

---

Ciências Biológicas

---

Lucas Fazardo de Lima

**Avaliação de metabólicos secundários  
produzidos por fungos endofíticos de *Passiflora  
incarnata* com ação antibacteriana contra  
espécies do gênero *Xanthomonas***

Lucas Fazardo de Lima

**Avaliação de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos de *Passiflora incarnata* com ação antibacteriana contra espécies do gênero *Xanthomonas***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas

Orientador: Profa. Dra. Daiane Cristina Sass -Departamento de Biologia Geral e Aplicada – Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro – SP

Coorientador: Dra. Derlene Attili de Angelis – Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – UNICAMP, Paulínia, SP

Rio Claro - SP  
2022

L732a

Lima, Lucas Fazardo de

Avaliação de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos de *Passiflora incarnata* com ação antibacteriana contra espécies do gênero *Xanthomonas* / Lucas Fazardo de Lima. -- Rio Claro, 2022

31 f. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) -  
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Daiane Cristina Sass

Coorientadora: Derlene Attili de Angelis

1. Biotecnologia. 2. Microbiologia. 3. Fungos endofíticos. 4. Fitopatogenos.  
5. Biotecnologia agrícola. 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.

Lucas Fazardo de Lima

**Avaliação de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos de *Passiflora incarnata* com ação antibacteriana contra espécies do gênero *Xanthomonas***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas

**BANCA EXAMINADORA:**

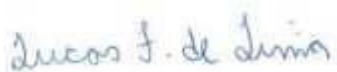
Profa. Dra. Daiane Cristina Sass (orientador) Profa.

Dra. Derlene Attili de Angelis (coorientador) Prof.

Dr. Henrique Ferreira

Profa. Dra. Antonia Marli dos Santos

Aprovado em: 7 de janeiro de 2022



Assinatura do discente



Assinatura da orientadora



Assinatura da coorientadora

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer inicialmente a minha mãe, Rose, por ser a grande inspiração da minha vida profissional; meu pai Silvio, por ser o pilar que me sustentou de todas as formas e meu irmão Bruno, pelo companheirismo e amizade. E a todos os três, pelo apoio incondicional em todas as minhas decisões, que me fizeram chegar até esse momento, se preocupando e cuidando de mim.

A minha orientadora Daiane, corientadora Derlene e ao LaQBiM, por ter me aceito como orientado estando apenas no meu primeiro semestre da universidade e me ensinado tanto sobre pesquisa e a vida, me ajudando a trilhar caminhos e inspirando novos sonhos.

Ao meu mestre Vitor, que me ensinou tudo que sabia, aprendemos muitas coisas juntos e sem ele, tudo seria mais difícil.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento e apoio para realização deste trabalho – Processo - 2018/00199-5.

Aos meus amigos da universidade, que me acolheram, me proporcionaram momentos de felicidade, me ajudando se precisasse ou não, sendo verdadeiros companheiros.

Aos meus amigos da vida que estiveram presentes a todo momento, em especial para Thalita, por vibrar em todas as pequenas e grandes conquistas da minha vida.

Agradecimento especial ao Santa Loira, pelas noites de quinta feira e ao Sujinhos, por qualquer dia aleatório da semana.

A você, que está lendo esse trabalho feito com tanto amor, carinho. Todo dia, noite e madrugada no laboratório está descrito abaixo, espero que gostem.

E por fim, aos fungos e bactérias, que mesmo pequenos, gigantes, me ensinando muito, me mantando focado e inspirado.

“O desafio não é pensar no que gostaríamos de mudar no nosso passado. Mas refletir sobre o que podemos mudar no nosso presente”  
(Zero – O homem do futuro)

## 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, causa impactos negativos na saúde e ao meio ambiente, fato 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, já que são produtos naturais de alta especificidade, com potencial atividade microbicida e que possuem meia-vida curta no ambiente. Suspeita-se que novas espécies microbianas e novos metabólitos secundários podem ser identificados investigando micro-organismos endofíticos que vivem no interior do tecido vegetal. Neste contexto, este projeto tem como objetivo avaliar a potencial atividade de metabólitos secundários obtidos de fungos endofíticos isolados da planta *Passiflora incarnata* contra *Xanthomonas* patogênicas das culturas de tomate, pimentão, frutas cítricas e mandioca. Os fungos serão submetidos ao processo de crescimento em meio de cultura líquido e agitação em shaker, seguido de extração com solvente para a obtenção de extratos contendo metabólitos secundários. Os extratos serão submetidos ao bioensaio antibacteriano contra as *Xanthomonas* para avaliação da atividade antibacteriana, assim pretende-se obter extratos bioativos contra os gêneros *Xanthomonas. citri subsp. Citri*, *Xanthomonas euvesicatoria* e *Xanthomonas axonopodis pv. Manihotis*

Palavras-chave: Biotecnologia, Microbiologia, Fungos endofíticos, Fitopatogenos, Biotecnologia agrícola

## ABSTRACT

Bacteria of the genus *Xanthomonas* affect agricultural crops of great economic importance in Brazil, and the control of these diseases through the use of chemical products, among other practices, causes negative impacts on health and the environment, a fact that makes the search for sustainable alternatives of fighting these diseases increasingly important. A possible alternative to the chemicals that have aroused great interest is the application of secondary metabolites, since they are natural products of high specificity, with potential microbicidal activity and that have a short half-life in the environment. It is suspected that new microbial species and new secondary metabolites can be identified by investigating endophytic microorganisms that live inside the plant tissue. In this context, this project aims to evaluate the potential activity of secondary metabolites obtained from endophytic fungi isolated from the *Passiflora incarnata* plant against pathogenic *Xanthomonas* of tomato, sweet pepper, citrus fruits and cassava. The fungi will be incorporated into the growth process in liquid culture medium and incorporated in a shaker, followed by solvent extraction to obtain extracts containing secondary metabolites. The extracts will be related to the antibacterial bioassay against *Xanthomonas* to evaluate the antibacterial activity, so it is intended to obtain bioactive extracts against the *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*, *Xanthomonas euvesicatoria* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*

Key-words: Biotechnology, Microbiology, Endophytic fungi, Phytopathogen, Agricultural biotechnology

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	10
2. OBJETIVO .....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	15
3.1.1 Fungos endofíticos .....	15
3.1.2 Bactérias fitopatogênicas.....	15
3.2 Obtenção dos extratos brutos.....	15
3.2.1 Condições de cultivo .....	15
3.2.2 Processamento, extração e armazenamento dos extratos brutos .....	16
3.2.3 Preparação dos extratos .....	16
3.2.4 Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos.....	16
3.2.5 Determinação da concentração necessária para 90% de inibição (CI90) dos extratos bioativos	17
3.2.6 Determinação da Concentração Mínima Bactericida (CBM) dos extratos bioativos.....	17
4 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	18
4.1 <i>Screening</i> para avaliação de atividade antibacteriana dos extratos brutos.....	18
4.2 Reavaliação da atividade inibitória dos extratos brutos para XAC .....	19
4.3 Concentração Inibitória (CI 90) dos extratos para XAC .....	21
4.4 Concentração Bactericida Mínima (CBM) para XAC .....	21
4.5 Reavaliação da atividade inibitória dos extratos brutos para XAEU .....	22
4.6 Concentração Inibitória (CI 90) dos extratos extratos para XAEU.....	24
4.7 Concentração Bactericida Mínima (CBM) para XAEU.....	25
4.8 Reavaliação da atividade inibitória dos extratos brutos para XAMH .....	26
4.9 Concentração Inibitória (CI 90) dos extratos extratos para XAMH.....	28
4.10 Concentração Bactericida Mínima (CBM) para XAMH.....	28
5 CONCLUSÃO .....	30
REFERÊNCIAS .....	31

## 1. INTRODUÇÃO

*Xanthomonas* são bactérias Gram-negativas fitopatogênicas distribuídas mundialmente e 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; ENCHEVA-MALINOVA et al., 2015).

