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

**FUNGOS ISOLADOS DA ANTÁRTICA COM ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA A FITOPATÓGENOS**

JULIANO HENRIQUE FERRAREZI

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

Rio Claro
2019

JULIANO HENRIQUE FERRAREZI

**FUNGOS ISOLADOS DA ANTÁRTICA COM ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA A FITOPATÓGENOS**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daiane Cristina Sass

Rio Claro
2019

F374f Ferrarezi, Juliano Henrique
Fungos isolados da Antártica com atividade antibacteriana a fitopatógenos / Juliano Henrique Ferrarezi. -- Rio Claro, 2019
56 f. : il., tabs., fotos, mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Daiane Cristina Sass

1. Biotecnologia. 2. Fitopatologias. 3. Metabólitos. 4. Fungos Antárticos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: FUNGOS ISOLADOS DO SOLO DA ANTÁRTICA: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CONTRA BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS

AUTOR: JULIANO HENRIQUE FERRAREZI

ORIENTADORA: DAIANE CRISTINA SASS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), área: Microbiologia Aplicada pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. DAIANE CRISTINA SASS

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / UNESP - Instituto de Biociências de Rio Claro - SP

Prof. Dr. BEN-HUR MATTIUZ

Departamento de Tecnologia / UNESP - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Jaboticabal / SP



Profa. Dra. PATRÍCIA GIOVANELLA GRAZZIOTIN

Pós Doutoranda do Departamento de Bioquímica e Microbiologia / UNESP - Instituto de Biociências de Rio Claro - SP

Rio Claro, 21 de fevereiro de 2019

Título alterado para: "Fungos isolados da Antártica com atividade antibacteriana a fitopatógenos"

Agradecimento

Agradeço à minha família pelo total apoio a mim. Em especial a meus pais, Rita e Valdecir, e meu irmão João Vitor.

A todos os amigos e amigas que conheci nestes dois anos, bem como amigos de longa data que conviveram estes dois anos comigo. Obrigado pelos momentos de descontração e por me apoiarem e darem suporte nos momentos mais complicados.

À Professora Doutora Daiane Cristina Sass por todo seu empenho, paciência, atenção e dedicação total a nosso laboratório.

Aos Professores Doutores Lara Durães Sette e Henrique Ferreira por cederem gentilmente os micro-organismos fundamentais para este trabalho ser realizado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro concedido através do processo 2015/206296.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Estou entre aqueles que acham que a ciência tem uma grande beleza”

Marie Curie

“Construímos muros de mais e pontes de menos”

Isaac Newton

*“Tempos difíceis nos aguardam e em breve teremos que escolher
entre o que é certo e o que é fácil”*

Albus Dumbledore (J.K. Rowling)

RESUMO

As bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas* são capazes de atingir diversos cultivares de interesse comercial, causando anualmente perdas severas na produção. Um exemplo deste gênero é a *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, causadora do cancro cítrico em diversas espécies de citros. O controle desta doença atualmente conta com o uso de quebra-ventos, erradicação de plantas contaminadas e desinfecção de equipamentos, embora o modo mais eficiente seja o uso de produtos químicos a base de cobre. Outra bactéria pertencente ao mesmo gênero é a *X. albilineans*, causadora da escaldadura-das-folhas na cana-de-açúcar. O controle dessa doença ainda é pouco efetivo, sendo aconselhada a desinfecção de equipamentos e mudas. Pensando no problema fitossanitário relacionado a essas bactérias e nos efeitos negativos associados aos produtos químicos à base de metais pesados, torna-se indispensável a busca por compostos naturais capazes de controlar estas doenças e que possam ser menos nocivos ao ambiente. Neste contexto, micro-organismos de ambientes extremos podem produzir metabólitos secundários ainda desconhecidos. Assim, o objetivo deste trabalho foi obter extratos brutos de fungos filamentosos isolados do solo antártico e avaliar seu potencial de bioatividade contra *X. citri* e *X. albilineans* através de ensaios de viabilidade celular. Foram testados 122 extratos contra ambas as bactérias. Nove destes extratos inibiram de forma satisfatória (>90%) o crescimento celular de *X. citri* e dois extratos apresentaram inibição satisfatória para *X. albilineans*. A partir destes dados foi determinada a concentração mínima de cada extrato para a atividade bactericida e para inibição de 90% das células das culturas. O extrato bioativo de B-FE (*Pseudogymnoascus*) foi fracionado por cromatografia em coluna normal e HPLC. As frações obtidas foram testadas e embora ainda não tenha sido possível purificar completamente os compostos bioativos, estas frações mostraram resultados promissores. Assim, com este trabalho foi possível verificar que os fungos antárticos podem se tornar uma alternativa viável no controle às bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas*.

Palavras-chave: Cancro cítrico. Escaldadura-das-folhas. Antártica. Atividade antimicrobiana. Extratos naturais.

ABSTRACT

Phytopathogenic bacteria of the genus *Xanthomonas* able of attain several cultivars of commercial interest, causing yearly severe production losses. An example of bacterium of this genus is *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, which causes citrus canker in various species of citrus. The control of this disease currently counts on the use of windbreaks, eradication of contaminated plants and disinfection of equipment, although the most efficient way is the use of copper-based chemicals. Another bacterium belonging to the same genus is *X. albilineans*, which causes leaf scald in sugarcane. The control of this disease is still not very effective, being advised the disinfection of equipment and seedlings. Thinking about the phytosanitary problem related to these bacteria and the negative effects associated with heavy metal chemicals, it is essential to search for natural compounds capable of controlling these diseases and that are less harmful to the environment. In this sense, microorganisms from extreme environments can produce secondary metabolites that are still unknown. Thus, the aim of this work was to obtain crude extracts of filamentous fungi isolated from the Antarctic soil and to evaluate their bioactivity potential against *X. citri* and *X. albilineans* through cell viability assays. In total, 122 extracts were tested against both bacteria. Nine of the 122 extracts inhibited satisfactorily (>90%) the cell growth of *X. citri* and two of the 122 extracts showed satisfactory inhibition against *X. albilineans*. The minimum bactericidal concentration of each extract was determined, as well the minimum concentration that inhibited 90% of cell growth. The positive extract from B-FE (*Pseudogymnoascus*) was fractionated by normal column chromatography and HPLC. The fractions obtained were tested and they showed promising results, although the compounds were not completely purified. Thus, we can conclude that Antarctic fungi may become a viable alternative in the fight against phytopathogenic bacteria of the genus *Xanthomonas*.

Keywords: Citrus canker. Leaf Scald. Antarctic. Antimicrobial activity. Natural extracts.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Triagem da bioatividade dos extratos brutos contra <i>X. citri</i>	31
Tabela 2. Concentração inibitória mínima dos extratos para inibição celular de 90%.	34
Tabela 3. Antibióticos contra <i>X. albilineans</i>	38
Tabela 4. Triagem qualitativa da bioatividade dos extratos brutos contra <i>X. albilineans</i>	38
Tabela 5. Concentração Inibitória Mínima dos extratos para inibição celular de 90%.....	40
Tabela 6. Valores médios de inibição do crescimento bacteriano das frações em 1,6 mg/mL.	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção de laranja em nível mundial (2013).	13
Figura 2. Principais estados produtores de laranja no Brasil, 2017.....	14
Figura 3. Produção de cana-de-açúcar em nível mundial, 2014.....	15
Figura 4. Principais estados produtores de cana-de-açúcar no Brasil, 2018.	16
Figura 5. <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> e <i>Xanthomonas albilineans</i>	17
Figura 6. Lesão causada pelo cancro cítrico.....	18
Figura 7. Percentual de árvores com sintomas do cancro cítrico no Cinturão Citrícola, 2018.	19
Figura 8. Sintoma da escaldadura-das-folhas em sua forma crônica	21
Figura 9. Mapa de Ilhas pertencentes à Antártica marítima.	24
Figura 10. Solo de coleta abaixo de barra de ferro enferrujada (Ilha Deception).	24
Figura 11. Solos de coleta da Ilha de King George.	25
Figura 12. Resazurina em processo de redução a resorufina.....	28
Figura 13. Replicador de colônias para placas de 96 pinos.....	30
Figura 14. Dose resposta dos extratos contra <i>X. citri</i>	33
Figura 15. Bioensaio de Concentração Bactericida Mínima (CBM) contra <i>X. citri</i>	35
Figura 16. Curva comparativa de crescimento de <i>X. albilineans</i> nos meios NYG, SB, NBY, YSG e NB.....	36
Figura 17. Concentração de células viáveis de <i>X. albilineans</i> em YSG.....	37
Figura 18. Dose resposta dos extratos contra <i>X. albilineans</i>	40
Figura 19. Bioensaio bactericida contra <i>X. albilineans</i>	41
Figura 20. Análise em Cromatografia de Coluna Delgada (CCD).....	43
Figura 21. Cromatograma da fração bioativa FII em CLAE.....	44
Figura 22. Dose resposta: frações contra <i>X. citri</i>	44

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I

Figura 23. Fungos bioativos	52
-----------------------------------	----

ANEXO II

Figura 24. Dose resposta: extrato extracelular 2-FE.	53
Figura 25. Dose resposta: extrato extracelular 3.1-FE.	53
Figura 26. Dose resposta: extrato extracelular 6-FE.	53
Figura 27. Dose resposta: extrato extracelular 11-FE.	54
Figura 28. Dose resposta: extrato extracelular B-FE.....	54
Figura 29. Dose resposta: extrato extracelular C-FE.....	54
Figura 30. Dose resposta: extrato extracelular D-FE.	55
Figura 31. Dose resposta: extrato extracelular G-FE.	55
Figura 32. Dose resposta: extrato intracelular 3'_4.0.	55
Figura 33. Dose resposta: extrato extracelular K_4.0	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	As culturas de citros e de cana-de-açúcar.....	13
2.1.1	Citros	13
2.1.2	Cana-de-Açúcar	14
2.2	<i>Xanthomonas</i> sp.....	16
2.2.1	Cancro cítrico nos pomares.....	17
2.2.2	Escaldadura-das-folhas nos canaviais	20
2.3	Biotecnologia a serviço da agricultura	21
3	OBJETIVO.....	23
3.1	Objetivos específicos.....	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1	Fungos	23
4.2	Linhagens de <i>Xanthomonas</i> sp.....	25
4.3	Obtenção dos extratos brutos.....	25
4.3.1	Condições de cultura para crescimento em incubadora com agitação	25
4.3.2	Processamento, extração e armazenamento dos extratos brutos	26
4.4	Avaliação da atividade antibacteriana	26
4.4.1	REMA completo em <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	26
4.4.2	REMA completo em <i>X. albilineans</i>	28
4.5	Concentração Bactericida Mínima (CBM)	29
4.6	Fracionamento dos extratos bioativos.....	30
4.7	Tratamento e Descarte de Resíduos da Pesquisa	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	31
5.1.1	Triagem dos extratos brutos	31
5.1.2	REMA completo com os extratos brutos positivos	32
5.1.3	Concentração Inibitória Mínima CIM90 dos extratos bioativos	34
5.1.4	Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos bioativos.....	34
5.2	<i>Xanthomonas albilineans</i>	35
5.2.1	Adaptação do protocolo REMA.....	35
5.2.2	Triagem dos extratos brutos	38
5.2.3	REMA completo com os extratos brutos positivos	39

5.2.4	Concentração Mínima Inibitória (CIM90) dos extratos bioativos	40
5.2.5	Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos bioativos.....	41
5.3	Identificação dos fungos produtores de extratos bioativos	41
5.4	Fracionamento do extrato bioativo B-FE (<i>Pseudogymnoascus</i>)	42
6	CONCLUSÃO.....	45
	REFERÊNCIAS.....	46
	ANEXO I	52
	ANEXO II	53

1 INTRODUÇÃO

Todos os anos diversas plantações ao redor do mundo sofrem perdas em suas produções devido a doenças de origens fúngicas, bacterianas e virais. As bactérias do gênero *Xanthomonas* aparecem como responsável por grande parte dessa perda. O gênero compreende 27 espécies e atinge cerca de 400 espécies vegetais (RYAN *et al.*, 2011), muitas delas de interesse econômico como: feijão, morango, citros, pimentão, tomate, mandioca, cana-de-açúcar, maracujá, entre outras.

Nos últimos anos o Brasil produziu cerca de 400 milhões de toneladas de laranja e mais de 700 milhões de toneladas de cana-de-açúcar (IBGE, 2017), mantendo-se como maior produtor destas culturas a nível mundial. Assim, torna-se essencial o controle de doenças que possam diminuir a produtividade destas culturas. Como exemplo há o cancro cítrico em culturas de citros e a escaldadura-das-folhas na cana-de-açúcar, doenças causadas pelas bactérias *X. citri* subsp. *citri* e *X. albilineans*, respectivamente.

O controle destas doenças inclui medidas como a desinfecção de equipamentos, mudas e sementes, uso de quebra ventos e, especificamente no controle ao cancro cítrico, uso de produtos químicos de base cúprica. O cobre é um metal pesado, sendo assim, é considerado tóxico e pode se acumular em tecidos e ser passado através da cadeia trófica. Dessa forma, é de extrema importância a busca por novos meios de controlar dessas doenças, de formas mais eficazes e menos danosas ao ambiente.

Neste sentido, pesquisas apontam para a bioprospecção de ambientes com condições extremas como fonte de novos micro-organismos e possíveis novos compostos naturais (PIKUTA *et al.*, 2007). Compostos naturais, em geral, apresentam maior variedade entre si, além de terem uma meia vida menor quando comparado a compostos sintéticos (DAYAN, 2009).

A bioatividade de compostos obtidos de micro-organismos antárticos vem sendo testada e os resultados se mostram promissores no controle de outros micro-organismos (FURBINO *et al.*, 2014). Recentemente, extratos brutos de fungos antárticos mostraram capacidade de controle no crescimento bacteriano de outras espécies de *Xanthomonas* (PURIC *et al.*, 2018) VIEIRA *et al.*, 2018). Os principais gêneros identificados dentre os fungos bioativos contra *Xanthomonas* foram *Pseudogymnoascus* e *Penicillium*.

Assim, o presente trabalho avaliou fungos filamentosos do ambiente antártico capazes de produzir extratos brutos bioativos contra *X. citri* e *X. albilineans*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

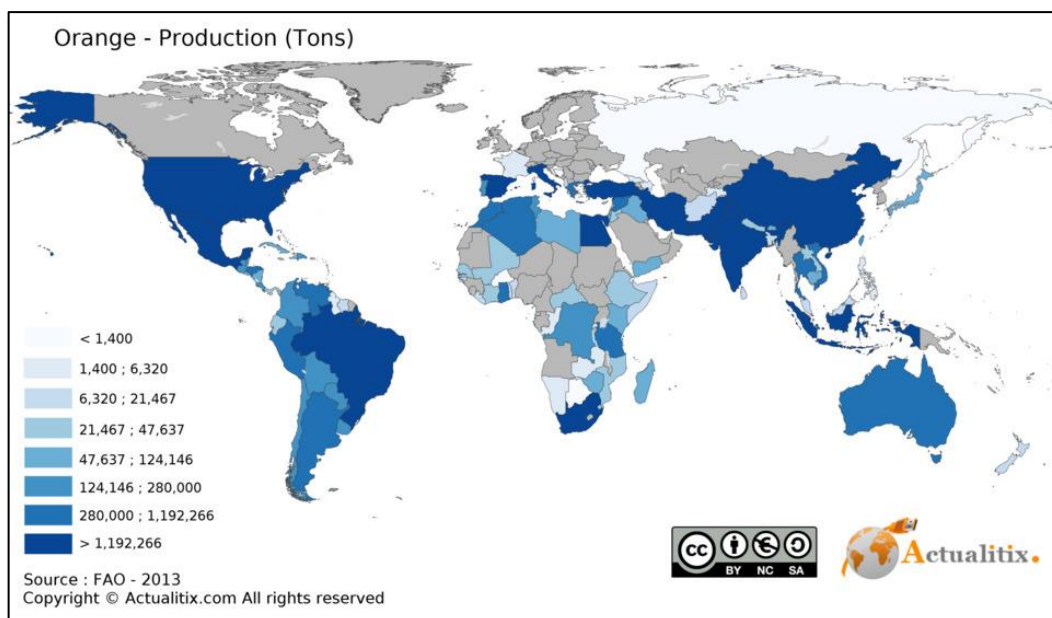
2.1 As culturas de citros e de cana-de-açúcar

Desde a última década o setor agrícola brasileiro encontra-se em crescimento e apresenta extrema importância para a economia nacional como um todo, sendo o Brasil um dos maiores produtores do mundo no setor agrícola, perdendo apenas para a Europa e para os Estados Unidos (COSTA *et al.*, 2013). Para Scolari (2007) a participação do Brasil no mercado mundial do agronegócio, principalmente nas exportações, ainda é reduzida e tende a crescer, podendo se transformar de fato no “celeiro do mundo”.

