
Ciências Biológicas

VICTOR GUSTAVO NARDO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DE
FUNGOS DA ANTARTICA CONTRA
*XANTHOMONAS***



Rio Claro
2019

VICTOR GUSTAVO NARDO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DE
FUNGOS DA ANTARTICA CONTRA *XANTHOMONAS*

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

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências - Campus de Rio Claro, da
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita
Filho, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Rio Claro

2019

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a minha família, a meus pais que permitiram que eu esteja me graduando, sem eles meu sonho não seria possível, sempre me dando total suporte financeiro e emocional em todas as fases da minha formação, muito obrigado por tudo Francisca e Edmilson, vocês sempre me mostraram a sorte e a benção grande de ter nascido nessa família, não tenho palavras para descrever o quanto amo vocês.

Agradeço também a Deus, que sempre esteve me guiando e me dando suporte por essa jornada que é a vida. Obrigado por todas as bênçãos e proteções.

Aos amigos de graduação que levarei para a vida, muito obrigado por todos os momentos de suporte, companheirismo, risadas trocadas, e segredos divididos, tenho muito a agradecer por me ajudarem a crescer e me tornar uma pessoa melhor do que era ontem, obrigado Ana, Rubens, Pedro, Felipe, Nilson, Arthur.

Não teria como não te agradecer amor, Beatriz Lemes, você entrou na minha vida tem um pouco mais de um ano, mas conseguiu mudar totalmente ela, você me inspira diariamente a ser melhor, a aprender mais, a buscar mais, a repensar coisas, você esteve me ajudando e acreditando em mim quando nem eu mesmo acreditava, me apoiou em dias que nem eu mesmo podia me apoiar, obrigado por todo o seu amor dedicado a mim.

Ao meu finado avô Joel, que me acompanhou no início da minha graduação, e que sonhava em me ver formado, obrigado por tudo que o senhor fez por mim. A minha finada vó Thereza, que sempre me amou incondicionalmente, e foi umas das inspirações para eu fazer Biologia, e minha finada Tia avó Nanci, que sempre me tratou como um filho, não tem um dia em que eu não sinta saudade de vocês, obrigado por todas as orações que faziam diariamente pedindo saúde e bênçãos para mim, creio que um dia nos reencontraremos.

Aos meus primos Gabriel, Luana, Giovanna, Augusto que são como irmãos para mim, vocês sempre estiveram e creio que sempre estarão ao meu lado me ajudando em tudo, sempre me movendo de saudade de vocês e é tão bom ver vocês crescerem e se tornando pessoas incríveis.

Aos amigos de vida Guilherme, Junior, que também passaram pelo árduo caminho da graduação, sem vocês teria sido bem mais difícil.

A minha Co orientadora Mariana, muito obrigado por ter me ensinado tanto coisa sobre microbiologia, por ter tido paciência, e vontade de passar seus conhecimentos, obrigado pelas conversas e pela amizade também.

Á Professora Doutora Daiane Cristina Sass por todo o suporte, atenção e paciência tanto para conseguir uma bolsa pra mim, quanto para me orientar com minha pesquisa.

RESUMO

As bactérias do gênero *Xanthomonas* afetam culturas agrícolas de grande importância econômica no Brasil, sendo que o controle destas doenças realizado pela utilização de produtos químicos, entre outras práticas causam impactos negativos na saúde e ao meio ambiente, o que torna a busca de alternativas sustentáveis de combate a estas doenças cada vez mais importante. Uma possível alternativa aos produtos químicos que tem despertado grande interesse é a aplicação de metabólitos secundários. Acredita-se que fungos que vivem em ambientes extremos como a Antártica podem produzir metabólitos secundários ainda desconhecidos. Esse projeto teve como objetivo principal investigar a potencial atividade de metabólitos secundários produzidos por fungos isolados do solo e de sedimentos marinhos do recuo da geleira Collins na Antártica contra três espécies de *Xanthomonas* economicamente importantes para a agricultura do país. Para tanto, foi utilizado 17 fungos coletados em solo e em sedimentos marinhos em duas expedições na Antártica (2013 e 2015) no âmbito do INCT Criosfera, que estão preservados junto à Central de Recursos Microbianos da UNESP. Após a produção dos extratos brutos pelos fungos estes foram submetidos a bioensaios antibacterianos a fim de avaliar a atividade antibacteriana destes extratos contra *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae*; *Xanthomonas citri* subsp. *citri*; *Xanthomonas euvesicatoria* patogênicas das culturas de maracujá, frutas cítricas e tomate, respectivamente. Três extratos apresentaram potencial atividade antibacteriana contra as três *Xanthomonas*, e um extrato apresentou resultado promissor apenas contra a *X. euvesicatoria*.

Palavras-chave: *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*; *Xanthomonas citri* subsp. *citri*; *Xanthomonas euvesicatoria*; Fungos da Antártica.

ABSTRACT

Bacteria of the genus *Xanthomonas* affect the cultures of great economic importance in Brazil, and the control of these diseases by the use of chemical products, among others practices cause negative impacts on health and the environment, which makes the search for sustainable alternatives of combating these diseases increasingly important. A possible alternative to the chemicals that have aroused great interest is the application of secondary metabolites. It is believed that fungi living in extreme environments such as Antarctica can produce secondary metabolites as yet unknown. This Project aims to investigate the potential activity of secondary metabolites produced by fungi isolated from the soil and marine sediments from the retreat of the Collins glacier in Antarctica against three economically important species of *Xanthomonas* for the country's agriculture. For this purpose, 17 fungi collected in soil and marine sediments were used in two expeditions in Antarctica (2013 and 2015), which are preserved at the Microbial Resources Center of UNESP. After the production of the crude extracts by the fungi, they were submitted to antibacterial bioassays in order to evaluate the antibacterial activity of these extracts against *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*; *Xanthomonas citri* subsp. *citri*; *Xanthomonas euvesicatoria* pathogenic effects of passion fruit, citrus fruits and tomato, respectively. Three extracts presented potential antibacterial activity against the three *Xanthomonas*, and one extract presented promising results only against *X. euvesicatoria*.

Keywords: *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*; *Xanthomonas citri* subsp. *citri*; *Xanthomonas euvesicatoria*; Antarctica Fungi.

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO.....	7
1.1	Compostos Antimicrobianos.....	7
1.2	Bactérias <i>Xanthomonas</i>	8
2	OBJETIVOS.....	13
2.1	Objetivo Geral.....	13
2.2	Objetivos Específicos	13
3	METODOLOGIA.....	13
3.1	Fungos.....	13
3.2	Obtenção de Extratos Brutos	14
3.2.1	Condições de Cultura para Fermentação em Shaker	14
3.2.2	Processamento, Extração e Armazenamento do Extrato Bruto	14
3.3	Avaliação da atividade contra bactérias fitopatogênicas e determinação da concentração inibitória mínima (MIC).	14
3.4	Avaliação da atividade bactericida e determinação da Concentração Mínima Bactericida (MBC) dos extratos bioativos.	17
3.5		17
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1	Produção dos extratos	17
4.2	<i>Screening</i> para avaliação de atividade antibacteriana dos extratos brutos	18
4.3	Reavaliação da atividade inibitória dos extratos brutos considerados positivos.	24
4.4	Concentração Inibitória (MIC) dos extratos	27
4.5	Avaliação da atividade bactericida.	28
5	CONCLUSÃO.....	30
6	REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

1.1 Compostos Antimicrobianos

Desde a descoberta da penicilina, produtos naturais de fungos são considerados uma importante fonte para novos compostos antimicrobianos, devido à grande diversidade de espécies de fungos e as estruturas químicas altamente diversas de seus metabólitos secundários. As atividades antimicrobianas de um número crescente de fungos que vivem em ambientes distintos, tais como fungos endófitos de plantas selvagens, fungos da Antártica e fungos marinhos, estão sendo investigadas para a descoberta de novos compostos antimicrobianos (FURBINO et al., 2014; CHEUNG et al., 2014).

Os fungos possuem um metabolismo único, onde se produz subprodutos advindos destes metabolismos. A produção dessas moléculas orgânicas (metabólitos) pode ser dissociada ou associada (parcial ou totalmente) ao crescimento do microrganismo. Tais metabólitos podem ser classificados em primários ou secundários (EMERY et al., 2010). Enquanto os primários são relacionados ao crescimento e reprodução os secundários são relacionados às respostas ao stress e à competição encontrados no ambiente em que o microrganismo se encontra (KNIGHT et al., 2006).

