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

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

CAIO FELIPE CAVICCHIA ZAMUNER

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

FEVEREIRO - 2019

CAIO FELIPE CAVICCHIA ZAMUNER

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

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

Orientador: Prof. Dr. Henrique Ferreira

Co-orientador: Prof. Dr. Luis Octávio Regasini

Rio Claro

2019

Z26p	Zamuner, Caio Felipe Cavicchia Potencial de ação de compostos como protetivos e sanitizantes contra o fitopatógeno <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>, causador do cancro cítrico / Caio Felipe Cavicchia Zamuner. -- Rio Claro, 2019 68 p. : tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro Orientador: Henrique Ferreira Coorientador: Luis Octávio Regasini 1. Cancro (Fitopatologia). 2. Antimicrobianos. I. Título.
------	--

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

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTOR: CAIO FELIPE CAVICCHIA ZAMUNÉR

ORIENTADOR: HENRIQUE FERREIRA

COORIENTADOR: LUIS OCTÁVIO REGASINI

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

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

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

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

Rio Claro, 28 de fevereiro de 2019

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

A minha família e minha companheira, dedico

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

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

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

CAPÍTULO II: An organic acid and essential oil based bactericide as an alternative to sodium hypochlorite for post-harvest disinfection of citrus fruit49

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

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.1.1 Híbridos de pirazinamida-chalcona

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

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

1.1.2 Ésteres do Ácido Vanílico

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

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

1.1.3 Constituintes de óleos essenciais

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

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

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

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

OBJETIVOS

Avaliar a ação anti-*Xanthomonas citri* subsp. *citri* e potencial uso compostos sintéticos e derivados naturais no controle do cancro cítrico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Síntese dos híbridos de pirazinamida-chalcona

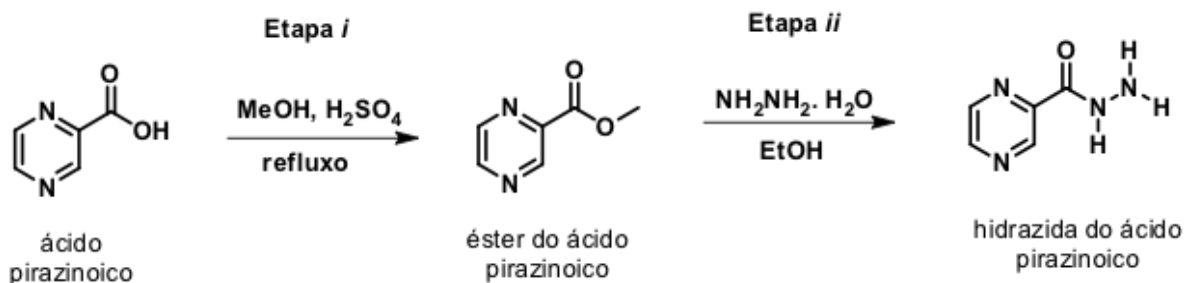
Os compostos híbridos de pirazinamida-chalcona foram cedidos pelo Professor Dr. Luís Octávio Regasini do Laboratório de Química Verde e Medicinal, Departamento de Química e Ciências Ambientais, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, São José do Rio Preto, SP. Tais compostos foram sintetizados de acordo com a metodologia que segue:

A síntese dos híbridos pirazinamida-chalcona (PZA-CHA) foi realizada em três etapas; **(4.1.1)** preparação da hidrazida dos ácido pirazinoico (etapa i); **(4.1.2)** preparação de chalconas (etapa ii) e **(4.1.3)** preparação dos híbridos, por meio da reação entre a hidrazida dos ácido pirazinoico (**etapa i**) e as chalconas (**etapa ii**).

2.2 Preparação de Hidrazida do Ácido Pirazinoico

A hidrazida do ácido pirazinoico foi preparada em duas etapas, (i) esterificação do ácido pirazinoico, e (ii) hidrazinólise do éster metílico, na presença de hidrato de hidrazina (Figura 1) (GROVER & KINI, 2006).

Figura 1 - Etapas na síntese da hidrazida do ácido pirazinoico

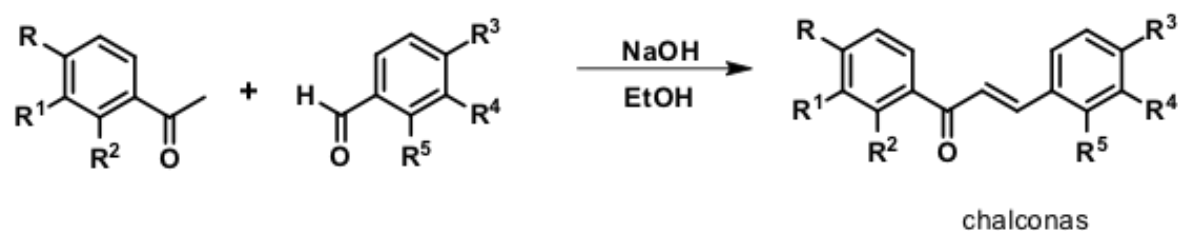


Fonte: Elaborado no software ChemDraw

2.2.1 Preparação de Chalconas

A preparação das chalconas foi realizada por meio da condensação de Claisen-Schmidt (BUKHARI *et al.*, 2013) e foram utilizados derivados acetofenônicos e derivados benzaldeídicos como materiais de partida, bem como hidróxido de sódio e etanol como catalisador e solvente, respectivamente (Figura 2).

Figura 2 - Síntese das chalconas a partir de derivados acetofenônicos.

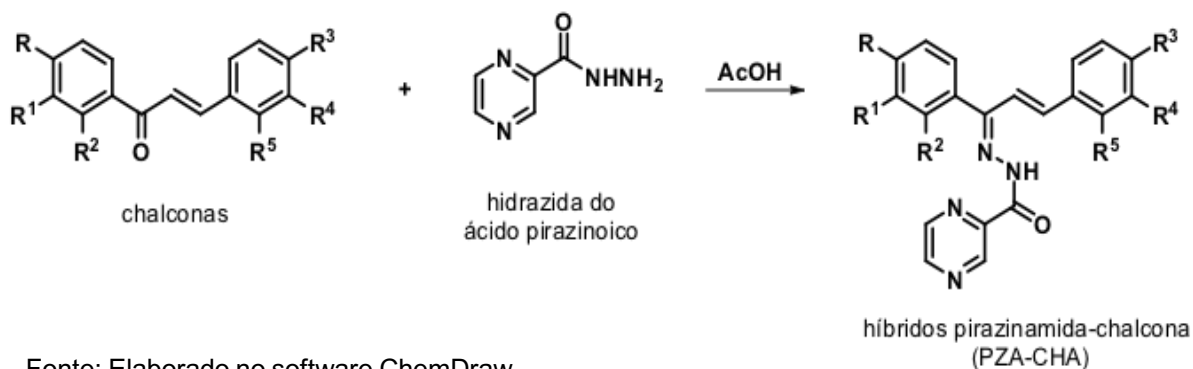


Fonte: Elaborado no software ChemDraw

2.2.2 Preparação dos Híbridos PZA-CHA

A preparação dos híbridos PZA-CHA foi realizada pela reação entre a hidrazida do ácido pirazinoico (**etapa i**) e as chalconas (**etapa ii**) em ácido acético glacial sob refluxo (Figura 3) (YUSUF & JAIN, 2014).

Figura 3 - Reação entre a hidrazida do ácido pirazinoico preparado na etapa A e as chalconas, preparadas na etapa B, para a formação dos híbridos de pirazinamida-chalcona.

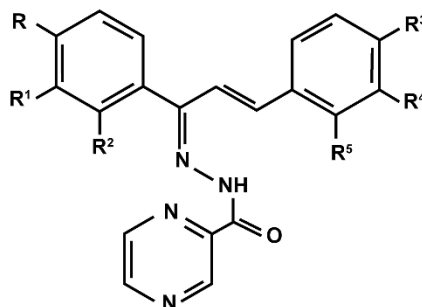


Fonte: Elaborado no software ChemDraw

2.2.3 Estruturas dos Híbridos Pirazinamida-Chalcona

Os compostos obtidos seguiram o seguinte código e substituição de radicais (Tabela 1 e Figura 4):

Tabela 1 - Substituintes e posições (R, R¹, R², R³, R⁴, R⁵) dos radicais nos híbridos de pirazinamida-chalcona e seus respectivos códigos



Compostos	R	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
LR25	H	H	H	H	H	H
LR24	CH ₃	H	H	H	H	H
LR23	O-CH ₃	H	H	H	H	H
LR20	H	H	H	CH ₃	H	H
LR22	H	H	H	O-CH ₃	H	H
LR26	H	H	H	Cl	H	H
LR29	H	H	H	Cl	Cl	H
LR35	H	OH	H	H	H	H
LR36	OH	H	H	H	H	H
LR41	H	H	H	H	H	OH
LR37	H	H	H	OH	H	H

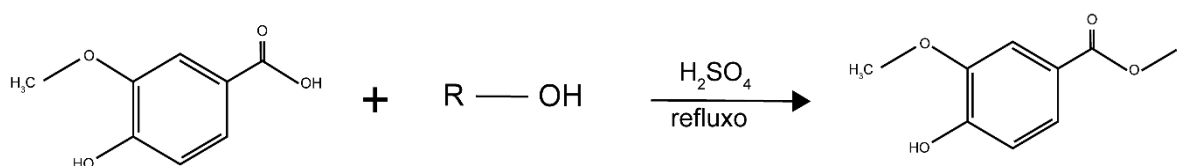
R : Radicais substituídos

2.3 Síntese dos ésteres do Ácido Vanílico

A síntese dos ésteres do Ácido vanílico (Ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico) foi realizada pelo método de esterificação de Fischer, utilizando-se do ácido vanílico e os respectivos álcoois (Figura 5), para obtenção de cadeias laterais de diferentes tamanhos (Tabela 2). Com isso visamos aumentar a hidrofobicidade do composto, o que possivelmente, potencializaria sua capacidade de ser assimilado pela membrana celular. Para tanto, 1 g do Ácido vanílico (Sigma Aldrich®) foi dissolvido em 5 mL dos respectivos álcoois alquílicos em um balão volumétrico sob agitação constante. Após a completa solubilização do meio reacional, foi adicionado ácido sulfúrico (de 1 a 3

gotas) como catalisador. As reações foram mantidas sob refluxo em temperaturas entre 65-90°C. A conversão dos reagentes em produtos foi acompanhada por Cromatografia de Camada Delgada Analítica (CCDA) com as placas reveladas em luz ultravioleta (254 nm). Uma vez que houve a total conversão do álcool, o meio foi diluído em acetato de etila e conduzido para uma partição líquido-líquido. A partição foi realizada com três alíquotas de 25 mL de água destilada, seguida por três alíquotas de 25 mL de uma solução de bicarbonato de sódio 1 mol/L, afim de neutralizar o meio. A fase orgânica restante foi seca em um evaporador rotativo.

Tabela 2 – Reação de esterificação do ácido vanílico para a adição de cadeias laterais (R) de diferentes tamanhos e os ésteres obtidos com os respectivos álcoois utilizados na reação.



Composto (Código)	Álcool	Cadeia lateral
Vanilato de etila (VA2)	Etanol	- CH ₂ -CH ₃
Vanilato de butila (VA4)	Butanol	- (CH ₂) ₃ -CH ₃
Vanilato de pentia (VA5)	Pentanol	- (CH ₂) ₄ -CH ₃
Vanilato de hexila (VA6)	Hexanol	- (CH ₂) ₅ -CH ₃
Vanilato de heptila (VA7)	Heptanol	- (CH ₂) ₆ -CH ₃
Vanilato de octila (VA8)	Octanol	- (CH ₂) ₇ -CH ₃
Vanilato de decila (VA10)	Decanol	- (CH ₂) ₉ -CH ₃

Após a síntese, os compostos passaram por uma coluna cromatográfica de fase normal (CC-FN) para reter o excesso de álcool e eventuais impurezas e, então, foram cristalizados com a adição de hexano em baixas temperaturas. Uma vez cristalizados, os compostos foram analisados em Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN de ¹H e ¹³C) quanto à sua pureza e confirmação estrutural.

2.4 Constituintes de óleos essenciais

Os compostos: Timol 98.5% - Sigma-Aldrich®; Carvacrol 98% - Sigma-Aldrich®; e Linalol 97% - Sigma-Aldrich®, foram utilizados para os ensaios antimicrobianos, afim de garantir a maior pureza de compostos isolados, dentre os que são encontrados nos óleos essenciais de interesse.

2.5 Linhagens celulares e condições de crescimento

A linhagem bacteriana selvagem de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (IBSBF-1594) foi cultivada a 29 °C em meio NYG sólido e quando em meio líquido, sob rotação de 200 rpm.

2.6 Avaliação da inibição do crescimento bacteriano pelo método Resazurin Microtiter Assay (REMA) Plate e determinação da porcentagem de inibição de células

A avaliação da inibição do crescimento bacteriano foi feita através do método Resazurin Microtiter Assay (REMA) Plate descrito por PALOMINO *et al.* (2002) com algumas modificações (SILVA *et al.*, 2013). Uma solução estoque foi preparada pela diluição dos compostos em DMSO 100%. As soluções estoque foram diluídas em meio de cultura em microplacas multipoços (96 poços; volume final de 100 µL/poço), de modo que, após a diluição seriada, a amostra mais concentrada possuísse a concentração máxima de 400 µg.mL⁻¹ de composto e 1% de DMSO. Posteriormente, o inóculo de *Xanthomonas citri* foi realizado para uma concentração final de 10⁵ UFC/poço. O controle negativo foi composto por 90 µL de meio e 10 µL de inóculo, sem tratamento; o controle positivo foi composto pelo inóculo e por 20 µg.mL⁻¹ de canamicina, enquanto o controle de veículo foi realizado com o inóculo e DMSO a 1% (v/v). As microplacas multipoços foram, então, incubadas a 29 °C, durante 16 horas. Após isso, 15 µL de resazurina 0,01% (w/v) foram adicionados e a microplaca incubada por duas horas a 29 °C. Seguido à reação, a fluorescência foi medida utilizando-se um scanner de fluorescência - nos comprimentos de onda de 530 nm e 590nm. A mudança de coloração do meio (de azul para rosa) indicou que houve a

redução da resazurina na presença de NADH (célula respirando), sendo possível determinar, por essa relação, a porcentagem de células inibidas (CI) pelo composto.

$$\text{Células inibidas (\%)} = \left(\frac{\text{Média das UAF}^{(a)} \text{ do CN}^{(b)} - \text{Média das UAF do teste}}{\text{Média das UAF do CN}} \right) \times 100$$

^(a) Unidades arbitrárias de fluorescência

^(b) Controle negativo

A porcentagem de inibição de células dos tratamentos em relação ao controle negativo foi calculada segundo a equação:

Todos os testes foram realizados em triplicatas técnicas, com três repetições para cada compostos nas microplacas, e em três eventos independentes (triplicatas biológicas). Para calcular as concentrações inibitórias mínimas para 90% (CI₉₀) e 50% (CI₅₀) das células, os resultados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Para o cálculo teórico da concentração inibitória mínima para 90% (CI₉₀) e 50% (CI₅₀) das células, uma curva de porcentagem de inibição celular pela concentração dos compostos foi ajustada de acordo com o modelo logístico, descrito pela equação:

$$IC(x) = \frac{A2 + (A1 - A2)}{\left(1 + \left(\frac{x}{x0}\right)^p\right)}$$

A CI₅₀ foi definida como a concentração inibitória mínima na qual 50% das células se mostraram inibidas pelos compostos. A CI₉₀ foi definida como a concentração mínima na qual 90% das células foram inibidas.

2.7 Avaliação do efeito bactericida dos compostos

Para a avaliação do potencial bactericida/bacteriostático dos compostos um ensaio de MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*) foi realizado. Uma fração do teste de REMA foi inoculada em meio sólido, com os inóculos transferidos por meio de um replicador de microplaca, e as placas incubadas em B.O.D. a 29 °C durante 48 horas. Após um período de 48 horas de incubação foi avaliado se houve crescimento bacteriano em meio NYG sólido, livre de quaisquer compostos.

