

As Ciências Biológicas e da Saúde e seus Parâmetros

2

Christiane Trevisan Slivinski
(Organizadora)



Atena
Editora

Ano 2018

Christiane Trevisan Slivinski

(Organizadora)

**As Ciências Biológicas e da Saúde
e seus Parâmetros
2**

Atena Editora
2018

2018 by Atena Editora

Copyright © da Atena Editora

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação e Edição de Arte: Geraldo Alves e Natália Sandrini

Revisão: Os autores

Conselho Editorial

- Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
Profª Drª Deusilene Souza Vieira Dall’Acqua – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Profª Drª Juliane Sant’Ana Bento – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

C569 As ciências biológicas e da saúde e seus parâmetros 2 [recurso eletrônico] / Organizadora Christiane Trevisan Slivinski. – Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2018. – (As ciências biológicas e da saúde e seus parâmetros; v. 2)

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-85-85107-74-1

DOI 10.22533/at.ed.741180511

1. Ciências biológicas. 2. Saúde. I. Slivinski. Christiane Trevisan.

CDD 620.8

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores.

2018

Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

www.atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

As Ciências Biológicas estão relacionadas a todo estudo que envolve os seres vivos, sejam eles micro-organismos, animais ou vegetais, bem como a maneira com que estes seres se relacionam entre si e com o ambiente. Quando se fala em Ciências da Saúde faz-se menção a toda área e estudo relacionada a vida, saúde e doença. Neste sentido, fazem parte das Ciências Biológicas e Saúde áreas como Biologia, Biomedicina, Ciências do Esporte, Educação Física, Enfermagem, Farmácia, Fisioterapia, Fonoaudiologia, Medicina, Medicina Veterinária, Nutrição, Odontologia, Saúde Coletiva, Terapia Ocupacional, Zootecnia, entre outras.

A preservação do meio ambiente, a manutenção da vida e a saúde dos indivíduos é foco principal dos estudos relacionados as Ciências Biológicas, onde pode-se navegar por um campo bem abrangente de pesquisas que vai desde aspectos moleculares da composição química dos organismos vivos até termos médicos utilizados para compreensão de determinadas patologias.

Neste ebook é possível observar essa grande diversidade que envolve os aspectos da vida. A preocupação de profissionais e pesquisadores das grandes academias em investigar formas de viver em equilíbrio com o meio ambiente, bem como aproveitando da melhor forma possível os benefícios ofertados pelos seres vivos.

Inicialmente são apresentados artigos que discutem os cuidados de enfermagem com os seres humanos, desde acidentes com animais peçonhentos, cuidados com a dengue, preenchimento de prontuários, cuidados com a higiene, atendimento de urgência e emergência e primeiros socorros, doenças sexualmente transmissíveis e hemodiálise.

Em seguida são apresentados alguns estudos relacionados a intoxicação com drogas e álcool, bem como aspectos envolvendo a farmacologia. Caracterização bioquímica de enzimas e sua relação com infarto, insegurança alimentar e obesidade infantil.

Ainda podem ser observados artigos que relatam sobre aspectos antimicrobianos e antioxidantes de vegetais e micro-organismos. Presença de fungos plantas. Caracterização do solo e frutas. Doenças em plantas. E para terminar, você irá observar algumas discussões envolvendo a fisioterapia no desenvolvimento motor de crianças, os benefícios da caminhada, além de tratamentos estéticos para o controle de estrias.

