balões utilizados na evaporação do solvente foram esterilizados com etanol absoluto e para a definição do peso inicial foram colocados em uma estufa com ventilação forçada a 105°C por 2 horas. Ao final desse período foram retirados e colocados em um dessecador por 15 minutos para resfriar e em seguida colocados em uma balança com sensibilidade de 0,0001g marca Mettler, modelo AE-160, para determinação da massa inicial de cada balão. Esse processo foi repetido com todos os demais balões utilizados no experimento.



Figura 5. 5. Processo de maceração das partículas de madeira com metanol. Foto: Autor.

Ao final do período de maceração das partículas de madeira (120 horas), a mistura metanol-madeira foi filtrada com um filtro de papel comum em um Becker de 1 L, e transferida para um balão de 300 mL para evaporação do metanol. Esta operação foi realizada no evaporador rotativo marca QUIMIS, sucessivas vezes até a completa

evaporação do solvente, obtendo-se ao final do processo o extrato metanólico bruto – EMB no balão. As partículas de madeira que ficaram no filtro de papel foram inseridas novamente nos frascos de 600 mL com metanol e o processo de maceração foi repetido por mais duas vezes (Figura 5.6).

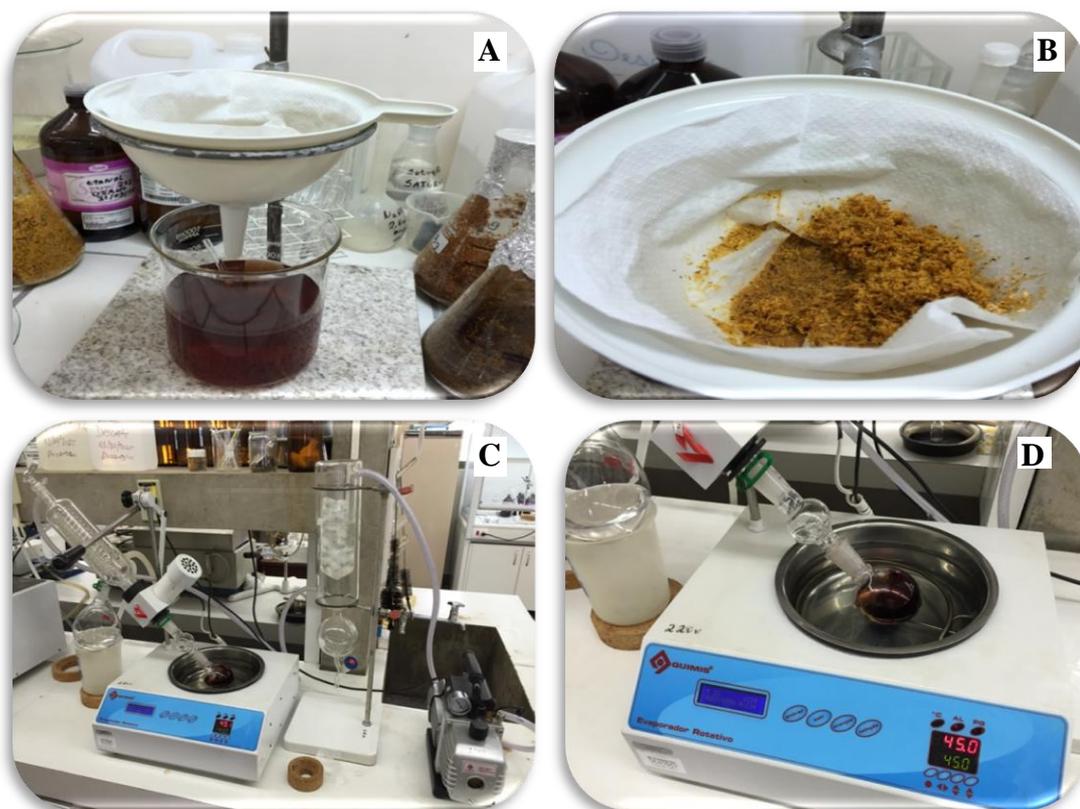


Figura 5. 6. (A e B) Filtragem da mistura metanol-madeira; (C) evaporador rotativo com pressão reduzida; (D) evaporação do solvente e obtenção do extrativo no balão. Foto: Autor.

O balão com o EMB de cada uma das triplicatas foi colocado em uma estufa a vácuo marca TECNAL, modelo TE-395, a 45°C por 24 horas, visando garantir a total evaporação do solvente, e em seguida colocados em um dessecador por 15 minutos e pesados para verificação do ganho de massa (Figura 5.7).



Figura 5. 7. Balões com o EMB na estufa a vácuo para evaporação completa do metanol.
Foto: Autor.

Retirou-se 1 g de cada extrato metanólico bruto obtido nesse processo para ser utilizado posteriormente no teste de difusão, visando a avaliação do potencial antifúngico destas amostras.

5.3.4. Particionamento entre solventes imiscíveis

Após o processo de maceração foi preparado 1 L de uma solução metanólica a 95% (950 mL de metanol e 50 mL de água), porque apesar de os dois solventes serem majoritariamente imiscíveis, segundo Sarker et al. (2012) eles são miscíveis até certo ponto e a preparação dessa solução ajuda na formação de duas camadas distintas no processo de partição. Colocou-se 200 mL dessa solução em contato com EMB por 24h em um balão, com objetivo de dissolver totalmente o EMB antes do processo de separação.

Posteriormente foi iniciada a separação do EMB com os solventes escolhidos pelo método de partição líquido-líquido, de forma a obter os quatro extratos com polaridades distintas para o teste de inibição do crescimento fúngico: extrato hexânico, extrato diclorometânico, extrato do acetato de etila e extrato butanólico. Todo esse processo de separação com solventes está representado na Figura 5.8.

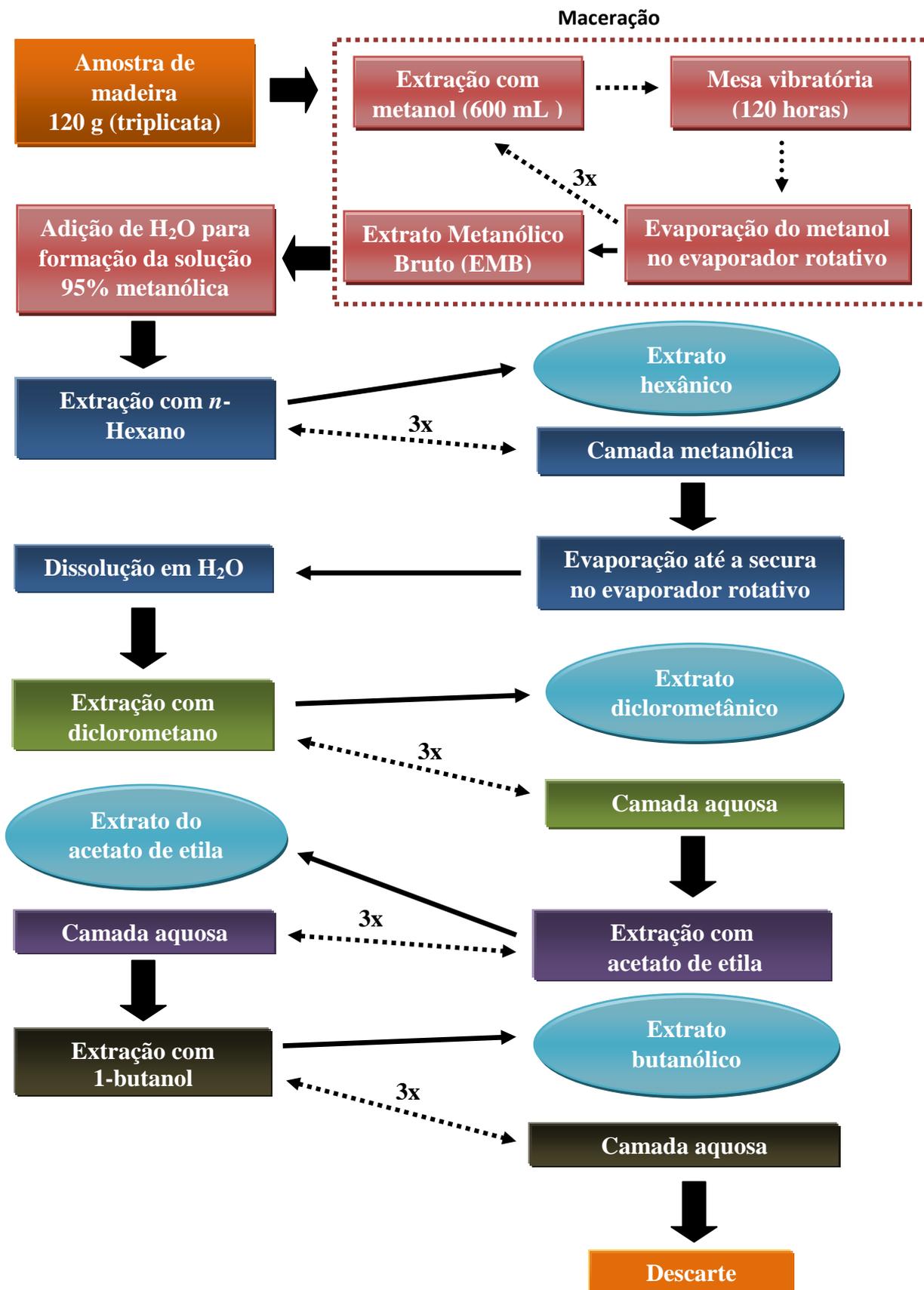


Figura 5. 8. Esquema de separação do EMB para formação dos diferentes extratos. Fonte: Adaptado de Sarker, Latif e Gray (2012).

5.3.5. Separação dos extratos

Sarker et al. (2012) e Cechinel Filho e Yunes (1998) estabeleceram a seguinte metodologia para a separação do extrato metanólico bruto obtido na maceração de plantas: *n*-hexano (C₆H₁₄), diclorometano (CH₂Cl₂), acetato de etila (C₄H₈O₂) e o 1-butanol (C₄H₁₀O). O *n*-hexano é apolar, e a polaridade aumenta entre os solventes até chegar ao mais polar que é a água. Apesar de possuir polaridade inferior ao acetato de etila, o butanol é o último solvente a ser utilizado, pois seu alto ponto de ebulição (118°C) faz com que sua evaporação seja difícil, podendo não ser removido completamente em etapas intermediárias, interferindo no processo de extração do acetato de etila (Tabela 5.3).

Tabela 5. 3. Propriedades físico-químicas de alguns solventes utilizados na extração de produtos naturais.

Solvente	Índice de polaridade	Ponto de ebulição (°C)	Solubilidade em água (% massa/massa)
<i>n</i> -Hexano	0,0	69	0,001
Diclorometano	3,1	41	1,6
1-Butanol	3,9	118	7,81
Acetato de Etila	4,4	77	8,7
Metanol	5,1	65	100
Etanol	5,2	78	100
Água	9,0	100	100

Adaptado de Sarker et al. (2012).

Para a separação do primeiro extrato, utilizou-se na partição líquido-líquido o *n*-hexano como solvente apolar, obtendo-se assim, um extrato contendo somente compostos apolares. A solução metanólica foi colocada em um funil de separação de dois litros, e em seguida, 200 ml de *n*-hexano. O funil foi fechado e agitado vigorosamente por alguns segundos de forma a misturar os solventes, e deixado em repouso até a completa separação das duas fases (Figura 5.9A). Por ser mais densa, a solução metanólica foi a primeira a ser retirada, e em seguida o *n*-hexano. A camada metanólica foi reservada para a próxima etapa.

Adicionou-se sal de sulfato de sódio P.A. (Na₂SO₄) ao becker com a solução de *n*-hexano. O sulfato de sódio se liga à água presente na solução e precipita, evitando que compostos ligados à água (polares) pudessem ficar no extrato hexânico, interferindo no experimento. Na sequência, foi feita a filtragem da solução de *n*-hexano para um balão devidamente esterilizado e pesado, utilizando-se filtro de papel comum, com o objetivo de

remover o sal de sulfato de sódio da solução (Figura 5.9B). O balão foi encaminhado para um evaporador rotativo até a completa evaporação do solvente.

O extrato hexânico apresentou uma coloração amarelada, pois o *n*-hexano por ser apolar realiza a extração dos lipídios presentes no extrato metanólico bruto, fazendo a chamada “desengorduração” do extrativo (Figura 5.9C).

