
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

JELENA PURIĆ

**Fungos de sedimentos marinhos da Antártica: Produção
de metabólitos secundários e avaliação da atividade contra
espécies de *Xanthomonas***

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada)

Rio Claro - SP
2018

JELENA PURIĆ

FUNGOS DE SEDIMENTOS MARINHOS DA ANTÁRTICA: PRODUÇÃO
DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
CONTRA ESPÉCIES DE *XANTHOMONAS*

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas (Microbiologia
Aplicada)

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Daiane Cristina Sass (UNESP/Rio Claro)

Rio Claro - SP

2018

589.2 Puric, Jelena
P985f Fungos de sedimentos marinhos da Antártica: produção de metabólitos secundários e avaliação da atividade contra espécies de *Xanthomonas* / Jelena Puric. - Rio Claro, 2018
61 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientadora: Daiane Cristina Sass
Coorientadora: Lara Durães Sette

1. Fungos. 2. Bioensaio de atividade antimicrobiana. 3.
Metabólitos secundários. 4. Antibacterianos. 5. *Xanthomonas*.
6. Fitopatógeno. 7. Cancro cítrico. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Fungos de sedimentos marinhos da Antártica: Produção de metabólitos secundários e avaliação da atividade contra espécies de Xanthomonas

AUTORA: JELENA PURIC

ORIENTADORA: DAIANE CRISTINA SASS

COORIENTADORA: LARA DURÃES SETTE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), área: MICROBIOLOGIA APLICADA pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. DAIANE CRISTINA SASS

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro



Profa. Dra. GISLAINE VICENTE DOS REIS

Departamento de Ciências Exatas / Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz



Prof. Dr. JONAS CONTIERO

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro

Rio Claro, 22 de fevereiro de 2018

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo obter extratos contendo metabólitos secundários de fungos filamentosos isolados de sedimentos marinhos da Antártica e avaliar sua potencial atividade antibacteriana em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *Xanthomonas euvesicatoria* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (bactérias fitopatogênicas que causam doenças em cítricos, pimenta e tomate, e maracujá, respectivamente). Entre os 90 extratos brutos intracelulares e extracelulares obtidos a partir de fungos, 19 mostraram a capacidade de impedir o crescimento de *X. citri* subsp. *citri* e *X. euvesicatoria in vitro* e 22 mostraram a capacidade de dificultar o crescimento de *X. axonopodis* pv. *passiflorae in vitro*. Os extratos extracelulares inibiram em média 97,12% de *X. citri* subsp. *citri*, 95,94% de *X. euvesicatoria* e 96,58% de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* a 3,0 mg / mL.

Palavras-chave: Metabólitos secundários, Antibacterianos, *Xantomonas*, Fitopatógeno, Cancro cítrico, Maracujá, Tomate

ABSTRACT

This work aimed to obtain extracts containing secondary metabolites from filamentous fungi isolated from marine sediments from Antarctic and assess their potential antibacterial activity on *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *Xanthomonas euvesicatoria* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (phytopathogenic bacteria causing diseases in citrus, pepper and tomato, and passionfruit, respectively). Among the 90 raw intracellular and extracellular extracts obtained from fungi, 19 showed the ability to hamper the growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *X. euvesicatoria in vitro* and 22 showed the ability to hamper the growth of *X. axonopodis* pv. *passiflorae in vitro*. The extracellular extracts inhibited on average 97,12% of *Xanthomonas citri* subsp., 95,94% of *X. euvesicatoria* and 96,58% of *X. axonopodis* pv. *passiflorae* at 3,0 mg/mL.

Keywords: Secondary Metabolites, Antibacterial, *Xanthomonas*, Phytopathogen, Citrus canker, Passionfruit, Tomato

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1. <i>Xanthomonas</i> sp.....	6
2.2. <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	6
2.3. <i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	8
2.4. <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>	11
2.5. Fungos da Antártica como fontes de novos produtos para o controle de doenças causadas por <i>Xanthomonas</i> sp.	13
2.6. Informação sobre gêneros dos fungos usados neste estudo.....	16
2.6.1. <i>Penicillium</i>	16
2.6.2. <i>Pseudogymnoascus</i>	16
2.6.3. <i>Cadophora</i>	17
2.6.4. <i>Cladosporium</i>	18
2.6.5. <i>Toxicocladosporium</i>	19
2.6.6. <i>Paraconiothyrium</i>	19
2.6.7. <i>Phaeoacremonium</i>	20
2.6.8. <i>Pestalotiopsis</i>	20
3. OBJETIVOS.....	21
4. MATERIAIS E METODOS.....	21
4.1. Fungos.....	21
4.2. Linhagens das <i>Xanthomonas</i> sp.....	22
4.3. Obtenção dos extratos brutos.....	23
4.3.1. Condições de cultura para fermentação em agitador orbital.....	23
4.3.2. Processamento, extração e armazenamento do extrato bruto.....	23
4.4. Avaliação da atividade contra bactérias fitopatogênicas.....	23
4.5. Concentração mínima inibitória (CMI90).....	26
4.6. Concentração mínima bactericida (CMB).....	27

4.7. Fracionamento dos extratos bioativos	27
5. RESULTADOS E DISCUSÃO	28
5.1. Produção dos extratos	28
5.2. Avaliação da atividade antibacteriana	31
5.2.1. Triagem dos extratos brutos com bioensaio REMA.....	31
5.2.2. Ensaio antibacteriano com a diluição seriada completa	35
5.3. Concentração Mínima Inibitória (CMI90) dos extratos bioativos.....	39
5.4. Avaliação da Concentração Mínima Bactericida (CMB) dos extratos bioativos.....	39
5.5. Relação dose-resposta.....	40
5.6. Fracionamento dos extratos bioativos	42
5.6.1. Purificação 1	42
5.6.2. Purificação 2	43
6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	46

1. INTRODUÇÃO

Xanthomonas é um grande gênero de bactérias gram-negativas, pigmentadas de amarelo, associadas às plantas. O gênero é composto por 27 espécies que causam doenças graves em 400 hospedeiros de plantas, incluindo uma grande variedade de culturas economicamente importantes, como arroz, citros, banana, repolho, tomate, pimenta e feijão (RYAN et al., 2011). O controle químico dessas doenças é realizado com utilização de antibióticos para uso na agricultura e produtos à base de cobre. No entanto, vários estudos apontam para a baixa eficiência desses métodos de controle de doenças, tendo como possível causa o surgimento de indivíduos resistentes em populações bacterianas (NASCIMENTO et al., 2013; MUNHOZ et al., 2015).

Os problemas associados à seleção de isolados de patógenos resistentes aos bactericidas e a percepção pública geral do impacto potencial das práticas tradicionais de controle de doenças na saúde e no meio ambiente levaram a uma demanda crescente de produtos químicos isentos de resíduos. Consequentemente, agricultores e pesquisadores começaram a considerar o uso de métodos alternativos para controlar doenças (TONUCCI-ZANARDO et al., 2015). A descoberta de compostos antimicrobianos inovadores e eficientes tornou-se um ponto focal de interesse para a química de produtos naturais. Para tanto, a exploração de fontes incomuns e subexploradas de substâncias úteis e o rastreamento de grupos microbianos menos explorados foram reconhecidos como ferramentas promissoras para o isolamento de novos compostos antimicrobianos com estruturas únicas e atividade biológica específica (GIUDICE, FANI, 2016).

Os organismos de ecossistemas especiais, como as regiões polares, são uma fonte rica de novos produtos naturais com várias estruturas químicas e bio-atividades promissoras (TIAN et al., 2017). De acordo com Tian et al. (2017), de 2001 a 2016, uma grande quantidade de novos compostos naturais biológicos com várias atividades, como anti-bactérias, antitumorais, anti-vírus e assim por diante, foram isolados de organismos polares, incluindo micro-organismos, líquen, musgo, cnidários, equinodermos, moluscos, esponjas e tunicados. Considerando a necessidade atual de novas alternativas no controle das espécies de *Xanthomonas* na perspectiva da substituição de produtos químicos sintéticos e, ao mesmo tempo, minimizando danos ao meio ambiente, este trabalho teve como objetivo descobrir novos compostos produzidos por fungos isolados de sedimentos marinhos antárticos que possuem ação potencial contra *X. citri* subsp. *citri*, *X. a. passiflorae* e *X. euvesicatoria* que causam, em vários países, sérios danos à agricultura.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Xanthomonas* sp.

As bactérias fitopatogênicas são um problema sério na agricultura. Elas causam doenças em muitas espécies de plantas e, a cada ano, os agricultores sofrem grandes perdas em todo o mundo. As bactérias do gênero *Xanthomonas* são bactérias fitopatogênicas típicas que atacam mais de 200 espécies de plantas, incluindo citrinos, pimentões, tomates e maracujá (ENCHEVA-MALINOVA et al., 2015).

Xanthomonas (do xanthos grego, que significa 'amarelo', e monas, que significa 'entidade') é um grande gênero de bactérias gram-negativas, de pigmentação amarela, associadas às plantas. As espécies patogênicas e patovares mostram um alto grau de especificidade da planta hospedeira (RYAN et al., 2011). Doenças causadas por *Xanthomonas* spp. muitas vezes começam com sementes contaminadas, embora os agentes patógenos possam ser espalhados em plantas saudáveis por práticas agrícolas, pela água da chuva, pela formação de aerossóis que podem transportar bactérias a partir de campos contaminados, por solo contaminado e possivelmente por insetos (RYAN et al., 2011).

Muitas *Xanthomonas* spp. podem sobreviver no solo em associação com material vegetal morto para formar uma fonte de inóculos para culturas futuras, que também podem se infectar através de feridas nas raízes (RYAN et al., 2011). As medidas de controle para essas doenças incluem procedimentos de quarentena, plantação de mudas saudáveis, uso de cultivares resistentes, quebra-ventos para impedir a dispersão do inóculo e uso de bactericidas, como compostos à base de cobre. Estas medidas de controle têm eficácia limitada, com apenas alguns bactericidas disponíveis no mercado e a questão adicional de que os compostos de cobre são tóxicos, o que afeta o meio ambiente (SPAGO et al., 2014). Algumas doenças importantes causadas por espécies de *Xanthomonas* incluem a mancha bacteriana do tomate e pimentão, mancha bacteriana do maracujazeiro e cancro cítrico, quais levam a uma séria perda de qualidade e rendimento nas culturas hospedeiras.

2.2. *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

O Brasil é o principal produtor mundial de laranja e responsável por cerca de 30% da produção da fruta e 53% de suco de laranja produzido mundialmente. O estado de São Paulo é responsável por 76% da produção nacional da fruta e 70% da área plantada com laranja no Brasil (SANCHES et al., 2014). O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, afeta todas as espécies e variedades de citros de importância comercial. A primeira

detecção desse patógeno no Brasil ocorreu em 1957 no estado de São Paulo e posteriormente foi encontrada também nos estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Roraima (SANCHES et al., 2014).

Os impactos desta doença estão relacionados à desfolha de plantas, à depreciação da qualidade da produção pela presença de lesões em frutos, à redução na produção pela queda prematura de frutos e à restrição da comercialização da produção para áreas livres da doença (FUNDECITRUS, 2017). Os primeiros sintomas de cancro cítrico normalmente surgem na face inferior das folhas, na forma de pequenos pontos salientes de coloração marrom clara. Com o progresso da doença, estas lesões tornam-se maiores e mais escuras com aspecto semelhante a verrugas. As lesões de cancro cítrico podem ocorrer também em frutos (Figura 1).

Figura 1. Cancro cítrico em fruto.



Fonte: Fundecitrus (2017).

A bactéria causadora do cancro cítrico (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) pode chegar a um pomar livre da doença por ação do homem, por meio de mudas, materiais de colheita, implementos e veículos contaminados que transitam pelos pomares, e da natureza, por meio de chuvas acompanhadas de vento. As formas mais comuns de penetração da bactéria são por aberturas naturais, como os estômatos (estrutura responsável pelas trocas gasosas da planta); por ferimentos mecânicos, causados por equipamentos, atrito entre partes da própria planta, abrasão de partículas de poeira, e ainda por ferimentos causados por insetos como, por exemplo, o minador dos citros, que ao se alimentar de folhas novas provoca aberturas que servem de entrada para a bactéria. Um fator fundamental para a contaminação é a presença de água na superfície da planta (FUNDECITRUS, 2017).

A sobrevivência da bactéria e a continuidade da doença do pomar ao longo dos anos ocorrem pelas lesões velhas em ramos, frutos e folhas que permanecem na planta de um ano

para outro. Na ocorrência de chuvas, estas lesões liberam bactérias que são dispersas por respingos associados ao vento para diferentes partes da planta ou ainda para outras plantas que podem ao redor ou mesmo a alguns quilômetros de distância, o que, havendo condições favoráveis como temperaturas elevadas e brotações, poderá dar início a um novo ciclo da doença (FUNDECITRUS, 2017).

O controle do cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, é um problema grave na citricultura, e as estratégias de gerenciamento incluem o uso de mudas saudáveis, cultivares resistentes, quebra-vento para impedir a dispersão de inoculo, e bactericidas à base de cobre. A aplicação de cobre não previne a entrada da bactéria no pomar. Esta medida ajuda a reduzir a quantidade de sintomas nas plantas e a queda de frutos. Os produtos usados são à base de cobre fixo como oxicloreto de cobre, hidróxido de cobre e óxido cuproso. Os cobres fixos apresentam baixa solubilidade em água e, por isso, proporcionam efeito residual na planta. Quando aplicados, estes bactericidas formam uma camada protetora e agem preventivamente evitando novas infecções em folhas e frutos jovens (FUNDECITRUS, 2017). Mas, estas estratégias não são sempre eficazes, especialmente quando as condições ambientais são ideais para a disseminação da doença ou a densidade de inóculo é alta. O desafio é encontrar um novo método de controle do cancro cítrico no pomar de laranja (OLIVEIRA et al., 2011).

2.3. *Xanthomonas euvesicatoria*

O pimentão (*Capsicum annuum*) é uma das 10 hortaliças mais importantes do mercado hortigranjeiro brasileiro, tanto em forma de frutos verdes como maduros, podendo ser estes nas colorações vermelha, amarela, marfim, laranja e roxa, sendo os verdes os mais consumidos (Andrade et al., 2016). O pimentão tem origem americana (entre o Sul dos Estados Unidos e o Norte do Chile) e pertencente a mesma família do tomate, jiló, berinjela, batata e pimentas em geral (Sousa, 2017).

Os frutos apresentam as mais variadas cores, formas e tamanhos e são importantes fontes de vitamina E e C e antioxidantes naturais. O fruto é a parte lucrativa da planta e pode ser comercializado de forma fresca, desidratada, em flocos, em conservas ou em pó. Quando desidratado e moído é denominado páprica e é bastante utilizado na indústria alimentícia como ingrediente de enlatados, embutidos ou comercializado em pequenas embalagens (Sousa, 2017).

Seu cultivo pode se dar tanto em campo aberto quanto em estufas, sendo o cultivo em campo aberto responsável pela grande maioria da área ocupada com esse legume no Brasil,

enquanto ao cultivo em estufas cabe a produção de frutos a serem comercializados maduros na coloração vermelha, amarela e outras. Entre as principais áreas de cultivos estão os estados de São Paulo, Santa Catarina, Minas Gerais, Rio de Janeiro e estados do Nordeste (Maldonado, 2001).