2.1.1 Citros

Os citros compreendem diversas variedades de limões, tangerinas, limas e principalmente laranjas. O grande desenvolvimento agrícola aliado a condições climáticas favoráveis fez com que o Brasil assumisse o posto de um dos maiores produtores de laranja em nível mundial (Figura 1), (AMORIM, 2015), colhendo atualmente mais de 600 mil hectares ao ano (IBGE, 2018). Segundo dados do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) a safra brasileira 2017/2018 de laranja foi de cerca de 398 milhões de caixas, uma média de 16 milhões de toneladas da fruta.

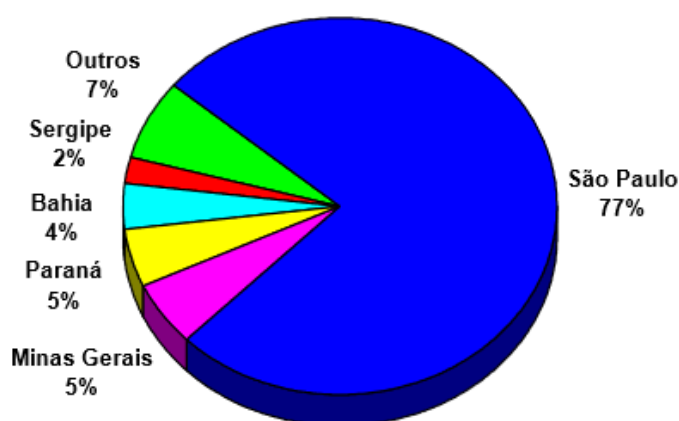
Figura 1. Produção de laranja em nível mundial (2013).



(Fonte: Actualitix e FAO 2013. Disponível em: <https://en.actualitix.com/country/wld/orange-producing-countries.php> Acesso em: 13 nov. 2018)

A região sudeste é um constante destaque na citricultura brasileira, com participação de quase 83% na produção (IBGE, 2017). Nesta região, destaca-se o estado de São Paulo, responsável por 77% da produção nacional de 2017 (Embrapa 2017; IBGE, 2018), como apresentado na Figura 2. Esta produção equivale a quase de 14 milhões de toneladas de laranja, em cerca de 400 mil hectares (IBGE, 2017). Segundo o Anuário da Citricultura (NEVES e TROMBIN, 2017), a produção de citros no Brasil é responsável por cerca de 200 mil empregos (diretos e indiretos), gerando um PIB de US\$ 6,5 bilhões em sua cadeia produtiva.

Figura 2. Principais estados produtores de laranja no Brasil, 2017.



(Fonte: Base de dados da Embrapa, 2017. Disponível em http://www.cnpmf.embrapa.br/Base_de_Dados/index_pdf/dados/brasil/laranja/b1_laranja.pdf Acesso em: 13 nov. 2018).

2.1.2 Cana-de-Açúcar

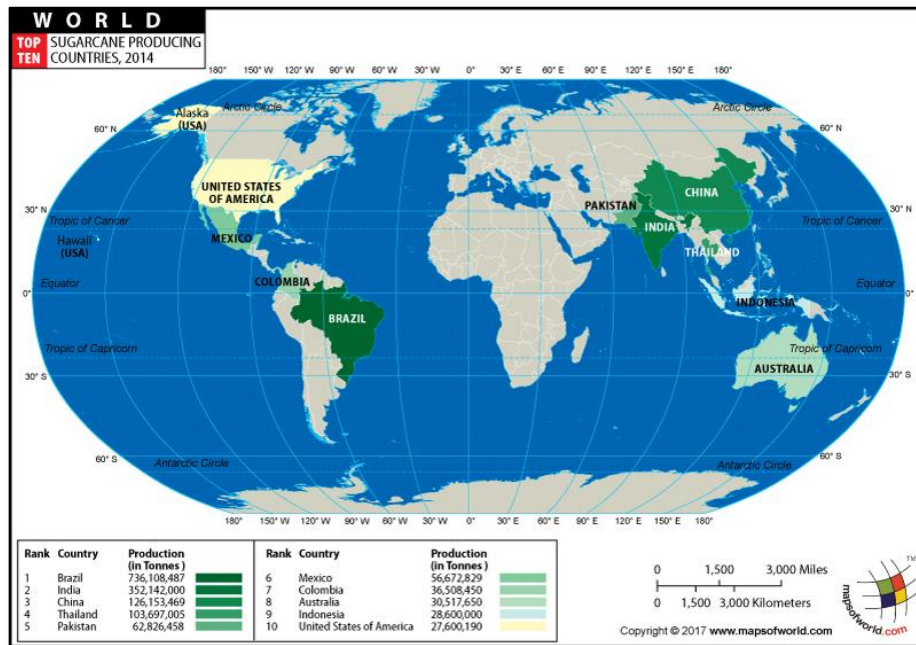
Assim como a laranja, a cana-de-açúcar é amplamente produzida em território nacional, devido às condições climáticas favoráveis para o plantio, tornando o Brasil uma potência na exportação mundial deste produto.

O plantio de cana-de-açúcar é de grande importância econômica por ser matéria-prima para a produção de açúcar e etanol. Assim, a partir do ano 2000, a demanda internacional por fontes de energia menos nocivas ao ambiente fez aumentar a produção de biocombustíveis no Brasil e em outros países (GILIO e CASTRO, 2017).

Neste sentido, pesquisas, investimentos e incentivos foram criados, como o programa Proálcool (Programa Nacional do Álcool) (DE MORAES e ZILBERMAN, 2014). A produção de cana-de-açúcar subiu de 256,81 milhões de toneladas em 2000 para 620,41 milhões de toneladas em 2010, aumento de cerca de 140%, que tornou o Brasil o maior produtor e um grande exportador na atualidade (UNICA, 2016), como mostrado na Figura 3.

Em 2017 plantou-se cerca de 10 milhões de hectares de cana-de-açúcar, atingido uma produção de quase 760 milhões de toneladas (IBGE, 2018).

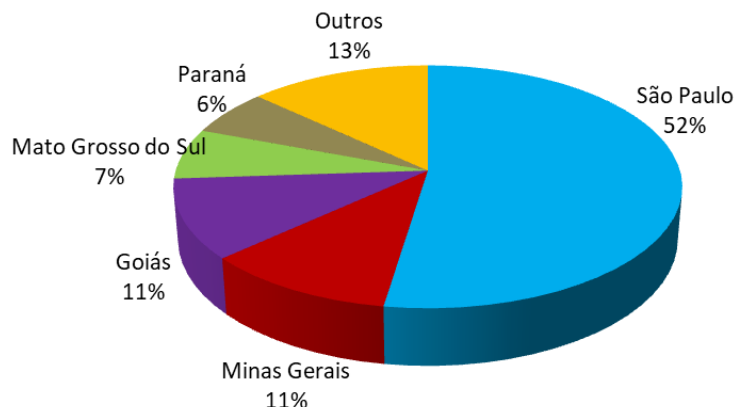
Figura 3. Produção de cana-de-açúcar em nível mundial, 2014.



(Fonte: Maps of World. Disponível em: <https://www.mapsofworld.com/world-top-ten/sugar-cane-producing-countries.html> Acesso em: 13 nov 2018)

A Figura 4 mostra os principais estados produtores de cana-de-açúcar no Brasil e suas respectivas contribuições para a produção nacional. Assim como na cultura de citros, o estado de São Paulo é destaque na produção de cana-de-açúcar, responsável por mais da metade da produção brasileira, seguido por Minas Gerais e Goiás.

Figura 4. Principais estados produtores de cana-de-açúcar no Brasil, 2018.



(Elaboração: Juliano H. Ferrarezi. Fonte: IBGE, 2019. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#resultado> Acesso em: 25 fev 2019)

Entretanto, os danos causados por pragas e doenças resultam em perdas nas lavouras e diminuição da qualidade dos produtos agrícolas (MICHEREFF, 2001). Nos pomares e canaviais não é diferente, pois doenças provocam diminuição na produtividade. Investimentos em prevenção e controle se fazem necessários para melhorar a produção e a rentabilidade para a economia nacional.

As bactérias do gênero *Xanthomonas* contribuem para grande parte dessas perdas, tanto na cultura de citros (*X. citri* subsp. *citri*) como na de cana-de-açúcar (*X. albilineans*).

2.2 *Xanthomonas* sp.

Xanthomonas (do grego, *xanthos* que significa “amarelo”, e *monas* que significa “entidade”) são bactérias aeróbias obrigatórias, possuem formato de bastonete e um único flagelo (TESSMANN, 2002). Seu crescimento em placa apresenta cor amarelada devido à presença de xantomonadina (DAS, 2003; RAJAGOPAL *et al.*, 1997), embora algumas espécies não apresentem este pigmento. Além disso, estas bactérias são exclusivamente Gram-negativas, o que lhes confere maior resistência a antibióticos e químicos devido à parede celular de lipopolisacarídeo que envolve a membrana celular (MAI-PROCHNOW *et al.*, 2016). Esta parede externa é impermeável e proteínas específicas (porinas) são responsáveis por permitir ou não a entrada de substâncias no espaço periplásmico (KRISHNAMOORTHY *et al.*, 2017).

Já foram reconhecidas 27 espécies e cerca de 120 patovares. Em geral, as espécies e patovares possuem hospedeiros específicos (PIERETTI *et al.*, 2015), mas isto não impede as

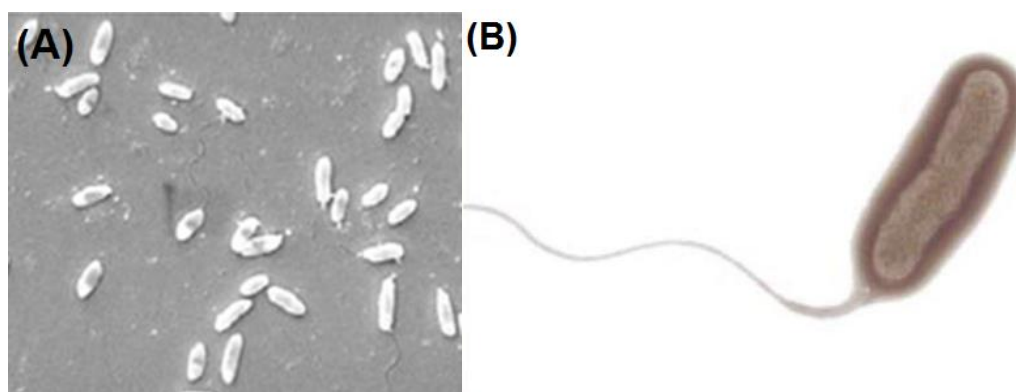
Xanthomonas de representarem um grande problema fitossanitário, pois estão distribuídas pelo mundo todo. Segundo Leyns (1984) este gênero de bactéria infecta ao menos 124 espécies de monocotiledôneas e 268 espécies de dicotiledôneas. Estas bactérias fitopatogênicas podem causar doenças em diversas espécies de interesse comercial como arroz, tomate, pimenta, feijão, banana, citros, mandioca e cana-de-açúcar (RYAN *et al.*, 2011; RODRIGUEZ-R *et al.*, 2012).

2.2.1 Cancro cítrico nos pomares

O cancro cítrico é causado pela bactéria *X. citri* subsp. *citri* (Figura 5) e atinge as principais variedades de interesse econômico. A doença é considerada um dos principais problemas da citricultura brasileira, uma vez que compromete a qualidade de frutos e diminui o interesse pela exportação do produto. Além disso, o Brasil tem perdas grandes para o cancro cítrico devido às condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento do patógeno, sendo identificado nos estados: de São Paulo, do Paraná, do Mato Grosso do Sul, de Santa Catarina, de Minas Gerais, de Roraima e do Rio Grande do Sul (CABI, 2017). Segundo levantamento da Fundecitrus (2018), as safras de 2016 e 2017 tiveram perdas de 37% de suas produções para o cancro cítrico quando não utilizadas medidas de manejo.

O primeiro registro da doença no estado de São Paulo foi feito no ano de 1957 em Presidente Prudente, sendo disseminado para outras regiões desde então (BITANCOURT, 1957). A disseminação desta fitobactéria ocorre por meio de chuva, ventos, equipamentos mal higienizados ou por mudas e sementes já contaminados. Sua entrada nos tecidos ocorre através de aberturas naturais, sejam estômatos, hidatódios ou ferimentos causados por equipamentos ou insetos (GOTTWALD *et al.*, 2002).

Figura 5. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e *Xanthomonas albilineans*.



(A) *X. citri* em microscopia eletrônica (Fonte: Elliot Watanabe Kitajima, NAP-NEPA-Esalq-USP).
(B) *X. albilineans* em microscopia eletrônica (Fonte: LIMA, 2003).

As lesões causadas pela bactéria são circulares, corticosas, salientes, de coloração castanha e aspecto eruptivo (BITANCOURT, 1957; ROSSETTI, 1984; ROSSETTI, 1993; NAMEKATA, 1991) (Figura 6). Elas ocorrem apenas no local de inserção da bactéria no hospedeiro, e podem localizar-se nos mais diversos tecidos vegetais como folhas, ramos e frutos (DO AMARAL, 2003). Sua multiplicação ocorre em espaços intercelulares (JACOB, 2009) como mesófilo e parênquima.

Estes ferimentos causados pelo *X. citri* são responsáveis por diminuir as exportações, uma vez que diversos países não aceitam frutas cítricas que contenham o patógeno. Segundo site da Fundecitrus (2016), existe relação entre a queda de frutos com a contaminação de frutos mais jovens. Com base no experimento, frutos contaminados até 45 dias após a floração tiveram 34,9% de queda, enquanto frutos contaminados após 75 dias da floração o percentual de queda foi de 16,3%. A Fundecitrus estima que na safra de 2017 as perdas para o cancro cítrico foram de aproximadamente 74 kg/planta.

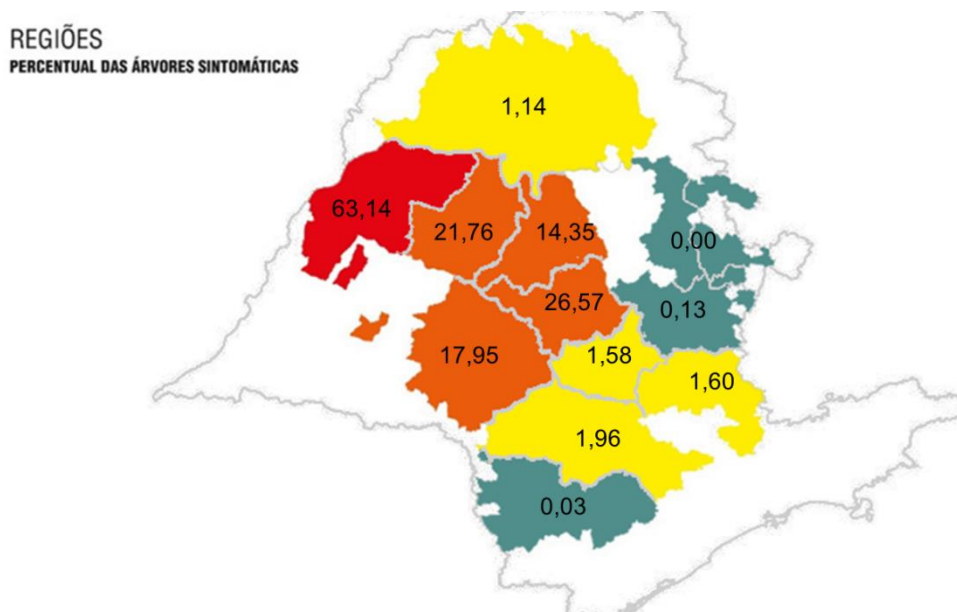
Figura 6. Lesão causada pelo cancro cítrico



(Fonte: FUNDECITRUS. Disponível em:
<https://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro/7>)

Em relatório oficial a FUNDECITRUS (2018) mostra os efeitos do cancro cítrico para a região do Cinturão Citrícola no Estado de São Paulo e parte do sul de Minas Gerais (Figura 7). De 2017 para 2018 houve um aumento de 8,68% para 11,71% na quantidade de árvores infectadas pela doença, o que corresponde a um total de 23 milhões de árvores contaminadas. Este aumento de 35% no período de um ano pode ser considerado alarmante para a região. Este estudo também mostra que as árvores com maior incidência da doença têm idade de 6 a 10 anos.

Figura 7. Percentual de árvores com sintomas do cancro cítrico no Cinturão Citrícola, 2018.



(Fonte: Levantamento FUNDECITRUS, 2018, com modificações. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/levantamentos/cancro-citrico>)

Desde a descoberta da doença a medida mais efetiva encontrada para conter o cancro cítrico foi erradicar as plantas contaminadas, porém o protocolo padrão considerava que árvores em um raio de 30 m estavam expostas ao patógeno e deveriam ser também eliminadas (GOTTWALD *et al.*, 2002; GRAHAM *et al.*, 2004). Ou seja, a erradicação trouxe prejuízos aos produtores e com o tempo este protocolo deixou de ser aplicado no controle do cancro cítrico.

Recentemente, em 2017, entrou em vigor a Normativa 37 elaborada pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Esta normativa sugere um sistema de mitigação que inclui o uso de mudas menos suscetíveis, implantação de barreiras verdes, e uso massivo de defensivos a base de cobre como parte do sistema de manejo.