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. 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).

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



**Figura 1.** Cancro cítrico em fruto (Fundecitrus, 2017).

O controle do cancro cítrico, causado pela bactéria *X. citri subsp. citri*, é um problema grave na citricultura, e as estratégias de gerenciamento incluem o uso de mudas saudáveis, cultivares resistentes, quebra-vento para impedir a dispersão de inoculo, e bactericidas à base de cobre (FUNDECITRUS, 2017). Entretanto, estas medidas não são sempre eficazes,

especialmente quando as condições ambientais são ideais para a disseminação da doença ou a densidade de inoculo é alta. O desafio é encontrar um novo método de controle do cancro cítrico no pomar de laranja (OLIVEIRA et al., 2011).

A *Xanthomonas euvesicatoria* é uma das bactérias causadoras da mancha bacteriana de pimentão e tomate (JONES et al., 2004). A mancha bacteriana é uma das doenças mais devastadoras de pimentão e tomate cultivados em ambientes úmidos e quentes. Uma vez presente na cultura sob condições favoráveis é quase impossível controlar a doença e prevenir grandes perdas de frutos. Muitas das características da doença são similares nas duas culturas. A bactéria ataca folhas, caules e frutos de pimentões e tomateiros, a figura 2 apresenta um exemplo da mancha bacteriana nos frutos de pimentão (RITCHIE, 2000).



**Figura 2.** Mancha bacteriana nos frutos de pimentão. Fonte: APS (2017).

A mancha bacteriana é de difícil controle devido à rápida disseminação do patógeno em condições ambientes favoráveis, transmissão por sementes, sobrevivência em plantas voluntárias ou como epífitas em plantas daninhas, pouca eficiência dos produtos químicos e indisponibilidade de cultivares com resistência adequada (NASCIMENTO et al., 2013).

O controle químico da mancha bacteriana tem sido feito com antibióticos para uso em agricultura (como oxitetraciclina e estreptomicina) e produtos à base de cobre (como hidróxido de cobre e oxicloreto de cobre) (VIANA et al., 2007). No entanto, vários relatos apontam para a baixa eficiência dos mesmos, tendo como uma possível causa o aparecimento de indivíduos resistentes nas populações bacterianas. Além disso, em muitos países, o uso de antibióticos agrícolas não é permitido ou é restrito, devido a fatores ligados ao custo, eficiência, proteção ambiental e saúde humana (NASCIMENTO et al., 2013; POTNIS et.al., 2015).

A bacteriose da mandioca, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* pode ser considerada a principal doença desta cultura no Brasil (MIURA & MONTEIRO, 1997). Os

sintomas incluem lesões que envolvem manchas foliares, murcha, exsudação de látex, necrose do sistema vascular e morte descendente dos ramos (MASSOLA & BEDENDO, 2005). As raízes também podem ser acometidas em casos mais graves, levando a descolorações dos feixes vasculares e apodrecimento (PERUCH et al., 2013).

Poucas são as medidas de controle da bacteriose da mandioca, sendo os bactericidas utilizados praticamente os mesmos desde a década de cinquenta, e somente aplicados em culturas de alto valor econômico (LOPES, 1998). O mais eficaz método de controle tem sido apontado como o uso de manivas sadias, o que se torna uma prática difícil aos agricultores, tendo em vista que praticamente todas as regiões produtoras apresentam sintomas da doença em suas lavouras (MIURA & MONTEIRO, 1997). O uso de resistência genética também é indicado, porém a maioria das variedades com resistência é destinada à indústria.

Para consumo humano e animal são cultivadas variedades de mesa, as quais são, em sua maioria, suscetíveis à enfermidade (KUHN et al., 2006). Desta forma, medidas de controle alternativo são fortemente indicadas, inclusive o uso de controle biológico (SCHWAN-ESTRADA et al., 2003).

Assim, o controle das infecções causadas por diversos patovares de *Xanthomonas* tem sido tido como ineficientes, devido à acumulação de material químico no ambiente, suscetibilidade de variedades supostamente resistentes e perdas de área plantada. Dessa maneira há uma 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 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 (DAYAN et al., 2009).

Na literatura vem sendo relatados diversos estudos da atividade antibacteriana de metabólitos secundários, produzidos por micro-organismos, contra bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas* (MURATE, et al. 2015; SPAGO et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2011).

Suspeita-se que novas espécies microbianas e novos metabólitos secundários podem ser identificados investigando microrganismos endofíticos que vivem no interior do tecido vegetal (STANIEK et al., 2008; QIU et al., 2010), e que os metabólitos secundários desses microrganismos estão diretamente relacionados com a sua planta hospedeira (KRINGS et al., 2007). Mesmo assim, poucas espécies vegetais foram estudadas completamente em relação à sua biologia endofítica até o momento (VAZ et al., 2014), como é o caso de microrganismos

endofíticos de *passiflorae*.

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

Apesar da *P. incarnata* apresentar uma variedade de atividades biológicas, as propriedades da sua microbiota endofítica são praticamente inexplorados. Dessa maneira, é de suma importância explorar essa microbiota, principalmente com relação a ação que estes endofíticos podem apresentar contra doenças que causam sérios prejuízos a culturas de grande interesse econômico.

Estudos recentes e preliminares, realizado em nosso laboratório, com alguns extratos de fungos endofíticos isolado de *P. incarnata*, tem apresentado resultados promissores contra *X. axonopodis* pv. *Passiflorae*, responsável pela mancha bacteriana do maracujazeiro. Dessa maneira, neste projeto propõem-se avaliar a ação dos extratos de fungos endofíticos isolados de *P. incarnata* contra as espécies de *Xanthomonas*, responsáveis pelas doenças em frutas cítricas, tomate/pimenta e mandioca (*X. citri* subsp. *citri*, *X. euvesicatoria* e *X. axonopodis* pv. *manihotis* respectivamente).

## 2. OBJETIVO

O projeto tem como objetivo obter extratos que contenham metabólitos secundários de fungos endofíticos isolados de *P. incarnata* e testar o seu potencial de ação antibacteriana contra *X.citri subsp. citri*, *X. euvesicatoria* e *X. axonopodis pv. manihotis*.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Micro-organismos**

##### **3.1.1 Fungos endofíticos**

Foram utilizados ao total 34 fungos endofíticos isolados da planta *Passiflora incarnata*, e destes, 24 já possuíam extratos disponíveis na extratoteca do laboratório. Outros 10 isolados foram cedidos pela professora e curadora Derlene Attili de Angelis, da Divisão de Recursos Microbianos do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, da Universidade Estadual de Campinas (CPQBA). Os exemplares foram examinados quanto à sua pureza e preservadas pelo método de Castellani (CASTELLANI, 1939).