A cultura do tomate no Brasil é a mais importante dentre as hortaliças, tanto no âmbito econômico, quanto no social, pelo seu grande volume de produção e geração de empregos (Apolinário et al., 2016). Os maiores produtores mundiais de tomate em 2012-13 foram: China (30,38%), Índia (10,00%), Estados Unidos (7,90%), Turquia (7,10%), Egito (5,00%), Itália (3,40%), Irã (3,70%), Espanha (2,38%), Brasil (2,40%) e México (1,9%)⁴. Esses dez países produziram 74,2% da produção global de tomate (Camargo, 2017).

No Brasil, embora cultivado em todos os estados em maior ou menor escala, os principais produtores são Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Bahia e Rio de Janeiro. Da produção total, 70% são destinados ao mercado para consumo ao natural e os restantes são matéria prima para industrialização, com os quais são elaborados diversos produtos, tais como estratos, pastas, molhos, sucos e outros derivados. É necessário ressaltar que as cultivares de tomate para mercado são diferentes daquelas para industrialização, tanto no que se refere à planta quanto ao fruto e ao sistema de cultivo (Apolinário et al., 2016). Apesar dos bons índices, o Brasil ainda apresenta baixa inserção no mercado internacional, tanto no segmento de fruto destinado ao consumo in natura quanto no de pasta de tomate. As razões para essa baixa inserção são: alto custo do produto nacional, grande distância dos principais países consumidores e barreiras ao comércio externo (Carvalho, 2007).

A *X. euvesicatoria* é uma das bactérias (*X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri*, conforme Nascimento et al., 2013) causadoras da mancha bacteriana de pimentão e tomate (JONES et al., 2004). A mancha bacteriana é uma das doenças mais devastadoras de pimentão e tomate cultivados em ambientes úmidos e quentes. Uma vez presente na cultura sob condições favoráveis é quase impossível controlar a doença e prevenir grandes perdas de frutos. A mancha bacteriana ocorre em pimentão e tomate. Muitas das características da doença são similares nas duas culturas. A bactéria ataca folhas, caules e frutos de pimentões e tomateiros (RITCHIE, 2000).

No pimentão, a doença é caracterizada por lesões necróticas em folhas, caules e frutas. Os sintomas nas folhas começam como manchas encharcadas de água que se transformam gradualmente em lesões necróticas de 1,6 a 6,4 mm de diâmetro. Os sintomas no fruto começam com manchas pequenas, pálidas e encharcadas de água que gradualmente se transformam em

lesões escuras, criadas e necróticas. Em condições favoráveis, a doença pode causar perdas de rendimento até 100% (DUTTA et al., 2014). A maior parte das perdas resulta da queda de flores e de frutos jovens em desenvolvimento. Os frutos que permanecem, geralmente não são comercializados por causa da baixa qualidade. Estes podem apresentar lesões e estão frequentemente deformados e danificados devido à excessiva exposição ao sol como resultado do desfolhamento da planta. As folhas doentes caem prematuramente, resultando em desfolhamento extensivo. À medida que as folhas recém emergidas são infetadas e o desfolhamento das mais velhas continua, a planta fica com folhas somente na parte superior dos ramos (RITCHIE, 2000).

Geralmente, o desfolhamento é mais comum em pimentões do que em tomateiros. Por causa da folhagem doente que frequentemente permanece nos tomateiros, as plantas afetadas podem apresentar uma aparência chamuscada. As manchas nos frutos de pimentão e tomate (Figura 2) podem ir até 0,5 cm e começam como áreas encharcadas de cor verde pálido, tornando-se, eventualmente, elevadas, marrons e ásperas. Essas manchas podem servir de pontos de entrada para invasores fúngicos e bacterianos que causam podridões secundárias de frutos. O patógeno que causa a mancha bacteriana não causa podridão de frutos (RITCHIE, 2000).

Figura 2. Mancha bacteriana no frutos de pimentão.



Fonte: APS (2017).

X. euvesicatoria é um patógeno transmitido por sementes e as sementes de pimentão infestadas servem como fonte principal de inóculo primário em sistemas de transplante e produção de frutas. Uma vez que o patógeno é introduzido em estufas, alta temperatura, alta densidade de plantas e alta umidade favorecem o desenvolvimento da doença. A propagação da doença é ainda facilitada pela irrigação aérea. Assim, o uso de sementes e transplantes sem

patógenos é uma das estratégias importantes estratégia de gestão de doenças para mancha bacteriana (DUTTA et al., 2014).

A mancha bacteriana é favorecida por temperaturas entre 20°C a 30°C e alta umidade relativa. A bactéria penetra na planta através de estômatos ou de ferimentos provocados por equipamentos ou por pequenas partículas de solo movimentadas pelo vento. A disseminação a curta distância se dá por respingos de água e, a longa distância por mudas ou sementes contaminadas. A mancha bacteriana é de difícil controle devido à rápida disseminação do patógeno em condições ambientes favoráveis, transmissão por sementes, sobrevivência em plantas voluntárias ou como epífitas em plantas daninhas, pouca eficiência dos produtos químicos e indisponibilidade de cultivares com resistência adequada (NASCIMENTO et al., 2013). O controle químico da mancha bacteriana tem sido feito com antibióticos para uso em agricultura (como oxitetraciclina e estreptomicina) e produtos à base de cobre (como hidróxido de cobre e oxicloreto de cobre) (VIANA et al., 2007). No entanto, vários relatos apontam para a baixa eficiência dos mesmos, tendo como uma possível causa o aparecimento de indivíduos resistentes nas populações bacterianas. Além disso, em muitos países, o uso de antibióticos agrícolas não é permitido ou é restrito, devido a fatores ligados ao custo, eficiência, proteção ambiental e saúde humana (NASCIMENTO et al., 2013; POTNIS et.al., 2015)

2.4. *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*

A distribuição do gênero *Passiflora* se estende do sul da Argentina para o norte, em toda a América Central e México até o sul dos Estados Unidos. A principal espécie cultivada é *Passiflora edulis*. É nativa nas bordas das florestas da região amazônica, Paraguai e norte da Argentina. As plantas são cultivadas em todo o mundo, principalmente para a produção de suco e frutas frescas, em climas variando de subtropical fresco (variedade roxa) a tropical quente (variedade amarela) (MUNHOZ et al., 2015).

As plantações comerciais de maracujá são um fenômeno relativamente recente. No Brasil, o maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims) é uma cultura de importância econômica, tanto para a produção de suco quanto para o consumo como fruta fresca. A planta também é utilizada nas indústrias cosméticas e fitoterápicos (MUNHOZ et al., 2015). O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá amarelo com uma produção estimada de 838.244 toneladas e uma área plantada de 58.089 hectares por ano (NASCIMENTO et al., 2016). Como o Brasil tem alta diversidade de frutos e altos níveis de produção de espécies de *Passiflora*, não é surpreendente que a expansão do cultivo de maracujá tenha sido acompanhada pelo aparecimento de problemas fitossanitários, incluindo vários problemas de pragas (causados por

lagartas, moscas da fruta e vários outros insetos, além de nemátodos) e doenças (causadas por fungos, bactérias, vírus e fitoplasmas) (CERQUEIRA-SILVA et al., 2014).

Figura 3. Mancha bacteriana do maracujazeiro nas folhas (A) e frutos (B).



Fonte: APS (2017).

A mancha-bacteriana do maracujazeiro, causada pela bactéria *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, é uma das principais doenças da cultura. No Brasil, a mesma foi constatada na região de Araraquara, no Estado de São Paulo, em 1967 (ISHIDA, HALFELD-VIEIRA, 2009). Também chamada de mancha-oleosa, crestamento bacteriano, morte precoce ou simplesmente bacteriose do maracujá, essa doença provoca perdas expressivas em maracujazeiro-doce e azedo durante os períodos mais quentes e úmidos do ano. Ocorre em todas as regiões onde se cultiva o maracujazeiro, sendo mais severa nas regiões mais quentes e úmidas. Nas folhas (Figura 3-A), o patógeno induz pequenas lesões encharcadas e translúcidas, as quais necrosam, assumindo tonalidade marrom-avermelhada (VIANA et al., 2003). Com o desenvolvimento da doença, ocorre seca das folhas e, posteriormente, a desfolha, reduzindo consideravelmente a produtividade. Nos frutos (Figura 3-B), as manchas são grandes, bem delimitadas, inicialmente esverdeadas e oleosas, podendo coalescer e causar lesões de grandes extensões.

As condições ideais para *X. axonopodis* pv. *passiflorae* incitar doença são temperaturas superiores a 30 °C e umidade relativa do ar elevada (VIANA et al., 2003). A disseminação entre áreas pode se dar por meio de sementes e mudas contaminadas e entre plantas pela água de irrigação ou das chuvas, vento e insetos. A principal medida de controle da mancha-bacteriana é a exclusão, evitando-se a introdução do patógeno na área de cultivo, com a utilização de mudas e sementes livres do patógeno. Essas medidas de prevenção são de fundamental importância, pois, uma vez estabelecida, a bacteriose é uma doença de difícil controle. (ISHIDA, HALFELD-VIEIRA, 2009)

Nas condições do cerrado, o manejo da bacteriose vem sendo feito por meio da integração dos controles químico, cultural e genético. Para o controle cultural, são recomendadas medidas como: instalação de novos plantios em locais distantes de plantios contaminados, adubação e calagem adequadas, controle de plantas invasoras, insetos e destruição de restos culturais. Como controle químico para a cultura do maracujá são utilizadas combinações do sulfato de cobre e oxitetraciclina, oxitetraciclina e estreptomicina, e kasugamicina. O uso intensivo de produtos cúpricos para o controle da doença pode levar, em longo prazo, à seleção de formas resistentes do patógeno. A utilização de cultivares resistentes é uma alternativa simples e efetiva no controle de doenças causadas por bactérias, no entanto, ainda não existe material cultivado resistente à doença (ISHIDA, HALFELD-VIEIRA, 2009).

O controle químico tem sido uma das principais tentativas de reduzir as perdas causadas por esta doença. Os problemas associados à seleção de isolados de patógenos resistentes a fungicidas e a percepção pública geral do impacto potencial das práticas de controle tradicionais na saúde e no meio ambiente levaram a uma demanda crescente de produtos químicos isentos de resíduos. Conseqüentemente, agricultores e pesquisadores começaram a considerar o uso de métodos alternativos para controlar a doença (TONUCCI-ZANARDO et al., 2015).

2.5. Fungos da Antártica como fontes de novos produtos para o controle de doenças causadas por *Xanthomonas* sp.

Os produtos naturais são moléculas de metabolismo secundário (compostos orgânicos que não estão diretamente envolvidos nos processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução dos organismos) derivadas de plantas, animais ou micro-organismos, que podem representar pontos de partida como protótipos de compostos para pesquisa de descoberta de medicamentos novos. Nos últimos anos, a relevância dos micro-organismos na bioprospecção para a descoberta de medicamentos tem aumentado e, entre as fontes microbianas, as moléculas bioativas produzidas por fungos representam um reservatório químico para descobrir novos compostos com compostos antibióticos, antioxidantes, imunomoduladores, anticancerígenos e antiparasitários (FURBINO, 2014). Ao longo do século passado, os fungos foram utilizados como fonte de diferentes metabólitos secundários bioativos e são considerados produtores prolíficos de moléculas prototípicas, que podem ser usadas como modelos para desenvolver novos medicamentos ou pesticidas. Mais recentemente, diferentes programas de pesquisa em bioprospecção começaram a utilizar fungos presentes em ambientes inexplorados, o que

representa uma estratégia interessante para encontrar novas vias metabólicas e, finalmente, novos constituintes bioativos (GONÇALVES et al., 2015).

Os micro-organismos de ecossistemas extremos, como as regiões polares, precisam sobreviver em condições difíceis com baixas temperaturas, baixos níveis de nutrientes, dessecação, estresse hipersalino (osmótico) e altos níveis de radiação solar. Os micro-organismos se adaptam a estas condições evoluindo diversas adaptações bioquímicas e fisiológicas essenciais para a sobrevivência. A sua sobrevivência e adaptação a tais ambientes podem aumentar o seu potencial para a produção, por exemplo, de compostos bioativos característicos, enzimas a frio e proteínas anticongelantes. Tudo isso faz com que estes micro-organismos sejam uma fonte rica de novos produtos naturais baseados em estruturas químicas únicas. Neste contexto, os fungos endêmicos e adaptados ao frio e os fungos marinhos foram reconhecidos como fontes potenciais de novos produtos naturais para aplicações farmacêuticas, agrícolas e industriais (FURBINO, 2014; TIAN et al., 2017; ABNEUF et al., 2016).

As regiões polares, que se referem ao Ártico, à Antártica e suas sub-regiões, são áreas remotas e desafiadoras da Terra. A Antártica é o continente mais ao sul e está cercado pelo Oceano Antártico. É o continente mais frio, mais seco e com mais ventos, com aproximadamente 98% do continente coberto por gelo, onde são encontradas baixas temperaturas, diferentes níveis de pH, baixa disponibilidade de nutrientes orgânicos e água, ventos fortes e radiação UV alta. (ENCHEVA-MALINOVA, 2014; FURBINO et al, 2014). Apesar das condições ambientais difíceis e únicas, a Antártica encontrou-se uma diversidade maior do que a esperada, incluindo uma série de espécies endêmicas e ainda desconhecidas. O continente antártico é um habitat para diferentes formas de vida que incluem invertebrados, aves, mamíferos, macroalgas, plantas e micro-organismos. (GONÇALVES et al., 2015). Esta vasta região tem sido relativamente isolada do resto do mundo desde a separação da Antártica da Gondwana mais de 10 milhões de anos atrás. Este poderia ser o motivo pelo qual muitas novas espécies de bactérias, micro-algas, fungos e protozoários foram descritas na Antártica e não foram registradas em outras partes do mundo, sugerindo que o nível de endemismo poderia ser considerável. (VINCENT, 2000)

Os micro-organismos presentes na Antártica podem apresentar papéis ecológicos importantes na região, tais como interações de mutualismo, parasitismo e predação com plantas e animais. As comunidades microbianas são tipicamente o componente dominante de biomassa dos ecossistemas antárticos e controlam a maior parte do fluxo biológico de carbono, nutrientes e energia. (VINCENT, 2000). Entre a vida microbiana presente na Antártica, os fungos

colonizam diferentes substratos terrestres, como solo e plantas, mas também água doce, macroalgas e sedimentos marinhos. A sua ocorrência também foi registrada em madeira e em associação com invertebrados e vertebrados. (FURBINO et al., 2014). No entanto, devido ao isolamento geográfico e às condições inóspitas, uma diversidade abrangente e potenciais aplicações biotecnológicas de fungos na Antártica permanecem estudadas de forma incompleta quando comparadas com outras regiões polares, temperadas e tropicais, especialmente seu arsenal de moléculas bioativas (GONÇALVES et al., 2015).

