



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA



DANIELA SILVA GONÇALVES

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DAS PRÓPOLIS
BRASILEIRAS VERDE, VERMELHA E MARROM FRENTE A *XANTHOMONAS CITRI*

UBERLÂNDIA-MG

2022

DANIELA SILVA GONÇALVES

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DAS PRÓPOLIS
BRASILEIRAS VERDE, VERMELHA E MARROM FRENTE A *XANTHOMONAS CITRI*

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial
para obtenção do título de Bacharel
em Biomedicina na Universidade
Federal de Uberlândia.

Orientador: Profº Drº Carlos
Henrique Gomes Martins

Coorientadora: Me. Mariana
Brentini Santiago

UBERLÂNDIA-MG

2022

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DAS PRÓPOLIS
BRASILEIRAS VERDE, VERMELHA E MARROM FRENTE A *XANTHOMONAS CITRI*

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial
para obtenção do título de Bacharel
em Biomedicina na Universidade
Federal de Uberlândia.

Uberlândia, 20 de julho de 2022.

Banca examinadora formada por:

Profº Drº Carlos Henrique Gomes Martins

Drª Ralciane de Paula Menezes

Me. Nágela Bernadelli Sousa Silva

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela graça de concluir mais uma etapa da minha vida;

Agradeço aos meus pais e toda a minha família, sem eles nada disso seria possível;

A todos os meus amigos, em especial a Anna, Giovanna, Higor e Mikaela, por estarem comigo desde o começo do curso;

Ao meu orientador Carlos Henrique Martins, que me acolheu no laboratório desde o estágio e me ofereceu todas as oportunidades que precisava;

À minha coorientadora Mariana Santiago, que esteve ao meu lado, me ajudando e ensinando em todos os momentos;

E a toda equipe do Laboratório de Ensaios Antimicrobianos (LEA/UFU).

RESUMO

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* é uma bactéria fitopatogênica, capaz de formar biofilme na superfície de plantas cítricas e, consequentemente, levar ao desenvolvimento do cancro cítrico. Tendo em vista o desenvolvimento da resistência antimicrobiana aos pesticidas já utilizados no mercado, é necessária a busca por novas formas de controle desses fitopatógenos, dentre elas a aplicação de produtos naturais e seus derivados. A própolis, produzida pelas abelhas *Apis mellifera* através das resina de brotos, exsudatos, pólen e outras partes das plantas, se destaca por apresentar várias atividades biológicas, inclusive antimicrobiana. O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme dos extratos das própolis brasileiras: verde (PBVD), vermelha (PBVM) e marrom (PBMA) frente a *X. citri*. A PBVD foi coletada em Bambuí-MG, a PBVM foi coletada em Canavieiras-BA e a PBMA foi coletada em União da Vitória-PR. Foram utilizadas as bactérias *X. citri* (Isolado de Campo 12 – sensível ao cobre), *X. citri* (Isolado de Campo 1733 – tolerante ao cobre) e *X. citri* (Isolado de Campo 1647 – resistente ao cobre) nos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e avaliação da inibição de biofilme (Concentração Inibitória Mínima de Biofilme [CIMB₅₀] e viabilidade celular pela contagem de Unidade Formadora de Colônia/mililitros). Os valores de CIM e CBM se mostraram promissores para PBVD frente *X. citri* (IC1733) na concentração de 250 µg/mL e *X. citri* (IC1647) na concentração de 125 µg/mL, e para PBVM frente *X. citri* (IC1733) na concentração de 62,5 µg/mL e *X. citri* (IC1647) na concentração de 31,25 µg/mL. O efeito da CBM foi bactericida para todas as própolis e bactérias avaliadas. Os valores de CIMB₅₀ para PBVD foram de 125 µg/mL frente *X. citri* (IC1733) e de 15,63 µg/mL frente *X. citri* (IC1647), e para PBVM foram de 31,25 µg/mL frente *X. citri* (IC1733) e de 3,93 µg/mL frente *X. citri* (IC1647). Conclui-se que os extratos das PBVD e PBVM são produtos naturais com ação antibactericida e antibiofilme frente a *X. citri*. Outros estudos são necessários para avaliar seu potencial biológico e uma possível aplicação em pesticidas.

Palavras chave: *Xanthomonas citri*, própolis, antibacteriana, antibiofilme.

ABSTRACT

The bacteria *Xanthomonas citri* subsp. *Citri* is a phytopathogenic bacteria capable of forming biofilm on the surface of citrus plants and, consequently, lead to the development of citrus canker. In view of the development of antimicrobial resistance to pesticides already used on the market it is necessary to search for new ways to control these phytopathogens, among them the application of natural products and their derivatives. Propolis, produced by *Apis mellifera* bees through bud resin, exudates, pollen and other plant parts, stands out for having several biological activities, including antimicrobial. The aim of this study was to evaluate the antibacterial and antibiofilm activity of Brazilian propolis extracts: green (PBVD), red (PBVM) e brown (PBMA) against *X. citri*. The PBVD were collected in Bambuí-MG, the PBVM were collected in Canavieiras-BA and the PBMA were collected in União da Vitória-PR. The bacteria *X. citri* (IC12), *X. citri* (IC1733) and *X. citri* (IC 1647) were used in the assays of Minimum inhibitory concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and evaluation of biofilm inhibition (Minimum Inhibitory Concentration of Biofilm [MICB₅₀] and cell viability by counting CFU/mL). The MIC and CBM values were promising for PBVD against *X. citri* (IC1733) at a concentration of 250 µg/mL and *X. citri* (IC1647) at a concentration of 125 µg/mL, and for PBVM against *X. citri* (IC1733) at a concentration of 62.5 µg/mL and *X. citri* (IC1647) at a concentration of 31.25 µg/ml. The effect of CBM was bactericidal for all propolis and bacteria evaluated. CIMB50 values for PBVD were 125 µg/mL against *X. citri* (IC1733) and 15.63 µg/mL against *X. citri* (IC1647), and for PBVM were 31,25 µg/mL against *X. citri* (IC1733) e 3,93 µg/mL against *X. citri* (IC1647). It is concluded that the extracts of PBVD and PBVM are natural products with antibacterial and antibiofilm action against *X. citri*. Further studies are needed to assess its biological potential and possible application in pesticides in pesticides.

