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

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE METABÓLITOS DE
FUNGOS DA RIZOSFERA DA LARANJA NO COMBATE AO CANCRO CÍTRICO**

CHARLES MULLER FREIRE OLIVEIRA

**Rio Claro – SP
2021**

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

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE METABÓLITOS DE
FUNGOS DA RIZOSFERA DA LARANJA NO COMBATE AO CANCRO CÍTRICO**

CHARLES MULLER FREIRE OLIVEIRA

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

**Rio Claro – SP
2021**

O48a Oliveira, Charles Muller Freire
Avaliação do potencial biotecnológico de metabólitos de fungos da rizosfera da laranja no combate ao cancro cítrico / Charles Muller Freire Oliveira. -- Rio Claro, 2021
85 p. : il., tabs., fotos

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

1. Microbiologia. 2. Biotecnologia. 3. Fungos do solo. 4. Xanthomonas citri. 5. Citrus sinensis. 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: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS DA RIZOSFERA DA LARANJA NO COMBATE AO CANCRO CÍTRICO

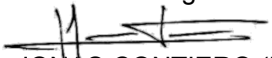
AUTOR: CHARLES MULLER FREIRE OLIVEIRA

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:

Daiane Cristina Sass

Profa. Dra. DAIANE CRISTINA SASS (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro


Prof. Dr. JONAS CONTIERO (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro

Luana Galvão Morão
Profa. Dra. LUANA GALVÃO MORÃO (Participação Virtual)
Pós-Doutoranda do Instituto de Física de São Carlos / Universidade de São Paulo

Rio Claro, 08 de dezembro de 2021

Título alterado para: "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE METABÓLITOS DE FUNGOS DA RIZOSFERA DA LARANJA NO COMBATE AO CANCRO CÍTRICO"

Sucesso significa realizar seus próprios sonhos,
cantar sua própria canção, dançar sua própria dança, criar do seu coração e,
apreciar a jornada confiando que não importa o que aconteça, tudo ficará bem.

Elana Lindquist

Dedico a minha mãe, Maria Conceição do Socorro Freire Oliveira que, sempre foi minha maior apoiadora, inspiração e exemplo para lutar com todas as forças por aquilo que eu acredito.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Conceição e Hildenir, por todo o suporte e por sempre acreditarem em mim;

À Ana Paula Cavalcante, Geovane Biase, Higor Bantim, Sárkia Silva e João Farias por todos os momentos que vocês acreditaram em mim quando eu não acreditava;

À Profa. Dra. Daiane Cristina Sass pela orientação, confiança, por ter sido um exemplo e, ter me mostrado como o meio acadêmico pode ser leve e empático;

À Profa. Dra. Derlene Atilli de Angelis pela Co orientação, pelas amostras que foram cedidas, pela ajuda durante os experimentos e por todos os ensinamentos;

À UNESP e o Departamento de Bioquímica e Microbiologia que foram meu lar pelos últimos anos;

A todos os amigos que fiz em Rio Claro: Morgana Turunday, Caroline Jonas, Thais Tiemi, Jaqueline Matos, Patrícia Giovanella, Mariana Costa, Ariane Lopes, Arthur de Lima, Matheus, Camila Vieira, Tatiane Pietrobon, Elisa Pelizzer entre outros por todos os momentos felizes e tristes que foram compartilhados, sem vocês essa jornada não teria sido cheia de realizações e companheirismo;

A todos os amigos e companheiros do Laboratório de Química e Biotecnologia Microbiana: Vitor, Gabrielle, Juliano, Lucas, Jullyana e Isabela por toda a ajuda e ensinamentos durante esse processo;

Aos membros do Laboratório de Genética de Bactérias, do Prof. Dr. Henrique Ferreira, pela assistência, espaço e atenção durante este período;

Ao Departamento de Bioquímica e Microbiologia e todos os seus membros;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento do projeto, Processo 2018/11747-3;

A todos que fizeram parte da minha vida nestes últimos anos e contribuíram para a realização deste trabalho.

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

RESUMO

O cancro cítrico é uma doença causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* que ataca espécies de citrus de importância comercial. Para atenuar perdas, a atual forma de controle da doença envolve pulverização de compostos contendo metais pesados como cobre em sua composição. Tais medidas têm causado grande impacto ambiental devido ao acúmulo destes no solo e por toda a cadeia trófica. Por este motivo, a procura de metabólitos produzidos por micro-organismos tem se tornado crescente nos últimos anos. O objetivo deste trabalho é obter metabólitos obtidos de fungos e/ou extratos fúngicos com potencial atividade contra *X. citri* subsp. *citri*. Neste trabalho 16 extratos brutos provenientes do cultivo de fungos isolados da rizosfera da laranja *Citrus sinensis* foram submetidos a ensaios para avaliação do seu potencial inibitório contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Os metabólitos foram produzidos em malte 2% em uma temperatura média de 28°C à 120rpm por 20 dias. A fase líquida foi extraída usando acetato de etila. Os extratos foram concentrados e dissolvidos em Dimetilsulfóxido (DMSO). O inóculo bacteriano foi preparado utilizando meio NYG à 29°C em 200rpm overnight. O bioensaio antibacteriano foi realizado utilizando o ensaio de micro diluição seriada em microplaca de 96 poços, utilizando como indicador resazurina (REMA). A avaliação da atividade inibitória quantitativamente foi realizada utilizando espectrômetro de fluorescência, permitindo verificar a quantidade de células mortas. Dentre os extratos testados 4 apresentaram concentrações inibitórias satisfatória acima de 80%, sendo eles o LMA 1957, LMA 1923, LMA 1844 e LMA 1840. O extrato LMA 1957 apresentou concentrações inibitórias elevadas mesmo nas menores concentrações testadas e, portanto, foi a linhagem escolhida para os testes em planta e purificação onde, após reavaliação de sua atividade inibitória apresentou inibição em concentrações ainda mais baixas acima de 90% na concentração de 0,88µg/mL. Mesmo após o teste em planta em condições diferentes das encontradas no laboratório com análises *in vitro* e a purificação do extrato os resultados foram considerados satisfatórios. Sendo, no entanto, necessário realizar a identificação destes compostos e análise de toxicidade até a obtenção do resultado final.

Keywords: *Xanthomonas citri*, REMA, *Citrus sinensis*, *Talaromyces* sp.

ABSTRACT

Citrus canker is a disease caused by the bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* that attacks commercially important citrus species. To mitigate losses, the current form of control of the disease involves spraying compounds containing heavy metals in their composition. Such measures have caused great environmental impact due to the accumulation of these metals in the soil and throughout the trophic chain. For this reason, the search for metabolites produced by microorganisms has become increasing in recent years. The objective of this work is to obtain fungi and/or fungal extracts with potential activity against *X. citri* subsp. *citri*. In this work 16 crude extracts from fungi isolated from the rhizosphere of *Citrus sinensis* orange were submitted to assays to evaluate their inhibitory potential against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Metabolites were produced in 2% malt at an average temperature of 28°C at 120rpm for 20 days. The liquid phase was extracted using ethyl acetate. The extracts were concentrated and dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). The bacterial inoculum was prepared using NYG medium at 29°C at 200rpm overnight. The antibacterial bioassay was performed using serial micro dilution assay in 96-well microplate using resazurin (REMA) as indicator. The evaluation of the inhibitory activity quantitatively was performed using fluorescence spectrometer, allowing to verify the amount of dead cells. Among the tested extracts, 4 presented satisfactory inhibitory concentrations above 80%, being LMA 1957, LMA 1923, LMA 1844 and LMA 1840. The extract LMA 1957 showed high inhibitory concentrations even at the lowest concentrations tested and, therefore, was the strain chosen for the plant and purification tests where, after reevaluating its inhibitory activity, it showed inhibition at even lower concentrations above 90% at the concentration of 0.88µg/mL. Even after the plant test under different conditions from those found in the laboratory with *in vitro* analyses and purification of the extract, the results were considered satisfactory. It is, however, necessary to perform the identification of these compounds and toxicity analysis until the final result is obtained.

Keywords: *Xanthomonas citri*, REMA, *Citrus sinensis*, *Talaromyces* sp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Micrografia eletrônica de varredura de <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i> tratadas com VLC4fA	16
Figura 2: Imagens contendo as diferentes formas de lesões por <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i> nas diferentes áreas de <i>citrus sinensis</i>	18
Figura 3: Erlenmeyers contendo meio MA2% e inóculo fúngico.....	27
Figura 4: Processo de separação do fermentado, fase orgânica e sobrenadante.....	28
Figura 5: Rotaevaporador contendo a fase orgânica para retirada do solvente.....	29
Figura 6: Esquema representativo da reação de resaurina para resorufina.....	30
Figura 7: Disposição de extratos e controles em microplaca para REMA.....	31
Figura 8: Carimbo de microplaca de 96 poços.....	33
Figura 9: Galhos de <i>citrus sinensis</i> marcados para a realização do teste.....	34
Figura 10: Ramos aspergidos com extrato LMA 1957.....	35
Figura 11: Plantas cobertas com saco plástico após aspersão de <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	36
Figura 12: Folhas digitalizadas após fim do experimento.....	37
Figura 13: coluna utilizada durante o experimento.....	39
Figura 14: Placas de CCD contendo frações obtidas durante o experimento.....	39
Figura 15: tubo contendo frações obtidas durante o experimento.....	40
Figura 16: A - LMA 1957 (<i>penicillium cf. Purpurogenum</i>), B - LMA 1840 (<i>aspergillus sp.</i>), C - LMA 1844 (<i>paecilomyces sp.</i>) e D - LMA – 1923(<i>penicillium sp.</i>)	42
Figura 17. Gráfico da dose repostada dos extratos LMA 1844, LMA 1840, LMA 1957 e LMA 1923 em relação à bactéria <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	44
Figura 18: Gráfico da dose repostada do extrato LMA 1844 em relação à bactéria <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	46

Figura 19: Gráfico da dose reposta do extrato LMA 1840 em relação à bactéria <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	46
Figura 20: Gráfico da dose reposta do extrato LMA 1957 em relação à bactéria <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	47
Figura 21: Gráfico da dose reposta do extrato LMA 1923 em relação à bactéria <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	47
Figura 22: Gráfico da dose reposta do extrato LMA1957 nos meios Malte 2%, Sabouraud e CZAPECK em relação à bactéria <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	49
Figura 23. Concentração Bactericida Mínima de cada extrato bruto em relação a sua interação com <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i> e suas concentrações (em µg/mL)	50
Figura 24:Folhas digitalizadas contendo os tratamentos CN, CP e LMA1957 respectivamente.....	52
Figura 25: figura contendo folhas de todos os controles testados.....	58
Figura 26: Gráfico da dose reposta do extrato LMA1957 no meio Malte 2% em relação à bactéria <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	61
Figura 27:Curva de inibição das frações de LMA 1957 obtidas através do método de REMA.....	62
Figura 28:Curva de inibição das frações de LMA 1957 obtidas através do método de REMA.....	63
Figura 29:Curva de inibição das frações de LMA 1957 obtidas através do método de REMA.....	63
Figura 30:Curva de inibição das frações de LMA 1957 obtidas através do método de REMA.....	63
Figura 31:Curva de inibição das frações de LMA 1957 obtidas através do método de REMA.....	64
Figura 32:Curva de inibição das frações de LMA 1957 obtidas através do método de REMA.....	64

Figura 33:Curva de inibição das frações de LMA 1957 obtidas através do método de REMA.....	64
Figura 34:Curva de inibição das frações de LMA 1957 obtidas através do método de REMA.....	65
Figura 35:Curva de inibição das frações de LMA 1957 obtidas através do método de REMA.....	65
Figura 36:Curva de inibição das frações de LMA 1957 obtidas através do método de REMA.....	65
Figura 37:Curva de inibição das frações de LMA 1957 obtidas através do método de REMA.....	66
Figura 38:Curva de inibição das frações de LMA 1957 obtidas através do método de REMA.....	66
Figura 39:Curva de inibição das frações de LMA 1957 obtidas através do método de REMA.....	66
Figura 40:Curva de inibição das frações de LMA 1957 obtidas através do método de REMA.....	67
Figura 41:Curva de inibição das frações de LMA 1957 obtidas através do método de REMA.....	67
Figura 42: Figura esquematizando placas de MBC.....	68
Figura 43: Placas de MBC contendo as frações 1 - 4 (A), 5-8 (B).....	68
Figura 44: Placas de MBC contendo as frações 9 - 12 (C), 13-16 (D).....	69
Figura 45: Placas de MBC contendo as frações 17 - 20 (E), 21 - 24 (F).....	69
Figura 46: Placas de MBC contendo as frações 25 - 27 (G), 28 - 29 (H).....	69
Figura 47: Talaperoxides A-D (1, 3, 4 e 5) e steperoxide B (2), moléculas com potencial atividade contra câncer de mama.....	71
Figura 48: Homodimérico (aR, 3R, 3'R) -flavomanina A (6), (aS, 3R, 3'R) -flavomanina B (7), flavomanina C (8) e flavomanina D (9), moléculas com atividades antibacterianas contra <i>S. aureus</i>	72

Figura 49: Talarolutinas A (10), Talarolutinas B (11), Talarolutinas C (12), Talarolutinas D(13), Chrodri-manins D (14), Chrodri-manins E(15), moléculas que possuem citotoxicidade contra carcinoma de próstata, atividade antimicrobiana e indução de quinona redutase.....72

Figura 50: Coloração do metabólito obtido após fermentação.....73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de microrganismos utilizados para produção dos extratos brutos	26
Tabela 2. Relação de extratos utilizados e sua atividade positiva contra <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i> (valores superiores a 80% foram considerados positivos)	42
Tabela 3. Porcentagem de inibição de crescimento de <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i> frente à presença do extrato LMA1957.....	45
Tabela 4. CIM90 dos extratos LMA 1844, LMA 1840, LMA 1957 e LMA 1923 em relação a bactéria <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i> (em µg/mL)	48
Tabela 5: Análise estatística de comparação entre os tratamentos.....	53
Tabela 6: Tabela contendo os dados obtidos através dos cálculos do número de lesões / cm ²	54
Tabela 7: Dados estatísticos obtidos referente ao número de lesões versus tamanho da folha.....	57
Tabela 8: Resultados estatísticos obtidos através do teste de Kruskal Wallis.....	59
Tabela 9: Dados estatísticos obtidos através do teste de Dunn's Post Hoc.....	60
Tabela 10: Tabela contendo as frações obtidas e seus respectivos rendimentos após secagem e pesagem.....	61

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
CV	Controle de Veículo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSF	Fator de Sinal Difusível
EtOH	Etanol
FMA	Fungos Micorrízicos Arbusculares
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
LMA	Laboratório de Microbiologia Ambiental
MA2%	Ágar Malte 2%
PIB	Produto Interno Bruto
REMA	<i>Resazurin Microtiter Assay</i>
RPM	 rotações Por Minuto
T/ha	Toneladas/Hectare
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UV	Ultravioleta
Xac	<i>Xanthomonas citri</i>

SUMÁRIO

1. Introdução	13
2. Revisão Bibliográfica	15
2.1. <i>Xanthomonas</i>	15
2.2. Citrus no Brasil	18
2.3. Importância dos fungos na agricultura	20
3. Objetivo	25
4. Materiais e Métodos	26
4.1. Micro-organismos utilizados	26
4.2. Produção dos extratos brutos	26
4.2.1. Cultivo Microbiano.....	26
4.2.2. Obtenção dos extratos brutos	27
4.2.3. Preparação dos extratos.....	29
4.3. Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos brutos	29
4.3.1. <i>Resazurin Microtiter Assay</i> (REMA).....	29
4.3.2. Avaliação da atividade inibitória dos extratos brutos.....	32
4.4. Concentração Inibitória Mínima (CIM90) dos extratos	32
4.5. Avaliação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	32
4.6. Teste em planta	33
4.7. Teste de validação de extrato	37
4.8. Cromatografia em Camada Delgada	37
4.9. Cromatografia em coluna	38
5. Resultados e Discussão	41
5.1. Produção dos extratos brutos	41
5.2. Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos brutos	41
5.2.1. Screening	41
5.2.2. Reavaliação da atividade inibitória dos extratos brutos	43
5.3. Concentração Inibitória Mínima (CIM90)	45
5.4. Avaliação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	49
5.5. Teste em planta	51
5.6. Teste de validação dos extratos	60
5.7. Cromatografia em coluna	61
6. Conclusão	74
7. Referências	75

1. INTRODUÇÃO

O cancro cítrico, causado pela bactéria *X. citri* subsp. *citri*, é uma doença que ataca todas as espécies e variedades de citros de importância comercial. O Brasil sofre perdas econômicas significativas por causa do cancro cítrico, sendo considerado um dos principais problemas fitossanitários na cultura de citros (SANCHES et al., 2014). Estas perdas são ainda mais importantes tendo em vista o fato do Brasil ser um dos principais produtores mundiais de citros, produzindo em 2017 cerca de 27,6 t/ha ficando à frente de países como os EUA 21,5 t/ha e China 14,5 t/ha (FAO, 2021). Onde destacam-se como os principais produtores os estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná que juntos são responsáveis por 86,94% de toda a produção nacional. (IBGE, 2020)

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). De acordo com levantamento feito pela Fundecitrus no ano de 2019 o cancro cítrico está presente em 15,01% dos talhões avaliados. Além disso, o levantamento confirma o crescimento da incidência em 28% quando comparada com o ano anterior da doença que se faz presente em todas as regiões do Parque Citrícola Paulista e Triângulo Mineiro (FUNDECITRUS, 2020).

Os principais impactos desta doença estão relacionados à desfolha de plantas, a depreciação da qualidade da produção pela presença de lesões em frutos, a redução na produção pela queda prematura de frutos e à restrição da comercialização da produção para áreas livres da doença. Além disso, a diminuição da produtividade comercial pode causar impactos que vão além do econômico como os efeitos sociais e ambientais ligados à migração geográfica dessas plantações para outras regiões produtoras, causando impactos sobre a balança comercial, na renda e também na quantidade de postos de trabalho disponíveis (SANCHES et al., 2014). O controle do cancro cítrico, causado por *X. citri* subsp. *citri*, é um problema grave na citricultura,

e as estratégias de manejo incluem o uso de mudas saudáveis, uso de cultivares menos suscetíveis ou com resistência moderada, quebra-vento para impedir a dispersão de inóculo e bactericidas à base de cobre. Estes bactericidas formam uma camada protetora e agem preventivamente evitando novas infecções em folhas e frutos jovens (FUNDECITRUS, 2014).

Entretanto 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 tendo como principal desafio encontrar um novo método de controle do cancro cítrico no pomar de laranja (OLIVEIRA et al., 2011). Além disso, os produtos utilizados à base de cobre fixo como oxiclreto de cobre, hidróxido de cobre e óxido cuproso, apresentam baixa solubilidade em água e proporcionam efeito residual na planta. Uma alternativa mais sustentável para combater essa doença é o controle da *Xanthomonas* por micro-organismos, direta ou indiretamente, através do uso de seus metabólitos envolvidos no biocontrole.

A rizosfera é a zona estreita do solo que envolve e é influenciada pelas secreções da raiz e pode conter milhares de micro-organismos (EGAMBERDIEVA et al., 2008). Este microbioma associado a rizosfera, além de influenciar no crescimento e nutrição das plantas (CHAPARRO et al., 2014; SCHREITER et al., 2014), tem apresentado importância na determinação da fitossanidade, induzindo a resistência das plantas contra vários fitopatógenos (FERNANDEZ et al., 2017; BERENDSEN et al., 2012; VAN LOON et al., 1998). O solo é um ecossistema extremamente complexo, onde a maior diversidade microbiana pode ser encontrada; associando-se às suas características físicas e químicas, o solo torna-se um fator chave no controle da produtividade e da qualidade em ecossistemas agrícolas (KENNEDY, 1999; MENDES et al., 2011).

Os fungos compõem a maior parte da biomassa microbiana e estão entre os micro-organismos conhecidos por seu desempenho benéfico em uma variedade de culturas (PFENNING, 2013). Os produtos secretados do metabolismo são liberados na rizosfera e

aproveitados pelas raízes das plantas, além do fato de que os fungos estão diretamente envolvidos em processos vitais, como ciclagem e disponibilidade de nutrientes, estabilização de partículas do solo, promoção do crescimento de plantas, controle de patógenos e insetos e degradação de moléculas químicas (PFENNING, 2013; PANDEY et al., 2018).

Na literatura, têm sido relatados diversos estudos de atividade de fungos isolados da rizosfera contra vários fitopatógenos, inclusive contra bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas* (FOYSAL & LISA, 2018; FERNANDEZ et al., 2017; XIE et al., 2018; MINGMA et al., 2014). Portanto, o interesse pelo emprego na agricultura de metabólitos bioativos produzidos por estes micro-organismos, como alternativa aos produtos químicos sintéticos e com nenhum ou mínimo impacto ambiental têm se tornado crescente nos últimos anos (DAYAN et al., 2009; FURBINO, 2014; NEWMAN & CRAGG, 2016).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. XANTHOMONAS

O gênero *Xanthomonas* (do grego, xanthos = amarelo; monas = unidade) compreende um grupo de bactérias fitopatogênicas de grande importância econômica em todo o mundo. Embora apresente ampla variedade de hospedeiros que incluem, pelo menos, 68 famílias de plantas e mais de 240 gêneros, individualmente cada espécie desse gênero possui limitada gama de hospedeiros. Essas bactérias podem incitar uma grande variedade de sintomas em diversos órgãos vegetais (BRUNINGS & GABRIEL, 2003; HAYWARD, 1993).

São classificadas como aeróbias restritas, com características bastonetiformes e se locomovem por um único flagelo polar (monotríquia), tem como característica principal a produção de um pigmento amarelo, quando em colônia, denominado xantomadina e a produção do polissacarídeo goma xantana (STALL & CIVEROLO, 1991).

