

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/02/2021.

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**POTENCIAL DE AÇÃO DE COMPOSTOS COMO PROTETIVOS E SANITIZANTES
CONTRA O FITOPATÓGENO *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, CAUSADOR DO
CANCRO CÍTRICO**

CAIO FELIPE CAVICCHIA ZAMUNER

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Meste em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada)

FEVEREIRO - 2019

CAIO FELIPE CAVICCHIA ZAMUNER

**POTENCIAL DE AÇÃO DE COMPOSTOS COMO PROTETIVOS E SANITIZANTES
CONTRA O FITOPATÓGENO *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, CAUSADOR DO
CANCRO CÍTRICO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Meste em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada)

Orientador: Prof. Dr. Henrique Ferreira

Co-orientador: Prof. Dr. Luis Octávio Regasini

Rio Claro

2019

Z26p Zamuner, Caio Felipe Cavicchia
Potencial de ação de compostos como protetivos e sanitizantes contra o fitopatógeno *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, causador do cancro cítrico / Caio Felipe Cavicchia Zamuner. -- Rio Claro, 2019
68 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Henrique Ferreira
Coorientador: Luis Octávio Regasini

1. Cancro (Fitopatologia). 2. Antimicrobianos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: POTENCIAL DE AÇÃO DE COMPOSTOS PROTETIVOS E SANITIZANTES
CONTRA O FITOPATÓGENO *Xanthomonas citri* subsp. *citri* NO COMBATE
AO CANCRO CÍTRICO

AUTOR: CAIO FELIPE CAVICCHIA ZAMUNÉR
ORIENTADOR: HENRIQUE FERREIRA
COORIENTADOR: LUIS OCTÁVIO REGASINI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA), área: Microbiologia Aplicada pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro

Prof. Dr. FRANKLIN BEHLAU
Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento / FUNDECITRUS

Profa. Dra. KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES
Departamento de Biologia / IB Rio Claro

Rio Claro, 28 de fevereiro de 2019

Título alterado para: "POTENCIAL DE AÇÃO DE COMPOSTOS COMO PROTETIVOS E
SANITIZANTES CONTRA O FITOPATÓGENO *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, CAUSADOR DO
CANCRO CÍTRICO"

A minha família e minha companheira, dedico

AGRADECIMENTOS

A minha família por todo suporte durante minha formação e apoio incondicional durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

A minha companheira de jornada, Carolina, há mais de 10 anos ao meu lado me aturando, apoiando e fazendo minha vida mais feliz.

Agradeço a todos meus amigos que me acompanharam e me apoiaram intelectualmente e principalmente, psicologicamente durante todo o processo: Marin, Carolina, Bigo, Branca, Reto, Ina, compartilhando alegrias e frustrações.

Agradeço a todo o pessoal do nosso grupo no LGB (Guilherme, Leonardo, Luana, Kenny, Camila, Lúcia, Mário e Natália) pelos ensinamentos, ideias trocadas, ajudas mil e pela convivência.

Agradeço ao Prof. Luís Regasini e todos os seus alunos que me ajudaram muito nas etapas iniciais do trabalho em Rio Preto, em especial a Ana (muito obrigado!), Carlos e Thaíse.

Agradeço ao pessoal da Fundecitrus por todo apoio, em especial Dr. Franklin Behlau e a Tamiris.

Agradeço a todos os companheiros de departamento pelas trocas de conhecimento e ajuda.

Agradeço muito a oportunidade, confiança e tudo o que me foi proporcionado para meu crescimento pessoal e profissional ao Prof. Henrique – principalmente pela paciência e orientação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código do Financiamento 001

Agradeço ao apoio para a realização do presente trabalho da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Processo nº 2017/09233-9

The most merciful thing in the world, I think, is the inability of the human mind to correlate its contents. We live on a placid island of ignorance in the midst of black seas of infinity, and it was not meant that we should voyage far. (The Call of Cthulhu. H. P. Lovecraft, 1928)

SUMÁRIO

CAPÍTULO I: Avaliação da atividade antimicrobiana de flavonoides, terpenóides e ácidos orgânicos sobre <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>.	6
RESUMO	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO	8
1.1 Atividade Antibacteriana dos híbridos de pirazinamida-chalcona, ésteres do ácido vanílico e constituintes de óleos essenciais.....	11
1.1.1 Híbridos de pirazinamida-chalcona	11
1.1.2 Ésteres do Ácido Vanílico.....	12
1.1.3 Constituintes de óleos essenciais	12
OBJETIVOS	13
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1 Síntese dos híbridos de pirazinamida-chalcona	13
2.2 Preparação de Hidrazida do Ácido Pirazinoico	14
2.2.1 Preparação de Chalconas	14
2.2.2 Preparação dos Híbridos PZA-CHA	15
2.2.3 Estruturas dos Híbridos Pirazinamida-Chalcona.....	15
2.3 Síntese dos ésteres do Ácido Vanílico	16
2.4 Constituintes de óleos essenciais.....	18
2.5 Linhagens celulares e condições de crescimento	18
2.6 Avaliação da inibição do crescimento bacteriano pelo método Resazurin Microtiter Assay (REMA) Plate e determinação da porcentagem de inibição de células.....	18
2.7 Avaliação do efeito bactericida dos compostos.....	19
2.8 Modo de ação de Timol e Carvacrol contra <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	20
2.8.1 Ativação da resposta SOS em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	20