##### **3.1.2 Bactérias fitopatogênicas**

A bactéria *X. citri* subsp. *citri* foi disponibilizada pelo Prof. Dr. Henrique Ferreira, do Depto. de Bioquímica e Microbiologia da UNESP, campus Rio Claro, e sua manipulação é realizada no Laboratório de Genética de Bactérias, o qual tem autorização do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para a manipulação da mesma.

As bactérias *X. euvesicatoria* e *X. axonopodis* pv. *manihotis* foram disponibilizadas pela Profa. Dra. Maria Lucia Carneiro Vieira, do Depto. de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo. Todas linhagens utilizadas estão preservadas à - 80°C.

#### **3.2 Obtenção dos extratos brutos**

##### **3.2.1 Condições de cultivo**

Os 10 fungos endofíticos foram cultivados em placa com meio Ágar malte 2% (MA 2%) por sete dias a 28°C. Discos de 0,5 cm de ágar com micélio foram transferidos para um frasco Erlenmeyer contendo aproximadamente 150 mL de meio de cultivo Malte 2% (M 2%). Os frascos foram mantidos a 28°C e 120 rpm por 20 dias. A padronização do método de cultivo foi realizada por Silva (2017). Os extratos secos foram armazenados em micro-tubos e preservados em geladeira (10°C). Todos extratos produzidos apresentaram massa suficiente para realização dos testes de triagem.

### 3.2.2 Processamento, extração e armazenamento dos extratos brutos

Após o cultivo, todo conteúdo foi submetido a uma extração com acetato de etila ( $C_4H_8O_2$ ) com auxílio de um liquidificador. O material foi transferido para um balão de separação onde o foi possível observar a formação de duas fases. A fase aquosa foi devidamente descartada enquanto a fase orgânica foi reservada e após a retirada do excesso de água pela adição de Sulfato de sódio ( $Na_2SO_4$ ), o excesso de solvente foi removido com o auxílio de um evaporador rotativo, à  $40^\circ C$ . A secagem dos extratos foi finalizada em um concentrador de amostras à  $40^\circ C$  com pressão de ar. O acondicionamento dos extratos se deu em micro tubos *eppendorf* à  $10^\circ C$ .

### 3.2.3 Preparação dos extratos

Após a determinação da massa dos extratos, todos foram dissolvidos em uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO) 10% a fim de se obter uma solução de concentração igual a 30 mg/mL.

### 3.2.4 Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos

Todos extratos obtidos foram submetidos a um ensaio afim de determinar sua capacidade de inibição contra as bactérias fitopatógenas *X. citri* subsp. *Citri*, *X. euviscátoria* e *X. axonpodis* pv. *manihotis*. O teste utilizado foi o *Resazurin Microtiter Assay* (REMA), segundo protocolo modificado por SILVA e FERREIRA em 2013.

O teste utilizou uma microplaca de 96 poços, onde são testados extratos em conjunto com controles negativo (CN), positivo (CP) e de veículo (CV). Inicialmente os extratos são diluídos em meio NYG (3g de extrato de levedura, 5g de peptona e 20mL/L de glicerol) de maneira que a concentração final máxima obtida, após a montagem na placa, seja de 2,1 mg/mL, seguida de até sete subsequentes diluições. O CP utiliza uma solução do antibiótico Canamicina (20  $\mu g/mL$ ), o CV utiliza uma solução de DMSO 1% e o CN consiste apenas em meio de cultivo com inóculo bacteriano.

O inóculo bacteriano foi cultivado em meio NYG a  $29^\circ C$  a 200 rpm afim de obter uma Densidade óptica (D.O.) de aproximadamente 0.8(à 600 nm) que se refere a fase de crescimento exponencial *log* da bactéria. O inóculo foi então padronizado para que se obtivesse  $10^5$  células em cada um dos poços ( $10^5$  Células/poço).

As placas foram incubadas por aproximadamente 18 horas a  $29^\circ C$ , foram então adicionados 15  $\mu L$  de uma solução de resazurina (0,1 mg/mL), um corante de cor

azul e de baixa fluorescência que na presença de NADH, presente mediante crescimento bacteriano, é reduzido para a resorufina, corante róseo de alta fluorescência

Assim, após a aplicação da resazurina e de um novo período de incubação a 29°C por aproximadamente 1 hora, foi possível observar alterações colorimétricas nos poços onde houve crescimento bacteriano.

Através de análise no leitor de microplacas SYNERGY H1 (Biotek®), foi possível obter a leitura das unidades de fluorescência (UF) em cada um dos poços, que possibilitou o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento bacteriano em relação ao CN mediante a fórmula abaixo:

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

Com os resultados, foi construída uma tabela, e os extratos que apresentaram inibição de 90% ou superior na maior concentração testada foram considerados positivos. Aqueles que mostraram resultados positivos para a bactéria XAC foram selecionados para um bioensaio completo, com oito diluições, realizado em triplicada em três eventos distintos.

### **3.2.5 Determinação da concentração necessária para 90% de inibição (CI90) dos extratos bioativos**

Os valores de concentração inibitória foram obtidos utilizando as porcentagens obtidas pelos testes de avaliação da inibição do crescimento celular descritos previamente. Os valores de porcentagem do evento que apresentou menor desvio padrão foram usados para a elaboração de uma função polinomial de quarta ordem, que ao ser igualada ao valor de 90, permite a obtenção das concentrações necessárias de cada extrato para a inibição celular de 90%.

### **3.2.6 Determinação da Concentração Mínima Bactericida (CBM) dos extratos bioativos.**

A atividade bactericida dos extratos testados nos 3 eventos distintos, foram determinados pela inoculação do conteúdo da microplaca de 96 poços contendo os extratos e o inóculo bacteriano, com auxílio de um replicador de colônia (Figura 2) após o período de incubação a 29 °C por 18 horas, e antes da adição do corante resazurina, em placa de Petri (150 x 15 mm) contendo meio NYG sólido. As placas foram incubadas por 48 horas a 29 °C em estufa bacteriológica. O crescimento bacteriano foi analisado visualmente, e para os extratos, em que não houve o crescimento bacteriano, foi determinada sua CBM.

## 4 RESULTADO E DISCUSSÃO

### 4.1 *Screening* para avaliação de atividade antibacteriana dos extratos brutos

Os 34 extratos foram testados em relação a sua atividade de inibição do crescimento de *X. citri* subsp. *Citri* (XAC), *X. euvesicatoria* (XAEU) e *X. axonopodis* pv. *Manihotis* (XAMH) gerando a seguinte tabela:

**Tabela 1.** Relação de extratos utilizados e sua atividade positiva contra os 3 generos de *Xanthomonas* (valores superiores a 90% foram considerados positivos).