Os fungos têm a capacidade de produzir metabólitos secundários com estruturas químicas altamente diversas (FEHÉR e SCHMIDT, 2003). As comunidades microbianas antárticas são temas de grande interesse por estarem sujeitas a longos períodos de isolamento com baixos níveis de perturbação (CLARKE, 2003; VINCENT, 2000). O conhecimento da sua diversidade fúngica e o potencial biotecnológico destes microrganismos são de extrema relevância e estratégico para o conhecimento da dinâmica dos ecossistemas antárticos e para a obtenção de compostos naturais de valor agregado (PIKUTA et al., 2007). Estudos recentes evidenciam o potencial de fungos do ambiente antártico em produzir metabólitos secundários bioativos (FURBINO et al., 2014; GONÇALVES et al., 2015; SVAHN et al., 2015; HENRÍQUEZ et al., 2014).

Em 2014 Henríquez e colaboradores isolaram 101 fungos diferentes associados a 11 amostras de esponjas coletadas na Ilha do Rei George na Antártica, destes 51% produziram extratos com atividade antibacteriana e 42% produziram extratos com atividade antitumoral significativa. (HENRÍQUEZ et al., 2014).

Em um estudo mais recente Gonçalves e colaboradores (GONÇALVES et al., 2015) identificaram cerca de 100 fungos isolados de diversos ambientes da Antártica, sendo que alguns destes fungos apresentaram atividade tripanossomicida, antifúngica, antibacteriana e

toxicidade moderada para células normais. Outro estudo realizado em 2015 por Svahn e colaboradores (SVAHN et al., 2015) mostrou que o fungo *Penicillium nalgiovense*, isolado de uma amostra de solo da Antártica produziu a anfotericina B, um antifúngico utilizado comercialmente com notável atividade contra *Candida albicans*.

O interesse pelo emprego de metabólitos bioativos produzidos por microrganismos em práticas agrícolas, como alternativa aos produtos químicos, vem aumentando significativamente nos últimos anos, tanto na promoção de crescimento vegetal como no controle de pragas e doenças de plantas, se constituindo em potenciais substitutos de produtos químicos e com nenhum ou mínimo impacto ambiental (PEIXOTO NETO et al. DAYAN et al., 2009).

Neste contexto, os metabólitos secundários tem despertado grande interesse como possíveis alternativas para o combate a diversas espécies de *Xanthomonas* (SPAGO et al., 2014; ENCHEVA-MALINOVA et al., 2014; SILBER, et al., 2013; LIM, et al., 2010; NEDIALKOVA, 2005; MONCHEVA et al., 2002), que são bactérias fitopatogênicas distribuídas mundialmente e que são responsáveis por doenças em diversas espécies vegetais economicamente importantes como: arroz, citros, mandioca, tomate, feijão, maracujá, cana-de-açúcar, banana (RYAN et al., 2011; RODRIGUEZ et al., 2012).

1.2 Bactérias *Xanthomonas*

As *Xanthomonas* (do grego, “xantus”= amarelo, “monas”=unidade) recebem este nome por produzirem um composto insolúvel em água, de cor amarelada, chamado xantomonadina (aril-polienos-brominado) (BRADBURY, 1994). São bactérias aeróbicas estritas, Gram negativas, possuidoras de um único flagelo e formato de bastonete (TESSMANN, 2002). A bactéria é disseminada naturalmente pelo vento ou chuva, podendo penetrar na planta por qualquer tipo de abertura natural (estômatos) ou ferimentos (Figura 1) (GOTTWALD et al., 2002).



Figura 1. Infecção de *Xac* pela abertura de estômatos da planta. Fonte: Plant management network, 2015

No Brasil muitas doenças causadas por bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas* afetam culturas de grande importância econômica e social tais como: citros, mandioca, tomate, feijão, maracujá, cana-de-açúcar (RYAN et al., 2011; RODRIGUEZ et al., 2012).

O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, é uma doença que ataca todas as espécies e variedades de citros de importância comercial (Figura 2). O Brasil por ser um dos principais produtores mundiais de laranja e por apresentar clima favorável para o desenvolvimento da bactéria sofre perdas econômicas significativas por causa do cancro cítrico, sendo considerado um dos principais problemas fitossanitários na cultura de citros no Brasil (SANCHES et al., 2014).



Figura 2. Cancro cítrico causado pela infecção de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Fonte: Florida Department of Agriculture and Consumer Services/Wikimedia Commons.

Xanthomonas citri subsp. *citri* é uma bactéria Gram-negativa, capaz de induzir sintomas em todas as espécies de Citrus, além de outros gêneros da família Rutaceae. As lesões causadas são circulares, corticosas, salientes, de coloração castanha e aspecto eruptivo (POLAQUINI et al., 2016). A doença é considerada uma “praga” quarentenária, ou seja, a não adoção de medidas

de exclusão/erradicação, caso esta bactéria seja detectada, impede o comércio de frutos cítricos, suco concentrado e seus derivados para países livres do patógeno, já que, o comércio destes produtos é regulamentado por legislação internacional (FUNDECITRUS, 2014).

A primeira ocorrência no Brasil foi em 1957, no município de Presidente Prudente, São Paulo. Medidas de exclusão e erradicação foram adotadas regionalmente já nesse mesmo ano e foi iniciada em São Paulo uma campanha de erradicação do cancro cítrico, que permanece em execução até os dias atuais (BELASQUE. J, BARBOSA, BERGAMIN. F, e MASSARI, 2011).

A bacteriose ou mancha oleosa, causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* é uma das doenças mais severas de ocorrência nos pomares de maracujá no Brasil (Figura 3) (MUNHOZ et al., 2015), a doença causa prejuízos econômicos significativos no país, visto que o Brasil se destaca como sendo um dos principais produtores de maracujá do mundo.



Figura 3. Bacteriose causada pela *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. Fonte: Embrapa 2009.

A mancha bacteriana, causada pela *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, se apresenta como um fato limitante para a cultura em várias regiões produtoras do Brasil, em virtude da forma severa com que ocorre sob condições de clima quente e úmido. Considerando-se que essa doença leva à redução da produtividade do maracujazeiro, é de fundamental importância que sejam realizadas pesquisas visando ao seu controle. (BRANCAGLIONE. P, FISCHER I. H, 2009).

A mancha bacteriana, causada por *Xanthomonas euvesicatoria* é uma das doenças mais importantes da cultura do tomate para o processamento industrial no Brasil (Figura 4) (MALAVOLTA JUNIOR, 2004). Esta doença tem causado grandes perdas no cultivo do tomate reduzindo a produtividade pela destruição de tecido foliar e pela derrubada de frutos em

formação, além de comprometer a qualidade e o valor comercial dos frutos (LOPES e QUEZADO-SOARES, 2000). Os sintomas da mancha bacteriana são lesões necróticas irregulares na parte aérea da planta. Em ataques severos, as lesões foliares podem coalescer e provocar amarelecimento e morte das folhas, dando um aspecto de queima das plantas, o que também expõe os frutos à escaldadura pelo sol (QUEZADO-DUVAL; LOPES, 2012).



Figura 4. Mancha bacteriana causada pela *Xanthomonas euvesicatoria*. Fonte: Embrapa 2008.

O controle destas infecções causadas por diversos patovares de *Xanthomonas* tem sido geralmente realizado por adição de produtos químicos à base de cobre, erradicação de plantas contaminadas e uso de variedades resistentes (SANCHES et al., 2014; LOPES e QUEZADO-SOARES, 2000; TEIXEIRA 1994). Porém, estas medidas têm sido ineficientes, devido à acumulação de material químico no ambiente, suscetibilidade de variedades supostamente resistentes e perdas de área plantada. Dessa maneira, muitos estudos tem se dedicado a encontrar alternativas mais eficientes e com menor impacto ambiental para o controle destas bactérias, como por exemplo, produtos naturais e micro-organismos antagônicos.

Em 2010 LIM e colaboradores isolaram cinco metabólitos secundários produzidos pelo fungo *Phomopsis longicolla* que apresentaram atividade contra a bactéria *Xanthomonas oryzae*, que causa a ferrugem bacteriana, uma doença potencialmente destrutiva do arroz, de acordo com os autores um dos metabólitos obtidos o deacetylphomoxanthone B apresentou efeito antibacteriano contra a *Xanthomonas oryzae* superior quando comparado com o controle positivo.

Estudos recentes relatados na literatura (MURATE, et al. 2015; SPAGO et al., 2014) mostraram que a bactéria *Pseudomonas* sp. produz metabólitos secundários com atividade significativa contra três espécies de *Xanthomonas*: *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*, *X. axonopodis* pv. *phaseoli* and *X. axonopodis* pv. *citri*, que atacam respectivamente as culturas de algodão, feijão, e frutas cítricas.

