
Ciências Biológicas

Mario Nicolas Caccalano

**ÁCIDO HEXANÓICO COMO UMA
ALTERNATIVA AO COBRE NA PROTEÇÃO DE
CITRUS CONTRA INFECÇÃO DE
XANTHOMONAS CITRI**



Rio Claro - SP
2022

MARIO NICOLAS CACCALANO

**ÁCIDO HEXANÓICO COMO UMA ALTERNATIVA AO COBRE NA
PROTEÇÃO DE CITRUS CONTRA INFECÇÃO DE XANTHOMONAS
CITRI**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, para obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Henrique Ferreira

Coorientador: Dr. Guilherme Dilarri

Rio Claro - SP
2022

C118a Cacalano, Mario Nicolas

Ácido hexanóico como uma alternativa ao cobre na proteção de citrus contra infecção de *Xanthomonas citri* / Mario Nicolas Cacalano. -- Rio Claro, 2022

35 p. : il., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: Henrique Ferreira

Coorientador: Guilherme Dilarri

1. Microorganismos fitopatogênicos. 2. Compostos bioativos. 3. Microbiologia. 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.

MARIO NICOLAS CACCALANO

**ÁCIDO HEXANÓICO COMO UMA ALTERNATIVA AO COBRE NA
PROTEÇÃO DE CITRUS CONTRA INFECÇÃO DE XANTHOMONAS
CITRI**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, para obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Henrique Ferreira (orientador)

Dr. Guilherme Dilarri (coorientador)

Prof. Dra. Karen Cristiane Martinez de Moraes

Prof. Dr. Douglas Silva Domingues

Aprovado em: 19 de janeiro de 2022


Assinatura do discente


Assinatura do coorientador


Assinatura do(a) orientador(a)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à FAPESP, pelo apoio financeiro através do processo nº 2018/23297-2, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), que permitiu a realização desse trabalho. Ao meu orientador Henrique Ferreira e meu coorientador Guilherme Dilarri por toda a ajuda, ensinamento e paciência. Aos integrantes do laboratório, Caio, Guilherme, Léo, Natalia, Giovane e Hayen. Aos meus pais Tânia e Danilo, meu irmão Matias e toda a minha família por todo o apoio. A meus amigos de graduação, pelos momentos de descontração.

Resumo

Brasil é um dos maiores produtores de laranja do mundo e é líder mundial em produção de laranjas doce. O cancro cítrico asiático (ACC) é uma das doenças bacterianas mais preocupantes para a citricultura no Brasil. ACC é causada pela bactéria Gram-negativa *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*), que afeta diversas variedades cultivadas de citros de interesse econômico e para a qual não existe cura. De acordo com a nova legislação para controle da ACC, São Paulo é uma área de mitigação de risco (SMR), desta forma, controle de ACC é exercida mediante plantio de cultivares menos susceptíveis ao cancro, uso de formulações a base de cobre, instalação de quebra-vento em pomares com o intuito de se evitar a disseminação da bactéria, que se espalha pela ação combinada de ventos e chuva. Cobre é bio-cumulativo e tóxico e resistência bacteriana a este metal já foi relatada em linhagens de *X. citri*. Desta maneira, o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial do ácido hexanóico como uma possível alternativa ao cobre no combate do cancro cítrico. O ácido hexanóico apresentou uma IC₉₀ de 123,8 ppm e IC₅₀ de 96,33ppm. O composto foi considerado bacteriostático em 125 ppm, visto que houve crescimento no ensaio de MBC. O ácido hexanóico foi bactericida a 250 ppm. O composto não interferiu com o número total de sementes germinadas em concentrações de até 300 ppm e não houve redução no índice de germinação em até 200 ppm. Em testes protetivos, em concentração de 400ppm, foi observada uma diminuição no número de lesões de cancro, sugerindo um efeito protetivo. Em análises de microscopia não foi visto nenhuma alteração tanto na integridade da membrana bacteriana quanto na formação de septos de divisão nos grupos tratados com o ácido. Por fim, definimos a concentração de segurança (400ppm) por meio de um ensaio de indução de resistência.

Palavras-chave: Microorganismos fitopatogênicos; Compostos bioativos; Microbiologia

Abstract

Brazil is one of the largest orange producers in the world and is the world leader in the production of sweet oranges. Asian citrus canker (ACC) is one of the most worrying bacterial diseases for the agricultural industry in Brazil. ACC is caused by the Gram-negative bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*), which affects several cultivated citrus varieties of economic interest and for which there is no cure. According to the new legislation to control ACC, São Paulo is a risk mitigation area (RMA), therefore, ACC control is exercised by planting less susceptible cultivars, the use of copper-based formulations, installation windbreaks in order to prevent the spread of the bacteria, which spreads through the combined action of wind and rain. Copper is bioaccumulative and toxic and bacterial strains resistant to this metal have been reported. Thus, the objective of this work was to evaluate the potential of hexanoic acid as a possible alternative to copper in the fight against citrus canker. The hexanoic acid had an IC₉₀ of 123.8ppm and an IC₅₀ of 96.33ppm. The compound was considered bacteriostatic at 125 ppm, as there was growth in the MBC assay. The hexanoic acid was bactericidal at 250 ppm. The compost did not interfere with the total number of seeds germinated at concentrations up to 300 ppm and there was no reduction in the germination index up to 200 ppm. In protective tests, at a concentration of 400ppm, a decrease in the number of cancer lesions was observed, suggesting a protective effect. In microscopic analysis, no alteration was seen either in the integrity of the bacterial membrane or in the formation of dividing septa in the groups treated with the acid. Finally, we defined the safety concentration (400ppm) through a resistance induction test.

Keywords: Phytopathogenic microorganisms; Bioactive compounds; Microbiology

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1 Importância da produção de laranja para SP	8
1.2 Ácido Hexanóico	10
2. Materiais e Métodos	11
2.1 Cultivo celular e linhagens celulares	11
2.2 Avaliação da inibição do crescimento bacteriano	11
2.3 Avaliação do efeito bactericida do composto	12
2.4 Avaliação da fitotoxicidade	12
2.5 Definição da dose de segurança para aplicação	13
2.6 Teste de fitopatogenicidade	14
2.7 Avaliação do potencial protetivo do ácido hexanóico	14
2.8 Microscopia Celular	15
2.8.1 Análise da morfologia celular	15
2.8.2 Análise da permeabilidade de membrana	16
2.8.3 Análise do septo de divisão	16
3. RESULTADOS	17
3.1 Atividade antimicrobiana do ácido hexanóico em <i>Xanthomonas</i>	17
3.2 Fitotoxicidade do ácido hexanóico em sementes de alface	19
3.3 Definição da dose de segurança	20
3.4 Ácido hexanóico não altera morfologia celular	21
3.5 Ácido hexanóico não altera integridade da membrana celular de <i>X. citri</i>	23
3.6 Microscopia para septo de divisão	25
3.7 Ácido hexanóico apresentou potencial protetivo <i>in planta</i>	27
4. DISCUSSÃO	29
5. REFERÊNCIAS	32

1. INTRODUÇÃO

1.1 Importância da produção de laranja para SP

A produção de laranja doce no Brasil é uma atividade de grande importância social e econômica, capaz de gerar diversos empregos (NEVES, 2010). De acordo com o senso de produção realizado pelo Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) em abril de 2021, a produção do cinturão citrícola (área que inclui os estados de São Paulo e Oeste/Sudoeste de Minas Gerais) no período de 2020-2021 foi estimada em 269,01 milhões de caixas de laranja (FUNDECITRUS, 2021).

A citricultura brasileira, apesar do sucesso, enfrenta diversas ameaças, como a disponibilidade de água e doenças. O cancro cítrico é visto como uma das doenças bacterianas mais preocupantes para a citricultura no Brasil (LANZA *et al.*, 2019). Em que sua forma mais disseminada e severa é o cancro cítrico tipo A ou cancro cítrico Asiático, sendo causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*) (SCHAAD *et al.*, 2006). Existe também, na América do Sul mais dois tipos: os tipos B e C de cancro cítrico, causados por linhagens de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. Essas variações da doença são menos severas e afetam um espectro menor de hospedeiros (GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002). A bactéria penetra no tecido vegetal através de aberturas naturais (estômato) e ferimentos. Esta doença é localizada, não sistêmica, e a proliferação da bactéria do cancro pode causar a queda prematura do fruto, desfolhação e até morte da planta quando a incidência de infecção for elevada (BRUNINGS; GABRIEL, 2003; GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002). Existem dois principais fatores que contribuem para a disseminação da doença: a ação do vento e da chuva. E além disso, há também a ação da larva minadora do citrus capaz de agravar e exacerbar a infecção, em que há criação de galerias no mesofilo da planta facilitando a sua propagação na folha (MARCONE; CHAGAS, 2001).

Não existem nenhum indício de resistência a ACC, assim a forma mais efetiva para o combate e eliminação da doença é a eliminação das árvores contaminadas, bem como pela utilização de biocidas com formulação a base de cobre. Essas formulações são nocivas ao meio ambiente, e já existe relato de espécies de *Xanthomonas* que apresentam níveis de resistência a eles (BEHLAU *et al.*, 2013).

Contudo, essa eliminação traz consigo um alto impacto social e político, com a perda de árvores infectadas. Além disso, a eliminação de plantas requer um grande

número de inspetores para localizar o foco da infecção no campo. A partir de 2009, a legislação relativa ao controle do cancro cítrico no estado de São Paulo começou a ser flexibilizada. Mudanças subsequentes que levaram a procedimentos cada vez menos efetivos para a erradicação da doença culminaram em um cenário atual de endemismo.

Com a mudança da normativa SAA de 2017 (Resolução da Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SAA), 2017), passa a ser possível a presença do cancro cítrico nos pomares. O que autoriza os fazendeiros a adotar medidas de manejo com relação a doença, usando técnicas conhecidas: o uso de cultivares de citros menos suscetíveis, instalação de quebra-ventos, ao passo que a bactéria pode ser transmitida de planta a planta pela ação combinada de chuvas e vento, bem como pelo contato direto e aplicação de sprays regulares de formulações de cobre que exercem proteção mecânica contra a entrada bacteriana nos tecidos da planta (FERENCE *et al.*, 2018). Com essa medida, o estado de São Paulo passou a ser considerado uma área de sistema de mitigação de risco (SMR). Com a maior utilização desses sprays a base de cobre para a proteção dos cultivares, se espera um maior acúmulo desse metal no ambiente.