O uso de barreiras verdes, como quebra-ventos, visa à formação de uma barreira física, em geral feita com árvores de grande porte, que reduz a velocidade dos ventos e evita a contaminação natural entre plantações vizinhas, principalmente em regiões de muito vento. Enquanto o manejo visa aumentar a produtividade e o lucro, fazendo uso de cultivos intensivos, monoculturas, aplicação de pesticidas e fertilizantes químicos (MAZZONCINI, 2010).

Compostos com base cúprica como o oxiclureto de cobre, hidróxido de cobre e óxido de cobre são utilizados para prevenir os sintomas do cancro cítrico, como a queda prematura de frutos (FUNDECITRUS, 2018). O uso destes compostos tem caráter preventivo, uma vez que formam uma camada protetora tóxica para bactérias e dessa forma evita novas contaminações (BEHLAU e BELASQUES, 2014). Porém, para um controle adequado do fitopatógeno é necessário múltiplas aplicações destes compostos químicos a base de cobre (GRAHAM, 2004).

É importante lembrar que metais pesados, como o cobre, são substâncias altamente tóxicas e de fácil acumulação ao longo de cadeias tróficas (ROCHA e DE AZEVEDO, 2017). Assim, a prevenção ao cancro cítrico feita com produtos químicos de caráter bactericida pode causar danos ao ambiente por conter cobre em sua constituição, trazendo problemas ao crescimento das raízes e absorção de nutrientes pelas árvores do pomar (BRUNETTO *et al.*, 2016; CORNU *et al.*, 2017). Além disso, o cobre pode se acumular na cadeia trófica, podendo afetar os sistemas nervoso central, hepático, renal, hematopoiético e/ou esquelético (SEGURA-MUÑOS, 2002).

2.2.2 Escaldadura-das-folhas nos canaviais

A cana-de-açúcar por sua vez é atacada pela bactéria *Xanthomonas albilineans* (Ashby, 1929) Dowson, que causa a escaldadura-das-folhas (Figura 5). Nesta doença a bactéria invade diretamente o sistema vascular da planta, onde se instala e se prolifera, sendo considerada uma doença sistêmica. Os sintomas da doença e sua gravidade podem variar dependendo das condições ambientais, agressividade do patógeno e variedade de cana plantada (LOPES *et al.*, 2001). A doença apresenta-se na planta de três formas:

- Forma Latente: considerada a forma assintomática da doença, é muito difícil sua identificação neste estágio, ao mesmo tempo a doença ainda é disseminada, podendo contaminar touceiras saudáveis próximas. Esta forma pode se desenvolver nas outras duas possíveis.
- Forma Crônica (Figura 8): apresenta estrias brancas bem definidas nas folhas, em geral paralelas a nervura central. Já foram relatados casos de regressão para forma assintomática, o que pode levar a uma interpretação errada de possível cura da touceira. O mais comum é a doença se desenvolver para a forma aguda.
- Forma Aguda (Figura 8): folhas apresentam aspecto avermelhado, parecido com a queima das folhas, os vasos na região nodal escurecem e pode ocorrer o brotamento de gemas do colmo. Esta forma pode levar à murcha de colmos e conseqüentemente morte da touceira.

Figura 8. Sintoma da escaldadura-das-folhas em sua forma crônica



(A) Forma crônica da escaldadura-das-folhas (B) Forma aguda da escaldadura-das-folhas (Fonte: Brugnera. IFMT, 2016. Disponível em: <http://fitopatologiaifmt.blogspot.com.br/2016/03/escaldadura-das-folhas.html>).

A escaldadura pode causar redução na produção de sacarose e até morte das touceiras, podendo ocasionar perdas de até 100% da plantação em variedades mais suscetíveis (TOKESHI e RAGO, 2005). Entretanto, segundo a AGEITEC (Agência Embrapa de Informação e Tecnologia), devido à fácil confusão entre escaldadura-das-folhas e o raquitismo-das-soqueiras (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) há poucos dados oficiais quanto às perdas pela doença no agronegócio.

Algumas variedades de cana-de-açúcar podem se mostrar mais resistentes à escaldadura que outras, assim, a aquisição de variedades resistentes tem sido adotada como modo de controle da doença. Entretanto, estudos mostram variabilidade do patógeno (SILVA *et al.*, 2005), de forma que uma variedade de cana resistente à doença em uma região pode não ser resistente ao patógeno de outros locais. Ainda hoje não há registros de defensivos agrícolas capazes de controlar satisfatoriamente a disseminação da doença (AGEITEC), sendo aconselhada apenas a desinfecção de equipamentos.

2.3 Biotecnologia a serviço da agricultura

Tendo em vista a dimensão do problema fitossanitário causado pelas *Xanthomonas* (*X. citri* e *X. albilineans*) e pela dificuldade a cerca de seu controle, a busca por novas formas de controle menos danosas ao ambiente têm se tornado cada vez mais necessária. Nesta perspectiva, o avanço nas pesquisas em biotecnologia fazendo uso de micro-organismos e seus metabólitos pode se mostrar um grande aliado.

Um dos metabólitos bioativos mais conhecidos no mundo é a penicilina, descoberta em 1928 por Alexander Fleming. Desde então, a busca por novas moléculas bioativas se mantém. Igarashi et al. (2010) conseguiu isolar um ciclo peptídico chamado Rakicidina D a partir de uma espécie marinha de *Streptomyces*. Este composto é capaz de inibir a divisão de células cancerígenas. Terpenoides do grupo dos Austalides capazes de inibir a atividade transcricional de células do câncer de mama foram isolados de *Penicillium lividum* e *P. thomii* (QIAO et al., 2016). Liu et al. (2014) mostrou a produção de cochliomicina D-F pelo fungo *Cochliobolus lunatus*. Este composto mostrou caráter antifúngico contra alguns fitopatógenos agrícolas.

A biotecnologia se interliga às mais diversas áreas relacionadas do desenvolvimento humano: produção de alimentos, medicamentos, biocombustíveis, agrodefensivos/pesticidas entre outros (COKER, 2016). Muitos destes processos estão associados a metabólitos, ou seja, moléculas orgânicas oriundas dos metabolismos de seres vivos. Estes metabólitos podem estar associados ou não ao crescimento do organismo, sendo classificados como primários ou secundários (EMERY et al., 2010). Os metabólitos primários estão relacionados ao crescimento e reprodução do micro-organismo, enquanto os metabólitos secundários são produzidos na fase estacionária, ou seja, após a fase de crescimento ativo, e estão relacionados a respostas ao estresse e à competição encontrados no ambiente (CALVO et al., 2002).

Na corrida biotecnológica, micro-organismos extremófilos têm se mostrado promissores. Suas adaptações a ambientes de características extremas (temperatura, salinidade, pH, pressão) fazem com que sejam utilizados em processos industriais (COKER, 2016).

Suspeita-se que novos micro-organismos e metabólitos secundários possam ser identificados explorando ambientes extremos, como a Antártica (PIKUTA et al., 2007). Alguns estudos evidenciam o potencial de fungos do ambiente antártico em produzir metabólitos secundários bioativos (FURBINO et al., 2014), como é o caso de alguns fungos isolados do solo da Antártica que apresentaram atividades antifúngicas significativas (SANTIAGO et al., 2012; SVAHN et al., 2015).

Na literatura, há estudos que mostram a atividade de extratos brutos produzidos por micro-organismos isolados do solo da Antártica contra bactérias do gênero *Xanthomonas*, como: *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria* e *X. gardneri*, causadoras da mancha bacteriana na pimenta (ENCHEVA-MALINOVA et al., 2014), *X. axonopodis* pv. *glycines* e *X. axonopodis*

pv. *phaseoli*, causadoras de doenças nas culturas de soja e feijão, respectivamente. (MONCHEVA *et al.*, 2002).

Estudos recentes encontraram 32 fungos isolados da Antártica (gêneros: *Penicillium*, *Pseudogymnoascus*, *Cadophora*, *Paraconiothyrium* e *Toxicocladosporium*), produtores de extratos com atividade antibacteriana contra *X. citri*, *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, *X. axonopodis* pv. *manihotis* e *X. euvesicatoria* (PURIC *et al.*, 2018; VIEIRA *et al.*, 2018; FONSECA, 2018).

Entretanto, ainda há certa escassez nos estudos relacionados ao uso de metabólitos secundários de micro-organismos antárticos em atividades de interesse agrônômico. Dessa maneira, torna-se necessário a exploração desses micro-organismos buscando novos compostos bioativos, que possam contribuir para o setor agrícola e ao meio ambiente.

Assim, o presente trabalho buscou contribuir para a descoberta de novos compostos produzidos por fungos do solo da Antártica com ação contra as bactérias fitopatogênicas de interesse para a cultura de citros e cana-de-açúcar.

3 OBJETIVO

O presente trabalho buscou por fungos filamentosos do ambiente antártico capazes de produzir extratos brutos bioativos contra *X. citri* e *X. albilineans*.

3.1 Objetivos específicos

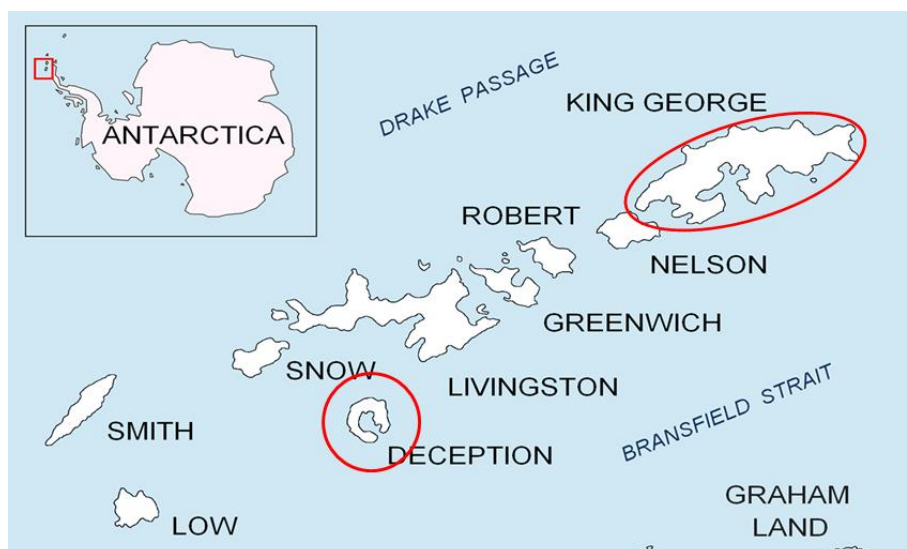
Produzir extratos brutos, contendo metabólitos secundários, de fungos filamentosos isolados de solo na Antártica; Selecionar os extratos brutos com potencial ação antibacteriana contra *X. citri* e *X. albilineans*; Determinar a concentração mínima dos extratos para inibição de 90% das células bacterianas; Calcular a concentração bactericida dos extratos brutos; Purificar parcialmente os extratos bioativos produzidos pelos fungos selecionados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Fungos

Os 61 fungos estudados no presente projeto foram coletados do solo antártico em duas ilhas: Ilha Deception e Ilha de King George (Figura 9). Os fungos foram coletados durante expedição PROANTAR (OPERANTAR XXXII) realizada em novembro/dezembro de 2013 no âmbito do projeto INCT Criosfera (Coordenado pelo Prof. Jefferson Simões, UFRGS) e armazenados em ultrafreezer (-80 °C).

Figura 9. Mapa de Ilhas pertencentes à Antártica marítima.



Em destaque as ilhas de coleta das amostras contendo os fungos filamentosos utilizados no presente projeto (Deception e King George). (Fonte: wikiwand.com modificado. Acesso em: 23 nov 2018)

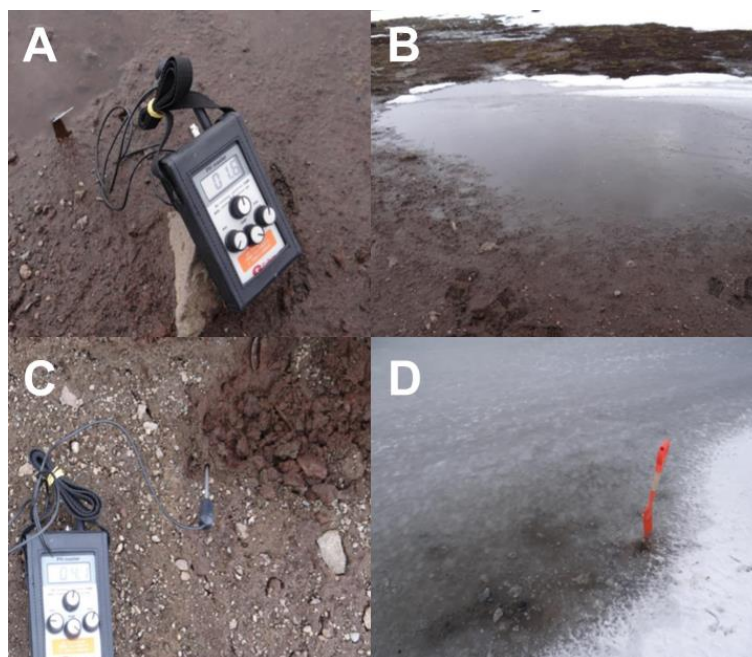
Foram utilizados fungos de três tipos diferentes de solo, sendo: 23 fungos filamentosos isolados de amostras do solo coletado abaixo de uma barra de ferro enferrujado (FE), na Ilha Deception (Pendulum Couve) (Figura 11); 23 fungos filamentosos isolados de amostras de solo a 4.0°C (4.0), coletadas na Ilha de King George (Ponta Turret) (Figura 11); 15 fungos filamentosos isolados de amostras de solo alagado a 1.6°C (1.6), coletadas na Ilha de King George (Ponta Turret) (Figura 11).

Figura 10. Solo de coleta abaixo de barra de ferro enferrujada (Ilha Deception).



(Fonte: Alysson W. F. Duarte)

Figura 11. Solos de coleta da Ilha de King George.



(A) Indicação de temperatura do solo a 1.6 °C. (B) Solo de coleta das amostras 1.6. (C) Indicação de temperatura do solo a 4.0 °C. (D) Solo de coleta das amostras 4.0 (alagado). (Fonte: Alysson W. F. Duarte)

Os micro-organismos fazem parte do acervo de fungos da coleção de pesquisa da Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP) onde estão preservados por meio de ultracongelamento a -80°C .

4.2 Linhagens de *Xanthomonas* sp.

As bactérias utilizadas no presente trabalho foram: *X. citri* subsp. *citri* (linhagem selvagem 306) e *X. albilineans* (isolado IBSBF 1387). Ambos os fitopatógenos foram preservados em ultra freezer (-80°C).

4.3 Obtenção dos extratos brutos

4.3.1 Condições de cultura para crescimento em incubadora com agitação

Os fungos utilizados neste trabalho foram reativados em placas de Petri contendo meio malte sólido (2% malte, 1,5% ágar) e mantidos em incubadora BOD a 15°C por aproximadamente 10 dias. Após crescimento dos fungos, cinco discos de aproximadamente 5 mm de ágar e micélio foram transferidos para frascos Erlenmeyers contendo 150 mL de meio malte líquido (2%) e mantidos pelo período de 20 dias em agitação constante (150 rpm) a 15°C .

4.3.2 Processamento, extração e armazenamento dos extratos brutos

Após os 20 dias de crescimento microbiano, a biomassa foi separada do sobrenadante por filtração a vácuo.

Do sobrenadante obteve-se o extrato extracelular. Para isso, o sobrenadante foi submetido à extração líquido-líquido com acetato de etila. A fase aquosa foi devidamente descartada e a fase orgânica foi concentrada com auxílio de evaporador rotativo de pressão reduzida (rotaevaporador). Por fim, o extrato foi seco em concentrador de amostras e armazenado em microtubos.

Da biomassa, por sua vez, obteve-se o extrato intracelular. Esta foi macerada em almofariz com metanol. A maceração provocou rompimento mecânico das células do fungo e o metanol solubilizou moléculas orgânicas. A mistura de biomassa e metanol foi submetida à centrifugação (2000 rpm por 2 minutos) para decantar a massa celular. Na sequência, o meio contendo as moléculas foi separado e também foi concentrado em evaporador rotativo de pressão reduzida e o extrato, após seco, foi armazenado em microtubos.

4.4 Avaliação da atividade antibacteriana

Os 122 extratos brutos obtidos foram submetidos ao bioensaio REMA (*Resazurin Microtiter Assay Plate*), contra as bactérias *X. albilineans* (causadora da escaldadura-das-folhas na cana de açúcar) e *X. citri* (causadora do cancro cítrico em frutas cítricas). A metodologia foi baseada em Silva *et al.* (2013), com modificações.

O teste foi montado de duas formas, dependendo da quantidade de extratos testados:

- Triagem: Na triagem testaram-se todos os extratos produzidos, sendo que em cada placa foram testados 16 extratos em quatro concentrações (2,1; 1,05; 0,525 e 0,262 mg/mL). A partir dos resultados da triagem os extratos bioativos frente à bactéria (inibição celular \geq 90%) foram submetidos ao teste completo. A triagem foi feita em triplicata.

