

JULIANO HENRIQUE FERRAREZI

**FUNGOS DO SOLO DA ANTÁRTIDA: PRODUÇÃO DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS BIOATIVOS CONTRA
XANTHOMONAS CITRI SUBSP. *CITRI***

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

2016

589.2 Ferrarezi, Juliano Henrique
F374f Fungos do solo da Antártida : produção de metabólitos secundários bioativos contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri* / Juliano Henrique Ferrarezi. - Rio Claro, 2016
33 f. : il., figs., tabs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientadora: Daiane Cristina Sass

1. Fungos. 2. Inibição de crescimento. 3. Cancro cítrico. 4. Resazurina. 5. Bioensaio. I. Título.

Agradecimentos

Agradeço à minha família pelo total apoio a mim. Aos meus pais, Rita e Valdecir, que são minha base, meus exemplos de vida e que sempre estiveram junto a mim em todos os momentos. E ao meu irmão, João Vitor, pelos momentos de descontração.

Aos amigos de casa André, Daniel, Lucas, Luíza, Otávio e Isadora sempre pacientes e atenciosos, se mantiveram ao meu lado em todos os momentos e me ajudaram a crescer como pessoa. Obrigado pelas experiências incríveis pelos inúmeros momentos de descontração, que me mantiveram seguro.

Às amigas Gabriela, Gabriella, Jéssica, Júlia e Lila por todos os momentos que passamos juntos, histórias que criamos e jamais serão esquecidas. Sem vocês a graduação não seria a mesma, guardo todas no coração.

Aos amigos de graduação, que em muitos momentos foram de extrema importância no aprendizado tanto no curso em si quanto nas questões da vida. Não me disponho a lista-los por medo de deixar alguém de fora, mas todos tiveram sua importância em minha vida.

À Professora Doutora Daiane Cristina Sass pela paciência e por me ensinar sobre microbiologia, além do incentivo, atenção e dedicação. Sempre disposta a me ajudar no que fosse necessário, com ela aprendi que é possível seguir vida acadêmica de forma madura e responsável.

Aos parceiros de laboratório, Gabriela, Jelena, Leonardo e Mariana, pelo apoio e companhia. Nada como ter alguém na mesma situação para poder compartilhar os momentos.

À Luana e Lúcia do Laboratório de Genética de Bactérias da UNESP Rio Claro pela total disposição, ajuda, ensinamentos e paciência que fizeram este projeto se tornar possível.

À Marina do Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial da UNESP Rio Claro pelo suporte e por ter cedido os fungos utilizados neste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro.

“[...]Se me fosse dado um dia, outra oportunidade,
eu nem olhava o relógio.
Seguiria sempre em frente e iria jogando pelo caminho
a casca dourada e inútil das horas.
Seguraria o amor que está a minha frente e diria que eu o amo.
E tem mais: não deixe de fazer algo de que gosta devido à falta de tempo.
Não deixe de ter pessoas ao seu lado por puro medo de ser feliz.
A única falta que terá será a desse tempo que,
infelizmente, nunca mais voltará.”

(MARIO QUINTANA, O Tempo)

Resumo

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. Atualmente o controle da doença inclui o uso de pulverizações das árvores com compostos bactericidas contendo cobre e a erradicação de plantas contaminadas. Entretanto, estas medidas causam uma grande perda de quantidade de árvores e impacto ambiental devido à acumulação de cobre no ambiente. Dessa maneira, torna-se necessário a busca de maneiras sustentáveis de combate ao cancro cítrico. Neste contexto, os metabólitos secundários tem despertado grande interesse como possíveis alternativas aos produtos químicos, apresentando, em muitos estudos, grande potencial para a aplicação no controle de pragas na agricultura. Suspeita-se que metabólitos secundários ainda desconhecidos possam ser produzidos por fungos que vivem em ambientes extremos como a Antártica. Este projeto teve como objetivo investigar a potencial atividade de metabólitos secundários, produzidos por fungos isolados de amostras do solo abaixo de barra de ferro na Ilha Deception na Antártica, contra a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, causadora do cancro cítrico em frutas cítricas. Após a extração dos metabólitos intracelulares e extracelulares por compostos químicos, foram testados via REMA para comprovar a bioatividade do extrato no desenvolvimento bacteriano. Ao final do projeto obtivemos 44 extratos, dos quais 7 apresentaram bioatividade significativa contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

Palavras-chave: Cancro cítrico. *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Fungos da Antártica

Abstract

The citrus canker, caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, is a disease that attacks all species and varieties of commercially important citrus. Brazil as one of the world's leading producers of orange and have a favorable climate for the development of bacteria suffer significant economic losses because of citrus canker. Currently, the control of the disease includes the use of spraying of trees with bactericidal compounds containing copper and eradication of infected plants. However, these measures cause a large loss in quantity of trees and environmental impact due to accumulation of copper in the environment. Thus, it becomes necessary to search for sustainable ways to combat citrus canker. In this context, secondary metabolites has aroused great interest as alternatives to chemicals, with, in many studies, great potential for application in pest control in agriculture. It is suspected that as yet unknown secondary metabolites can be produced by fungi that live in extreme environments such as Antarctica. This project aims to investigate the potential activity of secondary metabolites produced by fungi isolated from soil samples under iron bar at Deception Island in Antarctica, against the bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, which causes citrus canker in citrus fruits. After extraction of intracellular and extracellular metabolites by chemicals, they were tested by REMA to prove the bioactivity of the extract in bacterial development. Lastly, we obtained 44 extracts, of which 7 presented significant bioactivity against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

Keywords: Citrus Canker. *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Antarctica Fungi.

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO	8
1.1	Agricultura Brasileira.....	8
1.2	<i>Xanthomonas</i> e o Cancro Cítrico.....	8
1.3	Metabólitos secundários e microrganismos da Antártica	10
2	OBJETIVOS	12
2.1	Objetivo Geral	12
2.2	Objetivos Específicos.....	12
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 de Atividade Contra <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	14
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1	Produção dos extratos	16
4.1.1	Extratos intracelulares.....	17
4.1.2	Extratos extracelulares.....	19
4.2	Testes REMA.....	20
5	CONCLUSÃO	27
6	REFERÊNCIAS.....	29

1 INTRODUÇÃO

1.1 Agricultura Brasileira

O setor agrícola apresenta cada vez mais importância para a economia brasileira. Entretanto o crescimento da produção de insumos agrícolas no país tem sido limitado por alguns fatores. Além das condições climáticas, que estão cada vez mais instáveis, os agricultores enfrentam diferentes tipos de doenças causadas por vírus, fungos e bactérias que resultam em perdas e diminuição da qualidade de seus produtos (MICHEREFF, 2001).

O Brasil é o maior produtor de laranja do mundo. Essa liderança começou na década de 80, quando a produção da fruta se alinhou a produção industrial e ao mesmo tempo os Estados Unidos, até então maiores produtores da fruta, passaram por uma série de geadas, diminuindo sua produção (AMORIM, 2015). Desde então o Brasil não para de aumentar suas plantações e encontra-se na liderança da produção da fruta sendo responsável por 30% da produção da fruta (NEVES, 2011).