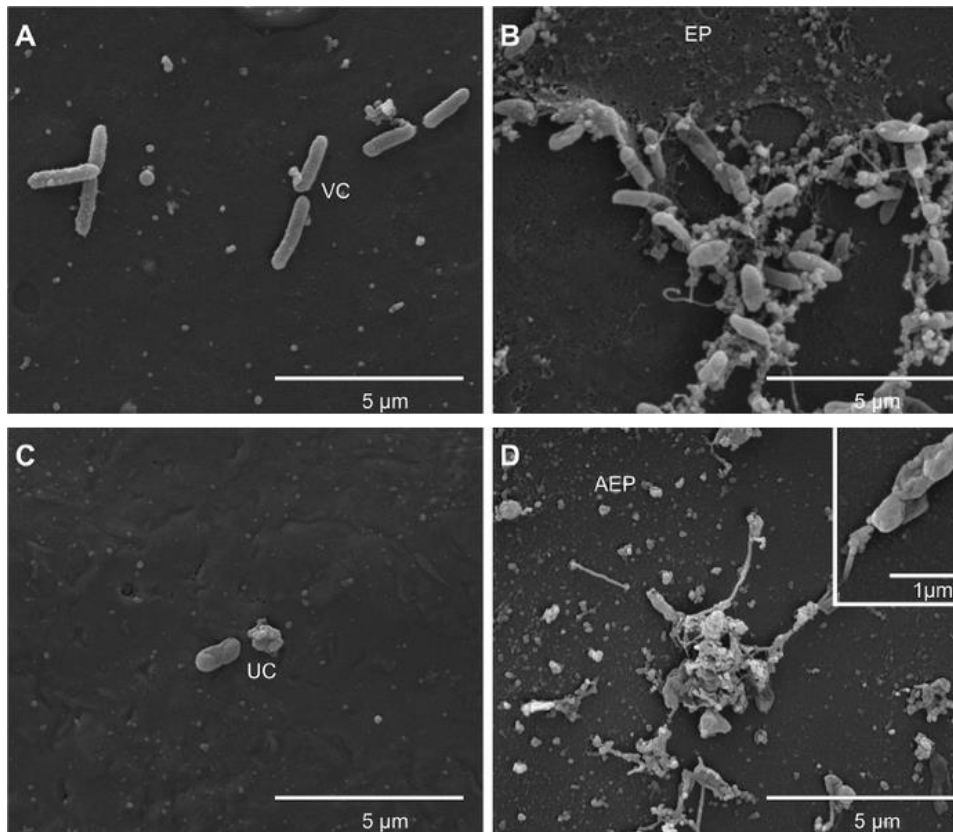


Figura 1: Micrografia eletrônica de varredura de *X. citri* subsp. *citri* tratadas com VLC4fA – fonte: <https://bityli.com/P1gNa>

Porém, apesar de serem organismos unicelulares, as células bacterianas são comumente encontradas em comunidades estruturalmente organizadas conhecidas como biofilmes formados através da produção de goma xantana, cuja principal função é proteger as células de dessecação, radiação UV, agentes antimicrobianos e predação, bem como fornecer a estes microrganismos um ambiente adequado para a troca de material genético (DAVEY E O'TOOLE 2000; BERLANGA E GUERRERO 2016; BURMØLLE et al. 2014; FLEMMING E WINGENDER 2010; PICCHI et al. 2016). A motilidade celular e a formação de biofilme são conhecidas por desempenhar um papel crítico na sobrevivência, virulência e infecção precoce de *X. citri* em hospedeiros cítricos (MALAMUD et al. 2011; GRANATO et al. 2019).

Por meio do sistema de quórum sensing, as bactérias monitoram a densidade populacional e modulam a expressão de seus genes adequadamente, e, através disso, são

capazes de regular uma série de comportamentos bacterianos e características fenotípicas, como a bioluminescência, esporulação, virulência, conjugação e diversas outras funções. Por exemplo, a principal molécula envolvida no quórum sensing em *X. citri* é o Fator de Sinal Difusível (DSF), que regula seletivamente os genes envolvidos no movimento bacteriano e formação de biofilme (CASERTA et al. 2014). Além disso, recentemente foi demonstrado que o quórum sensing mediado por DSF modula especificamente genes que aumentam a aptidão bacteriana para favorecer a infecção do hospedeiro (LI et al. 2019). Por esse motivo, a formação de biofilme bacteriano está sendo considerado como um alvo nas práticas de manejo para o controle do cancro. Na verdade, como *X. citri* é mais resistente a compostos de cobre quando cultivados como biofilmes, novas moléculas que interrompem esses biofilmes têm sido exploradas (LI E WANG, 2014).

O cancro cítrico não é apenas uma das principais ameaças à cultura dos citros como também uma das mais importantes doenças de plantas cultivadas do mundo. Além de causar danos significativos para a planta, como queda prematura dos frutos e desfolha, gera enormes prejuízos econômicos para os produtores. Sintomas podem ser vistos em toda parte aérea da planta e, embora característicos, podem variar de acordo com o órgão afetado e sua idade no momento da infecção pela bactéria. Os sintomas em folhas constituem-se em lesões corticosas, geralmente salientes nas duas faces e circundadas por um halo amarelo (Figura 2). A formação deste halo está associada ao decréscimo da produção de clorofilas a e b, caroteno e xantofila nessas regiões (PADMANABHAM et al., 1974).

Nos frutos os sintomas são semelhantes aos observados nas folhas podendo, em estágio avançado, provocar o rompimento da casca (Figura 2). Lesões em ramos, geralmente, são encontradas apenas em variedades muito suscetíveis (Figura 2). A fotossíntese é prejudicada em função da destruição da área foliar e ataques mais severos podem levar à desfolha e a queda

de frutos (LEITE JR., 1990). Sob condições naturais de infecção a disseminação ocorre principalmente pela ação de respingos de chuvas e de chuvas associadas com ventos, e a disseminação a longas distâncias dá-se pelo transporte de material vegetal infectado. No Brasil o cancro cítrico é mais severo no início do verão, quando altas temperaturas, chuvas intensas e ventos ocorrem ao mesmo tempo e num período no qual as plantas hospedeiras apresentam grande quantidade de tecidos imaturos (ramos, folhas e frutos) (CIVEROLO, 1985; DANÓS et al., 1984; GOTTWALD et al., 1992).



Fonte: <https://bitly.com/8dDh0U>



Fonte: <https://bitly.com/WICyMH>



Fonte: <https://bitly.com/KSPuH>

Figura 2: Imagens contendo as diferentes formas de lesões por *X. citri* subsp. *citri* nas diferentes áreas de *citrus sinensis*.

2.2. CITRUS NO BRASIL

Originárias da Ásia, as primeiras plantas cítricas introduzidas no Brasil foram trazidas da Espanha pelos portugueses. Desde então, o que se viu foi uma história de sucesso e

conquistas. O cultivo da laranjeira se estabeleceu no Brasil pela introdução dos portugueses, no período de 1500, com mudas de laranjeiras doces, o que não significa ter um mercado movimentado naquela época (FERNANDES, 2010).

Atualmente o país é o maior produtor de laranja e o maior produtor e exportador de suco de laranja do mundo, constituindo-se em uma das atividades de maior relevância do agronegócio nacional. O setor alcançou níveis inigualáveis de competitividade externa, gera milhares de empregos diretos e indiretos e traz, em média, US\$ 1,75 bilhão por ano em divisas ao país (SNA, 2020).

Sendo o Brasil responsável por mais da metade de todo suco de laranja produzido no mundo, destes, 98% destinado à exportação e impressionantes 85% de participação no mercado mundial concentradas principalmente na Europa (70,3%), América (15,5%), China (5,2%) e Japão (5,2%). Isto significa que de cada cinco copos de suco de laranja consumidos no mundo, três são produzidos em território nacional. Não há qualquer outro produto industrializado em que a soberania do Brasil seja tão expressiva (NEVES & LOPES, 2005; AGN, 2020). Com quase quatrocentos municípios dedicando-se ao cultivo da laranja e 70% de toda a área plantada do país (aproximadamente 560 mil hectares), somente o Estado de São Paulo detém 80% da produção nacional de laranja e 53% da produção mundial de suco, classificando-se como maior polo citrícola do mundo (NEVES, M. F.; JANK, M. S., 2011; SOUZA, N. S. et al 2011).

Segundo Barros (2016) a citricultura brasileira apresenta números expressivos que traduzem a grande importância econômica e social que a atividade tem para a economia do país, a exemplo do estado de São Paulo. A atividade gera um Produto Interno Bruto (PIB) de US\$ 6,5 bilhões em todos os elos da sua cadeia produtiva e cerca de 200 mil empregos diretos e indiretos. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística o IBGE (2021), o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) as cidades citrícolas têm alguns dos mais altos índices de

IDH dentro do Estado de São Paulo e dentro do *ranking* geral do Brasil, como é o caso de Araraquara (0,815), Botucatu (0,800), Bebedouro (0,780), Limeira (0,775) e Matão (0,773).

E, ainda de acordo com o (IBGE, 2021), a produção brasileira de laranja em 2020 foi de 16,7 milhões de toneladas em 573 mil hectares, destacando-se como produtores os estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná, responsáveis por 86,94% da produção nacional. A estimativa para a safra do parque citrícola de São Paulo e Minas Gerais para 2017/2018 é de 364 milhões de caixas, a melhor dos últimos cinco anos. O estado de São Paulo apresenta uma das maiores produções de laranja devido ao alto investimento em tecnologias nos pomares e empresas (NEVES et al., 2017). Na região Norte destaca-se o estado do Pará, como o principal produtor de laranja, com participação de 1,64% da produção nacional. Os números expressivos alcançados pelo agronegócio citrícola brasileiro podem ser atribuídos aos elevados padrões de qualidade do setor de produção, pesquisa de vanguarda e inovações em tecnologia e logística (NEVES et al., 2007; NEVES, 2010).

2.3. IMPORTÂNCIA DOS FUNGOS NA AGRICULTURA

Apesar das doenças causadas por fungos representarem prejuízos anuais às lavouras, eles são imprescindíveis para a sustentabilidade dos ecossistemas agrícolas. A relação com as plantas e os limites entre fungos patógenos, tróficos e simbiotes vai depender das interações entre hospedeiro e condições ambientais (BEDENDO, 1995; PRIMAVESI, 1999), apresentando inúmeros benefícios em ecossistemas estáveis.

Dentre eles destaca-se a ciclagem e disponibilização de nutrientes. A partir da degradação de substratos complexos de origem vegetal, como celulose e seus derivados, além de quitina e componentes recalcitrantes do solo, representam cerca de 90% da produtividade

primária líquida na maioria dos ecossistemas terrestres (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; THORN; LYNCH, 2007).

Os fungos desempenham importante papel no biocontrole de doenças e pragas, atuando sobre alvos de grande importância econômica. Atualmente no mercado global, existem mais de 433 produtos comerciais para o controle biológico e os fungos constituem a base de 60% desses produtos (TRENDSCE, 2021). No manejo das doenças, podemos citar o fungo leveduriforme *S. cerevisiae* no controle da queda prematura de frutos cítricos (LOPES et al., 2015) e o filamentosos *Trichoderma* utilizado para controlar diversas doenças causadas por patógenos de solo e de parte aérea (CAVERO et al., 2015; MORANDI; BETTIOL, 2009; POMELLA; RIBEIRO, 2009). Com relação ao manejo de pragas, ocorrem no Brasil, mais de 20 gêneros de fungos entomopatogênicos descritos parasitando insetos de várias ordens (ALVES, 1998). Para a cultura de citros, o controle de algumas pragas como a cochonilha (*Orthezia praelonga*), broca do citros (*Diploschema rotundicolle*), ácaro da ferrugem (*Phyllocoptruta oleivora*) e ácaro rajado (*Tetranychus urticae*) pode ser realizada com os produtos alternativos a base de fungos como *Beauveria bassiana*, *Colletotrichum gloesporioides*, *Metharhizium anisopliae* e *Hirsutella thompsonii* (MICHEREFF FILHO; FARIA; WRAIGHT, 2007).

Fungos filamentosos também controlam nematoides de solo, que ao atacar as culturas prejudicam a produtividade. Eles são conhecidos como fungos nematófagos e desenvolveram diversos mecanismos para impedir o crescimento desses vermes, agindo por predação direta, ou como parasitas endógenos, em ovos e cistos (WEBSTER, J.; WEBER, R.W.S., 2007).

Além disso, uma pesquisa recentemente divulgada demonstrou que os fungos também podem ter ação herbicida. Por meio da liberação de toxinas, esses fungos, poderiam controlar plantas espontâneas sem, no entanto, afetar a cultura principal (BARBOSA, 2021).

Outro grupo fúngico de grande importância agrícola são os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), conhecidos pelas associações simbióticas que desenvolvem com praticamente todas as culturas tropicais. As plantas cítricas em geral são altamente dependentes dessa simbiose, que pode proporcionar melhoria dos aspectos nutricionais, proteção da planta contra patógenos e metais pesados, maior tolerância a estresses hídricos, aumento da estabilidade dos agregados do solo (CARDOSO et al., 2010; CARRENHO et al., 2010) além de fixação de altas taxas de carbono no solo (CLEMMENSEN et al., 2013).

No aspecto nutricional os FMA são especialmente importantes em agroecossistemas com baixo uso de insumos, sendo sua ação mais significativa aos nutrientes de baixa mobilidade no solo como o fósforo (P), zinco (Zn) e cobre (Cu). Além de mostrar efeito desses simbiontes na absorção de nitrogênio (N), potássio (K), e, de alguns micronutrientes (CARDOSO et al., 2010).

No que tange à proteção da planta contra patógenos, a interação fungo-planta pode ser considerada como um meio de controle biológico, devido à eficiência de mecanismos envolvidos que possibilitam maior resistência da planta contra o patógeno, proveniente do melhor desenvolvimento e nutrição do hospedeiro (REIS et al., 2010).

Com relação à estruturação física, os FMA têm efeito agregante à medida que crescem dentre os poros e unem as partículas de solo (POWELL, J.; KLIRONOMOS, J., 2007), sendo esse efeito também observado em fungos filamentosos não simbiontes (PRIMAVESI, A. 1999; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O., 2006).

Assim, em geral a atividade fúngica influencia positivamente a estruturação do solo, pois à medida que desenvolvem suas hifas, aproximam as partículas do solo dando estabilidade aos macroagregados (TISDALL, J.M.; OADES, L.M., 1982).

Outro fator importante que deve ser considerado na estruturação física, envolvendo os FMA é a produção de glomalina. Esta glicoproteína atua na estabilização dos agregados do solo que, por consequência, protegem a proteína da decomposição representando assim, um dreno importante de carbono no solo (SINGH et al., 2013).

Além do mais, os fungos também estão envolvidos nos processos de degradação de pesticidas e apesar de alguns compostos químicos transformados serem mais tóxicos que as moléculas originais, outros são transformados até sua completa mineralização. Isto ocorre por meio de reações enzimáticas diversas e complexas e estão associadas a gêneros fúngicos como *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus* e *Trametes*. (MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O., 2006.).

Os fungos também podem atuar na promoção de crescimento das plantas por meio de mecanismos de fitoestimulação. Espécies de *Trichoderma*, por exemplo, têm demonstrado resultados positivos em diversas culturas como feijão, milho, tomate, pimenta entre outros, apresentando incrementos no conteúdo de clorofila, altura das plantas, área foliar, massa seca, além de maior emergência de plântulas (LÓPEZ-BUCIO, J.; PELAGIO-FLORES, R.; HERRERA-ESTRELLA, A., 2015; NEUMANN, B.; LAING, M., 2006). Amprayn et al. (2012) verificaram aumento na massa seca de raiz e maior mobilização de fosfato quando inocularam fungos leveduriformes do gênero *Candida* em sementes de arroz.

E, mais recentemente foi demonstrado que solos com maior biomassa fúngica são mais eficientes na retenção de nutrientes, apresentando menores perdas de nitrogênio por lixiviação (DE VRIES et al., 2011). Além disso, os fungos são menos afetados, quando comparados as bactérias, por mudanças climáticas relacionadas à seca devido a maior capacidade em suportar distúrbios (PIMM, 1984). Assim, este trabalho tem como objetivo investigar (*in vitro* e *in planta*) a ação da comunidade fúngica do solo sob citros contra a *X. citri* subsp. *citri*, causadora

do cancro cítrico, já que estes micro-organismos presentes nas rizosferas apresentam relação com indução da resistência das plantas contra estes fitopatógenos.

3. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é avaliar o potencial de fungos isolados do rizoma da laranja *Citrus x. sinensis* (L.) Osbeck com potencial atividade contra *X. citri* subsp. *citri*, causadora do cancro cítrico em frutas cítricas.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar microrganismos com atividade inibitória contra *X. citri* subsp. *citri*;
- Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos brutos frente à bactéria;
- Identificação da concentração inibitória mínima;
- Identificação da concentração bactericida mínima dos extratos;
- Avaliação do extrato bruto frente ao teste em planta.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Micro-organismos utilizados

Para a realização do trabalho foram selecionados 16 fungos (tabela 1) isolados da rizosfera da laranja *Citrus sinensis* depositados no CPQBA. Estes isolados foram previamente selecionados com atividades contra fungos fitopatógenos pelo grupo de pesquisa da Prof^a. Dr^a. Derlene Atilli de Angelis em solos de plantações de laranja sob manejo de transição e manejo convencional de cultivo em uma área comercial de citros na Fazenda Santo Antônio do Lageado (22°08'49,4"S e 47°10'47,6"W), município de Mogi Guaçu, no estado de São Paulo (SCOTTON, J. C., 2016). Os exemplares foram examinados quanto a sua pureza e preservados pelo método de Castellani (CASTELLANI, 1939).

Tabela 1: Lista de microrganismos utilizados para produção dos extratos brutos.

Nº	Código do isolado	Identificação
1	LMA1957	<i>Penicillium cf. purpurogenum</i>
2	LMA1841	<i>Purpureocilium Lilacinum</i>
3	LMA1842	<i>Purpureocilium Lilacinum</i>
4	LMA1850	<i>Purpureocilium Lilacinum</i>
5	LMA1923	<i>Penicillium sp.</i>
6	LMA1844	<i>Paecilomyces sp.</i>
7	LMA1854	<i>Paecilomyces sp.</i>
8	LMA1955	<i>Penicillium sp.</i>
9	LMA1840	<i>Aspergillus sp.</i>
10	LMA1950	<i>Penicillium sp.</i>
11	LMA1921	Sem identificação
12	LMA1852	<i>Penicillium sp.</i>
13	LMA1939	Sem identificação
14	LMA1916	Sem identificação
15	LMA1905	Sem identificação
16	LMA1922	Sem identificação

4.2. Produção dos Extratos Brutos

4.2.1. Cultivo microbiano

Para o cultivo, os fungos foram reativados e repicados em placas de Petri contendo Ágar Malte 2% (MA) e incubados a 28°C por 7 dias. Discos de aproximadamente 5 mm de ágar mais micélio foram transferidos para Erlenmeyers de 250ml contendo cerca de 150ml de meio líquido malte 2% (M). Após essa etapa esses frascos foram mantidos sob agitação constante a 120 rpm sob temperatura de 28°C por 20 dias (figura 3). A padronização do método de cultivo foi realizada por SILVA, 2017.



Figura 3: erlenmeyers contendo meio MA2% e inóculo fúngico.

4.2.2. Obtenção dos extratos Brutos

Após o crescimento fúngico, a biomassa microbiana e o sobrenadante (meio metabólico) foram separados. O sobrenadante foi submetido à extração líquido-líquido com o solvente orgânico acetato de etila ($C_4H_8O_2$) obtendo o extrato bruto utilizando um balão de separação a fim de se obter somente a fração orgânica (figura 4). A fase aquosa foi devidamente descartada enquanto a fase orgânica teve o excesso de água removido pela adição de sulfato de sódio (Na_2SO_4).



Figura 4: processo de separação do fermentado, fase orgânica e sobrenadante.

O excesso de solvente foi removido com auxílio de um evaporador rotativo sob pressão reduzida e banho maria com temperatura de 40°C (figura 5) e, a secagem dos extratos foi feita por um concentrador de amostras à 40°C com pressão de ar. Os extratos foram acondicionados em micro tubos eppendorfs, seu rendimento pesado e anotado sendo posteriormente armazenado a 10°C.



Figura 5: rotaevaporador contendo a fase orgânica para retirada do solvente.

4.2.3. Preparação dos extratos

Após a determinação da massa dos extratos, todos foram dissolvidos em uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO) 10% a fim de se obter uma solução de concentração igual a 30mg/mL. Os extratos diluídos foram armazenados em congelador à -4°C.

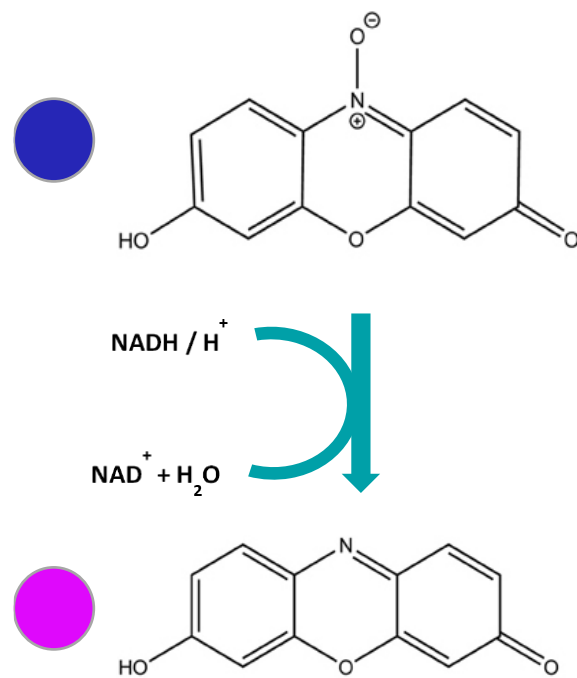
4.3. Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos brutos

Os extratos foram submetidos ao bioensaio para determinar sua capacidade de inibição de crescimento da bactéria fitopatogênica *X. citri* subsp. *citri*. A bactéria *X. citri* subsp. *citri* linhagem IBSBF 1594 foi disponibilizada pelo Prof. Dr. Henrique Ferreira da Unesp de Rio Claro, a sua manipulação foi realizada no Laboratório de Genética de Bactérias, o qual tem autorização do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para a manipulação da bactéria *X. citri* subsp. *citri*.

4.3.1. Resazurin Microtiter Assay (REMA)

A fim de determinar a capacidade de inibição dos extratos, estes foram avaliados através do método *Resazurin Microtiter Assay* REMA. O teste se baseia na redução da resazurina, que apresenta cor azul e baixa fluorescência, para resorufina, que apresenta cor rosa e fluorescência elevada. A redução do corante se dá pelo metabolismo celular de organismos presentes através da ação de NADH desidrogenase que é gerado pelo metabolismo celular, sendo proporcional a respiração aeróbica, de maneira que é possível quantificar a viabilidade celular do patógeno mediante a presença do extrato testado (figura 6).

O ensaio foi realizado em placas de 96 poços contendo os extratos testados juntamente com um controle negativo, meio NYG (CN), controle positivo, Canamicina (CP) e controle de veículo, DMSO 1% (CV).



Adaptado de Schmit et al, 2013

Figura 6: esquema representativo da reação de resazurina para resorufina.