2.8.2	Microscopia celular.....	21
2.8.2.1	Análise morfológica.....	21
2.8.2.2	Permeabilidade da membrana celular de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> .	21
2.9	Ensaio de fitotoxicidade.....	22
2.10	Potencial protetivo de Timol e Carvacrol contra o cancro cítrico	23
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
3.1	A Inibição do crescimento bacteriano pelos compostos híbridos de pirazinamida-chalcona.....	24
3.2	Ésteres do ácido vanílico inibem o crescimento de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	24
3.3	Atividade antimicrobiana dos vanilatos contra <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> .	27
3.4	Timol e Carvacrol foram ativos contra <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	29
3.5	Timol e Carvacrol possuem atividade bactericida contra <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	31
3.6	Investigando o modo de ação de Timol e Carvacrol contra <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	33
3.6.1	Não há ativação da resposta SOS em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 pelos compostos Timol e Carvacrol	33
3.6.2	Microscopia Celular	35
3.6.2.1	Os compostos Timol e Carvacrol não alteram a morfologia de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	35
3.6.2.2	Timol e Carvacrol atuam na permeabilização da membrana celular de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	36
3.7	Os compostos Timol e Carvacrol atuam sobre a germinação de <i>Lactuca sativa</i> em concentrações maiores do que a CI_{90}	39
3.8	Timol e Carvacrol não atuam na proteção contra o cancro cítrico	40
4.	CONCLUSÃO	44
5.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

CAPÍTULO II: An organic acid and essential oil based bactericide as an alternative to sodium hypochlorite for post-harvest disinfection of citrus fruit 49

RESUMO	50
ABSTRACT	51
1. INTRODUCTION	52
2. MATERIAL AND METHODS	54
2.1 Sanitizing agents	54
2.2 Bacterial strain and growth conditions	54
2.3 Sensitivity assays	54
2.4 Sanitizing tests.....	55
2.4.1 Preparation of the bacterial suspension and fruit	55
2.4.3 Efficacy of PosFruit in a pilot packing line	55
2.4.4 Assessment of the sanitization efficiency	56
3. RESULTS	57
3.1 PosFruit has bactericidal action against <i>X. citri</i>	57
3.2 PosFruit was efficient to sanitize <i>X. citri</i> under laboratory conditions	58
3.3 PosFruit was efficient to sanitize <i>X. citri</i> in a packing line.....	61
4. DISCUSSION	64
5. CONCLUSION	66
7. REFERENCES	67

CAPÍTULO I: Avaliação da atividade antimicrobiana de flavonoides, terpenóides e ácidos orgânicos sobre *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

RESUMO

A citricultura constitui uma importante atividade econômica no país, com o Brasil sendo o maior produtor de laranja doce no mundo. A produção é ameaçada pelo cancro cítrico asiático, uma doença severa que traz grande prejuízo e leva a necessidade do controle de seu agente causador, a bactéria Gram-negativa *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac). Atualmente não há nenhuma medida curativa para os pomares e a opção é o manejo integrado para evitar o avanço da doença. O único controle químico utilizado no presente é a aplicação de compostos a base de cobre, os quais trazem riscos de contaminação ao solo e de mananciais de água. Desta forma, estratégias alternativas de controle são essenciais para manter a citricultura brasileira competitiva no mercado. Compostos derivados do metabolismo vegetal tais como os flavonoides, ácido fenólicos e terpenóides são classes de substâncias com um grande potencial antimicrobiano. Nesse contexto, foi avaliada a ação anti-Xac de compostos híbridos de chalcona, ésteres do ácido vanílico e os monoterpenóides Timol e Carvacrol. No caso dos híbridos de pirazinamida-chalconas, não houve atividade antimicrobiana constatada contra Xac. Para os vanilatos, os compostos de cadeia lateral de 5 até 8 carbonos apresentaram ação anti-Xac, com atividade bacteriostática. Timol e Carvacrol mostraram atividade anti-Xac, uma vez que foram bactericidas a 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Estes terpenóides foram avaliados quanto ao seu modo de ação e apresentaram atividade na permeabilização da membrana de Xac, não agindo sobre a divisão/segregação ou causando danos ao DNA. Timol e Carvacrol apresentam baixa fitotoxicidade em sementes de *Lactuca sativa* até 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os ensaios protetivos em mudas de *Citrus sinensis* não indicaram ação mais eficaz para Timol e Carvacrol frente ao oxicleto de cobre.

Palavras-chave: Cancro cítrico. *Xanthomonas*. Citricultura. Antimicrobianos.