Extratos dos isolados		XAC	XAEU	XAMH
LMA 1705	1	-	-	-
<b>LMA 1719</b>	<b>2</b>	+	+	+
<b>LMA 1602</b>	<b>3</b>	+	+	+
<b>LMA 1793</b>	<b>4</b>	+	+	+
LMA 1666	5	-	-	-
<b>LMA 1798</b>	<b>6</b>	+	+	+
LMA 1596	7	-	-	-
LMA 1672	8	-	-	-
LMA 1605	9	-	-	-
LMA 1684	10	-	-	-
LMA 1630	11	-	-	-
LMA 1602	12	-	-	-
LMA 1686	13	-	-	-
LMA 1722	14	-	-	-
LMA 1681	15	-	-	-
LMA 1709	16	-	-	-
LMA 1718	17	-	-	-
LMA 1720	18	-	-	-
LMA 1694	19	-	-	-
LMA 1705	20	-	-	-
<b>LMA 1792</b>	<b>21</b>	+	-	-
LMA 1710	22	-	-	-

LMA 1604	23	-	-	-
LMA 1697	24	-	-	-
LMA 1714	25	-	-	-
LMA 1693	26	-	-	-
LMA 1717	27	-	-	-
<b>LMA 1715</b>	<b>28</b>	-	+	-
<b>LMA 1696</b>	<b>29</b>	-	+	-
<b>LMA 1674</b>	<b>30</b>	+	+	-
LMA 1721	31	-	-	-
LMA 1706	32	-	-	-
<b>LMA 1701</b>	<b>33</b>	-	+	-
LMA 1732	34	-	-	-

Fonte: Dados do Trabalho

Observando a tabela 1 é possível verificar que quatro extratos (dos fungos LMA 1793, LMA 1719, LMA 1798 e LMA 1602) se mostraram positivos para os três gêneros das *Xanthomonas*. Dois (LMA 1792 e LMA 1674) apresentaram atividade contra XAC e três (LMA 1715, LMA 1696 e LMA 1674) para XAEU.

#### 4.2 Reavaliação da atividade inibitória dos extratos brutos para XAC.

Foram testados, em triplicata e em 3 eventos diferentes, os extratos que obtiveram resultados considerados positivos, com inibição superior a 90%, para a XAC

A tabela 2 e a figura 3 apresentam os resultados obtidos no bioensaio completo contra a XAC, realizado com seis extratos bioativos produzidos pelos fungos LMA 1793, LMA 1719, LMA 1798, LMA 1602, LMA 1792 e LMA 1674. Os dados da Tabela 2 apresentam os valores médios de inibição do crescimento bacteriano de XAC

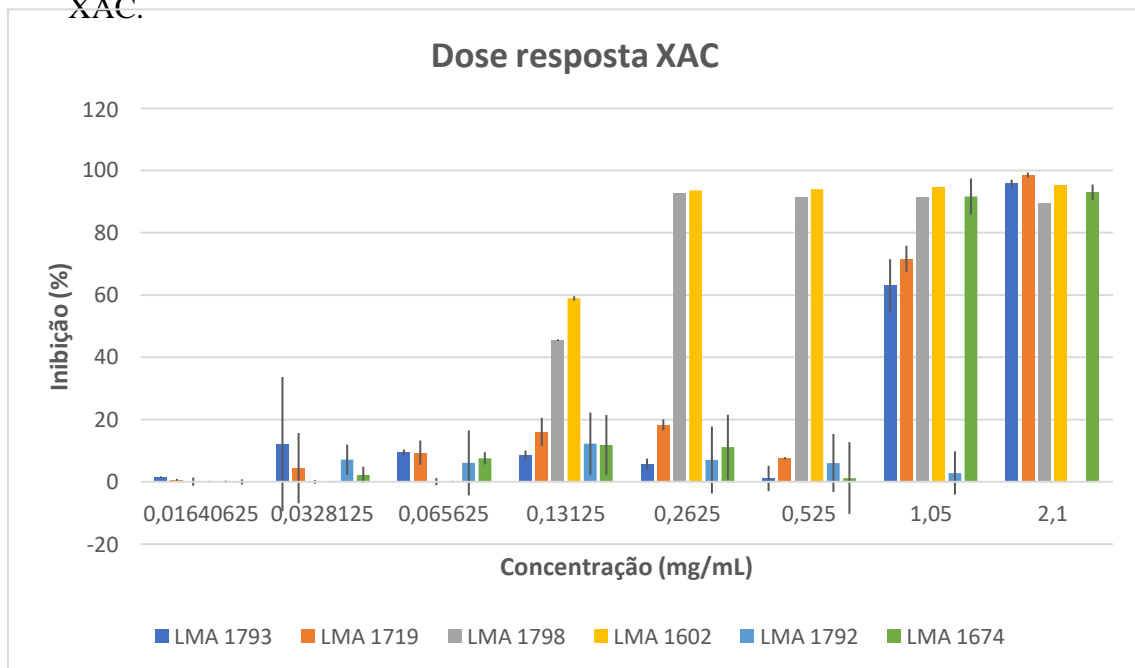
**Tabela 2.** Relação da média da inibição bacteriana (%) nas diferentes concentrações (mg/mL).

Concentração mg/mL	LMA 1793	LMA 1719	LMA 1798	LMA 1602	LMA 1792	LMA 1674
2,1	95,81988	98,55113	89,52221	95,32341	0,010286	93,02215

<b>1,05</b>	63,01297	71,62913	91,53764	94,5142	2,81126	91,6491
<b>0,525</b>	1,081555	7,497597	91,54115	93,97584	6,02762	1,14328
<b>0,2625</b>	5,713618	18,24181	92,77291	93,56628	6,995517	11,09701
<b>0,13125</b>	8,453199	16,00226	45,50658	58,92338	12,24312	11,88197
<b>0,065625</b>	9,373871	9,313557	0	0	6,052783	7,502946
<b>0,032813</b>	12,08623	4,337025	0	0	7,067746	2,169086
<b>0,016406</b>	1,439552	0,553087	0	0	0	0

Fonte: Dados do Trabalho

**Figura 3.** Gráfico da dose resposta dos extratos dos isolados LMA 1793, LMA1719, LMA 1798, LMA 1602, LMA 1792 e LMA 1674 em relação a bactéria XAC.



Fonte: Dados do Trabalho

No bioensaio foi possível analisar que um dos extratos (LMA 1792) não mostrou real biotividade contra XAC, enquanto os demais (LMA 1793, LMA 1719, LMA 1798, LMA 1602, LMA e LMA 1674) obteve valores acima de 89%. Os extratos dos isolados LMA 1798 e LMA 1602 apresentaram bioatividade acima de 90% para concentrações menores e é possível observar na Figura 1 que para estes extratos houve um decaimento de inibição menos acentuado com a diminuição da concentração, mostrado que para estes extratos há sim uma relação dose resposta, enquanto que para

os outros extratos há um decaimento de atividade mais acentuado conforme ocorre a diminuição da concentração.

#### **4.3 Concentração Inibitória (CI 90) dos extratos para XAC**

A partir do gráfico de dose resposta obtido foi possível traçar curvas de regressão linear para cada extrato obtendo-se uma equação polinomial de quarta ordem. Esta equação foi usada para o cálculo das concentrações inibitórias de 90 % do crescimento bacteriano (CI90) de cada um dos extratos. Os valores estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3** :CI90 dos extratos dos isolados LMA 1793, LMA 1719, LMA 1798,LMA 1602 e 1674, em relação à XAC (em mg/ml).