A utilização de sprays de cobre são uma das únicas medidas de manejo efetivo com relação a doença. Assim, existe uma discussão com relação ao uso indiscriminado e excessivo de cobre como único bactericida para controlar a dispersão de ACC. Sprays de cobre são aplicados com frequência para que o controle seja eficaz, especialmente na sequência de novos brotamentos e após a queda das pétalas e aparecimento dos frutos. O cobre é um elemento que pode ser acumulado no ambiente apresentando toxicidade ao solo (BRUNETTO *et al.*, 2016; CORNU *et al.*, 2017; FONES; PRESTON, 2013). Além disso, a aplicação contínua de cobre proporciona a seleção de cepas resistentes e favorece um aumento gradual na frequência de linhagens resistentes dentro da população bacteriana, o que compromete a eficiência dos sprays (SUNDIN, 1989). Cepas de *X. citri* resistentes ao cobre (CuR) foram detectadas na Argentina nos anos 90 (CANTEROS, 1999). Com isso, é necessário a criação de novas formulações químicas para o combate as infecções bacterianas e fúngicas.

1.2 Ácido Hexanóico

O ácido hexanóico ($C_6H_{12}O_2$) é um ácido carboxílico derivado do hexano. É também conhecido como ácido cáprico, por ser considerado o composto que produz o cheiro característico de caprinos. Na indústria de cosméticos, ele é um ácido graxo utilizado na fabricação de condicionadores e cremes.

A aplicação exógena de ácido hexanóico em plantas para proteção contra infecções foi aventada devido à solubilidade deste composto em água e a existência de trabalhos que indicavam a atividade antimicrobiana decorrente da aplicação de ácidos graxos em plantas (LEYVA *et al.*, 2008; VICEDO *et al.*, 2006). Um efeito similar foi também observado em outros patógenos fúngicos (como *Alternaria sp.*), bem como na resposta a patógenos bacterianos como *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas citri*, e *C. jejuni* e *C. coli* e em diferentes sistemas vegetais, como *Arabidopsis thaliana* e espécies cítricas (CAMANES *et al.*, 2015; KRAVCHUK *et al.*, 2011; LLORENS *et al.*, 2015; SCALSCHI *et al.*, 2013; PEH *et al.*, 2020). Deste modo, postulou-se que a aplicação de baixas concentrações (faixa de 1 a 5 mM) de ácido hexanóico teria um efeito indutor de resistência, e que concentrações mais altas (de 6 a 20 mM) teriam um efeito bactericida e fungicida, mas sem efeitos de toxicidade em plantas, conforme revisado por (ARANEGA-BOU *et al.*, 2014).

A base molecular da resposta ao ácido hexanóico in planta foi relacionada a regulação transcricional positiva tanto da via de biossíntese de jasmonatos como de salicilatos (FINITI *et al.*, 2014; SCALSCHI *et al.*, 2013). Dois trabalhos recentes identificaram metabólitos induzidos pela aplicação de ácido hexanóico (CAMANES *et al.*, 2015; LLORENS *et al.*, 2016), em tomateiro e citros. Foi observado que a aplicação de ácido hexanóico diminui a produção de metabólitos da via do aspartato e aminoácidos de cadeia ramificada, mas induz a produção de frutose, oxilipinas e fosfolípidios (CAMANES *et al.*, 2015). Demonstrou-se posteriormente que não há translocação para folhas do ácido hexanóico aplicado em solução nutritiva nas raízes; no entanto, ocorre em folhas a indução da emissão de compostos voláteis e da via metabólica do mevalonato, em termos transcricionais e metabólicos (LLORENS *et al.*, 2016), levando a especular-se que sinalizadores moleculares translocados pelo xilema poderiam estar envolvidos neste processo.

2. Materiais e Métodos

2.1 Cultivo celular e linhagens celulares

A linhagem celular bacteriana 306 de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (IBSBF-1594) foi utilizada, sendo cultivada a uma temperatura de 29°C em meio solido NYG (nitrogen-yeast- glycerol com 5 g·L⁻¹ de peptona, 3 g·L⁻¹ de extrato de levedura, 2% de glicerol e 15 g·L⁻¹ de ágar), como também em meio líquido a 200 rpm, sem adição de ágar, quando necessário.

2.2 Avaliação da inibição do crescimento bacteriano

A determinação da porcentagem de inibição do crescimento bacteriano foi realizada através do método *Resazurin Microtiter Assay* (REMA) descrita por (SILVA *et al.*, 2013). Uma solução estoque com concentração de 1000 ppm foi preparada pela diluição do composto em água destilada. Essa solução foi então diluída em meio de cultura em microplacas multipoços, que totalizam 96 poços por placa, com volume final de 100 µl/poço. Com isso, um inóculo de *Xanthomonas citri* foi preparado com uma concentração final de 10⁶ CFU/ poço. Para o controle negativo, 90 µl de meio NYG e 10 µl de inóculo foram adicionados. Para o controle positivo, 10 µl do inóculo foi acrescentado ao poço contendo o antibiótico canamicina a uma concentração final de 20 µg·ml⁻¹, totalizando 100 µl. Para o controle do veículo foi utilizado água destilada, visto que o composto foi solubilizado em água destilada. Após o preparo, as placas foram incubadas a 29°C por um período de 16 horas. Subsequente a incubação, 15 µl de resazurina a 0,01% (w/v) foram adicionados a cada poço para medir a respiração celular, sendo a placa incubada por mais 2 horas a 29°C. Havendo respiração, a resazurina é reduzida por NADH a resofurina (fluorescente), que pode ser detectada por *scanner* de fluorescência, utilizando-se os comprimentos de onda de excitação 530 nm e emissão 590 nm. A porcentagem de células inibidas (IC) pelo composto foi determinada com base na fluorescência emitida para cada tratamento em comparação com os controles utilizando-se a seguinte equação:

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

(a): Unidades arbitrárias de fluorescência

(b) : Controle negativo

Após determinação das concentrações inibitórias, os dados foram utilizados para a construção de uma curva logística utilizando-se o *software* Excel, curva que serve para estimar os valores das concentrações em que 50% (IC₅₀) e 90% (IC₉₀) das células são inibidas pelo composto.

2.3 Avaliação do efeito bactericida do composto

Para a avaliação do potencial bactericida/bacteriostático do ácido hexanóico foi utilizada a técnica de *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC). Para tanto, foi feito a inoculação de cada poço do REMA em uma placa de Petri de 15 cm com meio NYG sólido antes da adição da resazurina, com o auxílio de replicador de placas. A placa foi então incubada a 29°C por 48 horas para se determinar a presença ou ausência de crescimento bacteriano. O crescimento foi avaliado após 24 e 48 horas de incubação.

2.4 Avaliação da fitotoxicidade

Sementes de alface (*Lactuca sativa*) com 100% de pureza e índice de germinação mínimo de 98% foram utilizadas para medir a toxicidade do composto com base no índice de germinação (MORAES; BIDOIA, 2015). Ácido hexanóico foi avaliado nas concentrações de 150, 200, 300, 400, 500 e 600 ppm. Além disso foi preparado um controle negativo com água destilada e um controle positivo com sulfato de zinco (ZnSO₄ – 0.05 M; inibidor conhecido da germinação de sementes). Para cada um dos tratamentos, 25 sementes foram igualmente distribuídas sobre papel filtro cobrindo o fundo de placas de Petri contendo 3 ml de cada uma das soluções do ácido, ou controles. As placas foram seladas com papel filme e colocadas em sacolas escuras, com o intuito de reduzir a entrada de luz e perda de água. Em seguida, essas

amostras foram colocadas em B.O.D a 21°C por um período de 72 horas. Após as 72 horas, as sementes foram coletadas para medição do comprimento radicular, bem como para determinar o número de sementes que germinaram por teste. O cálculo do índice de germinação foi realizado conforme as seguintes equações:

$$\text{Germinação relativa (\%)} = \left[\frac{\text{Número de sementes germinadas nos tratamentos}}{\text{Número de sementes germinadas no controle negativo}} \right]$$

$$\text{Elongação radicular relativa (\%)} = \left[\frac{\text{Média da elongação dos tratamentos}}{\text{Média da elongação no controle}} \right]$$

$$\text{Índice de germinação (\%)} = \left[\frac{\text{Germinação relativa X elongação radicular relativa}}{100} \right]$$

2.5 Definição da dose de segurança para aplicação

Para definir uma dose de segurança para o uso do composto nos testes em plantas, foi conduzido um teste de resistência branda com algumas modificações (OZ *et al.*, 2014). Potes coletores com volume final de 5 mL, com 10^6 células $\cdot$ mL⁻¹ em meio NYG líquido, adicionados de ácido hexanóico em concentração inicial de 0,125x IC₉₀, foram incubados sob agitação de 200 rpm por 12 horas a 29°C. Ao final do tempo de tratamento, uma amostra do inóculo foi transferida para uma placa de meio NYG sólido e incubada a 29°C por 48 horas para verificar a presença ou ausência de crescimento bacteriano; enquanto 500 µl da cultura (DO₆₀₀ ~ 0,4) foram inoculados em um novo

tratamento em concentrações crescentes (0,25x IC₉₀; 1x IC₉₀; 2x IC₉₀) até que se atinja a concentração de 3X IC₉₀.

2.6 Teste de fitopatogenicidade

O potencial do ácido hexanóico em alterar a capacidade de infecção de *X. citri* foi avaliado em testes de infiltração em folhas de laranja doce. Para tal, células de *X. citri* foram cultivadas em meio NYG líquido por 16 horas e suas DO_{600nm} foram ajustadas para 0,4. Cultivos com diferentes tratamentos foram então preparados com concentração final de 10⁵ células·ml⁻¹: (I) controle positivo (CP), apenas com meio de cultura; (II) adição de ácido hexanóico com concentração final de 400 ppm (AcX) e por fim, (III) solução salina 0,85% (w/v), estéril, como controle negativo (CN). Após 4 horas de incubação em *shaker*, as células foram centrifugadas a 6000 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em mesmo volume (5 ml) com solução salina 0,85% (w/v). Ramos de laranjeira foram selecionados para a aplicação de cada um dos tratamentos (CN, AcX e CP). Folhas de *Citrus sinensis* de tamanho V4 (FUNDECITRUS, 2017) foram previamente selecionadas e 0,5 ml de cada um dos tratamentos CN, AcX e CP foram infiltrados com seringa de 1 ml sem agulha, na região abaxial de cada uma das folhas de cada ramo. As plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura e umidade controladas. Folhas foram coletadas após 7 dias de tratamento para avaliação.

2.7 Avaliação do potencial protetivo do ácido hexanóico

O potencial protetivo do ácido hexanóico em folhas de laranja doce foi avaliado em ensaio de aspersão. Para tal, plantas foram selecionadas e divididas em três grupos distintos compostos por três plantas cada. Foram realizados diferentes tratamentos para cada grupo de plantas: (I) controle negativo (CN), onde foi realizada uma aspersão apenas com água; (II) o controle positivo (CP), utilizando 600 µg/mL do produto comercial Difere (Oxiquímica) e (III) o tratado com ácido hexanóico (AcX), 400 ppm. Ramos jovens, com 6 a 8 folhas de tamanho V4 (FUNDECITRUS, 2004) foram marcados para posterior avaliação dos sintomas. As folhas foram aspergidas com cada um dos tratamentos, tanto na porção abaxial como adaxial, até ponto de escorrimento, e mantidas em casa de vegetação. Após 24 horas, foi feita a aspersão com suspensão contendo uma suspensão de células de *X. citri*, na concentração de

10^8 células por ml (JUNIOR, 2006). Os sintomas e a formação de lesões foram avaliados após 30 dias da inoculação com auxílio do *software* ImageJ.