ABSTRACT

Citriculture has great importance to Brazil's economy, with the country occupying the post of the largest sweet orange producer in the world. This production is threatened by Asiatic citrus canker, a crop disease which causes great losses in production and fruit quality. Because of these problems, there is a need to manage its causal agent – the Gram-negative bacteria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac). Nowadays there are no curative measure to surpass the disease in the orchards and the only option is the integrated management to avoid its spread. The only chemical control used in this strategy is based on copper, which is associated with soil and water springs contamination. For that reason, new alternative control strategies become essential to maintain the Brazilian citriculture competitive in the market. Compounds derived from plants metabolism such as flavonoids, phenolic acids and terpenoids are interesting substances with antimicrobial proprieties. In this context, we evaluated the anti-Xac action of hybrid chalcone compounds, vanillic acid esters and monoterpenoids (Thymol and Carvacrol). The pyrazinamide-chalcone hybrids showed no antimicrobial activity against Xac. In the case of the vanillic acid esters, synthetic compounds with a side chain structure composed of 5 to 8 carbons presented an bacteriostatic anti-Xac activity. Compounds Thymol and Carvacrol also showed anti-Xac action, once this compounds were bactericidal at 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. These terpenoids were evaluated for its mode of action in Xac and showed action in the membrane permeabilization, not affecting cell division/segregation nor damaging DNA. Furthermore, Thymol and Carvacrol presented low phytotoxicity until 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in *Lactuca sativa* seeds. Protective assays in *Citrus sinensis* did not indicate a great efficiency for this monoterpenoids when compared to the commercial product based on copper oxychloride. Nevertheless, considering the promising antimicrobial activity found against Xac for Thymol and Carvacrol, it may be interesting compounds for further developments in applied formulations.

Keywords: Citrus canker. *Xanthomonas*. Citriculture. Antimicrobials.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de laranja no mundo, exportando o suco da fruta processado, regularmente, para 20 países. No ano 2015/16, 75,3% da participação do país nas exportações mundiais foi estimada pelo USDA (BRASIL, 2017) e os números médios mostram que somente o estado de São Paulo é responsável por cerca de 92% de toda a produção de suco nacional (USDA, 2018). A citricultura movimenta milhões de reais anualmente com exportações e gera empregos de maneira direta ou indireta. Desta forma, há uma grande preocupação com as pragas e doenças que afetam o cultivo, uma vez que foram erradicadas 40 milhões de árvores na década passada (NEVES et al., 2010) acarretando em grandes prejuízos para o setor.

Entre tais pragas está o cancro cítrico, uma doença severa que está presente nas áreas de maior produção cítrica no mundo, sendo o cancro cítrico asiático (Cancro A) o tipo mais disperso (GOTTWALD et al., 2002). Tal doença é causada pela bactéria Gram-negativa *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) (SCHAAD et al., 2006) e é caracterizada pelo aparecimento de sintomas típicos, como o surgimento de lesões necróticas, que mancham folhas, frutos e galhos jovens de plantas suscetíveis, podendo afetar todos os tecidos aéreos vegetais. A infecção bacteriana prolongada leva à queda prematura dos frutos, perda das folhas e deterioração dos brotos, debilitando a planta e provocando uma redução direta na qualidade dos frutos e seu rendimento. Além disso, a imposição de restrições em exportações e quarentena nas áreas afetadas, gera grande impacto socioeconômico e político, devido ao padrão de qualidade que demanda o mercado e pela possibilidade de transmissão de inóculos da bactéria (GOTTWALD et al., 2002; GRAHAM et al., 2004)

A infecção por *X. citri* ocorre com a invasão do patógeno pelos estômatos ou através de ferimentos provocados na planta (GOTTWALD & GRAHAM, 1992; GRAHAM et al., 2004). A bactéria se propaga nos tecidos e, com a presença de umidade na região lesionada, é exsudada, possibilitando sua dispersão (GOTTWALD et al., 2002; FAVARO et al., 2017). Fatores ecológicos como chuvas e ventos, podem agravar a infecção, uma vez que, carregam a bactéria a curtas/médias distâncias, sendo que a dispersão regional da doença geralmente envolve movimentação humana de material vegetal e equipamento contaminado (GRAHAM et al., 2004). Quando se encontra em novo hospedeiro, *X. citri* multiplica-se sobre as superfícies

(epifiticamente), formando um biofilme, processo este precede à colonização dos tecidos vegetais (RIGANO et al., 2007; FAVARO et al., 2014). No desenvolvimento da doença, há uma alteração na transcrição de vários genes vegetais associados à divisão e crescimento celular, biossíntese de ribossomos, formação da parede celular vegetal, transporte de vesículas, além da biossíntese e mobilização de hormônios vegetais (CERNADAS et al., 2008). Tais alterações transcricionais levam à hiperplasia e hipertrofia das células vegetais, ação atribuída à proteína PthA. Esta proteína pertence à família AvrBs3/PthA (efetores TAL) e é translocada pelo sistema de secreção do tipo III bacteriano para a célula vegetal hospedeira. Na célula vegetal ela age como um ativador transcricional provocando a formação do cancro (DOMINGUES et al., 2010).

