



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – MICROBIOLOGIA
APLICADA

PROTEÇÃO DE CITROS COM PEPTÍDEOS ANTIBACTERIANOS E GALATOS

GUILHERME DILARRI

Rio Claro – SP
2021

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – MICROBIOLOGIA
APLICADA**

PROTEÇÃO DE CITROS COM PEPTÍDEOS ANTIBACTERIANOS E GALATOS

GUILHERME DILARRI

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Ferreira
Co-orientador: Prof. Dr. Luis Octávio Regasini

**Rio Claro – SP
2021**

D576p Dilarri, Guilherme
Proteção de citros com peptídeos antibacterianos e galatos :
proteção de citros com peptídeos antibacterianos e galatos /
Guilherme Dilarri. -- Rio Claro, 2021
112 p. : il., tabs., fotos, mapas

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

1. Microorganismos fitopatogênicos. 2. Cancro cítrico. 3.
Defensivos agrícolas. 4. Peptídeos. 5. Microgéis. 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.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: PROTEÇÃO DE CITROS COM PEPTÍDEOS ANTIBACTERIANOS E GALATOS

AUTOR: GUILHERME DILARRI

ORIENTADOR: HENRIQUE FERREIRA

COORIENTADOR: LUIS OCTÁVIO REGASINI

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

Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro



Prof. Dr. JESUS APARECIDO FERRO (Participação Virtual)
Departamento de Tecnologia / UNESP - Jaboticabal



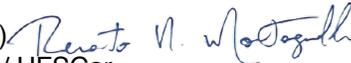
Prof. Dr. MARCO AURÉLIO TAKITA (Participação Virtual)
Departamento de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação / Instituto Agrônomo (IAC)



Prof. Dr. HELVÉCIO DELLA COLETTA FILHO (Participação Virtual)
Centro APTA Citros Sylvio Moreira / Instituto Agrônomo de Campinas – IAC



Prof. Dr. RENATO NALLIN MONTAGNOLLI (Participação Virtual)
Departamento de Ciências da Natureza, Matemática e Educação / UFSCar



Rio Claro, 20 de dezembro de 2021

DEDICATÓRIA

Gostaria de dedicar este trabalho à minha esposa Carolina Rosai Mendes. Ao seu lado eu aprendi a gostar mais de mim e do mundo... Aprendi a ter esperança e persistência. Hoje sem nenhum arrependimento dos desencontros que a vida nos deu, tenho certeza que ela estava juntando você e eu. Ainda bem que você me encontrou no seu jardim próximo a um urucuzeiro.

Eu amo você!

AGRADECIMENTOS

- Agradeço primeiramente a minha esposa Carolina Rosai Mendes, pelo apoio, companheirismo e amor durante toda essa minha jornada.
- Aos meus avôs Miguel Dilarri e Hilda B. Dilarri, pais Edson L. Dilarri e Therezinha P. Q. Dilarri, sogros Antônio Eduardo W. Mendes e Paula R. W. Mendes, que me apoiaram e incentivaram a todo momento.
- Aos meus amigos e técnicos do Departamento de Biologia Geral e Aplicada da UNESP de Rio Claro, pela ajuda e suporte durante as realizações dos meus experimentos ao longo do meu doutorado.
- Aos meus colegas do Laboratório de Genética de Bactérias, especialmente ao Caio F. C. Zamuner e Mário N. Caccalano que participaram e me ajudaram em diversos experimentos e trabalhos.
- A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento fornecido através da bolsa de doutorado FAPESP 2017/07306-9 e doutorado sanduíche FAPESP-BEPE 2018/23306-1. Sem o apoio da FAPESP esse trabalho e todas as publicações e resultados derivados dele não existiriam. Meu sincero agradecimento.
- Aos Professores Ederio D. Bidoia, Renato N. Montagnolli, Paulo R. M. Lopes e Maurício Bacci Júnior, pela colaboração e parceria em diversos experimentos e trabalhos ao longo deste doutorado.
- A FUNDECITRUS, especialmente ao Dr. Franklin Behlau, pelo apoio e colaboração em várias etapas e trabalhos realizados ao longo do meu doutorado.
- A empresa Andrade Sun Farms Agrocomercial LTDA, por ter trazido diretamente para nós diversos problemas que a citricultura paulista encontra atualmente. Colaborando e aproximando a Universidade e Empresa para juntos solucionar problemas da citricultura paulista.
- Thanks to all my collaborators from DWI - Leibniz-Institut für Interaktive Materialien and RWTH Aachen University. I'm thankful for the supervision and collaboration of Dr. Felix Jakob, Prof. Dr. Ulrich Schwaneberg, and Prof. Dr. Andrij Pich. My Doctoral stay at DWI and RWTH Aachen University was very important for my formation and the development of the present work. Special thanks to my friends Christian Simons, Raphael Soeur, Felix Jakob, and Leticia C. L. Novaes for the warm and friendly time in Germany. From my side, I'm still looking for more Happy-Happy-Go-Fun-Fun!
- Agradeço também ao meu orientador, Prof. Dr. Henrique Ferreira, pela orientação e confiança no meu trabalho.

“Os grandes feitos são conseguidos não pela força, mas pela perseverança.”

(Samuel Johnson)

RESUMO

O Brasil é o maior exportador de suco de laranja concentrado do mundo. Apesar do sucesso da citricultura no país, uma das principais doenças bacterianas que causam grandes perdas na produtividade é o cancro cítrico. Essa doença é causada pela bactéria Gram-negativa *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*). Para fazer o controle da doença realiza-se o manejo integrado com aplicação constante de soluções cúpricas nos pomares. Porém, o cobre é um metal pesado tóxico para o meio ambiente e para a saúde humana, sendo importante encontrar alternativas, diminuindo assim a aplicação desse metal na citricultura. Logo, o objetivo deste trabalho foi testar dois novos protetivos para folhas de citros contra infecção por *X. citri*. A primeira plataforma desenvolvida foi baseada em microgéis para liberação controlada de agentes antibacterianos e que contém um peptídeo de ancoragem em sua superfície capaz de promover sua adesão às folhas de citros. Tais géis possuem o galato G6 como agente bactericida imobilizado em sua matriz polimérica. A segunda plataforma proposta foi a de peptídeos antimicrobianos em fusão com peptídeo de ancoragem também para fixação foliar. Os resultados mostraram que de oitos diferentes microgéis sintetizados apenas GMA_hDerm_G6 e GMA_hDerm_AT_G6 apresentaram inibição de *X. citri in vitro*, com atividade bactericida nas concentrações de 1,375 e 0,343 mg mL⁻¹, respectivamente. Dos peptídeos produzidos, apenas o Melittin_Cg-Def na concentração de 125 µg mL⁻¹ apresentou efeito bactericida em ensaios *in vitro*. Ensaios de microscopia mostraram que o G6 presente no microgel era o principal agente antimicrobiano, mantendo seu mecanismo de ação mesmo após ter sido imobilizado na matriz polimérica do microgel, afetando a estrutura da membrana citoplasmática e desfazendo o anel divisional da *X. citri*. O Melittin também continuou apresentando seus mecanismos de ação mesmo após ser fusionado com o peptídeo de ancoragem Cg-Def, apresentando ainda ação na perturbação e rompimento da membrana citoplasmática bacteriana. Os testes de fitotoxicidade e citotoxicidade mostraram que os microgéis e o peptídeo bifuncional eram tóxicos para as sementes de *Eruca sativa* e para as células J774A.1. Porém, suas toxicidades eram menores que o composto cúprico comercial (Difere). Os resultados em casa de vegetação confirmaram que os microgéis na concentração de 2,75 mg mL⁻¹ e o Melittin_Cg-Def na concentração de 250 µg mL⁻¹ apresentavam uma proteção efetiva contra a infecção da *X. citri*, reduzindo significativamente o número de lesões por área foliar. Destacou-se nos testes o microgel GMA_hDerm_G6, que mesmo após uma simulação de chuva, continuava protegendo eficientemente as plantas contra a *X. citri*. Pode-se concluir que ambas as plataformas propostas, utilizando as respectivas construções mostradas no presente trabalho, são uma possível alternativa aos compostos cúpricos aplicados em campo para o controle do cancro cítrico, podendo vir a ser uma alternativa menos tóxica e mais sustentável no manejo da doença.

Palavra-chave: Cancro cítrico; Defensivos agrícolas; Melittin; Microgéis; *Xanthomonas citri*.