Key words: *Xanthomonas citri*, propolis, antibacterial, antibiofilm.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
MATERIAIS E MÉTODOS	13
Cepas bacterianas e condições de crescimento	13
Aquisição das própolis.....	13
Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)	14
Avaliação da Inibição de Biofilme	15
RESULTADOS	16
DISCUSSÃO	19
CONCLUSÃO.....	21
REFERÊNCIAS	22

INTRODUÇÃO

As frutas cítricas pertencentes ao gênero *Citrus* como laranja, limão, tangerina, cidra, toranja, por exemplo, tiveram origem no sudeste da Ásia, mas hoje também são amplamente cultivadas em regiões tropicais e subtropicais com grande importância para economia mundial (SAINI; RANJIT; SHARMA; PRASAD *et al.*, 2022). O Brasil se destaca como maior produtor e exportador de laranjas no mundo, com uma safra prevista em cerca de 16 milhões de toneladas, uma produção de aproximadamente R\$13 bilhões, para o ano comercial de 2021/2022 (julho/junho) (USDA, 2022). Dentre os fatores que limitam a produção dos citros estão: as condições climáticas, como aumento da temperatura e escassez de chuva; a salinidade do solo e o aumento de infecções causadas por microrganismos patogênicos (KANASHIRO; AKIYAMA; KUPPER; FILL, 2020).

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (syn. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) é um fitopatógeno baciloforme, gram-negativo, com um único flagelo polar, aeróbio obrigatório que cresce em temperatura entre 25 e 30°C (AN; POTNIS; DOW; VORHOLTER *et al.*, 2020). Pertence ao filo Proteobacteria, à classe Gammaproteobacteria, ordem *Xanthomonadales*, família *Xanthomonadaceae* (ISPM, 2014). Ao colonizar a superfície das plantas, essas bactérias podem formar biofilmes estruturados, essenciais para sua sobrevivência, proteção contra agentes estressantes e microrganismos competidores, bem como para virulência e estabelecimento do processo infeccioso (ALVAREZ-MARTINEZ; SGRO; ARAUJO; PAIVA *et al.*, 2021). O Fator de Sinal Difusível (DSF) é a principal molécula do *quorum sensing*, meio de comunicação bacteriano, da *X. citri*, que regula seletivamente os genes envolvidos na motilidade dessas células, levando à formação do biofilme e, conseqüentemente, ao desenvolvimento do cancro cítrico (MARTINS; DE OLIVEIRA ANDRADE; BENEDETTI; DE SOUZA, 2020).

O cancro cítrico é uma das doenças cultivares mais destrutivas que resulta em perdas de rendimento, má qualidade dos frutos e barreiras comerciais (SUN; NASRULLAH; KE; NIE *et al.*, 2019). É relatado no Brasil, Argentina, México, Estados Unidos, endêmico na Índia, no Japão e em outros países asiáticos (MARIN; FERRAREZI; VIEIRA; SASS, 2019). Nas folhas e ramos, o cancro se apresenta como uma erupção esponjosa, parda, circundada por um halo amarelo característico. Já nos frutos, as lesões tendem a ser mais salientes, com centro irregular em forma de crateras. Além disso, é comum a junção das lesões, formando uma lesão única, normalmente voltada para o exterior da copa das árvores (EMBRAPA, 2008).

Os métodos atuais de manejo utilizados para prevenção e correção da cancriose incluem barreira vegetal de quebra-vento; pesticidas à base de cobre e estreptomicina; controle do minador de citros; inspeções dos pomares; desinfestação de equipamentos e máquinas (FUNDECITRUS, 2022). Milhões de dólares são gastos anualmente em todo o mundo para controle do cancro cítrico. Nesse contexto, surgem novas preocupações com relação às práticas ineficazes, produtos tóxicos para saúde humana, resistência ao cobre e antibióticos, contaminação química do solo e da água, tornando cada vez mais necessária a busca por novas estratégias de combate a esses fitopatógenos (NAKAYINGA; MAKUMI; TUMUHAISE; TINZAARA, 2021).

Desde a antiguidade, os produtos naturais têm sido utilizados para o tratamento de várias doenças. Cientistas buscam, então, determinar a aplicação das moléculas naturais, seus análogos e derivados (CHOPRA; DHINGRA, 2021). Assim, a apicultura se apresenta como uma fonte animadora de recursos contra vários patógenos, por exemplo, por seus produtos obtidos como o mel, a geleia real e a própolis (LIMA; BRITO; DA CRUZ NIZER, 2021).

A própolis é produzida pelas abelhas *Apis mellifera* que coletam a resina de brotos, exsudatos, pólen e outras partes da planta e misturam com suas próprias ceras e enzimas salivares (PRZYBYLEK; KARPINSKI, 2019). O produto final depende de cada região geográfica e seu bioma, uma vez que estes influenciam na vegetação e, conseqüentemente, na cor, cheiro, gosto, textura e composição da própolis (FREIRES; DE ALENCAR; ROSALEN, 2016). No Brasil, por exemplo, a própolis verde é encontrada principalmente no Cerrado, coletada das plantas *Baccharis dracunculifolia* e *Vernonia rubriramea*, e na Caatinga, coletada da *Mimosa tenuiflora*, a vermelha nos Manguezais, coletada das plantas *Dalbergia ecastaphyllum* e *Symphonia globulifera* e a marrom na Mata das Araucárias, coletada da *Araucaria* sp. e *Populus* sp. (SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2021).

