

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 19/07/2020



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

ANA CAROLINA NAZARÉ

**Preparação e Avaliação de Diidroxibenzoatos de Alquila contra
Xanthomonas citri subsp. *citri* e no controle do Cancro Cítrico**

São José do Rio Preto
2019

ANA CAROLINA NAZARÉ

**Preparação e Avaliação de Diidroxibenzoatos de Alquila contra
Xanthomonas citri subsp. *citri* e no controle do Cancro Cítrico**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Processo 2015/08089-6

Orientador: Prof. Dr. Luis Octávio Regasini
Coorientador: Prof. Dr. Henrique Ferreira e
Prof. Dr. José Belasque Jr.

São José do Rio Preto
2019

N335p Nazaré, Ana Carolina
Preparação e Avaliação de Diidroxibenzoatos de Alquila contra
Xanthomonas citri subsp. citri e no controle do Cancro Cítrico / Ana Carolina
Nazaré. -- São José do Rio Preto, 2019
185 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de
Bióciências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto
Orientador: Luis Octávio Regasini
Coorientador: Henrique Ferreira

1. fitobacterioses. 2. compostos fenólicos. 3. ésteres alquílicos. 4.
Xanthomonas. 5. doenças citrícolas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

ANA CAROLINA NAZARÉ

**Preparação e Avaliação de Diidroxibenzoatos de Alquila contra
Xanthomonas citri subsp. *citri* e no controle do Cancro Cítrico**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Processo 2015/08089-6

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Luis Octávio Regasini
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Profa. Dra. Rosana Marta Kolb
UNESP – Assis

Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins
UFU – Uberlândia

Profa. Dra. Vera Aparecida de Oliveira Tiera
UNESP – São José do Rio Preto

Dra. Janaina de Cássia Orlandi Sardi
UNICAMP – Piracicaba

São José do Rio Preto
19 de julho de 2019

Dedico este trabalho à minha família,
em especial meus pais **Elaine Borsari Nazaré** e **Nilton Nazaré**,
ao meu irmão **Eduardo Nazaré**
e ao meu companheiro de vida **Maicon Segalla Petrônio**.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que se dedicaram e trabalharam muito para que eu pudesse estudar. Obrigada pelo esforço diário, pela educação que me proporcionaram não só no âmbito do conhecimento intelectual, mas também no quesito pessoal. Obrigada pelo apoio em minhas decisões e por me mostrarem que sou capaz.

À minha família, muito obrigada pelo carinho, afeto, amor, respeito e por entenderem que nem sempre posso estar presente fisicamente.

Ao meu companheiro de vida Maicon Segalla Petrônio, obrigada pela parceria, atenção, dedicação, carinho, amor, respeito, cumplicidade e pelas conversas sobre tudo, por me compreender tão bem e por me apoiar em todas as minhas decisões e indecisões. Você é parte fundamental nas minhas escolhas!

Ao meu orientador Prof. Dr. Luis Octávio Regasini pela oportunidade oferecida, por confiar em minha capacidade, por disponibilizar de seu tempo e laboratório para que eu pudesse desenvolver este trabalho, obrigada por todos os ensinamentos e puxões de orelha, obrigada pelo comprometimento ao longo destes anos de meu doutoramento. Obrigada por sempre me desafiar e por me fazer enxergar novas possibilidades! Agradeço por poder participar de um grupo tão colaborativo que me fez crescer pessoal e intelectualmente.

Aos professores Dr. Henrique Ferreira e Dr. José Belasque Jr. pela coorientação neste trabalho. Meus sinceros agradecimentos ao Prof. Dr. Henrique Ferreira por ceder seu laboratório, pela confiança, por sua disponibilidade, atenção, por sua paciência e educação, obrigada por me ensinar muito além da microbiologia.

Aos professores, Dr. Dirk-Jan Scheffers, Dra. Eleni Gomes, Dra. Paula Rahal, Dra. Rosana Marta Kolb, Dr. Osmar Malaspina, Dr. Eduardo Alves de Almeida e seus alunos Dra. Aleksandra Zielinska, Me. Diego A. Monteiro, Dra. Marília de Freitas Calmon Saiki, Me. Graciele Fernanda de Souza Pinto, Me. Adna Suelen Dorigo, Dra. Annelise de Souza Rosa-Fontana e Dr. Danilo Grünig Humberto da Silva pela colaboração, atenção e pela ajuda na realização de alguns dos ensaios/análises contidos neste trabalho.

Aos amigos de jornada acadêmica Me. Carlos Roberto Polaquini, Me. Mariana Bastos dos Santos, Me. Daiane Bertolin Anselmo, Caroline Sprengel Lima, Me. Thaíse Borges, Me. Beatriz Carvalho Marques, Me. Gabriela Miranda Ayusso, Me. Mayara Aparecida Rocha Garcia, Me. Laíza Araujo e Me. Guilherme Silva Torrezan, obrigada

aos que embarcaram nas minhas aventuras empreendedoras, por encararem os desafios lado a lado, por compartilhar conhecimento, por me apoiarem, pela convivência sempre tão alegre mesmo nos dias mais cansativos, pela amizade, barzinhos, baladinhas, comilanças e pelas risadas que não foram poucas.

Ao grupo de Rio Claro Me. Lúcia Bonci Cavalca, Me. Caio Zamuner, Me. Kenny Umino Sato, Me. Camila Malvessi, Me. Guilherme Dilarri, Dra. Luana Morão, Dr. Luiz Leonardo Saldanha, por me acolherem e me ensinarem com paciência a rotina de um laboratório de microbiologia, vencer o medo da autoclave foi difícil! Obrigada pelo carinho, atenção, cafés e cervejinhas.

Aos grandes amigos que a vida me deu, obrigada pela admiração, atenção, carinho e por todos os bons momentos de risada e descontração.

Ao Dr. Fábio Rogério de Moraes, técnico responsável do Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, da UNESP, Câmpus São José do Rio Preto, pelas análises de Ressonância Nuclear Magnética nos equipamentos Bruker Avance III 9,397 T (400 MHz) e 14,095 T (600 MHz). À Dra. Lucinéia Vizzotto Marconcini pelo treinamento fornecido para a utilização do espectrômetro Bruker Fourier (300 MHz) do Laboratório-II de Ressonância Magnética Nuclear, Instituto de Química, da UNESP, Câmpus Araraquara.

Aos funcionários do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, André Luis Domingues, João L. A. de Toledo Netto, Eliane Cristina Gonçalves do Nascimento Alíria Sena, Alex Antônio do Santos e todos que de alguma forma me ajudaram nesta caminhada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida (2015/08089-6) para a realização do presente trabalho.

À Comissão Examinadora, pela disponibilidade e aceite em tornar esse trabalho mais completo.

RESUMO

O cancro cítrico afeta variedades citrícolas de importância econômica mundial, sendo causado pela *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc), uma bactéria Gram-negativa. O controle do cancro cítrico é realizado por meio do manejo integrado com aplicações de substâncias cúpricas, plantio de cultivares menos suscetíveis, uso de quebra-ventos e controle da larva minadora de citros. No entanto, o uso excessivo de cobre pode ocasionar acúmulo no solo e afetar negativamente o crescimento radicular de plantas cítricas, e conseqüentemente a absorção de nutrientes. Por esta razão, a busca por substâncias anti-Xcc seguras ao meio ambiente e eficientes é de crucial importância. Neste trabalho utilizamos o planejamento de substâncias sintéticas anti-Xcc. Sendo assim, foram sintetizados 36 diidroxibenzoatos de alquila (DHB), dentre os quais, 14 apresentaram atividade anti-Xcc. Dentre estes, três ésteres com os menores valores de CIM e com sete carbonos na cadeia lateral (heptila) foram selecionados, **4** (52 µM), **16** (80 µM) e **28** (88 µM). O ensaio de curva de crescimento de Xcc demonstrou que os DHB selecionados promoveram atraso na fase exponencial, prolongando o tempo para Xcc atingir a fase estacionária. O efeito dos DHB **4**, **16** e **28** sobre a permeabilidade da membrana de Xcc foi comparado ao controle nisina, sendo o derivado DHB **28** mais efetivo (93,8%), do que **16** (41,3%) e **4** (13,9%). Os dados do ensaio de inibição da atividade GTPásica sugerem que os ésteres **4**, **16** e **28** podem promover alterações nos protofilamentos, levando à despolimerização da proteína mutante sensível à temperatura de filamento Z (FtsZ) e assim impedindo a divisão celular bacteriana. A viabilidade de aplicação dos DHB **4**, **16** e **28** foi comprovada por meio de ensaios de citotoxicidade, sendo os valores Cl_{50} superiores a 100 µM contra as células eucarióticas testadas. As células de Xcc perderam a capacidade de colonizar o hospedeiro após tratamento com as substâncias **4**, **16** e **28** a $\frac{1}{2}$ CIM e CIM, inibindo o aparecimento de sintomas de cancro cítrico nas folhas de laranja doce (*Citrus sinensis*). Os DHB **4**, **16** e **28** foram avaliados quanto a capacidade protetora de plantas jovens de laranja doce e a incidência de sintomas diminuiu 33,3 % (**4**), 15,3 % (**16**) e 28,6 % (**28**), valores próximos ao oxiclreto de cobre (26,7 %). Os ésteres mantiveram comportamento similar ao oxiclreto de cobre em relação a severidade dos sintomas de cancro cítrico. A fitotoxicidade dos três DHB foi avaliada em ensaio com *Lactuca sativa*, causando menor interferência no crescimento das plântulas quando comparados com o

oxicloreto de cobre presente nas formulações a base de cobre utilizadas nas lavouras cítricas. Os ésteres não causaram alterações nos parâmetros fotossintéticos, tais como a taxa de transpiração, condutância estomática, assimilação máxima, rendimento quântico efetivo de conversão fotoquímica do PSII, coeficiente de extinção fotoquímica do PSII e coeficiente de extinção não fotoquímica do PSII em plantas jovens de *C. sinensis*. Na avaliação da toxicidade contra abelhas sem ferrão (*Scaptotrigona postica*), os ésteres **4**, **16** e **28** provocaram mortalidade similar ao oxicloreto de cobre.

Palavras-chave: cancro cítrico, compostos fenólicos, fitobacteriose, ésteres de alquila

ABSTRACT

Citrus canker affects citrus varieties of worldwide economic importance, being caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc), a Gram-negative bacterium. The control of citrus canker is accomplished through integrated management with applications of cupric substances, planting of less susceptible cultivars, use of windbreaks and control of citrus-mining larva. However, excessive use of copper can cause soil accumulation and negatively affect root growth of citrus plants, and consequently nutrient absorption. For this reason, the search for environmentally safe and efficient anti-Xcc substances is of crucial importance. In this paper we use the planning of anti-Xcc synthetic substances. Thus, 36 alkyl dihydroxybenzoates (DHB) were synthesized, which showed anti-Xcc activity. Among them, three esters with the lowest MIC values and seven carbons in the side chain (heptyl) were selected, **4** (52 μ M), **16** (80 μ M) and **28** (88 μ M). The Xcc growth curve assay showed that the selected DHB promoted exponential phase delay, extending the time for Xcc to reach the stationary phase. The effect of DHB **4**, **16** and **28** on Xcc membrane permeability was compared to nisin control, with DHB **28** being the most effective derivative (93.8%) than **16** (41.3%) and **4** (13, 9%). Data from the GTPase inhibition assay suggest that esters **4**, **16** and **28** may promote changes in protofilaments, leading to depolymerization of the Filamentous temperature sensitive protein Z (FtsZ) and thus preventing bacterial cell division. The viability of application of DHB **4**, **16** and **28** was confirmed by cytotoxicity assays, with IC₅₀ values greater than 100 μ M against eukaryotic cells tested. Xcc cells lost the ability to colonize the host after treatment with compounds **4**, **16** and **28** at $\frac{1}{2}$ MIC and MIC, inhibiting the appearance of symptoms of citrus canker on sweet orange leaves (*Citrus sinensis*). DHB **4**, **16** and **28** were evaluated for the protective capacity of sweet orange young plants and the incidence of symptoms decreased by 33.3% (**4**), 15.3% (**16**) and 28.6% (**28**) to copper oxychloride (26.7%). The esters maintained copper oxychloride-like behavior with respect to the severity of citrus canker symptoms. The phytotoxicity of the three DHB was evaluated in a *Lactuca sativa* assay, causing less interference in seedling growth when compared to copper oxychloride present in the copper base formulations used in citrus crops. The esters did not cause changes in photosynthetic parameters, such as transpiration rate, stomatal conductance, maximum assimilation, PSII photochemical conversion effective quantum yield, PSII photochemical extinction coefficient and PSII non-

photochemical extinction coefficient in young *C. sinensis*. In the evaluation of toxicity against stingless bees (*Scaptotrigona postica*), esters **4**, **16** and **28** caused similar mortality to copper oxychloride.