ABSTRACT

Brazil is the largest exporter of concentrated orange juice in the world. Despite the success of citriculture in the country, one of the main bacterial diseases that cause great losses in productivity is citrus canker. This disease is caused by the Gram-negative bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*). To control the disease, integrated management is carried out with the constant application of cupric solutions in the orchards. However, copper is a heavy metal that is toxic to the environment and to human health, and it is important to find alternatives, thus reducing the application of this metal in citriculture. Therefore, the aims of this work were to test two new protective compounds for citrus leaves against *X. citri* infection. The first platform developed was based on microgels for controlled release of antibacterial agents and which contain an anchoring peptide on its surface capable of promoting its adhesion to citrus leaves. These gels have the G6 gallate as a bactericidal agent immobilized in their polymer matrix. The second platform proposed was that of antimicrobial peptides fused with an anchor peptide for foliar fixation. The results showed that from eight different microgels synthesized, only GMA_hDerm_G6 and GMA_hDerm_AT_G6 showed inhibition of *X. citri in vitro*, with bactericidal activity at concentrations of 1.375 and 0.343 mg mL⁻¹, respectively. From the synthesized peptides, only Melittin_Cg-Def at the concentration of 125 µg mL⁻¹ showed bactericidal effect at *in vitro* assays. Microscopy tests showed that the G6 present in the microgel was the main antimicrobial agent, maintaining its mechanism of action even after being immobilized in the polymeric matrix of the microgel, affecting the structure of the cytoplasmic membrane and undoing the divisional ring of *X. citri*. Melittin also continued to show its mechanisms of action even after being fused with the Cg-Def peptide, still acting on the disruption of the bacterial cytoplasmic membrane. Phytotoxicity and cytotoxicity tests showed that microgels and bifunctional peptide were toxic to *Eruca sativa* seeds and J774A.1 cells. However, its toxicities were lower than the commercial cupric compound (Difere). The results in a greenhouse confirmed that microgels at a concentration of 2.75 mg mL⁻¹ and Melittin_Cg-Def at a concentration of 250 µg mL⁻¹ provided effective protection against *X. citri* infection, significantly reducing the number of lesions caused by leaf area. The microgel GMA_hDerm_G6 was highlighted out in the tests, which even after a rain simulation, continues efficiently protective for plants against *X. citri*. It can be concluded that both proposed platforms, using the respective constructions showed in this work, are a possible alternative to cupric compounds applied in the field for the control of citrus canker, and may become a less toxic and more sustainable alternative in disease management.

Keywords: Citrus cancer; Pesticides; Melittin; Microgels; *Xanthomonas citri*.

LISTA DE ABREVIACÕES

Ácido tânico (AT)
Administração de Comidas e Remédios dos EUA (FDA)
American Type Culture Collection (ATCC)
Cadastro Geral de Empregados e Desempregados (Caged)
Células inibidas (CI)
Chemical Abstract Service (CAS)
Cinquenta por cento de células inibidas (CI₅₀)
Citrus sinensis (*C. sinensis*)
Citrus Leprosis Virus (CiLV)
Concentração inibitória mínima (MIC)
Concentração letal (CL)
Concentração letal de cinquenta por cento (CL₅₀)
Concentração mínima bactericida (MBC)
Controle negativo (CN)
Controle positivo (CP)
Controle do veículo (CV)
Cultivar (cv)
Densidade óptica (DO)
Departamento de Agricultura dos EUA (USDA)
Desvio padrão (DS)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil- sulfato de sódio (SDS-PAGE)
Elongamento Médio na Amostra (EMa)
Elongação Radicular Relativa (ERR)
Elongamento Médio no Controle (EMc)
Eruca sativa (*E. sativa*)
Espécies reativas de oxigênio (ROS)
Estados Unidos da América (EUA)
Ésteres de ácidos gálicos (Galatos)
Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS)
Galato de Hexila (G6)
Galato de Decapetila (G10)

Germinação Relativa (GR)
hDermcidin (hDerm)
Huanglongbing (HLB)
Índice de germinação (IG)
Iodeto de propídeo (IP)
Isopropil β -d-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG)
Luria-Bertani (LB)
Metacrilato de glicidil (GMA)
Microscopia eletrônica de varredura (MEV)
Microtitulação em Placa com Resazurina (REMA)
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)
Noventa por cento de células inibidas (CI_{90})
Número de medições (N)
Número de Sementes Germinadas na Amostra (NSGa)
Número de Sementes Germinadas no Controle (NSGc)
Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAOSTAT)
Porcentagem de células inibidas ($CI\%$)
Proteína verde fluorescente (GFP)
Reino Unido (UK)
Rotação por minuto (rpm)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SAA)
Sistema de Mitigação de Risco (SMR)
Soro bovino fetal (FBS)
Subespécie (subsp)
Substância geralmente reconhecida como segura (GRAS)
Sulfóxido de dimetilo (DMSO)
Superóxido dismutase (SOD)
Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS)
Unidade de Formação de Colônias (UFC)
Universidade Estadual Paulista (UNESP)
Valores obtidos dos dados experimentais (Q_{ie})
Valores obtidos dos dados calculados (Q_{ic})
Valor médio das unidades arbitrárias de fluorescência das amostras (UAF_i)
Valor médio das unidades arbitrárias de fluorescência do controle negativo (UAF_c)

Xanthomonas citri amy::pPM2a-zapA (*X. citri amy::pPM2a-zapA*)

Xanthomonas citri subsp. *citri* (*X. citri*)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Lesões causadas pelo cancro cítrico sendo observadas em ramos (A), folhas (B) e frutos (C).....	23
Figura 2. Situação do controle adotado por cada estado do Brasil em relação ao controle do cancro cítrico. (a: é a imagem geral do mapa do Brasil; b: 1 indica os municípios de Alenquer, Belterra, Mojuí dos Campos, Monte Alegre, Prainha e Santarém e 2 indica os municípios de Ourém, Irituia, Garrafão do Norte, Capitão Poço e Nova Esperança do Pará, todos municípios pertencentes ao estado do Pará; c: representa o estado de Goiás, onde as áreas 3, 4 e 5 indicam os municípios de Jataí, Itajá e Lagoa Santa, respectivamente; d: é o estado de Minas Gerais, onde as áreas 6, 7 e 8 representam os municípios de Carneirinho, Frutal e Planura, respectivamente; e: é o estado do Paraná, sendo que o 9 indica as mesorregiões de Curitiba e Paranaguá).....	25
Figura 3. Porcentagem de incidência do cancro cítrico nas mesorregiões (composta por vários municípios da região) citricultoras do estado de São Paulo com base no levantamento do FUNDECITRUS em 2019, conforme relatado por Behlau 2021.....	26
Figura 4. Reação geral para a síntese dos galatos de alquila G-6 e G-10 $(CH_2)_9CH_3$	37
Figura 5. Modelo esquemático dos microgéis com galatos imobilizados em sua matriz polimérica revestido em sua superfície com os peptídeos de ancoragem.....	38
Figura 6. Modelo esquemático dos peptídeos bifuncionais, sendo sua porção inferior um peptídeo de ancoragem fusionado com o peptídeo bactericida na parte superior.....	40
Figura 7. Disposição das sementes de <i>E. sativa</i> nas placas de Petri, permitindo que as sementes tenham espaço suficiente para a sua germinação.....	44
Figura 8. Microgéis de matriz polimérica de GMA sintetizados no presente trabalho.....	51
Figura 9. Gráficos das porcentagens de células de <i>X. citri</i> inibidas pelos microgéis contendo galatos em diferentes concentrações. Barras de erro representam os valores de <i>DS</i>	52
Figura 10. Gráficos das porcentagens de células de <i>X. citri</i> inibidas por diferentes concentrações de microgéis contendo apenas o peptídeo de ancoragem e o ácido tânico em sua composição. Barras de erro representam os valores de <i>DS</i>	53
Figura 11. Gráfico da porcentagem de inibição das células de <i>X. citri</i> pelo ácido tânico em diferentes concentrações. Barras de erro representam os valores de <i>DS</i>	54
Figura 12. Teste de MBC dos microgéis. A = Microgel GMA; B = Microgel GMA_AT; C = Microgel GMA_hDerm; D = Microgel GMA_hDerm_AT; E = Microgel GMA_hDerm_G6; F = Microgel GMA_hDerm_AT_G6; G = Microgel GMA_hDerm_G10; H = Microgel	

GMA_hDerm_AT_G10; CP = Controle positivo com Canamicina ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$); CV = Controle do veículo (50% de água deionizada autoclavada no meio NYG (v/v)); CN = Controle negativo (apenas a bactéria no meio NYG).....55

Figura 13. Teste de MBC dos compostos puros usados na construção dos microgéis. A = hDerm; B = AT; CP = Controle positivo (Canamicina á $20 \mu\text{g mL}^{-1}$); CV = Controle do veículo (50% de água deionizada autoclavada no meio NYG (v/v)); CN = Controle negativo (apenas a bactéria no meio NYG).....56

Figura 14. Gráfico da porcentagem de células de *X. citri* com a membrana citoplasmática danificada devido à exposição aos microgéis. CN são as células não tratadas, CP são as células com a membrana citoplasmática rompida por estresse térmico, CI50-M_G6 é o microgel GMA_hDerm_G6 na concentração de CI_{50} , CI50-M_AT-G6 é o microgel GMA_hDerm_AT_G6 na concentração de CI_{50} , CI90-M_G6 é o microgel GMA_hDerm_G6 na concentração de CI_{90} , e o CI90-M_AT-G6 é o microgel GMA_hDerm_AT_G6 na concentração de CI_{90}57