Um estudo realizado em 2011 (DE OLIVEIRA et al., 2011) mostrou que extratos metanólicos obtidos a partir da fermentação do fungo *Aspergillus niger* apresentaram significativa atividade contra as bactérias fitopatógenas: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, responsável pela podridão negra em couve e *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, responsável pelo cancro bacteriano da videira.

Estudos recentes de metabólitos secundários produzidos por micro-organismos do ambiente antártico demonstraram uma potencial atividade antibacteriana destes metabólitos contra algumas espécies de *Xanthomonas* (*X. campestris*, *X. axonopodis* pv. *glycines*, *X. vesicatoria*, *X. axonopodis* pv. *Phaseol*, *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria* e *X. gardneri*) (ENCHEVA et al., 2015; HENRÍQUEZ et al., 2014; SILBER, et al., 2013; NEDIALKOVA, 2005; MONCHEVA et al., 2002).

Um estudo de 2002 mostrou que actinobactérias isoladas do solo da antártica apresentaram atividade contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, *X. vesicatoria*, *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, causadoras respectivamente de doenças nas culturas de soja, tomate e feijão (MONCHEVA et al., 2002). Em 2014 HENRÍQUEZ e colaboradores mostraram a atividade de 22 fungos associados a amostras de esponjas coletadas na Antártica contra a bactéria *X. campestris* 833, a *X. campestris* é uma espécie de bactéria que causa uma variedade de doenças de plantas.

Estudos realizados por ENCHEVA e colaboradores em 2014 e 2015 mostraram a atividade de extratos brutos produzidos por microrganismos isolados do solo da Antártica contra as bactérias *Xanthomonas vesicatoria*, *Xanthomonas euvesicatoria* e *Xanthomonas gardneri*, causadoras da mancha bacteriana na pimenta (ENCHEVA et al., 2015; ENCHEVA et al., 2014).

Considerando a necessidade atual de novas alternativas no controle a espécies de *Xanthomonas*, que visam substituir os produtos químicos ao mesmo tempo minimizar danos ao meio ambiente. O presente projeto vem contribuir para a descoberta de novos compostos produzidos por fungos isolados do solo e de sedimentos marinhos da Antártica que apresentem potencial ação contra três espécies de *Xanthomonas* que causam sérios prejuízos a algumas culturas do país (*X. axonopodis* pv. *passiflorae*, *X. citri* subsp. *citri*, *X. euvesicatoria*).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do projeto é avaliar a atividade antibacteriana de extratos produzidos por fungos coletados na Antártica contra *Xanthomonas* que causam doenças em citros, maracujá e tomate.

2.2 Objetivos Específicos

- Produção de metabólitos por fermentação utilizando fungos provenientes da Antártica;
- Avaliação da atividade dos extratos fúngicos contra as bactérias *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e *Xanthomonas euvesicatoria* causadora do cancro cítrico respectivamente nas culturas de citros, maracujá e tomate.

3 METODOLOGIA

3.1 Fungos

Os micro-organismos que foram estudados no presente projeto (17 fungos filamentosos) foram disponibilizados pela Prof.^a Dr.^a Lara Durães Sette (UNESP, Rio Claro), os micro-organismos são provenientes de amostras coletadas do recuo da geleira Collins na Antártica (Figura 5). Os fungos que foram utilizados neste projeto estão sendo identificados (caracterização taxonômica) por alunos de pós-graduação orientados pela Prof.^a Dr.^a Lara Durães Sette.



Figura 5. Recuo visível do gelo que cobria a geleira Collins na ilha do Rei George (Antártica). Fonte: (AFP 2018)

Os microrganismos compõem o acervo de fungos da coleção de pesquisa da Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP) onde são preservados por meio de ultracongelamento a -80°C. Os 17 fungos filamentosos que foram estudados no presente projeto apresentam os seguintes códigos: P4.345; Px5.75; P6.86; P0.125; P10.175; P8.149; B0.245; B4.50; M0.227; B4.49; Px0.236; M0.32; B4.178; B3.130; PX0.29; M10.121; B10.276.

3.2 Obtenção de Extratos Brutos

3.2.1 Condições de Cultura para Fermentação em Shaker

Os fungos foram reativados e replicados em placas de Petri contendo meio Malte 2% e incubados em BOD à 15°C por um período de aproximadamente 10 dias para crescimento. Discos de 5 mm de ágar + micélio foram transferidos para placas de Petri contendo o meio líquido malte 2% e os Erlenmeyers foram mantidos pelo período de 21 dias em agitação constante (150 rpm) a 15°C.

3.2.2 Processamento, Extração e Armazenamento do Extrato Bruto

Após o crescimento fúngico, a biomassa microbiana e o sobrenadante (meio metabólico) foram separados por meio de filtração a vácuo.

Para a obtenção dos metabólitos secundários extracelulares o seguinte procedimento foi seguido: O sobrenadante foi submetido à extração líquido-líquido com acetato de etila. As frações orgânicas foram submetidas à evaporação rotativa, sob pressão reduzida e posteriormente submetidas ao bioensaio, enquanto a fase aquosa foi submetida a esterilização em autoclave e fora descartada posteriormente.

3.3 Avaliação da atividade contra bactérias fitopatogênicas e determinação da concentração inibitória mínima (MIC).

As 17 amostras (extratos brutos e frações) foram submetidas aos bioensaios contra as seguintes bactérias: *Xanthomonas citri subsp. citri*. – Causadora do Cancro Cítrico em frutas cítricas; *Xanthomonas euvesicatoria* – Causadora da Mancha Bacteriana no tomate; *Xanthomonas axonopodis pv. passiflorae* - Causadora da Bacteriose no Maracujá.

O Bioensaio antibacteriano realizado no presente trabalho utilizou o ensaio em microplaca com resazurina (REMA) descrito na literatura por (SILVA IC, REGASINI LO,

PETRONIO MS, SILVA DH, BOLZANI VS, BELASQUE J, JR., SACRAMENTO LV, FERREIRA H, 2013) da seguinte maneira:

Primeiramente os extratos brutos e secos já pesados foram dissolvidos em solução dimetilsulfóxido (DMSO) para se obter uma solução estoque, os extratos foram diluídos na concentração de 20%. A quantidade necessária de DMSO por extrato foi calculada individualmente de forma que a concentração final dos extratos atingisse valores entre 29 e 30 mg/ml. A solução estoque foi diluída em meio N diretamente nos micropoços da placa de 96 poços, de maneira que a concentração de DMSO não ultrapassasse 1% (que vem a ser a concentração do controle de veículo). Na primeira linha da placa (A), foi aplicado a maior concentração dos extratos (2,1 µg/ml), nas linhas seguintes foi realizada a microdiluição seriada das amostras. E então foi adicionado o inóculo bacteriano (padronizado em 105 UFC/poço) (Observação: as células bacterianas foram cultivadas em meio N a 30°C sob rotação de 200 rpm).

Para o Controle de veículo (CV) foi utilizado 1% de DMSO dissolvido em meio N, para o Controle negativo (CN) foi utilizado apenas o meio N com inóculo e para o Controle Positivo foi utilizado *Canamicina* na concentração de 20 µg/ml.

A Figura 6 representa o modelo de como foi adicionado as amostras na placa de 96 poços. As soluções (extrato+ DMSO) foram adicionadas nas colunas de 2 a 9, e nas linhas A e D (Otimização da placa para o teste simultâneo de 17 extratos) na fileira 10 foi adicionado o controle positivo nas quatro primeiras linhas e do veículo nas quatro últimas. Na fileira 11 foi adicionado o controle negativo, não se adicionou amostras nas fileiras 1 e 12 para se evitar evaporação, portanto nelas foram adicionados apenas meio N.