No estudo feito por Svahn et al. (2015) uma linhagem de *Penicillium nalgiovense* foi isolada de uma amostra de solo de um ninho de pinguins na Antártida e foi descoberto que o fungo produz anfotericina B com atividade antimicrobiana notável contra *Candida albicans* e *Streptomyces nodosus*. Gonçalves et al. (2015) isolaram comunidades de fungos de solo da rizosfera de *Deschampsia antarctica*, solo, solo ornitogênico, sedimentos marinhos e lacustres na Península Antártica e investigaram sua capacidade de produzir compostos bioativos com propriedades antimicrobianas, citotóxicas e antiprotozoárias. Uma das coisas que descobriram foi que as espécies de *Penicillium* e *Pseudogymnoascus* apresentaram atividade antifúngica forte contra o fungo patógeno humano *Paracoccidioides brasiliensis*. Os resultados de seu estudo sugerem que os ecossistemas antárticos representam um habitat interessante para o isolamento e caracterização de táxons fúngicos capazes de produzir compostos bioativos.

Estudos recentes de metabólitos secundários produzidos por micro-organismos do ambiente marinho e antártico demonstraram uma potencial atividade antibacteriana destes metabólitos contra algumas espécies de *Xanthomonas*:

Em um destes estudos Silber et al. (2013) obtiveram compostos bioativos de extratos brutos do fungo *Calcarisporium* sp., que foi isolado a partir de amostras de água do Mar Frísio alemão. Os compostos exibiram atividades inibitórias contra *Staphylococcus epidermidis*, *X. campestris* e *Propionibacterium acnes*. Moncheva et al. (2002) obtiveram 47 isolados de *Actinomyces* de solos antráticos. Os isolados pertenciam aos gêneros *Streptomyces*, *Actinomadura* e *Kitasatosporia* e algumas delas apresentaram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*, bem como as bactérias fitopatogênicas *X. axonopodis* pv. *glicinas*, *X. vesicatoria* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Em um estudo realizado por Encheva-Malinova et al. (2015), três linhagens de *Streptomyces* isoladas dos solos da Antártica foram pesquisadas para a atividade antibacteriana *in vitro* e *in vivo* em relação aos agentes causadores da mancha bacteriana de pimenta: *X. euvesicatoria* e *X. gardneri*. Em seu

estudo, todos os *Streptomyces* apresentaram efeito antibacteriano que variou para diferentes bactérias de teste e as estirpes produtoras.

Considerando a necessidade atual de novas alternativas no controle a espécies de *Xanthomonas*, que visam substituir os produtos químicos ao mesmo tempo minimizar danos ao meio ambiente, o presente projeto vem contribuir para a descoberta de novos compostos produzidos por fungos isolados de sedimentos marinhos da Antártica que apresentem potencial ação contra espécies de *Xanthomonas* que causam sérios prejuízos às culturas agrícolas do país.

2.6. Informação sobre gêneros dos fungos usados neste estudo

2.6.1. *Penicillium*

O *Penicillium* é um gênero diverso de fungos ascomicetosos filamentosos que ocorrem em todo o mundo e suas espécies desempenham papéis importantes como decompositores de materiais orgânicos e causam apodrecimentos destrutivos na indústria de alimentos, onde produzem uma ampla gama de micotoxinas. É o bolor que salvou milhões de vidas ao produzir o primeiro antibiótico moderno conhecido, a penicilina. A descoberta da penicilina do fungo *Penicillium chrysogenum* (então conhecido como *Penicillium notatum*) por Sir Alexander Fleming em 1928, aperfeiçoou o tratamento de infecções bacterianas (Kung'u, 2017).

O nome *Penicillium* vem da semelhança das estruturas produtoras de esporos (conidióforos) do fungo com um pincel (penicillus é a palavra latina para pincel). Eles são encontrados no solo, vegetação em decomposição, ar e são contaminantes comuns em várias substâncias. *Penicillium* provoca deterioração de alimentos, coloniza objetos de couro e é um organismo indicador de umidade interior. Algumas espécies são conhecidas por produzir compostos tóxicos (micotoxinas). Por exemplo, *P. italicum* e *P. digitatum* são causas comuns de podridão de frutas cítricas, enquanto que *P. expansum* é conhecido por estragar maçãs (Kung'u, 2017).

2.6.2. *Pseudogymnoascus*

Pseudogymnoascus (*Geomyces*) é um gênero de fungos ascomicetosos filamentosos. O gênero *Pseudogymnoascus* possui apenas algumas espécies descritas. O gênero *Pseudogymnoascus* foi introduzido por Raillo (1929) para *P. vinaceus* e *P. roseus*. (MULLER, 1982).

Apesar do pequeno número de espécies descritas, os fungos de *Pseudogymnoascus* têm uma distribuição global, e as espécies conhecidas do gênero são especialmente comuns nos solos dos ecossistemas de alta altitude e temperatura, mas também podem ser generalizadas em

ambientes marinhos. As espécies deste gênero tendem a ser queratinófilos e psicófilos, elas podem ser tolerantes ao sal e sabem tirar proveito da celulose como recurso alimentar. Os *Pseudogymnoascus* ocorrem em diversos ecossistemas e muitas vezes são o grupo de fungos mais comuns encontrados em ambientes frios. Os membros deste gênero são encontrados a partir de solos de campo de trigo na Alemanha e do pergelissolo ártico para os solos da Antártica e estão mesmo associados a macroalgas marinhas antárticas e ecossistemas de mar profundo (HAYES, 2012).

Os fungos de *Pseudogymnoascus* que vivem em ambientes polares de baixo nutriente sobrevivem no solo como propágulos dormentes que crescem e se reproduzem quando a nova matéria orgânica é introduzida no ecossistema. Os fungos encontrados no pergelissolo e nas condições polares também devem ser capazes de sobreviver e reproduzir em ambientes com níveis muito baixos de água biologicamente disponível. Apesar de estarem rodeados por gelo abundante ou pergelissolo, esses fungos são expostos a recursos hídricos que muitas vezes não estão disponíveis para o metabolismo celular quando a água está congelada. As espécies do gênero *Pseudogymnoascus* possuem adaptações fisiológicas que lhes permitem viver de forma produtiva em temperaturas muito frias, quando a água líquida é escassa, e baixas temperaturas ambientes provocam mudanças fisiológicas que promovem a sobrevivência, crescimento e reprodução. Quando exposto a baixas temperaturas, *Geomyces pannorum* eleva os níveis de gorduras não saturadas e outros produtos químicos que possuem propriedades crioprotetoras e, assim, promovem a continuação das células e da função da membrana. Estes fungos também sintetizam glicerol para ajudar a manter o equilíbrio de água celular em condições frias (HAYES, 2012).

Os fungos marinhos podem ser encontrados associados à maioria dos animais marinhos, desde esponjas até vertebrados. Embora exista uma abundante informação sobre os fungos associados aos ecossistemas terrestres, há pouca informação sobre fungos em ecossistemas marinhos e, até recentemente, não havia dados sobre associações de fungos e algas na Antártica. Em um estudo dos fungos associados às espécies de macroalgas da Antártica, os fungos mais comuns isolados foram identificados como *Geomyces pannorum*, o que sugere que esta espécie de *Pseudogymnoascus* pode ter um importante papel de decomposição e nutriente em ecossistemas marinhos frios (HAYES, 2012).

2.6.3. *Cadophora*

O gênero *Cadophora* é um grupo de fungos ascomicetos. A maioria das espécies de *Cadophora* são isoladas principalmente do solo e das plantas, interagindo como patógenos de

plantas, colonizadores de raízes ou saprófitos. As espécies conhecidas de *Cadophora* e seus parentes ocorrem em muitos habitats, como a decomposição de madeira, solo ou plantas (GRAMAJE et al., 2015A). As espécies de *Cadophora* também foram isoladas do solo e da madeira decaída em ambientes extremos, com *C. malorum*, *C. luteo-olivacea* e *C. fastigiata* causando podridão macia de cabanas de madeira na Antártica (TRAVADON et al., 2015).

Cadophora spp. também foram relatados associados a musgos antárticos, uma carcaça de foca mumificada, penas de mandriões e solo da região do Mar de Ross (ARENZ et al., 2006). Estes estudos suportam informações que *Cadophora* spp. estão bem adaptados para prosperar em condições extremas e parecem ser importantes decompositores nesses biomas e que esse grupo prospera em ambientes polares especialmente, quando a madeira está presente como fonte primária de nutrientes (HELD, 2013).

2.6.4. *Cladosporium*

Cladosporium é um gênero de fungos, incluindo alguns dos bolores internos e externos mais comuns. As espécies produzem colônias de verde-oliva a marrom ou negra. Os esporos de *Cladosporium* são dispersos pelo vento e geralmente são extremamente abundantes no ar exterior. Espécies de *Cladosporium* internas podem crescer em superfícies quando a umidade está presente (SCHOCH et al., 2006). O gênero *Cladosporium* spp compreende grande número de fungos dematiáceos com distribuição mundial e que estão entre os fungos de ambiente mais comuns. São frequentemente isolados como contaminantes, no entanto, algumas espécies são patogênicas e toxigênicas para os seres humanos, estando associados a infecções superficiais da pele e dos tecidos moles e incluem sepse disseminada com elevada mortalidade. *Cladoporium* spp são aero-alérgenos e causam graves doenças alérgicas do trato respiratório, bem como lesões intrabrônquicas (MENEZES et al., 2017).

O gênero *Cladosporium* spp, criado por Link, em 1816, é compreende mais de 189 espécies, estando entre os fungos mais comumente isolados do ambiente em quase todo lugar do mundo, podendo ser isolado a partir de praticamente qualquer fonte ambiental e localização geográfica. Muitas espécies são conhecidas por serem patógenos de plantas, causando manchas foliares e outras lesões, ou parasitando outros fungos. As espécies de *Cladosporium* spp são também conhecidos por serem endófitos comuns. Os fungos pertencentes ao gênero *Cladosporium* spp são denominados fungos demácios, mielinizados ou pretos por apresentarem coloração naturalmente acastanhada em decorrência da presença de pigmento melânico em sua parede celular. Este pigmento, além de constituir um elemento fotoprotetor, é considerado um fator de virulência do fungo, uma vez que protege os organismos do estresse ambiental

(exposição a metais pesados, dissecação, condições hiperosmóticas e temperaturas extremas), do antagonismo de outros organismos, da limitação de nutrientes, do choque de pH e contra a radiação ionizante e UV (MENEZES et al., 2017). Fungos do genero *Cladosporium* foram encontrados em solo na Ilha Livingston, Antártica (KOSTADINOVA et al., 2017), no ar (MARSHALL, 1997) e foram isolados de diferentes espécies de musgos da Antártica (TOSI et al., 2002).

2.6.5. *Toxicocladosporium*

O gênero *Toxicocladosporium* atualmente compreende 13 espécies relatadas de diferentes plantas hospedeiras em estudos na América, África, Ásia e Oceania. Semelhante ao *Cladosporium*, *Toxicocladosporium* exibe uma ampla distribuição e a capacidade de colonizar substratos e famílias de plantas distintos. Quase todas as espécies deste gênero foram descritas por espécies de plantas. *Toxicocladosporium irritans* foi encontrado colonizando manuscritos de pergaminho, tintas de tatuagem e tinta mofada, e também foi relatado associado a pacientes com dermatite atópica no Japão, e foi isolado a partir de sangue humano e uma unha nos EUA. Esta espécie também foi relatada em baobás no sul da África, e em equipamentos utilizados na Estação Espacial Internacional ou Ônibus Espacial (BEZERRA et al., 2017).

Também há relatos de outros substratos ou hospedeiros incomuns, incluindo insetos-escama de café no Vietnã, o vetor de leishmaniose visceral no Brasil, uma esponja não identificada da Coreia, pacientes com dermatite seborréica no Japão, amostras de poeira ao ar livre nos EUA, e como patógeno vegetal na azeitona africana na Austrália. As espécies de *Tóxoocladosporium* podem ser recuperadas de substratos discretos e habitats extremos, mostrando falta de preferência ambiental e capacidade de estar associada a materiais incomuns e condições ecológicas (BEZERRA et al., 2017).

2.6.6. *Paraconiothyrium*

Paraconiothyrium é um grupo de fungos ascomycetes que estão presentes nos ambientes terrestres em todo o mundo. Estes fungos são de grande interesse social porque várias espécies são conhecidos patógenos de plantas, agentes de controle biológico, biorremediadores e produtores de metabólitos com capacidades antimicrobianas. *Paraconiothyrium sporulosum* (também conhecido como *Coniothyrium sporulosum* ou *Coniothyrium fuckelii* var. *sporulosum*) tem uma distribuição cosmopolita no solo. Esta espécie foi identificada nos Estados Unidos e no Japão em sistemas de biorremediação passiva que tratam águas metalíferas - esses organismos contribuem para processos de biorremediação promovendo a oxidação de

compostos Mn (II) dissolvidos para minerais Mn (III / IV) insolúveis. Além disso, *P. sporulosum* pode promover a degradação da madeira (ZEINER et al., 2016).

2.6.7. *Phaeoacremonium*

As espécies de *Phaeoacremonium* são freqüentemente isoladas de plantas lenhosas doentes. Outros hospedeiros mais incidentais incluem larvas de besouros, artrópodes e solo. As espécies de *Phaeoacremonium* são encontradas principalmente no ambiente em plantas lenhosas como endófitas ou como agentes de doenças de plantas. As espécies de *Phaeoacremonium* foram isoladas de plantas lenhosas, solo e infecções humanas. A epidemiologia das espécies de *Phaeoacremonium* foi estudada em maior detalhe na videira do que em outras culturas, com o principal objetivo de compreender sua propagação na doença de Petri e nas vinhas afetadas pela esca. Onze espécies de *Phaeoacremonium* foram confirmadas como patógenos humanos causando micoses. As aparas podem ser uma fonte de infecções humanas, que causam cisto ou micetoma, se forem passadas sob a pele. Outras fontes ambientais de *Phaeoacremonium* causadoras de infecções humanas podem ser solo ou ar (GRAMAJE et al., 2015B).

2.6.8. *Pestalotiopsis*

As espécies de *Pestalotiopsis* ocorrem comumente como patógenos das plantas e representam um grupo de fungos conhecido por produzir uma ampla gama de metabólitos diversos quimicamente novos. *Pestalotiopsis* é um gênero assexuado rico em espécies e está amplamente distribuído em regiões tropicais e temperadas. A maioria das espécies no gênero carece de morfologias sexuais, e atualmente apenas 13 morfologias sexuais foram registradas na literatura, que foram previamente tratadas como espécies de *Pestalosphaeria*. As espécies de *Pestalotiopsis* são agentes fitopatogênicos comuns que causam uma variedade de doenças, incluindo lesões de câncer, manchas foliares, clorose grave, podridões de frutos e várias doenças pós-colheita. As espécies de *Pestalotiopsis* também reduzem a produção e causam perda econômica em maçã, mirtilo, coco, castanha, gengibre, videira, goiaba, avelã, lichia, manga, orquídea, pêssego, rambutão, chá e cera, devido à doença. As espécies de *Pestalotiopsis* também são comumente isoladas como endófitas e existem inúmeros relatórios de que estes endófitos produzem novos compostos com aplicações medicinais, agrícolas e industriais. Estima-se que as espécies de *Pestalotiopsis* sejam uma fonte rica de bioprospecção em comparação com outros gêneros fúngicos. Devido à sua capacidade de alternar os modos nutricionais, muitas espécies de *Pestalotiopsis* patogênicas e endofíticas persistem como saprófitos e foram isoladas de folhas mortas, cascas e galhos. Várias espécies foram

recuperadas do solo, águas contaminadas, madeira, papel, tecidos e lã. Algumas espécies foram associadas a infecções humanas e animais e outras também foram isoladas de ambientes extremos (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014).