Sua produção está distribuída por todas as regiões do país, embora haja uma hegemonia da Região Sudeste. O Estado de São Paulo se destaca, onde os pomares apresentam forte concentração de laranjeiras (ALMEIDA e PASSOS, 2011) sendo este estado sozinho o responsável por cerca de 80% da produção nacional. Assim como muitas outras culturas, a citricultura é diretamente afetada pelas mais diversas doenças, as quais além de comprometer a produtividade dos pomares (SANCHES et al., 2014), exigem investimentos em prevenção e controle que causam impactos diretamente na rentabilidade do citricultor e na economia do país.

1.2 *Xanthomonas* e o Cancro Cítrico

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).

Estes bacilos atacam 124 espécies de monocotiledôneas e 268 de dicotiledôneas, muitas dessas espécies possuem grande valor econômico, como feijão, tomate, cana, trigo e cítricos (LEYNS et al., 1984).

A grande maioria das bactérias do gênero *Xanthomonas* são consideradas fitopatogênicas e podem ser encontradas em plantas de todo o mundo (BRADBURY, 1994).

Sua entrada nas plantas pode se dar pelos estômatos ou por ferimentos, sua multiplicação ocorre no mesófilo e parênquima (espaços intercelulares) de frutos e folhas, causando futuras lesões necróticas, sendo o Cancro Cítrico uma destas doenças.



Figura 1. Lesões em frutos e folhas provocadas pelo cancro cítrico (FUNDECITRUS).

O cancro cítrico é uma doença que ataca todas as variedades e espécies de citros, e suas lesões podem ser encontradas nas folhas, frutos e ramos (Figura 1). A doença é causada pelo agente etiológico *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Figura 2) sendo um dos principais problemas fitossanitários na cultura de citros no Brasil (SANCHES et al., 2014).

No cancro cítrico as bactérias se multiplicam localmente apenas no ponto que penetraram no tecido vegetal, de onde liberam enzimas que degradam as células das plantas para obtenção de nutrientes. A temperatura é um fator importante para este processo, sendo que a faixa mais favorável para a colonização é de 25 °C a 35 °C (FUNDECITRUS).

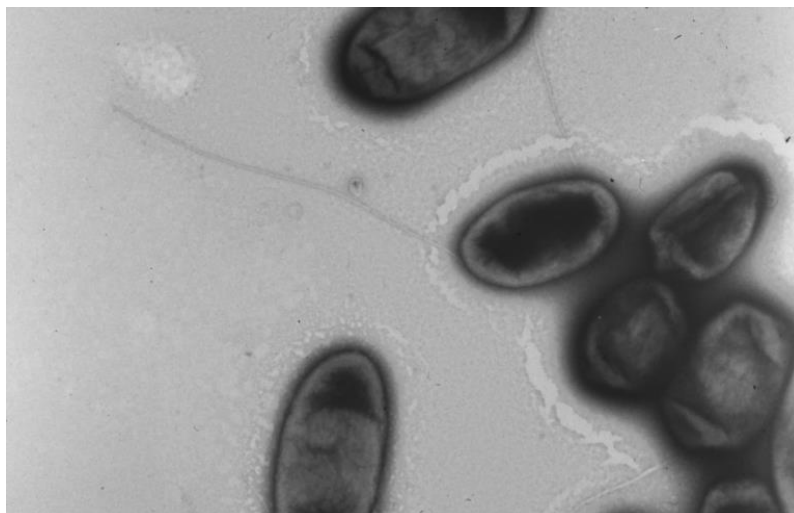


Figura 2. *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. FONTE: Florida Division of Plant Industry , Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Bugwood.org

O controle do cancro cítrico atualmente tem sido realizado através de pulverizações das árvores com compostos bactericidas contendo cobre e a erradicação de plantas contaminadas (CANTEROS, 2005), causando uma grande perda de quantidades de árvores (SANCHES et al., 2014) e acúmulo de cobre no ambiente.

Assim, a busca por novas alternativas de controle para o cancro cítrico, principalmente que sejam menos nocivas ao meio ambiente, vem se tornado cada vez mais frequente no Brasil e em outros países onde a doença também causa grandes prejuízos (PEIXOTO NETO et al., 2002; FRAVEL, 2005). Por estas razões, tem sido proposto o uso de antagonistas ou de metabólitos secundários como uma estratégia promissora para a proteção da planta (MURATE et al., 2015).

1.3 Metabólitos secundários e microrganismos da Antártica

Como todos os seres vivos, os microrganismos possuem seus respectivos metabolismos, e conseqüentemente seus próprios subprodutos vindos destes metabolismos. A produção destas 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), sendo os primários relacionados ao crescimento e reprodução enquanto os secundários relacionados às respostas ao stress e à competição encontrados no ambiente em que o microrganismo está estabelecido (KNIGHT et al., 2006).

Os fungos tem a capacidade de produzir metabólitos secundários com estruturas químicas altamente diversas (FEHÉR e SCHMIDT, 2003). Sendo a descoberta da penicilina foi o marco da aplicação de metabólitos secundários fúngicos na medicina (BUGNI e IRELAND, 2004). Nos últimos anos mais de 50 mil produtos naturais foram descobertos a partir de microrganismos, dentre os quais 10 mil são biologicamente ativos (NEWMAN e CRAGG, 2012).

Na agricultura metabólitos secundários oriundos de microrganismos têm sido empregados com fins fitossanitários e vários deles já são disponíveis comercialmente na forma de inseticidas (avermectinas, espinosinas-Entrust™; azadiractina, etc.), fungicidas (polioxorim-Endorse™; tomilho-Sporan™ e Promax™), bactericidas (estreptomicina-Agrimycin™) e herbicidas (bialafos, óleos essenciais cravo, etc.) (DAYAN et al., 2009).

Com relação aos estudos relacionando a utilização de metabólitos secundários produzidos por microrganismos contra o cancro cítrico é possível verificar que alguns microrganismos vêm produzindo metabólitos secundários com ação significativa contra a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (MURATE et al., 2015; DE OLIVEIRA et al., 2011, LOPES et al., 2012; VASCONCELLOS et al., 2014).

Suspeita-se que novas espécies microbianas e novos metabólitos secundários podem ser identificados investigando microrganismos provenientes de ambientes extremos ou inexplorados como o continente antártico (PIKUTA et al., 2007; FURBINO et al., 2014), o qual apresenta condições climáticas extremas e constitui um dos ambientes mais inóspitos do planeta. Devido a estes fatores os microrganismos presentes neste continente desenvolveram adaptações que possibilitaram a sua permanência em condições extremófilas (CLARKE, 2003), estas adaptações podem proporcionar aos microrganismos um grande potencial biotecnológico com produção de compostos naturais de valor agregado (PIKUTA et al., 2007; RAGUENES et al., 1997).

Há alguns estudos reportados recentemente na literatura (SVAHN et al., 2015; FURBINO et al., 2014; SANTIAGO et al., 2012) que evidenciam o potencial de fungos do ambiente Antártico em produzir metabólitos secundários bioativos de interesse tanto na medicina quanto na agricultura.