Extratos	CI90
LMA 1793	1.1588
LMA 1719	1.1107
LMA 1798	0.3142
LMA 1602	0.2678
LMA 1674	1.0453

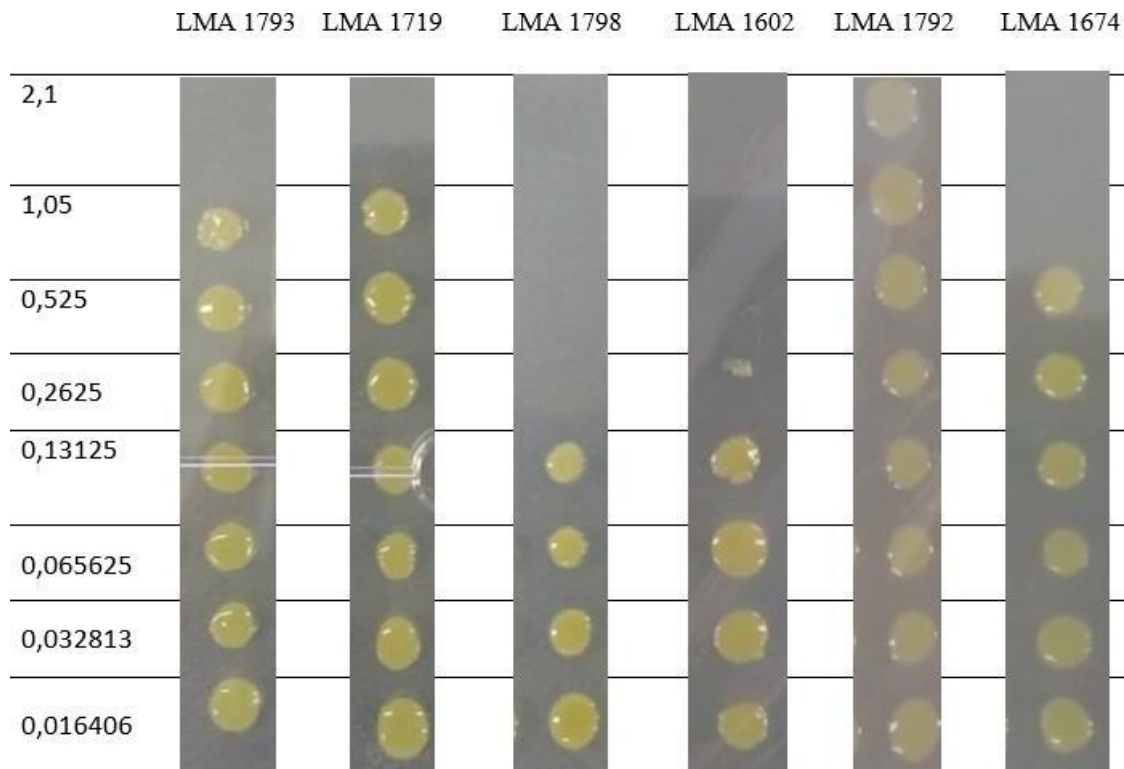
Fonte: Dados do Trabalho

Dos extratos testados, o extrato do isolado LMA 1602 apresentou o menor valor de IC90, seguido do extrato de LMA 1798. Os extratos dos isolados LMA 1793, LMA 1719 e LMA 1674 apresentam concentrações consideravelmente elevadas em relação aos outros dois extratos.

#### **4.4 Concentração Bactericida Mínima (CBM) para XAC**

Os extratos considerados positivos foram testados quanto a sua atividade bactericida, sendo possível então determinar a mínima concentração na qual o extrato possui características bactericidas. Os resultados obtidos neste bioensaio podem ser observados na Figura 4.

**Figura 4.** Concentração bactericida mínima de cada extrato bruto em relação aXAC e suas concentração (em mg/mL).



Fonte: Dados do Trabalho

Os extratos dos fungos LMA 1793 e LMA 1719 mostraram-se, na concentração máxima testada (2,1 mg/L) apresentaram atividade bactericida. O extrato do isolado LMA 1798 mostrou-se bactericida para as 4 primeiras concentrações, enquanto o extrato do fungo LMA 1602 mostrou atividade bactericida apenas nas 3 primeiras, LMA1674 mostrou atividade bactericida nas duas primeiras e LMA 1792 não se mostrou bactericida em nenhuma concentração, apresentando então caráter bacteriostático nas concentrações testadas.

#### 4.5 Reavaliação da atividade inibitória dos extratos brutos para XAEU

Foram testados, em triplicata e em 3 eventos diferentes, os extratos que obtiveram resultados considerados positivos, com inibição superior a 90% para a XAEU. A tabela 4 e a figura 5 apresentam os resultados obtidos no bioensaio completo contra a XAEU, realizado com oito extratos bioativos produzidos pelos fungos LMA 1719, LMA1602, LMA 1793, LMA 1798, LMA 1715, LMA 1696, LMA 1697 e LMA 1701. Os dados da Tabela 1 apresentam os valores médios de inibição do crescimento bacteriano de

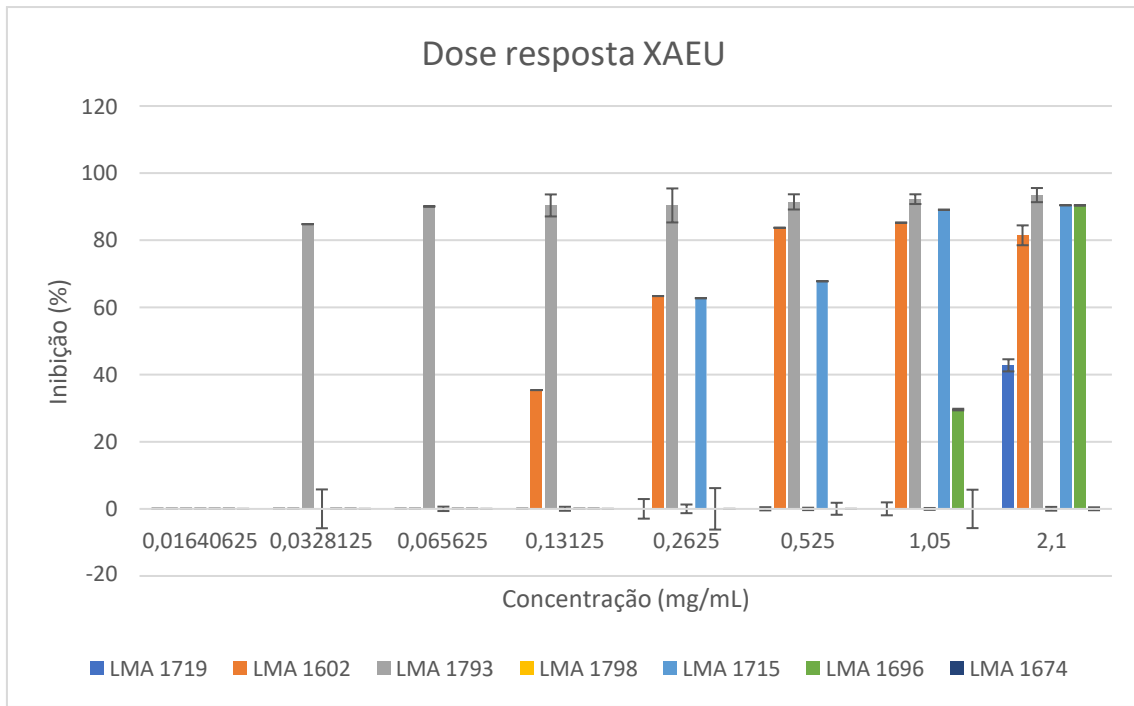
XAEU.