Figura 15. Células de *X. citri* com a membrana citoplasmática afetada pelos microgéis GMA_hDerm_G6 e GMA_hDerm_AT_G6. As células foram expostas aos compostos nos seus respectivos valores de CI_{50} e CI_{90} durante 15 minutos de contato, sendo em seguidas coradas com o SYTO9 e IP antes da observação ao microscópio de fluorescência. As células com membrana intacta são mostradas em azul, enquanto as células com membrana citoplasmática rompida são mostradas em vermelho. (A) Células não tratadas (CN); (B) Células com a membrana citoplasmática rompida por estresse de temperatura (CP); (C) Células tratadas com GMA_hDerm_AT_G6 na CI_{50} ($0,124 \text{ mg mL}^{-1}$); (D) células tratadas com GMA_hDerm_G6 na CI_{50} ($0,260 \text{ mg mL}^{-1}$); (E) Células tratadas com GMA_hDerm_AT_G6 na CI_{90} ($0,172 \text{ mg mL}^{-1}$); Células tratadas com GMA_hDerm_G6 na CI_{90} ($0,330 \text{ mg mL}^{-1}$). As imagens são a sobreposição de microscopia de contraste de fase e fluorescência. Os filtros TxRed e DAPI-Blue foram aplicados juntos e usados para visualizar IP e SYTO9. As barras correspondem a $5 \mu\text{m}$; ampliação de $100\times$, com um total de 100 células visualizadas por tratamento.....58

Figura 16. GMA_hDerm_G6 e GMA_hDerm_AT_G6 causaram o rompimento do septo divisional das células de *X. citri amy::pPM2a-zapA*. (a) Controle negativo (células não tratadas); (b) células tratadas com GMA_hDerm_AT_G6 na CI_{50} ($0,124 \text{ mg mL}^{-1}$); (c) GMA_hDerm_G6 na CI_{50} ($0,260 \text{ mg mL}^{-1}$); (d) células tratadas com GMA_hDerm_AT_G6 na CI_{90} ($0,172 \text{ mg mL}^{-1}$); (e) GMA_hDerm_G6 na CI_{90} ($0,330 \text{ mg mL}^{-1}$). O septo divisional

corresponde à barra verde no centro das células (indicados pelas setas vermelhas). Ampliação de 100×, barra de tamanho de 2 µm, total de 100 células visualizadas por tratamento.....59

Figura 17. Gráficos dos valores das porcentagens de *IG* para as sementes de *E. sativa* em contato com cada composto em diferentes concentrações. (GMA_hDerm - $LC_{50} = 27,6 \text{ mg mL}^{-1}$; GMA_hDerm_G6 - $LC_{50} = 0,0875 \text{ mg mL}^{-1}$; GMA_hDerm_AT_G6 - $LC_{50} = 0,0931 \text{ mg mL}^{-1}$; AT - $LC_{50} = 0,875 \text{ mg mL}^{-1}$; Difere - $LC_{50} = 0,004 \text{ mg mL}^{-1}$; G6 - $LC_{50} = 0,0133 \text{ mg mL}^{-1}$). Barras de erro representam os valores de *DS*.....61

Figura 18. Gráficos das porcentagens de células J774A.1 mortas nos ensaios de citotoxicidade. (GMA_hDerm_G6 - $LC_{50} = 0,0592 \text{ mg mL}^{-1}$; GMA_hDerm_AT_G6 - $LC_{50} = 0,0495 \text{ mg mL}^{-1}$; Difere - $LC_{50} = 0,0005 \text{ mg mL}^{-1}$). Barras de erro representam os valores de *DS*.....62

Figura 19. Comparação visual entre as folhas dos tratamentos utilizando os microgéis na concentração de $2,75 \text{ mg mL}^{-1}$ com os controles. Folhas de *C. sinensis* cv. Pêra com as lesões desenvolvidas ao final dos 35 dias de experimento (parte abaxial das folhas). A = CN; B = CP; C = GMA; D = GMA_hDerm; E = GMA_hDerm_G6; F = GMA_hDerm_AT; G = GMA_hDerm_AT_G6; H = GMA_AT.....63

Figura 20. Gráficos do número de lesão por área foliar de cada um dos tratamentos avaliados no presente trabalho. CP é a formulação comercial de cobre (Difere). Cada folha foi considerada como um indivíduo independente na distribuição do gráfico. Todos os dados e grupos foram submetidos à análise estatística não paramétrica de Kruskal-Wallis (Dunn), com três graus de liberdade. As barras de erro representam o erro padrão de cada grupo.....64

Figura 21. Gráfico do número de lesões por área foliar dos testes realizados em casa de vegetação com uma etapa de lavagem buscando simular o efeito de uma chuva no campo. O CP foi à formulação comercial de cobre (Difere), CN foram as folhas aspergidas apenas com solução salina (NaCl 0,85%), GMA_hDerm_AT_G6 com concentração de $2,75 \text{ mg mL}^{-1}$, GMA_hDerm_G6_A e GMA_hDerm_G6_B eram o microgel GMA_hDerm_G6 nas concentrações de $1,375$ e $2,75 \text{ mg mL}^{-1}$ respectivamente. Cada folha foi considerada como um indivíduo independente na distribuição do gráfico. Todos os dados e grupos foram submetidos à análise estatística não paramétrica de Kruskal-Wallis (Dunn), com três graus de liberdade. As barras de erro representam o erro padrão de cada grupo.....65

Figura 22. Comparação visual entre as folhas do teste protetivo com a etapa de lavagem. Folhas de *C. sinensis* cv Pêra com as lesões desenvolvidas ao final dos 35 dias de experimento (parte abaxial das folhas). A = CN; B = GMA_hDerm_AT_G6 com $2,75 \text{ mg mL}^{-1}$ de

concentração; C = GMA_hDerm_G6 com 1,375 mg mL⁻¹ de concentração; D = GMA_hDerm_G6 com 2,75 mg mL⁻¹ de concentração; E = CP.....67

Figura 23. Microscopia confocal de folhas cobertas com o microgel GMA_hDerm_G6 com concentração de 2,75 mg mL⁻¹. Aplicação = Folha após uma única etapa de pulverização usando GMA_hDerm_G6 á 2,75 mg mL⁻¹; Aplicação da *X. citri* = Uma etapa de pulverização usando GMA_hDerm_G6 e seguindo-se a uma etapa de pulverização usando uma suspensão de células *X. citri*; Lavagem = Uma segunda etapa de pulverização usando solução salina (NaCl 0,85 %) logo após a etapa de aplicação da *X. citri*; Após 35 dias = O mesmo lado da folha com aplicação de *X. citri* 35 dias pós-inoculação; Após 35 dias (lavagem) = A folha com aplicação de *X. citri* seguida da etapa de lavagem após 35 dias. As fotos foram tiradas usando o canal GFP; Escala 500 µm; Ampliação de 100×.....68

Figura 24. Microscopia eletrônica de varredura das folhas aspergidas com o GMA_hDerm_G6 (parte abaxial das folhas). Setas em vermelho indicam a presença do microgel. A = Folha após uma etapa de aspersão de GMA_hDerm_G6 com 2,75 mg mL⁻¹ de concentração; B = Folhas aspergidas com GMA_hDerm_G6 na concentração de 2,75 mg mL⁻¹, seguido por uma etapa de lavagem com solução salina (NaCl 0,85%); C = Folhas aspergidas apenas com uma solução salina de NaCl 0,85% (CN). As microscopias foram observadas na ampliação de 2500×, com 10 µm de escala da imagem.....69

Figura 25. Teste de MBC utilizando os peptídeos antimicrobianos selecionados. A = Tachyplesin_GFP; B = Melittin_GFP; C = GFP_Melittin; D = LL-37_GFP; E = GFP_LL-37; F = Tachyplesin_GFP; G = SMAP-29_GFP; H = GFP_SMAP-29; I = Controle positivo, Canamicina a 20 µg mL⁻¹ (linha 1 a 4); I = Controle do veículo, 50% de água deionizada no meio de cultivo NYG (linha 5 a 8); J = Controle negativo, bactérias sem exposição a qualquer composto.....74

Figura 26. Gel de SDS mostrando o peptídeo Cg-Def_Melittin e Melittin_Cg-Def 16 kDa (canaleta A e B- caixa verde, respectivamente). Marcador Pierce™ Unstained Protein MW Marker (canaleta central).....75

Figura 27. Gráficos das porcentagens de células de *X. citri* inibidas pelos peptídeos Melittin_Cg-Def e Cg-Def_Melittin em diferentes concentrações. Barras de erro representam os valores de *DS*.....76

Figura 28. Teste de MBC dos peptídeos Melittin fusionado com o peptídeo de ancoragem Cg-Def. A = Melittin_Cg-Def; B = Cg-Def_Melittin; CP = Controle positivo com Canamicina (20 µg mL⁻¹); CV = Controle do veículo (50% de água deionizada autoclavada no meio NYG (v/v)); CN = Controle negativo (células de *X. citri* sem exposição a qualquer composto).....77

