



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ADMILTON GONÇALVES DE OLIVEIRA JUNIOR

**PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE METABÓLITOS  
SECUNDÁRIOS COM ATIVIDADE ANTIBIÓTICA  
PRODUZIDOS POR *Pseudomonas aeruginosa* CEPA LV  
CONTRA BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS:  
AGENTE CAUSAL DO CANCRO CÍTRICO (*Xanthomonas citri*  
*pv. citri*) E ISOLADOS CLÍNICOS DE *Klebsiella pneumoniae*  
PRODUTORAS DE CARBAPENEMASE**

ADMILTON GONÇALVES DE OLIVEIRA JUNIOR

**PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE METABÓLITOS  
SECUNDÁRIOS COM ATIVIDADE ANTIBIÓTICA  
PRODUZIDOS POR *Pseudomonas aeruginosa* CEPA LV  
CONTRA BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS:  
AGENTE CAUSAL DO CANCRO CÍTRICO (*Xanthomonas citri*  
*pv. citri*) E ISOLADOS CLÍNICOS DE *Klebsiella pneumoniae*  
PRODUTORAS DE CARBAPENEMASE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho

Londrina  
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

O48p Oliveira Júnior, Admilton Gonçalves de.  
Produção e purificação de metabólitos secundários com atividade antibiótica produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* CEPA LV contra bactérias gram negativas : agente causal do cancro cítrico (*Xanthomonas citri* pv. *citri*) e isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase / Admilton Gonçalves de Oliveira Júnior. – Londrina, 2011.  
110 f. : il.

Orientador: Galdino Andrade Filho.

Tese (Doutor em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Ecologia microbiana – Teses. 2. Bactérias (Resistência) – Teses. 3. Microorganismos – Patogenicidade – Teses. 4. Bactérias – Metabolismo – Teses. 5. Laranjas – Doenças e pragas – Teses. 6. Microbiologia médica – Teses. 7. Citricultura – Teses. I. Andrade Filho, Galdino. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579.26

ADMILTON GONÇALVES DE OLIVEIRA JUNIOR

**PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS  
COM ATIVIDADE ANTIBIÓTICA PRODUZIDOS POR *Pseudomonas  
aeruginosa* CEPA LV CONTRA BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS:  
AGENTE CAUSAL DO CANCRO CÍTRICO (*Xanthomonas citri* pv. *citri*)  
E ISOLADOS CLÍNICOS DE *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORAS DE  
CARBAPENEMASE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho  
UEL – Londrina - PR

---

Prof. Dr. Gerson Nakazato  
UEL – Londrina - PR

---

Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Melo  
UEM – Maringá - PR

---

Profa. Dra. Maria Isabel Balbi Peña  
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Renata Katsuko Takayama  
Kobayashi  
UEL – Londrina - PR

Londrina, 20 de dezembro de 2011.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Ecologia Microbiana do Departamento de Microbiologia, do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Londrina e contou com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Dedico este trabalho a Deus, pela luz que me ilumina, à minha família, pelo amor e carinho, a equipe do Laboratório de Ecologia Microbiana e a todos aqueles que de alguma forma me acompanharam no desenvolvimento deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela luz que me guia.

Aos meus pais Admilton e Tereza pelo incentivo e apoio e principalmente por terem se empenhado intensamente na minha educação e formação como pessoa.

A meu irmão William, minha cunhada Kátia por serem pessoas maravilhosas que fazem parte insubstituível da minha vida. E a todos os meus familiares, pela confiança, companheirismo, motivação ao longo de todo doutorado.

À minha namorada, amiga e companheira Alane em todos os momentos, por toda a ajuda e principalmente pelo apoio emocional em todos os momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Galdino Andrade por ter me brindado com a oportunidade de trabalhar no seu laboratório (Laboratório de Ecologia Microbiana), pelo exemplo de profissionalismo, por ter sido paciente, compreensivo e amigo ao longo destes anos. Obrigado Gal!!!

À Profa. Dra. Célia Gadalupe Tardelli de Jesus Andrade, por sempre me incentivar a crescer como pessoa, pela orientação, pela amizade, brilhantismo profissional e valiosos conselhos profissionais e pessoais.

Aos meus amigos e colegas com quem tive o prazer de trabalhar, Ane, Carina, Carol, Cíntia, Eik, Fernanda, Flávia, Guilherme, Jamile, Jaqueline, Júlio, Luan, Luís, Lucilene, Mayara, Priscila, Vanessa, Viviana, pelo apoio, paciência, amizade e por terem tornado meu dia a dia de trabalho muito prazeroso. Além de fazerem com que este período de trabalho fosse não somente um período de aprimoramento profissional, mas também de crescimento pessoal.

Ao Amigo, Juca Abramo Barrera San Martin, pela valiosa amizade, companheirismo, incansável disposição de trabalho e pelos ensinamentos sobre a Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Ao Técnico Oswaldo Capelo, pela amizade, e disposição que foi parte fundamental para execução da Microscopia eletrônica de Varredura.

Ao Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello pela amizade, ajuda constante na condução e interpretação dos experimentos e por permitir a utilização de equipamentos e instalações de seu laboratório.

Aos técnicos, Dr. Cláudio Roberto Novello e Dra. Ivânia Teresinha Albrecht Schuquel pelas valiosas sugestões, ensinamentos e principalmente pelo esforço de ambos nas identificação das substâncias.

À técnica do laboratório, Marta S. de A. Salvador pela amizade, companherismo e por estar sempre disposta a ajudar.

Aos professores do Departamento de Microbiologia pelo apoio e orientação.

À Coordenação da Pós Graduação em Microbiologia, por fornecer condições para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro, fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho. **Fica registrado o meu muito obrigado!**

Não sejas nunca medroso!  
Fraco embora, tem coragem!  
Para fazer a viagem  
Da vida, sem hesitar,

É preciso, de alma forte,  
Sem ostentar valentia,  
Dominar a covardia,  
Para o perigo enfrentar.

O medo é próprio do pérfido,  
Do pecador, do malvado:  
Quem não se entrega ao pecado  
Não receia a punição.

Não tem medo quem caminha  
Com a consciência tranquila,  
Quem o inimigo aniquila  
Com a força da razão!

Não abuses da bravura;  
Não afrontes o inimigo;  
Não procures o perigo;  
Prega o amor! e prega a paz!

Mas, se isso for impossível,  
Não fujas! cai batalhando!  
E, se morreres lutando,  
Morre! feliz morrerás

Olavo Bilac

OLIVEIRA JUNIOR, Admilton Gonçalves de. **Produção e purificação de metabólitos secundários com atividade antibiótica produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV contra bactérias Gram negativas:** agente causal do cancro cítrico (*Xanthomonas citri* pv. *citri*) e isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemases. 2011. 110 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

## RESUMO

Uma das estratégias utilizadas pelos micro-organismos para proteção, competição por nutrientes, espaço que é constantemente encontrada na natureza é a produção de antimicrobianos no metabolismo secundário. Os antimicrobianos são substâncias capazes, em pequenas concentrações, de inibir o crescimento e/ou matar outros micro-organismos. Estas substâncias estão amplamente distribuídas na natureza, onde desempenham importante papel na regulação da população microbiana. Estes agentes interferem em diversos sítios vulneráveis na célula, como a síntese da parede celular, as funções da membrana citoplasmática, a síntese protéica, o metabolismo de ácidos nucléicos e o metabolismo intermediário. O uso indiscriminado e contínuo dos antimicrobianos tem levado à seleção de patógenos multirresistentes, tanto fitopatógenos de importância agrônômica como patógenos de importância médica. O problema da resistência microbiana é crescente e a perspectiva de uso de drogas antimicrobianas no futuro é incerta. Portanto, atitudes devem ser tomadas que possam reduzir este problema, como, por exemplo, a descoberta de novos antimicrobianos de amplo espectro de ação já que seu uso racional pode contribuir para o controle dos micro-organismos multirresistentes diminuindo custos de produção na agricultura e/ou nos tratamentos de infecções hospitalares.

**Palavras-chave:** Citricultura. Multirresistente. Infecção hospitalar. Laranja. Purificação.

OLIVEIRA JUNIOR, Admilton Gonçalves de. **Production and purification of secondary metabolites with antibiotic activity produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain against Gram-negative bacteria:** the causal agent of citrus canker (*Xanthomonas citri* pv. *citri*) and clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producers. 2011. 110 f. PhD (Thesis in Microbiology) – State University of Londrina, Londrina, 2011.

## ABSTRACT

One of the strategies used by microorganisms for protection, competition for nutrients, space and constantly found in nature is the production of antimicrobial secondary metabolism. Antimicrobials are substances that in small concentrations, to inhibit growth and / or kill other microorganisms. These substances are widely distributed in nature, which play an important role in regulating the microbial population. These agents interfere with several vulnerable sites in the cell such as cell wall synthesis, the functions of the cytoplasmic membrane, protein synthesis, nucleic acid metabolism and intermediary metabolism. The continuous and indiscriminate use of antimicrobials has led to the selection of multidrug-resistant pathogens, both pathogens of agronomic importance as pathogens of medical importance. The problem of microbial resistance is growing and the prospects for the use of antimicrobial drugs in the future is uncertain. Therefore, actions should be taken so that they can reduce this problem, for example, the discovery of new broad-spectrum antimicrobial action and its rationale may contribute to the control of multidrug-resistant microorganisms reducing costs of production in agriculture and / or treatment of hospital infections.

**Keywords:** Citriculture. Multiresistence. Hospital infection. Orange. Purification.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Algumas das principais bactérias fitopatogênicas de importância econômica. ....20

**Tabela 2** – Exemplos de antibióticos produzidos por *Pseudomonas* spp. ....41

### Artigo B

**Tabela 1** – Antibiotic activity against Xcc 306 by diffusion agar method of nine fractions obtained from purification of F3 fraction .....65

### Artigo D

**Tabela 1** – Perfil de resistência a diferentes antibióticos de 22 isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase pela técnica de disco difusão.....84

**Tabela 2** – Avaliação da atividade antibiótica por disco difusão da fração F3 contra isolados clínicos *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase .....89

**Tabela 3** – Concentração inibitória mínima e bactericida mínima da fração antibiótica F3d frente a três isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase.....90

### Patente (inclusão)

**Tabela 1** – Avaliação da ação antibiótica por difusão em ágar das frações antibióticas frente à Xcc 306 ..... 105

**Tabela 2** – Avaliação da atividade antibiótica das frações obtidas por CLV, por difusão em ágar frente à Xcc 306 ..... 106

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i> cepa 306 ( <i>Xcc</i> 306). .....	22
<b>Figura 2</b> – Folha de laranja ( <i>Citrus sinensis</i> cv. Valência) infectada com <i>Xcc</i> 306. ....	25
<b>Figura 3</b> – Lesões de CCA em folhas de laranja ( <i>C. sinensis</i> cv. Valência). .....	26
<b>Figura 4</b> – Eletromicrografia de varredura do início da infecção de <i>Xcc</i> 306 via estômato em folhas de laranja ( <i>C. sinensis</i> cv. Valência).....	27
<b>Figura 5</b> – Eletromicrografia de varredura de folhas de laranja ( <i>C. sinensis</i> cv. Valência) infectadas com <i>Xcc</i> 306.....	28
<b>Figura 6</b> – <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	33

### Artigo B

<b>Figure 1</b> – Regression of dose–effect of three concentrations of the F3d fraction on the number of lesions of citrus canker caused by <i>Xcc</i> 306 strain in leaves of <i>C. sinensis</i> cv. Valence after 21 days of application .....	66
<b>Figure 2</b> – Scanning electron micrographs of the orange leaves ( <i>C. sinensis</i> cv. Valence) inoculated and non-inoculated with <i>Xcc</i> 306 .....	67
<b>Figure 3</b> – Orange leaves Valence ( <i>C. sinensis</i> var. Valence) inoculated with <i>Xcc</i> 306 strain and treated in the preventive and curative treatment with antibiotic compounds F3d.....	68
<b>Figure 4</b> – Transmission electron micrographs of the orange leaves ( <i>C. sinensis</i> cv. Valence) inoculated and non-inoculated with <i>Xcc</i> 306 .....	70
<b>Figure 5</b> – Orange leaves Valence at 120 h after inoculated with <i>Xcc</i> 306 strain and treated (preventive treatment) with antibiotic compounds F3d. ....	71
<b>Figure 6</b> – Orange leaves Valence at 120 h after inoculated with <i>Xcc</i> 306 strain and treated (curative treatment) with antibiotic compounds F3d. ....	71

## Artigo D

- Figura 1** – Eletromicrografia de varredura de isolado clínico de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase cepa 2812-4 .....91
- Figura 2** – Eletromicrografia de transmissão de isolado clínico de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase cepa 2812-4 .....92

## Patente

- Figura 1** – Regressão dose-efeito da aplicação do composto antibiótico FD em dois regimes de tratamento (preventivo e curativo) sobre o número de lesões foliares de CCA..... 108
- Figura 2** – Regressão dose-efeito da aplicação do composto antibiótico F3 em dois regimes de tratamento (preventivo e curativo) sobre o número de lesões foliares de CCA..... 109
- Figura 3** – Regressão dose-efeito da aplicação do composto antibiótico F3d em dois regimes de tratamento (preventivo e curativo) sobre o número de lesões foliares de CCA..... 110

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>Bc</b>	<i>Botrytis cinerea</i>
<b>DAPG</b>	2,4-diacetylphloroglucinol
<b>CCA</b>	Cancro cítrico asiático
<b>CCD</b>	Cromatografia em camada delgada
<b>CGS</b>	Cromatografia gás-sólido
<b>CLS</b>	Cromatografia líquida sólido
<b>CIM</b>	Concentração inibitória mínima
<b>CSS</b>	Cromatografia supercrítica com fase estacionária
<b>CVC</b>	Clorose variegada dos citros
<b>CW</b>	Parede celular
<b>D</b>	Dose
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>Eh</b>	<i>Erwinia herbicola</i>
<b>EPS</b>	Exopolissacarídeo
<b>ESBL</b>	$\beta$ -lactamase de espectro ampliado
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization
<b>FDA</b>	Florida Department of Agriculture
<b>FD</b>	Fase diclorometano
<b>Fo</b>	<i>Fusarium oxysporum</i>
<b>F3</b>	Fração acetato de etila
<b>F3a</b>	Fração hexano
<b>F3b</b>	Fração hexano/diclorometano
<b>F3c</b>	Fração diclorometano
<b>F3d</b>	Fração diclorometano/acetato de etila
<b>F3e</b>	Fração acetato de etila
<b>F3</b>	Fração acetato de etila/metanol
<b>F3g</b>	Fração metanol
<b>F3h</b>	Fração metanol/água
<b>F3i</b>	Fração água
<b>Gg</b>	<i>Gaeumannomyces graminis</i>
<b>Ggt</b>	<i>G. graminis</i> var. <i>tritici</i>

<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>IS</b>	Espaço inter-celular
<b>KPC</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
<b>LV</b>	Lesão velha
<b>MIC</b>	Concentração inibitória mínima
<b>NA</b>	Ágar nutriente
<b>NB</b>	Caldo nutriente
<b>n-BBS</b>	n-butilbenzenosulfonamida
<b>NC</b>	Controle negativo
<b>OD</b>	Densidade óptica
<b>OMP</b>	Proteína de membrana externa
<b>PBP</b>	Proteína ligadora de penicilina
<b>Pc</b>	<i>Phytophthora cryptogea</i>
<b>Ps</b>	<i>Pythium splendens</i>
<b>Pu</b>	<i>P. ultimum</i>
<b>Pv</b>	Patovar
<b>Rs</b>	<i>Rhizoctonia solani</i>
<b>SC</b>	Câmara subestomática
<b>SEM</b>	Microscopia eletrônica de varredura
<b>St</b>	<i>Septoria tritici</i>
<b>Subsp</b>	Subspecies
<b>Tb</b>	<i>Thielaviopsis basicola</i>
<b>TEM</b>	Microscopia eletrônica de transmissão
<b>UFC</b>	Unidade formadora de colônias
<b>Var</b>	Variedade
<b>VBC</b>	Células bacterianas viáveis
<b>Xcc</b>	<i>Xantomonas citri</i> pv. <i>citri</i>
<b>Xoo</b>	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	17
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	19
3.1	BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS DE INTERESSE AGRONÔMICO	19
3.1.1	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i> : Agente Causador do Cancro Cítrico Asiático	21
3.1.2	Cancro Cítrico Asiático: Histórico e Importância Econômica	22
3.1.3	Ciclo da Doença	24
3.1.4	Controle do Cancro Cítrico Asiático	29
3.1.4.1	Erradicação e exclusão	29
3.1.4.2	Controle químico	29
3.1.4.3	Controle biológico	30
3.2	BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS DE INTERESSE CLÍNICO	31
3.2.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	32
3.2.2	Epidemiologia das Infecções Hospitalares Causadas por <i>K. pneumoniae</i>	33
3.2.3	Mecanismos de Resistência de <i>K. pneumoniae</i> aos Beta-lactâmicos	34
3.2.3.1	Redução da Afinidade pelos Alvos da Droga	35
3.2.3.2	Alteração da permeabilidade da membrana externa	35
3.2.3.3	$\beta$ -lactamases	36
3.2.3.3.1	<i>Amp C betalactamase</i>	36
3.2.3.3.2	<i><math>\beta</math>-lactamase de espectro ampliado (ESBL)</i>	37
3.2.3.3.3	<i>Metallo-Betalactamases (MBL)</i>	38
3.2.3.3.4	<i>Klebsiella pneumoniae Carbapenemase</i>	38
3.3	AGENTES ANTIMICROBIANOS	39
3.3.1	Produção de Antibióticos por <i>Pseudomonas</i> spp.	40
3.3.2	Produção de Substâncias Bioativas no Metabolismo Secundário	42

3.4	PURIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS.....	43
3.4.1	Cromatografia por Adsorção.....	43
3.4.2	Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	44
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	46
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	47
	<b>ARTIGOS</b> .....	56
	<b>ARTIGO A – EVALUATION OF THE ANTIBIOTIC ACTIVITY OF EXTRACELLULAR COMPOUNDS PRODUCED BY THE PSEUDOMONAS STRAIN AGAINST THE XANTHOMONAS CITRI PV. CITRI 306 STRAIN</b> .....	57
	<b>ARTIGO B – ULTRASTRUCTURAL EVALUATION OF ANTIBIOTIC ACTIVITY ON THE ORANGE LEAVES DEVELOPING LESION BY XANTHOMONAS CITRI PV. CITRI</b> .....	58
	<b>ARTIGO C – ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF AN ANTIBIOTIC SUBSTANCE PRODUCED BY A PSEUDOMONAS AERUGINOSA LV STRAIN (EM PROCESSO DE PATENTE)</b> .....	79
	<b>ARTIGO D – ATIVIDADE ANTIBIÓTICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS BACTERIANOS SEMI-PURIFICADOS PRODUZIDOS POR PSEUDOMONAS AERUGINOSA CEPA LV NO CONTROLE DE ISOLADOS CLÍNICOS MULTIRRESISTENTES DE KLEBSIELLA PNEUMONIAE</b> .....	81
	<b>PATENTE</b> .....	96
	<b>PATENTE – PROCESSO DE PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E OBTENÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADES ANTIBIÓTICAS PARA O CONTROLE DE DOENÇAS CAUSADAS POR BACTÉRIAS EM PLANTAS #PI 0803350</b> .....	97
	<b>INCUSÃO – INCLUSÃO DE PROCESSO NA PATENTE</b> .....	98

## 1 INTRODUÇÃO

As ameaças à saúde de seres vivos causadas por infecções de micro-organismos resistentes a antimicrobianos e a vários agentes químicos vêm atingindo índices jamais registrados. Muitos micro-organismos têm desenvolvido resistência tanto contra os já bem estabelecidos antimicrobianos de uso convencional quanto contra outros mais potentes e tóxicos, causando graves problemas de saúde pública e vultosos prejuízos econômicos, tanto para área médico como para a agricultura.

O impacto da crescente resistência a medicamentos e a substâncias químicas específicas tem movimentado vários grupos de pesquisa, assim como a indústria para o desenvolvimento de novas drogas que sejam capazes de efetivamente combater as estratégias de adaptação que os micro-organismos elaboram em face de todo o tipo de situação adversa.

O surgimento da resistência a antimicrobianos é um exemplo clássico de evolução em resposta a uma forte pressão de seleção. Tanto na agricultura, na medicina ou em outras áreas onde há uma comunidade microbiana estabelecida, diversos tipos de micro-organismos circulam e interagem entre si diretamente e/ou indiretamente trocando material genético.

A respeito dos micro-organismos patogênicos e/ou fitopatogênicos, a maior preocupação é o surgimento de cepas resistentes aos antimicrobianos disponíveis. Neste contexto, uma linha de pesquisa com grande potencial é o isolamento de moléculas com atividade antimicrobiana a partir de micro-organismos. Entretanto, entre o isolamento e caracterização inicial até a obtenção de um produto comercial há tarefa longa e difícil, sendo necessário obter informações com relação à estrutura molecular, modo de ação do agente e potencial de toxicidade para espécies não alvo. Além disso, estudo com relação à formulação, estabilidade e vida de prateleira também são necessários.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Produção, purificação e identificação de metabólitos secundários com atividade antibiótica produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV contra bactérias Gram negativas de interesse agrônômico e clínico.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Produzir compostos antibióticos do metabolismo secundário da cepa LV com atividade antibiótica contra o fitopatógeno *Xanthomonas citri* pv. *citri* cepa 306 (*Xcc* 306) e contra isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase.

2.2.2 Purificar os metabólitos secundários da cepa LV com uso de métodos cromatográficos.

2.2.3 Determinar qual(is) fração(ões) purificada(s) terá(ão) maior atividade antibiótica *in vitro* e *in vivo* contra a *Xcc* 306 e *in vitro* contra isolados clínicos de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase.

2.2.4 Determinar a concentração da molécula com maior atividade antibiótica para o controle da *Xcc* 306.

2.2.5 Caracterizar as moléculas isoladas com uso de métodos de ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massas (EM), espectroscopia no UV/VIS e dicroísmo circular (DC), infravermelho.

2.2.6 Identificar todas as substâncias isoladas e caracterizadas quimicamente.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

No presente estudo foram avaliadas a atividade antibiótica de compostos semi-purificados do metabolismo secundário de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV contra dois grupos de bactérias patogênicas Gram negativas: *Xanthomonas citri* pv. *citri*, patógeno de importância agrônômica e isolados clínicos multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase, patógeno multirresistentes de importância médica.

#### 3.1 BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS DE INTERESSE AGRONÔMICO

Bactérias são importantes patógenos de plantas, não somente pela alta incidência e severidade que apresentam em culturas de valor econômico, mas também pela facilidade com que se disseminam e pelas dificuldades encontradas para o controle das enfermidades por elas incitadas.

Atualmente, são reconhecidos cerca de 26 gêneros de bactérias fitopatogênicas, sendo que representantes de muitos desses gêneros (incluindo espécies, subespécies e patovares) já foram encontrados em nosso país. Alguns desses patógenos são responsáveis por graves prejuízos econômicos, chegando a constituir fator limitante à exploração comercial de diversas culturas de importância econômica (ALMEIDA, 2001).

Dentre as fitobacterioses, as causadas por bactérias Gram negativas se destacam pelo grande número de patógenos envolvidos e principalmente pela importância econômica das doenças causadas por este grupo de micro-organismos (Tabela 1).

**Tabela 1** – Algumas das principais bactérias fitopatogênicas Gram negativas de importância econômica.

Patógenos	Doenças causadas	Principais hospedeiros
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	Podridão-mole	milho, tomate
<i>E. carotovora</i> var. <i>zeae</i>	Podridão-mole	milho
<i>E. chrysanthemi</i> pv. <i>zeae</i>	Podridão-mole	milho
<i>E. herbicola</i> pv. <i>gypsophilae</i>	Galha	cravo, rosa
<i>E. tracheiphila</i>	Murcha bacteriana	cucurbitáceas
<i>Pantoea stewartii</i>	Murcha bacteriana	milho
<i>Pseudomonas asplenii</i>	Mancha foliar	asplenium
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	Galha aérea	oliveira
<i>P. syringae</i> pv. <i>passiflorae</i>	Mancha oleosa	maracujazeiro
<i>P. tolaasii</i>	Pústula bacteriana	cogumelos
<i>Rhizobacter dauci</i> ...	Galha	cenoura
<i>Rhizomonas suberifaciens</i>	Engrossamento de raiz	alface
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>celebensis</i>	Estria bacteriana	bananeira
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i>	Gomose	gramíneas
<i>X. campestris</i> pv. <i>aberrans</i>	Mancha foliar	brássicas
<i>X. campestris</i> pv. <i>armoraciae</i>	Mancha foliar	brássicas
<i>X. campestris</i> pv. <i>musacearum</i>	Murcha bacteriana	bananeira
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Podridão-negra	couve
<i>X. cassavae</i>	Necrose bacteriana	mandioca
<i>X. citri</i> pv. <i>citri</i>	Cancro cítrico asiático	<i>Citrus</i> spp.
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Crestamento bacteriano	gramíneas, arroz
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	Estria bacteriana	gramíneas
<i>X. vasicola</i> pv. <i>holcicola</i>	Mancha foliar	gramíneas
<i>Xylella fastidiosa</i>	Clorose variegada do <i>citrus</i>	<i>Citrus</i> spp.
<i>Xylophilus ampelinus</i>	Crestamento bacteriano	videira

Adaptado de Almeida (2001).

Com relação a produção mundial agrícola, o Brasil ultrapassou o Canadá e se tornou o terceiro maior exportador de produtos agrícolas do mundo. Na última década, o País já havia deixado para trás Austrália e China. Hoje, apenas Estados Unidos e União Européia vendem mais alimentos no planeta que os agricultores brasileiros (IBGE, 2010).

Dentre as diferentes áreas do agronegócio brasileiro, a citricultura é de suma importância para a economia, uma vez que, a produção e exportação de laranja no Brasil garantiram o primeiro lugar no *ranking* mundial (IBGE, 2010). Além disso, o Brasil produz mais da metade do suco de laranja consumido no mundo, que responde anualmente por mais de um bilhão de dólares nas exportações brasileiras.

Entretanto, esta posição vem sendo constantemente ameaçada por graves problemas fitossanitários que a citricultura vem enfrentando, dentre eles destacamos o cancro cítrico asiático (CCA), onde sua incidência além de aumentar os custos de produção, também desestimula o citricultor e causa problemas na exportação devido a barreiras fitossanitárias que muitas vezes são impostas por países importadores.

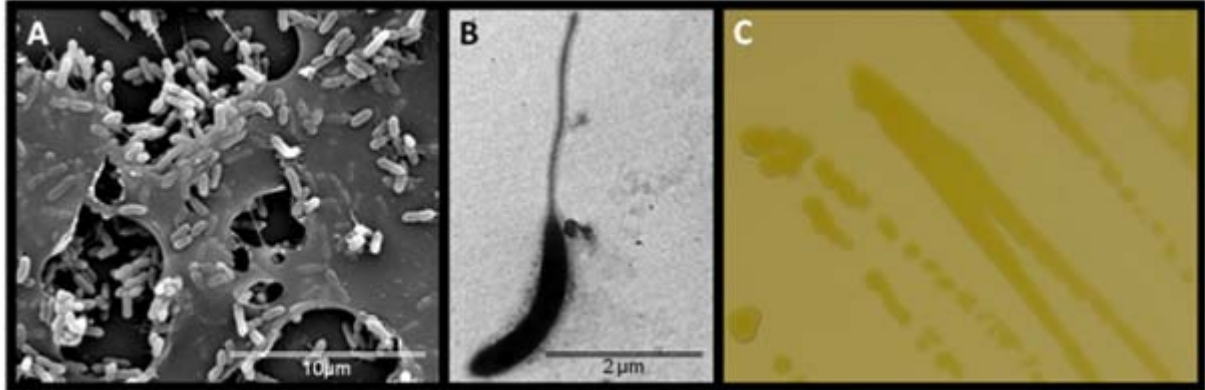
### 3.1.1 *Xanthomonas citri* pv. *citri*: Agente Causador do Cancro Cítrico Asiático.

A taxonomia do agente causal do CCA vem sendo constantemente revisada, com isso, propostas de reclassificações tem sido feitas por alguns pesquisadores (SHAAD et al., 2000, 2005; BRUNINGS; GABRIEL; 2003; VAUTERIN et al., 1995). Em virtude disto, adotamos no presente trabalho a seguinte classificação aceita na literatura mundial: *Xanthomonas citri* pv. *citri* (*Xcc*) (SCHAAD et al., 2005).