- Teste completo: Nesta etapa os 12 extratos considerados bioativos na triagem foram testados em oito concentrações (2,1; 1,05; 0,525; 0,262; 0,131; 0,062; 0,032 e 0,016 mg/mL), sendo possível testar oito extratos por placa. O teste também foi feito em triplicata

4.4.1 REMA completo em *X. citri* subsp. *citri*

Para montagem do teste REMA inicialmente foram adicionados 90 μ L de meio NYG (0,5% peptona, 0,3% extrato de levedura e 2% glicerol) em todos os poços (exceto coluna 10 e poços de A2 a A9).

Os extratos brutos secos foram dissolvidos em uma solução estoque (30 mg/mL), cujo veículo escolhido para suspensão dos metabólitos foi dimetilsulfóxido (DMSO) 10% (v/v).

Cada solução estoque foi diluída em meio NYG até a concentração de 2,1 mg/mL (17,5 µL de solução estoque em 232,5 µL de NYG), concentração inicial utilizada no teste. Foram adicionados 200 µL de cada extrato nos poços A2 - A9 da placa de 96 poços e a partir destes poços foi feita a microdiluição, passando 100 µL para os demais poços da coluna.

Controle Positivo (CP): Solução estoque de canamicina em água (200 µg/mL), a qual foi diluída para 20 µg/mL (50 µL da solução estoque em 450 µL de NYG). Foram adicionados 100 µL deste controle nos poços A10, B10, C10 e D10.

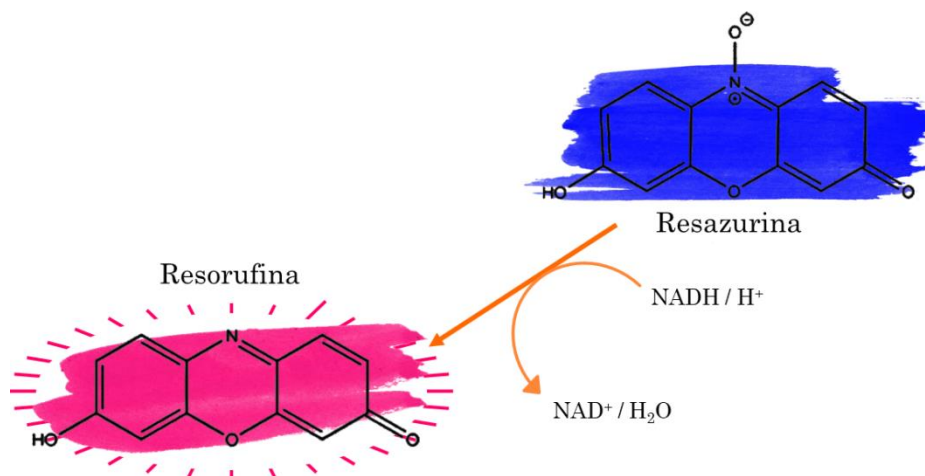
Controle do Veículo (CV): 1% de DMSO preparado em meio NYG (5 µL de DMSO 100% em 495 µL de meio NYG), uma vez que a concentração de DMSO em cada poço não ultrapassou 0,7%. Foram adicionados 100 µL deste controle nos poços E10, F10, G10 e H10.

Controle Negativo (CN): este controle foi montado diretamente nos poços da coluna 11, com a adição do inóculo já padronizado no poço contendo meio NYG líquido.

Inóculo: A bactéria utilizada no bioensaio (*X. citri* subsp. *citri*) foi reativada em meio NYG ágar por dois dias em BOD a 29 °C. A partir deste crescimento celular foi feito o inóculo bacteriano em frasco coletor contendo 30 mL de meio NYG líquido. O frasco foi mantido em *shaker* a 29 °C e rotação constante de 200 rpm, até que atingisse a densidade óptica a 600 nm (DO_{600}) desejada de 0,8, referente à fase log do crescimento bacteriano. O inóculo foi então diluído em meio NYG (1:10) e adicionou-se 10 µL dessa diluição em cada poço da placa (exceto colunas 1 e 12, que não foram utilizadas no REMA para evitar perdas por evaporação), fazendo com que haja 10^5 UFC/poço.

Após a montagem, as placas de 96 poços foram vedadas e incubadas a 29 °C por 16-18 horas e em seguida foi adicionado 15 µL de uma solução de resazurina 0,01% (m/v). A microplaca foi novamente incubada a 29 °C por cerca de 2 h. A resazurina (de cor azul e sem fluorescência) quando em contato com metabolismo microbiano sofre redução à resorufina (rosa e fluorescente) (Figura 12). Assim, após o período de incubação a fluorescência apresentada foi mensurada a 530 nm (excitação) e 590 nm (emissão) usando leitor de microplacas Synergy H1 (SILVA e FERREIRA, 2013).

Figura 12. Resazurina em processo de redução a resorufina.



(Fonte: do autor)

A porcentagem de inibição do crescimento bacteriano foi definida pela fórmula citada abaixo, onde UF são as Unidades de Fluorescência medidas pelo espectrômetro de fluorescência.

$$\frac{[(\text{Média UF controle negativo}) - (\text{UF extrato teste})]}{(\text{Média UF controle negativo})} \times 100$$

Extratos com inibição igual ou superior a 90% das células bacterianas foram considerados positivos. A partir destes dados foram construídas curvas de regressão polinomial para cada extrato positivo. As concentrações dos extratos capazes de inibir o crescimento de 90% das células bacterianas (CIM90) foram calculadas com base na equação obtida da curva de regressão polinomial.

4.4.2 REMA completo em *X. albilineans*

O bioensaio foi similar ao utilizado com *X. citri* subsp. *citri*, entretanto foi necessário realizar algumas modificações.

Tendo em vista que *X. albilineans* não apresentou crescimento satisfatório em meio NYG, foi preciso testar novos meios de cultivo antes de prosseguir com o REMA.

Os meios de cultivo testados foram: NYG (3 g de extrato de levedura, 5 g de peptona e 20 mL de glicerol); NB (5 g de peptona e 3 g de extrato de carne); SB (5 g de sacarose, 5 g de extrato de levedura e 5 g de peptona); YSG (5 g de extrato de levedura, 5 g de glucose, 0,5 g de fosfato de amônio monobásico e 0,2 g de fosfato de potássio dibásico anidro) e NBY (5 g de peptona, 2 g de extrato de levedura, 3 g de extrato de carne, 2 g fosfato de potássio dibásico anidro e 0,5 g de fosfato de potássio monobásico).

O teste para análise do meio de cultivo foi realizado em placas de 24 poços mantidas 29°C com rotação constante, as curvas de crescimento foram determinadas com leituras a cada 30 minutos feitas pelo leitor de microplacas SYNERGY H1 (Biotek®), que quantificou as unidades de fluorescência em cada poço.

Após a definição da utilização de YSG como meio de cultivo, foi realizada a contagem de células por Câmara de Neubauer para definir a DO_{600} mais adequada para o teste ($DO_{600} = 0,9$).

Para definição do controle positivo, cinco antibióticos (Rifampicina, Gentamicina, Tetraciclina, Espectinomicina e Ceftazidima) foram testados, entretanto todos apresentaram resultados insatisfatórios, ou seja, inibição do crescimento de células bacterianas inferior a 90%. Dessa maneira manteve-se o uso de canamicina na concentração de 20 µg/mL como CP.

A montagem do REMA foi realizada de forma semelhante à detalhada anteriormente. Foram adicionados 90 µL de YSG em todos os poços (exceto poços de A2 a A9 e na coluna 10). Neste caso, os estoques de cada extrato foram diluídos para a concentração de 3 mg/mL (25 µL de solução estoque em 225 µL de YSG), sendo então adicionado 200 µL de cada extrato nos poços A2 a A9, seguido de microdiluição seriada. O CP (canamicina 200 µg/mL em água) foi adicionado nos poços A, B, C e D da coluna 10 (100 µL/poço), e o controle de veículo (DMSO 1%) nos poços E, F, G e H da coluna 10 (100 µL/poço). O CN foi montado diretamente nos poços da coluna 11 (YSG + inóculo). As colunas 1 e 12 novamente não foram utilizadas.

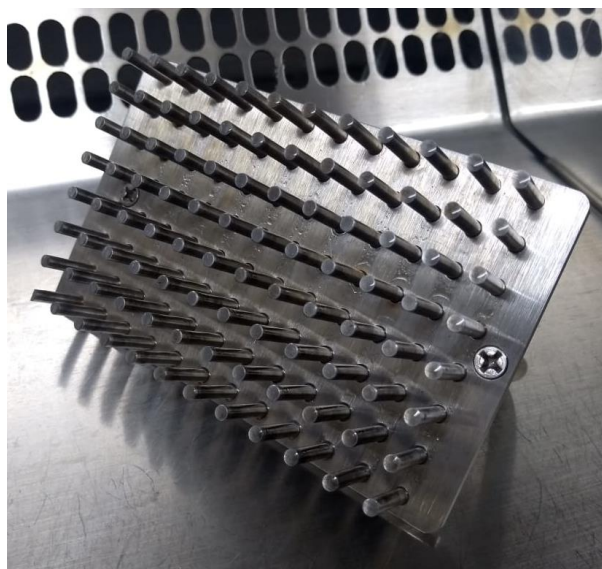
X. albilineans, após ser reativada em placa com YSG, leva de 3 a 5 dias para atingir crescimento suficiente para fazer o inóculo em meio YSG líquido. A incubação foi feita em *shaker* a 29 °C e 200 rpm até atingir a DO_{600} de 0,9. Foram adicionados 10 µL deste inóculo em cada poço. Na sequência a placa foi incubada de 16-18 horas em BOD a 29 °C. Após este período, aplicou-se resazurina em todos os poços e foi realizada a segunda incubação (aproximadamente 2 horas). A leitura e análise dos dados foram feitas como descrita para *X. citri* (item 4.4.1).

4.5 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

O teste CBM foi realizado entre o primeiro período de incubação (29 °C por 16-18 horas) e a adição de resazurina do teste REMA completo. Dessa forma, o conteúdo da placa de 96 poços foi inoculado, com auxílio de replicador de 96 pinos (Figura 13), em placa de Petri (150 x 15 mm) contendo meio de cultivo sólido. Estas placas foram então incubadas por 48 h e 72 h (*X. citri* e *X. albilineans*, respectivamente) a 29 °C.

O crescimento bacteriano foi verificado visualmente, sendo possível identificar qual a menor concentração de extrato em que não houve crescimento bacteriano (CBM). O teste foi realizado em triplicatas e em três experimentos independentes.

Figura 13. Replicador de colônias para placas de 96 pinos.



(Fonte: do autor)

4.6 Fracionamento dos extratos bioativos

O extrato bioativo produzido pelo fungo B-Fe (*Pseudogymnoascus* sp.) foi separado em frações utilizando cromatografia em coluna de Sílica Gel 60 (Ø 0,2 a 0,5mm) como fase estacionária e fase móvel gradiente com os solventes: acetato de etila e hexano (6:4); acetato de etila e hexano (8:2); acetato de etila; metanol; água destilada.

Para acompanhar o fracionamento foi utilizada CCD, Cromatografia de Camada Delgada (TLC Sílica Gel 60 F₂₅₄ MERCK), com as mesmas misturas de solvente utilizadas na coluna. Todas as placas foram analisadas em luz ultravioleta (254 nm e 365 nm) e na sequência foram submetidas à revelação com a solução de *p*-anisaldeído.

Frações similares foram unidas e submetidas novamente à avaliação de atividade frente às bactérias fitopatogênicas. Dentre as frações testadas, a fração que obteve melhor bioatividade foi purificada por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) analítico (Shimadzu) acoplado a detectores UV-Vis e índice de refração, utilizando coluna C18-Shim pack CLC-ODS (M) (Shimadzu) e fase móvel isocrática de acetonitrila e água (4:6). O tempo de corrida foi 45 minutos, com fluxo de 0,4 mL/s e injeção de 20 μL por corrida.

4.7 Tratamento e Descarte de Resíduos da Pesquisa

Os resíduos químicos produzidos na presente pesquisa foram acondicionados em frascos devidamente rotulados, os quais foram mantidos em área de resíduos do Departamento de Bioquímica e Microbiologia para posterior tratamento especializado, com exceção do solvente acetato de etila que foi destilado para reutilização. Os resíduos biológicos foram autoclavados e devidamente descartados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

5.1.1 Triagem dos extratos brutos

Para a triagem de potencial antibacteriano dos extratos brutos foram utilizados 23 fungos antárticos isolados do solo abaixo de barra de ferro e 38 fungos filamentosos isolados de solo da Ilha de King George (Anexo I). No total, foram obtidos 122 extratos, sendo 61 de origem intracelular e 61 de origem extracelular. Estes extratos foram submetidos à triagem frente à bactéria fitopatogênica *X. citri* subsp. *citri*, causadora do cancro cítrico.

O resultado da triagem está apresentado na Tabela 1. Extratos com inibição $\geq 90\%$ do crescimento bacteriano no REMA foram considerados positivos (+).

Tabela 1. Triagem da bioatividade dos extratos brutos contra *X. citri*.

Gênero	Extrato	Intra	Extra	Gênero	Extrato	Intra	Extra
/	1-FE	-	-	<i>Candida davisiana</i>	L_4.0	-	-
<i>Pseudogymnoascus sp.</i>	1.1-FE	-	-	<i>Cryptococcus albidosimilis</i>	M_4.0	-	-
<i>Pseudogymnoascus sp.</i>	2-FE	-	+	/	P_4.0	-	-
/	3-FE	-	-	/	2"_4.0	-	-
<i>Pseudogymnoascus sp.</i>	3.1-FE	-	+	/	3_4.0	+	-
/	4-FE	-	-	/	3"_4.0	-	-
/	5-FE	-	-	/	4"_4.0	-	-
/	5.1-FE	-	-	<i>Penicillium manginii</i>	5_4.0	-	-
<i>Pseudogymnoascus sp.</i>	6-FE	-	+	/	6_4.0	-	-
/	6.1-FE	-	-	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	8_4.0	-	-
/	7-FE	-	-	<i>Leucosporidium scottii</i>	10.C_4.0	-	-
/	8-FE	-	-	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	10.D_4.0	-	-
/	10.2-FE	-	-	/	10.E_4.0	-	-
/	10.3-FE	-	-	<i>Cystofilobasidium sp.</i>	10.F_4.0	-	-
/	10.4-FE	-	-	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	11_4.0	-	-

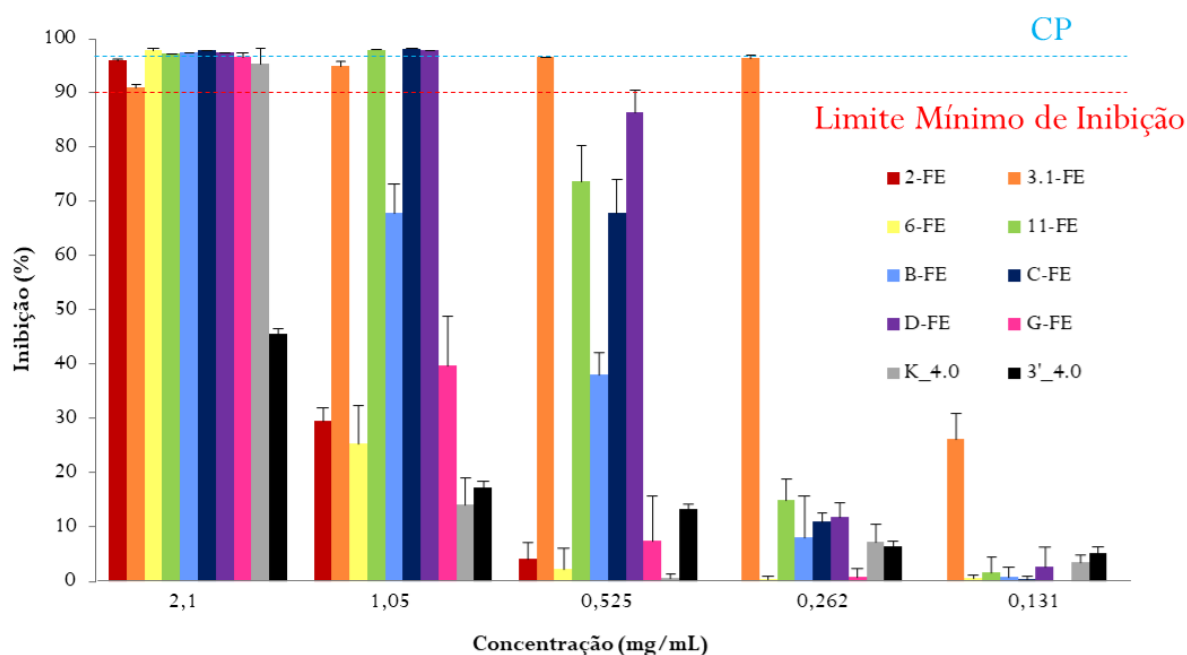
<i>Pseudogymnoascus sp.</i>	11-FE	-	+	/	A_1.6	-	-
/	12-FE	-	-	/	1'_1.6	-	-
<i>Pseudogymnoascus sp.</i>	B-FE	-	+	/	1''1.6	-	-
<i>Pseudogymnoascus sp.</i>	C-FE	-	+	/	2_1.6	-	-
<i>Cladosporium</i>	D-FE	-	+	/	3_1.6	-	-
/	E-FE	-	-	/	3''_1.6	-	-
/	F-FE	-	-	/	4_1.6	-	-
<i>Pseudogymnoascus sp.</i>	G-FE	-	+	/	5_1.6	-	-
<i>Candida davisiana</i>	A_4.0	-	-	/	10.2_1.6	-	-
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	B_4.0	-	-	/	10.3_1.6	-	-
/	C_4.0	-	-	/	10.4_1.6	-	-
/	D_4.0	-	-	<i>Nemania bipapillata</i>	10.5_1.6	-	-
/	F_4.0	-	-	/	10.6_1.6	-	-
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	I_4.0	-	-	<i>Hypocrea sp.</i>	10.7_1.6	-	-
/	J_4.0	-	-	/	10.8_1.6	-	-
<i>Debaryomyces macquariensis</i>	K_4.0	-	+		BRANCO	-	-

Intra: extrato intracelular. **Extra:** extrato extracelular. (+) positivo para inibição do crescimento celular. (-) negativo para inibição do crescimento celular. (/) Não identificado. Valor de corte: 90%.