**Tabela 4.** Relação da média da inibição bacteriana (%) nas diferentes concentrações (mg/mL).

Concentração mg/mL	LMA 1719	LMA 1602	LMA 1793	LMA 1798	LMA 1715	LMA 1696	LMA 1674	LMA 1701
<b>2,1</b>	90,7827 6	42,7271 4	87,4547 1	93,4317 2	0	90,43 086	90,40 963	0
<b>1,05</b>	89,0864 4	0	85,1998 8	92,2240 4	0	89,06 497	20,09 894	0
<b>0,525</b>	88,6690 2	0	83,6896 4	91,4055 4	0	67,79 006	0	0
<b>0,2625</b>	0	0	69,5786 9	90,355	0	62,70 976	0	0
<b>0,13125</b>	0	0	35,3660 9	90,3621 2	0	0	0	0
<b>0,065625</b>	0	0	0	90,0628 8	0	0	0	0
<b>0,032813</b>	0	0	0	84,7910 9	0	0	0	0
<b>0,016406</b>	0	0	0	0	0	0	0	0

Fonte: Dados do Trabalho

**Figura 5.** Gráfico da dose resposta dos extratos dos isolados LMA 1719, LMA 1602, LMA 1793, LMA 1798, LMA 1715, LMA 1696, LMA 1697 e LMA 1701 em relação a bactéria XAEU



Fonte: Dados do Trabalho

No bioensaio foi possível analisar que tres dos extratos (LMA 1602, LMA 1715e LMA 1701) não mostrou real biotividade contra XAEU, um deles (LMA 1793) obtiveram valores inferiores a 90% e os demais (LMA 1719, LMA 1798, LMA 1696 e LMA 1674) mostraram efetiva bioatividade, com valores acima de 90%. O extrato do isolado LMA 1798 apresentou bioatividade acima de 90% para concentrações menores eé possível observar na Figura 6 que para este extrato houve um decaimento de inibição menos acentuado com a diminuição da concentração, mostrado que para este extrato há sim uma relação dose resposta, enquanto que para os outros extratos há um decaimento de atividade mais acentuado conforme ocorre a diminuição da concentração

#### 4.6 Concentração Inibitória (CI 90) dos extratos extratos para XAEU

A partir do gráfico de dose resposta obtido foi possível traçar curvas de regressão linear para cada extrato obtendo-se uma equação polinomial de quarta ordem. Esta equação foi usada para o cálculo das concentrações inibitórias de 90 % do crescimento bacteriano (CI90) de cada um dos extratos positivos reavaliados. Os valores estãoapresentados na

Tabela 5.

**Tabela 5:** CI90 dos extratos dos isolados LMA 1719, LMA 1793, LMA 1798, LMA 1696 e 1674, em relação à XAEU (em mg/ml).

<b>Extratos</b>	<b>CI90</b>
LMA 1719	1,05227
LMA 1793	2,0321
LMA 1798	0,13073
LMA 1696	2,08193
LMA 1674	2,10277

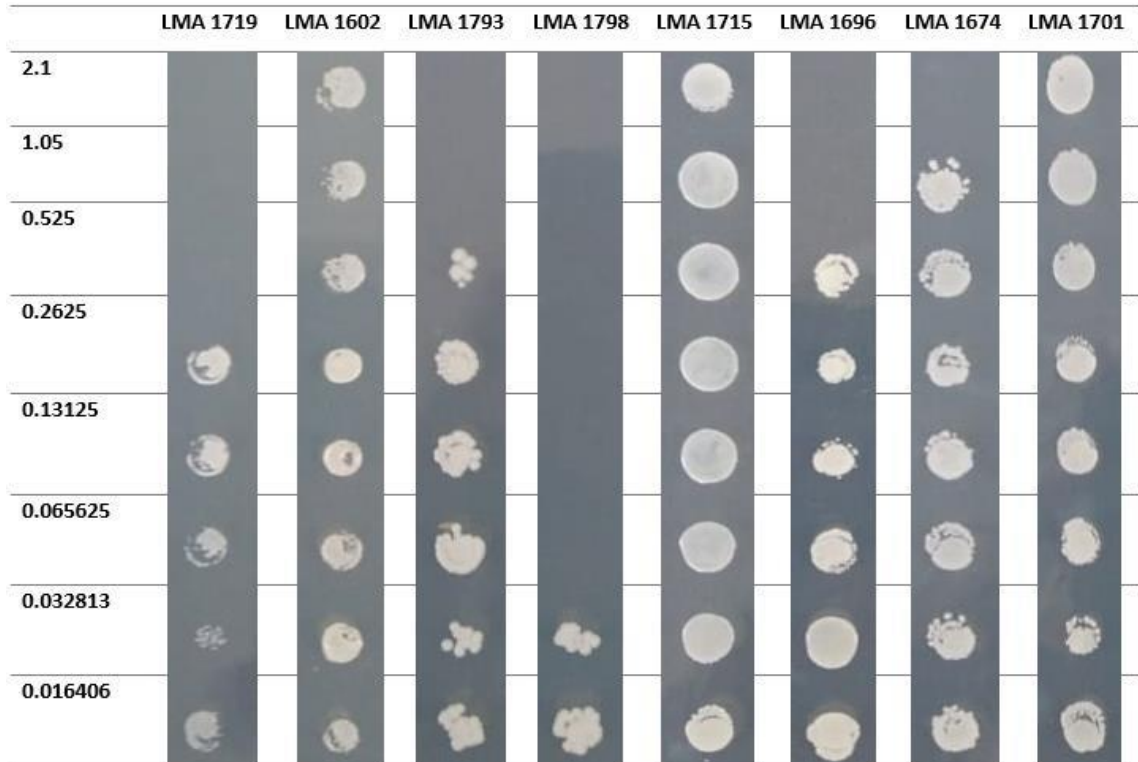
Fonte: Dados do Trabalho

Dos extratos testados, o extrato do isolado LMA 1798 apresentou o menor valor de IC90, seguido do extrato de LMA 1719. Os extratos dos isolados LMA 1793, LMA 1696 e LMA 1674 apresentam concentrações consideravelmente elevadas em relação aos outros dois extratos.

#### **4.7 Concentração Bactericida Mínima (CBM) para XAEU**

Os extratos considerados positivos foram testados quanto a sua atividade bactericida, sendo possível então determinar a mínima concentração na qual o extrato possui características bactericidas. Os resultados obtidos neste bioensaio podem ser observados na Figura 6.

**Figura 6.** Concentração bactericida mínima de cada extrato bruto em relação a XAEU e suas concentração (em mg/mL).



Fonte: Dados do Trabalho

O extrato do fungo LMA 1674 mostrou-se, na concentração máxima testada (2,1 mg/L), atividade bactericida. Os extratos dos isolados LMA 1793 e LMA 1696 mostrou-se bactericida para as 2 primeiras concentrações, LMA 1719 nas 3 primeiras concentrações e LMA 1798 mostrou a atividade bactericida para as 6 primeiras concentrações. LMA 1602, LMA 1715 e LMA 1701 não se mostrou bactericida em nenhuma concentração.