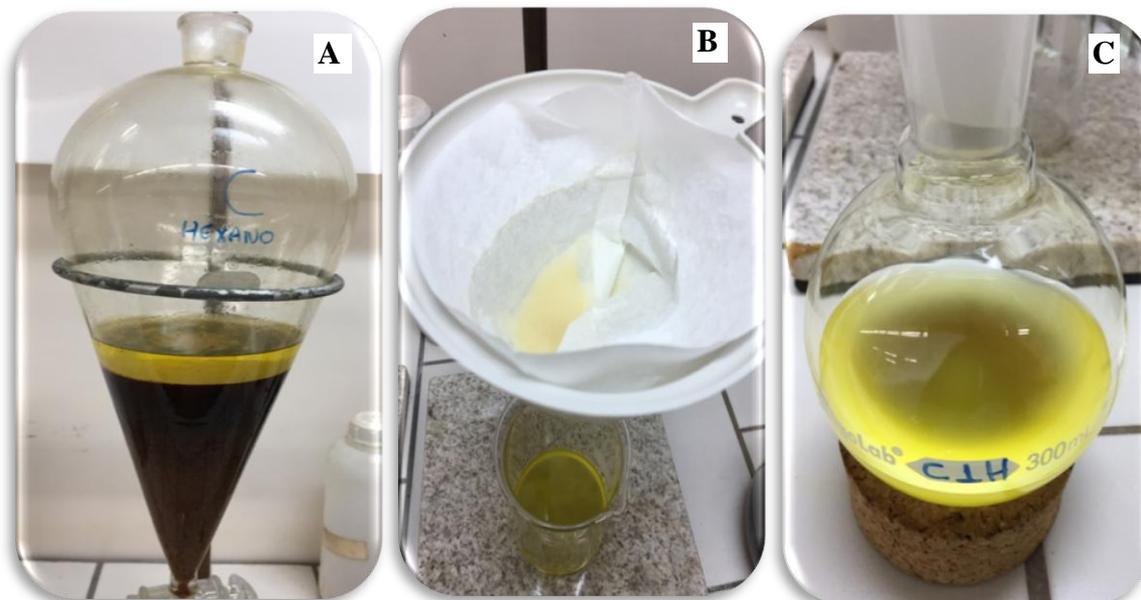


Figura 5. 9. (A) Formação das duas camadas imiscíveis no funil de separação (camada hexânica acima e metanólica embaixo); (B) filtração do sulfato de sódio utilizado para retirada da água presente no extrato hexânico; (C) extrato hexânico pronto para a evaporação do solvente no evaporador rotativo. Foto: Autor.

A separação do extrato foi feita em cada triplicata (Figura 5.10A). Assim, os três balões, com o extrato hexânico, foram colocados em uma estufa à vácuo a 45°C por 24 horas. Ao final desse período, foram retirados da estufa, levados a um dessecador por 15 minutos, e pesados. O extrato hexânico nos três balões foi raspado e armazenado a $\pm 5^{\circ}\text{C}$ em refrigerador até sua utilização no teste de inibição (Figura 5.10B e Figura 5.10C).

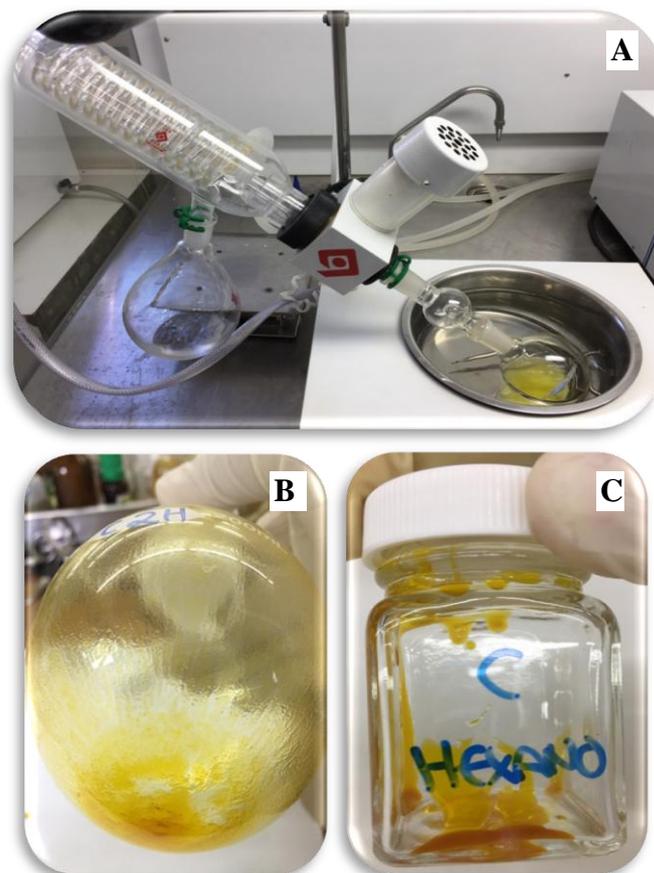


Figura 5. 10. (A) evaporação do solvente no evaporador rotativo; (B) extrato sem o solvente no balão; (C) extrato hexânico reservado após raspagem do balão. Foto: Autor.

Continuando com o processo de separação dos extratos, a camada metanólica reservada após a separação com o *n*-hexano foi evaporada até a secagem completa no evaporador rotativo e então dissolvida em 300 mL de água por 24 horas para a formação da solução aquosa. Essa solução formou todas as camadas aquosas nas extrações subsequentes até o final do processo.

Para a obtenção do extrato diclorometânico foi adicionado à solução aquosa, 200 mL de diclorometano por balão. A partição com diclorometano apresentou uma particularidade durante o processo de separação em todas as espécies, que foi a presença de emulsão após a agitação no funil de separação e isso interferiu na visualização da distinção nítida entre as duas camadas (Figura 5.11).

Para contornar esse problema foi adicionado cloreto de sódio P.A. (NaCl) em pequenas quantidades na suspensão até que a emulsão desaparecesse. O cloreto de sódio foi escolhido para remoção da emulsão por não interferir no processo de separação dos extratos.



Figura 5. 11. Formação de emulsão durante a separação com o diclorometano. Foto: Autor.

O extrato diclorometânico foi separado, pesado e armazenado conforme os procedimentos adotados para o extrato hexânico, e a camada com a solução aquosa foi reservada para a próxima etapa de separação. O processo de partição líquido-líquido foi repetido por três vezes para cada triplicata.

Posteriormente, a solução aquosa recebeu 200 mL de acetato de etila, sendo particionada cada triplicata por três vezes. Similarmente às etapas pregressas, o extrato do acetato de etila foi separado, pesado e armazenado conforme os procedimentos adotados para o extrato hexânico e diclorometânico, e a camada aquosa foi reservada para a última separação de compostos com o 1-butanol.

O 1-butanol, devido ao seu alto ponto de ebulição (118°C), dificultou bastante a evaporação do solvente no evaporador rotativo, mesmo com a baixa pressão durante as primeiras tentativas. A solução foi aumentar gradualmente a temperatura do banho-maria, avaliando a velocidade de evaporação do solvente. A temperatura de 60°C à baixa pressão permitiu que a evaporação do 1-butanol fosse realizada de maneira eficiente e a uma temperatura relativamente baixa.

Após a separação do extrato butanólico, a camada aquosa restante, composta com os metabólitos secundários com maior afinidade pela água, foi descartada por causa da presença do cloreto de sódio utilizado para remoção da emulsão, inviabilizando a liofilização para avaliação futura dos possíveis metabólitos ainda restantes.

5.4. Testes de inibição do crescimento fúngico

Para avaliação da atividade antifúngica dos diferentes extratos obtidos foram utilizados os mesmos fungos testados no ensaio de apodrecimento acelerado: *Trametes versicolor*, *Pycnoporus sanguineus*, *Gloeophyllum trabeum* e *Gloeophyllum striatum*. A inibição do crescimento fúngico *in-vitro* dos extratos foi avaliada usando o teste de difusão em placas de Petri conforme Medeiros et al. (2016), com modificações.

Foi preparado meio de cultura preparado com uma mistura de 30 g de extrato de malte e 18 g de ágar em 1 L de água deionizada pré-aquecida. Esse meio foi esterilizado em autoclave à temperatura de 121°C por 30 minutos. Durante esse período a capela de fluxo laminar foi limpa e esterilizada com etanol absoluto e irradiada com luz ultravioleta por 15 minutos, para esterilização.

Após 30 minutos do meio de cultura na autoclave foram colocados 15 mL deste meio por placa de Petri. As placas eram lisas, de poliestireno descartável de 90 x 15 mm e o meio foi depositado com o auxílio de um pipetador. As placas foram protegidas com plástico parafilm e mantidas em uma incubadora com umidade de $75 \pm 2\%$ e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 72 horas.

Em cada placa foram colocados dois inóculos na posição “A” com 6 mm de diâmetro, contendo micélios do fungo a ser avaliado (Figura 5.12), e posteriormente encaminhados para uma incubadora com umidade de $75 \pm 2\%$ e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de modo a permitir o adequado desenvolvimento micelial. O tempo de crescimento de cada um dos fungos nas placas foi avaliado em triplicata.

O tempo de crescimento foi calculado quando o fungo cobria toda a extensão da placa de Petri, a partir do crescimento dos dois micélios colocados na posição “A”. Os fungos *Trametes versicolor* e *Pycnoporus sanguineus* cobriram a placa em 7 dias, já os fungos *Gloeophyllum trabeum* e *Gloeophyllum striatum*, em 14 dias.

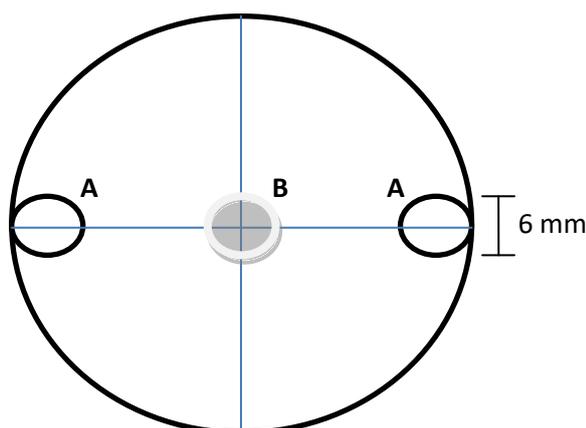


Figura 5. 12. Mapa de posicionamento na placa de Petri. (A) micélio; (B) local de deposição do extrato particionado. Fonte: Adaptado de Medeiros et al. (2016).

De posse desses valores, os cinco extratos separados por espécie de madeira na etapa anterior (extrato hexânico, extrato diclorometânico, extrato do acetato de etila e extrato butanólico) foram preparados para o teste de difusão. O número de repetições para cada extrato pode ser observado na Tabela 5.3. Nas amostras controle foi inoculado somente o etanol (teste em branco), para avaliar se o solvente promovia inibição do fungo.

Tabela 5. 4. Número de repetições por placa utilizada em cada extrato.

Fungo	Extrato	Repetições
<i>Trametes versicolor</i>	metanólico bruto (EMB)	10
	hexânico (Hex)	10
	diclorometânico (DCL)	10
	acetato de etila (AcEtl)	10
	butanólico (But)	10
	Controle	3
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	metanólico bruto (EMB)	10
	hexânico (Hex)	10
	diclorometânico (DCL)	10
	acetato de etila (AcEtl)	10
	butanólico (But)	10
	Controle	3
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	metanólico bruto (EMB)	10
	hexânico (Hex)	10
	diclorometânico (DCL)	10
	acetato de etila (AcEtl)	10
	butanólico (But)	10
	Controle	3
<i>Gloeophyllum striatum</i>	metanólico bruto (EMB)	10
	hexânico (Hex)	10
	diclorometânico (DCL)	10
	acetato de etila (AcEtl)	10
	butanólico (But)	10
	Controle	3

Para avaliar a atividade inibitória de cada extrato, utilizou-se uma concentração variável baseada na porcentagem separada de cada extrato em relação ao extrato metanólico bruto obtido na maceração (Tabela 5.4).

Tabela 5. 5. Porcentagem separada de cada extrato e concentração utilizada no teste de difusão em placas.

Espécies de madeira		HEX	DCL	AcEtl	But
<i>Pterodon abruptus</i>	% separada	1,67	2,42	18,76	22,38
	Concentração (mg/mL)	0,0167	0,0242	0,1876	0,2238
<i>Diptychandra aurantiaca</i>	% separada	5,71	2,21	3,28	4,77
	Concentração (mg/mL)	0,0571	0,0221	0,0328	0,0477
<i>Terminalia fagifolia</i>	% separada	0,87	0,30	2,60	2,69
	Concentração (mg/mL)	0,0087	0,0030	0,0260	0,0269
<i>Machaerium acutifolium</i>	% separada	0,72	0,28	12,39	3,15
	Concentração (mg/mL)	0,0072	0,0028	0,1239	0,0315
<i>Aspidosperma multiflorum</i>	% separada	1,45	0,38	0,17	2,95
	Concentração (mg/mL)	0,0145	0,0038	0,0017	0,0295

Hex – extrato hexânico; Dcl – extrato diclorometânico; AcEtl – extrato do acetato de etila e But – extrato butanólico.

A alíquota de 1 g retirada do EMB após o processo de maceração de todas as espécies foi dissolvida em etanol absoluto utilizando-se um balão volumétrico de 100 mL para ser utilizado no teste de difusão. Em algumas espécies não houve a total dissolução do EMB no etanol, sendo necessário utilizar uma lavadora ultra-sônica marca UNIQUE, modelo UltraCleaner 1600, por uma hora a fim de garantir a homogeneidade da solução.

Foi realizado um teste exploratório para avaliar a quantidade de solução necessária por placa de Petri, capaz de promover inibição. Foram testados os volumes de 20, 200, 250, 300, 350 e 400 μ L por placa, seguindo as concentrações separadas. O melhor resultado foi obtido com o volume de 300 μ L.

