



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

FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Passiflora incarnata*: AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL DE AÇÃO CONTRA BACTERIOSE DO MARACUJÁ

VÍTOR RODRIGUES MARIN

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).

Abril – 2019

VÍTOR RODRIGUES MARIN

FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Passiflora incarnata*: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE AÇÃO
CONTRA BACTERIOSE DO MARACUJÁ

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

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

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Derlene Attili de Angelis

Rio Claro

2019

M337f Marin, Vítor Rodrigues
Fungos endofíticos de Passiflora incarnata: Avaliação do potencial de ação contra bacteriose do maracujá / Vítor Rodrigues Marin. -- Rio Claro, 2019
64 p. : il., tabs., fotos

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

1. Microbiologia agrícola. 2. Fungos endofíticos. 3. Controle biológico. 4. Bacteriose. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

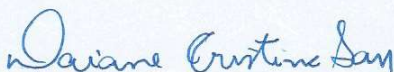
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Fungos endofíticos de *Passiflora incarnata*: avaliação do potencial de ação contra bacteriose do maracujá

AUTOR: VÍTOR RODRIGUES MARIN

ORIENTADORA: DAIANE CRISTINA SASS

COORDENADORA: DERLENE ATTILI DE ANGELIS

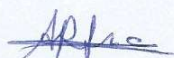
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), área: Microbiologia Aplicada pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. DAIANE CRISTINA SASS
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro



Prof. Dr. JONAS CONTIERO
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro



Profa. Dra. ANGELA REGINA ARAUJO
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Rio Claro, 18 de fevereiro de 2019

**A todos aqueles que fizeram parte de minha vida
nessa etapa**

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Angelo e Marta e minha irmã Thais, por acreditarem que a jornada vale a pena;

À Profa. Dra. Daiane Cristina Sass, pela orientação, oportunidade, paciência e amizade nessa etapa de desafios e aprendizagem;

À Profa. Dra. Derlene Attili de Angelis pela Co orientação, pelo espaço cedido e pelos ensinamentos que me auxiliaram nessa etapa;

À UNESP e o Instituto de Biociências, por serem minha casa nestes últimos anos e onde me formei profissional e pessoalmente;

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

A todos meus amigos: Bigo, Olinda, Reto, Branca, Mack, Porteira, Carol, Bafo, Ju, Aveia, Ina, Cobra, Berimba, Cabeça, Rapz, e tantos outros cujas casas eu convivi e compartilhei risadas e tristezas;

A todos meus amigos e companheiros do Laboratório de Química e Biotecnologia Microbiana: Juliano, Gabrielle, Lucas, Gustavo, Jullyana, Victor, Jelena, Mariana, Isabela;

À Dra. Lusiane M. Picca, do Laboratório de Microbiologia Ambiental, pela atenção e contribuição com meu trabalho;

A Dra. Elis Marina Turini, pela atenção e auxílio na coleta de dados;

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

Aos membros do Laboratório de Toxicidade de Águas, da Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis, pelo espaço cedido e auxílio na realização do trabalho;

Aos membros do Laboratório de Microbiologia Industrial, do Prof. Dr. Jonas Contiero, em especial Ana Maria e Cinthia, pelo auxílio na coleta de dados;

À Profa. Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira, do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, por gentilmente fornecer as linhagens utilizadas neste trabalho;

Ao Dr. Eduardo José Crevelin, do Laboratório de Espectrometria de Massas Aplicado a Química de Produtos Naturais, pelo auxílio nas análises;

Ao Departamento de Bioquímica e Microbiologia e todos seus membros;

A todos que fizeram parte de minha vida nestes últimos anos e contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

RESUMO

O Brasil é o maior produtor de maracujá amarelo do mundo. Ainda assim, a produção da fruta é afetada por várias pragas, dentre elas destaca-se a bacteriose, ou mancha oleosa do maracujá, causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. O manejo integrado da doença conta com aplicação de compostos químicos baseados em cobre que, com frequente utilização, podem causar danos ambientais e promover o surgimento de patógenos resistentes. Neste contexto, o uso de produtos de origem natural se mostra como uma possível alternativa no controle da bactéria devido sua diversidade estrutural e funções biológicas. Neste trabalho, 24 extratos brutos provenientes de fungos filamentosos endofíticos isolados de folhas de *Passiflora incarnata* Linnaeus foram submetidos a ensaios para avaliação de seu potencial de inibição de duas linhagens, LM4a e M83, da bactéria *X. axonopodis* pv. *pasiflorae*. Dentre os extratos testados, os originados dos isolados LMA 1793, LMA 1798, LMA 1719 e LMA 1602, apresentaram 95% de inibição de crescimento celular bacteriano a 2100 µg/mL para as duas linhagens. Os extratos de LMA 1793, LMA 1798 também apresentaram características bactericidas para ambas as linhagens enquanto os extratos de LMA 1719 e LMA 1602 apenas para a linhagem M83. O extrato do isolado LMA 1793 foi submetido a três etapas de fracionamento. Algumas frações apresentaram inibição igual ou superior a 90% e foram analisadas por espectrometria de massas. Uma delas apontou a possível presença da chaetoglobosina X.

Palavras chaves: *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*; bacteriose; *Passiflora incarnata*; fungos endofíticos; biocontrole

ABSTRACT

Brazil is the world's biggest producer of yellow passion fruit. Nevertheless, the fruit production is affected by various pests, among them, the passion fruit bacteriosis, or grease spot, caused by the bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* is highlighted. The integrated pest management relies on the application of chemical composts based on copper, which, when applied recurrently causes environmental damage and may promote the emergence of resistant organisms. In this context, the use of products of natural origin are revealed as a viable alternative in the bacteria control due to their structural diversity and biological functions. In this work, 24 extracts from endophytic fungi, isolated from *Passiflora incarnata* Linnaeus were tested to assess their potential action against two strains, LM4a and M83, of the bacteria *X. axonopodi* pv. *passiflorae*. Among the extracts, the ones originated from isolates LMA 1793, LMA 1798, LMA 1719 and LMA 1602, presented inhibition of bacterial cellular growth of 95% at 2100 µg/mL. Extracts from LMA 1793 and LMA 1798 also presented bactericidal characteristics to both strains, while extracts from LMA 1719 and LMA 1602 only showed bactericidal properties to the M83 strain. Extract from isolate LMA 1793 went through three stages of fractionation. Fractions that presented inhibition equal or higher than 90% were analyzed by mass spectrometry. One of them pointed to the presence of chaetoglobosin X.

Keywords: *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*; bacteriosis; *Passiflora incarnata*; endophytic fungi; biocontrol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Microscopia do estômato de toranja com células de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	19
Figura 2 - Morte da planta ocasionada por infecção de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i>	21
Figura 3 - Frutos mostrando sintomas de <i>woodiness</i>	22
Figura 4 - Fruto mostrando sintomas da bacteriose do maracujá.....	22
Figura 5 - Flor de <i>Passiflora incarnata</i> Linnaeus, o maracujá vermelho.....	28
Figura 6 - Funil de separação mostrando as fases orgânica (acima) e aquosa (abaixo).....	32
Figura 7 - Concentrador de amostras.....	32
Figura 8 - Reação de redução da rezasurina para resorufina mediada pela ação do NADH.....	33
Figura 9 - Exemplo de uma placa de REMA após o último período de incubação. A: Amostras; CP: controle positivo; CV: controle de veículo; CN: controle negativo.....	34
Figura 10 - Gráfico exemplificando a determinação da curva de regressão de um extrato apresentando o modelo da equação gerada	36
Figura 11 - Repicador de colônias utilizado para a inoculação em placas de Petri com meio NYG para determinação da CBM	37
Figura 12 - Gráfico da inibição (%) por concentração (µg/mL) do extrato LMA 1793 em relação às duas linhagens da bactéria <i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> (LM4a e M83) (CP = aprox. 90%) ...	41
Figura 13 - Gráfico da inibição (%) por concentração (µg/mL) do extrato LMA 1798 em relação às duas linhagens da bactéria <i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> (LM4a e M83) (CP = aprox. 90%) ...	41
Figura 14 - Gráfico da inibição (%) por concentração (µg/mL) do extrato LMA 1719 em relação às duas linhagens da bactéria <i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> (LM4a e M83) (CP = aprox. 90%) ...	42
Figura 15 - Gráfico da inibição (%) por concentração (µg/mL) do extrato LMA 1602 em relação às duas linhagens da bactéria <i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> (LM4a e M83) (CP = aprox. 90%) ...	42
Figura 16 - Concentração bactericida mínima de cada extrato bruto em relação à duas linhagens (LM4a e M83) e suas concentrações (em µg/mL)	44

Figura 17 - A: <i>Chaetomium globosum</i> (LMA 1793); B: <i>Aspergillus</i> sp. (LMA 1798); C: <i>Fusarium oxysporum</i> (LMA 1719); D: <i>Chaetomium</i> sp. (LMA 1602)	45
Figura 18 - Cromatograma obtido através da análise por CLAE – Detector UV-VIS.....	48
Figura 19 - Espectro de massas do composto com tr = 23,91 min. da fração F4	50
Figura 20 - Estrutura química da Chaetoglobosina X	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Massa (mg) de extrato obtida de cada um dos isolados de fungos endofíticos. Massa relativa à aproximadamente 300 mL de caldo de cultivo utilizado na extração	39
Tabela 2 - Relação de extratos utilizados e sua atividade positiva (em destaque) contra as duas linhagens <i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> (valores superiores a 90% foram considerados positivos)	40
Tabela 3 - IC90 dos extratos bioativos em relação às linhagens LM4a e M83 (em µg/mL)	43
Tabela 4 - Inibição do crescimento celular bacteriano (%) por concentração (µg/mL) pelas 5 frações testadas	47
Tabela 5 - Inibição do crescimento celular bacteriano (%) por concentração (µg/mL) pelas frações F ₄ , F ₅ , F ₆ , F ₇ e F ₈	48
Tabela 6 - Inibição do crescimento celular bacteriano (%) por concentração (µg/mL) pelas frações F ₉ , F ₁₀ , F ₁₁ , F ₁₂ e F ₂₁	49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CI90	Concentração Inibitória para 90%
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMB	Concentração Bactericida Mínima
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
CV	Controle de veículo
DMSO	Dimetilsulfóxido
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> (Organização para Alimentação e agricultura)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LC-MS/MS	Cromatógrafo líquido acoplado a espectrômetro de massas
M	Meio de cultivo Malte 2%
MA	Meio de cultivo Malte Ágar 2%
NYG	Meio de cultivo <i>Nutrient Yeast Glycerol</i>
ONU	Organização das Nações Unidas
PARA	Programa de Análises de Resíduos em Alimentos
PH3B	Poli-3-hidroxibutirato
pv.	patovar, variedade patogênica relacionada a espécie vegetal afetada
REMA	<i>Resazurin Microtiter Assay</i> (Ensaio de micro diluições com corante resazurina)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 <i>Xanthomonas</i> e sua fitopatologia.....	18
2.2 O maracujá no Brasil.....	20
2.3 Modelo de agricultura atual.....	23
2.4 Produtos naturais e organismos endofíticos.....	25
3 OBJETIVOS.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Micro-organismos utilizados.....	31
4.2 Produção dos extratos.....	31
4.2.1 Cultivo microbiano.....	31
4.2.2 Obtenção dos extratos brutos.....	31
4.3 Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos brutos.....	33
4.3.1 <i>Resazurin Microtiter Assay</i> (REMA).....	33
4.3.2 Avaliação da atividade inibitória dos extratos brutos.....	35
4.4 Concentração Inibitória (CI 90) dos extratos.....	35
4.5 Avaliação da Concentração Mínima Bactericida (CMB).....	36
4.6 Fracionamento dos extratos positivos.....	37
4.6.1 Cromatografia em coluna.....	37
4.6.2 Separação em CLAE.....	38
4.6.3 Análise por Espectrometria de massas.....	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1 Produção de extratos brutos.....	39

5.2 Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos brutos.....	39
5.2.1 Screening.....	39
5.2.2 Reavaliação da atividade inibitória dos extratos brutos.....	41
5.3 Concentração Inibitória (IC 90) dos extratos.....	43
5.4 Avaliação da Concentração Mínima Bactericida (CMB).....	43
5.5 Identificação dos isolados promissores.....	44
5.6 Fracionamento do extrato bioativo do isolado LMA 1793 (<i>Chaetomium globosum</i>).....	46
6 CONCLUSÃO.....	51
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	52

1 INTRODUÇÃO

O maracujá pertence ao gênero *Passiflora*, o mais importante economicamente e que apresenta o maior número de espécies da família Passifloraceae (BERNACCI et al. 2003; NUNES & QUEIROZ, 2006; FREITAS et al. 2011). No Brasil já foram encontradas cerca de 130 espécies (CERVI et al. 2010), sendo o maracujá-amarelo ou azedo (*P. edulis*) a espécie mais cultivada no país (FREITAS et al. 2011; MELETTI, 2011).

Atualmente o Brasil figura como o maior produtor de maracujá amarelo do mundo. Segundo levantamentos da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (ONU/FAO) a produção brasileira foi de aproximadamente 1 milhão de toneladas em 2017, voltada quase que em sua totalidade para o mercado interno (FAO 2018). Destacam-se as regiões Sul, Sudeste e Nordeste, em especial o estado da Bahia, como o maior produtor da fruta (EMBRAPA 2017).

O maracujá-amarelo é o fruto mais popular dentre os *Passiflora*, representando aproximadamente 90% da produção nacional, devido a qualidade da fruta e o maior rendimento industrial (FALEIRO et al. 2011; FERREIRA et al. 2016; VIANA et al. 2016). A importância econômica se dá majoritariamente pelo consumo da fruta fresca e da produção de sucos, mas há grande interesse de indústrias farmacêuticas na extração de compostos que são utilizados como calmantes, vitaminas, entre outros (ISHIDA & HALFELD-VIEIRA, 2009).

Entretanto, o aumento da área de cultivo sem os devidos cuidados fitossanitários tem propiciado a disseminação de patógenos, que em casos graves, podem inviabilizar o cultivo em determinadas regiões, afetando o ciclo produtivo e, conseqüentemente levando a perdas econômicas (TORRES FILHO, 1985; MELLETI 2011).

Os pomares de maracujá são afetados por doenças causadas por fungos, vírus e bactérias, sendo que em algumas regiões há patologias limitantes para a cultura em que não se conhece controle químico eficiente e/ou economicamente viável até o momento. Neste contexto, destaque-se a bacteriose do maracujá (*Xanthomonas axonopodis* patovar *passiflorae*) pelas perdas extensivas na produção e o difícil controle (MELETTI, 2011).