Figura 29. Porcentagem do número de células de *X. citri* com a membrana citoplasmática afetada após 15 minutos de contato com o Mellitin_Cg-Def nas concentrações de CI_{50} e CI_{90} . O CN é o controle negativo (células não tratadas), CP é o controle positivo (células com a membrana rompida por estresse térmico), Peptídeo (CI_{50}) é o Mellitin_Cg-Def na concentração de CI_{50} e o Peptídeo (CI_{90}) é o Mellitin_Cg-Def na concentração de CI_{90}78

Figura 30. Células de *X. citri* com a membrana citoplasmática afetada após o contato com o Melittin_Cg-Def. As células foram expostas ao peptídeo na sua respectiva concentração de CI_{50} e CI_{90} durante 15 minutos de contato. As células de *X. citri* foram então coradas com SYTO9 e IP. As células com membrana citoplasmática rompida são mostradas em vermelho, enquanto que as células com membrana citoplasmática intacta são mostradas em azul. (a) CN (células não tratadas); (b) CP (células com a membrana citoplasmática rompida por estresse de temperatura); (c) Células tratadas com o Melittin_Cg-Def na CI_{50} ; (d) células tratadas com Melittin_Cg-Def na CI_{90} . As imagens são a sobreposição de microscopia de contraste de fase e fluorescência. Os filtros TxRed e DAPI-Blue foram aplicados juntos e usados para visualizar IP e SYTO9. As barras correspondem a 5 μm ; ampliação de 100 \times , com um total de 100 células visualizadas por tratamento.....79

Figura 31. O peptídeo Melittin_Cg-Def não afeta a divisão celular da *X. citri*. (a) CN (células não tratadas); (b) células tratadas com Melittin_Cg-Def na CI_{90} . O septo divisional corresponde à barra verde no centro das células (indicados pelas setas vermelhas). Ampliação de 100 \times , barra de tamanho de 2 μm , total de 100 células visualizadas por tratamento.....80

Figura 32. Gráfico da fitotoxicidade do peptídeo Melittin_Cg-Def e Difere para as sementes de *E. sativa*. (Difere - $LC_{50} = 0,004 \text{ mg mL}^{-1}$; Melittin_Cg-Def - $LC_{50} = 0,0103 \text{ mg mL}^{-1}$). Barras de erro representam os valores de *DS*.....81

Figura 33. Porcentagem de células J774A.1 mortas por diferentes concentrações do peptídeo bifuncional produzido e pelo composto cúprico comercial aplicado em campo. (Melittin_Cg-Def - $LC_{50} = 0,102 \text{ mg mL}^{-1}$; Difere - $LC_{50} = 0,0005 \text{ mg mL}^{-1}$). Barras de erro representam os valores de *DS*.....82

Figura 34. Gráficos do número de lesão por área foliar dos tratamentos utilizando o Melittin_Cg-Def em diferentes concentrações. Plantas de *C. sinensis* cv Pêra foram pulverizadas com o peptídeo bifuncional variando sua concentração de aplicação. CP é a formulação de cobre comercial (Difere), CN eram as folhas aspergidas apenas com uma solução salina (NaCl a 0,85%), M3 é o Melittin_Cg-Def com $62,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de concentração, M2 é o Melittin_Cg-Def com $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de concentração, M1 é o Melittin_Cg-Def com $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ de concentração. Vinte e quatro horas após o tratamento, as folhas foram aspergidas

com *X. citri* (10^8 UFC mL⁻¹) e mantidas sob observação até o tempo final de 35 dias para analisar o desenvolvimento dos sintomas da doença. Cada folha foi considerada como um indivíduo independente na distribuição do gráfico. Todos os dados e grupos foram submetidos à análise estatística não paramétrica de Kruskal-Wallis (Dunn), com três graus de liberdade. As barras de erro representam o erro padrão de cada grupo.....84

Figura 35. Comparativo visual das folhas tratadas com o peptídeo bifuncional em diferentes concentrações após o teste de aspersão em casa de vegetação. Folhas de *C. sinensis* cv Pêra com as lesões desenvolvidas ao final dos 35 dias de experimento (parte abaxial das folhas). A = CN; B = Melittin_Cg-Def com 62,50 µg mL⁻¹ de concentração; C = Melittin_Cg-Def com 125 µg mL⁻¹ de concentração; D = Melittin_Cg-Def com 250 µg mL⁻¹ de concentração; E = CP.....85

Figura 36. Comparação visual entre as folhas dos tratamentos após o teste de aspersão com uma etapa de lavagem. Folhas de *C. sinensis* cv Pêra com as lesões desenvolvidas ao final dos 35 dias de experimento (parte abaxial das folhas). A = CN; B = Melittin_Cg-Def com 250 µg mL⁻¹ de concentração; C = CP.....86

Figura 37. Gráfico dos resultados dos testes em casa de vegetação simulando uma chuva. Plantas de *C. sinensis* cv Pêra foram pulverizadas com os respectivos microgéis, após 24 horas foram aspergidas com 100 mL de água filtrada e autoclavada por 2 minutos. Após 24 horas, ocorreu a aspersão do inóculo de *X. citri* (10^8 UFC mL⁻¹). As plantas foram observadas até o tempo final de 35 dias. O CN foram as folhas aspergidas apenas com solução salina (NaCl 0,85%), CP foi à formulação de cobre comercial (Difere), M1 é o Melittin_Cg-Def com 250 µg mL⁻¹ de concentração. Cada folha foi considerada como um indivíduo independente na distribuição do gráfico. Todos os dados e grupos foram submetidos à análise estatística não paramétrica de Kruskal-Wallis (Dunn), com três graus de liberdade. As barras de erro representam o erro padrão de cada grupo.....87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ranking dos países na produção de citros de acordo com o levantamento da FAOSTAT durante o período de 1961 á 2019.....	19
Tabela 2. Peptídeos antimicrobianos avaliados e suas propriedades.....	73

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1. Citricultura e o cancro cítrico.....	22
2.2. A busca por possíveis alternativas ao cobre na citricultura.....	28
3. OBJETIVOS.....	35
3.1. Objetivo geral.....	35
3.2. Objetivos específicos.....	35
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1. Micro-organismos.....	36
4.2. Preparo e crescimento do inóculo.....	36
4.3. Síntese dos galatos.....	36
4.4. Síntese dos microgéis.....	37
4.5. Imobilização do peptídeo de ancoragem nos microgéis.....	38
4.6. Peptídeos bifuncionais.....	39
4.7. Avaliação da inibição do crescimento bacteriano pelo método de Microtitulação em Placa com Resazurina (REMA).....	40
4.8. Avaliação do efeito bactericida dos compostos.....	42
4.9. Avaliação do mecanismo de ação dos compostos testados.....	42
4.10. Fitotoxicidade.....	43
4.11. Teste de citotoxicidade.....	45
4.12. Teste protetivo em casa de vegetação.....	46
4.13. Teste protetivo em casa de vegetação com uma etapa de lavagem.....	47
4.14. Microscopia de fluorescência confocal do microgel.....	47
4.15. Microscopia eletrônica de varredura do microgel.....	48
MICROGÉIS.....	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS MICROGÉIS.....	51
5.1. Galatos e microgéis sintetizados.....	51
5.2. Avaliação da inibição do crescimento bacteriano pelo método de REMA.....	51
5.3. Avaliação do efeito bactericida dos microgéis.....	55
5.4. Avaliação do mecanismo de ação dos microgéis testados.....	56
5.5. Fitotoxicidade dos microgéis.....	60
5.6. Teste de citotoxicidade dos microgéis.....	61

5.7. Teste protetivo em casa de vegetação utilizando os microgéis.....	63
5.8. Teste protetivo utilizando os microgéis em casa de vegetação com uma etapa de lavagem.....	65
5.9. Microscopia de fluorescência confocal do microgel.....	67
5.10. Microscopia eletrônica de varredura do microgel.....	69
6. CONCLUSÃO.....	71
PEPTÍDEOS BIFUNCIONAIS.....	72
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS PEPTÍDEOS BIFUNCIONAIS.....	73
7.1. Peptídeos bifuncionais produzidos e sua avaliação nos testes de REMA e MBC.....	73
7.2. Avaliação do mecanismo de ação do peptídeo bifuncional testado.....	77
7.3. Fitotoxicidade do peptídeo bifuncional.....	81
7.4. Teste de citotoxicidade do peptídeo bifuncional.....	82
7.5. Teste protetivo em casa de vegetação utilizando o peptídeo bifuncional.....	83
7.6. Teste protetivo utilizando os peptídeos bifuncionais em casa de vegetação com uma etapa de lavagem.....	86
8. CONCLUSÃO.....	88
CONCLUSÃO GERAL.....	89
9. CONCLUSÃO GERAL.....	90
10. BIBLIOGRAFIA.....	92

1. INTRODUÇÃO

O cultivo ou plantação de citrinos com fins comerciais se caracteriza como citricultura. Os citros são plantas do gênero *Citrus*, originários do sudeste tropical e subtropical da Ásia, sendo pertencentes à família *Rutaceae* (DUARTE et al., 2016a). O grupo é composto por um total de três espécies (*Citrus reticulata*, *Citrus medica* e *Citrus maxima*) juntamente com vários híbridos naturais e cultivados. Os frutos dos *Citrus* podem ser a cidra, laranja, lima, limão, tangerina e a toranja. Esses frutos são ricos em compostos bioativos e vitamina C, sendo uma ótima fonte de alimento e vitaminas essenciais para o corpo humano (DUARTE et al., 2016b). Por ser considerado um produto básico global não industrializado com preço uniformemente determinado pela oferta e procura internacional, a citricultura é considerada uma comódite. Como comódite, a citricultura consiste de uma das atividades agrícolas mais lucrativas do mundo, sendo de vital importância para os países produtores. De acordo com o último levantamento feito pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAOSTAT) no ano de 2019 os três maiores produtores de citrinos do mundo eram a China, Brasil e Índia, respectivamente (Tabela 1) (FAOSTAT, 2019).