Em 2002 foi reportado um estudo que demonstrou a atividade antibacteriana de actinobactérias isoladas do solo da Antártica contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, *X. vesicatoria*, *X. axonopodis* pv. *phaseol*, causadoras respectivamente de doenças nas culturas de soja, tomate e feijão (MONCHEVA et al., 2002). Em 2005 NEDIALKOVA e

NAIDENOVA relataram a atividade de actinobactérias *isoladas* do solo da Antártica contra bactérias e fungos fitopatógenos.

Estudos mais recentes (MALINOVA et al., 2015; MALINOVA et al., 2014) 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.

Entretanto há certa escassez de estudos relacionados ao conhecimento sobre metabólitos secundários produzidos por microrganismos isolados do ambiente antártico, e suas atividades biológicas principalmente envolvendo atividades de interesse agrônomo. Dessa maneira, torna-se importante e necessário a exploração desses microrganismos buscando novos compostos bioativos, que possam contribuir para o setor agrícola, meio ambiente e saúde.

Considerando a necessidade atual de novas alternativas no controle do cancro cítrico na cultura de citros, que visam substituir os produtos químicos ao mesmo tempo minimizar danos ao meio ambiente, o presente projeto veio contribuir para a descoberta de novos compostos produzidos por fungos do solo da Antártica que apresentem ação contra a bactéria causadora do cancro cítrico (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*). Assim este projeto poderá resultar na obtenção de extratos brutos com compostos potencialmente ativos contra a *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do projeto foi avaliar a atividade contra a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* de extratos brutos, contendo metabólitos secundários, produzidos por fungos provenientes de amostras do solo abaixo de barra de ferro coletados na Ilha de Deception - Antártica.

2.2 Objetivos Específicos

- Produção de metabólitos secundários por fermentação utilizando fungos provenientes de amostras do solo abaixo de barra de ferro coletados na Ilha de Deception na Antártica;
- Avaliação da atividade dos extratos brutos contra a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, causadora do cancro cítrico nas culturas de citros.

3 METODOLOGIA

3.1 Fungos

Os microrganismos estudados neste projeto (22 fungos filamentosos) são provenientes de amostras do solo abaixo de barra de ferro (Figura 3) coletados na Ilha de Deception na Antártica por Alysson Wagner Fernandes Duarte sob orientação da Prof.^a Dr.^a Lara Durães Sette (UNESP, Rio Claro) durante expedição PROANTAR (OPERANTAR XXXII) realizada em novembro/dezembro de 2013 no âmbito do projeto INCT Criosfera (Coordenado pelo Prof. Jefferson Simões, UFRGS).



Figura 3. Solo sob Barra de Ferro na Ilha *Deception* (Antártica).
(Foto cedida por Alysson Wagner Fernandes Duarte)

Os microrganismos fazem parte do acervo de fungos da coleção de pesquisa da Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP) onde se encontram preservados por meio de ultracongelamento a -80°C . Os 22 fungos filamentosos que foram estudados no presente projeto apresentam os seguintes códigos: 1-Fe; 1.1-Fe; 2-Fe; 2.1-Fe; 3-Fe; 3.1-Fe; 4-Fe; 6-Fe; 7-Fe; 8-Fe; 10.1-Fe; 10.2-Fe; 10.3-Fe; 10.4-Fe; 10.A-Fe; 11-Fe; 12-Fe; A-Fe; B-Fe; C-Fe; D-Fe; G-Fe.

3.2 Obtenção de Extratos Brutos

3.2.1 Condições de Cultura para Fermentação em Shaker

Os fungos foram reativados em placa de petri com meio de cultura estéril composto de malte (2%) e ágar (1,5%) durante 10 dias a 15 °C em BOD (Biochemical Oxygen Demand). Após o crescimento, discos de aproximadamente 5 mm de meio + micélio foram transferidos para Erlenmeyer contendo meio líquido de malte (2%) (120 mL) e foram mantidos pelo período de 21 dias em shaker sob agitação constante (150 rpm) a 15 °C.

3.2.2 Processamento, Extração e Armazenamento do Extrato Bruto

Após crescimento dos fungos, a biomassa foi separada do sobrenadante através de filtração a vácuo.

Para a extração dos metabólitos secundários extracelulares foi realizado o seguinte procedimento: O sobrenadante foi submetido à extração líquido-líquido com acetato de etila, com auxílio de um liquidificador de inox a fim de otimizar a extração. A fase orgânica foi submetida à evaporação rotativa sob pressão reduzida, e a fase aquosa foi submetida à esterilização em autoclave e foi posteriormente descartada.

Para a extração dos metabólitos secundários intracelulares foi realizado o seguinte procedimento: a biomassa foi triturada com metanol e submetida à centrifugação. O sobrenadante obtido contendo os metabólitos secundários intracelulares foi concentrado em estufa à 30°C. A parte contendo o resíduo da biomassa foi submetida à esterilização em autoclave e foi posteriormente descartada.

3.3 Avaliação de Atividade Contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Os 22 extratos extracelulares e os 22 extratos intracelulares foram utilizados no bioensaio contra a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, causadora do cancro cítrico em frutas cítricas, através ensaio de microplaca com resazurina (REMA), conforme descrito na literatura (SILVA e FERREIRA, 2013).

Para avaliação da atividade antimicrobiana contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri* os extratos brutos secos e pesados foram dissolvidos em solução de Dimetilsulfóxido (DMSO) em água. Para extratos intracelular utilizamos DMSO na concentração 10%, enquanto para os extratos extracelulares utilizamos DMSO em concentração 30%. A quantidade da solução de

DMSO utilizada foi calculada individualmente de forma que a concentração final dos extratos atingisse valores entre 29 e 30 mg/ml.

Os estoques dos extratos foram diluídos em meio N diretamente nos micropoços da placa, de forma que a concentração de DMSO não ultrapassasse 1% (concentração do controle de veículo). A maior concentração dos extratos (2100 µg/ml) foi colocada na primeira linha (A), e em seguida foi realizada nas outras linhas a microdiluição seriada das amostras. Em seguida foi adicionado o inóculo bacteriano (padronizado em 105 UFC/poço) (Observação: as células bacterianas foram cultivadas em meio N a 29°C sob rotação de 200 rpm por 12 horas).