2.8 Modo de ação de Timol e Carvacrol contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

2.8.1 Ativação da resposta SOS em *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

O sistema de resposta SOS é um mecanismo utilizado por bactérias que é ativado em células que possuem danos no DNA, na tentativa de reparar lesões (JANION, 2008). Compostos antimicrobianos podem causar diversas mudanças genéticas envolvendo uma variedade de vias metabólicas, uma delas é a indução de polimerases, que são propensas ao erro, mediada pelo sistema de resposta SOS (BLÁSQUEZ *et al.*, 2012; RODRÍGUEZ-ROJAS *et al.*, 2013).

Afim de verificar potencial ação dos compostos sobre o DNA bacteriano, foi realizado um ensaio utilizando um mutante de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 com um reporter *PrecA-lux* cromossomal (linhagem mutante *attTn7::PrecA-lux*). A indução da resposta SOS é evidenciada através da co-expressão de RecA e luciferase (gerando luminescência).

Culturas saturadas do mutante foram diluídas 10.000x em meio MH e incubadas a 37 °C, sob agitação constante, até a D.O.₆₀₀ ~ 0.3. Logo após os compostos foram adicionados ao meio na concentração de CI₉₀. Como controle negativo, nenhum composto foi adicionado as culturas. Para o controle positivo, ciprofloxacina (CIP), antibiótico conhecido por induzir a resposta SOS, foi adicionado na concentração de 0,03 µg.mL⁻¹.

Alíquotas de 100 µl foram coletadas após 0, 1 e 2 h de tratamento e a DO₆₀₀, bem como a luminescência, foram medidas com o leitor de microplacas GloMax-Multi+. Os dados de luminescência obtidos foram normalizados pela absorbância aferida em cada tempo, correlacionando a expressão de *recA* e indução da resposta SOS (modificado de: VALENCIA, *et al.*, 2017).

2.8.2 Microscopia celular

2.8.2.1 Análise morfológica

Uma análise morfológica foi realizada com os compostos que mostraram um efeito de inibição de 90% (CI₉₀) nos testes de REMA. As células foram observadas por microscopia de contrastes de fase, afim de verificar possíveis alterações provocadas na forma celular. O cultivo ocorreu a 29 °C e a observação foi feita em D.O.₆₀₀ ~ 0,4, em uma diluição de 1:10, após imobilização em lâminas de agarose 0,85% (w/v) em salina 0,85% (w/v) (modificado de: MARTINS *et al.*, 2010). Para tanto, cerca de 1 mL da solução contendo agarose foi vertida sobre as lâminas de microscopia, as quais outras lâminas foram posicionadas sobre de modo a permitir a formação de um fino gel de altura homogênea. Para a observação, as lâminas foram abertas e uma suspensão de células foi fixada no gel para observação.

As células de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* passaram por tratamentos de 15 e 30 minutos de contato com compostos na concentração de CI₉₀. Tal período de exposição foi definido de modo a não ultrapassar o tempo de duplicação celular do microrganismo (120 minutos). Após esse tempo de exposição, as amostras foram diluídas 1:10 com solução salina 0,85% (w/v), afim de minimizar a ação dos compostos sobre a bactéria. Logo após a diluição, a amostra foi centrifugada a 4.000 x.g por 1 minuto e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspendidas em solução salina 0,85 (w/v) e 10 µL foram vertidos na lâmina com agarose. Como controle positivo, foi realizado um tratamento de calor (MORÃO *et al.*, 2015), com as células incubadas por 30 minutos a 55 °C. Os experimentos foram realizados em três eventos independentes.

A observação das células (n=200) foi realizada no microscópio Olympus BX61, equipado com câmera monocromática OrcaFlase 2.8 (Hamamatsu) e as análises de imagem foram feitas com o software Fiji ImageJ.

2.8.2.2 Permeabilidade da membrana celular de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Para avaliar os efeitos dos compostos Timol e Carvacrol sobre a integridade da membrana celular de Xac foi utilizado uma mistura dos corantes para ácidos nucleicos DAPI (permeável por membranas) e iodeto de propídeo (IP) (permeável em

membranas corrompidas), uma vez que tais corantes auxiliam na visualização de células com a membrana intacta e comprometida, respectivamente (MORÃO *et al.*, 2018).

As lâminas e os tratamentos foram preparados de acordo com o descrito no item 4.7.1. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em 100 µL de solução salina 0,85% (w/v) adicionada de 6 µL de DAPI (1 mg/mL) e 2 µL de IP (1 mg/mL) e incubadas no escuro, em temperatura ambiente, por 15 minutos. Após incubação, as amostras foram novamente centrifugadas, o sobrenadante descartado e as células resuspensas em 10 µL de solução salina 0,85% (w/v) para observação no microscópio.

2.9 Ensaio de fitotoxicidade

Para determinar o potencial ecotóxico dos compostos, um teste de fitotoxicidade aguda foi realizado para Timol e Carvacrol. Sementes de alface (*Lactuca sativa*) foram utilizadas como indicador de toxicidade, uma vez que é uma espécie altamente sensível e recomendada para uso em testes de fitotoxicidade (MORAES & BIDOIA, 2015).

Sementes da marca ISLA® (lote:14713-G8) foram selecionadas por não possuírem nenhum defensivo que poderia influenciar os resultados do experimento e o teste foi conduzido de acordo com ARAÚJO & MONTEIRO (2005), com modificações.

Os compostos foram solubilizados em etanol e diluídos em água destilada estéril nas concentrações de 50, 100 e 200 µg.mL⁻¹, de modo que a concentração máxima de etanol fosse 1% (v/v) na concentração máxima testada de composto. O controle negativo foi realizado com uma solução de etanol 1% (v/v) em água destilada estéril. Como controle positivo, uma solução de sulfato de zinco (ZnSO₄ – 0.05 M) foi utilizada, uma vez que trata-se de um composto tóxico que não permite a germinação das sementes (ARAÚJO & MONTEIRO, 2005). Os tratamentos foram realizados com 20 sementes posicionadas sobre papel filtro estéril em placas de Petri e 3 mL de cada solução foi adicionado. As placas foram seladas com plástico filme, afim de impedir a evaporação e cobertas com papel alumínio, para evitar a entrada de luz. As amostras foram incubadas em B.O.D. durante 72 horas, ± 21 °C no escuro. Todos os tratamentos foram realizados em duplicatas.

Após o período de incubação, o número de sementes germinadas foi avaliado e as raízes foram medidas para calcular o índice de germinação de sementes e a elongação radicular relativa, de acordo com as equações (ARAÚJO & MONTEIRO, 2005):

$$\text{Germinação relativa (\%)} = \left(\frac{\text{número de sementes germinadas nos tratamentos}}{\text{número de sementes germinadas no controle negativo}} \right) \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Elongação radicular relativa (\%)} = \left(\frac{\text{média da elongação nos tratamentos}}{\text{média da elongação no controle}} \right) \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Índice de germinação(\%)} = \frac{\text{germinação relativa (\%)} \times \text{elongação radicular relativa (\%)}}{100} \quad (3)$$

2.10 Potencial protetivo de Timol e Carvacrol contra o cancro cítrico

Afim de verificar a eficácia na proteção contra o cancro cítrico, os compostos Timol e Carvacrol foram aspergidos na concentração de 1 mg/mL em brotos jovens, em estágio de desenvolvimento V4 a V5 (FUNDECITRUS), de *Citrus sinensis*. A aspersão ocorreu até o ponto de escorrimento (cerca de 20 – 30 mL de solução por planta). Como controle positivo foi utilizado o oxiclureto de cobre (Difere®, Oxiquímica) na concentração recomendada pela bula - 0,525 µg.mL⁻¹ equivalente em cobre metálico. Para o controle de veículo, foi utilizado etanol 1% (v/v). Após 24 horas, as plantas foram aspergidas com suspensão de Xac em salina 0,85% (m/v) em um concentração de 10⁸ células.mL⁻¹ (LI & WANG, 2012; LI & WANG, 2014) até o ponto de escorrimento (cerca de 20 – 30 mL de suspensão por planta). O desenvolvimento dos sintomas foi avaliado ao longo de um período de 45 dias e o percentual de folhas sintomáticas foi registrado. Todos os testes foram realizados com o uso de três plantas por tratamento e o teste de ANOVA, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey foi utilizado para avaliar se houve diferenças significativas entre o percentual de folhas sintomáticas para cada tratamento.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 A Inibição do crescimento bacteriano pelos compostos híbridos de pirazinamida-chalcona

Os compostos híbridos de pirazinamida-chalcona foram testados quanto sua atuação na inibição de Xac, porém, apesar do pontencial antimicrobiano associado as chalconas e a pirazinamida, em nenhum dos eventos houve qualquer tipo de inibição promovida pelo contato com os híbridos contra o fitopatógeno. Por conta disso, buscamos novos compostos promissores para serem investigados quanto sua ação antimicrobiana frente a Xac.

3.2 Ésteres do ácido vanílico inibem o crescimento de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Os ésteres do ácido vanílico compostos por cadeias laterais de número par, ímpar, bem como o próprio Ácido vanílico, foram testados quanto sua atividade antibacteriana para *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac). Os compostos VA5, VA6, VA7 e VA8 (com 5, 6, 7 e 8 carbonos na cadeia lateral, respectivamente) mostraram ação inibitória contra Xac (Figura 6). Para VA6 e VA8 (compostos de cadeia lateral par), a inibição máxima ocorreu na maior concentração ($400 \mu\text{g.mL}^{-1}$), com uma taxa de inibição celular entre 70 e 80% - ainda abaixo do controle com canamicina que apresentou 90% de inibição – e diminuiu conforme a concentração de vanilato no meio também foi diminuída. No caso de VA7, a inibição manteve-se praticamente constante nas doses de $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ até $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, com uma queda apenas a partir de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Para VA5, taxa de inibição máxima foi de 60%. O vanilato de pentila (VA5), mostrou inibição na maior concentração testada – por volta de 89% – porém com uma queda acentuada na resposta, fato que pode sugerir uma inibição por perturbações osmóticas na célula. O ácido vanílico e os compostos VA2, VA4 e VA10 não mostraram nenhuma atividade contra Xac nos ensaios realizados. Para os vanilatos testados, a CI_{90} não pode ser definida empiricamente, pois na concentração máxima testada ($400 \mu\text{g.mL}^{-1}$) a inibição sempre foi menor do que 90% (Figura 7).

Figura 4 – Porcentagem de células de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* inibidas nas diferentes concentrações testadas para os ésteres do ácido vanílico. (A) VA5; (B) VA6, (C) VA7 e (D) VA8. O controle de veículo (CV) foi realizado com DMSO 1% (v/v) e o controle positivo (CP) com canamicina (20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). As barras indicam o desvio padrão entre as triplicatas realizadas.

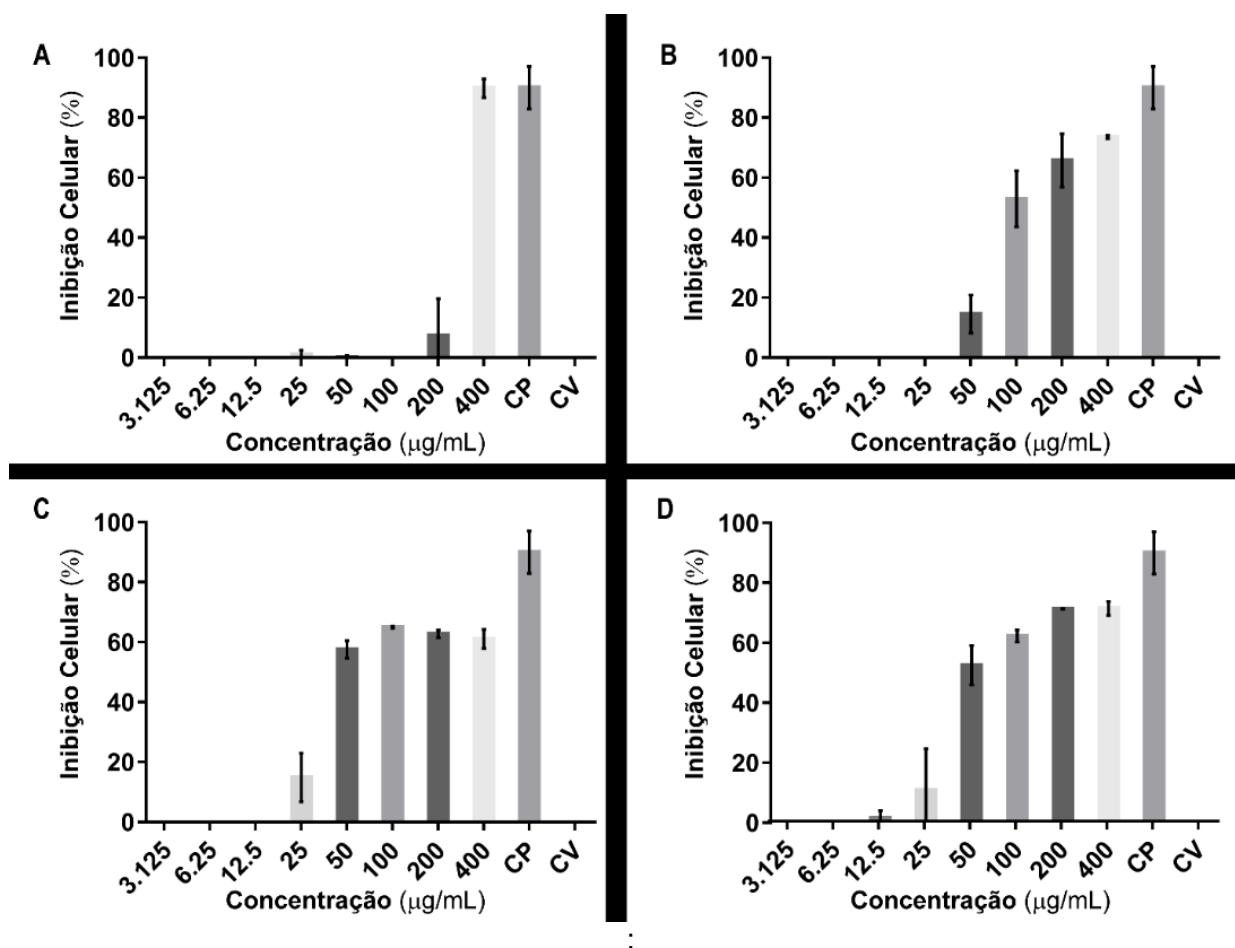


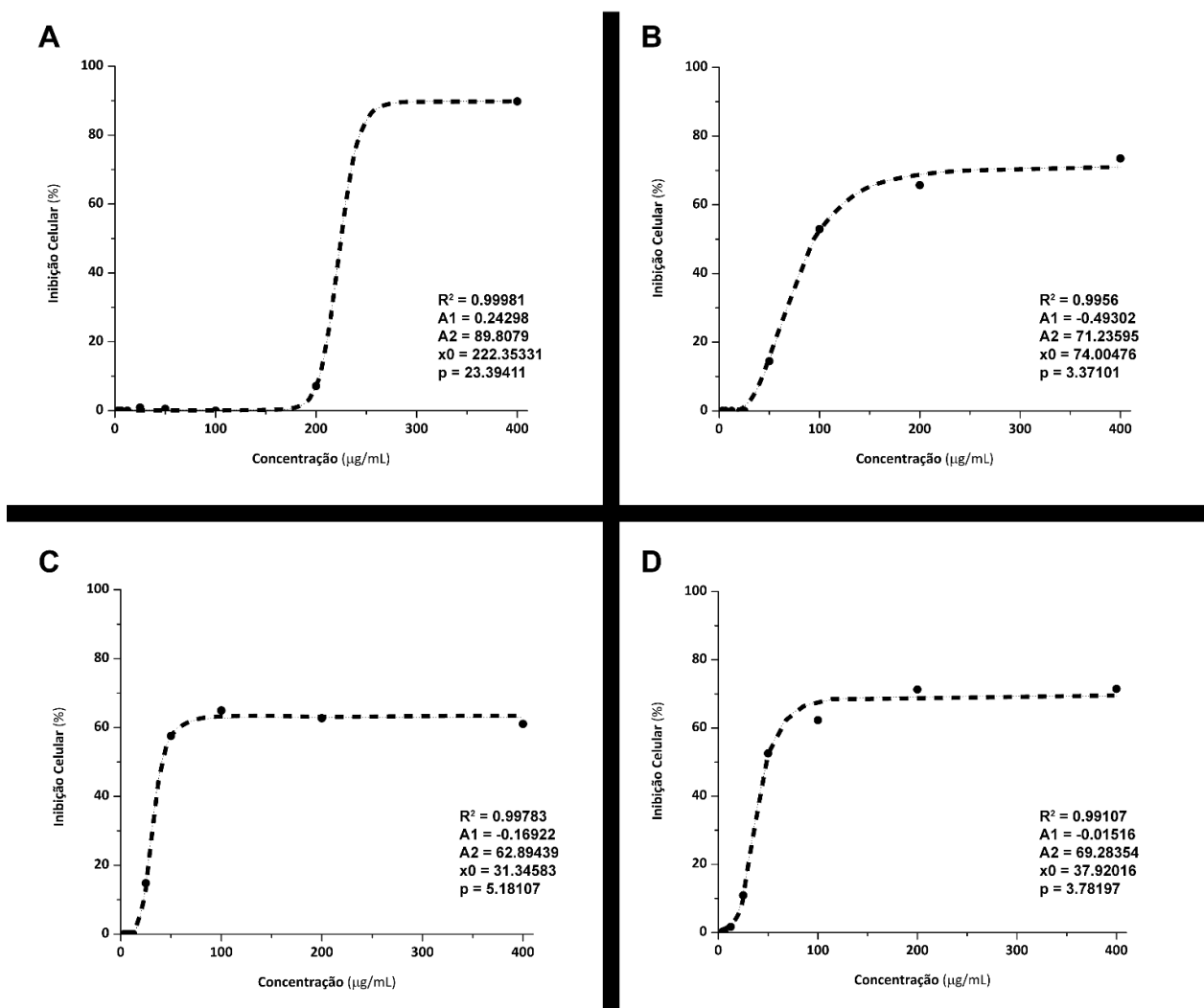
Tabela 3 – Atividade anti-*Xanthomonas citri* do ácido vanílico e dos vanilatos sintetizados.