Tabela 1. Ranking dos países na produção de citros de acordo com o levantamento da FAOSTAT durante o período de 1961 á 2019.

Posição no ranking	País	Métrica em toneladas (1961 á 2019)	Ano	Taxa de crescimento anual	Taxa de crescimento anual (últimos 5 anos)
1	China	42.776.572	2019	+2,1%	+3,8%
2	Brasil	19.305.081	2019	+0,2%	+0,2%
3	Índia	12.763.518	2019	+1,7%	+2,8%
4	México	8.550.007	2019	+1,3%	+1,8%
5	Espanha	6.802.878	2019	+0,4%	-0,7%
6	EUA	6.662.954	2019	-5,3%	-4,8%
7	Turquia	5.005.524	2019	+2,1%	+5,8%
8	Egito	4.766.378	2019	+1,9%	+1,6%
9	Nigéria	4.114.676	2019	+1,1%	+1,7%
10	Argentina	3.526.249	2019	-0,4%	+6,3%

A cadeia produtiva da citricultura no Brasil gera mais de 230 mil empregos diretos e indiretos, e uma massa salarial anual de R\$ 676 milhões, sendo uma atividade de grande relevância social e econômica (NEVES et al., 2011; IRENO et al., 2014). Porém, uma preocupação mundial para os países produtores de citros são as doenças que acometem essas cultivares, causando perdas e prejuízos para os produtores. Ao se estimar os gastos no Brasil com o uso de defensivos agrícolas para controle dessas doenças, juntamente com a perda da produtividade, os prejuízos somam mais de US\$ 150 milhões por ano, com uma perda anual aproximada de 80 milhões de caixas de laranja (NEVES & LOPES, 2005; NEVES et al., 2011; MENDONÇA et al., 2017). As doenças bacterianas em particular representam uma ameaça constante à citricultura, causando impactos econômicos substanciais em todas as áreas de cultivo ao redor do mundo (MENDONÇA et al., 2017). Entre elas o cancro cítrico e o Huanglongbing (HLB) são os principais, causando perdas e reduções significativas na produção (VOJNOV et al., 2010).

O cancro cítrico é causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*) (GOTTWALD et al., 2002). A doença é disseminada por chuva e ventos, contaminando outras plantas ao redor e se espalhando facilmente para novas áreas (BOCK et al., 2010). A infecção das plantas pela bactéria gera o desfolhamento e conseqüentemente queda da produção, além de inviabilizar a comercialização dos frutos contaminados com o cancro cítrico, causando prejuízos ao agricultor. Atualmente no estado de São Paulo, o controle do cancro cítrico é feito pela pulverização constante de soluções cúpricas (cobre fixo) nos pomares. O cobre tem sido usado na agricultura por mais de 160 anos no manejo de doenças de plantas (LAMICHHANE et al., 2018), no entanto, seu uso massivo na agricultura tem causado preocupações quanto às conseqüências de sua constante aplicação (COELHO et al., 2020). O cobre é um metal pesado, sendo tóxico para os seres vivos quando expostos constantemente a esse metal. O íon cobre é geralmente imóvel no solo. Portanto, a pulverização contínua desse metal resulta no seu acúmulo na camada superficial do solo, atingindo níveis tóxicos para os seres vivos, causando estresse nas plantas, além de impactar a biodiversidade da microbiota, reduzindo conseqüentemente a fertilidade do solo (RUSJAN et al., 2007; CALVINO et al., 2009; TÓTH et al., 2016; COELHO et al., 2020). O cobre também pode se acumular em toda a cadeia trófica, contaminando e impactando diversos seres vivos. Por essas razões os agricultores orgânicos tentam minimizar cada vez mais o uso de cobre (IFOAM, 2018). Logo, torna-se necessário a busca por novas alternativas para substituir ou minimizar a aplicação de cobre na agricultura.

Dessa forma, o objetivo do trabalho foi imobilizar compostos bioativos já caracterizados como eficientes agentes bactericidas (galatos G6 e G10) (KRÓL et al., 2015; CAVALCA et al., 2020) em microgéis supramoleculares (AGRAWAL et al., 2013; LÓPEZ & PICH, 2018) revestidos com peptídeos de ancoragem para fixação foliar. A segunda alternativa para o cobre avaliada no presente trabalho foi à síntese de peptídeos bifuncionais (peptídeo de ancoragem fusionado com um peptídeo antimicrobiano), avaliando a aplicação dessas proteínas com capacidade de fixação no limbo foliar e atividade bactericida frente às células de *X. citri*. Todas as construções de microgéis e peptídeos bifuncionais foram avaliados em ensaios *in vitro*. Para as construções mais promissoras, realizamos estudos de toxicidade e investigação do seu mecanismo de ação na inibição das células de *X. citri*. Em seguida, os melhores microgéis e peptídeos bifuncionais foram testados quanto a sua capacidade protetiva contra o cancro cítrico em casa de vegetação (*in vivo*), avaliando o mais próximo possível de uma aplicação real dos microgéis/peptídeos produzidos no presente trabalho.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Citricultura e o cancro cítrico

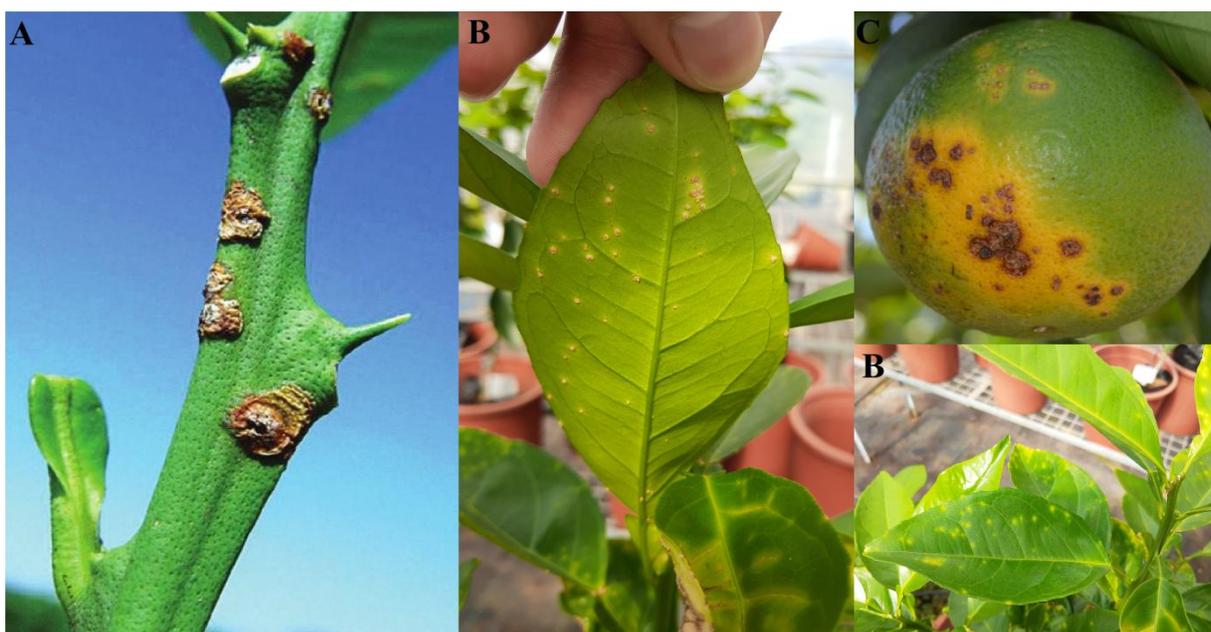
A citricultura é uma das atividades comerciais mais lucrativas do mundo, sendo o Brasil e os Estados Unidos da América (EUA) responsáveis por quase metade de toda a produção global de laranja de laranja doce (NEVES et al., 2020). Logo, esse setor agrícola é vital para a economia do Brasil, gerando diversos empregos diretos e indiretos, tendo uma introdução de capital interno importante para a economia do país. A citricultura é atualmente o setor agrícola que mais emprega pessoas no estado de São Paulo, gerando um emprego para cada nove hectares conforme relatado pelos registros do Cadastro Geral de Empregados e Desempregados (Caged) (MORÃO, 2018). Além disso, a citricultura tem um grande impacto no Brasil devido à exportação gerada pelo setor, onde o país representa cerca de 35% da produção de laranja e 56% do suco de laranja consumido no mundo de acordo com a estimativa do Departamento de Agricultura dos EUA (USDA) (USDA, 2015; CURTOLO et al., 2017). A citricultura brasileira iniciou suas atividades de exportações a partir de 1962, contribuindo significativamente para o desenvolvimento e crescimento do país, sendo que 98% do que é produzido pelo setor é exportado (NEVES, 2017). A produção brasileira total atingiu 294,17 milhões de caixas de laranja (40,8 kg) na safra 2021/2022, segundo levantamento de estimativa de safra do Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS, 2021). Considerando o preço médio por caixa de laranja como sendo aproximadamente US\$ 6,43 a citricultura tem gerado quase dois bilhões de dólares anuais em receitas para o Brasil (CACCALANO et al., 2021). Logo, a citricultura é um setor do agronegócio de destaque para o estado de São Paulo e para o Brasil, sendo importante a manutenção e continuidade da produção dessa atividade agrícola.