Estudos têm demonstrado resultados da própolis verde com ação farmacológica antitumoral, antioxidante, antigenotóxica e antimicrobiana, e das própolis vermelha e marrom como antitumoral, antioxidante, antiparsitária e antimicrobiana (BOUCHELAGHEM, 2022). Essa variedade de propriedades biológicas sugere que a própolis possa ser usada no desenvolvimento de produtos de uso tanto humano como animal e vegetal (SANTOS; FONSECA; SOKOLONSKI; DEEGAN *et al.*, 2020). Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme do extrato bruto das própolis brasileiras verde, vermelha e marrom frente ao fitopatógeno *X. citri* subsp. *citri*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolados bacterianos e condições de crescimento

Para realizar os ensaios antibacterianos e antibiofilme foram utilizados os seguintes fitopatógenos isolados de plantas com cancro cítrico: *X. citri* (Isolado de Campo 12), sensível ao cobre, isolada em Paranavaí – PR em 1997; *X. citri* (Isolado de Campo 1733) tolerante ao cobre, isolada no Paraná em 2014 e *X. citri* (Isolado de Campo 1647) resistente ao cobre, isolada em Bella Vista-Corrientes, na Argentina, em 2003. Todas as bactérias utilizadas pertencem a bacterioteca do Laboratório de Ensaios Antimicrobianos (LEA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia/MG e foram fornecidas pelo Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), da cidade de Araraquara/SP.

Durante todos os ensaios, as bactérias foram cultivadas em Ágar Nutriente (AN) ou Caldo Nutriente (CN) e foram mantidas em estufa de Demanda Biológica de Oxigênio (DBO) a 28°C por 72 horas para crescimento e repique.

Aquisição das própolis

Foram utilizados extratos brutos hidroalcoólicos de três própolis brasileiras. A própolis verde (PBVD) foi coletada em Bambuí, no estado de Minas Gerais e seu extrato bruto hidroalcoólico obtido como descrito anteriormente por RODRIGUES; DE SOUZA; ARRUDA; PEREIRA *et al.* (2020). A própolis vermelha (PBVM) foi coletada em Canavieiras, no estado da Bahia, e seu extrato bruto hidroalcoólico obtido como descrito anteriormente por CCANA-CCAPATINTA; MEJIA; TANIMOTO; GROPPPO *et al.* (2020). Já a própolis marrom (PBMA) foi coletada em União da Vitória, no estado do Paraná, e seu extrato bruto hidroalcoólico obtido como descritos anteriormente por SANTOS; OLIVEIRA; RIBEIRO; SOARES *et al.* (2021).

Os extratos brutos hidroalcoólicos das PBVM, PBVD e PBMA que foram utilizadas no presente estudo foram fornecidas pelos professores Dr. Sérgio Ricardo Ambrósio, Dr. Rodrigo Cassio Sola Veneziani da Universidade de Franca, Franca/SP, e Dr. Jairo Kenupp Bastos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP, que é coordenador do projeto temático intitulado “Realização de estudos químicos, analíticos, biológicos, farmacológicos e tecnológicos para preenchimento das lacunas no desenvolvimento do setor brasileiro de própolis” (Processo FAPESP no 2017/04138-8.).

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

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é a menor concentração da amostra capaz de inibir o crescimento microbiano. Para determinar a CIM, a metodologia recomendada por IANTAS; SAVI; SCHIBELBEIN; NORILER *et al.* (2021) foi seguida com algumas modificações. Os extratos de própolis foram solubilizados primeiramente em dimetilsulfóxido (DMSO) 5% (v/v) e, posteriormente, diluídos em Caldo Nutriente (CN). A diluição seriada foi realizada em microplaca de 96 poços preparada com CN a fim de atingir concentração final variando de 0,98 a 2.000 µg/mL. As células bacterianas foram ajustadas para cada isolado com o objetivo de atingir uma concentração final de 5×10^5 Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL). Como controle positivo foi utilizado estreptomicina nas concentrações de 0,0115 a 5,90 µg/mL. As placas foram incubadas a 28°C por 72 horas em estufa DBO. Após o período de incubação, foi adicionado 30 µL de resazurina a 0,02% em cada poço. A resazurina é um revelador bacteriano que, na presença de células bacterianas viáveis, sofre reação de oxi-redução transformando-se em resofurina, o que altera sua coloração de azul para rosa, ou seja, a azul indica ausência de crescimento bacteriano e a rosa indica crescimento (SARKER; NAHAR; KUMARASAMY, 2007). Assim, as placas foram incubadas a 28°C por 12 horas em estufa DBO. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Para determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), definida como a menor concentração da amostra em que não houve crescimento bacteriano, 10 µL do inóculo foram retirados de cada poço antes da adição de resazurina, semeados em AN e incubados a 28°C por 72 horas em estufa DBO, para observar ausência e/ou presença de crescimento bacteriano. Valores de CBM iguais aos de CIM indicam resultado bactericida, enquanto valores maiores que os de CIM indicam resultado bacteriostático. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Avaliação da Inibição de Biofilme

Da mesma forma como na metodologia de CIM, foram preparadas duas placas de 96 poços com CN, para diferentes finalidades. Os extratos foram padronizados a fim de atingir concentração final variando de 0,49 a 1.000 µg/mL. O inóculo bacteriano foi ajustado na concentração final de 3×10^8 UFC/mL. A estreptomicina foi utilizada como controle positivo nas concentrações de 0,0115 a 5,90 µg/mL. As placas foram incubadas a 28°C por 72 horas em estufa DBO.