3. OBJETIVOS

O objetivo geral do projeto é obter metabólitos secundários produzidos por fungos isolados de sedimentos marinhos da Antártica com potencial atividade contra *X. citri* subsp. *citri*, *X. axonopodis* pv. *passiflorae* e *X. vesicatoria*.

4. MATERIAIS E METODOS

4.1. Fungos

Os micro-organismos utilizados neste estudo (53 fungos filamentosos) foram disponibilizados pela Prof.^a Dr.^a Lara Durães Sette (UNESP, Rio Claro) e foram isolados de sedimentos marinhos coletados em diversos locais na Antártica durante a fase IV da OPERANTAR XXXIII (Janeiro de 2015) (Tabela 1, Figura 4) no âmbito do projeto PROANTAR/CNPq intitulado "A vida microbiana na criosfera antártica: mudanças climáticas e bioprospecção - MICROSFERA" sob a coordenação da Profa. Vivian Pellizari (IO/USP). Os micro-organismos fazem parte do acervo de fungos da coleção de pesquisa da Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM- UNESP) onde se encontram preservados por meio de ultracongelamento a -80°C. Os 53 fungos já tiveram seus gêneros identificados pela Prof.^a Dr.^a Lara Durães Sette.

Tabela 1. Dados das amostras de sedimentos marinhos coletadas durante a fase IV da OPERANTAR XXXIII (Janeiro de 2015).

Nome da amostra	Localção	GPS coordenadas (XX°Y.YYYY')	Tipo de amostra	Profundidade (m)	T (°C)
Amostra 2	Botany Point	62° 05.734'S 58° 19.919'W	sedimento marinho	21.7	0.8
				20.4	0.6
				32.0	0.4
				23.4	0.7
				21.4	0.3
Amostra 3	EACF	62° 05.130'S 58° 23.356'W	sedimento marinho	24.0	0.4
				20.3	0.5
				19.4	0.3
Amostra 4	Punta Ullman	62° 05.015'S 58° 20.987'W	sedimento marinho	21.2	0.1
				19.7	0.2
				19.1	0.0
Amostra 5	Refúgio 2 Sed.	62° 04.373'S 58° 25.335'W	sedimento marinho	21.4	0.1
Amostra 6	Ref. 2 entre mares	62° 04.341'S 58° 25.233'W	sedimento marinho na zona entre marés	NaN	2.4

Fonte: Inforsato (2017).

Figura 4. Locais de coleta das amostras, os números representam os pontos de coleta dos sedimentos marinhos citados na tabela 1.



Fonte: Inforsato (2017).

4.2. Linhagens das *Xanthomonas* sp.

As linhagens das bactérias do gênero *Xanthomonas* estudadas no presente projeto são (Tabela 2): *X. citri* subsp. *citri* linhagem selvagem 306, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Henrique Ferreira da UNESP de Rio Claro; *X. euvesicatoria* (isolado IBSBF1387), isolado de pimenta em Brasilândia – MG e *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (isolado LM4a), isolado de

maracujá azedo em Limeira/SP, estes isolados foram gentilmente cedidos pela Prof.^a Dr^a Maria Lúcia Carneiro Vieira da Esalq/USP. Os fitopatógenos foram mantidos em ultrafreezer -80 °C para preservação.

Tabela 2. As linhagens das bactérias do gênero *Xanthomonas* estudados no projeto.

Micro-organismo	Linhagem	Isolado de	Cedido por
<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	306	-	Prof. Dr. Henrique Ferreira (UNESP, Rio Claro)
<i>X. euvesicatoria</i>	IBSBF1387	Pimenta Brasilândia/MG	Prof. ^a Dr ^a Maria Lúcia Carneiro Vieira (Esalq, USP)
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>	LM4a	Maracujá azedo Limeira/SP	Prof. ^a Dr ^a Maria Lúcia Carneiro Vieira (Esalq, USP)

4.3. Obtenção dos extratos brutos

4.3.1. Condições de cultura para fermentação em agitador orbital

Os 53 fungos foram reativados em placas de Petri contendo meio malte sólido (2% extrato de malte, 1,5% ágar) e incubados em B.O.D. à 15°C por um período de aproximadamente 10 dias para crescimento. Discos de 5 mm de ágar com micélio foram transferidos para Erlenmeyer contendo 150 mL do meio malte líquido (2% extrato de malte) e foram mantidos pelo período de 20 dias em agitação constante (150 rpm) a 15°C. Estas condições de crescimento foram determinadas pela Prof.^a Dr.^a Lara Durães Sette.

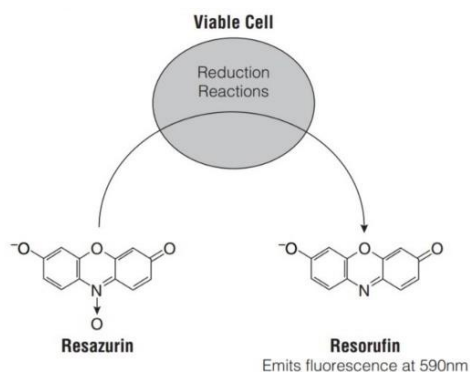
4.3.2. Processamento, extração e armazenamento do extrato bruto

Após o crescimento fúngico, realizado em incubadora rotativa, a biomassa microbiana e o sobrenadante foram separados através de filtração a vácuo. O sobrenadante foi submetido à extração líquido-líquido com acetato de etila para extração de metabólitos secundários extracelulares e a biomassa foi macerada com solvente metanol, para a extração de metabólitos secundários intracelulares. As frações orgânicas (extratos orgânicos) de ambas as extrações (extracelular e intracelular) foram concentradas em um evaporador rotativo, sob pressão reduzida, e depois o solvente residual foi evaporado em um concentrador de amostra.

4.4. Avaliação da atividade contra bactérias fitopatogênicas

A análise de atividade antibacteriana contra as *Xanthomonas* foi realizada pelo método REMA (resazurin microtiter assay), consiste em um ensaio de microtitulação com rezasurina (C₁₂H₇NO₄), um corante que em presença de crescimento bacteriano sofre redução, de azul com baixa fluorescência para coloração rósea e altamente fluorescente (resorufina)(Figura 5). Dessa maneira, quanto menor o crescimento bacteriano menor será a redução da rezasurina em resorufina e conseqüentemente menor a leitura de fluorescência detectada.

Figura 5. Conversão da rezasurina (corante não fluorescente) para a resorufina (corante fluorescente).



Fonte: Promega (2016).

O teste do REMA permite determinar quantitativamente os resultados obtidos via leitura da fluorescência da resorufina, o sinal de fluorescência é monitorado usando comprimentos de onda de excitação 530-560 nm e comprimento de onda de emissão de 590 nm. Os dados de fluorescência emitidos foram transformados em porcentagem de células mortas (inibição de células), calculada com base na média de fluorescência do controle negativo, conforme fórmula:

$$CM = [(CN - AM)/CN] \times 100 \quad (1)$$

onde o CM representa porcentagem de células mortas (inibição de células), CN a média das medidas de fluorescência do controle negativo e AM a medida de fluorescência da amostra.

Os extratos dos fungos filamentosos foram submetidos a bioensaio contra as bactérias *X. citri* subsp. *citri*, *X. euvesicatoria* e *X. axonopodis* pv. *passiflorae* através ensaio de microplaca com resazurina (REMA), conforme descrito na literatura (SILVA, 2013).

Para avaliação da atividade antimicrobiana os extratos brutos secos e pesados foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) 10%. A quantidade de DMSO utilizada foi calculada individualmente de forma que a concentração final dos extratos atingisse valor de 30 mg/ml. Para o controle de veículo foi utilizado 1% de DMSO dissolvido em meio NYG, para controle negativo foi utilizado apenas o meio NYG e para controle positivo foi utilizado antibiótico canamicina na concentração de 20 µg/ml.

Os estoques dos extratos foram diluídos em meio NYG líquido (0,3% extrato de levedura, 0,5% peptona bacteriológica, 2% glicerol) diretamente nos micropoços da placa, contendo a maior concentração dos extratos (3,0 mg/ml) na primeira linha (A), de forma que a concentração de DMSO não ultrapassasse 1% (concentração do controle de veículo), e em seguida foi realizada nas outras linhas a microdiluição seriada das amostras, de modo que a concentração de cada diluição é 2 vezes menor que a concentração na linha acima (linha 1: 3,0

mg/mL, linha 2: 1,5 mg/mL, linha 3: 0,75 mg/mL e assim por diante). Em seguida foi adicionado o inóculo bacteriano (10^7 UFC/mL). Observação: as células bacterianas foram cultivadas em meio NYG líquido a 29°C sob rotação de 200 rpm por 12 horas, até atingir a densidade ótica (DO) de 0,8 (lido no espectrofotometro a 600 nm) que corresponde a 10^8 UFC/mL e fase log do crescimento da bactéria.

As placas foram incubadas a 29°C por aproximadamente 16 horas e em seguida foi adicionada uma solução de resazurina (0.1 mg/mL) para uma nova incubação a 29°C por aproximadamente 1 hora. Após este período foi realizada a medida da fluorescência através do aparelho Biotek Synergy H1MFD leitor de microplacas (comprimento de onda de excitação: 530 nm; comprimento de onda de emissão: 590 nm).

O ensaio foi realizado em triplicata para cada espécie de *Xanthomonas*. Primeiro foi realizado o teste de triagem (Figura 6-A) de todos os extratos, no qual foram testados 16 extratos em uma placa, cada extrato com 4 concentrações diferentes (3 diluições seriadas de primeira concentração de 3,0 mg/mL). Os extratos que tinham inibição de crescimento maior que 90%, foram testados de novo em REMA com diluição seriada completa (Figura 6-B) em que cada extrato tinha 8 concentrações diferentes (7 diluições seriadas feitas da primeira concentração de 3,0 mg/mL).

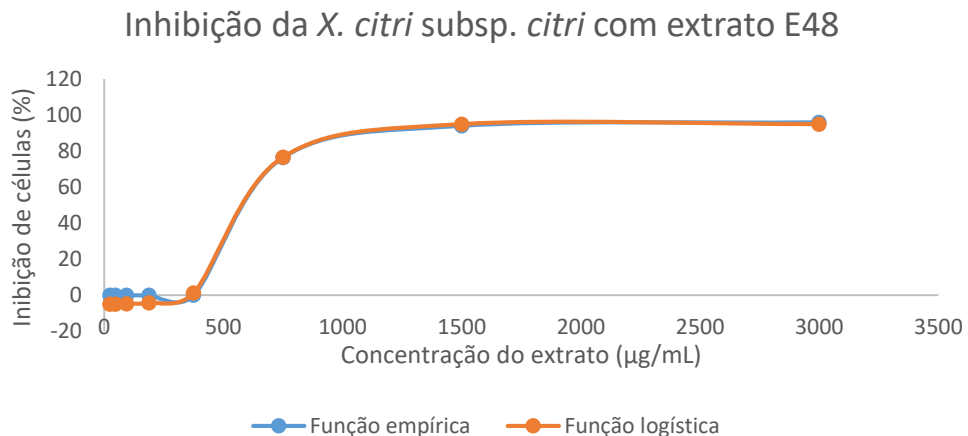
Figura 6. Modelo de placa para triagem dos extratos brutos (A) e REMA com diluição seriada completa (B).



4.5. Concentração mínima inibitória (CMI90)

Os dados de porcentagem inibitória obtidos pelo ensaio de viabilidade celular foram utilizados para a construção de curvas de regressão para cada extrato bioativo. Os valores para CMI90, isto é, a concentração de extrato bruto necessária para a inibição do crescimento de 90% de células bacterianas respectivamente, foi calculada com base no modelo da função logística. A figura 7 apresenta um exemplo de curva de regressão utilizada para cálculo do CMI90 dos extratos.

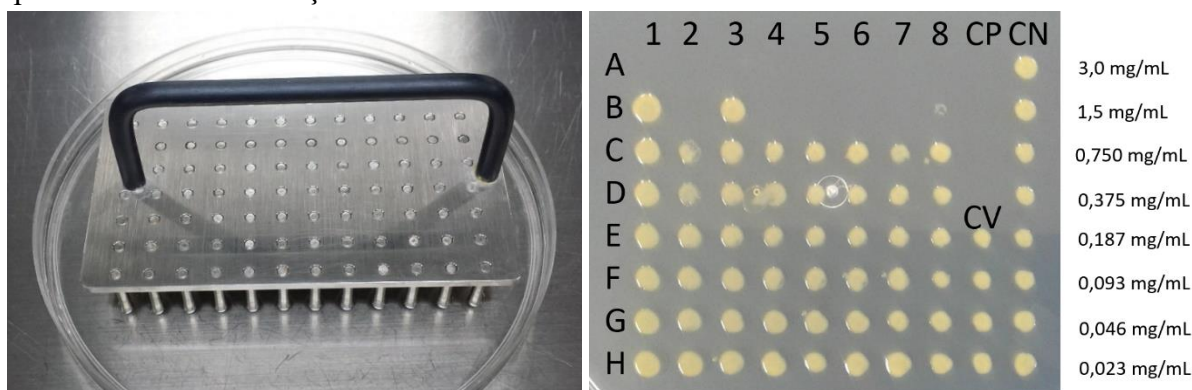
Figura 7. Gráfico para determinação da CMI90 do extrato E48.



4.6. Concentração mínima bactericida (CMB)

O bioensaio de atividade bactericida foi realizado por imersão de um replicador de colônia (Figura 8) nos poços da microplaca de 96 poços ao fazer o teste REMA, contendo os extratos e a bactéria (após a incubação a 29°C por 18h, e antes da adição de resazurina) em placa de Petri (150 x 15 mm) contendo meio NYG sólido (0,3% extrato de levedura, 0,5% peptona bacteriológica, 2% glicerol, 1,5% ágar). As placas foram incubadas por 48 horas a 29°C em estufa bacteriológica. O crescimento bacteriano foi analisado visualmente, e para os extratos, em que não houve o crescimento bacteriano, foi determinada a CMB. O ensaio foi realizado em triplicata em três experimentos independentes para cada espécie de *Xanthomonas*.

Figura 8. Replicador de colônia usado para o teste CMB e crescimento bacteriano em placa após 48 horas da incubação.



4.7. Fracionamento dos extratos bioativos

O processo de fracionamento dos extratos foi conduzido em coluna cromatográfica. A purificação dos extratos foi feita em coluna de Sílica Gel 60 (0,2 à 0,5 mm) e fase móvel utilizando solventes e misturas de solventes: hexano, acetato de etila, metanol e água. A coluna cromatográfica HiPrep Octyl FF 16/10 também foi utilizada no processo de fracionamento dos extratos, com a fase móvel água e metanol. O extrato a ser fracionado foi dissolvido em uma pequena quantidade de solvente (máximo de 500 µL) e depois injetado manualmente com auxílio de um conta-gotas.