Composto (Código)	CI ₅₀	MBC (48 h)	Ação
Ácido vanílico	-	-	Sem Atividade
Vanilato de etila (VA2)	-	-	Sem Atividade
Vanilato de butila (VA4)	-	-	Sem Atividade
Vanilato de pentila (VA5)	224 µg.mL ⁻¹	>400 µg.mL ⁻¹	Bacteriostática
Vanilato de hexila (VA6)	74 µg.mL ⁻¹	>400 µg.mL ⁻¹	Bacteriostática
Vanilato de heptila (VA7)	40 µg.mL ⁻¹	>400 µg.mL ⁻¹	Bacteriostática
Vanilato de octila (VA8)	38 µg.mL ⁻¹	> 400 µg.mL ⁻¹	Bacteriostática
Vanilato de decila (VA10)	-	-	Sem Atividade

CI₅₀: concentração inibitória para 50% da células

MBC (48 h): concentração bactericida/bacteriostática após 48 h de incubação

Figura 5 - Curva de inibição do crescimento celular de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* pelos compostos (A) VA-5, (B) VA-6, (C) VA-7 e (D) VA-8. O ajuste da curva foi realizado pela função logística $IC(x) = A2 + (A1-A2)/(1 + (x/x0)^p)$ para a obtenção dos valores teóricos das concentrações inibitórias (CI_{50}).

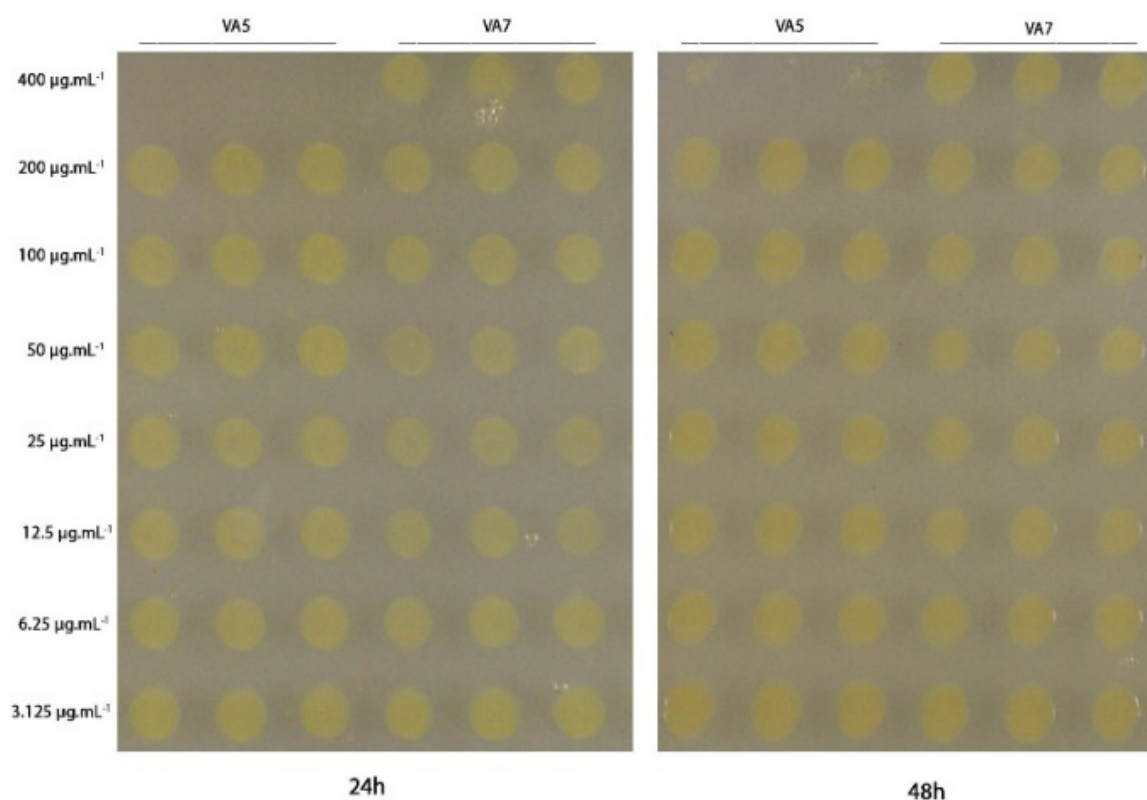


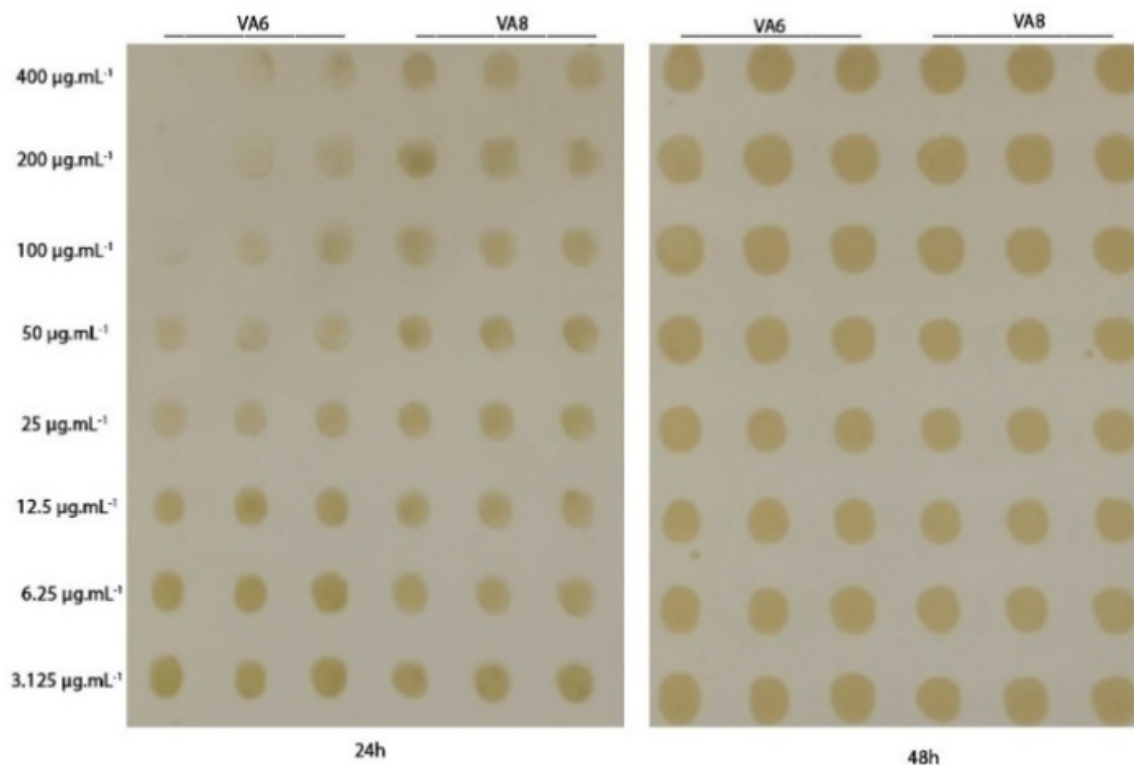
3.3 Atividade antimicrobiana dos vanilatos contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Para caracterizar se os compostos aos quais a bactéria *Xanthomonas* foi susceptível possuíam uma ação bactericida ou bacteriostática, um ensaio de MBC foi realizado logo após cada tratamento nos testes de REMA. A concentração bactericida mínima foi considerada como aquela onde não houve crescimento visível de colônias após 48h de incubação. Caso observado crescimento bacteriano o composto foi considerado bacteriostático.

É possível observar para VA6 uma inibição gradativa no crescimento nas primeiras 24 h. Após 48 h, há uma retomada no crescimento bacteriano, evidenciado pelo surgimento e aumento das colônias em todas as concentrações. No caso de VA8 e VA7, as primeiras 24h de incubação já foram suficientes para o crescimento de *Xanthomonas*, não sendo observada uma inibição completa. Para VA5, há uma grande inibição apenas na concentração de 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ – assim como mostra a taxa de inibição celular no teste de REMA – nas primeiras 24h de incubação. Após as 48h, a bactéria retomou seu crescimento (Figura 8).

Figura 6 – Crescimento de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em meio NYG, em triplicata, após incubação de 24h e 48h. As células passaram previamente pelo tratamento com os compostos (VA5: VA7: VA6 e VA8) no ensaio de REMA.



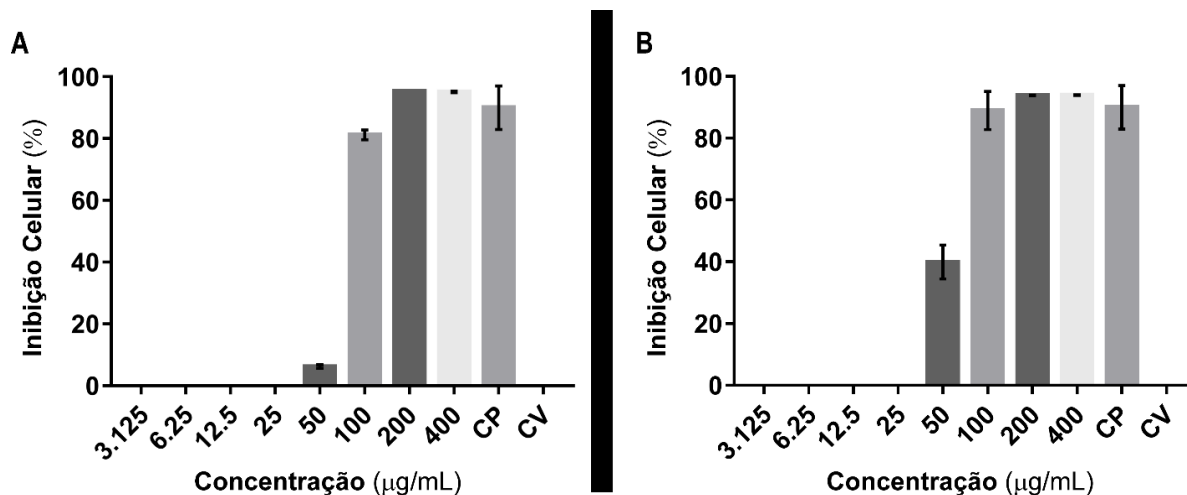


Visto que todos os compostos, após 48h de incubação, não foram capazes de inibir completamente o desenvolvimento da bactéria, todos ésteres que exibiram inibição no teste de REMA foram considerados bacteriostáticos nas concentrações testadas (Tabela 3)

3.4 Timol e Carvarol foram ativos contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Os compostos constituintes de óleos essenciais foram testados afim de avaliar sua ação antimicrobiana contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac). Os isômeros Timol e Carvacrol apresentaram atividade contra Xac (Figura 8) enquanto o Linalol não foi efetivo nas concentrações testadas.

Figura 7 - Porcentagem de células de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* inibidas nas diferentes concentrações testadas para (A) Timol e (B) Carvacrol. O controle de veículo (CV) foi realizado com etanol 1% (v/v) e o controle positivo (CP) com canamicina (20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). As linhas indicam o desvio padrão entre as triplicatas realizadas.



A CI_{50} e a CI_{90} para os compostos ativos estão apresentadas na Tabela 4. A CI_{90} para o Carvacrol foi calculada como $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto que para o Timol a CI_{90} foi de $118 \mu\text{g.mL}^{-1}$ frente à Xac (Figura 9). Não observamos uma dose reposta clara para os compostos, uma vez que há um aumento abrupto na inibição a partir de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os terpenóides como Timol e Carvacrol, são compostos que passam por modificações enzimáticas que adicionam moléculas de oxigênio e movem ou removem grupos metila dos terpenos, no metabolismo vegetal e tais grupos parecem ter importância na atividade microbiana de ambos compostos. Timol possui uma estrutura muito similar ao Carvacrol e os grupos hidroxila parecem estar envolvidas em sua atividade microbiana e o modo de ação parece ser similar para estes terpenóides (HYLDGAARD *et al.*, 2012). No estudo de Kotan *et al.* (2010), as concentrações inibitórias mínimas para Carvacrol e Timol foram avaliadas pelo método de difusão em ágar, contra várias espécies do gênero *Xanthomonas*. O composto carvacrol mostrou uma concentração inibitória de $15,63 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a maioria das linhagens testadas enquanto o Timol exibiu uma MIC de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$, porém neste estudo nenhuma linhagem de Xac foi avaliada. Em nosso trabalho, as concentrações inibitórias definidas pelo método de REMA foram mais elevadas se comparadas as avaliadas por Kotan *et al.* (2010) contra outras espécies de *Xanthomonas*, fato que pode ser devido a uma diferença na sensibilidade dos métodos utilizados, já que no REMA a indicação de inibição celular é obtida a partir

da fluorescência medida pela oxidação da resazurina no metabolismo celular e não depende da formação de um halo de inibição (como no método de difusão por ágar). Outro fator envolvido pode estar relacionado com uma maior resistência de Xac frente aos compostos.

3.5 Timol e Carvacrol possuem atividade bactericida contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

A atividade bactericida ou bacteriostática frente a *Xanthomonas citri* subsp. *citri* foi definida pelo ensaio de MBC. Para ambos os compostos, foi constatado uma atividade bactericida a partir de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 4) (Figura 10) após uma incubação de 48h. No período de 24h de crescimento, Carvacrol e Timol mostram-se bacteriostáticos em 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, uma vez que há inibição no crescimento das colônias nas primeiras horas de incubação, porém o desenvolvimento ocorre normalmente após as 48h. Na CI_{90} as células de Xac que restam parecem ser capazes de retomar seu desenvolvimento normalmente e em concentrações mais altas, ocorre a completa inibição.

Tabela 4 – Atividade anti-*Xanthomonas citri* para os compostos Linalol, Timol e Carvacrol.

Composto	CI_{50}	CI_{90}	MBC (48h)	Ação
Linalol	-	-	-	Sem atividade
Timol	77 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	118 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Bactericida
Carvacrol	55 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Bactericida

CI_{50} : concentração inibitória para 50% da células

CI_{90} : concentração inibitória para 90% da células

MBC (48 h): concentração bactericida/bacteriostática após 48 h de incubação

Figura 9 - Curva de inibição do crescimento celular de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* pelos compostos (A) Timol e (B) Carvacrol. O ajuste da curva foi realizado pela função logística $IC(x) = A2 + (A1-A2)/(1 + (x/x0)^p)$ para a obtenção dos valores teóricos das concentrações inibitórias (CI_{90}).