Apesar do sucesso notável, a citricultura brasileira enfrenta constantemente problemas relativos às pragas e doenças que acarretam queda de produção, perda de frutos ou até mesmo das plantas. Dentre as doenças que acometem os citros as que mais merecem destaque são: leprose cítrica causada pelo Citrus Leprosis Virus (CiLV) (REHMAN et al., 2020), pinta preta que possui como agente etiológico o fungo *Guignardia citricarpa* (*Phyllosticta citricarpa*) (SCHREUDER et al., 2018), *Candidatus Liberibacter asiaticus* causadora do Greening/Huanglongbing (HLB) (LI et al., 2020) e *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*) responsável pelo cancro cítrico (BEHLAU, 2021).

Das doenças supracitadas, o cancro cítrico é uma das mais importantes para a citricultura, causando perdas e uma redução significativa na produção dos pomares (ZHANG

et al., 2010; FERENCE et al., 2018). A bactéria Gram-negativa *X. citri* infecta todas as variedades de importância comercial de citros, sendo essa bactéria classificada como uma praga quarentenária (GOTTWALD et al., 2002; ZHANG et al., 2010; GE et al., 2015; BATTAGIN et al., 2021). Uma vez que a planta é infectada ocorre o aparecimento das lesões no tecido vegetal, se caracterizando como sendo na maioria das vezes lesões corticosas, circulares, salientes, com coloração castanho amarelado e aspecto eruptivo (BITTANCOURT, 1957; GOTTWALD et al., 1988; GOTTWALD et al., 1989; ROSSETTI, 2001; MORÃO, 2018), como é mostrado na Figura 1. A infecção e surgimento da lesão ocorrem nas partes aéreas da planta, como folhas, ramos e frutos, gerando consequentemente desfolhamento da planta, diminuindo assim a produção de frutos (GOTTWALD et al., 2002; ZHANG et al., 2010; ZHANG & MENG, 2011; BEHLAU 2021).

Figura 1. Lesões causadas pelo cancro cítrico sendo observadas em ramos (A), folhas (B) e frutos (C).



Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

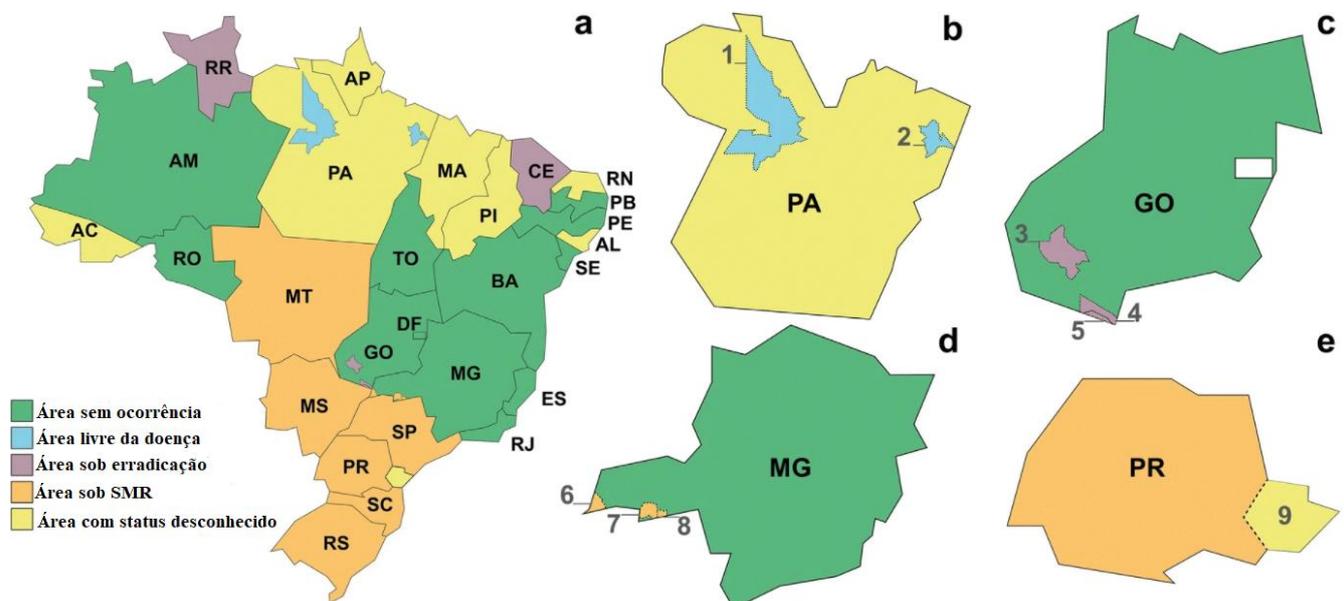
A bactéria infecta o tecido vegetal mediante a entrada por aberturas naturais, como estômatos e hidatódios, e por ferimentos causados por utensílios e maquinários agrícolas (GOTTWALD et al., 2002). A disseminação da doença não ocorre através de artrópodes, sendo a sua dispersão planta-a-planta pela ação combinada de chuvas e ventos, se espalhando facilmente para novas áreas (BOCK et al., 2010). O contato e manuseio do homem também facilitam esta disseminação. Além disto, a larva minadora dos citros, *Phyllocnistis citrella*, é

um fator capaz de exacerbar a infecção, pois ao alimentar-se em tecidos novos produz galerias no mesófilo foliar, que facilitam a penetração e infecção pela bactéria (CHAGAS & PARRAS, 2000). Outro fator responsável pelo grande sucesso da infecção e dispersão da *X. citri* é a sua capacidade de formar biofilmes na superfície dos tecidos da planta hospedeira como caules, galhos, ramos, folhas e frutos (CUBERO et al., 2011; SENA-VÉLEZ et al., 2016). O biofilme produzido pela *X. citri* auxilia suas células na fixação, colonização, mobilidade e proteção contra fatores físicos como temperatura, pH e desidratação celular. Portanto, plantas e frutas contaminadas com a bactéria estão proibidas de serem comercializadas, evitando assim a disseminação do fitopatógeno em áreas/países livres da doença (BEHLAU et al., 2016; ZAMUNER et al., 2020). O fruto de mesa é o produto com maior valor agregado, uma vez que a fruta é contaminada, ela não pode mais ser comercializada, causando um prejuízo ainda maior para o citricultor.

O cancro cítrico foi primeiramente detectado no estado de São Paulo em 1957 na região de Presidente Prudente e em seguida foi registrado sua presença nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Roraima (AMARAL 1957; BITANCOURT, 1957). Durante dez anos, período compreendido entre 1999 até 2009, o controle do cancro cítrico no estado de São Paulo era feito por meio da erradicação de talhões onde o índice de contaminação bacteriana fosse igual ou superior a 0,50% no talhão (BEHLAU et al., 2016; BEHLAU, 2021). Desta forma a doença manteve-se em baixa incidência em todo o estado de São Paulo, chegando ao máximo de 0,20% de contaminação bacteriana em um talhão com a presença da doença. Porém, uma alteração de legislação ocorreu em 2009 (resolução SAA – 43 de 25/06/2009), e a partir desta data apenas as plantas sintomáticas deveriam ser eliminadas juntamente com as demais contidas em um raio de trinta metros (SÃO PAULO, 2009). Além dessa alteração, o convênio entre a FUNDECITRUS e a Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo não foi renovado, diminuindo a fiscalização e inspeção dos pomares. Como consequência dessa amenização do programa de erradicação, o cancro cítrico avançou sua incidência de contaminação de 0,20% para 0,44% em apenas um ano, e registrou em 2012 sua maior incidência atingindo o patamar de 1,39% (BEHLAU et al., 2016; BEHLAU, 2021). Mesmo com o aumento acentuado na disseminação da doença, o método de controle do cancro cítrico foi novamente abrandado no estado de São Paulo em 1º de Novembro de 2013 através da Resolução SAA – 147 de 01/11/2013, determinando-se que para controlar a doença era necessária a erradicação apenas da planta contaminada, e em seguida deveria ser pulverizado cobre nas outras plantas em um raio de 30 metros, e a pulverização de cobre deveria ser

repetida a cada brotação (SÃO PAULO, 2013). Como consequência dessas resoluções SAA 43 seguida pela 147, que amenizaram o programa de erradicação do cancro cítrico no estado de São Paulo, o índice de contaminação da doença saiu do nível de supressão com baixos registros de incidência, para uma situação de epidemia. No ano de 2018 passou a vigorar a Normativa 21 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que abre a alternativa de um plano de mitigação da doença, permitindo novas estratégias para o controle do cancro cítrico, não sendo mais exclusivamente por meio da erradicação da planta contaminada. Cabe agora ao estado citricultor determinar em qual cenário se encaixa e elaborar suas normas fitossanitárias (SÃO PAULO, 2018). Neste caso ao observar o mapa do Brasil com a distribuição e registro da presença da doença (Figura 2), é possível ver quais estados ainda estão fazendo o programa de erradicação e quais aderiram ao Sistema de Mitigação de Risco (SMR) (BEHLAU, 2021).