A bacteriose ou mancha oleosa, é uma das doenças mais severas a afetar o maracujá (MUNHOZ et al. 2015). Sua transmissão pode ocorrer pelas sementes, chuva, irrigação e o manuseio de plantas úmidas (FISCHER & REZENDE, 2008). O patógeno penetra por estômatos ou feridas na planta, colonizando o espaço intracelular, causando manchas escuras em folhas e

frutos, podendo causar sua queda prematura ou tornando-os impróprios para consumo, em alguns casos a infecção pode se espalhar para o sistema vascular, obstruindo-o e causando morte de porções das vinhas ou mesmo a morte de toda a planta (FISCHER & REZENDE, 2008; TORDIN, 2016)

No Brasil a doença foi confirmada, inicialmente, no final da década de 1960 na cidade de Araraquara – SP e se disseminou para as regiões do país onde se produz a fruta, em especial em locais de alta humidade e temperatura. No estado de São Paulo, devido ao clima quente e úmido, a disseminação da doença se tornou um empecilho grave no cultivo ou até mesmo na obtenção de indivíduos sadios (FALEIRO et al. 2011; ISHIDA & HALFELD-VIEIRA, 2009; NAKATANI et al. 2009; ISHIDA et al. 2017).

A bacteriose costuma ser controlada pelo uso de produtos químicos de origem cúprica, no país existem registros para uso de sulfato de cobre associado a antibióticos como oxitetraciclina, estreptomicina e casugamicina (ISHIDA & HALFELD-VIEIRA, 2009). Todavia, com aplicações recorrentes, o micro-organismo alvo pode adquirir resistência rapidamente (TORDIN, 2016; ECONOMOU & GOUSIA, 2015), tornando a prática ineficaz, prejudicial ao ambiente e de alto custo (TORDIN, 2016).

Preocupações sobre o impacto em potencial destes pesticidas no ambiente e sobre a saúde humana têm atraído à atenção em muitos países, como os Estados Unidos que passaram a adotar medidas regulatórias mais rígidas, assim como esforços internacionais, incluindo orientações emitidas por comitês da Organização das Nações Unidas (ONU) visando um maior controle sobre estes produtos sintéticos (DAYAN et al. 2009; FAO, 2015). Neste contexto, o Brasil lidera o consumo mundial de agrotóxicos, com um mercado na casa dos 10 bilhões de dólares, e devido a legislações conhecidamente brandas, a opinião pública, comunidade científica, produtores e trabalhadores rurais levantam questionamentos importantes sobre sua seguridade (BETIM, 2018; PRADA, 2015; RIGOTTO et al. 2014).

Dessa maneira, torna-se necessária a busca por novas alternativas de controle de pragas, principalmente aquelas menos nocivas ao ambiente e ao ser humano. Por estes motivos o uso de organismos antagonistas ou metabólitos produzidos por estes têm recebido grande destaque e são apontados como estratégias viáveis ao problema (TORDIN, 2016; MURATE et al. 2015; FOLDES et al. 2000). A obtenção de substâncias de fontes naturais é importante tendo em vista a variabilidade de tais produtos. De maneira geral, substâncias de origem

natural apresentam maior diversidade estrutural e como são frutos de um metabolismo secundário é comum que possuam diversas funções bioativas (DAYAN et al. 2009; FEHER & SCHMIDT, 2003).

Na literatura são relatados diversos estudos da atividade antibacteriana de metabólitos secundários, produzidos por micro-organismos, contra bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas* (VIEIRA et al. 2018; PÚRIC et al. 2018; MURATE et al. 2015; SPAGO et al. 2014; De OLIVEIRA et al. 2011; LIM et al. 2010).

Em relação à bactéria *X. axonopodis* pv. *passiflorae* estudos recentes desenvolvido por Zanardo e colaboradores (2015) mostraram que extratos produzidos por *Lentinula edodes* reduziram significativamente a multiplicação da bactéria. Em 2016, Tordin publicou um estudo preliminar, no qual demonstrou que bactérias isoladas da superfície foliar (filoplano) da planta do maracujá, e portanto, consideradas nativas da planta, inibiram o crescimento do patógeno (TORDIN, 2016).

Suspeita-se que novas espécies microbianas e novos metabólitos secundários podem ser identificados investigando micro-organismos endofíticos que vivem no interior de tecidos vegetais, durante parte ou por toda sua vida, podendo habitar desde raízes e caules a até frutos, flores e sementes (STANIEK et al. 2008; QIU et al. 2010; PARK et al. 2012; FOUDA et al. 2015; KUMAR et al. 2019). Estes organismos são conhecidos por várias funções associadas a seus hospedeiros vegetais, podendo agir como promotores de crescimento, garantindo maior resistência contra fatores bióticos e abióticos, e produzindo uma variedade de substâncias de interesse para áreas de agricultura, medicina e farmacologia em geral (STROBEL & DAISY, 2003; KUSARI et al. 2012; PARK et al. 2012; KUMAR et al. 2019; SAHA et al. 2019)

Ainda assim, poucas espécies vegetais foram estudadas quanto a totalidade de sua microbiota endofítica (VAZ et al. 2014), como é o caso dos micro-organismos endofíticos do gênero *Passiflora*.

A espécie *P. incarnata* Linnaeus, popularmente conhecida como maracujá-vermelho, apresenta diversas propriedades medicinais associadas aos seus vários constituintes químicos, tais como compostos fenólicos, alcalóides e flavonoides (LORENZI, 2002; MARCHART et al. 2003). Em 2010 Patil relatou em seus estudos a ação antibacteriana de metabólitos secundários extraídos da *P. incarnata* L. contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (PATIL, 2010).

Apesar da *P. incarnata* L. apresentar uma variedade de atividades biológicas, as propriedades da sua microbiota endofítica são praticamente inexploradas. Dessa maneira, é de suma importância explorar essa microbiota, principalmente com relação à ação que estes micro-organismos podem apresentar contra doenças que causam sérios prejuízos a culturas de *Passiflora* de grande interesse econômico, como é o caso da bacteriose no maracujá-amarelo (*P. edulis*).

Assim, este trabalho tem como objetivo contribuir para a descoberta de novos compostos produzidos por fungos endofíticos isolados de *P. incarnata* L. que possuam ação contra a *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, causadora da bacteriose no maracujá-amarelo (*P. edulis*).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Xanthomonas* e sua fitopatologia

A primeira descrição de um membro do gênero *Xanthomonas* foi feita por Ethel M. Doidge, em 1921, ainda como *Bacterium vesicatorium*, ao estudar um patógeno que atacava tomateiros e pimentões (DOIDGE, 1921). Mais tarde, em 1939, a espécie foi renomeada por Dowson para *Xanthomonas vesicatoria*, passando por diversas alterações desde então (KYEON et al. 2016; JONES et al. 2000).

A classificação e agrupamento dos membros do gênero passou por várias adaptações e correções devido à uniformidade fenotípica do grupo, mas com o surgimento de novas técnicas moleculares a utilização do sistema de patovares, que relaciona as variedades patogênicas com as espécies vegetais afetadas, se tornou o mais usual para o grupo (VAUTERIN et al. 2000).

As bactérias do gênero *Xanthomonas* são Gram-negativas, em forma de bastonetes, com um único flagelo polar. Em cultura apresentam colônias convexas, de margens arredondadas, com brilho e em geral coloração amarelada devido à presença do pigmento xanthomonadina, que dá nome ao gênero (VAUTERIN et al. 1995). O destaque do grupo se dá pela variedade de espécies vegetais atingidas. Com distribuição mundial, o grupo é responsável por doenças em culturas economicamente importantes como: citros, maracujá, mandioca, tomate, cana-de-açúcar, morango, pimentão, arroz, feijão, banana e outros (FISCHER & REZENDE, 2008; ISHIDA & HALFELD-VIEIRA, 2009 ; RYAN et al. 2011; RODRIGUEZ-R et al. 2012).

As infecções usualmente se espalham por sementes e mudas contaminadas, e uma vez instalada em um pomar, plantas saudáveis podem ser infectadas durante seu manuseio, pela ação de chuva, vento, solo contaminando e possivelmente insetos. Os patógenos inicialmente colonizam as superfícies do vegetal, mas podem afetar os tecidos internos através de estômatos, hidatódios ou lesões na planta (Fig. 1) (RYAN et al. 2011).

Figura 1 - Microscopia do estômato de toranja com células de *X. axonopodis* pv. *citri*

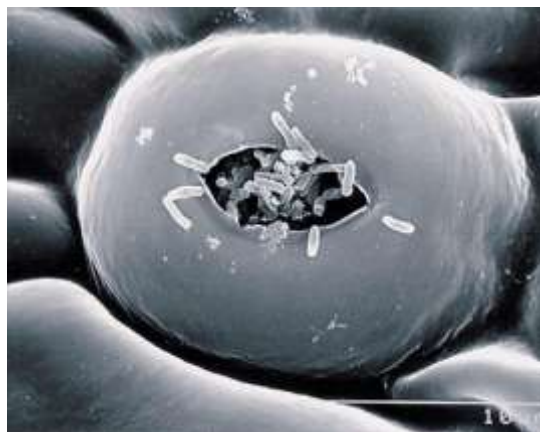


Foto: J. Cubero. Retirado de Gottwald et al. 2012

De maneira geral é recomendada a utilização de técnicas de manejo integrado para o cultivo, como maior espaçamento entre as plantas, higienização dos materiais de trabalho, utilização de produtos antibacterianos, dentre outros, de maneira que se atenha aos níveis adequados de fitossanidade. Um aumento na área de produção sem adesão destas técnicas pode ocasionar o aumento de incidência de patologias. (MEW & NATURAL, 1993; COELHO et al. 2016).

Tendo em vista que em muitos casos, as infecções causadas por membros do gênero são de difícil controle e erradicação, grande parte dos esforços é direcionado a não instalação dos micro-organismos nas plantações através da seleção de mudas e sementes saudáveis, uso de cultivares resistentes, quando disponíveis, controle de insetos e plantas invasoras, destruição dos restos vegetais. (ISHIDA & HALFELD-VIEIRA, 2009; JUNQUEIRA 2005 *apud* ISHIDA & HALFELD-VIEIRA, 2009; SANCHES et al. 2014)

Após sua instalação, os métodos mais comuns de controle são a erradicação das plantas contaminadas e a aplicação de químicos, sendo os mais comuns os produtos à base de cobre associados a antibióticos. Porém, é seguro afirmar que as aplicações recorrentes de químicos nas lavouras criam uma força de seleção que pode gerar micro-organismos resistentes aos produtos utilizados (ANDERSON & HUGHES, 2011; ECONOMOU & GOUSIA, 2015). Alguns relatos na literatura já revelam a existência de alguns isolados do gênero *Xanthomonas* com resistência a determinadas concentrações de cobre (AGUIAR et al. 2003; FRANCO & TAKATSU, 2004).

2.2 O maracujá no Brasil

O gênero *Passiflora* é conhecido pela grande variedade de espécies, são aproximadamente 500 espécies, com 130 delas encontradas no Brasil. A maior importância econômica do gênero vem da produção de frutos, principalmente da espécie *P. edulis* f. *flavicarpa*, o maracujá amarelo ou azedo (CERVI et al. 2010; MELETTI, 2011; JUNQUEIRA et al. 2005 *apud* ZUCARELI et al. 2015).

O maracujá vem de uma cultura relativamente recente, com a instalação dos primeiros pomares comerciais no estado de São Paulo, na década de 60, ainda assim, o país figura como maior produtor mundial de maracujá amarelo (MELETTI, 2011; IBGE, 2016; FAO, 2018;). Mesmo apreciada pelo sabor exótico pelo mercado exterior, quase que a totalidade da produção nacional de frutas frescas acaba por atender ao mercado interno, devido sua popularidade, com as poucas exportações sendo relegadas a sucos concentrados (MELETTI, 2011; FAO 2018).

No final da década de 80 houve um grande investimento na cultura no país, com intensa profissionalização da produção, levando o país aos patamares atuais. O maracujá se tornou um meio de entrada viável para o agricultor que buscava uma alternativa na fruticultura e encontrou no fruto um rápido retorno financeiro e uma produção constante durante o ano. Mesmo com o investimento aplicado na produção agrícola no país, várias etapas, como a polinização, necessitam de intensiva mão de obra e não permitem a mecanização, relegando a cultura do maracujá a pequenas propriedades, com destaque para agricultores familiares que tem incentivado o desenvolvimento de pomares comerciais e a fixação de mão de obra rural (LIRA, 2018; MELETTI, 2011; MONDAINI & KINPARA, 2003).

A variedade de produtos obtidos do maracujá é ampla, garantindo um alto valor agregado à cultura. Frutas frescas, sucos, polpas, iogurtes, sorvetes, flores para ornamentação e a obtenção de fitoterápicos para medicina, como a maracujina e a passiflorina (MONDAINI & KINPARA, 2003; COELHO et al. 2016). Pesquisas recentes ainda apontam para utilização de rejeitos da fruta, como a casca, que representa mais de 50% da massa da fruta, e suas sementes, que podem ser utilizadas na extração de fibras, pectina, niacina, substâncias antioxidantes e outros (CÓRDOVA et al. 2005; VERA et al. 2019; VUOLO et al. 2019).

O aumento na produção, sem os cuidados necessários, expôs o agricultor a novas problemáticas. Além do aumento nos custos de mão de obra, fertilizantes, agrotóxicos e a flutuação dos preços dos produtos originados da fruta, o surgimento de pragas que afetam as lavouras tem se

tornado um empecilho na produtividade acarretando perdas econômicas substanciais (COELHO et al. 2016).

Diversas pragas causadas por fungos, vírus e bactérias, afetam a cultura do maracujá, ocasionando a morte da planta antecipadamente, a perda na produtividade ou na qualidade dos frutos. Muitos pomares acabaram aderindo um caráter itinerante, mudando a produção de região devido a saturação de certas doenças (MELETTI, 2011). Dentre elas, destaque-se no Brasil: a fusariose, ou murcha do fusarium (Fig. 2), ocasionada pelo fungo filamentoso *Fusarium oxysporum*, que pode causar o entupimento dos vasos internos e levar a planta à morte; o *woodiness* (Fig. 2), causado por um vírus do gênero *Potyvirus* que provoca o endurecimento dos frutos e malformação da planta; a bacteriose, mancha bacteriana, ou morte súbita do maracujá (Fig. 3), causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, que leva a manchas em flores e frutos e até a morte da planta em casos graves (FISCHER & REZENDE, 2008).