Os extratos foram diluídos em meio NYG (0,3% de extrato de levedura; 0,5% de peptona bacteriológica e 2% de glicerol) a fim de se obter uma concentração de 2,1mg/mL e de

maneira que a concentração de DMSO não ultrapasse 1%, a mesma utilizada no controle de veículo. Para o controle positivo utilizou-se o antibiótico canamicina (20µg/mL); para o controle de veículo (CV) foi utilizada uma solução de DMSO 1%; para o controle negativo (CN) foi utilizado apenas meio de cultivo NYG e inóculo bacteriano. A montagem do ensaio segue o protocolo modificado por Silva et al, 2013. Onde, oito extratos são testados em oito subseqüente micro diluições (Figura 7)

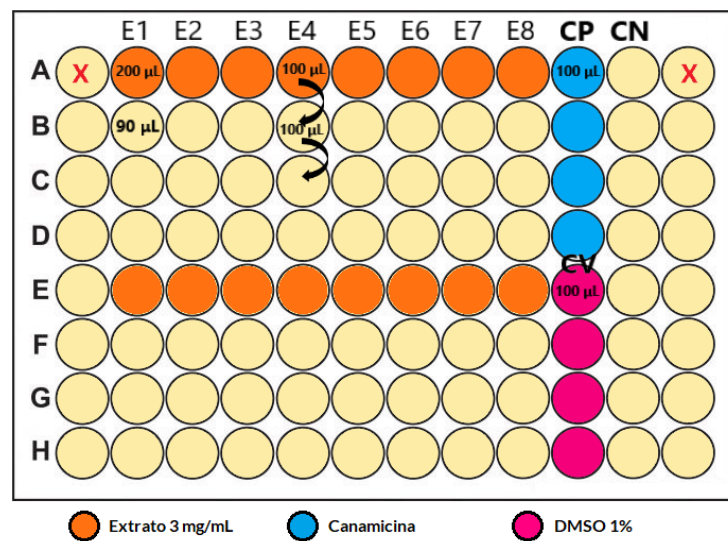


Figura 7: Disposição de extratos e controles em microplaca para REMA (Fonte: Gabriele Vieira)

As células bacterianas para o inóculo foram cultivadas em meio NYG líquido à 29°C e 200 rpm por 12 horas, a fim de atingir uma densidade óptica (D.O) de aproximadamente 0,8 sob faixa de 600nm referente a fase log de crescimento bacteriano. O inóculo então foi padronizado com sua diluição em meio NYG a fim de obter a concentração de 10⁵ Unidades Formadoras de Colônias por poço (UFC/mL).

Após o inóculo, as placas foram incubadas a 29°C por aproximadamente 16 horas, quando já foi possível observar a turbidez do meio de cultivo no controle negativo. Foi adicionado 15µL de rezasurina (0,1 mg/mL) e a placa foi novamente incubada a 29°C por cerca de 1 hora. Após esse período foi realizada a medida de fluorescência através do leitor de

microplacas SYNERGY H1 (Biotek®) com excitação e emissão nos comprimentos de onda de 530nm e 590nm, respectivamente.

Após a leitura as medidas de fluorescência foram utilizadas para calcular a porcentagem da inibição do crescimento celular em cada poço utilizando a seguinte fórmula:

$$\%I = [(CN - AM) / CN] * 100$$

Onde temos que: %I é a porcentagem de inibição do crescimento celular em um determinado poço; CN representa a média das medidas de fluorescência obtidas em todos os poços de controle negativo e AM são as medidas de fluorescência obtidas em cada um dos poços contendo amostras.

4.3.2. Avaliação da atividade inibitória dos extratos brutos

A triagem dos extratos foi realizada em triplicata para a linhagem de *X. citri* subsp. *citri* utilizada. Foram considerados como positivos aqueles que mostraram porcentagens de inibição celular superiores a 80%. Para estes extratos, os testes foram repetidos em triplicata em três eventos distintos, onde cada extrato foi testado em oito concentrações diferentes ($\mu\text{g/mL}$): 2100; 1050; 525; 262; 131; 65; 32; 16.

4.4. Concentração Inibitória Mínima (CIM90) dos extratos

Os valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM90) foram obtidos utilizando as porcentagens obtidas pelos testes de avaliação da inibição do crescimento celular descritos previamente. Os valores de porcentagem do evento que apresentaram menor desvio padrão foram usados para a elaboração de uma função polinomial de quarta ordem, que foi igualada aos valores de 90 para a obtenção das concentrações necessárias de cada extrato para a inibição celular de 90%.

4.5. Avaliação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A Concentração Bactericida Mínima CBM foi determinada pelo repique através da imersão de um carimbo do conteúdo da placa de 96 poços (figura 8), previamente a adição de resazurina (0,1 mg/mL), em uma placa de petri (150 x 15 mm) contendo meio de cultivo NYG sólido. Estas novas placas foram incubadas por 48h a 29°C em uma estufa bacteriológica. O crescimento bacteriano é verificado visualmente através do crescimento ou não das colônias podendo ser determinadas em quais das concentrações cada extrato apresentou características bactericidas. Os testes foram realizados em triplicata em três eventos distintos.

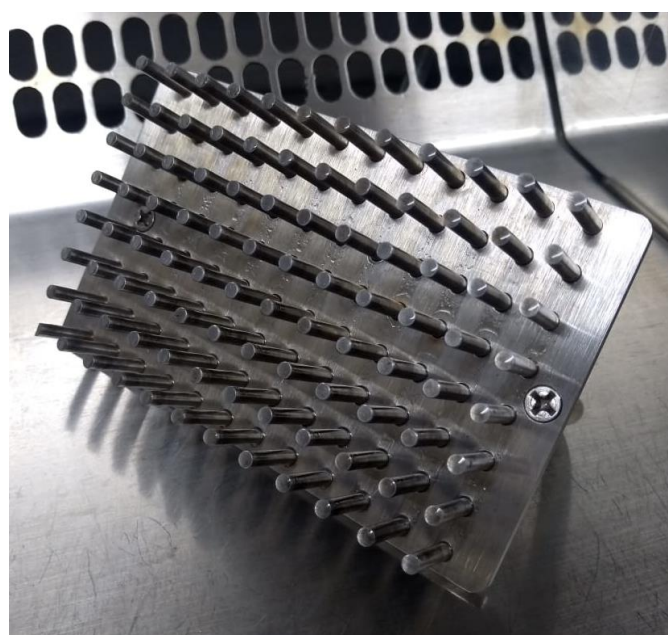


Figura 8: carimbo de microplaca de 96 poços. Foto: Juliano Ferrarezi

4.6. Teste em Planta

Afim de avaliar a ação antibacteriana *in planta* dos extratos contra XAC, inicialmente foram obtidas 15 plantas de *Citrus sinensis* enxertados em limão cravo (*Citrus x limonia*) da empresa Citrograf e cultivadas em casa de vegetação sob os cuidados do Prof. Dr. Henrique Ferreira. Foi realizada a poda das mudas para que fossem obtidas folhas jovens, entre os estágios de crescimento V4 e V5 conforme o preconizado pela Fundecitrus. O extrato selecionado (LMA1957) foi diluído em etanol 100% e o agroquímico Difere® foi ajustado a

concentração recomendada pelo fabricante de 0,2% em água e o controle negativo utilizado consistiu em uma solução 2% de etanol em água. Em cada planta, foram selecionados e marcados 3 ramos, conforme a figura 9.



Figura 9: Galhos de *citrus sinensis* marcados para a realização do teste. Foto: do autor

Nos ramos selecionados foram aspergidos os extratos e os controles na face abaxial e adaxial das folhas (figura 10). Para garantir a secagem das folhas, a bactéria *X. citri* subsp. *citri* foi aplicada após 24 horas. O inóculo bacteriano foi preparado em meio NYG, durante aproximadamente 12h, afim de garantir uma Densidade Óptica (D.O.) de 0.4 (à 600 nm), que equivale a 10^8 células/mL. O conteúdo foi centrifugado para a formação de um pellet de células,

o sobrenadante foi descartado e as células suspensas em mesmo volume de solução salina 1% (NaCl). O conteúdo foi então aspergido nos ramos selecionados e um saco plástico foi utilizado para recobrir as plantas durante as primeiras 48 horas afim de garantir a abertura dos estômatos das folhas e infecção bacteriana fosse assegurada. (figura 11).



Figura 10: Ramos aspergidos com estrato LMA 1957. Foto: do autor



Figura 11: Plantas cobertas com saco plástico após aspersão de X. citri subsp. citri. Foto: do autor

A casa de vegetação conta com um sistema de irrigação automática. A evolução dos tratamentos foi acompanhada semanalmente até que fossem completados 40 dias. Os galhos foram então cortados e levados ao laboratório para triagem. As folhas foram destacadas dos galhos e com auxílio de uma mesa digitalizadora foi possível realizar a análise qualitativa do número de lesões (figura 12). Para a análise foi utilizado o software Past 4.03 e o JASP 0.014.1, onde foi relacionada a área da folha com a quantidade de lesões. Os demais galhos das mudas foram podados e descartados apropriadamente juntamente com as folhas utilizadas nas análises.



Figura 12: Folhas digitalizadas após fim do experimento.

4.7. Teste de Validação de Extrato

A fim de obter uma quantidade maior do extrato bruto de LMA 1957 para as etapas seguintes, foi realizada uma nova produção seguindo as etapas descritas em 4.2.1 e 4.2.2. e posteriormente analisadas através do método de REMA em triplicata verificando e confirmando as atividades inibitórias dos extratos após uma nova produção.

4.8. Cromatografia em Camada Delgada

O extrato foi aplicado em uma placa de sílica (Aprox. 5cm x 2cm) e corridas com acetato de etila, acetato de etila + hexano na proporção de 1:1 e com acetonitrila + hexano em diferentes proporções. A revelação das placas se deu em luz UV em dois comprimentos de onda distintos (254nm e 365nm) e solução reveladora de (5mL de ácido acético, 465mL de etanol, 12,5mL de *p*-anisaldeído e 17,5mL de ácido sulfúrico) com posterior aquecimento em chapa aquecedora (aprox. 80°C). O uso desta técnica permitiu o acompanhamento do comportamento do extrato

durante o fracionamento e purificação dos compostos presentes durante a cromatografia em coluna.

4.9. Cromatografia em coluna

Foi montada uma coluna de sílica gel, 0,2 – 0,5 mm, em uma bureta de 250ml de volume total com fase móvel composta por uma mistura de Acetonitrila e Hexano (figura 13). Inicialmente foi utilizado uma proporção de 80% de Acetonitrila e 20% de Hexano aumentando a proporção de Acetonitrila gradualmente até atingir 100% de concentração e, após, foi adicionado Metanol gradualmente à Acetonitrila (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9) até obter a concentração de 100% finalizando a corrida com 100% de metanol e 2% de Ácido acético. A separação das frações foi acompanhada de modo visual pela mudança de coloração e através de Cromatografia de Camada Delgada a fim de confirmar a separação dos compostos (figura 14).

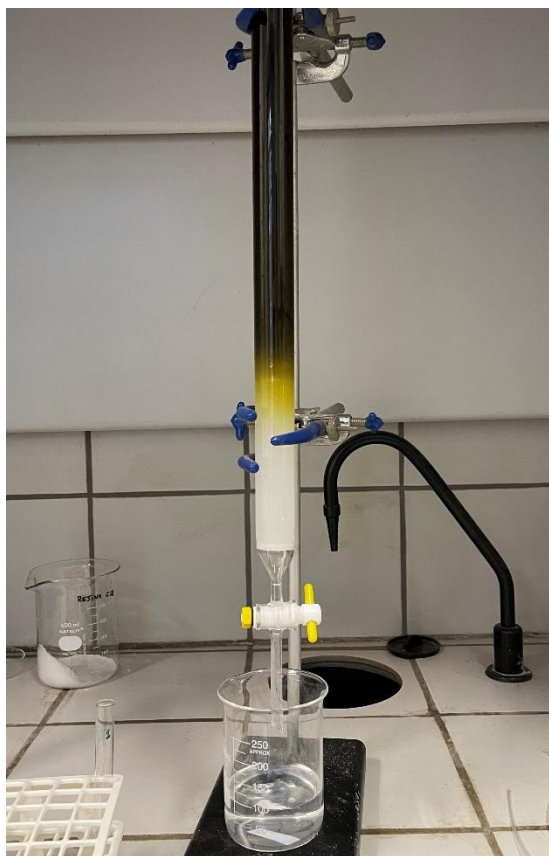


Figura 13: coluna utilizada durante o experimento. Foto: do autor

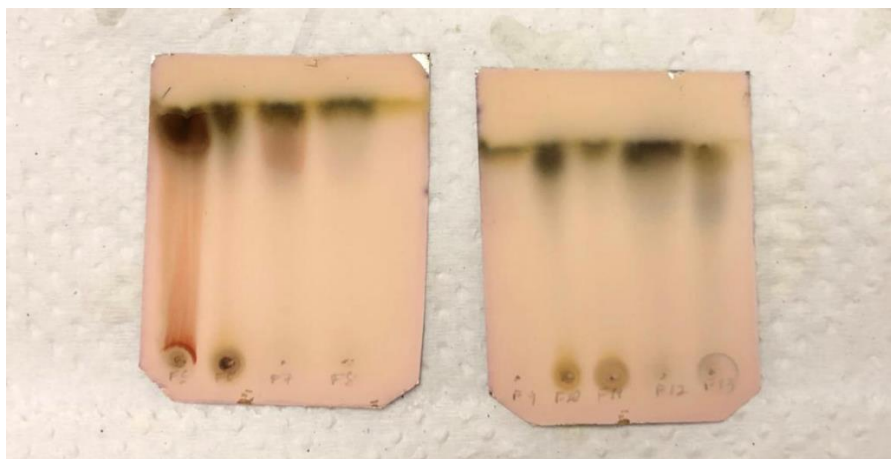


Figura 14: Placas de CCD contendo frações obtidas durante o experimento. Foto: do autor

O extrato eluído foi armazenado em tubos de ensaio e posteriormente separados por frações de acordo com a coloração presente tanto na amostra física quanto pela placa de CCD

realizada de cada tubo (Figura 15), após a junção das frações o conteúdo de cada fração foi secado com auxílio de rotaevaporador e concentrador de amostras e posteriormente liofilizados e cada fração foi analisada quanto a sua atividade inibitória contra *X. citri* subsp. *citri* seguindo o protocolo de REMA descrito no tópico 4.3.1.

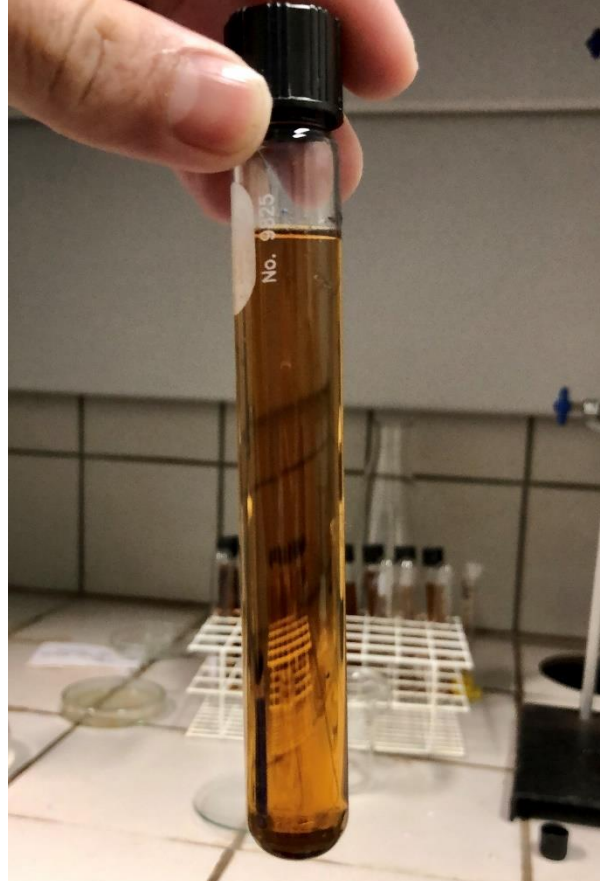


Figura 15: tubo contendo frações obtidas durante o experimento. Foto: do autor

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Produção dos extratos brutos

Ao final do processo de fermentação foram obtidos 16 extratos brutos. Inicialmente todos os extratos produzidos apresentaram massa suficiente para a realização dos testes de triagem. Os extratos que foram considerados positivos foram produzidos em maior quantidade de forma contínua para obtenção de maior massa para purificação e futuros testes.

5.2. Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos brutos

5.2.1. Screening

Os 16 extratos foram testados em triplicata quanto ao seu potencial de atividade inibitória contra *X. citri* subsp. *citri*. (tabela 2). A partir dos testes foi possível observar que, dos 16 extratos brutos obtidos a partir as 16 linhagens utilizadas, 4 apresentaram potencial atividade inibitória contra *X. citri* subsp. *citri* sendo previamente identificadas como do gênero, *Penicillium* sp., *Paecilomyces* sp. e *Aspergillus* sp (figura 16). Os quatro extratos consideradas positivas apresentaram potencial inibitório acima de 80% sendo, portanto, selecionadas para os testes subsequentes.

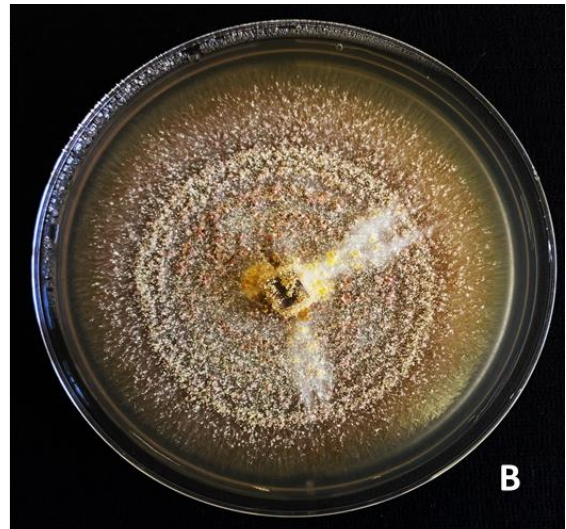
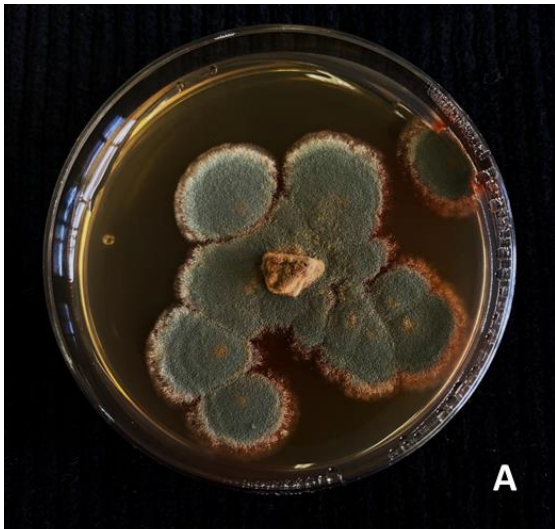


Figura 16: A - LMA 1957 (*penicillium cf. Purpurogenum*), B - LMA 1840 (*aspergilus sp.*), C - LMA 1844 (*paecilomyces sp.*) e D - LMA - 1923(*penicillium sp.*).

Tabela 2. Relação de extratos utilizados e sua atividade positiva contra *X. citri subsp. citri* (valores superiores a 80% foram considerados positivos).

Nº	Código do isolado	Identificação	Inibição <i>X. Citri</i>
----	-------------------	---------------	--------------------------

1	LMA1957	<i>Penicillium cf. purpurogenum</i>	+
2	LMA1841	<i>Purpureocilium Lilacinum</i>	-
3	LMA1842	<i>Purpureocilium Lilacinum</i>	-
4	LMA1850	<i>Purpureocilium Lilacinum</i>	-
5	LMA1923	<i>Penicillium sp.</i>	+
6	LMA1844	<i>Paecilomyces sp.</i>	+
7	LMA1854	<i>Paecilomyces sp.</i>	-
8	LMA1955	<i>Penicillium sp.</i>	-
9	LMA1840	<i>Aspergillus sp.</i>	+
10	LMA1950	<i>Penicillium sp.</i>	-
11	LMA1921	Sem identificação	-
12	LMA1852	<i>Penicillium sp.</i>	-
13	LMA1939	Sem identificação	-
14	LMA1916	Sem identificação	-
15	LMA1905	Sem identificação	-
16	LMA1922	Sem identificação	-

5.2.2. Reavaliação da atividade inibitória dos extratos brutos

Os extratos considerados positivos, LMA 1957, LMA 1923, LMA 1844 e LMA 1840 foram reavaliados quanto à atividade frente a *X. citri* subsp. *citri*. A Figura 17 apresenta a relação dose-resposta comparando a média da porcentagem de inibição obtida dos extratos bioativos frente à linhagem utilizada de *X. citri* subsp. *citri* nas concentrações de 2100; 1050; 525; 262; 131; 65; 32; 16 ($\mu\text{g/mL}$).

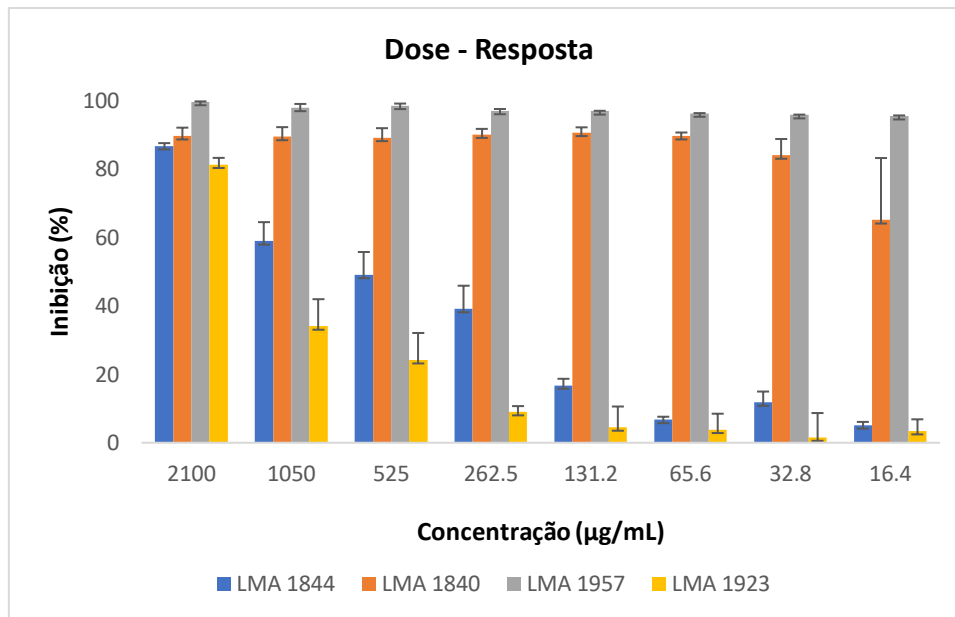


Figura 17. Gráfico da dose reposta dos extratos LMA 1844, LMA 1840, LMA 1957 e LMA 1923 em relação à bactéria *X. citri subsp. citri*

A partir do gráfico de dose-resposta é possível observar que todos os extratos testados apresentaram uma inibição igual ou superior a 80% na concentração inicial testada de 2100 µg/mL, com destaque para o extrato obtido pelo fungo LMA 1957 que apresentou inibição superior a 90% mesmo na concentração mais baixa, de 95,4% em 16,4 µg/mL. O extrato obtido pela linhagem LMA 1840 também apresentou porcentagens de inibição alta nas menores concentrações (cerca de 60% de inibição na concentração de 16,4 µg/mL). Os extratos LMA 1844 e LMA 1923 apresentaram um decaimento proporcional de atividade antibacteriana com a diminuição da concentração.