2.8 Análises por técnicas microscopia

Dentre os possíveis mecanismos de ação do ácido hexanóico em células de *X. citri*, investigaremos se há alteração da morfologia celular, de permeabilidade de membrana e também de formação do septo divisional. Células foram tratadas com o ácido na concentração de IC_{90} por 15 e 30 minutos. Na sequência, células foram lavadas em salina esterilizada e 10 μ L foram utilizados para a confecção de lâminas de microscopia para observação. Em todas as análises, para a confecção das lâminas, 1 ml de agarose, em solução salina (0,85%), foi transferido para cada uma das lâminas afim de formar um fino filme de agarose após solidificação e para que as células possam ser imobilizadas durante observação (MARTINS *et al.*, 2010). A observação foi feita com auxílio do microscópio Olympus BX-61 com captura de imagem feita pela câmera monocromática Orca-Flash 2.8 Hamamatsu e *software* Cellsense Dimension. Entre 100 e 200 células foram analisadas para cada tratamento com auxílio do *software* ImageJ.

2.8.1 Análise da morfologia celular

Para avaliar possíveis alterações morfológicas causadas pelo ácido foi realizado microscopia de contraste de fase de células de *X. citri* expostas ao composto; no mínimo 100 células de *X. citri* foram observadas por tratamento. Os tratamentos com o ácido hexanóico foram realizados em um tempo de contato com as células bacterianas de 15 e 30 minutos. Suspensões bacterianas adicionadas ao composto foram preparadas para se atingir uma concentração final de 10^5 células $\cdot$ mL^{-1} e ácido hexanóico (IC_{90}). Para a observação, após cada um dos tratamentos, 1 ml de solução salina 0,85% (w/v) foi adicionado, a fim de minimizar a ação do composto sob as células, as amostras foram centrifugadas a 5000 xg por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e a solução foi homogeneizada com 100 μ L de solução salina 0,85% (w/v). Uma fração de 5 μ L de cada uma das soluções (tratamentos) foi transferida para as lâminas e observadas em microscopia de contraste de fase.

2.8.2 Análise da permeabilidade de membrana

X. citri foi exposta ao ácido hexanóico com avaliação de permeabilidade de membrana, segundo (POLAQUINI *et al.*, 2019), com modificações. Para tal, células de *X. citri* foram cultivadas em meio NYG líquido por 16 horas, suas DO_{600nm} foram ajustadas para 0,1 e incubadas até DO_{600nm} 0,4 (10^7 células por ml). Foram então preparados três tratamentos: o controle negativo CN – livre de qualquer tratamento, o controle positivo CP – feito em estufa a 45°C (SUMARES *et al.*, 2016) e o ácido hexanóico a IC₉₀. Em cada tratamento a concentração de células foi de 10^5 células por ml e cada um dos tratamentos foi feito durante 15 e 30 minutos. As células foram centrifugadas a 4000 xg por 5 min, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 100 µl de solução salina 0,85% (w/v). Foi então adicionado 2 µl de Iodeto de propídio - IP ($1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) e 5 µl de DAPI ($1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). As células foram incubadas em ausência de luz por 20 minutos para a entrada dos corantes nas células. Estas foram então centrifugadas a 4000 xg por 5 minutos, o sobrenadante descartado e ressuspensas em 10 µl de salina 0,85% (w/v). Em que 5 µl de cada tratamento foi transferido para uma lâmina e observado em microscopia.

2.8.3 Análise do septo de divisão

X. citri amy:pPM2a-zapA, que expressa GFP-ZapA (proteína fluorescente capaz de marcar o septo divisional (MARTINS *et al.*, 2010), foi exposta ao ácido e posteriormente avaliada em microscopia. Para isso, células do mutante foram cultivadas em meio NYG líquido por 16 horas, suas DO_{600nm} ajustadas para 0,1 e incubadas até DO_{600nm} 0,4 (10^7 células·ml⁻¹). Foram então preparados três tratamentos: o controle negativo CN – apenas com meio de cultura, com formação de septo de divisão, o controle positivo CP – feito com galato de hexila (IC₉₀), composto que a capacidade de interferir com a formação do septo de divisão já foi avaliada (SILVA *et al.*, 2013) e o ácido hexanóico (IC₉₀). Os inóculos foram preparados com concentração final de 10^5 células e volume final de 5 ml, e então induzidos com arabinose 0,001% por 1 hora. Após 60 minutos cada um dos tratamentos foi aplicado aos inóculos previamente induzidos com arabinose. Após 15 e 30 minutos de tratamento, as células foram centrifugadas a 4000 xg por 5 minutos e ressuspensas em 10 µl de solução salina 0,85% (w/v). Após, 5 µl de cada tratamento foi transferido para uma lâmina e observado sob microscopia.

3. RESULTADOS

3.1 Atividade antimicrobiana do ácido hexanóico em *Xanthomonas*

O ácido hexanóico foi testado para avaliar a sua capacidade de inibir o crescimento de *Xanthomonas citri subsp. citri*. Há uma inibição máxima de 99% na concentração de ~250 ppm, e uma inibição de 96,5% a 125 ppm (figura 1) – inibição próxima a presente no controle positivo com o antibiótico canamicina (20 ppm), em que 95% das células foram inibidas. Em concentrações inferiores, há uma queda acentuada na porcentagem de inibição, passando de 97% em 125 ppm para 57,7% em 100 ppm e 2,5% em 50 ppm. Por conta dessa queda abrupta na inibição uma curva de dose resposta do ácido hexanóico não é clara (figura 2). Apesar disso, com base na curva construída a partir dos valores de fluorescência média do controle negativo e de cada um dos tratamentos, foi possível calcular que a concentração em que 90% das células foram inibidas (IC_{90}) foi de cerca de 124 ppm. Já a concentração em que 50% das células foram inibidas (IC_{50}) foi de aproximadamente 96,3 ppm.

A avaliação do potencial bactericida do ácido hexanóico foi realizada por meio de um ensaio de MBC. É possível observar que após 48 horas de incubação, em concentrações superiores a 250 ppm, não houve crescimento bacteriano (figura 3), da mesma maneira que no controle positivo, demonstrando a ação bactericida do composto.

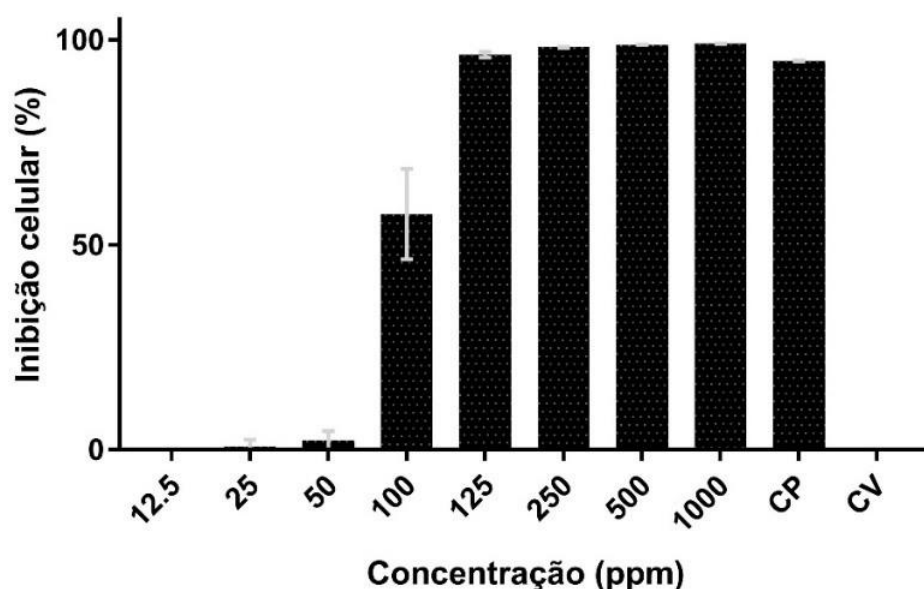


Figura 1: Porcentagem de células de *Xanthomonas citri subsp. citri* inibidas nas diferentes concentrações testadas para o ácido hexanóico. As linhas indicam o desvio padrão entre as triplicatas realizadas e CP representa o controle positivo com

antibiótico canamicina (20 ppm) e o CV representa o controle do veículo feito com água destilada.

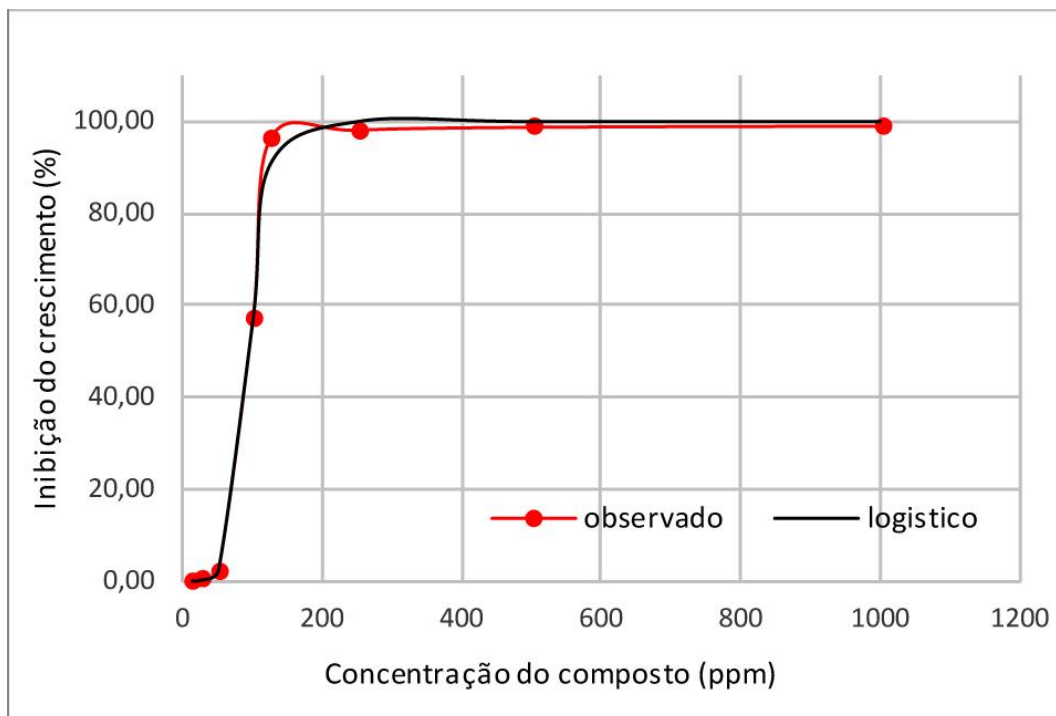


Figura 2: Curva de inibição de crescimento celular nas diferentes concentrações de ácido hexanóico testadas. Para a obtenção dos valores estimados de IC_{50} e IC_{90} foi feita uma adequação da curva de inibição através de uma função logística descrita por: $x = -0.08 \cdot \ln((0,1 \cdot (100 - y)) / (y \cdot 99,9)) - 10$.