Figura 2 - Morte da planta ocasionada por infecção de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*



Foto: J. R. Liberato DPI&F. Retirado de Liberato & Laranjeira, 2005

Figura 3 - Frutos mostrando sintomas de *woodiness*

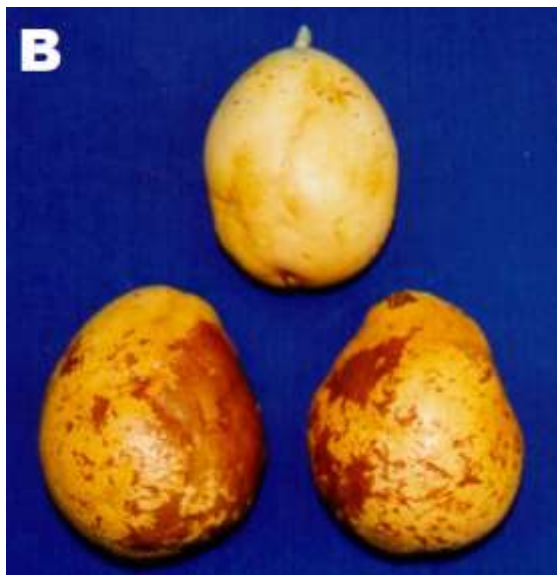


Foto: Michel C. Moraes. Retirado de Moraes et al. 2002

Figura 4 - Fruto mostrando sintomas da bacteriose do maracujá



Foto: Bernardo de Almeida Halfeld-Vieira. Retirado de Ishida & Halfeld-Vieira, 2009

A bacteriose do maracujá se destaca pelo seu causador, a bactéria *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. O primeiro relato da doença no país data de 1967, na cidade de Araraquara e rapidamente se espalhou para todas as regiões onde se produz a fruta, especialmente em regiões com altas temperaturas e umidade (ISHIDA & HALFELD-VIEIRA, 2009; NAKATANI et al. 2009).

A doença é conhecida como uma das mais limitantes para cultura do maracujazeiro. É caracterizada pelo surgimento de manchas de aspecto oleoso que levam a necrose e podem formar regiões cloróticas ao seu redor. Os frutos também apresentam manchas oleosas que podem atingir grandes extensões que embora superficiais, em casos de infecções avançadas, pode atingir as

sementes tornando o fruto impróprio para consumo, causando perdas primárias e secundárias na produtividade (GONÇALVES & ROSATO, 2000; ISHIDA & HALFELD-VIEIRA, 2009; CERDA et al. 2017).

O nome de “morte súbita” remete a redução no tempo de vida do maracujazeiro, que passa de 3 a 4 anos para 12 a 18 meses de vida. O fato ocorre em casos graves onde os vasos das folhas são contaminados e os micro-organismos atingem os vasos da região lenhosa, obstruindo seu interior e provocando a seca de porções ou da planta inteira (VIANA et al. 2003).

Assim como outros membros do gênero, a bactéria *X. axonopodis* pv. *passiflorae* tem como um dos principais métodos de disseminação o uso de sementes e mudas contaminadas, o que, devido a abrangência da doença, tem se tornado um grave problema para agricultores que tem dificuldades em obter material de propagação sadio (NAKATNI, 2009). De maneira geral, o controle da doença usa um manejo integrado, que prevê desde a instalação de plantios em locais distantes dos contaminados, técnicas de manipulação adequada e erradicação de insetos e plantas invasoras a até a aplicação de químicos que em geral são combinados de compostos cúpricos e antibióticos (ISHIDA & HALFELD-VIEIRA, 2009).

O uso de químicos, além de levantar questões importantes sobre a manutenção de um ambiente saudável, já é considerado como uma das possíveis causas da severidade da doença, visto que a aplicação de compostos cúpricos é recorrente e possivelmente existem isolados com maior resistência (FRANCO & TAKATSU, 2014). Com a possibilidade do surgimento de micro-organismos resistentes aos métodos de controle conhecidos, tanto pesquisadores quanto agricultores têm buscado métodos alternativos para se combater a bacteriose (ZANARDO et al. 2016).

2.3 Modelo de agricultura atual

Os anos que se seguiram após o término da Segunda Guerra Mundial foram marcados por avanços científicos em diversas áreas, dentre elas, as ciências agrárias mostraram significativa expansão tecnológica que culminou na criação de um modelo agro econômico utilizado até hoje no mundo (PELAEZ et al. 2010).

O momento, conhecido como revolução verde, foi caracterizado pela combinação da mecanização do campo, o uso de sementes e organismos geneticamente modificados e a aplicação da química na forma de fertilizantes e agrotóxicos, mudanças essas incentivadas pela promessa do aumento da produção alimentar visando à erradicação da fome e segurança alimentar.

ALBERGONI & PELAEZ, 2007). De fato, a produção de alimentos, dentre os anos de 1966 e 2000 mostrou um aumento de 125%, evitando as previsões de fome mais alarmantes feitas no início da década de 60 (KUSH, 2001).

Estima-se uma população de aproximadamente mais de nove bilhões de pessoas para 2050, assim é essencial um aumento drástico (em torno de 70%) na produção de alimentos (CRIST et al. 2017; CLAY, 2011; CARVALHO, 2006; COHEN, 2005).

Juntamente com o aumento na produção é essencial que se diminuam as perdas de alimentos, seja na lavoura ou no pós-processamento de seus produtos. Segundo a ONU, doenças e pragas podem ocasionar até 40% de perda na produção alimentar, sendo essas causadas por uma variedade de organismos como vírus, bactérias, fungos, nematoides e plantas parasitas (FAO, 2017; STRANGE & SCOTT, 2005). Além da perda quantitativa, com a redução de produtividade, é importante ressaltar que existem perdas qualitativas, que podem diminuir a qualidade de algum produto, afetando desde suas propriedades até seu preço de mercado (OERKE, 2006).

Neste contexto, o uso de químicos nas lavouras tem sido importante mundialmente para o controle de pragas, neste cenário o Brasil, desde 2008, se destaca como sendo o maior importador e consumidor de produtos sintéticos na agricultura (RIGOTTO et al. 2014; CARNEIRO et al. 2015; BOMBARDI, 2017; VASCONCELOS, 2018) e figura na sétima posição como consumidor por hectare de cultivo em média (VASCONCELOS, 2018).

Ainda que o advento dos agrotóxicos, ou intensivos agrícolas, tenha permitido o controle de diversas pragas colaborando com a segurança alimentar, a perspectiva de um aumento da utilização destes produtos de maneira irregular ou sem os devidos estudos sobre possíveis riscos para saúde pública, meio ambiente e implicações socioeconômicas colocam novamente em pauta sua seguridade (PIMENTEL, 2005; ARAÚJO et al. 2007; GILDEN et al. 2010; BOMBARDI, 2017; FERNANDES et al. 2019).

Dentre os riscos apresentados é possível observar casos de doenças e envenenamentos de trabalhadores rurais e animais e a contaminação de produtos agrícolas (PIMENTEL, 2005), criando riscos para população e agravando problemas para a saúde pública. Segundo o relatório divulgado em 2016 pelo Programa de Análises de Resíduos em Alimentos (PARA), associado à ANVISA (BRASIL, 2016), aproximadamente 20% das amostras alimentares coletadas de produtos agrícolas se mostraram com níveis insatisfatórios de produtos químicos variados. Em relação ao ambiente são relatadas contaminações de corpos aquáticos e do solo, promovendo efeitos variados em

diversos organismos da cadeia alimentar da região afetada (HAYO & WERF, 1996; GRAVILESCY, 2005; PIMENTEL, 2005).

Ademais, o uso recorrente de químicos na agricultura cria uma pressão de seleção que tem aumentado à frequência do surgimento de micro-organismos resistentes aos mesmos (ANDERSON & HUGHES, 2011). A extensa utilização de monoculturas, e suas técnicas associadas, promovem um ambiente geneticamente homogêneo e mais denso, que permite a rápida proliferação de doenças nas lavouras, e que quando associada à contínua aplicação de pesticidas promove condições necessárias para o possível desenvolvimento de pragas resistentes (STUKENBROCK & MCDONALD, 2008; DAYAN et al. 2009)

Devido aos riscos apontados, países como os Estados Unidos passaram a adotar medidas regulatórias mais rígidas (*Food Quality Protection Act*, em 1996), enquanto no âmbito internacional, instituições como os comitês da *Food and Agriculture Organization* (ONU) emitem orientações visando maior entendimento e controle do uso destes produtos sintéticos (DAYAN et al. 2009; ECONOMOU & GOUSIA, 2015; FAO, 2015). A União Européia, que concentra aproximadamente 50% da indústria de agroquímicos, possui legislações mais restritivas que visam proibir produtos nocivos e reavaliar, a cada 10 anos, os químicos em utilização nas lavouras (PELAEZ et al. 2015; BOMBARDI, 2017)

No Brasil, por mais que as legislações sejam menos rigorosas do que em outros países, com diversos produtos em circulação que se encontram proibidos por outros governos (BOMBARDI, 2017), agências como a ANVISA visa um maior controle destes químicos (LOPES, 2017) e a EMBRAPA, que aliada a produtores e a pesquisadores, promove trabalhos que buscam alternativas para a agricultura e para que se evitem os efeitos nocivos dos agrotóxicos (EMBRAPA, 2015; TORDIN, 2015; KARAM et al. 2017).

2.4 Produtos naturais e organismos endofíticos

No contexto abordado, a busca por produtos naturais se mostra como uma alternativa viável ao combate de pragas. A importância destes produtos se dá pela grande variedade estrutural, o que permite a elaboração de diversas estratégias no controle de pragas. A associação com micro-organismos aponta para a existência de funções biológicas associadas a estas substâncias. Além disso, a ausência de estruturas “não naturais” possibilita um melhor reconhecimento e degradação destes compostos por organismos na natureza, o que lhes confere uma menor “meia-vida” (FEHER & SCHMIDT, 2003; DAYAN & DUKE, 2009; DAYAN et al. 2009).

É possível obter substâncias de origem natural de vários tipos de organismos, como plantas, animais e micro-organismos. Aqui, dá-se destaque aos micro-organismos endofíticos, os quais residem em tecidos vegetais vasculares sem causar aparente dano a seu hospedeiro. (BACON & WHITE, 2000; GUO et al. 2008).

De acordo com as últimas estimativas, existem cerca de 400.000 espécies de plantas no mundo, com milhares de espécies sendo descritas anualmente (KEW, 2017). Considerando que cada espécie vegetal é hospedeira de um ou mais endófitos e que raras são as espécies com estudos completos acerca desses micro-organismos e seus produtos, é seguro afirmar a potencialidade da área para a descoberta de novos produtos naturais bioativos (STROBEL & DAISY, 2003; GUO et al. 2008; KUSARI et al. 2012; GOUDA et al. 2016; SAVI et al. 2019).

As substâncias mais comumente obtidas destes micro-organismos são seus metabólitos secundários, compostos de baixo peso molecular que apresentam uma diversidade de funções como antifúngicas, antibacterianas, antivirais, antitumorais, antioxidantes, inseticidas e imunomodulatórias (GUO et al. 2008; STROBEL & DAISY, 2003).

Strobel et al. (2001) descrevem a ação de uma mistura compostos antibióticos voláteis produzidos pelo fungo *Muscodora albus*, isolado de *Cinnamomum zeylanicum*, com capacidade de inibição de fungos e bactérias, incluindo o causador da doença do carvão na cevada, *Ustilago hordei*. Linhagens de *Pseudomonas fluorescens* e *P. putida*, isoladas de oliveiras (*Olea europaea* Picual) apresentaram ação *in vitro* e *in vivo* contra o patógeno *Verticillium dahliae*, causador da murcha nas oliveiras, e portanto, possibilitam a criação de estratégias no controle da doença, seja no desenvolvimento de produtos originados de seus extratos ou na forma de controle biológico (MERCADO-BLANCO et al. 2004; MERCADO-BLANCO & LUGTENBERG, 2014).

Na área médica existem grandes avanços proporcionados pelo estudo de micro-organismos endofíticos, por exemplo, a produção de drogas como o taxol, obtido inicialmente da árvore *Taxus brevifolia*, um dos mais importantes medicamentos no combate ao câncer, podem ser barateadas através da produção por isolados endofíticos com capacidade de produção de compostos similares (STIERLE et al. 1993; STROBEL, 2002; CANUTO et al. 2012). Substâncias antibióticas, como pseudomicinas e ecomicinas, têm sido obtidas de bactérias endofíticas e apresentam efeitos positivos contra patógenos com *Candida albicans*, ampliando estratégias de controle de patologias humanas (CHRISTINA et al. 2013).

Nas ciências de materiais, produtos como os bioplásticos, sendo o Poli-3-hidroxibutirato (P3HB) o mais conhecido, são produzidos por diversas bactérias como *Herbaspirillum seropedicae*, por exemplo, e podem fornecer uma alternativa aos plásticos convencionais (RYAN et al. 2008).

Muito se discute acerca da origem das propriedades desses organismos e seu processo de co-evolução entre micro-organismos e plantas. Registros arqueológicos mostram hifas fossilizadas em uma estrutura similar a micorrizas, possivelmente associadas a briófitas, que datam do Ordoviciano (aprox. 460 milhões de anos) (REDECKER, 2000). A evolução destes micro-organismos com o surgimento de plantas vasculares pode ter permitido o desenvolvimento de vias metabólicas cujos metabólitos apresentassem função ecológica (KRINGS et al. 2007; KUSARI et al. 2012; VENUGOPALAN & SRIVASTAVA, 2015).

Uma das espécies vegetais em questão é a *P. incarnata* L (Fig. 5), o maracujá vermelho, ou *maypop*, como é conhecido na América do Norte, de onde a planta é nativa. Ainda que do mesmo gênero dos demais maracujás, como o amarelo por exemplo (*P. edulis* f. *flavicarpa*), e possuindo um fruto comestível (DHAWAN et al. 2001) o destaque de *P. incarnata* L. está na variedade de substâncias obtidas da planta e suas flores ornamentais (MIRODDI et al. 2013).

Figura 5 - Flor de *Passiflora incarnata* Linnaeus, o maracujá vermelho



Retirado de: Dai et al. 2016.