Como o extrato de LMA 1957 (*Penicillium cf. purpurogenum*) apresentou-se promissor, visto que promoveu uma alta inibição de crescimento bacteriano mesmo em concentrações menores, foi realizada uma abertura da curva de concentração dos extratos devido a sua elevada inibição mesmo em concentrações mais baixas (16µg/mL), sendo testado em (µg/mL): 2100; 1950; 1800; 1050; 975; 900; 525; 487,5; 450; 262,5; 243,75; 224; 131,2; 121,87; 112,5; 65,6; 60,94; 56,25; 32,8; 30,47; 28,13; 16,4; 15,23; 14,06; 8,2; 7,62; 7,03; 4,1; 3,81; 3,52; 2,05; 1,9;

1,76; 1,025; 0,95; 0,88; 0,513; 0,48; 0,44; 0,26; 0,24; 0,22; 0,13; 0,12; 0,11; 0,064. A fim de obter dados mais apurados quanto ao decréscimo de sua inibição sendo também repetidos em triplicata em três eventos distintos (tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de inibição de crescimento de *X. citri* subsp. *Citri* frente à presença do extrato LMA1957.

Concentração µg/mL	% média de inibição	Desvio padrão
16,4	95,44	0,17
15,23	97,42	0,02
14,06	97,31	0,04
8,2	95,35	0,06
7,62	97,36	0,01
7,03	97,21	0,03
4,1	89,90	3,80
3,81	93,83	0,94
3,52	93,98	1,47
2,05	61,67	12,41
1,9	67,18	6,34
1,76	71,87	10,85
1,025	39,64	16,76
0,95	29,56	6,87
0,88	31,33	18,26
0,513	14,55	10,57
0,48	0	0
0,26	0	0
0,24	0	0
0,22	0	0
0,13	0	0

Como observado na Tabela 3 a partir da concentração de 3,52 µg/mL a inibição do crescimento bacteriano começa a diminuir conforme a concentração do extrato diminui, até atingir 0% de inibição na concentração de 0,48 µg/mL.

5.3. Concentração Inibitória Mínima (CIM90)

A partir dos valores de inibição versus a concentração foi possível traçar curvas de regressão linear para os extratos LMA 1844, LMA 1840, LMA 1923 e LMA 1957 obtendo-se uma equação polinomial de quarta ordem (figuras 18, 19, 20 e 21). Esta equação foi usada para

o cálculo das concentrações inibitórias de 90% do crescimento bacteriano (CIM90) dos extratos em relação à linhagem utilizada de *X. citri* subsp. *citri* (Tabela 4).

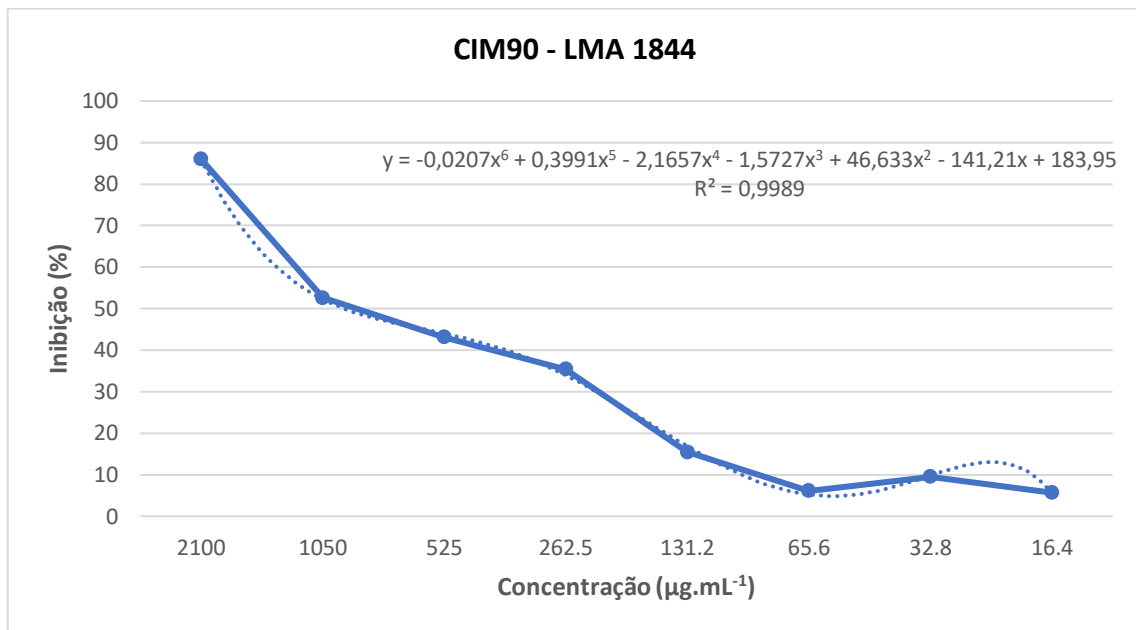


Figura 18: Gráfico da dose reposta do extrato LMA 1844 em relação à bactéria *X. citri* subsp. *Citri*.

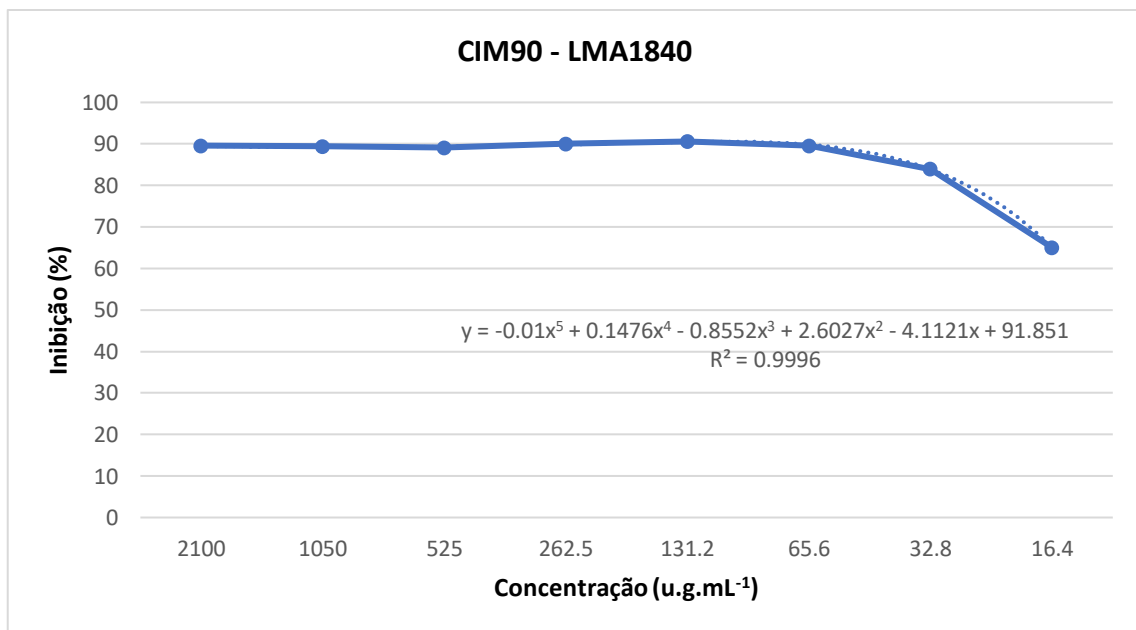


Figura 19: Gráfico da dose reposta do extrato LMA 1840 em relação à bactéria *X. citri* subsp. *Citri*.

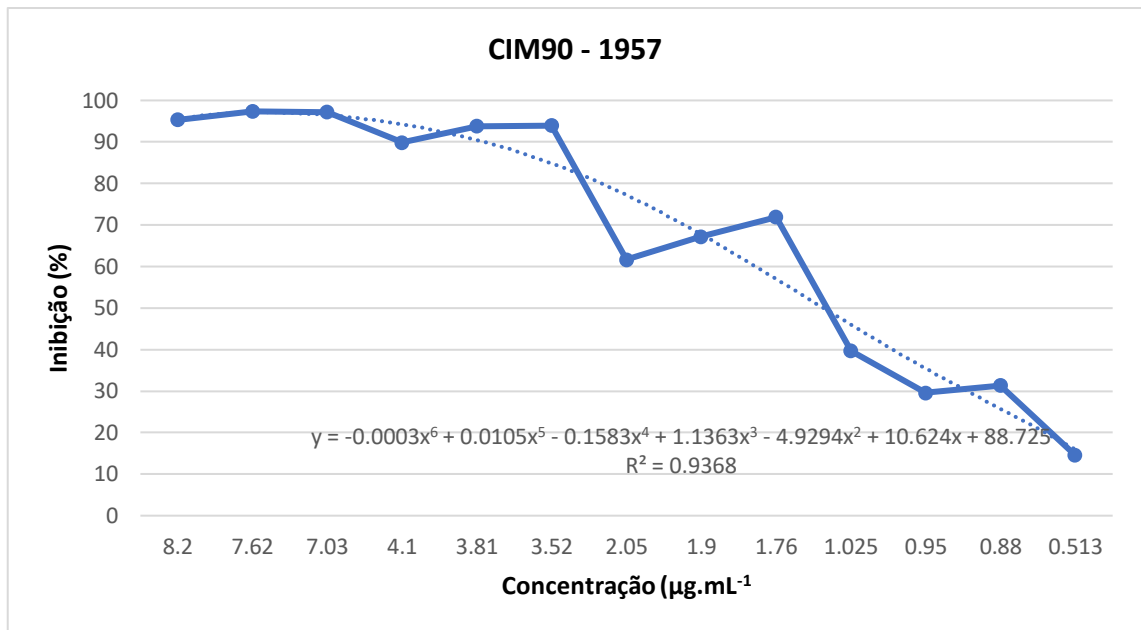


Figura 20: Gráfico da dose reposta do extrato LMA 1957 em relação à bactéria *X. citri subsp. Citri*.

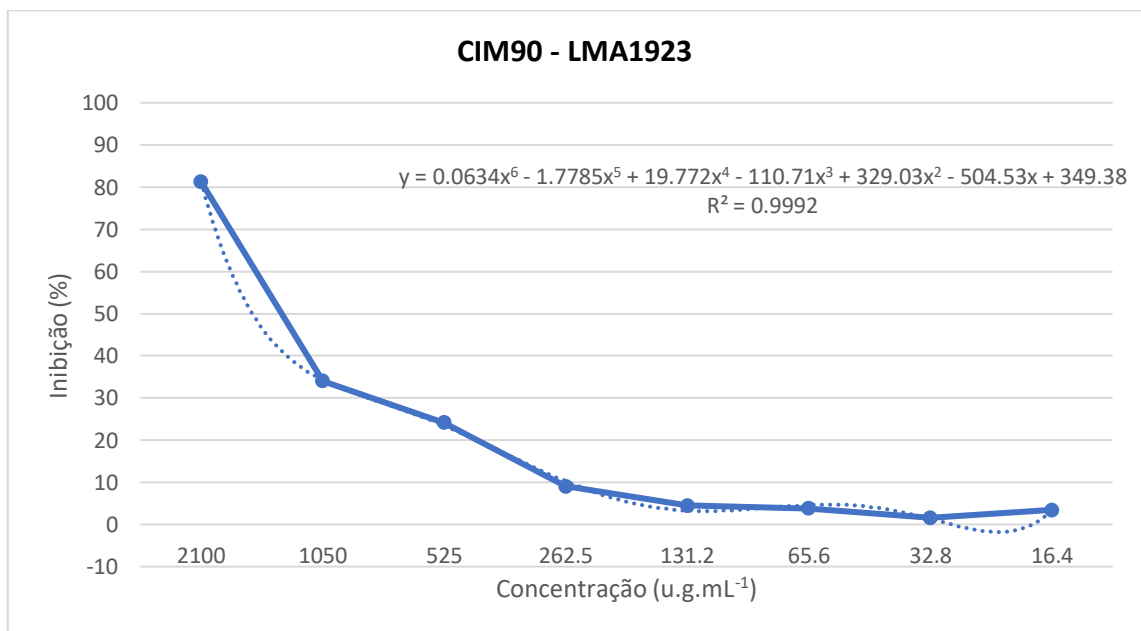


Figura 21: Gráfico da dose reposta do extrato LMA 1923 em relação à bactéria *X. citri subsp. Citri*.

Tabela 4. CIM90 dos extratos LMA 1844, LMA 1840, LMA 1957 e LMA 1923 em relação a bactéria *X. citri* subsp. *citri* (em $\mu\text{g/mL}$).

Extratos	CIM90 ($\mu\text{g/mL}$)
LMA 1844	2196
LMA 1840	2614
LMA 1957	4,89
LMA 1923	2213

Os extratos de LMA 1844, LMA 1840 e LMA 1923 apresentaram concentrações muito altas de CIM90, ficando acima da concentração limite testada que foi de 2100 $\mu\text{g/mL}$ se tornando inviável de realizar os testes subsequentes por serem necessárias grandes quantidades de extrato bruto. Já o valor obtido da CIM 90 para o extrato LMA 1957 (*Penicillium cf. purpurogenum*) foi de 4,89 $\mu\text{g/mL}$, ou seja, é necessária uma concentração do extrato de apenas 4,89 $\mu\text{g/mL}$ para inibir em 90% o crescimento de *X. citri* subsp. *citri*,

Este resultado é muito interessante visto que na literatura foram obtidos resultados significativos no controle da doença a partir de metabólitos secundários de *Pseudomonas aeruginosa* na concentração de 10,0 $\mu\text{g/mL}$ para *X. citri* subsp. *citri* por MURATE, L.S., et al. (2015), valor bem acima do obtido para o extrato de LMA 1957. Além disso, é importante salientar que a amostra em questão se trata de um extrato bruto e provavelmente o metabólito bioativo purificado poderá apresentar uma CIM90 ainda menor.

Foi realizado também o crescimento de LMA 1957 em outros dois meios de cultivo além de MA2% para verificar se com a mudança dos nutrientes ofertados o extrato continuaria apresentando a mesma inibição, os resultados estão apresentados na Figura 22.

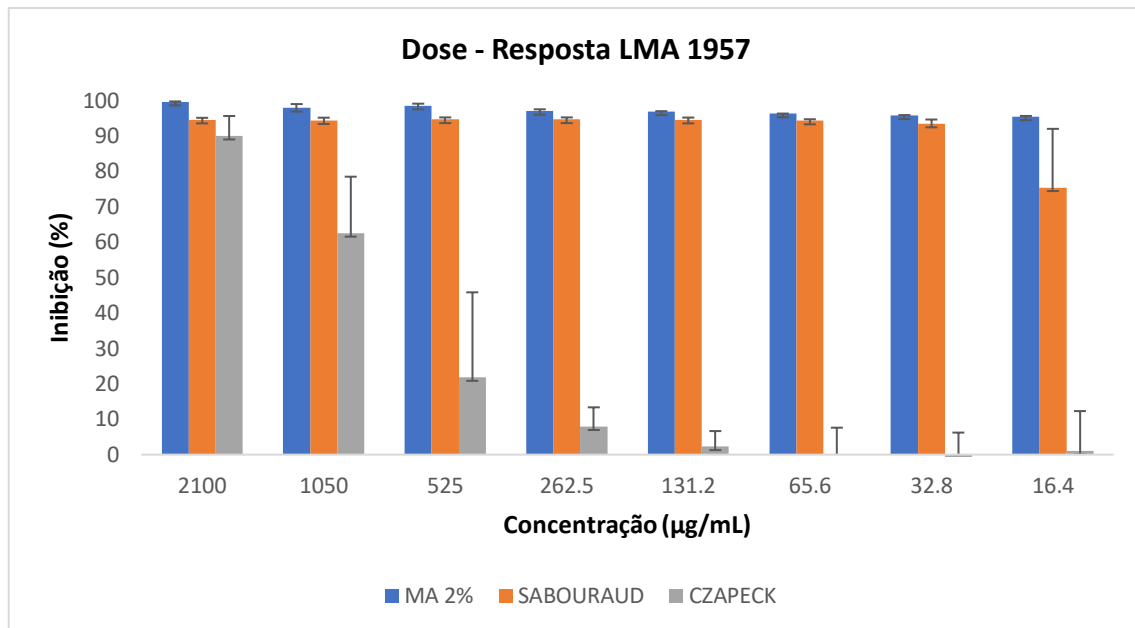


Figura 22: Gráfico da dose reposta do extrato LMA1957 nos meios Malte 2%, Sabouraud e CZAPECK em relação à bactéria *X. citri subsp. citri*

A partir dos dados apresentados na figura 22 é possível observar que tanto em Malte 2% quanto em Sabouraud houve porcentagens inibitórias superiores a 90% nas concentrações iniciais, já no extrato obtido através do meio CZAPECK houve inibição do crescimento bacteriano próximo a 90% para a maior concentração e esta foi decaindo de forma proporcional a diminuição da concentração. Provavelmente, por ser um meio pobre em nutrientes é possível notar uma produção inferior dos compostos responsáveis pela inibição bacteriana, fazendo com que a atividade diminua ou não esteja sendo produzido no meio nas concentrações mais baixas. Entretanto, o importante é observar que o micro-organismo continua produzindo o composto bioativo mesmo quando submetido ao crescimento em diferentes meios de cultivo.

5.4. Avaliação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Os quatro extratos considerados positivos durante a triagem inicial foram testados quanto a sua atividade bactericida, sendo possível então determinar a concentração mínima na qual o extrato possui características bactericidas. Os resultados obtidos neste bioensaio podem ser observados na Figura 23.

Todos os extratos dos fungos testados LMA 1844, LMA 1840, LMA 1957 e LMA 1923 apresentaram na concentração máxima de 2100 µg/mL poder bactericida como apresentado na Figura 6, inibindo totalmente o crescimento bacteriano, o extrato testado do fungo LMA 1840 apresentou poder bactericida em concentrações bem mais baixas até a concentração de 131,25 µg/mL e, bacteriostático nas concentrações subsequentes, sendo no entanto excluído dos testes futuros por ter ficado abaixo de 90% na média de inibição obtida através do REMA.

Por apresentar características inibitórias em todas as concentrações testadas até 16,4 µg/mL, o extrato obtido pelo fungo LMA 1957 foi testado até a concentração de 0,06 µg/mL (Figura 23) a fim de obter dados mais concretos quanto ao seu poder inibitório. Foi possível observar que ele apresentou poder bactericida até a concentração de 4,1 µg/mL inibindo completamente o crescimento bacteriano de *X. citri* subsp. *citri*. É possível observar que este extrato a partir da concentração de 2,05 µg/mL apresenta características bacteriostáticas sendo, portanto, considerada uma concentração capaz de inibir o crescimento celular em número, mas não eliminar totalmente o crescimento da bactéria como nas concentrações anteriores.

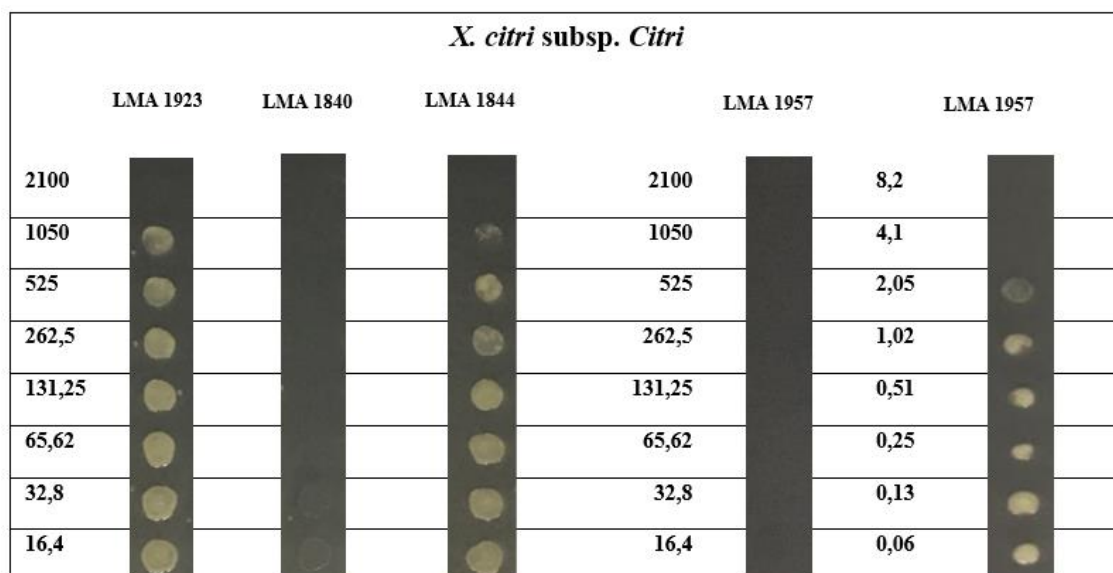


Figura 23. Concentração Bactericida Mínima de cada extrato bruto em relação a sua interação com *X. citri* subsp. *citri* e suas concentrações (em µg/mL).

5.5. Teste em planta

Os resultados obtidos através do teste com o extrato bruto de LMA 1957 ajustados a uma concentração de 4.1 µg/ml que foi a concentração obtida através do teste inibitório de MBC em solução de 2% de etanol apresentaram os seguintes resultados: o Controle Negativo (1% DMSO) aplicado apresentou número de lesões na superfície abaxial das folhas de *Citrus sinensis* (L) Osbeck, com média de 2,29 lesões/cm² (n = 67, desvio padrão ± 5,49). O Controle Positivo com Difere® foi o tratamento com menor número de lesões/área com média de 0,376 lesões/cm² (n = 59, desvio padrão ± 0,91) seguido do tratamento com o extrato bruto de LMA1957, com média de 1,76 lesões/cm² (n = 52, desvio padrão ± 3,808) (Figura 25). No entanto, os resultados obtidos através do extrato obtido por LMA1957 não apresentou diferença estatística significativa ou alta capacidade protetiva na concentração testada de 4,1µg/mL, esse resultado se dá principalmente pelos elevados números obtidos de desvios padrões.