Como mostrado na Tabela 1, os extratos extracelulares dos fungos 2-FE, 3.1-FE, 6-FE, 11-FE, B-FE, C-FE, D-FE, G-FE e K_4.0, bem como o extrato intracelular de 3'_4.0, apresentaram atividade inibitória acima de 90% contra a *X. citri* subsp. *citri*, sendo portanto considerados positivos. Também foi avaliada a bioatividade do meio de cultivo líquido (malte 2%), listado como “branco” na Tabela 1.

5.1.2 REMA completo com os extratos brutos positivos

Todos os extratos positivos foram reavaliados utilizando o método REMA completo, sendo testadas, neste caso, oito concentrações de cada extrato contra *X. citri* subsp. *citri*. Os resultados quantitativos de inibição de cada extrato foram compilados na Figura 14. Os resultados estão apresentados de forma individual no Anexo II (Figuras 24 a 33).

Figura 14. Dose resposta dos extratos contra *X. citri*.

Média de inibição (%) do crescimento celular de *X. citri* em função da concentração (mg/mL) dos extratos bioativos testados, com barra de desvio padrão. **Corte:** 90%. **CP:** \cong 97%. (Fonte: do autor)

Como pode ser observado, dos 10 extratos reavaliados nove mantiveram seu potencial inibitório acima de 90% na primeira concentração testada (2,1 mg/mL), o extrato 3'_4.0 não atingiu o valor de corte (90%). Importante salientar que este extrato foi produzido novamente para o teste completo, assim, há a possibilidade de alteração na composição do extrato bruto obtido, resultando em queda de inibição na reavaliação.

Os extratos 11-FE, B-FE e C-FE, mantiveram a inibição acima de 90% até a segunda concentração testada (1,05 mg/mL). O extrato 3.1-FE manteve a inibição acima de 90% até a concentração de 0,262 mg/mL, sendo considerado o melhor resultado dentre os extratos testados. De maneira geral, a capacidade de inibição de todos os extratos foi decaindo à medida que a concentração reduzia, mostrando uma relação dose-resposta entre a concentração dos extratos e a atividade antibacteriana (Figuras 14 e de 24 a 33), sendo B-FE o melhor exemplo deste decaimento menos drásticos da inibição entre as concentrações testadas.

A partir da concentração de 0,062 mg/mL nenhum extrato apresentou inibição no crescimento bacteriano, por isso estes resultados não estão apresentados na Figura 14.

Como verificado na Figura 14, cinco extratos (6-FE, 11-FE, B-FE, C-FE e D-FE) tiveram inibição superior à inibição média do controle positivo (96,95%). O desvio padrão

dos resultados foi relativamente baixo, o que confere maior confiabilidade nos dados em questão.

5.1.3 Concentração Inibitória Mínima CIM90 dos extratos bioativos

Com base nas equações obtidas da curva de regressão para cada extrato a partir dos dados de inibição do bioensaio de REMA, foi possível determinar a CIM90 dos extratos bioativos contra *X. citri* subsp. *citri*. Os valores estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima dos extratos para inibição celular de 90%.

Extrato	CIM 90 (mg/mL)	R ²
2-FE	2,009	0,9997
3.1-FE	0,285	0,9806
6-FE	1,995	0,9989
11-FE	0,805	0,9854
B-FE	1,714	0,9972
C-FE	0,784	0,9956
D-FE	0,600	0,9850
G-FE	1,995	0,9992
K_4.0	2,044	0,9987

Como apresentado na Tabela 3, cinco dos extratos testados tiveram CIM90 em torno de 2,0 mg/mL (2-FE, 6-FE, B-FE, G-FE e K_4.0), três extratos apresentaram CIM90 entre 0,6 e 0,8 mg/mL (11-FE, C-FE e D-FE) e o menor valor da CIM90 foi obtido pelo extrato 3.1-FE, com 0,285 mg/mL. Tendo em vista que foram utilizados extratos brutos, ou seja, uma mistura de compostos produzidos pelos fungos, o valor da CIM90 tende a diminuir ao purificar a(s) molécula(s) bioativa(s).

5.1.4 Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos bioativos.

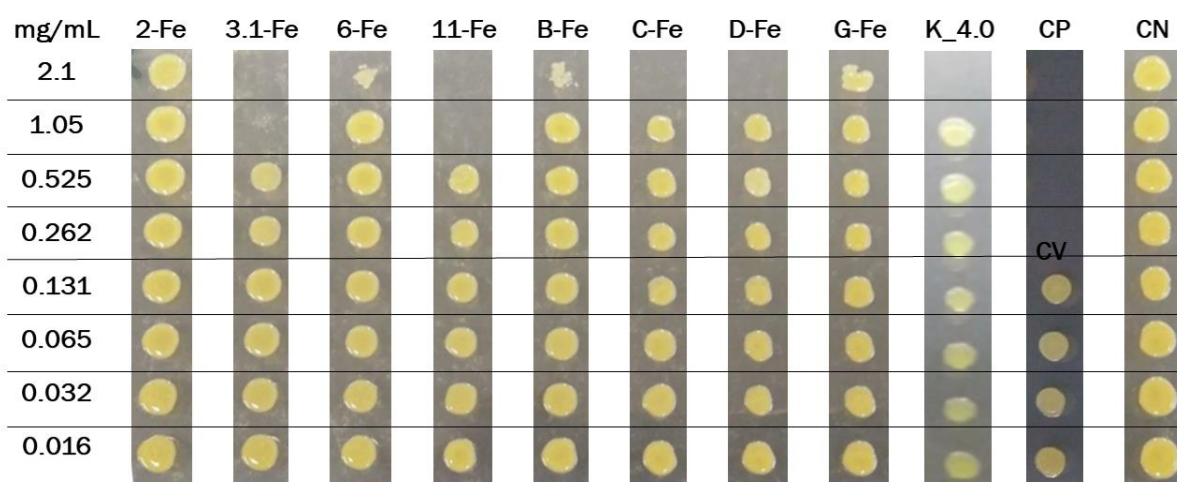
Os extratos com resultado positivo ($\geq 90\%$) no REMA completo foram submetidos à avaliação de atividade bactericida.

Uma alíquota de cada poço foi inoculada em placa contendo meio NYG. Comparando o crescimento em placa com o resultado do REMA podemos estabelecer se o extrato possui caráter bacteriostático ou bactericida. Diz-se bacteriostático quando um composto tem capacidade de inibir a multiplicação celular, ou seja, inibir o crescimento, sem necessariamente levar à morte da cultura e das células em questão. Por outro lado, compostos

que levam a inviabilidade ou morte celular são considerados compostos bactericidas (NEMETH et al., 2015; MADIGAN *et al.*, 2016).

Baseado nisto, extratos com resultado positivos no REMA e que apresentam crescimento em placa foram considerados como bacteriostáticos, enquanto extratos de resultados positivos no REMA e que não apresentaram crescimento em placa foram considerados bactericidas. Os resultados estão apresentados na Figura 15.

Figura 15. Bioensaio de Concentração Bactericida Mínima (CBM) contra *X. citri*.



(Fonte: do autor)

De acordo com os resultados apresentados na Figura 15, foi possível observar que os extratos C-FE, D-FE e K_4.0 apresentaram ação bactericida na concentração de 2,1 mg/mL. Os extratos 3.1-FE e 11-FE apresentaram ação bactericida até a segunda concentração testada (1,050 mg/mL). Os demais extratos (2-FE, 6-FE, B-FE e G-FE) foram considerados como bacteriostáticos nas concentrações testadas.

5.2 *Xanthomonas albilineans*

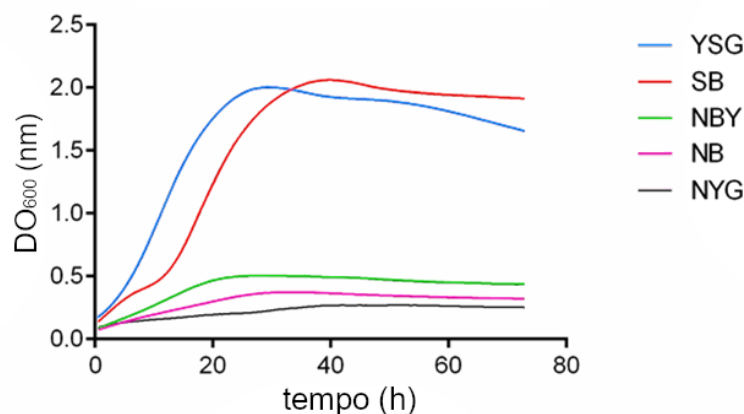
5.2.1 Adaptação do protocolo REMA

Ao iniciar a triagem dos extratos foi possível observar aspectos que tornavam o protocolo REMA utilizado em *X. citri* subsp. *citri* inviável para avaliação frente à *X. albilineans*:

- *X. albilineans* não apresenta crescimento em meio NYG líquido;
- O DMSO apresentou inibição no crescimento da bactéria;
- O CP (canamicina) não apresentava inibição satisfatória (90 % de inibição de células bacterianas)

Na busca por uma adaptação do protocolo que se adequasse à *X. albilineans* foi necessário primeiramente avaliar o crescimento da bactéria em diferentes meios de cultivo. As curvas de crescimento da bactéria em cada meio estão representadas na Figura 16.

Figura 16. Curva comparativa de crescimento de *X. albilineans* nos meios NYG, SB, NBY, YSG e NB.



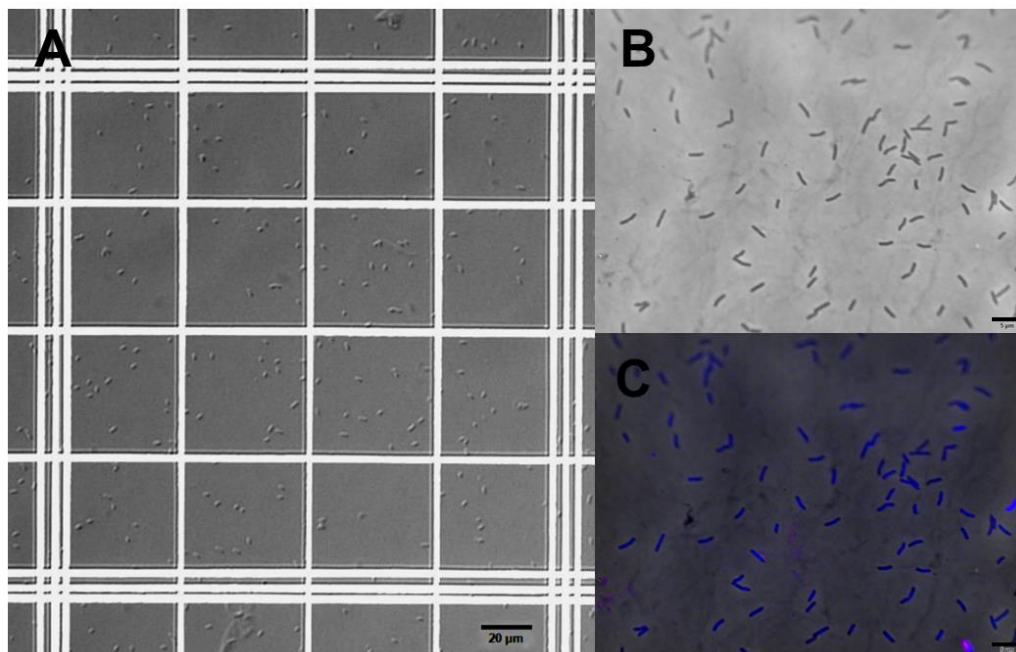
(Fonte: Caio F. Zamurer)

Observando a Figura 16 é possível verificar que de fato *X. albilineans* cresce de forma insatisfatória nos meios de cultivo NBY, NB e NYG (utilizado no teste REMA de *X. citri*). Em compensação, os meios SB e YSG se mostraram opções viáveis para o crescimento de *X. albilineans*.

A composição do meio SB inclui sacarose (um açúcar pouco complexo), dessa forma este meio possui uma melhor assimilação pela bactéria. O meio YSG por sua vez apresenta sais em sua composição que configuram um efeito tampão, evitando assim que este meio se acidifique facilmente com o crescimento bacteriano. Como o crescimento em meio YSG permite a bactéria atingir a fase log mais rápido do que em meio SB, foi escolhido o uso de YSG para a adaptação do protocolo REMA.

Na sequência a DO₆₀₀ foi padronizada para *X. albilineans*. Para isso foi realizada contagem em câmeras de Neubauer juntamente de teste de viabilidade das células (Figura 17).

Figura 17. Concentração de células viáveis de *X. albilineans* em YSG.



(A) Contagem de células nos quadrantes internos (menores) da câmara de Neubauer (escala: 20 µm). (B) Células de *X. albilineans* em microscopia de luz (escala: 5 µm). (C) Células de *X. albilineans* em microscopia de luz, coradas com DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) (escala: 5 µm). Células azuis são células viáveis, enquanto células avermelhadas/rosadas são células inviáveis. (Fonte: Caio F. Zamurer)

Considerando que a viabilidade celular do inóculo era alta ($\cong 99\%$), foi estipulada a quantidade de células para DO_{600} da fase log de *X. albilineans* (fase de grande divisão celular e alta taxa metabólica). Para isso, foram usados os quadrantes menores da câmara de Neubauer e um microscópio de luz acoplado a computador. A conversão para células/mL foi feita com auxílio do programa Calibra (EMBRAPA). Assim, para a DO_{600} 0,9 o inóculo foi padronizado com 10^7 células viáveis/mL. Dessa forma, mesmo sem uma diluição (1:10) do inóculo, a quantidade de células aplicada por poço é igual a *X. citri* (10^5).

Também foram testados dois veículos (DMSO e metanol) em concentrações diferentes (2%, 1%, 0,5% e 0,3%) em relação à diluição dos extratos, metanol (1%) não apresentou inibição do crescimento bacteriano, porém se mostrou ineficiente na diluição dos extratos brutos. O DMSO se mostrou eficiente nas diluições dos extratos apenas em 2% e 1%, dentre elas, 1% mostrou menor potencial inibitório no crescimento bacteriano. Portanto, para veículo e controle de veículo foi mantido DMSO 1%.

A canamicina mostrou baixa inibição no crescimento da bactéria, assim, foram testados outros antibióticos na busca de um possível substituto para o CP. A Tabela 4 mostra os demais antibióticos testados e o potencial de inibição contra *X. albilineans* (%).

Tabela 3. Antibióticos contra *X. albilineans*.

Antibiótico	Inibição de crescimento (%)
Rifampicina	67,01
Gentamicina	37,34
Tetraciclina	66,93
Espectiomicina	00,00
Ceftazidima	11,98
Canamicina	64,92

Antibióticos testados na concentração de 20 µg/mL.

Ao final dos testes nenhum dos antibióticos testados obteve resultado satisfatório na inibição de *X. albilineans* na concentração testada. A canamicina teve um resultado próximo aos outros dois antibióticos de melhor desempenho, assim, optou por mantê-la como CP, uma vez que o CP não interfere ativamente nos cálculos de inibição do teste REMA, servindo apenas como comparação.

Deve-se salientar que outras concentrações de canamicina foram testadas contra *X. albilineans* e mesmo na concentração de 8 mg/mL a inibição foi de cerca de 87%, ou seja, mesmo com um aumento de 400x a canamicina não atingiu o valor mínimo de inibição estipulado para os extratos brutos (90%), mostrando o quanto esta bactéria é resistente.

Baseado na ineficácia dos antibióticos decidiu-se por aumentar a primeira concentração testada em cada extrato de 2,1 mg/mL para 3 mg/mL. A partir deste novo protocolo foi possível prosseguir com as triagens iniciais.

5.2.2 Triagem dos extratos brutos

Assim como foi feito em *X. citri*, primeiramente os extratos passaram por uma triagem inicial pelo método REMA, utilizando extratos de origem intracelular e extracelular em quatro concentrações diferentes (2,1; 1,05; 0,525 e 0,262 mg/ml).