Compostos extraídos da planta já mostraram efeitos positivos no combate a ansiedade, eretismo (intoxicação por mercúrio), insônia, hipertensão, neuralgia e até mesmo câncer (MIRODDI et al. 2013; KIM et al. 2017), fazendo com que a planta fosse reconhecida em farmacopeias britânicas, americanas, indianas, francesas, suíças, alemãs e egípcias (DHAWAN et al. 2001). É considerado, no entanto, que as propriedades ansiolíticas e calmantes da planta já seriam utilizadas por populações locais desde antes seus estudos clínicos através do consumo de frutos ou por preparações com partes do vegetal, o que, se mantém até hoje, com a comercialização de diversos extratos naturais e o consumo caseiro corriqueiro em muitas regiões (DHAWAN et al. 2004; MIRODDI et al. 2013; KIM et al. 2017).

Visto a variedade dos produtos encontrados na planta, seus micro-organismos endófitos se apresentam como uma possível nova fonte de substâncias de interesse. A microbiota endofítica de *P. incarnata* L. ainda é pouco explorada, porém, os trabalhos existentes na literatura revelam resultados promissores. O fungo *Alternaria alternata* mostrou altas produções de um composto com atividade contra células tumorais (SEETHARAMAN et al. 2017). Ademais, foram isolados diversos compostos como saponinas, flavonoides e compostos fenólicos provenientes de extratos de fungos filamentosos endofíticos (SILVA, 2017). Além de fungos, bactérias endofíticas também

já foram isoladas e demonstraram produzir substâncias com capacidade de promover crescimento vegetal (YESQUÉN, 2018).

Neste contexto, pesquisas envolvendo produtos naturais e seus organismos são importantes não apenas no combate a pragas na agricultura, mas também em áreas como a da saúde e de ciências de materiais, possibilitando estratégias de controle de doenças humanas e novas soluções industriais.

3 OBJETIVOS

O trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de fungos endofíticos isolados de *P. incarnata* com atividade antimicrobiana em relação a bactéria *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, causadora da bacteriose no maracujá amarelo (*P. edulis*).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos utilizados

Vinte e quatro fungos endofíticos isolados de *P. incarnata* L foram utilizados. Os isolados foram examinados quanto à sua pureza e preservados pelo método de Castellani (CASTELLANI, 1939). Os isolados utilizados neste trabalho foram previamente selecionados mediante sua atividade contra fungos fitopatógenos, pelo grupo de pesquisa da Prof.^a Derlene Attili de Angelis.

As linhagens de *X. a. pv. passiflorae* utilizadas foram cedidas pela professora Maria Lúcia Carneiro Vieira, do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo. As linhagens foram criopreservadas à - 80°C (20% glicerol).

4.2 Produção dos extratos

4.2.1 Cultivo microbiano

Os fungos filamentosos foram reativados em placas com meio de cultivo ágar malte 2% (MA) e incubados em estufa por sete dias à 28°C. Após esse período, discos de aproximadamente 0,5 cm, contendo micélio e ágar, foram transferidos para frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL contendo aproximadamente 150 mL de meio de cultivo líquido Malte 2% (M). Os frascos foram mantidos a 28°C e 120 rpm por 20 dias. A padronização do método de cultivo foi realizada por Silva (2017).

4.2.2 Obtenção dos extratos brutos

Após o tempo de cultivo, todo caldo obtido foi submetido a processo de extração, onde este foi triturado em liquidificador industrial com o solvente acetato de etila, este passo foi realizado três vezes para garantir maior eficiência ao processo. Com auxílio de um funil de separação as fases orgânica e aquosa foram separadas (Fig. 6). A fase aquosa foi devidamente descartada enquanto a fase orgânica foi reservada para a concentração, tendo o excesso de água removido pela adição de sulfato de sódio (Na₂SO₄) quando necessário.

Figura 6 - Funil de separação mostrando as fases orgânica (acima) e aquosa (abaixo)



Foto: Acervo pessoal

O excesso de solvente foi removido com o auxílio de um evaporador rotativo e a secagem dos extratos foi obtida em um concentrador de amostras à 40°C com fluxo de ar incidido sobre as amostras (Fig. 7). Os extratos brutos secos foram acondicionados em microtubos à 10°C.

Figura 7. Concentrador de amostras



Foto: Acervo pessoal

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

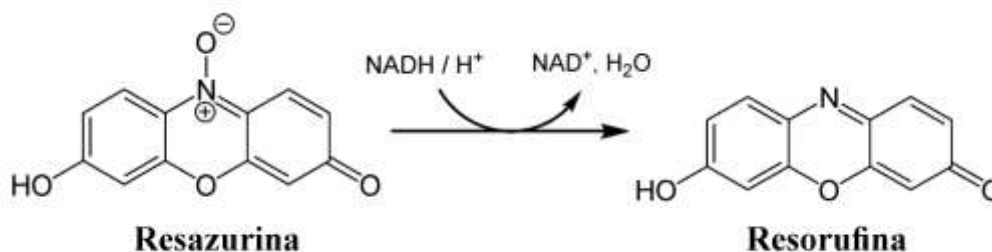
4.3 Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos brutos

Todos os extratos obtidos foram submetidos a um ensaio de seleção visando determinar sua capacidade inibitória contra a bactéria fitopatogênica *X. a. pv. passiflorae*. As linhagens utilizadas foram: LM4a e M83, isoladas a partir de amostras coletadas de pomares nas cidades de Limeira – SP e Uberaba – MG, respectivamente.

4.3.1 Resazurin Microtiter Assay (REMA)

Afim determinar a capacidade de inibição dos extratos, estes foram avaliados pelo método de REMA. O teste se baseia na redução da resazurina, corante de cor azul e baixa fluorescência, para resorufina, de cor rósea e alta fluorescência. A redução da resazurina se dá pela ação do NADH desidrogenase gerado pelo metabolismo celular de organismos presentes, sendo proporcional à respiração aeróbica (Fig. 8), de maneira que é possível quantificar a viabilidade celular do fitopatógeno mediante a presença do extrato testado. A quantificação é feita a partir do aparelho de fluorescência Synergy H1 (BIOTEK) com excitação e emissão nos comprimentos de onda de 530 e 590 nm.

Figura 8 - Reação de redução da resazurina para resorufina mediada pela ação do NADH



Fonte: Adaptado de Schimit et al. 2013

O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços contendo os extratos testados juntamente com um controle negativo (CN), controle positivo (CP) e controle de veículo (CV) (Fig. 9).

Figura 9 - Exemplo de uma placa de REMA após o último período de incubação. A: Amostras; CP: controle positivo; CV: controle de veículo; CN: Controle Negativo

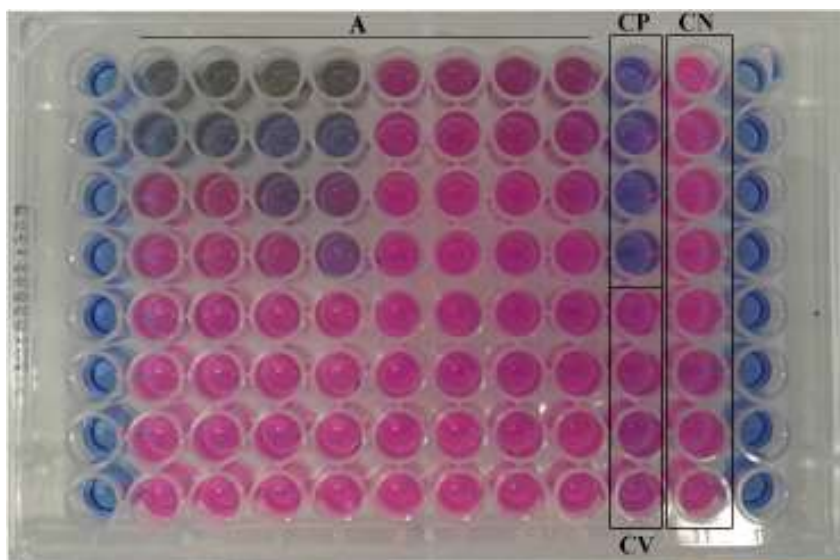


Foto: Acervo pessoal

Os extratos, já padronizados em solução de DMSO 10%, foram diluídos em meio NYG (0,3% extrato de levedura; 0,5% de peptona bacteriológica e 2% glicerol) a fim de se obter uma concentração de 2,1 mg/mL, concentração máxima testada, e de maneira que a concentração de DMSO não ultrapasse 1%, a mesma utilizada para a elaboração do CV. Para o CP se utilizou o antibiótico canamicina (20µg/mL), o CN foi composto apenas por meio de cultivo NYG e inóculo bacteriano. A montagem do ensaio seguiu o protocolo por Silva & Ferreira (2013), modificado para a utilização de meio NYG, onde oito extratos são testados em oito diluições seriadas.

As células bacterianas para o inóculo foram cultivadas em meio NYG líquido à 29°C e 200 rpm por 12 h, afim de atingir uma densidade óptica (D.O.) de aproximadamente 0,8 (à 600nm) referente a fase *log* de crescimento bacteriano, buscando a utilização de células viáveis. O inóculo então foi padronizado com uma diluição em meio NYG para se obter a concentração de 10^5 células em cada poço da placa.

Após a preparação, as placas foram incubadas à 29°C por aproximadamente 16 h, quando é possível observar o turvamento do meio de cultivo no CN, apontando crescimento bacteriano, foi então adicionado o corante rezasurina (0,1 mg/mL) e a placa foi novamente incubada à 29°C por cerca de 1 hora. Após esse período foi realizada leitura da placa por meio do leitor de microplacas SYNERGY H1 (Biotek®) que quantifica as unidades de fluorescência em cada poço.

As medidas de unidade fluorescência foram utilizadas para o cálculo de porcentagem de inibição do crescimento celular em cada poço, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%I = \left[\frac{CN - AM}{CN} \right] * 100$$

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

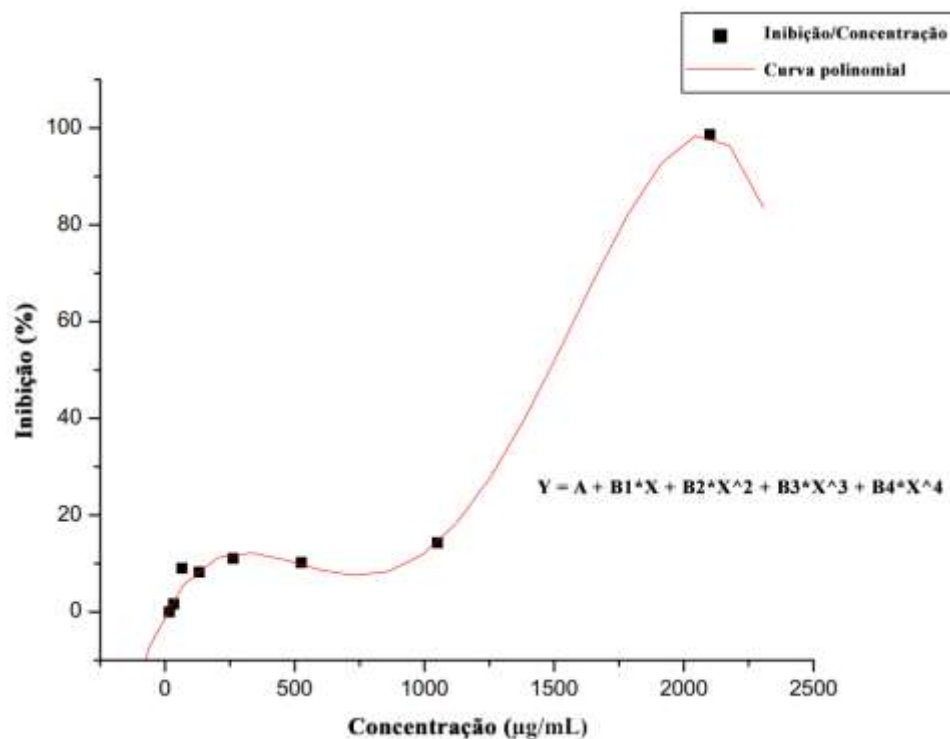
A triagem dos extratos foi realizada em duplicata para as duas linhagens de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, LM4a e M83. Foram considerados como positivos aqueles que mostraram porcentagens de inibição celular superiores a 90% na maior concentração testada.

Para estes extratos, os testes foram repetidos em triplicata em três eventos distintos, onde cada extrato foi testado em oito concentrações diferentes (µg/mL): 2100; 1050; 525; 262; 131; 65; 32; 16.

4.4 Concentração Inibitória (CI 90) dos extratos

Os valores de concentração para inibição celular de 90% (CI90) foram calculados utilizando as porcentagens inibitórias obtidas (4.3.2). Os valores de porcentagem do evento que apresentou o menor desvio padrão foram usados para a elaboração de uma função polinomial de quarta ordem, que ao ser igualada ao valor de 90 (Y=90), permite a obtenção das concentrações (µg/mL) necessárias de cada extrato para a inibição celular de 90%. Um modelo de equação obtida pode ser visto na Figura 10.

Figura 10 - Gráfico exemplificando a determinação da curva de regressão de um extrato apresentando o modelo de equação gerada.



Fonte: Dados do trabalho

4.5 Avaliação da Concentração Mínima Bactericida (CMB)

A CMB foi determinada pelo repique do conteúdo da placa de 96 poços, previamente a adição do corante resazurina (0,1 mg/mL), em uma placa de Petri (150 x 15 mm) contendo meio de cultivo NYG sólido, usando um repicador de colônias (Figura 11).

Figura 11 - Repicador de colônias utilizado para inoculação em placas de Petri com meio NYG para determinação da CBM.



Fonte: Gabrielle Vieira

As placas foram incubadas por 48h à 29°C. O crescimento bacteriano foi verificado visualmente, sendo possível determinar em quais concentrações cada um dos extratos apresentou características bactericidas. Os testes foram realizados em conjunto com os testes REMA, sendo então realizados em triplicatas em três eventos distintos.

4.6 Fracionamento dos extratos ativos

4.6.1 Cromatografia em coluna

O fracionamento em coluna do extrato selecionado foi realizado de duas maneiras:

1) Em coluna de sílica gel, 0,2 – 0,5 mm, montada em bureta de 50 mL de volume total, com fase móvel composta por uma mistura de acetato de etila e hexano. O início da corrida se deu com uma solução de 10% acetato de etila e com o decorrer do fracionamento a concentração do solvente foi aumentada até 100% de acetato de etila. Aproximadamente 120 mg de extrato foram diluídos em metanol 100% em um volume não superior a 2 mL e injetados com auxílio de uma pipeta manual. As frações foram coletadas em microtubos com volume de 500 µL cada.