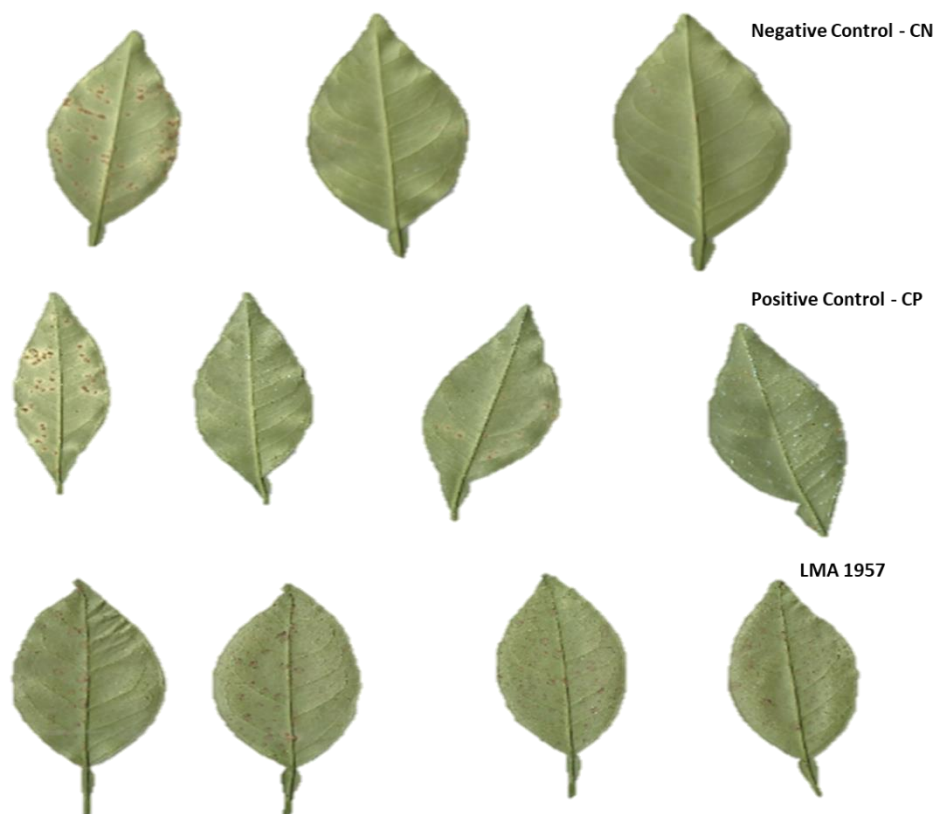


Figura 24: Folhas digitalizadas contendo os tratamentos CN, CP e LMA1957 respectivamente.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk para análise de distribuição normal e, conforme esperado pelo modelo do experimento não apresentaram distribuição normal, o que ocorre por razões inerentes ao processo de infecção e aparecimento de lesões na superfície foliar.

Sendo considerados não normais, os dados foram avaliados quanto à diferença entre as médias dos tratamentos por meio de análise estatística não-paramétrica aplicando o Teste de Kruskal-Wallis e em seguida foi aplicado o teste de comparações de Dunn's Post Hoc, para determinar qual tratamento teve maior efeito na prevenção de lesões/área. Os testes foram realizados com nível de significância de 0,05 (α : 0,05), ou seja, conclui-se com 95% de certeza que as médias dos tratamentos realmente são diferentes. Quando o valor p gerado na análise é $< \alpha$, há diferença estatística entre a média dos dados.

O Teste de Kruskal-Wallis determinou diferença significativa entre os tratamentos com $p < 0,076$. A comparação entre os tratamentos pelo teste de Dunn mostra que a diferença ocorreu entre os 3 tratamentos, pois todas as comparações apresentaram $p < 0,05$.

O teste de Dunn (Tabela 5) revela que o Controle Negativo teve o menor aparecimento de lesões (W: 83.522), seguido do tratamento com o extrato bruto de LMA1957 (W: 93.550), enquanto que o Controle Positivo testado com o Difere® não teve efeito no aparecimento de lesões (W:104.780).

Tabela 5: Análise estatística de comparação entre os tratamentos.

Dunn's Post Hoc Comparisons - Tratamento				
Comparison	z	W_i	W_j	p
CP - CN	2.273	104.780	83.522	0.012*
CP - LMA1957	1.169	104.780	93.550	0.121
CN - LMA1957	-1.077	83.522	93.550	0.141

Ainda de acordo com a tabela é possível observar a diferença significativa entre os controles Positivo e Negativo onde nesta análise CN apresentou um número inferior de incidência de lesões, não houve diferença significativa entre o Controle Positivo e o extrato bruto de LMA1957 devido as variações do desvio padrão presentes na análise. E, também a diferença ainda que mínima entre CN e LMA1957 que não deveriam apresentar valores próximos visto que o CN que está somente com 2% de EtOH não deveria influenciar no crescimento da doença. Os valores de **p** em que há * ao lado, são valores menores que 0.05, considerando um nível de confiança de 95% sendo, portanto, considerados não normais.

É importante salientar que embora a ação protetiva do extrato LMA 1957 não tenha apresentado nesta concentração uma média de lesões tão baixas (1,76) quanto as obtidas através do Difere® (0,36), este extrato ainda assim apresentou em estado bruto, em uma mistura de componentes uma média de lesões inferiores as obtidas pelo CN (2,29). No entanto, a concentração testada foi a mesma realizada no laboratório in vitro em condições controladas, diferentes das encontradas na estufa, portanto, é possível que com o teste *in planta* em

concentrações maiores ou após purificação e isolamento de seus compostos ativos revelem moléculas de alta capacidade inibitória podendo ser futuramente aplicadas como substituto de origem natural para defensivos agrícolas químicos atuais.

Posteriormente, com base nos resultados obtidos através do experimento realizado acima, foi realizado um novo teste com o extrato bruto onde foi testado em 10x a concentração de 4,1µg/mL que é correspondente a concentração mínima para a inibição de 90% do crescimento bacteriano (MIC90) *in vitro*. após a análise dos dados do primeiro teste realizou-se um novo teste em 20 plantas de *Citrus sinensis* enxertados em limão cravo (*Citrus x limonia*) da empresa Citrograf e cultivadas em casa de vegetação sob os cuidados do Prof. Dr. Henrique Ferreira. Foi realizada a poda das mudas para que fossem obtidas folhas jovens, entre os estágios V4 e V5 (Fundecitrus). O extrato selecionado (LMA 1957) foi diluído em etanol 100% e então ajustado a uma concentração de 41 µg/ml em solução de 2% etanol. O agroquímico difere® foi ajustado a concentração recomendada pelo fabricante de 0,2% em água, o controle de veículo utilizado consistiu em uma solução 2% de etanol em água e acrescentou-se mais um controle negativo sendo apenas água destilada. Através da leitura e análise de todas as folhas digitalizadas (figura 25) foram obtidos os dados referentes a média de lesões através do número de lesões / tamanho da folha ou lesões/cm² (tabela 6) utilizando o aplicativo ImageJ – FIJI (SCHINDELIN, J., et al., 2012).

Tabela 6: Tabela contendo os dados obtidos através dos cálculos do número de lesões / cm².

LMA 1957	CV	DIFERE	H2O
0	1.165710187	2.325919465	0.055404732
2.183179125	0.973591335	5.600077242	0
2.386402377	1.135659715	0.17541808	0
1.078431373	1.952819872	2.05449827	0
5.970924195	0.411332202	1.523229246	0
3.418945964	6.075988309	0	0.409556314
4.83155735	2.202238943	0.279251606	0
3.118411806	0	0.229744218	0.344063002
0.788449219	0.255427842	3.412616339	0

2.035038046	7.412898443	4.48906301	0.10704346
0.202238102	3.298845404	0	0
0	4.564225168	1.783492327	4.155647903
0	6.789755807	2.288732394	0
0.518710634	4.151624549	0.40155267	0.9352204
0	0.094840668	3.24787506	0
2.269002899	5.010569169	0.056123022	0.114246544
1.284109149	2.063557573	0	0
8.939538693	1.327825317	0.084530854	0
0	0.270526173	0.056044387	0
0	1.789366053	0.578536303	0.353169698
0.578321216	0.378644453	0	0
0	3.115911924	0.048146365	3.830369357
0.264596931	1.106847698	0.45674614	0.508130081
0.535045479	0.616522811	0.397772474	2.702983678
0.552355401	3.95976875	0.190376469	0.355019082
0	6.485484867	0.848999394	0.76394194
0.179195413	0.871839582	1.067287634	1.253918495
1.468249113	1.4651189	0.263574064	0.565158009
1.315356791	4.474799812	0.765462339	1.595668899
0	5.127010021	0	0
0	2.35220323	0	0
0	0	0.107544228	0
0.064614092	0.717801477	4.903883876	7.413743941
0	0.096209352	0.663570007	8.814057291
0	0.985646523	3.279696628	1.754010695
2.599301438	2.989458226	5.861136159	7.664341161
4.046180406	0.30848329	6.044455999	1.81315011
1.945701357	2.361371224	0.455414883	4.683273447
0.570450656	0.960614793	0.961815908	1.340482574
0	2.160604969	1.030927835	1.436575205
0	0.337381916	8.229098091	0.478640661
0.047662171	7.897934386	0.568074228	3.208341688
0	7.066444205	1.756954612	6.62659886
0.365821793	1.782531194	0.342641768	2.529084471
0.777264999	6.648113791	0.35083616	11.65848527
1.419026784	1.248347775	0.99195415	0.487820742
0.826943317	1.341201717	2.235523185	6.68989547
2.610966057	4.313770008	0	12.22808598
0.399760144	2.458712192	0	0.606501698
1.95019502	0.601853709	0	0.276497696
0.450653447	3.598209966	3.080325409	0
3.656975681	1.641164261	0.810956929	0
0	2.57447591	2.148050231	0
0.980049002	0	3.549930545	0

1.620620466	1.445306557	3.293957292	2.374983507
4.27167877	6.287090898	2.361275089	0
1.483679525	1.738959249	0.704721635	0
6.432807317	0.9957141	0.730246823	0
0	2.628602867	0.332078813	0
0	1.676979125	0	0.200521356
0	8.86756796	0	0
0	1.323865688	2.088078967	0
0.288392213	8.94492941	6.854949273	0
0.504649989	6.861239119	2.031900843	2.80033604
0.839438339	1.212807245	1.909763667	0.253871541
0.574382539	1.642541833	0.300842359	0.581707535
0.877903836	0.576784427	3.438789546	1.391734643
3.842705265	0.456225193	5.201560468	0
0	0.26316559	0.454103146	2.051808156
2.775636083	0.499562882	0.665956313	1.720459707
0.272090334	0.306896401	4.60385439	2.055714046
1.063582278	0.942253332	0.384578406	0.244453951
2.875724461	1.715462031	2.621231979	0
6.927426956	6.120726045	2.568923965	4.171225383
1.598779114	2.547198082	0.916279228	0.143430866
2.282282282	1.324893272	0.755458185	3.80010038
7.139886316	0	1.761006289	10.67501918
0	0	0.296333926	0.627833973
1.306392615	0.31152648	1.348687623	2.530844669
2.933661399	0	4.145711567	3.350757271
0.872600349	0.709773582	3.051396968	1.62835249
	4.307334109	0.646026934	0
	0	0.372740262	0
	0	0.07637669	0.176688851
	7.525870179	0	0
	9.009009009	3.246094543	0
	3.480278422	2.300520644	0.211476103
	0	5.639655684	0.862316758
	0.117439812		0.159328695
	3.329448976		0
	0.896619744		0.104297038
	0		0.633011552
	10.98694124		0.595238095
	1.364334034		0
	0		
	1.19868145		
	0.263937359		
	0.284474788		
	4.537953795		

0.804990944
0.460935699

Ao analisar os resultados obtidos através do teste com o extrato bruto de LMA 1957 na tabela 7 é possível verificar os seguintes resultados: O Controle Negativo (2% EtOH) apresentou uma média de número de lesões na superfície abaxial das folhas de *Citrus sinensis* (L) Osbeck, de 2,38 lesões/cm² (n = 101, desvio padrão ± 0,25). O Controle Positivo com Difere® com média de 1,64 lesões/cm² (n = 88, desvio padrão ± 0,19) seguido do tratamento com o extrato bruto de LMA1957 que foi o tratamento com menor número de lesões/área, com média de 1,44 lesões/cm² (n = 81, desvio padrão ± 0,21).

Tabela 7: Dados estatísticos obtidos referente ao número de lesões versus tamanho da folha

	LMA 1957	CV	DIFERE	H20
Nº	81	101	88	94
Min	0	0	0	0
Max	8,939539	10,98694	8,229098	12,22809
Sum	117,4139	240,9596	145,101	141,1046
Media	1,449555	2,385739	1,648875	1,501113
D. Padrão	0,2118717	0,255459	0,1991717	0,2715944

Foi possível identificar como satisfatórios os resultados obtidos, onde, o LMA1957 apresentou diferença estatística significativa ou alta capacidade protetiva, semelhante ao controle positivo Difere, na concentração testada de 41µg/mL, considerado, portanto, viável a utilização deste extrato para testes futuros, é importante salientar que esses resultados foram obtidos através do extrato bruto, que após o isolamento do composto ou da mistura de compostos responsáveis pela sua atividade inibitória esses resultados poderão se tornar ainda mais satisfatórios.

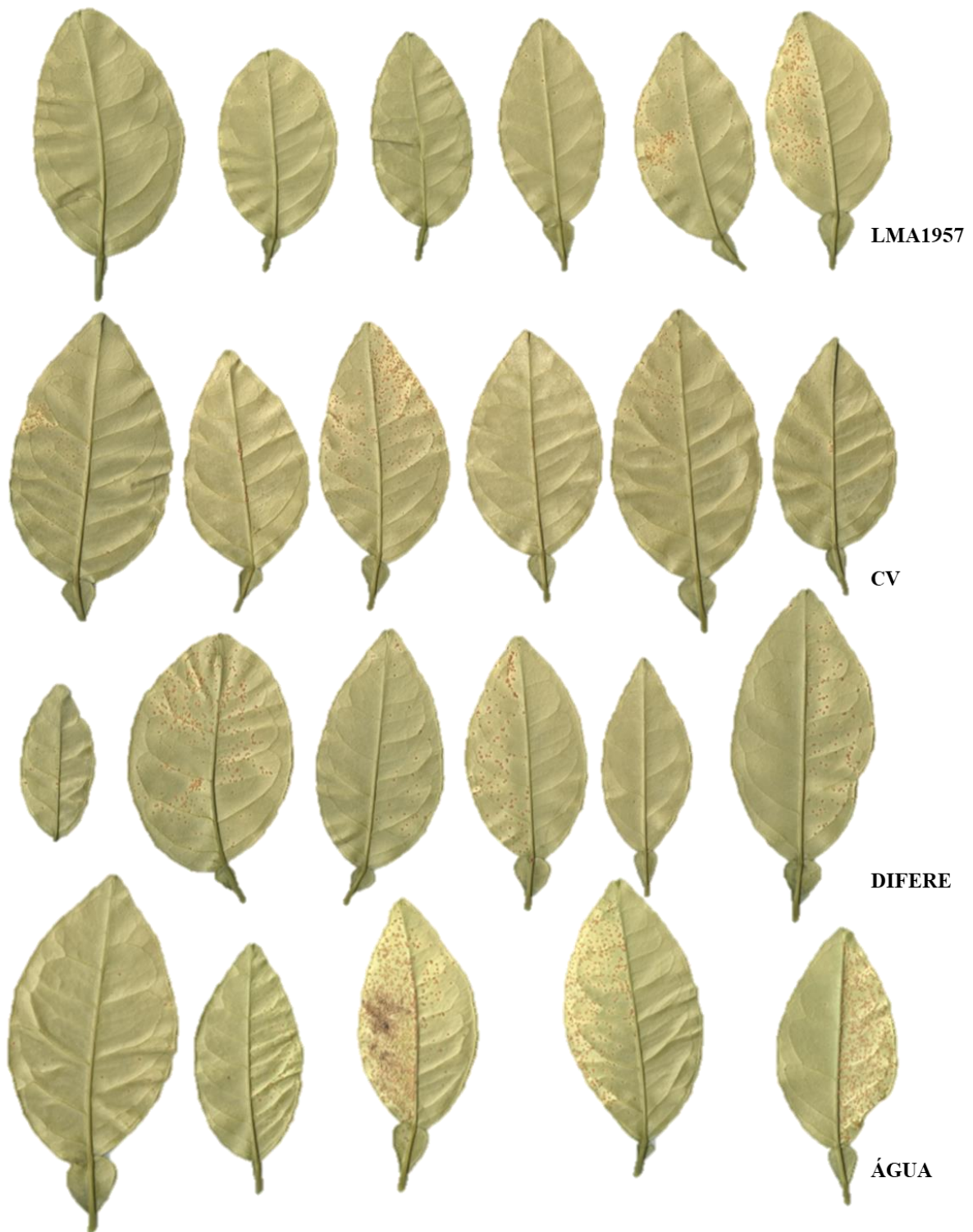


Figura 25: figura contendo folhas de todos os controles testados. Foto: do autor.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk (tabela 8) para análise de distribuição normal e, conforme esperado pelo modelo do experimento não apresentaram distribuição normal, o que ocorre por razões inerentes ao processo de infecção e

aparecimento de lesões na superfície foliar, sendo feitos testes subsequentes a fim de analisar as variáveis apresentadas através dos dados obtidos. O Teste de Kruskal-Wallis determinou diferença significativa entre os quatro tratamentos com $p < 0,05$.

Tabela 8: Resultados estatísticos obtidos através do teste de Kruskal Wallis.

Kruskal-Wallis test for equal medians	
H (chi2):	21,25
Hc (tie corrected):	21,49
p (same):	8,326E-05
There is a significant difference between sample medians	

Sendo considerados não normais, os dados foram avaliados quanto à diferença entre as médias dos tratamentos por meio de análise estatística não-paramétrica aplicando o Teste de Kruskal-Wallis e em seguida foi aplicado o teste de comparações de Dunn's Post Hoc, para determinar qual tratamento teve maior efeito na prevenção de lesões/área. Os testes foram realizados com nível de significância de 0,05 ($\alpha: 0,05$), ou seja, conclui-se com 95% de certeza que as médias dos tratamentos realmente são diferentes. Quando o valor p gerado na análise é $< \alpha$, há diferença estatística entre a média dos dados.

O teste de Dunn (Tabela 9) revela que o Controle Positivo testado com Difere® (W:189:500) seguido do tratamento com o extrato bruto de LMA1957 (W:169:889) apresentaram o melhor efeito preventivo ou o menor aparecimento de lesões enquanto que o Controle de veículo (W:216.782) testado com o Difere® não teve efeito no aparecimento de lesões. Os valores de p (Tabela 8) em que há * ao lado, são valores menores que 0.05, considerando um nível de confiança de 95% sendo, portanto, considerados não normais. Análises estatísticas de Normalidade, Kruskal-Wallis e de Dunn's Post Hoc foram realizadas através do software Past versão 4 (University of Oslo, Noruega) (Hammer et al, 2001) a fim de confirmar os resultados estatísticos obtidos.

Tabela 9: Dados estatísticos obtidos através do teste de Dunn's Post Hoc

Dunn's Post Hoc Comparisons – Tratamento				
Comparison	z	W_i	W_j	p
ÁGUA - CV	-4.455	149.979	216.782	< .001*
ÁGUA - DIFERE	-2.546	149.979	189.500	0.005*
ÁGUA - LMA 1957	-1.255	149.979	169.889	0.105
CV – DIFERE	1.788	216.782	189.500	0.037*
CV - LMA 1957	3.005	216.782	169.889	0.001 *
DIFERE - LMA 1957	1.217	189.500	169.889	0.112

É importante salientar que embora a ação protetiva do extrato LMA 1957 tenha apresentado um número de lesões tão baixas quanto as obtidas através do Difere®, este extrato apresenta-se em uma mistura de componentes uma média de lesões bem inferiores as obtidas pelo CN. É importante salientar que, embora a concentração testada tenha sido de 10x que a concentração realizada no laboratório in vitro em condições controladas, diferentes das encontradas na estufa, é possível que com o teste *in planta* em concentrações ainda maiores ou após purificação e isolamento de seus compostos ativos revelem moléculas de alta capacidade inibitória podendo ser futuramente aplicadas como substituto de origem natural para defensivos agrícolas químicos atuais.

5.6. Teste de validação dos extratos

Após a produção de uma nova quantidade de extrato bruto da linhagem LMA 1957, o mesmo passou por uma avaliação a fim de verificar se o mesmo continuaria apresentando atividades inibitórias satisfatórias em valores semelhantes aos encontrados anteriormente, foi possível verificar que diferente das atividades encontradas nas avaliações anteriores onde apresentou atividade inibitória superior a 90% acima de 3,52 µg/mL (figura 27). Nesta nova avaliação foi possível observar que atividades inibitórias contra *X. citri* subsp. *citri* foram

encontradas em concentrações ainda mais baixas, apresentando atividades inibitórias acima de 90% em 0,88 µg/mL. Os dados para esta análise foram obtidos em triplicata.

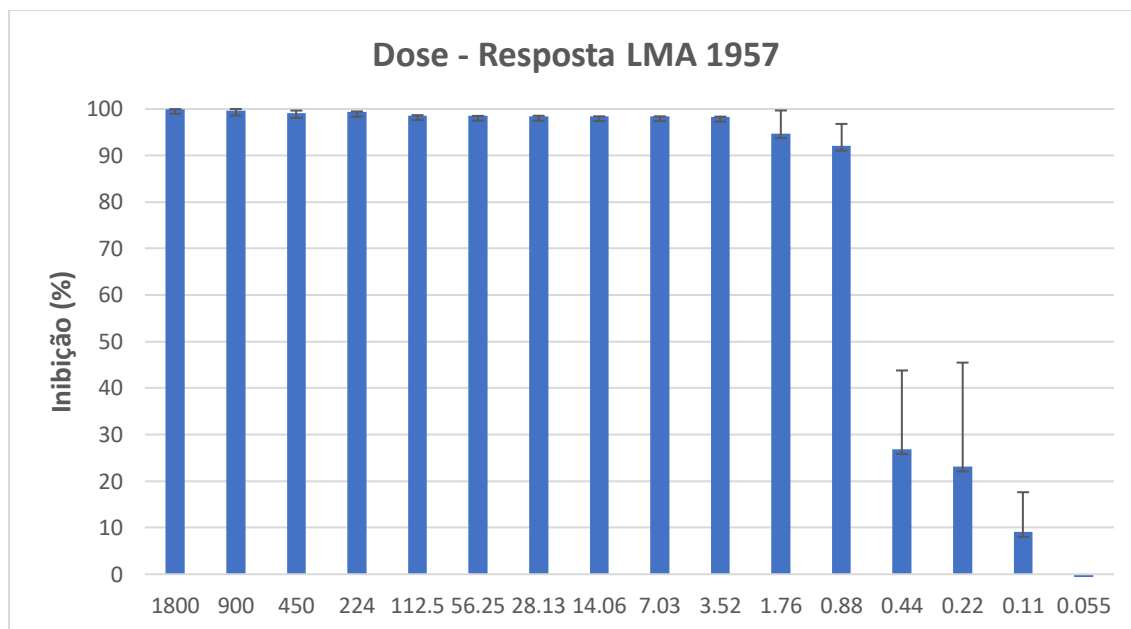


Figura 26: Gráfico da dose resposta do extrato LMA1957 no meio Malte 2% em relação à bactéria *X. citri* subsp. *citri*

5.7. Cromatografia em coluna

Durante o processo de eluição da coluna foram obtidos um total de 344 tubos que foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD) e por similaridade foram reunidos em 29 frações, as quais apresentaram após o processo de secagem os seguintes rendimentos (tabela 10).