5.4.1. Inoculação dos extratos nas placas

As placas foram preparadas com dois discos de micélios de 6 mm de diâmetro, cortados com o auxílio de um vazador de rolha, e colocados na posição A da placa de Petri. Em seguida, os cinco extratos separados foram inoculados na posição B de cada placa de Petri nas concentrações calculadas (Figura 5.12). O mesmo procedimento foi utilizado para as placas controle, utilizando ao invés do extrato somente etanol absoluto.

Após a deposição, as placas foram deixadas em repouso sobre a bancada da capela até a completa evaporação do etanol. Todas as placas foram então fechadas com plástico

parafilm e encaminhadas para a incubadora visando o pleno desenvolvimento do fungo (Figura 5.13).

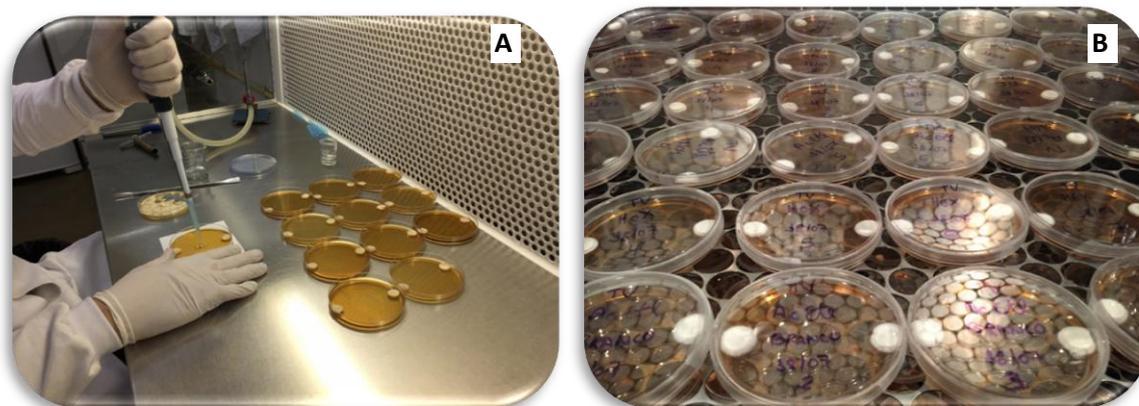


Figura 5. 13. (A) aplicação do extrato na placa já inoculada; (B) placas com os diferentes extratos na incubadora. Foto: Autor.

5.4.2. Análise do efeito antifúngico dos extratos separados

A avaliação do efeito inibitório dos diferentes extratos foi realizada por meio da análise da imagem tirada de cada placa após o prazo de crescimento para cada tipo de fungo. Essa análise foi feita utilizando-se um software livre de tratamento de imagens denominado ImageJ, medindo a zona de inibição ao redor de cada disco contendo os micélios de fungo já depositados na placa de Petri.

Após o período definido para o crescimento de cada fungo, as placas foram retiradas da incubadora e posicionadas em cima de uma cartolina preta, com o objetivo de realçar o contraste. A parte superior da placa de Petri foi removida e as fotos foram tiradas no laboratório de fungos, que possui uma fonte difusa de luz, de forma a obter a melhor imagem.

As fotos foram tiradas com um uma câmera de Iphone 6[®], com 8 megapixels, sem flash e sem zoom, posicionado a uma distância vertical de 12 cm da bancada, conforme metodologia estabelecida por Medeiros et al. (2016). As imagens coloridas foram obtidas no formato JPEG, sendo em seguida analisadas pelo software ImageJ pelo processo de limiarização. Nesse processo, a imagem original colorida é transformada em uma imagem em preto e branco de 8 bits, sendo em seguida limiarizada.

A limiarização corresponde à transformação da área ocupada pelo fungo transformada em uma imagem branca. Com base no tamanho da placa de Petri essa área é calculada pelo software em porcentagem de placa ocupada pelo fungo. Esse processo está ilustrado na Figura 5.14.

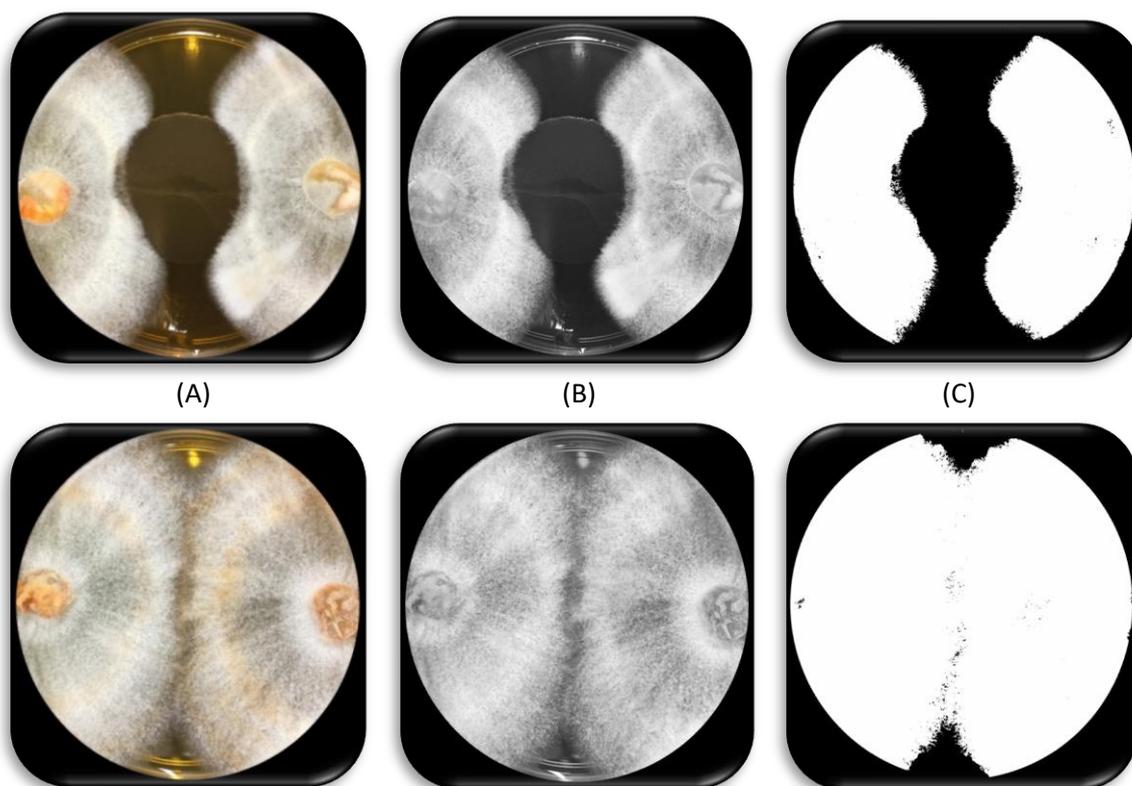


Figura 5. 14. Processo de transformação da imagem: (A) imagem original; (B) imagem em 8 bits; (C) imagem limiarizada. Efeito do EMB na primeira linha e do extrato butanólico na segunda linha da espécie *D. aurantiaca* sobre o fungo *Pycnoporus sanguineus*.

O software ImageJ fornece a porcentagem total da área da placa de Petri que o fungo preencheu. O percentual de inibição foi calculado conforme metodologia proposta por Cheng et al. (2011), conforme demonstrado na Equação 5.3.

$$PI = \left(1 - \frac{AE}{AC}\right) \times 100 \quad (5.3)$$

Em que:

PI = porcentagem de inibição (%).

AE = área ocupada pelos fungos nos extratos (%);

AC = área ocupada pelos fungos nas placas controle (%).

5.5. Análises estatísticas

Foi avaliada a presença de outliers e promoveu-se a remoção destes dados dos cálculos, com base na metodologia estabelecida por Hoaglin et al. (1986).

Neste trabalho utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, uma vez que os dados não apresentaram normalidade pelo Teste de Shapiro-Wilk, e nem

homogeneidade das variâncias pelo Teste de Levene. A análise foi baseada em três tratamentos (percentual de inibição dos extratos, fungos e espécies de madeiras) ao nível de significância de 5%.

A avaliação não paramétrica *post hoc* foi realizada por meio da comparação de pares entre os diversos fatores avaliados, de forma a avaliar se houve realmente influência dos metabólitos secundários presentes em cada extrato na resistência da madeira. O software utilizado foi o SPSS v. 21.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1. Durabilidade natural em ensaio acelerado

As cinco espécies de madeiras da Caatinga submetidas aos fungos de podridão branca e parda apresentaram grande variação na perda de massa. Segundo Schwarze (2007) isso pode ser ocasionado não apenas pelas diferenças anatômicas entre as espécies, mas também pela presença de diferentes compostos antifúngicos no extrativo das madeiras (DIX; WEBSTER, 1995).

Essas diferenças de perda de massa para cada tipo de fungo e entre espécies de madeiras corroboram os dados apresentados na literatura, que indicam uma alta heterogeneidade entre as madeiras de angiospermas (DANIEL et al., 1991).

Os resultados de perda de massa obtidos no ensaio de apodrecimento acelerado permitem afirmar que as espécies *Pterodon abruptus* e *Diptychandra aurantiaca* foram classificadas como altamente resistentes aos quatro fungos apodrecedores. Estas espécies apresentaram os maiores teores de extrativos removidos pelo processo de maceração com metanol, uma indicação positiva da influência dos metabólitos na sua resistência.

A média de perda de massa e as respectivas classes de resistência das cinco espécies madeireiras da Caatinga submetidas ao ataque dos quatro fungos apodrecedores podem ser observadas nas Tabelas 6.1.

Tabela 6. 1. Valores médios de perda de massa e classe de resistência das cinco espécies de madeiras da Caatinga submetidas ao ataque de quatro fungos apodrecedores.

Espécies de madeira	Perda de massa (%)				
		<i>Trametes versicolor</i>	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	<i>Gloeophyllum striatum</i>
<i>Pterodon abruptus</i>	Δm	5,90ab	7,63b	5,54a	8,83b
	Classe	AR	AR	AR	AR
<i>Diptychandra aurantiaca</i>	Δm	2,49a	4,58b	3,77b	4,72b
	Classe	AR	AR	AR	AR
<i>Terminalia fagifolia</i>	Δm	14,11b	5,20a	4,55a	4,12a
	Classe	R	AR	AR	AR
<i>Machaerium acutifolium</i>	Δm	17,44a	14,41a	16,18a	12,41a
	Classe	R	R	R	R
<i>Aspidosperma multiflorum</i>	Δm	11,57a	14,96a	31,68b	28,13b
	Classe	R	R	RM	RM

Letras iguais nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de comparação de pares ao nível de 5% de probabilidade. Δm – Perda de massa; Classe: AR – Altamente Resistente; R – Resistente; RM – Resistência Moderada e NR – Não Resistente.

6.1.1. *Pterodon abruptus*

P. abruptus foi classificada como altamente resistente aos quatro fungos, uma vez que a perda de massa ficou entre 5,90% e 8,83% (Tabela 6.1). A perda de massa entre os dois fungos de podridão parda *Gloeophyllum trabeum* e *Gloeophyllum striatum* foi considerada significativa. Para *Gloeophyllum trabeum* a espécie apresentou a menor perda de massa (5,54%) e para o *Gloeophyllum striatum* a maior (8,83%). Essa diferença na perda de massa pode ter sido ocasionada por diferenças de metabolismo e ataque enzimático de cada fungo, uma vez que o substrato de madeira foi o mesmo.

Avaliando o gráfico box plot da Figura 6.1, observa-se que o fungo *Pycnoporus sanguineus* promoveu a maior variação na perda de massa da espécie *Pterodon abruptus*. Já os resultados do *Trametes versicolor* apresentam valores intermediários de perda de massa, uma vez que estão ligados estatisticamente tanto à menor perda de massa, quanto aos maiores valores (Figura 6.1).

Teste de Kruskal-Wallis de Amostras Independentes

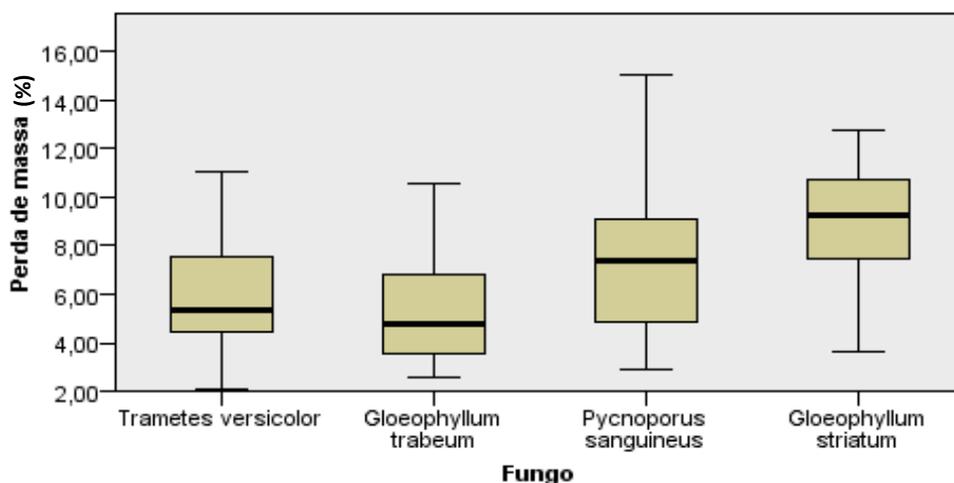


Figura 6. 1. Gráfico box plot da perda de massa dos quatro fungos para a espécie *P. abruptus*.