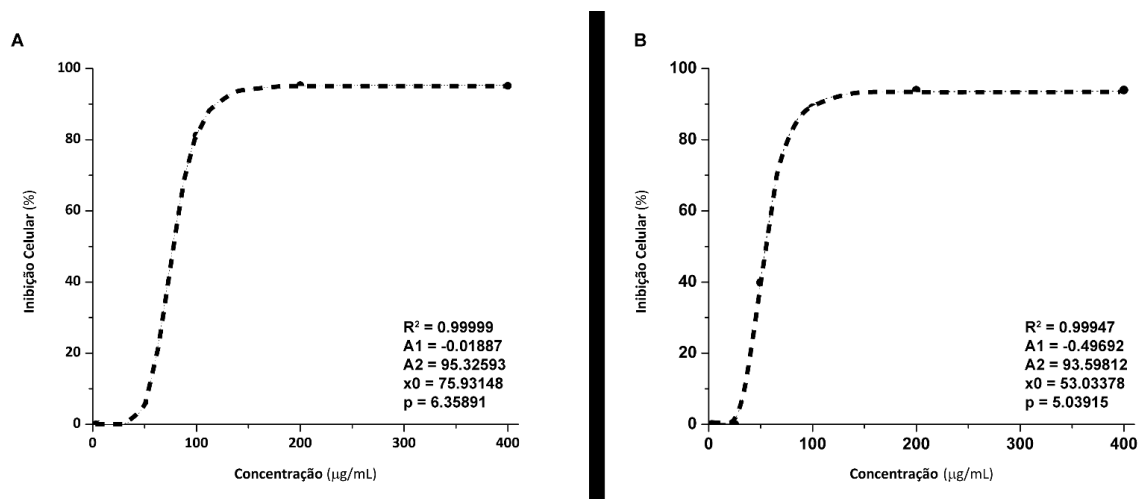
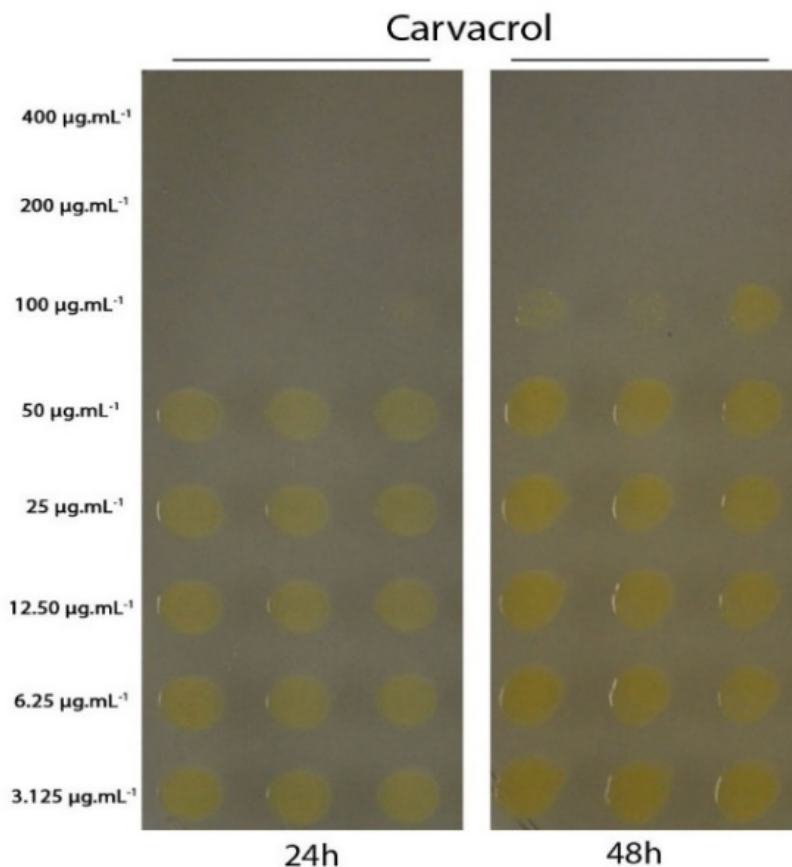
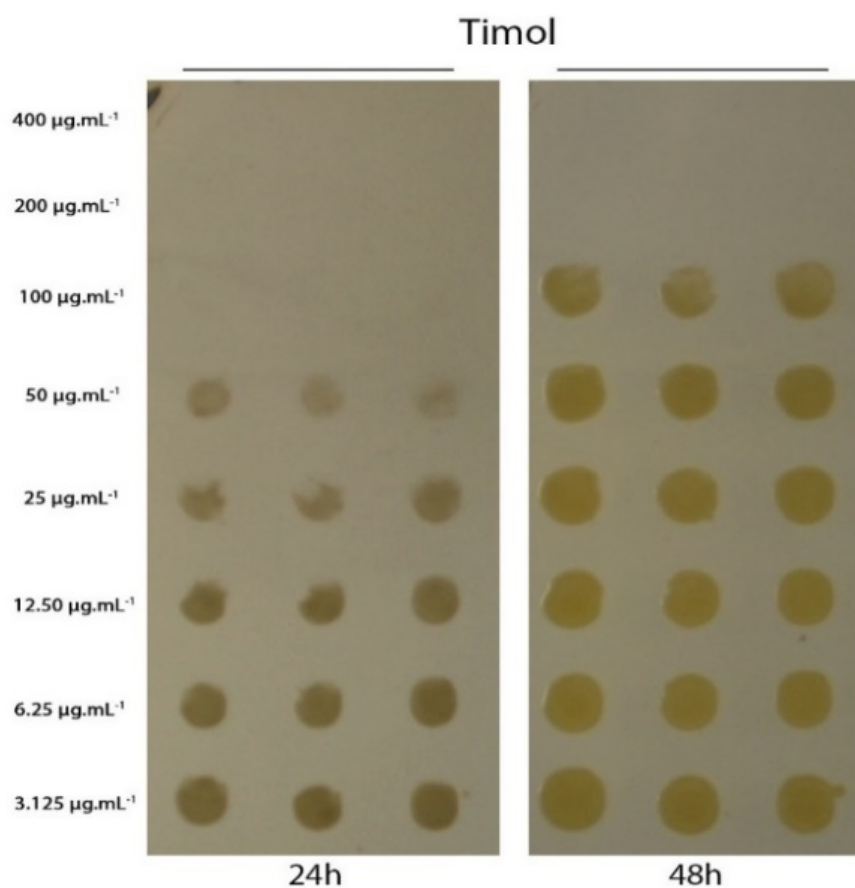


Figura 8 - Crescimento de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em meio NYG, em triplicata, após incubação de 24h e 48h. As células passaram previamente pelo tratamento com os compostos Carvacrol e Timol, em diferentes concentrações, no ensaio de REMA.





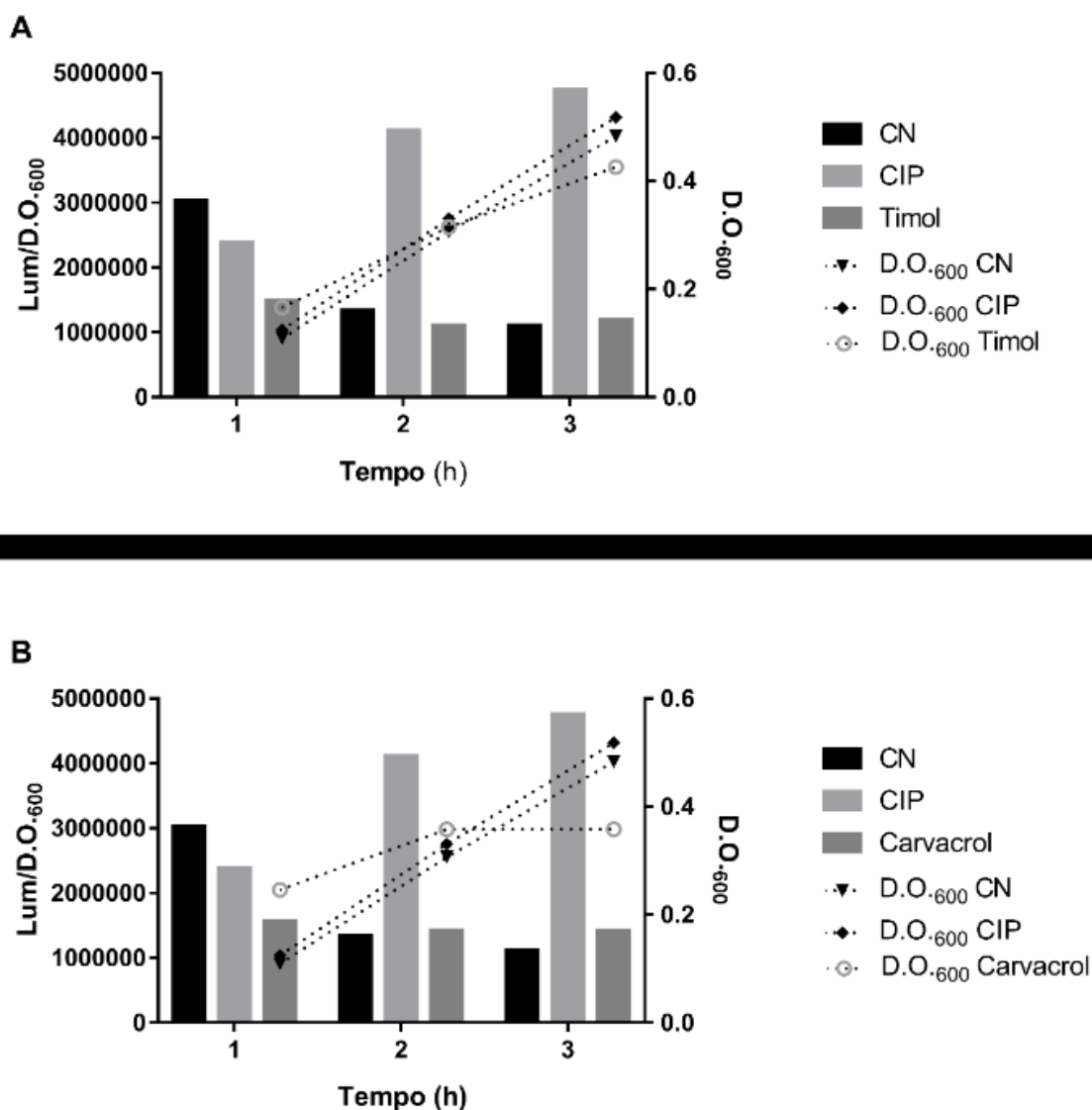
3.6 Investigando o modo de ação de Timol e Carvacrol contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

3.6.1 Não há ativação da resposta SOS em *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 pelos compostos Timol e Carvacrol

Nos ensaios realizados para verificar danos ao DNA bacteriano potencialmente provocados pelos compostos Timol e Carvacrol, foi observado que não houve uma indução na resposta SOS. É possível observar na Figura 11 que há ativação do sistema de reparo no controle positivo realizado com o antibiótico Ciprofloxacina ao decorrer do tempo, o que é evidenciado pelo aumento de luminescência, fato que não ocorreu com nenhum dos compostos testados, corroborando com o controle negativo (sem tratamento algum). Isso sugere que não ocorrem alterações genéticas ou danos ao DNA causados pela atuação de ambos compostos, uma vez que a luminescência aferida nos tratamentos – o que indica a expressão da proteína luciferase, que, por

sua vez, reporta a ativação do gene *recA* envolvido diretamente na resposta SOS – não teve aumento.

Figura 10 – Relação entre a emissão de luminescência e o crescimento celular, indicada pelas barras (Lum/D.O.₆₀₀), do mutante *PrecA-lux* de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 após contato com os compostos (A) Timol e (B) Carvacrol na CI₉₀. A Ciprofloxacina (CIP) foi usada como controle positivo. O controle negativo (CN) não possui nenhum tratamento com antimicrobianos. As linhas pontilhadas indicam o crescimento bacteriano pela densidade óptica (D.O.₆₀₀) durante os diferentes tempos de contato (h) com os compostos.



3.6.2 Microscopia Celular

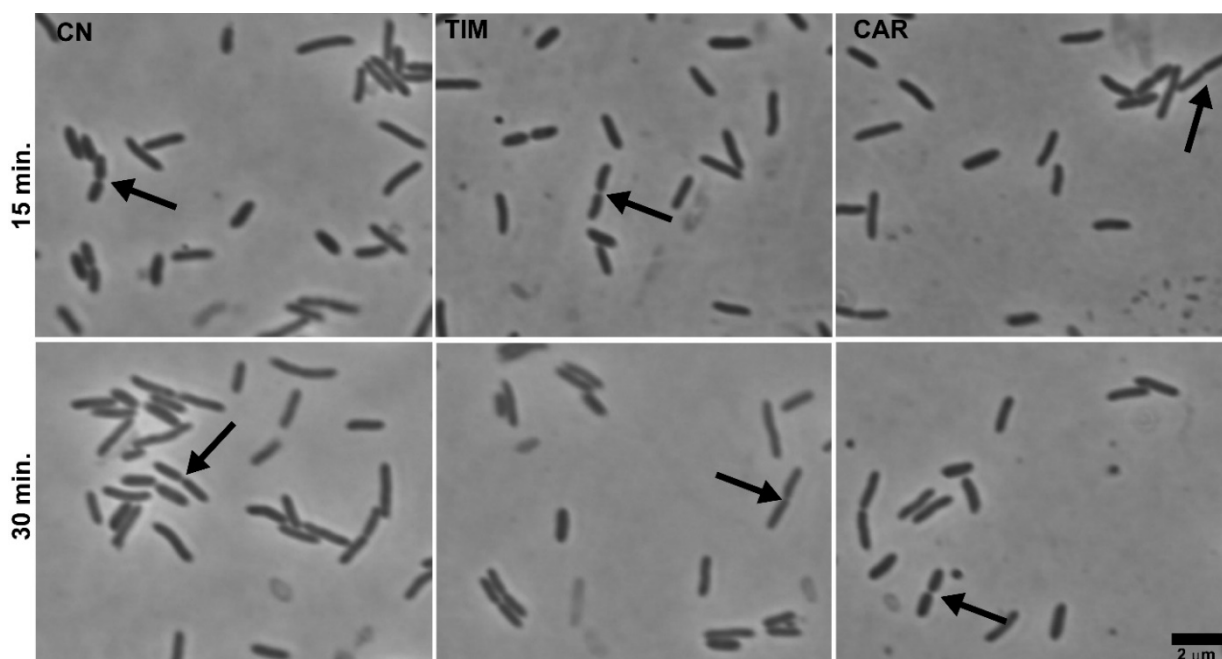
3.6.2.1 Os compostos Timol e Carvacrol não alteram a morfologia de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Nas análises morfológicas por contraste de fase das células de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, optamos por seguir com os compostos Carvacrol e Timol, pois mostraram uma maior inibição nos testes anteriores. Os tratamentos foram realizados na CI_{90} dos compostos e o controle negativo (sem tratamento). Uma média de 100 células em diferentes campos da lâmina foi mensurada quanto a seu comprimento (Tabela 5). Não foi possível observar diferenças com relação ao controle negativo e as células apresentaram medidas dentro do comprimento celular médio para a espécie (de 1,5 a 1,8 μm) (Figura 10). Outras características relacionadas ao comprimento médio mensurado como alongamento das células ou características morfológicas, como várias células ainda ligadas sem constrição completa, podem sugerir alterações na divisão celular e/ou segregação. Tais características não foram encontradas nos testes. Estes resultados, aliados as evidências de que os compostos não ativam o sistema de repostas SOS no modelo estudado, indicam que os alvos de atuação dos compostos possivelmente não se relacionam com a divisão e segregação celular. Algumas evidências apontam para a ação dos compostos Timol e Carvacrol nas membranas celulares (HYLDGAARD *et al.*, 2012), porém nenhum trabalho foi relatado para a espécie Xac com relação ao modo de ação dos compostos.

Tabela 5 - Comprimento celular médio (μm) de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* nos tratamentos com Carvacrol e Timol na CI_{90} . Os tempos de incubação foram de 15 e 30 minutos e o desvio padrão entre as repetições é indicado ($\pm$).