A cromatografia em camada delgada (CCD) (TLC Silica gel 60 F₂₅₄ MERCK) foi utilizada como uma forma de acompanhamento do processo de fracionamento. Cada fração coletada na coluna foi aplicada na placa cromatográfica de sílica (4 cm x 2 cm). A CCD foi conduzida utilizando misturas de solventes usados no processo de fracionamento como fase móvel. Após a eluição as placas cromatográficas foram reveladas em UV (comprimento de onda: 254 nm) e em solução reveladora de *p*-anisaldeído (preparada previamente com 5 mL de ácido acético,

465 mL de etanol, 12,5 mL de *p*-anisaldeído e 17,5 mL de ácido sulfúrico), e para revelação dos compostos a placa foi aquecida em chapa quente. Os reveladores ninidrina e orcinol também foram utilizados para revelação dos compostos das placas cromatográficas, mas o *p*-anisaldeído se mostrou o melhor revelador.

5. RESULTADOS E DISCUSÃO

5.1. Produção dos extratos

Após reativação em duplicata, os fungos filamentosos provenientes de sedimentos marinhos da Antártica foram submetidos à crescimento em incubadora rotativa à temperatura de 15°C e 150 rpm por 20 dias. Foram produzidos extratos extracelulares de 53 fungos e extratos intracelulares de 39 fungos.

Os fungos e seus respectivos extratos extracelulares e intracelulares estão apresentados na tabela 4, os fungos foram numerados de 1 a 53 para facilitar a identificação. A tabela 4 apresenta as quantidades de extratos (extra e intracelular) obtidas na fermentação de cada fungo. A média de extratos intracelulares obtida foi de de 122 mg, enquanto que a de extratos extracelulares foi de 24 mg. Para a identificação mais fácil os extratos extracelulares tem um E na frente do número do fungo que o produz, e os extratos intracelulares tem um I na frente do número.

Como a quantidade obtida de alguns extratos foi relativamente baixa para realização de etapas do projeto (principalmente de purificação) e para serem armazenados na extratoteca, vários destes extratos foram e/ou estão sendo produzidos em maior quantidade.

Os extratos que apresentam quantidade suficiente estão armazenados na extratoteca, a qual já está sendo utilizada por outro pesquisador (Prof.^a Dr.^a Leticia Veras Costa Lotufo) para realização de testes antitumorais.

Tabela 4. Códigos e gêneros dos fungos e massas dos extratos extracelulares e intracelulares obtidas na fermentação.

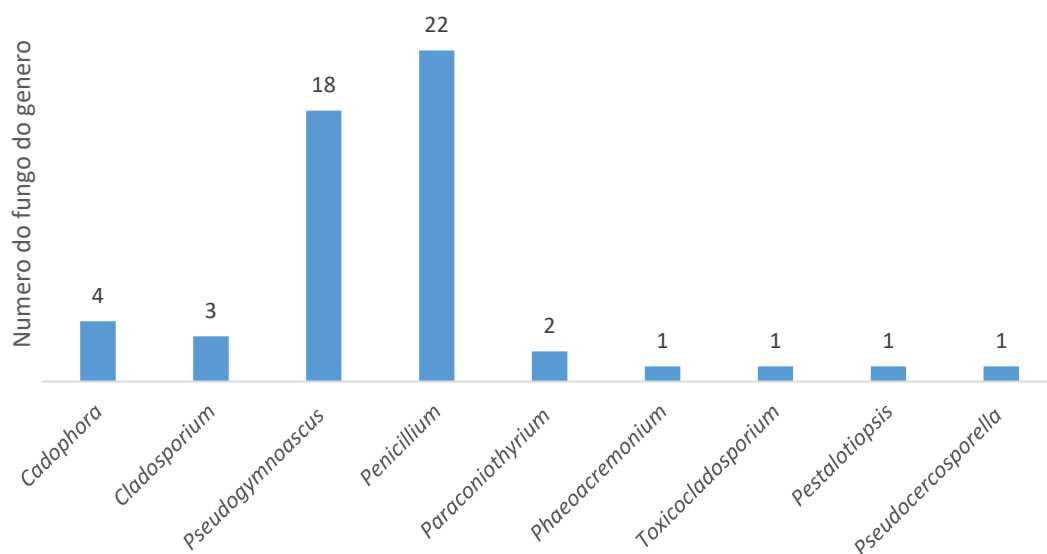
Número	Código do fungo	Gênero	Extrato extracelular	Massa do extrato extracelular* (mg)	Extrato intracelular	Massa do extrato intracelular* (mg)
1	3A-1C415III	<i>Cadophora</i>	E1	14	I1	98
2	4B-1C115III	<i>Cladosporium</i>	E2	18	I2	237
3	2B-1C115III	<i>Pseudogymnoascus</i>	E3	23	I3	224
4	5A-1C315III	<i>Pseudogymnoascus</i>	E4	23	I4	/
5	4A-1C115III	<i>Penicillium</i>	E5	17	I5	117
6	2B-1C115II	<i>Penicillium</i>	E6	16	I6	26
7	5A-1C115II	<i>Paraconiothyrium</i>	E7	10	I7	57
8	5B-1C315IIIA	<i>Penicillium</i>	E8	8	I8	/
9	5A-1C715III	<i>Pseudogymnoascus</i>	E9	7	I9	/
10	3A-1C215IIIP	<i>Penicillium</i>	E10	17	I10	90
11	4A-1C615III	<i>Pseudogymnoascus</i>	E11	33	I11	219
12	4B-1C1II	<i>Penicillium</i>	E12	7	I12	64
13	3A-1C315III	<i>Cadophora</i>	E13	16	I13	84
14	2A-1C115II	<i>Penicillium</i>	E14	13	I14	63
15	2A-1C1III	<i>Pseudogymnoascus</i>	E15	17	I15	62
16	6DC415I	<i>Pseudogymnoascus</i>	E16	29	I16	45
17	5A-1C515II	<i>Penicillium</i>	E17	77	I17	148
18	3A-1C215IIIC	<i>Cadophora</i>	E18	20	I18	130
19	2DC615IA	<i>Pseudogymnoascus</i>	E19	17	I19	118
20	6DC315IA	<i>Pseudogymnoascus</i>	E20	26	I20	94
21	4A-1C315III	<i>Penicillium</i>	E21	10	I21	94
22	6DC4I	<i>Pseudogymnoascus</i>	E22	7	I22	/
23	3D-3C615I	<i>Penicillium</i>	E23	33	I23	159
24	5DC115I	<i>Paraconiothyrium</i>	E24	14	I24	24
25	2DC615IB	<i>Pseudogymnoascus</i>	E25	7	I25	/
26	4D-3C115I	<i>Phaeoacremonium</i>	E26	37	I26	/
27	4DC515I	<i>Penicillium</i>	E27	8	I27	50
28	2D-3C115III	<i>Pseudogymnoascus</i>	E28	30	I28	218

29	5D-3C115II	<i>Toxicocladosporium</i>	E29	6	I29	/
30	6DC215III	<i>Pseudogymnoascus</i>	E30	25	I30	167
31	6DC4III	<i>Pseudogymnoascus</i>	E31	39	I31	130
32	5DC1III	<i>Pseudogymnoascus</i>	E32	9	I32	/
33	5D-3C1II	<i>Pseudocercospora</i>	E33	17	I33	/
34	3A-1C4III	<i>Cadophora</i>	E34	22	I34	113
35	6DC1I	<i>Pseudogymnoascus</i>	E35	9	I34	/
36	2DC1II	<i>Pseudogymnoascus</i>	E36	11	I35	/
37	6DC315IB	<i>Pseudogymnoascus</i>	E37	12	I36	/
38	2DC415III	<i>Penicillium</i>	E38	67	I38	76
39	6DC615I	<i>Penicillium</i>	E39	68	I39	126
40	2DC715III	<i>Penicillium</i>	E40	12	I40	113
41	4D-3C115III	<i>Penicillium</i>	E41	21	I40	/
42	4DC615I	<i>Penicillium</i>	E42	15	I42	72
43	5B-1C315IIIB	<i>Penicillium</i>	E43	9	I43	143
44	3DC615I	<i>Penicillium</i>	E44	11	I44	143
45	5D-3C215II	<i>Penicillium</i>	E45	55	I45	124
46	4DC115II	<i>Penicillium</i>	E46	57	I46	158
47	5DC815I	<i>Penicillium</i>	E47	51	I47	93
48	2D-3C115III	<i>Pseudogymnoascus</i>	E48	12	I48	/
49	2D-3C115II	<i>Penicillium</i>	E49	80	I49	157
50	3D-3C1II	<i>Cladosporium</i>	E50	29	I50	99
51	4D-3C1II	<i>Cladosporium</i>	E51	3	I51	336
52	6DC715I	<i>Penicillium</i>	E52	67	I52	163
53	6D-3C1III	<i>Pestalotiopsis</i>	E53	14	I53	121

* Massa média produzida pelo fungo por 150 mL de meio líquido. (/) Apresenta que nenhum dado foi obtido; (E) Significa extrato extracelular; (I) Significa extrato intracelular. O crescimento dos fungos foi feito em meio malte líquido (150mL) a 15°C e 150 rpm por 20 dias.

Como pode-se observar na tabela 4, os fungos são dos gêneros *Penicillium* (22 fungos) e *Pseudogymnoascus* (18). Outros gêneros incluem *Cadophora* (4), *Cladosporium* (3), *Paraconiothyrium* (2), *Phaeoacremonium* (1), *Toxicocladosporium* (1), *Pestalotiopsis* (1) e *Pseudocercospora* (1). A comparação do número de fungos de cada gênero está apresentada na figura 9.

Figura 9. Gêneros dos fungos usados em obtenção dos extratos brutos.



5.2. Avaliação da atividade antibacteriana

5.2.1. Triagem dos extratos brutos com bioensaio REMA

A triagem dos extratos brutos foi conduzida como descrito em materiais e métodos, de forma que a maior concentração dos extratos foi de 3,0 mg/mL, a partir deste foram realizadas 3 microdiluições seriadas, para poder testar 16 extratos em uma placa de 96 poços.

Como pode ser observado na tabela 5, contra a bactéria *X. citri* subsp. *citri* foram estudados 53 extratos extracelulares, dos quais 32 apresentaram inibição de crescimento acima de 90% na triagem. Contra esta bactéria foram também estudados 37 extratos intracelulares e nenhum deles apresentou inibição de crescimento maior que 90%. Quarenta e oito extratos extracelulares foram testados contra a bactéria *X. euvesicatoria*, dos quais 21 apresentaram inibição positiva (+). Trinta e um extrato intracelular foi testado contra *X. euvesicatoria* mas de novo nenhum deles apresentou inibição de crescimento maior que 90%. Como os extratos intracelulares não apresentaram inibição satisfatória contra *X. citri* subsp. *citri* e *X. euvesicatoria*, eles não foram estudados contra a *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. Contra esta

bactéria foram testados 48 extatos extracelulares e 23 deles deram resultado positivo, ou seja uma inibição de crescimento de bactéria maior que 90%.

Tabela 5. Resultados de trigem (REMA) dos extratos brutos extracelulares e intracelulares contra *Xanthomonas* sp.

Extrato extracelular	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	<i>X. euvesicatoria</i>	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>	Extrato intracelular	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	<i>X. euvesicatoria</i>
E1	-	-	-	I1	-	-
E2	-	-	-	I2	-	-
E3	+	+	+	I3	-	-
E4	+	+	+	I4	/	/
E5	+	+	+	I5	-	-
E6	-	-	-	I6	-	-
E7	+	+	+	I7	-	-
E8	+	+	+	I8	/	/
E9	+	+	+	I9	/	/
E10	+	-	-	I10	-	-
E11	+	-	-	I11	-	-
E12	-	-	-	I12	-	-
E13	+	+	+	I13	-	-
E14	+	+	+	I14	-	-
E15	+	+	+	I15	-	-
E16	+	+	+	I16	-	-
E17	+	-	-	I17	-	-
E18	+	+	+	I18	-	-
E19	+	+	+	I19	-	-
E20	+	-	-	I20	-	-
E21	-	+	+	I21	-	-
E22	-	-	-	I22	/	/
E23	-	-	-	I23	-	-
E24	-	-	+	I24	-	-
E25	-	-	-	I25	/	/
E26	+	-	-	I26	/	/
E27	+	-	-	I27	-	-
E28	+	+	+	I28	-	-

E29	+	+	+	I29	/	/
E30	-	+	+	I30	-	-
E31	+	+	+	I31	-	-
E32	+	+	+	I32	/	/
E33	+	/	/	I33	/	/
E34	-	-	-	I34	-	-
E35	-	/	/	I35	/	/
E36	-	/	/	I36	/	/
E37	-	/	/	I37	/	/
E38	-	-	-	I38	-	-
E39	-	-	-	I39	-	-
E40	+	+	+	I40	-	-
E41	+	-	-	I41	/	/
E42	+	-	-	I42	-	-
E43	+	+	+	I43	-	-
E44	+	-	+	I44	-	-
E45	+	-	-	I45	-	/
E46	-	-	-	I46	-	/
E47	-	-	-	I47	-	/
E48	+	+	+	I48	/	/
E49	-	-	-	I49	/	/
E50	+	-	-	I50	-	/
E51	-	-	-	I51	-	/
E52	+	-	-	I52	-	/
E53	-	/	/	I53	/	/

(+) Significa que o extrato apresentou inibição de crescimento da bactéria maior que 90%; (-) Significa que o extrato apresentou inibição de crescimento da bactéria menor que 90%; (/) Significa que nenhum dado foi obtido. A triagem foi feita em triplicata.

5.2.2. Ensaio antibacteriano com a diluição seriada completa

Os extratos positivos contra as espécies de *Xanthomonas* do estudo de triagem foram submetidos ao bioensaio de REMA com diluição seriada completa, na qual se utilizou 8 concentrações diferentes para cada extrato. A tabela 6 apresenta os resultados de REMA com a diluição seriada completa contra *X. citri* subsp. *citri*, *X. euvesicatoria* e *X. axonopodis* pv. *passiflorae*.

No bioensaio de REMA com a diluição seriada completa dos 32 extratos extracelulares bioativos na triagem contra *X. citri* subsp. *citri*, apenas 19 extratos apresentaram inibição de crescimento maior que 90%, E10, E11, E17, E26, E27, E31, E33, E41, E41, E43, E45, E50 e E52 não apresentaram mas atividade contra a bactéria. Para a *X. euvesicatoria* de 21 extratos testados, 19 continuaram a apresentar inibição de crescimento satisfatória, E31, E33 e E43 não apresentaram mais atividade. Já para a *X. axonopodis* pv. *passiflorae* dos 22 extratos testados apenas o extrato E33 não deu resultado positivo.

Comparando os extratos que apresentaram inibição de crescimento maior que 90% na REMA com a diluição seriada completa (Tabela 6, Figura 10), pode-se verificar que a maioria dos extratos (18 de 22 extratos) foram bioativos contra as três *Xanthomonas*. Os extratos E24 e E31 apresentaram resultados positivos apenas contra a *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. O extrato E43 foi ativo contra *X. axonopodis* pv. *passiflorae* e *X. euvesicatoria*, *citri* e o extrato E44 apresentou atividade contra *X. axonopodis* pv. *passiflorae* e *X. citri* subsp. *citri*.