A *Xcc* (sinônimo *X. axonopodis* pv. *citri*) (SCHAAD et al., 2005), é um bacilo Gram negativo, aeróbico, com um único flagelo polar. Suas colônias possuem pigmentação amarela quando cultivadas em ágar nutriente e um aspecto viscoso devido à produção de exopolissacarídeos (EPS) (RAJAGOPAL et al., 1997) (Figura 1).

A *Xcc* cresce na maioria dos meios utilizados em laboratório e é facilmente isolada de tecido vegetal infectado. Colônias são visíveis após 24 e 72 horas de incubação a uma temperatura de 28 °C (BRUNINGS; GABRIEL; 2003). As condições ideais para o crescimento da *Xcc* são: umidade elevada e temperatura entre 20 e 30 °C.

**Figura 1** – *Xanthomonas citri* pv. *citri* cepa 306 (*Xcc* 306). A: Eletromicrografia de varredura da *Xcc* 306 mergulhada em EPS (Oliveira et al., 2011). B: Eletromicrografia de transmissão da *Xcc* 306. Note a presença de um flagelo polar. C: Fotografia de *Xcc* 306 cultivada em ágar nutriente mostrando a coloração amarela e o aspecto viscoso.



O sequenciamento completo do genoma da bactéria *Xcc* cepa 306 (um cromossomo de 5,17 Mpb e dois plasmídeos) permitiu evidenciar a considerável versatilidade bioquímica e os vários mecanismos que esse organismo utiliza para a sua sobrevivência e para a infecção na planta hospedeira (DA SILVA et al., 2002). Aspectos como, produção de compostos potencialmente capazes de aumentar a habilidade da bactéria em causar danos a planta, proteínas que atenuam o efeito de antibióticos, proteínas que destroem as células do interior da folha (DA SILVA et al., 2002), estão permitindo abrir novas linhas de pesquisa para combater o CCA.

### 3.1.2 Cancro Cítrico: Histórico e Importância Econômica

A citricultura é uma das mais importantes atividades econômicas do Brasil (FAO, 2009). No *rank* mundial de produtores de laranja, o Brasil ocupa a primeira posição, com uma produção de aproximadamente 19 milhões de toneladas (IBGE, 2010), e é responsável por 56% do suco de laranja comercializado no mundo (FUNDECITRUS, 2010). O setor ainda é responsável pela geração de milhares de empregos diretos e indiretos (FUNDECITRUS, 2010).

Apesar do seu grande potencial econômico e social, os citros são susceptíveis a muitas doenças, algumas de alto potencial destrutivo, tais como a clorose variegada dos citros (CVC), causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*

(LARANJEIRA; PALAZZO, 1999) e o CCA (BITANCOURT, 1957; SHAAD et al., 2000, 2005).

O CCA é originário do sudoeste da Ásia, mesmo centro de origem dos citros. As primeiras indicações de sua existência datam dos anos entre 1827 e 1831 em folhas herbarizadas de *Citrus medica* provenientes da Índia (FAWCETT; JENKINS, 1933; BITANCOURT, 1957). A partir daí, esta doença tem se disseminado pelo mundo, principalmente através de importação de material vegetativo contaminado, propagando-se para várias regiões do mundo tais como Oceania, África, América do Norte e do Sul (KOIZUMI, 1985; LEITE JUNIOR; MOHAM, 1990; FEICHTENBERGER, 1997; BRAITHWAIT et al., 2002).

Nos EUA, segundo produtor mundial de citros, apesar do CCA ter sido considerado erradicado na década de 40 (DOPSON, 1964), por volta de 1984 novos focos foram encontrados, levando à eliminação de milhões de plantas o que representou um prejuízo acumulado de aproximadamente 100 milhões de dólares.

Hoje, apesar dos esforços em continuar com os programas de erradicação, a Flórida ainda possui focos da doença devido à disseminação da bactéria (FDA, 2010). Entre 1994 e 2006, mais de 7 milhões de mudas comerciais e 4,2 milhões residenciais foram destruídas em uma tentativa de erradicar o CCA na Flórida (GOTTWALD et al., 2007). No início de 2006, pelo efeito dos furacões que entre 2004 e 2005 cruzaram a Flórida, o CCA disseminou-se pela península, aumentando a incidência da doença até o ponto que a erradicação não foi mais considerada viável e o programa de erradicação foi descontinuado (GOTTWALD et al., 2007).

A primeira ocorrência no Brasil foi em 1957, no município de Presidente Prudente, São Paulo (AMARAL, 1957; BITANCOURT, 1957), dando assim início a várias medidas de controle com o objetivo de evitar a disseminação da doença.

Apesar dos esforços iniciais, a doença foi posteriormente encontrada em outros estados como: Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Roraima (FEICHTENBERGER et al., 1997; LEITE JUNIOR; MOHAM, 1990; NASCIMENTO et al., 2003). Provavelmente isto ocorreu em razão da movimentação de material vegetal infectado.

Acredita-se que a introdução do CCA no Brasil tenha ocorrido alguns anos antes da primeira detecção, quando materiais propagativos foram importados da Ásia (ROSSETTI, 1977).

A partir do ano de 1996, com a introdução da lagarta minadora dos citros, *Phyllocnistis citrella*, mudou as características epidemiológicas do patossistema, ocasionando um aumento na incidência do CCA e mudanças nas legislações, a fim de diminuir ou até mesmo eliminar os focos da bactéria (BERGAMIN FILHO et al., 2001).

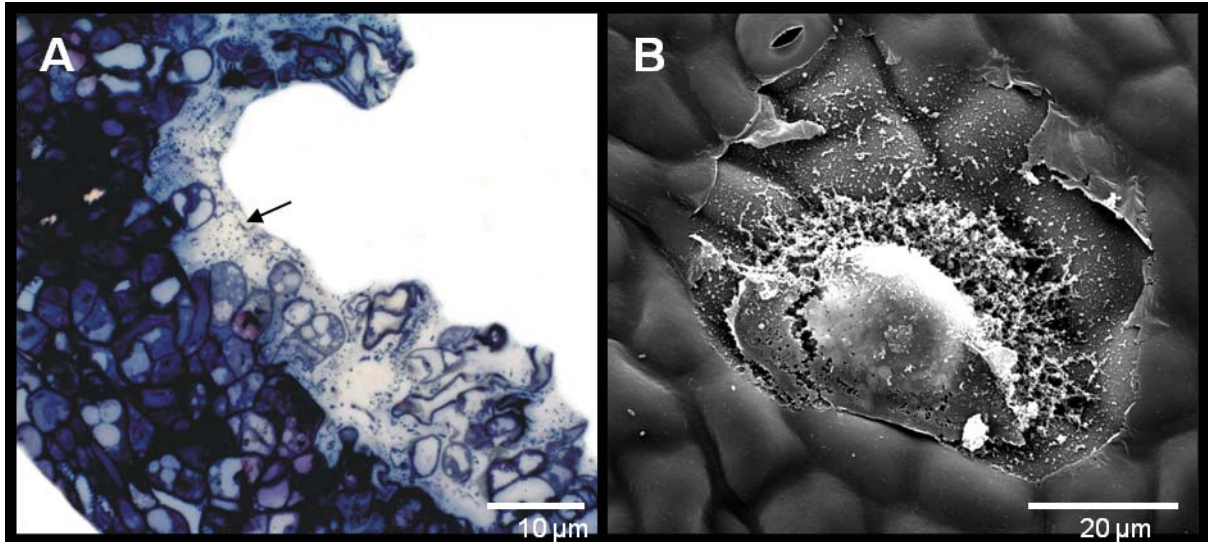
### 3.1.3 Ciclo da Doença

A disseminação da bactéria se dá principalmente através de três fatores essenciais à dispersão da doença: altas temperaturas, umidade elevada acompanhada de ventos fortes e novas brotações nos pomares. As precipitações elevadas e o aumento da temperatura no início da estação de maior fluxo de crescimento são características favoráveis ao desenvolvimento epidêmico de CCA. Isso provavelmente está relacionado ao fato de que em condições de alta umidade as lesões de CCA exsudam mais células bacterianas na superfície afetada (LEITE JUNIOR et al., 1987). Além disso, as células bacterianas são mantidas ativas por mais tempo quando a umidade do ar é elevada, aumentando com isso a viabilidade e, conseqüentemente a amplitude de dispersão do inóculo (KOIZUMI et al., 1996).

Em precipitações acompanhadas de fortes ventos, um filme de água é formado desde o filoplano até as células do mesófilo, passando por entre as células estomáticas. Nesta condição, lesões novas exsudam células bacterianas imediatamente, chegando a liberar de  $10^4$  a  $10^5$  unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Em lesões mais velhas e suberizadas, a liberação de células ocorre mais lentamente (GRAHAN et al., 1992).

Uma vez no interior do tecido de citros, a colonização por Xcc restringe-se ao sítio de infecção. No início da colonização, as células da Xcc multiplicam-se no espaço intercelular envolvidas por uma matriz de EPS (Figura 2 A). As primeiras lesões salientes começam aparecer após 5 a 10 dias, formadas por hipertrofia e hiperplasia de células do mesofilo foliar (Figura 2 B).

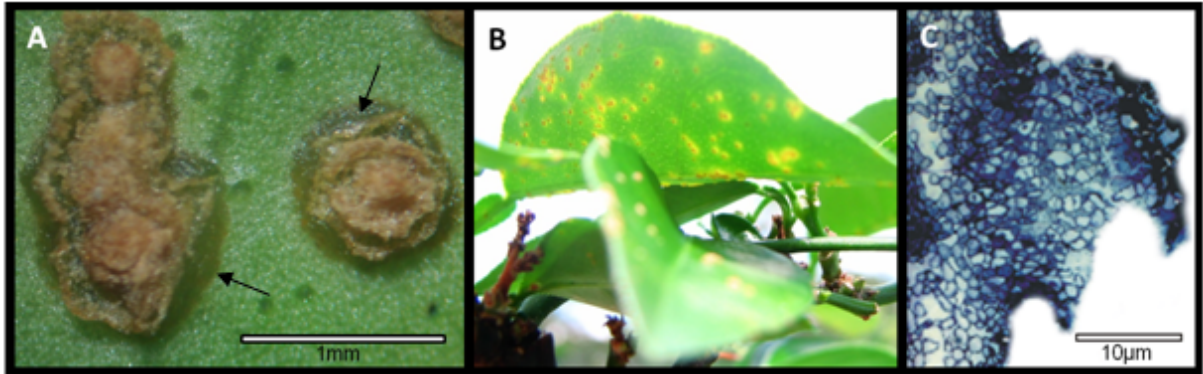
**Figura 2** – Folha de laranja (*Citrus sinensis* var. Valência) infectada com *Xcc* 306. A: Fotomicrografia do mesofilo de folhas de laranja com lesão de cancro cítrico asiático. Note a presença de *Xcc* 306 envolvida por uma matriz de EPS multiplicando-se no espaço intercelular do mesofilo do hospedeiro (seta). B: Eletromicrografia de varredura de lesão de CCA em folhas de laranja após 5 dias de infecção via estômato



As lesões apresentam coloração amarelada no início de sua formação e vão se tornando de cor marrom e corticosa ao longo do tempo (Figura 3A). Quando ocorre uma infecção via estômato, a lesão se torna mais rapidamente visível em ambas as faces da folha (Figura 3B). A multiplicação da *Xcc* no sítio de colonização ocorre somente durante a fase de expansão da lesão, com isso, a população de bactéria produzida por lesão esta fortemente relacionada ao tamanho da lesão (GRAHAM et al., 1992).

A lesão de CCA apresenta um fenótipo de encharcamento (*water-soaking*) no tecido infectado (Figura 3A). As lesões apresentam-se necróticas necroses, e geralmente encontra-se cercadas por halos amarelados (Figura 3B), causando hiperplasia do mesofilo foliar da planta hospedeira (Figura 3C).

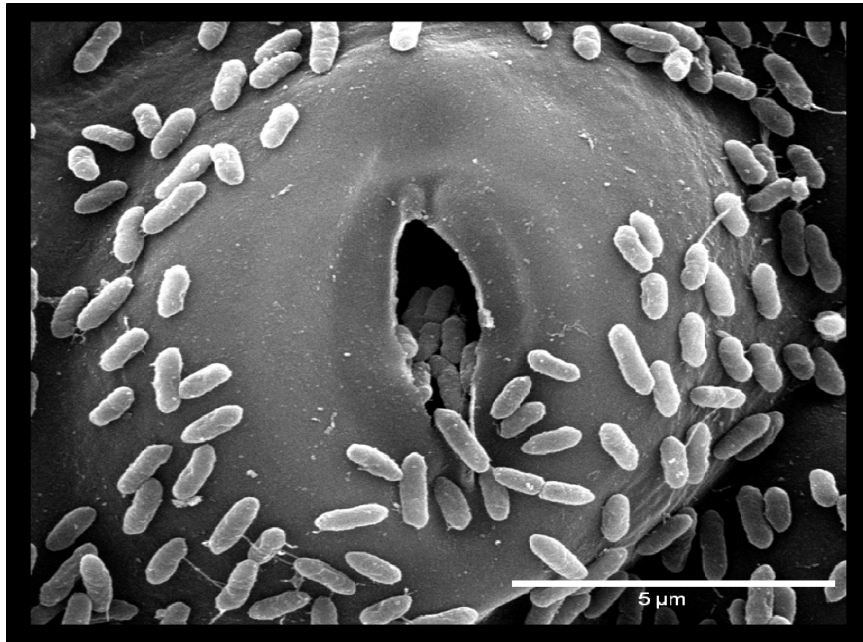
**Figura 3** –Lesões de CCA em folhas de laranja (*C. sinensis* var. Valência). A: Lesão típica de CCA de cor marrom e corticosa com presença do fenótipo de encharcamento (*water-soaking*) no tecido infectado (seta). B: Folhas de laranja com lesões de CCA na face abaxial e adaxial cercadas por halos cloróticos (halos amarelados ao redor da lesão). C: Fotomicrografia do mesofilo foliar de laranja com lesão de CCA. Observar a hiperplasia do tecido vegetal.



A *Xcc* tem capacidade de infectar folhas, ramos e frutos. A penetração e infecção se dão através de aberturas naturais (principalmente estômatos) (Figura 4), ou de ferimentos causados por espinhos, grãos de areia, pelo homem ou por insetos. As faces abaxiais das folhas são mais suscetíveis que as faces adaxiais, em razão da maior densidade de estômatos presentes (GRAHAM et al., 1992).

Fatores climáticos como temperatura e umidade exercem importante papel no sucesso da infecção. A duração do molhamento e o próprio filme de água sobre a folha influenciam na capacidade da bactéria ganhar a câmara subestomática ou um ferimento. Nas folhas, o período de expansão foliar é mais suscetível à infecção da bactéria *Xcc* do que aquele posterior à maturação. Já em frutos, o período de suscetibilidade ocorre entre 60 a 90 dias após a sua formação.

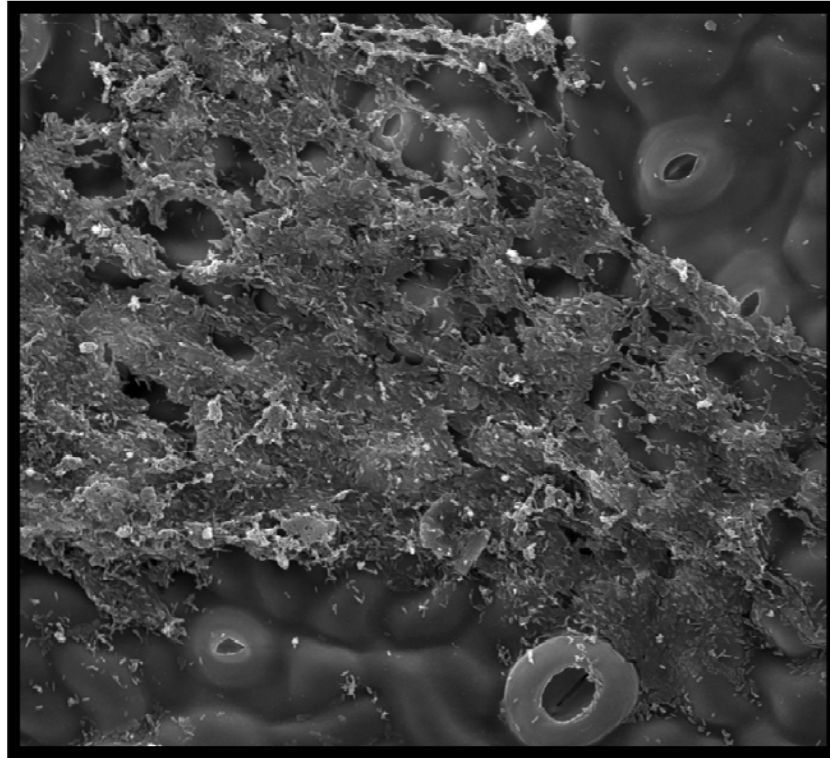
**Figura 4** –Eletromicrografia de varredura do início da infecção de Xcc 306 via estômato em folhas de laranja (*C. sinensis* var. Valencia).



A sobrevivência de Xcc no ambiente pode chegar até seis meses em órgãos infectados, mesmo após a queda. Um dos mecanismos que a Xcc usa para sobreviver por longos períodos no ambiente é a produção de uma matriz de EPS (GRAHAM et al., 2004; GOTO; HYODO, 1985), (Figura 5).

A produção de uma matriz de EPS (xantana) é uma das características mais importantes do gênero *Xanthomonas*, ocorrendo principalmente no final da fase de crescimento logarítmico e início da fase estacionária (HARDING et al., 1995). A função do EPS no gênero *Xanthomonas* é bastante controverso. Alguns autores relatam que a produção de EPS está diretamente associada com a virulência de algumas espécies deste gênero (KATZEN et al., 1998; DHARMAPURI; SONTI, 1999;. KEMP et al., 2004). Por outro lado, outros autores consideram que EPS não desempenha um papel essencial nos estágios iniciais de infecção do CCA (DUNGER et al., 2007). No entanto, a maioria dos autores concordam que o EPS está diretamente relacionado com o poder de sobrevivência, disseminação e manutenção da bactéria na planta hospedeira, melhorando a eficiência da colonização dos tecidos foliares.

**Figura 5** – Eletromicrografia de varredura de folhas de laranja (*C. sinensis* var. Valencia) infectadas com *Xcc* 306. Note que a *Xcc* 306 está mergulhada em uma matriz de EPS na superfície abaxial da folha.



Em ambiente aberto, a sobrevivência da bactéria pode chegar por volta de 15 dias em solo e por volta de 62 dias tanto no filoplano quanto no rizoplano de algumas gramíneas. A sobrevivência da *Xcc* por várias semanas em material de plantas não hospedeiras e em raízes de algumas gramíneas embaixo de árvores doentes foram observadas no Japão e no Brasil (GOTO et al., 1975).

Em casos de folhas e frutos em decomposição caídos no chão, a população de bactéria declina para um nível não detectável em 1 - 2 meses por sofrer interferência de bactérias antagonistas e competição com organismos saprofitos (GRAHAM et al., 1989). Em materiais como metal, plástico, tecido ou madeira, a *Xcc* possui um período de sobrevivência relativamente curto, podendo chegar até 72 horas (GRAHAM et al., 2000).

### 3.1.4 Controle do Cancro Cítrico

#### 3.1.4.1 Erradicação e exclusão

Diversas medidas de controle vêm sendo utilizados a fim de reduzir os prejuízos causados pelo CCA. Dentre elas destacamos medidas de caráter curativo como a erradicação das plantas doentes que causa um grande prejuízo ao produtor (LEITE JUNIOR; MOHAM, 1990) e o tratamento químico com pulverização das plantas infectadas com produtos a base de cobre que pode contaminar o ambiente por ser um metal pesado (KOIZUMI, 1985; LEITE JUNIOR; MOHAN, 1990).

Para as medidas de controle em caráter preventivo, são adotadas as seguintes normas: i) localização de viveiros em locais livres de CCA, ii) pomares manejados para prevenir ou reduzir o risco de epidemias de CCA com o uso de quebra-ventos, iii) construção de cercas para restringir o acesso aos pomares, iv) pulverização de desinfetantes sobre a maquinaria, equipamentos de colheita dos pomares e trabalhadores, bem como a desinfecção de suas roupas e calçados, e, v) frutas frescas para comércio interno e exportação são sujeitas a uma inspeção rigorosa para garantir a isenção dos sintomas do CCA, além de tratamentos sanitários nas câmaras de armazenagem de frutos.

#### 3.1.4.2 Controle químico

O uso de produtos à base de cobre como forma de controle do CCA é feito em todos os países produtores de citros (KOIZUMI, 1985; LEITE JUNIOR; MOHAN, 1990). O cobre reduz a população bacteriana na superfície das folhas e aplicações múltiplas são necessárias para alcançar um controle adequado em hospedeiros susceptíveis (STALL et al., 1980). A pulverização à base de cobre é efetiva por um período de duas a quatro semanas quando as taxas de formação e crescimento das folhas se igualam (GRAHAM et al., 1992; STALL et al., 1982).

A eficiência das pulverizações com cobre depende do seu contato com a bactéria na superfície da folha. Devido ao uso contínuo de produtos à base de cobre pode ocorrer o aparecimento de cepas de *Xcc* resistentes ao produto, o que compromete a eficiência do controle (RINALDI; LEITE JUNIOR, 2000).

Mesmo sendo eficaz no controle dos agentes causais, o controle de fitopatógenos através da utilização de produtos químicos pode apresentar efeitos colaterais ao hospedeiro ou níveis de contaminação na cadeia trófica nem sempre aceitáveis, podendo causar doenças muitas vezes graves como o câncer (ALVA et al., 1995, LIMA et al. 2000).

#### 3.1.4.3 Controle biológico

Ao longo dos anos, exigências dos consumidores por produtos agrícolas livres de resíduos tóxicos e por uma agricultura mais cuidadosa com o meio ambiente têm feito os agricultores buscarem tecnologia cada dia mais limpa para a produção de alimentos. Neste contexto, esta pressão tem forçado os governos a estabelecerem novas políticas públicas quanto à utilização de agrotóxicos no controle de fitopatógenos (GULLINO; KUJIPERS, 1994; RAGSDALE; SISLER, 1994). Desta forma, todos os segmentos envolvidos na cadeia produtiva de produtos agrícolas estão envolvidos na busca de produtos fitossanitários menos tóxicos para os consumidores e ao meio ambiente (PUNJA; UTKHEDE, 2003).

A procura de micro-organismos com potencial de uso como agente de biocontrole, ou a obtenção de compostos de metabolismo secundário com ação antimicrobiana produzidos por estes micro-organismos, é uma das alternativas atualmente muito estudadas pela comunidade científica para o controle de patógenos.

No Brasil e no mundo, centros de pesquisas, universidades e indústrias vêm realizando estudos para desenvolver novos produtos biológicos a partir de bactérias usadas no controle biológico que podem ser utilizados no controle de doenças e pragas (MELO, 1998).

O sucesso da descoberta está diretamente relacionado com as propriedades antagônicas e mecanismos de ação, como, por exemplo: i) inibição de patógenos por meio da competição por nutrientes, oxigênio e espaço, ii) espectro de ação, iii) produção de antibióticos, iv) resistência a fatores ambientais estressantes e, v) estabilidade genética dos agentes de biocontrole (MELO, 1998).

Muitos estudos demonstraram que os antimicrobianos produzidos por agentes de biocontrole têm atividade de amplo espectro contra muitos micro-organismos. Como exemplo temos: atividade antifúngica de pirrolnitrina, produzida e

isolada de espécies de *Pseudomonas* e *Burkholderia* (LIGON et al., 2000) e atividade antibacteriana do mesmo antibiótico contra bactérias Gram positivas (EL-BANNA; WINKELMANN, 1998), 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) produzido por diferentes cepas de *P. fluorescens* com atividade contra fungos patogênicos de plantas (KEEL et al. 1992) e contra bactérias fitopatogênicas (THOMASHOW; WELLER, 1996).

Outros autores relataram o controle de diferentes espécies do gênero *Xanthomonas*, utilizando suspensões de bactérias antagonistas do gênero *Pseudomonas* sp. no controle de doenças do tomate causadas por *X. campestris* pv. *vesicatoria* e *X. vesicatoria* (BYRNE et al., 2005), suspensões de células de bactérias epífitas (STROMBERG et al., 2003, 2000) e fenazina-1-carboxamida produzida e isolada de *P. aeruginosa* com atividade antibiótica contra *X. oryzae* pv. *oryzae* (SHANMUGAIAH et al., 2010).

Com relação ao controle da *Xcc* com uso de antibióticos naturais produzidos por micro-organismos, os estudos ainda são escassos. Recentemente, Oliveira et al. (2011) relatou que metabólitos secundários semipurificados produzidos por *Pseudomonas* sp. cepa LV possuem alta atividade antibiótica *in vitro* contra *Xcc* cepa 306 e diminuem a formação de lesões em plantas de laranja em ensaios conduzidos em casa de vegetação.

### 3.2 BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS DE INTERESSE CLÍNICO

Dentre as bactérias Gram negativas de interesse clínico, as enterobactérias assumem grande importância, uma vez que estes micro-organismos são ubíquos e estão envolvidos em inúmeras infecções (MURRAY, 2009).

A família Enterobacteriaceae é constituída por um grupo grande e bastante heterogêneo, sendo descrito mais de 30 gêneros e 130 espécies (MURRAY, 2007). Os principais gêneros desta família são *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Shigella*, e *Salmonella*, estando envolvidos em 70% das infecções do trato urinário, 30 a 35% dos casos de septicemias, altos índices de infecções intestinais, além de outros sítios infecciosos (MURRAY; ROSENTHAL; PFAÜER, 2006).

### 3.2.1 *Klebsiella pneumoniae*

Historicamente, a classificação das espécies de *Klebsiella* foi baseada em suas características patogênicas ou quanto a sua origem. Posteriormente, foram classificadas de acordo com suas características relativas à utilização de substratos e atividades das enzimas (MARTINEZ, 2004).

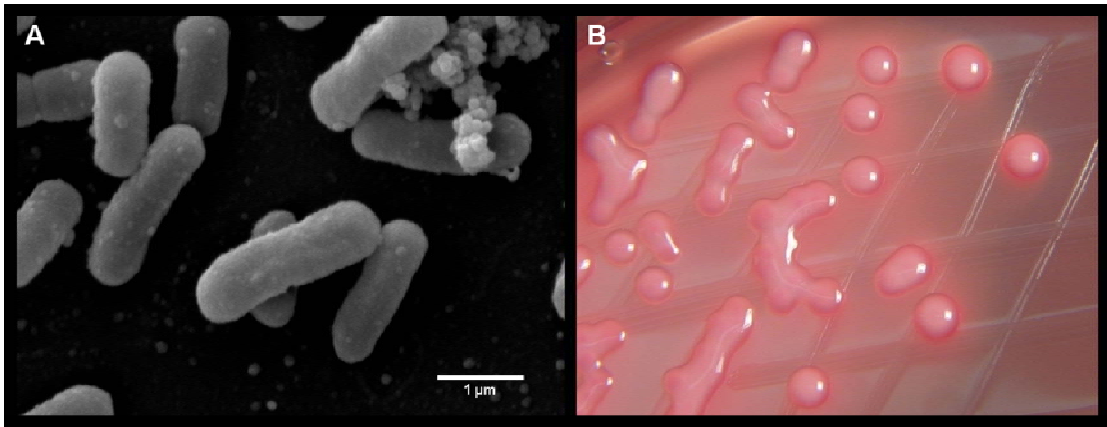
Com o advento da biologia molecular, houve a necessidade de uma reclassificação e a possibilidade de identificação de novas espécies, alterando a taxonomia deste gênero. Dentre as espécies identificadas no gênero, a *K. pneumoniae*, é clinicamente a mais importante espécie do gênero (MARTINEZ, 2004).

*K. pneumoniae* é um bastonete Gram negativo, aeróbio facultativo, com melhor crescimento em condições aeróbias, não formadora de esporo, sem flagelo, com tamanho variando de 0,3 a 1 µm de diâmetro e 0,6 a 6 µm de comprimento (Figura 6 A) e quando cultivado em ágar Mac Conkey, produz colônias róseas, brilhantes, com aspecto elevado e de consistência mucóide (Figura 6 B).

A *K. pneumoniae* possui cápsula mucóide de polissacarídeo (Antígeno K) que está relacionado com a sobrevivência no meio ambiente, proteção contra fagocitose e ainda tem função de auxiliar na aderência (MARTÍNEZ et al., 2004).