Para avaliação da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIMB₅₀), de acordo com STEPANOVIC'; VUKOVIC'; HOLA; BONAVENTURA *et al.* (2007), o caldo foi retirado de uma das placas após incubação, o biofilme foi lavado para retirada das células planctônicas, fixado com metanol por 20 minutos, corado com cristal violeta 2% por 20 minutos e ressuscitado com ácido acético 33,3% por 30 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (A₆₀₀) e a porcentagem de inibição calculada pela equação: Porcentagem de inibição = $1 - (\text{Absorbância do poço tratado com a amostra teste} / \text{absorbância do poço controle não tratado}) \times 100$, para determinar a menor concentração do agente antibacteriano capaz de inibir a formação do biofilme em 50% ou mais (STEPANOVIC'; VUKOVIC'; HOLA; BONAVENTURA *et al.*, 2007).

A viabilidade celular foi avaliada por meio da contagem de colônias bacterianas (UFC/mL), segundo a metodologia descrita por Silva *et al.* (2014) com algumas modificações. Após incubação, o caldo foi retirado da segunda microplaca, o biofilme foi lavado, ressuscitado em CN e sonificado por 15 minutos. Logo depois, 20 µL do biofilme foram diluídos em outra microplaca contendo 180 µL de CN em cada poço para obter diluições de 10^0 a 10^{-7} . Por conseguinte, uma alíquota de 50 µL de cada poço foi transferida para a microplaca de AN fracionada em oito partes, de acordo com HARRISON; TURNER e CERI (2005). As placas de AN foram incubadas a 28°C por 72 horas em estufa DBO. Por fim, as colônias foram contadas e os resultados expressos em log₁₀ (UFC/mL). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

RESULTADOS

A Tabela 1 demonstra os resultados da atividade antibacteriana. A PBVD inibiu o crescimento bacteriano de *X. citri* (IC12), *X. citri* (IC1733) e *X. citri* (IC1647) nas concentrações de 1000, 250 e 125 µg/mL, respectivamente. A PBVM também inibiu *X. citri* (IC12) na concentração de 1000 µg/mL, porém *X. citri* (IC1733) e *X. citri* (IC1647) foram inibidas nas concentrações de 62,5 µg/mL e 31,25 µg/mL, nessa ordem. Já a PBMA inibiu *X. citri* (IC12) na concentração de 2000 µg/mL e *X. citri* (IC1733) e *X. citri* (IC1647) na concentração de 1000 µg/mL. A estreptomicina inibiu o crescimento bacteriano de *X. citri* IC12, IC1733, IC1647 nas concentrações de 0,046, 0,184 e 0,092 µg/mL, respectivamente. Todos os valores de CIM descritos acima foram iguais aos obtidos na CBM, sendo, portanto, as PBVD, PBVM e PBMA bactericidas frente as *X. citri* avaliadas.

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) da Própolis Verde, Vermelha, Marrom frente aos isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	Própolis Verde		Própolis Vermelha		Própolis Marrom		Estreptomicina	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
IC12 Sensível ao cobre	1000	1000	1000	1000	2000	2000	0,046	0,046
IC1733 Tolerante ao cobre	250	250	62,5	62,5	1000	1000	0,184	0,184
IC1647 Resistente ao cobre	125	125	31,25	31,25	1000	1000	0,092	0,092

De acordo com os melhores resultados obtidos da CIM, a avaliação da inibição de biofilme foi realizada com os extratos das própolis verde e vermelha para *X. citri* (IC1733) e *X. citri* (IC1647). Como demonstrado na Figura 1, frente a *X. citri* (IC1733), a PBVD apresentou CIMB₅₀ de 125 µg/mL, a PBVM de 31,25 µg/mL e a estreptomicina de 0,1844 µg/mL. Nota-se que na contagem de UFC não houve crescimento bacteriano na concentração de 1000 µg/mL da PBVM. Já na Figura 2, frente a *X. citri* (IC1647), a PBVD obteve CIMB₅₀ de 15,63 µg/mL; a PBVM de 3,91 µg/mL e a estreptomicina de 0,1844 µg/mL. Observa-se ainda que na contagem de UFC não houve crescimento bacteriano nas concentrações de 1000 µg/mL da PBVD; de 500 e 1000 µg/mL da PBVM e de 1,475, 2,95 e 5,9 µg/mL da estreptomicina.