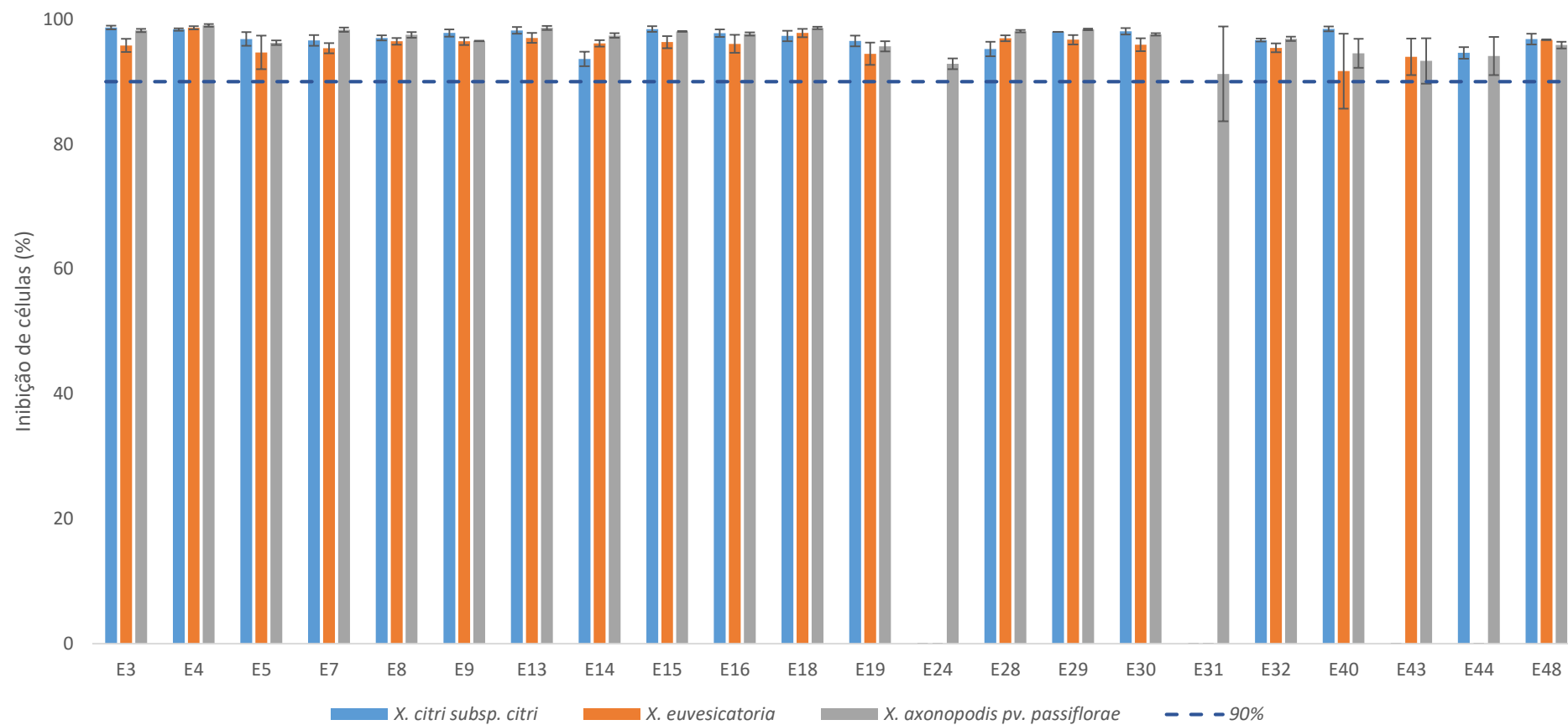
Além disso, é possível verificar na tabela 6 que o extrato E3 apresentou a maior inibição de crescimento (98,69%) contra a bactéria *X. citri* subsp. *citri* e o extrato E4 apresentou a maior inibição de crescimento bacteriano contra *X. euvesicatoria* e *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (98,64 e 99,04% respectivamente).

Tabela 6. Resultados de inibição de crescimento obtidos com ensaio REMA de diluição seriada completa, calculada concentração mínima inibitória (CMI90) e concentração mínima bactericida (CMB) para *Xanthomonas* sp.

Extrato	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>			<i>X. euvesicatoria</i>			<i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>			Gênero do fungo
	Inibição de células (%)	CMI90 (mg/mL)	CMB (mg/mL)	Inibição de células (%)	CMI90 (mg/mL)	CMB (mg/mL)	Inibição de células (%)	CMI90 (mg/mL)	CMB (mg/mL)	
E3	98,69	2,65	1,50	95,82	2,56	3,00	98,23	2,61	3,00	<i>Pseudogymnoascus</i>
E4	98,38	0,71	1,50	98,64	0,66	0,75	99,04	0,58	0,75	<i>Pseudogymnoascus</i>
E5	96,84	2,96	3,00	94,70	2,76	3,00	96,24	2,34	3,00	<i>Penicillium</i>
E7	96,63	1,21	1,50	95,38	2,80	3,00	98,35	0,86	1,50	<i>Paraconiothyrium</i>
E8	97,01	1,83	3,00	96,48	2,49	3,00	97,50	1,53	3,00	<i>Penicillium</i>
E9	97,81	1,19	1,50	96,49	1,44	1,50	96,53	1,21	1,50	<i>Pseudogymnoascus</i>
E13	98,23	1,19	1,50	97,03	1,52	3,00	98,62	1,38	1,50	<i>Cadophora</i>
E14	93,65	1,72	3,00	96,14	1,18	1,50	97,40	1,01	1,50	<i>Penicillium</i>
E15	98,44	1,24	1,50	96,35	1,72	3,00	98,05	1,47	1,50	<i>Pseudogymnoascus</i>
E16	97,78	2,39	3,00	96,08	2,35	3,00	97,65	2,23	3,00	<i>Pseudogymnoascus</i>
E18	97,34	2,02	3,00	97,81	1,40	3,00	98,62	1,23	1,50	<i>Cadophora</i>
E19	96,54	2,43	3,00	94,49	2,30	3,00	95,66	2,76	3,00	<i>Pseudogymnoascus</i>
E24	/	/	/	/	/	/	92,88	1,28	3,00	<i>Paraconiothyrium</i>
E28	95,25	2,12	3,00	96,98	1,95	3,00	98,09	1,25	3,00	<i>Pseudogymnoascus</i>
E29	98,01	1,63	1,50	96,74	1,34	1,50	98,39	1,28	3,00	<i>Toxicocladosporium</i>
E30	98,08	1,99	3,00	95,93	2,05	3,00	97,58	2,17	3,00	<i>Pseudogymnoascus</i>
E31	/	/	/	/	/	/	91,26	2,81	3,00	<i>Pseudogymnoascus</i>
E32	96,68	1,72	3,00	95,43	1,34	3,00	96,87	1,61	3,00	<i>Pseudogymnoascus</i>
E40	98,48	1,19	3,00	91,71	2,56	3,00	94,55	2,36	3,00	<i>Penicillium</i>
E43	/	/	/	94,01	2,32	3,00	93,33	2,48	3,00	<i>Penicillium</i>
E44	94,63	2,52	3,00	/	/	/	94,12	2,84	3,00	<i>Penicillium</i>
E48	96,85	1,63	3,00	96,72	1,79	3,00	95,87	2,34	3,00	<i>Pseudogymnoascus</i>

(/) Significa que não tem dados. Todos os ensaios foram feitos em triplicata. Os resultados na tabela são de extratos da concentração 3,0 mg/mL.

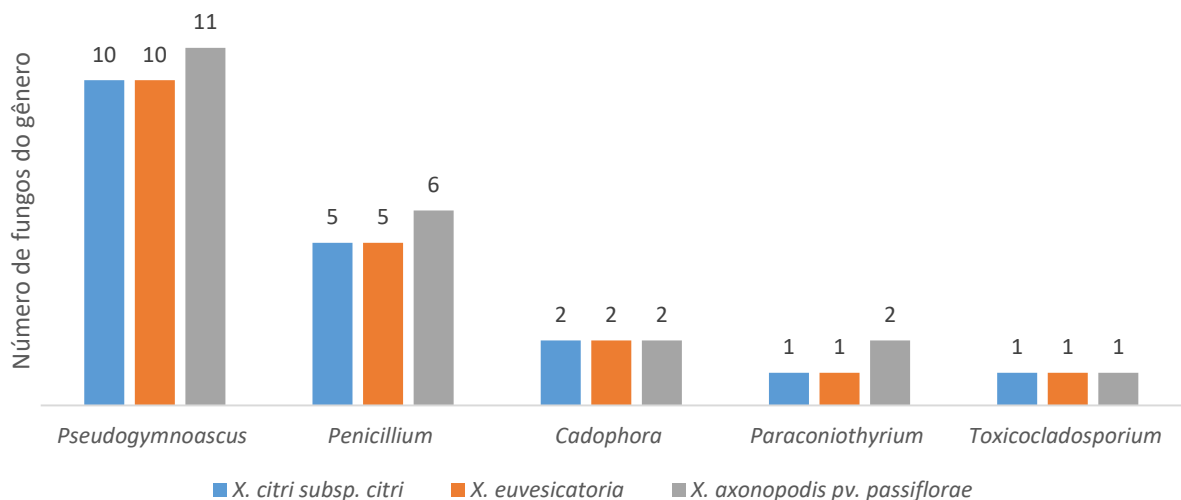
Figura 10. Gráfico de resultados de inibição de crescimento obtidos com ensaio REMA de diluição seriada completa para *Xanthomonas* sp.



O gráfico representa mesmos dados da inibição como a tabela anterior.

Ainda comparando os resultados na tabela 6, pode-se ver que os fungos que produzem extratos com atividade antibacteriana contra *X. citri* subsp. *citri* são dos gêneros *Pseudogymnoascus*, *Penicillium*, *Cadophora* e *Toxicocladosporium*. Os números de fungos, de cada gênero, que produziram extratos bioativos são apresentados na figura 11. A maioria dos extratos ativos foi produzida por fungos do gênero *Pseudogymnoascus* (E3, E4, E9, E15, E16, E19, E28, E30, E31, E32, E48). Os extratos E5, E8, E14, E40, E43 e E44 são produzidos por fungos do gênero *Penicillium*, os extratos E13 e E18 por fungo do gênero *Cadophora*, os extratos E7 e E24 por fungo do gênero *Paraconiothyrium* e o extrato E29 por fungo do gênero *Toxicocladosporium*.

Figura 11. Gêneros dos fungos produtores de extratos bioativos.



No estudo realizado por Idris (2006) metabólitos produzidos por *Penicillium* sp. foram encontrados para suprimir o crescimento de *X. campestris* pv. *malvacearum* (bactéria causadora da mancha bacteriana de algodão) e *X. campestris* pv. *euvesicatoria* (causadora da mancha bacteriana do tomate). De acordo com Rampelotto (2016) fungos dos gêneros *Geomyces* (*Pseudogymnoascus*) e *Penicillium*, isolados de esponjas marinhas da Antártica, exibiram atividade antibacteriana contra *X. campestris*. Henríquez et al (2014) descobriram que *Geomyces* sp. isolados do solo antártico e *Geomyces panorum* isolado do solo antártico e estruturas de madeira na Península Antártica, bem como *Penicillium commune* e *Penicillium polonicum* da Antártica mostram atividade antimicrobiana contra *X. campestris*.

Não foram encontrados outros estudos de atividade antibacteriana de fungos dos gêneros *Penicillium*, *Pseudogymnoascus*, *Cadophora* e *Toxicocladosporium* contra as bactérias de gênero *Xanthomonas*, principalmente contra a *X. citri* subsp. *citri* e *X. euvesicatoria*, mostrando a grande carência de estudos realizados nesta área.

5.3. Concentração Mínima Inibitória (CMI90) dos extratos bioativos

A partir dos dados de porcentagem de inibição, obtidos nos bioensaios de REMA com diluição seriada completa, foram traçadas curvas de regressão para cada extrato. Com base nas equações obtidas das curvas de regressão, foi calculada a concentração mínima inibitória, de cada extrato bioativo, para inibir o crescimento de 90% das células bacterianas (CMI90). A tabela 6 apresenta os valores de CMI90 dos extratos bioativos contra as *X. citri* subsp. *citri*, *X. euvesicatoria* e *X. axonopodis* pv. *passiflorae*.

Para a *X. citri* subsp. *citri* a maioria (11/19) dos extratos apresentaram CMI90 entre 1 e 2 mg/mL (E7, E8, E9, E13, E14, E15, E29, E30, E32, E40, E48), 7 de 19 extratos apresentaram CMI90 > 2 mg/mL (E3, E5, E16, E18, E19, E28, E44) e só um extrato apresentou CMI90 < 1 mg/mL (E4).

Para a *X. euvesicatoria* o mesmo número (9/19) dos extratos apresentaram CMI90 > 2 mg/mL (E3, E5, E7, E8, E16, E19, E30, E40, E43) e CMI90 entre 1 e 2 mg/mL (E9, E13, E14, E15, E18, E28, E29, E32, E48) e só um extrato apresentou CMI90 < 1 mg/mL (E4).

Para a *X. axonopodis* pv. *passiflorae* o mesmo número (10/22) dos extratos apresentaram CMI90 > 2 mg/mL (E3, E5, E16, E19, E30, E31, E40, E43, E44, E48) e CMI90 entre 1 e 2 mg/mL (E8, E9, E13, E14, E15, E18, E24, E28, E29, E32) e dois extratos apresentaram CMI90 < 1 mg/mL (E4, E7).

Dos extratos extracelulares testados contra *X. citri* subsp. *citri* o extrato E4, produzido pelo fungo do gênero *Pseudogymnoascus*, apresentou as menores CMI90 para todas as três bactérias (CMI90 de 0,71 mg/mL para *X. citri* subsp. *Citri*; 0,66 mg/mL para *X. euvesicatoria* e 0,58 mg/mL para *X. axonopodis* pv. *Passiflorae*).

5.4. Avaliação da Concentração Mínima Bactericida (CMB) dos extratos bioativos.

Os extratos bioativos foram submetidos à avaliação da atividade bactericida, sendo que para as amostras que apresentaram esta atividade foi determinada a concentração bactericida mínima (CMB).

De acordo com os dados obtidos na avaliação da atividade bactericida contra as *Xanthomonas* spp., as concentração nas quais os extratos apresentaram uma inibição celular maior que 90%, também mostraram ação bactericida nos bioensaios.

Como pode ser observado na Tabela 6 para a *X. citri* subsp. *citri* a maioria (12/19) dos extratos apresentaram CMB de 3,0 mg/mL e 7 de 19 extratos apresentaram CMB de 1,5 mg/mL (E3, E4, E7, E9, E13, E15, E29).