6.1.2. *Diptychandra aurantiaca*

A espécie *D. aurantiaca* foi a que apresentou a menor perda de massa em todo o ensaio de apodrecimento acelerado (2,49%), sendo classificada como altamente resistente aos quatro fungos (Tabela 6.1).

Houve diferença estatística significativa, para a perda de massa, provocada pela ação dos fungos *Trametes versicolor* e os fungos *Pycnoporus sanguineus*, *Gloeophyllum trabeum* e *Gloeophyllum striatum* (Figura 6.2).

Teste de Kruskal-Wallis de Amostras Independentes

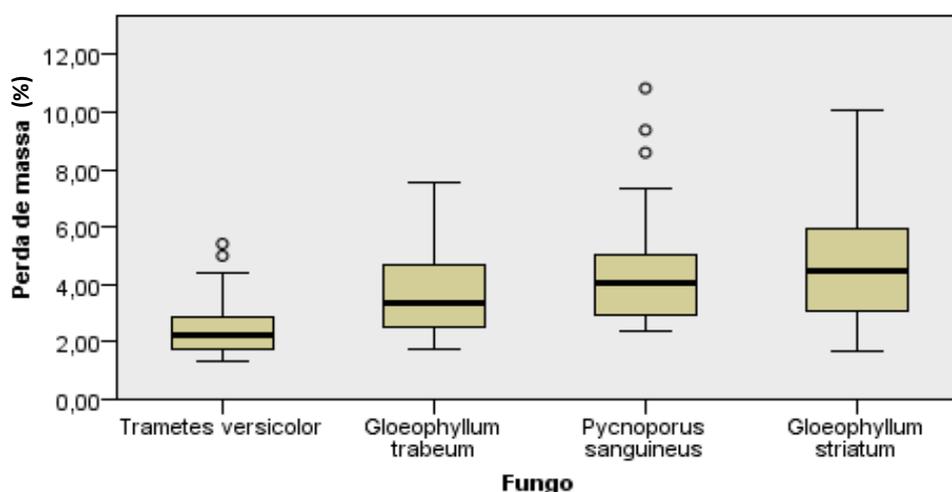


Figura 6. 2. Gráfico box plot da perda de massa dos quatro fungos para a espécie *Diptychandra aurantiaca*.

A maior perda de massa foi ocasionada pelo fungo *Gloeophyllum striatum*, porém, ainda assim, muito pequena (4,72%). Os baixos valores de perda de massa apresentados pelos quatro fungos demonstram a alta resistência desta espécie.

6.1.3. *Terminalia fagifolia*

A espécie *T. fagifolia* foi classificada como altamente resistente ao ataque dos fungos *Pycnoporus sanguineus* (5,20%), *Gloeophyllum trabeum* (4,55%) e *Gloeophyllum striatum* (4,12%), não havendo diferença estatisticamente significativa pelo teste de Kruskal-Wallis para perda de massa entre estes fungos. No entanto, o fungo *Trametes versicolor* (14,11%) foi classificado como resistente e apresentou diferença significativa com os demais (Tabela 6.1). Esta maior perda de massa obtida com o *T. versicolor* indica uma baixa eficiência dos metabólitos secundários em inibir o crescimento deste fungo, mesmo apresentando alta densidade. Essa grande variação na perda pode ser observada na Figura 6.3.

Segundo Ayres e Chaves (2010), Garcez et al. (2003) e Sousa et al. (2007), as plantas do gênero *Terminalia* são ricas em triterpenos pentacíclicos e seus derivados glicosilados, flavonoides, taninos, compostos fenólicos e outros compostos aromáticos com conhecida atividade antifúngica (ARIF et al., 2011), corroborando os resultados deste estudo para o ensaio de apodrecimento acelerado do *P. sanguineus*, *G. trabeum* e *G. striatum*.

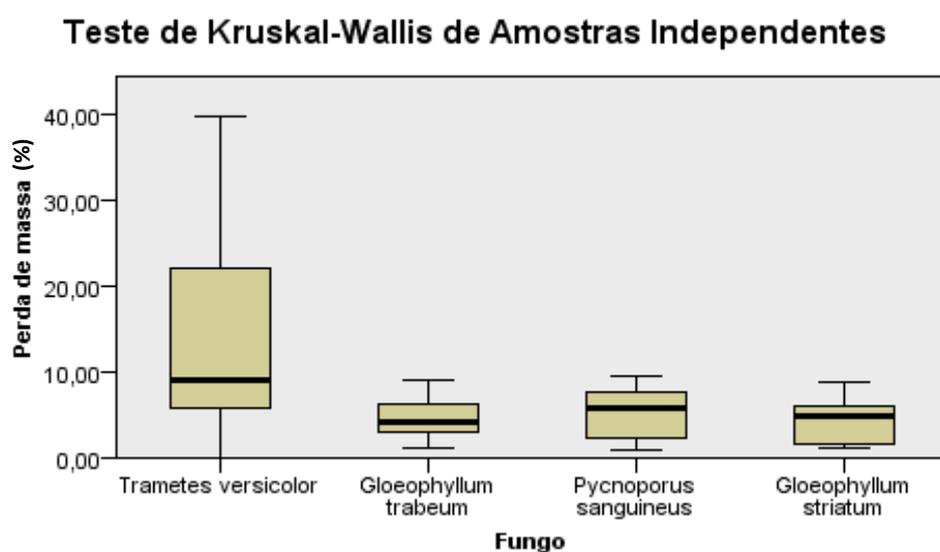


Figura 6. 3. Gráfico box plot da perda de massa dos quatro fungos para a espécie *Terminalia fagifolia*.

Observando a figura 6.3 pode-se observar a elevada variação de perda de massa provocada pelo fungo *Trametes versicolor* nesta espécie, em relação aos demais fungos.

6.1.4. *Machaerium acutifolium*

A espécie *M. acutifolium* após o ensaio de apodrecimento acelerado apresentou perda de massa superior a 10% para todos os fungos, não havendo diferença estatisticamente significativa. Dessa forma, esta espécie foi classificada como resistente ao ataque dos quatro fungos.

As maiores perdas de massa para esta espécie foram observadas nos fungos *T. versicolor* (17,44%) e *G. trabeum* (16,18%). A Figura 6.4 mostra a alta variação na perda de massa provocada pelos quatro fungos, em especial no *T. versicolor* e no *G. trabeum*.

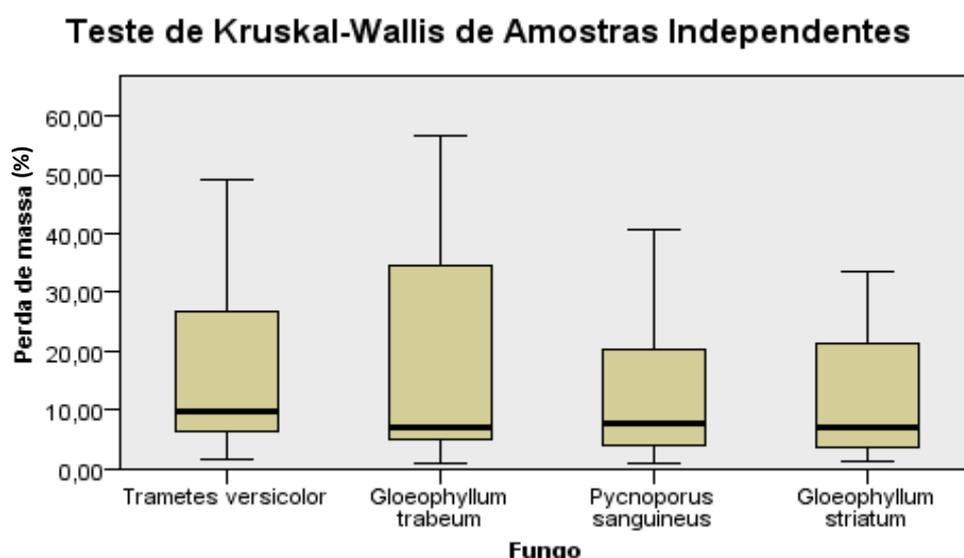


Figura 6. 4. Gráfico box plot da perda de massa dos quatro fungos para a espécie *Machaerium acutifolium*.

6.1.5. *Aspidosperma multiflorum*

Essa espécie apresentou a menor resistência entre as cinco avaliadas, sendo classificada como resistente aos fungos de podridão branca *Trametes versicolor* (11,57%) e *Pycnoporus sanguineus* (14,96%). *Aspidosperma multiflorum* foi moderadamente resistente aos fungos de podridão parda *Gloeophyllum trabeum* (31,68%) e *Gloeophyllum striatum* (28,13%), representando as duas maiores perda de massa entre todos os tratamentos. Essa diferença obtida entre os fungos de podridão branca e parda foi significativa estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis (Tabela 6.1).

A alta perda de massa observada nos fungos de podridão parda (*Gloeophyllum trabeum* e *Gloeophyllum striatum*) podem indicar uma maior facilidade de atuação das enzimas produzidas por essa categoria de fungos na obtenção de energia ou baixa atividade antifúngica dos compostos presentes no extrativo desta espécie (Figura 6.5).

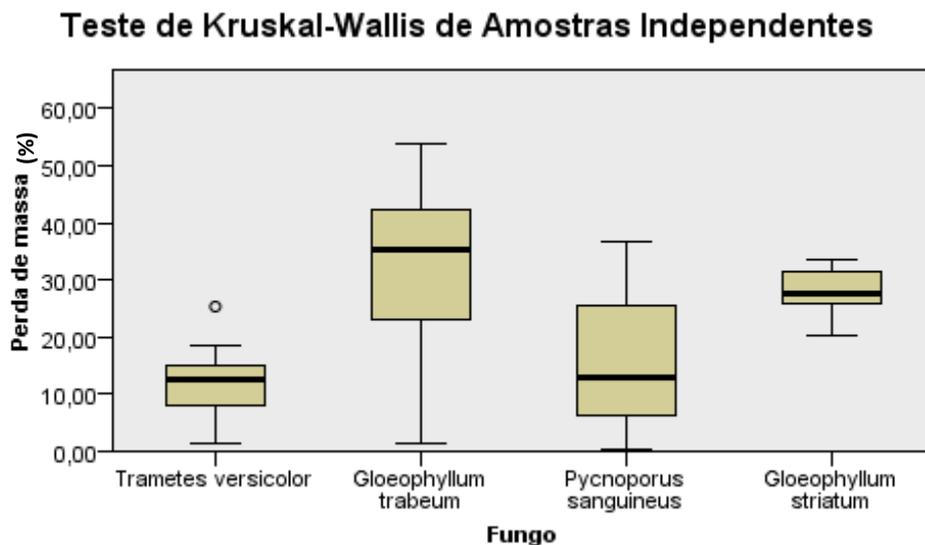


Figura 6. 5. Gráfico box plot da perda de massa dos quatro fungos para a espécie *Aspidosperma multiflorum*.

6.2. Metabólitos secundários

O teor de umidade da madeira é um dado importante para que possa ser corretamente calculado o peso seco da amostra e o teor de extrativos da madeira. Os valores de teor de umidade e teor de extrativos totais obtidos com a maceração em metanol encontra-se na Tabela 6.2.

Tabela 6. 2. Teores de umidade e extrativos das cinco espécies de madeiras da Caatinga.

	Espécies de madeiras (%)				
	<i>Pterodon abruptus</i>	<i>Diptychandra aurantiaca</i>	<i>Terminalia fagifolia</i>	<i>Machaerium acutifolium</i>	<i>Aspidosperma multiflorum</i>
Teor de umidade	10,29	9,32	10,37	9,18	9,31
Teor de extrativos*	10,51	7,47	13,52	6,66	2,87

* Valor médio obtido com base em cada uma das amostras de madeira em triplicata (120 g).

A Tabela 6.3 apresenta o total separado em cada um dos extratos com os solventes de diferentes polaridades utilizados, a partir do extrato metanólico bruto, e a porcentagem da solução aquosa não separada ao final do processo.

Tabela 6. 3. Percentual separado em cada extrato ao final do processo.

Extrato	Espécies de madeiras (%)				
	<i>Pterodon abruptus</i>	<i>Diptychandra aurantiaca</i>	<i>Terminalia fagifolia</i>	<i>Machaerium acutifolium</i>	<i>Aspidosperma multiflorum</i>
Hexânico	1,67	5,71	0,87	0,72	1,45
Diclorometânico	2,42	2,21	0,30	0,28	0,38
Acetato de Etila	18,76	3,28	2,60	12,39	0,17
Butanólico	22,38	4,77	2,69	3,15	2,95
Solução aquosa	54,77	84,03	93,53	83,46	95,05
EMB total	100	100	100	100	100

A espécie *P. abruptus* apresentou o segundo maior teor de extrativos (10,51%) e a maior quantidade de extratos diclorometânico (2,42%), acetato de etila (18,76%) e butanólico (22,38%), bem como o menor percentual de solução aquosa não separada (54,77%) entre as cinco espécies estudadas.