Christiane Trevisan Slivinski

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
O IMPACTO DAS MICOTOXINAS NA SEGURANÇA ALIMENTAR	
<i>Jakeline Luiz Corrêa</i>	
<i>Isabella Letícia Esteves Barros</i>	
<i>Flávia Franco Veiga</i>	
<i>Amanda Milene Malacrida</i>	
<i>Victor Hugo Cortez Dias</i>	
CAPÍTULO 2	7
ANÁLISE DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA UTILIZADA NO PREPARO DE MEDICAMENTOS E/OU COSMÉTICOS	
<i>Helena Teru Takahashi Mizuta</i>	
<i>Keitia Couto dos Santos</i>	
<i>Josueli Camila Timbola</i>	
<i>Rodrigo Hinojosa Valdez</i>	
CAPÍTULO 3	15
ANÁLISE DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE BASES GALÊNICAS DE DUAS FARMÁCIAS DE MANIPULAÇÃO DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ	
<i>Helena Teru Takahashi Mizuta</i>	
<i>Keitia Couto dos Santos</i>	
<i>Josueli Camila Timbola</i>	
<i>Rodrigo Hinojosa Valdez</i>	
CAPÍTULO 4	21
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO DOS EXTRATOS DE PELARGONIUM GRAVEOLENS L'HÉR. SOBRE BACTÉRIAS CAUSADORAS DA ACNE VULGAR	
<i>Jéssica Camile Favarin</i>	
<i>Marivane Lemos</i>	
<i>Juliângela Mariane Schröder Ribeiro dos Santos</i>	
<i>Talíze Foppa</i>	
<i>Zípora Morgana Quinteiro dos Santos</i>	
<i>Vilmair Zancanaro</i>	
<i>Emyr Hiago Bellaver</i>	
CAPÍTULO 5	34
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO SORGO	
<i>Micaeli Silva Belgamazzi</i>	
<i>Larissa Tombini</i>	
<i>Letycia Lopes Ricardo</i>	
<i>Ricardo Andreola</i>	
<i>Graciene de Souza Bido</i>	
CAPÍTULO 6	42
AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FUNGOS DA ANTÁRTICA EM XANTHOMONAS CITRI SUBSP. CITRI	
<i>Gabrielle Vieira</i>	
<i>Juliano Henrique Ferrarezi</i>	
<i>Daiane Cristina Sass</i>	
CAPÍTULO 7	53
ENDOPHYTIC FUNGI OF ARISTOLOCHIA TRIANGULARIS CHAM.: A MOLECULAR OVERVIEW	
<i>Andressa Katiski da Costa Stuart</i>	
<i>Rodrigo Makowiecky Stuart</i>	
<i>Ida Chapaval Pimentel</i>	

CAPÍTULO 8 58

ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM PLANTAS MEDICINAIS

Rebeca Rocha Silva
Valdiele de Jesus Salgado
Tatiana Reis dos Santos Bastos
Pâmela Beatriz Lima Oliveira
Bruna Luiza Bedoni Italiano
Gabriele Marisco da Silva

CAPÍTULO 9 69

PESQUISA DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM ESCHERICHIA COLI PATOGÊNICA AVIÁRIA MULTIRRESISTENTE ISOLADAS DE COLIBACILOSE EM AVESTRUZ

Angela Hitomi Kimura
Vanessa Lumi Koga
Benito Guimarães de Brito
Kelly Cristina Taglieri de Brito
Gerson Nakazato
Renata Katsuko Takayama Kobayashi

CAPÍTULO 10 80

VÍRUS RÁBICO EM CÃES DOMÉSTICOS E SUA TRANSMISSÃO PARA O SER HUMANO

Aline Mendes Balieiro Diniz
Denise Santos Abelha
Márcio de Moraes Pereira Rosa
Sabrina Guimaraes Silva

CAPÍTULO 11 94

AValiação DA UTILIZAÇÃO DE ADUBAÇÕES NITROGENADAS NO CULTIVO DE HORTELÃ VISANDO O APERFEIÇOAMENTO DE SEU SISTEMA PRODUTIVO

Kleber Lopes Longhini
Anny Rosi Mannigel
Rafael Egea Sanches
Sonia Tomie Tanimoto

CAPÍTULO 12 103

AValiação ESPAÇO-TEMPORAL DE CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DE SOLO ALUVIAL ÀS MARGENS DO RIO UVU, CURITIBA-PR

Victoria Stadler Tasca Ribeiro
Silvia Schmidlin Keil

CAPÍTULO 13 118

COMPOSIÇÃO PROXIMAL, MINERAL E LIPÍDICA DE FRUTAS NATIVAS E EXÓTICAS

Antonio Eduardo Nicácio
Joana Schuelter Boeing
Érica Oliveira Barizão
Carina Alexandra Rodrigues
Jesuí Vergílio Visentainer
Liane Maldaner

CAPÍTULO 14 130

DIVERSIDADE FÚNGICA ASSOCIADA A INSETOS COLETADOS EM CULTIVO DE MORANGUEIRO

Carolina Gracia Poitevin
Mariana Vieira Porsani
Alex Sandro Poltronieri
Maria Aparecida Cassilha Zawadneak
Ida Chapaval Pimentel

CAPÍTULO 15..... 138

COMPARAÇÃO ENTRE O TESTE DA CAMINHADA DE SEIS MINUTOS E O INCREMENTAL SHUTTLE WALK TEST SOB AS VARIÁVEIS HEMODINÂMICAS EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