#### 4.8 Reavaliação da atividade inibitória dos extratos brutos para XAMH

Foram testados, em triplicata e em 3 eventos diferentes, os extratos que obtiveram resultados considerados positivos, com inibição superior a 90% para a XAMH. A tabela 6 e a figura 7 apresentam os resultados obtidos no bioensaio completo contra a XAMH, realizado com quatro extratos bioativos produzidos pelos fungos LMA 1719, LMA 1602, LMA 1793 e LMA 1798. Os dados da Tabela 6 apresentam os valores médios de inibição do crescimento bacteriano de XAMH.

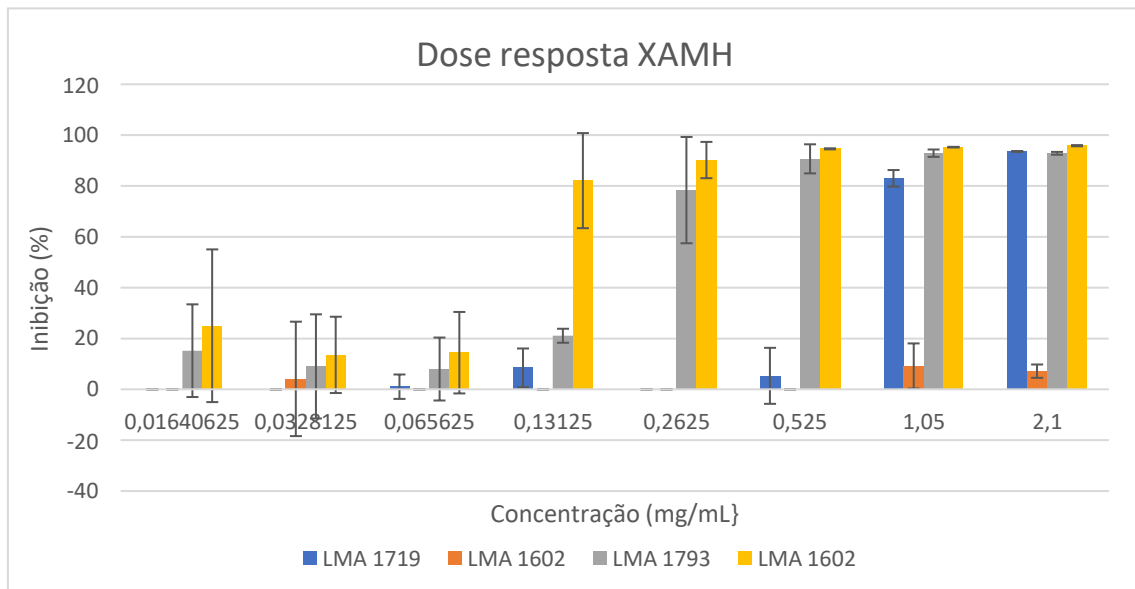
**Tabela 6.** Relação da média da inibição bacteriana (%) nas diferentes concentrações (mg/mL).

Concentração mg/mL	LMA 1719	LMA 1602	LMA 1793	LMA 1798
-----------------------	-------------	-------------	-------------	-------------

<b>2,1</b>	93,57182	7,155863	92,86912	95,82872
<b>1,05</b>	82,95949	9,210814	92,89719	95,22844
<b>0,525</b>	5,262518	-1,66202	90,64257	94,56552
<b>0,2625</b>	-6,22104	-5,67268	78,33326	90,19491
<b>0,13125</b>	8,463876	-0,25318	21,08082	82,08147
<b>0,065625</b>	1,009277	-3,54209	8,003261	14,42619
<b>0,032813</b>	-12,3474	4,094643	9,015059	13,54888
<b>0,016406</b>	-14,449	-3,7803	15,20458	25,02194

Fonte: Dados do Trabalho

**Figura 7.** Gráfico da dose resposta dos extratos dos isolados, LMA 1719, LMA 1602, LMA 1793 e LMA 1798 em relação a bactéria XAMH.



Fonte: Dados do Trabalho

No bioensaio foi possível analisar que um dos extratos (LMA 1602) não mostrou real biotividade contra XAMH, e os demais (LMA 1719, LMA 1793 e LMA 1798) mostraram efetiva bioatividade, com valores acima de 90%. O extrato do isolado LMA 1798 e LMA 1793 apresentaram bioatividade acima de 90% para concentrações menores e é possível observar na Figura 7 que para estes extratos houve um decaimento de inibição menos acentuado com a diminuição da concentração, mostrando que para estes extratos há sim uma relação dose resposta, enquanto que para os outros extratos há um decaimento de atividade mais acentuado conforme ocorre a diminuição da concentração.

#### 4.9 Concentração Inibitória (CI 90) dos extratos para XAMH

A partir do gráfico de dose resposta obtido foi possível traçar curvas de regressão linear para cada extrato obtendo-se uma equação polinomial de quarta ordem. Esta equação foi usada para o cálculo das concentrações inibitórias de 90 % do crescimento bacteriano (CI90) de cada um dos extratos positivos reavaliados. Os valores estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7:** CI90 dos extratos dos isolados LMA 1719, LMA 1793 e LMA 1798, em relação à XAMH (em mg/ml).

Extratos	CI90
LMA 1719	1,08067
LMA 1793	0,46125
LMA 1798	0.22878

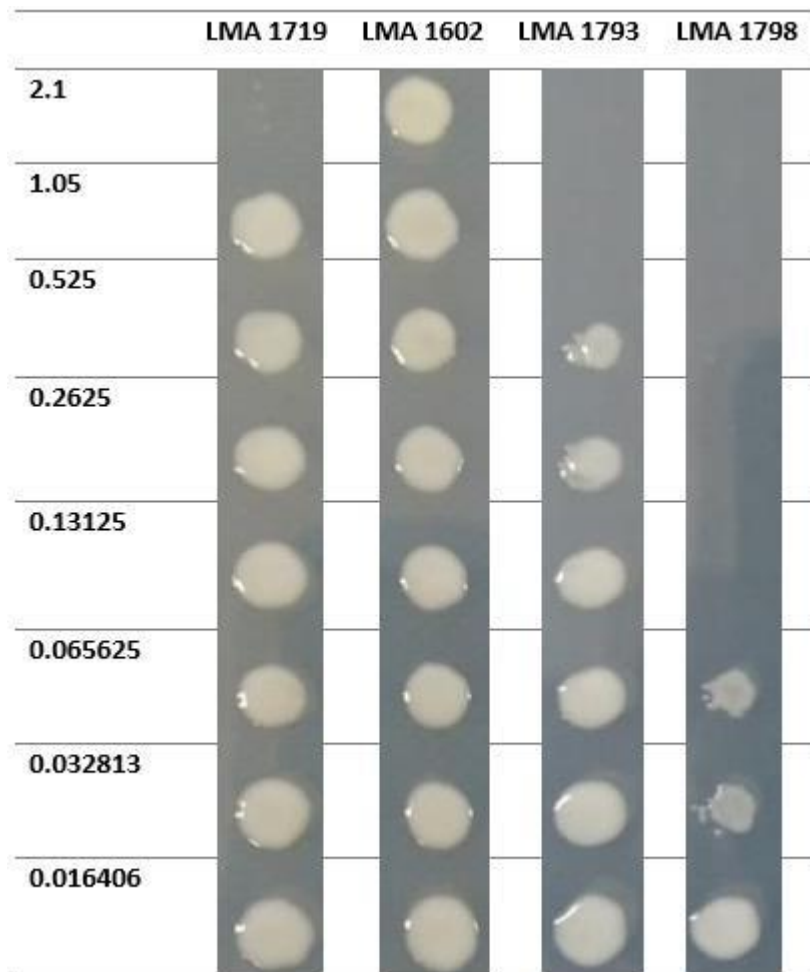
Fonte: Dados do Trabalho

Dos extratos testados, o extrato do isolado LMA 1798 apresentou o menor valor de IC90, seguido do extrato de LMA 1793. O extrato do isolado LMA 1719 apresentou concentração consideravelmente elevadas em relação aos outros dois extratos.