O agente causal do cancro foi identificado em 1957 na região de Presidente Prudente, SP (BITANCOURT, 1957). Desde então, para evitar o estabelecimento e reduzir os danos causados pela doença em diferentes regiões do estado, estratégias de controle se baseavam na eliminação de *X. citri* através do uso de diferentes protocolos de erradicação das árvores infectadas. O programa de erradicação de plantas aplicado no estado de São Paulo entre os anos de 1999 a 2009, é considerado ainda o método de controle que foi o mais eficaz para se conter o avanço da doença. Neste período, a legislação ditava que a totalidade de plantas presentes em um talhão, deveria ser removida caso a incidência de contaminação pela bactéria fosse superior a 0,5% (BELASQUE JUNIOR et al., 2010; BEHLAU et al., 2016). Tal método foi importante no controle do cancro após a introdução da larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*) que provoca lesões nos tecidos vegetais e favorecia a colonização por *Xanthomonas* (CHAGAS et al., 2001)

A partir de 2009 a legislação no estado foi alterada, havendo um abrandamento no programa de erradicação. A obrigatoriedade de se erradicar a totalidade de plantas do talhão foi abandonada e a remoção deixou de considerar o índice de incidência da doença. Passou-se a adotar um raio de 30 metros como parâmetro para a erradicação das plantas a partir da contaminação. Mais uma vez no final de 2013 houve um novo relaxamento na lei, que passou a exigir apenas a remoção de plantas sintomáticas no entorno do foco da doença (e não mais incluía a remoção das plantas assintomáticas). Os sucessivos abrandamentos no programa acarretaram em um aumento da incidência do cancro (BELASQUE JUNIOR et al., 2010; BEHLAU et al., 2016). Segundo BEHLAU *et al.* (2016), a metodologia de erradicação cumpriu seu papel na

proteção dos interesses econômicos associados ao cultivo no estado de São Paulo e sua manutenção não é mais uma opção viável devido ao constante aumento na incidência do cancro. Desde 2017 foi adotado em áreas endêmicas da doença o sistema de controle por manejo integrado. Tal método inclui uso de barreiras de quebra-vento, plantio de cultivares mais resistentes, tratamentos com inseticidas para a redução dos danos da larva mineradora e aplicações de compostos bactericidas a base de cobre (LEITE & MOHAN, 1990; SILVA et al., 2013; FERENCO et al., 2018)

Em 6 de março de 2017, entrou em vigor a nova instrução normativa (MAPA I.N. nº 37 de 5 de setembro de 2016) sobre o controle da doença no Brasil, na qual o Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) permite que as Unidades Federativas definam, dentre quatro métodos, quais dos procedimentos serão seguidos. No estado de São Paulo o Sistema de Mitigação de Risco (SMR) já foi oficializado e tem como objetivos: (i) a redução potencial de inóculo em áreas sem a ocorrência da praga; (ii) a permissão do trânsito para outros estados de frutos vindos de áreas de ocorrência da praga e (iii) permitir a exportação de frutos cítricos de áreas afetadas para países que reconheçam o SMR como medida fitossanitária. A normativa prevê métodos como o uso de cultivares menos suscetíveis; destruição de frutos contaminados; tratamentos fitossanitários preventivos; manejo da larva minadora; desinfecção de ferramentas e máquinas e o uso de quebra ventos, tais quais as já utilizadas nas áreas endêmicas. Em junho de 2018 a IN nº 21 revogou a IN nº 37 de 2016, mantendo as categorias (área com praga ausente, área livre de praga, área sob SMR e área sob erradicação, porém traz mudanças para o SMR e as áreas de erradicação). Nas áreas cadastradas sob o sistema de mitigação, fica permitido que os frutos com cancro colhidos em talhões de até 1% de frutos sintomáticos, possam ser removidos na *packing house* e destinados a indústria de suco. Fica permitido também que os frutos produzidos em áreas de SMR possam ser processados em estados vizinho, desde que adote o mesmo sistema. Ainda, podem ser reconhecidas propriedades sem cancro cítrico dentro do SMR, mas que ainda necessitam adotar as medidas integradas. Para as áreas sob o sistema de erradicação, ficam disponíveis duas ações possíveis: eliminar as plantas doentes e pulverizar cobre em um raio de 30 metros, com a exigência de inspeções mensais, ou ainda, erradicar a planta doente e todas plantas no raio de 30 metros, com inspeções a cada 60 dias. (FUNDECITRUS, 2018).

No manejo integrado, os custos para o controle da doença são elevados, já que diferentes frentes devem ser trabalhadas para prevenir a expansão de Xac. Fica claro que estratégias alternativas de controle são uma importante demanda para manter a citricultura brasileira competitiva.

Nesse contexto, novas alternativas já vêm sendo estudadas como forma de minimizar os prejuízos. A resistência sistêmica adquirida em plantas é uma opção para outras doenças bacterianas em algumas espécies vegetais (LOUWS et al., 2001; OBRADOVIC et al., 2004; PRADHANANG et al., 2005) porém não mostrou-se efetiva no controle do cancro cítrico (GRAHAM & LEITE, 2004). Ainda, estudos como o de BALOGH et al. (2008) vem considerando o controle da doença através do uso de bacteriófagos, porém sua eficiência é mais baixa quando comparada a aplicação de cobre e sua viabilidade comercial também precisa ser melhor avaliada. A busca por compostos alternativos eficientes tem mostrado resultados promissores, como mostram os estudos e colaborações do nosso grupo na avaliação da ação anti-Xac dos compostos sintéticos de galatos alquila (SILVA et al., 2013; KROL et al., 2015). Sendo assim, o presente trabalho visou avaliar a ação de compostos de interesse ao nosso grupo de pesquisa, frente a *Xanthomonas*, na busca de novas alternativas para o controle do cancro cítrico.