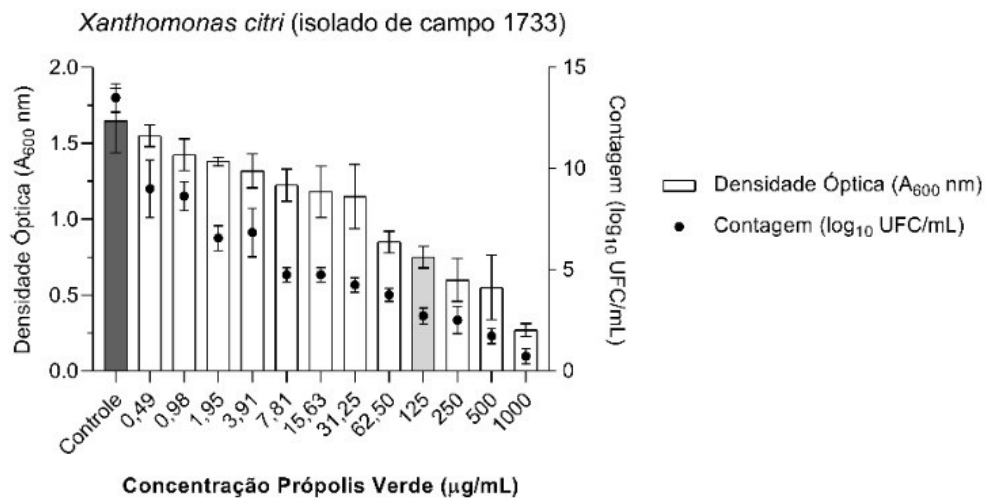
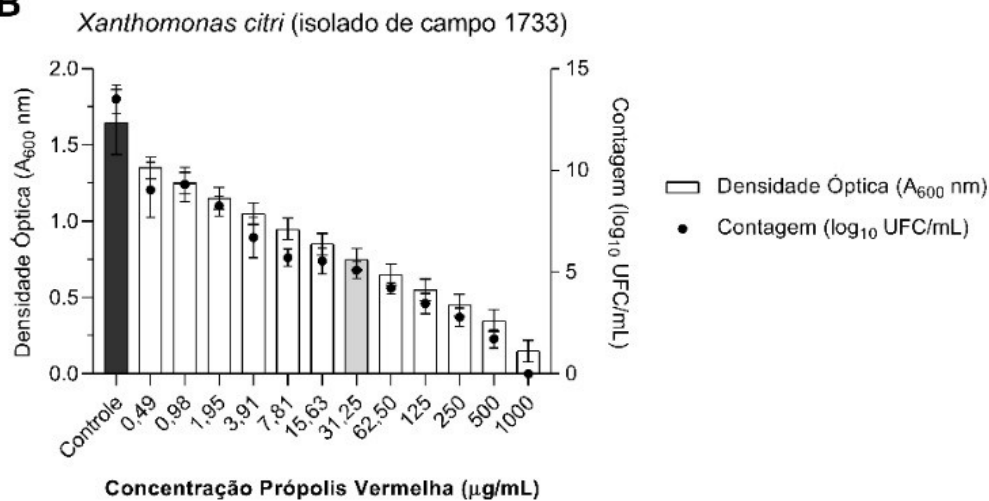
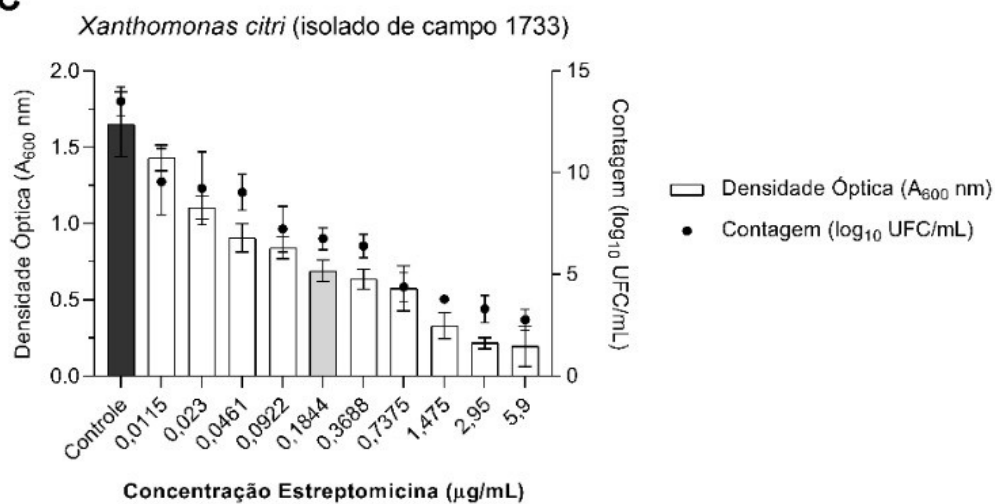
A**B****C**

Figura 1. Representação gráfica da atividade antibiofilme do extrato bruto das própolis brasileiras verde e vermelha frente ao isolado 1733 de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