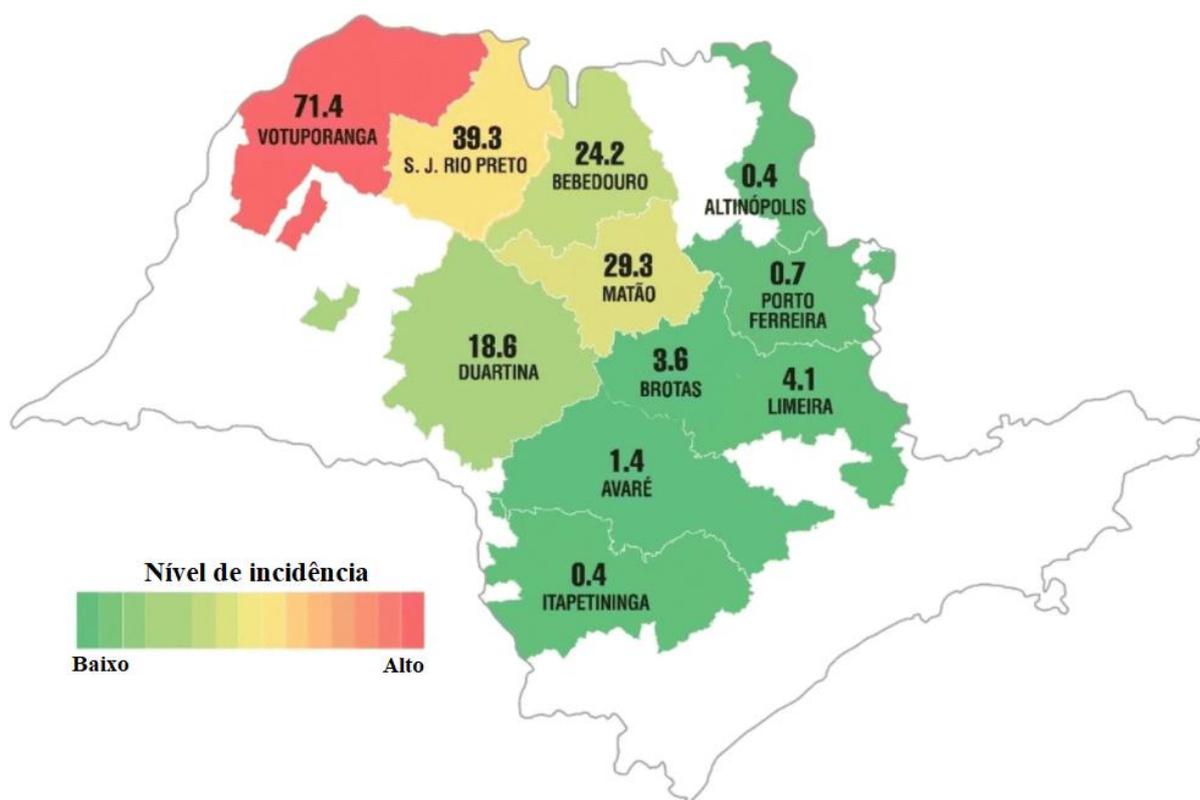
Figura 2. Situação do controle adotado por cada estado do Brasil em relação ao controle do cancro cítrico. (a: é a imagem geral do mapa do Brasil; b: 1 indica os municípios de Alenquer, Belterra, Mojuí dos Campos, Monte Alegre, Prainha e Santarém e 2 indica os municípios de Ourém, Irituia, Garrafão do Norte, Capitão Poço e Nova Esperança do Pará, todos municípios pertencentes ao estado do Pará; c: representa o estado de Goiás, onde as áreas 3, 4 e 5 indicam os municípios de Jataí, Itajá e Lagoa Santa, respectivamente; d: é o estado de Minas Gerais, onde as áreas 6, 7 e 8 representam os municípios de Carneirinho, Frutal e Planura, respectivamente; e: é o estado do Paraná, sendo que o 9 indica as mesorregiões de Curitiba e Paranaguá).



Fonte: figura adaptada de BEHLAU, 2021.

Os estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e os municípios de Carneirinho, Frutal e Planura em Minas Gerais, por sua vez, adotaram o Sistema de Mitigação de Risco, onde a prevenção da doença passa a ser feita por práticas de manejo integrado, utilizando-se quebra-ventos nos pomares, aquisição e plantio apenas de mudas sadias, cuidados durante a colheita, combate a larva minador do citros, destruição de frutos contaminados, tratamentos fitossanitários preventivos, desinfecção de ferramentas e máquinas, e a aplicação constante de bactericidas cúpricos. Atualmente, com a adoção do sistema SMR, o cancro cítrico ficou presente em todas as áreas de citros do estado de São Paulo, aumentando sua incidência principalmente nas regiões noroeste e centro do estado (Figura 3).

Figura 3. Porcentagem de incidência do cancro cítrico nas mesorregiões (composta por vários municípios da região) citricultoras do estado de São Paulo com base no levantamento do FUNDECITRUS em 2019, conforme relatado por Behlau 2021.



Fonte: figura adaptada de BEHLAU, 2021.

As maiores incidências da doença foram registradas na área de Votuporanga com 71,4% de árvores contaminadas com o cancro cítrico, seguida por São José do Rio Preto, Matão, Bebedouro e Duarteina (BEHLAU, 2021). A previsão é que com o fim do programa de

erradicação e adoção do SMR, a doença continuará a se espalhar cada vez mais pelo estado de São Paulo e demais regiões onde a citricultura está presente. Com base na incidência de cancro cítrico registradas em levantamentos de 2009, quando começou a epidemia, até o último levantamento em 2019, é possível estimar que o cancro cítrico esteja presente em 100% das regiões produtoras até 2029, aumentando os prejuízos causados em decorrência da doença, conforme relatado por Behlau (2019) e Behlau (2021).

Além da perda econômica causada pelo avanço da doença, considerando-se o caráter de endemismo do cancro cítrico e a necessidade de aplicações constantes do cobre para controle da doença (FERENCE et al., 2018), têm-se gerado conseqüentemente um maior acúmulo desse metal nos solos e ambientes próximos aos pomares de citros. O cobre quando aplicado no solo pode causar a morte de diversos seres naturais daquele ambiente, como nematódeos, anelídeos, fungos e bactérias, desregulando todo o seu ecossistema (MARTINEZ et al., 2016). Por ser um metal pesado e bioacumulativo, o cobre ainda apresenta risco para a saúde humana, apresentando efeitos tóxicos para os seres vivos que são expostos frequentemente a este metal (KAZEMINEZHAD & MOSIVAND, 2017). Além disso, estudos recentes já relacionaram o efeito da alta aplicação de cobre na agricultura com a doença de Alzheimer em humanos (COELHO et al., 2020).

Os organismos vegetais também são afetados negativamente pelo cobre, quando este metal está sendo aplicado em excesso. O cobre é um elemento essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas (DUCIC & POLLE, 2005), participando de vários processos fisiológicos fundamentais, como sendo um cofator da enzima superóxido dismutase (SOD) responsável por eliminar as espécies reativas de oxigênio (ROS) (YRUELA, 2009; RAVET & PILON, 2013; HIPPLER et al., 2016). Além disso, o cobre é um dos principais constituintes da plastocianina, uma proteína responsável pelo transporte de elétrons durante a fotossíntese (HIPPLER et al., 2016). Porém, o excesso de cobre gera um estresse oxidativo nas plantas devido ao aumento da produção de ROS, resultando na disfunção proteica devido à ligação irreversível entre o excesso de Cu^{2+} e grupos sulfidrila (FERNANDES & HENRIQUES, 1991; RAVET & PILON, 2013; HIPPLER et al., 2016). Conseqüentemente, isso gera a degradação de proteínas e enzimas da célula vegetal, inibindo o crescimento da planta (YRUELA, 2009). Além da inibição de crescimento e perturbação bioquímica celular, o cobre em excesso também vai causar necrose e clorose dos órgãos vegetais, sendo sintomas visíveis da exposição excessiva das plantas a esse metal (DUCIC & POLLE, 2005).