1.1 Atividade Antibacteriana dos híbridos de pirazinamida-chalcona, ésteres do ácido vanílico e constituintes de óleos essenciais.

1.1.1 Híbridos de pirazinamida-chalcona

A pirazinamida é uma molécula que possui uma atividade biológica antibacteriana e é atualmente utilizada como um dos medicamentos na ação contra o bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. A substância é utilizada em conjunto com outros antibióticos no tratamento da tuberculose, pois seu uso isolado leva ao rápido desenvolvimento de resistência. Acredita-se que a ação da pirazinamida se dê pela conversão da molécula em ácido pirazinoico pela ativação de uma amidase específica em organismos suscetíveis. Os ésteres derivados mostram grande atividade contra uma variedade de organismos do gênero *Mycobacterium* e são considerados potenciais pró-fármacos (SEITZ et al., 2002).

As chalconas são precursores na síntese dos flavonoides, pigmentos encontrados em plantas e que constituem uma importante classe de compostos naturais orgânicos heterocíclicos. Tal grupo possui diversos efeitos biológicos, podendo agindo na inibição de enzimas virais, como bactericidas e antiprotozoários (HAVSTEEN, 2002). A estrutura da molécula de chalcona tem gerado interesse no desenvolvimento de novas substâncias com atividades biológicas. A estruturação de compostos baseada em chalconas vem mostrando uma gama de ações biológicas, incluindo atividades antimicrobianas em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (*Staphylococcus aureus* e *Helicobacter pylori*, respectivamente) (NIELSEN et al., 2004; CUSHNIE & LAMB, 2011).

1.1.2 Ésteres do Ácido Vanílico

Os ácidos fenólicos são metabólitos secundários que ocorrem naturalmente na maioria dos organismos vegetais e os efeitos biológicos como de ação anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, anti-aterogênese, antibacteriana e anti-carcinogênica, já foram reportadas (MERKL *et al.*, 2010). O ácido vanílico é uma substância que possui tal estrutura, de um ácido monofenólico, com um grupo metoxila presente na posição meta do anel aromático. CUVELIER *et al.* (1992) descreve que há uma relação entre a estrutura molecular e atividade antioxidante dos ácidos fenólicos. Ainda, o estudo mostra que há um aumento na atividade antioxidante dos ácidos que possuem um segundo grupo hidroxila no anel aromático e, para os ácidos monofenólicos, a presença de um ou dois radicais metoxilas contribui consideravelmente para tal aumento.

Considerando a diversa gama de atividade biológicas que essas substâncias têm mostrado, possuem o potencial de atuação como compostos antimicrobianos frente à *Xanthomonas*. A esterificação e alteração no tamanho das cadeias laterais é um fator interessante para ser avaliado, pois pode alterar o nível de atividade dos derivados destes ácidos (MERKL *et al.*, 2010).

1.1.3 Constituintes de óleos essenciais

Os óleos essenciais têm em sua composição uma mistura complexa de compostos oleosos obtidos a partir de material vegetal como flores, brotos, folhas,

sementes, galhos, frutas e raízes, a partir, principalmente da técnica de arraste a vapor (BURT, 2004; BIZZO et al., 2009). As principais substâncias encontradas são geralmente mono e sesquiterpenos (com 10 e 15 carbonos, respectivamente) compostos apenas por carbono e hidrogênio, assim como fenilpropanóides (BIZZO et al., 2009).

Tais óleos são empregados na indústria como aromatizantes, fixadores de fragrâncias e medicamentos (CRAVEIRO & QUEIROZ, 1993) e suas propriedades antimicrobianas tem sido exploradas em diversas formulações comerciais, principalmente na suplementação de alimentos visando sua conservação (BAJPAI et al., 2011).

As espécies vegetais *Origanum vulgare* L. (orégano) e *Thymus vulgaris* L. (tomilho) possuem óleos essenciais com potencial antimicrobiano testado frente a diversas espécies de microrganismos, como mostram os trabalhos de BHASKARA REDDY et al. (1998) para tomilho e como o de (KOTAN et al., 2010) que mostra a ação antimicrobiana dos principais compostos encontrados no óleos do orégano e do tomilho. Apesar mostrar o potencial dos compostos como o timol e o carvacrol quanto sua ação frente à diversas espécies do gênero *Xanthomonas*, o trabalho não inclui a bactéria causadora do cancro cítrico asiático: *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. (Xac). Ainda, um estudo realizado por SHIMADA et al. (2014), sugere que a resistência de diversas plantas cítricas à Xac pode estar relacionada com a maior produção de linalol, principal componente do óleo essencial extraído de citros. Desse modo, os constituintes dos óleos essenciais podem ser potenciais fontes para a obtenção de compostos com ação anti-Xac.