Apesar de apresentar o terceiro maior teor de extrativos obtidos com a maceração em metanol entre as cinco espécies testadas (7,47%), a espécie *D. aurantiaca* foi a espécie mais resistente no ensaio de apodrecimento acelerado, demonstrando o alto poder antifúngico dos compostos presentes em seu extrativo. Além disso, esta espécie apresentou o maior percentual separado de extrato hexânico (5,71%) durante o processo de separação dos extratos.

Na maceração com metanol a *Terminalia fagifolia* apresentou o maior teor de extrativos entre as cinco espécies estudadas (13,52%), porém, a quantidade separada de cada um dos extratos foi muito baixa quando comparada com o volume total obtido, apresentando inclusive o menor volume separado do extrato butanólico (2,69%). A maior parte do extrato não foi separada durante todo o processo (93,53%), mostrando a maior afinidade dos compostos presentes neste extrativo com a solução aquosa restante ao final do processo de separação, não se ligando, dessa forma, a nenhum dos diferentes solventes utilizados na separação.

Em relação ao teor de extrativos, a espécie *Machaerium acutifolium* (6,66%), obteve um percentual muito semelhante ao da espécie *Diptychandra aurantiaca* (7,47%), a espécie mais resistente no ensaio de apodrecimento acelerado, demonstrando que apenas o teor de extrativos não é um fator suficiente para avaliação da durabilidade natural de

madeiras (SILVA; SOUZA, 2016). Os percentuais separados na *M. acutifolium* do extrato do acetato de etila (12,39%) e extrato butanólico (3,15%) se destacaram positivamente dos demais, no qual o extrato hexânico (0,72%) e extrato diclorometânico (0,28%) foram as menores concentrações separadas entre todas as espécies de madeiras estudadas.

Os resultados acerca da maceração com metanol e separação dos diferentes extratos da espécie *Aspidosperma multiflorum* demonstraram que essa espécie de madeira possui o menor teor de extrativos (2,87%) e a maior porcentagem de metabólitos secundários não separados (95,05%) entre as cinco espécies, bem como a menor porção do extrato de acetato de etila (0,17%). Esse fato pode ter influenciado no teste de difusão em placas, uma vez que foram testadas quantidades muito pequenas dos extratos por fungo para esta espécie.

Ao final do processo, puderam-se observar diferenças na coloração, consistência e estado físico entre todos os extratos obtidos, conforme ilustrado na Figura 6.6.

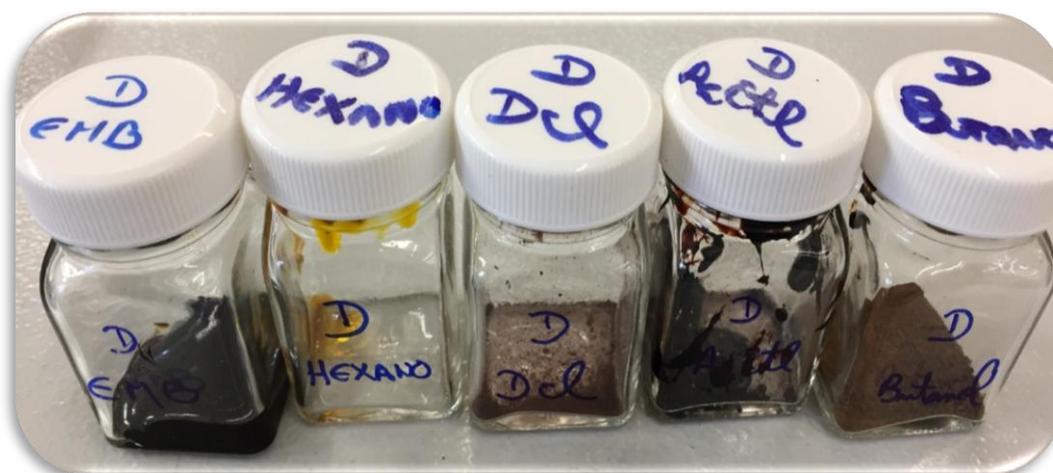


Figura 6. 6. Extratos obtidos da espécie *Machaerium acutifolium*. Da esquerda para a direita: EMB; extrato hexânico; extrato diclorometânico; extrato do acetato de etila e extrato butanólico. Foto: Autor.

6.3. Potencial de inibição

Os valores médios de inibição dos diferentes extratos por espécies de madeira da Caatinga aos quatro fungos apodrecedores podem ser observados nas Tabelas 6.4 e 6.5.

Tabela 6. 4. Valores médios de inibição do crescimento das hifas e perda de massa no ensaio de apodrecimento acelerado dos fungos de podridão branca *Trametes versicolor* e *Pycnoporus sanguineus* para as cinco espécies de madeiras da Caatinga.

	<i>Pterodon abruptus</i>		<i>Diptychandra aurantiaca</i>		<i>Terminalia fagifolia</i>		<i>Machaerium acutifolium</i>		<i>Aspidosperma multiflorum</i>	
	TV	PS	TV	PS	TV	PS	TV	PS	TV	PS
Extrato metanólico bruto	14,89	10,87	10,22	41,48	2,23	4,55	4,62	12,18	0,00	0,00
Extrato hexânico	26,78	0,32	2,42	29,61	0,34	0,00	1,54	0,00	0,05	3,73
Extrato diclorometânico	7,22	0,00	1,46	24,64	0,00	0,00	3,97	2,56	0,00	2,71
Extrato do Acetato de Etila	0,54	3,68	0,00	16,23	0,00	0,00	3,01	6,88	0,01	5,88
Extrato butanólico	1,21	1,44	0,00	14,42	0,00	5,99	2,18	10,14	0,21	6,77
Perda de Massa	5,90	7,63	2,49	4,58	14,11	5,20	17,44	14,41	11,57	14,96

TV – *Trametes versicolor*; PS – *Pycnoporus sanguineus*.

Tabela 6. 5. Valores médios de inibição do crescimento das hifas e perda de massa no ensaio de apodrecimento acelerado dos fungos de podridão parda *Gloeophyllum trabeum* e *Gloeophyllum striatum* para as cinco espécies de madeiras da Caatinga.

	<i>Pterodon abruptus</i>		<i>Diptychandra aurantiaca</i>		<i>Terminalia fagifolia</i>		<i>Machaerium acutifolium</i>		<i>Aspidosperma multiflorum</i>	
	GT	GS	GT	GS	GT	GS	GT	GS	GT	GS
Extrato metanólico bruto	7,88	21,59	42,61	19,05	0,01	0,21	28,94	27,70	0,00	0,00
Extrato hexânico	0,85	0,00	7,11	8,46	0,65	0,00	13,92	0,95	0,00	0,00
Extrato diclorometânico	0,00	0,00	4,57	1,48	0,00	0,00	0,00	2,11	0,00	0,00
Extrato do Acetato de Etila	7,58	0,06	1,48	1,75	0,00	0,00	0,54	3,68	0,00	0,00
Extrato butanólico	6,79	0,00	2,02	0,00	0,55	0,97	1,54	0,65	0,00	0,00
Perda de Massa	5,54	8,83	3,77	4,72	4,55	4,12	16,18	12,41	31,68	28,13

GT – *Gloeophyllum trabeum*; GS – *Gloeophyllum striatum*

6.3.1. *Pterodon abruptus*

Avaliando as Figura 6.7, observa-se que os extratos do acetato de etila e butanólico, apesar do maior percentual separado, tiveram efeito inibitório considerável apenas no fungo *G. trabeum*, evidenciando que a quantidade total de extrativos, não necessariamente significa alta atividade antifúngica dos metabólitos secundários.

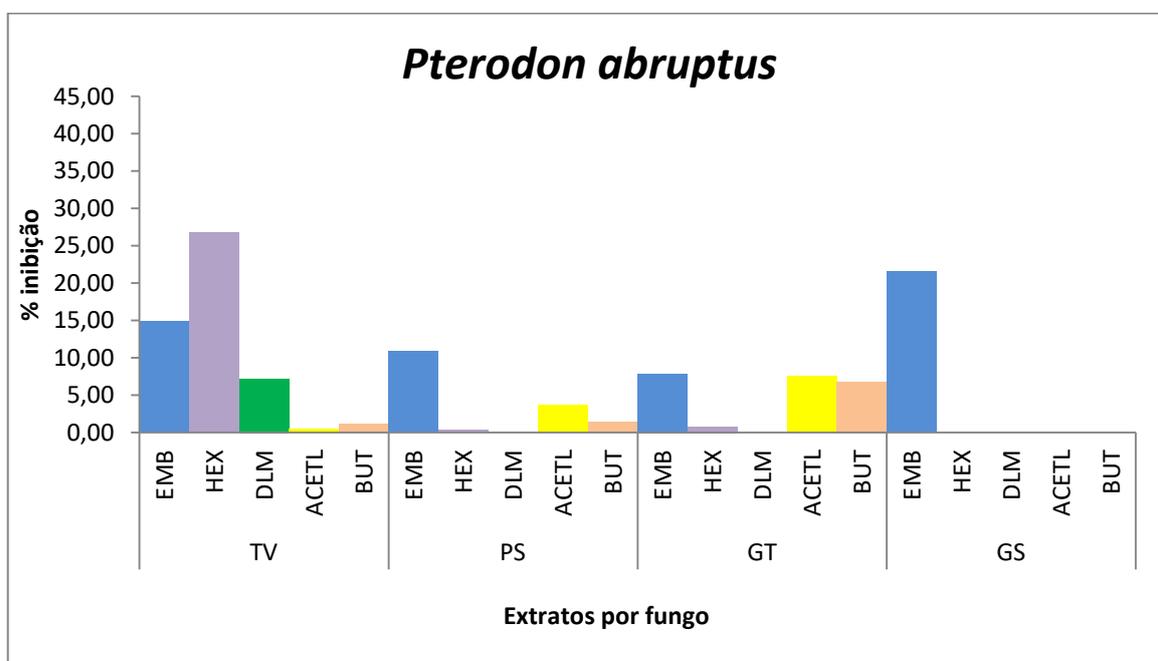


Figura 6. 7. Valores médios de inibição fúngica dos diferentes extratos da espécie *P. abruptus*.

Os metabólitos secundários presentes no extrato hexano como esteróides, terpenos e acetofenonas (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998) inibiram fortemente o *Trametes versicolor* (26,78%) e quase nada nos demais. Este fato mostra que os compostos desse extrato provavelmente não apresentam efeito antifúngico para os demais fungos, uma vez que as diferenças morfológicas entre eles alteram o nível de sensibilidade de cada um a esse extrato.

Brand et al. (2006), e citado por Brocco et al. (2017) mencionam o efeito sinérgico dos compostos químicos presentes no extrativo, destacando que certos metabólitos quando usados sozinhos tem pouco ou nenhum efeito na resistência da madeira, porém, quando combinados, podem produzir um grande aumento na resistência da madeira.

A alta inibição promovida pelo extrato hexânico (26,78%) superou inclusive a inibição provocada pelo EMB (21,59%), que possui todos os compostos químicos e

potencial máximo de sinergia entre eles. Esse resultado demonstra o efeito da especificidade dos metabólitos secundários do extrato hexânico desta espécie na inibição do crescimento fúngico, superando o efeito sinérgico entre os compostos presentes no EMB.

O extrato diclorometânico promoveu uma pequena inibição (7,22%) somente do fungo *T. versicolor*, indicando a especificidade dos metabólitos secundários presentes neste extrato, como as lignanas, flavonoides metoxilados, sesquiterpenos, lactonas, triterpenos e cumarinas (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998), contra a atuação deste fungo.

Comparando os resultados obtidos no ensaio de apodrecimento acelerado com o teste de difusão em placas, observa-se que os fungos *T. versicolor* e *G. trabeum* promoveram a menor perda de massa na espécie *Pterodon abruptus* no ensaio de apodrecimento acelerado, e foram os fungos mais inibidos no teste de difusão em placa de Petri, apesar da alta inibição provocada somente pelo EMB no *G. striatum* (21,59%). Isso demonstra o efeito positivo do teste de difusão com os diferentes extratos separados, em representar a potencial perda de massa desta espécie de madeira no ensaio de apodrecimento acelerado.

6.3.2. *Diptychandra aurantiaca*

Os dados apresentados no teste de difusão em placa de Petri apresentaram boa relação com os resultados encontrados no ensaio de apodrecimento acelerado, com exceção dos resultados deste mesmo teste para o fungo *T. versicolor*, uma vez que no ensaio de apodrecimento acelerado a espécie *D. aurantiaca* apresentou a menor perda de massa para este fungo (2,49%), porém, no teste de difusão, os diferentes extratos promoveram uma baixa inibição do fungo *T. versicolor* e uma elevada inibição nos demais (Figura 6.8). Pode-se inferir que, como os extratos não provocaram uma inibição significativa no crescimento do *T. versicolor*, a baixa perda de massa observada para este fungo se deu em razão das propriedades anatômicas da madeira desta espécie e/ou devido à baixa eficiência dos metabólitos secundários em inibir este fungo.