Tabela 10: Tabela contendo as frações obtidas e seus respectivos rendimentos após secagem e pesagem.

Fração	Massa	Fração	Massa
1	1,4 mg	16	20 mg
2	1,1 mg	17	4,4 mg
3	7,8 mg	18	3,5 mg
4	13,3 mg	19	15 mg
5	10,4 mg	20	20,9 mg

6	5,8 mg	21	13,4 mg
7	4,6 mg	22	6,2 mg
8	4,1 mg	23	3,5 mg
9	5,6 mg	24	17,1 mg
10	4 mg	25	12 mg
11	0,8 mg	26	3,3 mg
12	11,6 mg	27	11 mg
13	12,8 mg	28	6,2 mg
14	2,9 mg	29	13,7 mg
15	94 mg		

Seguindo o método de REMA já descrito anteriormente, todas as frações foram testadas e analisadas quanto ao seu potencial inibitório contra *X. citri* subsp. *citri* a fim de identificar qual ou quais frações bioativas apresentaram melhor atividade inibitória. Os gráficos contendo a variação da atividade versus a concentração para cada fração estão apresentados nas figuras 27 – 41 e nas figuras 43-46 são apresentados os testes de atividade bactericida de cada fração.

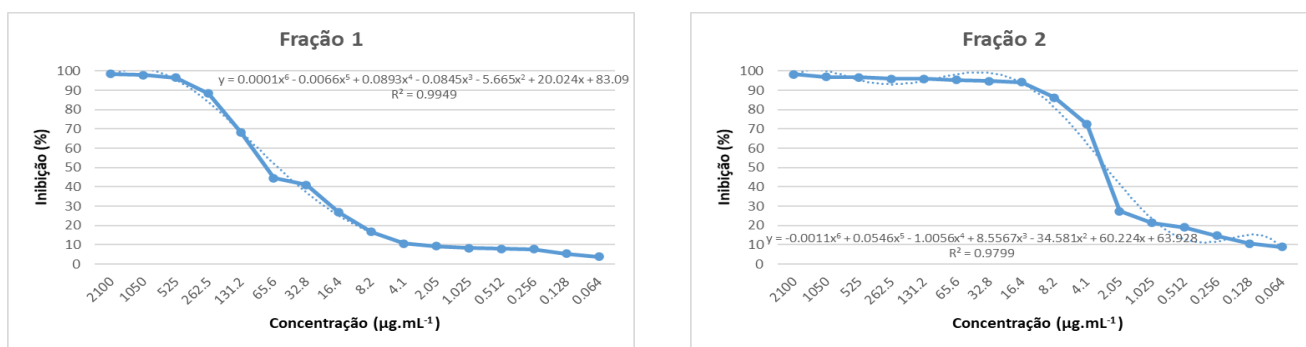


Figura 27: Curva de inibição das frações de LMA 1957 obtidas através do método de REMA.

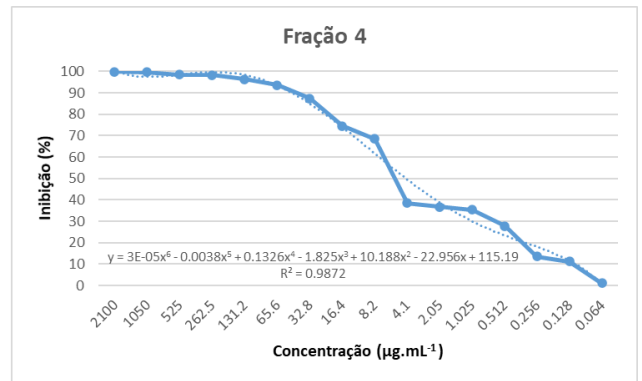
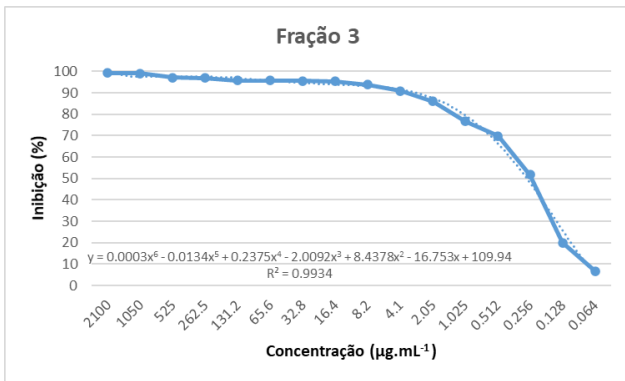


Figura 28: Curva de inibição das frações de LMA 1957 obtidas através do método de REMA.

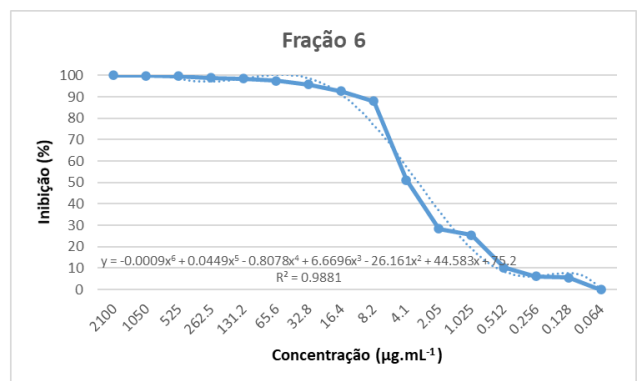
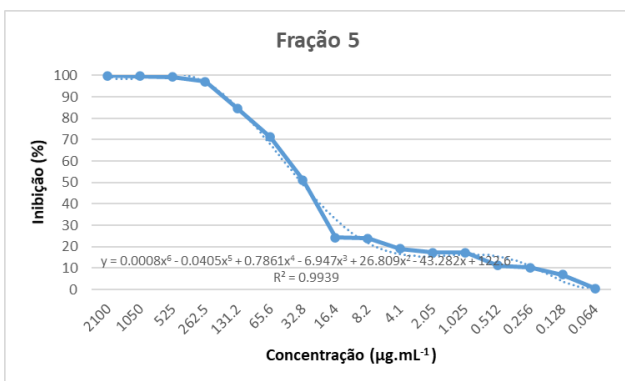


Figura 29: Curva de inibição das frações de LMA 1957 obtidas através do método de REMA.

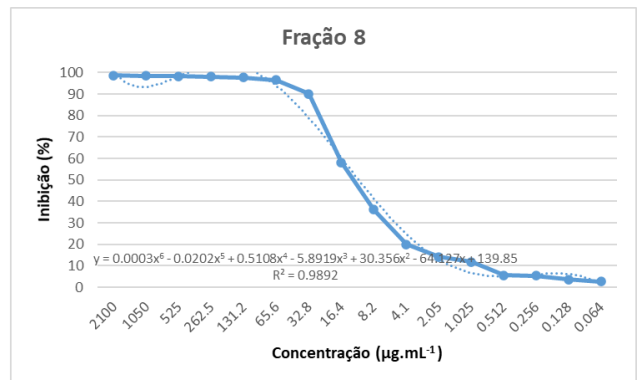
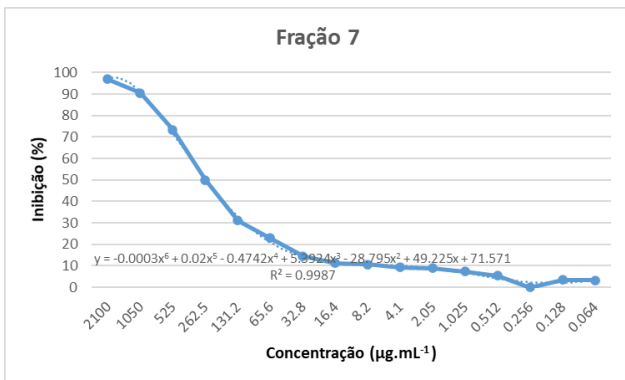


Figura 30: Curva de inibição das frações de LMA 1957 obtidas através do método de REMA.

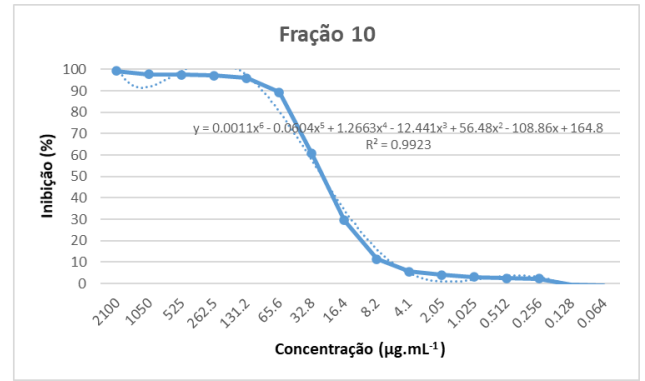
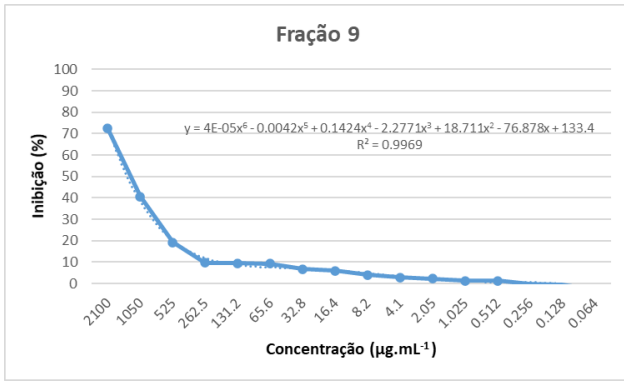


Figura 31: Curva de inibição das frações de LMA 1957 obtidas através do método de REMA.

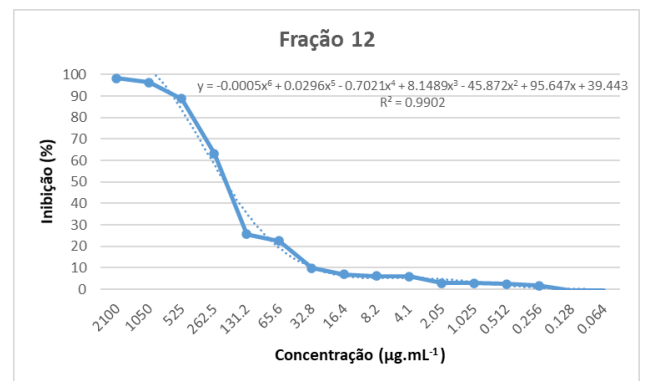
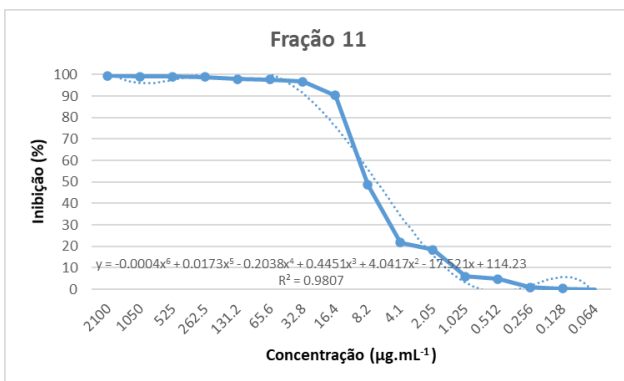


Figura 32: Curva de inibição das frações de LMA 1957 obtidas através do método de REMA.

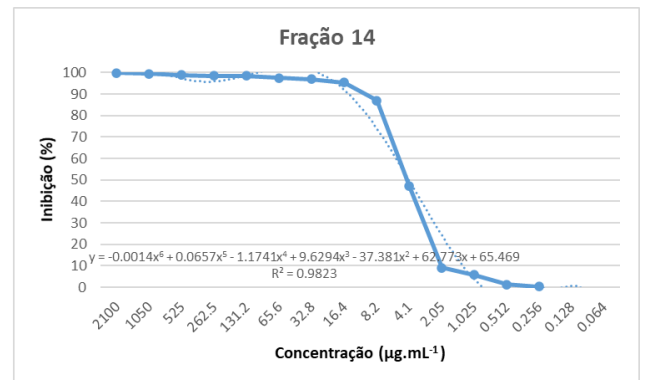
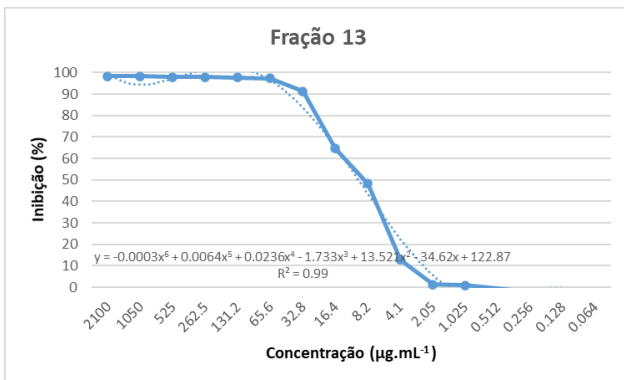


Figura 33: Curva de inibição das frações de LMA 1957 obtidas através do método de REMA.

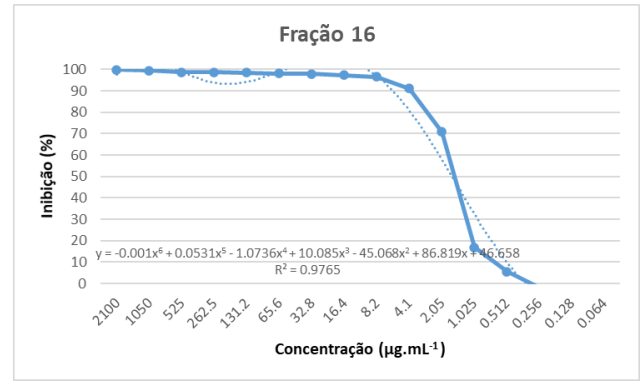
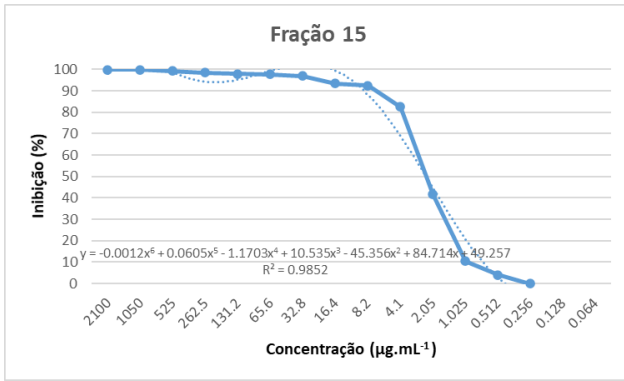


Figura 34: Curva de inibição das frações de LMA 1957 obtidas através do método de REMA.

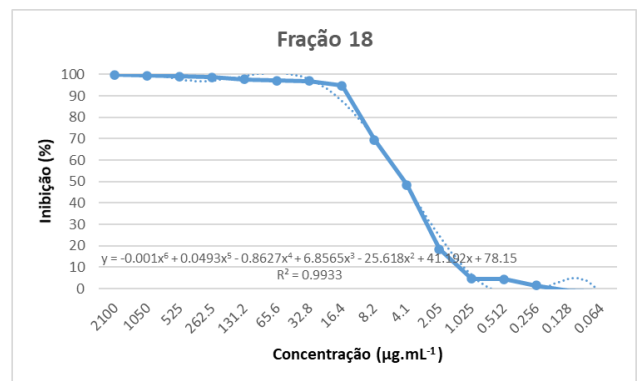
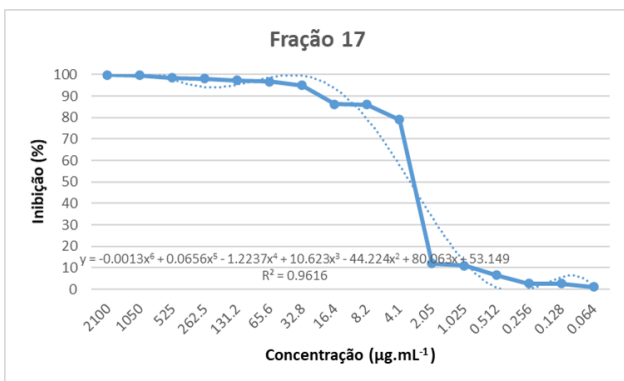


Figura 35: Curva de inibição das frações de LMA 1957 obtidas através do método de REMA.

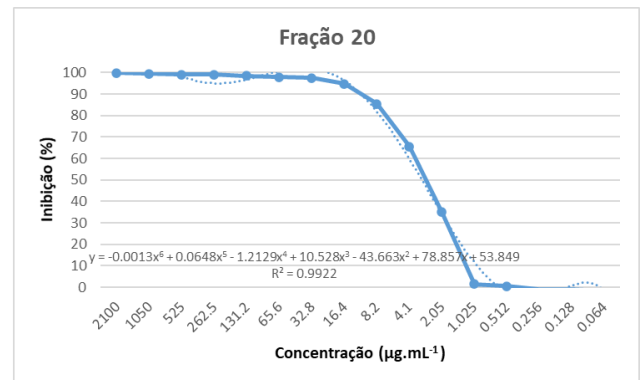
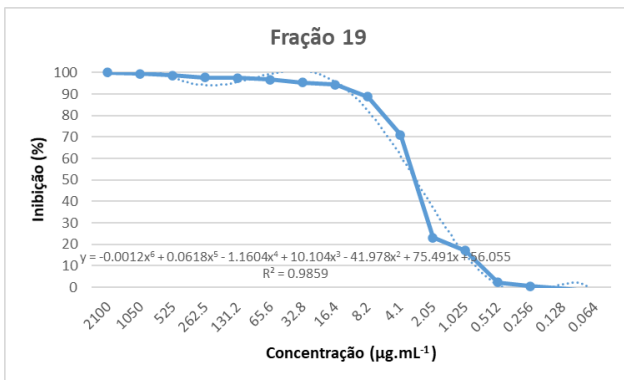


Figura 36: Curva de inibição das frações de LMA 1957 obtidas através do método de REMA.

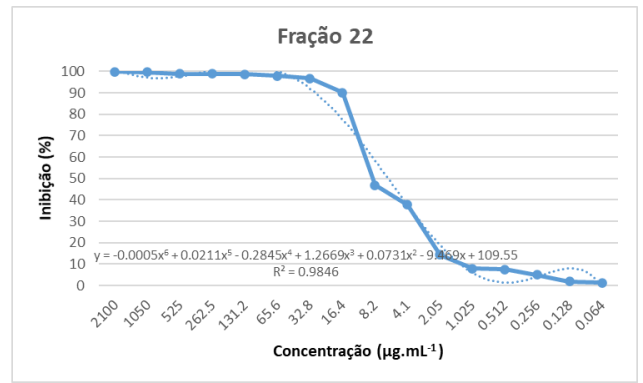
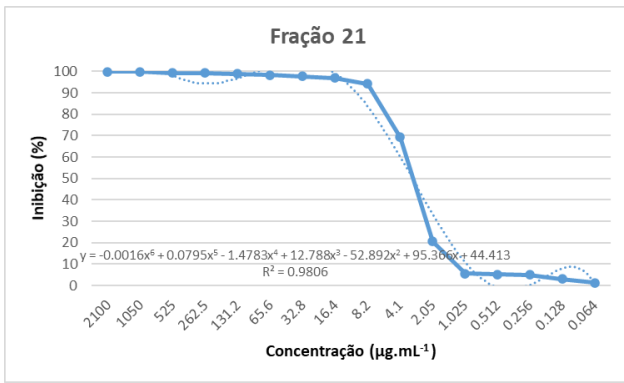


Figura 37: Curva de inibição das frações de LMA 1957 obtidas através do método de REMA.

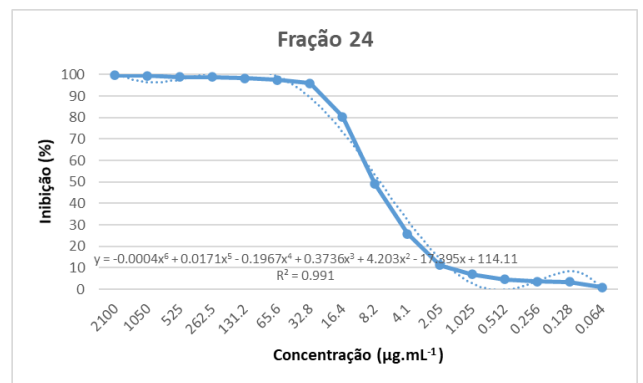
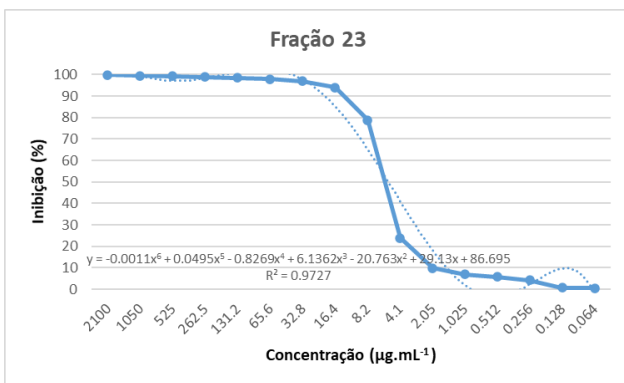


Figura 38: Curva de inibição das frações de LMA 1957 obtidas através do método de REMA.