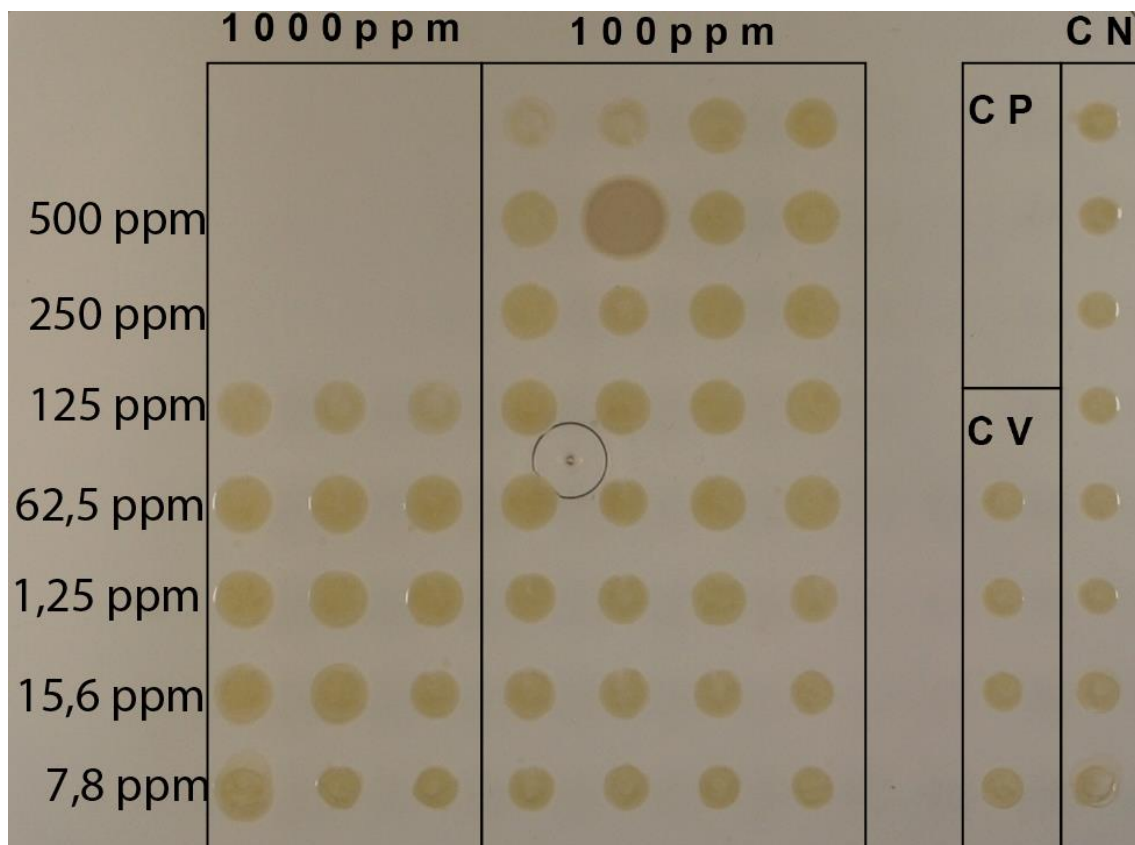


Figura 3: Crescimento das colônias de *Xanthomonas citri subsp. citri* após incubação 48h em duas concentrações iniciais: 1000 e 100 ppm. O Ácido hexanóico foi bactericida a partir de 250 ppm. No MBC é possível observar que não houve nenhum crescimento a partir dos 250ppm, após 48h de incubação.

3.2 Fitotoxicidade do ácido hexanóico em sementes de alface

Sementes tratadas com o ácido hexanóico não foram significativamente afetadas quanto ao número de sementes germinadas em comparação ao controle negativo até concentrações próxima de 300 ppm (figura 4). Entretanto, uma redução no índice de germinação passou a ser observada em concentrações maiores que 300 ppm. Tal fato se deve a uma redução no comprimento final das radículas das sementes.

Já em concentrações maiores (a partir de 400 ppm), o composto passa a interferir não somente no comprimento final da radícula, mas também na capacidade de germinação da semente, o que é evidenciado pela drástica diminuição no índice de germinação (figura 4). Sendo assim, em concentrações próximas a bactericida (250 ppm) e bacteriostática (125 ppm), o ácido hexanóico apresentou baixa fitotoxicidade. (figura 4).

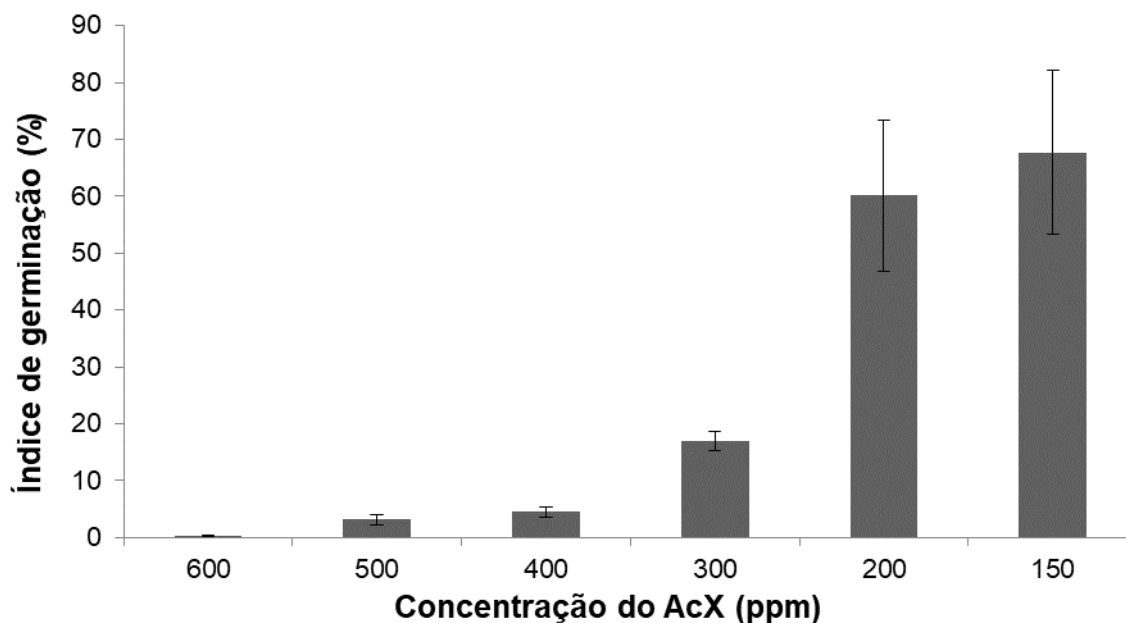


Figura 4: Índice de germinação para as sementes de alface (*Lactuca sativa*) tratadas com ácido hexanóico em diferentes concentrações, em que as linhas representam o desvio padrão entre as réplicas técnicas.

3.3 Definição da dose de segurança

Um teste de indução de resistência foi realizado para se definir uma dose de segurança para aplicação do composto em plantas. Bactérias foram expostas ao ácido a partir de dose sub-letal ($1/8$ da IC_{90}) e ao crescerem nesta dose, amostras são utilizadas como inóculo para iniciar cultivos com dose dobrada do composto ($1/4 > 1/2 > \text{etc.}$). Em passagens subsequentes, e com doses cada vez maiores, pode haver indução de resistência ao composto refletida por vezes em alterações no DNA. Nestes ensaios, verificamos que o crescimento bacteriano ocorreu normalmente até a dose de 124 ppm (figura 5, $1 \times IC$; concentração definida como IC_{90}). O desenvolvimento bacteriano até este ponto demonstra que a exposição crescente ao ácido pode estar induzindo adaptação, uma vez que, em ensaios anteriores, esta dose promoveu inibição de crescimento se ministrada diretamente às células (vide figura 1). Note ainda que observamos crescimento a 250 ppm (figura 5, $2 \times IC_{90}$), dose está definida anteriormente como bactericida. Isso evidência uma adaptação/tolerância de *X. citri* ao composto, quando exposta a dose crescentes e a partir de uma concentração sub-letal. Finalmente, com o tratamento de três vezes a IC_{90} , as células não foram mais

capazes de se multiplicar (figura 5). Desta forma, a concentração de 400 ppm foi definida como a dose de segurança para os testes em planta.

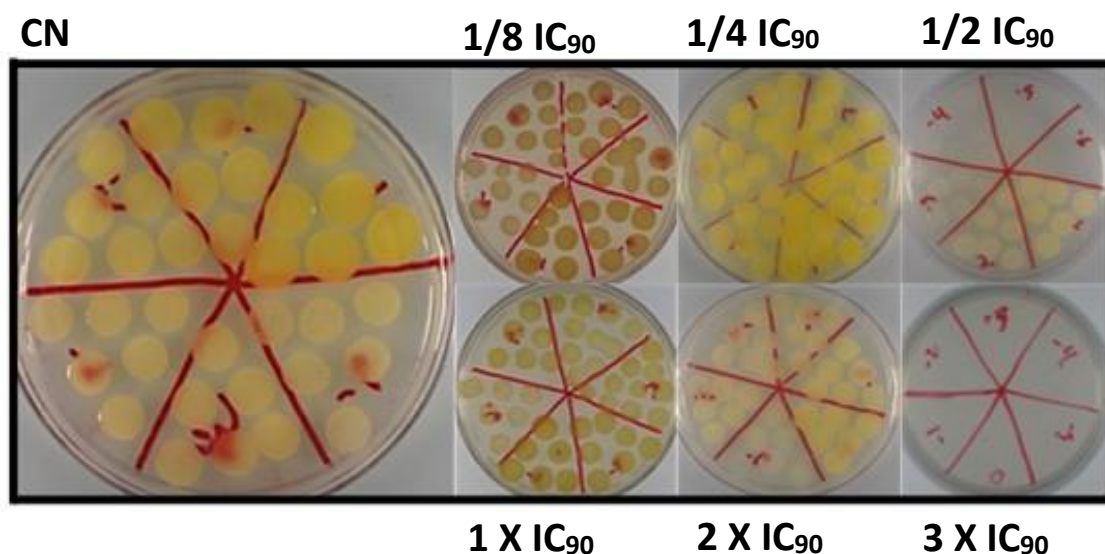


Figura 5: Crescimento celular da *Xanthomonas* ao ser tratada com diferentes concentrações do ácido hexanóico para avaliar a resistência/persistência e definição da dose de segurança e controle negativo (CN), sem qualquer tipo de tratamento.