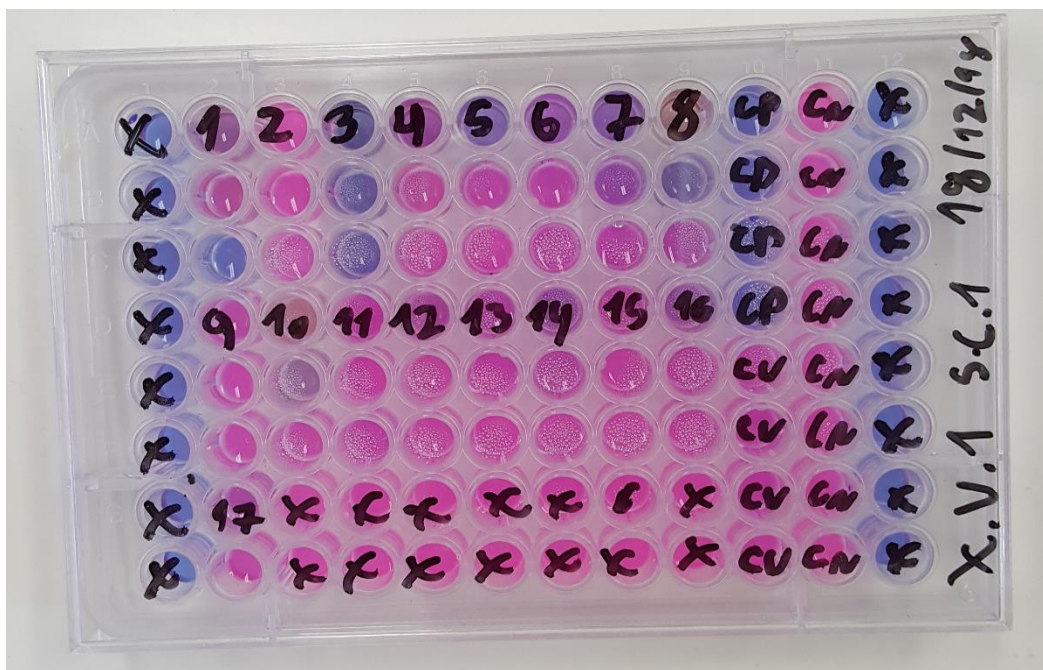


Figura 6. Modelo de disposição dos extratos no bioensaio REMA Fonte: Victor Nardo.

As placas foram incubadas a 29° por aproximadamente 16 horas e em seguida foi adicionado uma solução de resazurina (0,1mg/ml) para uma nova incubação a 29° por aproximadamente 1 hora. A análise da atividade antibacteriana dos extratos contra as espécies de *Xanthomonas* realizada pelo método REMA (resazurin microtiter assay), consiste em um ensaio de microtitulação com o corante resazurina ($C_{12}H_7NO_4$), que na presença de crescimento bacteriano sofre redução, de um azul com baixa fluorescência para a coloração rósea e altamente fluorescente (resorufina).

Portanto, quanto menor o crescimento bacteriano menor será a redução da resazurina em resorufina em consequência menor vai ser a leitura de fluorescência detectada.

Após o período de incubação foi realizada a medida da fluorescência através do aparelho Synergy H1N1 (Biotek). A partir dessa medida de fluorescência foi possível calcular os dados de porcentagens de células mortas.

$\% \text{ de células mortas} = [(m\acute{e}dia \text{ das medidas de fluoresc\^encia do CN} - \text{fluoresc\^encia da amostra}) / m\acute{e}dia \text{ das medidas de fluoresc\^encia do CN}] \times 100$

Os testes foram realizados em triplicata, com inóculos diferentes, garantindo a efetividade dos resultados.

A partir dos dados obtidos nesta análise, foi possível verificar quais amostras apresentaram atividade contra as bactérias fitopatogênicas e a sua concentração inibitória mínima (MIC). A concentração inibitória mínima (MIC) é definida como a concentração mais baixa do antibiótico capaz de inibir o crescimento de 90% dos organismos.

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, foi disponibilizada pelo Prof. Dr. Henrique Ferreira da Unesp de Rio Claro, a sua manipulação foi realizada no Laboratório de Genética de Bactérias, o qual tem autorização do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para a manipulação da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. As bactérias *Xanthomonas euvesicatoria* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* foram disponibilizadas pela professora Maria Lucia Carneiro Vieira, do Departamento de Genética da *Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"* da Universidade de São Paulo.

3.4 Avaliação da atividade bactericida e determinação da Concentração Mínima Bactericida (MBC) dos extratos bioativos.

A atividade bactericida foi determinada pela inoculação do conteúdo da microplaca de 96 poços contendo os extratos e a bactéria (após a incubação a 29 °C por 16h, e antes da adição de resazurina) em placa de Petri (150 x 15 mm) contendo meio Ágar NYG. As placas foram incubadas por 48 horas a 29 °C em estufa bacteriológica. O crescimento bacteriano foi analisado visualmente, e para os extratos, em que não houveram o crescimento bacteriano, foi determinada a MBC.

3.5 Tratamento e Descarte de Resíduos da Pesquisa

Os resíduos químicos produzidos na presente pesquisa foram acondicionados em frascos rotulados, os quais serão acumulados em área de resíduos do Departamento de Bioquímica e Microbiologia para posterior tratamento especializado, sendo que o solvente acetato de etila residual será destilado para posterior utilização. Os resíduos biológicos, como inóculos, microrganismos, etc., foram autoclavados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção dos extratos

A Tabela 1 ilustra a quantidade média de extrato fúngico que foi obtido por cada um dos fungos.

Tabela 1. Quantidade em massa obtida de cada extrato fúngico.

Código	Extrato Extracelular (mg)	Código	Extrato Extracelular (mg)
P4.345	20	M0.32	55
Px5.75	27	B4.178	115
P6.86	142	B3.130	16
P0.125	28	Px0.29	67
P10.175	12	M10.121	26
P8.149	17	B10.276	14
B0.245	26		
B4.50	59		
M0.227	68		
B4.49	37		
Px0.236	64		

Como observado a média de massa obtida foi de 47 mg, onde alguns fungos produziram mais extratos com dois deles obtendo valores acima de 100 mg. A obtenção dos extratos foi satisfatória, somente o M0.227 e P6.86 tiveram que ser produzidos novamente por terem produzido pouco extrato extracelular na primeira fermentação.

4.2 Screening para avaliação de atividade antibacteriana dos extratos brutos

Os 17 extratos foram testados em relação a sua atividade de inibição do crescimento de *X. citri* subsp. *Citri* (XAC), *X. euvesicatoria* (XAEU) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (XAP), os resultados dos bioensaios com as 3 espécies de *Xanthomonas* estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Relação de extratos utilizados e sua atividade positiva contra os 3 gêneros de *Xanthomonas* (valores superiores a 90% foram considerados positivos).

Extratos dos isolados		XAC	XAEU	XAP
P4.345	1	-	-	-
Px5.75	2	-	-	-
P6.86	3	+	+	+
P0.125	4	-	-	-
P10.175	5	-	+	-
P8.149	6	-	-	-
B0.245	7	-	-	-
B4.50	8	+	+	+
M0.227	9	-	-	-
B4.49	10	+	+	+
Px0.236	11	-	-	-
M0.32	12	-	-	-
B4.178	13	-	-	-
B3.130	14	-	-	-
Px0.29	15	-	-	-
M10.121	16	-	-	-
B10.276	17	-	-	-

Observando a Tabela 2 é possível verificar que os extratos produzidos pelos fungos B4.49, B4.50 e P6.86 foram positivos para contra os três gêneros de *Xanthomonas*, e o isolado P10.175 apresentou atividade somente contra a *X. euvesicatoria*.

As Figuras 7, 8 e 9 a seguir apresentam alguns resultados qualitativos que foram possíveis de se obter através do método REMA para as amostras citadas na Tabela 2.

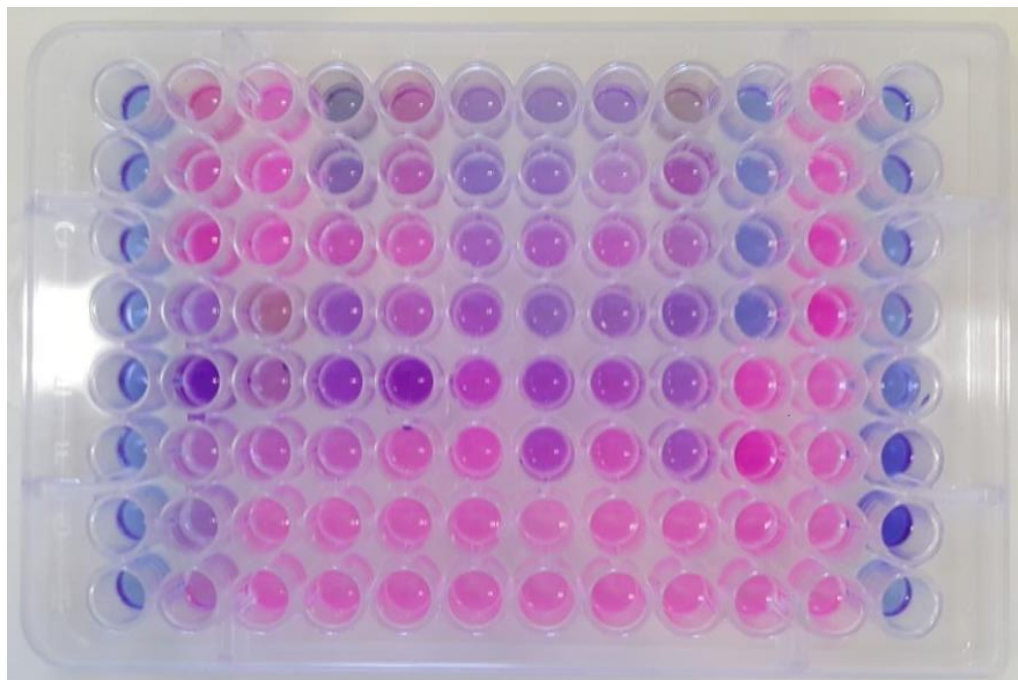


Figura 7. Avaliação qualitativa da ação antibacteriana contra a *X. citri* subsp. *citri*