O gênero *Klebsiella* possui algumas características bioquímicas que permitem sua identificação. Algumas características como ausência de citocromo oxidase, fermentação de glicose e capacidade de reduzir nitrato são comuns a todas as enterobactérias. *Klebsiella pneumoniae* se caracteriza pela produção de lisina descarboxilase, utilização de citrato como única fonte de carbono, hidrólise da uréia, produção de ácidos a partir da metabolização de lactose, dulcitol, edonitol e inositol, e produção de gás acetoína e butilenoglicol durante a fermentação da glicose (KONEMAN et al., 2001).

**Figura 6** –*Klebsiella pneumoniae*. A: Fotomicrografia de varredura de isolado clínico de *K. pneumoniae*. B: Colônias de *K. pneumoniae* cultivadas em ágar Mac Conkey. Fonte: <http://www.microbiologyinpictures.com/klebsiella%20pneumoniae.html>.



Os micro-organismos deste gênero são encontrados em quase todos os ambientes naturais (solo, água e plantas). Historicamente, as bactérias deste gênero primeiramente foram isoladas em plantas e não possuíam associação com infecções. As infecções causadas por *K. pneumoniae* tendem a ocorrer em pessoas com deficiências do sistema imune sendo responsáveis por alta taxa de mortalidade. As síndromes clínicas mais frequentes são pneumonia, infecções do trato urinário, bacteremia, rinite, meningites e septicemias (KONEMAN, 2001).

A patogenicidade de *K. pneumoniae* pode ser atribuída principalmente à presença de cápsula polissacarídica, sistema de captura de ferro, presença de adesinas com ou sem fímbrias que favorece sua adesão às mucosas e células epiteliais (BRISSE et al., 2009).

Considerado os diferentes mecanismos que a *K. pneumoniae* possui para se proteger, além do caráter de resistência a diversos antibióticos, a busca por novos compostos ou substâncias com atividade antibiótica contra esta bactéria é vista com grande importância pela comunidade científica.

### 3.2.2 Epidemiologia das Infecções Hospitalares Causadas por *K. pneumoniae*

*K. pneumoniae* é uma das bactérias mais importantes associada tanto as infecções comunitárias quanto as hospitalares. A incidência de infecções causadas por este patógeno é cada vez maior, e está relacionada principalmente

com a diminuição da sensibilidade aos antimicrobianos. Sua transmissão ocorre por contato direto ou pode ser veiculada por objetos e superfícies contaminadas (MARRA, 2002). O aumento da mortalidade por infecções causadas por *K. pneumoniae* ocorre principalmente pelas complicações decorrentes de infecção, como sepse e choque séptico, e está intimamente relacionada às limitações na antibioticoterapia.

No Brasil as taxas das infecções causadas por este microorganismo são maiores do que as encontradas em diferentes partes do mundo. Em estudo realizado pelo programa MYSTIC Brasil em 2002, *K. pneumoniae* foi o 3º bacilo Gram negativo mais frequentemente isolado em hospitais brasileiros (16,9%). De acordo com estudos de Kiffer et al. (2005), *K. pneumoniae* foi responsável por 17,2% das infecções da corrente sanguínea relacionadas a cateter; 12% do trato respiratório; trato urinário, 18,6% e infecções de pele e tecidos moles 11,5%.

### 3.2.3 Mecanismos de Resistência de *K. pneumoniae* aos Beta-lactâmicos

As infecções causadas por bactérias multirresistentes normalmente necessitam de um tempo maior de hospitalização e de agentes terapêuticos mais potentes, que geralmente são mais tóxicos e mais caros, além de apresentarem uma maior taxa de morbidade e mortalidade que infecções causadas por microorganismos sensíveis. As infecções causadas por bactérias multirresistentes estão associadas a períodos prolongados de internação, elevados custos hospitalares e significativo aumento da morbimortalidade (JACOBY; ARCHER, 1991).

A pressão de seleção antimicrobiana levou ao desenvolvimento de cepas *K. pneumoniae* multirresistentes, limitando as opções terapêuticas nas infecções. Os principais mecanismos de resistências observados nesta espécie bacteriana são: alteração do sítio de ação do antimicrobiano, alteração de permeabilidade de membrana externa e produção de enzimas que inativam a molécula antimicrobiana. Esses mecanismos são descritos resumidamente na sequência.

### 3. 2.3.1 Redução da afinidade pelos alvos da droga

O alvo dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são as proteínas ligadoras de penicilina, as PBPs. A redução da afinidade pelas PBPs, situadas na membrana citoplasmática bacteriana ocorre por substituição de um aminoácido. A partir desta alteração a nível de aminoácido, a droga não consegue ligar a PBP (RICE, 2001). A modificação das PBPs é o principal mecanismo de resistência bacteriana aos  $\beta$ -lactâmicos nos cocos Gram positivos e em algumas bactérias fastidiosas Gram negativas como *Neisseria gonorrhoeae* (SANDERS; SANDERS, 1992).

### 3.2.3.2 Alteração da permeabilidade da membrana externa

A alteração de permeabilidade da membrana externa bacteriana pode constituir um mecanismo de resistência nas Gram negativas. A perda de uma proteína de membrana externa (OMP) pode reduzir o acesso do antibiótico ao espaço periplasmático uma vez que os  $\beta$ -lactâmicos têm que cruzar a membrana externa das bactérias Gram negativas através de OMPs. Em bactérias mutantes estas porinas podem não ser produzidas e ocorre a impermeabilidade da membrana (GALES, 1997b; BRADFORD, 2001; RICE, 2001).

As OMPs são geralmente divididas em duas classes: i) porinas não específicas que permitem a difusão de moléculas hidrofílicas de baixo peso molecular e, ii) porinas específicas, as quais facilitam a difusão de substratos específicos (HUANG; HANCOCK, 1996).

A taxa de entrada de um  $\beta$ -lactâmico pelos canais de porina depende do seu tamanho, carga e hidrofobicidade. Moléculas de alto peso molecular (maiores de 800 Da), carregadas negativamente e hidrofóbicas apresentam dificuldade na entrada da célula bacteriana. Por outro lado, moléculas pequenas e com características hidrofílicas apresentam rápida penetração. Por isso ampicilina, cefaloridina e imipenem que são moléculas pequenas e hidrofílicas, penetram mais facilmente a membrana externa bacteriana (NIKAIDO, 1994).

### 3.2.3.3 $\beta$ -lactamases

As  $\beta$ -lactamases são enzimas capazes de catalisar a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico impossibilitando assim sua atividade antimicrobiana. Este é o principal mecanismo de resistência das bactérias Gram negativas aos  $\beta$ -lactâmicos o qual inativa os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos diminuindo a habilidade destes de alcançarem o sítio ativo. As  $\beta$ -lactamases atuam via éster de serina em que o anel  $\beta$ -lactâmico é atacado pela hidroxila livre da cadeia lateral do resíduo de serina que ativa o sítio da enzima, produzindo um éster acil covalente. O anel  $\beta$ -lactâmico é rompido em sua cadeia lateral pelo radical hidroxil livre do resíduo de serina da  $\beta$ -lactamase (sítio ativo da enzima). Após a hidrólise do éster ocorre a liberação da enzima ativa e da droga inativada (BUSH; SIKES, 1983; WALEY, 1987; LIVERMORE, 1995; ROSSI; ANDREAZZI, 2005; BABIC et al., 2006).

A atividade de hidrólise do  $\beta$ -lactâmico varia de acordo com o tipo de substrato e com a suscetibilidade aos inibidores de  $\beta$ -lactamases como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. A resistência aos  $\beta$ -lactâmicos dependerá da quantidade de enzima produzida, da habilidade em hidrolisar o antimicrobiano e da velocidade com que o  $\beta$ -lactâmico penetra pela membrana externa (BRADFORD, 2001).

A importância clínica das  $\beta$ -lactamases está relacionada à sua produção que pode ocorrer em grandes concentrações. A produção de  $\beta$ -lactamases é o resultado de um processo evolutivo e da pressão seletiva exercida pelos antimicrobianos. Embora o uso destas drogas tenha auxiliado a disseminação deste mecanismo de resistência, este não foi o fator que provocou o aparecimento destas enzimas (BARBOSA et al., 1998).

#### 3.2.3.3.1 *Amp C betalactamase*

As Amp C  $\beta$ -lactamases são enzimas derivadas de genes cromossomais, capazes de hidrolisar  $\beta$ -lactâmicos de amplo espectro e com atividade contra cefamicinas. Estas enzimas hidrolisam penicilinas de espectro estendido, monobactâmicos e cefamicinas. São, contudo, incapazes de hidrolisar cefepime, cefpirome e carbapenêmicos. Estas não são inibidas por inibidores de  $\beta$ -lactamase como o ácido clavulânico. Os primeiros relatos de bactérias produtoras de

AmpC  $\beta$ -lactamases ocorreram em 1988, sendo encontradas exclusivamente em nível de expressão cromossômica e desde então várias enzimas AmpC mediadas por plasmídeos passaram a ser relatadas em *Klebsiella*, *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp.* e *P. mirabilis* (LIMAYE et al., 1997; SANDER et al., 2000; PAI et al., 2004; ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

Em alguns micro-organismos Gram negativos como *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* ocorre a produção de AmpC constitutivamente em quantidades insuficientes para causar resistência a antimicrobianos de amplo espectro. Em outros como *P. aeruginosa*, *Enterobacter spp.* e *Serratia marcescens* a AmpC é produzida de forma induzida, determinando resistência a cefalosporinas de terceira geração. O poder de indução é variável: as cefalosporinas de primeira geração, ampicilina e carbapenems são fortes indutores enquanto as cefalosporinas de segunda e terceira gerações são indutores fracos. A indução da produção de AmpC ocorre pela exposição do microrganismo a um antibiótico indutor, que uma vez removido fará com que a produção de AmpC retorne aos níveis basais (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

#### 3.2.3.3.2 $\beta$ -lactamase de espectro ampliado (ESBL)

As ESBLs são enzimas mediadas por genes plasmidiais, não induzíveis e possuem resíduo de serina em seu sítio ativo. São enzimas capazes de hidrolisar oximinocefalosporinas e monobactâmicos e são inibidas pelo ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam. Dos três inibidores disponíveis para o uso clínico o ácido clavulânico é o mais potente (JACOBY; MEDEIROS, 1991; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995; LIVERMORE, 1995; TENOVER et al., 1999; JONES, 2000; BRADFORD, 2001; GIAMARELLOU, 2005).

A emergência desse tipo de  $\beta$ -lactamase provavelmente decorreu da pressão seletiva causada pelo amplo uso de cefalosporinas de amplo espectro (MEYER et al, 1993). Os primeiros relatos de ESBL ocorreram em 1983 em Frankfurt, posteriormente na Europa e logo após nos EUA e Ásia, sendo estas enzimas resultantes de mutações que ocorrem em genes plasmidiais, derivadas de ESBLs mais antigas (BUSH, 1998; BRADFORD, 2001). A produção de ESBL ocorre predominantemente em *Klebsiella spp.* e em menor grau em *E. coli*, mas pode ser encontrada em vários patógenos clinicamente importantes.

### 3.2.3.3.3 *Metallo-Betalactamases (MBL)*

As MBLs são enzimas de amplo espectro que hidrolisam não somente penicilinas e cefalosporinas, como também outros  $\beta$ -lactâmicos como imipenem e meropenem, mas não hidrolisam o aztreonam. A metalo-enzima se mostra como a grande preocupação mundial pela sua emergência e sua ação catalítica sobre o grupo dos carbapenêmicos (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

Os genes codificadores destas enzimas são geralmente cromossomais, mas alguns podem ser plasmidiais, o que permite que se disseminem mais rapidamente entre os micro-organismos. As metalo-betalactamases foram reportadas em poucos isolados de *Serratia marcescens*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* (PAGE, 2002; ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

Estas enzimas requerem pelo menos um íon zinco por molécula para ser cataliticamente ativas. O mecanismo de ação das metalo-betalactamases pode não ser único e pode variar conforme os diferentes substratos e a fonte da enzima. Sua estrutura é formada por moléculas responsáveis pelo enorme potencial de expressão e disseminação das resistências bacterianas.

### 3.2.3.3.4 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

A carbapenemase foi isolada pela primeira vez em 1996 nos Estados Unidos, descrita a princípio em *K. pneumoniae*, por isso a denominação *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC). Posteriormente verificou-se a disseminação entre outras espécies pertencentes a família das Enterobacteriaceae. Atualmente encontram-se distribuídas em diversas partes do mundo (SMITH et al., 2003; QUEENAN; BUSH, 2007).

A KPC inativa os carbapenêmicos e todos os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos. Além disso, as bactérias que produzem a enzima do tipo KPC também são normalmente resistentes ao sulfametoxazol/trimetoprim, quinolonas e aminoglicosídeos, tornando esses patógenos verdadeiramente multirresistente (YIGIT, et al., 2001; WOODFORD, et. al, 2008).

As infecções por *K.pneumonia* produtoras de KPC se tornou um problema cada vez mais preocupante na prática clínica, tendo em vista a significativa

limitação terapêutica e o conseqüente aumento nas taxas de morbimortalidade (ABBO, et al., 2007; SUNENSHINE et al., 2007).

Os genes que codificam KPC, estão presentes em material genético móvel como plasmídeos e transposons o que facilita a rápida proliferação da multiresistência entre diferentes espécies de bactérias Gram negativas e diversas cepas de *K. pneumoniae*. Esses elementos podem carregar além do gene da KPC genes de resistência a outras classes de antibióticos ou a outras  $\beta$ -lactamases como as ESBLs (RASHEED, 2008).

### 3.3 AGENTES ANTIMICROBIANOS

Uma estratégia de proteção constantemente encontrada na natureza contra micro-organismos patogênicos e utilizada pela grande maioria dos organismos vivos, como, por exemplo, plantas, animais invertebrados e micro-organismos é a produção de metabólitos secundários ou peptídeos com atividade antimicrobiana.

Os antimicrobianos são substâncias químicas capazes, em pequenas concentrações, de inibir o crescimento e/ou matar os micro-organismos (KOROLKOVAS, 1999). Entretanto, o advento de métodos sintéticos resultou em uma modificação nesta definição. O termo antimicrobiano hoje em dia, se refere à substâncias produzidas por micro-organismos ou por síntese química total ou parcial que, em baixas concentrações, inibe o crescimento e/ou mata os micro-organismos (JOLIK, 2003). Os antimicrobianos estão amplamente distribuídos na natureza, onde desempenham importante papel na regulação da população microbiana. Estas substâncias diferem tanto quimicamente como em seu mecanismo de ação e há pouca ou nenhuma relação entre elas, exceto por sua capacidade em afetar processos vitais de certos micro-organismos (JOLIK, 2003).

Estes agentes interferem em diversos processos vulneráveis na célula, como a síntese da parede celular, as funções da membrana citoplasmática, a síntese protéica, o metabolismo de ácidos nucléicos e o metabolismo intermediário (HARDMAN, 2003). O uso indiscriminado e prolongado de muitos antimicrobianos principalmente os químicos e sem a devida prescrição, tem levado à seleção de micro-organismos patogênicos e fitopatogênicos multirresistentes a esses compostos.

O problema da resistência microbiana é crescente e a perspectiva do uso de drogas antimicrobianas no futuro é incerta. Portanto, atitudes devem ser tomadas para que possam reduzir este problema, como, por exemplo, controlar o uso indiscriminado de antibióticos, desenvolver pesquisas para melhor compreensão dos mecanismos genéticos de resistência e continuar o estudo de desenvolvimento de novas drogas, principalmente de origem naturais.

### 3.3.1 Antibióticos Produzidos por *Pseudomonas* spp.

Os antibióticos englobam um grupo quimicamente heterogêneo de compostos orgânicos de baixo peso molecular. Em baixas concentrações, os antibióticos são deletérios para o crescimento ou atividade metabólica dos micro-organismos (FRAVEL, 1988; THOMASHOW et al., 1997). Dentre os mais diferentes micro-organismos produtores de antibiótico, o gênero *Pseudomonas* se destaca como um dos mais estudados agentes de biocontrole na produção de antibiótico nas últimas décadas (Tabela 2).

**Tabela 2** – Exemplos de antibióticos produzidos por *Pseudomonas* spp.

Antibióticos <sup>1</sup>	Espécies/cepas	Patógenos <sup>2</sup>	Origem/hospedeiro	Referências
DAPG	<i>Pseudomonas</i> spp. Q2-87 CHAO F113 PFM2 Pf-5 Q8r1-96	Ggt Ggt, Tb, Pu Pu St Pu, Rs Ggt	Trigo, USA Tabaco, Suíça Beterraba, Irlanda Trigo, USA Algodão, USA Trigo, USA	Vincent et al., 1991 Keel et al., 1992 Shanahan et al., 1992 Levy et al., 1992 Howell; Stipanovic 1979 Raaijmakers; Weller 2001
Fenazinas	<i>Pseudomonas</i> spp. 2-79RN10 30-84  PGS12  In-b-109 PCL1391  PNA1 <i>P. aeruginosa</i>	Ggt Ggt  Fo  Rs, Gg Fo  Fo, Ps Xoo	Trigo, USA Trigo, USA  Milho, Bélgica  Arroz, Filipinas Tomate, Espanha  Grão de bico, Índia Arroz, Índia	Weller 1983 Pierson; Thomashow 1992 Georgakopoulos et al., 1994 Rosales et al., 1995 Chin-A-Woeng et al., 1998 Anjaiah et al., 1998 Shanmugaiah et al., 2010
Oomicina A	<i>P. fluorescens</i> Hv37a	Pu	Cevada, USA	Guttererson et al., 1986
Pioluteorina	<i>P. fluorescens</i> Pf-5 CHA0 Tb	Pu, Rs Pu	Algodão, USA Tobaco, Suíça	Howell; Stipanovic 1979 Keel et al., 1992
Pirrolnitrina	<i>P. fluorescens</i> BL915	Rs	Algodão, USA	Ligon et al., 2000
Viscosinamida	<i>P. fluorescens</i> DR54	Pu, Rs	Beterraba, Dinamarca	Nielsen et al., 1998
Butirolactonas	<i>P. aureofaciens</i> 63-28	Pu, Pc	Canola, Canadá	Gamard et al., 1997
N-BBS	<i>Pseudomonas</i> sp. AB2	Pu, Rs, Bc	Solo, Coreia	Ki Kim et al., 2000
Pantocina	<i>P. agglomerans</i>	Eh	Maça, USA	Wright et al., 2001

<sup>1</sup>DAPG – 2,4-diacetylphloroglucinol n-BBS – n-butilbenzenosulfonamida. <sup>2</sup>Ggt: *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*; Gg: *G. graminis*; Tb: *Thielaviopsis basicola*; Pu: *Pythium ultimum*; St: *Septoria tritici*; Rs: *Rhizoctonia solani*; Fo: *F. oxysporum*; Ps: *Pythium splendens*; Pc: *Phytophthora cryptogea*; Bc: *Botrytis cinerea*; Eh: *Erwinia herbicola*; Xoo: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Adaptado de Raaijmakers et al. (2002)

De acordo com Whipps (1997), existem várias razões para a abundância de estudos sobre antibióticos produzidos por *Pseudomonas* spp., como, por exemplo: são habitantes comuns da rizosfera e filosfera, são isolados facilmente, utilizam uma ampla gama de substratos e são fáceis de cultivar e manipular geneticamente.

Nishida et al. (1965) demonstraram que cepas de *Pseudomonas* sp. e *Burkholderia* sp. produziram o antimicrobiano pirrolnitrina com amplo espectro de ação, o que levou estes autores a desenvolverem o antimicrobiano para fins

terapêuticos contra bactérias e fungos patogênicos em humanos. Este mesmo composto demonstrou ter alta atividade contra fungos patogênicos de planta de interesse agrônômico (LIGON et al., 2000).

### 3.3.2 Produção de Substâncias Bioativas no Metabolismo Secundário

A atividade metabólica associadas ao catabolismo e biossíntese dos organismos é extraordinariamente uniforme. A diversidade da arquitetura e a função das macromoléculas na biosfera são determinadas pela quantidade de reações e disposições de um pequeno número de unidades monoméricas reunidas dentro de estruturas macromoleculares. Para obtenção dos monômeros responsáveis pela formação das várias enzimas necessárias para o metabolismo celular, existe uma rede de vias biossintéticas envolvidas que estão interligadas entre si. Os metabólitos formados estão associados a este processo vital da célula e são designados como primários.

Por outro lado, o metabolismo secundário revela uma ausência na função metabólica primária não sendo essenciais para o crescimento e reprodução dos micro-organismos que os produzem (MARTIN; DEMAIN, 1980). No entanto, em termos competitivos, os micro-organismos produtores de antibióticos são favorecidos em relação aos não produtores. Esses tipos de substâncias bioativas matam ou inibem o crescimento de outras espécies microbianas, mesmo em pequenas quantidades.

Uma das características dos compostos produzidos no metabolismo secundário é que eles são frequentemente produzidos depois dos processos celulares associados ao crescimento. O metabolismo secundário pode ser reconhecido como um fenômeno geral de manutenção de algumas espécies. Usualmente é associado com plantas e micro-organismos, no entanto, existe uma variedade de exemplos no reino animal (MANN, 1978).

O metabolismo secundário microbiano tem propiciado um grande número de trabalhos com substâncias bioativas que podem ser usadas tanto no controle de doenças na agricultura como na medicina terapêutica, desempenhando funções antimicrobianas, antifúngicas, antivirais entre outras (OUHDOUCH et al., 2001).

### 3.4 PURIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIBIÓTICAS

De modo geral, as técnicas cromatográficas são de larga aplicação em química e bioquímica, na pesquisa e na indústria. Segundo Collins et al. (1997) estas técnicas cromatográficas variam desde as de extrema simplicidade, que podem ser facilmente manipuladas por não peritos, até as de alta sofisticação, usadas somente por especialistas. Entre estes dois extremos existem muitas variações de maior ou menor complexidade.

Os termos “cromatografia”, “cromatograma” e “método cromatográfico” foram atribuídos pelo botânico Mikhael Semenovitch Tswett, que em 1906, utilizou em seus estudos, descrevendo suas experiências na separação, onde usou colunas de vidro recheadas com vários sólidos, e arrastou os componentes com éter de petróleo (BEREZKIN, 1989).

Entre os métodos modernos de análise, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido a sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das substâncias químicas como os antibióticos naturais (tanto os produzidos por plantas como os produzidos por micro-organismos) por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como, por exemplo, a espectrofotometria ou a espectrometria de massas (COLLINS et al., 1997).

A cromatografia é um método físico-químico de separação de componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes (COLLINS et al., 1997).

#### 3.4.1 Cromatografia por Adsorção

Empiricamente considera-se a cromatografia quando se usa uma coluna recheada com um sólido (fase estacionária) e uma fase móvel líquida, onde a sorção isotérmica (adsorção) refere-se a um aumento da concentração do material (que está em excesso na fase móvel) entre as superfícies das fases móvel e

estacionária. Esta cromatografia em coluna (adsorção) pode ser primeiramente escolhida porque é tecnicamente mais simples não exigindo equipamentos caros. Dependendo do tamanho da coluna usada, é facilmente aplicada para fins preparativos, devendo ser monitorada, principalmente, por cromatografia em camada delgada (COLLINS et al., 1997).

A fase móvel, quando está passando através do adsorvente na coluna, arrasta consigo os componentes da amostra que está sendo cromatografada. A velocidade de movimento descendente de um componente depende de sua adsorção pela fase estacionária, isto é, quanto mais fracamente o componente for adsorvido mais rápido é sua passagem pela coluna, e vice versa. Conclui-se, portanto, que quanto maior a diferença entre os coeficientes de adsorção, mais completa será a separação do composto (terá maior grau de pureza). Esta separação dos componentes de uma mistura é devido às diferenças nas forças de adsorção (forças eletrostáticas de van der Waals) entre eles e o adsorvente (COLLINS; BONATO, 1990).

#### 3.4.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A CCD consiste na separação dos componentes de uma mistura pela migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. Esta técnica teve início com os trabalhos de Izmailov e Shraiber, (1938), sendo que somente a partir da década de 60 passou a ser largamente utilizada, de tal forma que hoje é praticamente indispensável em qualquer laboratório que envolva análise de substâncias orgânicas.

O grande desenvolvimento desta técnica é consequência natural das múltiplas vantagens que ela oferece, tais como: fácil compreensão e execução, separações em espaço de tempo curto, versatilidade, grande reprodutibilidade e baixo custo. Pode ser de aplicação analítica ou preparativa, cuja escala está na dependência da espessura da camada de adsorvente e da amostra em análise (COLLINS et al., 1997).

O processo de separação está fundamentado, principalmente, no fenômeno da adsorção. Entretanto, usando fases estacionárias tratadas pode ocorrer também por partição ou troca iônica, o que permite seu emprego tanto na separação de substâncias hidrofóbicas como hidrofílicas. A CCD é a mais simples e

a mais econômica das técnicas cromatográficas quando se pretende separação rápida e identificação visual. Ela tem demonstrado ser de valor extraordinário na análise de substâncias orgânicas e inorgânicas, acompanhamento de reações em sínteses e de processos de purificações.

Outra técnica usada a partir das cromatoplasas CCD é o ensaio de bioautografia, onde é realizada uma triagem de atividade antimicrobiana através da absorção de produtos químicos na superfície de placas cromatográficas colocando-a diretamente em contato com um meio de cultivo sólido inoculado com culturas bacterianas ou fúngicas (CHOMA; GRZELAK, 2011).

Esta técnica tem o poder de detectar zonas onde o crescimento microbiano é inibido. Infelizmente, compostos antimicrobianos que não dissolvem bem em água pode, portanto, não ser detectado (CHOMA; GRZELAK, 2011).

## CONCLUSÃO

O uso indiscriminado e contínuo de muitos antimicrobianos tem levado à seleção de micro-organismos patogênicos e fitopatogênicos multirresistentes a esses compostos. Neste contexto, a descoberta de novos antimicrobianos de amplo espectro de ação e seu uso racional pode contribuir para o controle dos micro-organismos multirresistentes diminuindo custos de produção na agricultura e/ou nos tratamentos de infecções hospitalares.

## REFERÊNCIAS

- ABBO, A.; CARMELI, Y.; NAVON-VENEZIA, S.; SIEGMAN-IGRA, Y.; SCHWABER, M. J. Impact of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* on clinical outcomes. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 26, p. 793–780, 2007.
- ALMEIDA, I. M. G. Bactérias fitopatogênicas exóticas. **Biológico**, São Paulo, v. 63, p. 45-47, 2001.
- ALVA, A. K.; GRAHAM, J. H.; ANDERSON, C. A. Soil pH and copper effects on young ‘Hamlin’ orange trees. **Soil Science Society of America Journal**, v. 59, p. 481-487, 1995.
- AMARAL, S. F. Providências para a erradicação do cancro cítrico. **O Biológico**, v. 23, p. 112-123, 1957.
- BABIC, M.; HUJER, A. M.; BOMONO, R. A. What’s new in antibiotic resistance? Focus on  $\beta$ -lactamases. **Elsevier**, v. 10, p. 1016-1032, 2006.
- BARBOSA, H. M.; TORRES, B. B.; FURLANETO, M. C. Microbiologia básica. **Editora Atheneu**, São Paulo, 1998.
- BERGAMIN FILHO, A.; GOTTWALD, T. R.; LARANJEIRA, F. F. Spatial distribution of citrus canker in São Paulo – Brazil. In: International Workshop on Plant Disease Epidemiology, 8, 2001, Ouro Preto. Ouro Preto: **International Society of Plant Pathology**, p. 28-29, 2001.
- BEREZKIN, V. G. Biography of Mikhail Semenovich Tswett and translation of Tswett's preliminary communication on a new category of adsorption phenomena. **Chemistry Review**, v. 89 (2), p. 279–285, 1989.
- BITANCOURT, A. A. O cancro cítrico. **O Biológico**, v. 23, p. 101-111, 1957.
- BRADFORD, PA. Extended spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 14, p. 933-951, 2001.
- BRAITHWAIT, M.; LEITE JUNIOR, R. P.; SMITH, J. J.; BOA, E.; SADDLER, G. S. First report of citrus canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* on *Citrus sinensis* in Bolívia. **Plant Pathology**, v. 51, p. 383, 2002.
- BRISSE, S.; FEVRE, C.; PASSET, V.; ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; TOURNEBIZE, R.; DIANCOURT, L.; GRIMONT, P. Virulent Clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and Evolutionary Scenario Based on Genomic and Phenotypic Characterization. **Plos One**, v. 4, p. e4982, 2009.
- BRUNINGS, A. M.; GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, p. 141-157, 2003.
- BUSH, K.; SIKES, R. B.  $\beta$ -lactamases inhibitors in perspective. **Journals Antimicrobial Chemotherapy**, v. 11, p. 97-107, 1983.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 39, p. 1211-33, 1995.