Valmir Ferreira da Silva Júnior

Gabriel Martins de Araújo

Catharinne Angélica Carvalho de Farias

Francisco Assis Vieira Lima Júnior

Rodrigo Augusto Xavier de Sousa Barros

Rêncio Bento Florêncio

CAPÍTULO 16..... 152

EFEITOS DA INTERVENÇÃO FISIOTERAPÊUTICA NO DESEMPENHO MOTOR DE ESCOLARES COM DESORDEM COORDENATIVA DESENVOLVIMENTAL

Kátia Gama de Barros Machado

Giovana Flávia Manzotti

Siméia Palácio Gaspar

CAPÍTULO 17 159

O MICROAGULHAMENTO ASSOCIADO AO PEELING QUÍMICO NO TRATAMENTO DE ESTRIAS CORPORAIS

Isabela Mascarenhas de Oliveira

Hevellyn Mayara Fernandes Pereira

Renata Cappellazzo

SOBRE A ORGANIZADORA 169

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FUNGOS DA ANTÁRTICA EM *XANTHOMONAS CITRI* SUBSP. *CITRI*

Gabrielle Vieira

Mestre em Microbiologia Aplicada, Instituto de Biociências de Rio Claro - UNESP.

e-mail: gabriellevieir@gmail.com

Juliano Henrique Ferrarezi

Graduado em Ciências Biológicas, Instituto de Biociências de Rio Claro – UNESP

e-mail: julianoferrarezi@hotmail.com

Daiane Cristina Sass

Professora do Instituto de Biociências de Rio Claro – UNESP.

e-mail: daiane_sass@rc.unesp.br

RESUMO: O Brasil possui grande destaque na produção de laranja em escala mundial, entretanto, todos os anos registram-se perdas consideráveis relacionadas a doenças e pragas nos pomares. Uma das principais doenças que atacam citros é o cancro cítrico causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Atualmente o combate ao cancro cítrico é feito principalmente com o uso de defensivos agrícolas químicos a base de cobre. Tendo em vista o impacto ambiental envolvido no uso de metais pesados, é fundamental a busca por alternativas sustentáveis de combate à doença. Novas pesquisas apontam o potencial de metabólitos secundários para fins fitossanitários, principalmente metabólitos originados de microrganismos em condições extremas, como

é o caso da Antártica. Esse trabalho avaliou a atividade antibacteriana contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri* de 24 extratos produzidos por 12 fungos isolados de solo antártico. Dez dos isolados produziram extratos que inibiram em pelo menos 85% o crescimento do fitopatógeno. Os resultados indicam o potencial de produção de compostos bioativos por fungos oriundos da Antártica para o combate ao cancro cítrico.

PALAVRAS-CHAVE: Citros, Antártica, cancro cítrico, fungos, metabólitos secundários.

ABSTRACT: Brazil has great importance in the world production of citrus, however, every year there are considerable losses related to plant diseases and pests in the orchards. One of the main diseases that attack citrus is citrus canker caused by the bacteria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Currently citrus canker disease control is done mainly with the use of copper based chemical pesticides. In view of the environmental impact involved in the use of heavy metals it is essential to search for sustainable alternatives to combat the pathology. Recent research indicates the potential of secondary metabolites for phytosanitary purposes, mainly metabolites originating from microorganisms under extreme conditions, such as Antarctica. This study evaluated the antibacterial activity against *Xanthomonas citri* subsp. *citri* of 24 extracts produced by 12 fungi isolated from Antarctic

soil. Ten of the isolates produced extracts that inhibited phytopathogen growth by at least 85%. The results indicate the potential for the production of bioactive compounds by fungi from Antarctica to combat citrus canker.

KEYWORDS: Citrus, Antarctic, citrus canker, fungi, secondary metabolites.

1 | INTRODUÇÃO

Desde a década de 60 o Brasil tem se tornado destaque na agricultura em escala mundial, principalmente após uma série de incentivos na área de ciência e tecnologia agrícola que permitiu melhor aproveitamento de sua extensão territorial. Na década de 80 o país se tornou potência na citricultura, principalmente por conta de suas condições climáticas favoráveis ao plantio de citros. A produção ainda hoje é a maior do mundo, segundo dados do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) a safra 2017/2018 de laranja foi de aproximadamente 398,35mi de caixas, ou seja, mais de 16mi de toneladas da fruta, safra 62% maior que a produção 2016/2017.

Infelizmente, a citricultura, assim como outras culturas de interesse econômico, é constantemente afetada por doenças e pragas que diminuem a produtividade dos pomares (SANCHES et al., 2014) e causam impactos tanto na rentabilidade para o produtor quanto na economia do país como um todo. No Brasil, um dos problemas fitossanitários relacionados à citricultura é o cancro cítrico (SANCHES et al., 2014; CABI, 2017; EPPO, 2017), doença causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Figura 1).