2) Em coluna HiPrep, Octyl FF 16/10 (GE Healthcare®) de 20 mL de volume total, 10 cm de altura, 1,6 cm de diâmetro e com fase móvel composta por uma mistura de metanol e água, iniciando a corrida com uma solução de 10% metanol a um fluxo de aproximado de 200 µL/min. Com o decorrer do fracionamento a concentração de metanol foi aumentada até 100%. Aproximadamente 140 mg de extrato foram diluídos em metanol 100% em um volume não superior a 2 mL e injetado com auxílio de uma bomba peristáltica. As frações foram coletadas em microtubos com volume de 500 µL cada.

O fracionamento, em ambos os métodos, foi acompanhado por cromatografia em camada delgada (CCD) (TLC Sílica Gel 60 F₂₅₄, MERCK®). As frações foram aplicadas em placa de sílica (aprox. 5 cm x 2cm) e corridas com acetato de etila 100%. A revelação das placas se deu em luz UV em dois comprimentos de onda distintos (254nm e 365nm) e solução reveladora (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 da técnica permitiu o acompanhamento do processo de fracionamento e guiou o aumento na proporção de solventes utilizados em ambos os processos citados.

4.6.2 Separação em CLAE

As frações ativas foram submetidas à análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para tanto, foi utilizado um aparelho *Shimadzu* acoplado a detectores UV-VIS e de Índice de Refração (IR). A coluna utilizada foi uma C18 Shim-pack CLC-ODS (M) ® da *Shimadzu*. A fase móvel isocrática foi composta por 5% de Metanol e 95% água, com tempo de corrida de 25 min e volume de injeção de 20µL.

O cromatograma obtido pela análise de CLAE foi separado em regiões determinadas e a coleta das mesmas regiões foi realizada guiada pelo tempo de retenção de cada região. As amostras foram coletadas ao longo de várias corridas e concentradas de acordo com cada região e testadas quanto a sua bioatividade através do teste REMA (item 4.3.1).

4.6.3 Análise por Espectrometria de massas

A mesma fração utilizada para a análise por CLAE (item 4.6.2) foi submetida a um novo fracionamento em coluna de sílica gel, como citado no item 4.6.1, modificado para um menor fluxo de corrida.

As frações obtidas a partir deste novo fracionamento foram analisadas quanto sua bioatividade e as consideradas positivas foram submetidas à análise por espectrometria de massas. As análises de espectrometria de massas foram realizadas por cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massas (LC-MS/MS - Waters).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção de extratos brutos

Ao final do processo de extração foram obtidos 24 extratos, apresentados, com suas respectivas massas, na Tabela 1.

Tabela 1 - Massa (mg) de extrato obtida de cada um dos isolados de fungos endofíticos. Massa relativa à aproximadamente 300 mL de caldo de cultivo utilizados na extração.

Isolado	Massa	Isolado	Massa	Isolado	Massa
LMA 1666	63.6	LMA 1672	97.2	LMA 1684	101.6
LMA 1603	57.2	LMA 1681	44.4	LMA 1686	92.8
LMA 1710	35	LMA 1674	26.3	LMA 1605	51.6
LMA 1630	27	LMA 1705	93.8	LMA 1709	47.7
LMA 1596	32.9	LMA 1706	29.6	LMA 1720	56.3
LMA 1722	15.8	LMA 1719	18	LMA 1792	50.6
LMA 1721	32	LMA 1718	127	LMA 1798	129.6
LMA 1793	52	LMA 1602	45.7	LMA 1694	40.3

Fonte: Dados do trabalho

Inicialmente todos os extratos produzidos apresentaram massa suficiente para a realização dos testes de triagem. Os extratos considerados positivos foram produzidos em maior quantidade (de acordo com item 4.2.1) durante a realização do trabalho afim de se obter maior massa para futuros testes.

5.2 Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos brutos

5.2.1 Screening

Os 24 extratos foram testados em duplicata em relação a sua atividade de inibição do crescimento celular das linhagens LM4a e M83 de *X. a. pv. passiflorae*. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Relação de extratos utilizados e sua atividade positiva (em destaque) contra as duas linhagens de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (valores superiores a 90% foram considerados positivos)

Extratos dos isolados	LM4a	M83
LMA 1666	-	-
LMA 1603	-	-
LMA 1710	-	-
LMA 1630	-	-
LMA 1596	-	-
LMA 1722	-	-
LMA 1721	-	-
LMA 1793	+	+
LMA 1672	-	-
LMA 1681	-	-
LMA 1674	-	+
LMA 1705	-	-
LMA 1706	-	-
LMA 1719	+	+
LMA 1718	-	-
LMA 1602	+	+
LMA 1684	-	-
LMA 1686	-	-
LMA 1605	-	+
LMA 1709	-	-
LMA 1720	-	-
LMA 1792	-	-
LMA 1798	+	+
LMA 1694	-	-

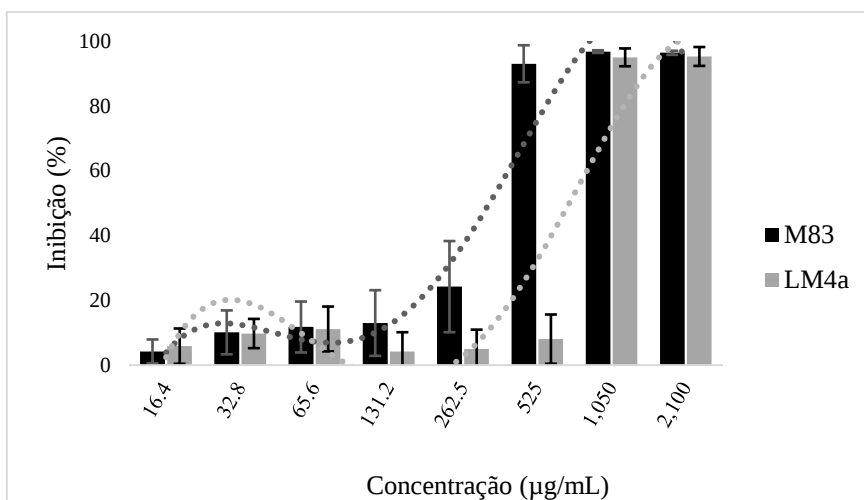
Fonte: Dados do trabalho

Observando a Tabela 1 é possível verificar que 4 extratos (dos fungos LMA 1793, LMA 1719, LMA 1798 e LMA 1602) se mostraram positivos para as duas linhagens de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* testadas. Dois extratos, dos fungos LMA 1605 e LMA 1674, revelaram atividade apenas contra a linhagem M83, o que pode indicar uma maior susceptibilidade da linhagem aos extratos em questão. A diferença de susceptibilidade entre as linhagens pode estar relacionada a alta diversidade observada entre os isolados da espécie (Munhoz et al. 2015).

5.2.2 Reavaliação da atividade inibitória dos extratos brutos

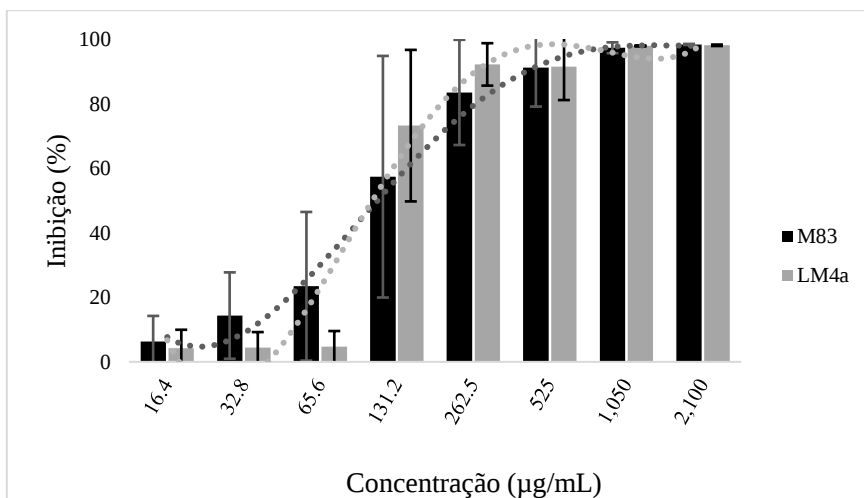
Os quatro extratos considerados positivos (inibição celular superior a 90% na maior concentração), para ambas as linhagens, foram testados em triplicatas em três eventos distintos. As Fig. 12, 13, 14 e 15 apresentam a relação concentração e inibição desses extratos bioativos frente às linhagens LM4a e M83 plotadas com linha de regressão polinomial e desvios padrões.

Figura 12 - Gráfico da inibição (%) por concentração ($\mu\text{g/mL}$) do extrato LMA 1793 em relação às duas linhagens da bactéria *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (LM4a e M83) (CP = aprox. 90%).



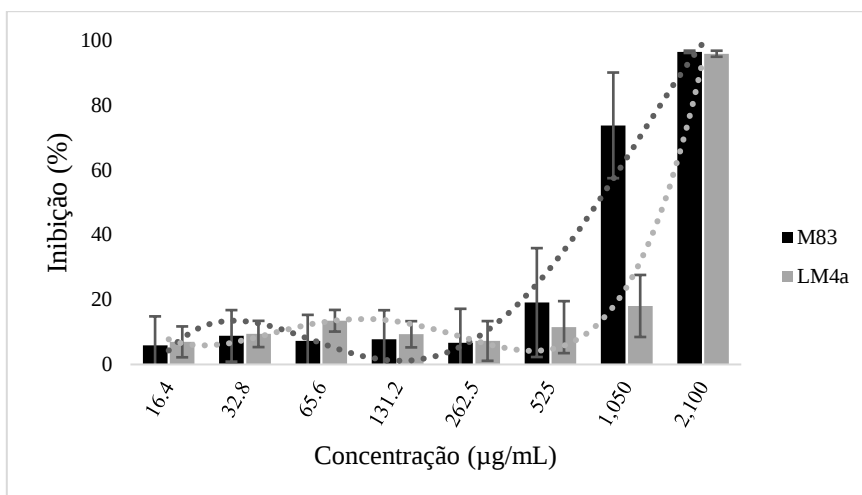
Fonte: Dados do trabalho

Figura 13 - Gráfico da inibição (%) por concentração ($\mu\text{g/mL}$) do extrato LMA 1798 em relação às duas linhagens da bactéria *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (LM4a e M83) (CP = aprox. 90%).



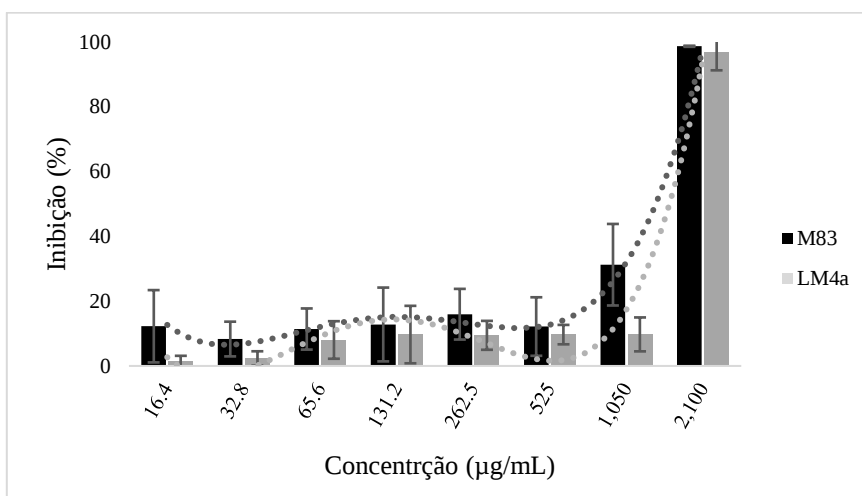
Fonte: Dados do trabalho

Figura 14 - Gráfico da inibição (%) por concentração ($\mu\text{g/mL}$) do extrato LMA 1719 em relação às duas linhagens da bactéria *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (LM4a e M83) (CP = aprox. 90%).



Fonte: Dados do trabalho

Figura 15 - Gráfico da inibição (%) por concentração ($\mu\text{g/mL}$) do extrato LMA 1602 em relação às duas linhagens da bactéria *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (LM4a e M83) (CP = aprox. 90%).



Fonte: Dados do trabalho

Todos os extratos, para ambas as linhagens, mostram inibições similares na maior concentração, os extratos LMA 1798 e LMA 1793 apresentaram inibição próxima a 90%, também em concentrações menores, para ambas as linhagens.

Para a linhagem LM4a não há uma relação dose resposta entre as concentrações dos extratos e a atividade inibitória. Já para a linhagem M83 é possível verificar que para todos os extratos há uma relação dose-resposta, ou seja, a atividade inibitória vai diminuindo na medida em que a

concentração do extrato diminui. Para os extratos LMA 1793 e LMA 1798 esta relação só é verificada a partir da concentração de 1050 µg/mL, sendo que para estes dois extratos há um decaimento de atividade menos acentuado conforme ocorre a diminuição da concentração.

5.3 Concentração Inibitória (IC 90) dos extratos

Com base nas equações obtidas da curva de regressão para cada extrato a partir dos dados de inibição via REMA, foi possível determinar a IC90 dos extratos bioativos contra as duas linhagens de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (Tabela 3).