BUSH, K. Metallo beta-lactamases: a class apart. **Clinical Infection Disease**, v. 27, p. 48-53, 1998.

BYRNE, J. M.; DIANESE, A. C.; JIA, P.; CAMPBELL, H. L.; CUPPELS, D. A.; LOUWS, F. J.; MILLER, S. A.; JONES, J. B.; WILSON, M. Biological control of bacterial spot of tomato under field conditions at several locations in North America. **Biological Control**, v. 32, p. 408–418, 2005.

CHOMA, I. M.; GRZELAK, E. M. Bioautography detection in thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 2684–2691, 2011.

COLLINS, H. C.; BRAGA, L. G.; BONATO, S. P. Introdução a métodos cromatográficos. Campinas: **Editora UNICAMP**, p. 279, 1997.

da SILVA, A. C. R.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; QUAGGIO, R. B.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; VAN SLUYS, M. A.; ALMEIDA, N. F.; ALVES, L. M. C.; AMARAL, A. M.; BERTOLINI, M. C.; CAMARGO, L. E. A.; CAMAROTTE, G.; CANNAVAN, F.; CARDOZO, J.; CHAMBERGO, F.; CLAPINA, L. P.; CICARELLI, R. M. B.; COUTINHO, L. L.; CURSINO-SANTOS, J. R.; EL-DORRY, H.; FARIA, J. B.; FERREIRA, A. J. S.; FERRERIA, R. C. C.; FERRO, M. I. T.; FORMIGHIERI, E. F.; FRANCO, M. C.; GREGGIO, C. C.; GRUBER, A.; KATSUYAMA, A. M.; KISHI, L. T.; LEITE R. P. JR.; LEMOS, E. G. M.; LEMOS, M. V. F.; LOCALI, E. C.; MACHADO, M. A.; MADEIRA, A. M. B. N.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; MARTINS, E. C.; MEIDANIS, J.; MENCK, C. F. M.; MIYAKI, C. Y.; MOON, D. H.; MOREIRA, L. M.; NOVO, M. T. M.; OKURA, V. K.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, V. R.; PEREIRA, H. A.; ROSSI, A.; SENA, J. A. D.; SILVA, C.; SOUZA, R. F.; SPINOLA, L. A. F.; TAKITA, M. A.; TAMURA, R. E.; TEIXEIRA, E. C.; TEZZA, R. I. D.; SANTOS, M. T.; TRUFFI, D.; TSAI, S. M.; WHITE, F. F.; SETÚBAL, J. C.; KITAJIMA, J. P. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with different host specificities. **Nature**, v. 417, p. 459-463, 2002.

DHARMAPURI, S.; SONTI, R. V. A transposon insertion in the *gumG* homologue of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causes loss of extracellular polysaccharide production and virulence. **FEMS Microbiology Letter**, v. 179, p. 53-59, 1999.

DOPSON, R. N. The eradication of citrus canker. **Plant Disease Reporter**, v. 48, p. 30-31, 1964.

DUNGER, G.; RELLING, V. M.; TONDO, M. L.; IELPI, M. B. L.; ORELLANO, E. G.; OTTADO, J. Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. **Archives Microbiology**, v. 188, p. 127-135, 2007.

El-Banna, N.; Winkelmann, G. Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, p. 69–76, 1998.

FDA, Florida Department of Agriculture and Consumer Services - Division of Plant Industry: Comprehensive Report on Citrus Canker in Florida. Capturado em 06 dezembro 2011. *On line*. Disponível em: <<http://www.freshfromflorida.com/pi/canker/index.html>>. 2010

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Citrus: statistics fruit fresh and processed annual. Capturado em 10 de novembro 2011. *on line*. Disponível em: <http://www.fao.org>. 2009.

FAWCETT, H. S.; JENKINS, A. E. Records of citrus canker from herbarium specimens of the genus citrus in England and the United States. **Phytopathology**, St. Paul, v. 23, p. 820-824, 1933.

FEICHTENBERGER, E. Manejo ecológico das principais doenças fúngicas e bacterianas dos citros no Brasil. Anais do Quinto Seminário Internacional de Citros – Tratos Culturais. Bebedouro: **Fundação Cargil**, p. 23-65, 1997.

FRAVEL, D. R. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. **Annual Review Phytopathology**, v. 26, p. 75-91, 1988.

FUNDECITRUS, Fundo de Defesa da Citricultura. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br>>. Acesso em 21 jun. 2011.

GALES, A. C. Prevalência, sensibilidade a antimicrobianos e tipagem molecular de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de  $\beta$ -lactamase de espectro ampliado. São Paulo, (DISSERTAÇÃO – Mestrado – Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina), 1997a.

GALES, A. C.; BOLMSTROM, A.; SAMPAIO, J.; JONES, R. N.; SADER, H. S. Antimicrobial susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* producing ESBL isolated in hospitals in Brazil. **Brazilian Journal Infectious Disease**, v. 1, p. 196-203, 1997b.

GIAMARELLOU, H. Multidrug resistance in gram-negative bacteria that produce extended spectrum  $\beta$ -lactamases. **Clinical Microbiology and Infection**, suppl 4, p. 1-16, 2005.

GOTO, M.; HYODO, H. Role of extracellular polysaccharides of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in the early stage of infection. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v. 51, p. 22-31, 1985.

GOTO, M.; OHTA, K.; OKABE, N. Studies on saprophytic survival of *Xanthomonas citri* (Hesse) Dowson. 2. Longevity and survival density of the bacterium on artificially infested weeds, plant residues and soils. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v. 41, p. 141-147, 1975.

GOTTWALD, T. R.; BASSANEZI, R. B.; AMORIM, L.; BERGAMIN-FILHO, A. Spatial pattern analysis of citrus canker-infected plantings in São Paulo, Brazil, and augmentation of infection elicited by the Asian leafminer. **Phytopathology**, v. 97, p. 674-683, 2007.

- GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; CIVEROLO, E. L.; MCGUIRE, R. G. Population dynamics and survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in soil in citrus nurseries in Maryland and Argentina. **Plant Disease**, v. 73, p. 423-427, 1989.
- GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; RILEY, T. D.; ACHOR, D. Penetration through leaf stomata and strains of *Xanthomonas campestris* in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. **Phytopathology**, v. 82, n. 11, p. 1319-1325, 1992.
- GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; RILEY, T. D.; CUBERO, J.; DROUILLARD, D. L. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* on various surfaces and chemical control of Asiatic citrus canker. **Proceedings of the International Citrus Canker Research Workshop**, Ft. Pierce, Florida. *Online*: <http://doacs.state.fl.us/canker>. 2000.
- GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; CUBERO, J.; ACHOR, D. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: Factors affecting successful eradication of citrus canker. **Molecular Plant Pathology**, v. 5, p. 1-15, 2004.
- GULLINO, M. L.; KUIJPERS, L. A. M. Social and political implications of managing plant diseases with restricted fungicides Europe. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, p. 559-579, 1994.
- HARDMAN, J. **Goodman and Gilman**: The pharmacological basis of therapeutics. 10. Ed. Rio de Janeiro: MacGraw Hill, p. 67-71, 2003.
- HARDING, N. E.; CLEARY, J. M.; IELPI, L. Genetics and biochemistry of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*. In: Hui YH, Khachatourians G (eds) **Food biotechnology microorganisms**. VCH Publishers, New York, p. 495-514, 1995.
- HUANG, H.; HANCOCK, R. E. The role of specific surface loop regions in determining the function of the imipenem specific pore protein OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p.3085-3090, 1996.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e estatística; Agropecuária; Produção agrícola; **Levantamento sistemático da produção agrícola** (junho/2010). Disponível em: <[www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)>. Acesso em 20 jul. 2010.
- JACOBY, G. A.; ARCHER, G. L. New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. **The New England Journal of Medicine**, v. 324, p. 601-612, 1991.
- JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. More extended spectrum  $\beta$ -lactamases **Antimicrobial Agent Chemotherapy**, v. 35, p.1697-1704, 1991.
- JOLIK, C. **Zinsser microbiologia**. 29.ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, p.1696, 2003.
- JONES, R. Incidência global, tipos e triagem de  $\beta$ -lactamases com espectro ampliado. In:1° Simpósio ESBL: **incidência, importância e soluções**. Argentina, 2000.

KATZEN, F.; FERREIRO, D.; ODDO, C.; LELMINI, M.V.; BECKER, A.; PUHLER, A.; LELPI, L.; *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 1607–1617, 1998.

KEEL, C.; SCHNIDER, U.; MAURHOFER, M.; VOISARD, C.; LAVILLE, J.; BURGER, U.; WIRTHNER, P.; HAAS, D.; DÉFAGO, G. Suppression of root disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 5, p. 4–13, 1992.

KEMP, B. P.; HORNE, J.; BRYANT, A.; COOPER, R. M.; *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* *gumD* gene is essential for EPS production and pathogenicity and enhances epiphytic survival on cassava (*Manihot esculenta*). **Physiology Molecular Plant Pathology**, v. 64, p. 209–218, 2004.

KIFFER, C.; HSUING, A.; OPLUSTIL, C.; SAMPAIO, J.; SAKAGAMI, E.; TURNER, P.; MENDES, C.; MYSTIC BRASIL GROUP. Antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: The MYSTIC Program Brasil 2003. **Brazilian Journals Infectious Disease**, v. 9, p. 216-224, 2005.

KOIZUMI, M. Citrus canker: The World Situation. In: **Citrus Canker: an International Perspective**. Citrus Research and Education Center, University of Florida, Lake Alfred, FL. p. 2-7, 1985.

KOIZUMI, S.; KIJIMA, E.; TSUKAMOTO, T.; TOGAWA, M.; MASUI, S. Dispersal of citrus canker bacteria in droplets and prevention with windbreaks. In: **International Citrus Congress**, 1996, Sun City. Riverside: International Society of Citriculture, 1, p. 340-344, 1996.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; DOWEL, JR. V. R.; SOMMER, H. M. Diagnóstico microbiológico: texto e Atlas colorido. Enterobacteriaceae. 5° ed. Rio de Janeiro; **MDSI**. p. 177-250, 2001.

KOROLKOVAS, A. Dicionário Terapêutico Guanabara. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p. 21-26, 1999.

LARANJEIRA, F. F.; PALAZZO, D. Danos qualitativos à produção de laranja 'Natal' causados pela clorose variegada dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.20, n.1, p.77-91, 1999.

LEITE JUNIOR, R. P.; MOHAM, S. K.; PEREIRA, A. L. G.; CAMPACCI, C. A. Controle integrado do cancro cítrico: efeito da resistência genética e da aplicação de bactericidas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 12, p. 257-263, 1987.

LEITE JUNIOR, R. P.; MOHAM, S. K. Integrated management of the citrus bacterial canker disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in the State of Paraná. **Grop Protection**, v. 9: p. 3-7, 1990.

LIGON, J. M.; HILL, D. S.; HAMMER, P. E.; TORKEWITZ, N. R.; HOFMANN, D.; KEMPF, H. J.; VAN PEE, K. H. Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. **Pest Manage**, v. 56, p. 688–695, 2000.

LIMA, L. H. C.; MARCO, J. L.; FELIX, C. R.; Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo. In: MELO I. S., AZEVEDO, J. L (Ed.). **Controle Biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, v. 2, p. 263-304. 2000.

LIMAYE, A. P.; GAUTOM, R. K.; BLACK, D.; FRITSCH, T. R. Rapid emergence of resistance to cefepime during treatment. **Clinical Infectious Diseases**, v. 25, p. 339-340, 1997.

LIVERMORE, D. M.  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Review*, v. 8, p.557-584, 1995.

MADSON, B.; OFEK, I.; CLEGG, S.; ABRAHAM, S. N. Type 1 fimbrial shafts of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* influence sugar binding specificities of their fimbriae H adhesions. *Infection and Immunity*, v. 62, p. 843-848, 1994.

MARRA, A. R. Análise dos fatores de risco relacionados à letalidade das infecções da corrente sanguínea hospitalares por *Klebsiella pneumoniae*. São Paulo; 2002 [Dissertação: Mestrado-Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina].

MARTÍNEZ, J.; MARTÍNEZ, L.; ROSENBLUETH, M.; SILVA, J.; MARTINEZ, R. How are genes sequence analyses modifying bacterial taxonomy. *International Microbiology*, v. 7, p. 261-268, 2004.

MEYER, K. S.; URBAN, C.; EAGAN, J.; BERGER, B. J.; RAHAL, J. J. Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* infection resistant to late generation cephalosporins. **Annals of Internal Medicine**, v. 119, p. 353-358, 1993.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO I. S., AZEVEDO, J. L.(Ed.) **Controle Biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, v. 2, p. 17-67, 1998.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFAÜER, M. A. Microbiología médica. 5a. ed.. Madrid: **Elsevier**, 2006.

NASCIMENTO, J. F.; RODRIGUES NETO, J.; ALVES, J. M. A.; RÊGO, M. M.; ARAÚJO, A. E. S. Ocorrência de cancro cítrico no Estado de Roraima. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 29, p. 81-82, 2003.

NIKAIDO, H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. **Science**, v. 264, p. 382-388, 1994.

NISHIDA, M.; MATSUBARA, T.; WATANABE, N. Pyrrolnitrin, a new antifungal antibiotic. Microbiological and toxicological observations. *Journal Antibiotic*, v. 18, p. 211–219, 1965.

OLIVEIRA, A. G.; MURATE, L. S.; SPAGO, F. R.; LOPES, L. P.; BERANGER, J. P. O.; SAN MARTIN, 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.

PAI, H.; KANG, C. I.; BYEON, J. H.; LEE, K. D.; PARK, W. B.; KIM, H. B. Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by Amp C producing *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agent Chemother**, v. 48, p. 3720-3728, 2004.

PAGE, M. I. Understanding metallo- beta-lactamases. **American Society for Microbiology**, v. 20, p. 1609-1617, 2002.

PODSCHUN, R.; PENNER, P.; ULLMAN, U. Interaction of *Klebsiella* capsule type 7 with human polymorphonuclear leucocytes. **Microbiology Pathology**, v. 13, p. 371-379, 1992.

PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, v. 21, p. 400-407, 2003.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clinical Microbiology Review**, v. 20, p. 440-458, 2007.

YIGIT, H.; QUEENAN, A. M.; ANDERSON, G.J. Novel carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase KPC-1 from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, p. 1151-1161, 2001.

RAAIJMAKERS, J. M.; VLAMI, M.; SOUZA, J. T. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 537-547, 2002.

RAGSDALE, N. N.; SISLER, H. D. Social and political implications of managing plant diseases with decreased availability of fungicides in the United States. **Annual Review of Plant Pathology**, v. 32, p. 545-557, 1994.

RAJAGOPAL, L; SUNDARI, C. S.; BALASUBRAMANIAN, D.; SONTI, R. V. The bacterial pigment xanthomonadin offers protection against photodamage. **FEBS Letter**, v. 415, p. 125-128, 1997.

RASHEED, J. K; BIDDLE, J. W; ANDERSON, K. F. Detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase type 2 Carbapenemhydrolyzing enzyme in clinical isolates of *Citrobacter freundii* and *K. oxytoca* carrying a common plasmid. **Journal Clinical Microbiology**, v. 46, p. 2066-2069, 2008.

RICE, L. B. Evolution and clinical importance of extended spectrum  $\beta$ -lactamase. **Chest**, v. 119, p. 391-395, 2001.

ROSSETTI, V. Citrus canker in Latina América: A review. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, v. 3, p. 918-924, 1977.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. Resistência bacteriana: Interpretando o antibiograma. Ed. Atheneu. São Paulo, 2005.

RINALDI, D. A. M. F.; LEITE JUNIOR, R. P. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* population to the presence of copper compounds in nature. **Proc. Int. Soc. Citric.**, v. 2, p. 1064, 2000.

SADER, H. S. Antimicrobial resistance in Brazil: comparison of results from two multicenter studies. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 4, p. 91-99, 2000.

SANDERS, C. C.; SANDERS, W. E. JR.  $\beta$ -lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. *Clinical Infectious Diseases*, v. 15, p. 824-839, 1992.

SHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G. H.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P. E.; STROMBERG, V. K.; VIDAVER, A. K. Reclassifications of *Xanthomonas campestris* pv *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. ver. Comb. nov., and *X. alfalfa* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov., *X. campestris* pv. *alfalfa* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfa* subsp. *alfalfa* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev., and "var. *fuscans*" of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 28, p. 494-518, 2005.

SHAAD, N. W.; VIDAVER, A. K.; LACY, G. H.; RUDOLPH, K.; JONES, J. B. Evaluation of proposed amended names of several *Pseudomonads* and *Xanthomonads* and recommendations. **Phytopatology**, St. Paul, v. 90, n. 3, p. 208-213, 2000.

SHANMUGAIAH, V.; MATHIVANAN, N.; VARGHESE, B. Purification, crystal structure and antimicrobial activity of phenazine-1-carboxamide produced by a growth-promoting biocontrol bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MML2212. **Journal of Applied Microbiology**. v. 108, p. 703–711, 2010.

STROMBERG, K. D.; KINKEL, L. L.; LEONARD, K. J. Interactions between *Xanthomonas translucens* pv. *translucens*, the causal agent of bacterial leaf streak of wheat, and bacterial epiphytes in the wheat phyllosphere. **Biological Control**, v. 17, p. 61–72, 2000.

STROMBERG, K. D.; KINKEL, L. L.; LEONARD, K. J. Quantifying the effect of bacterial antagonists on the relationship between phyllosphere population sizes of *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* and subsequent bacterial leaf streak severity on wheat seedlings. **Biological Control**. v. 29, p. 58–65, 2003.

STALL, R. E.; MILLER, J. W.; MARCO, G. M.; CANTEROS DE ECHENIQUE, B. I. Timing of sprays to control cancrrosis of grapefruit in Argentina. **Proceedings of International Society of Citriculture**, v. 1, p. 414-417, 1982.

STALL, R. E.; MILLER, J. W.; MARCO, G. M.; CANTEROS DE ECHENIQUE, B. I. Population dynamics of *Xanthomonas citri* causing cancrrosis of citrus in Argentina. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v. 93, p. 10-14, 1980.

SUNENSHINE, R. H.; M. O. WRIGHT, L. L.; MARAGAKIS, A. D.; HARRIS, X.; SONG, J.; HEBDEN, S. E.; COSGROVE, A.; ANDERSON, J.; CARNELL, D. B.; JERNIGAN, D. G.; KLEINBAUM, T. M.; PERL, H. C.; STANDIFORD, A.;

SRINIVASAN. Multidrug- resistant *Acinetobacter* infection mortality rate and length of hospitalization. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, p. 97–103, 2007.

TENOVER, F. C.; MOHAMED, M.J.; GORTON, T.S.; DEMBEK, Z.F. Detection and reporting of organisms producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: **Survey of laboratories in Connecticut**, v. 37, p. 4065-4070, 1999

THOMASHOW, L. S.; WELLER, D. M.; BONSALL, R. F.; PIERSON, L. S. III. Production of antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 908-912, 1996.

THOMASHOW, L. S.; BONSALL, R. F.; WELLER, D. M. Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes in situ. In: Hurst, C. J.; Knudsen, G. R.; McInerney, M. J.; Stetzenbach, L. D.; Walter, M. V. (Eds) Manual of Environmental Microbiology, **ASM Press**, Washington, DC. p. 493–499, 1997.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS. J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 45, p. 472-489, 1995.

WALEY, S. G. An explicit model for bacterial resistance: application to betalactam antibiotics. **Microbiol Science**, v. 4, p. 143-146, 1987.

WHIPPS, J. M. Developments in the biological control of soilborne plant pathogens. **Advanced Botanical Research**, v. 26, p. 1–133, 1997.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 487–511, 2001.

WOODFORD, et al. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p. 1261-1264, 2008.

## **ARTIGOS**

## ARTIGO A

Biological Control 56 (2011) 125–131



Contents lists available at ScienceDirect

Biological Control

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ybcon](http://www.elsevier.com/locate/ybcon)

## Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain

Admilton Gonçalves de Oliveira<sup>a</sup>, Leticia Sayuri Murate<sup>a</sup>, Flavia Regina Spago<sup>a</sup>, Lucilene de Paula Lopes<sup>a</sup>, Jamile Priscila de Oliveira Beranger<sup>a</sup>, Juca Abramo Barrera San Martin<sup>c</sup>, Marco Antonio Nogueira<sup>a</sup>, João Carlos Palazzo de Mello<sup>b</sup>, Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade<sup>c</sup>, Galdino Andrade<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, CEP 86051-990, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Farmácia e Farmacologia, Laboratório de Produtos Fitoterápicos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, CEP 87020-900, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Biologia Geral, Laboratório de Microscopia e Microanálise, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, CEP 86051-990, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 20 January 2010

Accepted 19 October 2010

Available online 30 October 2010

## Keywords:

Citriculture

Biological control

Citrus canker

Antibiosis

Ultrastructure

## ABSTRACT

In this work, we evaluated the antibiotic activity of metabolites produced by the *Pseudomonas* sp. LV strain and their effects on the cell morphology of the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain (*Xcc* 306), which causes citrus canker lesions. The LV strain was cultivated, centrifuged, a cell-free supernatant was treated with dichloromethane and then concentrated, frozen in liquid nitrogen and lyophilized. The dichloromethane phase (DP) was fractionated by vacuum liquid chromatography (VLC) using six organic solvents with a crescent polarity. The antibiotic activity of the DP and all the fractions from VLC were tested against *Xcc* 306 and only the F3 fraction showed antimicrobial activity. The antibiotic activity of F3 was determined by minimum inhibitory concentration and the action on the cell morphology of *Xcc* 306 carried out in glass tubes with cell suspensions plus F3 solution sampled at three different times (one, three and six hours). The effects were analyzed by electron microscopy. Both the DP and F3 showed antibiotic activity against *Xcc* 306 in *in vitro* experiments. Electron microscopy showed that the F3 fraction completely disrupted the cell integrity after six hours. In a greenhouse experiment, the DP and F3 fraction (highly effective in *in vitro* experiments), reduced the formation of lesions by approximately 80% and 94%, respectively.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Citrus canker caused by *Xanthomonas citri* pv. *citri* (*Xcc*) is an important disease in citriculture in all producing countries (Stall and Civerolo, 1991; Kimati and Bergamin Filho, 1995; Gottwald et al., 2002). The symptoms consist of erumpent lesions on fruit, leaves and young stems, reducing fruit quality and production.

The control of bacterial pathogens is a serious problem in citriculture, and the management strategies include the use of disease-free seedlings, resistant cultivars, windbreaks to hinder inoculum dispersal, and bactericides containing copper (Schubert and Sun, 2003). But, these strategies are not always effective, especially when the environmental conditions are optimal for disease dissemination or inoculum density is high (Sahin and Miller, 1996).

The challenge is find a new control method which increases the effectiveness of citrus canker control in the orange orchard. At the moment, some alternatives methods should be named as follow, a

systemic acquired resistance inducers (van Loon et al., 1998), which has been used effectively against a number of bacterial plant diseases (Louws et al., 2001; Maxson-Stein et al., 2002; Pradhanang et al., 2005). Some compounds have already been tested but were not effective against citrus canker (Graham and Leite, 2004), thus, further studies are needed with new compounds.

Another strategy is the use of biological control agents, including antagonistic bacteria (Arya and Parashar, 2002; Wulff et al., 2002; Byrne et al., 2005), plant growth-promoting bacteria (Ji et al., 2006) and bacteriophages (Balogh et al., 2003, 2008), methods that were successfully used in the control of several pathogens and are also promising candidates for control of citrus canker. Studies of biological control on citrus canker are still in preliminary stages using many antagonistic bacteria strains such as *Pseudomonas* sp., *Erwinia herbicola* and *Bacillus subtilis* isolated from citrus phylloplane were showed antagonistic effect *in vitro* against canker pathogen (Goto et al., 1979; Ota, 1983; Kalita et al., 1996). However, further studies needs to be performed in order to find an effective antagonist bacteria or antibiotic compounds produced by its secondary metabolism with an effective ability to control citrus canker.

\* Corresponding author. Address: Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Caixa Postal 6001, CEP 86051-990, Brazil. Fax: +55 433371 4791.

E-mail address: [andraged@uel.br](mailto:andraged@uel.br) (G. Andrade).

**ARTIGO B****ULTRASTRUCTURAL EVALUATION OF ANTIBIOTIC ACTIVITY ON THE  
ORANGE LEAVES DEVELOPING LESION BY *XANTHOMONAS CITRI* PV. *CITRI***

**Admilton Gonçalves de Oliveira, Cíntia Greice Matsuoca Góis, Flavia Regina Spago, Jamile Priscila de Oliveira Beranger, Mayara Milek Stanganelli, Ane Stefano Simionato, Juca Abramo Barrera San Martin, Cláudio Roberto Novello, Ivânia Teresinha Albrecht Schuquel, João Carlos Palazzo de Mello, Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade, Galdino Andrade**

## ULTRASTRUCTURAL EVALUATION OF ANTIBIOTIC ACTIVITY ON THE ORANGE LEAVES DEVELOPING LESION BY *XANTHOMONAS CITRI* PV. *CITRI*

Admilton Gonçalves de Oliveira<sup>1</sup>, Cíntia Greice Matsuoca Góis<sup>1</sup>, Flavia Regina Spago<sup>1</sup>, Jamile Priscila de Oliveira Beranger<sup>1</sup>, Mayara Milek Stanganelli<sup>1</sup>, Ane Stefano Simionato<sup>1</sup>, Juca Abramo Barrera San Martin<sup>2</sup>, Cláudio Roberto Novello<sup>3</sup>, Ivânia Teresinha Albrecht Schuquel<sup>4</sup>, João Carlos Palazzo de Mello<sup>3</sup>, Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade<sup>2</sup>, Galdino Andrade<sup>1a</sup>

### Abstract

Brazil is the biggest orange producer around the world and citrus production is a very important commodity of this country. The citrus canker caused by *Xanthomonas citri* pv. *citri* (*Xcc*) is a serious worldwide disease in citrus production. The aim of this work was evaluate the ultrastructural of lesion formation by *X. citri* pv. *citri* 306 strain on leaves of *Citrus sinencis* cv. Valence treated with antibiotic compound, produced by *Pseudomonas* sp LV strain. The F3 fraction was purified by chromatographic columns, the antibiotic activity of fractions were evaluated with disc diffusion technique against *Xcc* 306 strain. The fraction (F3d) that showed high activity was selected and used in the next experiments. The minimum inhibitory concentration of F3d was 6.25 µg mL<sup>-1</sup>. The in vivo experiment was carried out in a greenhouse conditions, the experiments consisted of three concentrations of F3d (1, 10 and 100 µg mL<sup>-1</sup>), two regimes treatment (preventive and curative) with plants experimental infected with *Xcc* 306. The lesions formation was evaluated after 21 days after infection. The results showed decrease of lesions formation in all doses used in plants treated with F3d. Moreover, in the preventive treatments the D1 dose, (1 µg mL<sup>-1</sup>) decrease around 90% of lesion formation on orange leaves. The electron microscopy, F3d changed of exopolysaccharide matrix and showed abnormalities cellular of *Xcc* 306 strain in phylloplane leaves and also in the mesophyll host cells of orange leaves. The control on lesion formation and complete collapse of the bacterium cells observed suggests that the F3d there is a high potential to control the infection and lesion formation by *Xcc*.

---

<sup>1</sup> Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, CEP 86051-990, Brasil. <sup>a</sup>Corresponding author: Galdino Andrade, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Caixa Postal 6001, CEP 86051-990, Brazil. Phone/Fax: +554333714791; E-mail: andrade@uel.br

<sup>2</sup> Departamento de Biologia Geral, Laboratório de Microscopia e Microanálise, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, CEP 86051-990, Brasil.

<sup>3</sup> Departamento de Farmácia e Farmacologia, Laboratório de Produtos Fitoterápicos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, CEP 87020-900, Brasil.

<sup>4</sup> Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, CEP 87020-900, Brasil.

## 1 INTRODUCTION

The protection of intensive citriculture against disease is the challenge of researchers and industry, each year new pathogen and/or pests are identified, especially plant pathogens (Graham et al., 2004). One of the most important is *Xanthomonas citri* pv. *citri* (syn. *X. axonopodis* pv. *citri*) (Schaad et al., 2005), the bacterium that causes Asiatic citrus canker.