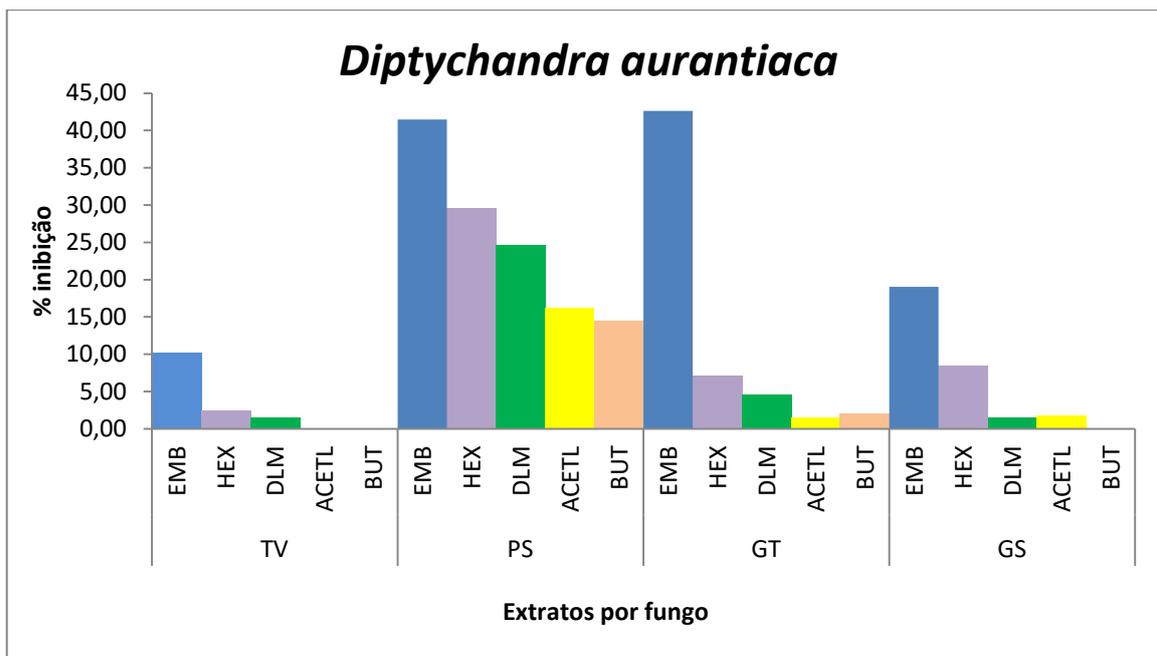


Figura 6. 8. Valores médios de inibição fúngica dos diferentes extratos da espécie *D. aurantiaca*.

No geral, os diferentes extratos desta espécie mostraram uma grande capacidade de inibição, sendo mais forte no EMB em função de um possível efeito sinérgico dos metabólitos secundários presentes neste extrato, com inibições acima de 40% para os fungos *P. sanguineus* e *G. trabeum*. Esta sinergia pode ser observada na inibição dos quatro fungos, mas principalmente no fungo *Pycnoporus sanguineus*, onde a atividade antifúngica do extrativo torna-se mais fraca conforme foram sendo realizadas as separações a partir do EMB até o extrato butanólico, com a menor inibição.

6.3.3. *Terminalia fagifolia*

Em relação à inibição dos quatro fungos pelos diferentes extratos da *Terminalia fagifolia*, observou-se que quase não houve inibição promovida pelos cinco extratos, contrariando a alta resistência da espécie ao ataque dos quatro fungos apodrecedores no ensaio de laboratório.

O baixo percentual de inibição apresentando por esta espécie pode ter sido provocado pela alta quantidade de extrativo que permaneceu na solução aquosa ao final do processo de separação (93,53%). Este fato reforça a teoria de que a maior parte dos compostos químicos inibitórios desta espécie teve maior afinidade com a água, não sendo separados com os solventes orgânicos utilizados durante os processos de particionamento,

e nesse caso, estes metabólitos secundários não foram utilizados no teste de difusão, sendo descartados.

Apesar da baixa inibição ocorrida no teste de difusão em placas, a Figura 6.9 demonstra o efeito sinérgico dos componentes químicos presentes no EMB, bem como o efeito individual dos componentes presentes no extrato butanólico para os fungos *Trametes versicolor* e *Pycnoporus sanguineus*.

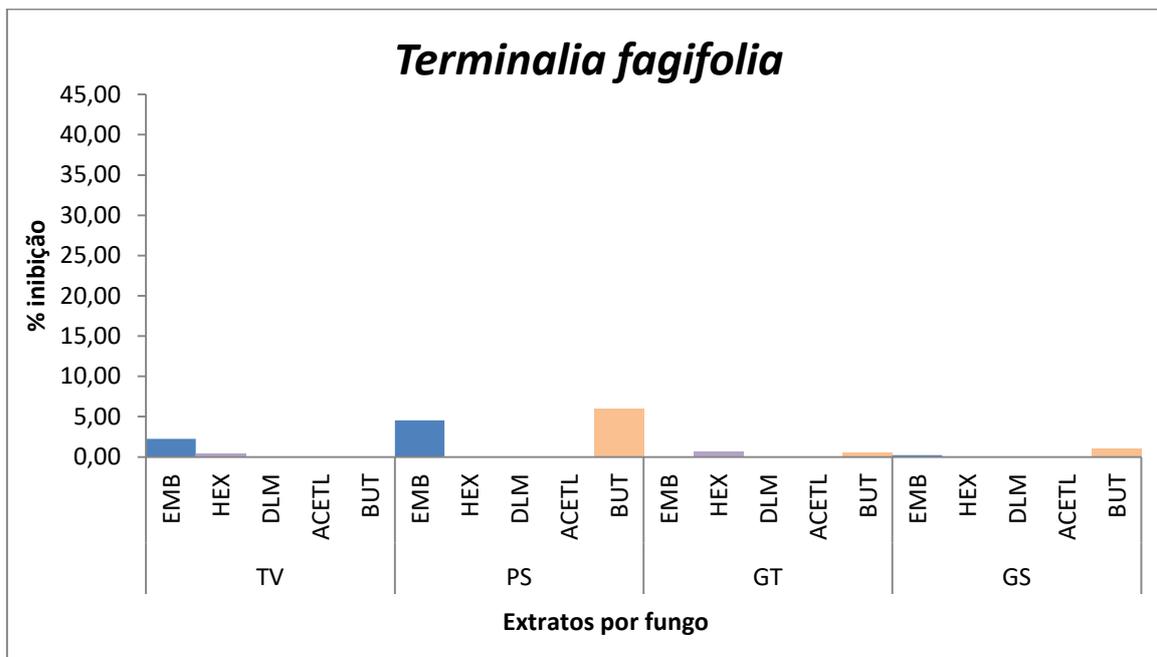


Figura 6. 9. Valores médios de inibição fúngica dos diferentes extratos da espécie *Terminalia fagifolia*.

6.3.4. *Machaerium acutifolium*

A atividade antifúngica promovida pelos diferentes extratos da espécie *Machaerium acutifolium* apresentou um resultado similar ao obtido no ensaio de apodrecimento acelerado em laboratório, uma vez que em todos os fungos foi observado um pequeno percentual de inibição no teste de difusão promovido pelos cinco extratos.

Os componentes presentes no EMB apresentaram os maiores valores de inibição, principalmente para os fungos *P. sanguineus*, *G. trabeum* e *G. striatum* (Figura 6.10). Além desses, foram observados valores significativos de inibição no extrato hexânico para o fungo *G. trabeum* (13,92%), e no extrato butanólico (10,14%) e extrato do acetato de etila (6,88%) para o fungo *P. sanguineus*.

No extrato do acetato de etila é possível encontrar flavonoides, taninos, ácidos triterpênicos, saponinas e compostos fenólicos em geral, já no extrato butanólico é possível

encontrar flavonoides glicosilados, taninos e saponinas, sendo muitas destas classes com atividade antifúngica já confirmada (SARKER et al., 2012).

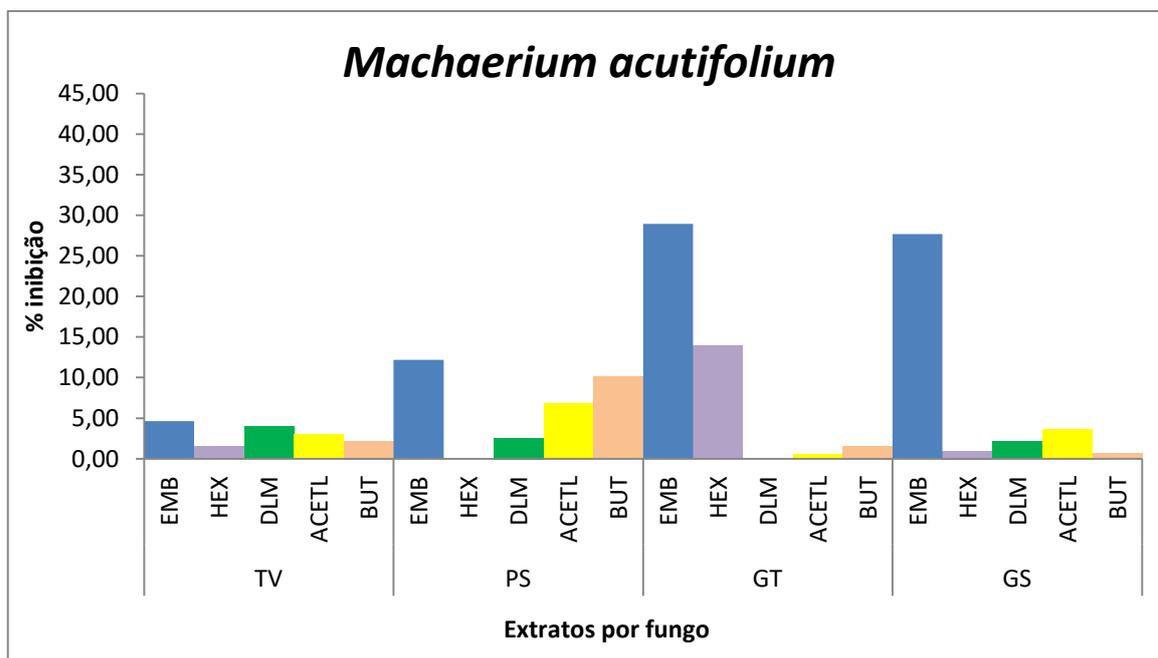


Figura 6. 10. Valores médios de inibição fúngica dos diferentes extratos da espécie *Machaerium acutifolium*.

A ação antifúngica promovida pela sinergia dos metabólitos secundários presentes no EMB promoveu a maior inibição nos fungos *Gloeophyllum trabeum* (28,94%) e *Gloeophyllum striatum* (27,70%). No *G. trabeum* o extrato hexânico promoveu a segunda maior inibição (13,98%), apesar da menor quantidade de extrato hexânico separado entre as espécies estudadas (0,72%), demonstrando a alta ação inibitória dos compostos químicos presentes neste extrato.

6.3.5. *Aspidosperma multiflorum*

Os dados apresentados pelo teste de inibição em placas de Petri confirmaram os resultados encontrados no ensaio de apodrecimento acelerado, principalmente em relação aos fungos de podridão parda, uma vez que não houve inibição de nenhum dos cinco extratos para esses dois fungos e no ensaio de apodrecimento acelerado ambos os fungos promoveram as duas maiores perdas de massa em todo o experimento (Figura 6.11).

Em relação aos fungos de podridão branca foi observada uma inibição mínima somente no *Pycnoporus sanguineus*. Para esse fungo apenas o EMB não promoveu inibição, demonstrando que o efeito dos metabólitos secundários separados nos demais extratos tiveram maior atividade antifúngica, com o extrato butanólico tendo a maior

inibição (6,77%). A baixa inibição mostra que os metabólitos secundários desse extrato possuem um baixo efeito antifúngico.

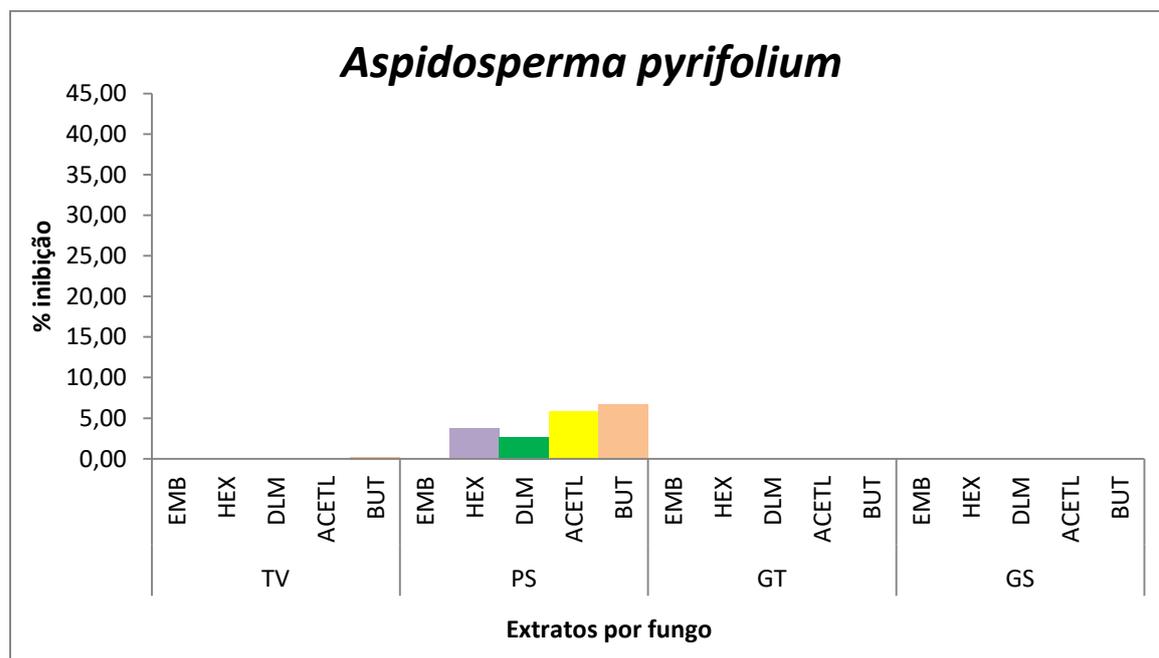


Figura 6. 11. Valores médios de inibição fúngica dos diferentes extratos da espécie *Aspidosperma multiflorum*.