	Comprimento celular médio (μm) (n = 200)	
	15 minutos	30 minutos
Controle negativo	1,59 $\pm$ 0,35	1,48 $\pm$ 0,39
Carvacrol	1,61 $\pm$ 0,36	1,59 $\pm$ 0,43
Timol	1,84 $\pm$ 0,35	1,61 $\pm$ 0,34

Figura 11 - Morfologia celular de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* após 15 e 30 minutos de contato com os compostos Carvacrol e Timol nas concentrações definidas como CI_{90} . É possível observar o processo de divisão celular ocorrendo nas células tratadas com os compostos (setas). O controle negativo (CN) não recebeu qualquer tipo de tratamento. Aumento 100x.



3.6.2.2 Timol e Carvacrol atuam na permeabilização da membrana celular de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

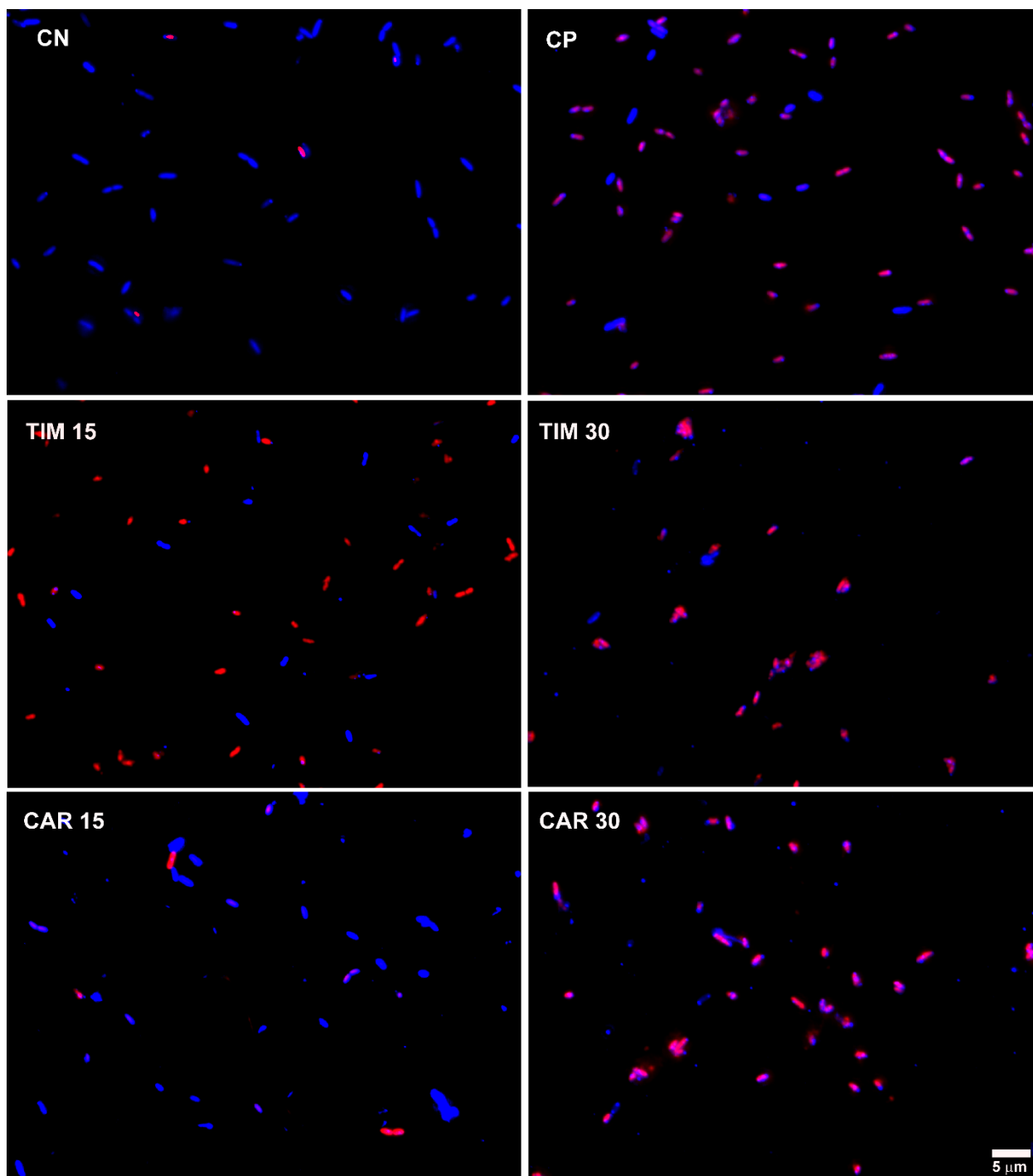
Os compostos Timol e Carvacrol não apresentaram ação na ativação do sistema de reposta SOS (item 3.6.1) e na alteração morfológica das células de Xac (item 3.6.2.1), sugerindo que a principal ação de ambos, não está relacionada com alterações na divisão/segregação celular ou provocando danos no DNA microbiano. Quando as células tratadas com os compostos em sua IC_{90} foram avaliadas quanto a ação na permeabilização da membrana de Xac, foi possível identificar que ocorreram perturbações a partir de 15 minutos de contato com os compostos (Tabela 6 e Figura 12).

]

Tabela 6 – Porcentagem de células de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* com a membrana permeabilizada. Timol e Carvacrol foram testadas em sua IC₉₀ e n = 200 células foram avaliadas em cada experimento. Controle negativo: células não tratadas e Controle positivo: células exposta a temperatura elevada (55 °C)

Tempo (min)	Tratamento			
	Controle Negativo	Controle Positivo	Timol	Carvacrol
15	16,7 ± 0,94	-	87,62 ± 0,91	70,27 ± 0,31
30	-	100	90,37 ± 5,09	84,49 ± 0,75

Figura 12 – Permeabilidade da membrana celular de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. O controle negativo (**CN**) não recebeu nenhum tipo de tratamento. Como controle positivo (**CP**) as células foram incubadas durante 30 minutos à 55 °C. Os tratamentos com Timol e Carvacrol ocorreram na CI_{90} com tempo de contato de 15 minutos (**TIM 15** e **CAR 15**, respectivamente) e 30 minutos (**TIM 30** e **CAR 30**, respectivamente). Em azul, células com a membrana intacta coradas pelo coante DAPI. Em vermelho, células as quais a membrana foi perturbada, permitindo a entrada do corante iodeto de propídeo, indicando morte celular.



Espera-se que a atuação de compostos fenólicos, como Timol e Carvacrol, cause danos estruturais e funcionais às membranas plasmáticas (SIKKEMA *et al.*, 1995). O modo de ação primário do Timol ainda não está completamente elucidado, porém existem evidências de que atue na disrupção da membrana interna – causando perda do potencial de membrana e integrando-se na região das cabeças polares da bicamada lipídica - e na interação com proteínas de membrana e alvos intracelulares (HYLDGAARD *et al.*, 2012). Carvacrol parece ter uma atuação similar, tendo a capacidade de se posicionar entre os lipídeos da membrana e aumentar a permeabilidade, afetando a fluidez da membrana (DI PASQUA *et al.*, 2007; HYLDGAARD *et al.*, 2012). Nos bioensaios de microscopia celular, o mecanismo de ação sobre as membranas celulares foi constatado para ambos compostos também em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, não havendo evidências da ação em alvos intracelulares envolvidos na divisão/segregação celular neste caso.

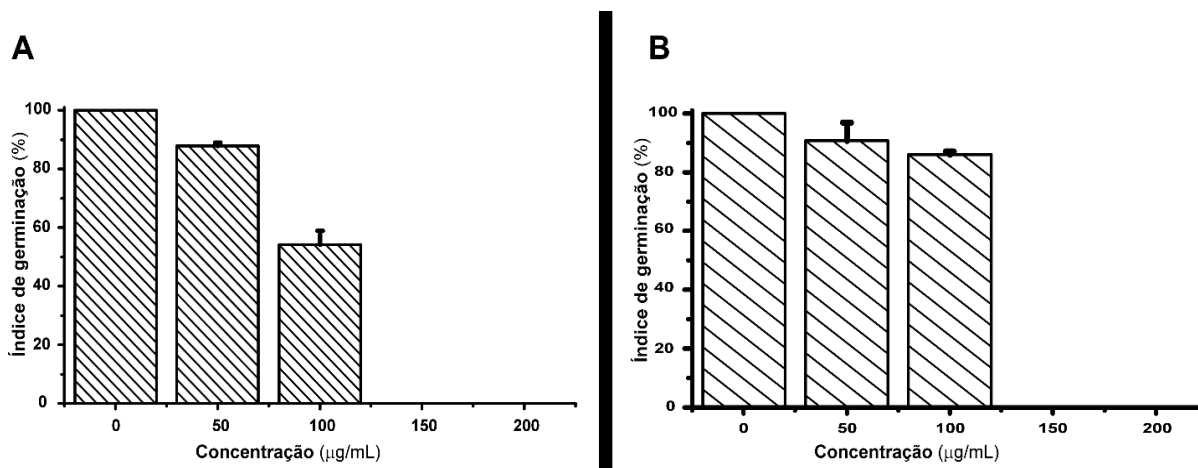
3.7 Os compostos Timol e Carvacrol atuam sobre a germinação de *Lactuca sativa* em concentrações maiores do que a CI_{90}

Os terpenóides não apresentam diferenças, frente ao controle, quanto ao número de sementes de alface (*Lactuca sativa*) germinadas, até a concentração de $100\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ – próxima das concentrações definidas como CI_{90} para ambos compostos. Uma pequena redução no índice de germinação (por volta de 15%) já pode ser identificada para Timol e Carvacrol a partir da concentração de $50\ \mu\text{g.mL}^{-1}$. Isso se deve ao fato de que, apesar do número de sementes germinadas ter se mantido indiferente entre eles, e com relação ao controle, houveram pequenas diferenças no comprimento das raízes. Para o caso do Timol, o índice de germinação teve uma grande queda (cerca da metade) na concentração de $100\ \mu\text{g.mL}^{-1}$. Isto ocorreu devido a uma diminuição no comprimento das raízes, causada pela presença do composto, apesar do número de sementes germinadas ter se mantido. A partir de $150\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ (concentração próxima daquela definida como bactericida para Timol e Carvacrol) não houveram sementes germinadas, o que leva o índice de germinação a zero (Figura 14).

Muitos óleos essenciais e seus constituintes parecem possuir algum grau de fitototoxicidade e influência na germinação de muitas plantas (AMRI *et al.*, 2013) devido seus efeito alelopáticos, uma vez que muitos componentes dos óleos podem estar

relacionados com mecanismos de defesa/competição na planta. A fitotoxicidade foi evidenciado pelos testes em *Lactuca sativa* neste bioensaio.

Figura 13 - Índice de germinação para as sementes de *Lactuca sativa* tratadas com (A) Timol e (B) Carvacrol.



3.8 Timol e Carvacrol não atuam na proteção contra o cancro cítrico

O composto a base de cobre, Difere[®], foi capaz de inibir a colonização das folhas de *Citrus sinensis* pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, atuando na proteção das plantas. Tal efeito protetivo é evidenciado por uma redução no percentual de folhas sintomáticas em relação ao controle negativo não tratado (Figura 15). No caso dos compostos Timol e Carvacrol, não ocorreu redução nos sintomas do cancro cítrico nas concentrações testadas (10X CI₉₀) (Figura 16), com o percentual de folhas sintomáticas se mantendo semelhante ao dos controles sem tratamento. Além disso, algumas folhas apresentaram manchas após o contato com Carvacrol.

A aplicação de compostos cúpricos é ainda essencial no manejo do cancro cítrico como forma de prevenção à doença. A aplicação é realizada durante os meses da primavera e verão, quando as condições climáticas são mais favoráveis para infecção por Xac, e ocorre a presença de tecido vegetal jovem com o crescimento das plantas (FERENCE *et al.*, 2018). O cobre age reduzindo a expansão do inóculo do microrganismo nos brotos imaturos e protege a superfície de frutos e folhas da infecção ((BEHLAU *et al.*, 2008; BEHLAU *et al.*, 2010). As formulações mais utilizadas são aquelas que possuem cobre na forma insolúvel ou fixada como hidróxido de cobre, oxicloreto de cobre (no caso do Difere[®]) e óxido de cobre. A fitotoxicidade é

reduzida, pois acredita-se que ocorra uma liberação lenta dos íons de cobre nestas formas, atingindo um efeito residual que auxilia na proteção a médio prazo (FERENCE *et al.*, 2018). Além disso, o tratamento das plantas com formulações contendo cobre insolúvel/fixado confere a formação de um filme protetivo na superfície das folhas, aliado com a liberação lenta dos íons, atua como uma proteção física e química, impedindo a entrada de Xac nos tecidos susceptíveis e diminuindo a quantidade de inóculo por seu efeito bactericida (GRAHAM *et al.*, 2010; FERENCE *et al.*, 2018). Por conta da formulação e, principalmente sua proteção física, o cobre ainda é muito eficiente no manejo do cancro. Os compostos Timol e Carvacrol, apesar de apresentarem uma ação bactericida contra Xac nos testes *in vitro*, quando aplicados nas plantas em uma concentração cinco vezes maior do que a definida como bactericida, não foram capazes de proteger as folhas da infecção por Xac. Tal ineficiência na proteção pode estar relacionada com o modo de aplicação destes compostos, sem nenhuma formulação específica, que pode ter acarretado em uma perda dos agentes na superfície das folhas e, conseqüentemente, efeito reduzido sobre o inóculo de Xac. Alguns trabalhos reportam o sucesso do uso de Timol e Carvacrol na proteção de alimentos (GUARDA *et al.*, 2011; HERNANDEZ-HERNANDEZ *et al.*, 2014), ou ainda para o uso na aquicultura (TOMAZELLI JUNIOR *et al.*, 2018), através da microencapsulação dos compostos para a formação de filmes e para liberação lenta e específica dos agentes antimicrobianos. Ainda, o uso dos compostos juntos em uma mesma formulação, mostra um efeito sinérgico em sua ação antimicrobiana (GUARDA *et al.*, 2011). A lenta liberação do Timol e Carvacrol é interessante para reduzir os danos causados as folhas (como no caso do Carvacrol) e propiciar uma atividade residual, uma vez que existem evidências de que tais compostos possuem atividade bactericida contra Xac. Além disso, a formação de uma camada/filme nas folhas é um fator protetivo importante que atua como barreira física para a entrada do inóculo de *Xanthomonas*. Apesar da alta concentração e do efeito protetivo não ter sido evidenciado pelos bioensaios realizados, considerando possíveis modificações químicas na estrutura simples dos compostos naturais, a atividade pode ser potencializada. O trabalho de (MORÃO *et al.*, 2018) desenvolvido por nosso grupo de pesquisa, mostra como modificações simples em uma molécula natural pode acarretar em um aumento na eficiência e espectro de ação. Além disso, considerando os fatores no desenvolvimento de formulações mais eficazes, Timol e Carvacrol podem ser compostos interessantes para serem explorados no combate ao cancro, já

que são ativos contra *Xanthomonas* e já vêm sendo utilizados como antimicrobianos na proteção de alimentos.

Figura 14 - Folhas de *Citrus sinensis* tratadas com Carvacrol (10X CI_{90}). **(A)** Visão adaxial das folhas; **(B)** Visão abaxial das folhas. É possível observar a formação de manchas/lesões causadas pelo contato do composto com as folhas.