Os resultados das triagens estão apresentados na Tabela 5. Extratos com inibição $\geq 90\%$ do crescimento bacteriano foram considerados positivos (+).

Tabela 4. Triagem qualitativa da bioatividade dos extratos brutos contra *X. albilineans*.

Extrato	Intra	Extra	Extrato	Intra	Extra
1-FE	-	-	L_4.0	-	-
1.1-FE	-	+	M_4.0	-	-
2-FE	-	-	P_4.0	-	-
3-FE	-	-	2''_4.0	-	-
3.1-FE	-	-	3´_4.0	-	-

4-FE	-	-	3"_4.0	-	-
5-FE	-	-	4"_4.0	-	-
5.1-FE	-	-	5_4.0	-	-
6-FE	-	-	6_4.0	-	-
6.1-FE	-	-	8_4.0	-	-
7-FE	-	-	10.C_4.0	-	-
8-FE	-	-	10.D_4.0	-	-
10.2-FE	-	-	10.E_4.0	-	-
10.3-FE	-	-	10.F_4.0	-	-
10.4-FE	-	-	11_4.0	-	-
11-FE	-	-	A_1.6	-	-
12-FE	-	-	1'_1.6	-	-
B-FE	-	+	1"1.6	-	-
C-FE	-	-	2_1.6	-	-
D-FE	-	-	3_1.6	-	-
E-FE	-	-	3"1.6	-	-
F-FE	-	-	4_1.6	-	-
G-FE	-	-	5_1.6	-	-
A_4.0	-	-	10.2_1.6	-	-
B_4.0	-	-	10.3_1.6	-	-
C_4.0	-	-	10.4_1.6	-	-
D_4.0	-	-	10.5_1.6	-	-
F_4.0	-	-	10.6_1.6	-	-
I_4.0	-	-	10.7_1.6	-	-
J_4.0	-	-	10.8_1.6	-	-
K_4.0	-	-	BRANCO	-	-

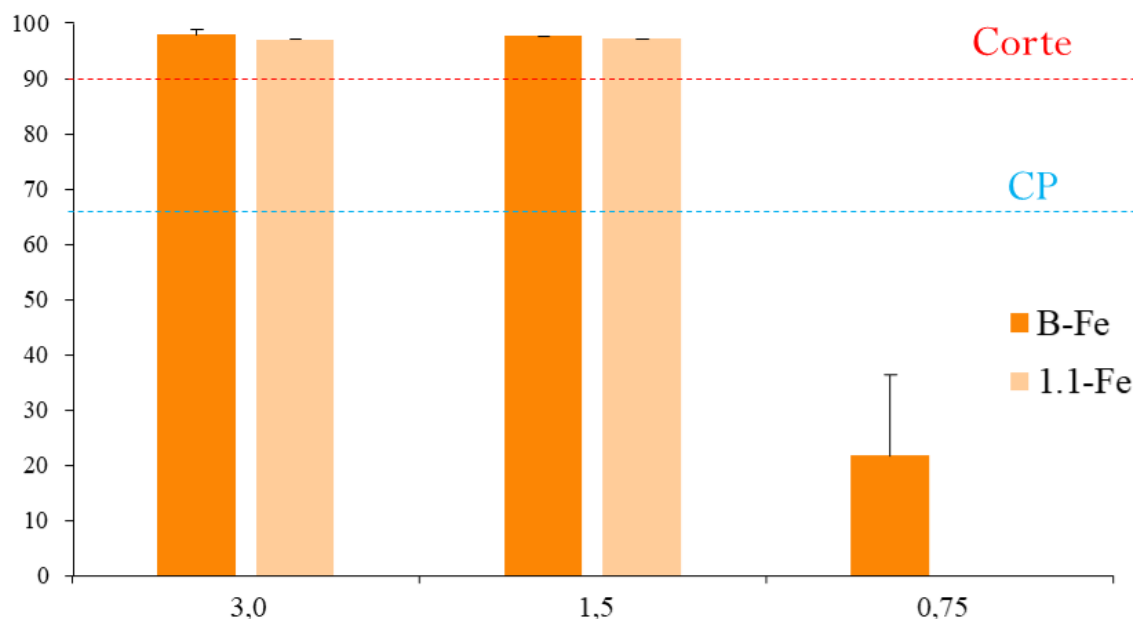
Intra: extrato intracelular. **Extra:** extrato extracelular. (+) positivo para inibição do crescimento celular. (-) Negativo para inibição do crescimento celular. **Valor de corte:** 90%. (Fonte: do autor)

Como mostrado na tabela acima, dos 122 extratos brutos testados apenas dois extratos brutos apresentaram bioatividade satisfatória ($\geq 90\%$), comprovando a dificuldade no controle de *X. albilineans* comparado a *X. citri*.

Ambos os extratos positivos são de origem extracelular, assim como observado em *X. citri*, extratos intracelulares mostraram resultados não satisfatórios.

5.2.3 REMA completo com os extratos brutos positivos

Na reavaliação dos dois extratos considerados positivos, ambos os extratos mantiveram seus potenciais inibitórios e os resultados estão apresentados na Figura 18.

Figura 18. Dose resposta dos extratos contra *X. albilineans*.

Média de inibição (%) do crescimento celular de *X. albilineans* em função da concentração (mg/mL) dos extratos bioativos testados, com barra de desvio padrão. **Corte:** 90%. **CP:** \cong 65%. (Fonte: do autor)

Nas concentrações de (3,0 e 1,5 mg/mL) os extratos tiveram um desempenho satisfatório (em torno de 97% de inibição do crescimento bacteriano) e muito superior ao controle positivo usado (canamicina) (\cong 65%). É importante ressaltar que para esta adaptação de protocolo foi testada uma concentração de 8 mg/mL de canamicina, que mesmo sendo mais de duas vezes maior que a concentração inicial dos extratos não atingiu 90% de inibição, evidenciando assim o potencial inibitório dos extratos brutos obtidos.

5.2.4 Concentração Mínima Inibitória (CIM90) dos extratos bioativos

A partir dos resultados da reavaliação foi possível calcular o valor de CIM90, ou seja, a concentração de extrato necessária para inibição de 90% das células bacterianas. Os valores de CIM90 dos dois extratos estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 5. Concentração Inibitória Mínima dos extratos para inibição celular de 90%.

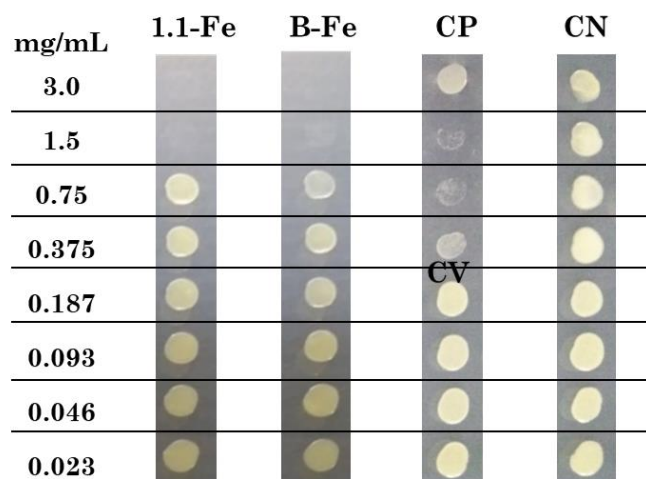
Extrato	CIM 90 (mg/mL)	R ²
1.1-FE	1,448	0,993
B-FE	1,411	0,9996

O valor de CIM90 foi muito próximo para ambos os extratos, em torno de 1,45 mg/mL. É importante ressaltar que este valor poderá ser menor à medida que os compostos bioativos forem purificados.

5.2.5 Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos bioativos

Durante o teste REMA completo foi possível fazer a avaliação quanto à atividade bactericida dos extratos bioativos. O resultado está apresentado na Figura 19.

Figura 19. Bioensaio bactericida contra *X. albilineans*.



(Fonte: do autor)

Como observado, ambos os extratos mostraram caráter bactericida contra *X. albilineans*. Até a concentração de 1,5 mg/mL não há crescimento de colônias bacterianas. Este resultado se mostra muito promissor, principalmente tendo em vista que o controle positivo (CP) não foi capaz de inibir o crescimento celular completamente.

5.3 Identificação dos fungos produtores de extratos bioativos

Dos nove fungos produtores de extratos positivos contra *X. citri* subsp. *citri*, sete (2-FE, 3.1-FE, 6-FE, 11-FE, B-FE, C-FE e G-FE) foram identificados como pertencentes ao gênero *Pseudogymnoascus*, o fungo D-FE, por sua vez, foi identificado como pertencente ao gênero *Cladosporium* e o isolado K_4.0 ainda não foi identificado.

No bioensaio contra a *X. albilineans* os dois fungos bioativos (B-FE e 1.1-FE) pertencem também ao gênero *Pseudogymnoascus*, sendo que o B-FE foi positivo também contra a *X.citri*. Os fungos bioativos (em sua maioria) estão apresentados na Figura 23 em anexo 1.

O gênero *Pseudogymnoascus* pode ser encontrado por todo o planeta, até mesmo em ambientes com condições extremas (HAYES, 2012), como a Antártica (BRIDGE e SPOODER, 2012; GODINHO *et al.*, 2015). Wentzel et al (2018) reporta este gênero como o mais abundante em amostras de solo e sedimentos marinhos da Antártica. Além disso, este

gênero possui comprovada atividade antimicrobiana (FURBINO *et al.*, 2014; GONÇALVES *et al.*, 2015).

Henriquez *et al.* (2014) indica bioatividade de isolados pertencentes ao gênero *Geomyces* (*Pseudogymnoascus*) contra *X. campestris*. Mais recentemente, estudos do nosso grupo de pesquisa mostraram que isolados antárticos pertencentes ao gênero *Pseudogymnoascus* apresentaram bioatividade contra *X. citri*, *X. euvesicatoria*, *X. axonopodis* pv. *passiflorae* e *X. axonopodis* pv. *manihotis* (VIEIRA *et al.*, 2018; PURIC *et al.*, 2018; FONSECA, 2018). Seguindo esta linha, o presente trabalho contribui para a literatura atual mostrando que representantes do gênero *Pseudogymnoascus* podem apresentar bioatividade também contra *X. albilineans*, resultado inédito até então.

É importante ressaltar que mesmo com as crescentes descobertas sobre atividade antimicrobiana de *Pseudogymnoascus*, pesquisas sobre isolamento de compostos produzidos por este gênero ainda são escassas na literatura.

O gênero *Cladosporium* também é encontrado na região Antártica (ARENS *et al.*, 2006; BRIDGE and SPOONER, 2012; WENTZEL *et al.*, 2018), sendo o fungo mais comumente encontrado em associação com musgos e algas da região (TOSI *et al.*, 2002). Estudos apontam para a produção de compostos antimicrobianos por membros deste gênero (ZHANG *et al.*, 2001; XIONG *et al.*, 2009; LIANG *et al.*, 2018). O gênero *Cladosporium* é capaz de produzir compostos como ácido 3-fenil-2-propenoico (TARUS *et al.*, 2003), com caráter antibacteriano (QI *et al.*, 2009) e Puric *et al.* (2018) mostra que isolados pertencentes ao gênero *Cladosporium* podem ser capazes de inibir o crescimento de *X. euvesicatoria*, *X. axonopodis* pv. *passiflorae* e *X. citri*.

(Dai *et al.* 2006), 3-phenyl-2-propenoic acid (5), 2-phenylethanol (6) (Tarus *et al.* 2003), bis(2-ethylhexyl)phthalate (7) (Uyeda *et al.* 1990), cyclo-(Phe-Pro) (8) (Adamczeski *et al.* 1995), and cyclo(Val-Pro) (9)

Assim, o presente estudo apresentando bioatividade de *Cladosporium* contra *X. citri*, visa corroborar com as descobertas nesta área de pesquisa, uma vez que estudos de *Cladosporium* contra o gênero *Xanthomonas* ainda são escassos.

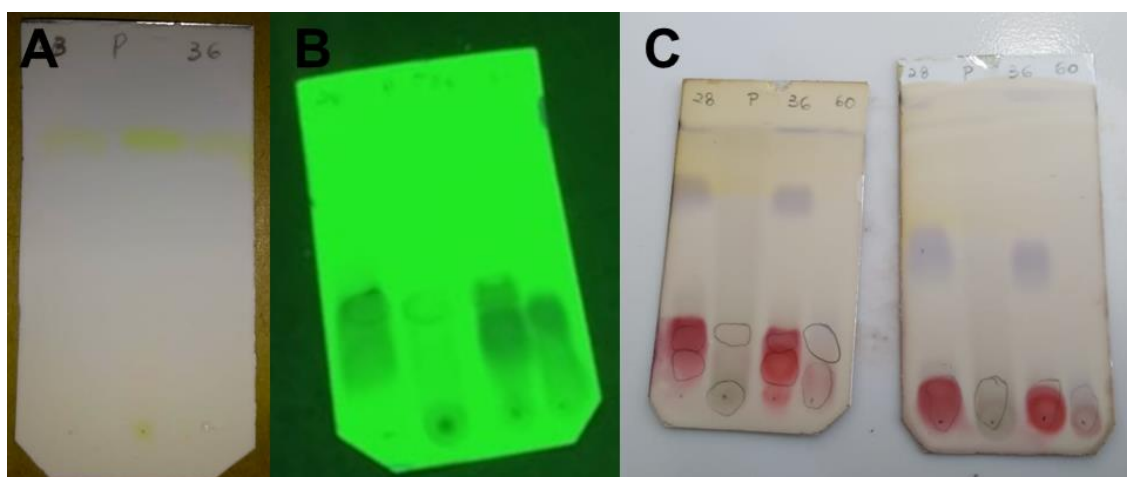
5.4 Fracionamento do extrato bioativo B-FE (*Pseudogymnoascus*)

Para o fracionamento foi escolhido o extrato B-FE, uma vez que ele mostrou potencial inibitório para ambas as fitobactérias.

A primeira parte do fracionamento foi realizada utilizando coluna cromatográfica de 50 mL com Sílica Gel 60 como fase estacionária. Foi utilizada fase móvel gradiente composta por: acetato de etila e hexano (6:4; 8:2); acetato; metanol.

As frações foram coletadas a cada 500 μ L, totalizando 400 frações. Cada uma delas foi analisada em CCD conforme descrito no item 4.6 (Figura 20). As frações foram agrupadas por similaridade química, e ao final do fracionamento foram obtidas oito frações de interesse.

Figura 20. Análise em Cromatografia de Coluna Delgada (CCD).



(A) Placa de sílica gel após aplicação de frações e corrida de solvente. (B) Análise de compostos em câmara ultravioleta. (C) Análise de compostos por revelador *p*-anisaldeído. (Fonte: do autor)

Estas oito frações foram submetidas à avaliação frente a *X. citri* a fim de avaliar qual fração era responsável pela inibição no extrato bruto. A avaliação foi feita através de um novo REMA, cuja concentração inicial testada no primeiro poço foi de 1,6 mg/mL, tendo em vista que as frações estavam mais puras e conseqüentemente seria necessária uma menor quantidade para causar a inibição de crescimento. Neste ponto, três frações apresentaram potencial inibitório significativo, como mostra a Tabela 8.

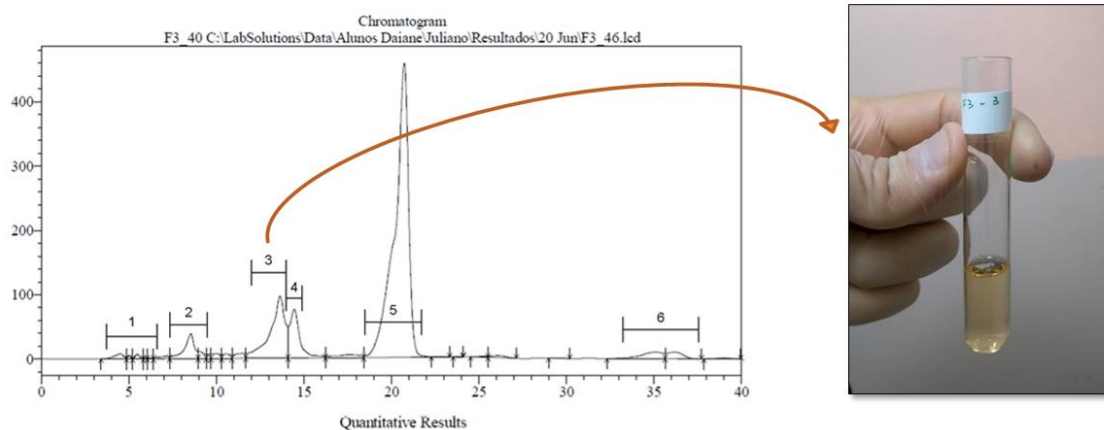
Tabela 6. Valores médios de inibição do crescimento bacteriano das frações em 1,6 mg/mL.

Frações Bioativas	Inibição do Crescimento Bacteriano (%)
FI	97,21 \pm 0,21
FII	97,09 \pm 0,06
FIII	97,46 \pm 0,09
Controle Positivo	94,91 \pm 0,45

Considerando que a fração FII apresentou maior quantidade em massa (5,8 mg) esta foi escolhida para prosseguir para a segunda etapa de purificação em CLAE.