Tabela 3 - IC90 dos extratos bioativos em relação às linhagens LM4a e M83 (em µg/mL)

	LMA4a	M83
Extratos	IC90	IC90
LMA 1793	1027	499
LMA 1798	288	252
LMA 1719	2061	1047
LMA 1602	1875	1705

Fonte: Dados do trabalho

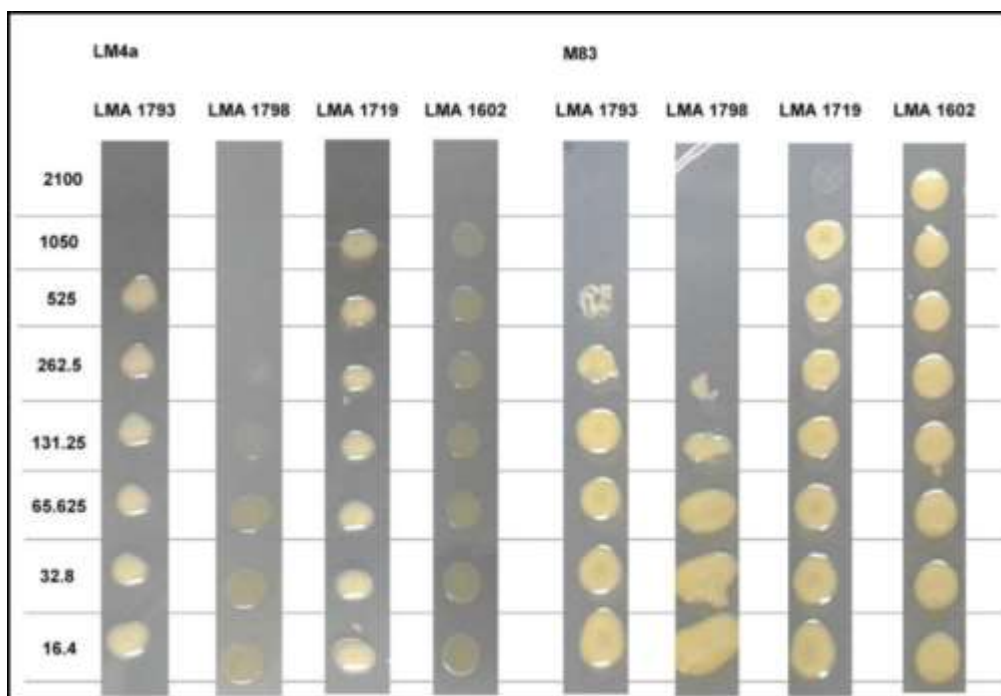
Os extratos LMA 1719 e LMA 1602 apresentaram valores de IC90 muito superiores em relação aos outros extratos. Dos extratos testados, o LMA 1798 apresentou o menor valor de IC 90 para ambas às linhagens propostas, seguido pelo extrato LMA 1793. Considerando-se que a composição e a proporcionalidade dos compostos presentes em um extrato bruto são desconhecidas, concentrações baixas obtidas podem ser um indicador de que uma ou mais substâncias bioativas, que quando isoladas, provavelmente apresentaram valores de IC90 ainda menores, o que é desejado para um composto antibacteriano.

Foi possível notar valores menores para linhagem M83 em todos os extratos testados, o que novamente indica uma maior suscetibilidade da bactéria aos compostos presentes nos extratos brutos.

5.4 Avaliação da Concentração Mínima Bactericida (CMB)

Os extratos considerados positivos foram testados quanto à sua atividade bactericida, sendo possível então determinar a mínima concentração na qual o extrato possui características bactericidas. Os resultados obtidos neste bioensaio para as duas linhagens podem ser observados na Figura 16.

Figura 16 - Concentração bactericida mínima de cada extrato bruto em relação às duas linhagens (LM4a e M83) e suas concentração (em $\mu\text{g/mL}$)



Fonte: Dados do trabalho

Os extratos dos fungos LMA 1719 e LMA 1602 mostraram-se, na concentração máxima testada de 2100 $\mu\text{g/mL}$, bactericidas para a linhagem LM4a e bacteriostáticos para a linhagem M83, o que é demonstrado pelo crescimento bacteriano no ponto de maior concentração de extrato, esta seletividade novamente evidencia a diferença entre as linhagens de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*.

Os extratos dos isolados LMA 1793 e LMA 1798 apresentaram características bactericidas para ambas as linhagens, sendo que para as duas linhagens a concentração mínima bactericida dos extratos LMA 1793 e LMA 1798 foram respectivamente de 1050 $\mu\text{g/mL}$ e 525 $\mu\text{g/mL}$.

De maneira geral, os extratos dos isolados LMA 1798 e LMA 1793 apresentaram os melhores resultados, com as menores concentrações inibitórias e menores concentrações mínimas bactericidas.

5.5 Identificação dos isolados promissores

Técnicas moleculares e análise morfológica, realizadas pela equipe da Prof.^a Derlene Attili de Angelis, foram utilizados para a identificação dos fungos considerados como positivos neste trabalho. Os isolados LMA 1793, LMA 1798, LMA 1719 e LMA 1602 foram identificados como

Chaetomium globosum, *Aspergillus* sp., *Fusarium oxysporum* e *Chaetomium* sp. (Fig. 17), respectivamente.

Figura 17 - A: *Chaetomium globosum* (LMA 1793); B: *Aspergillus* sp. (LMA 1798); C: *Fusarium oxysporum* (LMA 1719); D: *Chaetomium* sp. (LMA 1602).

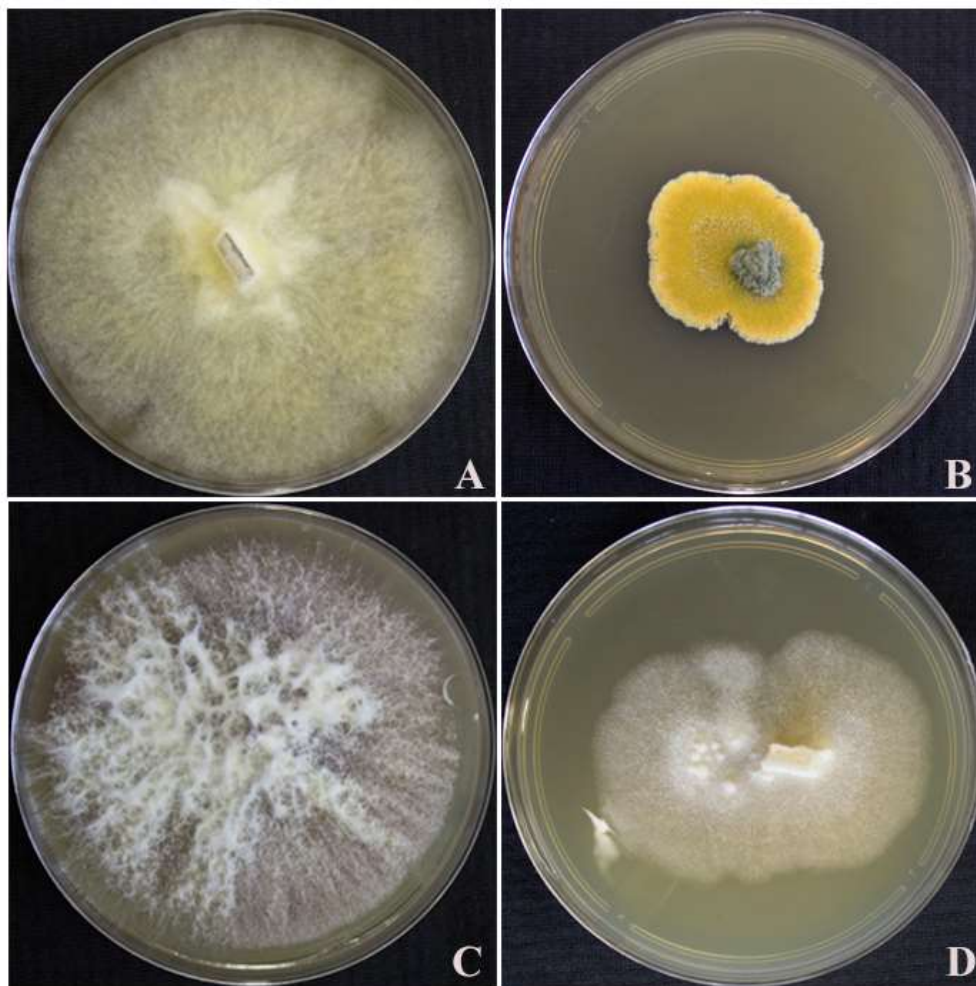


Foto: Acervo Pessoal

Dentre os extratos, o proveniente do fungo *Aspergillus* sp. (LMA 1798) apresentou resultados mais promissores, pois, apresentou a menor concentração necessária para a inibição de 90% do patógeno. A literatura sobre metabólitos com capacidade antibacteriana do gênero é amplamente conhecida, corroborando os dados obtidos neste trabalho (YANG et al. 2018; NIELSEN et al. 2009; BUSH & GOTH, 1943).

O isolado LMA 1719, membro da espécie *F. oxysporum*, é conhecido tanto por sua patogenicidade, inclusive como causador da fusariose em espécies de *Passiflora*, quanto pela

diversidade de metabólitos conhecidos (SOARES & MARINGONI, 2018; WASKIEWICZ et al. 2010; FISCHER & REZENDE, 2008; FRAVEL et al. 2002). É interessante ressaltar a mudança no papel de endófito para o de um patógeno. É possível que mudanças ambientais causaram uma alteração no equilíbrio da microbiota endofítica da planta, proporcionando o maior crescimento de uma ou mais espécies ocasionando sintomas.

Os isolados LMA 1602 e LMA 1793, identificados como *Chaetomium* sp. e *Chaetomium globosum*, pertencem à um gênero conhecido pela variedade de moléculas produzidas com grande diversidade de propriedades como antibacterianas, antifúngicas, imunomodulatórias, citotóxicas e antitumorais (LI et al. 2018; LI et al. 2008; PARANAGAMA et al. 2007; OH et al. 1998). Em particular, *C. globosum*, é comumente encontrado em solo ou associação com diversas espécies vegetais, tendo amplo destaque na literatura sobre os grupos químicos produzidos pelo seu metabolismo secundário (AWAD et al. 2018; YANG et al. 2018; RUAN et al. 2017; QIN et al. 2009).

A capacidade de biocontrole de *C. globosum* já foi atestada contra diversos fitopatógenos (CHANG & LIU, 2018; AWAD et al. 2014. PARK et al. 2009; DI PIETRO et al. 1992) no entanto, até o presente momento, não foram encontrados estudos relacionados a bactérias do gênero *Xanthomonas*.

5.6 Fracionamentos do extrato bioativo do isolado LMA 1793 (*Chaetomium globosum*)

Inicialmente, o extrato selecionado para o processo de fracionamento foi o extrato do isolado LMA1798, entretanto ao produzi-lo em maior quantidade este não mais apresentou atividade inibitória, dessa maneira, o extrato proveniente do isolado LMA 1793 (*Chaetomium globosum*), que também apresentou bons resultados nos bioensaios quanto à capacidade inibitória e bactericida, foi selecionado para o fracionamento.

O primeiro método de fracionamento, realizado na coluna de fase normal (Sílica Gel) apresentou pouca eficiência e pouca recuperação de massa, principalmente na fração com bioatividade. Isso pode estar relacionado à alta polaridade de determinados compostos, que pode favorecer a retenção destes na coluna cromatográfica.

Dessa maneira, foi produzido mais extrato bioativo e este foi submetido ao fracionamento utilizando uma coluna de fase reversa (HiPrep Octyl), conforme descrito em materiais e métodos. Ao todo foram coletados 246 microtubos com aproximadamente 500 µL que posteriormente foram

concentrados em 20 frações, no entanto apenas 5 frações apresentaram massa suficiente para a realização dos testes necessários.

As frações foram concentradas e submetidas ao ensaio antibacteriano. A Tabela 4 apresenta os valores de inibição do crescimento bacteriano para as frações obtidas no segundo método de fracionamento.

Tabela 4 - Inibição de crescimento celular bacteriano (%) por concentração ($\mu\text{g/mL}$) pelas 5 frações obtidas

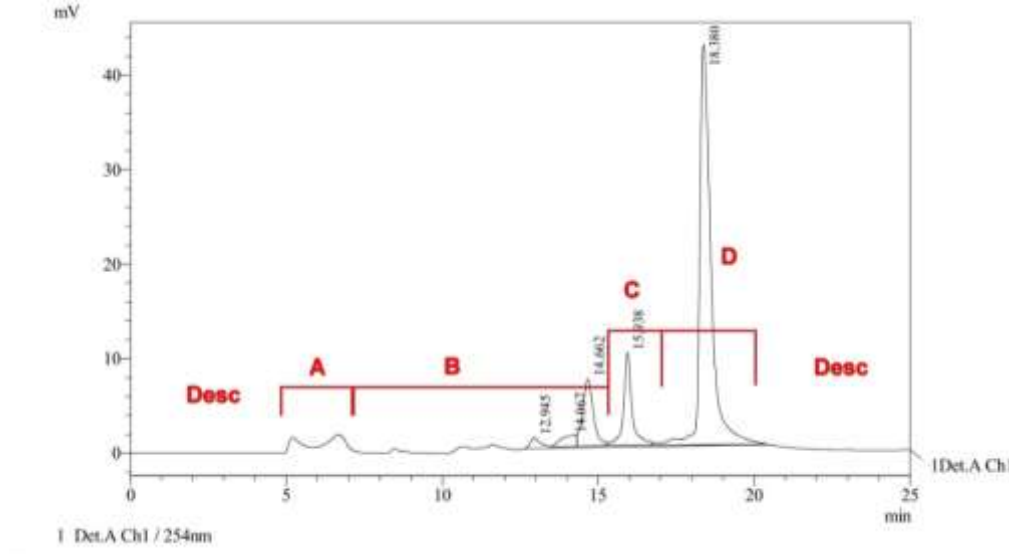
Concentração	Frações				
	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₂₀
2100	96.45099	94.91447	96.23366	96.68571	51.68309
1050	95.66426	95.45997	96.98345	97.53547	12.18545
525	96.46403	92.58251	93.96691	97.02257	10.56416
262.5	78.05832	93.92344	55.745	96.39014	9.184114
131.6	49.41633	77.14553	19.3943	81.99852	2.740266
65.6	40.34713	66.77886	23.86696	39.56691	0
32.8	37.19584	42.62475	4.381111	24.87755	0
16.4	31.44527	29.8479	0	34.4227	0

Fonte: Dados do Trabalho

As frações F₃, F₄, F₅ e F₆ apresentaram porcentagens de inibição de crescimento celular bacteriano acima de 90% e foram, portanto, submetidas à análise por CLAE.

As frações apresentaram cromatogramas similares e como a fração F₄ apresentou maior massa, aproximadamente 23,4 mg, ela foi selecionada para a coleta dos picos. A figura 18 apresenta o cromatograma obtido da amostra F₄ citada e a divisão realizada para a coleta dos picos.

Figura 18 - Cromatograma obtido através da análise por CLAE – Detector UV-VIS



Fonte: Dados do Trabalho

No cromatograma apresentado na Figura 18 os pontos delimitados, incluindo os pontos marcados com Desc (Descarte), foram coletados, concentrados e submetidos a uma nova análise por REMA. No entanto, nenhuma das amostras apresentou inibição, tanto testadas separadamente quanto concentradas em uma única amostra.