Figura 1. Lesão eruptiva causada pelo Cancro Cítrico na laranja (Fonte: FUNDECITRUS)

A primeira detecção no estado de São Paulo ocorreu em 1957 e desde então há um esforço para a contenção da doença. Sua disseminação ocorre de forma natural por meio de sementes contaminadas, chuva, vento, insetos, podas, nebulização de canteiros, além da manipulação de mudas e equipamentos contaminados. A entrada da bactéria na planta hospedeira ocorre através de aberturas naturais dos tecidos, sejam estômatos, hidatódios ou ferimentos (GOTTWALD et al., 2002), e a multiplicação ocorre em espaços intercelulares (JACOB, 2009) como mesofilo e parênquima.

As lesões causadas pelo cancro cítrico são circulares, corticosas, salientes, de coloração castanha e aspecto eruptivo/necrótico (BITANCOURT, 1957; ROSSETTI, 1981; ROSSETTI, 1993; NAMEKATA, 1991) (Figura 1). As feridas ocorrem apenas no local de inserção da bactéria no hospedeiro, e podem ocorrer nos mais diversos tecidos vegetais como folhas, ramos e frutos (AMARAL, 2003). Há relatos de contaminação via ferimentos de raízes, por espécies de *Xanthomonas* que sobrevivem no solo em associação com material vegetal morto (RYAN et al., 2011)

A bactéria causadora do cancro cítrico pertence ao gênero *Xanthomonas* (do grego, “xantus” = amarelo, “monas” = unidade) que são bactérias aeróbicas obrigatórias, possuem formato de bastonete, um único flagelo polar (TESSMANN, 2002) e não formam esporos. Além disso, são bactérias Gram negativas, ou seja, suas paredes celulares são mais delgadas e apresentam uma membrana de lipoproteínas, polissacarídeos e fosfolípidios que lhes confere maior complexidade e seletividade de captação de recursos externos, de modo a serem mais resistentes a antibióticos e defensivos químicos (TORTORA et al., 2012).

Em 2016 a legislação brasileira referente ao cancro cítrico foi alterada e as áreas de cultivo passaram a ser categorizadas em relação à incidência da doença. Atualmente as medidas contra o cancro cítrico incluem o uso de mudas sadias, uso de quebra vento, uso de espécies e variedades menos suscetíveis, além de aplicação de defensivos agrícolas com base de cobre durante o manejo.

O cobre, bem como outros metais pesados, é altamente tóxico e se acumula facilmente ao longo de cadeias tróficas (ROCHA e AZEVEDO, 2017), afetando sistema nervoso central, sistema hepático, renal e até esquelético (SEGURA-MUÑOZ, 2002) dos seres vivos. Tendo em vista o impacto ambiental que agroquímicos de base cúprica podem causar torna-se extremamente necessária a busca por medidas alternativas e sustentáveis de combater o cancro cítrico.

Uma alternativa ao uso de agrodefensivos e produtos químicos atualmente utilizados no combate aos fitopatógenos, principalmente os de interesse econômico, são os produtos naturais. Essas substâncias, produzidas por diversos organismos como animais, plantas e micro-organismos, apresentam um menor impacto em relação aos bactericidas químicos sintéticos, sendo mais facilmente degradáveis além de não se acumularem no ambiente e oferecerem um menor risco para o desenvolvimento de fitopatógenos resistentes (PEIXOTO NETO et al., 2002; DAYAN et al., 2009). Neste sentido surgem novas pesquisas na área da biotecnologia com uso de micro-organismos.

Conhecidos produtores de compostos com atividade antimicrobiana, os fungos filamentosos tem sido alvo de estudos frequentes desde a descoberta da penicilina e são considerados uma importante fonte de novos compostos antimicrobianos devido à grande diversidade de espécies e diversificação das estruturas químicas dos metabólitos secundários produzidos (NIGAM e SINGH, 2014).

Dentre esses micro-organismos os extremófilos constituem um grupo

relativamente pouco explorado, mas no qual o interesse como fonte de metabólitos secundários tem aumentado, pois são fortes potenciais para produzirem compostos bioativos com estruturas químicas únicas (FURBINO et al., 2014; CHEUNG et al., 2014, TIAN et al., 2017). Estudos prévios em organismos provenientes da região Antártica revelaram diversos compostos bioativos produzidos pelos isolados como alcaloides, ácidos, ésters e actinomicinas (GONÇALVES et al., 2015; SVAHN et al., 2015; IVANOVA, 2007).