3.4 Ácido hexanóico não altera morfologia celular

Na análise morfológica por contraste de fase foi observado um comprimento celular médio no controle negativo de 1,54 μm e 1,50 μm nos tempos de 15 e 30 minutos respectivamente (figura 6). Após tratamento com o ácido hexanóico na concentração da IC_{90} , foi observado um comprimento celular médio de 1,41 μm no tratamento de 15 minutos de contato e 1,23 μm no tratamento de 30 minutos, não demonstrando uma alteração significativa no comprimento e que pudesse sugerir alteração ou retardo de divisão celular (figura 6). Além disso, características morfológicas como alongamento celular exagerado (dobrar de tamanho), células ainda ligadas (sem divisão completa), e que poderiam indicar erros de divisão e/ou segregação cromossômica, não foram observados em nenhum dos tratamentos. Em suma, células tratadas com o ácido apresentaram morfologia e tamanho equivalentes às células normais (figura 7).

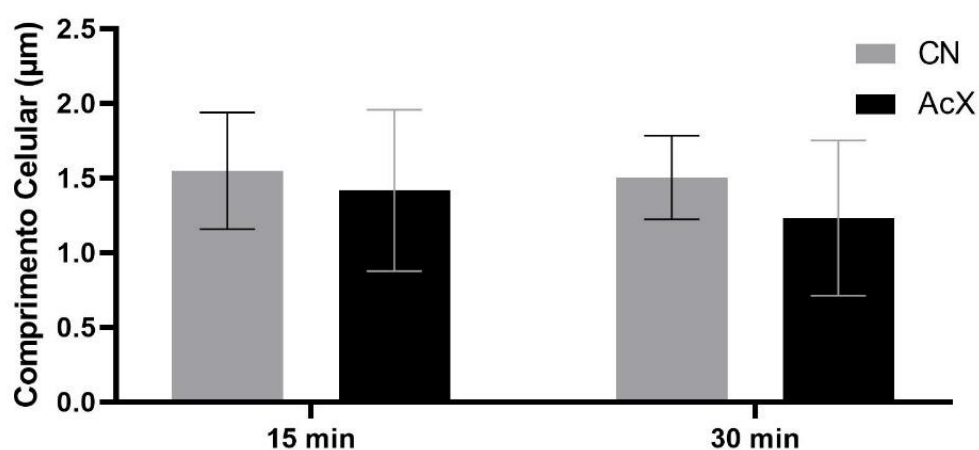


Figura 6: Comprimento médio das células (μm) de *Xanthomonas citri subsp. citri* no tratamento com IC₉₀ (AcX) e WT – sem tratamento. O desvio padrão indicado pelas barras verticais. Os tempos de contato com o composto foram de 15 e 30 minutos. (n=100 células).

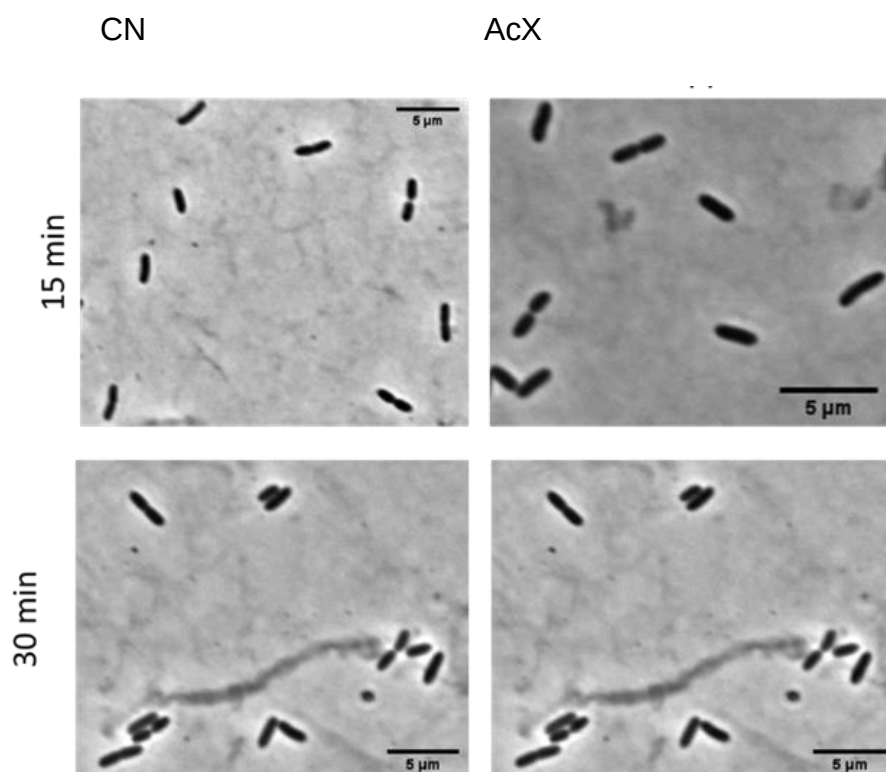


Figura 7: Morfologia celular de *Xanthomonas citri subsp. citri* após tratamento de 15 e 30 minutos em contato com o composto na concentração definida como IC₉₀ (AcX). O controle negativo (CN) não recebeu qualquer tipo de tratamento (n=100 células). Aumento 100x.

3.5 Ácido hexanóico não altera integridade da membrana celular de *X. citri*

X. citri foi exposta ao ácido e posteriormente tratada com os corantes para ácidos nucleicos DAPI e iodeto de propídio (IP). DAPI penetra membrana de células integras, enquanto IP somente células com membrana corrompida, sendo este último, um marcador para comprometimento de membranas. Ao avaliarmos permeabilidade a IP em células não tratadas (figura 8, controle negativo – CN) observamos uma permeabilidade basal entre 10-37% (células integras variando de 88,47% e 62,59%, respectivamente, nos tempos 15 e 30 min pós-avaliação). Permeabilidade neste caso se deve, provavelmente, a background de manipulação, tendo em vista que durante a coloração há passos diversos de lavagens. Entretanto, a maioria das células possuem morfologia padrão pós-coloração (figura 9 e 10; CN: azul é a representação artificial para DAPI e vermelho para IP). Como controle positivo para permeabilidade (CP), células foram mantidas em estufa à 45°C (SAVIETTO *et al.*, 2018), onde observamos um aumento de células coradas por IP para 70 - 87% (células integras variando de 32,2% e 13,23%, respectivamente) (figura 8 e 10, CP). Já para o tratamento feito com o ácido hexanóico - AcX a IC₉₀, as porcentagens de células com a membrana não permeabilizada nos tempos de 15 e 30 minutos foi de 82,19% e 65,8%, respectivamente, e bem semelhante ao observado para o controle negativo (figura 8 e 10, AcX). Células tratadas com o ácido hexanóico também não apresentaram nenhuma perturbação detectável na organização do nucleóide bacteriano, sendo praticamente idênticas ao controle sem tratamento. Aplicando-se ANOVA, verificamos que não houve diferença significativa entre os valores das células tratadas com o ácido hexanóico e do CN, demonstrando que o composto não perturba a membrana celular (figura 8 e 10).

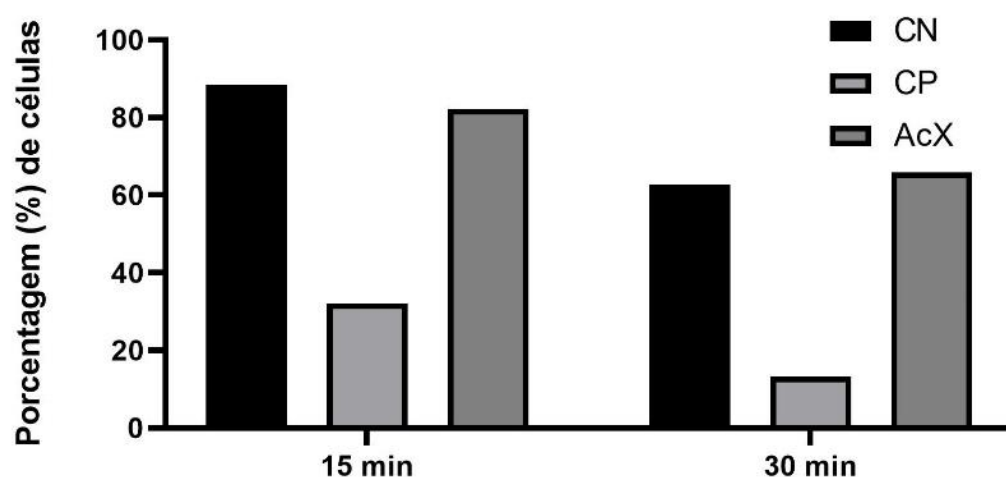


Figura 8: Porcentagem média de células (n=200) com a membrana não permeabilizada nos tratamentos controle negativo - sem qualquer tratamento (CN), controle positivo tratado em estufa a 45°C (CP) e ácido hexanóico AcX (IC₉₀), nos tempos de 15 e 30 minutos de tratamento.

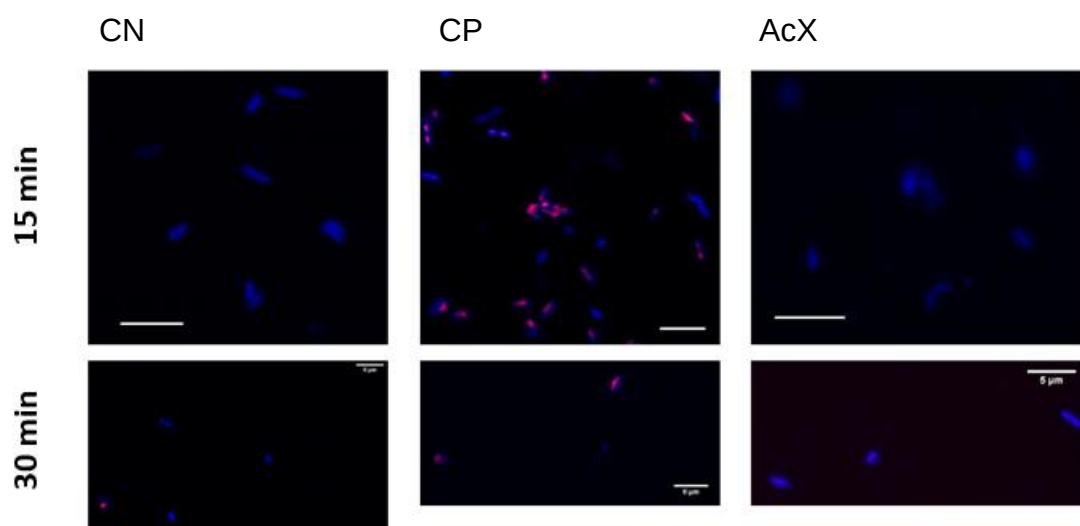


Figura 9: Microscopia de fluorescência: CN - Controle negativo, células sem tratamento; CP - Controle positivo, células tratadas a 45°C; AcX - tratamento com Ácido Hexanóico (IC₉₀). As células foram coradas com DAPI e IP e observadas sob os filtros DAPI e TxRED. Células em azul (DAPI) apresentam membrana intacta e células em vermelho (IP) apresentam a membrana permeabilizada. Aumento = 100X, n = 200 células e escala 5 μm.