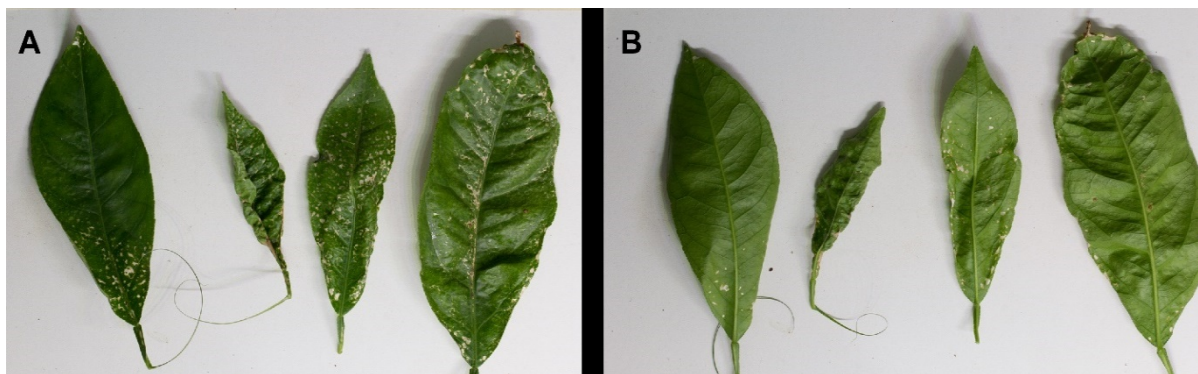
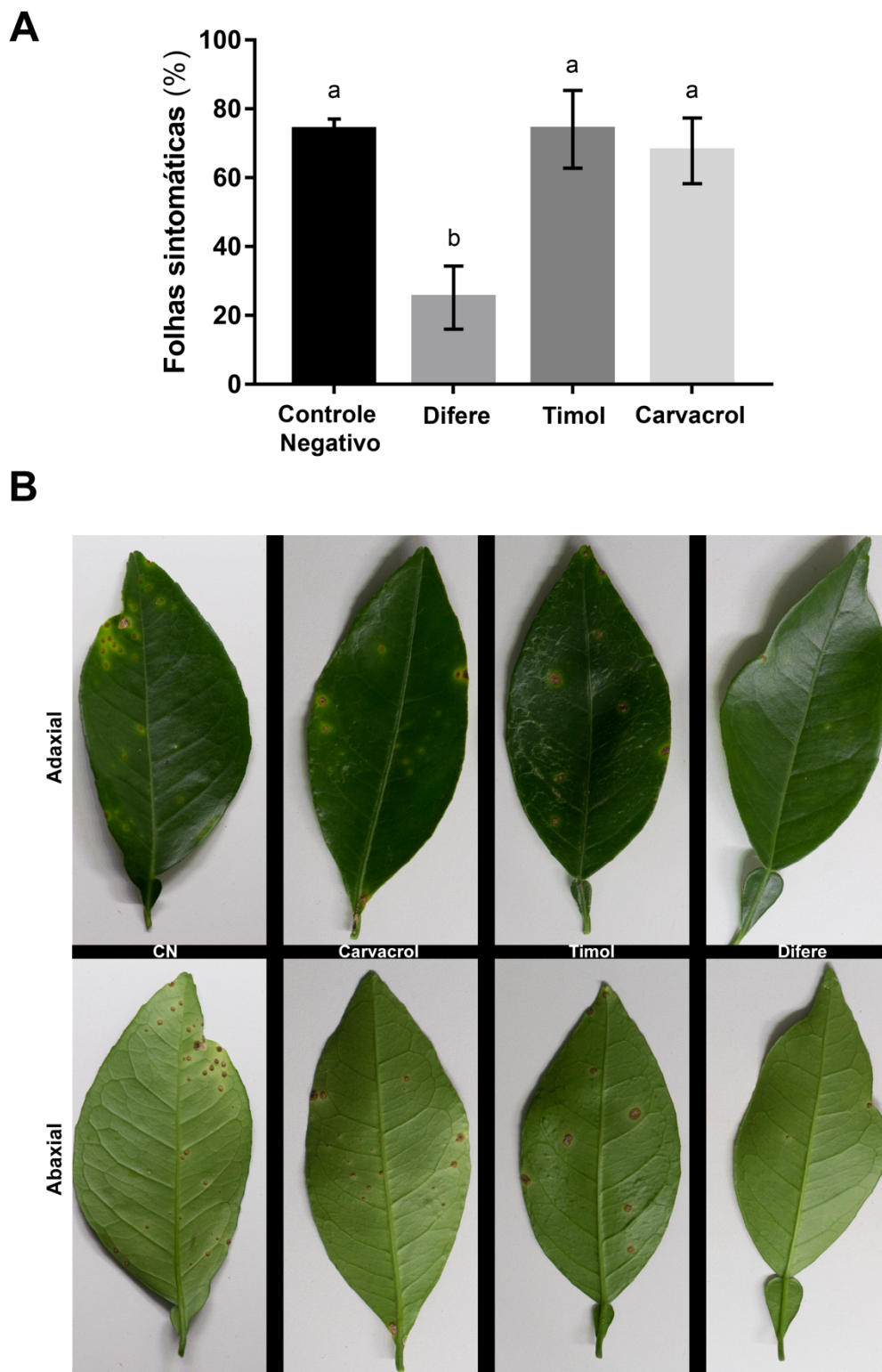


Figura 15 – Folhas sintomáticas nos testes protetivos. **(A)** Percentual de folhas com sintomas de cancro nas mudas de *Citrus sinensis*. O controle negativo foi realizado com aspersão de água e o oxicleto de cobre utilizado comercialmente (Difere) como comparativo. Timol e Carvacrol foram testados na concentração equivalente a 10x a IC_{90} (1 mg.mL^{-1}). No gráfico letras iguais indicam que não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos ($p > 0.05$). As barras indicam o desvio padrão entre as repetições. **(B)** Folhas representativas do número de lesões observadas nos ensaios.



4. CONCLUSÃO

Os híbridos de pirazinamida-chalcona sintetizados, apesar de apresentarem potencial como antimicrobianos, não foram ativos contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. No caso do vanilatos, a ação anti-Xac foi identificada para os ésteres a partir de cinco até oito carbonos na cadeia lateral, porém todos os compostos ativos apresentaram baixa atividade e de ação bacteriostática. Para os constituintes dos óleos essenciais, Timol e Carvacrol mostraram-se promissores exibindo ação anti-Xac. Tais compostos apresentaram uma atividade de permeabilização da membrana bacteriana e baixa fitotoxicidade na Cl₉₀. Entretanto, os testes protetivos não evidenciaram o potencial de uso de Timol e Carvacrol por aspersão diretamente nas plantas, já que não houve efetividade na proteção contra o cancro quando comparados ao produto comercial a base de cobre.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Zamuner, C. F. C.¹; Dilarri, G.¹; Cavalca, L. B.¹; Behlau, F.²; da Silva, T. G.²; Bacci, Jr. M.³; Ferreira, H. ^{1*}

¹ Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Av. 24A, 1515, Rio Claro, SP, 13506-900, Brazil

² Department of Research & Development, Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), Araraquara, Sao Paulo 14.807-040, Brazil

³ Centro de Estudos de Inseto Sociais (CEIS), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Av. 24A, 1515, Rio Claro, SP, 13506-900, Brazil

Keywords: Citrus canker, fresh fruit, sanitization

RESUMO

De acordo com a mais recente legislação, publicado em 2018, áreas ou estados do Brasil onde o cancro cítrico é endêmico não são mais obrigados a erradicar os citros afetados pela doença como nos últimos 60 anos. Em vez disso, os produtores têm que adotar um conjunto de medidas de controle, como sprays de cobre, uso de quebra-vento, controle da larva minadora do citros, para minimizar o impacto da doença na qualidade e produtividade dos frutos. Outra mudança importante foi que todas as frutas frescas comercializadas fora do estado de origem e para outros países têm que ser higienizadas com hipoclorito de sódio contra a bactéria causadora de cancro *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*). O hipoclorito de sódio (NaOCl) é o único produto permitido no Brasil pela referida legislação. Apesar de eficaz, pode danificar a pele dos frutos, causar corrosão nos equipamentos da casa de embalagem e reagir com a matéria orgânica, que gera subprodutos nocivos. No presente trabalho, avaliamos um produto alternativo ao NaOCl conhecido como PosFruit. O PosFruit é uma formulação composta por ácidos orgânicos e óleos essenciais à base de vegetais, que foram inicialmente desenvolvidos para serem utilizados como fortificante de plantas. Nós mostramos que o PosFruit foi tão eficaz quanto o NaOCl para eliminar o *X. citri* de frutas cítricas contaminadas artificialmente com a bactéria. Em uma linha de sanitização piloto, o tratamento com 2% de PFruit reduziu a população de *X. citri* em frutos contaminados em 4 log₁₀ UFC / mL. Por fim, não detectamos resistência natural de *X. citri* a PosFruit nem a persistência da bactéria após exposição progressiva ao produto, o que indica que o produto possui ação multialvos. O PosFruit é uma alternativa adequada ao NaOCl para desinfecção pós-colheita de citros contra *X. citri*.

Palavras-chave: Cancro cítrico. Fruta fresca. Sanitização.

ABSTRACT

According to the most recent regulation, published in 2018, areas or states of Brazil where citrus canker is endemic are no longer obliged to eradicate citrus trees affected by the disease as in the past 60 years. Instead, growers have to adopt a set of control measures, such as copper sprays, windbreaks, control of the citrus leaf miner to minimize the impact of the disease on fruit quality and yield. Another important change was that all fresh fruit commercialized out of the state of origin and to other countries have to be sanitized with sodium hypochlorite against the canker-causing bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*). Sodium hypochlorite (NaOCl) is the only product allowed in Brazil by the referred legislation. Although effective, it may damage fruit skin, cause corrosion of packing house equipment and react with organic matter, which generates noxious byproducts. Here, we evaluated an alternative product to NaOCl known as PosFruit. PosFruit is a formulation composed of organic acids and essential vegetable-based oils, which had been initially developed to be used as a plant fortifier. We show that PosFruit was as effective as NaOCl to eliminate *X. citri* from citrus fruit artificially contaminated with the bacterium. In a pilot sanitization line, treatment with 2% PosFruit reduced the *X. citri* population on contaminated fruit by 4 log₁₀ CFU/mL. Finally, we did not detect natural resistance of *X. citri* to PosFruit nor the persistence of the bacterium following progressive exposure to the product, which indicate that the product has multi-target action. PosFruit is a suitable alternative to NaOCl for post-harvest disinfection of citrus fruit against *X. citri*.

Keywords: Citrus canker. fresh fruit. Sanitization.

1. INTRODUCTION

The most profitable market within the citrus business is that of the fresh fruit, which has a higher aggregated value compared to fruit used for the production of juice. However, there are important limitations to be addressed concerning the quality of the fruit, which is constantly threatened by diseases and insects. Amongst them, a great focus has been given to citrus canker, a disease caused by the Gram-negative bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*). Citrus canker affects all the commercial citrus cultivars at different levels, and the only viable option to control the disease is to apply concomitantly a set of agricultural management measures (GOTTWALD *et al.*, 2002; FERENCE *et al.*, 2018). This disease has a great dispersion potential through the combined action of wind and rain. It can also be introduced into new areas by contaminated vegetal parts and fruit. Therefore, the post-harvest sanitization of citrus fruit before their distribution is extremely important to avoid the dissemination of the pathogen.

Based on the most recent Brazilian regulation, known as Normative Instruction 21 (IN21), published by the Ministry of Agriculture Livestock and Supply (MAPA) on April 25th, 2018 (Brazil, 2018), areas or states where citrus canker is endemic are no longer obliged to eradicate canker-affected or suspect trees as before (Behlau *et al.*, 2016). Instead, growers have to adopt a set of control measures, such as copper sprays, windbreaks, control of the citrus leaf miner to minimize the impact of the disease on fruit quality and yield. Another important change was that all fresh fruit commercialized out of the state of origin and to other countries have to be sanitized with sodium hypochlorite. Upon arrival in the packing house, fruit harvested from orchards where citrus canker is present should be immersed in a 200 ppm (0,2% v/v) sodium hypochlorite solution at pH 7.0 for 2 minutes.

Sodium hypochlorite is the only product allowed in Brazil by the referred legislation. That is likely due to a high number of studies that demonstrate its efficacy and low cost. Although it is considered generally safe and has been used for nearly a century as a disinfectant for water supplies (MISHRA *et al.*, 2018), sodium hypochlorite has some important disadvantages. The chlorine dissociated from sodium hypochlorite is a volatile element that loses its effectiveness upon binding to the organic matter, which makes necessary to constantly adjust its concentration in solution (topping off) during the sanitization process. Moreover, chlorine is corrosive to industrial equipment

and may also damage the fruit skin. Chlorine-based products are not friendly to the environment and to packing-house workers as it can cause injuries to eyes and skin (MORETTI, 2007; GIL *et al.*, 2009; MISHRA *et al.*, 2018). Finally, some concerns are associated with the use of hypochlorite solutions as they may result in the formation of trihalomethanes that are considered carcinogens, as well as other byproducts due to its reaction with the organic matter (RICHARDSON *et al.*, 2000). Therefore, some European countries have already imposed restrictions for the use of chlorine-based disinfectants of fruit and vegetables (European Union Commission of Health and Food Safety).

Although the Brazilian legislation has pointed sodium hypochlorite as the only bactericide for post-harvest sanitization of citrus fruit, it also allows the recognition of alternative fruit disinfectants, provided that their efficacy and safety are scientifically demonstrated. A number of sanitizing products are known and allowed to be safely used in other countries. For instance, in the United States, the Food and Drug Administration (FDA) approved the use of chlorine dioxide, hydrogen peroxide, peracetic acid and ozone, beyond sodium hypochlorite, for the sanitization of fruit and vegetables in post-harvest. In addition, several studies have suggested the use of formulations containing essential oils as sanitizers due to their antimicrobial potential (LIS *et al.*, 2017; SAKKAS & PAPADOPOULOU, 2017; UMA *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2017).

Thus, in this work we evaluated the use of a formulation of essential oils and organic acids known as PosFruit as a post-harvest sanitizer of citrus fruit as an alternative to sodium hypochlorite. We showed that PosFruit has bactericidal action against *X. citri*, and it is as effective as sodium hypochlorite to sanitize citrus fruit artificially contaminated with *X. citri*. Using an pilot processing line, we also demonstrated that PosFruit is able to reduce the *X. citri* population on contaminated fruit by 4 log₁₀ in CFU/mL.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Sanitizing agents

The agricultural adjuvant PosFruit (Arvensis; Zaragoza, Spain) was evaluated as a sanitizer of citrus fruit against *X. citri*. According to the manufacturer, PosFruit is a mixture of organic acids and vegetable oils. The formulation was obtained from Aurora Agroespecialidades LTDA (Paulínia, São Paulo – Brazil, Lot number 3690006). Pluron 444A (Catanduva, São Paulo, Brazil - Lot 2138), containing sodium hypochlorite, was used as a positive control for fruit disinfection. All experiments were performed from February to August 2018.

2.2 Bacterial strain and growth conditions

The *X. citri* strain used for the sanitization tests was the isolate 306 (IBSBF 1594) (SCHAAD *et al.*, 2006). Before being exposed to the sanitizing agents, bacteria were cultivated for 16 h in NYG/NYG-agar medium (nitrogen-yeast-glycerol: 5 g/L of peptone, 3 g/L of yeast extract, 2% glycerol; for solid medium bacterial agar was added to 15 g/L) at 29 °C.

2.3 Sensitivity assays

Bacterial liquid cultures had their Optical Densities (O.D. 600 nm) adjusted to 0.3 using fresh NYG medium. Subsequently, cell suspensions were diluted 100x with fresh medium to make test cultures of 5 mL containing 10^6 CFU/mL. PosFruit was added to the bacterial cultures at the final concentrations of 0.0625%, 0.125%, 0.25%, 0.5%, and 1% (v/v). As positive control, cells were exposed to Kanamycin at 20 µg/mL. All treatments were kept at 29 °C for 4 hours and 200 rpm. After incubation, samples of 100 µL of each treatment were diluted (10 to 10^6 -fold) and spread onto NYG-agar plates for CFU counting. The absence of growth after 72 h incubation indicated bactericidal activity. The minimal inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest concentration of the compound which completely prevented growth of *X. citri*. Experiments were performed in triplicates, and repeated three times.

2.4 Sanitizing tests

2.4.1 Preparation of the bacterial suspension and fruit

Bacteria were inoculated from plate in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of NYG and incubated at 29 °C under shaking (200 rpm) until cultures reached the O.D. 600 nm of 0.3 (10^8 CFU/mL). After incubation, the cultures were centrifuged at 6000 xg for 7 minutes and the supernatant discarded. Cells were resuspended in phosphate buffer (1X PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄; pH 7.4) and the O.D. 600 nm was again adjusted to 0.3. In this study we used Tahiti limes (*Citrus latifolia*) taking into account its importance for the national and international market of fresh fruit and also for being smaller and easier to manipulate than other citrus fruit. The limes had approximately 5 cm in diameter measured in the cross-section perpendicular to the longer axis of the fruit.