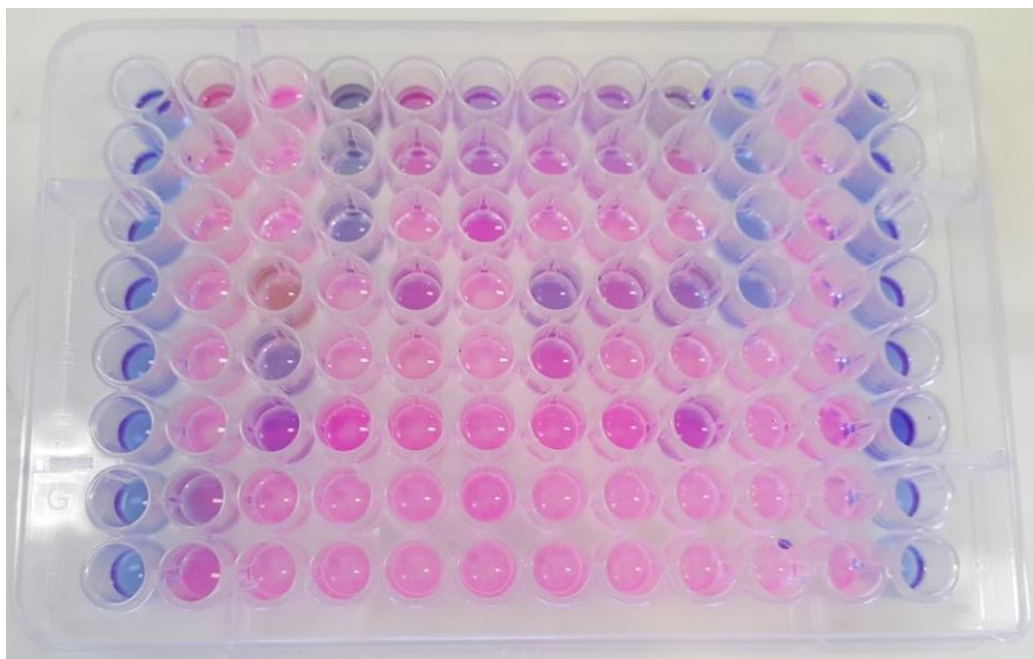


Figura 8. Avaliação qualitativa da ação antibacteriana contra a *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*



Figura 9. Avaliação qualitativa da ação antibacteriana contra a *X. euvesicatoria*

Como é possível observar nas Figuras 7, 8 e 9 o CV e o CN possuem coloração rósea na presença do corante resofurina (fluorescente), o que indica respectivamente que o veículo (DMSO) não interferiu nos resultados e que houve crescimento bacteriano na placa. Enquanto que o CP (canamicina) possui uma coloração azul após a aplicação da rezasurina, indicando então que ocorreu inibição do crescimento bacteriano. As colunas 1 e 12 não foram inoculadas, apenas foi aplicado o meio de cultivo.

Já nas amostras dispostas nas linhas 2 a 9 a coloração dos poços variam em vários tons de rosa, do mais escuro ao mais claro, e algumas linhas a coloração notada foi toda azul, indicando, portanto, que em alguns poços houve inibição do crescimento bacteriano, sendo que foram considerados positivos os extratos que inibiram mais de 90% de crescimento bacteriano. Alguns fungos produzem certas substâncias que podem vir a alterar a coloração final do poço, porém, como se trata de uma leitura de fluorescência esta alteração é irrelevante para o resultado quantitativo do bioensaio.

Para a obtenção dos resultados quantitativos foi realizado uma leitura da fluorescência da resorufina. Para tanto o sinal de fluorescência é monitorado usando comprimentos de onda de excitação 530-560 e comprimento de onda de emissão de 590 nm. Os dados de fluorescência obtidos nas amostras foram transformados em porcentagem de células mortas. As Tabelas 3, 4, 5 apresentam respectivamente as porcentagens de células mortas (valor médio de inibição

obtido dos resultados de triplicata) obtidas pelos extratos frente às *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e *X. euvesicatoria*.

Tabela 3: Porcentagens médias (%) de células mortas obtidas nos testes com as amostras, frente à *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

P4.345	Px5.75	P6.86	P0.125	P10.175	P8.149	B0.245	B4.50	CP
14,28	16,11	98,07	36,65	67,82	73,26	64,44	96,89	96,29
3,03	5,63	69,08	24,20	68,97	58,96	43,74	30,16	96,44
6,53	3,47	11,89	6,26	44,80	38,13	24,76	40,67	96,31
0	0	0	0	0	0	0	0	96,55
M0.227	B4.49	Px0.236	M0.32	B4.178	B3.130	PX0.29	M10.121	B10.276
47,79	98,70	54,00	34,68	34,33	63,72	47,94	61,78	59,03
38,83	42,53	40,57	13,31	8,88	31,73	17,70	47,74	41,10
28,25	26,60	25,72	1,72	0,00	22,43	7,20	42,23	0,00
0,00	9,99	3,33	14,84	2,38	8,64	4,65	4,73	0,00
0,00	18,22	5,05	4,73	3,94	5,52	6,74	5,84	0,00
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Como observado na Tabela 3, algumas amostras apresentaram expressiva inibição do crescimento bacteriano, os extratos P6.86, B4.50 e B4.49 atingiram grau de inibição entre 96% e 98% na concentração de 2,1 µg/ml, valores estes semelhantes ao controle positivo (CP).

Observa-se na Tabela 5, que as amostras P6.86, P10.175, B4.50 e B4.49, apresentaram expressiva inibição do crescimento bacteriano na concentração de 2,1 µg/mL, com valores de 97%, 90%, 96% e 98% respectivamente, excluindo o P10.175 todos os outros valores são superiores ao do controle positivo (CP).

4.3 Reavaliação da atividade inibitória dos extratos brutos considerados positivos.

Os bioensaios de *screening* mostraram que três extratos, produzidos pelos fungos B4.49, B4.50 e P6.86, foram bioativos (inibição maior de 90%) contra as três espécies de *Xanthomonas*. Enquanto o extrato P10.175 se mostrou bioativo somente contra a *X. euvesicatoria*. Para confirmação destes resultados estes extratos foram submetidos à reavaliação da atividade contra as três espécies de *Xanthomonas*, utilizando o bioensaio completo em triplicata e em três eventos diferentes, neste bioensaio é realizado teste com 8 concentrações dos extratos bioativos.

A Tabela 6 apresenta os valores médios (considerando os 3 bioensaios) de inibição do crescimento bacteriano da *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (XAC) em relação às diferentes concentrações dos extratos e a Figura 10 apresenta o gráfico dose-resposta dos três extratos bioativos para a XAC.