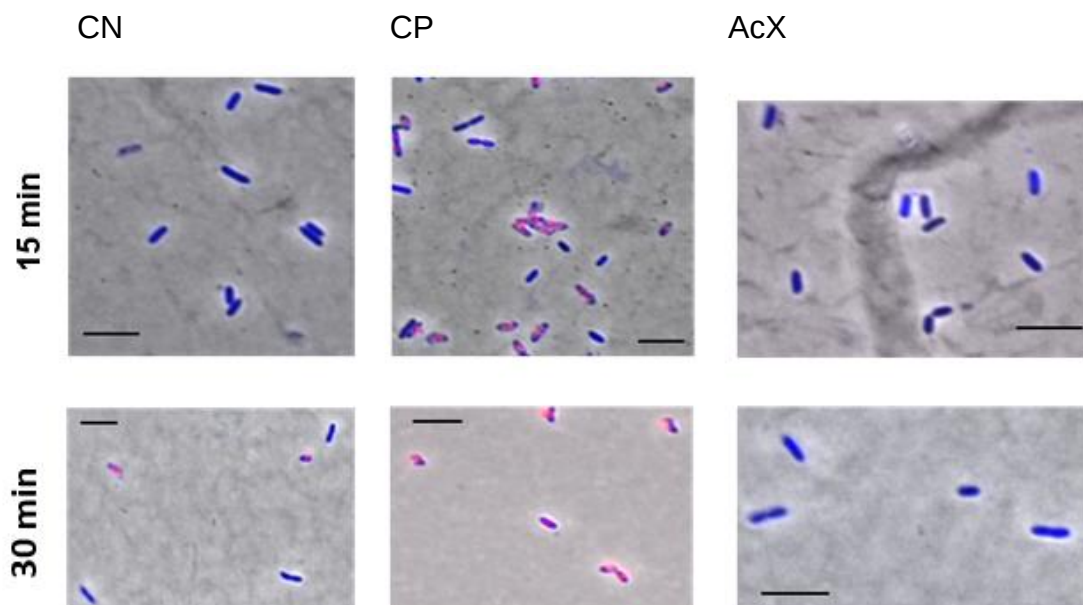


Figura 10: Microscopia de fluorescência e contraste de fase: CN - Controle negativo, células sem tratamento; CP - Controle positivo células tratadas a 45°C; AcX - tratamento com Ácido Hexanóico (IC₉₀). As células foram coradas com DAPI e IP e observadas sob os filtros DAPI e TxRED e fundo em PH100. Células em azul (DAPI) apresentam membrana intacta e células em vermelho (IP) apresentam a membrana permeabilizada. Aumento = 100X, n = 200 células e escala = 5µm.

3.6 Microscopia para septo de divisão

Neste ensaio, submetemos o mutante *X. citri amy::pPM2a-zapA* ao ácido e imediatamente após o tratamento, células foram observadas ao microscópio para averiguarmos presença ou ausência de septo divisional (Silva *et al.*, 2013). Neste mutante, células não tratadas apresentam septo como barra perpendicular ao eixo longitudinal do bastonete no momento da divisão, pois expressam proteína fluorescente GFP-ZapA que se liga ao anel-Z (MARTINS *et al.*, 2010) (figura 11 e 12, setas). Ao tratarmos estas células com galato de hexila (controle positivo) (Silva *et al.*, 2013), vemos a completa dissolução dos septos de divisão e a dispersão da fluorescência de GFP-ZapA pelo citoplasma das células (figura 11 e 12, CP). Contudo, para o ácido hexanóico na concentração IC₉₀, não houve inibição da formação do septo de divisão (figura 9 e 10, AcX). Isto demonstra que muito provavelmente o mecanismo de ação do composto não está diretamente relacionado a divisão celular.

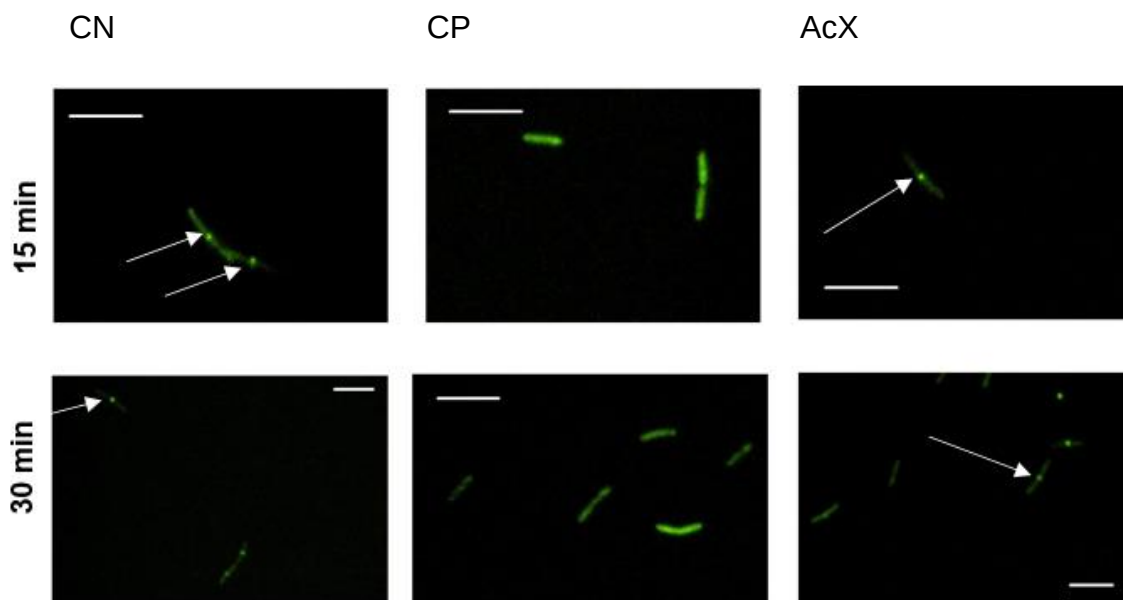


Figura 11: Microscopia de fluorescência com mutante *Xac amy:pPM2a-zapA*: CN - Controle negativo, células sem tratamento; CP - Controle positivo células tratadas com galato de hexila (IC_{90}); AcX - tratamento com ácido hexanóico (IC_{90}). As células foram induzidas com arabinose (0,001%) e observadas sob o filtro GFP. Setas indicam septo de divisão. Aumento = 100X, $n = 200$ células e escala = $5\mu m$.

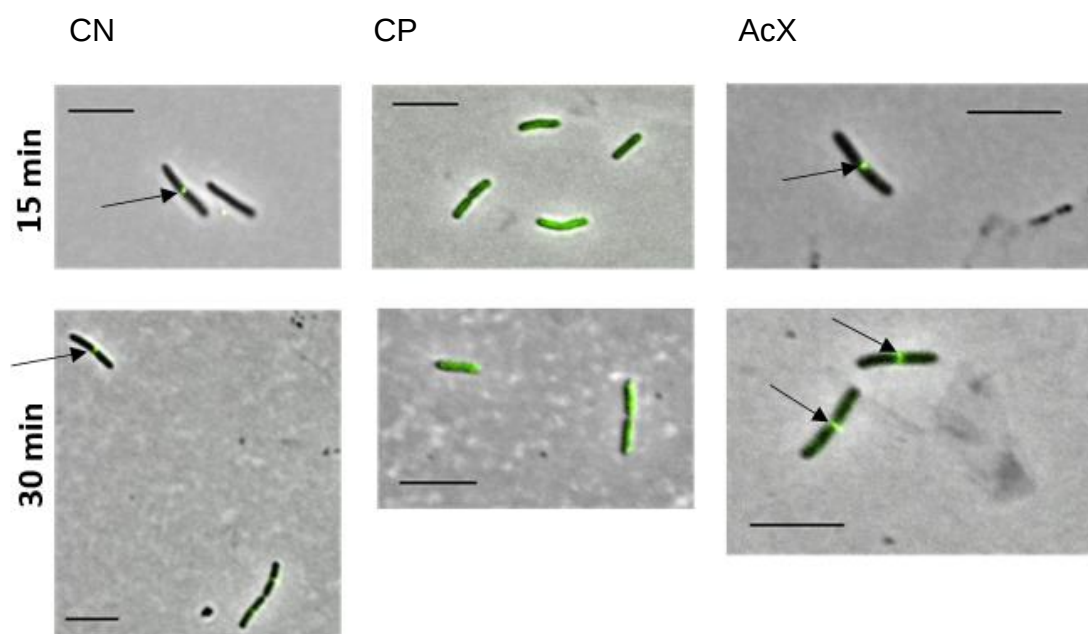


Figura 12: Microscopia de fluorescência e contraste de fase com mutante *Xac amy:pPM2a-zapA*: CN - Controle negativo, células sem tratamento; CP - Controle positivo células tratadas com Galato de Hexila (IC_{90}); AcX - tratamento com Ácido Hexanóico (IC_{90}). As células foram induzidas com arabinose (0,001%) e observadas sob o filtro GFP e fundo em PH100. Setas indicam septo de divisão. Aumento = 100X, $n = 200$ células e escala = $5\mu m$.

3.7 Ácido hexanóico apresentou potencial protetivo *in planta*

A habilidade de *Xanthomonas citri* de causar infecções está diretamente ligada com sua capacidade de colonizar o hospedeiro citros. Primeiramente, avaliamos se células de *Xanthomonas* previamente expostas ao ácido hexanóico seriam capazes de provocar infecção utilizando teste de infiltração (figura 13). Células foram tratadas com ácido na dose de segurança determinada acima e subsequentemente infiltradas em folhas de laranjeira. Nestas análises, observamos a formação de lesões amarronzadas na superfície foliar de ambos os tratamentos (CP e AcX), coalescentes pela dose de células infiltradas. Já para o controle negativo (CN, salina) não houve aparecimento de lesões. Tais resultados mostram que a exposição ao ácido hexanóico na concentração de 400 ppm não foi capaz de reduzir a carga bacteriana de *X. citri* suficientemente para evitar a indução de sintomas. Em adição, o ácido não foi capaz de induzir alterações nas células de forma a torná-las incapazes de produzir sintomas de cancro cítrico.