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

A Figura 4 apresenta um modelo de como foi adicionado as amostras na placa de 96 poços. As soluções (extrato + DMSO) foram adicionadas nas colunas de 2 a 9 nas linhas A e E (otimizando as placas para que fossem testados 16 extratos por placa) na fileira 10 foi adicionado Controle Positivo nas quatro primeiras linhas e do Veículo nas quatro últimas. Na fileira 11 foi adicionado o Controle Negativo, não foram adicionadas amostras nas fileiras 1 e 12 para evitar evaporação, neles foram adicionados apenas meio N.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100µL	200µL extr + 10µL bac	200µL extr + 10µL bac	200µL extr + 10µL bac	200µL extr + 10µL bac	200µL extr + 10µL bac	200µL extr + 10µL bac	200µL extr + 10µL bac	200µL extr + 10µL bac	CP kanamicina	CN	
B	100µL	90µL meio + 100µL extr + 10µL bac	90µL meio + 100µL extr + 10µL bac	90µL meio + 100µL extr + 10µL bac	90µL meio + 100µL extr + 10µL bac	90µL meio + 100µL extr + 10µL bac	90µL meio + 100µL extr + 10µL bac	90µL meio + 100µL extr + 10µL bac	90µL meio + 100µL extr + 10µL bac	CP kanamicina	CN	
C		90µL meio + 100µL extr + 10µL bac	90µL meio + 100µL extr + 10µL bac	90µL meio + 100µL extr + 10µL bac	90µL meio + 100µL extr + 10µL bac	90µL meio + 100µL extr + 10µL bac	90µL meio + 100µL extr + 10µL bac	90µL meio + 100µL extr + 10µL bac	90µL meio + 100µL extr + 10µL bac	CP kanamicina	CN	
D		90µL meio + 100µL extr + 10µL bac	90µL meio + 100µL extr + 10µL bac	90µL meio + 100µL extr + 10µL bac	90µL meio + 100µL extr + 10µL bac	90µL meio + 100µL extr + 10µL bac	90µL meio + 100µL extr + 10µL bac	90µL meio + 100µL extr + 10µL bac	90µL meio + 100µL extr + 10µL bac	CP kanamicina	CN	

Figura 4. Modelo de placa para avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos. CP (controle positivo); Canamicina; CV (controle do veículo);

As placas foram incubadas a 29°C por aproximadamente 16 horas e em seguida foi adicionada uma solução de resazurina (0,1mg/ml) para uma nova incubação a 29°C por aproximadamente 1 hora. A análise de atividade antibacteriana contra a *Xanthomonas citri* subsp. *citri* realizada pelo método REMA (resazurin microtiter assay), consiste em um ensaio de microtitulação com resazurina (C₁₂H₇NO₄), um corante que em presença de crescimento

bacteriano sofre redução, de azul com baixa fluorescência para coloração rósea e altamente fluorescente (resorufina) (Figura 5).

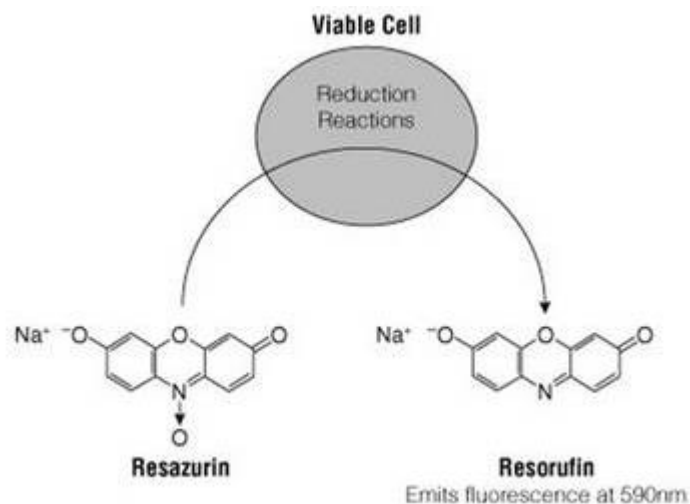


Figura 5. Conversão da rezasurina (corante não fluorescente) para a resorufina (corante fluorescente (disponível em: www.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/101/celltiter-blue-cell-viability-assay-protocol/)).

Dessa maneira, quanto menor o crescimento bacteriano menor será a redução da rezasurina em resorufina e conseqüentemente menor a leitura de fluorescência detectada.

Após este período foi realizada a medida da fluorescência através do aparelho SPECTRAfluor Plus (Tecan). A partir da medida de fluorescência das amostras é possível calcular os dados de porcentagens de células mortas com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de células mortas} = \frac{[(\text{média das medidas de fluorescência do CN} - \text{fluorescência da amostra}) / \text{média das medidas de fluorescência do CN}] \times 100}{1}$$

Os testes REMA foram realizados em triplicata, ou seja, testes feitos em dias diferentes com inóculos diferentes, para comprovação da efetividade das amostras.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção dos extratos

As quantidades médias dos extratos intracelular e extracelular obtidas por cada um dos fungos foram compiladas e apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Valores obtidos por extrato.

Código	Extrato Extracelular (mg)	Extrato Intracelular (mg)	Código	Extrato Extracelular (mg)	Extrato Intracelular (mg)
1 – Fe	29	109	10.2 – Fe	37	187
1' – Fe	24	293	10.3 – Fe	72	223
2 – Fe	21	360	10.4 – Fe	33	147
2' – Fe	44	467	10.A – Fe	19	149
3 – Fe	33	142	11 – Fe	26	174
3' – Fe	59	170	12 – Fe	44	100
4 – Fe	31	215	A – Fe	28	224
6 – Fe	21	214	B – Fe	30	183
7 – Fe	31	264	C – Fe	32	68
8 – Fe	16	53	D – Fe	23	185
10.1 – Fe	52	169	G – Fe	16	334

Como pode ser observado na Tabela 1 a quantidade de extratos intracelulares obtida foi muito satisfatória, com uma média de aproximadamente 201 mg de extratos intracelulares. Já a obtenção dos extratos extracelulares foi muito baixa comparada aos intracelulares, mesmo com o uso de métodos que otimizaram a extração.

4.1.1 Extratos intracelulares

Todos os 22 extratos intracelulares foram testados em bioensaio contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Para tanto, primeiramente foi realizada a diluição dos extratos em DMSO (10%), conforme descrito em materiais e métodos. A Tabela 2 apresenta a quantidade de

DMSO (10%) utilizada para solubilização das amostras e suas respectivas concentrações finais no estoque.

Tabela 2 – Concentrações das soluções estoques das amostras intracelulares em DMSO 10%

Amostra	Extrato (mg)	DMSO 10%(uL)	C (mg/mL)
1 – Fe	28	940	29,7
1' – Fe	30	1000	30
2 – Fe	59	1970	29,9
2' – Fe	48	1600	30
3 – Fe	35	1170	29,9
3' – Fe	37	1240	29,8
4 – Fe	38	1270	29,9
6 – Fe	51	1700	30
7 – Fe	28	940	29,7
8 – Fe	53	1770	29,9
10.1 – Fe	48	1600	30
10.2 – Fe	44	1470	29,9
10.3 – Fe	48	1600	30
10.4 – Fe	48	1600	30
10.A – Fe	49	1640	29,8
11 – Fe	33	1100	30
12 – Fe	32	1070	29,9
A – Fe	51	1700	30
B – Fe	39	1300	30
C – Fe	29	970	29,8
D – Fe	39	1300	30
G – Fe	39	1300	30

4.1.2 Extratos extracelulares

Todos os 22 extratos extracelulares também foram testados em bioensaio contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Assim como feito com os extratos intracelulares, os extracelulares foram diluídos em DMSO porém, em concentração 30% devido a dificuldade de diluição que encontramos anteriormente. Os valores de DMSO (30%) utilizados e a concentração da solução estoque estão compilados na Tabela 3 apresentada a seguir.