4. CONCLUSÃO

Os híbridos de pirazinamida-chalcona sintetizados, apesar de apresentarem potencial como antimicrobianos, não foram ativos contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. No caso do vanilatos, a ação anti-Xac foi identificada para os ésteres a partir de cinco até oito carbonos na cadeia lateral, porém todos os compostos ativos apresentaram baixa atividade e de ação bacteriostática. Para os constituintes dos óleos essenciais, Timol e Carvacrol mostraram-se promissores exibindo ação anti-Xac. Tais compostos apresentaram uma atividade de permeabilização da membrana bacteriana e baixa fitotoxicidade na CI₉₀. Entretanto, os testes protetivos não evidenciaram o potencial de uso de Timol e Carvacrol por aspensão diretamente nas plantas, já que não houve efetividade na proteção contra o cancro quando comparados ao produto comercial a base de cobre.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMRI, A.; HAMROUNI, L.; HANANA, M.; JAMOSSI, B. Reviews on phytotoxicity effects of essential oils and their individual components: new approach for weeds management. **Internacional Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, v. 4, n. 1, p. 96 - 114, 2013.

ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Plant bioassays to assess toxicity of textile sludge compost. **Scientia Agricola**, v. 62, n. 3, p. 286-290, 2005.

BAJPAI, V. K.; KANG, S.-R.; XU, H.; LEE, S.-G.; BAEK, K.-H.; KANG, S.-C. Potential Roles of Essential Oils on Controlling Plant Pathogenic Bacteria *Xanthomonas* Species: A Review. **The Plant Pathology Journal**, v. 27, n. 3, p. 207-224, 2011.

BALOGH, B.; CANTEROS, B. I.; STALL, R. E.; JONES, J. B. Control of Citrus Canker and Citrus Bacterial Spot with Bacteriophages. **Plant Disease**, v. 92, n. 7, p. 1048-1052, 2008.

BEHLAU, F.; BELASQUE, J.; BERGAMIN FILHO, A.; GRAHAM, J. H.; LEITE, R. P.; GOTTWALD, T. R. Copper sprays and windbreaks for control of citrus canker on young orange trees in southern Brazil. **Crop Protection**, v. 27, n. 3-5, p. 807-813, 2008.

BEHLAU, F.; BELASQUE, J.; GRAHAM, J. H.; LEITE, R. P. Effect of frequency of copper applications on control of citrus canker and the yield of young bearing sweet orange trees. **Crop Protection**, v. 29, n. 3, p. 300-305, 2010.

BEHLAU, F.; FONSECA, A. E.; BELASQUE, J. A comprehensive analysis of the Asiatic citrus canker eradication programme in São Paulo state, Brazil, from 1999 to 2009. **Plant Pathology**, v. 65, n. 8, p. 1390-1399, 2016.

BELASQUE JUNIOR, J.; BARBOSA, J. C.; BERGAMIN FILHO, A.; MASSARI, C. A. Prováveis consequências do abrandamento da metodologia de erradicação do cancro cítrico no Estado de São Paulo. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 5, p. 314-317, 2010.

BHASKARA REDDY, M. V.; ANGERS, P.; GOSSELIN, A.; ARUL, J. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. **Phytochemistry**, v. 47, n. 8, p. 1515-1520, 1998.

BITANCOURT, A. A. O cancro cítrico. **Biologico**, v. 23, p. 101-111, 1957.

BIZZO, H. B.; HOVELL, A. M.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588 - 594, 2009.

BRASIL. **Projeções do Agronegócio**. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A.: 103 p. 2017.

BUKHARI, A. P. D. S. N. A.; JASAMAI, M.; JANTAN, I. **Review of Methods and Various Catalysts Used for Chalcone Synthesis**. 2013. 73-83

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. **Int J Food Microbiol**, v. 94, n. 3, p. 223-53, Aug 1 2004.

CERNADAS, R. A.; CAMILLO, L. R.; BENEDETTI, C. E. Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. citri and *Xanthomonas axonopodis* pv. aurantifolii. **Mol Plant Pathol**, v. 9, n. 5, p. 609-31, Sep 2008.

CHAGAS, M. C. M.; PARRA, J. R. P.; NAMEKATA, T.; HARTUNG, J. S.; YAMAMOTO, P. *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) and its

relationship with the citrus canker bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* in Brazil. **Neotrop. Entomol.**, v. 30, n. 1, p. 55-59, 2001.

CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, D. C. <1993_Craveiro_Oleos essencias e quimica fina.pdf>. **Química Nova**, v. 16, n. 3, p. 224 - 228, 1993.

CUSHNIE, T. P.; LAMB, A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **Int J Antimicrob Agents**, v. 38, n. 2, p. 99-107, Aug 2011.

CUVELIER, M.-E.; RICHARD, H.; BERSET, C. Comparison of the Antioxidative Activity of Some Acid-phenols: Structure-Activity Relationship. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 56, n. 2, p. 324-325, 1992.

DI PASQUA, R.; BETTS, G.; HOSKINS, N.; EDWARDS, M.; ERCOLINI, D.; MAURIELLO, G. Membrane Toxicity of Antimicrobial Compounds from Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 12, p. 4863-4870, 2007/06/01 2007.