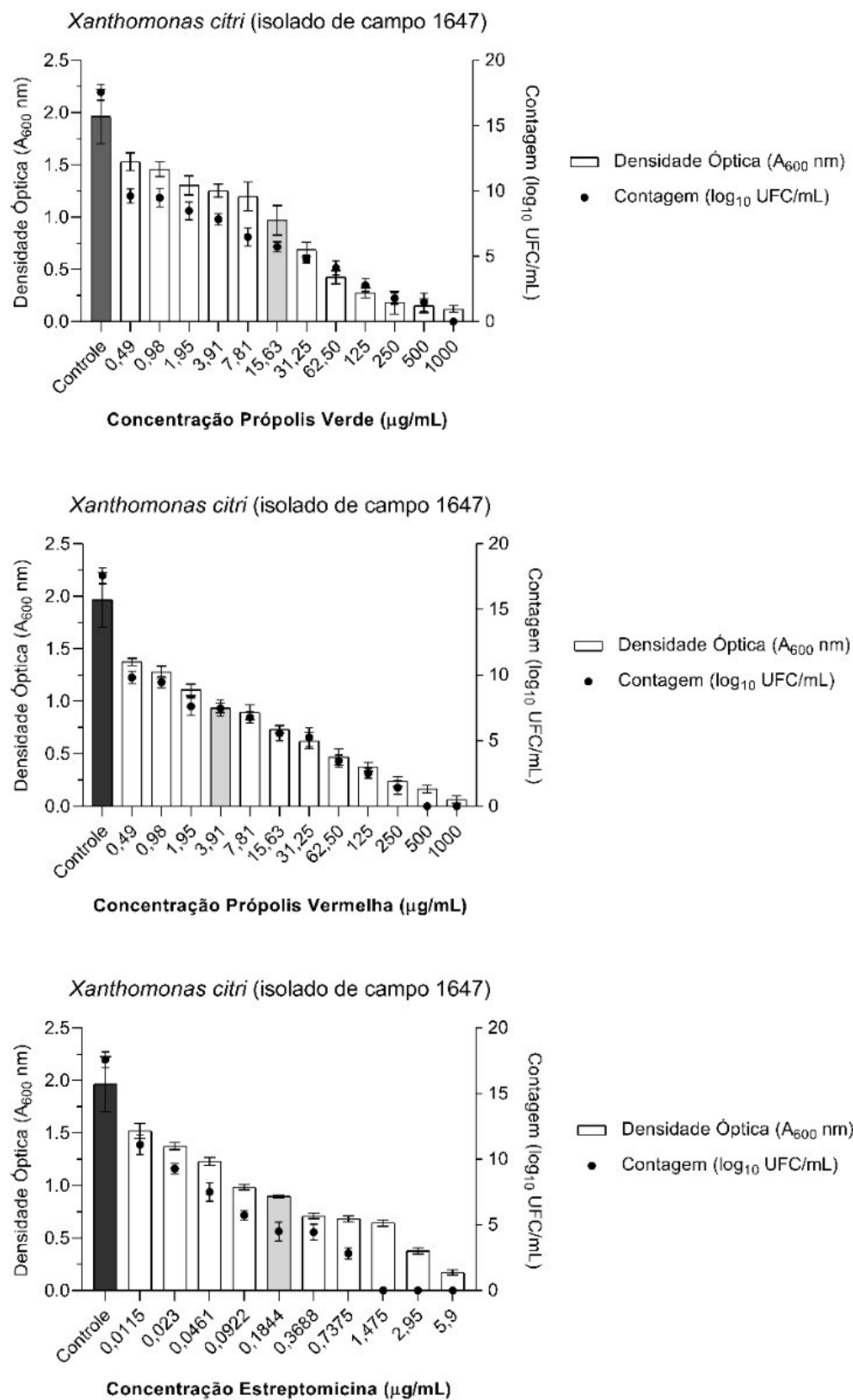


Figura 2. Representação gráfica da atividade antibiofilme do extrato das própolis brasileiras verde e vermelha frente ao isolado 1733 de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

DISCUSSÃO

HOLETZ; PESSINI; SANCHES; CORTEZ *et al.* (2002) consideram uma boa atividade antimicrobiana o extrato bruto que apresenta a CIM menor que 100 µg/mL, moderada entre 100 e 500 µg/mL, fraca entre 500 e 1000 µg/mL e inativa maior que 1000 µg/mL. Dessa forma, em nossa pesquisa e baseado nos critérios acima, o extrato da PBVM foi a que apresentou melhor atividade antibacteriana, com valores menores que 100 µg/mL para *X. citri* (IC1647 - 31,25 µg/mL) e *X. citri* (IC1733 - 62,5 µg/mL). Ainda nesse contexto, o extrato da PBVD mostrou atividade antibacteriana moderada, com valores entre 100 e 500 µg/mL também para *X. citri* (IC1647 - 125 µg/mL) e *X. citri* (IC1733 - 250 µg/mL), o que justifica também a escolha das PBVD e PBVM para a avaliação da atividade antibiofilme de *X. citri* (IC1733) e *X. citri* (IC1647).

Atualmente, não existem trabalhos na literatura que avaliem a atividade antibacteriana da própolis brasileira contra *X. citri*. Por essa razão, o presente trabalho é inédito ao avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme do extrato bruto das própolis brasileiras verde, vermelha e marrom frente ao fitopatógeno *X. citri*.

ORDONEZ; ZAMPINI; MORENO e ISLA (2011) testaram a eficácia do extrato de seis amostras de própolis argentina: duas provenientes de Santiago del Estero (S1 e S2), duas de Tucumán (T1 e T2) e duas de Chaco (CH1 e CH2), contra *X. campestris* pvar *vesicatoria* (CECT 792), fitopatógeno da mancha bacteriana, principalmente em tomate. Os resultados de CIM, utilizando microdiluição em caldo, foram 76 µg/mL para S1 e S2; 38 µg/mL para T1 e T2; 152 µg/mL para CH1 e CH2. Neste trabalho, os valores de CIM da PBVM para *X. citri* (IC1733) foi de 62,5 µg/mL e para *X. citri* (IC1647) de 31,25 µg/mL, enquanto da PBVD para *X. citri* (IC1647) foi de 125 µg/mL.

Ao testar a atividade antibacteriana das plantas *Citrus aurantifolia* e *C. aurantium* contra *X. citri* subsp. *citri* (Xcc-KVXCC1), MIRZAEI-NAJAFGHOLI; TARIGHI; GOLMOHAMMADI e TAHERI (2017) obtiveram resultados de 500, 1300, 625, 375, 1000, 900, 850, 8500 µg/mL para os óleos essenciais da *C. aurantifolia*, *C. aurantium* e seus compostos α -terpineol, citral, citronelal, geraniol, linalol, acetato de linalila, respectivamente, no teste de CIM, pelo método de microdiluição em caldo. Neste estudo, o maior valor de CIM foi 2000 µg/mL da PBMA para *X. citri* (IC12). Em continuidade ao trabalho de MIRZAEI-NAJAFGHOLI; TARIGHI; GOLMOHAMMADI e TAHERI (2017), foi realizada também avaliação de CBM com efeito bacteriostático para todas as amostras. No presente estudo, todas as amostras tiveram efeito bactericida frente a *X. citri*.