Keywords: citric canker, phenolic compounds, phyto-bacteriosis, alkyl esters

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1.** Sintomas de cancro cítrico: manchas eruptivas amarelas em folhas de *Citrus sinensis*.....32
- Figura 2.** Antibióticos avaliados contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e seus valores de concentração inibitória mínima (CIM).....38
- Figura 3.** Diidroxibenzoatos de alquila com atividade antimicrobiana gentisato de butila (**14**) e protocatecuatos de butila (**26**), hexila (**27**), heptila (**28**), octila (**29**), nonila (**30**), decila (**31**) e dodecila (**32**).....39
- Figura 4.** Ácidos avaliados contra isolados clínicos de bactérias Gram-negativas...40
- Figura 5.** Estrutura do galato de heptila, um triidroxibenzoato de alquila com atividade anti- *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e inibição de FtsZ.....41

Capítulo 2

- Figure 1.** Growth curve profiles of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* with treatments in MIC and $\frac{1}{2}$ MIC values of alkyl dihydroxybenzoates for 72 h. **A** Compound **4**, **B** compound **16**, **C** compound **28**, and **D** copper oxychloride (CO) in comparison to control (untreated) and DMSO (vehicle control).....62
- Figure 2.** Cellular permeability evaluation in the presence of alkyl dihydroxybenzoates (**** $p < 0.0001$, ANOVA with Dunnett's post-test), ns = not significant.....63
- Figure 3.** Optical microscopy of fluorescence images at $\frac{1}{4}$ MIC of alkyl dihydroxybenzoates for 15 min. (**A**) Negative control (untreated), (**B**) vehicle control (DMSO), (**C**) positive control (nisin), (**D**) compound **4**, (**E**) compound **16**, and (**F**) compound **28**.....64
- Figure 4.** Inhibition of GTPase activity of alkyl dihydroxybenzoates in MIC value (* $p < 0.04$, ** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ANOVA with Dunnett's post-test).....65

Appendix A – Supplementary Materials

| | |
|--|-----|
| Figure S1. I) ^1H NMR spectrum of compound 1 (400 MHz – CDCl_3)..... | 95 |
| Figure S1. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 1 (100 MHz – CDCl_3)..... | 95 |
| Figure S1. III) HPLC chromatogram of compound 1 | 96 |
| Figure S2. I) ^1H NMR spectrum of compound 2 (400 MHz – CDCl_3)..... | 96 |
| Figure S2. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 2 (100 MHz – CDCl_3)..... | 97 |
| Figure S2. III) HPLC chromatogram of compound 2 | 97 |
| Figure S3. I) ^1H NMR spectrum of compound 3 (400 MHz – CDCl_3)..... | 98 |
| Figure S3. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 3 (100 MHz – CDCl_3)..... | 98 |
| Figure S3. III) HPLC chromatogram of compound 3 | 99 |
| Figure S4. I) ^1H NMR spectrum of compound 4 (600 MHz – CDCl_3)..... | 99 |
| Figure S4. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 4 (150 MHz – CDCl_3)..... | 100 |
| Figure S4. III) HPLC chromatogram of compound 4 | 100 |
| Figure S5. I) ^1H NMR spectrum of compound 5 (400 MHz – CDCl_3)..... | 101 |
| Figure S5. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 5 (100 MHz – CDCl_3)..... | 101 |
| Figure S5. III) HPLC chromatogram of compound 5 | 102 |
| Figure S6. I) ^1H NMR spectrum of compound 6 (400 MHz – CDCl_3)..... | 102 |
| Figure S6. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 6 (100 MHz – CDCl_3) | 103 |
| Figure S6. III) HPLC chromatogram of compound 6 | 103 |
| Figure S7. I) ^1H NMR spectrum of compound 7 (400 MHz – CDCl_3)..... | 104 |
| Figure S7. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 7 (100 MHz – CDCl_3)..... | 104 |

| | |
|---|-----|
| Figure S7. III) HPLC chromatogram of compound 7 | 105 |
| Figure S8. I) ^1H NMR spectrum of compound 8 (300 MHz – CDCl_3)..... | 105 |
| Figure S8. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 8 (100 MHz – CDCl_3)..... | 106 |
| Figure S8. III) HPLC chromatogram of compound 8 | 106 |
| Figure S9. I) ^1H NMR spectrum of compound 9 (600 MHz – CDCl_3)..... | 107 |
| Figure S9. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 9 (150 MHz – CDCl_3)..... | 107 |
| Figure S9. III) HPLC chromatogram of compound 9 | 108 |
| Figure S10. I) ^1H NMR spectrum of compound 10 (600 MHz – CDCl_3)..... | 108 |
| Figure S10. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 10 (150 MHz – CDCl_3)..... | 109 |
| Figure S10. III) HPLC chromatogram of compound 10 | 110 |
| Figure S11. I) ^1H NMR spectrum of compound 11 (600 MHz – CDCl_3)..... | 110 |
| Figure S11. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 11 (150 MHz – CDCl_3)..... | 111 |
| Figure S11. III) HPLC chromatogram of compound 11 | 111 |
| Figure S13. I) ^1H NMR spectrum of compound 13 (400 MHz – CDCl_3)..... | 112 |
| Figure S13. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 13 (100 MHz – CDCl_3)..... | 112 |
| Figure S13. III) HPLC chromatogram of compound 13 | 113 |
| Figure S14. I) ^1H NMR spectrum of compound 14 (400 MHz – CDCl_3)..... | 114 |
| Figure S14. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 14 (100 MHz – CDCl_3)..... | 114 |
| Figure S14. III) HPLC chromatogram of compound 14 | 115 |
| Figure S15. I) ^1H NMR spectrum of compound 15 (400 MHz – CDCl_3)..... | 115 |
| Figure S15. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 15 (100 MHz – CDCl_3)..... | 116 |

| | |
|---|-----|
| Figure S15. III) HPLC chromatogram of compound 15 | 116 |
| Figure S16. I) ^1H NMR spectrum of compound 16 (600 MHz – CDCl_3)..... | 117 |
| Figure S16. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 16 (150 MHz – CDCl_3)..... | 117 |
| Figure S16. III) HPLC chromatogram of compound 16 | 118 |
| Figure S17. I) ^1H NMR spectrum of compound 17 (400 MHz – CDCl_3)..... | 118 |
| Figure S17. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 17 (100 MHz – CDCl_3)..... | 119 |
| Figure S17. III) HPLC chromatogram of compound 17 | 119 |
| Figure S18. I) ^1H NMR spectrum of compound 18 (600 MHz – CDCl_3)..... | 120 |
| Figure S18. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 18 (100 MHz – CDCl_3)..... | 120 |
| Figure S18. III) HPLC chromatogram of compound 18 | 121 |
| Figure S19. I) ^1H NMR spectrum of compound 19 (400 MHz – CDCl_3)..... | 121 |
| Figure S19. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 19 (100 MHz – CDCl_3)..... | 122 |
| Figure S19. III) HPLC chromatogram of compound 19 | 122 |
| Figure S20. I) ^1H NMR spectrum of compound 20 (300 MHz – CDCl_3)..... | 123 |
| Figure S20. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 20 (100 MHz – CDCl_3)..... | 123 |
| Figure S20. III) HPLC chromatogram of compound 20 | 124 |
| Figure S21. I) ^1H NMR spectrum of compound 21 (400 MHz – CDCl_3)..... | 124 |
| Figure S21. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 21 (150 MHz – CDCl_3)..... | 125 |
| Figure S21. III) HPLC chromatogram of compound 21 | 125 |
| Figure S22. I) ^1H NMR spectrum of compound 22 (300 MHz – CDCl_3)..... | 126 |
| Figure S22. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 22 (150 MHz – CDCl_3)..... | 126 |

| | |
|---|-----|
| Figure S22. III) HPLC chromatogram of compound 22 | 127 |
| Figure S23. I) ^1H NMR spectrum of compound 23 (300 MHz – CDCl_3)..... | 127 |
| Figure S23. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 23 (150 MHz – CDCl_3)..... | 128 |
| Figure S23. III) HPLC chromatogram of compound 23 | 128 |
| Figure S24. I) ^1H NMR spectrum of compound 24 (400 MHz – CDCl_3)..... | 129 |
| Figure S24. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 24 (150 MHz – CDCl_3)..... | 129 |
| Figure S24. III) HPLC chromatogram of compound 24 | 130 |
| Figure S25. I) ^1H NMR spectrum of compound 25 (400 MHz – $\text{DMSO-}d_6$)..... | 130 |
| Figure S25. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 25 (100 MHz – $\text{DMSO-}d_6$)..... | 131 |
| Figure S25. III) HPLC chromatogram of compound 25 | 131 |
| Figure S26. I) ^1H NMR spectrum of compound 26 (400 MHz – CDCl_3)..... | 132 |
| Figure S26. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 26 (100 MHz – CDCl_3)..... | 132 |
| Figure S26. III) HPLC chromatogram of compound 26 | 133 |
| Figure S27. I) ^1H NMR spectrum of compound 27 (400 MHz – $\text{DMSO-}d_6$)..... | 133 |
| Figure S27. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 27 (150 MHz – $\text{DMSO-}d_6$)..... | 134 |
| Figure S27. III) HPLC chromatogram of compound 27 | 134 |
| Figure S28. I) ^1H NMR spectrum of compound 28 (600 MHz – $\text{DMSO-}d_6$)..... | 135 |
| Figure S28. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 28 (150 MHz – $\text{DMSO-}d_6$)..... | 135 |
| Figure S28. III) HPLC chromatogram of compound 28 | 136 |
| Figure S29. I) ^1H NMR spectrum of compound 29 (400 MHz – CDCl_3)..... | 136 |
| Figure S29. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 29 (100 MHz – CDCl_3)..... | 137 |

| | |
|---|-----|
| Figure S29. III) HPLC chromatogram of compound 29 | 137 |
| Figure S30. I) ^1H NMR spectrum of compound 30 (300 MHz – CDCl_3)..... | 138 |
| Figure S30. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 30 (150 MHz – $\text{DMSO-}d_6$)..... | 138 |
| Figure S30. III) HPLC chromatogram of compound 30 | 139 |
| Figure S31. I) ^1H NMR spectrum of compound 31 (400 MHz – CDCl_3)..... | 139 |
| Figure S31. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 31 (100 MHz – CDCl_3)..... | 140 |
| Figure S31. III) HPLC chromatogram of compound 31 | 140 |
| Figure S32. I) ^1H NMR spectrum of compound 32 (300 MHz – CDCl_3)..... | 141 |
| Figure S32. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 32 (100 MHz – CDCl_3)..... | 141 |
| Figure S32. III) HPLC chromatogram of compound 32 | 142 |
| Figure S33. I) ^1H NMR spectrum of compound 33 (300 MHz – $\text{DMSO-}d_6$)..... | 142 |
| Figure S33. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 33 (150 MHz – $\text{DMSO-}d_6$)..... | 143 |
| Figure S33. III) HPLC chromatogram of compound 33 | 143 |
| Figure S34. I) ^1H NMR spectrum of compound 34 (300 MHz – $\text{DMSO-}d_6$)..... | 144 |
| Figure S34. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 34 (150 MHz – $\text{DMSO-}d_6$)..... | 144 |
| Figure S34. III) HPLC chromatogram of compound 34 | 145 |
| Figure S35. I) ^1H NMR spectrum of compound 35 (600 MHz – $\text{DMSO-}d_6$)..... | 145 |
| Figure S35. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 35 (150 MHz – $\text{DMSO-}d_6$)..... | 146 |
| Figure S35. III) HPLC chromatogram of compound 35 | 146 |
| Figure S36. I) ^1H NMR spectrum of compound 36 (300 MHz – $\text{DMSO-}d_6$)..... | 147 |
| Figure S36. II) ^{13}C NMR spectrum of compound 36 (150 MHz – $\text{DMSO-}d_6$)..... | 147 |

Figure S36. III) HPLC chromatogram of compound **36**.....148

Capítulo 3

Figure 1. Heptyl dihydroxybenzoates and their Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.....161

Figure 2. Infiltration points in abaxial face of the leaves, NC (distilled water); VC (cells treated with 1% DMSO); PC (untreated cells) (**A**); Citrus canker symptom in *C. sinensis* leaves after artificial inoculation of the treatment with heptyl dihydroxybenzoates and copper oxychloride (CO) and copper sulfate (CS) at ½ MIC and MIC; representative images of triplicates after 3 weeks of infiltration (**B**).....162

Figure 3. (**A**) Percentage of citrus canker symptoms incidence in *Citrus sinensis* leaves. NC = negative control (distilled water), VC = vehicle control (DMSO 1%), heptyl dihydroxybenzoates (**4**, **16** and **28**) at 10×MIC values, or copper oxychloride (CO) at 600 µg mL⁻¹*. Data are means ± standard deviations. Significant differences among treatments were determined with ANOVA and Tukey's test; values followed by different letters are significantly different ($p < 0.001$). *Concentration recommend by the manufacture (**B**) Representative symptom severity rate in *Citrus sinensis* leaves after spray test treatments.....163