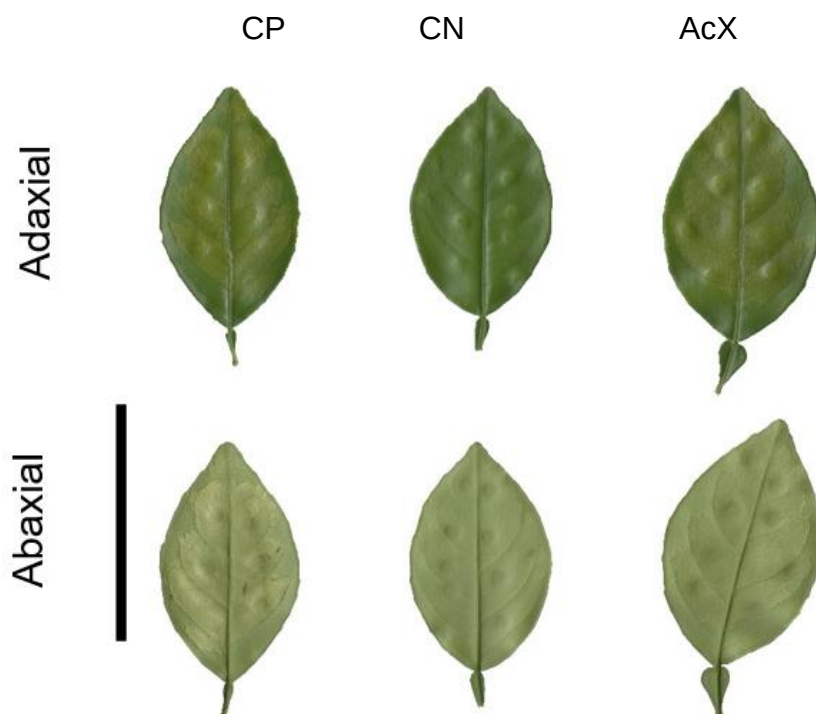


Figura 13: Infiltração em folhas de laranjeira: CP - Controle positivo - sem tratamento; CN – folhas tratadas com solução salina 0,85% (w/v); AcX - tratamento com Ácido Hexanóico (400ppm). As folhas foram infiltradas na região abaxial com seringa sem agulha, com os tratamentos (0,5 ml/ folha). O desenvolvimento de sintomas foi observado por 7 dias. Escala 5 cm.

Na sequência, avaliamos se haveria proteção contra infecção em plantas que foram previamente tratadas com ácido hexanóico na dose de segurança (concentração de 400 ppm). Plantas foram aspergidas com o ácido e 24h depois, inoculadas também por aspersão com *X. citri*. Vemos aqui que plantas tratadas com o ácido apresentaram uma menor incidência de lesões por área de folha sintomática (figuras 14 e 15, AcX). Note que o ácido promoveu proteção significativa, se comparado ao controle, e bem próxima da proteção exercida por Difere (formulação comercial a base de cobre normalmente utilizada em proteção de citros). Folhas tratadas com o ácido hexanóico apresentaram uma redução no número de lesões por área foliar, com média de 1,6 lesões por cm², enquanto o controle apresentou uma incidência de 5,1 lesões por cm² e o difere com média de 0,6 lesões por cm². Análise estatística (ANOVA) aplicada aos dados demonstra diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos AcX e controle negativo, como também entre o controle e o Difere, demonstrando assim, que o ácido hexanóico em concentração de 400 ppm apresenta um potencial protetivo contra *Xanthomonas*.

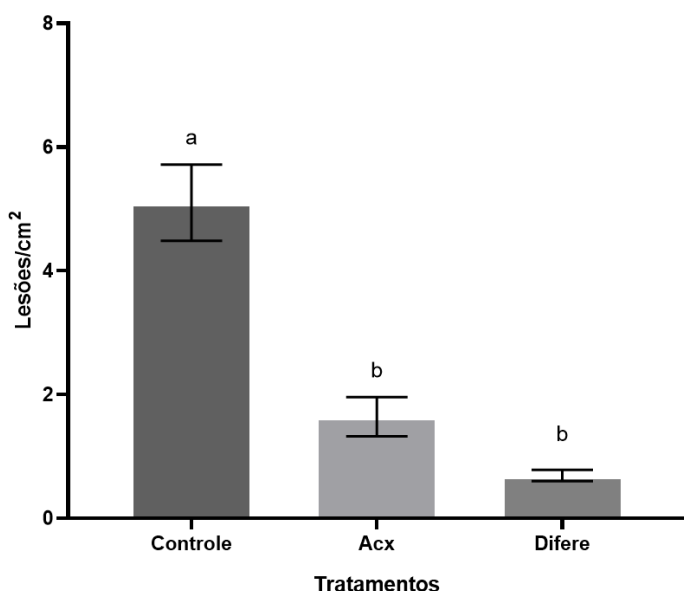


Figura 14: Média de lesões por folha sintomática em diferentes tratamentos: Controle – livre de qualquer tratamento, AcX – folhas tratadas com ácido hexanóico (400 ppm) e Difere – folhas tratadas com oxicleto de cobre (600µg·mL⁻¹). Linhas verticais representam o erro padrão. Letras representam diferença estatística somente entre o controle e o AcX e entre o Difere e o controle ($p < 0,05$).

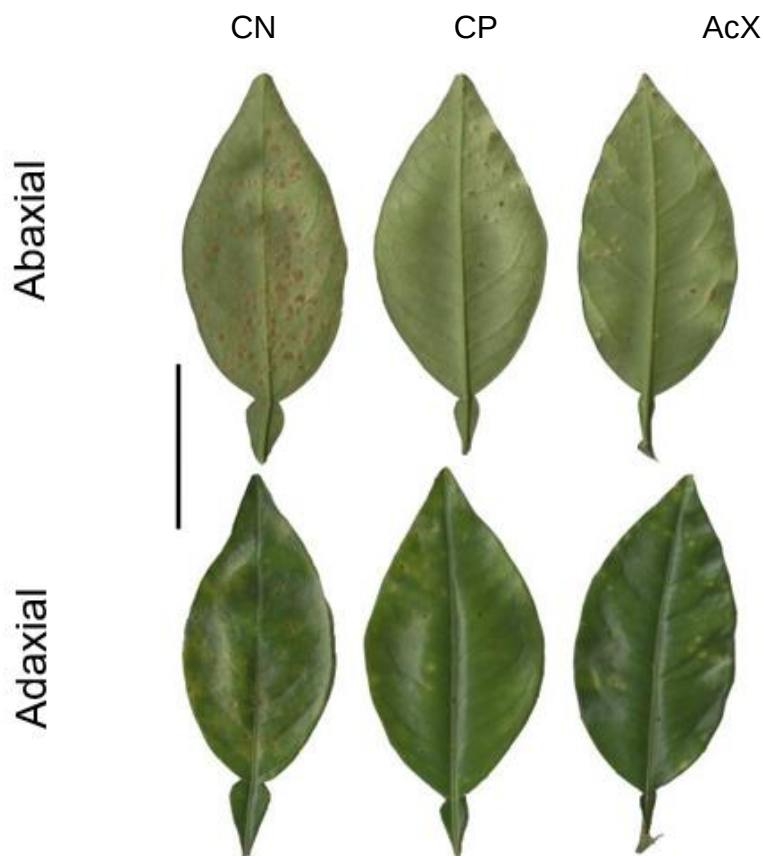


Figura 15: Aspersão em folhas de laranjeira: CN - Controle negativo, folhas sem tratamento; CP - Controle positivo - folhas tratadas com Difere ($600\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); AcX - tratamento com Ácido Hexanóico (400ppm). As folhas foram aspergidas com os tratamentos e 24 horas após aspergidas com suspensão de 10^8 células· mL^{-1} . O desenvolvimento de sintomas foi acompanhado por 30 dias. Escala – 5 cm

4. DISCUSSÃO

O ácido hexanóico é um ácido orgânico natural, que pode ser produzido por diversas plantas (ZABETAKIS *et al.*, 2000). A ação antimicrobiana do ácido hexanóico já havia sido demonstrada para alguns microrganismos como *Pseudomonas syringae* e *Xanthomonas citri*, em diferentes sistemas vegetais como *Arabidopsis thaliana* e espécies cítricas, respectivamente (KRAVCHUK *et al.*, 2011; SCALSCHI *et al.*, 2013; CAMANES *et al.*, 2015; LLORENS *et al.*, 2015).

O controle de diversos fitopatógenos como a *Xanthomonas* é feito com uso de produtos à base de cobre diretamente sobre as plantas de interesse (BEHLAU *et al.*, 2017). O aumento na utilização dessas formulações pode acarretar em uma maior fitotoxicidade. O uso do cobre pode acarretar na contaminação tanto do solo como também a água. Além disso, a aplicação frequente pode levar ao desenvolvimento de

linhagens resistentes, aumentando assim os custos de manejo do fitopatógeno (BEHLAU *et al.*, 2011). Na busca por alternativas, o ácido hexanóico se mostrou uma possível opção a longo prazo para o uso das soluções de cobre.

O ácido hexanóico em concentração de 250 ppm, ao ser avaliado em teste de MBC impediu o crescimento de *Xanthomonas citri*. Segundo Llorens *et al.* (2015), o ácido hexanóico mostrou atividade bacteriostática em testes *in vitro* na concentração de 0,6 mM (70 ppm). Nossos dados, desta forma, corroboram os resultados anteriormente descritos e reforçam a utilização deste ácido contra *X. citri*.

Ao ser avaliada a possibilidade de células de *Xanthomonas* adquirirem resistência ao composto, observamos crescimento bacteriano em concentrações de até 2 vezes a IC₉₀ aqui determinada (~250 ppm). Desta forma, definimos a dose de segurança para utilização do composto em 400 ppm.

O ácido hexanóico é um composto que apresenta uma baixa toxicidade em laranjeiras (LLORENS *et al.*, 2015). O ácido hexanóico, em nossos testes, em concentração de 150 e 200 ppm apresentou uma baixa fitotoxicidade. Entretanto, apresentou interferência não somente no comprimento final da radícula como no número de sementes que germinavam de *Lactuca sativa* em concentrações superiores a 300 ppm. Uma explicação para uma maior toxicidade do ácido em sementes de *Lactuca sativa*, se comparado as laranjeiras, se deve ao fato das sementes de *Lactuca sativa* serem mais sensíveis e, portanto, utilizadas para testes de fitotoxicidade.

Em folhas de *Citrus sinensis* infiltradas com células previamente tratadas, houve formação de lesões de cancro cítrico semelhantes as observadas no controle negativo. Uma explicação para o ocorrido pode ser que o tempo de tratamento no teste de infiltração foi 3 vezes menor que no teste de indução de resistência (12 horas para indução de resistência/dose de segurança e 4 horas para o teste de infiltração).

A redução no tempo de tratamento pode ter proporcionado sobra de células infectivas que induziram sintomas de cancro.

A baixa toxicidade e o potencial protetivo do ácido hexanóico apontados por Graham *et al.* (2015) estão de acordo com os resultados encontrados nesse projeto. Plantas que foram previamente aspergidas com ácido hexanóico em concentração de

400 ppm, não apresentaram danos as suas folhas. E em condição de estufa, o ácido hexanóico foi capaz de reduzir significativamente a incidência de lesões foliares.