Para avaliação do efeito inibitório dos cinco extratos obtidos em relação aos quatro fungos apodrecedores, realizou-se o somatório das inibições promovidas por cada um dos cinco extratos como um todo (extrato metanólico bruto, extrato hexânico, extrato diclorometânico, extrato do acetato de etila e extrato butanólico) nas cinco espécies de madeiras submetidas aos quatro fungos (Tabela 6.6).

Tabela 6. 6. Valores totais de inibição promovidos pelos diferentes extratos nas cinco espécies de madeiras da Caatinga submetidos aos quatro fungos apodrecedores.

Fungos	Inibição nas cinco espécies (%)				
	EMB	Hex	Dcl	AcEtl	But
<i>Trametes versicolor</i>	31,96	31,13	12,65	3,56	3,6
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	69,07	33,66	29,91	32,67	38,76
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	79,44	22,52	4,57	9,59	10,91
<i>Gloeophyllum striatum</i>	68,54	9,41	3,59	5,49	1,62

EMB – Extrato metanólico bruto; Hex – Extrato hexânico; Dcl – Extrato diclorometânico; AcEtl – Extrato do Acetato de Etila; But – Extrato butanólico.

Pode-se observar que o extrato metanólico bruto – EMB foi o mais ativo, promovendo a maior inibição em três dos quatro fungos, chegando próximo de 80% de inibição no fungo de podridão parda *Gloeophyllum trabeum*. Este resultado demonstra o significativo efeito inibitório que a sinergia entre todos os compostos químicos presentes neste extrato promovem.

Dentre os extratos separados, o extrato hexânico se destacou dos demais. Os compostos apolares contidos no extrato hexânico promoveram alta inibição dos fungos *Trametes versicolor*, *Pycnoporus sanguineus* e *Gloeophyllum trabeum*. O fungo *Pycnoporus sanguineus* foi inibido por todos os extratos, demonstrando a alta eficiência dos metabólitos secundários das espécies estudadas contra este fungo (Figura 6.12).

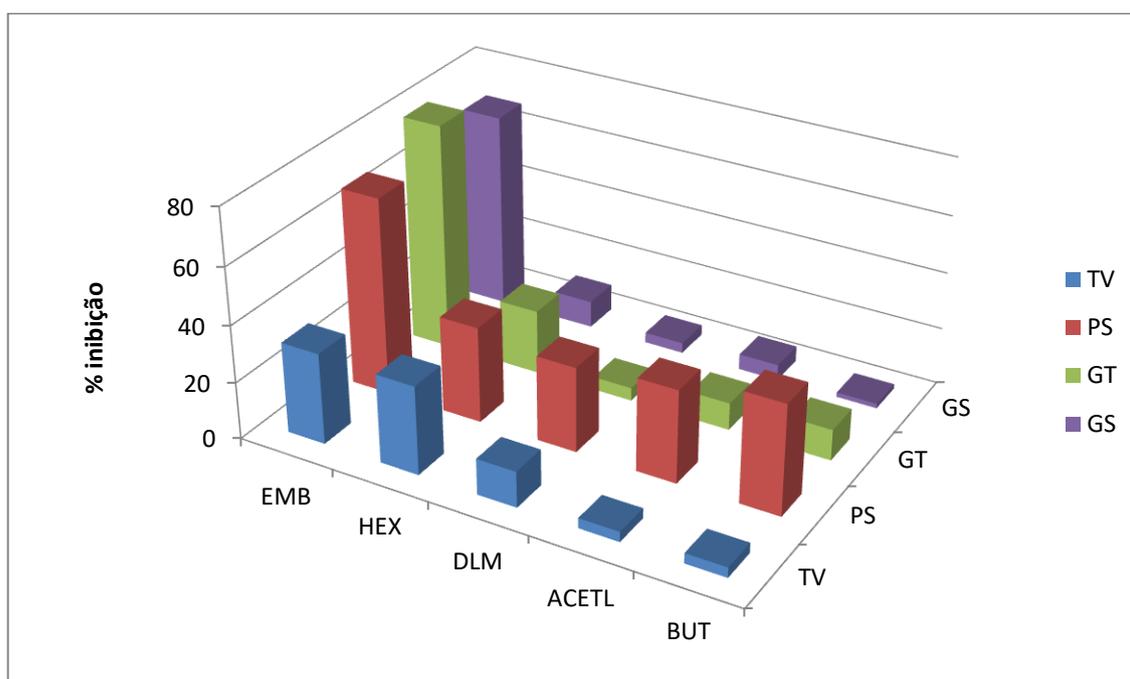


Figura 6. 12. Efeito inibitório dos diferentes extratos para os quatro fungos testados.

A avaliação acerca do efeito inibitório de cada extrato pelo teste de difusão em placas de Petri representou bem a perda de massa mensurada no ensaio de apodrecimento acelerado em quatro das cinco espécies testadas, no entanto, para a espécie *Terminalia fagifolia*, a alta resistência apresentada no ensaio de apodrecimento acelerado não se confirmou no teste de difusão.

7. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Ao final deste trabalho foi possível concluir que houve relação entre a inibição promovida pelos metabólitos secundários presentes nos diferentes extratos das cinco espécies de madeira da Caatinga e a resistência natural ao ataque de quatro fungos apodrecedores, com exceção da *Terminalia fagifolia*.

O presente trabalho serve como um primeiro passo, facilitando a pesquisa dentro dos extratos com maior potencial inibitório para cada tipo de fungo e estimulando a continuidade de estudos com essas espécies.

As espécies *Pterodon abruptus* e *Diptychandra aurantiaca* foram altamente resistentes aos quatro fungos apodrecedores testados no ensaio de apodrecimento acelerado em laboratório. A espécie *Terminalia fagifolia* foi altamente resistente aos fungos *P. sanguineus*, *G. trabeum* e *G. striatum*, e apenas resistente ao fungo *T. versicolor*. A espécie *Machaerium acutifolium* foi classificada como resistente aos quatro fungos apodrecedores e a espécie *Aspidosperma multiflorum* foi classificada como resistente aos fungos *T. versicolor* e *P. sanguineus*, e moderadamente resistente aos fungos de podridão parda *G. trabeum* e *G. striatum*.

As cinco espécies apresentaram valores muito diversos quanto ao teor de extrativos obtidos com a maceração em metanol. *Terminalia fagifolia* apresentou o maior teor de extrativo (13,52%), seguida por *Pterodon abruptus* (10,51%), *Diptychandra aurantiaca* (7,47%), *Machaerium acutifolium* (6,66%) e *Aspidosperma multiflorum* (2,87%). Essas diferenças também se refletiram na separação do extrato hexânico, extrato diclorometânico, extrato do acetato de etila e extrato butanólico das cinco espécies.

O teste de difusão em placas de Petri permitiu avaliar o efeito inibitório dos metabólitos secundários nos diferentes extratos para os quatro fungos apodrecedores e inferir quais possíveis grupos de metabólitos secundários apresentam maior potencial de inibição do crescimento fúngico para cada espécie de madeira, sendo muito variada a inibição dos diferentes extratos para cada fungo apodrecedor. O extrato metanólico bruto teve a maior atividade inibitória entre os quatro fungos, sendo seguido pelo extrato hexânico. Dessa forma, pode-se inferir que o extrato hexânico é um bom candidato para a pesquisa de novos metabólitos secundários com atividade antifúngica.

O estudo dos metabólitos secundários de madeiras pode trazer muitos benefícios na pesquisa de novos compostos químicos, principalmente como preservantes de madeiras. Este estudo fitoquímico pode aumentar o aproveitamento de muitas espécies subutilizadas e desvalorizadas. Posto isto, recomenda-se:

- Identificar quimicamente os compostos bioativos responsáveis pela atividade antifúngica observada, bem como avaliar e entender os mecanismos moleculares e os caminhos envolvidos na produção destas moléculas;
- Realizar testes com a utilização desses extratos em madeiras menos resistentes naturalmente, de forma a avaliar se o grau de proteção promovido pelos metabólitos secundários consegue ser transferido a outras espécies de madeiras;
- Avaliar o potencial inibitório dos metabólitos secundários restantes na solução aquosa ao final do processo de separação;
- Realizar outros testes com esses extratos, como o teste de diluição ou a bioautografia direta, de forma a comparar a eficiência de cada método;
- Realizar esta metodologia com um menor número de espécies e fungos, uma vez que a análise fica muito complexa, dificultando a visualização dos diversos resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-ZAHARIN, F. BINTI. **Effect of extractives on wood density and natural durability of *Tristanopsis Whiteana* and *T. Beccarii***. University Malaysia Sarawak, 2013.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS - ASTM D 1413-99. **Standard Test Method for Wood Preservatives by Laboratory Soil-Block Cultures Title**. West Conshohocken, 1999.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS - ASTM D 2017-05. **Standard Test Method of Accelerated Laboratory Test of Natural Decay Resistance of Woods**. West Conshohocken, 2005.

AMORIM, F. et al. Natural resistance of plantation grown African mahogany (*Khaya ivorensis* and *Khaya senegalensis*) from Brazil to wood-rot fungi and subterranean termites. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 107, p. 88–91, 2016.

ANDRES, B. et al. **A study of natural durability of wood in selected tropical wood species from South America and Africa affected by the fungus *Serpula lacrymans* (Wulf., Fr.) Schroet**. Annals of Warsaw University of Life Sciences. **Anais...**2015

ANTWI-BOASIAKO, C.; PITIMAN, A. J. Influence of density on the durabilities of three Ghanaian timbers. **Journal of Science and Technology**, v. 29, n. 2, p. 34–45, 2009.

ARIF, T.; MANDAL, T. K.; DABUR, R. Natural products: Anti-fungal agents derived from plants. **ResearchGate**, v. 661, n. 2, p. 283–311, 2011.

ASSOCIAÇÃO CAATINGA. **Caatinga - Um novo olhar**. 1ª ed. Fortaleza: Associação Caatinga, 2012.

AUST, S. D. Mechanisms of degradation by white rot fungi. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, n. SUPPL. 5, p. 59–61, 1995.

AYRES, M. C. C.; CHAVES, M. H. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc Mariane. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1509–1512, 2010.

BARI, E. et al. Comparison between degradation capabilities of the white rot fungi *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* in beech wood. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 104, p. 231–237, 2015.

BENEVIDES, D. S. et al. Estudo da flora herbácea da caatinga no município de caraúbas no estado do rio grande do norte. **Revista Verde**, v. 2, n. 1, p. 33–44, 2007.

BI, Z.; ZHENG, G.; TAIHUI, L. **The Macrofungus Flora of China's Guangdong Province**. Hong Kong: The Chinese University Press, 1993.

BORGES, E. B. et al. **Isolamento, purificação e caracterização de metabólitos espécies de nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L.)**. 1º Congresso de Pesquisa e Pós-Graduação do Câmpus Rio Verde do IFGoiano. **Anais...**Rio Verde - GO: 2012.

BRAND, M. A.; ANZALDO, J.; MORESCHI, J. C. Novos produtos para o tratamento preservante da madeira. “Perspectivas da pesquisa e utilização”. **Floresta**, v. 36, n. 1, p. 129–138, 2006.