Figure 4. Initial growth roots and shoots of *L. sativa*. Negative control (NC), heptyl dihydroxybenzoates **4**, **16** and **28**, copper oxychloride (CO). Data presented with mean ± standard deviation ($p < 0.0001$, ANOVA with Dunnett's post-test).....164

Figure 5. Leaves gas exchange after 1 and 15 days of treatment application in *C. sinensis*. Distilled water was applied as negative control (NC), other treatments were heptyl dihydroxybenzoates (**4**, **16** and **28**) and copper oxychloride (CO). (**A**) stomatal conductance - g_s , (**B**) maximum CO₂ assimilation - A_{max} . Data are means ± standard deviations; there were not significant differences among treatments with one-way ANOVA with repeated measures and Tukey's test ($p > 0.05$).....165

Figure 6. Chlorophyll *a* fluorescence measurements in leaves after 1 and 15 days of treatment application in *C. sinensis*. Distilled water was applied as negative control (NC), other treatments were heptyl dihydroxybenzoates (**4**, **16** and **28**) and copper oxychloride (CO). (**A**) effective quantum yield of photochemical conversion of PSII, (**B**)

photochemical extinction coefficient of PSII (ϕ_{NO}), (C) non-photochemical extinction coefficient of PSII (ϕ_{NPQ}), (D) maximum photosystem II quantum yield (F_v/F_m), (E) maximum rate of electron transport (ETR_{max}). Data are means \pm standard deviations. Significant differences among treatments were determined with one-way ANOVA with repeated measures and Tukey's test; values followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$). Data in figures **A-D** were not significantly different ($p > 0.05$).....166

Figure 7. Average food intake per bee (μg) and Mortality rate of *Scaptotrigona postica*. NC = negative control (sucrose solution 50%), VC = vehicle control (DMSO 1%), heptyl dihydroxybenzoates (**4**, **16** and **28**) and copper oxychloride (CO) (***) $p < 0.0001$, ANOVA with Tukey post-test).....167

LISTA DE ESQUEMAS

Scheme 1. Preparation of alkyl dihydroxybenzoates by Fischer's Esterification.....70

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

| | |
|--|----|
| Table 1. Antibacterial activities against <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> , purity and log $P_{o/w}$ of dihydroxybenzoates 1–36 | 60 |
| Table 2. IC ₅₀ value of compounds 4 , 16 and 28 in μM against cell lines..... | 61 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μg – microgramas

μL – microlitros

μM – micromolar

ACHN – human renal adenocarcinoma cell line

C18 – octadecylsilane

CDCl₃ – deuterated chloroform

CEIS – Centro de Estudos de Insetos Sociais

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

COOH – carboxila

CS – Copper Sulfate

d – doublet

DA – dihydroxybenzoic acid

dd – doublet of doublet

DHB – diidroxibenzoatos de águila

DMSO – dimethylsulfoxide

DMSO d₆ – deuterated dimethylsulfoxide

EFSA – European Food Safety Authority

EzrA – septation ring formation regulator

FAO – Food and Agriculture Organization

FCAV – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária

FEA – Faculdade de Economia Administração e Contabilidade

FtsA – Filamentous temperature sensitive protein A

FtsZ – Filamentous temperature sensitive protein Z

Fundecitrus – Fundo de Defesa da Citricultura

g – gramas

GDF – guanosina-5'-difosfato

GFP – green fluorescent protein

GTP – guanosina-5'-trifosfato

GTPase – guanosina-5'- trifosfatase

HaCaT – human keratinocyte cell line

HepG2 – human liver cancer cell line
HP – Hewlett-Packard Company
HPLC – High-Performance Liquid Chromatography
Huh-7.5 – human hepatoma cell line
Hz – Hertz
IAN – 3-indolacetonitrila
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC₅₀ – Inhibitory concentration
Lafep – Laboratório de Anatomia e Fisiologia Ecológica de Plantas
LAQ – Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos
LECA – Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas
LEGO – Laboratório de Estudos Genômicos
LGB – Laboratório de Genética de Bactérias
MBC – Minimum Bactericidal Concentration
mg – miligramas
MIC – Minimum Inhibitory Concentration
MinC – cell division inhibitor C
MinD – ATP binding protein MinD
mL – mililitros
MRC-5 – human lung fibroblast cell line
MTT – 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil – tetrazólio brometo
NC –negative control
NMR – Nuclear Magnetic Resonance
NYG – Nitrogen Yeast Glicerol
OD – Optical Density
OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development
OH – hidroxila
PC – positive control
PEP – phosphoenol pyruvate
Pi – fosfato inorgânico
PI – propidium iodide
REMA – Resazurin Microtiter Assay
s – singlet
SAA – Secretaria da Agricultura e Abastecimento

SepF – cell division protein SepF

SMR – Sistema de Mitigação de Risco

SOPP – ortofenilfenato de sódio

TA – triidroxibenzoato de alquila

TLC – thin layer chromatography

UE – União Europeia

USDA – United States Department of Agriculture

USP – Universidade de São Paulo

VC – vehicle control

VERO – monkey kidney epithelial cell line

Xcc – *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

ZapA – Z ring associate protein A

ZipA – Z interacting protein A

SUMÁRIO

Capítulo 1: Considerações gerais

| | |
|---|-----------|
| 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS..... | 28 |
| 2. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA..... | 29 |
| 2.1. Importância da citricultura..... | 31 |
| 2.2. Surgimento do cancro cítrico e seu prejuízo para a citricultura..... | 31 |
| 2.3. Estratégias de controle do cancro cítrico..... | 33 |
| 2.4. <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> | 34 |
| 2.5. Divisão celular bacteriana..... | 35 |
| 2.6. Substâncias anti-Xanthomonas..... | 37 |
| 2.7. Diidroxi benzoatos de alquila e sua atividade antimicrobiana..... | 38 |
| 3. OBJETIVO GERAL..... | 41 |
| 3.1. Objetivos específicos..... | 41 |
| 4. REFERÊNCIAS..... | 42 |

Capítulo 2: Desing of Antibacterial Agents: Alkyl Dihydroxybenzoates against

Xanthomonas citri subsp. *citri*

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCTION..... | 55 |
| 2. RESULTS..... | 56 |
| 2.1. Synthesis, Purification and Identification of Alkyl Dihydroxybenzoates..... | 56 |
| 2.2. Partition Coefficient Study..... | 57 |
| 2.3. Determination of MIC and MBC against <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> Assay..... | 57 |
| 2.4. Citotoxicity Assay..... | 58 |
| 2.5. Growth Curve..... | 58 |
| 2.6. Cellular Membrane Permeability of Xcc Using Live/Dead Kit..... | 58 |
| 2.7. Inhibition Assay of GTPase Activity..... | 59 |
| 2.8. Figures, Tables and Schems..... | 60 |
| 3. DISCUSSION..... | 66 |
| 4. METHODS..... | 69 |
| 4.1. Synthesis of Alkyl Dihydroxybenzoates..... | 69 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2. Partition Coefficient Determination Log $P_{o/w}$ by HPLC..... | 70 |
| 4.3. Determination of MIC and MBC against <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> Assay..... | 70 |
| 4.4. Determination of Cytotoxicity..... | 71 |
| 4.5. Growth Curve..... | 72 |
| 4.6. Cellular Membrane Permeability of Xcc Using the Live/Dead Kit..... | 72 |
| 4.7. Inhibition of GTPase Activity..... | 73 |
| 4.8. Statistical Analysis..... | 73 |
| 5. REFERENCES..... | 74 |

Appendix A – Supplementary Materials

| | |
|---|-----------|
| 1. SPECTROSCOPY DATA ANALYSES..... | 79 |
| 1.1. ethyl 2,4 dihydroxybenzoate (1)..... | 79 |
| 1.2. butyl 2,4 dihydroxybenzoate (2)..... | 79 |
| 1.3. hexyl 2,4 dihydroxybenzoate (3)..... | 80 |
| 1.4. heptyl 2,4 dihydroxybenzoate (4)..... | 80 |
| 1.5. octyl 2,4 dihydroxybenzoate (5)..... | 81 |
| 1.6. nonyl 2,4 dihydroxybenzoate (6)..... | 81 |
| 1.7. decyl 2,4 dihydroxybenzoate (7)..... | 82 |
| 1.8. dodecyl 2,4 dihydroxybenzoate (8)..... | 82 |
| 1.9. isopropyl 2,4 dihydroxybenzoate (9)..... | 82 |
| 1.10. cyclopentyl 2,4 dihydroxybenzoate (10)..... | 83 |
| 1.11. cyclohexyl 2,4 dihydroxybenzoate (11)..... | 83 |
| 1.12. ethyl 2,5 dihydroxybenzoate (13)..... | 83 |
| 1.13. butyl 2,5 dihydroxybenzoate (14)..... | 84 |
| 1.14. hexyl 2,5 dihydroxybenzoate (15)..... | 84 |
| 1.15. heptyl 2,5 dihydroxybenzoate (16)..... | 85 |
| 1.16. octyl 2,5 dihydroxybenzoate (17)..... | 85 |
| 1.17. nonyl 2,5 dihydroxybenzoate (18)..... | 86 |
| 1.18. decyl 2,5 dihydroxybenzoate (19)..... | 86 |
| 1.19. dodecyl 2,5 dihydroxybenzoate (20)..... | 87 |
| 1.20. isopropyl 2,5 dihydroxybenzoate (21)..... | 87 |
| 1.21. cyclopentyl 2,5 dihydroxybenzoate (22)..... | 88 |
| 1.22. cyclohexyl 2,5 dihydroxybenzoate (23)..... | 88 |

| | | |
|-------|--|----|
| 1.23. | phenylethyl 2,5 dihydroxybenzoate (24) | 88 |
| 1.24. | ethyl 3,4 dihydroxybenzoate (25) | 89 |
| 1.25. | butyl 3,4 dihydroxybenzoate (26) | 89 |
| 1.26. | hexyl 3,4 dihydroxybenzoate (27) | 90 |
| 1.27. | heptyl 3,4 dihydroxybenzoate (28) | 90 |
| 1.28. | octyl 3,4 dihydroxybenzoate (29) | 91 |
| 1.29. | nonyl 3,4 dihydroxybenzoate (30) | 91 |
| 1.30. | decyl 3,4 dihydroxybenzoate (31) | 91 |
| 1.31. | dodecyl 3,4 dihydroxybenzoate (32) | 92 |
| 1.32. | isopropyl 3,4 dihydroxybenzoate (33) | 92 |
| 1.33. | cyclopentyl 3,4 dihydroxybenzoate (34) | 93 |
| 1.34. | cyclohexyl 3,4 dihydroxybenzoate (35) | 93 |
| 1.35. | phenylethyl 3,4 dihydroxybenzoate (36) | 94 |

**Capítulo 3: Heptyl dihydroxybenzoates as an alternative
to copper to prevent citrus canker**

| | | |
|-----------|---|------------|
| 1. | INTRODUCTION | 151 |
| 2. | MATERIALS AND METHODS | 152 |
| 2.1. | Compounds | 152 |
| 2.2. | Xcc pathogenicity after treatment with heptyl dihydroxybenzoates on <i>Citrus sinensis</i> leaves | 152 |
| 2.3. | Heptyl dihydroxybenzoates protetive effect against citrus canker on <i>C. sinensis</i> | 152 |
| 2.4. | Phytotoxicity of heptyl dihydroxybenzoates on <i>Lactuca Sativa</i> initial growth | 153 |
| 2.5. | Phytotoxicity assay against young orange plants | 154 |
| 2.6. | Toxicity evaluation against <i>Scaptotrigona postica</i> | 154 |
| 2.7. | Statistical analyses | 155 |
| 3. | RESULTS AND DISCUSSION | 156 |
| 3.1. | Xcc pathogenicity after treatment with heptyl dihydroxybenzoates on <i>Citrus sinensis</i> leaves | 156 |
| 3.2. | Heptyl dihydroxybenzoates exhibited protetive ability against citrus canker | 157 |

| | |
|--|------------|
| 3.3. Evaluation of phytotoxicity heptyl dihydroxybenzoates against initial growth of <i>Lactuca sativa</i> | 157 |
| 3.4. Phytotoxicity of heptyl dihydroxybenzoates against young <i>C. sinensis</i> | 158 |
| 3.5. Toxicity of dihydroxybenzoates against <i>Scaptotrigona postica</i> | 159 |
| 3.6. Conclusion..... | 160 |
| 3.7. Figures..... | 161 |
| 4. REFERENCES..... | 168 |

Capítulo 4: Considerações finais e conclusão

| | |
|-------------------------------------|------------|
| 1. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 175 |
| 2. CONCLUSÕES..... | 181 |
| 3. REFERÊNCIAS..... | 182 |

Capítulo 1

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A cultura de laranja é destaque no setor citrícola, tanto em volume de produção quanto aos benefícios econômicos. A estimativa da safra de laranja 2019/20 é de 388,89 milhões de caixas (40,8 kg) no cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo Mineiro, com o total de 173,973 milhões de árvores produtivas, dados de março de 2019. Avaliando a produtividade por hectare, tem-se a estimativa de 1051 caixas por hectare na safra de 2019/20, representando um aumento de 295 caixas em relação a safra anterior de 2018/19 (Fundecitrus, 2019). Neste sentido, o setor citrícola gera um PIB de US\$ 6,5 bilhões de dólares (Neves & Trombin, 2017).