The Asiatic type of citrus canker is a serious disease of most commercial citrus varieties and some citrus plants (Schubert and Sun, 2003). The bacterial pathogen goes through the host plant tissues or by natural openings such as stomata (Hung, 1986). The symptoms consist in erumpent lesions on leaf, branch and fruit, which should reduce photosynthetic area, fruit quality and premature senescence, and in high level of infection orange plant could die. Lesion developed on the fruits has particular importance because it loses value in the market (Gottwald et al., 2009; Shiotani et al., 2009).

Currently the methods used on the citrus canker control involve the use of resistant varieties of citrus, windbreaks to hinder inoculum dispersal and applications of bactericides containing copper (Schubert and Sun, 2003), but sometimes the bacterium could develop resistance by copper products, thus demanding an increase of these products and frequent application. In addition, there is an increasing concern about the accumulation of copper in the environment.

Many times the control are not effective, especially when the lesions remain active for many months (Gottwald et al., 2009; Pruvost et al., 2002) and exude high number of viable bacteria through the environment especially during the rain (Bock et al., 2010a, 2010b, 2005).

There are many methods successfully used in the control of several diseases, that should be used in the control of citrus canker, such as biological control agents, including antagonistic bacteria (Arya and Parashar, 2002; Byrne et al., 2005; Wulff et al., 2002), plant growth-promoting bacteria (Ji et al., 2006) bacteriophages (Balogh et al., 2008) and systemic acquired resistance inducers (Louws et al., 2001; Pradhanang et al., 2005). Compounds inducing resistance have already been tested but were not effective against citrus canker (Graham and Leite Junior, 2004), and, further studies are needed to obtain and test new compounds. On the other hand, could be use antibiotic compounds on the *Xcc* control, that were obtained

from many microorganisms such as bacterial products from *Pseudomonas* genus (Goto et al., 1979; Kalita et al., 1996; Oliveira et al., 2011; Ota, 1983) but the efficiency and application needs further studies.

In this way, the challenge is to find new compounds that show high antibiotic activity, low toxicity for plant and the environment, long-action against free bacteria in the phylloplane and reduce potential of inoculum inside the lesions of citrus canker. The aim of this work was evaluate the ultrastructural of lesion formation by *X. citri* pv. *citri* 306 strain on leaves of *Citrus sinencis* cv. Valence treated with antibiotic compound, produced by *Pseudomonas* sp. LV strain.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 BACTERIA STRAINS

The pathogen Xcc 306 highly virulent was used in all experiments where the genome had been sequenced (Da Silva et al., 2002). The Xcc 306 strain was stored in 40% glycerol (v : v) at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  and the cell stock was renewed every six months, cultured on nutrient agar (NA) at  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$   $48\text{ h}^{-1}$ .

The antagonist bacterium, a *Pseudomonas* sp. LV strain isolated from the old citrus canker lesion on the leaves of orange plants, was collected in Astorga, Paraná State, Brazil [ $23^{\circ}13'29.11''\text{ S}$ ;  $51^{\circ}39'47.20''\text{ W}$ ] (Rampazo, 2004). The procedure of storage and cell maintenance was the same as described for Xcc 306, except the culture medium was NA plus copper chloride ( $100\text{ mg L}^{-1}$ ).

### 2.2 CULTURE CONDITIONS AND SECONDARY METABOLITE

The method used to produce the secondary metabolite by *Pseudomonas* sp LV strain and its semi-purification was described by Oliveira et al. (2011) and was patented (Patent, September 10th. 2008, PI0803350-1; <http://www.inpi.gov.br>).

### 2.3 SEMI-PURIFICATION OF THE ANTIBIOTIC SUBSTANCES BY CHROMATOGRAPHY COLUMN

The F3 fraction obtained by Oliveira et al. (2011) was mixed with silica gel 60 (0.063–0.200 mm, Macherey–Nagel) to prepare the slurry metabolite–silica gel that is air-dried. A glass column ( $\varnothing$ : 20 mm h: 350 mm) was coupled to a vacuum pump with 51 kPa. This column was washed, with 40 mL (10 x) each using the following mobile phase (v : v): hexane [100, (F3a)], hexane/dichloromethane [50:50, (F3b)], dichloromethane [100, (F3c)] dichloromethane/ethyl acetate [50:50, (F3d)], ethyl acetate [100, (F3e)] ethyl acetate/methanol [50:50, (F3f)], methanol [100, (F3g)] methanol/water [50:50, (F3h)], and water [100, (F3i)]. Each fraction was concentrated in a rotary evaporator (Büchi R 215) under reduced pressure at 45 °C and lyophilized (Jouan LP3).

### 2.4 EVALUATION OF ANTIBIOTIC ACTIVITY

#### 2.4.1 Disc Diffusion Technique

To quantify the amount of fraction and the halo size was used the disc diffusion technique. The discs were prepared with different concentrations of each fraction of F3a to F3i (100 and 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), with three replicates. The determination was carried out in Petri dishes with 20 mL of NA with cell suspension of *Xcc* 306 ( $10^8$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ ) in the log phase on agar surface. After that dry discs with each fraction or solvent control (dichloromethane or chloroform used for each fraction dilute) were left on the culture media surface plus cell suspension and was incubated for 48 h at 28 °C, and the halo formed was measured (mm). The experiment was repeated three times and the antibiosis effect was determined by measure of inhibited halos formed around the discs.

#### 2.4.2 Minimal Inhibitory Concentration (MIC) Determination of the F3d Fraction

The MIC was used to determine the concentration of F3d would be used on plant experiment. The concentrations used: were 0.78 up to 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of F3d fraction plus 0.05% (v : v) of Dimethylsulfoxide (DMSO). The MIC was carried out in sterile cell culture with 96-wells plates, and non-inoculated NB and cell

suspensions of *Xcc* 306 were considered negative and positive control, respectively. The inoculum was prepared with cell suspension of *Xcc* 306 plus NB ( $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>) and the plates were incubated at 28 °C for 24 h. After that the OD ( $\lambda = 590$  nm) was determined using a Microplate Reader (Bio-Rad model 3550). Each experiment was performed in triplicate and repeated three times. The percentage of viable cells was calculated in relation to the control cultured in the medium alone.

#### 2.4.3 Plant Experiment at Greenhouse Conditions

Plants of *Citrus sinensis* cv. Valence were grown in 3 L pots with non-sterile soil Rhodic Ferralsol (FAO, 1994) and kept in a greenhouse (28 °C/22 °C and 10 h/14 h day/night, relative humidity of 80%). Every 15 days, 150 mL of Hewitt's solution for non-legume plants (Hewitt, 1966) was added, and plants were watered with tap water when needed.

The experimental design was a completely randomized block, composed of two regimes treatment (preventive and curative), three concentrations of the F3d (D1 = 1 ; D2 = 10 and D3 = 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) with five reeplicates, and was considered as positive control (inoculated with *Xcc* 306 suspension) and negative control (sprayed with sterile distilled water) (2 x 3 x 2, n = 40). The old leaves were cut, and when the new leaves were with 15 days, fifteen leaves were selected by the same aspect, size, colour and age, and all other leaves were cut before F3d application. The application was made as following, plants were covered for 24 h 28 °C<sup>-1</sup> with black plastic bag of 150 L to form a moist chamber. In the preventive treatment, the five plants were sprayed with 8 mL of the F3d per plant for each concentration described above. After 24 h, the plants were sprayed with a cell suspension of 8 mL of *Xcc* 306 (O.D. = 0.1,  $\lambda = 590$  nm) per plant. After 24 h, the moist chamber was removed.

In the curative treatment, the same procedure described above was adopted except the order of the spraying (*Xcc* 306 was inoculated first and after the F3d. Finally, 8 mL of distilled water per plant in the preventive- and curative treatments (solvent used to dilute the F3d) was considered the control.

The number of lesions formation was evaluated 21 days after the last spraying session. The number of lesions was measured by counting lesions formed

in a stereomicroscope (40 x). The results were evaluated by analyses of variance (ANOVA) and quadratic regression analyses were performed at  $p \leq 0.05$ .

## *2.5 ULTRASTRUCTURAL EVALUATION OF ANTIBIOTIC ACTIVITY*

To electron microscopy study, samples of 6 mm of diameter from orange leaves were collected during in plant experiment at greenhouse conditions of three concentrations (1, 10 and 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) in six different times (0, 6, 12, 24, 72 and 120 h) and two regimes treatments (curative and preventive).

In the SEM analysis, samples were fixed by immersion in 2.5% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer solution (pH 7.2), post-fixed in OsO<sub>4</sub> 1% and were dehydrated in an ethanol gradient (70, 80, 90 and 100 °GL). Samples were critical point dried in CO<sub>2</sub> (BALTEC CPD 030 Critical Point Dryer), coated with gold (BALTEC SDC 050 Sputter Coater) and observed under a scanning electron microscope (FEI Quanta 200).

In the TEM, samples were fixed and dehydrated as described for SEM. The samples were embedded and blocked in Araldite<sup>®</sup> resin. Ultrathin sections (60–70 nm) were stained with 2% uranyl acetate and in lead citrate (Reynold's solution), and observed using a FEI Tecnai 12 transmission electron microscope.

## **3 RESULTS**

### *3.1 EVALUATION OF THE ANTIBIOTIC ACTIVITY OF FRACTIONS BY AGAR DIFFUSION TECHNIQUE*

The F3d fraction showed highest antibiotic activity on Xcc 306 (35 mm in 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and no antibiotic activity was observed for F3a, F3b, F3c, F3e, F3f, F3g, F3h and F3i fractions (Table 1).

**Table 1** – Antibiotic activity against *Xcc* 306 by diffusion agar method of nine fractions obtained from purification of F3 fraction (Oliveira et al., 2011). The fractions obtained from F3 were purified by vacuum liquid chromatography using nine mobile phases with crescent polarity (F3a hexane [100%], F3b hexane/dichloromethane [50:50], F3c dichloromethane [100%], F3d dichloromethane/ethyl acetate [50:50], F3e ethyl acetate [100%], F3f ethyl acetate/methanol [50:50], F3g methanol [100], F3h methanol/water [50:50], and F3i water [100%]).

Fractions	Concentration ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		Productivity (%)
	100	1000	
F3	10.5 $\pm$ 0.5	26.5 $\pm$ 0.5	
F3a	-	-	
F3b	-	-	
F3c	-	-	
F3d	35 $\pm$ 0.5	42.5 $\pm$ 0.5	
F3e	-	-	
F3f	-	-	
F3g	-	-	
F3h	-	-	
F3i	-	-	
NC			

F3 was considered as positive control and dichloromethane or chloroform solvent was considered as negative one (NC). The data represent the mean of four replicates and its respective standard deviation. Values of halo inhibition (mm); absence of halo formation (-).

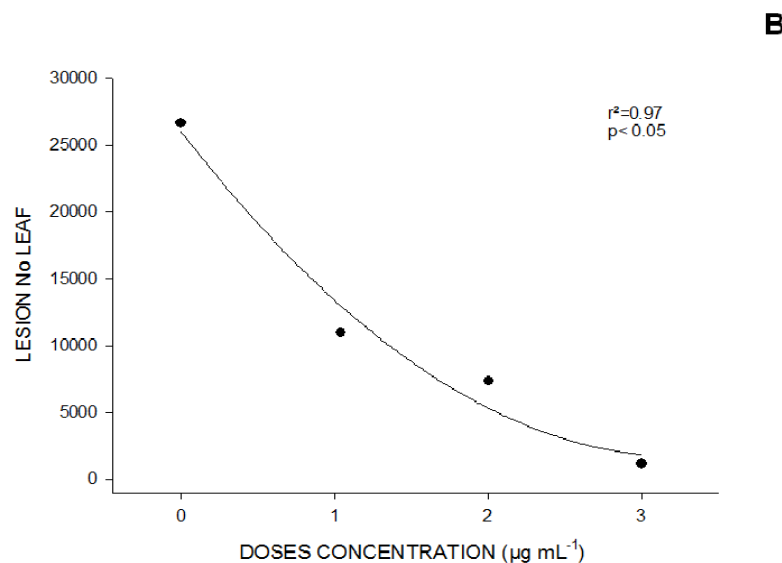
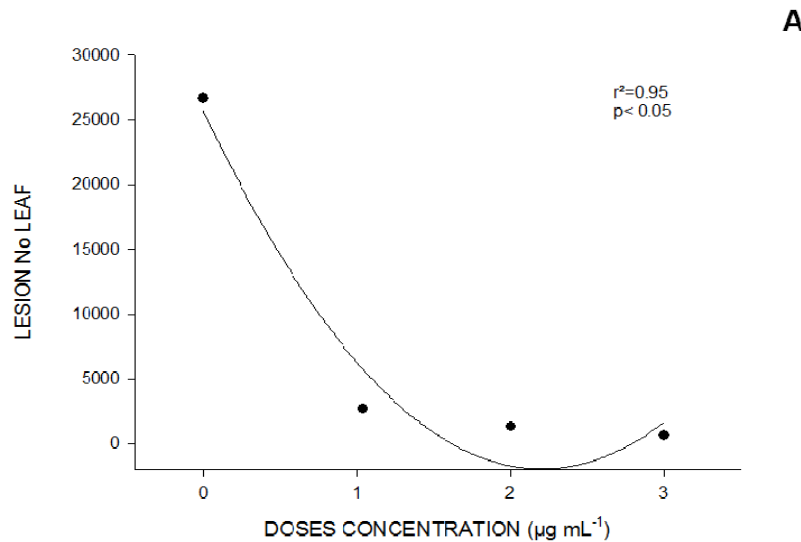
### 3.2 MIC AND LESION FORMATION.

After MIC determination of  $6.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , three concentrations 1, 10 and  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  was chosen to use in plant experiment at greenhouse conditions.

The correlation between doses and lesion number in preventive treatment showed high effect on lesions control when compared with non-treated plants ( $r^2 = 0.95$ ,  $p < 0.05$ ), this effect were observed in all doses tested (D1= 90.0%, D2= 95.0% and D3= 97.5%) where D3 showed the highest effect on lesions formation (Fig. 1A).

The same results were observed in the curative treatment where all doses used showed high effect decreasing the number of lesions formation when compared with control plants ( $r^2 = 0.97$ ,  $p \leq 0.05$ ). However, the number of lesions in the curative treatments was two times higher than was observed in preventive treatment, suggesting that preventive is more effective than curative treatment (Fig. 1B).

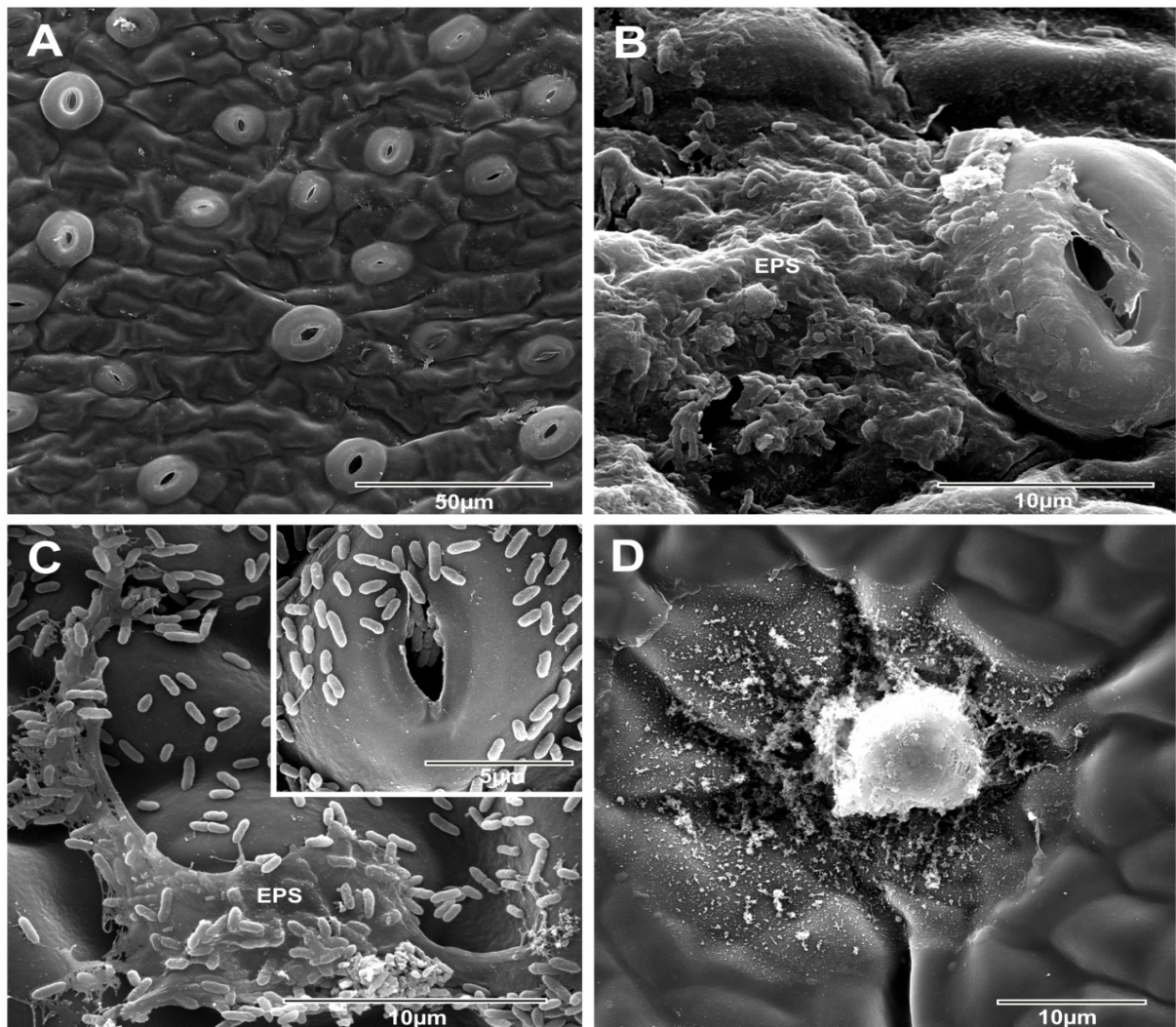
**Figure 1** – Regression of dose–effect of three concentrations of the F3d fraction on the number of lesions of citrus canker caused by Xcc 306 strain in leaves of *C. sinensis* cv. Valence after 21 days of application (n = 50). ([0] D0 = Xcc 306 suspension no treated, [1] D1 = 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; [2] D2 = 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; [3] D3 = 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . (A) Preventive treatment. (B) Curative treatment.



### 3.3 ULTRASTRUCTURAL EVALUATION OF ANTIBIOTIC ACTIVITY

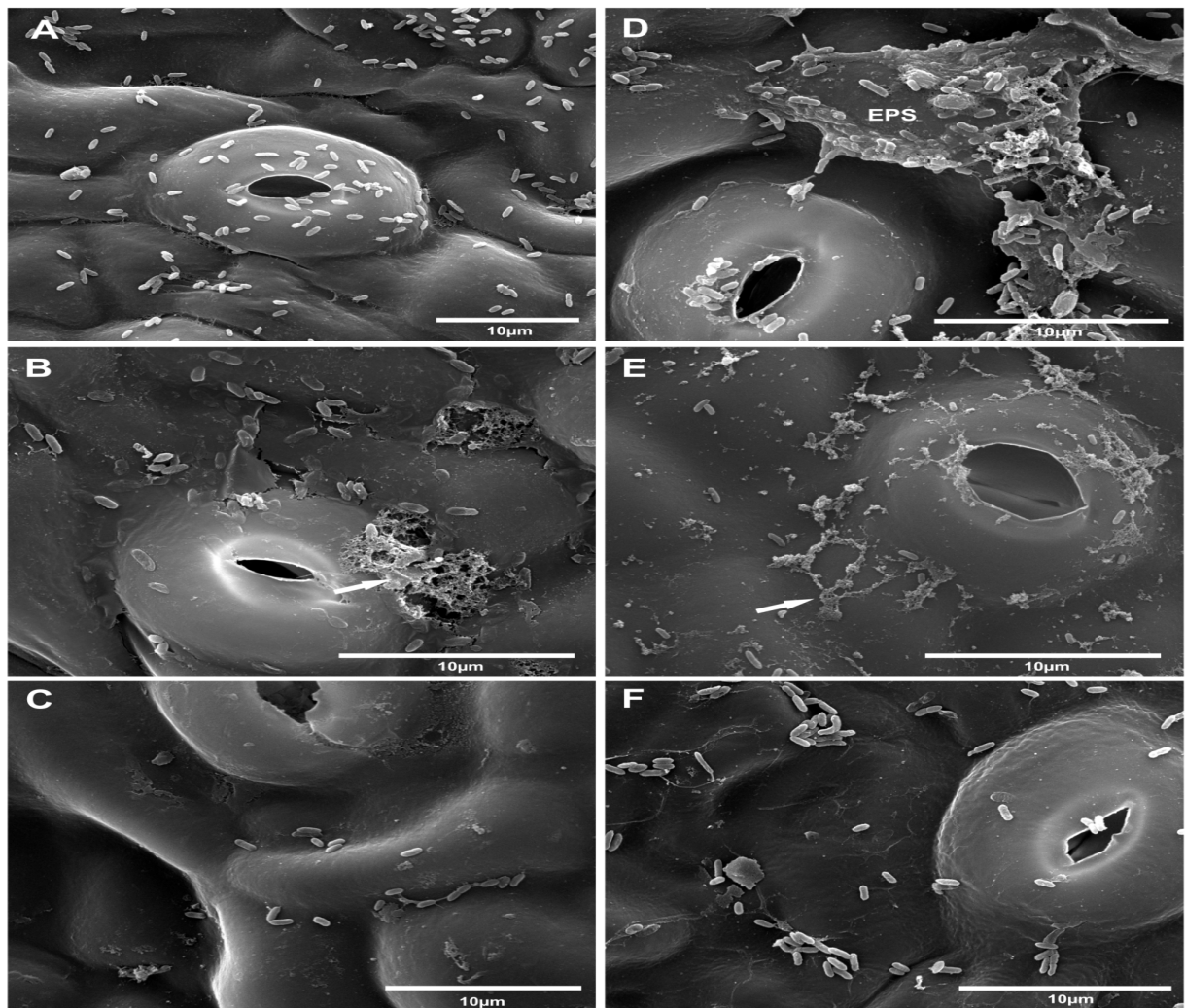
In the electron microscopy study, the control plants no bacteria and EPS were observed at SEM (Fig.2A). After 6 h and 24 h of inoculation, was observed a high colonization and healthy bacterial cells submerged in an amorphous EPS (Figs. 2B and C) and after 72 h of inoculation, the first lesions of citrus canker were observed (Fig. 2D).

**Figure 2** – Scanning electron micrographs of the orange leaves (*C. sinensis* var. Valence). A - Negative control; B, C and D - Positive control. A: Photomicrograph of the lower leaf surface non-inoculated with *Xcc* 306. B: At 6 h after inoculation, are seen bacterial cells submerged in exopolysaccharide matrix (EPS) in the phylloplane and outer chamber stomatal. C: At 24 h after inoculation, are seen bacterial cells free and submerged in EPS in the phylloplane and bacterial cells into the outer chamber stomatal. D: At 48 h after inoculation, lesions formations were observed in phylloplane.



In the preventive treatment was observed reduction of bacteria number at 6 h after inoculation (Fig. 3A). After 24 h the bacteria number decreased and the bacteria morphology was disrupted as well as the EPS changed when compared with control plant (Fig. 3B), and after 48 h, was observed a large increase in the reduction of inoculums on the cell surface of orange leaves and absence of EPS (Fig. 3C).

**Figure 3** –Orange leaves Valence (*C. sinensis* var. Valence) inoculated with  $10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  of Xcc 306 strain and treated in the preventive and curative treatment with antibiotic compounds F3d ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Preventive treatment: A: At 6 h after inoculation. Note the reduction of the inoculums and absence of EPS. B and C: At 24 h and 48 h after inoculation respectively, note the reduction of the inoculum and the change or absence of EPS. Curative treatment: D: At 6 h after inoculation. Not reductions of inoculums of Xcc 306, moreover, observe the presence of EPS unchanged. E and F: At 24 h and 48 h after inoculation. Note the reduction of the inoculum and the change or absence of EPS. EPS: Exopolysaccharide. Arrows: Change in the configuration of EPS.



In the curative treatment was observed reduction of inoculums of *Xcc* 306 at 6 h, moreover, presence of EPS was seen (Fig. 3D). In the 24 h and 48 h not observed different results also when compare with preventive treatment (Figs. 3E and F).

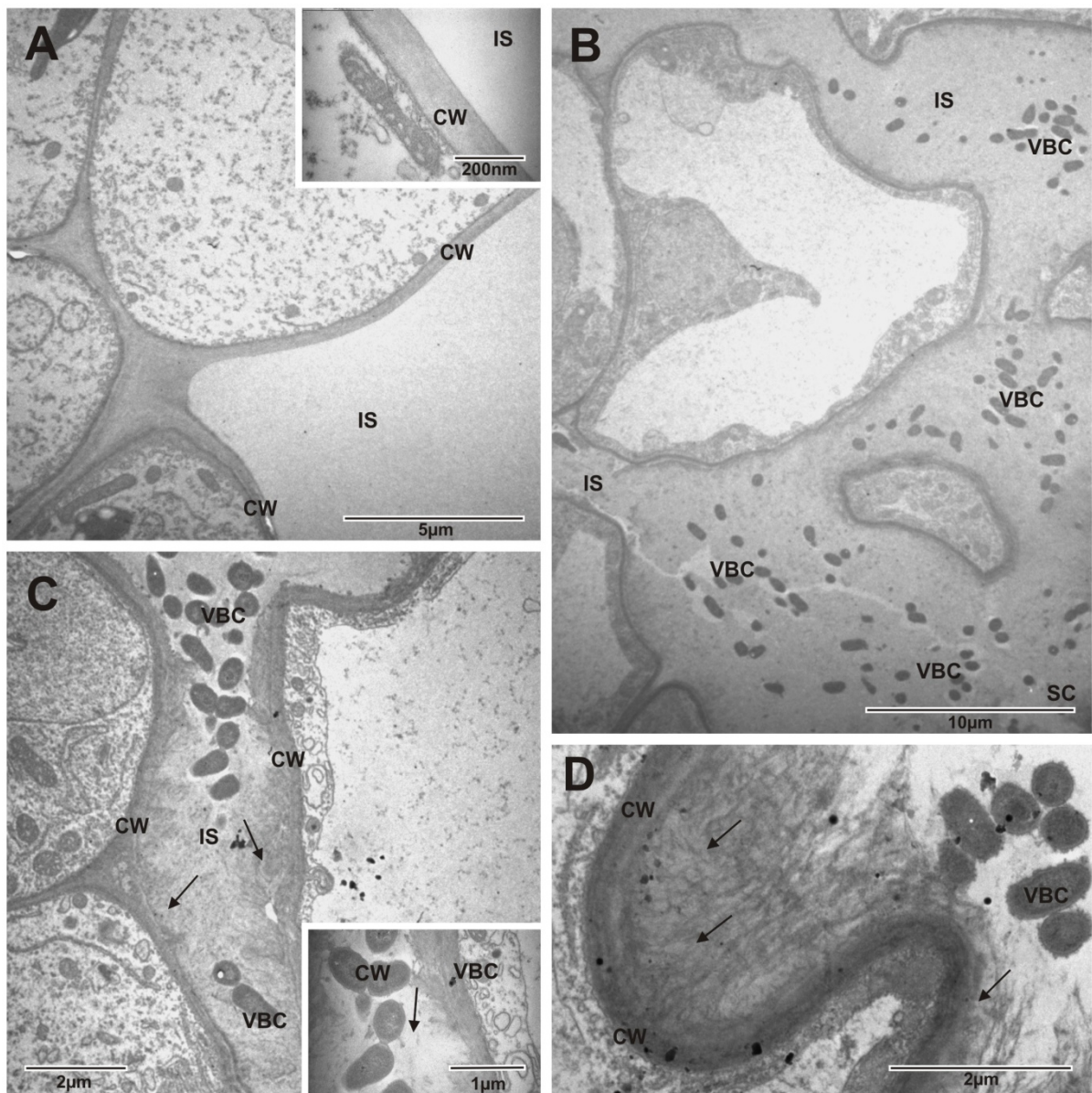
In the TEM, non-inoculated orange leaves showed no changes in the mesophyll with intact cell wall after 120 h (Fig. 4A) more details is show in the inset.

Viable bacteria cells were frequently observed in the intercellular spaces and substomatal chamber of the orange leaves inoculated. Organelles of host cells appeared damaged (Fig. 4B).The electrondense intercellular spaces and substomatal chamber were filled with homogeneous EPS (Fig. 4B and C). A fibrillar material was from host cell walls was present and was projecting into the intercellular space (Figs. 4C and 4D).