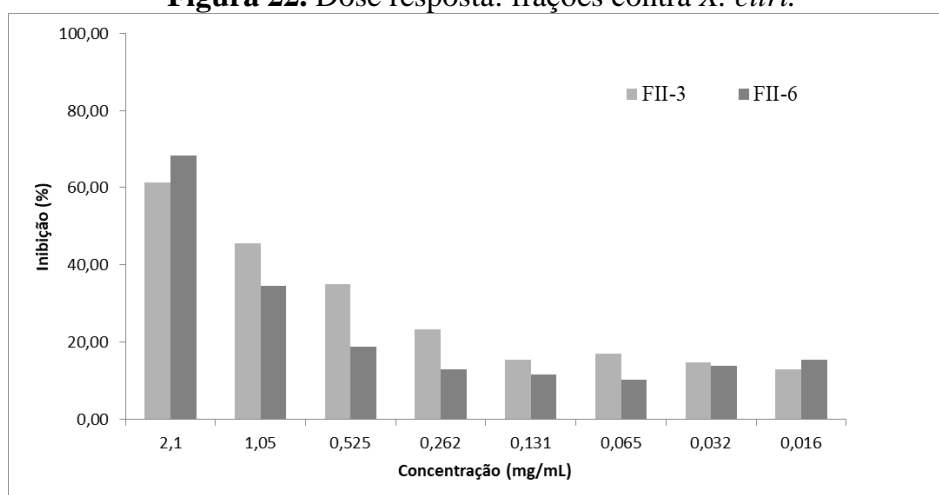
O cromatograma da amostra bioativa FII está representada na Figura 21. As frações foram coletadas como apresentada na Figura 21 e nomeadas de FII-1 a FII-6.

Figura 21. Cromatograma da fração bioativa FII em CLAE.



Todas as frações foram submetidas a um novo bioensaio REMA contra a *X. citri*, sendo que as amostras FII-3 e FII-6 mostraram inibição de 61,4% e 68,2%, respectivamente, na maior concentração testada (2,1 mg/mL) contra *X. citri*, como mostrado na Figura 22. Ambas as frações foram enviadas para análise de espectroscopia de massas, entretanto até o momento a análise não foi realizada.

Figura 22. Dose resposta: frações contra *X. citri*.



6 CONCLUSÃO

O protocolo REMA foi capaz de avaliar *in vitro* a eficiência dos extratos produzidos frente às bactérias alvo deste trabalho. Assim, foram selecionados 10 extratos (2-FE, 3.1-FE, 6-FE, 11-FE, B-FE, C-FE, D-FE, G-FE, K_4.0) com bioatividade significativa ($\geq 90\%$), sendo oito deles capazes de inibir o crescimento de *X. citri*, um capaz de inibir o crescimento de *X. albilineans* e um bioativo para ambas espécies.

Os extratos de B-FE e 3.1-FE se apresentaram promissores, o de B-FE (*Pseudogymnoascus*) por apresentar boa atividade contra ambas as bactérias, mantendo bioatividade contra *X. citri* mesmo após o fracionamento. Já o de 3.1-FE se destaca por apresentar uma MIC90 muito inferior aos demais.

REFERÊNCIAS

- AGEITEC (Agência Embrapa de Informação e Tecnologia). Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_78_22122006154841.html.
- AMORIM, M. S. Desempenho inicial de combinações copa e porta-enxerto de citros no Litoral Norte do Estado da Bahia. 2016.
- ARENZ, B. E. *et al.* Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross Sea Region of Antarctica. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, n. 10, p. 3057-3064, 2006.
- BEHLAU, F.; BELASQUE, J. Cancro cítrico: a doença e seu controle. **Fundecitrus, Araraquara, Brasil**, 2014.
- BITANCOURT, A. A. O cancro cítrico. **O biológico**, v. 23, n. 10, 1957.
- BRASIL. Instrução Normativa n. 37 de 5 de setembro de 2016. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, 6 de set. 2016. Seção 1, p. 1-17
- BRIDGE, P. D.; SPOONER, B. M. Non-lichenized Antarctic fungi: transient visitors or members of a cryptic ecosystem?. **Fungal ecology**, v. 5, n. 4, p. 381-394, 2012.
- BRUNETTO, G. *et al.* Copper accumulation in vineyard soils: Rhizosphere processes and agronomic practices to limit its toxicity. **Chemosphere**, v. 162, p. 293-307, 2016.
- CABI. *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. In: Invasive Species Compendium. Wallingford, UK: CAB International, 2017.
- CALVO, A. M. *et al.* Relationship between secondary metabolism and fungal development. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 66, n. 3, p. 447-459, 2002.
- CARVALHO, M. A.; SILVA, C. R. L.; NETO, Afonso N. Exportações brasileiras de produtos agrícolas e mudanças na demanda mundial de alimentos. **Economia e Sociedade**, v. 13, n. 2, p. 133-145, 2016.
- COKER, J. A. Extremophiles and biotechnology: current uses and prospects. **F1000Research**, v. 5, 2016.
- CORNU, J. *et al.* Bioremediation of copper-contaminated soils by bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 26, 2017.
- COSTA, C. C. da; GUILHOTO, J. J. M.; IMORI, D. Importância dos setores agroindustriais na geração de renda e emprego para a economia brasileira. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 51, n. 4, p. 787-814, 2013.
- DAS, A. K. Citrus canker - A review. **Journal of Applied Horticulture**, v. 5, n. 1, p. 52-60, 2003.

DAYAN, Franck E.; CANTRELL, Charles L.; DUKE, Stephen O. Natural products in crop protection. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 17, n. 12, p. 4022-4034, 2009.

DE MORAES, M. A. F. D.; ZILBERMAN, D. **Production of Ethanol from Sugarcane in Brazil: From State Intervention to a Free Market**. Springer Science & Business Media, 2014.

DO AMARAL, A. M. Cancro cítrico: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2003.

EMERY, F. S., SANTOS, Gabriela B., BIANCHI, Rita C. *A Química na Natureza*. Rio de Janeiro: Ministério da Educação, Coleção Química no Cotidiano, v.1, p. 70, 2010.

ENCHEVA-MALINOVA, M. *et al.* Antibacterial potential of streptomycete strains from Antarctic soils. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 28, n. 4, p. 721-727, 2014.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/x0262e/x0262e06.htm>

FONSECA, M. G. Bioatividade de extratos de fungos da Antártica no combate a bacterioses da mandioca, tomate e pimentão causadas por *Xanthomonas* ssp. 2018.

FUNDECITRUS (Fundo de Defesa da Citricultura), 2017. <https://www.fundecitrus.com.br/levantamentos/cancro-citrico>

FUNDECITRUS (Fundo de Defesa da Citricultura), 2018. <https://www.fundecitrus.com.br/levantamentos/cancro-citrico>

FUNDECITRUS (Fundo de Defesa da Citricultura). Revista Citricultor, 2018.

FURBINO, L. E. *et al.* Diversity patterns, ecology and biological activities of fungal communities associated with the endemic macroalgae across the Antarctic Peninsula. **Microbial ecology**, v. 67, n. 4, p. 775-787, 2014.

GILIO, L.; CASTRO, N. R. Avaliação de aspectos limitantes ao crescimento do etanol e o setor sucroenergético no Brasil. **Revista Eletrônica de Energia**, v. 6, n. 1, 2017.

GODINHO, V. M. *et al.* Diversity and bioprospection of fungal community present in oligotrophic soil of continental Antarctica. **Extremophiles**, v. 19, n. 3, p. 585-596, 2015.

GONÇALVES, V. N. *et al.* Antibacterial, antifungal and antiprotozoal activities of fungal communities present in different substrates from Antarctica. **Polar Biology**, v. 38, n. 8, p. 1143-1152, 2015.

GOTTWALD, T. R. *et al.* Geo-referenced spatiotemporal analysis of the urban citrus canker epidemic in Florida. **Phytopathology**, v. 92, n. 4, p. 361-377, 2002.

GRAHAM, J. H.; LEITE JR, R. P. Lack of control of citrus canker by induced systemic resistance compounds. **Plant Disease**, v. 88, n. 7, p. 745-750, 2004.

HAYES, M. A. The *Geomyces* fungi: ecology and distribution. **BioScience**, v. 62, n. 9, p. 819-823, 2012.

HENRÍQUEZ, M. *et al.* Diversity of cultivable fungi associated with Antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial, antitumoral and antioxidant potential. **World journal of microbiology and biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 65-76, 2014.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA), 2018. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/pesquisa/lspa/tabelas>

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Produção Agrícola Municipal (PAM), 2017. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pam/tabelas>

IGARASHI, Yasuhiro *et al.* Rakicidin D, an inhibitor of tumor cell invasion from marine-derived *Streptomyces* sp. **The Journal of antibiotics**, v. 63, n. 9, p. 563, 2010.

JACOB, T. R. **Análise da expressão dos genes pertencentes aos sistemas secretórios Tipo III e Tipo IV e genes pthAs em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* sob condições infectante e não infectante.** 2009.

KRISHNAMOORTHY, Ganesh *et al.* Synergy between active efflux and outer membrane diffusion defines rules of antibiotic permeation into Gram-negative bacteria. **MBio**, v. 8, n. 5, p. e01172-17, 2017.

LEYNS, F. *et al.* The host range of the genus *Xanthomonas*. **The Botanical Review**, v. 50, n. 3, p. 308-356, 1984.

LIANG, X. *et al.* Unstable Tetramic Acid Derivatives from the Deep-Sea-Derived Fungus *Cladosporium sphaerospermum* EIODSF 008. **Marine drugs**, v. 16, n. 11, p. 448, 2018.

LIMA, G. M. A. **Estudos estruturais e moleculares da enzima fosfopanteteinil transferase de *Xanthomonas albilineans*: alvo molecular para o desenvolvimento de novos agroquímicos para cultura de cana-de-açúcar.** 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

LIU, Qing-Ai *et al.* Antifouling and fungicidal resorcylic acid lactones from the sea anemone-derived fungus *Cochliobolus lunatus*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 14, p. 3183-3191, 2014.

LOPES, S. A.; DAMANN, K. E.; GRELEN, L. B. *Xanthomonas albilineans* diversity and identification based on rep-PCR fingerprints. **Current Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 155-159, 2001.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock-14ª Edição.** Artmed Editora, 2016.

MAI-PROCHNOW, Anne *et al.* Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. **Scientific reports**, v. 6, p. 38610, 2016.

MAZZONCINI, M. *et al.* Comparison of organic and conventional stockless arable systems: a multidisciplinary approach to soil quality evaluation. **Applied soil ecology**, v. 44, n. 2, p. 124-132, 2010.

MICHEREFF, S. J. Fundamentos de fitopatologia. **Recife-PE: UFRPE**, 2001.

MONCHEVA, P. *et al.* Characteristics of soil actinomycetes from Antarctica. 2002.

NAMEKATA T. O Cancro cítrico. *In*: RODRIGUEZ O. et al (Ed.). **Citricultura brasileira**. 2 ed., p.775-786, 1991.

NEMETH, Johannes; OESCH, Gabriela; KUSTER, Stefan P. Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics for patients with serious bacterial infections: systematic review and meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 2, p. 382-395, 2015.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G. Anuário da citricultura 2017. **São Paulo: CitrusBR**, 2017.

PIERETTI, I. *et al.* What makes *Xanthomonas albilineans* unique amongst xanthomonads?. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 289, 2015.

PIKUTA, E. V.; HOOVER, Richard B.; TANG, Jane. Microbial extremophiles at the limits of life. **Critical reviews in microbiology**, v. 33, n. 3, p. 183-209, 2007.

PURIĆ, J. *et al.* Activity of Antarctic fungi extracts against phytopathogenic bacteria. **Letters in applied microbiology**, v. 66, n. 6, p. 530-536, 2018.

QI, Shu-Hua et al. Antifouling and antibacterial compounds from a marine fungus *Cladosporium* sp. F14. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 399, 2009.

QIAO, Yichun et al. AP-1 is a key regulator of proinflammatory cytokine TNF α -mediated triple-negative breast cancer progression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 10, p. 5068-5079, 2016.

RAJAGOPAL, L. *et al.* The bacterial pigment xanthomonadin offers protection against photodamage. **FEBS letters**, v. 415, n. 2, p. 125-128, 1997.

RODRIGUEZ-R, L. M. *et al.* Genomes-based phylogeny of the genus *Xanthomonas*. **BMC microbiology**, v. 12, n. 1, p. 43, 2012..

RYAN, R. P. *et al.* Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium–plant interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 344, 2011

ROCHA, C. H. B.; DE AZEVEDO, L. P.. Avaliação da presença de metais pesados nas águas superficiais da Bacia do Córrego São Mateus, Juiz de Fora (MG), Brasil. **Revista Espinhaço UFVJM**, p. 33-44, 2017.

ROSSETTI, V. **Identificação do cancro cítrico**. DFA, 1984.

ROSSETTI, V. Doenças dos citros causadas por algas, fungos, bactérias e vírus. 1993.

SEGURA-MUÑOZ, S. I. **Impacto ambiental na área do aterro sanitário e incinerador de resíduos sólidos de Ribeirão Preto, SP: Avaliação dos níveis de metais pesados.** 131p. Tese. *Saúde Ambiental*, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

SANTIAGO, I. F. *et al.* Leishmanicidal and antitumoral activities of endophytic fungi associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. **Extremophiles**, v. 16, n. 1, p. 95-103, 2012.

SCOLARI, Dante DG. Produção agrícola mundial: o potencial do Brasil. **Área de Informação da Sede-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2012.

SILVA, I. C. *et al.* Antibacterial activity of alkyl gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Journal of bacteriology**, v. 195, n. 1, p. 85-94, 2013.

SILVA, M. D. S. E.; BEDENDO, I.; CASAGRANDE, M. Caracterização molecular e patogênica de isolados de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson agente causal escaldadura da cana de açúcar. **Summa Phytopathology**, v. 33, p. 341-347, 2005.

SILVA, I. C.; FERREIRA, H. Drug sensitivity assay of *Xanthomonas. citri* subsp. *citri* using REMA plate method. **Journal of Bacteriology**, 2013.

SVAHN, K. S. *et al.* *Penicillium nalgiovense* Laxa isolated from Antarctica is a new source of the antifungal metabolite amphotericin B. **Fungal biology and biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 1, 2015.

TARUS, P, K. *et al.* Bioactive metabolites from *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma longibrachiatum*. **Bull Chem Soc Ethiop** 17:185–190. 2003.

TESSMANN, C. **Caracterização Molecular de Xanthomonas campestris pv pruni pela técnica de RAPD e relação da planta hospedeira e com a produção, viscosidade e composição química da xantana.** 2002.

TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da Cana-de-Açúcar. *In*: KIMATI H. *et al.* (Ed.). *Manual de Fitopatologia*. 4ed. São Paulo, 197-223p. 2005

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**, 10ed, Porto Alegre, 2012.

TOSI, S. *et al.* Fungi isolated from Antarctic mosses. **Polar Biology**, v. 25, n. 4, p. 262-268, 2002.

UNICA (União Da Indústria De Cana-De-Açúcar), 2016. Disponível em: <http://www.unicadata.com.br/index.php>

VIEIRA, Gabrielle *et al.* Terrestrial and marine Antarctic fungi extracts active against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Letters in applied microbiology**, 2018.