Contudo, doenças e pragas acometem as lavouras de citros, diminuindo a produção e causando problemas fitossanitários, sendo necessário o manejo adequado para o controle e desinfecção dos pomares. Assim, o objetivo desta tese foi o estudo de substâncias com atividade antibacteriana contra *Xantomonas citri* subsp. *citri* (Xcc), uma bactéria causadora de uma doença endêmica, o cancro cítrico.

Esta tese está distribuída em quatro capítulos (1-4). O **Capítulo 1** se constituiu por uma breve introdução seguida de uma revisão de literatura pontuando a importância da citricultura e os prejuízos causados pelo cancro cítrico no Brasil e suas medidas de controle. Neste capítulo foram destacadas a divisão celular bacteriana e substâncias capazes de inibir o crescimento bacteriano por meio de danos ou perturbações causadas à Xcc. Por fim, foi salientada a atividade antimicrobiana dos diidroxibenzoatos de alquila (DHB) contra outras espécies bacterianas.

No **Capítulo 2** foram descritas a preparação, purificação e identificação de 36 diidroxibenzoatos de alquila, seguidas da determinação de pureza e hidrofobicidade destes ésteres. Foram avaliadas a atividade anti-Xcc dos 36 DHB, e posteriormente selecionou-se três substâncias com menores valores de concentração inibitória mínima (CIM). Os ésteres **4**, **16** e **28** foram selecionados e avaliados quanto a alterações no padrão da curva de crescimento de Xcc, na permeabilidade de membrana de Xcc e inibição sobre a atividade GTPásica de FtsZ, uma proteína envolvida na divisão celular. A toxicidade dos ésteres selecionados foi avaliada contra linhagens celulares de queratinócitos não tumorigênicos (HaCaT) CLS 300493, hepatoma humano (Huh-7.5) ATCC® PTA-8561, células pulmonares humanas de

linhagem normal (MRC-5) ATCC CCL-171, células renais de macaco de linhagem normal (VERO) ATCC® CCL81 e células renais carcinogênicas humanas (ACHN) ATCC® CRL1611. Os resultados foram publicados no periódico International Journal of Molecular Sciences (IJMS) em outubro de 2018.

O **Capítulo 3** é a sequência de estudos dos ésteres selecionados, quanto a capacidade de interferir na patogenicidade de Xcc, sob ação protetora de plantas jovens de laranja doce (*Citrus sinensis*), avaliando a incidência e a severidade do cancro cítrico. O potencial fitotóxico dos DHB **4**, **16** e **28** foi avaliado contra o desenvolvimento inicial de alface (*Lactuca sativa*) e na interferência nos parâmetros fotossintéticos de plantas jovens de *C. sinensis*. Por fim, foi estudada a toxicidade das substâncias **4**, **16** e **28** contra abelhas sem ferrão (*Scaptotrigona postica*).

No **Capítulo 4** foram compiladas as considerações finais discutindo os resultados dos capítulos 2 e 3. Finalizando com uma conclusão geral.

2. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O cancro cítrico é causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) (Stall & Seymour, 1983; Gottwald et al., 2002). Xcc acomete as principais variedades de citros de importância comercial, causando lesões necróticas de aspecto marrom eruptivo em folhas, frutos e ramos (Behlau & Belasque Jr., 2014). Xcc provoca a desfolha e queda prematura de frutos, provocando a depreciação da qualidade dos frutos, e conseqüentemente, tornando o seu comércio inviável (Bitancourt, 1957; Gottwald et al., 2002; Behlau & Belasque Jr., 2014).

O estado de São Paulo detém cerca de 75% da produção nacional de laranja (Neves et al., 2010; IBGE, 2018). A legislação para controle do cancro cítrico em São Paulo até 2016 determinava a erradicação das plantas sintomáticas e realização de inspeções frequentes, junto a pulverização de substâncias cúpricas (Massari & Belasque Jr., 2006; Behlau et al., 2016). No início de 2017, o estado de São Paulo por meio da publicação da Resolução SAA 10, definiu o Sistema de Mitigação de Risco (SMR) como medida oficial de controle (São Paulo, 2017).

As regiões endêmicas do cancro cítrico trabalham com estratégias de manejo integrado, utilizando medidas de controle como: a) pulverizações com substâncias cúpricas, b) utilização de quebra-ventos (com espécies de casuarinas, grevéilas,

pinus, eucaliptos e corymbia); c) controle do inseto minador de citros e d) emprego de cultivares resistentes à Xcc (Behlau & Belasque Jr., 2014). O manejo integrado reduz as perdas de produção, mas não elimina a bactéria do pomar, tornando o comércio de exportação de frutas impróprio em áreas de quarentena (Choi et al., 2017).

Li e Wang (2014) estudaram a atividade anti-Xcc de aminoácidos e derivados indólicos (Li & Wang, 2014). Gholami e colaboradores avaliaram o potencial anti-Xcc de antibióticos como ampicilina, penicilina, cloranfenicol, estreptomicina e canamicina (Gholami et al., 2018). Porém a utilização de antibióticos em larga escala, dispersos no ambiente vem sendo bastante contestada. Como alternativa ecologicamente sustentável foram descritas recentemente a capacidade inibitória de extratos de fungos filamentosos da Antártica contra Xcc (Vieira et al., 2018).

O nosso grupo de pesquisa tem a premissa de buscar alternativas com menor impacto ambiental, e para tanto, estuda a atividade de substâncias com esqueletos carbônicos baseados em produtos naturais. Em 2013, Silva e colaboradores demonstraram a atividade anti-Xcc de uma série de galatos de alquila (3,4,5-triidroxibenzoato de alquila) os quais inibiram o crescimento de Xcc e reduziram sua patogenicidade em *Citrus limonia* (Silva et al., 2013). Posteriormente, o mecanismo de ação destes galatos foi elucidado, evidenciando sua ação sobre a membrana em combinação com a inibição da proteína FtsZ (Król et al., 2015; Kopacz et al., 2018). Visando avaliar a segurança dessas substâncias foram realizadas investigações citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas (Silva et al., 2017). Recentemente foi avaliada a atividade anti-Xcc de galatos de alquila monoacetilados. Com a inserção do grupo acetila ocorreu aumento na lipofilicidade, conferindo maior potência para os galatos de alquila monoacetilados quando comparados aos galatos de alquila não esterificados (Savietto et al., 2018).

A similaridade estrutural entre os galatos e diidroxibenzoatos somada a atividade antimicrobiana dos diidroxibenzoatos contra outras espécies bacterianas, sugeriu uma potencial atividade contra Xcc, bem como potencial atividade inibitória da proteína FtsZ, justificando o investimento químico e biológico nesta classe de ésteres (Nihei, Nihei & Kubo, 2003; Merkl et al., 2010; Alves et al, 2013; Soares et al., 2014; Medina-Alarcón et al, 2017).

Na presente tese foram estudados 36 diidroxibenzoatos de alquila, variando o tamanho das cadeias alquílicas laterais para observar o efeito da lipofilicidade.

Adicionalmente, foram observadas diferentes posições das hidroxilas, visando encontrar substâncias mais potentes anti-Xcc e no controle do cancro cítrico.

2.1. Importância da citricultura

A citricultura brasileira ascendeu na década de 60 com a forte geada na Flórida (EUA). A partir da década de 80, a cultura de laranja passou a ser a quinta mais produzida no país (FAO, 2015). Desde então, o Brasil se destaca como um dos maiores produtores de laranja, seguido pela China, União Europeia, Estados Unidos e México (Fares et al., 2017).

Além do suco concentrado e congelado de laranja e do suco de laranja não-concentrado, os subprodutos do processo industrial, incluindo óleos essenciais das cascas de laranjas, essências aquosas e oleosas, terpenos cítricos (limoneno), farelo de polpa cítrica, polpa congelada e álcool obtido da fermentação das laranjas, também podem ser comercializados (Neves et al., 2010; CitrusBr, 2016).

O cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo Mineiro possui aproximadamente 450 mil hectares, gerando por volta de 200 mil empregos diretos e indiretos. Segundo Neves e Trombim (2017), a geração de empregos deste setor tem relação direta com os índices de qualidade de vida destes municípios (Neves & Trombim, 2017).

2.2. Surgimento do cancro cítrico e seu prejuízo para a citricultura

Nos últimos cem anos, surgiram muitas doenças com impacto na cultura citrícola, tais como: leprose (1933), tristeza (1937), cancro cítrico (1957), pinta preta (1980), clorose variegada dos citros (1987), morte súbita dos citros (2001), e greening/HLB (2004) (Sanchez et al., 2014). Dentre estas doenças, o cancro cítrico reduz a produtividade dos pomares, devido a desfolha das plantas e queda prematura dos frutos. O aparecimento dos sintomas causa a depreciação, inviabilizando o comércio de frutos *in natura* (Bitancourt, 1957; Gottwald et al., 2001, 2002; Behlau et al., 2007, 2008; Behlau & Belasque, 2014; Lanza et al., 2018).

O cancro cítrico causa impacto econômico mundial devido à restrição do acesso ao mercado da União Europeia (UE). Apesar da ausência de evidência documentada para a introdução de frutas com lesões de cancro (Gottwald et al., 2009), a UE considera a importação de frutos infectados e até mesmo frutas expostas ao

patógeno como um risco inaceitável (EFSA, 2013; Painel da EFSA sobre Fitossanidade, 2014).

O cancro cítrico causa lesões em toda a parte aérea, principalmente nos tecidos jovens, que são mais suscetíveis à bactéria, que penetra via estômatos ou ferimentos mecânicos. As lesões atingem de 2 a 12 mm de diâmetro, sendo eruptivas, levemente salientes e de coloração palha ou pardacenta, que vão se tornando de aspecto corticoso, e algumas vezes circundado por um halo amarelo (Rosetti, 2001; Duan et al., 2018).

Nas folhas (**Figura 1**), os sintomas aparecem de 4 a 7 dias após a infecção (Vernieri et al., 2003). As lesões são salientes nas faces adaxial e abaxial, com manchas claras que exibem um centro necrosado, duro e lignificado (Schubert et al., 2001; Gottwald et al., 2002; Brunning & Gabriel, 2003). Nos frutos, as lesões são de aspecto pardo, salientes e algumas vezes ocorre um halo amarelo que circunda as lesões (Rosetti, 2001; Feichtenberger et al., 2005; Amorim; Rezende & Bergamin Filho, 2011). Em estágio avançado, parecem crostas escuras com fissuras, às vezes concêntricas, com pequenas ou grandes crateras, por onde exsuda a bactéria. Nos ramos, os sintomas ocorrem como lesões salientes de cor parda como aqueles apresentados em folhas e frutos.

Além dos sintomas citados, o cancro cítrico, quando bem estabelecido no hospedeiro, provoca redução da área foliar, diminuindo a capacidade fotossintética, e indução da produção de etileno, prejudicando a qualidade dos frutos remanescentes e causando a seca de novos ramos (Brown, 2001; Francis et al., 2009; Dewdney & Graham, 2012).

Figura 1 – Sintomas de cancro cítrico: manchas eruptivas amarelas em folhas de *Citrus sinensis*



Fonte: Laboratório de Genética de Bactérias

O cancro cítrico inicia-se a partir de uma planta doente com lesões ativas, e a disseminação da bactéria para as plantas vizinhas ocorre principalmente pela ação de chuva acompanhada de ventos, ou pelo trânsito de pessoas e maquinário nos pomares (Stall; Seymour, 1983; Leite Jr., 1990; Bock et al., 2005).

2.3. Estratégias de controle do cancro cítrico

A disseminação de fitobacterioses representa um risco para a citricultura, pois além de comprometer a produtividade dos pomares, exige investimentos em prevenção e controle, impactando diretamente na rentabilidade do citricultor (Sanches et al., 2014).

A prática realizada no Brasil, e em outros países é a pulverização de pomares com produtos à base de cobre, que são capazes de reduzir a população bacteriana na superfície foliar, mas o seu uso a longo prazo pode induzir resistência e acúmulo no solo (Belasque Jr. et al., 2009; Behlau et al., 2010; Hasabi et al., 2014).

Em áreas endêmicas a doença é controlada pelo manejo integrado com: a) pulverizações preventivas com bactericidas a base de cobre; b) o uso de quebra-ventos; c) o controle da larva minadora dos citros e d) plantio de variedades menos suscetíveis ao cancro cítrico (Scapin et al., 2015; Graham et al., 2016, Behlau et al., 2017). Contudo, nas áreas com baixa incidência de infecção, as medidas de controle empregadas são: exclusão e erradicação (Gottwald et al., 2001). A estratégia de erradicação foi empregada em São Paulo por quase 60 anos, sofrendo inúmeras modificações na legislação. Em 1987, o critério de erradicação foi modificado, sendo estabelecida a eliminação de plantas doentes e das demais plantas no raio de 50 metros (Brasil, 1987). Em 1995, alterou-se para a eliminação de plantas doentes em uma área circundante de 30 metros (Brasil, 1995).