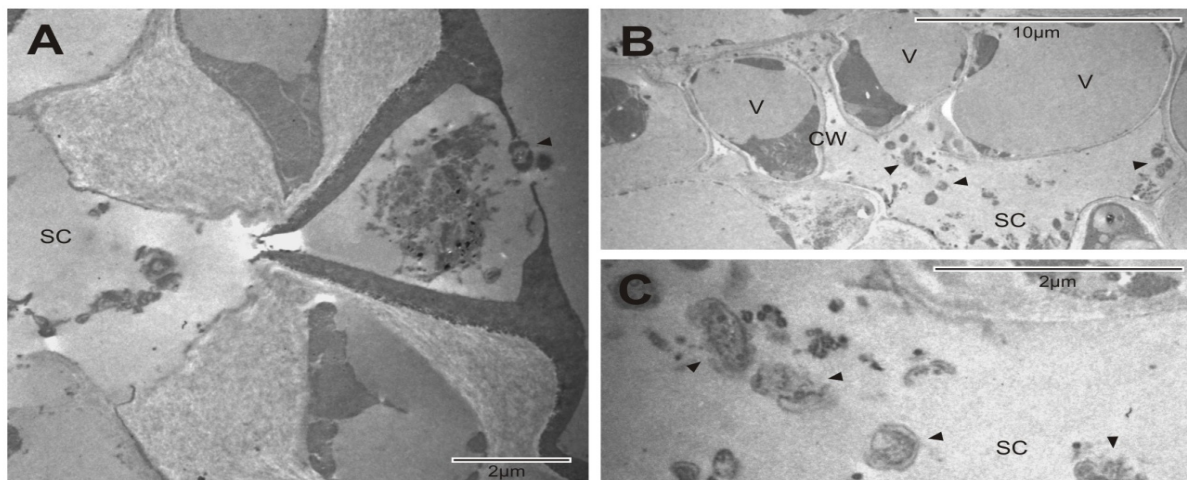
After 120 h in the preventive treatment, bacterial cells was in very small number in the mesophyll host cells when compared with control (Fig. 5A), and its morphology and electron-densities was different than positive control (Fig. 5B). The host cells of mesophyll and cell wall were unaltered, while the bacterial cell appeared lysed (Fig. 5C).

In the curative treatments, the same effects were found when compared with preventive on orange leaves (Figs. 6A, B), including the effect on bacterial cells (Fig. 6C).

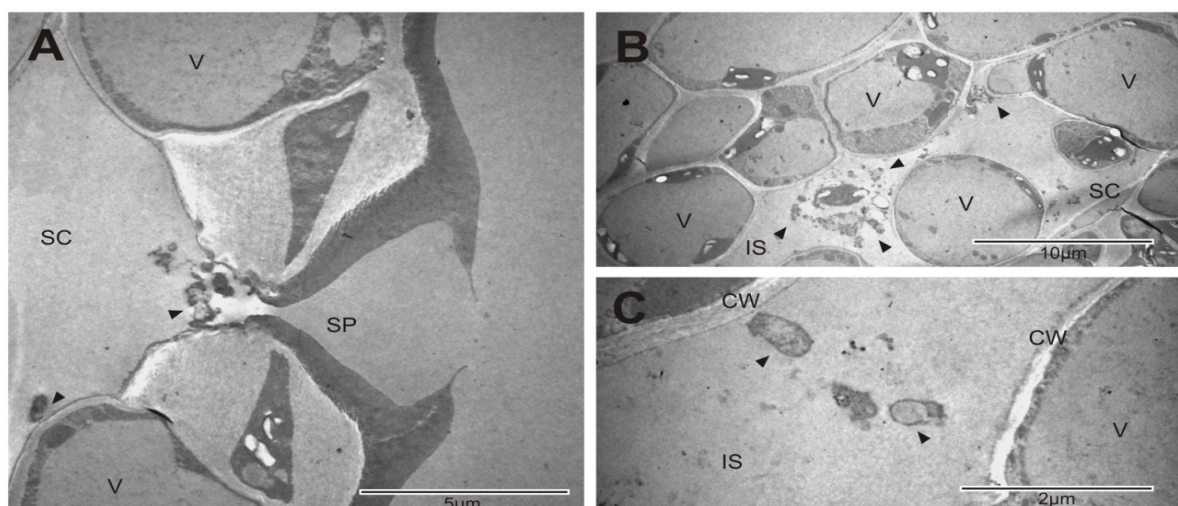
**Figure 4** – Transmission electron micrographs of the orange leaves Valence (*C. sinensis* var. Valence). A - Negative control; B, C and D - Positive control. A: Mesophyll host cells non-inoculated with *Xcc* 306. Observe absence the bacterial cell and for EPS in the intercellular space. Inset is showing the intact cell wall. B: At 120 h after inoculation bacterial cells with  $10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  of *Xcc* 306 strain are seen. The intercellular space and substomatal chamber is filled by an EPS. Note the host mesophyll cells are vacuolated. C: Intercellular space colonized with *Xcc* 306. Inset: viable bacterial cell are present in the intercellular space in contact with host cell wall in process of dissolution. D: viable bacteria cell are present in the intercellular space in contact with host cell wall in process of dissolution at higher magnification. CW, host cell wall; IS, intercellular space; VBC, viable bacterial cell; SC, substomatal chamber, (arrows) dissolution of host cell wall.



**Figure 5** –Orange leaves Valence (*C. sinensis* var. Valence) at 120 h after inoculated with  $10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  of *Xcc* 306 strain and treated (preventive treatment) with antibiotic compounds F3d ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). A: Unviable bacterial cells are shown at the entrance of outer stomata chamber and substomatal chamber. Note that the outer chamber is filled by an electron-dense material. B: Unviable bacterial cells are present on the extracellular space of the host mesophyll cells involved by intact cell wall. EPS is absent. C: Higher magnification of B. Observe unviable bacterial cell present in the substomatic chamber. CW, host cell wall; IS, intercellular space; SC, substomatal chamber, (arrowheads) unviable bacterial cell (*Xcc* 306).



**Figure 6** –Orange leaves Valence (*C. sinensis* var. Valence) at 120 h after inoculated with  $10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  of *Xcc* 306 strain and treated (curative treatment) with antibiotic compounds F3d ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). A: Unviable bacterial cell (*Xcc* 306) in the substomatal chamber of orange leaves Valence treated with F3d. B: Unviable bacterial cells in the host mesophyll cell and absence of EPS. Note the intact host cell wall. C: Higher magnification of unviable bacterial cell in the intercellular space. CW, host cell wall; IS, intercellular space; SC, substomatal chamber, (arrowheads) unviable bacterial cell (*Xcc* 306).



## 4 DISCUSSION

Many studies demonstrated that the antibiotics produced by bacterial biocontrol agents have large spectrum activity. For eg. the spectrum activity of pyrrolnitrin, produced by *Pseudomonas* and *Burkholderia* species, this compound showed activity against many phytopathogenic fungi (Ligon et al. 2000) and Gram-positive bacteria in particular for *Streptomyces* sp (El-Banna and Winkelmann 1998). Other compound, DAPG, produced by many *P. fluorescens* strains has activity against a wide range of plant pathogenic fungi (Keel et al. 1992) and also for antibacterial (Thomashow and Weller 1996).

Recently, Oliveira et al. (2011) reported that secondary metabolites produced by *Pseudomonas* sp. LV strain had high effect on *Xcc* 306 growth and in lesion formation in orange plant. Others authors reported the control of many species of *Xanthomonas* genus, using cell suspension of *Pseudomonas* sp. to control *X. campestris* pv. *vesicatoria* and *X. vesicatoria* in tomato (Byrne et al., 2005), cell suspensions of epiphytic bacteria against many species of *Xanthomonas* genus (Stromberg et al., 2003, 2000) and phenazine extracted from *P. aeruginosa* used to control *R. solani* and *X. oryzae* pv. *oryzae* (Shanmugaiah et al., 2010).

Initially, the F3 fraction showed effect on *Xcc* 306 cells and in lesions formation (Oliveira et al., 2011). In the present paper, the F3d obtained from F3 was used to evaluate in the lesion formation control by *Xcc* 306 on orange leaves.

Different effects were observed in the greenhouse test using F3d. In the two treatment regimes (preventive and curative) high antibiotic effects was seen in the lesions number and cell present on leaf or inside in the mesophyll. By contrast the results found by Oliveira et al. (2011) using F3 showed that the F3d fraction was more effectiveness and lower phytotoxicity, suggested that the level of purification increase antibiotic activity and decrease toxicity.

The differences observed between preventive and curative treatment, suggests that when *Xcc* 306 is inoculated after the F3d application, the fraction acts immediately reducing the inoculum, probably the presence of this compound (F3d) involve others mechanisms than antibiotic activity such as hypersensitive response (de Wit, 2007) which is influenced by application time of inductor (Ryals et al., 1996) and/or its concentration.

In the SEM study, was observed a clear effect of the F3d fraction on the reduction and changes on the EPS arrangement, which stopped biofilm formation of treated bacteria on orange leaves. One of the most important characteristic of the *Xanthomonas* genus is the synthesis and excretion of an EPS, xanthan, mainly in the late logarithmic and stationary growth phases (Harding et al., 1995). In citrus canker, the EPS formed by bacterial cells, when the EPS is exudate through the lesion to leaf surface the EPS help bacterial dispersal and survival in the environment (Graham et al., 2004). The reduction and changes in the EPS arrangement might be involved in the reduction of the lesion formation observed in plants treated with the F3d fraction.

The function of EPS in the *Xanthomonas* genus is controversial, many authors related that EPS production is associated by virulence for many species of the *Xanthomonas* genus (Katzen et al., 1998; Dharmapuri and Sonti, 1999; Kemp et al., 2004), and others authors consider that EPS does not play an essential role in citrus canker at the initial stages of infection or in the incompatible interactions between *Xcc* and nonhost plants, but facilitates the maintenance of bacteria on the host plant, improving the efficiency of colonization of deep leaf tissue (Dunger et al., 2007).

The low production of EPS and changes in the bacterial cells observed by SEM on phylloplane of orange leaves was also observed by Oliveira et al., (2011) *in vitro* experiment using F3 fraction.

The presence of *Xcc* 306 in orange leaves caused changes in the mesophyll of host cells, fibrillar materials were seen in the host cell walls projecting into the intercellular space. Viable bacteria cells were frequently observed in the intercellular spaces and substomatal chamber filled with homogeneous EPS. However, plants treated, few bacterial cells were present in the mesophyll of leaf, also the morphology of mesophyll cells and cell wall kept unaltered, suggesting that antibiotic activity of F3d had high antibiotic activity against bacterial cells and low phytotoxicity effect.

The fact of found unviable bacterial cells inside the internal tissues of leaf suggests that, F3d fraction had ability to penetrate and had antibiotic activity in the mesophyll of orange leaves controlling *Xcc* 306.

The present study showed that the F3d had high antibiotic activity, low toxicity for orange plant, long time-action against free *Xcc* 306 in the phylloplane and reduction of inoculum potential inside the lesions of citrus canker and all of these

suggest that the F3d has a great potential to use in the future in the control of canker citrus disease, but further field studies needs to carry in the future.

### **Acknowledgments**

To the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) who enabled the execution of this study by conceding PIBIC, MSc., PhD and Productivity in research grants.

## REFERENCES

- Arya, S., Parashar, R. D., 2002. Biological control of cotton bacterial blight with phylloplane bacterial antagonists. *Tropical Agriculture*. 79, 51–55.
- Balogh B., Canteros B.I., Stall R. E., Jones J.B., 2008. Control of citrus canker and citrus bacterial spot with bacteriophages. *Plant Disease*. 92, 1048-1052.
- Byrne, J. M., Dianese, A. C., Jia, P., Campbell, H. L., Cuppels, D. A., Louws, F. J., Miller, S.A., Jones, J.B., Wilson, M., 2005. Biological control of bacterial spot of tomato under weld conditions at several locations in North America. *Biological Control*. 32, 408–418.
- Bock, C. H., Graham, J., Gottwald, T. R., Cook, A. Z., Parker, P. E., 2010a. Wind speed effects on the quantity of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* dispersed downwind from canopies of grapefruit trees infected with citrus canker. *Plant Disease*. 94, 725–736.
- Bock, C. H., Graham, J. E., Gottwald, T. R., Cook, A. Z., Parker, P. E., 2010b. Wind speed and wind associated injury affect severity of citrus canker on *Swingle citrumelo*. *Euro Journal Plant Pathology*. 128, 21–38.
- Bock, C. H., Parker, P. E., Gottwald, T. R., 2005. The effect of simulated wind-driven rain on duration and distance of dispersal of *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* from canker infected citrus trees. *Plant Disease*. 89, 71–80.
- Da Silva, A. C. R., Ferro, J. A., Reinach, F. C., Farah, C. S., Furlan, L. R., Quaggio, R. B., Monteiro-Vitorello, C. B., Van Sluys, M. A., Almeida, N. F., Alves, L. M. C., Amaral, A. M., Bertolini, M. C., Camargo, L. E. A., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J., Chambergo, F., Clapina, L.P., Cicarelli, R. M. B., Coutinho, L. L., Cursino-Santos, J. R., El-Dorry, H., Faria, J. B., Ferreira, A. J. S., Ferreria, R. C. C., Ferro, M. I. T., Formighieri, E. F., Franco, M. C., Greggio, C. C., Gruber, A., Katsuyama, A. M., Kishi, L. T., Leite R. P. Jr., Lemos, E. G. M., Lemos, M. V. F., Locali, E. C., Machado, M. A., Madeira, A. M. B. N., Martinez-Rossi, N. M., Martins, E. C., Meidanis, J., Menck, C. F. M., Miyaki, C. Y., Moon, D. H., Moreira, L. M., Novo, M. T. M., Okura, V. K., Oliveira, M. C., Oliveira, V. R., Pereira, H. A., Rossi, A., Sena, J. A. D., Silva, C., Souza, R. F., Spinola, L. A. F., Takita, M. A., Tamura, R. E., Teixeira, E. C., Tezza, R. I. D., Santos, M. T., Truffi, D., Tsai, S. M., White, F. F., Setúbal, J. C., Kitajima, J. P., 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with different host specificities. *Nature*. 417, 459–463.
- Dharmapuri, S., Sonti, R. V., 1999. A transposon insertion in the gumG homologue of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causes loss of extracellular polysaccharide production and virulence. *FEMS Microbiology Letters*. 179, 53–59.
- Dunger, G., Relling, V. M., Tondo, M. L., Barreras, M., Lelpi, L., Orellano, E. G., Ottado, J., 2007. Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. *Archives Microbiology*. 2, 127–135.

- El-Banna, N., Winkelmann, G., 1998. Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. *Journal of Applied Microbiology*. 85, 69–76.
- FAO., 1994. Soil Map of the World. Revised legend with corrections. FAO-UNESCO ISRIC, Wageningen, Rome. p. 140.
- Gottwald, T., Graham, J., Bock, C. H., Bonn, G., Civerolo, E., Irey, M., 2009. The epidemiological significance of post-packinghouse survival of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* for dissemination of Asiatic citrus canker via infected fruit. *Crop Protection*. 28, 508–524.
- Goto, M., Tadanchi, Y. Okabe, N., 1979. Interaction between *Xanthomonas citri* and *Erwinia herbicola* *in vitro* and *in vivo*. *Ann. Phytopathology Society Japan*. 45, 618–624.
- Graham, J. H., Gottwald, T. R., Cubero, J., Achor, D. S., 2004. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Molecular Plant Pathology*. 5, 1–15.
- Graham, J. H., Leite Junior, R.P., 2004. Lack of control of citrus canker by induced systemic resistance compounds. *Plant Disease*. 88, 745–750.
- Harding, N. E., Cleary, J. M., Ielpi, L. 1995. Genetics and biochemistry of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*. In: Hui YH, Khachatourians, G. (eds) *Food biotechnology microorganisms*. VCH Publishers, New York, 495–514.
- Hewitt, E. J., 1966. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. East Maling: Commonwealth Agricultural Bureau. 547.
- Hung J. S. 1986. Ultrastructure of bacterial penetration in plants. *Ann Review Phytopathology*. 24, 141–157.
- Ji, P., Campbell, H.L., Kloepper, J.W., Jones, J. B., Suslow, T. V. Wilson, M., 2006. Integrated biological control of bacterial speck and spot of tomato under field conditions using foliar biological control agents and plant growth-promoting rhizobacteria. *Biological Control*. 36, 358–367.
- Katzen, F., Ferreiro, D., Oddo, C., Lelmini, M. V., Becker, A., Puhler, A., Ielpi, L., 1998. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. *Journal of Bacteriology*. 180, 1607–1617.
- Keel, C., Schnider, U., Maurhofer, M., Voisard, C., Laville, J., Burger, U., Wirthner, P., Haas, D., Défago, G., 1992. Suppression of root disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. 5, 4–13
- Kemp, B. P, Horne, J., Bryant, A., Cooper, R. M., 2004. *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* gum D gene is essential for EPS production and pathogenicity and enhances epiphytic survival on cassava (*Manihot esculenta*). *Physiology Molecular Plant Pathology*. 64, 209–218.

- Ligon, J. M., Hill, D. S., Hammer, P. E., Torkewitz, N. R., Hofmann, D., Kempf, H. J., van Pee, K. H., 2000. Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest Manage.* 56, 688–695.
- Louws, F. J., Wilson, M., Campbell, H. L., Cuppels, D. A., Jones, J. B., Shoemaker, P. B., Sahin, F., Miller, S. A., 2001. Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. *Plant Disease.* 85, 481–488.
- Oliveira, A. G., Murate, L. S., Spago, F. R., Lopes, L. P., Beranger, J. P. O., San Martin, J. A. B., Nogueira, M. A., Mello, J. C. P., Andrade, C. G. T. J., Andrade, G., 2011. Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain, *Biological Control.* 56, 125–131.
- Ota, T., 1983. Interaction *in vitro* and *in vivo* between *Xanthomonas campestris* pv. *citri* and antagonistic *Pseudomonas* sp. *Ann. Phytopathology Society Japan.* 49, 308.
- Patent, 2008. Process of production, purification and obtation of substances with antibiotic activity to control diseases caused by bacteria in plants September 10<sup>th</sup>.
- Pradhanang, P. M., Ji, P., Momol, M. T., Olson, S. M., Mayfield, J. L., Jones, J. B., 2005. Application of acibenzolar-S-methyl enhances host resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum*. *Plant Disease.* 89, 989–993.
- Pruvost, O., Boher, B., Brocherieux, C., Nicole, M., Chiroleu, F., 2002. Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* in leaf lesions under tropical environmental conditions and simulated splash dispersal of inoculum. *Phytopathology.* 92, 336–346.
- Rampazo, L. G. L., 2004. Evaluation of the effect of biological agents and their products into the incidence of citrus canker lesions. Universidade Estadual de Londrina. Master thesis. Brasil. p. 57.
- Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. Y., Hunt, M. D., 1996. Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8, 1809-1819.
- Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G. H., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P. E., Stromberg, V.K. Vidaver, A.K., 2005. Reclassification of *Xanthomonas* species pathogenic on citrus. *Syst Applied Microbiology.* 28, 494–518.
- Shanmugaiah, V., Mathivanan, N. Varghese, B., 2010. Purification, crystal structure and antimicrobial activity of phenazine-1-carboxamide produced by a growth-promoting biocontrol bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MML2212. *Journal of Applied Microbiology.* 108, 703–711.
- Shiotani, H., Uematsu, H., Tsukamoto, T., 2009. Survival and dispersal of *Xanthomonas citri* pv. *citri* from infected Satsuma mandarin fruit. *Crop Protection.* 28, 19–23.

- Schubert, T. S., Sun, X., 2003. Bacterial citrus canker. Florida Department of Agriculture & Conservancy Services. Plant Pathology Circular. 377, 1–6.
- Stromberg, K. D., Kinkel, L. L., Leonard, K. J., 2000. Interactions between *Xanthomonas translucens* pv. *translucens*, the causal agent of bacterial leaf streak of wheat, and bacterial epiphytes in the wheat phyllosphere. *Biological Control*. 17, 61–72.
- Stromberg, K. D., Kinkel, L. L., Leonard, K. J., 2003. Quantifying the effect of bacterial antagonists on the relationship between phyllosphere population sizes of *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* and subsequent bacterial leaf streak severity on wheat seedlings. *Biological Control*. 29, 58–65.
- Thomashow, L. S., Weller, D. M., Bonsall, R. F. Pierson, L. S. III., 1996. Production of antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. *Applied and Environmental Microbiology*. 56, 908-912.
- de Wit, P. J. G. M., 2007. How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cellular and Molecular Life Science*. 64, 2726–2732.
- Wulff, E. G., Mguni, C. M., Mortensen, C. N., Keswani, C. L. Hockenhull, J., 2002. Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of brassicas with an antagonistic strain of *Bacillus subtilis* in Zimbabwe. *European Journal of Plant Pathology*. 108, 317–325.

**ARTIGO C****EM PROCESSO DE PATENTE****ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF AN ANTIBIOTIC SUBSTANCE  
PRODUCED BY A *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* LV STRAIN**

**Admilton Gonçalves de Oliveira, Cíntia Greice Matsuóca Góis, Flavia Regina Spago, Jamile Priscila de Oliveira Beranger, Cláudio Roberto Novello, Ivânia Teresinha Albrecht Schuquel, João Carlos Palazzo de Mello, Galdino Andrade**

**EM PROCESSO DE PATENTE****ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF AN ANTIBIOTIC SUBSTANCE  
PRODUCED BY A *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* LV STRAIN**

**Admilton Gonçalves de Oliveira<sup>1</sup>, Cíntia Greice Matsuóca Góis<sup>1</sup>, Flavia Regina Spago<sup>1</sup>, Jamile Priscila de Oliveira Beranger<sup>1</sup>, Cláudio Roberto Novello<sup>2</sup>, Ivânia Teresinha Albrecht Schuquel<sup>3</sup>, João Carlos Palazzo de Mello<sup>2</sup>, Galdino Andrade<sup>1a</sup>**

---

<sup>1</sup> Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, CEP 86051-990, Brasil. <sup>a</sup>Corresponding author: Galdino Andrade, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Caixa Postal 6001, CEP 86051-990, Brazil. Phone/Fax: +554333714791; E-mail: andradeg@uel.br

<sup>2</sup> Departamento de Farmácia e Farmacologia, Laboratório de Produtos Fitoterápicos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, CEP 87020-900, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, CEP 87020-900, Brasil

**ARTIGO D****ATIVIDADE ANTIBIÓTICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS BACTERIANOS SEMI-PURIFICADOS PRODUZIDOS POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CEPA LV NO CONTROLE DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* PRODUTORAS DE CARBAPENEMASE (KPC)**

**Admilton Gonçalves de Oliveira, Cíntia Greice Matsuóca Góis, Flavia Regina Spago, Gilselena Kerbauy, Jamile Priscila de Oliveira Beranger, Eliana Carolina Vespero, Marsileni Pelisson, Júlio César Spadotto, Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade, João Carlos Palazzo de Mello, Galdino Andrade**

**ATIVIDADE ANTIBIÓTICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS BACTERIANOS SEMI-PURIFICADOS PRODUZIDOS POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CEPA LV NO CONTROLE DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* PRODUTORAS DE CARBAPENEMASE (KPC)**

**Admilton Gonçalves de Oliveira<sup>1</sup>, Cíntia Greice Matsuóca Góis<sup>1</sup>, Flavia Regina Spago<sup>1</sup>, Gilselena Kerbauy<sup>1</sup>, Jamile Priscila de Oliveira Beranger<sup>1</sup>, Eliana Carolina Vespero<sup>2</sup>, Marsileni Pelisson<sup>2</sup>, Júlio César Spadotto<sup>3</sup>, Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade<sup>3</sup>, João Carlos Palazzo de Mello<sup>4</sup>, Galdino Andrade<sup>1a</sup>**

**Resumo**

*Klebsiella pneumoniae* é uma das bactérias mais importantes relacionada a infecções, tanto no meio ambiente comunitário quanto no hospitalar. A resistência aos antimicrobianos apresentada por *K. pneumoniae*, tornou-se um problema de saúde pública e preocupação em todos os campos da saúde, principalmete a *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC). Em vista do presente cenário, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibiótica de uma fração semi-purificada de metabólitos produzidos pela *Pseudomonas aeruginosa* (cepa LV) contra isolados clínicos de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase isoladas no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina (HU – UEL). Vinte e dois isolados clínicos foram testados quanto ao perfil de sensibilidade aos compostos antibióticos semi purificados F3 e F3d por métodos de disco difusão, concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), além da avaliação ultraestrutural dos isolados clínicos tratados. No ensaio de disco difusão, 68% dos isolados clínicos testados foram sensíveis ou moderadamente sensíveis ao composto antibiótico F3 e F3d. Quanto a CIM e CBM de F3d, foram entre 125 e 500 µg/mL. Na microscopia eletrônica de varredura e transmissão, foi possível observar alterações morfológicas e estruturais no isolado de KPC após tratamento com F3d. Os resultados indicam que a F3d tem um grande potencial para ser utilizada no futuro como um agente antimicrobiano.

---

<sup>1</sup> Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, CEP 86051-990, Brasil. <sup>a</sup>Corresponding author: Galdino Andrade, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Caixa Postal 6001, CEP 86051-990, Brazil. Phone/Fax: +554333714791; E-mail: andradeg@uel.br

<sup>2</sup> Departamento de Microbiologia, Hospital Universitário, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, CEP , Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Biologia Geral, Laboratório de Microscopia e Microanálise, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, CEP 86051-990, Brasil

<sup>4</sup> Departamento de Farmácia e Farmacologia, Laboratório de Produtos Fitoterápicos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, CEP 87020-900, Brasil

## 1 INTRODUÇÃO

A *Klebsiella pneumoniae* é uma das bactérias mais importantes relacionada a infecções, tanto no meio ambiente comunitário quanto no hospitalar. O número de surtos hospitalares causados por este patógeno é cada vez maior principalmente devido a mudanças no padrão de sensibilidade aos antibióticos. Sua transmissão ocorre por contato direto ou por fonte comum, em qualquer área física hospitalar (Marra, 2002), e podendo levar a quadros de infecções graves (Desimoni et al., 2004; Martinez et al., 2004).

A resistência apresentada por essa bactéria a antimicrobianos nos últimos anos se tornou um problema de saúde pública e preocupação em todos os campos da saúde. Notícias sobre mortes provocadas por *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) provocaram alarde em várias partes do Brasil. Segundo dados do Ministério da Saúde, no Distrito Federal foram feitas 187 notificações de infecção no ano de 2010, sendo registrados 18 óbitos (Ministério da Saúde, 2010).

A enzima KPC foi isolada pela primeira vez em 1996 nos Estados Unidos, descrita a princípio em *K. pneumoniae*, posteriormente verificou-se a disseminação entre outras espécies pertencentes à família das Enterobacteriaceae. Atualmente se encontram distribuídas em diversas partes do mundo (Smith, et al., 2003; Queenan, Bush, 2007).

A KPC inativa os carbapenêmicos e todos os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos. Além disso, as bactérias que produzem a enzima do tipo KPC também são normalmente resistentes ao trimetoprim/sulfametoxazol, quinolonas e aminoglicosídeos, tornando esses patógenos verdadeiramente multirresistente (Yigit, et al., 2001; Woodford, et. al, 2008).

Em vista do presente cenário, a busca por novas substâncias antimicrobianas a partir de fontes naturais, incluindo bactérias antagonistas produtoras de antibióticos, tem ganhado importância na comunidade científica. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibiótica de uma fração semi-purificada de metabólitos produzidos pela *Pseudomonas aeruginosa* (cepa LV) contra isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase isoladas no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina (HU – UEL).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 CEPAS BACTERIANAS

Vinte e dois isolados clínicos multirresistentes *K. pneumoniae* produtores de carbapenemase (Tabela 1) foram gentilmente cedidos pelas Profa. Dra. Marsileni Pelisson e Profa. Dra. Eliana Vespero do Departamento de Patologia Aplicada, Análise Clínicas e Toxicológicas do Hospital Universitário de Londrina – UEL. Os isolados foram criopreservados em solução de glicerol 30% em nitrogênio líquido no Laboratório de Ecologia Microbiana – UEL. A cepa padrão utilizada foi a *K. pneumoniae* ATCC 10031.