LI e WANG (2014) obtiveram valores de CIM, por microdiluição em caldo, de 200 µg/mL e 250 µg/mL ao testar a molécula 3-indolilacetônitrila (IAN), adquirida industrialmente (Sigma-Aldrich Co.), para as cepas *X. citri* (306) e *X. citri* (A44), respectivamente. No teste de CIM deste trabalho, a PBVD apresentou resultado de 250 µg/mL para *X. citri* (IC1733) e de 125 µg/mL para *X. citri* (IC1647), enquanto a PBVM apresentou valores de 62,5 µg/mL para *X. citri* (IC1733) e de 31,25 µg/mL para *X. citri* (IC1647).

Ao utilizar a mesma amostra, LI e WANG (2014) ainda observou diminuição de 65% na massa de biofilme para *X. citri* (306) na concentração de 100 µg/mL. No presente estudo, a PBVD inibiu 50% da massa de biofilme na concentração de 15,63 µg/mL para *X. citri* (IC1647), enquanto a PBVM inibiu 50% de massa na concentração de 31,25 µg/mL para *X. citri* (IC1733) e 3,91 µg/mL para *X. citri* (IC1647).

PICCHI; TAKITA; COLETTA-FILHO; MACHADO *et al.* (2016) obtiveram uma diminuição significativa de formação do biofilme ao utilizarem N-acetilcisteína, molécula análoga à cisteína já conhecida por suas atividades antibacteriana e antibiofilme, na concentração de 4000 µg/mL contra *X. citri* (306). Neste estudo, o maior valor de CIMB₅₀ foi de 125 µg/mL da PBVD para *X. citri* (IC1733). Além disso, não houve crescimento de células bacterianas viáveis de *X. citri* (IC1733), tolerante ao cobre, na concentração de 1000 µg/mL da PBVM e de *X. citri* (IC1647), resistente ao cobre, nas concentrações de 1000 µg/mL da PBVD; 500 e 1000 µg/mL da PBVM.

A frequência com que o cobre é utilizado nas plantações pode levar as bactérias fitopatogênicas ao desenvolvimento de mecanismos de resistência (DE FREITAS; UCCI; TEIXEIRA; PEDROSO *et al.*, 2019). Além disso, BEHLAU; CANTEROS; MINSAVAGE; JONES *et al.* (2011) clonaram, sequenciaram e identificaram a cepa *X. citri* (A44) carregando sete genes codificados por plasmídeo, sendo eles copABMGCDF, que codificam proteínas homólogas a proteínas de resistência ao cobre. Ou seja, a resistência ao cobre se dá por fatores: extrínseco, ambiental, pelo uso recorrente do cobre em pesticidas, e intrínseco, genético, à bactéria. No presente estudo, os extratos da PBVM e PBVD apresentaram melhor atividade antibacteriana e antibiofilme frente a *X. citri* (IC1733), tolerante ao cobre, e *X. citri* (IC1647), resistente ao cobre, tendo, portanto, potencial de se tornarem aliadas ao combate a esse fitopatógeno.

As concentrações de 125 µg/mL e 15,63 µg/mL de PBVD, bem como as concentrações de 31,25 µg/mL e 3,91 µg/mL de PBVM obtidas para inibir 50% do biofilme dos isolados 1733 e 1647, respectivamente, foram menores que as concentrações de 250

µg/mL e 125 µg/mL de PBVD, como também 62,5 µg/mL e 31,25 µg/mL de PBVM obtidas no teste de CIM. Levando em consideração que microrganismos produtores de biofilme são mais resistentes a agentes antimicrobianos (STEWART; WILLIAM COSTERTON, 2001), nossos resultados se mostram promissores.

CONCLUSÃO

Os extratos das própolis brasileiras verde e vermelha mostraram atividade antibacteriana e antibiofilme promissora no combate a *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. O extrato da própolis brasileira marrom demonstrou atividade antibacteriana inativa. Ainda assim, mais estudos são necessários para melhor avaliar o potencial biológico dos extratos das própolis brasileiras contra bactérias fitopatogênicas e de uma possível aplicação em pesticidas.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ-MARTINEZ, C. E.; SGRO, G. G.; ARAUJO, G. G.; PAIVA, M. R. N. *et al.* Secrete or perish: The role of secretion systems in *Xanthomonas* biology. **Comput Struct Biotechnol J**, 19, p. 279-302, 2021.
- AN, S. Q.; POTNIS, N.; DOW, M.; VORHOLTER, F. J. *et al.* Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. **FEMS Microbiol Rev**, 44, n. 1, p. 1-32, Jan 1 2020.
- BEHLAU, F.; CANTEROS, B. I.; MINSAVAGE, G. V.; JONES, J. B. *et al.* Molecular characterization of copper resistance genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*. **Appl Environ Microbiol**, 77, n. 12, p. 4089-4096, Jun 2011.
- BOUCHELACHEM, S. Propolis characterization and antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*: A review. **Saudi J Biol Sci**, 29, n. 4, p. 1936-1946, Apr 2022.
- CCANA-CCAPATINTA, G. V.; MEJIA, J. A. A.; TANIMOTO, M. H.; GROPPPO, M. *et al.* *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. and *Symphonia globulifera* L.f.: The Botanical Sources of Isoflavonoids and Benzophenones in Brazilian Red Propolis. **Molecules**, 25, n. 9, Apr 28 2020.
- CHOPRA, B.; DHINGRA, A. K. Natural products: A lead for drug discovery and development. **Phytother Res**, 35, n. 9, p. 4660-4702, Sep 2021.
- DE FREITAS, E. C.; UCCL, A. P.; TEIXEIRA, E. C.; PEDROSO, G. A. *et al.* The copper-inducible *copAB* operon in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* is regulated at transcriptional and translational levels. **Microbiology (Reading)**, 165, n. 3, p. 355-365, Mar 2019.
- EMBRAPA. Cancro cítrico: epidemiologia e controle. Pelotas: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento 2008.
- FREIRES, I. A.; DE ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **Eur J Med Chem**, 110, p. 267-279, Mar 3 2016.
- FUNDECITRUS. **Cancro Cítrico**. 2022. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro>. Acesso em: 23 jun. 2022.
- HARRISON, J. J.; TURNER, R. J.; CERI, H. High-throughput metal susceptibility testing of microbial biofilms. **BMC Microbiol**, 5, p. 53, Oct 3 2005.
- HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G. *et al.* Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.
- IANTAS, J.; SAVI, D. C.; SCHIBELBEIN, R. D. S.; NORILER, S. A. *et al.* Endophytes of Brazilian Medicinal Plants With Activity Against Phytopathogens. **Front Microbiol**, 12, p. 714750, 2021.
- ISPM. Diagnostic protocols for regulated pests. Annex 6: *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Rome: IPPC, FAO. 2014.
- KANASHIRO, A. M.; AKIYAMA, D. Y.; KUPPER, K. C.; FILL, T. P. *Penicillium italicum*: An Underexplored Postharvest Pathogen. **Front Microbiol**, 11, p. 606852, 2020.
- LI, J.; WANG, N. Foliar application of biofilm formation-inhibiting compounds enhances control of citrus canker caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Phytopathology**, 104, n. 2, p. 134-142, Feb 2014.
- LIMA, W. G.; BRITO, J. C. M.; DA CRUZ NIZER, W. S. Bee products as a source of promising therapeutic and chemoprophylaxis strategies against COVID-19 (SARS-CoV-2). **Phytother Res**, 35, n. 2, p. 743-750, Feb 2021.
- MARIN, V. R.; FERRAREZI, J. H.; VIEIRA, G.; SASS, D. C. Recent advances in the biocontrol of *Xanthomonas* spp. **World J Microbiol Biotechnol**, 35, n. 5, p. 72, Apr 22 2019.