Bergamin Filho e Amorim (1999) observaram o aumento do cancro cítrico entre os anos de 1996 a 1999, tendo em 1999 o critério de erradicação modificado, no qual: a) talhões com incidência superior a 0,5% de plantas contaminadas deveriam ser completamente eliminados e b) talhões com incidência de até 0,5% de plantas contaminadas deveriam ser eliminadas as plantas sintomáticas e as demais contidas no raio de 30 metros (Bergamin Filho et al., 2000).

Levantamentos realizados no estado São Paulo pelo Fundecitrus mostraram que a erradicação do cancro cítrico baseado na incidência de plantas doentes, de julho

de 1999 a junho de 2009 manteve a doença controlada, com baixa incidência de plantas doentes. Em 2009, a legislação foi alterada, sendo o critério para controle de cancro cítrico no estado de São Paulo baseado na erradicação de plantas em um raio de 30 metros a partir da planta doente, independentemente da incidência da infecção no talhão (Belasque Jr. et al., 2010).

Em 2012, a citricultura paulista enfrentou o maior nível de disseminação do cancro cítrico desde 2000 (Behlau et al., 2016). Diante desse histórico, o uso de substâncias cúpricas tornou-se essencial, juntamente com a realização de inspeções periódicas (Behlau & Belasque Jr., 2014).

A partir de novembro de 2013 foi preconizado pela Secretaria da Agricultura (Resolução SAA – 147) a não obrigatoriedade da erradicação de plantas que estivessem num raio de 30 metros da planta doente. No entanto, adotou-se a eliminação de plantas contaminadas e pulverização com substâncias cúpricas dentro do raio de 30 metros (São Paulo, 2013). Com a utilização de protocolos mais maleáveis na eliminação de plantas contaminadas, houve um crescimento significativo na ocorrência do cancro cítrico no parque citrícola paulista (Behlau & Belasque, 2014; Behlau et al., 2016), sendo o emprego do manejo da doença indispensável a partir de 2017.

Em 2017, São Paulo foi oficializado como área sob Sistema de Mitigação de Risco (SMR). A Secretaria de Agricultura e Abastecimento publicou a Resolução SAA nº 10 que delimita todo o território paulista como área de controle do cancro cítrico. O Sistema de Mitigação de Risco é uma medida fitossanitária que objetiva: reduzir o potencial de inóculo, e permitir o trânsito e exportação de frutos cítricos oriundos de áreas com ocorrência de cancro cítrico (São Paulo, 2017). No início de 2018, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou uma nova legislação que regulamenta o controle do cancro cítrico no país, e estabeleceu por meio da Instrução Normativa nº 21, quatro cenários: i) Área sem ocorrência; ii) Área Livre da Praga; iii) Área sob Erradicação ou Supressão e; iv) Área sob Sistema de Mitigação de Risco (SMR) (Brasil, 2018).

2.4. *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Pertencente ao gênero *Xanthomonas*, o agente etiológico do cancro cítrico foi isolado primeiramente pela pesquisadora Clara Henriette Hasse, em 1915, e

classificado como *Pseudomonas citri*. A partir de então, teve sua classificação alterada por mais algumas vezes, sendo em 1949 reclassificada como *Xanthomonas citri*, por Dowson (Khan & Hingorani, 1970), e novamente reclassificada como *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* por Vauterin (Vauterin et al., 1995; Hartung et al., 1996). Em 2006, a bactéria teve sua classificação mais uma vez alterada para *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Schaad et al., 2006).

Xcc apresenta morfologia de bastonete com 1,5 a 2,0 µm de comprimento e 0,5 a 0,7 µm de largura, sendo uma bactéria Gram-negativa, aeróbica, não fixadora de nitrogênio, uniflagelada polar, não forma esporos e não é exigente nutricionalmente (Galli, 1980; Bedendo, 1995). Raramente é encontrada livre no solo, sendo altamente adaptada ao crescimento endofítico (Swings & Civerolo, 1993).

Essa bactéria pode formar colônias amarelas e mucoides na maioria dos meios de cultura, devido à produção de xantomonadina (pigmento importante na proteção contra raios ultravioleta) e de goma xantana (exopolissacarídeo que auxilia na dispersão e sobrevivência do patógeno), respectivamente. Suas colônias são visíveis após 2 a 3 dias de incubação a 28 °C (Meyer & Bogdanove, 2009).

A Xcc pode sobreviver por meses em material vegetal em decomposição e se disseminar facilmente. Entretanto, para que a infecção ocorra no hospedeiro, a bactéria deve entrar em contato com ferimentos no tecido da planta ou através dos estômatos, acessando o interior das folhas (Gottwald, Graham & Schubert, 2002; Gonçalves-Zuliani et al., 2016). A colonização ocorre no mesófilo foliar levando ao aparecimento de sintomas previamente descritos no **item 2.2**, p.31.

2.5. Divisão celular bacteriana

O processo de divisão bacteriana envolve a invaginação da membrana em conjunto com a parede celular subsequente à formação do septo divisional na região mediana da célula, causando a separação dos cromossomos duplicados. Após a septação e término do processo de divisão, o peptidoglicano do septo bacteriano é hidrolisado, permitindo a separação definitiva das células-filhas (Migocki et al., 2002; Errington; Daniel & Scheffers, 2003; Vicente et al., 2006; Lutkenhaus, 2007).

A divisão celular de procariotos possui proteínas específicas, sendo assim considerado um alvo promissor no desenvolvimento de antibacterianos (Hogan et al., 2018). O divisomo é um complexo macromolecular que controla a divisão bacteriana,

iniciada a partir da polimerização da proteína FtsZ (*Filamentous temperature-sensitive protein Z*). Essa proteína é um homólogo distante da tubulina de eucariotos (Goehring & Gueiros Filho, 2005; Li & Ma, 2015; Panda et al., 2016). A proteína FtsZ é constituída por duas subunidades globulares separadas por uma hélice alfa central, formando um filamento polarizado (Mukherjee & Lutkenhaus, 1994). Além da subunidade globular, há a região C-terminal, que possui estrutura aleatória (Durvale, 2013). Esta proteína é responsável pela organização de uma estrutura polimérica e anelar, denominada anel Z, o qual se situa internamente à membrana citoplasmática, na posição mediana da célula, sendo o local em que será iniciada a divisão celular.

Fatores diversos controlam o processo de septação bacteriana, estimulando ou inibindo a formação do anel Z (Lutkenhaus, 2007). Há sistemas que protegem os cromossomos contra guilhotinamento o qual poderia ocasionar o fechamento prematuro do anel Z sobre a massa cromossômica ainda não completamente segregada (Wu & Errington, 2004; Bernhardt & de Boer, 2005).

O anel Z mostra-se como uma estrutura altamente conservada entre os procariotos, atuando como força-motriz para a constrição e divisão celular (Huang et al., 2007). Dessa forma, inibidores do divisomo podem atuar como antibacterianos de amplo espectro de ação (Lock & Harry, 2008).

A proteína FtsZ possui atividade GTPásica, sendo capaz de hidrolisar guanosina trifosfato (GTP) em guanosina difosfato (GDP) e fosfato inorgânico (Pi). A ligação de FtsZ com GTP produz subunidades GTP-FtsZ que irão compor os protofilamentos retilíneos e estáveis, que iniciam o processo de anelação (Chen et al., 2005; Schoenemann & Margolin, 2017). A hidrólise de GTP induz alterações conformacionais no sítio de ligação com o nucleotídeo, alterando a volta T7, responsável por interações cabeça-cauda entre os monômeros, culminando na dissociação dos protofilamentos e despolimerização (Weiss, 2004). As substâncias capazes de reduzir ou aumentar a atividade GTPásica de FtsZ promovem alterações nos protofilamentos, impedindo a divisão celular bacteriana.

A inibição da formação do anel Z, por meio da ligação à proteína FtsZ, constitui-se em uma estratégia para o desenvolvimento de agentes antibacterianos de interesse agrícola de elevada patenteabilidade (Hong & Xie, 2013, Stokes et al., 2013).

2.6. Substâncias anti-*Xanthomonas*

As substâncias cúpricas são amplamente utilizadas no controle de fitobacterioses (Leite Jr. & Mohan, 1990; Gottwald et al., 2002; Sales Jr. et al., 2005; Scapin et al., 2015; Graham et al., 2016, Canteros et al., 2017). A aplicação de produtos a base de cobre na lavoura protege o tecido vegetal da infecção e reduz a população bacteriana na superfície foliar. Esta proteção foliar ocorre por ação mecânica, formando uma película temporária, necessitando de reaplicações (Behlau et al., 2010). O cátion cobre não possui atividade curativa ou sistêmica (Lamichhane et al., 2018).

A ação preventiva com frequentes aplicações e dose de cátion cobre ajustada importantes para obtenção do controle adequado do cancro cítrico (Gottwald et al., 2002, Stein et al., 2007, Behlau et al., 2010), mas a exposição repetida e prolongada pode induzir resistência bacteriana (Behlau et al., 2013; Richard et al., 2017).

Na Argentina, existem relatos da ocorrência de resistência ao cátion cobre em linhagens de Xcc obtidas de viveiros que receberam aplicações sucessivas de substâncias cúpricas (Canteros, 1999). Richard e colaboradores (2017) descreveram resistência ao cátion cobre em linhagens de Xcc na França.

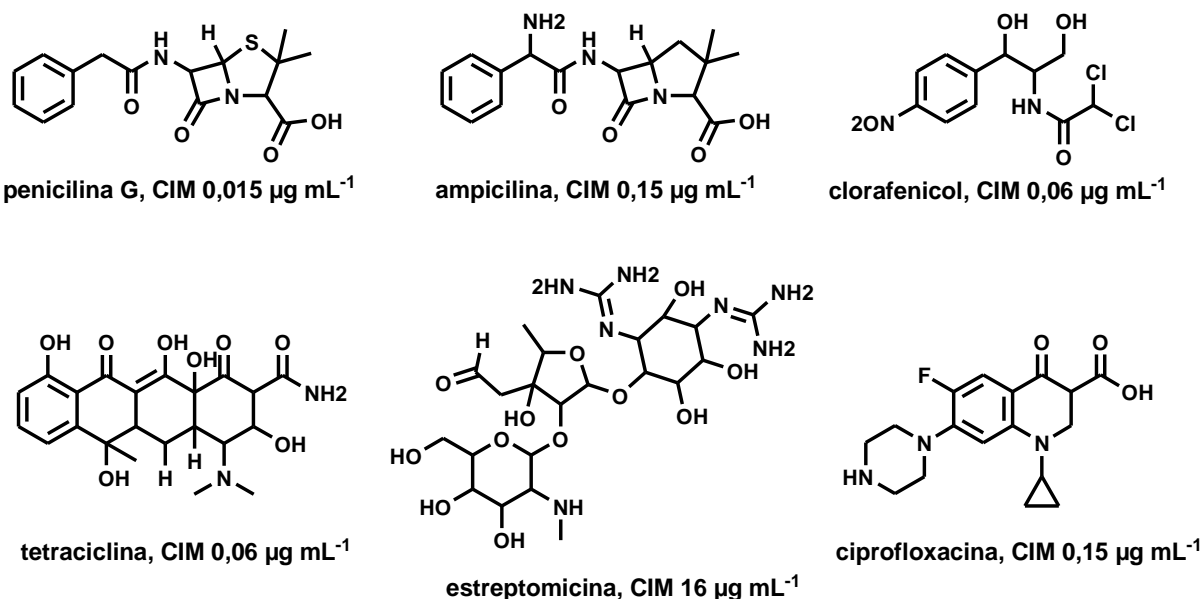
Considerando que o cátion cobre diminui a infecção pelo efeito de contato com a bactéria na superfície foliar, a eficiência de programas de aplicações de produtos a base de cobre pode ser prejudicada pela lixiviação causada por chuvas e pelo vento (Behlau et al., 2010; Graham et al., 2010).

Altos níveis de cobre podem reduzir a fertilidade do solo e causar estresse nas plantas, diminuindo o rendimento das culturas (Dumestre et al., 1999). Aplicações excessivas de formulações a base de cobre, altas temperaturas e tempo seco podem causar fitotoxicidade (Behlau et al., 2017).

Controles alternativos contra Xcc têm sido recentemente estudados. Li e Wang (2014) descreveram a redução de biofilme de Xcc por meio do aminoácido D-leucina e do derivado indólico 3-indoliacetonitrila, com diminuições do número de lesões de cancro cítrico e aumenta a sensibilidade bacteriana ao cobre. Gholami e colaboradores (2018) estudaram a atividade anti-Xcc de enzimas proteolíticas como: proteinase K, tripsina, pepsina, papainase e catalase. No ensaio de digestão enzimática, a proteinase K, tripsina e pepsina inibiram a atividade bacteriana. Os antibióticos penicilina G, ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina, estreptomicina, e

ciprofloxacina (**Figura 2**) foram avaliados contra Xcc, obtendo-se valores de concentração inibitória mínima (CIM) na faixa de 0,0015 a 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo a penicilina G a mais potente (Gholami et al., 2018).