Bactérias isoladas na região demonstraram atividade antimicrobiana contra diversas bactérias e fungos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans* (ROJAS et al., 2009; SHEKH et al., 2011).

Os fungos filamentosos oriundos da Antártica também tem mostrado potencial como nova fonte de compostos e moléculas com propriedades antimicrobianas (DE OLIVEIRA et al., 2011; GONÇALVES, et al., 2015; HENRÍQUEZ, et al., 2014). Em 2015, Gonçalves e colaboradores produziram extratos etanólicos de fungos filamentosos isolados de solo da Antártica que apresentaram atividade antifúngica e antimicrobiana. Em outro estudo, extratos fúngicos produzidos por 101 isolados foram avaliados quanto ao potencial antimicrobiano e mais de 50% dos extratos apresentaram bioatividade (HENRÍQUEZ, et al., 2014)

Recentemente tem sido relatada atividade de metabólitos produzidos por micro-organismos do ambiente antártico contra diferentes espécies do gênero (*X. axonopodis* pv. *glycines*, *X. campestris*, *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*). (ENCHEVA-MALINOVA et al., 2015; HENRÍQUEZ et al., 2014; SILBER, et al., 2013)..

Em 2002, Moncheva e colaboradores relataram atividade de actinobactérias isoladas de solo antártico em *X. axonopodis* pv. *glycines*, *X. euvesicatoria*, *X. axonopodis* pv. *phaseol*, causadoras de doenças nas culturas de soja, tomate e feijão, respectivamente (MONCHEVA et al., 2002). A atividade de fungos associados a esponjas coletadas na Antártica contra *X. campestris* foi constatada por Henríquez et al. (2014). Estudos conduzidos em 2014 e 2015 apontam atividade de extratos brutos produzidos por micro-organismos de solo antártico contra as espécies *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria* e *X. gardneri*, responsáveis pela mancha-bacteriana nas culturas de tomate e pimentão (ENCHEVA-MALINOVA et al., 2014; ENCHEVA-MALINOVA et al., 2015).

Tendo em vista a substituição de produtos cúpricos para minimização de danos ao ambiente e considerando a necessidade de medidas alternativas para o controle de fitopatógenos como *X.citri* subsp. *citri*, o trabalho contribui para a busca de compostos bioativos produzidos por fungos isolados da Antártica no combate ao cancro cítrico em frutas cítricas. Para tal, extratos produzidos pelos isolados foram avaliados em triagem quanto à atividade antibacteriana contra *X. citri* subsp. *citri*, causadora do cancro cítrico.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Recursos Microbianos

Os fungos filamentosos utilizados nesse estudo (12) foram cedidos pela Prof.^a Dr.^a Lara Durães Sette (UNESP, Rio Claro), tendo sido coletados na Ilha Deception na Antártica e isolados de solos abaixo de madeira podre durante expedição PROANTAR (OPERANTAR XXXII) em novembro/dezembro de 2013 no âmbito do projeto INCT Criosfera (Coordenado pelo Prof. Jefferson Simões, UFRGS). Os isolados atualmente fazem parte do acervo de fungos da coleção de pesquisa da Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP).

O fitopatógeno causador do cancro cítrico, *X. citri* subsp. *citri*, linhagem selvagem 306, foi disponibilizado pelo Prof. Dr. Henrique Ferreira da UNESP de Rio Claro.

2.2. Extratos metabólicos brutos

Para a produção dos metabólitos secundários os fungos foram cultivados em meio de cultura ágar malte 2% à 15°C por 7 dias. Após crescimento discos de aproximadamente 5 mm contendo ágar e micélio foram inoculados em erlenmeyers contendo meio de cultura malte 2% líquido e colocados sob agitação à 15°C e 150 rpm por 20 dias.

Após separação entre biomassa e fase líquida por filtração à vácuo, os metabólitos secundários foram extraídos do meio extracelular com acetato de etila por extração líquido-líquido e do meio intracelular via rompimento celular em almofariz na presença de metanol, As frações orgânicas obtidas foram concentradas em evaporador rotativo.

2.3. Atividade antibacteriana dos extratos

A avaliação da atividade antibacteriana dos extratos foi feita pelo método Resazurin Microtiter Assay (REMA) que se baseia na redução da resazurina (corante azul), quando há metabolismo celular, para a substância resorufina, que apresenta cor rosa e é altamente fluorescente (SILVA et al., 2013).

Os extratos brutos secos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) 10% para concentração final de 30 mg/mL e em seguida diluídos para 2,1 mg/mL em meio de cultivo NYG (0,3% de extrato de levedura; 0,5% de peptona bacteriológica e 2% de glicerol). A partir dessa concentração partiu-se a microdiluição seriada em microplaca de 96 poços até 0,016 mg/mL.