A fração F₄ (23,4 mg) utilizada para análise por CLAE foi novamente submetida a um novo fracionamento, utilizando agora uma coluna de Sílica Gel normal, seguindo o método descrito previamente (4.6.1).

Ao todo foram coletados aproximadamente 800 microtubos, concentrados em 23 frações. Estas foram submetidas novamente ao bioensaio a fim de averiguar suas inibições e das 23 amostras 10 apresentaram resultados positivos (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5 - Inibição do crescimento celular bacteriano (%) por concentração (µg/mL) pelas frações F₄, F₅, F₆, F₇ e F₈.

Concentração	Frações				
	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇	F ₈
2100	97.46187	97.90507	95.27206	97.72565	97.74846
1050	19.23669	60.26879	0	0	86.67779
525	0	0	0	0	0
262.5	0	0	0	0	0

Fonte: Dados do trabalho

Tabela 6 - Inibição do crescimento celular bacteriano (%) por concentração ($\mu\text{g/mL}$) pelas frações F₉, F₁₁, F₁₂ e F₂₁.

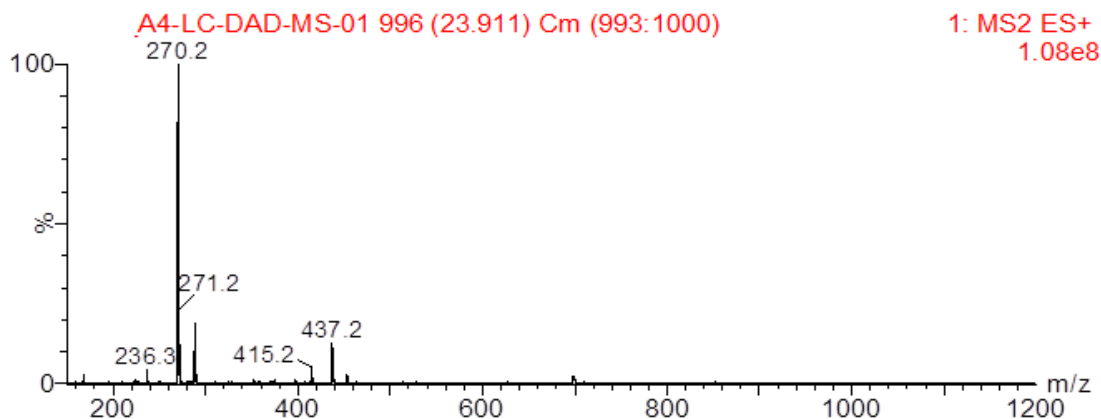
Concentração	Frações				
	F ₉	F ₁₁	F ₁₂	F ₁₃	F ₂₁
2100	97.62456	96.61197	96.53215	97.2636	91.67814
1050	97.72821	97.19451	3.918754	0	77.90088
525	47.79998	65.28576	0	0	72.34436
262.5	0	0	0	0	67.32045

Fonte: Dados do trabalho

A partir dos dados obtidos, as frações F₄, F₈ e F₉ foram selecionadas para análises de espectroscopia de massas por apresentarem cromatogramas mais limpos e massa suficientes.

Até o momento, a partir das análises dos espectros de massas foi possível identificar um provável composto conhecido na fração F₄. A Figura 19 apresenta o espectro de massas do composto com tempo de retenção de 23,91 min da fração F₄ (cromatograma da Figura 18).

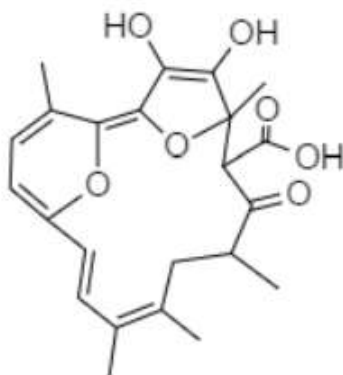
Figura 19 - Espectro de massas do composto com $t_r = 23,91$ min da fração F₄.



Fonte: Dados do trabalho

Os dados do espectro de massas do composto foram comparados com compostos na literatura e no banco de dados do Dicionário de Produtos Naturais (DPN, 2017). Um composto isolado de *C. globosum* foi identificado por comparação dos dados do espectro de massas, os dados do espectro são semelhantes aos obtidos para o composto Chaetoglobosina X (Figura 20) (Wang et al. 2012), no espectro de massas o m/z 437,2 refere-se ao íon molecular $[M+Na]^+$ e o m/z 415,2 ao íon molecular $[M+H]^+$.

Figura 20 - Estrutura química da Chaetoglobosina X



Fonte: Dados do trabalho

Este composto foi isolado por Wang e colaboradores (2012) a partir do fungo endofítico *C. globosum* L18 associado à planta medicinal *Curcuma wenyujin*. De acordo com a literatura a Chaetoglobosina X apresenta atividades citotóxicas e alta atividade antifúngica contra os fitopatógenos *Exserohilum turcicum*, *Fusarium oxysporium* f. sp. *cucumeris* e *Curvularia lunata* (Wang et al. 2012; Hani e Eman, 2015; Uzma et al. 2018).

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi possível atestar que fungos endofíticos isolados de *P. incarnata* L. apresentaram atividade antibacteriana contra a bactéria *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. Ademais, o fracionamento e análise do extrato bruto do fungo *Chaetomium globosum* (LMA 1793) indica a possível presença da substância Chaetoglobosina X, conhecida por sua atividade antifúngica.

Desta maneira, fica claro que organismos endofíticos são uma fonte para a descoberta de produtos naturais com diversas áreas de aplicação.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR L. A. *et al.* Efeito de formulações cúpricas e cuprorgânicas na severidade da mancha-bacteriana e na população resistance de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em pimentão. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 21, p. 44-50, 2003.

ALBERGONI L., PELAEZ V. Da Revolução Verde à agrobiotecnologia: ruptura ou continuidade de paradigmas? **Revista de Economia**, v. 33, n. 1, p. 31-53, 2007

ANDERSSON D. I., HUGHES D. Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. **Microbiology Reviews**, v. 35, p. 901-911, 2011.

ARAÚJO, A. J. *et al.* Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. **Ciências & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p.115-130, 2007.

AWAD, N.E. *et al.* Hepatoprotective evaluation and isolation of the major secondary metabolites from the ethyl acetate extract of liquid culture filtrate of **Chaetomium globosum**. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. v. 97, p. 174-180, 2018.

AWAD, N.E. *et al.* Bioassays guided isolation of compounds from *Chaetomium globosum*. **Journal of Mycologie Médicale**. v. 24, n. 2, p. 35-42, 2014.

BACON C. W., WHITE Jr. **Microbial Endophytes**, New York and Basel, 2000.

BERNACCI, L.C., VITTA, F.A., BAKKER, Y.V. Passifloraceae. *In*: WANDERLEY, M. das G.L et al. **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: FAPESP: RiMa. v. 3, p. 247-274, 2003.

BETIM, F. **A operação para afrouxar ainda mais a lei de agrotóxicos no Brasil, na contramão do mundo.** El país. 2018. Disponível em: brasil.elpais.com/brasil/2018/06/26/politica/1530040030_454748.html. Acessado em 3 de julho de 2018.

BOMBARDI L. **Geografia do uso agrotóxicos no Brasil e conexões com a União Européia**. 2017. São Paulo, FFLCH – USP.

BRASIL. **Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015.** Programa de Análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA). Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2016. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acessado em setembro de 2018.

BUSH, M. T., GOTH, A. Flavicin: an antibacterial substance produced by an *Aspergillus flavus*. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 78, n. 2, p. 164 – 169, 1943.

CANUTO K. M. *et al.* **Fungos endofíticos: perspectiva de descoberta e aplicação de compostos bioativos na agricultura.** Embrapa Agroindústria Tropical, Documentos 154, 2012.

CARNEIRO F. F. *et al.* **Dossiê ABRASCO: Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde.** 2015. Rio de Janeiro / São Paulo. Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio.

CARVALHO F. P. Agriculture, pesticides, food security and food safety. **Environmental Science & Policy**, v. 9, p. 685-692, 2006.

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

CERDA R. *et al.* Primary and secondary losses caused by assessment and modelling in coffee. **PLoS One**, v. 12, n. 1, 2017.

CERVI, A.C; MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A; BERNACCI, L.C. Passifloraceae. *In: Lista de espécies da flora do Brasil.* Rio de Janeiro: Jardim Botânico, 2010. Disponível em: floradobrasil.jbrj.gov.br. Acesso em: junho de 2018.

CHANG Z., LIU C. Identification of the biocontrol strain LB-2 and determination of its antifungal effects on plant pathogenic fungi. **Journal of Plant Pathology**. 2018.

CHRISTINA A., CHRISTAPHER V., BHORE S. J. Endophytic bacteria as a source of novel antibiotics: An overview. **Pharmacogn. Rev.**, v. 7, n 13, p. 11-16, 2013.

CLAY J. Freeze the footprint of food. **Nature**, v. 475, p. 287-289, 2011.

COELHO E. M., AZÊVEDO L. C., UMSZA-GUEZ M. A. Fruto do maracujá: importância econômica e industrial, produção subprodutos e prospecção tecnológica. **Cad. Prospec.**, v. 9, n. 3, p. 347-361, 2016.

- COHEN, J. E. Human population grows up. **Scientific American**, v. 293, n. 3, p. 48-55, 2005.
- CÓRDOVA K. R. V. *et al.* Características físico-químicas da casaca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Flavicarpa Degener) obtida por secagem. **B. Ceppa**, v. 23, n. 2, p. 221-230, 2005.
- CRIST E., MORA C., ENGELMAN R. The Interaction of human population, food production, and biodiversity protection. **Science**, v. 356, n. 6335, 2017.
- DAYAN F.E., CANTRELL C.L., DUKE S.O. Natural products in crop protection. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 17, p. 4022-4034, 2009.
- DE OLIVEIRA A.G. *et al.* Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. **Biological Control**. v. 56, p. 125-131, 2011.
- DHAWAN K., DHAWAN S., SHARMA A. *Passiflora*: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 1-23, 2004.
- DHAWAN K., KUMAR S., SHARMA A. Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* Linneaus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 165-170, 2001.
- DI PIETRO A. Role of antibiotics produced by *Chaetomium globosum* in biocontrol of *Phythium ultimum*, a causal agent of Damping-off. **Physiology and Biochemistry**. v. 82, p. 131-135, 1992.
- DOIDGE E. M. A Tomato Canker. **Annals of Applied Biology**, v. 7, p. 407-430, 1921.
- ECONOMOU V., GOUSA P. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. **Infection and drug Resistance**, v. 8, p. 59-61, 2015.
- EMBRAPA. **Soluções Tecnológicas e Inovação**. 2015. Embrapa, Brasília.
- EMBRAPA. Mandioca e Fruticultura. **Base de dados dos Produtos. Produção Brasileira de maracujá em 2017**. 2017. Disponível em: http://www.cnpmf.embrapa.br/Base_de_Dados/index_pdf/index_pdf.htm. Acessado em março de 2019.
- FALEIRO F. G. *et al.* Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro – histórico e perspectivas. **Planaltina: Embrapa cerrados**, Documentos 307, 2011.

FAO, Food and Agriculture Organization, United Nations. **International Code of Conduct on Pesticide Management: Guidelines on Pesticide Legislation**. 2015. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i5008e.pdf>. Consultado em setembro de 2018

FAO, Food and Agriculture Organization, United Nations. **Food Outlook: Biannual Report on Global Food Markets**. Disponível em: <http://www.fao.org/3/CA0239EN/ca0239en.pdf>. Consultado em março de 2019.

FAO, Food and Agriculture Organization, United Nations. **Plant Health and Food Security**. 2017. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i7829e.pdf>. Consultado em setembro de 2018.

FEHER M., SCHMIDT J. M; Property Distributions: Differences between Drugs, Natural Products, and molecules from Combinatorial Chemistry. **J. Chem. Inf. Comput. Sci.**, v. 43, p. 218-227, 2003.

FERNANDES G. *et al.* Indiscriminate use of glyphosate impregnates river epilithic biofilms in southern Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 651, p. 1377-1387, 2019.

FERREIRA R. T. *et al.* Seleção recorrente intrapopulacional em maracujazeiro-azedo via modelos mistos. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 38, p. 158-166, 2016.

FISHCER I. V., REZENDE J. A. M. Diseases of Passion Flower (*Passiflora* spp.). **Pest Technology**, v. 2 (1), p. 1-19, 2008.

FÖLDES T. *et al.* Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and *in vitro* screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage micro-organisms. **J. of Appl. Microbiol.**, v. 89, p. 840-846, 2000.

FOUDA A. H. *et al.* Biotechnological applications of fungal endophytes (Bioss.). **Annals of Agriculture Science**, 2015.

FRANCO M. M., TAKATSU A. Sensibilidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* a cobre. **Biosci. J.**, v. 20, n. 2, p. 207-210, 2004.

FRAVEL D., OLIVAIN C., ALABOUVETTE C. Research Review: *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. **New Phytologist**, v. 157. p. 493 – 502, 2003.

- FREITAS J. P. X. *et al.* Avaliação de recursos genéticos de maracujazeiro-amarelo. **Pesq. agropec. bras.**, v. 46, p. 1013-1020, 2011.
- GILDEN R. C., HUFFLING K., SATTTLER B. Pesticides and Health Risks. **JOGNN**, v. 39, p. 103-110, 2010.
- GONÇALVES E. R., ROSATO Y. B. Genotypic characterization of xanthomonad strains isolated from passion fruit plants (*Passiflora* spp.) and their relatedness to different *Xanthomonas* species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 811-821, 2000.
- GOUDA S. *et al.* Endophytes: a treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.
- GOTTWALD T. R., GRAHAM J. H., SCHUBERT T. S. Citrus canker: the pathogen and its impact. **Plant Management Network**, 2012.
- GRAVILESCU M. Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. **Eng. Life Sci.**, v. 5, n. 6, p. 497-526, 2005.
- GUO B. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 136-142, 2008.
- HANI M., EMAN H. Anticancer compounds from *Chaetomium globosum*. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, v. 4, n. 2, 2015.
- HAYO M. G., WELF, V. D. Assessing the impact of pesticides on the environment. **Agriculture Ecosystems & Environment**, v. 60, p. 81-96, 1996.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal, Culturas Temporárias e Permanentes. 2016.** Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2016/>. Consultado em setembro de 2018.
- ISHIDA A. K. N., HALFELD-VIEIRA B.A; Mancha-Bacteriana do Maracujazeiro (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*): Etiologia e Estratégias de Controle. **Belém: Embrapa Amazônia Oriental**, Documentos 357, 2009.