Figura 2. Antibióticos avaliados contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e seus valores de concentração inibitória mínima (CIM)



Fonte: autora

Redondo e colaboradores avaliaram a eficácia dos tratamentos bactericidas atualmente aprovados (NaCl, CuSO_4 , NaClO, ortofenilfenato de sódio [SOPP], Aquazix® [mistura de peróxido de hidrogênio com prata] e Zixvirox® [mistura de peróxido de hidrogênio com ácido peracético] para a desinfecção de Xcc em frutas no *packing house* (Davey & O 'Toole, 2000; Monier & Lindow, 2003; Danhorn & Fuqua, 2007, Redondo et al., 2015). Os autores concluíram que os bactericidas reduziram a formação de biofilmes de modo dose-dependente, o que foi observado anteriormente para o cloreto de sódio, conhecido por induzir a formação de biofilme de *Escherichia coli* (Karatan & Watnick, 2009).

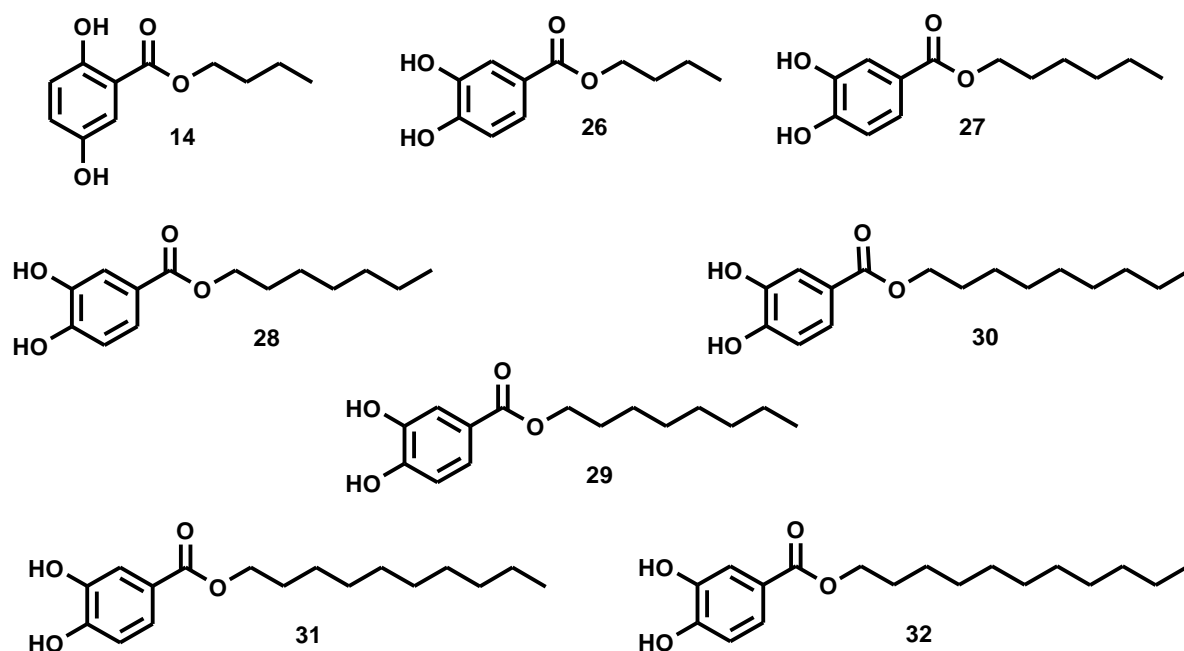
2.7. Diidroxibenzoatos de alquila e sua atividade antimicrobiana

Os DHB são substâncias fenólicas provenientes da biossíntese do acetato ou do ácido chiquímico. São caracterizados por uma carboxila (COOH) e duas hidroxilas

(OH), as quais conferem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Bravo, 1998; Simões et al., 2003).

Os DHB apresentam atividade antimicrobiana, incluindo ação contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos, incluindo: *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Fusarium culmorum* e *Saccharomyces cerevisiae*. Dentre os DHB, destacam-se protocatecuato de butila (**26**), protocatecuato de nonila (**30**) e gentisato de butila (**14**) (**Figura 3**), os quais inibiram o crescimento bacteriano e fúngico com valores de concentração inibitória mínima (CIM) compreendidos entre 1,25 a 2,50 mM (Nihei, Nihei & Kubo, 2003, 2004; Merkl et al., 2010).

Figura 3. Diidroxibenzoatos de alquila com atividade antimicrobiana: gentisato de butila (**14**) e protocatecuatos de butila (**26**), hexila (**27**), heptila (**28**), octila (**29**), nonila (**30**), decila (**31**) e dodecila (**32**).

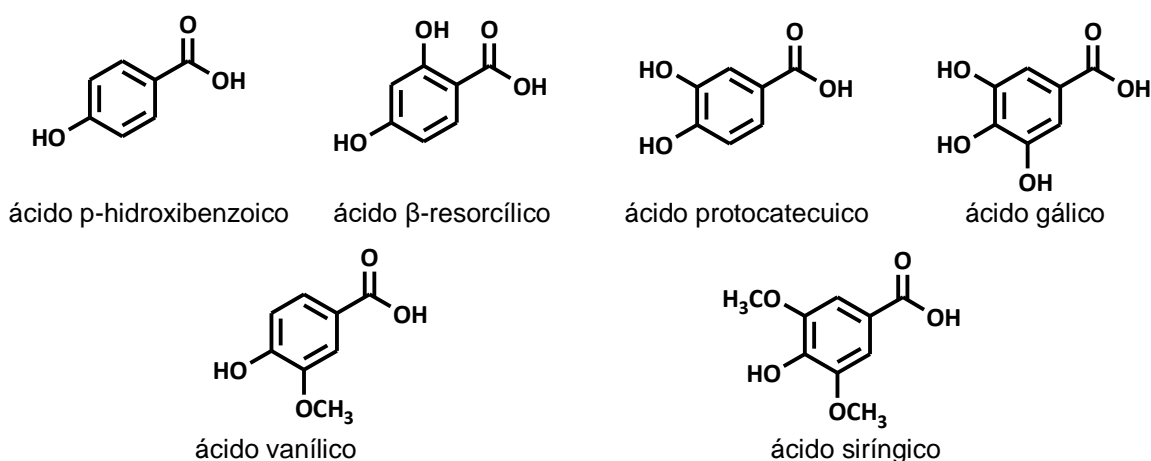


Fonte: autora

Alves e colaboradores demonstraram a atividade antimicrobiana dos ácidos *p*-hidroxibenzóico, β -resorcílico, protocatecuico, gálico, vanílico e siringico (**Figura 4**, p. 40) contra isolados clínicos de bactérias Gram-negativas como: *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganni*, *Pasteurella multocida* e *Neisseria gonorrhoeae* (Alves et al., 2013). Os ácidos com maior atividade antibacteriana foram o ácido β -resorcílico e o ácido protocatecuico, destacando-se a atividade dos ácidos β -resorcílico, vanílico

e siríngico (CIM 0,5 mg mL⁻¹) e *p*-cumárico (CIM 1,0 mg mL⁻¹) contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). Os autores sugeriram que a presença da carboxila (COOH) e dois grupos hidroxila (OH) *para* ou *orto* posicionados no anel benzênico foram importantes para a atividade anti-MRSA.

Figura 4. Ácidos avaliados contra isolados clínicos de bactérias Gram-negativas



Fonte: autora

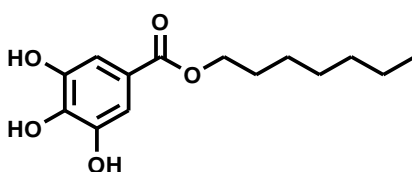
Soares e colaboradores descreveram a atividade antidermatofítica de DHB, os quais inibiram o crescimento de *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes* (**Figura 3**, p. 39). Dentre esses, destacou-se o protocatecuato de heptila (**28**), que apresentou valores de concentração fungicida mínima (CFM) inferiores a 4,0 µg mL⁻¹, atuando sinergicamente com o fluconazol, um fármaco antifúngico (Soares et al., 2014).

Recentemente foram avaliadas as atividades antifúngicas dos protocatecuatos de hexila (**27**), heptila (**28**), octila (**29**), nonila (**30**), decila (**31**) e dodecila (**32**) (**Figura 3**, p. 39), os quais demonstraram potencial inibitório no crescimento de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*, com valores de CIM entre 0,24 e 0,97 µg mL⁻¹. A citotoxicidade destas substâncias foi avaliada usando o revelador de sulforrodamina B a 0,4% contra linhagem celular MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano). Os protocatecuatos avaliados demonstraram elevadas viabilidades celulares, destacando o hexila (**27**), nonila (**30**) e dodecila (**32**) (**Figura 3**, p. 39) com menor toxicidade à MRC-5 (Medina-Alarcón et al, 2017).

Com o problema da ineficiente diminuição da população bacteriana de Xcc descrita no **item 2.1**, p. 31 e os esforços na procura de alternativas eficazes (**item 2.6**, p. 37), este trabalho se faz relevante na busca de substâncias úteis ao controle do cancro cítrico. Silva e colaboradores indicaram a ação anti-Xcc de galatos de alquila

(3,4,5-triidroxibenzoatos de alquila), destacando-se o galato de heptila (**Figura 5**). Este galato foi capaz de inibir o crescimento de Xcc, em modelos *in vitro* e *in planta* (Silva et al., 2013). Os estudos de mecanismos de ação antibacteriana dos galatos envolvem a ação sobre a membrana e perturbação de FtsZ (Król et al., 2015).

Figura 5. Estrutura do galato de heptila, um 3,4,5-triidroxibenzoato de alquila (TA) com atividade anti-Xcc e inibição da proteína FtsZ



Fonte: autora

A similaridade estrutural entre os TA (**Figura 5**) e os DHB (**14, 26–32**) (**Figuras 3**, p. 39) sugere que estes últimos possuem potencial atividade contra Xcc, bem como potencial atividade inibitória de FtsZ, justificando o investimento químico e biológico nesta classe de ésteres.

3. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desse estudo foi investigar a atividade anti-Xcc e anti-cancro cítico de diidroxibenzoatos de alquila, bem como avaliar sua toxicidade.

3.1. Objetivos específicos

- A) Sintetizar 36 DHB, sendo 12 β -resorcilatos (**Série I**), 12 gentisatos (**Série II**) e 12 protocatecuatos (**Série III**), por meio da reação de esterificação de Fischer;
- B) Determinar a hidrofobicidade dos DHB por meio do coeficiente de partição octanol-água ($\log P_{o/a}$) utilizando CLAE-DAD;
- C) Avaliar a susceptibilidade de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* aos DHB, por meio do ensaio de microdiluição em caldo utilizando resazurina como revelador de viabilidade celular (Resazurin Microtiter Assay - REMA);
- D) Avaliar os efeitos de DHB selecionados sobre a curva de crescimento de Xcc;

Capítulo 4

1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O gênero *Xanthomonas* compõe um grupo de bactérias que atinge culturas agrícolas economicamente importantes, como arroz, feijão, tomate, laranja, pimentão, maracujá, uva e outros (Graham et al., 2004).

O enfoque deste trabalho foi a *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, o agente etiológico do cancro cítrico, que acomete os pomares de citrus. O controle químico deste patógeno no campo consiste na aplicação de substâncias cúpricas, largamente utilizadas no controle de fitobacterioses, pois protegem o tecido vegetal da infecção e reduzem a população bacteriana na superfície foliar, devido a formação temporária de uma película protetora (Behlau et al., 2010). Com isso, são necessárias novas aplicações de cobre, o que pode causar a resistência bacteriana. Com o surgimento de cepas resistentes ao cobre tem se realizado pesquisas de novas substâncias antibacterianas (Behlau et al., 2013; Scapin et al., 2015; Graham et al., 2016; Canteros et al., 2017; Richard et al., 2017; Martins et al., 2018; Gochez et al., 2018).

No **Capítulo 2** foram avaliadas a atividade anti-Xcc dos ácidos β -resorcílico, gentísico e protocatecuico demonstrando-se inativos ($MIC > 100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Avaliou-se o potencial anti-Xcc de três séries de ésteres alquílicos, constituída por diidroxibenzoatos de etila, *n*-butila, *n*-hexila, *n*-octila, *n*-decila e *n*-dodecila, sendo estes ativos contra Xcc, destacando os ésteres hexílicos e octílicos. Posteriormente, foram preparados e testados os ésteres de heptila e nonila. Os menores valores de CIM foram obtidos para os ésteres heptílicos (**4**, **16** e **28**). Estudamos diidroxibenzoatos de alquila ramificados, cíclicos e aromáticos para analisar os efeitos estereoeletrônicos na atividade anti-Xcc, no entanto, não obtivemos conclusões claras sobre a relação estrutura e atividade antibacteriana destas substâncias (**Tabela 1 Capítulo 2**, p. 60).