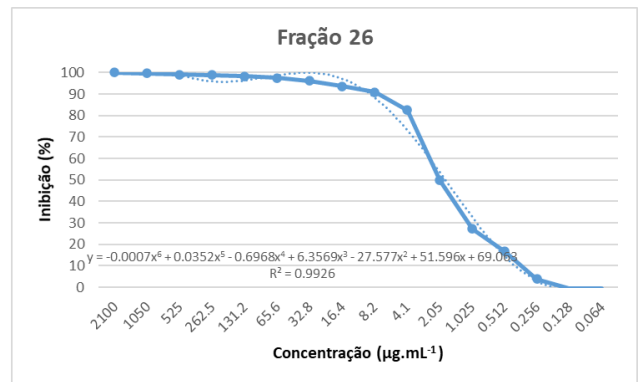
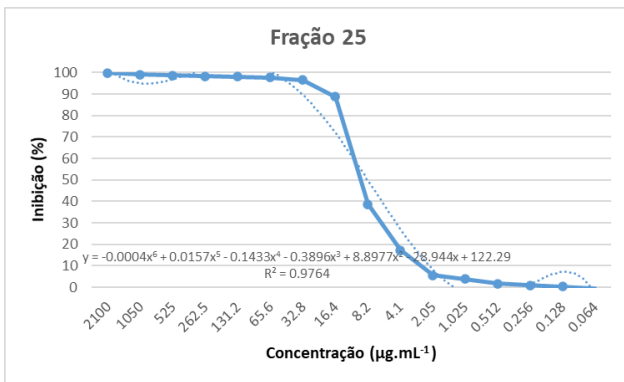


Figura 39: Curva de inibição das frações de LMA 1957 obtidas através do método de REMA.

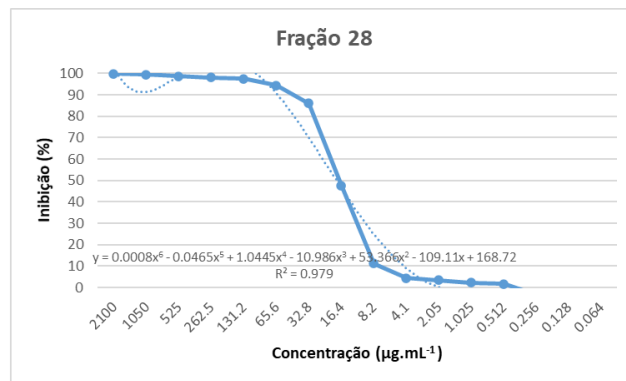
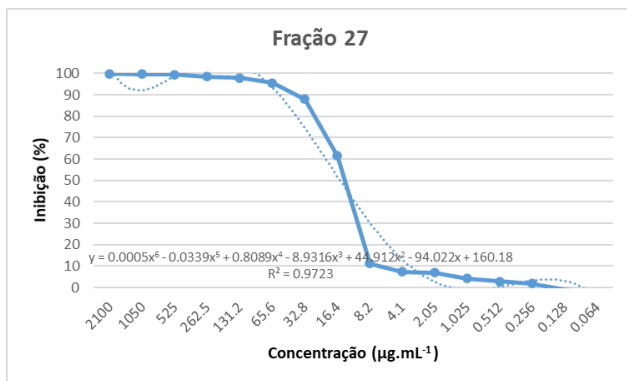


Figura 40: Curva de inibição das frações de LMA 1957 obtidas através do método de REMA.

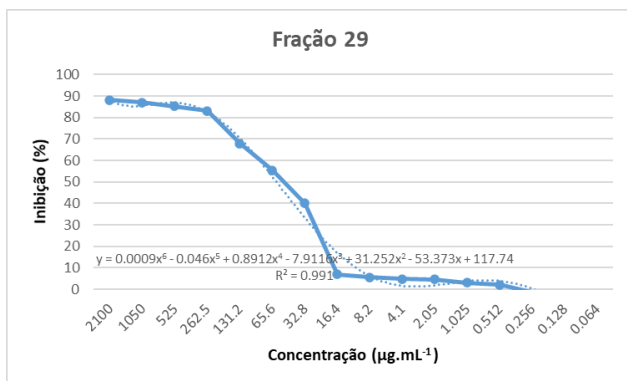


Figura 41: Curva de inibição das frações de LMA 1957 obtidas através do método de REMA.

A figura 42 mostra um esquema das placas de MBC apresentadas abaixo, onde, as colunas em branco estão apenas com meio e bactéria, sendo, portanto, descartadas da leitura dos resultados por terem sido preenchidas apenas para evitar erros padrões como a evaporação do meio nos poços que serão lidos. Cada fração foi adicionada no poço marrom escuro na maior concentração presente e diminuindo conforme o método de REMA já descrito anteriormente e seguido por duas colunas conforme a figura abaixo a fim de obter uma melhor abertura da curva de concentração, sendo assim, a leitura das placas de MBC presentes neste trabalho seguirão esse mesmo método de leitura.

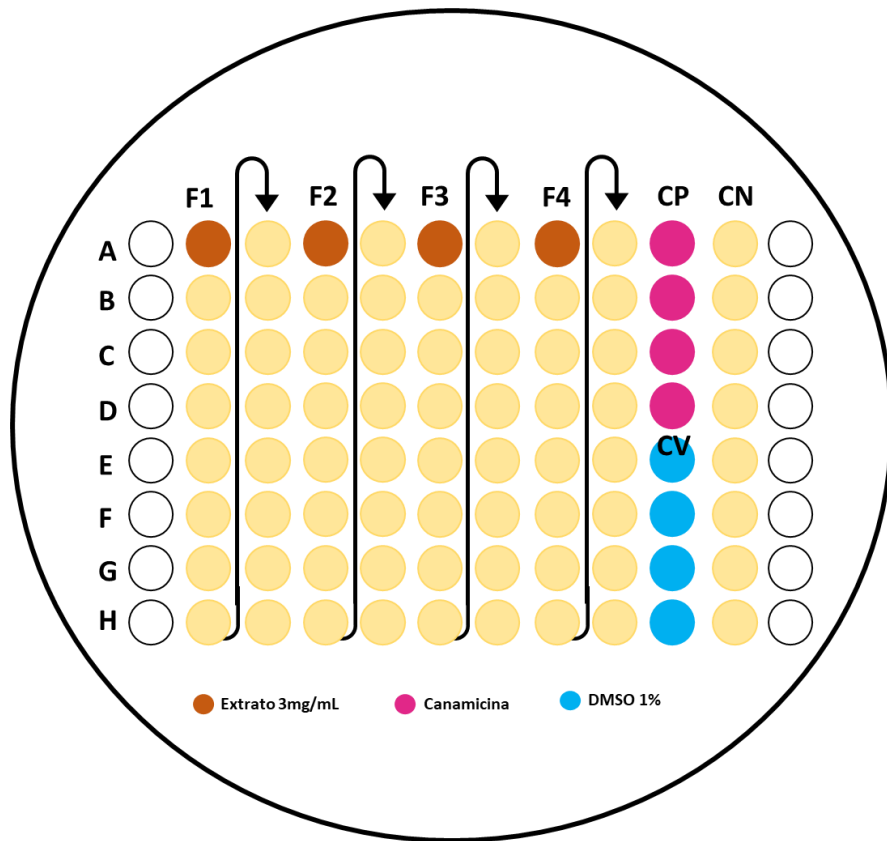


Figura 42: Figura esquematizando os resultados de MBC apresentados abaixo.

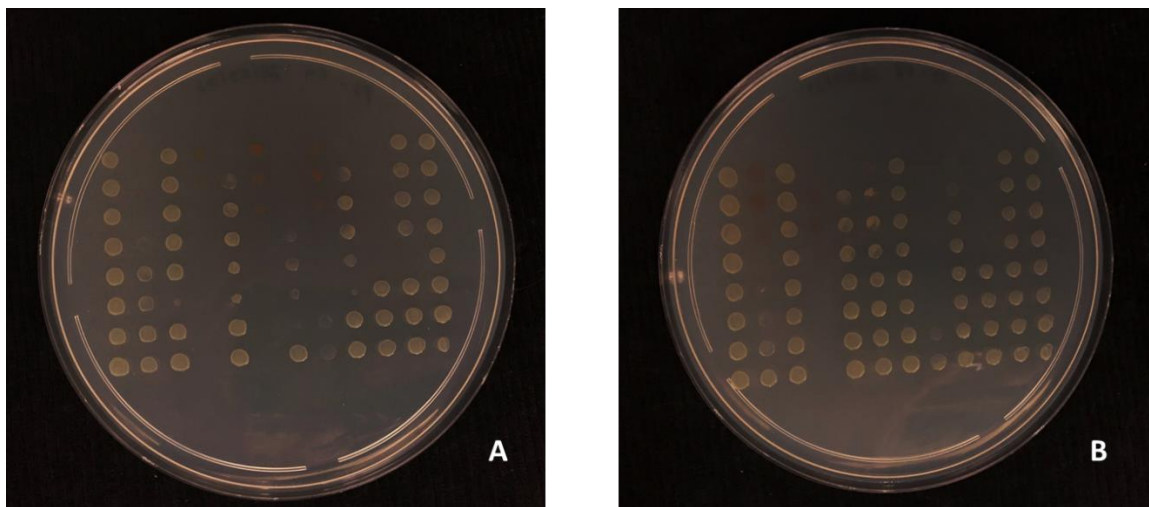


Figura 43: Placas de MBC contendo as frações 1 - 4 (A), 5-8 (B). Foto: do autor

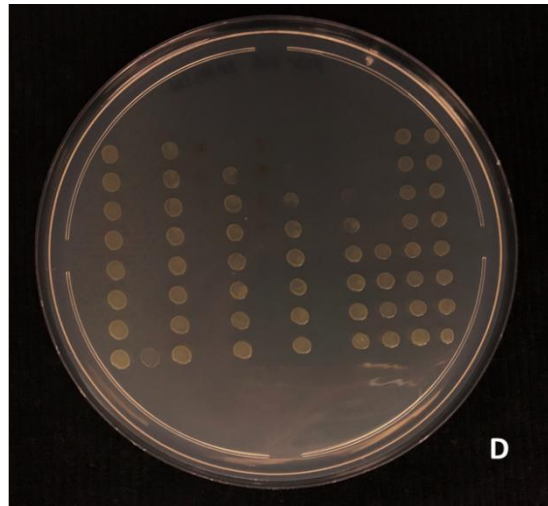
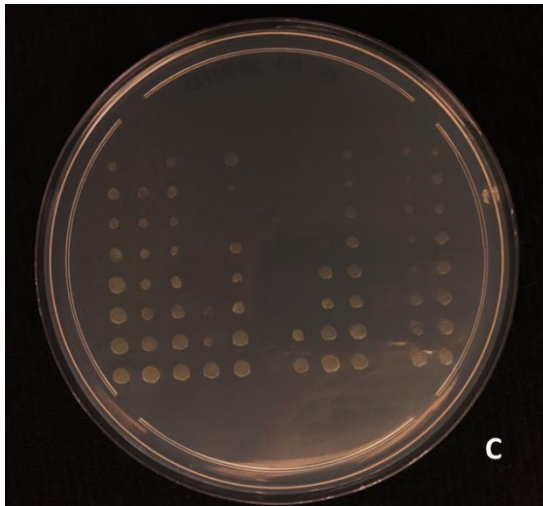


Figura 44: Placas de MBC contendo as frações 9 - 12 (C), 13-16 (D). Foto: do autor

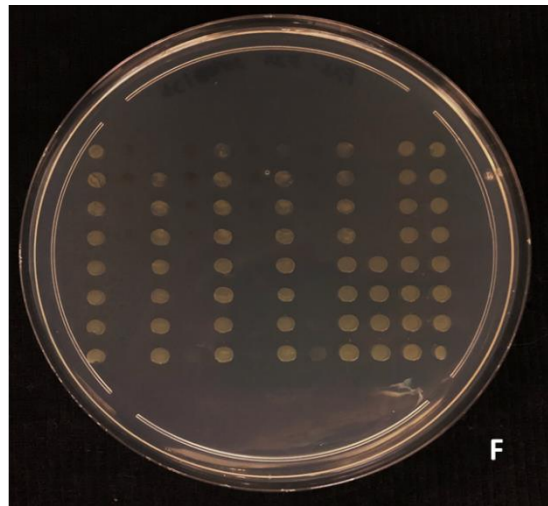
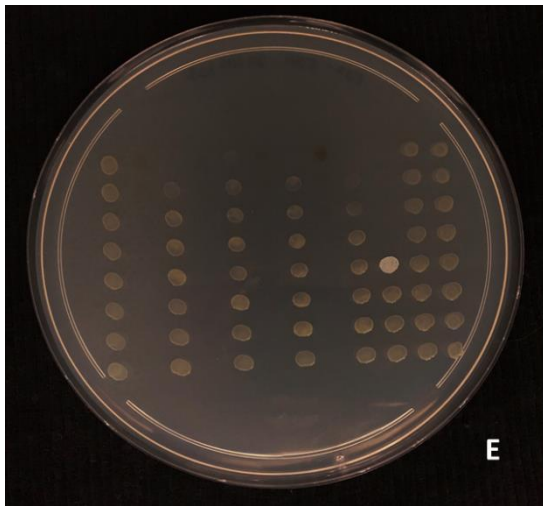


Figura 45: Placas de MBC contendo as frações 17 - 20 (E), 21 - 24 (F). Foto: do autor

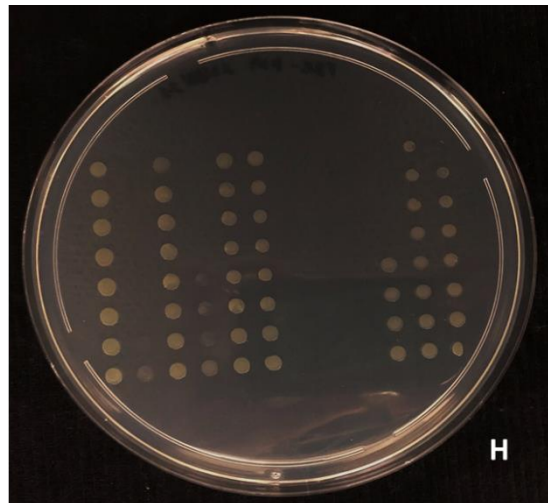
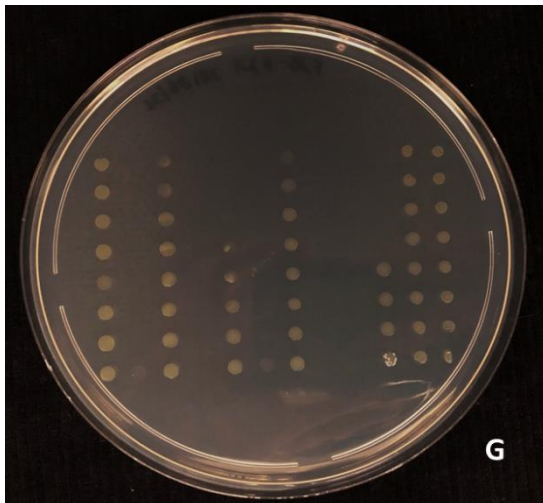


Figura 46: Placas de MBC contendo as frações 25 - 27 (G), 28 - 29 (H). Foto: do autor

Analisando os gráficos de decaimento de atividade vs concentração, a atividade bactericida e o rendimento da fração, visto que é necessária uma massa considerável para as análises químicas, a fração F15 foi selecionada para dar prosseguimento, já que está apresentou maior massa, o decaimento da atividade foi proporcional a diminuição da concentração, mantendo atividade máxima até 4,1 µg/mL e apresentou atividade bactericida em 4,1 µg/mL. A amostra foi encaminhada para a realização de análise de RMN de ¹H, entretanto, não foi possível ainda pelo espectro de hidrogênio da amostra identificar o composto, há necessidade de uma análise de espectrometria de massas, a qual já tentou realizá-las em vários locais, mas sem sucesso.

Identificado inicialmente como *Penicillium cf purpurogenum* em 1904 por Beitr et al, foi atualmente reclassificado para *Talaromyces Purpurogenum* (Samson R. A., 2011). É possível encontrar relatos na literatura sobre a bioatividade de metabólitos secundários obtidos de *Talaromyces* sp., sendo as principais atividades encontradas: antifúngica, antibacteriana e antitumoral. Dentre os encontrados com potencial atividade antifúngica estão os metabólitos secundários de *Talaromyces flavus* com potencial inibitório contra *Candida albicans*, *Aspergillus niger* e *Mucor racemosus* (M. ARAI et. al. 2002; F. LIU et. al. 2010; J. W. HE et. al. 2015).

Metabólitos secundários de *Talaromyces* sp., *Talaromyces amestolkiae* e *Talaromyces flavus* isolados de amostras de solo, *Talaromyces rugulosus* isolado através de esponja marinha mediterrânea e o endófito *Talaromyces wortmannii* isolado de babosa *Aloe vera* (L.) Burm. f. apresentaram atividade inibitória significativa contra diversas bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus megaterium*, *Sarcina ventriculi*, *Pseudomonas aeruginosa* e

Micrococcus luteus (F. LIU et. al. 2010; S. CHEN et. al.,2016; J. W. HE et. al. 2015; M. M. ZHAI et. al. 2015; R. BARA et. al. 2013)

Existem, também, relatos de atividade antitumoral proveniente de metabólitos do grupo, como visto em H. LI et al 2011, que identificou 3 metabólitos extraídos de *T. flavus* apresentando resultados citotóxicos considerados promissores para 5 tipos de células cancerígenas em humanos e por M. M. ZHAI et. al. em 2015 que identificaram metabólitos do isolado *Talaromyces wortmannii* com atividade citotóxica contra diversas linhagens celulares cancerígenas.

Já são bem conhecidas algumas estruturas químicas isoladas de *Talaromyces* sp. que apresentam atividades antibacterianas, antifúngicas e antitumorais como as citadas acima, dentre os exemplos de moléculas identificadas a partir destes isolados estão esteroides e terpenoides (H. Li et al, 2011)(figura 47), Quinonas (J. Atherton et al, 1968) (Figura 48), Meroterpenóides (Kaur et al, 2016; H. Hideo et al, 2012) (figura 49).

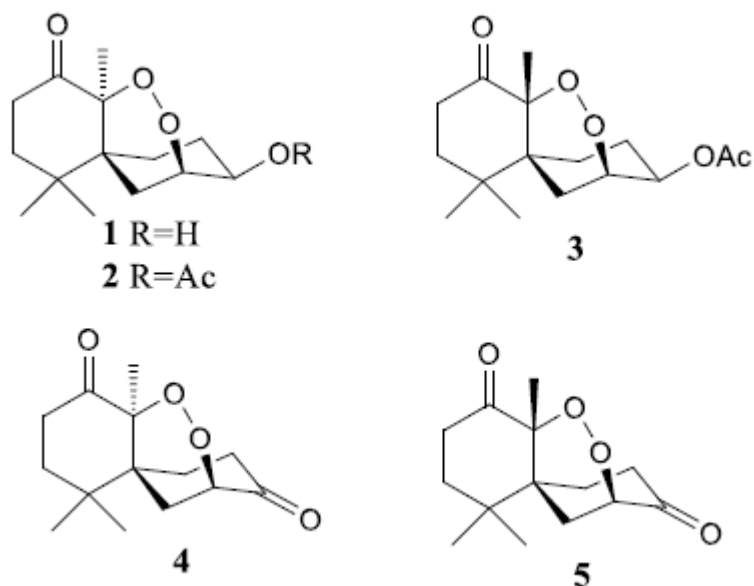


Figura 47: Talaperoxides A-D (1, 3, 4 e 5) e steperoxide B (2), moléculas com potencial atividade contra câncer de mama.

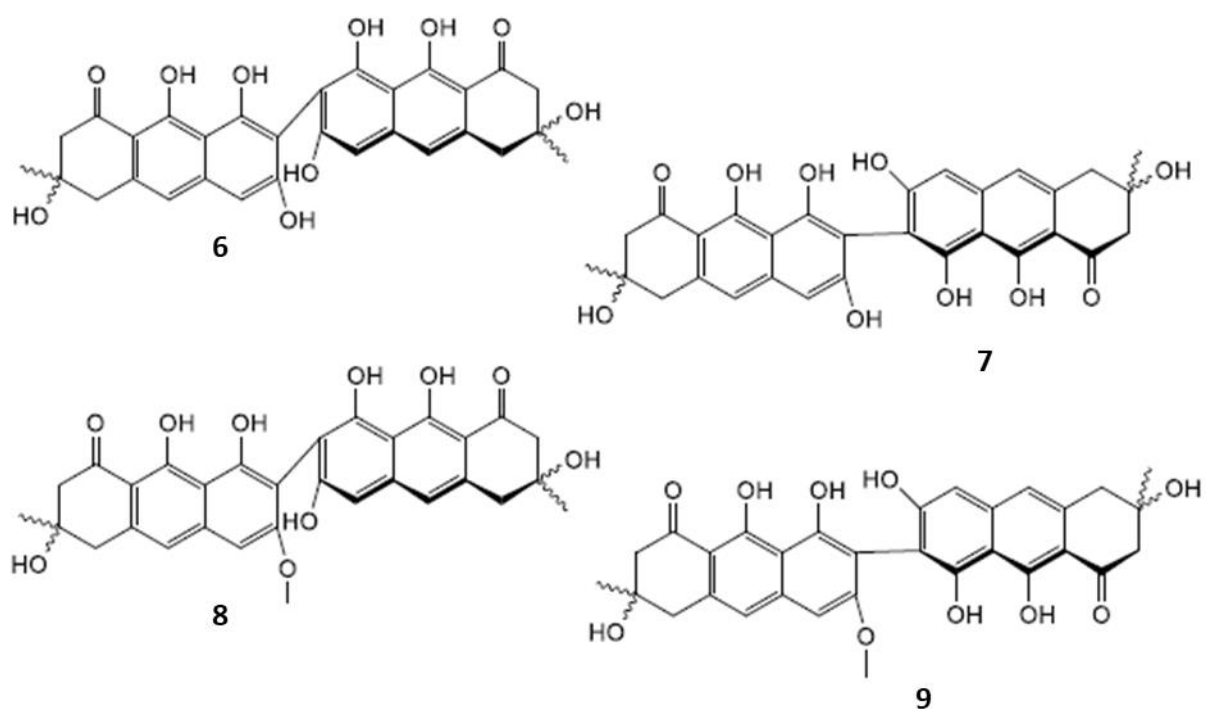


Figura 48: Homodimérico (aR, 3R, 3'R)-flavomanina A (6), (aS, 3R, 3'R)-flavomanina B (7), flavomanina C (8) e flavomanina D (9), moléculas com atividades antibacterianas contra *S. aureus*.