Tabela 6: Porcentagens média (%) de células mortas obtidas nos testes com as amostras, frente à *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

[µg/mL]	B4.49	B4.50	P6.86	CP
2,1	98,47	96,97	98,18	96,66
1,05	21,60	12,96	68,12	96,89
0,525	19,11	0,00	52,44	97,55
0,2625	38,54	0,00	22,34	96,65
0,13125	45,65	0,00	18,60	CV
0,065625	27,98	0,00	10,16	1,65
0,032813	0,00	0,04	0,42	0,32
0,016406	5,28	0,46	2,42	0,00

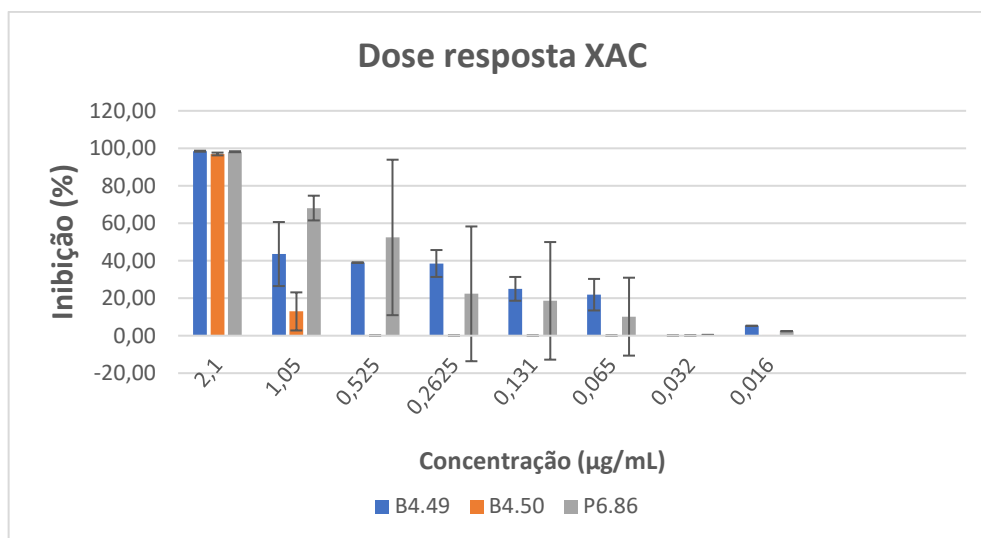


Figura 10. Gráfico de dose resposta dos extratos bioativos em relação a XAC.

Como verificado na Tabela 6 os três extratos continuaram mostrando bioatividade contra a bactéria XAC com valores de inibição bacteriana acima de 90%.

Observando o gráfico de dose resposta apresentado na Figura 10, nota-se que o extrato P6.86 possui um decaimento de inibição menos acentuado com a diminuição da concentração em relação aos outros dois extratos, mostrando que para esse extrato existe uma melhor relação dose resposta, pois os outros extratos há um grande decaimento de atividade mais acentuado conforme as concentrações diminuem.

A Tabela 7 apresenta os valores médios (considerando os três bioensaios) de inibição do crescimento bacteriano da *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (XAP) em relação às diferentes concentrações dos extratos e a Figura 11 apresenta o gráfico dose-resposta dos três extratos bioativos para a XAP.

Tabela 7: Porcentagens média (%) de células mortas obtidas nos testes com as amostras, frente à *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*.

[µg/mL]	B4.49	B4.50	P6.86	CP
2,1	39,22	96,69	79,04	93,03
1,05	45,32	22,92	50,16	92,81
0,525	43,71	6,57	28,74	92,15
0,2625	34,56	3,57	11,40	92,32
0,13125	8,62	5,31	4,28	CV
0,065625	1,47	2,52	3,03	7,18
0,032813	1,38	1,40	0,97	8,26
0,016406	2,53	1,07	0,81	8,84

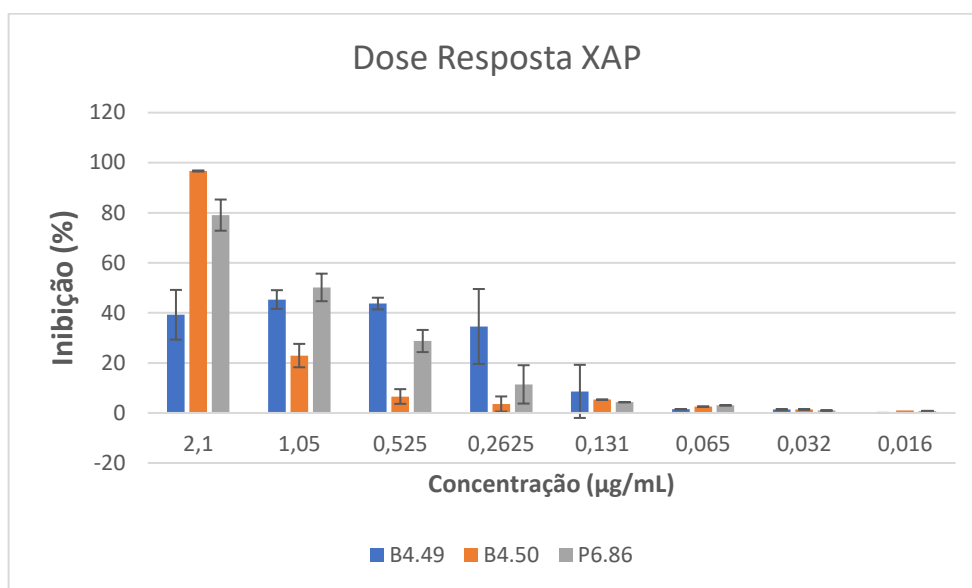


Figura 11. Gráfico de dose resposta dos extratos bioativos em relação à *XAP*.

No bioensaio completo (Tabela 7) notou-se que os extratos B4.49 e P6.86 não apresentaram mais bioatividade (inibição do crescimento bacteriano acima de 90%) contra a *XAP*, porém é possível observar na Figura 11 que o P6.86 apresentou um decaimento de atividade menor com relação a concentração, quando comparado aos outros extratos. O extrato B4.50 continuou exibindo uma ótima atividade inibitória na concentração de 2,1 µg/mL (96%), contra a *XAP*.

A Tabela 8 apresenta os valores médios (considerando os três bioensaios) de inibição do crescimento bacteriano da *X. euvesicatoria* (*XAEU*) em relação às diferentes concentrações dos extratos e a Figura 12 apresenta o seu gráfico dose-resposta.

Tabela 8: Porcentagens médias (%) de células mortas obtidas nos testes com as amostras frente à *X. euvesicatoria*.

[µg/mL]	B4.49	B4.50	P6.86	P10.175	CP
2,1	31,95	95,77	98,18	96,93	93,70
1,05	17,54	83,68	89,68	68,65	93,21
0,525	17,33	6,77	39,89	20,13	93,30
0,2625	17,32	16,31	15,37	21,11	93,47
0,13125	20,55	13,17	12,71	2,31	CV
0,065625	21,46	16,12	7,74	4,96	16,59
0,032813	12,81	5,83	0,98	10,85	7,37
0,016406	2,03	5,06	0,53	11,71	3,14

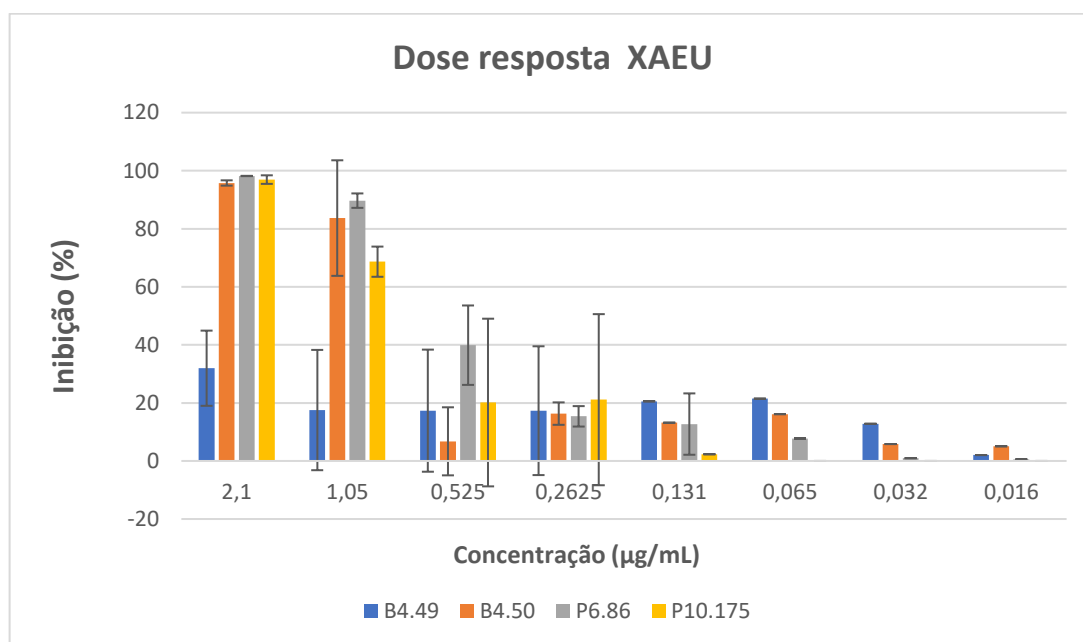


Figura 12. Gráfico da dose resposta dos extratos dos isolados B4.49, B4.50, P6.86 e P10.175 em relação a bactéria *XAEU*.