O ensaio seguiu o protocolo de Silva et al. (2013) com algumas modificações. Para controle positivo (CP) do teste foi utilizado uma solução de canamicina a 20 µg/mL em NYG preparada a partir de solução estoque a 20 mg/mL. Uma solução de DMSO 1% preparada em meio NYG foi usada como controle do veículo (CV). O controle negativo (CN) foi feito diretamente na microplaca.

O inóculo bacteriano foi cultivado em meio NYG líquido a 29 °C e 200 rpm

overnight até densidade óptica ($D.O._{600}$) de 0,8 (10^7 UFC/mL) e então diluído 1:10 em meio NYG e 10 μ L foram adicionados em cada poço (10^5 UFC/poço). A microplaca foi incubada a 29 °C por 18h, em seguida 15 μ L de uma solução de resazurina 0,01% (w/v) foi adicionada e a placa novamente levada para incubação à 29 °C por 1 h e trinta minutos.

Após o período de incubação a fluorescência apresentada foi mensurada a 530 nm (excitação) e 590 nm (emissão) usando um espectrômetro de fluorescência Biotek Synergy H1MFD. A porcentagem de inibição (%) de cada extrato foi determinada pela fórmula abaixo, onde UF são as Unidades de Fluorescência.

$$\frac{[(\text{Média UF de CN}) - (\text{UF do extrato})]}{\text{Média UF de CN}} \times 100$$

Consideraram-se efetivas as amostras cuja porcentagem de inibição foi igual ou superior a média do controle positivo, 87%.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme descrito anteriormente, 12 fungos foram avaliados quanto à produção de metabólitos secundários com ação antibacteriana. Esses isolados deram origem a 24 extratos, 12 extratos extracelulares e 12 extratos intracelulares, os quais foram testados quanto à atividade em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. A Tabela 1 apresenta a média de inibição dos extratos avaliados em 2,1 mg/mL.

Isolado	Extrato*	Média** de Inibição (%)
3MP	i	92,00
	e	89,00
5MP	i	93,00
	e	00,00
6MP	i	85,00
	e	93,00
9MP	i	00,00
	e	00,00
10MP	i	92,00
	e	00,00
10.1MP	i	90,00
	e	00,00
10.4MP	i	93,00
	e	90,00
10.5MP	i	92,00
	e	00,00
10.7MP	i	00,00
	e	00,00
10.8MP	i	89,00
	e	00,00
CMP	i	93,00
	e	95,00
FMP	i	00,00
	e	89,00
Controles		
CP	Canamicina 20 µg/mL	87,00
CV	DMSO 1%	0,00
CN	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	0,00

Tabela 1 – Média de inibição do crescimento de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* por extratos produzidos por fungos filamentosos de solo antártico

* i: intracelular e: extracelular. **Média de triplicata.

Como mostra a Tabela 1, 10 isolados produziram pelo menos um extrato com atividade antimicrobiana em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Dentre os 24 extratos, 10 inibiram em 90% ou mais o crescimento bacteriano, 4 extratos apresentaram inibição entre 85 e 89% e 10 extratos não inibiram o crescimento de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Treze dos 24 extratos testados apresentaram inibição superior ao controle positivo (87%), sendo 8 extratos de origem extracelular e 5 extratos intracelulares.

O extrato extracelular produzido por CMP apresentou a maior inibição do fitopatógenos, 95%, seguido do extrato extracelular produzido pelo isolado 6MP e dos extratos intracelulares obtidos do cultivo de 5MP, 10.4MPi e CMPi, todos com 93% de inibição.

A atividade inibitória de extratos extracelulares condiz com resultados de estudos anteriores em extratos orgânicos de fungos da Antártica. Em 2014, Furbino

e colaboradores relataram atividade de extratos de fungos associados a macroalgas em *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Cladosporium sphaerosperum*. Outros estudos denotam atividade antifúngica e antibacteriana de extratos de fungos isolados de solo e outros substratos (GONÇALVES et al., 2015; ENCHEVA-MALINOVA et al., 2015).

Embora grande parte das pesquisas em atividade antimicrobiana seja centralizada em moléculas encontradas no meio extracelular devido à facilidade do acesso a esses compostos sem a necessidade de quebra da parede celular, a atividade antimicrobiana não se restringe aos compostos excretados, englobando também moléculas não secretadas, como evidenciam os extratos intracelulares ativos em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

A triagem de extratos bioativos iniciada nesse trabalho teve continuidade para comprovação dos resultados em estudo posterior envolvendo isolados de solo e sedimentos marinhos da região da Antártica e outros fitopatógenos de interesse agroeconômico como *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e *Xanthomonas euvesicatoria* em adição aos testes envolvendo *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, sendo que estes resultados foram recentemente publicados (VIEIRA, et al., 2018; PURIC, et al., 2018).