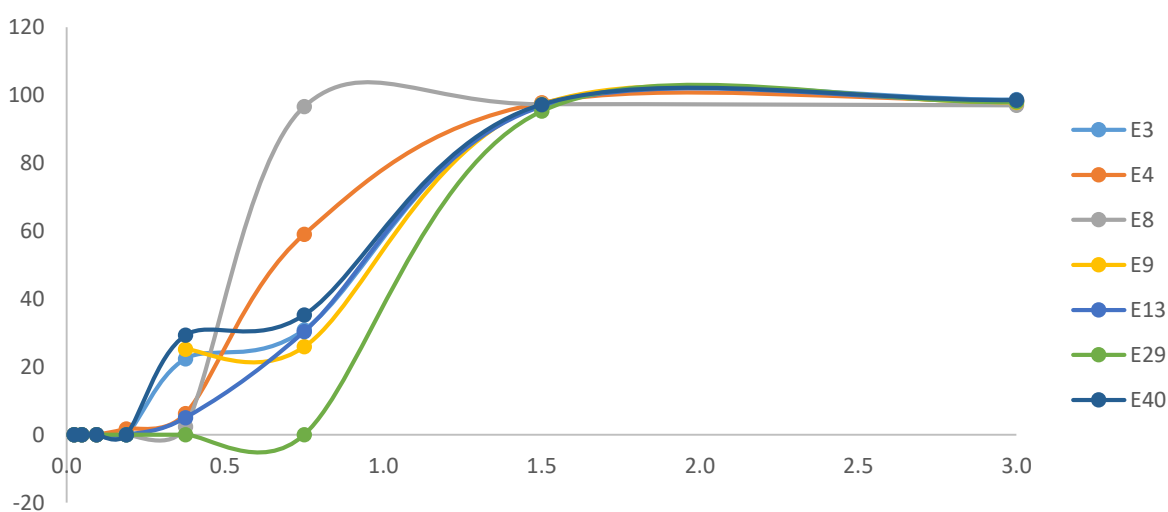
Para a *X. euvesicatoria* a maioria (15/19) dos extratos apresentaram CMB de 3,0 mg/mL, 3 extratos apresentaram CMB de 1,5 mg/mL (E9, E14, E29) e so 1 extrato apresentou CMB de 0,75 mg/mL (E4). Para a *X. axonopodis* pv. *passiflorae* a maioria (15/22) dos extratos apresentaram CMB de 3,0 mg/mL, 6 extratos apresentaram CMB de 1,5 mg/mL (E7, E9, E13, E14, E15, E18) e so 1 extrato apresentou CMB de 0,75 mg/mL (E4).

Com base nesses resultados, podemos concluir que o extrato E4 apresentou as melhores características bactericidas, visto que ele foi o único extrato que apresentou CMB de 0,75 mg/mL contra *X. euvesicatoria* e *X. axonopodis* pv. *passiflorae* e 1,5mg/mL contra *X. citri* subsp. *citri*.

5.5. Relação dose-resposta

Todos os gráficos de relação dose-resposta dos extratos bioativos estão representados em anexo. Para melhor comparação das curvas dose-resposta, as melhores curvas para cada espécie de *Xanthomonas* foram traçadas juntas em um gráfico. Na figura 12 estão representadas as curvas dose-resposta para *X. citri* subsp. *citri*, que são as curvas dos extratos E3, E4, E8, E9, E13, E29 e E40. O extrato E4 apresenta a melhor curva dose resposta, tendo um decaimento de resposta diretamente relacionado à diminuição da dose do extrato. Os extratos E40, E3 e E9 também apresentam uma resposta à dose consideravelmente boa. Já os extratos E8, E29 e E40 apresentam um decaimento de resposta muito pronunciado com relação à diminuição da concentração.

Figura 12. Grafico mostrando as melhores curvas dose-resposta para *X. citri* subsp. *citri*.



Desta maneira foi possível concluir que a melhor relação dose-resposta des todos os extratos bioativos foi observada para o extrato E4 contra as três bactérias *X. euvesicatoria* e *X. axonopodis* pv. *passiflorae* e *X. citri* subsp. *citri*.

5.6. Fracionamento dos extratos bioativos

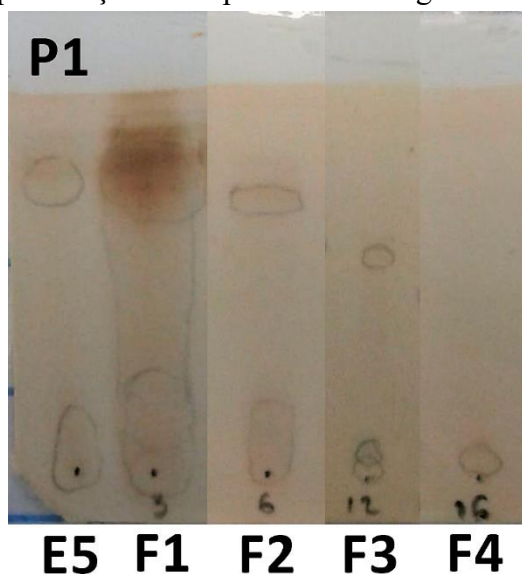
A purificação dos extratos foi realizada apenas para o extrato E5. O extrato E5 foi escolhido para a purificação porque ele foi um dos primeiros extratos testados que mostraram boa inibição de crescimento e também porque este extrato apresentou uma quantidade satisfatória para ser submetido à purificação. Para cada purificação, o fungo 5 (um *Penicillium* com código 4A-1C115III) foi submetido à fermentação em incubadora rotativa para obter a massa do extrato extracelular suficiente para fazer o fracionamento.

5.6.1. Purificação 1

Primeiramente o extrato E5 (120 mg) foi purificado em coluna cromatográfica de 5 mL. Para tal utilizou-se Sílica Gel 60 como fase estacionária e fase móvel gradiente, sendo inicialmente acetato de etila-metanol (8:2), metanol e por fim a metanol-ácido acético (19:1).

A coleta das frações foi realizada a cada 500 μ L, e obteve-se um total de 34 frações até o volume total de extratos ter passado pela coluna. As frações obtidas foram analisadas em placas cromatográficas de sílica com mistura de solventes acetato de etila e metanol (8:2) como fase móvel (cromatografia de camada delgada CCD) e foram agrupadas por similaridade química (Figura 15).

Figura 15. As frações da purificação 1 nas placas cromatográficas de sílica.



Ao final as frações passaram por um processo de secagem para remoção dos solventes e foram pesadas. Os dados da purificação do extrato E5 podem ser observados na tabela 7, onde P1 significa purificação 1, e F significa fração. A massa de fração purificada P1F1 obtida ao final do processo com a coluna de sílica foi satisfatória (56.0 mg/fração reunida). A massa de frações P1F2, P1F3 e P1F4 purificadas obtidas ao final do processo com a coluna de sílica foi baixa (< 10 mg/fração reunida), em geral o processo de purificação teve uma recuperação dos composto em torno de 66%.

Tabela 7. Dados da purificação 1 do extrato E5 e do bioensaio antibacteriano das frações.

Fração	Massa (mg)	Concentração testada (mg/mL)	Inibição (%)
P1F1	56,0	3,0	0,00
P1F2	8,1	3,0	0,00
P1F3	9,9	3,0	0,00
P1F4	6,1	3,0	0,00

As frações obtidas foram testadas com REMA contra *X. citri* subsp. *citri* e os resultados são mostrados na tabela 7. Nenhuma das 4 frações mostrou atividade antibacteriana. O extrato E5 que foi submetido para purificação não foi testado com REMA antes de se realizar a purificação, e por isto é possível que o extrato tivesse uma atividade antibacteriana baixa antes de ser purificado, fazendo com que as frações purificadas não mostrassem atividade. Outra causa poderia ser a presença de sinergia de compostos que se perdeu quando os compostos foram separados.

5.6.2. Purificação 2

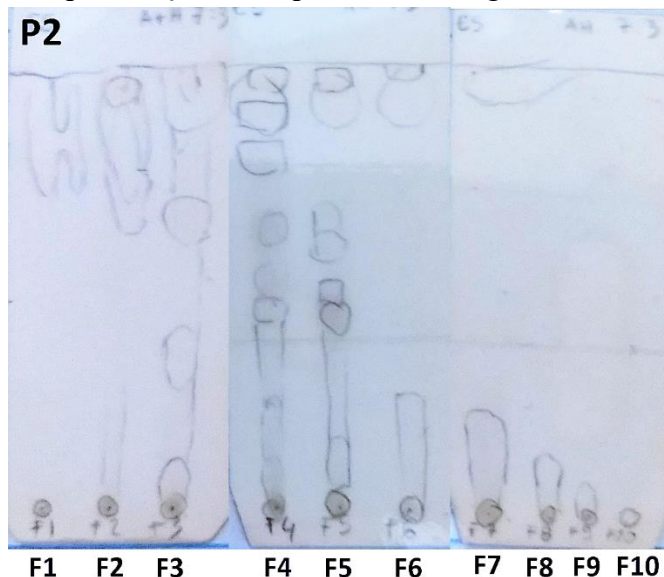
O extrato E5 (246,4 mg) foi purificado segunda vez em coluna cromatográfica de sílica de 25 mL. Entretanto, neste caso antes de ser submetido a fracionamento o extrato foi submetido ao bioensaio para confirmação da atividade antibacteriana. A atividade antibacteriana do extrato antes da purificação foi 96,84% na concentração máxima testada.

Na coluna cromatográfica utilizou-se Sílica Gel 60 como fase estacionária e fase móvel gradiente (a fase móvel inicialmente foi uma mistura de hexano e cetato de etila (7:3), depois acetato de etila e metanol (8:2), metanol 100%, mistura de metanol e água (1:1) e por fim só água).

A coleta das frações foi realizada a cada 500 - 1500 µL, e obteve-se um total de 715 frações até o volume total de extratos ter passado pela coluna. As frações obtidas foram

analisadas em placas cromatográficas de sílica com mistura de acetato de etila e hexano (7:3) como fase móvel e foram agrupadas por similaridade química (figura 16).

Figura 16. As frações da purificação 2 nas placas cromatográficas de sílica.



No final foram obtidas 10 frações, as quais foram secadas e testadas contra *Xanthomonas* spp. Os dados da purificação 2 (P2) do extrato E5 e das porcentagens da inibição de crescimento bacteriano podem ser observados na tabela 8.

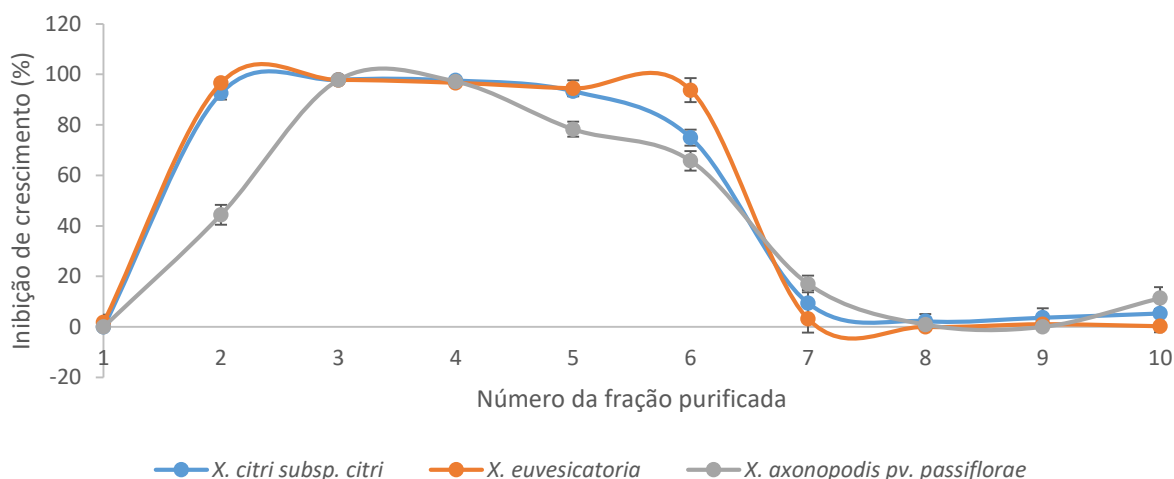
Tabela 8. Dados da purificação 2 do extrato E5 e do bioensaio antibacteriano das frações.

Fração	Massa (mg)	Concentração testada (mg/mL)	Inibição (%)		
			<i>X. citri subsp. citri</i>	<i>X. euvesicatoria</i>	<i>X. axonopodis pv. passiflorae</i>
P2F1	17,4	3,0	0,00	1,76	0,00
P2F2	13,8	3,0	92,60	96,64	44,43
P2F3	5,8	3,0	97,85	97,78	97,77
P2F4	20,9	3,0	97,61	96,64	97,14
P2F5	29,2	3,0	93,36	94,43	78,24
P2F6	72,3	3,0	74,95	93,73	65,75
P2F7	18,4	3,0	9,42	3,18	17,06
P2F9	40,1	3,0	2,26	0,00	0,90
P2F9	15,7	3,0	3,65	1,08	0,00
P2F10	5,4	3,0	5,32	0,28	11,36

A soma das massas das frações é 239 mg que significa que o processo de purificação teve uma recuperação dos compostos em torno de 97%. A fração F6 tinha a maior massa (72,3 mg) e as frações F3 e F10 tinham a menor massa (5,8 e 5,4 respectivamente).

Como é possível observar na tabela 8 as frações F2, F3, F3, F5, e F6 apresentaram as melhores atividades contra as *Xanthomonas* spp, fato que pode ser observado também na figura 17.

Figura 17. Grafico mostrando a inibição de crescimento pelas frações obtidas na purificação 2.



Contra *X. citri subsp. citri* a inibição foi melhor com frações F2, F3, F4 e F5 (entre 92,60 e 97,85%). Frações F2-F6 tiveram os melhores resultados contra *X. euvesicatoria* (inibição entre 93,73 e 97,78%). Contra *X. axonopodis pv. passiflorae* as melhores frações foram F3 e F4 (97,77 e 97,14 respectivamente).

A fração F3 mostrou a melhor inibição de crescimento contra as três bactérias (97,85% para *X. citri subsp. citri*, 97,78% para *X. euvesicatoria* e 97,77% para *X. axonopodis pv. passiflorae*). Esta fração foi enviada para ser caracterizada pelo aparelho de cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (USP campus Ribeirão Preto).

6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentre os 90 extratos testados 32 extratos extracelulares apresentaram atividade inibitória significativa (maior que 90%) contra *X. citri* subsp. *citri* causadora do cancro cítrico em frutas cítricas. Destes 32 extratos, 19 apresentaram uma inibição maior que 90% no bioensaio de diluição seriada completa. O extrato E3 (provindo de fungo 2B-1C115III do gênero *Pseudogymnoascus*) apresentou a maior inibição de crescimento contra *X. citri* subsp. *citri*, entretanto e o extrato E4 (provindo de fungo 5A-1C315III do gênero *Pseudogymnoascus*) apresentou a menor CMI90 e CMB para esta bactéria.

No caso da *X. euvesicatoria* 21 extratos extracelulares de 79 extratos testados, apresentaram atividade inibitória significativa contra a bactéria. Destes 21 extratos, 19 apresentaram uma inibição maior que 90% no bioensaio de diluição seriada completa. O extrato E4 (*Pseudogymnoascus* sp.) apresentou a maior inibição do crescimento bacteriano e a menor CMI90 e CMB contra *X. euvesicatoria*.

Dentre os 48 extratos testados contra *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, 22 apresentaram uma inibição maior que 90% no bioensaio de diluição seriada completa. O extrato E4 (*Pseudogymnoascus* sp.) apresentou a maior inibição do crescimento bacteriano e a menor CMI90 e CMB contra *X. axonopodis* pv. *passiflorae*.

De 22 extratos 18 apresentaram atividade antibacteriana contra todas as 3 espécies de *Xanthomonas*. Todos os extratos tinham ação bactericida (CMB) em concentração menor que 3,0 mg/mL.

Os fungos do gênero *Pseudogymnoascus* foram os que produziram maior quantidade de extratos bioativos contra as espécies *Xanthomonas* avaliadas, resultado interessante visto que não há relatos na literatura da ação destes fungos contra estas espécies de *Xanthomonas*.