No bioensaio completo (Tabela 8) observa-se que um dos extratos (B4.49) não apresentou mais atividade contra a *XAEU*, enquanto os outros três (B4.50, P6.86 e P10.175) obtiveram valores expressivos de inibição variando de 95 a 98%. No gráfico de dose-resposta (Figura 12) é possível verificar que os extratos P6.86 e P10.175 apresentaram uma boa relação dose resposta, com a atividade diminuindo proporcionalmente a diminuição da concentração dos extratos.

4.4 Concentração Inibitória (MIC) dos extratos

Com base nos resultados obtidos no ensaio completo foi possível traçar curvas de regressão linear para cada um dos extratos contra as três *Xanthomonas*, obtendo-se equações polinomiais de quarta ordem, as equações foram utilizadas para se realizar o cálculo dos valores de concentrações inibitórias mínima de 90% do crescimento bacteriano (MIC) de cada um dos extratos bioativos no bioensaio completo.

Tanto para a *XAC* quanto para a *XAEU* o extrato P6.86 foi o que apresentou o menor valor de MIC (Tabelas 9 e 10, respectivamente), se mostrando um extrato com real potencial de controle do fitopatógeno. Para a *XAP* o B4.50, que foi o único extrato bioativo apresentou o valor de MIC de 2018,65 µg/mL.

Tabela 9: MIC dos extratos em relação à *XAC* (em $\mu\text{g/mL}$).

Extratos	MIC	R ²
B4.49	2,0081	0,9682
B4.50	2031,5	0,9913
P6.86	1745,8	0,9886

Tabela 10: MIC dos extratos em relação à *XAEU* (em $\mu\text{g/mL}$).

Extratos	MIC	R ²
B4.50	1667,7	0,9193
P6.86	1074,7	0,9984
P10.175	1811,3	0,9713

4.5 Avaliação da atividade bactericida.

Os extratos que obtiveram resultados positivos foram testados quanto a sua atividade bactericida para cada uma das três *Xanthomonas*, sendo possível então determinar a mínima concentração na qual o extrato possui características bactericidas. Os resultados obtidos nestes bioensaios podem ser observados nas Figuras 13, 14 e 15.

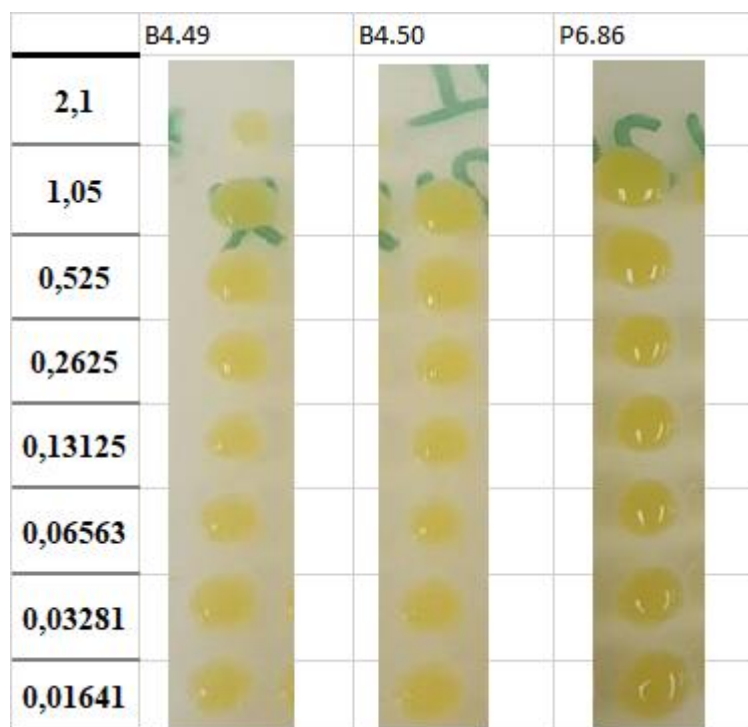


Figura 13. Resultados do bioensaio de avaliação da atividade bactericida contra *XAC* dos extratos em diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$).

Como observado na Figura 13, os extratos B4.50 e P6.86 mostraram-se, na concentração máxima testada (2,1 $\mu\text{g/mL}$) atividade bactericida. O extrato B4.49 apresentou crescimento bacteriano na concentração máxima testada assim este foi considerado bacteriostático.

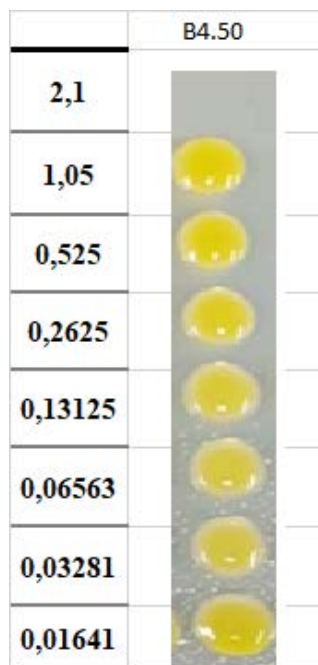


Figura 14. Resultados do bioensaio de avaliação da atividade bactericida contra *XAP* do extrato em diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$).

Como verificado na Figura 14, o extrato B4.50 apresentou atividade bactericida na concentração máxima testada (2,1 $\mu\text{g/mL}$).

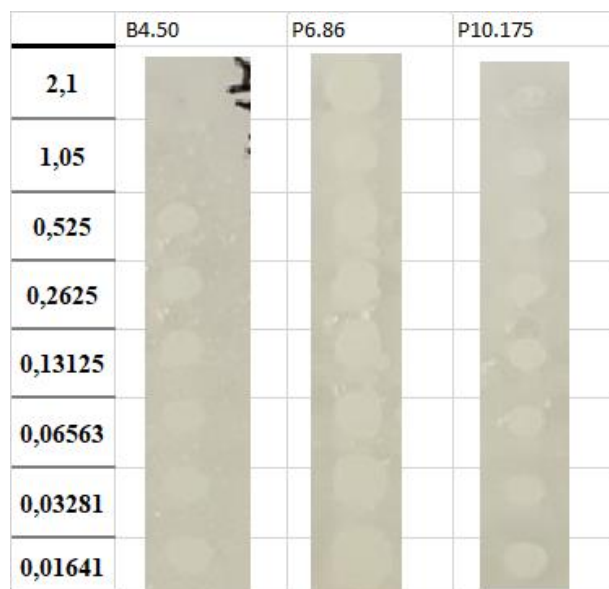


Figura 15. Resultados do bioensaio de avaliação da atividade bactericida contra *XAEU* dos extratos em diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$).

O P6.86 não apresentou atividade bactericida em nenhuma concentração testada (Figura 15), desta maneira foi considerado bacteriostático, nas concentrações testadas. O extrato fúngico P10.175 apresentou na concentração máxima testada ($2,1 \mu\text{g/mL}$) atividade bactericida. E o B4.50 apresentou atividade bactericida até na concentração de $1,05 \mu\text{g/mL}$, desta maneira apresentando a menor concentração bactericida dentre os extratos testados para esta bactéria.

5 CONCLUSÃO

Dentre os dezessete extratos fúngicos testados, quatro apresentaram atividade inibitória significativa com pelo menos uma das bactérias testadas: *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e *Xanthomonas euvesicatoria*, causadoras respectivamente do cancro cítrico em frutas cítricas, da bacteriose do maracujá e da mancha bacteriana do tomate.

Os extratos obtidos dos isolados B4.49 e P6.86 apresentaram bioatividade frente as bactérias *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e *Xanthomonas euvesicatoria* e o isolado P10.175 produziu extrato bioativo apenas contra a *Xanthomonas euvesicatoria*. Já o extrato produzido pelo isolado B4.50, apresentou atividade inibitória acima de 95% e ação bactericida para as três espécies de *Xanthomonas*, sendo que este apresentou a menor concentração bactericida frente à *Xanthomonas euvesicatoria*, mostrando que este isolado pode ser um potencial produtor de compostos com ação antibacteriana contra este gênero de bactéria.