4 | CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram o potencial biotecnológico dos fungos de ambientes extremos como fonte de moléculas naturais com propriedades bioativas assim como a capacidade dos fungos de solo antártico de produzirem compostos capazes de inibir o crescimento de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, fitopatógeno causador do cancro cítrico.

5 | AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Proc. 2015/20629-6), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Proc. 401230/2016-3) e Pró-Reitoria de Pesquisa da UNESP pelos suportes financeiros que possibilitaram a execução deste estudo.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, A. M. do. **Cancro cítrico: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo**. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 5p. (EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Comunicado Técnico, 86).
- BITANCOURT, A. A. **Cancro cítrico**. *Biológico*, São Paulo, v. 23, n. 6, p. 101-111, 1957.
- CABI, 2017. ***Xanthomonas citri* subsp. *citri***. In: *Invasive Species Compendium*. Wallingford, UK: CAB International. www.cabi.org/isc. 2017. Disponível em <www.cabi.org/isc>. Acesso em: 26 de dez. 2017.
- CHEUNG, R. C. F. et al.. **Antifungal and antiviral products of marine organisms**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 98, n. 8, p. 3475–3494, 2014.
- DAYAN, F. E.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O. Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, n.12, p. 4022-4034, 2009.
- DE OLIVEIRA, A. G. et al.. **Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain**. *Biological Control*, v. 56, n. 2, p. 125–131, 2011.
- ENCHEVA-MALINOVA, M. et al.. **Antibacterial potential of streptomycete strains from Antarctic soils**. *Biotechnology & Biotechnological Equipments*, v. 28, n. 4, p. 721-727, 2014.
- ENCHEVA-MALINOVA, M. et al.. **Antimicrobial activity of Antarctic streptomycetes against pepper bacterial spot causing agents**. *First National Conference of Biotechnology - Sofia*. v. 100, p. 216-222, 2015.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organisation), online. **EPPO Plant Quarantine Data Retrieval System**. 2017. Disponível em: <<http://www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm>> Acesso em 25 set. 2017.
- FUNDECITRUS. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/pes/estimativa>
- FURBINO, L. E. et al.. **Diversity Patterns, Ecology and Biological Activities of Fungal Communities Associated with the Endemic Macroalgae Across the Antarctic Peninsula**. *Microbial Ecology*, v. 67, n. 4, p. 775-787, 2014.
- GONÇALVES, V. N. et al.. **Antibacterial, antifungal and antiprotozoal activities of fungal communities present in different substrates from Antarctica**. *Polar Biology*, v. 38, n. 8, p. 1143-1152, 2015.
- GOTTWALD, T.R. et al.. **Geo-referenced spatiotemporal analysis of the urban citrus canker epidemic in Florida**. *Phytopathology*, v.92, p.361-377, 2002.
- HENRÍQUEZ, M. et al.. **Diversity of cultivable fungi associated with Antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial, antitumoral and antioxidant potential**. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 30, n. 1, p. 65–76, 2014.
- IVANOVA, V. et al.. **Microbiaeratin, a new natural indole alkaloid from a *Microbispora aerata* strain, isolated from Livingston Island, Antarctica**. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. v. 37, n. 2, p. 161-168, 2007.
- JACOB, T. R. **Análise da expressão dos genes pertencentes aos sistemas secretórios Tipo III e Tipo IV e genes *pthAs* em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* sob condições infectante e não infectante**. Universidade Estadual Paulista (Jaboticabal), 2009.