7. REFERÊNCIAS

ABNEUF, M.A., KRISHNAN, A., ARAVENA, M.G., PANG, K.L., CONVEY, P., FAUZI, N.M., IDID, M.R., ALIAS, S.A. Antimicrobial activity of microfungi from maritime Antarctic soil. *Czech polar reports*, v. 6, p. 141-154, 2016.

ANDRADE, F.H.A., ARAÚJO, C.S.P., BATISTA, W.F., QUEIROGA NETO, J.A., DANTAS, E.E.M., ANDRADE, R., Comportamento da cultura do pimentão submetido a diferentes níveis de salinidade. *Biofarm*, v. 12, n. 3, p. 1-10, 2016.

APOLINÁRIO, A.R., SILVA, M.E., FERRARI, M.C., Viabilidade de produção de tomate (*Solanum lycopersicum*) safra 2017/2018 em sistema de cultivo protegido de 1000 m², *V Jornacitec*, v. 5, p. 1-6, 2016.

APS, The American Phytopathological Society. Disponível em:
<<https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/prokaryotes/Pages/BacterialSpotPort.aspx>>
Acesso em: Dezembro 2017.

ARENZ, B.E., HELD, B.W., JURGENS, J.A., FARRELL, R.L., BLANCHETTE, R.A. Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross Sea Region of Antarctica. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 38, p. 3057–3064, 2006.

BEZERRA, J.D.P., SANDOVAL-DENIS, M., PAIVA, L.M., SILVA, G.A., GROENEWALD, J.Z., SOUZA-MOTTA, C.M., CROUS, P.W. New endophytic *Toxicocladosporium* species from cacti in Brazil, and description of *Neocladosporium* gen. *IMA Fungus*, v. 8(1), p. 77–97, 2017.

CAMARGO FILHO, W.P., CAMARGO, F.P., Evolução das cadeias produtivas de tomate industrial e para mesa no Brasil, 1990-2016, *Informações Econômicas*, v. 47, n. 1, p. 50-59, 2017.

CARVALHO, J.L., PAGLIUCA, L.G., Tomate, um mercado que não para de crescer globalmente. *Hortifruti Brasil*, v. 58, p. 6-14, 2007.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M., JESUS, O.N., OLIVEIRA, E.J., SANTOS, E.S.L. AND SOUZA, A.P., Characterization and selection of passion fruit (yellow and purple) accessions based on molecular markers and disease reactions for use in breeding programs. *Euphytica*, v. 202, p. 345–359, 2015.

DUTTA, B., GITAITIS, R., SANDERS, H., BOOTH, C., SMITH, S., LANGSTON, D. B., Jr. Role of blossom colonization in pepper seed infestation by *Xanthomonas euvesicatoria*. *Phytopathology*, v. 104, p. 232-239, 2014.

ENCHEVA-MALINOVA M, STOYANOVA M, AVRAMOVA H, PAVLOVA Y, GOCHEVA B, IVANOVA I, MONCHEVA P. Antibacterial potential of streptomycete strains from Antarctic soils. *Biotechnol. Biotec. Eq.* v. 28, p. 721-727, 2014.

ENCHEVA-MALINOVA, M., VANCHEVA, T., BADZHINEROV, N., KOLEVA, V., TISHKOV, S., BOGATZEVSKA, N., MONCHEVA, P. Antimicrobial activity of Antarctic streptomycetes against pepper bacterial spot causing agents. *First National Conference of Biotechnology - Sofia*. v. 100, p. 216-222, 2015.

FUNDECITRUS, Fundo de defesa da agricultura, 2017. Disponível em:

<<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro/7>> Acesso em: Dezembro 2017.

FURBINO, L.E., GODINHO, V.M., SANTIAGO, I.F., PELLIZARI, F.M., ALVES, T.M.A., ZANI, C.L., JUNIOR, P.A.S., ROMANHA, A.J., CARVALHO, A.G.O., GIL, L.H.V.G., ROSA, C.A., MINNIS, A.M., ROSA, L.H. Diversity Patterns, Ecology and Biological Activities of Fungal Communities Associated with the Endemic Macroalgae Across the Antarctic Peninsula. *Microbial Ecology*. v. 67, p. 775-787, 2014.

GIUDICE, A.L. e FANI R. Antimicrobial Potential of Cold-Adapted Bacteria and Fungi from Polar Regions, In *Biotechnology of Extremophiles: Grand Challenges in Biology and Biotechnology* ed. Rampelotto P. p. 83-115. Cham: Springer, 2016.

GONÇALVES, V.N., CARVALHO, C.R., JOHANN, S., MENDES, G., ALVES, T.M.A., ZANI, C.L., JUNIOR, P.A.S., MURTA, S.M.F., ROMANHA, A.J., CANTRELL, C.L., ROSA, C.A., ROSA, L.H. Antibacterial, antifungal and antiprotozoal activities of fungal communities present in different substrates from Antarctica. *Polar Biol*. v. 38, p. 1143-1152, 2015.

GRAMAJE, D., MOSTERT, L., ARMENGOL, J. *Cadophora viticola*, sp. nov. *Fungal Planet* v. 360, p. 242-243, 2015A.

GRAMAJE, D., MOSTERT, L., GROENEWALD, J.Z., CROUS, P.W. *Phaeoacremonium*: From esca disease to phaeohyphomycosis. *Fungal Biology*, v. 119(9), p. 759-783, 2015B.

HAYES, M. A. The *Geomyces* Fungi: Ecology and Distribution. *BioScience*, v. 62(9), p. 819-823, 2012.

HELD, B.W., Diversity and Characterization of Wood Decay Fungi From Historic Wood in Antarctica, 99 f. Dissertação de doutorado, Universidade de Minnesota, 2013.

HENRÍQUEZ, M., VERGARA, K., NORAMBUENA, J., BEIZA, A., MAZA, F., UBILLA, P., ARAYA, I., CHÁVEZ, R., SAN-MARTÍN, A., DARIAS, J., DARIAS, M.J., VACA, I. Diversity of cultivable fungi associated with Antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial, antitumoral and antioxidant potential. *World J Microbiol Biotechnol*, v. 30, p. 65-76, 2014.

IDRIS, K.E., AHMED, N.E., ABDELRAHMAN, E.E., OSMAN, N.A., Effects of Penicillium metabolites on *Xanthomonas* spp. and *Staphylococcus aureus*, *Gezira journal of agricultural science*, 2006.

INFORSATO, F.J. Fungos de sedimentos marinhos da Antártica: diversidade e prospecção de enzimas. 134 f. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2017.

ISHIDA, A.K.N., HALFELD-VIEIRA, B.A. *Mancha-Bacteriana do Maracujazeiro (Xanthomonas axonopodis pv. passiflorae): Etiologia e Estratégias de Controle*, Versão Eletrônica Embrapa, p. 12-15, 1a edição, 2009.

JONES, J.B., LACY, G.H., BOUZAR, H., STALL, R.E. e SCHAAD, N.W. Reclassification of the Xanthomonads Associated with Bacterial Spot Disease of Tomato and Pepper, *System. Appl. Microbiol*. v. 27, p. 755-762, 2004.

KOSTADINOVA, N., KRUMOVA, E., TOSI, S., PASHOVA, ANGELOVA, M. Isolation and Identification of Filamentous Fungi from Island Livingston, Antarctica. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, v. 23, p. 267-270, 2009.

KUNG'U, J. *Penicillium*. Disponível em:

< <https://www.moldbacteria.com/mold/penicillium.html> > Acesso em: Dezembro 2017.

MAHARACHCHIKUMBURA, S.S.N., HYDE, K.D., GROENEWALD, J.Z., XU, J., CROUS, P.W. *Pestalotiopsis* revisited. *Studies in mycology*, v. 79, p. 121–186, 2014.

MALDONADO, V., Pimentão: o cultivo do pimentão, *Cultivar Hortaliças e Frutas*, v. 1, n. 5, p. 23-25, 2001.

MARSHALL, W.A. Seasonality in antarctic airborne fungal spores. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 63(6), p. 2240-2245, 1997.

MENEZES, C.P. PÉREZ, A.L.A.L., LIMA E.O. *Cladosporium* spp: Morfologia, infecções e espécies patogênicas. *Acta Brasiliensis*, v.1(1), p. 23-27, 2017.

MONCHEVA P, TISHKOV S, DIMITROVA N, CHIPEVA V, NIKOLOVA AS, BOGATZEVSKA N. Characteristics of soil actinomycetes from Antarctica. *Journal of Culture Collections*. v. 3, p. 3-14, 2002.

MULLER, E. *Pseudogymnoascus alpinus*, nov. spec. *Sydowia*, v. 35, p. 135-137, 1982.

MUNHOZ, C.F., SANTOS, A.A., ARENHART, R.A., SANTINI, L., MONTEIRO-VITORELLO, C.B., VIEIRA, M.L.C. Analysis of plant gene expression during passion fruit–*Xanthomonas axonopodis* interaction implicates lipooxygenase 2 in host defence. *Ann Appl Biol.* v. 167, p. 135–155, 2015.

NASCIMENTO, A.R., FERNADES, P.M., BORGES, L.L., PONTES, N.C., QUEZADO-DUVAL, A.M. Controle Químico da Mancha Bacteriana em Mudanças de Tomate Para Processamento Industrial. *Biosci. J.* v. 29. p. 1878-1879, 2013.

NASCIMENTO, R.S.M., LOPES, E.A., MAGALHÃES, V.M.B.S., CARDOSO, J.A., SANTOS, C.E.M., ANTUNES, R.O. Host status of passion fruit genotypes to scab and bacterial blight. *Ciências Agrárias*, v. 37(6), p. 4005-4010, 2016.

OLIVEIRA, A.G., MURATE, L.S., SPAGO, F.R., LOPES, L.P., BERANGER, J.P.O., SAN MARTIN, J.A.B., NOGUEIRA, M.A., MELLO, J.C.P., ANDRADE, C.G.T.J., ANDRADE, G. Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. *Biological Control*. v. 56, p.125–131, 2011.

PROMEGA, Promega Corporation, CellTiter-Blue® Cell Viability Assay. Disponível em: < <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/celltiter-blue-cell-viability-assay-protocol.pdf?la=en> > Acesso em: Dezembro 2017.

POTNIS, N., TIMILSINA, S., STRAYER, A., SHANTHARAJ, D., BARAK, J.D., PARET, M.L., VALLAD, G.E. JONES, J.B. Bacterial spot of tomato and pepper: diverse *Xanthomonas* species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge. *Mol Plant Pathol*, v. 16, p. 907–920, 2015.

RAMPELOTTO, P.H., *Biotechnology of Extremophiles: Advances and Challenges*, Springer, p. 101-106, 2016.

RITCHIE, D.F. Bacterial spot of pepper and tomato. *The Plant Health Instructor*, 2000. Disponível em:

<<https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/prokaryotes/Pages/Bacterialspt.aspx>>

Acesso em: Dezembro 2017.

RYAN, R.P., VORHÖLTER, F.J., POTNIS, N., JONES, J.B., SLUYS, V., BOGDANOVA, A.J., DOW, J.M. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. *Nature Reviews Microbiology*. v. 9, p. 344-355, 2011.

SANCHES, A.L.R., DE MIRANDA, S.H.G., BELASQUE JUNIOR, J., BASSANEZI, R.B. Análise Econômica da Prevenção e Controle do Cancro Cítrico no Estado de São Paulo. *Econ. Sociol. Rural*. v. 52, p. 549-566, 2014.

SCHOCH, C.L., SHOEMAKER, R.A., SEIFERT, K.A. HAMBLETON, S., SPATAFORA, J.W., CROUS, P.W. A multigene phylogeny of the *Dothideomycetes* using four nuclear loci *Mycologia*, v. 98 (6), p. 1041–52, 2006.

SILBER J, OHLENDORF B, LABES A, ERHARD A, IMHOFF JF. Calcarides A–E, Antibacterial Macrocyclic and Linear Polyesters from a *Calcarisporium* Strain. *Mar. Drugs*, v. 11, p. 3309-3323, 2013.

SILVA, I.C., FERREIRA, H. Drug Sensitivity Assay of *Xanthomonas citri* subsp. *Citri* Using REMA Plate Method. *Bio-protocol*. v. 3, p. 1-4, 2013.

SOUSA, R.L., Doses de Ca e K na produção de pimentão fertirrigado em ambiente protegido, 17 f., Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2017.

SPAGO, F.R., ISHII MAURO, C.S., OLIVEIRA, A.G., BERANGER, J.P.O., CELY, M.V.T., STANGANELLI, M.M., SIMIONATO, A.S., MELLO, J.C.P., ANDRADE, G. *Pseudomonas aeruginosa* produces secondary metabolites that have biological activity against plant pathogenic *Xanthomonas* species. *Crop Protection*. v. 62, p. 46-54, 2014.

SVAHN, K.S., CHRYSANTHOU, E., OLSEN, B., BOHLIN, L., GÖRANSSON, U. *Penicillium nalgioense* Laxa isolated from Antarctica is a new source of the antifungal metabolite amphotericin B, *Fungal Biology and Biotechnology*. v. 2, p. 1-8, 2015.

TIAN, Y., LI, Y.L., ZHAO, F.C. Secondary Metabolites from Polar Organisms, *Mar. Drugs* v. 15, p. 28, 2017.

TONUCCI-ZANARDO, N.M., PASCHOLATI, S.F. AND DI PIERO, R.M. *In vitro* antimicrobial activity of aqueous extracts from *Lentinula edodes* isolates against *Colletotrichum sublineolum* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. *Summa phytopathol*, v. 41, p. 13-20. 2015.

TOSI, S., CASADO, B., GERDOL, R., CARETTA, G. Fungi isolated from Antarctic mosses. *Polar Biology*, V. 25(4), p. 262–268, 2002.

TRAVADON, R., LAWRENCE, D.P., ROONEY-LATHAM, S., Gubler, W.D., WILCOX, W.F., ROLSHAUSEN, P.E., BAUMGARTNER, K. *Cadophora* species associated with wood-decay of grapevine in North America. *Fungal Biology*, v. 119 (1), p. 53-66, 2015.

VIANA, F.M.P., FREIRE, F.C.O., CARDOSO, J.E., VIDAL, J.C., *Principais Doenças do Maracujazeiro na Região Nordeste e seu Controle*, Comunicado técnico Embrapa, Fortaleza, CE, 2003.

VIANA, F.M.P., FREIRE, F.C.O., PARENTE, G.B. *Controle das Principais Doenças do Pimentão Cultivado nas Regiões Serranas do Estado do Ceará*, Comunicado técnico Embrapa, Fortaleza, CE, 2007.

VINCENT, W.F., Evolutionary origins of Antarctic microbiota: invasion, selection and endemism. *Antarct. Sci.* v. 12, p. 374-385, 2000.

ZEINER, C.A., PURVINE, S.O., ZINK, E.M., PASA-TOLIC, L., CHAPUT, D.L., HARIDAS, S., WU, S., LABUTTI, K., GRIGORIEV, I.V., HENRISSAT, B., SANTELLI, C.M., HANSEL, C.M. Comparative Analysis of Secretome Profiles of Manganese(II)-Oxidizing Ascomycete Fungi. *PLoS One*. v. 11(7), 2016.

ANEXO

Gráficos dose-resposta para *Xanthomonas* spp.