2.4.2 Evaluation of PosFruit as a sanitizer

Before being exposed to the bactericides, fruit were washed with 5% Wash Fruit 33 soap (Aruá, Matão, Brazil), in order to remove dust and debris from the field. After washing, fruit were dried overnight at room temperature. A total of 15 Tahiti limes, divided in 5 groups (replicates) were spray-contaminated until the run-off point using the *X. citri* cell suspension mentioned in 2.4.1, and let to dry at room temperature (~21 °C) for approximately 6 h. PosFruit was assessed at 1%, 2% and 5% by spraying the fruit with a handgun sprayer until the run-off point. The fruit were exposed to the product for 2 minutes, followed by the removal of the excess using an air drier (without heat) for 30 seconds. Sodium hypochlorite at 0.2% and 1X PBS were used as positive and negative controls, respectively, in place of PosFruit.

2.4.3 Efficacy of PosFruit in a pilot packing line

Fruit used in these tests were not pre-washed before passing through the automated sanitization line. During the process, fruit were sprayed with PosFruit at 2% in water (v/v), and exposed to the product for 2 minutes. Fruit washed with tap water

only were used as negative control. For each treatment, 15 limes, divided into 5 groups of 3 limes each (replicates), were labeled using a permanent marker for identification, contaminated with *X. citri* as described in section 2.4.2, and then mixed with other limes added to give flow of fruit throughout the sanitizing line. Each of the five repetitions passed through the sanitizing line separately. Marked fruit were collected at the end of the line and allowed to dry at room temperature

2.4.4 Assessment of the sanitization efficiency

After the treatments, fruit were placed into plastic bags and washed manually using 100 mL of 1X PBS during 5 minutes. The washes were collected in 50 mL polypropylene tubes and centrifuged at 6000 xg for 7 minutes and the supernatant discarded. Cells were resuspended in 3 mL of 1X PBS and 100 µL were spread onto semi-selective MGY-KCC medium (16 µg/mL Kasugamycin, 16 µg/mL Cephalexin, and 50 µg/mL Cycloheximide) (BEHLAU *et al.*, 2012). Colony growth was evaluated after 72 h of incubation at 29 °C. To confirm the identity of *X. citri* colonies we performed diagnostic PCR following the procedure described by COLETTA-FILHO *et al.* (2006).

2.5 Induction of *X. citri* resistance

The probability that *X. citri* developed resistance against PosFruit was evaluated as previously described (OZ *et al.*, 2014), with modifications. Starting cultures of 5 mL at 10⁶ CFU/mL were exposed to PosFruit at 1x/8 of the MIC (MIC= 0.125%; section 3.1) and incubated for 24 h at 29 °C and 200 rpm. Following, 100 µL of the bacterial suspension were plated on NYG-agar and incubated for 72 h at 29 °C for CFU counting. This process was repeated until the maximum concentration of PosFruit reached 4x the MIC. In each step, 500 µL of the previous culture were used as inocula and transferred to fresh 5 mL cultures (identical to the starting cultures) Experiments were conducted in triplicates, and repeated three times.

2.6 Assessment of *X. citri* persistence

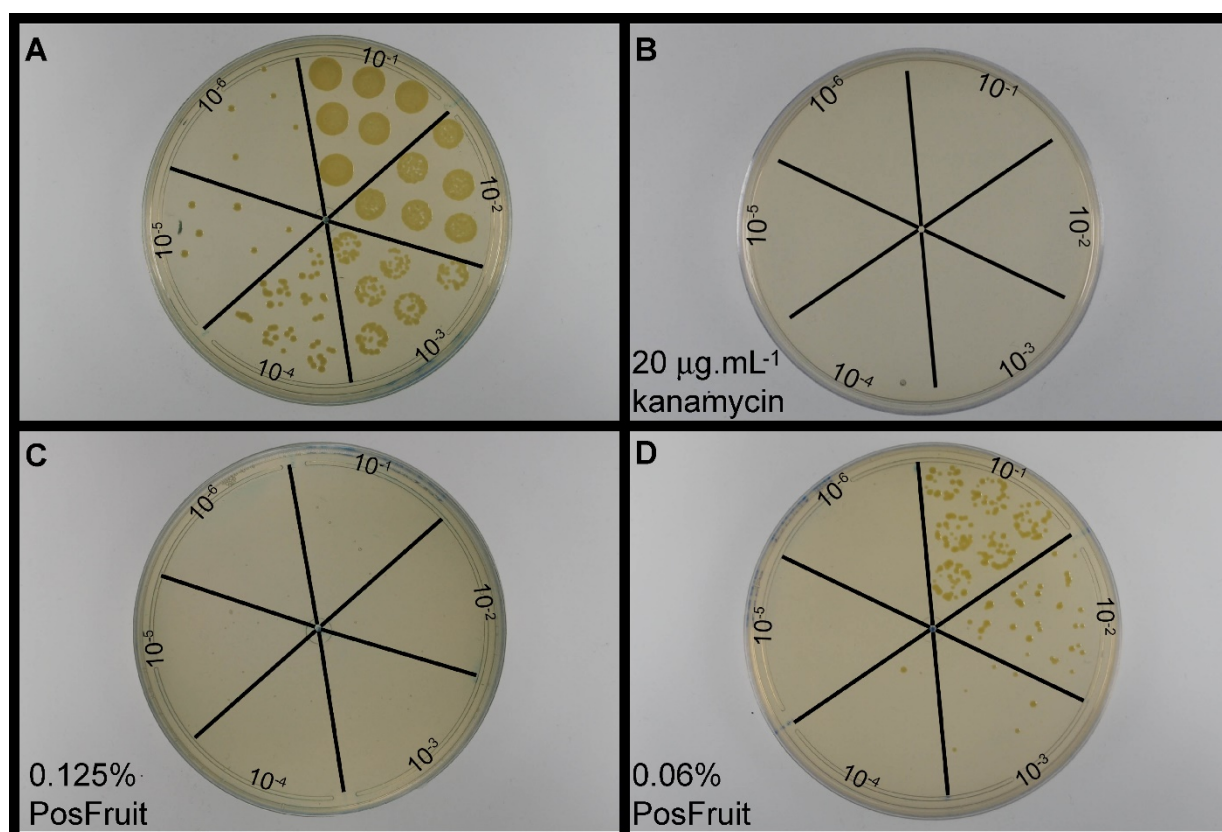
Firstly, *X. citri* was inoculated into 5 mL of NYG to a final concentration of 10^6 CFU/mL, followed by the addition of PosFruit at 0.9x the MIC (MIC= 0.125%; section 3.1). The bacterial suspension was exposed to the product for 4 h at 29 °C under shaking (200 rpm). After incubation, 100 μ L of the liquid culture were spread onto NYG-agar for the recovery of *X. citri*. Colonies that were able to grow were inoculated into fresh liquid NYG medium, now containing PosFruit at 1x the MIC, and incubated as before. Aliquots of 100 μ L were spread onto solid media following exposure to the product for 4 h, 4.5 h (half an hour beyond the incubation period used to define the MIC) and 24 h. Plates were incubated for up to 72 h before assessing the recovery of persistent colonies of *X. citri*.

3. RESULTS

3.1 PosFruit has bactericidal action against *X. citri*

The efficacy of PosFruit to inhibit growth of *X. citri* was evaluated by exposing bacterial cultures to various dilutions of the product prepared directly into the culture medium. PosFruit was able to inhibit *X. citri* growth in liquid medium at 0.125% after 4 h of exposure. In addition, no colonies from this treatment were recovered after plating samples of the cultures on NYG-agar (Fig. 1, C). These results were similar to the positive control, kanamycin, which has bactericidal action against *X. citri* at 20 μ g/mL (Fig. 1, B). By decreasing the concentration of PosFruit to 0.06%, there was still a significant inhibition of bacterial growth reflected as a reduced cell turbidity in the culture (not shown). However, upon plating samples of this culture on solid medium, a significant amount of *X. citri* colonies were able to grow (Fig. 1, compare D with our negative and positive controls, A and B, respectively). Based on that, 0.125% was defined as the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of PosFruit against *X. citri*.

Figure.1.- Sensitivity of *X. citri* to PosFruit. Bacterial suspension was exposed to different concentrations of PosFruit for a period of 4 h and plated on NYG-agar after serial dilutions (from 10^{-1} to 10^{-6}) for CFU counting. **A)** negative control (sterilized tap water); **B)** $20 \mu\text{g/mL}$ kanamycin; **C)** 0.0625% PosFruit, and **D)** 0.125% PosFruit.

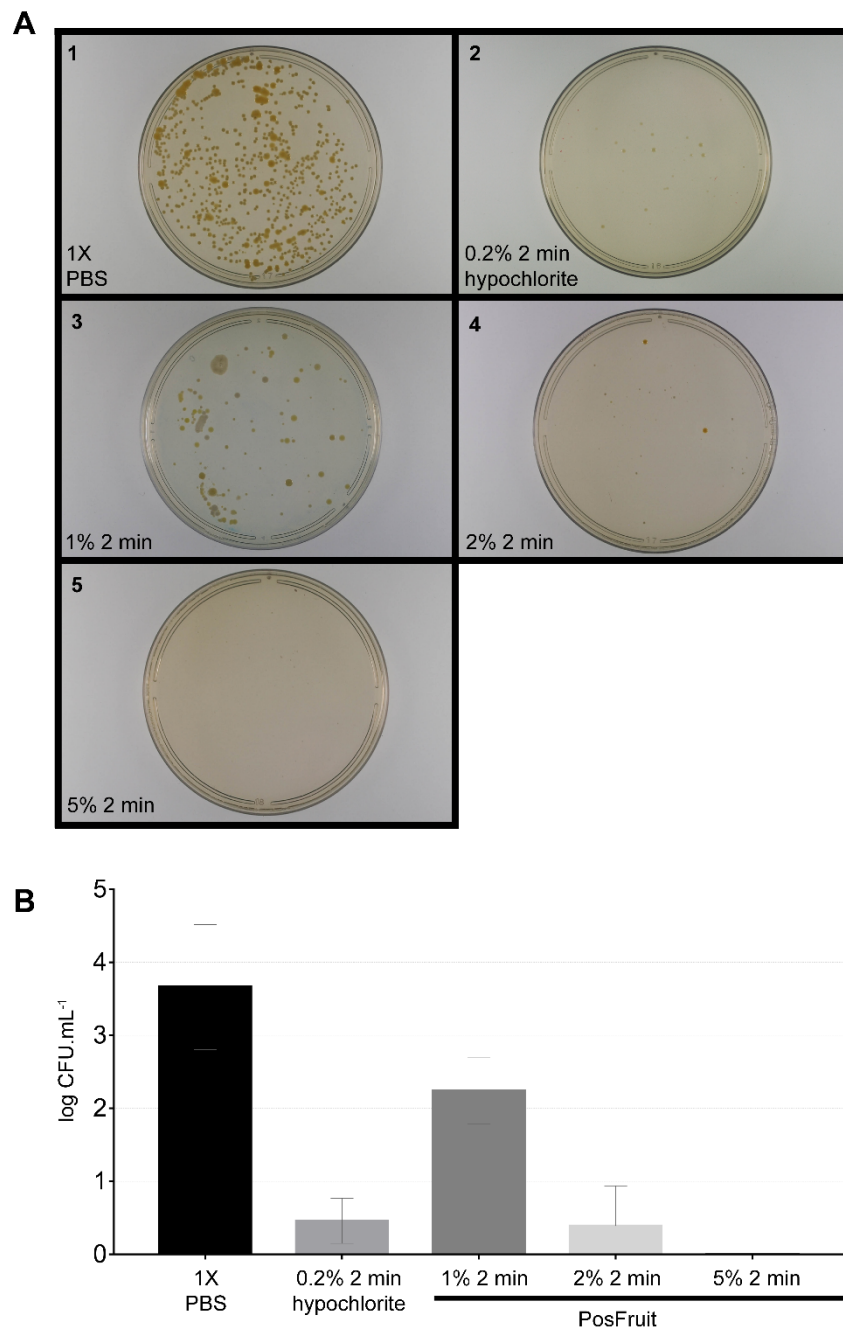


3.2 PosFruit was efficient to sanitize *X. citri* under laboratory conditions

The efficiency of PosFruit to sanitize Tahiti limes was evaluated by artificially contaminating fruit with *X. citri* followed by their exposure for 2 minutes to three concentrations of the product (Fig. 2). Treatments with PosFruit at 1% showed a reduction of approximately $2 \log_{10}$ in the number of *X. citri* CFU/mL recovered on agar plates (Fig. 2; compare panels A-1 and A-3; B). By further increasing the concentration of the product to 2% we detected a reduction of $3 \log_{10}$ in the number of recovered CFU/mL. At this concentration the efficacy of PosFruit was comparable to sodium hypochlorite at 0.2% used as the positive control (Fig. 2; compare panels A-1, A-2, and A-4; B). Besides some typical *X. citri* colonies, other yellowish epiphytic bacteria were also recovered after fruit sanitization with PosFruit at 2% (Fig. 2, A-4). These

contaminants were disregarded for being false positive colonies based on PCR analysis for *X. citri*. Finally, exposure of Tahiti limes to PosFruit at 5% completely eliminated all the bacteria, as no colonies could be recovered on NYG-agar plates (Fig. 2, A-5).

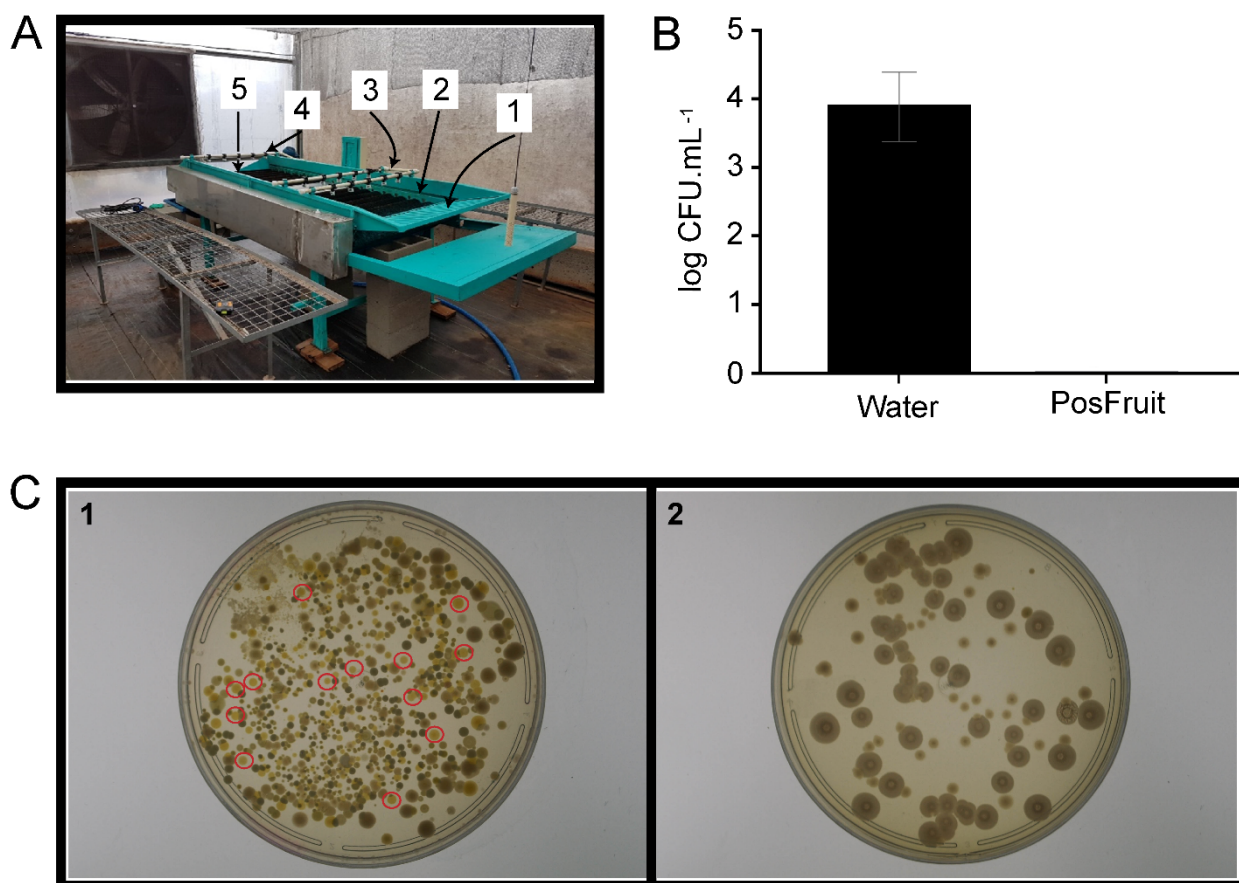
Figure 2.- Efficiency of PosFruit as a sanitizer of Tahiti limes against *X. citri* under laboratory conditions. Tahiti limes were spray-contaminated with *X. citri* and then manually exposed to 1, 2 and 5% PosFruit for 2 min. Following treatment, limes were washed and the recovery of *X. citri* was assessed on MGY-KCC agar plates after 72 h. **(A)** Recovery of *X. citri* on agar plates: **1**, 1X PBS (negative control); **2**, 0.2% sodium hypochlorite (NaOCl) (positive control); **3**, 1% PosFruit; **4**, 2% PosFruit; **5**, 5% PosFruit. **(B)** *X. citri* recovered after treatment as log₁₀ colony forming units (CFU)/mL. Whiskers indicate the standard error of the mean of three independent experiments



3.3 PosFruit was efficient to sanitize *X. citri* in a packing line

The efficiency of 2% PosFruit to sanitize Tahiti limes against *X. citri* was subsequently evaluated using a pilot processing line (Fig. 3, A). Untreated control fruit, washed with water only, led to the recovery of 4 log₁₀ CFU/mL (Fig. 3, B, and C-1, red circles). The identity of *X. citri* isolates was checked by PCR. A substantial amount of non-*X. citri* colonies was also recovered, and this was probably due to the fact that limes were washed only with tap water (not soap) before PosFruit application. However, when fruit were exposed to PosFruit at 2% using the pilot processing line, we observed a complete elimination of *X. citri* (Fig. 3, B, and C-2). Therefore, the reduction of the *X. citri* population on fruit exposed to this treatment was equivalent to 4 log₁₀ CFU/mL when compared with the untreated fruit.