6 REFERÊNCIAS

- ANDERSSON DI, HUGHES D. **Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations.** *FEMS Microbiol Rev.* v. 35, p. 901–11, 2011
- BELASQUE JUNIOR J, BARBOSA CARLOS B, BERGAMIN FILHO A, MASSARI CÍCERO A. **Prováveis consequências do abrandamento da metodologia de erradicação do cancro cítrico no Estado de São Paulo.** *Tropical Plant Pathology* 35, p.1, 2010.
- BRADBURY, J.F. *Xanthomonas* Dowson. In: Bergey's **Manual of Systematic Bacteriology**, KRIEG, N.R. & HOLT, J.G., eds. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994, v. 1, 964p.
- BRANCAGLIONE P, SAMPAIO AC, FISCHER IH, ALMEIDA AM, FUMIS TEREZINHA DE FÁTIMA. **Eficiência de argila silicatada no controle de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, in vitro e em mudas de maracujazeiro-amarelo.** Jaboticabal, p.1-2, 2009.
- CHRISTIANO, S. R. **Cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) e sua interação com a lagarta minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*) em laranja doce (*Citrus Sinensis*).** Piracicaba: Universidade de São Paulo Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, p.10, 2006
- CLARKE A. **Evolution, adaptation and diversity: global ecology in an Antarctic contexto.** In: HUIKES AHL, GIESKES WWC, ROZEMA J, SCHORNO RML, VAN DER VIES SM, WOLFF WJ. (Ed.) *Antarctic biology in a global contexto.* Leiden: *Backhuys Publishers*, p. 3-17, 2003.
- DE OLIVEIRA AG, MURATE LS, SPAGO FR, LOPES LP, BERANGER JPO, SAN MARTIN JAB, NOGUEIRA MA, MELLO JCP, ANDRADE CGTJ, ANDRADE G. **Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain.** *Biological Control.* v. 56, p.125–131, 2011.

EMERY FS, SANTOS GB, BIANCHI RC. **A Química na Natureza**. Rio de Janeiro: Ministério da Educação, Outubro, v.1, p. 70, 2010 (Coleção Química no Cotidiano).

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

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

FEHÉR M, SCHMIDT JM. **Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry**. *J Chem Inf Comput Sci.* v. 43, p. 218-27, 2003.

FUNDECITRUS. **Fundo De Defesa Da Citricultura**. Disponível em:

<http://www.fundecitrus.com.br/> - Acesso em 23/04/2019.

<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro/7-> Acesso em 23/04/2019

<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/revistas-> Acesso em 23/04/2019.

FURBINO LE, GODINHO VM, SANTIAGO IF, PELLIZARI FM, ALVES TMA, ZANI CL, JUNIOR PAS, ROMANHA AJ, CARVALHO AGO, GIL LHV, ROSA CA, MINNIS AM, ROSA LH. **Diversity Patterns, Ecology and Biological Activities of Fungal Communities Associated with the Endemic Macroalgae Across the Antarctic Peninsula**. *Microbial Ecology*. v. 67, p. 775-787, 2014.

GONÇALVES VN, CARVALHO CR, JOHANN S, MENDES G, ALVES TMA, ZANI CL, JUNIOR PAS, MURTA SMF, ROMANHA AJ, CANTRELL CL, ROSA CA, ROSA LH. **Antibacterial, antifungal and antiprotozoal activities of fungal communities present in different substrates from Antarctica**. *Polar Biol.* v. 38, p. 1143-1152, 2015.

GOTTWALD, T. R.; SUN, X.; RILEY, T.; GRAHAM, J. H.; FERRANDINO, F.; TAYLOR, E.L. **Geo-referenced spatiotemporal analysis of the urban citrus canker epidemic in Florida**. *Phytopathology*, v.92, p.361-377, 2002.

HENRÍQUEZ M, VERGARA K, NORAMBUENA J, BEIZA A, MAZA F, UBILLA P, ARAYA I, CHÁVEZ R, SAN-MARTÍN A, DARIAS J, DARIAS MJ, VACA I. **World J Microbiol Biotechnol**. v. 30, p. 65-76, 2014.

KNIGHT V, SANGLIER JJ, DITULLIO D, BRACCILI S, BONNER P, WATERS J, KOLLER OC, DE OLIVEIRA RBL, NUNES DS, SOGLIO FD, PANZENHAGEN NV, SARTORI IA, MANTEZA F. **Controle químico do cancro cítrico em plantas jovens sob manejo convencional e orgânico**. *Ciência Rural*, v. 36, p. 1043-1048, 2006.

LIM C, KIM J, CHOI JN, PONNUSAMY K, JEON Y, KIM SU, KIM JG, LEE C. *Identification, fermentation, and bioactivity against Xanthomonas oryzae of antimicrobial metabolites isolated from Phomopsis longicolla S1B4*. *J. Microbiol. Biotechnol*. v. 20, p. 494-500, 2010.

LOPES CA, QUEZADO-SOARES AM. **Doenças causadas por bactérias em tomate**. In: ZAMBOLIM L; VALE FXR; COSTA H. (ed). *Controle de doenças de plantas: hortaliças*. Viçosa: UFV. p. 754-784, 2000.

MALAVOLTA JUNIOR VA. **Doenças bacterianas em tomateiro: etiologia e controle**. In: *Seminário de atualização: Cadeia produtiva do tomate*, 2004.

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

MORÃO LG, POLAQUINI CR, SANTOS MB, REGASINI LO, FERREIRA H. **Atividade anti-xanthomonas citri subsp citri de híbridos moleculares curcumina-cinamaldeído: uma alternativa para a citricultura**. Jaboticabal: Unesp, p.1-2, 2016.

MUNHOZ CF, SANTOS AA, ARENHART RA, SANTINI L, MONTEIRO-VITORELLO CB, VIEIRA MLC. **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 LS, DE OLIVEIRA AG, HIGASHI AY, BARAZETTI AR, SIMIONATO AS, DA SILVA CS, SIMÕES GC, DOS SANTOS IMO, FERREIRA MR, CELY MVT, NAVARRO MOP, DE FREITAS VF, NOGUEIRA MA, DE MELLO JCP, LEITE JR RP, ANDRADE G. **Activity of Secondary Bacterial Metabolites in the Control of Citrus Canker.** *Agricultural Sciences.* v. 6, p. 295-303, 2015.

NEDIALKOVA D, NAIDENOVA M. **Screening the antimicrobial activity of actinomycetes strains isolated from Antarctica.** *J. Cult. Collect.* v. 4, p. 29-35, 2005.

PEIXOTO NETO PAS, AZEVEDO JL, ARAÚJO WL. **Microrganismos endofíticos.** *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Brasília, v. 29, p. 62-77, 2002.

PIKUTA EV, Hoover RB, Tang, J. **Microbial Extremophiles at the Limits of Life.** *Crit Rev Microbiol.* v. 33, p. 183-209, 2007.

QUEZADO-DUVAL, ARAÚJO ED, FERREIRA MA. **Detecção e identificação molecular de *Xanthomonas* spp. causadoras da mancha bacteriana do tomateiro.** Brasília, p.1-2, 2012.

RODRIGUEZ-R LM, GRAJALES A, ARRIETA-ORTIZ ML, SALAZAR C, RESTREPO S, BERNAL A. **Genomes-based phylogeny of the genus *Xanthomonas*.** *BMC Microbiology.* v. 12, p. 1-14, 2012.

RYAN RP, VORHÖLTER FJ, POTNIS N, JONES JB, SLUYS V, BOGDANOVE AJ, DOW JM. **Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions.** *Nature Reviews Microbiology.* v. 9, p. 344-355, 2011.

SANCHES ALR, DE MIRANDA SHG, BELASQUE JUNIOR J, BASSANEZI RB. **Análise Econômica da Prevenção e Controle do Cancro Cítrico no Estado de São Paulo.** *Econ. Sociol. Rural.* v. 52, p. 549-566, 2014.

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

SILVA IC, REGASINI LO, PETRONIO MS, SILVA DH, BOLZANI VS, BELASQUE J, JR., JR., SACRAMENTO LV, FERREIRA H. **Antibacterial Activity of Alkyl Gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.** *Journal of bacteriology* 195: 85-94.

SPAGO FR, ISHII MAURO CS, OLIVEIRA AG, BERANGER JPO, CELY MVT, STANGANELLI MM, SIMIONATO AS, MELLO JCP, ANDRADE G. ***Pseudomonas aeruginosa* produces secondary metabolites that have biological activity against plant pathogenic *Xanthomonas* species.** *Crop Protection.* v. 62, p. 46-54, 2014.

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

TEIXEIRA CG. Cultura. In: TEIXEIRA CG, et al. **Maracujá: cultura, matéria prima, processamento e aspectos econômicos.** Campinas: ITAL, 1994, 142p.

TESSMANN, C. **Caracterização molecular de *Xanthomonas campestris* pv *pruni* pela técnica de RAPD e relação com a planta hospedeira e com a produção, viscosidade e composição química da xantana.** Pelotas, 2002. 33f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel, 2002.

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