- MONCHEVA, P. et al.. **Characteristics of soil actinomycetes from Antarctica**. Journal of Culture Collections, v. 3, p. 3-14, 2002.
- NAMEKATA, T. **O Cancro cítrico**. In: RODRIGUEZ O, VIÈGAS F, POMPEU JÚNIOR J, AMARO AA. (Ed.). Citricultura brasileira. 2 ed., p.775-786, 1991.
- NIGAM, P.; SINGH, A. **Metabolic Pathways: Production of Secondary Metabolites – Fungi**. In: BATT, C. A.; TORTORELLO, M. L. (Ed.). Encyclopedia of Food Microbiology. Elsevier Ltd, Academic Press, v. 2, p. 570–578, 2014.
- PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. **Microrganismos endofíticos**. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, Brasília, n. 29, p. 62-77, 2002.
- PURIC, J.; VIEIRA, G.; CAVALCA, L.B. et al. **Activity of antarctic fungi extracts against phytopathogenic bacteria**. Lett. Appl. Microbiol., v. 66, n. 6, p. 530-536, 2018. <https://doi.org/10.1111/lam.12875>.
- ROCHA, C. H. B. et al.. **Avaliação da presença de metais pesados nas águas superficiais da Bacia do Córrego São Mateus**, Juíz de Fora (MG), Brasil. Revista Espinhaço, p.33-44, 2017.
- ROJAS, J. L. et al.. **Bacterial diversity from benthic mats of Antarctic lakes as a source of new bioactive metabolites**. Marine Genomics, v. 2, n. 1, p. 33–41, 2009.
- ROSSETTI, V. **Identificação do Cancro cítrico**. O Biológico, v.47, p.145-153, 1981.
- ROSSETTI, V. et al.. **Doenças dos citros causadas por algas, fungos, bactérias e vírus**. Fundação Cargill, p. 84, 1993.
- RYAN, R. P et al.. **Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions**. Nature Reviews Microbiology, v. 9, n. 5, p. 344-355, 2011.
- SANCHES, A. R. L. et al.. **Análise Econômica da Prevenção e Controle do Cancro Cítrico no Estado de São Paulo**. Revista de Economia e Sociologia Rural, v. 52, n. 3, p. 549-566, 2014.
- SEGURA-MUÑOZ, S. I. **Impacto ambiental na área do aterro sanitário e incinerador de resíduos sólidos de Ribeirão Preto, SP: Avaliação dos níveis de metais pesados**. 131p. Tese (Pós-Graduação de Enfermagem em Saúde 43 Pública - Linha de Pesquisa: Saúde Ambiental) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.
- SHEKH, R. M. et al.. **Antifungal activity of Arctic and Antarctic bacteria isolates**. Polar Biology, v. 34, n. 1, p. 139–143, 2011.
- SILBER, J. et al. **Calcarides A–E, Antibacterial Macrocyclic and Linear Polyesters from a Calcarisporium Strain**. Marine Drugs, v. 11, n. 9, p. 3309-3323, 2013.
- SILVA, I. C. et al.. **Antibacterial activity of alkyl gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. Journal of Bacteriology, v. 195, n. 1, p. 85-94, 2013.
- SVAHN, K. S. et al.. **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. 33p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel, 2002.

TIAN, Y. et al. **Secondary Metabolites from Polar Organisms**, Mar. Drugs, v. 15, p. 28, 2017.

TORTORA, G. J. et al.. **Microbiologia**, 10ed, Porto Alegre, 2012.

VIEIRA, G.; PURIC, J.; MORÃO, L.G et al. **Terrestrial and marine Antarctic fungi extracts active against *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. Lett. Appl. Microbiol., v. 67, n. 1, p. 64-71, 2018. <https://doi.org/10.1111/lam.12890>.

SOBRE A ORGANIZADORA

Christiane Trevisan Slivinski - Possui Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Ponta Grossa (2000), Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Estadual de Ponta Grossa (2007) e Doutorado em Ciências - Bioquímica pela Universidade Federal do Paraná (2012). Tem experiência na área de Bioquímica, com ênfase em Biotecnologia, atuando principalmente nos seguintes temas: inibição enzimática; fermentação em estado sólido; produção, caracterização bioquímica e purificação de proteínas (enzimas); e uso de resíduo agroindustrial para produção de biomoléculas (biosurfactantes). É professora na Universidade Estadual de Ponta Grossa nas disciplinas de Bioquímica e Química Geral desde 2006, lecionando para os cursos de Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas, Farmácia, Educação Física, Enfermagem, Odontologia, Química, Zootecnia, Agronomia, Engenharia de Alimentos. Também leciona no Centro de Ensino Superior dos Campos Gerais – CESCAGE desde 2012 para os cursos de Fisioterapia, Odontologia, Farmácia, Nutrição, Enfermagem e Agronomia, nas disciplinas de Bioquímica, Fisiologia, Biomorfologia, Genética, Metodologia Científica, Microbiologia de Alimentos, Nutrição Normal, Trabalho de Conclusão de Curso e Tecnologia de Produtos Agropecuários. Leciona nas Faculdades UNOPAR desde 2015 para o curso de Enfermagem nas disciplinas de Ciências Celulares e Moleculares, Microbiologia e Imunologia.

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-85107-74-1



9 788585 107741