Tabela 3 – Concentrações das soluções estoques das amostras extracelulares em DMSO 30%

Amostra	Extrato (mg)	DMSO 30%(uL)	C (mg/mL)
1 – Fe	15	500	30
1' – Fe	14	470	29,7
2 – Fe	21	700	30
2' – Fe	18	600	30
3 – Fe	21	700	30
3' – Fe	28	940	29,7
4 – Fe	18	600	30
6 – Fe	21	700	30
7 – Fe	31	1040	29,8
8 – Fe	18	600	30
10.1 – Fe	16	540	29,6
10.2 – Fe	26	870	29,8
10.3 – Fe	24	800	30
10.4 – Fe	19	640	29,6
10.A – Fe	19	640	29,6
11 – Fe	17	570	29,8
12 – Fe	19	640	29,6
A – Fe	17	570	29,8
B – Fe	18	600	30
C – Fe	15	500	30
D – Fe	23	770	29,8

G – Fe

16

540

29,6

4.2 Testes REMA

O DMSO foi selecionado como agente solubilizador dos extratos por se tratar de um solvente altamente polar e com alta capacidade de solubilização para compostos orgânicos, além disso, o DMSO não causa inibição do crescimento da *Xanthomonas citri* subsp. *citri* na concentração de até 1% na amostra do teste do REMA.

Foram realizadas triplicadas do bioensaio, em dias diferentes, para cada amostra, a fim de obter confiabilidade nos resultados.

Para o teste REMA as amostras testadas foram renomeadas conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Código para o teste REMA dos extratos intracelulares e extracelulares.

Amostras	Código REMA (Intracel.)	Código REMA (Extracel.)	Amostras	Código REMA (Intracel.)	Código REMA (Extracel.)
1 – Fe	I1	E1	10.2 – Fe	I12	E12
1' – Fe	I2	E2	10.3 – Fe	I13	E13
2 – Fe	I3	E3	10.4 – Fe	I14	E14
2' – Fe	I4	E4	10.A – Fe	I15	E15
3 – Fe	I5	E5	11 – Fe	I16	E16
3' – Fe	I6	E6	12 – Fe	I17	E17
4 – Fe	I7	E7	A – Fe	I18	E18
6 – Fe	I8	E8	B – Fe	I19	E19
7 – Fe	I9	E9	C – Fe	I20	E20
8 – Fe	I10	E10	D – Fe	I21	E21

10.1 – Fe

I11

E11

G – Fe

I22

E22

Os estoques dos extratos foram diluídos em meio N diretamente nos micropoços das placas, o ensaio REMA foi conduzido como descrito em materiais e métodos, quatro concentrações de cada extrato foi testado no bioensaio, de modo que cada coluna contém os testes de dois extratos com concentrações de (2100; 1050; 525 e 262,5µg/ml), conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Esquematiza a microdiluição seriada em placa das amostras nas fileiras 2-9.

	2	3	4	5	6	7	8	9
A	2100	2100	2100	2100	2100	2100	2100	2100
B	1050	1050	1050	1050	1050	1050	1050	1050
C	525	525	525	525	525	525	525	525
D	262,5	262,5	262,5	262,5	262,5	262,5	262,5	262,5
E	2100	2100	2100	2100	2100	2100	2100	2100
F	1050	1050	1050	1050	1050	1050	1050	1050
G	525	525	525	525	525	525	525	525
H	262,5	262,5	262,5	262,5	262,5	262,5	262,5	262,5

As Figuras 6, 7 e 8 apresentam alguns dos resultados qualitativos obtidos com o método REMA no primeiro dia de teste para as amostras citadas na Tabela 4.

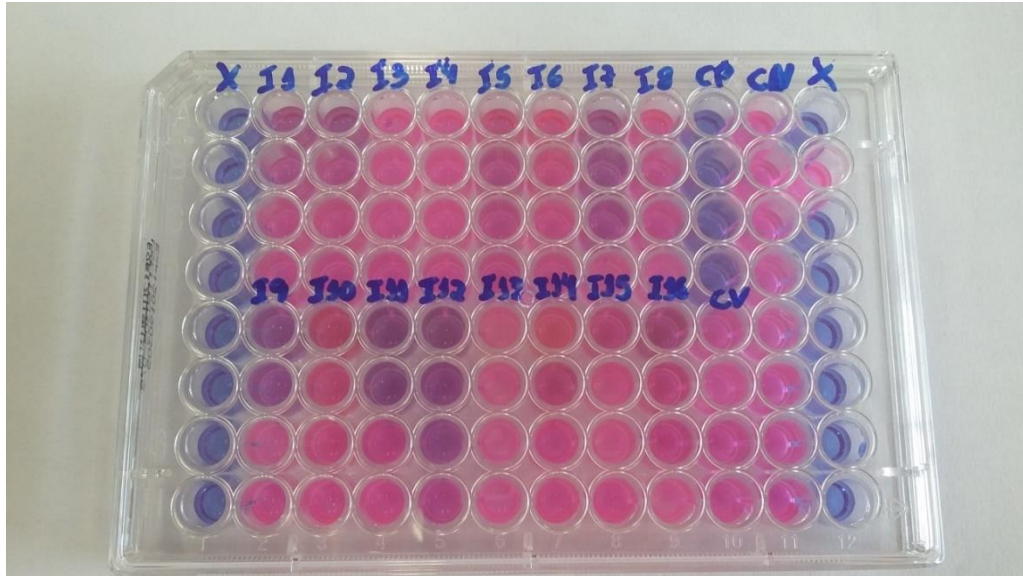


Figura 6. Avaliação qualitativa da ação antibacteriana dos extratos (I1 à I16) via REMA do 1º dia.