**Tabela 1** – Perfil de resistência a diferentes antibióticos de 22 isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase pela técnica de disco difusão

Isolados clínicos	Antibióticos (mm)											
	ami	gen	sut	col	pol	ipm	ert	mer	cep	cip	tig	caz
2814-4	0	0	0	16	16	11	0	0	0	0	20	14
301304	0	0	0	17	15	13	0	0	0	0	20	13
267904	0	0	0	14	15	14	0	0	0	0	20	13
301504	0	0	0	14	15	8	0	0	0	0	20	13
281204	13	0	0	0	13	17	11	16	11	0	19	13
U 313	0	0	0	14	16	10	0	10	0	0	n	0
317704	0	0	0	13	16	11	0	9	0	0	n	0
3154	0	0	0	14	16	14	0	10	0	0	20	13
S 1806	0	0	0	14	15	15	0	10	0	0	20	0
368304	0	0	0	14	15	11	0	10	0	0	20	12
361804	0	0	0	14	15	13	0	10	0	0	20	0
361704	0	0	0	15	16	15	0	10	0	0	21	16
362504	0	0	0	15	16	13	10	11	12	0	22	9
363902	0	0	0	15	16	15	0	9	10	0	20	0
363002	0	0	0	15	17	12	0	0	0	0	21	0
3608	0	0	0	15	17	15	0	0	10	0	20	0
358604	0	0	0	15	16	17	0	0	0	0	21	10
213202	0	0	0	14	16	16	10	15	0	0	23	16
U 9324	21	0	0	13	14	14	0	10	0	0	21	10
249404	0	0	0	15	15	16	0	16	0	0	22	15
U 815	0	0	0	15	16	13	0	0	0	0	22	0
U 9866	15	0	0	0	14	14	12	15	15	0	16	15

(ami) amicacina ; (gen) gentamicina ; (sut) sulfametoxazolotrimetoprin ; (col) colistina ; (pol) polimixina ; (ipm) imipinem ; (ert) ertapenem ; (mer) meropenem ; (cep) cefepime ; (cip) ; (tig) tigeciclina ; (caz) ceftazidima. Dados do Hospital Universitário de Londrina

## 2.2 AGENTE PRODUTOR DE SUBSTÂNCIAS ANTIBIÓTICAS

Para a produção de metabolitos secundários com atividade antibiótica foi utilizado o isolado antagonista *P. aeruginosa* (cepa LV), isolado a partir de amostras ambientais no Município de Astorga, Paraná (Rampazo, 2004). A cepa LV esta estocada em glicerol 30% e criopreservada em nitrogênio líquido no Laboratório de Ecologia Microbiana da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná.

## 2.3 PRODUÇÃO DE METABÓLITOS COM ATIVIDADE ANTIBIÓTICA

O processo de produção, extração e semi-purificação dos compostos antibiótico produzidos pela cepa antagonista *P. aeruginosa* cepa LV, foram feitos de acordo com a Patente (Patente: 2008, Processo de produção, purificação e obtenção de substâncias com atividades antibióticas para o controle de doenças causadas por bactérias em plantas #PI0803350-1; <http://www.inpi.gov.br>), e descrito por Oliveira et al. (2011).

### 2.3.1 Semi-purificação dos Compostos Antibióticos

A fração F3, obtida a partir do método de Oliveira et al. (2011) e com alta atividade antibiótica contra a bactéria Gram negativa *Xanthomonas citri* pv. *citri* cepa 306 (*Xcc* 306), foi submetida a um novo método de purificação em coluna. Onde uma alíquota de F3 foi fracionada através de cromatografia líquida a vácuo, em coluna de vidro (20 mm  $\Phi$  x 350 mm altura), acoplada a uma bomba de vácuo 51 kPa. Como fase estacionária foi utilizada sílica gel 60 (0.063 – 0.200 mm, Merck®), e como fases móveis foram utilizadas solventes orgânicos com polaridade crescente: hexano (100; F3a), hexano/diclorometano (1:1; F3b) diclorometano (100; F3c), diclorometano/acetato de etila (1:1; F3d), acetato de etila (100; F3e), acetato de etila/metanol (1:1; F3f), metanol (100; F3g), metanol/água (1:1; F3h) e água (100; F3i). As frações obtidas foram concentradas e liofilizadas e estocadas a -4 °C até a realização dos ensaios microbiológico.

## 2.4 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIBIÓTICA

### 2.4.1 Disco Difusão

Para avaliar a atividade antibiótica das frações obtidas, foi utilizado à técnica de disco difusão seguindo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2011). As suspensões dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase foram obtidos a partir de culturas em fase exponencial de crescimento e ajustadas para uma concentração celular de  $10^8$  UFC/mL utilizando a escala 0,5 de Mc Farland, e inoculadas em ágar Mueller Hinton com auxílio de *swab* estéreis.

Os discos foram preparados nas concentrações de 250 e 500 µg/disco da fração F3 para os 22 isolados clínicos de *K. pneumoniae* produtoras de KPC e uma cepa padrão de *K. pneumoniae* ATCC 10031 como controle negativo foi utilizado diclorometano (solvente usado para diluir a F3). As placas foram incubadas por 18 h a 37 °C. Após a incubação, os diâmetros da zona de inibição ao redor dos discos foram medidos em milímetros (mm).

### 2.4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A determinação dos valores de CIM foi realizada por ensaios de microdiluição em placas de 96 poços, seguindo as normas do “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI, 2007). A partir do teste de disco difusão foram selecionadas três isolados clínicos de KPC (2494-4, 2812-4, U313) e a cepa padrão (*K. pneumoniae* ATCC 10031).

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços com um volume total por poço de 200 µL (caldo nutriente + F3d + inóculo bacteriano). As concentrações dos inóculos foram ajustadas utilizando o tubo 0,5 da escala de MacFarland que corresponde a  $10^8$  UFC/mL e a concentração final em cada poço foi de  $10^5$  UFC/mL. As concentrações usadas da fração F3d foram de 500g a 0,9 µg/mL em diluições 1:1 (v:v). Três poços foram inoculados para cada concentração. As placas foram incubadas por 18 h a 37 °C. Os resultados foram obtidos em um leitor

de microplaca (BIO-RAD modelo 3550) com a D.O.<sub>590 nm</sub>. A leitura visual dos resultados foi realizada a partir da adição de uma solução aquosa de 0,02 mg/mL de Cloreto-trifenil-tetrazólio em todos os poços. Os poços que não apresentaram crescimento permaneceram sem alteração de cor, enquanto aqueles com crescimento ficaram com a coloração rosa-avermelhada, este método ajudou a dar uma clara demarcação das CIMs da F3d para cada isolado clínico de KPC.

A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada a partir das placas de CIM usando o método descrito pelo CLSI (2005), onde é definido como a menor concentração de um antibiótico que em determinadas condições *in vitro* reduz em 99,9% o número de organismos em um meio contendo um inóculo definido de bactérias. Para tal, foram inoculados 40 µL de cada poço que estavam na faixa de CIM em meio de cultura (ágar Mueller-Hinton) livre da fração antibiótica F3d. O CBM foi determinada como a concentração de antibióticos na qual nenhum crescimento foi observado após incubação por 18 h a 37 °C.

## 2.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA

### 2.5.1 Ensaio Microbiológico

Para a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET), foi selecionado o isolado clínico de KPC 2812-4 (isolado com sensibilidade moderada a fração antibiótica F3 e CIM da fração F3d intermediária quando comparadas entre elas). Para o preparo do ensaio microbiológico da KPC 2812-4 utilizada na microscopia eletrônica, foi realizado um cultivo em caldo nutriente a 37 °C, 100 rpm por 15 h, após este período, foi retirado uma alíquota de 10 mL e ajustada a concentração de células para 10<sup>8</sup> UFC/mL usando a escala de MacFarland (tubo 0,5) adicionado da fração F3d na concentração de 300 µg/mL, e na sequência foi incubada a 37 °C, 100 rpm, durante três tempos diferentes (30, 90 e 180 min). Em cada tempo, alíquotas em duplicata de 20 µL e 1000 µL foram coletadas para preparar o material para MEV e MET respectivamente. Para controle foi utilizada uma suspensão da KPC 2812-4 seguindo o mesmo procedimento citado acima sem o tratamento com a fração F3d.

### 2.5.1.1 MEV

Para a MEV, os 20 µL da suspensão coletada foram dispostos em lâminas de vidro em duplicata previamente revestida com uma fina camada de poli-L-lisina. Posteriormente, cada lâmina foi fixada por imersão em 1 mL de uma solução fixadora (glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0) por 12 h. Após este período, as amostras foram pós-fixadas em OsO<sub>4</sub> 1% por 1 h. O material fixado foi desidratado em um gradiente de etanol (70, 80, 90 e 100 °GL). Em seguida, as amostras foram secas pelo método do ponto crítico com CO<sub>2</sub> (BALTEC CPD 030 Critical Point Dryer), após, as amostras foram montadas em suporte, recobertas com ouro (BALTEC SDC 050 Sputter Coater) e observadas em MEV (mod. FEI Quanta 200).

### 2.5.1.2 MET

Para a MET, o *pellet* obtido a partir da centrifugação (10 min a 4 ° C<sup>-1</sup>, 5.000 rpm) da alíquota de 1000 µL em duplicata retirado no ensaio microbiológico foi fixado como o descrito para o MEV. Após a desidratação alcoólica, o material foi incluído em blocos de Araldite<sup>®</sup>. O bloco foi cortado em cortes ultrafinos de 60 a 70 nm (Leica ULTRACUT UCT) e corados com 2% acetato de uranila por 15 minutos e citrato de chumbo (solução de Reynold) por 20 min e observados em MET (FEI Tecnai 12).

## 3 RESULTADOS

### 3.1 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIBIÓTICA POR DISCO DIFUSÃO

Considerando que as frações antibióticas F3 e a F3d ainda são compostos semi-purificados e não identificados, não foi possível fazer uma comparação de sensibilidade com os antibióticos existentes no mercado. Desta forma os termos usado neste trabalho como (sensível, moderadamente sensível e resistente) refere-se à comparação observada da presença de halos de inibição das frações testadas e comparadas entre si. Neste contexto, a variação de diâmetro de

halos de inibição entre 0 e 11 foi considerado resistente, entre 12 e 15 moderadamente resistente e acima de 16, sensível a fração testada.

No ensaio de disco difusão, onde foi avaliada a atividade antibiótica da fração F3 frente a diferentes isolados clínicos de KPC, foi observado que na concentração de 500 µg/mL, houve a presença de uma zona de inibição para os 100% dos isolados de KPC testado e de 63% para 250 µg/mL (Tabela 2). No entanto, sete isolados de KPC testados foram resistentes a F3 com halos de inibição variando de 8 a 11 mm (U9866, 3625-4, 3618-4, 3683-4, 3177-4, 3015-4 e U313) (Tabela 2).

**Tabela 2** – Avaliação da atividade antibiótica por disco difusão da fração F3 contra isolados clínicos *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase, por meio da medição do tamanho do halo de inibição formado em milímetro.

Cepas	Identificação	Antibiótico F3 (mm)	
		250 µg/disco	500 µg/disco
CP	ATCC 10031	0	7
IC	281404	0	18
IC	301304	14	19
IC	267904	0	13
IC	301504	0	11
IC	281204	0	15
IC	U 313	0	10
IC	317704	7	10
IC	3154	11	12
IC	S 1806	12	15
IC	368304	11	10
IC	361804	0	11
IC	361704	0	13
IC	362504	8	10
IC	363902	11	13
IC	363002	10	12
IC	3608	12	15
IC	358604	14	17
IC	213202	11	13
IC	U 9324	10	16
IC	249404	12	18
IC	U 815	7	15
IC	U 9866	0	8

CP: Cepa padrão; IC: Isolados clínicos; F3: Fração acetato de etila (Oliveira et al., 2011)

### 3.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA

Para a realização do teste de CIM e CBM, foram selecionados três isolados com diferentes perfis de sensibilidade a fração antibiótica F3, sendo que o isolado KPC 313 foi resistente, o isolado KPC 2812-4 moderadamente resistente e o isolado KPC 2494-4 sensível a F3 (Tabela 2). Para os ensaios de CIM e CBM foi utilizada uma fração purificada a partir da F3 por métodos cromatográficos (F3d). O valor da CIM e CBM variou entre os diferentes isolados clínicos de KPC testados. Para o isolado KPC 313 a CIM e CBM foi de 500 µg/mL, para o isolado KPC 2812-4 a CIM e a CBM foi de 250 µg/mL e para o isolado KPC 2494-4 a CIM e a CBM foi de 125 µg/mL (Tabela 3).

**Tabela 3** – Concentração inibitória mínima e bactericida mínima da fração antibiótica F3d frente a três isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase

Cepas	Identificação	CIM/CBM (µg/ml)
CP	ATCC 10031	250
IC	249404	125
IC	281204	250
IC	U313	500

### 3.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Para o ensaio de microscopia eletrônica foi selecionado um isolado clínico de KPC (KPC 2812-4) que demonstrou sensibilidade moderada a fração F3 no teste de disco difusão e CIM da fração F3d intermediária entre os isolados testados. Nos ensaios de MEV e MET foi observada uma diminuição do inóculo do isolado testado a partir de 30 min do tratamento com a fração antibiótica F3d.

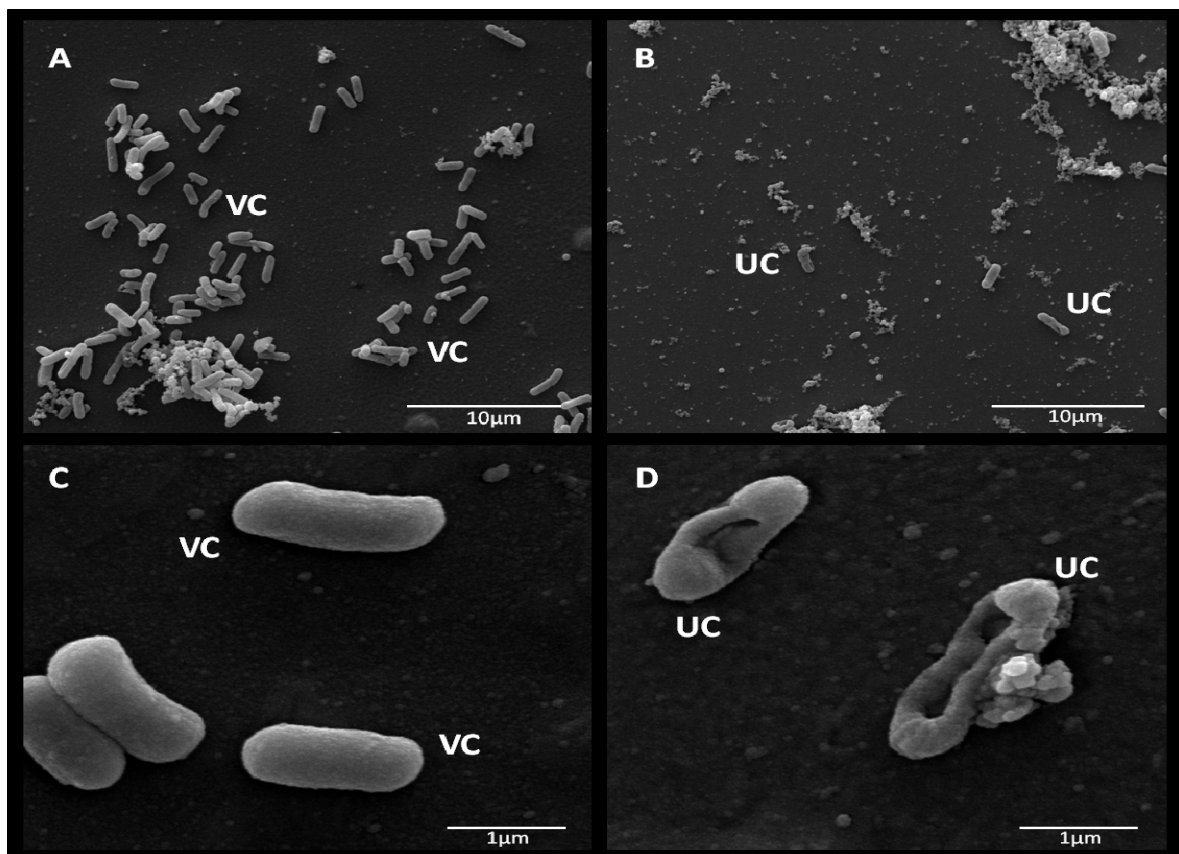
Após 90 min de tratamento com a fração F3d em MEV, foi claro a diminuição do inóculo da KPC 2812-4 quando comparado com o controle (Figura 1 A

e B), além disso, poucas células foram observadas neste tempo de tratamento (Figura 1B).

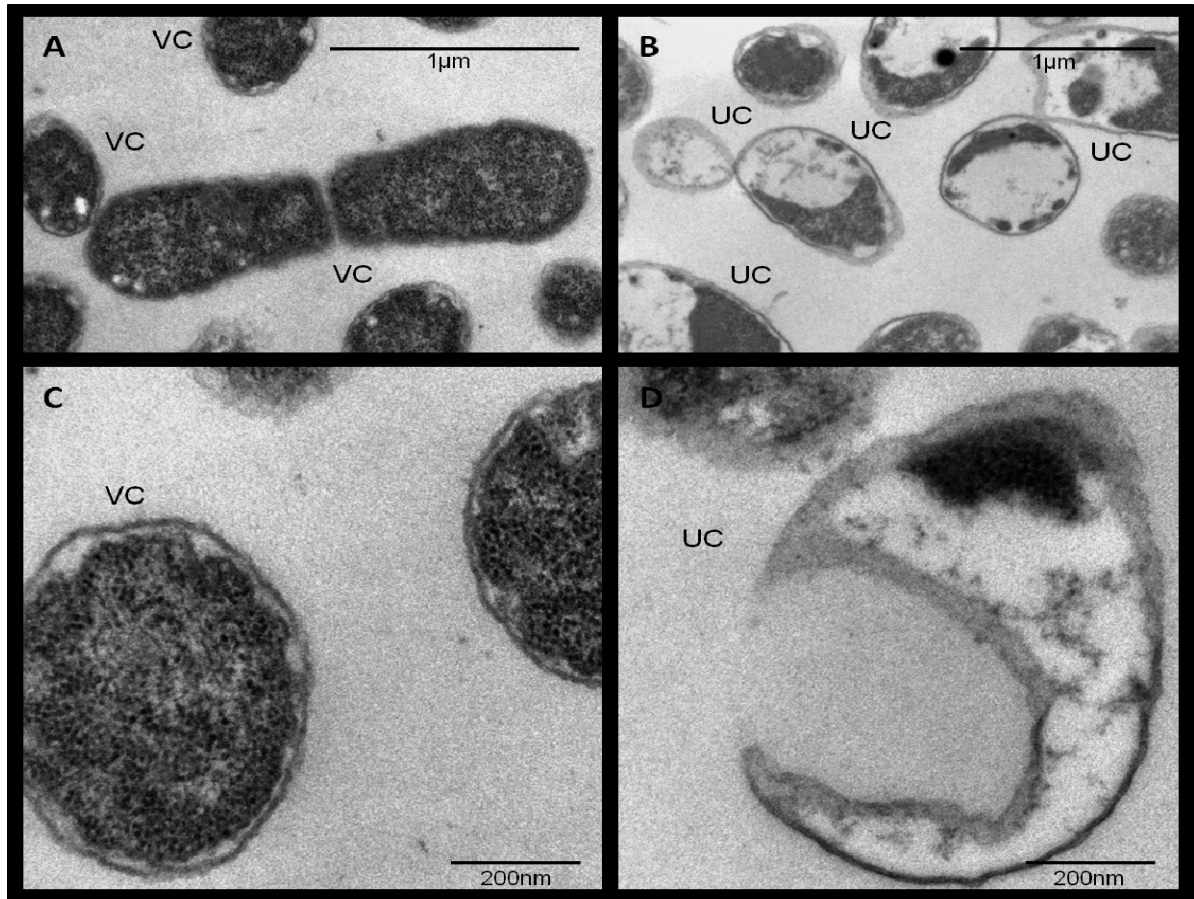
Em maiores aumento foi possível observar em MEV um total desarranjo da morfologia celular do isolado clínico de KPC 2812-4, com afundamentos e perfurações nas células quando comparadas com o controle (Figura 1 C e D).

Em MET foi observado após 90 min do tratamento com a fração antibiótica F3d, uma alteração na eletrondensidade celular das células tratadas quando comparadas com as células controle, além de, um total desarranjo nos constituintes celulares (Figura 2 A e B). Em maiores aumento, foi possível observar em MET nas células tratadas com a F3d uma inviabilidade celular com presença de afundamentos nas células da KPC, e nenhuma alteração foi observada nas células controles (Figura 2 C e D).

**Figura 1** – Eletromicrografia de varredura de isolado clínico de *Klebsiella pneumoniae* cepa 281204. **A. e C:** isolado 281204 não tratado com a fração F3d, 90 min após a incubação (controle positivo); **B e D:** Isolado 281204 tratada com a fração F3d ( $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) após 90 min do tratamento. VC: Células viáveis. UC: Células inviáveis.



**Figura 2** –Eletromicrografia de transmissão de isolado clínico de *Klebsiella pneumoniae* cepa 281204. **A. e C:** isolado 281204 não tratado com a fração F3d, 90 min após a incubação (controle positivo); **B e D:** Isolado 281204 tratada com a fração F3d ( $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) após 90 min do tratamento. VC: Células viáveis. UC: Células inviáveis.



#### 4 DISCUSSÃO

O uso indiscriminado e prolongado de muitos antimicrobianos principalmente os químicos, tem levado à seleção de micro-organismos patogênicos multirresistentes, desta forma, nas últimas décadas, tem havido um grande esforço na busca e no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos.

Entre os micro-organismos produtores de antibiótico, o gênero *Pseudomonas* se destaca como um dos mais estudados por serem encontrados em qualquer ambiente, isolados, cultivados e manipulados geneticamente facilmente (Whipps, 1997). Entre os composto com atividade microbiana destacam-se a pirrolnitrina que foi purificada de culturas de *Pseudomonas* sp. e *Burkholderia* sp. e tem amplo espectro de ação, sendo desenvolvido um antimicrobiano para fins

terapêuticos contra bactérias e fungos patogênicos em humanos (Nishida et al., 1965). Este mesmo composto demonstrou ter alta atividade contra fungos fitopatogênicos de interesse agrônômico (LIGON et al., 2000).

Dois outros compostos antibióticos (DAPG e fenazina-1-carboxamida) também foram isolados de espécies do gênero *Pseudomonas* sp., e tem amplo espectro de ação contra bactérias e fungos (KEEL et al., 1992; THOMASHOW; WELLER, 1996; SHANMUGAIAH et al., 2010).

Nos ensaios de atividade antibiótica pela técnica disco difusão, foram observados que em 100% dos isolados clínicos testados houve aparecimento de zonas de inibição, destes, 68% foram sensíveis ou moderadamente sensíveis a F3d, sugerindo que esta fração semi-purificada, possui um alto potencial de controle da *K. pneumoniae* produtoras de KPC, principalmente após o tratamento com a molécula pura, já que Oliveira et al. (2011) demonstrou que a atividade antibiótica da fração aumenta de acordo com o grau de pureza.

A cultura tratada com a fração F3d não apresentaram matriz de exopolissacarídeo quando comparada com a cultura não tratada, estes mesmos resultados foram observados por Oliveira et al. (2011) em culturas de *Xanthomonas citri* pv. *citri*, a qual também produz uma grande quantidade de exopolissacarídeos. A ausência deste exopolímero pode diminuir ou impedir a produção de biofilmes, que é um dos principais mecanismos de evasão utilizados pelas bactérias, por limitar a ação dos antimicrobianos (Jensen et al., 1990; Costerton et al., 1999).

A ação bactericida da F3d foi comprovada na microscopia eletrônica onde foi possível observar alterações morfológicas e estruturais do isolado clínico de KPC após 90 min do tratamento. A fração F3d não possui perfil dos principais compostos descritos como antimicrobianos produzidos pelo gênero *Pseudomonas* sp (NISHIDA et al., 1965; SHANMUGAIAH et al., 2010, WELLER, 1996)

Estes resultados, abrem oportunidades de novos estudos para determinar as vias metabólicas responsáveis pela biosíntese destes compostos e caracterizar novos compostos com ação antibiótica.

## REFERENCIAS

- Anwar, H., J. L. Strap, and J. W. Costerton. 1992. Kinetic interaction of biofilm cells of *Staphylococcus aureus* with cephalixin and tobramycin in a chemostat system. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:890–893.
- Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318–1322.
- Darouiche, R. O., A. Dhir, A. J. Miller, G. C. Landon, I. I. Raad, and D. M. Musher. 1994. Vancomycin penetration into biofilm covering infected prostheses and effect on bacteria. *J. Infect. Dis.* 170:720–723.
- Dunne, W. M., Jr., E. O. Mason, and S. L. Kaplan. 1993. Diffusion of rifampin and vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:2522–2526.
- Giwerzman, B., E. T. Jensen, N. Hoiby, A. Kharazmi, and J. W. Costerton. 1991. Induction of  $\beta$ -lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:1008–1010.
- Hoyle, B. D., J. Alcantara, and J. W. Costerton. 1992. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm as a diffusion barrier to piperacillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:2054–2056.
- Huang, C.-T., K. D. Xu, G. A. McFeters, and P. S. Stewart. 1998. Spatial Jensen, E. T., A. Kharazmi, K. Lam, J. W. Costerton, and N. Hoiby. 1990. Human polymorphonuclear leukocyte response to *Pseudomonas aeruginosa* grown in biofilms. *Infect. Immun.* 58:2383–2385.
- Kumon, H., K. Tomochika, T. Matunaga, M. Ogawa, and H. Ohmori. 1994. A sandwich cup method for the penetration assay of antimicrobial agents through *Pseudomonas* exopolysaccharides. *Microbiol. Immunol.* 38:615–619.
- Liu, X., F. Roe, A. Jesaitis, and Z. Lewandowski. 1998. Resistance of biofilms to the catalase inhibitor 3-amino-1,2,4-triazole. *Biotechnol. Bioeng.* 59:156–162.
- Nichols, W. W., M. J. Evans, M. P. Slack, and H. L. Walmsley. 1989. The penetration of antibiotics into aggregates of mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* 135:1291–1303.
- Stewart, P. S. 1994. Biofilm accumulation model that predicts antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:1052–1058.
- Stewart, P. S. 1996. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:2517–2522.
- Stewart, P. S., and J. B. Raquepas. 1995. Implications of reaction-diffusion theory for the disinfection of microbial biofilms by reactive antimicrobial agents. *Chem. Eng. Sci.* 50:3099–3104.

Vrany, J. D., P. S. Stewart, and P. A. Suci. 1997. Comparison of recalcitrance to ciprofloxacin and levofloxacin exhibited by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms displaying rapid-transport characteristics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:1352–1358.

**PATENTE**



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0803350-1 A2**



(22) Data de Depósito: 10/09/2008  
(43) Data da Publicação: 15/06/2010  
(RPI 2058)

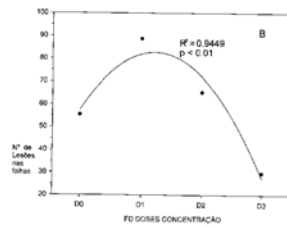
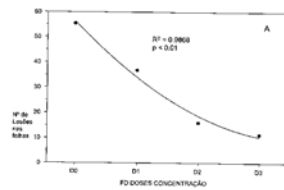
(51) *Int.Cl.*:  
C12P 1/04  
A01N 63/02  
C12R 1/01

(54) **Título: PROCESSO DE PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E OBTENÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADES ANTIBIÓTICAS PARA O CONTROLE DE DOENÇAS CAUSADAS POR BACTÉRIAS EM PLANTAS**

(73) Titular(es): Universidade Estadual de Londrina

(72) Inventor(es): Galdino Andrade Filho

(57) **Resumo:** A presente invenção trata-se de um processo de produção, purificação e obtenção de substâncias com atividades antibióticas para controle de doenças causadas por bactérias em plantas, uma vez que as formas atuais de controle não atuam efetivamente nas doenças e podem contaminar o ambiente pelo uso de metais pesados. Diante disso, vários experimentos foram conduzidos no sentido de avaliar os resultados da ação antibiótica de compostos produzidos por um isolado de bactéria gram negativa no crescimento da *Xac* in vitro, e na formação de lesões em folhas de Plantas diversas, uma vez que oferecem controles mais efetivos no aparecimento de doenças biológicas, maior segurança com o meio ambiente e menor custo de produção.



## Inclusão de processo de patente (20/11/2011)

**Título:** Processo de produção, purificação e obtenção de substâncias com atividades antibióticas para o controle do cancro cítrico.