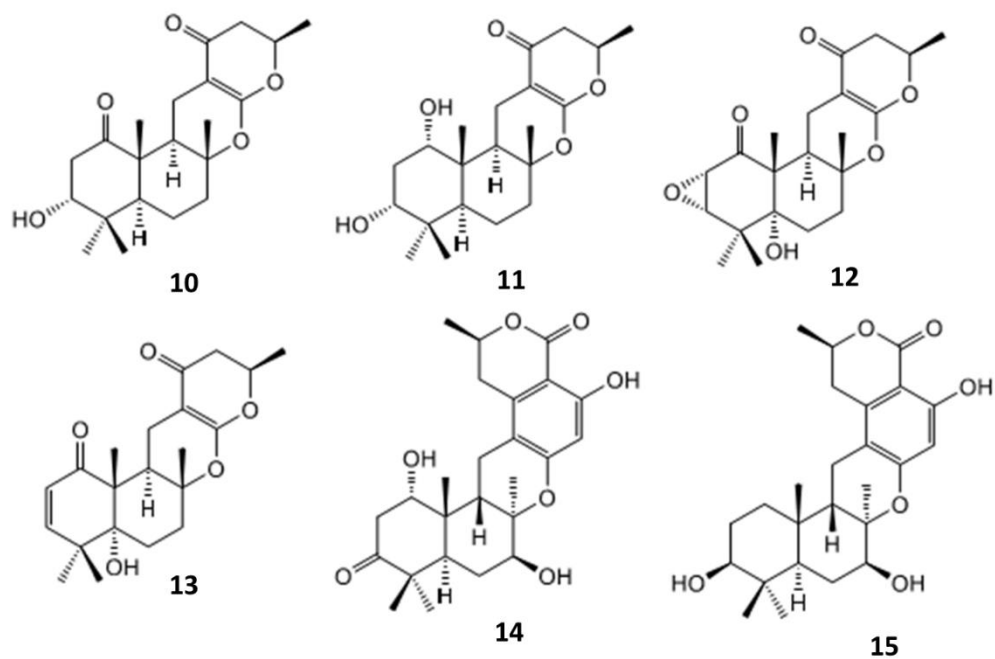


Figura 49: Talarolutinas A (10), Talarolutinas B (11), Talarolutinas C (12), Talarolutinas D (13), Chrodrimanins D (14), Chrodrimanins E (15), moléculas que possuem citotoxicidade contra carcinoma de próstata, atividade antimicrobiana e indução de quinona redutase.

Mesmo com diversos relatos das atividades antimicrobianas deste grupo, até o presente momento não foi encontrado na literatura trabalhos correlacionando a atividade inibitória de extratos obtidos de *Talaromyces* sp. contra *X. citri* subsp. *citri* sendo este o primeiro relato na literatura.

Muitas das espécies desse gênero produzem uma grande quantidade de pigmento vermelho intenso (J. C. Frisvad et. al. 2013), o que foi identificado também em nosso extrato LMA 1957 (*Talaromyces* sp) (Figura 50), o qual pode ser empregado como potencial aditivo colorífico na indústria alimentícia, sendo, no entanto, necessário realizar análises químicas deste pigmento para determinação da sua estrutura química.



Figura 50: Coloração do metabólito obtido após fermentação. Foto: do autor.

6. CONCLUSÃO

Dentre os 16 extratos testados 4 apresentaram atividade inibitória significativa (acima de 80%) contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Porém, destes 4 extratos testados apenas o obtido do isolado LMA 1957, identificado como sendo do gênero *Talaromyces* sp. apresentou uma atividade inibitória satisfatória, exibindo inibição superior ao antibiótico utilizado como controle (canamicina), verificou-se também que nos testes em planta mesmo em condições desfavoráveis apresentou resultados satisfatórios, ficando em valores de inibição próximos aos encontrados pelo antibiótico Canamicina, havendo no entanto a necessidade de identificação e isolamento do composto responsável pela inibição para testes futuros.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA CÂMARA DE NOTÍCIAS, AGN, 2020 Disponível em: <https://www.camara.leg.br/noticias/820230-comissao-aprova-reducao-de-imposto-sobre-exportacoes-de-suco-de-laranja> Acesso em 27/12/2021

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: (Eds.). Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap.11, p.289-381.

AMPRAYN, K.; ROSE, M.T.; KECSKÉS, M.; PEREG, L.; NGUYEN, H.T.; KENNEDY, I.R. Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis* HY) and its effectiveness for promoting rice growth. *Applied Soil Ecology*, v. 61, p.295-299, 2012.

BARBOSA, R.N.T. Toxinas de fungos podem reduzir o uso de herbicidas. Agrolink, 2105. Disponível em:< https://www.agrolink.com.br/noticias/toxinas-de-fungos-podem-reduzir-uso-de-herbicidas_220831.html>. Acesso em: 13 out. 2021.

BARROS, J. R. M.; BARROS, A. L. M.; CYPRIANO, M. P. O mercado da citricultura no Brasil e as suas novas perspectivas. Livro Concecitrus. CitrusBR. 2016

BEITR, STOLL. Morph. Biol. Char. *Penicillium*, *Penicillium purpureogenum* [as '*purpureogenum*'], Würzburg: 32 (1904)

BERENDSEN, R.L.; PIETERSE, C.M.; BAKKER, P.A. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.* v. 17, p. 478-486, 2012.

BERLANGA M, GUERRERO R (2016) Living together in biofilms: The microbial cell factory and its biotechnological implications. *Microb Cell Fact* 15:16

BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B.; PINTO, Z.V.; PAULA JÚNIOR, T.J.; CORRÊA, E.B.; MOURA, A.B.; LUCON, C.M.M.; COSTA, J.C.B.; BEZERRA, J.L. Produtos Comerciais à Base de Agentes de Biocontrole de Doenças de Plantas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, n.88, 155p., 2012.

Disponível em:<<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/66628/1/Doc-88-1.pdf>>.

BRUNINGS, A. M.; GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Molecular Plant Pathology*, London, v. 4, n. 3, p. 141–157, 2003.

BURMØLLE M, REN D, BJARNSHOLT T, SØRENSEN SJ (2014) Interactions in multispecies biofilms: Do they actually matter? *Trends Microbiol* 22:84–91

CARDOSO, E.J.B.N.; CARDOSO, I.M.; NOGUEIRA, M.A.; BARETTA, C.R.D.M.; PAULA, A.M. Micorrizas arbusculares na aquisição de nutrientes pelas plantas. In: SIQUEIRA, J.O.; SOUZA, F.A.; CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. (Eds.). *Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil*. Lavras: UFLA, 2010. p.153-214.

CARRENHO, R.; COSTA, S.M.G.; BALOTA, E.L.; COLOZZI FILHO, A. Fungos micorrízicos arbusculares em agroecossistemas brasileiros. In: SIQUEIRA, J.O.; SOUZA, F.A.; CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. (Eds.). *Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil*. Lavras: UFLA, 2010. p.215-250.

CASERTA R, PICCHI SC, TAKITA MA ET AL (2014) Expression of *Xylella fastidiosa* RpfF in Citrus Disrupts Signaling in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and Thereby Its Virulence. *Mol Plant Microbe Interact* 27:1241–1252

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 42, n. 225, p. 65-72, 1939.

CAVERO, P.A.S.; HANADA, R.E.; GASPAROTTO, L.; NETO, R.A.C.; SOUZA, J.T. Biological control of banana black Sigatoka disease with *Trichoderma*. *Ciência Rural*, v.45, n.6, p.951-957, 2015.

CHAPARRO, J.M.; BADRI, D.V.; VIVANCO, J.M. Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *ISME J.* v. 8, p. 790–803, 2014.

CIVEROLO, E. L. Citrus bacterial canker disease: The bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. In: **Citrus canker**: an international perspective. Lake Alfred: Citrus Research and Education Center, 1985. p. 11–17.

CLEMMENSEN, K.E.; BAHR, A.; OVASKAINEN, O.; DAHLBERG, A.; EKBLAD, A.; WALLANDER, H.; STENLID, J.; FINLAY, R.D.; WARDLE, D.A.; LINDAHL, B.D. Roots

and associated fungi drive long-term carbon sequestration in boreal forest. *Science*, v.339, p.1615-1618, 2013.

DANÓS, E.; BERGER, R. D.; STALL, R. E. Temporal and spatial spread of citrus canker within groves. *Phytopathology*, St Paul, v. 74, n. 8, p. 904–908, 1984.

DAVEY ME, TOOLE GAO. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(4): 847-867, 2000.

DAYAN, F.E.; CANTRELL, C.L.; DUKE, S.O. Natural products in crop protection. *Bioorg. Med. Chem.* v. 17, p. 4022-4034, 2009.

DE VRIES, F.T.; VAN GROENIGEN, J.W.; HOFFLAND, E.; BLOEM, J. Nitrogen losses from two grassland soils with different fungal biomass. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 43, p. 997–1005, 2011.

EGAMBERDIEVA, D.; KAMILOVA, F.; VALIDOV, S. et al. High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan. *Environ. Microbiol.* v. 10, p. 1–9, 2008.

F. LIU, X. L. CAI, H. YANG, X. K. XIA, Z. Y. GUO, J. YUAN, M. F. LI, Z. C. LIN, 'The Bioactive metabolites of the mangrove endophytic fungus *Talaromyces* sp. ZH-154 Isolated from *Kandelia candel* (L.) Druce', *Planta. Med.* 2010, 76, 185-189.

FAO. Food and Agriculture of the United Nations. Statistical Databases. Disponível em: <http://faostat.fao.org/faostat>. Disponível em: Acesso em: 20 de out. de 2021.

FERNANDEZ, M.; GODINO, A.; PRÍNCIPE, A. et al. Effect of a *Pseudomonas fluorescens* tailocin against phytopathogenic *Xanthomonas* observed by atomic force microscopy. *J. Biotechnol.* v. 256, p. 13-20, 2017.

FLEMMING HC, WINGENDER J (2010) The biofilm matrix. *Nat Ver. Microbiol* 8:623–63

FOYSAL, M.J.; LISA, A.K. Isolation and characterization of *Bacillus* sp. strain BC01 from soil displaying potent antagonistic activity against plant and fish pathogenic fungi and bacteria. *Genet Eng Biotechnol J.*, 2018.

FUNDECITRUS, Fundo de defesa da agricultura, 2020. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/levantamentos/cancro-citrico>. Acesso em 20 de out. De 2020

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. 2014 Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/pdf/relatorios/2014.pdf> . Acesso em: 1 outubro 2020

FURBINO, L.E.; GODINHO, V.M.; SANTIAGO, I.F. et al. 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.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; RICHIE, S. M. Relationship of leaf surface populations of strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citrumelo* to development of citrus bacterial spot and persistence of disease symptoms. *Phytopathology*, St Paul, v. 82, n. 6, p. 625–632, 1992.

GRANATO LM, PICCHI SC, DE OLIVEIRA ANDRADE M ET AL (2019) The EcnA antitoxin is important not only for human pathogens: Evidence of Its Role in the Plant Pathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *J Bacteriol* 201:e00796-18

H. HIDEO, O. YUKI, K. KENJI, A. KOHKI, 'New chrodriamanin congeners, chrodriamanins D-H, from YO-2 of *Talaromyces* sp.', *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2012, 76, 1765-1768.

H. LI, H. HUANG, C. SHAO, H. R. HUANG, J. JIANG, X. ZHU, Y. LIU, L. LIU, Y. LU, M. LI, Y. LIN, Z. SHE, 'Cytotoxic norsesquiterpene peroxides from the endophytic fungus *Talaromyces flavus* isolated from the mangrove plant *Sonneratia apetala*', *J. Nat. Prod.* 2011, 74, 1230-1235.

HAMMER, Ø.; et al. Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 2001.

HAYWARD, A. C. The hosts of *Xanthomonas*. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. (Ed.). *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall, p. 1–17, 1993.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-bett. Produção Agrícola nacional e regional. Disponível em: . Acesso em: 20 out. 2020.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE. Produção Agrícola nacional e regional. Disponível em: <<http://www2.sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 10 set. 2021.

J. ATHERTON, B. W. BYCROFT, J. C. ROBERTS, 'Studies in mycological chemistry. Part XXIII. The structure of flavomannin, a metabolite of *Penicillium wortmanni* Klöck', *J. Chem. Soc. C.* 1968, 0, 2560-2564.

J. C. FRISVAD, N. YILMAZ, U. THRANE, K. B. RASMUSSEN, J. HOUBRAKEN, R. A. SAMSOM, '*Talaromyces atroseus*, a new species efficiently producing industrially relevant red pigments', *PLoS. One.* 2013, 8, e84102.

J. W. HE, H. GAO, X. Z. LIU, X. S. YAO. 'Two new polyesters from wetland soil-derived fungus *Talaromyces flavus*', *Zhongguo. Zhong. Yao. Za. Zhi.* 2015, 40, 3347-51.

KAUR, H. A. RAJA, D. C. SWENSON, R. AGARWAL, G. DEEP, J. FALKINHAM, N. H.

OBERLIES, 'Talarolutins A–D: meroterpenoids from an endophytic fungal isolate of *Talaromyces minioluteus*', *Phytochemistry*. 2016, 126, 4-10.

KENNEDY, A. Microbial diversity in agroecosystem quality. In Collins Wand Qualset C (eds), *Biodiversity in Agroecosystems*. CRC, pp. 1–17, 1999.

LEITE JR., R. P. **Cancro cítrico**: prevenção e controle no Paraná. Londrina: Instituto Agronômico do Paraná, 1990. 51 p. (Circular, 61).

LI J, WANG N (2014) Foliar application of biofilm formation-inhibiting compounds enhances control of citrus canker caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Phytopathology* 104:134–142

LI L, LI J, ZHANG Y ET AL (2019) Diffusible signal factor (DSF)-mediated quorum sensing modulates expression of diverse traits in *Xanthomonas citri* and responses of citrus plants to promote disease. *BMC Genomics* 20:55

LOPES, M.R.; KLEIN, M.N.; FERRAZ, L.P.; SILVA, A.C.; KUPPER, K.C. *Saccharomyces cerevisiae*: A novel and efficient biological control agent for *Colletotrichum acutatum* during pre-harvest. *Microbiological Research*, v. 175, p.93–99, 2015.

LÓPEZ-BUCIO, J.; PELAGIO-FLORES, R.; HERRERA-ESTRELLA, A. Trichoderma as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Scientia Horticulturae*, v.196, p.109-123, 2015.

M. ARAI, H. TOMODA, T. OKUDA, H. WANG, N. TABATA, R. MASUMA, Y. YAMAGUCHI, S. OMURA, 'Funicone-related compounds, potentiators of antifungal miconazole activity, produced by *Talaromyces flavus* FKI-0076', *J. Antibiot.* 2002, 55, 172-180.

M. M. ZHAI, H. T. NIU, J. LI, H. XIAO, Y. P. SHI, D. L. DI, P. CREWS, Q. X. WU, 'Talaromycolides A–C, novel phenyl-substituted phthalides isolated from the green chinese onion-derived fungus *Talaromyces pinophilus* AF-02', *J. Agric. Food. Chem.* 2015, 63, 9558-9564.

MALAMUD F, TORRES PS, ROESCHLIN R ET AL (2011) The *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* flagellum is required for mature biofilm and canker development. *Microbiology* 157:819–829

MALAMUD F, TORRES PS, ROESCHLIN R ET AL (2011) The *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* flagellum is required for mature biofilm and canker development. *Microbiology* 157:819–829

MENDES, I.C., et al. Microbiologia do solo e sustentabilidade de sistemas agrícolas. In FALEIRO, F.G., et al. Biotecnologia: Estado da Arte E Aplicações na Agropecuária. *Embrapa Cerrados*, pp. 217–244, 2011.

MICHEREFF FILHO, M.; FARIA, M.R.; WRAIGHT, S.P. Micoínseticidas e Micoacaricidas no Brasil: Como estamos? Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 28p., 2007 (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Documentos 240).

MINGMA, R.; PATHOM-AREE, W.; TRAKULNALEAMSAI, S. et al. Isolation of rhizospheric and roots endophytic actinomycetes from *Leguminosae* plant and their activities to inhibit soybean pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *Glycine*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* v. 30, p. 271-280, 2014.

MORANDI, M.A.B; BETIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Orgs.). Biocontrole de doenças em plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 2009. p.7-14.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e Bioquímica do Solo. 2.ed. Lavras: UFLA, 2006. 729p.

MURATE, L.S., et al. (2015) Activity of Secondary Bacterial Metabolites in the Control of Citrus Canker. *Agricultural Sciences*, 6, 295-303.

NEUMANN, B.; LAING, M. Trichoderma: an ally in the quest for soil system sustainability. In: UPHOFF, N.; BALL, A.; FERNANDES, E.; HERREN, H.; HUSSON, O.; LAING, M.; PALM, C.A.; PRETTY, J.N.; SANCHEZ, P.A.; SANGINGA, N.; THIES J. (Eds.). *Biological Approaches to Sustainable Soil Systems*. Boca Raton: CRC Press, 2006. p.491- 500.

NEVES, M. F. Análise de uma década na cadeia da laranja. In: NEVES, M. F. (Coord.). 1. ed. Ribeirão Preto: Markestrat, 2011

NEVES, M. F.; JANK, M. S. Perspectivas da cadeia produtiva da laranja no Brasil: a agenda 2015.

NEVES, M. F.; LOPES, F. F. Estratégias para a laranja no Brasil. Editora Atlas. 2005

NEWMAN, D.J; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.*, v.79, p.629-661, 2016.

OLIVEIRA, A.G., MURATE, L.S., SPAGO, F.R. et al. Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. *Biol. Control*. v. 56, p.125–131, 2011.

PADMANABHAM, D.; VIDHYASEKARAN, P.; RAJAGOPALAN, C. K. S. Changes in photosynthesis and carbohydrate content in canker and halo regions in *Xanthomonas citri* infected citrus leaves. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 26, n. 2, p. 215–217, 1974

PANDEY, A.; CHANDRA, N.; SRIVASTAVA, A. et al. Antimicrobial metabolites producing soil microorganisms: An update. *Indian Journal of Applied Microbiology*. v. 21, p. 46-57, 2018.

PFENNING, L.H. Fungos do Solo. In MOREIRA, F.M.S, et al. (eds), O Ecosistema Solo. Lavras, MG: Universidade Federal de Lavras, pp. 271–288, 2013.

PICCHI SC, TAKITA MA, COLETTA-FILHO HD ET AL (2016) N -acetylcysteine interferes with the biofilm formation, motility and epiphytic behaviour of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Plant Pathol* 65:561–569

PIMM, S.L. The complexity and stability of ecosystems. *Nature*, v. 307, p.321-326, 1984.

POMELLA, A.W.V.; RIBEIRO, R.T.S. Controle biológico com *Trichoderma* em grandes culturas – Uma visão empresarial. In: BETIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Orgs.). Biocontrole de doenças em plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 2009. p.239-244.

POWELL, J.; KLIRONOMOS, J. The ecology of plant-microbial mutualisms. In: PAUL, E.A. (Eds.). *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*. 3.ed. Oxford: Elsevier Academic Press, 2007. p.257-281.

PRIMAVESI, A. Manejo ecológico do solo: a agricultura em regiões tropicais. São Paulo: Nobel, 1999. 549p.

R. BARA, I. ZERFASS, A. H. ALY, H. G. GECKE, V. RAGHAVAN, P. SASS, A. MANDI, V. WRAY, P. L. POLAVARAPU, W. H. LIN, T. KURTAN, A. DEBBAB, H. B. OESTERHELT, P. PROKSCH, 'Atropisomeric dihydroanthracenones as inhibitors of multiresistant *staphylococcus aureus*', *J. Med. Chem.* 2013, 56, 3257-3272.

REIS, V.M.; ANDRADE, G.; FARIA, S.M.; SILVEIRA, A.P.D. Interações de fungos micorrízicos arbusculares com outros microrganismos do solo. In: SIQUEIRA, J.O.; SOUZA, F.A.; CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. (Eds.). *Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil*. Lavras: UFLA, 2010. p.361-382.

S. CHEN, Y. LIU, Z. LIU, R. CAI, Y. LU, X. HUANG, Z. G. She, 'Isocoumarins and benzofurans from the mangrove endophytic fungus *Talaromyces amestolkiae* possessing α -glucosidase inhibitory and antibacterial activities', *RSC. Advances*. 2016, 6, 26412-26420.

SAMSON R. A., YILMAZ N, HOUBRAKEN J, SPIERENBURG H, SEIFERT SW, PETERSON SW, VARGA J, FRISVAD JC (2011) Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. *Studies in Mycology* 70: 159–183.

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

SCHINDELIN, J., ARGANDA-CARRERAS, I., FRISE, E., KAYNIG, V., LONGAIR, M., PIETZSCH, T., ... CARDONA, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682.

SCHREITER, S.; DING, G.S.; HEUER, H. et al. Effect of the soil type on the microbiome in the rhizosphere of field-grown lettuce. *Front. Microbiol.* v. 5, p. 1-13, 2014.

SCOTTON, JULIANA CRISTINA; Manejo de transição para agricultura orgânica, sob cultivo de citros (*Citrus sinensis* L. Osbeck), favorece a diversidade de fungos no solo / Juliana Cristina Scotton. - Rio Claro, 2016

SILVA et. al. Antibacterial activity of Alkyl Gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri* - *Journal of bacteriology*. 195: 85, 2013.

SILVA, M.H. Fungos endofíticos associados à *Passiflora incarnata* e avaliação de seu potencial biotecnológico. 2017. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro.

SINGH, P.K.; SINGH, M.; TRIPATHI, B.N. Glomalin: an arbuscular mycorrhizal fungal soil protein. *Protoplasma*, v.250, p.663–669, 2013.

SNA, 2020. Disponível em: <https://www.sna.agr.br/safra-2019-2020-fecha-com-exportacoes-de-suco-de-laranja-em-alta/> Acesso em 27/12/2021

SOUZA, N. S.; LIMA, I. L.; SILVA, M. K. F.; CONCEIÇÃO, H. E. O. Perfil sócio-econômico dos produtores de mudas cítricas de uma comunidade em Capitão Poço, PA. *Revista Agrarian Academy*, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.5, n.10; p. 2018.

STALL, R. E.; CIVEROLO, E. L. Research relating to the recent outbreak of citrus canker in Florida. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 29, n. 1, p. 399– 420, 1991.

THORN, R.G.; LYNCH, M.D.J. Fungi and eukaryotic algae. In: PAUL, E.A. (Eds.). *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*. 3.ed. Oxford: Elsevier Academic Press, 2007. p.145-162.

TISDALL, J.M.; OADES, L.M. Organic matter and water-stable aggregates in soil. *Journal Soil Science*, v. 33, p. 141-163, 1982.

TRENDSCE, 2021 Disponível em: <https://revistacampoenegocios.com.br/cresce-o-mercado-de-biodefensivos/> Acesso em 27/12/2021

VAN LOON, L.V.; BAKKER, P.A.H.M., PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* v. 36, p. 453–83, 1998.

WEBSTER, J.; WEBER, R.W.S. *Introduction to Fungi*. 3.ed. New York: Cambridge University Press, 2007. 841p.

XIE, S.; ZANG, H.; WU, H. et al. Antibacterial effects of volatiles produced by *Bacillus* strain D13 against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol. Plant Pathol.* v. 19, p. 49-58, 2018.