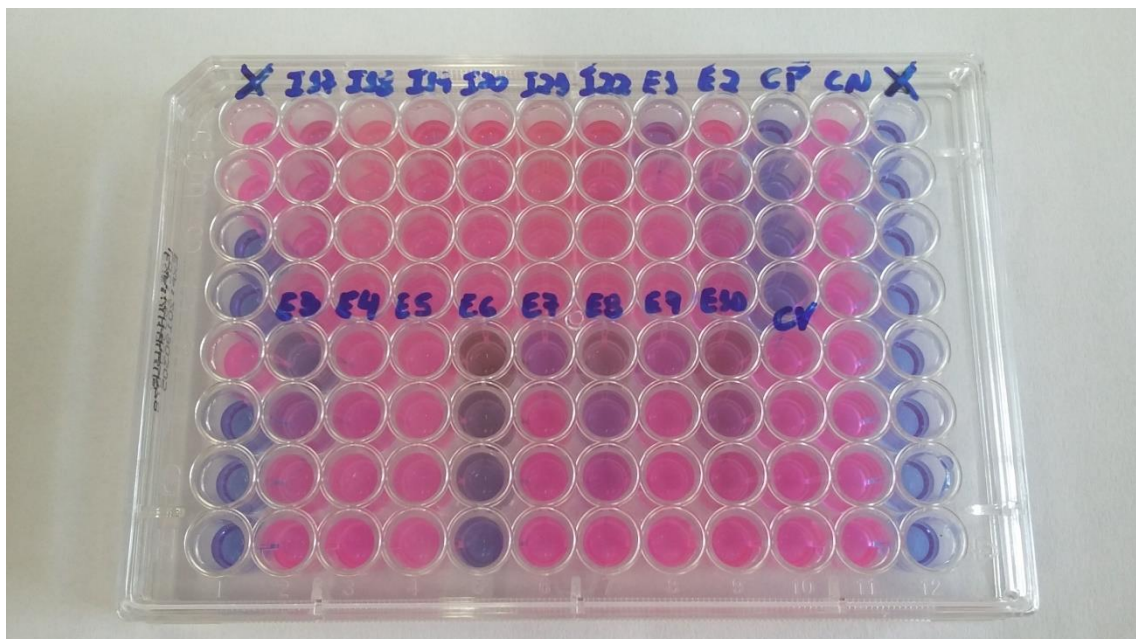


Figura 7. Avaliação qualitativa da ação antibacteriana dos extratos (I17 à I22 e E1 à E10) via REMA do 1º dia.

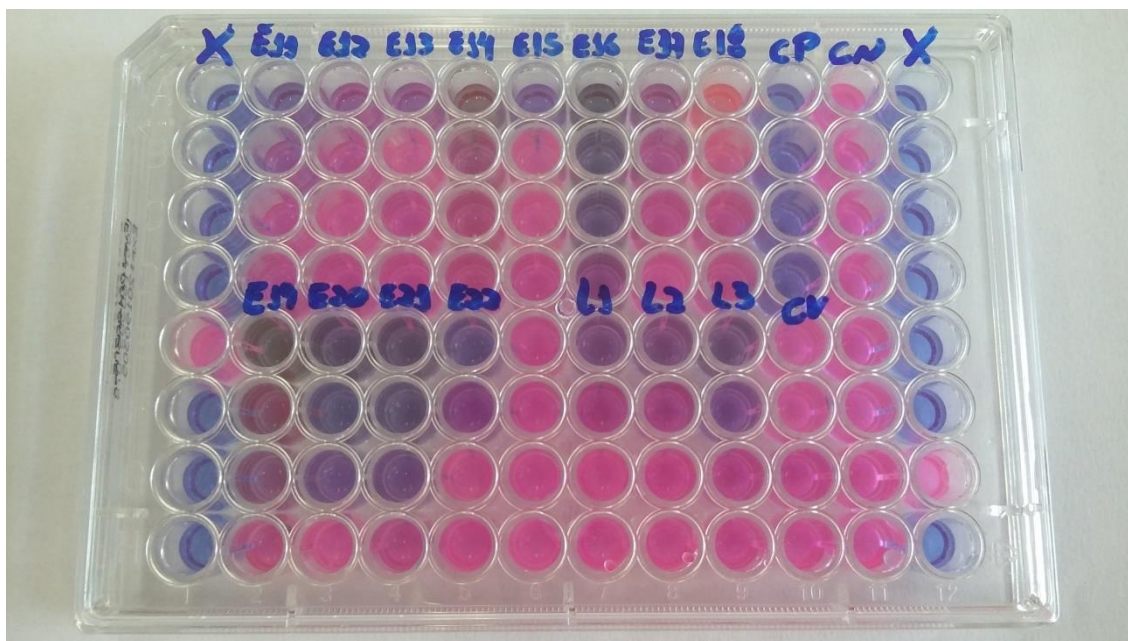


Figura 8. Avaliação qualitativa da ação antibacteriana dos extratos (E11 à E22) via REMA do 1º dia.

Podemos notar nas Figuras 6, 7 e 8 que o CN e o CV possuem coloração rósea da resofurina (fluorescente), indicando crescimento bacteriano e que o veículo (DMSO) não interferiu nos resultados. Ao mesmo tempo, o CP possui coloração azulada da rezasurina, indicando que não houve atividade bacteriana e sim sua inibição. Nas colunas 1 e 12 os poços não foram inoculados, porém, alguns apresentam coloração rosa indicando possível contaminação provavelmente com o próprio inóculo.

Nas amostras intracelulares (I1 à I22) a coloração dos poços varia em tons de rosa, sendo alguns mais escuros que outros. Enquanto isso, nos poços de amostras extracelulares (E1 à E22) a coloração vai do rosa ao azul, indicando que em alguns poços não houve inibição e em outros houve. A cor de alguns extratos pode alterar a coloração final do poço, porém, como se trata de leitura de Fluorescência esta alteração é pouco relevante.

O teste do REMA permite determinar quantitativamente os resultados obtidos via leitura da fluorescência da resorufina. 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 emitidos nas amostras intracelulares foram transformados em porcentagem de células mortas, calculada com base na média de inibição do Controle Positivo, conforme mostrado em materiais e métodos. As Tabelas 6, 7 e 8 apresentam as porcentagens de células mortas de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* obtidas em cada poço para os testes realizados para as amostras intracelulares e extracelulares durante os 3 experimentos.

Tabela 6: Porcentagens de células mortas obtidas nos 3 testes com amostras I1 a I16 (%).

1º Dia										
	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7	I8	CP	CN
A	11,67	7,71	29,89	20,09	0	8,60	20,51	21,08	97,01	0,20
B	0,56	0	18,25	19,26	0	13,77	17,95	2,60	96,87	4,76
C	0	0	19,21	21,76	0	10,09	2,51	7,05	94,50	15,35
D	2,56	1,43	9,83	12,08	0	10,91	43,34	56,49	96,90	11,51
	I9	I10	I11	I12	I13	I14	I15	I16	CV	CN
E	27,05	23,89	49,36	50,36	70,75	59,38	9,52	32,01	0	0
F	32,41	15,52	43,87	40,80	53,59	17,56	45,83	28,37	22,23	0
G	20,66	9,33	0	34,78	38,66	0	33,68	11,31	0	0
H	0	0	0	10,06	22,30	0	0	32,66	0	0

2º Dia										
	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7	I8	CP	CN
A	27,90	41,95	7,32	18,41	18,18	17,68	2,36	4,59	92,87	0
B	0	0	5,81	2,16	20,49	7,00	7,48	1,52	89,36	0
C	4,62	2,25	0	10,33	14,57	1,63	4,17	3,93	90,63	4,11
D	8,72	6,13	0,64	14,94	11,36	6,73	11,27	5,78	90,39	0
	I9	I10	I11	I12	I13	I14	I15	I16	CV	CN
E	3,72	27,22	43,87	59,46	37,65	30,48	22,86	54,82	0	0
F	0	35,40	38,97	34,86	13,03	21,04	6,60	31,88	1,12	0
G	24,20	27,02	24,64	23,37	4,77	20,21	7,37	18,28	0	0
H	5,30	27,61	17,20	8,89	23,51	11,60	0	4,66	0	0

3º Dia										
	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7	I8	CP	CN
A	63,20	69,91	0	0	36,73	2,03	73,53	27,57	74,72	0
B	40,83	25,22	0	0	40,01	6,36	36,12	14,55	40,51	0,28
C	0,84	0	13,82	17,90	21,61	5,52	31,28	8,50	45,24	10,99
D	0	3,59	4,20	20,43	0	11,75	21,03	0	36,51	2,25
	I9	I10	I11	I12	I13	I14	I15	I16	CV	CN
E	38,36	17,55	62,35	60,80	10,68	29,22	3,95	38,49	2,79	0,54
F	30,49	13,66	46,71	43,00	3,72	13,04	3,41	14,93	2,92	1,69
G	44,80	3,51	37,31	39,31	3,00	6,84	0,80	7,66	1,46	2,39
H	8,66	6,21	37,90	42,47	0	0	0	0	4,41	0

Tabela 7: Porcentagens de células mortas obtidas nos 3 testes com amostras I17 à I22 e E1 à E10 (%).