**Titular:** Universidade Estadual de Londrina

**Inventores:** Galdino Andrade

João Carlos Palazzo de Mello

Admilton Gonçalves de Oliveira Junior

### Campo da Invenção

A presente invenção trata-se de compostos com atividade antimicrobiana produzidos por bactérias Gram negativas compreendendo substâncias bioativas para controle microbiológico, em especial para controle de bactérias do gênero *Xanthomonas* spp. e para o agente causal do cancro cítrico *Xanthomonas citri* pv. *citri* (sinônimo *X. axonopodis* pv. *citri*) (Schaad et al., 2005), uma vez que as formas atuais de controle não atuam efetivamente na doença e ou podem contaminar o ambiente pelo uso de metal pesado.

A presente invenção descreve ainda um processo de produção, purificação e obtenção de substâncias com atividades antimicrobianas, além de prover métodos de controle destes micro-organismos.

### Antecedentes da Invenção

O Brasil é o maior produtor mundial de citros, com uma produção de aproximadamente 19 milhões de toneladas de frutas ano (FAO, 2006), sendo a citricultura uma atividade muito importante do agronegócio. Contudo, o cancro cítrico é considerado uma doença potencialmente grave para diversas regiões produtoras de citros no mundo (Gottwald et al., 2002; Kimati e Bergamin Filho, 1995; Leite Júnior et al., 1988; Stall e Civerolo, 1991; Stall e Seymour, 1983) pois se trata de uma doença séria, que ataca a maioria dos cultivares comercial e o seu controle é limitado.

O mais antigo relato data de 1827 e 1831 (Fawcett e Jenkins, 1933) sendo observado em folhas de *Citrus medica* provenientes da Índia. Foi descrita primeiramente por Hasse em 1915 nos EUA, e no Brasil na década de 50 (Bitancourt, 1957).

Cinco tipos diferentes de cancro cítrico foram agrupados em função da sintomatologia apresentada e os diferentes hospedeiros afetados: A, B, C, D e E, (Feichtenberger, 1997; Gabriel et al., 1989). O tipo A, ou cancro cítrico asiático, é o principal e mais severo tipo presente nos pomares, sendo causado pela *X. citri* pv. *citri*, bastonete aeróbio, Gram negativo. A *Xcc* pode infectar toda parte aérea da planta, causando sintomas característicos podendo variar em função do tipo e idade do órgão afetado.

Diversas medidas de controle vêm sendo utilizados a fim de reduzir os prejuízos causados pelo cancro cítrico. Dentre elas destacamos a erradicação das plantas doentes (Leite Junior e Moham, 1990) e o tratamento químico com pulverização das plantas infectadas, com produtos a base de cobre (Koizumi, 1985; Leite Junior e Mohan, 1990).

Outra estratégia que pode ser utilizada no controle do cancro cítrico é o controle utilizando metabólitos bacterianos com atividade antibiótica, produzidos a partir de bactérias antagonistas, produtos já utilizados com sucesso em outras culturas (Kloepper et al., 1999). Estes micro-organismos competem entre si inter e intraespecificamente dentro dos nichos nos quais vivem, sendo uma das formas de adquirirem maior competitividade (Andrade, 2004).

A presente invenção tem como proposta a produção e purificação de substâncias tendo como resultado a atividade antimicrobiana de compostos produzidos por isolados de bactérias Gram negativas no controle do crescimento da *Xcc in vitro*, e na formação de lesões de cancro cítrico em folhas de *Citrus* spp.

Diante disso a presente invenção difere dos outros produtos já existentes do mercado, visto ser um produto microbiano altamente ativo contra bactérias do gênero *Xanthomonas* em especial a *Xcc* e, além disso, o processo de obtenção dos compostos com atividade antimicrobiana é de simples e fácil execução. Sendo assim, os consumidores terão um produto mais eficiente, de baixo custo, altamente ativo e inócuo a saúde e ao ambiente.

A literatura patentária descreve alguns documentos relacionados à presente invenção.

O documento WO 99/63830 descreve um agente biológico e um método para inibir patógenos de plantas. Nesse documento é citado o uso de *Pseudomonas resinovorans* para o controle biológico de patógenos. Também é descrita a possibilidade de uma combinação biológica entre esse agente biológico e outro agente. Esses agentes biológicos realizam o controle dos patógenos competindo com os mesmos em seu habitat natural e podem ser utilizados em larga escala.

A presente invenção difere desse documento no tocante a não se tratar de um agente biológico, mas sim, de um produto semi0purificado do metabolismo microbiano usado para inibir patógenos de plantas.

### Sumário da Invenção

Em primeiro aspecto, a presente invenção descreve o processo de produção, extração e semi0purificação de compostos antimicrobianos de bactérias Gram negativas além de descrever formas de controle microbiológico.

É, portanto um objeto da presente invenção um processo de produção, extração e semi0purificação de compostos antimicrobianos com atividade antimicrobiana compreendendo as etapas de:

- a) Preparo de um inóculo de bactérias gram0negativas e indução da produção de compostos antimicrobianos *in vitro* em meio líquido e em aerobiose;
- b) Extrair os compostos com atividade antimicrobiana com solvente orgânico;
- c) Fracionamento da fase orgânica diclorometano (FD) em uma coluna de gel de sílica;
- d) Refracionamento das frações obtidas em c) em uma coluna de gel de sílica.
- e) Formas de controle microbiológico com o uso das frações obtidas nesta invenção.

## Descrição detalhada da invenção

### Produção e extração das substâncias antibióticas

O inóculo utilizado para a produção de metabólitos secundários com atividade antibiótica foi obtido a partir de cultura de bactérias Gram negativas na fase de crescimento acelerado ou exponencial (fase log), com  $10^8$  UFC mL<sup>01</sup> (D.O.= 0.9,  $\lambda$ = 590 nm), sendo retirada uma alíquota de 50 a 150  $\mu$ L desta suspensão e inoculada em caldo nutriente adicionado de cloreto de cobre a uma concentração cerca de 10 a cerca de 1000 mg/L, e incubada a uma temperatura cerca de 20°C a cerca de 37 °C durante cerca de 5 a cerca de 15 dias sob agitação mecânica em agitador horizontal com velocidade de cerca de 50 a cerca de 500 rpm. Após o cultivo, as células foram peletizadas por centrifugação (5.000 a 15.000 rpm por 5 a 60 min, a temperatura entre 2 e 10 °C). O sobrenadante livre de células foi lavados com diclorometano com cerca de 1 : 1 a cerca de 1 : 10 (v : v) por partição líquido-líquido em funil de separação. Para cada separação, este procedimento foi repetido cerca de 1 a cerca de 30 vezes, deixando em repouso por cerca de 1 a cerca de 30 min cada. A fase diclorometano (FD) obtida na partição foi concentrada em rotavapor a uma temperatura de cerca de 30 °C a cerca de 50 °C, em seguida, congelada em nitrogênio líquido e liofilizada. Nesta modalidade, o composto antibiótico FD da presente invenção rende cerca 0.1 g a cerca de 0.5 g para cada 15 L de sobrenadante.

### Purificação das substâncias antibióticas por cromatografia em coluna

A FD foi fracionada através de cromatografia em coluna de vidro (20 mm  $\Phi$  x 350 mm altura), acoplada a uma bomba de vácuo. Como fase estacionária foi utilizada sílica gel 60 (0.063 – 0.200 mm), e como fases móveis solventes orgânicos com polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol, metanol e água destilada na razão 1 : 1 (v : v) e água destilada. Para cada solvente foi utilizado um volume máximo de 500 mL. Nesta modalidade foram obtidas 6 frações: (F1) fração hexano; (F2) fração diclorometano; (F3) acetato de etila; (F4) metanol; (F5)

metanol e água destilada e (F6) água destilada. As frações foram concentradas em rotavapor e congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas.

A fração F3 obtida (fração com maior atividade antibiótica monitoradas por bioautografia em cromatografia em camada delgada e em método de disco difusão) foi submetida a uma nova cromatografia em coluna.

Uma alíquota da fração F3 foi fracionada utilizando a mesma coluna e a mesma bomba de vácuo. Como fase estacionária foi utilizada sílica gel 60 (0.063 – 0.200 mm), e como fases móveis foram utilizadas solventes orgânicos com polaridade crescente: (hexano (100; F3a), hexano/diclorometano (1 : 1; F3b) diclorometano (100; F3c), diclorometano/acetato de etila (1 : 1; F3d), acetato de etila (100; F3e), acetato de etila/metanol (1 : 1; F3f), metanol (100; F3g), metanol/água (1 : 1; F3h) e água (100; F3i). As frações foram concentradas em rotavapor e congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas.

## Experimentos realizados

### Ensaio *in vitro*

Para avaliar e quantificar a atividade e potencial das frações com atividade antibiótica foi utilizado à técnica de difusão em disco seguindo as recomendações do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) onde foi quantificado o tamanho do halo de inibição formado. Os discos foram preparados com diferentes concentrações de cada fração (FD; F1; F2; F3; F4; F5; F6) nas concentrações 100, 1000 e 10.000 µg/disco e (F3a; F3b; F3c; F3d; F3e; F3f; F3g; F3h; F3i) nas concentrações 100 e 1000 µg/disco) para a bactéria *Xcc* cepa 306 (*Xcc* 306) e as concentrações 250 e 500 µg/disco para 59 isolados clínicos multirresistentes de bactérias produtoras de carbapenemase. Todos os experimentos foram realizados com três repetições em três experimentos distintos.

Depois de secar os discos com cada fração ou controle de solvente (solventes utilizados no processo de extração para cada fração) foram colocados na superfície do meio de cultura acrescido da suspensão de bactéria e foi incubado por 24 horas a 28 °C para a *Xcc* 306 e por 18 h a 37 °C para os isolados clínicos de KPC. Os halos formados foram mensurados em milímetros.

### Ensaio in vivo

As plantas de *Citrus* foram cultivadas em vasos de 3 L com solo não estéril (Rhodic Ferralsol) (FAO, 1994) mantidos em casa de vegetação (28 °C/22 °C e 10 h/14 h dia/noite, umidade relativa de 80%). A cada 15 dias foram adicionados 150 mL de solução nutritiva de Hewitt para não leguminosas (Hewitt, 1966) e regadas conforme a necessidade com água de torneira.

O primeiro experimento foi em blocos casualizados com o seguinte delineamento experimental: 2 tempos de aplicação (pré e pós), 3 concentrações da FD, 5 repetições (2 x 3 x 5, n = 40) e dois controles positivos com Xcc 306 e água destilada para o pré e pós0tratamento com 5 plantas cada. A aplicação da FD foi feita após 15 dias da poda e foram selecionadas 18 a 20 folhas jovens com aproximadamente o mesmo tamanho. Antes da aplicação as plantas foram cobertas por 24 h com saco de polietileno preto para formar uma câmara úmida e escura, permanecendo nestas condições por mais 48 h até o final das aplicações dos tratamentos. No pré0tratamento, os vasos foram abertos e as plantas pulverizadas com 8 mL da FD por planta nas concentrações de (10.000, 1.000, 100 µg mL<sup>01</sup>) e 8 mL de água destilada no controle (solvente utilizado para diluir a FD) e fechados, após 24h, os vasos foram novamente abertos e pulverizados com uma suspensão de 8 mL de Xcc 306 (10<sup>8</sup> UFC mL<sup>01</sup>) por planta e fechados. Após 24h foi tirado à câmara úmida e escura dos vasos. No pós0tratamento, foi adotado o mesmo procedimento descrito anteriormente com exceção da ordem das pulverizações que primeiramente foram inoculadas com Xcc 306 e depois pulverizadas com as concentrações da FD.

O segundo experimento também foi em blocos casualizados e teve o seguinte desenho experimental: 2 tempos de aplicação (pré e pós), 4 concentrações da F3, 5 repetições (2 x 4 x 5, n = 50), e dois controles positivos com Xcc 306 e água destilada para o pré e pós0tratamento com 5 plantas cada. O procedimento realizado neste experimento foi o mesmo adotado no primeiro experimento, com exceção do composto antibiótico que foi a F3 com as seguintes concentrações (10.000, 1.000, 100, 10 µg mL<sup>01</sup>). O número de lesão dos experimentos foi determinado após 21 dias da aplicação. O número de lesão por folha foi avaliada a partir da contagem das lesões em 18 folhas coletadas de cada repetição por tratamento e os dados submetido à análise estatística por regressão (p < 0.01).

O terceiro experimento também foi em blocos casualizados com o seguinte desenho experimental: dois tempos de aplicação (pré e pós), três concentrações da fração F3d, cinco repetições, e dois controles (positivo com Xcc 306 e água destilada e negativo somente com água destilada com cinco plantas cada. O procedimento realizado neste experimento foi o mesmo adotado no primeiro experimento, com exceção do composto antibiótico que foi a F3d com as seguintes concentrações (1, 10, 100 µg mL<sup>-1</sup>). O número de lesão dos experimentos foi determinado após 21 dias da aplicação. O número de lesão por folha foi avaliada a partir da contagem das lesões em 18 folhas coletadas de cada repetição por tratamento e os dados submetido à análise estatística por regressão ( $p < 0.01$ ).

### Resultados

Na avaliação da ação antibiótica por difusão em ágar da FD e das frações F1; F2; F3; F4; F5 e F6, a FD apresentou halos de inibição frente a Xcc 306. No entanto somente a F3 mostrou ter efeito semelhante à FD formando halos de inibição de crescimento com diâmetro aproximados, 42 e 38.5 mm na concentração de 10.000 µg/disco. As frações F1, F2 e F4 apresentaram menor atividade antibiótica com halos de inibição de 13, 12.5 e 10 mm respectivamente. Na F1, a concentração 1000 µg/disco apresentou o mesmo efeito encontrado na 10.000 µg/disco (Tabela 1). A fração F3d apresentou uma alta atividade antibiótica contra a Xcc 306, com halos de inibição com diâmetro de 42 e 38.5 mm nas concentrações de 1000 e 100 µg/disco (Tabela 2).

**Tabela 1** – Avaliação da ação antibiótica por difusão em ágar da fase diclorometano (FD), fração hexano (F1), fração diclorometano (F2), fração acetato de etila (F3), fração metanol (F4), fração metanol e água (F5) e fração água (F6), frente à *Xcc* 306

Amostras	Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Diâmetro do halo (mm)
	10000	38.5
FD	1000	21.5
	100	16.0
	10000	13.0
F1	1000	13.0
	100	
	10000	12.5
F2	1000	0
	100	0
	10000	42.0
F3	1000	26.5
	100	10.5
	10000	10.0
F4	1000	0
	100	0
	10000	0
F5	1000	0
	100	0
	10000	0
F6	1000	0
	100	0

(0) sem formação de halos de inibição

**Tabela 2** – Avaliação da atividade antibiótica das frações obtidas por CLV, por difusão em agar frente à *Xcc* 306.

Amostras	Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Diâmetro do halo (mm)
F3a	100	0
	1000	0
F3b	100	0
	1000	0
F3c	100	0
	1000	0
F3d	100	35
	1000	42
F3e	100	0
	1000	0
F3f	100	0
	1000	0
F3g	100	0
	1000	0
F3h	100	0
	1000	0
F3i	100	0
	1000	0

F3a0 Extraído com hexano (100), F3b0 Extraído com hexano/diclorometano (1:1), F3c0 Extraído com diclorometano (100), F3d0 Extraído com diclorometano/acetato de etila (1:1), F3e0 Extraído com acetato de etila (100), F3f0 Extraído com acetato de etila/metanol (1:1), F3g0 Extraído com metanol (100), F3h0 Extraído com metanol/água (1:1), F3i0 Extraído com água (100). (0) sem formação de halos de inibição.

Nos ensaios para os isolados clínicos de cepas multi0rresistentes de KPCs, a fração F3 apresentou uma boa atividade antibiótica contra 65% das cepas multi0rresistentes testadas de KPC na concentração de 250  $\mu\text{g}/\text{disco}$ , com halos em média de 12 mm de diâmetro, e 89% na concentração 500  $\mu\text{g}/\text{disco}$ , com halos em média com 14 mm de diâmetro.

Nos três experimentos *in vivo* realizados, foi avaliado o efeito antibiótico na formação de lesão de cancro cítrico nas folhas.

No primeiro experimento onde foi aplicado a FD, no pré0tratamento, o efeito inibitório foi observado a partir da D1 sendo maior na D2 e na D3. Na regressão as diferenças entre dose0efeito foi significativa ( $r^2 = 0.9868$ ,  $p < 0.01$ ) mostrando que a dose

mínima testada foi a mais efetiva no controle da formação de lesão. As plantas tratadas com a D3 apresentaram 80% menos lesão nas folhas quando comparadas com o controle (Figura 1 A). No pós0tratamento as concentrações maiores D1 e D2 estimularam a formação de lesão quando comparadas com o controle. Somente a D3 teve efeito inibitório na formação de lesão. Isto mostra um modelo diferente na dose0efeito quando o produto é aplicado após a Xac 306 tendo também diferenças significativas no número de lesão formadas ( $r^2 = 0.9449$ ,  $p < 0.01$ ) (Figura 1 B).

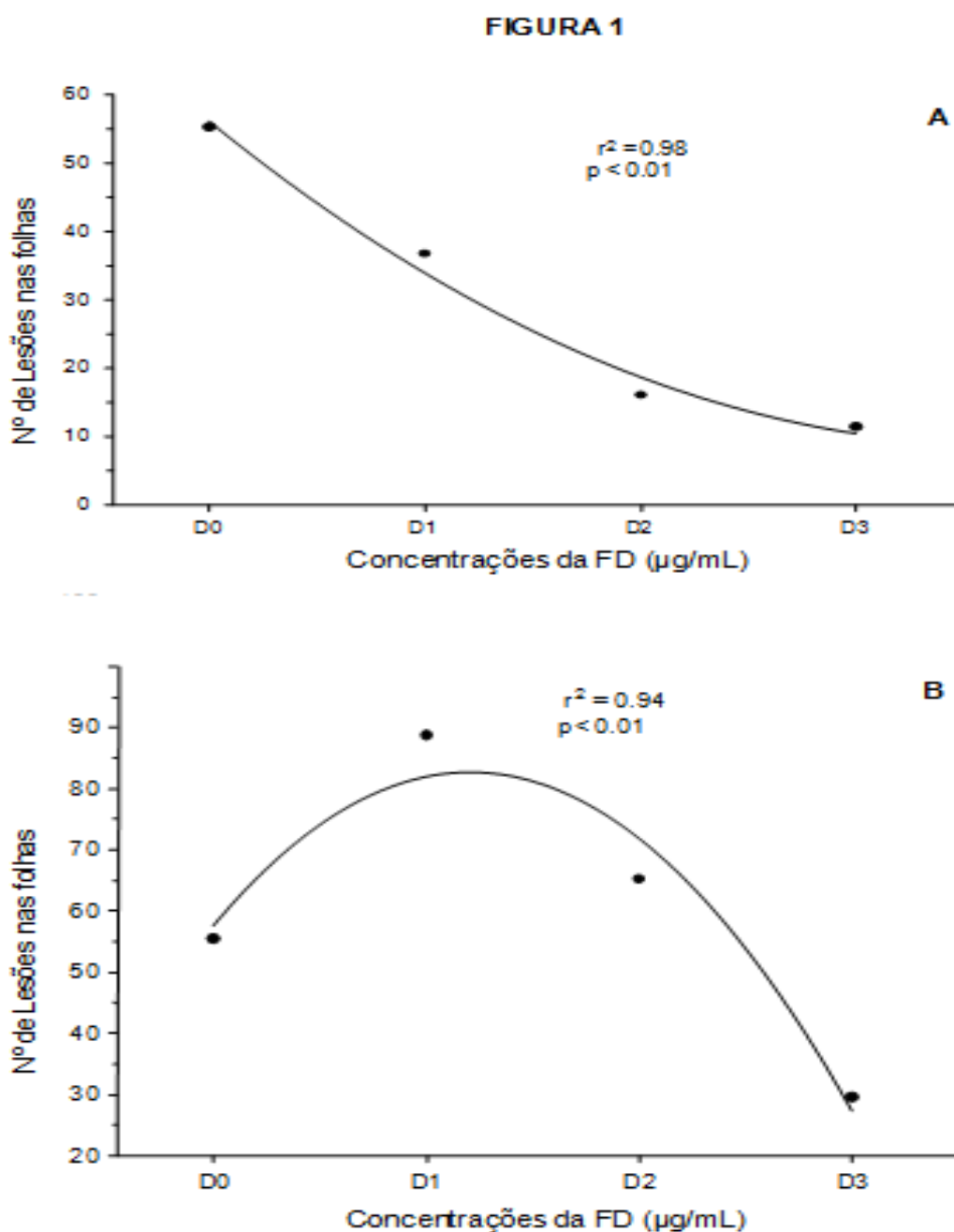
No segundo experimento, onde foi aplicado a F3 obtida na CLV a partir do tratamento da FD com acetato de etila, no pré0tratamento, todas as concentrações diminuíram o número de lesão e a dose0efeito na regressão foi significativa ( $r^2 = 0.8037$ ,  $p < 0.01$ ). As plantas tratadas com a D1, D2 e D3 diminuíram em aproximadamente 65 % no número de lesão e as plantas tratadas com a D4 o número de lesão foi reduzido em 92 %, quando comparado com as plantas controle (Figura 2A). As plantas tratadas com a F3 no pós0tratamento a correlação dose0efeito também foi significativa ( $r^2 = 0.9938$ ,  $p < 0.01$ ), onde todas as concentrações diminuíram o número de lesão, no entanto o efeito na formação de lesão foi diferente, quando comparada ao controle a D1 diminuiu em 42.4%, a D2 79,8%, a D3 87.7% e a mais efetiva foi a D4 com 93.5% (Figura 2B).

A FD na concentração D3 do pré0tratamento diminuiu aproximadamente 80% no número de lesões foliares, por outro lado, no pós0tratamento os efeitos observados foram diferentes. A D1 estimulou o número de lesões e a D2 não teve efeito tendo aproximadamente o mesmo número de lesões do controle. Mesmo a D3 que apresentou melhor controle, a sua eficiência diminuiu bastante, pois a redução no número de lesões foi somente de 30% em relação ao controle. Isto demonstra que a forma de tratamento com a FD tem efeitos diferentes no controle das lesões o que é reforçado pelo fato de ambos os modelos apresentaram diferenças significativas na correlação dose0efeito e um alto valor de regressão ( $r^2$ ). Na F3 no pré0tratamento todas as doses tiveram um grande efeito inibitório no número de lesão, sendo a mais efetiva a menor dose a D4 e no pós0tratamento o efeito observado foi menor do que no pré0tratamento, sugerindo que apesar de não ocorrer o estímulo na formação de lesão como na FD, o efeito observado foi menor do que no pré0tratamento. Isto significa que o tempo de aplicação é um importante fator na relação dose0efeito.

Portanto, atividade das substâncias antibióticas produzida pela cepa LV tem efeito inibitório na formação de lesões foliares do cancro cítrico. Este efeito é um resultado

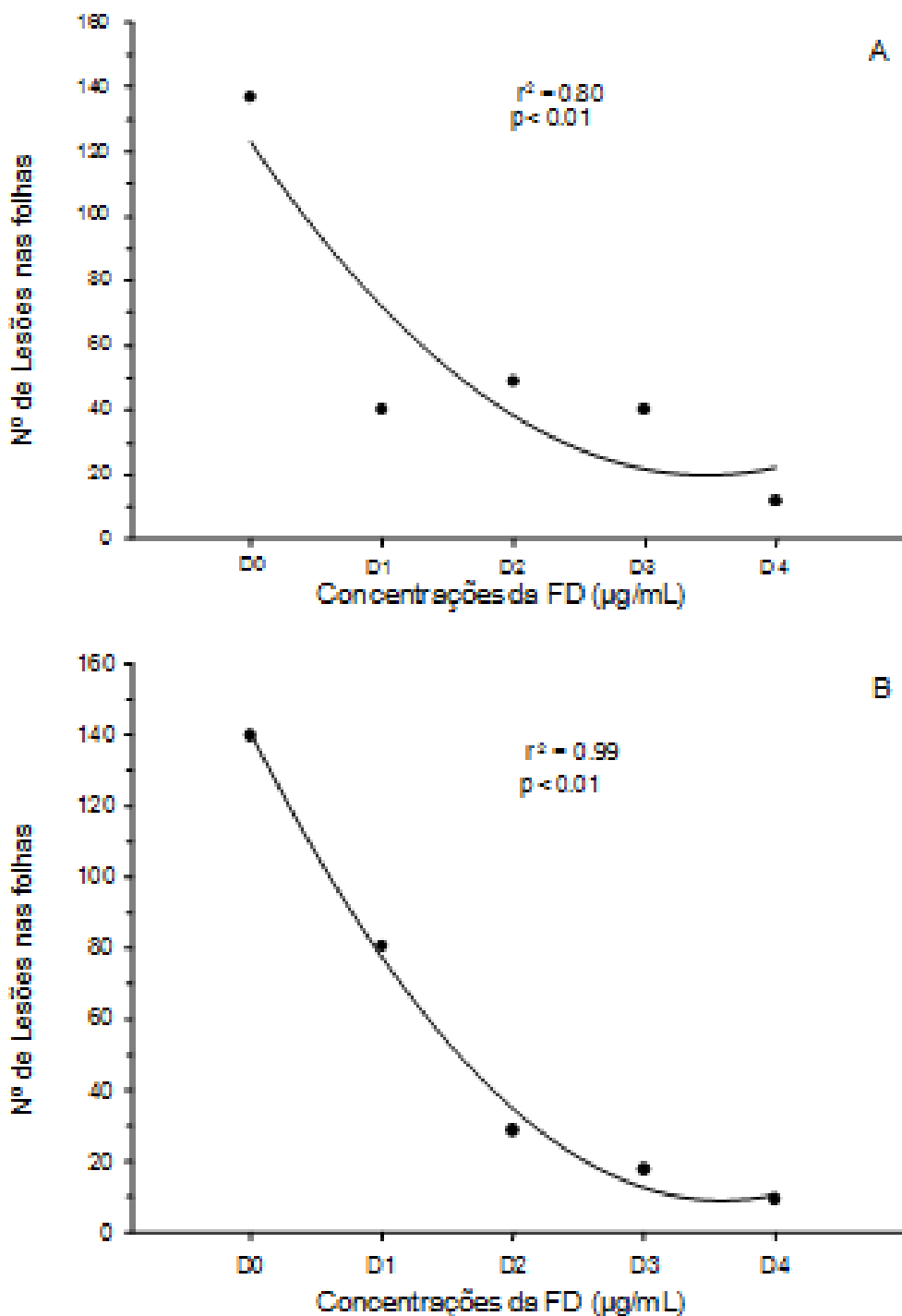
bastante importante na obtenção de novos produtos industriais para o controle efetivo das bactérias fitopatogênicas causadas por bactérias em citros, diminuindo assim, os prejuízos causados por estes micro-organismos na citricultura mundial.

**Figura 1** – Regressão ( $p < 0.01$ ,  $n = 40$ ) dose0efeito da aplicação de três doses da fase diclorometano (D0 = água destilada, D1 =  $10.000 \mu\text{g mL}^{01}$ , D2 =  $1.000 \mu\text{g mL}^{01}$ , D3 =  $100 \mu\text{g mL}^{01}$ ) sobre o número de lesões foliares de cancro cítrico causado pela *X. citri* pv. *citri* cepa 306 em plantas de *Citrus sinensis* cv. Valência após 21 dias da aplicação. (A) Pré0tratamento. (B) Pós0tratamento.



**Figura 2** – Regressão ( $p < 0.01$ ,  $n = 50$ ) dose0efeito da aplicação de quatro doses da fração F3 obtida a partir do tratamento da fase FD com acetato de etila (D0=água destilada, D1=10.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , D2=1.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , D3=100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , D4=10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) sobre o número de lesões foliares de cancro cítrico causado pela *X. citri* pv. *citri* cepa 306 em plantas de *Citrus sinensis* cv. Valência após 21 dias de aplicação. (A) Pré0tratamento, (B) Pós0tratamento.

**FIGURA 2**



**Figura 3** – Regressão ( $p < 0.01$ ,  $n = 50$ ) dose0efeito da aplicação de três doses da fração F3d obtida a partir do fracionamento da facção F3 com acetato de etila/diclorometano 1:1 (v:v) onde (D0=água destilada, D1=1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , D2=10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , D3=100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) sobre o número de lesões foliares de cancro cítrico causado pela *X. citri* pv. *citri* cepa 306 em plantas de *Citrus sinensis* cv. Valência após 21 dias de aplicação. (A) Pré0tratamento, (B) Pós0tratamento.