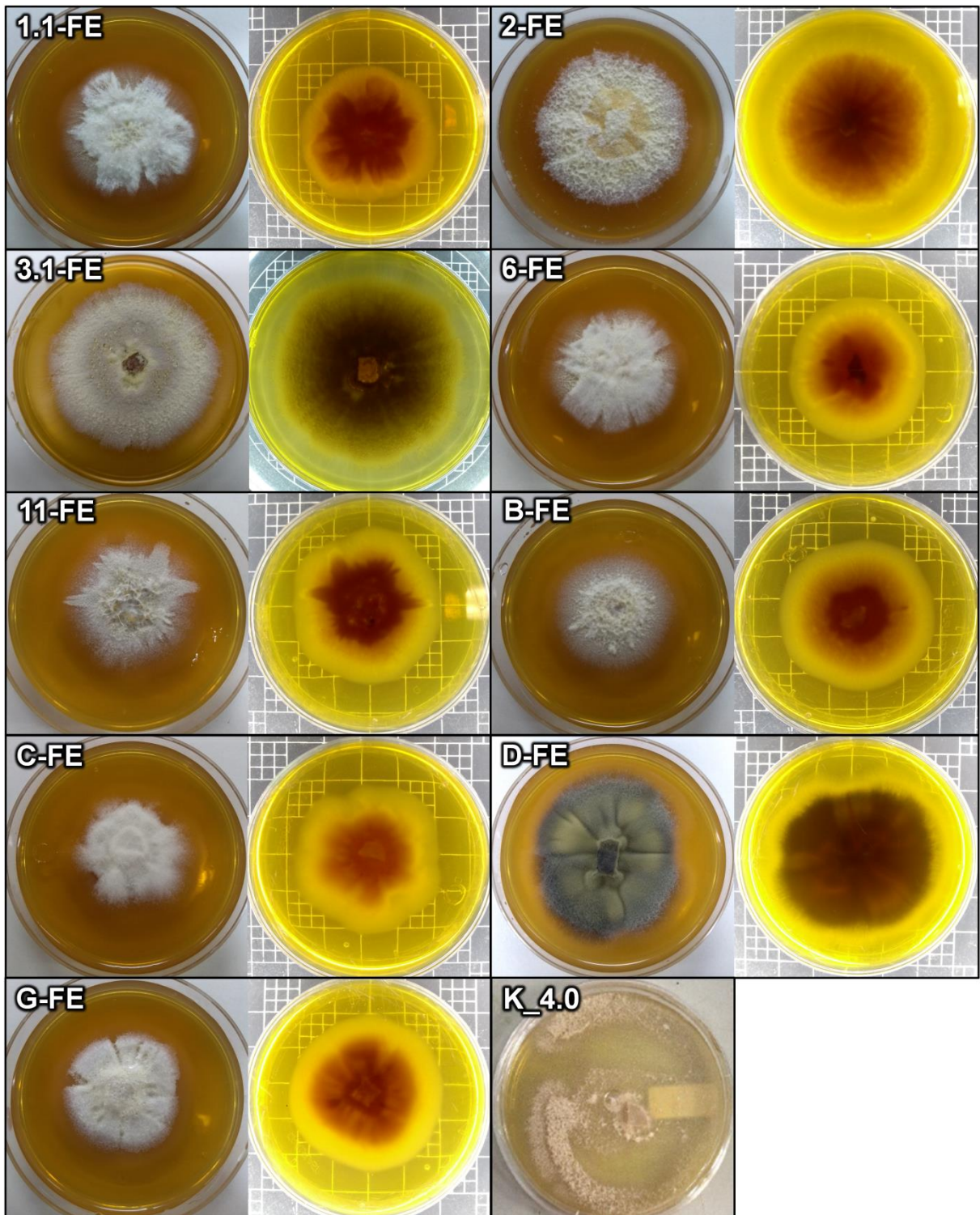
VIEIRA FILHO, José E. R. O. *et al.* Agricultura, transformação produtiva e sustentabilidade. 2016.

WENTZEL, L. C. P. *et al.* Fungi from Admiralty Bay (King George Island, Antarctica) Soils and Marine Sediments. **Microbial ecology**, p. 1-13, 2018.

XIONG, H. *et al.* Antibiotic and antifouling compound production by the marine-derived fungus *Cladosporium* sp. F14. **Journal of Hydro-environment Research**, v. 2, n. 4, p. 264-270, 2009.

ZHANG, H. *et al.* Cladospolide D, a new 12-membered macrolide antibiotic produced by *Cladosporium* sp. FT-0012. **The Journal of antibiotics**, v. 54, n. 8, p. 635-641, 2001.

ANEXO I
Figura 23. Fungos bioativos



ANEXO II

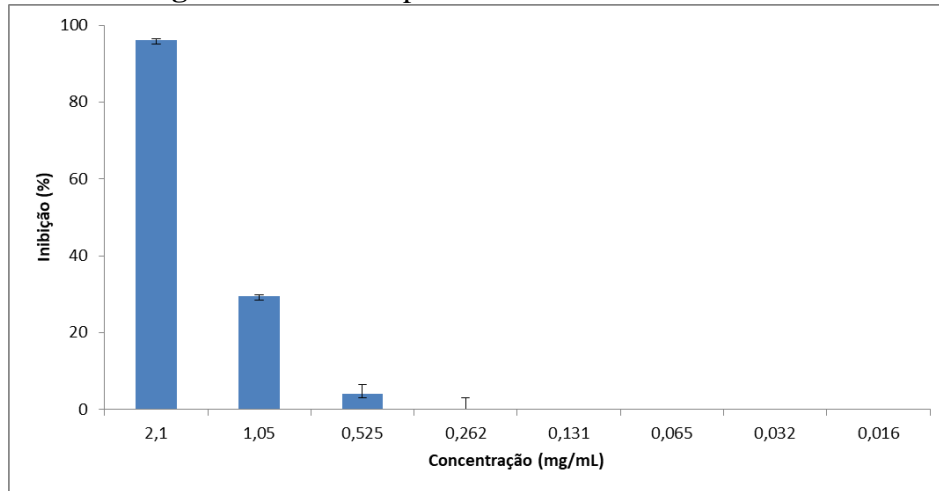
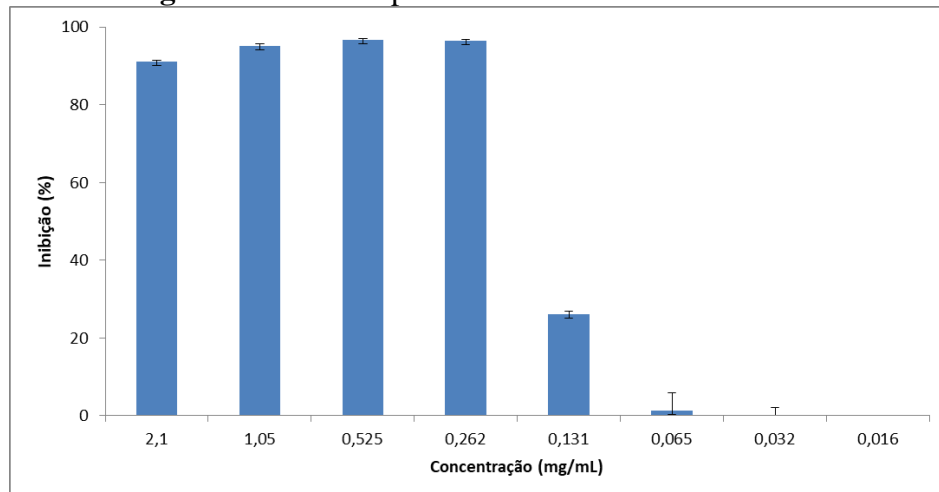
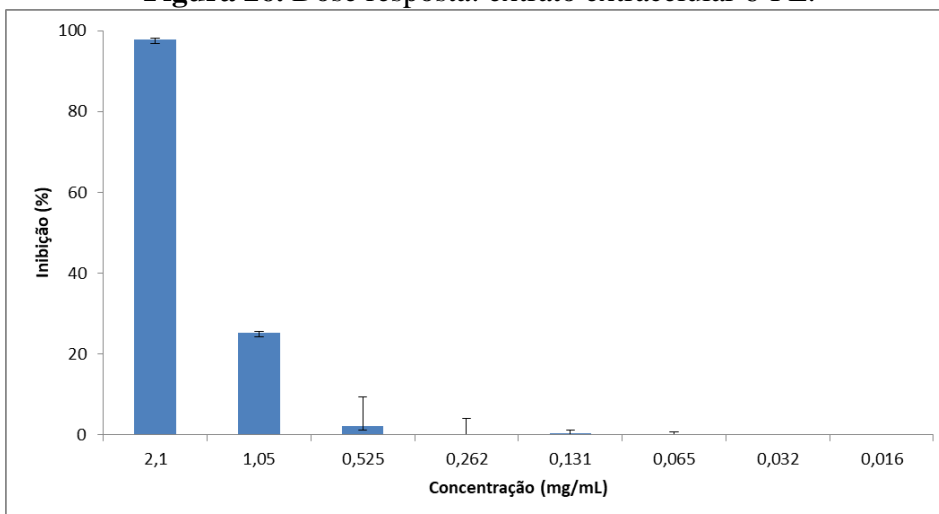
Figura 24. Dose resposta: extrato extracelular 2-FE.**Figura 25.** Dose resposta: extrato extracelular 3.1-FE.**Figura 26.** Dose resposta: extrato extracelular 6-FE.

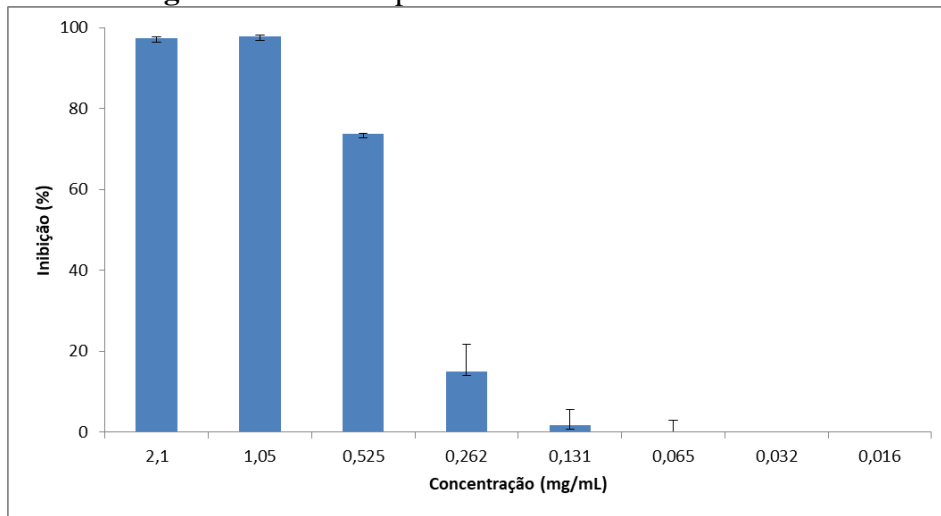
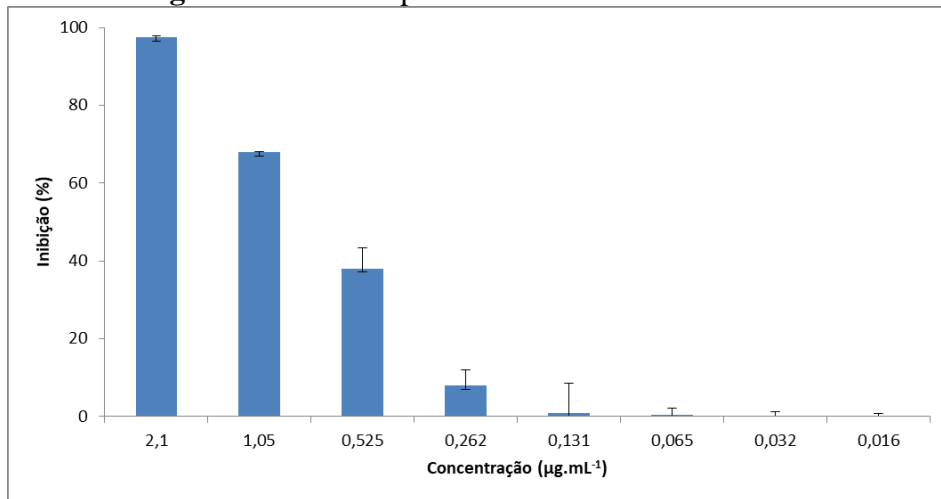
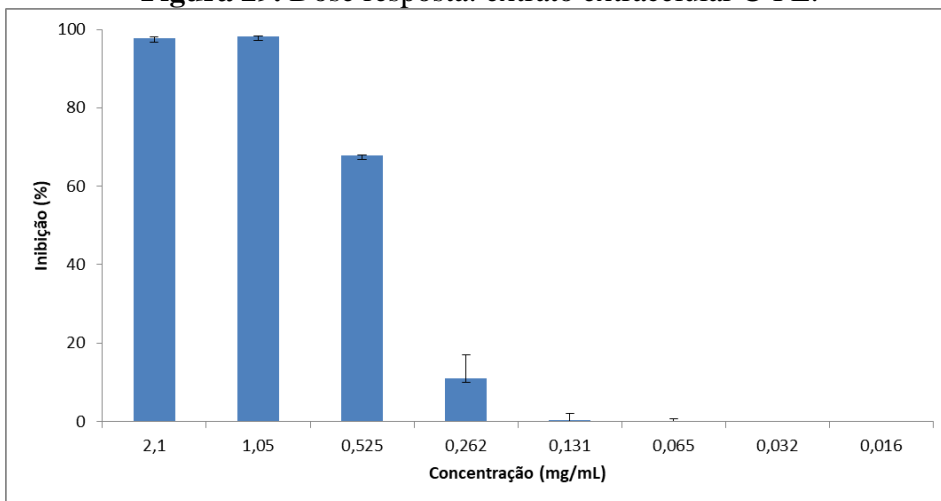
Figura 27. Dose resposta: extrato extracelular 11-FE.**Figura 28.** Dose resposta: extrato extracelular B-FE.**Figura 29.** Dose resposta: extrato extracelular C-FE.

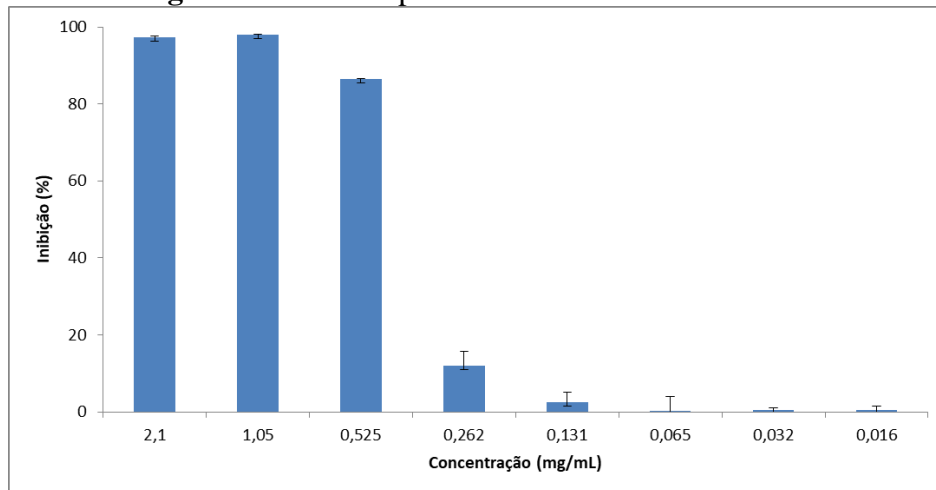
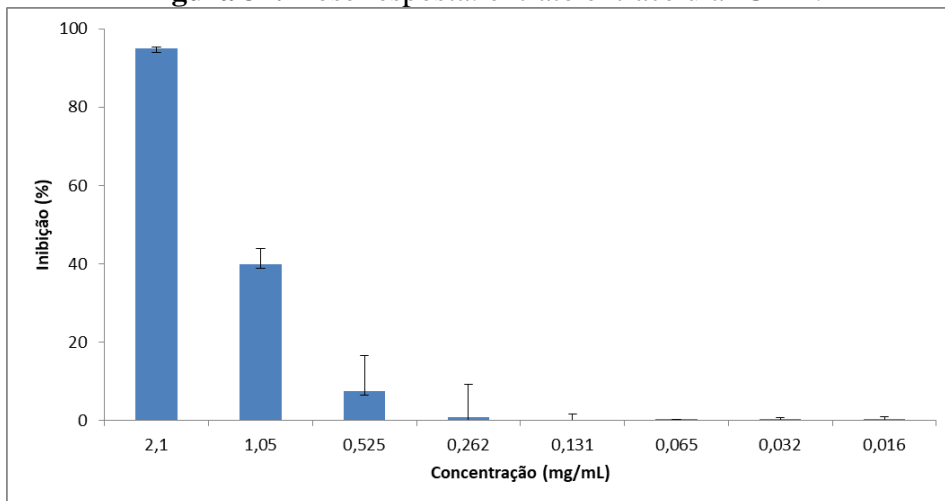
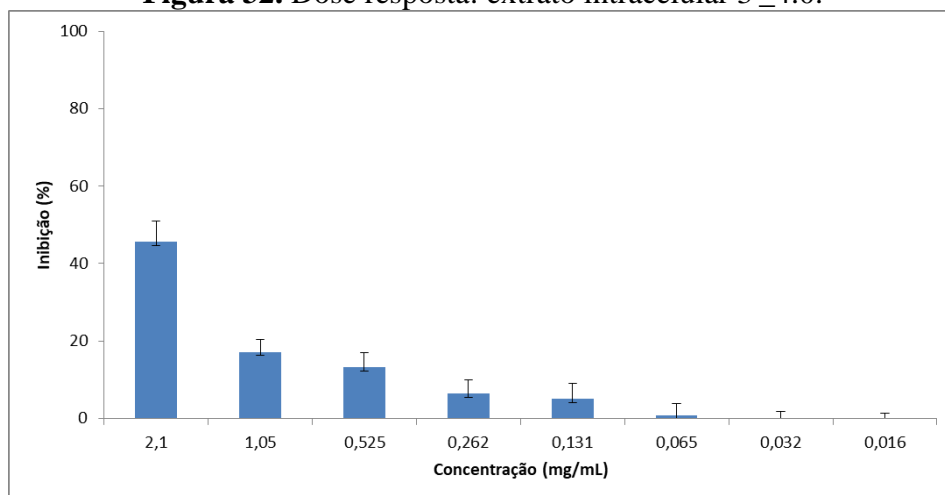
Figura 30. Dose resposta: extrato extracelular D-FE.**Figura 31.** Dose resposta: extrato extracelular G-FE.**Figura 32.** Dose resposta: extrato intracelular 3'_4.0.

Figura 33. Dose resposta: extrato extracelular K_4.0