#### 4.10 Concentração Bactericida Mínima (CBM) para XAMH

Os extratos considerados positivos foram testados quanto a sua atividade bactericida, sendo possível então determinar a mínima concentração na qual o extrato possui características bactericidas. Os resultados obtidos neste bioensaio podem ser observados na Figura 8.

**Figura 8.** Concentração bactericida mínima de cada extrato bruto em relação a XAMH e suas concentração (em mg/mL).



Fonte: Dados do Trabalho

O extrato do fungo LMA 1719 mostrou-se, na concentração máxima testada (2,1 mg/L) atividade bactericida. O extrato do isolado LMA 1793 mostrou-se bactericida para as 2 primeiras concentrações, enquanto o extrato do fungo LMA 1798 mostrou atividade bactericida apenas nas 5 primeiras e LMA 1602 não se mostrou bactericida em nenhuma concentração.

## 5 CONCLUSÃO

Dos 34 extratos brutos testados no primeiro bioensaio, seis mostraram-se inibição celular acima de 90% contra a XAC, oito para XAEU e quatro para XAMH. Quatro deles mostraram inibição celular acima de 90% para as 3 espécies.

Com os resultados do ensaio preliminar da XAC, e um bioensaio completo em triplicata e três eventos diferentes, cinco dos seis extratos mostraram valores similares ou superiores ao controle positivo utilizado nos testes, o que revela um real potencial dos compostos presentes nos extratos para o controle do fitopatógeno, um dos compostos, no entanto, não mostrou ação bactericida.

Com os resultados do ensaio preliminar da XAEU, e um bioensaio completo em triplicata e três eventos diferentes, cinco dos oito extratos testados mostraram valores similares ou superiores ao controle positivo utilizados nos testes, o que revela um real potencial dos compostos presentes nos extratos para o controle do fitopatogeno, os outros 3 compostos nao mostraram ação bactericida

Com os resultados do ensaio preliminar da XAMH, e um bioensaio completo em triplicata e em três eventos diferentes, três dos quatros extratos testados mostraram valores similares ou superiores ao controle positivo utilizados nos testes, o que revela um real potencial dos compostos presentes nos extratos para o controle do fitopatogeno, um composto não mostrou ação bactericida

Com a finalização dos bioensaios completos, foi possível observar que três desses compostos, mostraram bioatividade acima de 90% para as três espécies diferentes, com uma superioridade do extrato LMA 1798 sobre os outros, tendo bioatividade em concentrações mais baixas.

## REFERÊNCIAS

- APS, The American Phytopathological Society. Disponível em: <<https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/prokaryotes/Pages/BacterialSpotPort.aspx>> Acesso em: Dezembro 2017.
- DAYAN FE, CANTRELL CL, DUKE SO. Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 17, p. 4022-4034, 2009.
- 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.
- ENCHEVA-MALINOVA, M., VANCHEVA, T., BADZHINEROV, N., KOLEVA, V., TISHKOV, S., BOGATZEVSKA, N., MONCHEVA, P. Antimicrobial activity of Antarctic streptomycetes against pepper bacterial spot causing agents. *First National Conference of Biotechnology - Sofia*. v. 100, p. 216-222, 2015.
- FUNDECITRUS, Fundo de defesa da agricultura, 2017. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro/7>
- JONES, J.B., LACY, G.H., BOUZAR, H., STALL, R.E. e SCHAAD, N.W. Reclassification of the *Xanthomonads* Associated with Bacterial Spot Disease of Tomato and Pepper, *System. Appl. Microbiol.* v. 27, p. 755–762, 2004.
- KHIRALLA, A. et al. A pilot study of antioxidant potential of endophytic fungi from some Sudanese medicinal plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 8, p. 701-704, 2015.
- KRINGS, M. et al. 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.
- KUHN, O.J., PORTZ, R.L, STANGARLIN, J.R, Del ÁGUILA, R.M., SCHWAN-ESTRADA, K.R.F., FRANZENER, G. Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 27, n. 1, p. 13- 20, jan./mar. 2006
- LOPES, C. A. Controle de fitobacterioses. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.23, supl., p.202- 203, 1998.
- LORENZI, H. E.; MATOS, F. J. A. *Plantas medicinais no Brasil/ Nativas e exóticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.
- 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.
- MASSOLA JUNIOR, N. S.; BEDENDO, I. P. Doenças da mandioca, In: KIMATI, H.;

AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p.501-503.

MIURA, L.; MONTEIRO, A. J. A. Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) – Controle de doenças. In: VALE, F. X.R.; ZAMBOLIM, L. Controle de Doenças de Plantas: grandes Culturas. Viçosa: UFV, 1997. v. 2, p.791-814.

MURATE LS, OLIVEIRA AG, HIGASHI AY, BARAZETTI AR, SIMIONATO AS, SILVA CS, SIMÕES GC, SANTOS IMO, FERREIRA MR, CELY MVT, NAVARRO MOP, FREITAS VF, NOGUEIRA MA, 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.

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

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

PATIL AS. 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.

PERUCH, L.A, COLARICCIO, A., NEUBERT, E.O, MORETO, A.L, PEREIRA, E.F. Sintomas e Controle das principais doenças da mandioca em Santa Catarina. *Revista Agropecuária Catarinense*. Florianópolis, v.26, n.2, p.52-54, jul 2013.

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

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.

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

em:

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

RYAN, R.P., VORHÖLTER, F.J., POTNIS, N., JONES, J.B., SLUYS, V., BOGDANOVA, A.J., DOW, J.M. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding

bacterium-plant interactions. *Nature Reviews Microbiology*. v. 9, p. 344-355, 2011.

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

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. *Fitopatologia Brasileira*, Fortaleza, v.28, supl.,p.554-556. 2003.

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

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.

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.

VAZ ABM et al. Fungal endophyte  $\beta$ -diversity associated with Myrtaceae species in an Andean Patagonian forest (Argentina) and an Atlantic forest (Brazil). *Fungal ecology*, v. 8, p. 28-36, 2014.

VIANA, F.M.P., FREIRE, F.C.O., PARENTE, G.B. Controle das Principais Doenças do Pimentão Cultivado nas Regiões Serranas do Estado do Ceará, Comunicado técnico Embrapa, Fortaleza, CE, 2007. *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*, United Kingdom, v. 3, n. 2, p. 75-93, 2008.