DOMINGUES, M. N.; DE SOUZA, T. A.; CERNADAS, R. A.; DE OLIVEIRA, M. L.; DOCENA, C.; FARAH, C. S.; BENEDETTI, C. E. The *Xanthomonas citri* effector protein PthA interacts with citrus proteins involved in nuclear transport, protein folding and ubiquitination associated with DNA repair. **Mol Plant Pathol**, v. 11, n. 5, p. 663-75, Sep 2010.

FAVARO, M. A.; MICHELOUD, N. G.; ROESCHLIN, R. A.; CHIESA, M. A.; CASTAGNARO, A. P.; VOJNOV, A. A.; GMITTER, F. G., JR.; GADEA, J.; RISTA, L. M.; GARIGLIO, N. F.; MARANO, M. R. Surface barriers of mandarin 'okitsu' leaves make a major contribution to canker disease resistance. **Phytopathology**, v. 104, n. 9, p. 970-6, Sep 2014.

FAVARO, M. A.; ROESCHLIN, R. A.; RIBERO, G. G.; MAUMARY, R. L.; FERNANDEZ, L. N.; LUTZ, A.; SILLON, M.; RISTA, L. M.; MARANO, M. R.; GARIGLIO, N. F. Relationships between copper content in orange leaves, bacterial biofilm formation and citrus canker disease control after different copper treatments. **Crop Protection**, v. 92, p. 182-189, 2017.

FERENCE, C. M.; GOCHEZ, A. M.; BEHLAU, F.; WANG, N.; GRAHAM, J. H.; JONES, J. B. Recent advances in the understanding of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* pathogenesis and citrus canker disease management. **Mol Plant Pathol**, v. 19, n. 6, p. 1302-1318, Jun 2018.

GOTTWALD, T.; GRAHAM, J. **A Device for Precise and Nondisruptive Stomatal Inoculation of Leaf Tissue with Bacterial Pathogens.** *Phytopathology*. 82: 930-935 p. 1992.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; SCHUBERT, T. S. Citrus Canker : The Pathogen and Its Impact Plant Health Progress Plant Health Progress. **Plant Management Network.**, v. 1993, p. 48824, 2002.

GRAHAM, J. H.; DEWDNEY, M. M.; MYERS, M. E. **Streptomycin and copper formulations for control of citrus canker on grapefruit.** 2010. 92-99

GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; CUBERO, J.; ACHOR, D. S. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. **Mol Plant Pathol**, v. 5, n. 1, p. 1-15, Jan 1 2004.

GRAHAM, J. H.; LEITE, R. P. Lack of Control of Citrus Canker by Induced Systemic Resistance Compounds. **Plant Disease**, v. 88, n. 7, p. 745-750, 2004.

GROVER, G.; KINI, S. G. Synthesis and evaluation of new quinazolone derivatives of nalidixic acid as potential antibacterial and antifungal agents. **Eur J Med Chem**, v. 41, n. 2, p. 256-62, Feb 2006.

GUARDA, A.; RUBILAR, J. F.; MILTZ, J.; GALOTTO, M. J. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. **Int J Food Microbiol**, v. 146, n. 2, p. 144-50, Mar 30 2011.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol Ther**, v. 96, n. 2-3, p. 67-202, Nov-Dec 2002.

HERNANDEZ-HERNANDEZ, E.; REGALADO-GONZALEZ, C.; VAZQUEZ-LANDAVERDE, P.; GUERRERO-LEGARRETA, I.; GARCIA-ALMENDAREZ, B. E. Microencapsulation, chemical characterization, and antimicrobial activity of Mexican (*Lippia graveolens* H.B.K.) and European (*Origanum vulgare* L.) oregano essential oils. **ScientificWorldJournal**, v. 2014, p. 641814, 2014.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Front Microbiol**, v. 3, p. 12, 2012.

KOTAN, R.; CAKIR, A.; DADASOGLU, F.; AYDIN, T.; CAKMAKCI, R.; OZER, H.; KORDALI, S.; METE, E.; DIKBAS, N. Antibacterial activities of essential oils and extracts of Turkish *Achillea*, *Satureja* and *Thymus* species against plant pathogenic bacteria. **J Sci Food Agric**, v. 90, n. 1, p. 145-60, Jan 15 2010.

KROL, E.; DE SOUSA BORGES, A.; DA SILVA, I.; POLAQUINI, C. R.; REGASINI, L. O.; FERREIRA, H.; SCHEFFERS, D. J. Antibacterial activity of alkyl gallates is a combination of direct targeting of FtsZ and permeabilization of bacterial membranes. **Front Microbiol**, v. 6, p. 390, 2015.

LEITE, R. P.; MOHAN, S. K. Integrated management of the citrus bacterial canker disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in the State of Paraná, Brazil. **Crop Protection**, v. 9, n. 1, p. 3-7, 1990.

LI, J.; WANG, N. The *gpsX* gene encoding a glycosyltransferase is important for polysaccharide production and required for full virulence in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **BMC Microbiol**, v. 12, p. 31, Mar 9 2012.