Silva e colaboradores descreveram a atividade anti-Xcc de galatos de alquila. Visando investigar a relevância do número de grupos hidroxila na atividade anti-Xcc, comparando-os aos diidroxibenzoatos de alquila. Os diidroxibenzoatos heptílicos exibiram valores de CIM de 52 μM (**4**), 80 μM (**16**) e 88 μM (**28**) contra Xcc, sendo assim mais ativos que o galato de heptila (CIM = 116 μM) (Silva et al., 2013). Este conjunto de dados indicou que a redução no número de hidroxilas aumentou a

atividade anti-Xcc. Comparações entre os valores de CIM dos ésteres **4**, **16** e **28** sugerem que as hidroxilas nas posições 2 e 4 (DHB **4**) aumentaram a atividade anti-Xcc quando comparadas às posições 2 e 5 (DHB **16**), bem como 3 e 4 (DHB **28**).

Isso foi corroborado por outros dados referentes aos ácidos diidroxibenzóicos (DA) e seus ésteres que tiveram atividade antimicrobiana descrita contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Liu, Hsu & Yin, 2008; Kuet et al., 2009; Chao & Yin, 2009; Mandalari et al., 2010; Bisignano et al., 2013). Alguns DAs, como ácido *o*-pirocatecuico, β -resorcílico, gentísico, γ -resorcílico e protocatecuico mostram atividade contra *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica* (Friedman, Henika & Mandrel, 2003).

Merkl e colaboradores analisaram a atividade antimicrobiana dos ácidos protocatecuíco, gentísico, ferúlico, cafeíco, vanílico e *p*-hidroxibenzóico e os seus ésteres de metila, etila, *n*-propila, *n*-butila e *n*-hexila, contra *E. coli*, *Bacillus cereus*, *L. monocytogenes*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Fusarium culmorum* e relatou diferenças significativas entre os valores de CIM dos ácidos e seus ésteres. Em geral, os ésteres butílicos foram duas vezes mais ativos que os ácidos de origem. Além disso, os autores associaram o aumento da atividade antibacteriana com o tamanho da cadeia alquílica lateral (Merkl et al., 2010).

O aumento da cadeia alquílica promove uma diminuição na solubilidade em água, favorecendo a formação de micelas, as quais são incapazes de atravessar a membrana de células bacterianas. O caráter anfifílico dos diidroxibenzoatos de alquila permite a formação de micelas, devido à hidrofobicidade dos grupos hidroxila e a longa cadeia carbônica hidrofóbica (Wermuth, 2008; Merkl et al., 2010).

A substância com maior lipofilicidade foi o β -resorcilato de dodecila (2,4 diidroxibenzoato de dodecila - **8**) e a substância com menor lipofilicidade foi o ácido protocatecuíco (**ácido 3,4-DHB**). O aumento do tamanho da cadeia lateral alquílica, aumenta a lipofilicidade dos ésteres, promovendo maior permeação na fase estacionária formada por ODS (octadecilsilano), culminando em tempos de retenção maiores. O DHB **4** tem duas hidroxilas nas posições 2,4 (*meta*-posicionadas), o **16** tem duas hidroxilas em 2,5 (*para*-posicionadas) e o **28** tem duas hidroxilas nas posições 3,4 (*orto*-posicionadas). Os valores de $\log P_{o/a}$ de 5,1 (**4**), 5,0 (**16**) e 4,3 (**28**) são próximos, sendo a substância **4** a mais lipofílica.

Neste trabalho, demonstramos que os diidroxibenzoatos de heptila não apresentavam citotoxicidade (**Tabela 2, Capítulo 2**, p. 61) dentro da faixa de concentração testada (12,5 a 200 μM). Nossos resultados corroboram os estudos de Medina-Alarcón e colaboradores, que relataram que os protocatecuatos de alquila não mostraram toxicidade contra as linhagens celulares MRC-5 e HepG2 (Medina-Alarcón et al., 2017).

Ao observamos as curvas de crescimento de Xcc (**Figura 1, Capítulo 2**, p. 62) durante o tratamento com as substâncias, notou-se um atraso na fase exponencial, que prolongou o tempo para que a colônia bacteriana atingisse a fase estacionária. Este atraso foi mais evidente quando se aumentou a concentração das substâncias. As interações dos ésteres com as células de Xcc apresentaram curvas diferentes, o que é um fato interessante, uma vez que os ésteres possuem o mesmo tamanho de cadeia carbônica. Portanto, isso nos fez considerar a relevância das hidroxilas no crescimento de Xcc. Comparando os DHB ao controle positivo e ao controle veículo no **item 2.8 do Capítulo 2**, p. 60, o crescimento bacteriano sofreu um atraso de aproximadamente 18 h até atingir a fase estacionária. No entanto, ao avaliar o comportamento do DHB **16** observamos uma maior inibição do crescimento bacteriano, diminuindo significativamente a altura da curva (menor densidade óptica). Portanto, pode-se inferir que a ação do DHB **16** sobre Xcc é maior que a ação do DHB **4**. O perfil do DHB **28** apresentou aumento do crescimento bacteriano de 20 a 30 h, posteriormente a este tempo a inibição do crescimento de Xcc continuou mais eficaz do que aquela apresentada por DHB **4**, mas com menor capacidade de inibição em relação ao DHB **16** (**Figura 1, Capítulo 2**, p. 62).

Ao avaliamos o oxiclreto de cobre, encontramos um valor de CIM de 43,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra Xcc e contra as células eucarióticas não demonstrou toxicidade. Nas curvas de crescimento das colônias tratadas com o oxiclreto de cobre, notamos que o padrão de curva não se alterou e o oxiclreto de cobre mostrou-se inativo nas condições testadas. Behlau e colaboradores descreveram o oxiclreto de cobre como uma formulação de cobre insolúvel (ICuF) (syn. Copper fixo), sendo a forma mais estudada e comumente utilizada de cobre para o controle do cancro cítrico (Behlau et al., 2010; Behlau et al., 2017). A insolubilidade pode estar relacionada a baixa atividade do oxiclreto de cobre.

A concentração bactericida mínima foi determinada pela observação do crescimento bacteriano em placas de Petri transferidas das placas do ensaio de microdiluição em caldo. Obtivemos ação bactericida para os ésteres **11**, **22–24**, **31** e **36** a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, para os ésteres **2**, **3**, **15**, **27–30** a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e para os ésteres **4** e **16** a $25 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Investigamos os diidroxibenzoatos de alquila quanto a interferência na divisão celular de Xcc mediada por FtsZ (Lutkenhaus & Addinall, 1997). A proteína FtsZ está relacionada à tubulinas eucarióticas (Lowe & Amos, 1998), por possuir atividade GTPásica (de Boer, 1992; Ray Chaudhuri & Park, 1992) e capacidade de se polimerizar de modo dependente de GTP (Erckson & Stoffer, 1996). O ensaio de regeneração contínua do substrato foi realizado para caracterizar a atividade GTPásica (Margalit et al., 2004). Os ésteres **4**, **16** e **28** apresentaram inibição da atividade GTPásica de FtsZ (**Figura 4, Capítulo 2**, p. 65). Esses dados sugerem que os três compostos promoveram alterações nos protofilamentos, levando à despolimerização, e impedindo a divisão celular bacteriana.

Os ésteres heptílicos **4**, **16** e **28** afetaram a integridade da membrana (**Figura 2, Capítulo 2**, p. 63), mas apenas **28** mostrou alta permeabilidade similar à nisina. Portanto, similarmente aos galatos de alquila (Król et al., 2015), as substâncias **4**, **16** e **28** exibem atividade antibacteriana pela combinação da inibição de FtsZ e de permeabilização da membrana.

No **Capítulo 3**, dando sequência aos experimentos, avaliamos a capacidade dos ésteres heptílicos **4**, **16** e **28** sobre a patogenicidade de Xcc. Nas folhas de *C. sinensis* foram infiltradas suspensões de células de Xcc tratadas previamente com os diidroxibenzoatos (**4**, **16** e **28**) a $\frac{1}{2}$ MIC e MIC. Em ambas as concentrações, a Xcc perdeu sua capacidade de colonização, não observando a formação de lesões características do cancro cítrico (**Figura 2, Capítulo 3**, p. 162).

Comparando os ésteres aos compostos de cobre observamos a inibição parcial dos sintomas, sendo essa redução mais aparente no tratamento com sulfato de cobre. Este efeito pode ser explicado pela insolubilidade do oxiclreto de cobre em meio aquoso. Behlau e pesquisadores relataram que as formulações insolúveis de cobre são as mais estudadas e utilizadas para o controle do cancro cítrico (Behlau et al., 2010; Graham et al., 2010), o que justificou nossa seleção para o estudo comparativo com os ésteres heptílicos.

A inibição da capacidade patogênica de Xcc por DHB corrobora com dados anteriormente descritos para os galatos de alquila, os quais inibiram completamente o aparecimento de lesões em folhas de *Citrus limonia* (Silva et al., 2013). Os diidroxibenzoatos heptílicos demonstraram eficácia similar aos galatos (Nazaré et al., 2018). Para este ensaio, o número e a posição das hidroxilas não foi relevante, obtendo o mesmo efeito supressor nos sintomas do cancro cítrico, evidenciando que os ésteres (**4**, **16** e **28**) têm atividade protetora contra a infecção Xcc.

Para confirmar a capacidade protetora dos diidroxibenzoatos heptílicos **4**, **16** e **28** em plantas jovens de *C. sinensis*, seguimos a metodologia do teste de pulverização, que simula a infecção natural em condições de campo pela ação da chuva e vento. A infecção de Xcc em tecidos foliares saudáveis ocorre através dos estômatos e ferimentos (Gottwald e Graham, 1992; Schubert et al., 2001; Bock et al., 2010). Inicialmente, foram avaliadas a incidência de sintomas por grupo (tratamento) das folhas coletadas. Obtendo-se 80,1% de folhas sintomáticas no controle positivo (folhas não-tratadas), 80,3% no controle de veículo (DMSO 1%), 53,4% (**4**), 67,8% (**16**) e 57,2% (**28**) nos tratamentos com os diidroxibenzoatos de heptila (**Figura 3, Capítulo 3**, p. 163). Correlacionando os tratamentos com os ésteres e controle positivo observou-se a diminuição de 33,3% nos sintomas para o DHB **4**, 15,3% para o DHB **16** e 28,6% para o DHB **28**. Correlacionamos a capacidade dos ésteres heptílicos inibirem o início dos sintomas com o oxiclreto de cobre. Os sintomas para o tratamento com oxiclreto de cobre foi de 58,7%, com uma redução de 26,7% nos sintomas em relação ao controle positivo. Com base na análise estatística (one-way ANOVA com pós-teste de Tukey) os tratamentos com ésteres heptílicos e oxiclreto de cobre não apresentaram diferença significativa.

Utilizamos as escalas diagramáticas descritas por Belasque Jr. e colaboradores (2005) para avaliar a severidade dos sintomas. Obtivemos as taxas de severidade de 1,3 no controle positivo (água), 2,2 no controle veículo (DMSO 1%), 0,6 para o oxiclreto de cobre, 0,6 (**4**), 0,9 (**16**) e 0,6 (**28**), verificando que a capacidade inibitória das substâncias foi semelhante ao oxiclreto de cobre (**Figura 3, Capítulo 3**, p. 163). Portanto, os diidroxibenzoatos heptílicos são alternativas para o cobre.

Foram realizados estudos de fitotoxicidade para avaliar a segurança dos ésteres (Priac, Badot e Crini, 2017). A inibição do crescimento inicial de plântulas é um indicador válido e sensível de toxicidade ambiental, sendo a fase inicial de

crescimento mais sensível que a germinação (Pinto e Kolb, 2016). Vários autores mostraram que os testes de fitotoxicidade têm muitas vantagens: são simples, economicamente viáveis e requerem uma pequena quantidade de amostra (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1989, Banks & Schultz, 2005; Salvatore, Carafa e Caratù, 2008). As plantas geralmente recomendadas pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA, 1996), pela Food and Drug Administration (FDA, 1987) e pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2003) são pepino (*Cucumis sativus*), alface (*Lactuca sativa*), rabanete (*Raphanus* spp.), trevo vermelho (*Trifolium pratense*) e trigo (*Triticuma estivum*) (Priac, Bandot e Crini, 2017).

No presente trabalho, optamos por trabalhar com alface. A concentração usada para os testes foi 10 x CIM, porque foi a concentração capaz de inibir o aparecimento de sintomas no teste de pulverização **item 2.2, Capítulo 3**, pg. 152. Na avaliação dos ésteres heptílicos (**4, 16 e 28**), os comprimentos médios das raízes foram semelhantes ao das medidas do controle negativo (**Figura 4, Capítulo 3**, p. 164), com exceção do DHB **4**, sendo o comprimento médio das raízes 50% menor que a do controle negativo. Nos caules, todos causaram redução igual a **4, 16 e CO**, sendo menor para **28**. Finalmente, o oxiclreto de cobre foi avaliado e encontramos um comprimento médio de raiz de 0,4 cm (83% menor que o controle negativo). Assim, os ésteres heptílicos foram menos fitotóxicos ou similares ao oxiclreto de cobre.