1º Dia										
	I17	I18	I19	I20	I21	I22	E1	E2	CP	CN
A	16,38	76,19	28,22	20,39	79,12	3,41	31,75	16,29	97,36	32,93
B	5,36	76,14	20,33	3,60	71,36	10,29	33,95	0,71	97,26	6,42
C	0,19	69,17	19,58	14,50	68,59	58,76	32,91	0	97,16	0
D	0,46	16,28	16,86	18,60	58,85	41,92	34,13	4,42	97,20	0

	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	CV	CN
E	95,29	4,47	22,98	90,53	13,06	96,91	7,95	65,59	0	0
F	29,13	0	30,85	95,58	8,71	50,38	0	46,44	0	0
G	5,83	5,16	6,21	96,81	0	8,90	0	17,92	0	0
H	0	0	22,61	97,05	0	0	0	3,43	0	0

2º Dia

	I17	I18	I19	I20	I21	I22	E1	E2	CP	CN
A	17,94	22,42	26,25	18,63	33,64	4,96	34,85	88,52	92,07	0
B	4,06	19,11	12,99	5,68	19,10	6,43	43,16	46,17	85,81	0
C	8,52	10,76	14,43	14,84	9,47	1,18	23,64	0	84,69	0
D	13,71	1,34	2,22	2,35	7,79	0	18,06	9,90	87,70	0
	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	CV	CN
E	94,36	10,62	5,94	85,47	5,76	96,83	11,89	58,13	2,53	0
F	58,79	0	5,75	93,81	23,98	83,67	9,11	50,19	3,16	17,27
G	21,97	12,44	0,53	95,40	14,98	37,65	13,98	40,24	0	5,88
H	0	0	0	95,58	0	7,65	0	33,35	3,91	0

3º Dia

	I17	I18	I19	I20	I21	I22	E1	E2	CP	CN
A	45,15	50,17	31,25	0	85,19	86,33	51,96	31,49	47,80	0
B	36,82	26,99	1,61	0	79,60	23,79	28,01	6,87	2,57	0
C	24,15	15,57	5,70	2,11	49,38	8,70	0	0	5,10	11,69
D	4,46	0,55	7,02	8,83	0	12,87	0,87	3,96	2,90	3,17
	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	CV	CN
E	93,59	3,66	5,08	84,25	48,68	97,18	0,77	55,92	4,88	0,77
F	21,65	0	0	95,38	0	23,47	0	51,12	0,33	1,90
G	0	0,64	0	95,36	0	0	0	15,95	3,57	0
H	0	0	0	49,06	0	0	0	2,37	0	0

Tabela 8: Porcentagens de células mortas obtidas nos 3 testes com amostras E11 à E22 (%).**1º Dia**

	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	CP	CN
A	68,68	28,18	25,63	63,60	68,79	97,44	29,80	36,47	96,92	27,47
B	0	0	40,25	11,71	33,88	98,05	0	21,09	97,00	8,33
C	0	37,49	4,14	0	36,02	92,94	0	0	97,16	1,62
D	8,34	5,60	13,16	0	7,18	30,40	14,62	5,60	97,07	0
	E19	E20	E21	E22					CV	CN
E	98,02	98,07	97,62	94,35					53,64	0
F	45,69	97,87	97,90	19,23					32,37	0
G	37,32	58,70	67,39	21,62					1,66	0
H	2,75	22,27	6,13	0					0	0

2º Dia

	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	CP	CN
A	74,14	11,65	32,10	81,39	94,66	96,86	6,35	75,41	93,74	2,95
B	55,05	0,51	22,42	55,10	18,18	97,73	0	48,14	92,11	0
C	47,05	14,24	1,14	46,73	0	81,76	12,78	0	88,72	0
D	14,48	6,39	3,69	9,02	6,86	16,57	7,95	29,90	91,04	0
	E19	E20	E21	E22					CV	CN
E	96,98	98,02	97,50	94,11					3,17	5,70
F	76,12	98,17	97,91	59,06					0,24	1,93
G	56,00	83,39	97,88	54,86					1,45	0,14
H	39,06	50,99	55,06	41,16					0	0

3º Dia

	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	CP	CN
A	15,49	3,14	0	24,74	26,33	98,06	0	49,13	52,49	0,03
B	0	0	0	13,48	0	96,08	0	20,16	47,34	1,57
C	0	0,65	2,94	0	0	36,00	0	0	36,16	2,47
D	0	3,53	5,44	0	0	3,64	0	0	32,92	4,32
	E19	E20	E21	E22					CV	CN
E	97,66	98,31	98,01	61,22					8,08	0,34
F	40,17	89,43	98,26	13,96					2,05	1,61
G	19,31	12,18	25,49	0					0	0
H	2,36	0	0	0					2,13	-5,80

A partir destes resultados foi possível determinar um valor médio de inibição apresentada pelos extratos (Tabela 9), para podermos definir quais extratos têm potencial de utilização contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

Tabela 9: Porcentagens média de células mortas obtidas nos testes com amostras intracelulares e extracelulares (%).

Placa I										
	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7	I8	CP	CN
A	34,26	39,86	8,98	9,69	15,99	9,44	32,13	17,75	88,20	0
B	12,91	5,16	6,74	5,49	18,70	9,04	20,52	6,22	75,58	0,96
C	0,70	0	10,90	16,66	8,87	5,75	12,65	6,49	76,79	10,15
D	3,74	3,71	4,89	15,81	0,71	9,80	25,21	18,51	74,60	4,10
	I9	I10	I11	I12	I13	I14	I15	I16	CV	CN
E	23,04	22,88	51,86	56,87	39,69	39,69	12,11	41,77	0	0
F	19,23	21,53	43,19	39,55	23,45	17,21	18,62	25,06	8,76	0
G	29,89	13,29	20,59	32,49	15,48	7,31	13,95	12,42	0	0,86
H	0	10,08	12,81	20,47	14,65	1,02	0	10,96	0	0

Placa II										
	I17	I18	I19	I20	I21	I22	E1	E2	CP	CN
A	26,49	49,59	28,57	12,48	65,99	31,57	39,52	45,43	79,08	7,49