LI, J.; WANG, N. Foliar application of biofilm formation-inhibiting compounds enhances control of citrus canker caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Phytopathology**, v. 104, n. 2, p. 134 - 142, 2014.

LOUWS, F. J.; WILSON, M.; CAMPBELL, H. L.; CUPPELS, D. A.; JONES, J. B.; SHOEMAKER, P. B.; SAHIN, F.; MILLER, S. A. Field Control of Bacterial Spot and Bacterial Speck of Tomato Using a Plant Activator. **Plant Disease**, v. 85, n. 5, p. 481-488, 2001.

MERKL, R.; HRÁDKOVÁ, I.; FILIP, V.; ŠMIDRKAL, J. Antimicrobial and Antioxidant Properties of Phenolic Acids Alkyl Esters. v. 28, p. 275-279, 2010.

MORAES, J. R.; BIDOIA, E. D. Colour Degradation of Simulated Textile Effluent by Electrolytic Treatment and Ecotoxicological Evaluation. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, n. 12, p. 1 - 6, 2015.

MORÃO, L. G.; POLAQUINI, C. R.; KOPACZ, M.; TORREZAN, G. S.; AYUSSO, G. M.; DILARRI, G.; CAVALCA, L. B.; ZIELINSKA, A.; SCHEFFERS, D. J.; REGASINI, L. O.; FERREIRA, H. A simplified curcumin targets the membrane of *Bacillus subtilis*. **Microbiologyopen**, p. e00683, Jul 26 2018.

MORÃO, L. G.; SUMARES, J. A.; MARTINS, P. M.; MARTINS, D. A.; GOMES, E.; BELASQUE, J., JR.; FERREIRA, H. Temperature stress promotes cell division arrest in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Microbiologyopen**, v. 5, n. 2, p. 244-53, Apr 2015.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. O retrato da citricultura brasileira. p. 138, 2010.

NIELSEN, S. F.; BOESEN, T.; LARSEN, M.; SCHONNING, K.; KROMANN, H. Antibacterial chalcones--bioisosteric replacement of the 4'-hydroxy group. **Bioorg Med Chem**, v. 12, n. 11, p. 3047-54, Jun 1 2004.

OBRADOVIC, A.; JONES, J. B.; MOMOL, M. T.; BALOGH, B.; OLSON, S. M. Management of Tomato Bacterial Spot in the Field by Foliar Applications of Bacteriophages and SAR Inducers. **Plant Disease**, v. 88, n. 7, p. 736-740, 2004.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 8, p. 2720-2, Aug 2002.

PRADHANANG, P. M.; JI, P.; MOMOL, M. T.; OLSON, S. M.; MAYFIELD, J. L.; JONES, J. B. Application of Acibenzolar-S-Methyl Enhances Host Resistance in Tomato Against *Ralstonia solanacearum*. **Plant Disease**, v. 89, n. 9, p. 989-993, 2005.

RIGANO, L. A.; SICILIANO, F.; ENRIQUE, R.; SENDIN, L.; FILIPPONE, P.; TORRES, P. S.; QUESTA, J.; DOW, J. M.; CASTAGNARO, A. P.; VOJNOV, A. A.; MARANO, M. R. Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 20, n. 10, p. 1222-30, Oct 2007.

SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P. E.; STROMBERG, V. K.; VIDAVER, A. K. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Syst Appl Microbiol**, v. 29, n. 8, p. 690-5, Dec 2006.

SEITZ, L. E.; SULING, W. J.; REYNOLDS, R. C. Synthesis and Antimycobacterial Activity of Pyrazine and Quinoxaline Derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 25, p. 5604-5606, 2002.

SHIMADA, T.; ENDO, T.; FUJII, H.; RODRIGUEZ, A.; PENA, L.; OMURA, M. Characterization of three linalool synthase genes from Citrus unshiu Marc. and analysis of linalool-mediated resistance against *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Penicillium italicum* in citrus leaves and fruits. **Plant Sci**, v. 229, p. 154-166, Dec 2014.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 2, p. 201-222, 1995.

SILVA, I. C.; REGASINI, L. O.; PETRONIO, M. S.; SILVA, D. H.; BOLZANI, V. S.; BELASQUE, J., JR.; SACRAMENTO, L. V.; FERREIRA, H. Antibacterial activity of alkyl gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **J Bacteriol**, v. 195, n. 1, p. 85-94, Jan 2013.

TOMAZELLI JUNIOR, O.; KUHN, F.; PADILHA, P. J. M.; VICENTE, L. R. M.; COSTA, S. W.; BOLIGON, A. A.; SCAPINELLO, J.; NESI, C. N.; DAL MAGRO, J.; CASTELLVI, S. L. Microencapsulation of essential thyme oil by spray drying and its antimicrobial evaluation against *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*. **Braz J Biol**, v. 78, n. 2, p. 311-317, May 2018.

USDA. **GAIN Report: Brazil citrus semi-annual**. SERVICE, U. F. A.: 11 p. 2018.

YUSUF, M.; JAIN, P. Synthetic and biological studies of pyrazolines and related heterocyclic compounds. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 7, n. 5, p. 553-596, 2014.