- BROCCO, V. F. et al. Potential of teak heartwood extracts as a natural wood preservative. **Journal of Cleaner Production**, v. 142, p. 2093–2099, 2017.
- CARLILE, M. J. et al. **The Fungi**. 2nd. ed. Academic Press, 2001.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99–105, 1998.
- CHARIFO, A. et al. Comparative natural durability of five wood species from Mozambique. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 6, p. 768–776, 2011.
- CHENG, S. S. et al. Antifungal activities and chemical composition of wood and leaf essential oils from *Cunninghamia konishii*. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 31, n. 3, p. 204–217, 2011.
- CLAUSEN, C. A.; KARTAL, S. N. Accelerated detection of brown-rot decay: Comparison of soil block test, chemical analysis, mechanical properties, and immunodetection. **Forest Products Journal**, v. 53, n. 11–12, p. 90–94, 2003.
- COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. **Bioactive Natural Products**. 2nd. ed. Boca Raton: CRC Press, 2008.
- COLEMAN, J. J. et al. Antifungal activity of microbial secondary metabolites. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, 2011.
- CORASSA, J. D. N. et al. Durabilidade natural da madeira de quatro espécies florestais em ensaio de deterioração em campo. **Ciência da Madeira**, v. 4, n. 2177–6830, p. 108–117, 2013.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural Product Drug Discovery in the Next Millennium. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, n. sup1, p. 8–17, 2001.
- CULLEN, D. Section 2 Saprotrophic Fungi Wood Decay. In: MARTINS, F. (Ed.). **The Ecological Genomics of Fungi**. 1st ed. ed. John Wiley & Sons, 2014. p. 43–62.
- DANIEL, G.; NILSSON, T.; PETTERSON, B. Poorly and non-lignified regions in the middle lamella cell corners of birch (*Betula verrucosa*) and other wood species. **Iawa Bulletin**, v. 12, n. 1, p. 70–83, 1991.
- DELLAVALLE, P. D. et al. Antifungal activity of medicinal plants extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria* spp. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 71, n. June, p. 231–239, 2011.
- DICOSMO, F.; MASANARU, M. Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production. **Biotechnology advances**, v. 13, n. 3, p. 425–453, 1995.
- DIX, N. J.; WEBSTER, J. Colonization and Decay of Wood. In: **Fungal Ecology**. Dordrecht: Springer, 1995. p. 145–171.
- EATON, R. A.; HALE, M. D. C. **Wood - Decay, pests and protection**. 1st edition ed. London: Chapman & Hall, 1993.
- FOREST PRODUCTS LABORATORY. **Research Unit: Durability and Wood Protection Research**. Disponível em: <<https://www.fpl.fs.fed.us/research/units/4723.php>>. Acesso em: 16 jan. 2018.

- GABRIEL, J.; SVEC, K. Occurrence of indoor wood decay basidiomycetes in Europe. **Fungal Biology Reviews**, v. 1, p. 212–217, 2017.
- GARCEZ, F. R. et al. **Estudo Químico de Terminalia fagifolia (Combretaceae)**. Sociedade Brasileira de Química. **Anais...**Campo Grande: 2003
- GHOSH, R. **Principles of bioseparations engineering**. 1st. ed. Singapore: World Scientific Publishing, 2006.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.
- GOODELL, B. Brown-rot fungal degradation of wood: Our evolving view. **Wood Deterioration and Preservation**, v. 845, p. 97–118, 2003.
- GRYCZKA, M. **Mushroom Observer**. Disponível em: <http://mushroomobserver.org/name/show_name_description/641?_js=on&_new=true>. Acesso em: 18 out. 2017.
- HARA KISHORE, K. et al. Antimicrobial efficacy of secondary metabolites from *Glomerella cingulata*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 150–152, 2007.
- HE, D. H. et al. Tricalysiosides A-G: Rearranged ent-kauranoid glycosides from the leaves of *Tricalysia dubia*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 5, p. 685–688, 2002.
- HOAGLIN, D. C.; IGLEWICZ, B.; TUKEY, J. W. Performance of some resistant rules for outlier labeling, *Journal of American Statistical Association*. **Journal of American Statistical Association**, v. 81, p. 991–999, 1986.
- HOLM FREIESLEBEN, S.; JÄGER, A. K. Correlation between plant secondary metabolites and their antifungal mechanisms – a review. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 3, n. 2, p. Article ID 1000154 (1-6), 2014.
- IBAMA. **Projeto de Monitoramento do Desmatamento dos Biomas Brasileiros por Satélite - PMDBBS**. Disponível em: <http://siscom.ibama.gov.br/monitora_biomass/PMDBBS - CAATINGA.html>. Acesso em: 20 ago. 2017.
- JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO, J. **Flora do Brasil 2020**. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/ConsultaPublicaUC.do#CondicaoTaxonCP>>. Acesso em: 10 set. 2017.
- KAWAMURA, F. et al. Antifungal activities of extracts from heartwood, sapwood and bark of 11 malaysian timbers against *gloeophyllum trabeum* and *pycnoporus sanguineus*. **Journal of Tropical Forest Science**, v. 22, n. 2, p. 170–174, 2010.
- KIRKER, G. T. et al. The role of extractives in naturally durable wood species. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 82, p. 53–58, 2013.
- KLOCK, U. et al. **Química da Madeira**. 3ª ed. Curitiba: Departamento de Engenharia e Tecnologia Florestal, 2005.
- LEPAGE, E. S. et al. **Agentes destruidores da madeira**. 1ª ed. São Paulo: IPT - Divisão de Madeiras, 1986.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2ª ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1992.

- MAHDI, S.; ALTIKRITI, Y. Extraction of natural products. **Läkemedelsproduktion** **2010**, p. 7, 2010.
- MEDEIROS, F. C. M. **Caracterização química e atividade biológica de óleos essenciais de plantas do Cerrado contra fungos xilófagos**. Universidade de Brasília, 2014.
- MEDEIROS, F. C. M. et al. Fungicidal activity of essential oils from Brazilian Cerrado species against wood decay fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 114, p. 87–93, 2016.
- MOORE, D.; ROBSON, G. D.; TRINCI, A. P. J. **21st Century Guidebook to Fungi**. 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2011.
- MOREIRA, D. L. et al. Estudo Químico e da Atividade Leishmanicida de Frações de Piper cabralanum C.DC. (Piperaceae). **Revista Fitos**, v. 5, p. 92–98, 2010.
- MOYA, R.; BERROCAL, A. Evaluation of biodeterioration and the dynamic modulus of elasticity of wood in ten fast-growing tropical species in costa rica exposed to field testing. **Wood Research**, v. 60, n. 3, p. 359–374, 2015.
- NICHOLAS, D. D.; MILITZ, H. Concepts in the Development of New Accelerated Test Methods for Wood Decay. In: SOCIETY, A. C. (Ed.). **Wood deterioration and preservation : advances in our changing world**. Washington, DC. p. 288–312.
- NILSSON, T.; SINGH, A.; DANIEL, G. Ultrastructure of the Attack of Eusideroxylon zwageri Wood by Tunnelling Bacteria. **Holzforschung**, v. 46, n. 5, p. 361–368, 1992.
- NOLDIN, V. F. et al. Composição química e atividades biológicas das folhas de Cynara scolymus L. (alcachofra) cultivada no Brasil. **Quimica Nova**, v. 26, n. 3, p. 331–334, 2003.
- OBST, J. R. Special (Secondary) Metabolites from wood. In: **Forest Products Biotechnology**. 1st. ed. Madison: Forest Products laboratory, 1998. p. 151–165.
- ÖRDÖG, V.; ZOLTÁN, M. **Plant Physiology**. 1st. ed. Debreceni Egyetem, Nyugat-Magyarországi Egyetem, Pannon Egyetem, 2011.
- PAES, J. B. et al. Efeitos dos extrativos e da densidade na resistência natural de madeiras ao térmita Nasutitermes corniger. **Cerne**, v. 21, n. 4, p. 569–578, 2015.
- PAIVA, P.; GOMES, F.; NAPOLEÃO, T. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, p. 396–406, 2010.
- PAULI, A.; SCHILCHER, H. In vitro Antimicrobial Activities of Essentia Oils Monographed in the European Pharmacopoeia 6th Edition. In: **Handbook of Essential Oils - Science, Technology and Applications**. 6th. ed. Boca Raton: CRC Press, 2010. p. 5.
- PHROMPITTAYARAT, W. et al. Comparison of Various Extraction Methods of Bacopa monnieri. **Naresuan University Journal**, v. 15, n. 1, p. 29–34, 2007.
- RIBERA, A. E.; ZUÑIGA, G. Induced plant secondary metabolites for phytopatogenic fungi control: a review. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 12, n. 124, p. 893–911, 2012.
- ROBERT, V.; STEGEHUIS, G.; STALPERS, J. **Mycobank**. Disponível em:

<<http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?TableKey=14682616000000063&Rec=48370&Fields=All>>. Acesso em: 19 out. 2017.

RODRIGUES, A. M. S. et al. The wood preservative potential of long-lasting Amazonian wood extracts. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 75, p. 146–149, 2012.

SAAD, N. Y.; MULLER, C. D.; LOBSTEIN, A. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 28, n. 5, p. 269–279, 2013.

SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. **Natural Products Isolation**. 2nd. ed. New Jersey: Humana Press, 2012. v. 864

SASIDHARAN, S. et al. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2011.

SCHEFFER, T.; HOPP, H. Decay resistance of black locust heartwood. **Technical Bulletin n. 984**, p. 36, 1949.

SCHULZ, B. et al. 2002 - SCHULZ - Endophytic fungi a source of novel biologically active. v. 106, n. September, p. 996–1004, 2002.

SCHWARZE, F. W. M. R. Wood decay under the microscope. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 4, p. 133–170, 2007.

SEHLSTED-PERSSON, M.; KARLSSON, O. Natural Durability And Phenolic Content in Dried Scots Pine Heartwood. v. 5, n. Hillis 1987, p. 1126–1142, 2010.

SEIDEL, V. Initial and bulk extraction of natural products isolation. **Natural Products Isolation**, v. 864, p. 27–42, 2012.

SHENTU, X. et al. Antifungal activity of metabolites of the endophytic fungus *Trichoderma brevicompactum* from garlic. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 248–254, 2014.

SILVA, A. C. E.; JESUS, I. DE; AGUIAR, A. Micromorfologia da degradação da madeira da espécie amazônica *Hura crepitans* L. por fungos lignolíticos pertencentes a classe Hymenomycetes. **Acta Amazonica**, v. 3, n. 2, p. 397–418, 2001.

SILVA, A. G. C.; SOUZA, T. D. Atividade antifúngica in vitro de metabólitos secundários produzidos por *Bacillus cereus*. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 14, n. 2, p. 522–529, 2016.

SILVÉRIO, F. O. et al. Metodologia de extração e determinação do teor de extrativos em madeiras de eucalipto. **Sociedade de Investigações Florestais**, v. 30, p. 1009–1016, 2006.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia, da Planta ao Medicamento**. v. 1, 2^a ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2006.

SOUSA, C. M. D. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.

STANCHEVA, Y. et al. **Atlas of Wood Decaying Fungi**. 1st. ed. Bulgaria: Pensoft Publishers, 2009.

- SUNDARARAJ, R. et al. Natural durability of timbers under Indian environmental conditions - An overview. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 103, p. 196–214, 2015.
- TEIXEIRA, D. E.; GARLET, A.; SANCHES, K. L. Resistance of particleboard panels made of agricultural residues and bonded with synthetic resins or PVC plastic to wood-rotting fungi. **Cerne**, v. 15, n. 4, p. 413–420, 2015.
- TEOH, Y. P.; DON, M. M. In vitro antifungal activities and phytochemical analysis of filamentous white-rot Fungi, *Schizophyllum commune*. **Sains Malaysiana**, v. 42, n. 9, p. 1267–1272, 2013.
- TRENTIN, D. D. S. et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 327–335, 2011.
- TUOR, U.; WINTERHALTER, K.; FIECHTER, A. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. **Journal of Biotechnology**, v. 41, n. 1, p. 1–17, 1995.
- VALETTE, N. et al. Antifungal activities of wood extractives. **Fungal Biology Reviews**, v. 31, n. 3, p. 113–123, 2017.
- VINALE, F. et al. Trichoderma Secondary Metabolites Active on Plants and Fungal Pathogens. **The Open Mycology Journal**, v. 8, n. 1, p. 127–139, 2014.
- WHITE, D. G. et al. Antimicrobial resistance: standardisation and harmonisation of laboratory methodologies for the detection and quantification of antimicrobial resistance. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 20, p. 849–858, 2001.
- WINK, M.; SCHIMMER, O. **Molecular Modes of Action of Defensive Secondary Metabolites**. v. 39, 2nd. ed. Singapore: Wiley-Blackwell, 2010.
- WONG, A. H. H. et al. Natural Durability of Tropical Species with Emphasis on Malaysian Hardwoods – Variations and Prospects. **International Research Group on Wood Protection**, n. May 2016, p. 32, 2005.
- WONG, A. H. H.; WILKES, J.; HEATHER, W. A. Influence of wood density and extractives content on the decay resistance of the heartwood of *Eucalyptus delegatensis* R. T. Baker. **Journal of The Institute of Wood Science**, v. 9, n. 54, p. 261–263, 1983.
- XU, L. L. et al. Comparative research of chemical constituents, antifungal and antitumor properties of ether extracts of *Panax ginseng* and its endophytic fungus. **Phytomedicine**, v. 16, n. 6–7, p. 609–616, 2009.
- ZABEL, R. A.; MORRELL, J. J. **Wood Microbiology Decay and Its Prevention**. 1st. ed. San Diego: Academic Press, 1992.

ANEXO

Anexo 1. Resultado do teste de Kruskal-Wallis.

Espécies	Valor de qui-quadrado	Grau de liberdade	Significância assintótica
<i>Pterodon abruptus</i>	26.673	3	.000**
<i>Diptychandra aurantiaca</i>	29.795	3	.000**
<i>Terminalia fagifolia</i>	18.678	3	.000**
<i>Machaerium acutifolium</i>	3.077	3	.380
<i>Aspidosperma multiflorum</i>	51.171	3	.000**

** significativo ao nível de 5% de probabilidade