B	15,41	40,74	11,64	0,98	56,69	13,50	35,04	17,92	61,88	0
C	10,95	31,83	13,24	10,48	42,48	22,88	16,25	0	62,32	2,77
D	6,21	6,06	8,70	9,93	20,93	18,16	17,68	6,09	62,60	0,13
	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	CV	CN
E	94,42	6,25	11,33	86,75	22,50	96,97	6,87	59,88	1,86	0
F	36,52	0	11,10	94,92	10,59	52,51	0,30	49,25	0,97	4,05
G	8,87	6,08	1,56	95,86	0,15	14,66	0,18	24,71	0	0
H	0	0	4,47	80,56	0	0	0	13,05	0	0

Placa III

	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	CP	CN
A	52,77	14,32	17,31	56,58	63,26	97,45	11,82	53,67	81,05	10,15
B	17,06	0	20,54	26,76	15,66	97,29	0	29,80	78,82	2,22
C	14,04	17,46	2,74	13,03	9,44	70,23	1,25	0	74,01	0,46
D	7,21	5,17	7,43	1,08	4,67	16,87	6,77	10,35	73,68	0
	E19	E20	E21	E22					CV	CN
E	97,55	98,13	97,71	83,23					21,63	0
F	53,99	95,16	98,02	30,75					11,55	0,59
G	37,54	51,42	63,58	25,11					0,66	0
H	14,72	23,69	19,73	10,83					0	0

Como podemos observar na Tabela 9, as amostras intracelulares apresentam certo grau de inibição, porém, a quantidade de células mortas ainda é muito baixa e inferior ao controle positivo (CP), dessa forma podemos dizer que a inibição destes extratos não foi significativa. Em contrapartida, pra os extratos extracelulares podemos observar que algumas amostras apresentaram expressiva inibição do crescimento bacteriano. Tal inibição pode ser notada nas análises qualitativas (Figuras 7 e 8), em que alguns poços apresentaram coloração azulada semelhante ao controle positivo (CP). Quantitativamente sete extratos extracelulares (E3, E6, E8, E-16, E19, E20 e E21) apresentaram resultados realmente significativos em concentrações de 2100 µg/ml, atingindo grau de inibição médio entre 94% e 98%, ou seja, valores superiores ao controle positivo (CP), além disso, os extratos (E6, E-16, E20 e E21) apresentaram valores de inibição maiores que 90 %, mesmo em concentrações menores.

5 CONCLUSÃO

Dentre os 44 extratos testados neste projeto (22 intracelulares + 22 extracelulares) 7 de origem extracelular apresentaram atividade significativa contra bactérias *Xanthomonas citri* subsp. *citri* causadoras do cancro cítrico em frutas cítricas.

Considerando que a composição dos extratos não foi ainda identificada, os resultados obtidos revelam quais extratos contém compostos químicos potencialmente ativos contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. A constatação de extratos capazes de eliminar mais de 90% das bactérias inoculadas durante o REMA requer, portanto, a separação e identificação dos constituintes desse extrato e novos bioensaios com os compostos purificados.

6 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, C. O. de; PASSOS, O. S. Citricultura brasileira em busca de novos rumos: Desafios e oportunidades na região nordeste. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011. 145 p.

AMORIM, M. da S. Desempenho inicial de combinações copa e porta-enxerto de citros no litoral norte do estado da Bahia, 2015.

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.

BUGNI TS, IRELAND CM. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Nat. Prod. Rep.* v. 21, p. 143-163, 2004.

CANTEROS, B.I. Manejo de enfermidades en Citrus: cancrrosis, moteado negro (black spot) y caída anormal de frutos. In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE CITRICULTURA DO RS, 12., 2005, Faxinal do Soturno. Anais. Porto Alegre,: UFRGS, FEPAGRO e EMATER/RS, p.113-128, 2005.

CLARKE A. Evolution, adaptation and diversity: global ecology in an Antarctic context. In: HUIKES AHL, GIESKES WWC, ROZEMA J, SCHORNO RML, VAN DER VIES SM, WOLFF WJ. (Ed.) Antarctic biology in a global context. Leiden: *Backhuys Publishers*, p. 3-17, 2003.

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.

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).

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.

FRAVEL D. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* v. 43, p. 337-359, 2005.

FUNDECITRUS. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro/7>.

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.

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.

LEYNS, F.; DE CLEENE, M.; SWINGS, J. & DE LEY, J. The host range of the genus *Xanthomonas*. *The Botanical Review*, 50, p. 308-355, 1984.

LOPES LP, OLIVEIRA AG, BERANGER JPO, GOIS CG, VASCONCELLOS FCS, SAN MARTIN JAB, ANDRADE CGTJ, MELLO JCP, ANDRADE G. Activity of Extracellular Compounds of *Pseudomonas* sp. against *Xanthomonas axonopodis* in Vitro and Bacterial Leaf Blight in Eucalyptus. *Tropical Plant Pathology*, v. 37, p. 233-238, 2012.

MICHEREFF SJ. Fundamentos de fitopatologia. Recife-PE: UFRPE, 2001.

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.

NEVES MF, TROMBIN NG, MILAN P, LOPES FF, CRESSONI F, KALAKI R. O Retrato da Citricultura brasileira. Centro de pesquisas e marketing e estratégias. Disponível em: <<http://www.citrusbr.com.br/>>. Acesso em: 10 ago. 2011.

NEWMAN DJ, CRAGG GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* v. 75, p. 311–335, 2012.

OLIVEIRA, L.S. et al. Plantas Medicinais como Recurso Terapêutico em Comunidade do Entorno da Reserva Biológica do Tinguá, RJ, Brasil - Metabólitos Secundários e Aspectos Farmacológicos. *Revista Científica Internacional*, v.4, 2011.

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.

RAGUENES G, CHRISTEN R, GUEZENNEC J, PIGNET P, BARBIER G. *Vibrio diabolicus* sp. nov., a new polysaccharide-secreting organism isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid. *Alvinella pompejana*. *Int J Syst Bacteriol*, v. 47, p. 989-995, 1997.

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.

SANTIAGO IF, ALVES TMA, RABELLO A, SALES JUNIOR PA, ROMANHA AJ, ZANI CL, ROSA CA, ROSA LH. Leishmanicidal and antitumoral activities of endophytic fungi associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. *Extremophiles*. v. 16, p. 95-103, 2012.

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

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.

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.

VASCONCELLOS FCS, DE OLIVEIRA AG, LOPES-SANTOS L, BERANGER JPO, CELY MVT, SIMIONATO AS, PISTORI JF, SPAGO FR, MELLO JCP, SAN MARTIN JAB, ANDRADE CGTJ, ANDRADE G. Evaluation of Antibiotic Activity Produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV Strain against *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *Agricultural Sciences*, v. 5, p. 71-76, 2014.

FUNGOS DO SOLO DA ANTÁRTIDA: PRODUÇÃO DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS BIOATIVOS CONTRA
XANTHOMONAS CITRI SUBSP. *CITRI*

Juliano Henrique Ferrarezi

Daiane Cristina Sass
(Orientadora)

Rio Claro
2016