Fig. 3. Efficiency of PosFruit as a sanitizer of Tahiti limes against *X. citri* in a pilot processing line. Marked fruit were contaminated with *X. citri*, and loaded on the pilot line (A): 1, fruit drop point; 2, rollers; 3, water spray lines; 4, product (PosFruit) spray line, and 5, fruit collection point. Following treatment with PosFruit at 2% for 2 min, limes were washed and the recovery of *X. citri* was assessed on MGY-KCC agar plates after 72 h. B) *X. citri* recovered after treatment as $\log_{10}$ colony forming units (CFU)/mL. Tap water was used as negative control. Whiskers indicate the standard error of the mean of three independent experiments. C) Plates from a representative experiment: 1) negative control, limes washed with water only (*X. citri* colonies are labeled using red circles), and 2) plate inoculated with washes from limes exposed to PosFruit at 2



3.4 Resistance and persistence of *X. citri* against PosFruit

X. citri cells were exposed to PosFruit at the MIC (0.125%) for 4 h, 4.5 h, and 24 h, before culture samples were spread onto NYG-agar in order to allow growth of persistent colonies. After several attempts, no colonies could be recovered, which

indicated that *X. citri* is not able to persist the treatment with PosFruit. Additionally, to check if and how likely natural resistant cells could be isolated, we prepared serial dilutions of *X. citri* cultures and plated them on NYG-agar containing PosFruit at the MIC. Plates were incubated for up to a week under standard cultivation conditions, and again, no bacterial colonies could be detected.

A final approach to detect resistance to PosFruit was to expose *X. citri* to increasing concentrations of the product, starting from a sub-lethal concentration and increasing up to as high as fourfold the MIC (Table 1). The rationale was to test if the product can induce genetic alteration in the course of increasing concentrations, and that could lead to PosFruit resistance. The experiment was initiated by exposing *X. citri* to 1x/8 of the MIC (day 1). After 24 h of incubation, culture samples were spread onto NYG-agar, and as a result, we detected colonies in 3 out of 3 trials after 48 h of plate incubation (Table 1, day 1). Fractions of the starting cultures (day 1, after 24 h incubation) were used as inocula to prepare the subsequent cultures in which the concentration of PosFruit was increased twofold (to 1x/4 of the MIC). Upon plating samples of cultures collected on the second day, we detected growth in 2 out of 3 plates. However, when the concentration of the product reached half the MIC (1x/2), bacterial growth was halted (Table 1, day 3). This process continued until the concentration of PosFruit reached four times the MIC (13th day). Neither the increase of cell turbidity in liquid cultures nor the growth of colonies on plate were detected from the third day on. Altogether, these results show that PosFruit did not induce resistance in *X. citri*.

Table 1 – Resistance evaluation of *X. citri* treated with PorFruit. Cells were exposed to sub-lethal doses of the product which was increased until fourfold the MIC. Bacterial was still able to develop in sub-lethal doses of 1/8x and 1/4x the MIC. Starting at half the MIC until higher doses, bacterial growth was impaired.

Bacterial resistance induction

Day	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Concentration ^a	1/8x	1/4x	1/2x	1x	1x	2x	2x	2x	3x	3x	3x	3x	4x
Bacterial growth ^b	3/3	2/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

^a 1x, Minimal Inhibitory Concentration of PosFruit in water (MIC = 0,125%).

^b number of experiments in which at least one of the three replicate plates showed any growth of *X. citri*. Experiments were repeated three times

4. DISCUSSION

The current Brazilian legislation that regulates the control of citrus canker in the country (Brazil, 2018) determined for the first time in 60 years that growers in states where the incidence of the disease is high are no longer required to eradicate the affected trees. Instead, growers have to adopt a set of control measures in order to reduce the impact of the disease on fruit quality and yield. *This regulation also mandates that all fresh fruit commercialized out of the producing state or country are sanitized with bactericide in the packing-house.* Although the legislation indicates the use of sodium hypochlorite as the only disinfectant for that purpose, it also consents that other bactericides can be authorized upon demonstration of their safety and efficacy. Here, we showed that PosFruit is an efficient bactericide to be used for post-harvest sanitization of citrus fruit against *X. citri*.

Reactive chlorine released from sodium hypochlorite is probably one of the most widespread sanitization agents used in the world to guarantee the quality of water and freshly harvested salads, vegetables and fruit. Chlorine has long been recognized as an active agent against many bacteria, fungi, and viruses (RICH & SLOTS, 2015; DA SILVA AQUINO *et al.*, 2016; GODA *et al.*, 2018; KOHLER *et al.*, 2018; LINEBACK *et*

al., 2018). However, concerns have been raised about the relative efficacy of chlorine-based formulations compared to other products and its safety to health and the environment (GOMES *et al.*, 2018; TEIXEIRA *et al.*, 2018; SLAUGHTER *et al.*, 2019). In solution, hypochlorous acid (hypochlorite anion) promptly reacts with the organic matter forming byproducts potentially harmful to health such as trihalomethanes, haloacetic acids, haloketones and chloropicrin (reviewed by GIL *et al.* (2009)). Although the safe level of these byproducts in food has never been demonstrated, some European countries like Germany and Switzerland have banned the use of chlorine (GIL *et al.*, 2009). Nevertheless, there are other important disadvantages of sodium hypochlorite: loss of efficiency due to its interaction with the organic matter requiring constant solution adjustments in washing tanks, risk fruit skin damage, corrosion of equipment, and the release of gases that are harmful to workers direct- or indirectly exposed to solutions containing chlorine (SLAUGHTER *et al.*, 2019).

Conversely, PosFruit is a natural product composed of essential oils and organic acids (Arvensis AGRO, Spain). It has been used mainly as a plant fortifier or inducer of plant resistance. PosFruit has also been utilized as post-harvest sanitizer for the protection of fruit against several kinds of microorganisms without leaving any residues, i.e., fruit treated with PosFruit can be commercialized right after receiving the product, as no safety period needs to be observed. In our study, PosFruit demonstrated an efficient bactericidal capacity against *X. citri* based on the sensitivity tests *in vitro*, and its efficacy was comparable to sodium hypochlorite. In addition, we did not detect resistance to PosFruit in *X. citri*. These results are congruent with the performance of multi-target bactericides, such as chlorine, for which the emergence of microbial resistance is disregarded (assessment report on active chlorine, EU 528/2012 from January 2017).

Although some *X. citri* were recovered after exposure to PosFruit at 2% for 2 minutes under laboratory conditions, we did not recover any *X. citri* when fruit were treated with the product at the same concentration and exposure time in a pilot packing line. It is important to mention that the sanitizing processes or products are not necessarily intended to thoroughly eliminate a microorganism from a fruit or vegetable but mainly to reduce its population to harmless levels or to levels that do not represent risks for dissemination. Therefore, the best cost-benefit relationship was achieved in the pilot packing line with PosFruit at 2%. Alternative bactericides for post-harvest disinfection of citrus fruit, especially those with satisfactory effectiveness and with less

or no influence in the environment, are most welcome. Citrus farming and agriculture are generally lacking in this type of tool to deal with diseases and pests. At the same time, there is a very strong and unquestionable trend of valuing sustainability and adopting less invasive and polluting measures of control. As a plant fortifier and inducer of plant resistance, PosFruit fulfils such premises. Moreover, it can be used for the disinfection of not only Tahiti limes but also other types of citrus fruit. Considering the epidemiology of citrus canker and the morphological similarity between the citrus fruits of different species, the results of this study may also be extended to oranges, lemons, tangerines, tangors, among other important citrus fruit for the fresh market worldwide.

5. CONCLUSION

Altogether, PosFruit was effective to sanitize Tahiti limes against *X. citri* when used at 2% with a minimum exposure time of 2 minutes. Treatments led to a reduction of at least 3 logs of CFU counting when compared to the control treatment. The bactericidal activity of the natural active ingredient and no evidence in resistance development, suggests a great potential to PosFruit to be used as an alternative sanitizer.

6. ACKNOWLEDGMENTS

Caio Zamuner received a MSc Scholarship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (2017/09233-9). This work was funded by FAPESP (grant 2015/50162-2) and INCT Citros (FAPESP 2014/50880-0 and CNPq 465440/2014-2).

7. REFERENCES

BEHLAU, F.; JONES, J. B.; MYERS, M. E.; GRAHAM, J. H. Monitoring for resistant populations of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and epiphytic bacteria on citrus trees treated with copper or streptomycin using a new semi-selective medium. **European Journal of Plant Pathology**, v. 132, p. 259-270, 2012.

COLETTA-FILHO, H. D.; TAKITA, M. A.; SOUZA, A. A.; NETO, J. R.; DESTEFANO, S. A.; HARTUNG, J. S.; MACHADO, M. A. Primers based on the *rpf* gene region provide improved detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in naturally and artificially infected citrus plants. **J Appl Microbiol**, v. 100, n. 2, p. 279-85, Feb 2006.

DA SILVA AQUINO, I.; PORTO, J. C.; DA SILVA, J. L.; MORAIS, K. F.; COELHO, F. A.; DE SOUSA LOPES, T.; RIBEIRO, I. P.; NOLETO, I. S.; DO AMPARO SALMITO, M.; MOBIN, M. Evaluation of disinfectants for elimination of fungal contamination of patient beds in a reference hospital in Piauí, Brazil. **Environ Monit Assess**, v. 188, n. 11, p. 644, Nov 2016.

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

GIL, M. I.; SELMA, M. V.; LOPEZ-GALVEZ, F.; ALLENDE, A. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: problems and solutions. **Int J Food Microbiol**, v. 134, n. 1-2, p. 37-45, Aug 31 2009.

GODA, H.; IKEDA, K.; NISHIDE, M.; NAGAO, T.; KOYAMA, A. H. Characterization of Virucidal Activities of Chlorous Acid. **Jpn J Infect Dis**, v. 71, n. 5, p. 333-337, Sep 21 2018.

GOMES, I. B.; LEMOS, M.; MATHIEU, L.; SIMOES, M.; SIMOES, L. C. The action of chemical and mechanical stresses on single and dual species biofilm removal of drinking water bacteria. **Sci Total Environ**, v. 631-632, p. 987-993, Aug 1 2018.

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

KOHLER, A. T.; RODLOFF, A. C.; LABAHN, M.; REINHARDT, M.; TRUYEN, U.; SPECK, S. Efficacy of sodium hypochlorite against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. **J Hosp Infect**, v. 100, n. 3, p. e40-e46, Nov 2018.

LINEBACK, C. B.; NKEMNGONG, C. A.; WU, S. T.; LI, X.; TESKA, P. J.; OLIVER, H. F. Hydrogen peroxide and sodium hypochlorite disinfectants are more effective against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms than quaternary ammonium compounds. **Antimicrob Resist Infect Control**, v. 7, p. 154, 2018.

LIS, A.; KOWALSKA, W.; SIENKIEWICZ, M.; BANASZCZAK, P. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Phellodendron lavallei*. **Nat Prod Commun**, v. 12, n. 1, p. 123-126, Jan 2017.

MISHRA, V.; ABROL, G. S.; DUBEY, N. **Sodium and Calcium Hypochlorite as Postharvest Disinfectants for Fruits and Vegetables**. In **Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables**. 1st. Academic Press, 2018. 322

MORETTI, C. L. **Manual de Processamento Mínimo de Frutas e Hortalças: Embrapa Hortalças ISBN 978-85-7333-431-9**. Brasília: Embrapa, 2007. 531

OZ, T.; GUVENEK, A.; YILDIZ, S.; KARABOGA, E.; TAMER, Y. T.; MUMCUYAN, N.; OZAN, V. B.; SENTURK, G. H.; COKOL, M.; YEH, P.; TOPRAK, E. Strength of selection pressure is an important parameter contributing to the complexity of antibiotic resistance evolution. **Mol Biol Evol**, v. 31, n. 9, p. 2387-401, Sep 2014.

RICH, S. K.; SLOTS, J. Sodium hypochlorite (dilute chlorine bleach) oral rinse in patient self-care. **J West Soc Periodontol Periodontal Abstr**, v. 63, n. 4, p. 99-104, 2015.

RICHARDSON, S. D.; THRUSTON, A. D.; CAUGHRAN, T. V.; CHEN, P. H.; COLLETTE, T. W.; SCHENCK, K. M.; LYKINS, B. W.; RAV-ACHA, C.; GLEZER, V. Identification of New Drinking Water Disinfection by-Products from Ozone, Chlorine Dioxide, Chloramine, and Chlorine. In: BELKIN, S. (Ed.). **Environmental Challenges**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2000. p.95-102. ISBN 978-94-011-4369-1.

SAKKAS, H.; PAPADOPOULOU, C. Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils. **J Microbiol Biotechnol**, v. 27, n. 3, p. 429-438, Mar 28 2017.

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

SLAUGHTER, R. J.; WATTS, M.; VALE, J. A.; GRIEVE, J. R.; SCHEP, L. J. The clinical toxicology of sodium hypochlorite. **Clin Toxicol (Phila)**, p. 1-9, Jan 28 2019.

TEIXEIRA, P. A.; COELHO, M. S.; KATO, A. S.; FONTANA, C. E.; BUENO, C. E.; PEDRO-ROCHA, D. G. Cytotoxicity assessment of 1% peracetic acid, 2.5% sodium hypochlorite and 17% EDTA on FG11 and FG15 human fibroblasts. **Acta Odontol Latinoam**, v. 31, n. 1, p. 11-15, Jun 2018.

UMA, K.; HUANG, X.; KUMAR, B. A. Antifungal effect of plant extract and essential oil. **Chin J Integr Med**, v. 23, n. 3, p. 233-239, Mar 2017.

ZHAO, L.; FENG, C.; WU, K.; CHEN, W.; CHEN, Y.; HAO, X.; WU, Y. Advances and prospects in biogenic substances against plant virus: A review. **Pestic Biochem Physiol**, v. 135, p. 15-26, Jan 2017.