ISHIDA A. K. N., PROTAZIO D. C., OLIVEIRA L. C. Preservação de isolados *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em água destilada esterilizada. **Belém: Embrapa Amazônia Oriental**, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 121, 2017.

JONES, J. B. *et al.* Systematic analysis of xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 1211-1219, 2000.

KARAM D. Agrotóxicos. **Embrapa Milho e Sorgo**, 2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1007543/agrotoxicos>. Acessado em setembro de 2018.

KEW. **State of the World's Plants**. 2017. Royal Botanical Gardens. Disponível em: https://stateoftheworldsplants.org/2017/report/SOTWP_2017.pdf. Acessado em setembro 2008.

KIM, M. *et al.* Role identification of *Passiflora incarnata* Linnaeus: a mini-review. **Journal of Menopausal Medicine**, v. 23, p. 156-159, 2017.

KRINGS M. Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution and host responses. **New Phytologist**, v. 174, p. 648-657, 2007.

KUMAR V. *et al.* Endophytic Fungi: Recent Advances in Identification and Explorations. In: SINGH, B. P. **Advances in Endophytic Fungal Research, Fungal Biology**, Switzerland, Springer Nature, 2019.

KUSARI S., HERTWECK C., SPITELLER M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chemistry & Biology**, v. 19, p. 792-798, 2012.

KUSH, G. S. Green revolution: the way forward. **Nature Reviews: Genetics**, v. 2, p. 815-822, 2001.

KYEON, M. S. *et al.* *Xanthomonas euvesicatoria* causes bacterial spot disease on pepper plant in Korea. **The Plant Pathology Journal**, v. 32, n. 5, p. 431-440, 2016.

LI, G. *et al.* Secondary metabolites from the fungus *Chaetomium brasiliense*. **Helvetica Chimica Acta**, 91, 124-129, 2008.

LI, H. *et al.* Polyketides from two *Chaetomium* species and their biological functions. **The Journal of Antibiotics**, 2018.

LIBERATO, J. R., LARANJEIRA F. F. **Fusarium wilt of Passionfruit (*Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*)**. 2005. Disponível em: <http://www.padil.gov.au>. Acessado em fevereiro de 2019

LIM C. *et al.* Identification, fermentation, and bioactivity against *Xanthomonas oryzae* of antimicrobial metabolites isolated from *Phomopsis longicolla* S1B4. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 494-500, 2010.

LIRA A. **Cultivo de maracujá doce pode gerar mais renda dentro da agricultura familiar**. Embrapa. 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/33562532/cultivo-de-maracuja-doce-pode-gerar-mais-renda-dentro-da-agricultura-familiar>. Acessado em dezembro de 2018.

LOPES C. A. É possível produzir alimentos para o Brasil sem agrotóxicos? **Ciência e Agricultura**, p. 52-55, 2017.

LORENZI H. E; MATOS F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil/ Nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 512 p., 2002.

MARCHART E., KRENN L., KOOP B. Quantification of the flavonoid glycoside in *Passiflora incarnata* by capillary eletroforesis. **Planta Medica**, v. 69, p. 452-456, 2003.

MERCADO-BLANCO J. *et al.* Suppresion of Verticillium wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. **Biological Control**, v. 30, p. 474-486, 2004.

MERCADO-BLANC J., LUGTENBERG B. J. J. Biotechnological applications of bacterial endophyte. **Current Biotechnology**, v. 3, p. 60-75, 2014.

MELETTI L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. especial, p. 83- 91, 2011.

MEW T. W., NATURAL M. P. Management of *Xanthomonas* diseases. **Xanthomonas**, p. 341-362, 1993.

MIRODDI M. *et al.* *Passiflora incarnata* L.: ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinical trials. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, p. 791-804, 2013.

- MONDAINI I., KINPARA D. I. Avaliação Financeira de Produção de Maracujá. **Embrapa Cerrados**, Documento 97, 2003.
- MORAES M. C., VIEIRA M. L. C., NOVAES Q. S., REZENDE J. A. M. Susceptibilidade de *Passiflora nítida* ao *Passion fruit woodiness vírus*. **Fitopatol. Bras.**, v. 27, n. 1, 2002.
- MUNHOZ C. F. *et al.* Analysis of plant gene expression during passion fruit–*Xanthomonas axonopodis* interaction implicates lipoxygenase 2 in host defence. **Ann. Appl. Biol.**, v. 167, p. 135-155, 2015.
- MURATE L. S. *et al.* Activity of secondary bacterial metabolites in the control of Citrus Canker. **Agricultural Sciences**, v. 6, p. 295-303, 2015.
- NAKATANI A. K., LOPES R., CAMARGO L. E. A. Variabilidade genética de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. **Summa Phytopathol**, v. 35, n. 2, p. 116-120, 2009.
- NIELSEN K. F. *et al.* Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, p. 1225-1242, 2009.
- NUNES, T. S., QUEIROZ, L. P. Flora da Bahia: Passifloraceae. **Sitientibus: Série Ciências Biológicas**, v. 6, p. 194-226, 2006.
- OERKE E. C. Crop losses to pests. **Journal of Agricultural Science**, v. 144, p. 31-43, 2006.
- OH, H. *et al.* Chaetochalasin A: a new bioactive metabolite from *Chaetomium brasiliense*. **Tetrahedron Letters**, v. 39, p. 7633-7636, 1998.
- PARANAGAMA, P. A., WIJERATNE, E. M. K., GUNATILAKA, A. A. L. Uncovering biosynthetic potential of plant-associated fungi: effect of culture conditions on metabolite production by *Paraphaeosphaeria quadrisepata* and *Chaetomium chiversii*. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 1939-1945, 2007.
- PARK J. H. *et al.* Antifungal activity against plant pathogenic fungi of chaetoviridins isolated from *Chaetomium globosum*. **FEMS Microbiology letters**, v. 252, p. 309-313, 2009.
- PARK Y. J. *et al.* Diversity of fungal endophytes in various tissues of *Panax ginseng* Meyer cultivated in Korea. **Journal of Ginseng Research**, v. 36, n. 2, p. 211-217, 2012.

- PATIL A. S. Exploring *Passiflora incarnata* (L.): A medicinal plants secondary metabolites as antibacterial agent. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 14, p. 1496-1501, 2010.
- PELAEZ V., TERRA F. H. B., SILVA L. R. A regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente. **Revista de Economia**, v. 36, n. 1, p. 27-48, 2010.
- PELAEZ V. M. *et al.* A (des)coordenação de políticas para a indústria de agrotóxicos no Brasil. **Rev. Bras. Inov.** v. 14, p. 153-178, 2015.
- PIMENTEL D. Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. **Environment, Development and Sustainability**, v. 7, p. 229-252, 2005.
- PRADA, P. **Why Brazil has a big appetite for risky pesticides**. Fateful Harvest, Reuters, 2015. Disponível em: <https://www.reuters.com/investigates/special-report/brazil-pesticides/>. Acessado em 6 de março de 2019
- PÚRIC J. *et al.* Activity of Antarctic fungi extracts against phytopathogenic bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, p. 530-536, 2018.
- QIN J. C. Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus isolated from *Ginkgo biloba*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 1572-1574, 2009.
- QIU M. *et al.* Isolation and identification of two flavonoid-producing endophytic fungi from *Ginkgo biloba* L. **Annals of Microbiology**, v. 60, p. 143-150, 2010.
- REDECKER D., KODNER, R., GRAHAM L. E. Glomalean fungi from the Ordovician. **Science**, v. 289, p. 1920-1921, 2000.
- RIGOTTO R. M., VASCONCELOS D. P., ROCHA M. M. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. **Caderno de Saúde Pública**, v. 30, n. 7, p. 1-3, 2014.
- RODRIGUEZ-R L. M. *et al.* Genomes-based phylogeny of the genus *Xanthomonas*. **BMC Microbiology**, v. 12, 2012.
- RUAN B. H. *et al.* New bioactive compounds from aquatic endophyte *Chaetomium globosum*. **Natural products research**, 2017.

RYAN R. P. *et al.* Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 278, p. 1-9, 2008.

RYAN R. P. *et al.* Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 344-355, 2011.

SAHA, P. *et al.* Bioprospecting for Fungal-Endophyte-Derived Natural Products for Drug Discovery. In: SINGH, B. P., **Advances in Endophytic Fungal Research, Fungal Biology**, Switzerland, Springer Nature, 2019.

SANCHES A. L. R. *et al.* Análise econômica da prevenção e controle do cancro cítrico no estado de São Paulo. **RESR**, v. 52, n. 3, p. 549-566, 2014.

SAVI D. C., ALUIZIO R., GLIENKE C. Brazilian Plants: an unexplored source of endophytes as producers of active metabolites. **Planta Med**, 2019.

SEETHARAMAN P. *et al.* Isolation and characterization of anticancer flavone chrysin (5,7-dihydroxy flavone)- producing endophytic fungi from *Passiflora incarnata* L. leaves. **Ann. Microbiol.**, v. 67, p. 321-331, 2017.

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

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.

SOARES, R. M., MARINGONI, A. C. Eficácia de *Fusarium* spp. no controle da murcha-de-curtobacterium do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v.44 n. 1, p. 79–82, 2018.

SPAGO F. R. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* produces secondary metabolites that have biological activity against plant pathogenic *Xanthomonas* species. **Crop Protection**, v. 62, p. 46-54, 2014.

STANIEK A., WOERDENBAG H. J., KAYSER O. Endophytes: exploiting biodiversity for the improvement of natural product-based drug discovery. **Journal of Plant Interactions**, v. 3, p. 75-93, 2008.

- STIERLE A., STROBEL G., STIERLE D. Taxol and Taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus from pacific yew. **Science**, v. 260, p. 214-216, 1993.
- STRANGE R. N., SCOTT P. R. Plant Disease: a threat to global food security. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 43, n. 3, p. 3.1-3.34, 2005.
- STROBEL G. A. *et al.* Volatile antimicrobials from *Muscodor albus* a novel endophytic fungus. **Microbiology**, v. 147, p. 2943-2940, 2001.
- STROBEL G. A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 315-333, 2002.
- STROBEL G., DAISY B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 67, n.4, p. 491-502, 2003.
- STUKENBROCK E. H., McDONALD B. A. The origins of plant pathogens in agro-ecosystems. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 46, p. 75-100, 2008.
- TORDIN C. **Tecnologia reduz quantidade de agrotóxicos**. Embrapa Meio Ambiente, 2015. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/2607554/tecnologia-reduz-quantidade-de-agrotoxicos>. Acessado em setembro de 2018.
- TORDIN C. **Bacteriose do maracujá é combatida com microrganismos da própria planta**. Agroecologia e produção orgânica. EMBRAPA, 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/13777025/bacteriose-do-maracuja-ecombatida-com-microrganismos-da-propria-planta>. Acessado em: junho de 2018.
- TORRES-FILHO J. Doenças do maracujá (*Passiflora edulis f.flavicarpa*) na região da Ibiapaba, Ceará, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 10, p. 223. 1985.
- UZMA F. *et al.* Endophytic fungi – alternative sources of cytotoxic compounds: a review. **Frontier in Pharmacology**, v. 9, 2018.
- VASCONCELOS Y. **Agrotóxicos na berlinda**. 2018. Disponível em: <http://revistapesquisa.fapesp.br/2018/09/18/agrotoxicos-na-berlinda>. Acessado em setembro de 2018.

VAUTERIN L. *et al.* Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, p. 472-489, 1995.

VAUTERIN L., RADEMAKER J., SWINGS J. Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 90, p. 677-682, 2000.

VAZ A. B. M., FONTENLA S., ROCHA F. S. Fungal endophyte β -diversity associated with Myrtaceae species in an Andean Patagonian forest (Argentina) and an Atlantic forest (Brazil). **Fungal ecology**, v. 8, p. 28-36, 2014.

VENUGOPALAN A., SRIVASTAVA S. Endophytes as *in vitro* production platforms of high values plant secondary metabolites. **Biotechnology advances**, 2015.

VERA K., RAIF A., IKHTIARI, R. Antioxidant and anti-elastase activity of seed and peel extract of *P. edulis*. **American Scientific Research Journal for Engineering, Technology and Sciences**, v. 53, n. 1, p. 43-48, 2019.

VIANA A. P. *et al.* UENF Rio Dourado: a new passion fruit cultivar with high yield potential. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.16, p. 250-253, 2016.

VIANA F. M. P. *et al.* Principais doenças do maracujazeiro na região Nordeste e seu controle. **Embrapa Agroindústria Tropical**, Comunicado Técnico 86, 2003.

VIEIRA G. *et al.* Terrestrial and marine Antarctic fungi extracts active against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 67, p. 64-71, 2018.

VUOLO M. M. *et al.* *Passiflora edulis* Peel Flour and Health Effects. In: PREEDY V. R. & WATSON R. R., **Flour and Breads and their Fortification in Health and Diseases Prevention**, Academic Press, 2019.

WANG Y. *et al.* Bioactive metabolites from *Chaetomium globosum* L18, an endophytic fungus in the medicinal plant *Curcuma wenyujin*. **Phytomedicine**, v. 19, p. 364-368, 2012.

WASKIEWICZ A. *et al.* Formation of fumosins and other secondary metabolites by *Fusarium oxysporum* and *F. proliferatum*: a comparative study. **Food and Additives and Contaminants**, v. 27, n. 5, p. 608-615, 2010.

YANG M. H. *et al.* Aureochaeglobosins A-C, three [4 + 2] adducts of Chaetoglobosin and Aurenitol Derivatives from *Chaetomium globosum*. **Organic letters**, v. 20, p. 3345- 3348, 2018.

YANG, S. *et al.* Antibacterial anthraquinone derivatives isolated from a mangrove derived endophytic fungus *Aspergillus nidulans* by ethanol stress strategy. **The Journal of Antibiotics**, 2018.

YÉSQUEN L. G. C. **Comunidade bacteriana endofítica cultivável de *Passiflora incarnata* e seu potencial na promoção de crescimento vegetal**. 2018. Dissertação de Mestrado em Genética e Biologia Molecular. Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas.

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

ZUCARELI V., HENRIQUE L. A. V., ONO E. O. Influence of light and temperature on the germination of *Passiflora incarnata* L. seeds. **Journal of seed science**, v. 37, n. 2, p. 162-167, 2015.