- MARTINS, P. M. M.; DE OLIVEIRA ANDRADE, M.; BENEDETTI, C. E.; DE SOUZA, A. A. *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: host interaction and control strategies. **Tropical Plant Pathology**, 45, n. 3, p. 213-236, 2020.
- MIRZAEI-NAJAFGHOLI, H.; TARIGHI, S.; GOLMOHAMMADI, M.; TAHERI, P. The Effect of Citrus Essential Oils and Their Constituents on Growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Molecules**, 22, n. 4, Apr 14 2017.
- NAKAYINGA, R.; MAKUMI, A.; TUMUHAISE, V.; TINZAARA, W. *Xanthomonas* bacteriophages: a review of their biology and biocontrol applications in agriculture. **BMC Microbiol**, 21, n. 1, p. 291, Oct 25 2021.
- ORDONEZ, R. M.; ZAMPINI, I. C.; MORENO, M. I.; ISLA, M. I. Potential application of Northern Argentine propolis to control some phytopathogenic bacteria. **Microbiol Res**, 166, n. 7, p. 578-584, Oct 20 2011.
- PICCHI, S. C.; TAKITA, M. A.; COLETTA-FILHO, H. D.; MACHADO, M. A. *et al.* N-acetylcysteine interferes with the biofilm formation, motility and epiphytic behaviour of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Plant Pathology**, 65, n. 4, p. 561-569, 2016.
- PRZYBYLEK, I.; KARPINSKI, T. M. Antibacterial Properties of Propolis. **Molecules**, 24, n. 11, May 29 2019.
- RODRIGUES, D. M.; DE SOUZA, M. C.; ARRUDA, C.; PEREIRA, R. A. S. *et al.* The Role of *Baccharis dracunculifolia* and its Chemical Profile on Green Propolis Production by *Apis mellifera*. **J Chem Ecol**, 46, n. 2, p. 150-162, Feb 2020.
- SAINI, R. K.; RANJIT, A.; SHARMA, K.; PRASAD, P. *et al.* Bioactive Compounds of Citrus Fruits: A Review of Composition and Health Benefits of Carotenoids, Flavonoids, Limonoids, and Terpenes. **Antioxidants (Basel)**, 11, n. 2, Jan 26 2022.
- SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. How diverse is the chemistry and plant origin of Brazilian propolis? **Apidologie**, 52, n. 6, p. 1075-1097, 2021.
- SANTOS, L. M.; FONSECA, M. S.; SOKOLONSKI, A. R.; DEEGAN, K. R. *et al.* Propolis: types, composition, biological activities, and veterinary product patent prospecting. **J Sci Food Agric**, 100, n. 4, p. 1369-1382, Mar 15 2020.
- SANTOS, M. F. C.; OLIVEIRA, L. C.; RIBEIRO, V. P.; SOARES, M. G. *et al.* Isolation of diterpenes from *Araucaria* sp Brazilian brown propolis and development of a validated high-performance liquid chromatography method for its analysis. **J Sep Sci**, 44, n. 16, p. 3089-3097, Aug 2021.
- SARKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, 42, n. 4, p. 321-324, Aug 2007.
- STEPANOVIC', S.; VUKOVIC', D.; HOLA, V.; BONAVENTURA, G. D. *et al.* Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Journal Compilation**, p. 891-899, 2007.
- STEWART, P. S.; WILLIAM COSTERTON, J. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **The Lancet**, 358, n. 9276, p. 135-138, 2001.
- SUN, L.; NASRULLAH; KE, F.; NIE, Z. *et al.* Citrus Genetic Engineering for Disease Resistance: Past, Present and Future. **Int J Mol Sci**, 20, n. 21, Oct 23 2019.
- USDA. **Citrus Semi-annual**. United States Department of Agriculture SP, Brazil: June 21, 2022, p. 15. 2022. (BR2022-0041).