A proteção pode ser ocasionada pela ativação de algumas rotas metabólicas ligadas a produção de compostos que diminuiriam a susceptibilidade a infecções causadas pelo fitopatógeno (LORENS *et al.*, 2015).

Por fim, realizamos análises morfológicas por técnicas de microscopia para tentar avaliar possíveis mecanismos de ação do composto. Aqui, não foi observada nenhuma alteração morfológica significativa como filamentos, células anucleadas e minicélulas (LORENZONI *et al.*, 2017). Com relação a integridade da membrana celular, também não foi detectada nenhuma perturbação significativa, como permeabilidade a IP, em concentrações inibitórias do ácido. Com relação a divisão celular e formação de septo de divisão, *X. citri* ao ser tratada com o composto, da mesma maneira que o controle (CN), não deixou de formar septo de divisão, indicando que possivelmente a ação do ácido hexanóico não está diretamente relacionado a formação do septo de divisão e a divisão celular. Assim, a inibição de crescimento de *X. citri* ocasionada pelo ácido hexanóico não está relacionada com nenhum dos processos essenciais avaliados no presente estudo.

5. REFERÊNCIAS

- ARANEGA-BOU, P.; LEYVA, M.; FINITI, I.; GARCIA-AGUSTIN, P.; GONZÁLEZ-BOSCH, C. Priming of plant resistance by natural compounds. Hexanoic acid as a model. **Front Plant Sci**, 5, p. 488, 2014.
- BEHLAU, F.; HONG, J. C.; JONES, J. B.; GRAHAM, J. H. Evidence for acquisition of copper resistance genes from different sources in citrus-associated xanthomonads. **Phytopathology**, 103, n. 5, p. 409-418, Maio 2013.
- BEHLAU, F.; SCANDELAI, L. H. M.; DA SILVA JUNIOR, G. J.; LANZA, F. E. Soluble and insoluble copper formulations and metallic copper rate for control of citrus canker on sweet orange trees. **Crop Protection**, 94, p. 185-191, 2017.
- BRUNETTO, G.; BASTOS DE MELO, G. W.; TERZANO, R.; DEL BUONO, D.; ASTOLFI, S.; TOMASI, N.; PII, Y.; MIMMO, .; CESCO, S. Copper accumulation in vineyard soils: Rhizosphere processes and agronomic practices to limit its toxicity. **Chemosphere**, 162, p. 293-307, Novembro 2016.
- BRUNINGS, A. M.; GABRIEL, D. W. Xanthomonas citri: breaking the surface. **Mol Plant Pathol**, 4, n. 3, p. 141-157, Maio 1 2003.
- CAMANES, G.; SCALSCHI, L.; VICEDO, B.; GONZALEZ-BOSCH, C.; GARCÍA-AUGUSTIN, P. An untargeted global metabolomic analysis reveals the biochemical changes underlying basal resistance and priming in Solanum lycopersicum, and identifies 1-methyltryptophan as a metabolite involved in plant responses to Botrytis cinerea and Pseudomonas syringae. **Plant J**, 84, n. 1, p. 125-139, Outubro 2015.
- CANTEROS, B. I. Copper resistance in Xanthomonas campestris pv. citri. In Plant pathogenic bacteria. **Proceedings of the International Society of Bacteriology, Centre for Advanced Study in Botany, A. Mahadevan, ed. (Chennai, India: University of Madras)**, p. 455-459, 1999.
- CORNU, J. Y.; HUGUENOT, D.; JEZEQUEL, K.; LOLLIER, M.; LEBEAU, T. Bioremediation of copper-contaminated soils by bacteria. **World J Microbiol Biotechnol**, 33, n. 2, p. 26, Fevereiro 2017.
- REFERENCE, C. M.; GOCHEZ, A. M.; BEHLAU, F.; WANG, N.; GRAHAM, J. H. Recent advances in the understanding of Xanthomonas citri ssp. citri pathogenesis and citrus canker disease management. **Mol Plant Pathol**, 19, n. 6, p. 1302-1318, Junho 2018.
- FINITI, I.; DE LA, O. L. M.; VICEDO, B.; GOMEZ-PASTOR, R.; LOPEZ-CRUZ, J.; GARCIA-AUGUSTIN, P.; REAL, M. D.; GONZALEZ-BOSCH, C. Hexanoic acid protects tomato plants against Botrytis cinerea by priming defence responses and reducing oxidative stress. **Mol Plant Pathol**, 15, n. 6, p. 550-562, Agosto 2014.
- FONES, H.; PRESTON, G. M. The impact of transition metals on bacterial plant disease. **FEMS Microbiol Rev**, 37, n. 4, p. 495-519, Julho 2013.
- FUNDECITRUS, **Fundo de Defesa da Citricultura**. Disponível em: <<https://www.fundecitrus.com.br/index.php/pes/estimativa>>. Acesso em 11/05/2021
- FUNDECITRUS, **REESTIMATIVA DA SAFRA DE LARANJA 2020/21 DO CINTURÃO CITRÍCOLA DE SÃO PAULO E TRIÂNGULO/SUDOESTE MINEIRO - FECHAMENTO EM ABRIL/2021**. Disponível em:

<https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/0421_Fechamento_da_Safra_de_Laranja.pdf>. Acesso em 11/05/2021

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; SCHUBERT, T. S. Citrus Canker: The Pathogen and Its Impact. **Plant Health Progress**, 3, n. 1, 2002.

JUNIOR, J. B. J. W. C. D. J. CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO E MÉTODO DE INOCULAÇÃO DE XANTHOMONAS AXONOPODIS PV. CITRI. 2006.

KRAVCHUK, Z.; VICEDO, B.; FLORS, V.; CAMANES, G.; GONZALEZ-BOSCH, C.; GARCIA-AUGUSTIN, P. Priming for JA-dependent defenses using hexanoic acid is an effective mechanism to protect Arabidopsis against B. cinerea. **J Plant Physiol**, 168, n. 4, p. 359-366, Março 2011.

LANZA, F. E.; MARTI, W.; SILVA, G. J., Jr.; BEHLAU, F. Characteristics of Citrus Canker Lesions Associated with Premature Drop of Sweet Orange Fruit. **Phytopathology**, 109, n. 1, p. 44-51, Janeiro 2019.

LEYVA, M. O.; VICEDO, B.; FINITI, I.; FLORS, V.; DEL AMO, G.; REAL, M.D.; GARCÍA-AUGUSTÍN, P.; GONZÁLEZ-BOSCH, C. Preventive and post-infection control of Botrytis cinerea in tomato plants by hexanoic acid. **Plant Pathology**, 57, n. 6, p. 1038-1046, 2008.

LORENZONI, A. S. G.; DANTAS, G. C.; BERGSMA, T.; FERREIRA, H. et al. Xanthomonas citri MinC Oscillates from Pole to Pole to Ensure Proper Cell Division and Shape. **Front Microbiol**, 8, p. 1352, 2017.

LLORENS, E.; CAMANES, G.; LAPENA, L.; GARCIA-AGUSTIN, P. Priming by Hexanoic Acid Induce Activation of Mevalonic and Linolenic Pathways and Promotes the Emission of Plant Volatiles. **Front Plant Sci**, 7, p. 495, 2016.

LLORENS, E.; VICEDO, B.; LÓPEZ, M. M.; LAPEÑA, L.; GRAHAM, J. H.; GARCÍA-AUGUSTÍN, P. Induced resistance in sweet orange against Xanthomonas citri subsp. citri by hexanoic acid. **Crop Protection**, 74, p. 77-84, 2015.

MARCONE C.M. CHAGAS, J. R. P. P., NAMEKATA, T.; HARTUNG, J. S.; YAMAMOTO, P. T. Phyllocnistis citrella Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) and Its Relationship with the Citrus Canker Bacterium Xanthomonas axonopodis pv citri in Brazil. **Neotropical Entomology**, 30, p. 55-59, 2001.

MARTINS, P. M.; LAU, I. F.; BACCI, M.; BELASQUE, J.; AMARAL, A. M.; FERREIRA, H. Subcellular localization of proteins labeled with GFP in Xanthomonas citri ssp. citri: targeting the division septum. **FEMS Microbiol Lett**, 310, n. 1, p. 76-83, Sep 1 2010.

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

NEVES, M. F. **O retrato da citricultura Brasileira**. 2010.

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**, 31, n. 9, p. 2387-2401, Setembro 2014.

PEH, E.; KITTLER, S.; REICH, F.; KEHRENBURG, C. Antimicrobial activity of organic acids against *Campylobacter* spp. and development of combinations—A synergistic effect?. **Plos one**, v. 15, n. 9, p. e0239312, 2020.

POLAQUINI, C. R.; MORAO, L. G.; NAZARE, A. C.; TORREZAN, G. S.; DILLARI, G.; CAVALA, L. B.; CAMPOS, D. L.; SILVA, I. C.; PEREIRA, J. A.; SCHEFFERS, D. J.; DYQUE, C.; PAVAN, F. R.; FERREIRA, H.; REGASINI, L. O. Antibacterial activity of 3,3'-dihydroxycurcumin (DHC) is associated with membrane perturbation. **Bioorg Chem**, 90, p. 103031, Setembro 2019.

São Paulo (Estado). **Resolução da Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SAA)** nº 37, de 2 de Maio de 2016. Diário Oficial do Estado de São Paulo, 6 de Março de 2017, Seção 1. p. 31.

SCALSCHI, L.; VICEDO, B.; CAMANES, G.; FERNANDEZ-CRESPO, E.; LAPENA, L.; GONZALES-BOSCH, C.; GARCIA-AUGUSTIN, P. Hexanoic acid is a resistance inducer that protects tomato plants against *Pseudomonas syringae* by priming the jasmonic acid and salicylic acid pathways. **Mol Plant Pathol**, 14, n. 4, p. 342-355, Maio 2013.

SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P. E.; STROMBERG, V. K.; VIDADER, A. K. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Syst Appl Microbiol**, 29, n. 8, p. 690-695, Dezembro 2006.

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**, 195, n. 1, p. 85-94, Janeiro 2013.

SUMARES, J. A.; MORAO, L. G.; 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**, 5, n. 2, p. 244-253, Abril 2016.

SUNDIN, G. W., Jones, A. L., Fulbright, D. W. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* pv *syringae* from cherry orchards and its associated transfer in vitro and in planta with a plasmid. **Phytopathology**, 79, p. 861-865, 1989.

VICEDO, B.; DE LA, O. L. M.; FLORS, V.; FINITI, I.; DEL. AMO, G.; WALTERS, D.; REAL, M. D.; GARCIA-AUGUSTIN, P.; GONZALES-BOSH, C. Control of the phytopathogen *Botrytis cinerea* using adipic acid monoethyl ester. **Arch Microbiol**, 184, n. 5, p. 316-326, Janeiro 2006.