Avaliamos os parâmetros de trocas gasosas e fotoquímicos do processo fotossintético em folhas de *C. sinensis*. Os ésteres e o oxiclreto de cobre mostraram ausência de dano fotoinibitório, ou seja, não danificaram o aparato fotossintético, sendo assim considerados seguros para plantas jovens de *C. sinensis*.

Setenta e cinco por cento das lavouras dependem de polinizadores para a sua reprodução e as abelhas são os agentes mais importantes e eficientes tanto em ambientes naturais como agrícolas. Para o Brasil, o valor econômico estimado pela polinização é estimado em R\$ 43 bilhões por ano (BPBES, 2018). Entretanto, o declínio populacional de polinizadores tem sido observado drasticamente e entre as causas atribuídas a eventos de mortalidade, o principal é o uso indiscriminado de agrotóxicos. Portanto, torna-se essencial que todos os pesticidas lançados no meio ambiente sejam testados em abelhas. A toxicidade dos ésteres heptílicos foi testada contra as abelhas sem ferrão (*Scaptotrigona postica*). Para os testes, os protocolos estabelecidos pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico

(OECD, 1998a, 1998b) para a avaliação de pesticidas em abelhas em laboratório foram utilizados e adaptados para abelhas sem ferrão (*Scaptotrigona postica*).

Foram avaliadas as médias do consumo de alimento por abelha (μg) e a porcentagem de morte das abelhas, sendo o controle negativo e o controle de veículo constituídos por sacarose 50% e DMSO 1%, respectivamente.

Inicialmente avaliou-se a ingestão de alimento por abelha, e pode-se observar que os ésteres heptílicos **4** e **28** tiveram suas taxas de consumo semelhantes às dos controles, exceto a menor concentração da substância **4** (0,1 MIC) em que o consumo foi mais baixo do que as demais. O éster **16** apresentou baixa ingestão das abelhas para as três concentrações avaliadas, o que nos fez inferir que a substância **16** pode causar efeito repelente às abelhas. Avaliando o comportamento da média das concentrações do éster **16** observou-se efeito similar ao composto cúprico (CO) avaliado somente na concentração de aplicação na lavoura recomendada pelo fabricante. Em relação a taxa de mortalidade das abelhas observou-se que quanto maior a concentração, maior o número de abelhas mortas. Porém, este comportamento dose-resposta foi curioso para o éster **16**, pois foi o menos consumido pelas abelhas, fato que poderia ser simplesmente explicado devido à morte das abelhas por inanição, mas a mortalidade aumenta dependentemente da concentração, sendo assim, além da repelência a substância **16** foi tóxica para as abelhas. Ao compararmos as mortalidades dos ésteres heptílicos com o oxicleto de cobre (CO), notou-se que os ésteres foram mais seguros, pois apresentaram menores taxas de mortalidade que o CO, mesmo nas maiores concentrações. Ao avaliar as concentrações intermediárias, a mortalidade foi reduzida pela metade para os compostos **4** e **28**.

De qualquer forma, para minimizar os efeitos dos ésteres heptílicos nas abelhas, recomenda-se aplicá-los fora do período de floração, quando as abelhas forrageiam nas flores.

2. CONCLUSÕES GERAIS

Os 36 diidroxibenzoatos propostos foram obtidos, purificados e tiveram sua hidrofobicidade determinada. Os diidroxibenzoatos de alquila demonstraram atividade contra Xcc no ensaio de microdiluição em caldo, sendo os diidroxibenzoatos heptílicos (**4**, **16**, e **28**) selecionados devido a seus menores valores de CIM. Os

diidroxibenzoatos heptílicos exibiram atraso na fase exponencial de Xcc, afetaram a integridade da membrana de Xcc, inibiram a atividade GTPásica da proteína FtsZ, sugerindo a inibição da divisão celular bacteriana. Os diidroxibenzoatos **4**, **16**, e **28** interferiram na patogenicidade de Xcc, e se mantiveram ativos no ensaio de indução de cancro cítrico inibindo o aparecimento de sintomas. Os diidroxibenzoatos heptílicos demonstraram ser seguros, exibindo baixa toxicidade em células eucarióticas, no desenvolvimento inicial de *L. sativa* e em plantas jovens de *C. sinensis*, não alterando seus parâmetros fotossintéticos. Quanto a toxicidade em *S. postica* os diidroxibenzoatos heptílicos foram menos tóxicos ou com toxicidade similar ao oxiclreto de cobre.

Com isso, pode-se concluir que os diidroxibenzoatos heptílicos podem ser uma alternativa viável ao cobre, sendo agentes úteis no controle do cancro cítrico. As perspectivas deste trabalho seriam ensaios em maior escala (campo), ensaios de sinergismo com substâncias cúpricas, ensaios de estabilidade dos diidroxibenzoatos heptílicos e desenvolvimento de formulações agroquímicas.

3. REFERÊNCIAS

- ALVES, M. J. et al. Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 2, p. 346–357, 2013.
- BANKS, M. K.; SCHULTZ K. E. Comparison of Plants for Germination Toxicity Tests in Petroleum-Contaminated. **Soils, Water, Air, and Soil Pollution**. v. 167, p. 211–219, 2005.
- BEHLAU, F. et al. 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. et al. Evidence for acquisition of copper resistance genes from different sources in citrus-associated xanthomonads. **Phytopathology**, v. 103, n. 5, p. 409–418, 2013.
- BEHLAU, F. et al. Soluble and insoluble copper formulations and metallic copper rate for control of citrus canker on sweet orange trees. **Crop Protection**, v. 94, p. 185-191, 2017.
- BISIGNANO, C. et al. Antibacterial activities of almond skins on *cagA*-positive and-negative clinical isolates of *Helicobacter pylori*. **BMC Microbiol**. v. 13, p. 103, 2013.

BOCK, C. H.; PARKER, P. E.; GOTTWALD, T. R. Effect of simulated wind-driven rain on duration and distance of dispersal of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from canker-infected citrus trees. **Plant Disease**, v. 89, n. 1, p. 71–80, 2005.

BPBES disponível em: <https://www.bpb.es.net.br/>, Acesso: novembro, 2018.

CANTEROS, B. I., GOCHEZ, A. M., MOSCHINI, R. C. Management of citrus canker in Argentina, a success story. **Plant Pathology**, v. 33, n. 5, p. 441–449, 2017.

CHAO, C.Y.; YIN, M.C. Antibacterial effects of roselle calyx extracts and protocatechuic acid in ground beef and apple juice. **Foodborne Pathog. Dis.**, v. 6, p. 201–206, 2009.

DE BOER, P.A. et al. Roles of MinC and MinD in the Site-Specific Septation Block Mediated by The MinCDE System of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 63–70, 1992.

ERICKSON, H.P.; STOFFLER, D. Protofilaments and rings, two conformations of the tubulin family conserved from bacterial FtsZ to alpha/beta and gamma tubulin. **J. Cell Biol.**, v. 135, p. 5–8, 1996.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P.R.; MANDRELL, R.E. Antibacterial Activities of Phenolic Benzaldehydes and Benzoic Acids against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. **J. Food Prot.**, v. 10, p. 1811–1821, 2003.

GHOLAMI, D. et al. Comparison of antibiotics and bacteriocins antibacterial activity on *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 17, n. 1, p. 162-178, 2018.

GOCHEZ, A. M. et al. Pacbio sequencing of copper-tolerant *Xanthomonas citri* reveals presence of a chimeric plasmid structure and provides insights into reassortment and shuffling of transcription activator-like effectors among, *X. citri* strains. **BMC Genom.**, v. 19, p. 16, 2018.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H. A device for precise and nondisruptive stomatal inoculation of leaf tissue with bacterial pathogens. **Phytopathology**, v. 82, p. 930-935, 1992.

GRAHAM, J. H., BROOKS, C., YONCE, H. D. Importance of early season copper sprays for protection of Hamlin orange fruit against citrus canker infection and premature fruit drop. **Proceedings Florida State Horticultural Society**, v. 129, p. 74–78, 2016.

GRAHAM, J. H.; DEWDNEY, M. M.; MYERS, M. E. Streptomycin and copper formulations for control of citrus canker on grapefruit. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v. 123, p. 92–98, 2010.

KRÓL, E. et al. Antibacterial activity of alkyl gallates is a combination of direct targeting of FtsZ and permeabilization of bacterial membranes. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-12, 2015.

- KUETE, V. et al. Antimicrobial activity of the crude extract, fractions and compounds from stem bark of *Ficus ovate* (Moraceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 124, p. 556–561, 2009.
- LI, J.; WANG, N. Foliar application of biofilm formation-inhibiting compounds enhances control of citrus canker caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Phytopatology**, v. 104, n. 2, p. 134–42, 2014.
- LIU, W.; HSU, C.; YIN, M. In Vitro Anti-*Helicobacter pylori* Activity of Diallyl Sulphides and Protocatechuic Acid. **Phytother. Res.**, v. 22, p. 53–57, 2008.
- LÖWE, J.; AMOS, L.A. Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. **Nature**, v. 8, p. 391, 1998.
- LUTKENHAUS, J. Assembly Dynamics of the Bacterial MinCDE System and Spatial Regulation of the Z Ring. **Annual Reviews Biochemistry**, v. 76, p. 539–562, 2007.
- MANDALARI, G.; et al. Antimicrobial potential of polyphenols extracted from almond skins. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 51, p. 83–89, 2010.
- MARGALIT, D. N. et al. Targeting Cell Division: Small-Molecule Inhibitors of FtsZ GTPase Perturb Cytokinetic Ring Assembly and Induce Bacterial Lethality. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101, p. 11821–11826, 2004.
- MARTINS, P. M. M. et al. Persistence in Phytogetic Bacteria: Do Know Enough? **Front. Microbiol.**, v. 9, p. 1–14, 2018.
- MAYER, A. M.; POLIJAKOFF-MAYBER, A. In The germination of seeds. 4.ed. Great Britan: Pergamon Press, 1989. 270 p.
- MEDINA-ALARCÓN, K. P. et al. Alkyl Protocatechuate Loaded Nanostructured Lipid Systems as a Treatment Strategy for *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides litizii* In Vitro. **Frontiers in Microbiology** v.12, n. 8, p. 1048, 2017.
- MERKL, R. et al. Antimicrobial and Antioxidant Properties of Phenolic Acids Alkyl Esters, **Czech Journal of Food Sciences.**, v. 28, n. 4, p. 275-279, 2010.
- NIHEI, K., NIHEI A. & KUBO I. Rational Design of Antimicrobial Agents: Antifungal Activity of Alk(en)yl Dihydroxybenzoates and Dihydroxyphenyl Alkanoates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 22, p. 3993–3996, 2003.
- OECD, 1998a. Agricultural Policy Reform and the Rural Economy in OECD Countries, OECD, Paris.
- OECD, 1998b. “Agriculture in a Changing World: Which Policies for Tomorrow?”, Press Communiqué, Meeting of the OECD Committee for Agriculture at Ministerial level, OECD, Paris.
- PINTO, G. F. S.; KOLB, R. M. Seasonality affects phytotoxic potential of five native species of Neotropical savana. **Botany.**, v. 94, p. 81–89, 2016.

PRIAC, A.; BADOT, P. M.; CRINI G. Treated wastewater phytotoxicity assessment using *Lactuca sativa*: Focus on germination and root elongation test parameters. **Comptes Rendus Biologies.**, v. 340, p. 188-194, 2017.

RAYCHAUDHURI, D.; PARK, J.T. Escherichia coli cell-division gene ftsZ encodes a novel GTP-binding protein. **Nature**, v. 17, p. 359–392, 1992.

RICHARD, D. et al. Complete Genome Sequences of Six Copper-Resistant *Xanthomonas citri* pv. *citri* Strains Causing Asiatic Citrus Canker, Obtained Using Long-Read Technology. **Genome Announcements**, v. 5, n. 12, p. e00010-17, 2017.

SALVATORE, M. D.; CARAFA, A. M.; CARRATÙ, G. Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: A comparison of two growth substrates. **Chemosphere.**, v. 73, p. 1461-1464, 2008.

SCAPIN, M. S. et al. Tree-row-volume-based sprays of copper bactericide for control of citrus canker. **Crop Protection**, v. 77, p. 119–126, 2015.

SCHUBERT, T. S. et al. Meeting the challenge of Eradicating Citrus Canker in Florida-Again. **Plant Disease**, v. 85, n. 4, p. 340–356, 2001.

SILVA, I. C. et al. Antibacterial Activity of Alkyl Gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Journal Bacteriology**, v. 195, n. 1, p. 85, 2013.

SOARES, L. A. et al. Anti-*Trichophyton* Activity of Protocatechuates and Their Synergism with Fluconazol. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2014.

WERMUTH, C.G. *The Practice of Medicinal Chemistry*; London Academic Press: London, UK, 2008; Volume 3, pp. 273–287.