Porém, até o presente momento as soluções cúpricas a base de cobre fixo (óxido de cobre, oxicloreto de cobre e hidróxido de cobre) são os únicos agentes efetivos aplicados em

campo para o controle do cancro cítrico, prevenindo e diminuindo a incidência da doença nos pomares (BEHLAU et al., 2021; BEHLAU, 2021). O cobre é um agente antimicrobiano muito eficiente, eliminando as células bacterianas pelo contato com o metal (GRASS et al., 2010), além de ser também eficiente na inibição da formação de biofilme da *X. citri* (FAVARO et al., 2017). O cobre fixo apresenta uma baixa solubilidade em água, o que o torna mais eficiente na fixação das folhas, revestindo toda a superfície da lâmina foliar, prevenindo assim a colonização e infecção das células de *X. citri*. A baixa polaridade do cobre fixo também diminui sua lixiviação das folhas por ações físicas ambientais como a chuva, garantindo uma atividade residual prolongada na superfície foliar após sua aplicação.

Apesar da eficiência dos compostos a base de cobre em prevenir pragas agrícolas, a Comissão Europeia cada vez mais tem restringido e limitado a quantidade de cobre a ser aplicado nas plantações, devido ao seu viés negativo no meio ambiente (LAMICHHANE et al., 2018). Outros países também têm colocado recentemente mais restrições e monitorado os efeitos da aplicação excessiva do cobre na agricultura. Na Austrália, por exemplo, o sulfato de cobre e hidróxido de cobre ainda são permitidos pelas autoridades certificadoras, mas o uso do oxiclreto de cobre na agricultura é proibido (VAN ZWIETEN et al., 2004; LAMICHHANE et al., 2018). Ademais, já existe registro de *X. citri* resistente ao cobre isolado na Argentina (CANTEROS et al., 1995). A identificação da existência de genes de resistência ao cobre presente em isolados de *X. citri* (BEHLAU et al., 2011), somado com os fatores negativos da aplicação do cobre em excesso na agricultura, apóiam a necessidade de se buscar formas alternativas para o manejo do cancro cítrico, reduzindo ou até mesmo substituindo a aplicação de cobre no campo.

2.2. A busca por possíveis alternativas ao cobre na citricultura

Diversas alternativas já foram propostas no combate e controle do cancro cítrico, visando uma agricultura mais sustentável e diminuindo conseqüentemente a aplicação de cobre no campo. Dentro delas a utilização de um metal diferente do cobre como o zinco. O zinco já tem sido empregado em formulações agrícolas, um exemplo é o Zinkicida, que reduziu aproximadamente em 42% o número de lesões de cancro em folhas de abacaxi, como relatado por Graham et al. (2016). Uma das vantagens de formulações utilizando o zinco é que ele pode vir a ser metabolizado pela planta, diferente do cobre que acaba se acumulando no ambiente (GRAHAM et al., 2016). O óxido de zinco, que é um composto inorgânico bactericida, é listado como GRAS (substância geralmente reconhecida como segura) pela Administração de Comidas e Remédios dos EUA (FDA), sendo cada vez mais utilizado na

agricultura e indústria alimentícia (ESPITIA et al., 2012). Porém, até o presente momento, as formulações de zinco testadas em campo para o controle e combate do cancro cítrico não obtiveram resultados satisfatórios quando comparados com o cobre (GRAHAM et al., 2016). Além da aplicação de metais, uma possibilidade é a busca e introdução de genes de resistência ou de defesa para planta frente ao fitopatógeno através da engenharia genética, produzindo plantas transgênicas resistentes à doença. Por permitir a modificação direta e específica do genoma da planta, preservando as características desejáveis e introduzindo os genes de interesse, a engenharia genética é uma alternativa para se produzir transgênicos resistentes a certas pragas. Neste caso, transgênicos de citros com uma maior resistência ao cancro cítrico (MARTINS et al., 2020). Apesar de ser uma alternativa viável e que já demonstrou resultados promissores como relatado por Martins et al. (2020), alguns mercados consumidores como a União Europeia tem tido uma aceitação menor de alimentos transgênicos, tendo uma preferência e aceitação cada vez maior para alimentos orgânicos (DEVOS et al., 2005; MAYA et al., 2011; DELWAIDE et al., 2015).

Substâncias orgânicas, como o ácido hexanoico, também já foram utilizados como indutores natural de resistência nos citros frente à infecção da *X. citri*, obtendo resultados satisfatórios na proteção contra o cancro cítrico em casa de vegetação, como é descrito por Llorens et al. (2015) e Caccalano et al. (2021). Outras substâncias orgânicas, como o Acibenzolar-S-metil, Bismertiazol, Imidacloprida e derivados de nicotinamida, também foram utilizados como indutores de resistência natural de citros contra o cancro cítrico, obtendo resultados eficazes quando aplicados de modo exógeno sobre condições controladas (FRANCIS et al., 2009; GRAHAM & MYERS, 2011; YU et al., 2016; ALFEREZ et al., 2018). Além de compostos orgânicos indutores de resistência, outra alternativa proposta têm sido os compostos orgânicos anfifílicos, como por exemplo o aromático anfifílico de piridina, que apresentou resultados positivos *in vitro* contra a bactéria *X. citri* (WANG et al., 2016), mas até o presente momento não foi testado em casa de vegetação ou em campo.

Outras possibilidades exploradas recentemente é o uso do controle biológico para combater a doença. Um exemplo disso é o uso de bactérias do gênero *Cronobacter*, *Enterobacter* e *Pseudomonas* que já apresentaram atividade inibitória frente as células de *X. citri* em testes *in vitro* (ADLER et al., 2012; GHOLAMI et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2016). Apesar dos gêneros *Cronobacter* e *Enterobacter* ainda não terem sido avaliados em experimentos de casa de vegetação ou em campo, a *Pseudomonas aeruginosa* LV já demonstrou resultados promissores nos ensaios de casa de vegetação, reduzindo em 90% o número de lesões de cancro cítrico nas plantas testadas (OLIVEIRA et al., 2016). A *P.*

aeruginosa é um patógeno humano oportunista, logo seu uso como um organismo para biocontrole deve ser rigorosamente regulamentado e fiscalizado (MARTINS et al., 2020), sendo um fator que pode vir a limitar sua aplicação. Bacteriófagos são outros agentes já estudados como possíveis candidatos para o controle biológico do cancro cítrico. Ibrahim et al. (2017) obteve sucesso na proteção de citros contra a infecção da *X. citri* quando aplicou compostos orgânicos indutores de resistência contra o cancro cítrico juntamente com bacteriófagos isolados de pomares de laranja. Yoshikawa et al. (2018) também relatou o isolamento de um bacteriófago de pomares de citros no Japão capaz de infectar e consequentemente causar a lise celular de diferentes isolados de *X. citri*. No entanto, os bacteriófagos apresentam uma atividade na superfície foliar muito curta, sendo necessária uma aplicação constante desses agentes, além disso, as soluções contendo os bacteriófagos devem conter altas concentrações desses vírus para se ter um efeito protetivo satisfatório (NILSSON 2014; FRAMPTON et al., 2012; KERING et al., 2019; MARTINS et al., 2020). Por conta desses fatores negativos a aplicação de bacteriófagos no campo pode vir a ser limitada. Outro grupo de organismos que apresentam potencial para o controle biológico do cancro cítrico são os fungos. Mitchell et al. (2010) relatou o potencial de uso do *Muscodor crispans* contra a *X. citri*, obtendo sucesso na inibição das células bacterianas durante seus experimentos *in vitro*. Vieira et al. (2018) também obteve sucesso no isolamento de fungos do solo e sedimento marinho da Antártica que produziam compostos bioativos com capacidade bactericida frente as células de *X. citri*. Mas até o presente momento, não se realizou nenhum estudo da atividade protetiva desses fungos ou de seus compostos bioativos em casa de vegetação ou em campo contra o cancro cítrico.

Os antibióticos também têm sido utilizados na agricultura para controlar as doenças bacterianas de plantas (STOCKWELL & DUFFY, 2012), sendo uma das alternativas mais antigas que ainda é utilizada. Estreptomicina e a oxitetraciclina são os antibióticos mais utilizados para formulações de defensivos agrícolas, porém a gentamicina e a kasugamicina também são usadas para formulações com foco agrícola (MCMANUS et al., 2002). Devido à aplicação constante de antibióticos ao longo do tempo, mais bactérias resistentes a esses compostos inibitórios tradicionais têm sido isoladas, diminuindo constantemente o número de agentes antimicrobianos efetivos para o controle de micro-organismos (CANTÓN & MOROSINI, 2011; SILVER, 2011). O uso incorreto e excessivo de antibióticos tem gerado preocupações em escalas globais, já que muitas vezes é possível encontrar traços de antibióticos nos sistemas de água, indicando que eles estão sendo descartados e entrando em contato direto com outros micro-organismos, gerando uma seleção e indução de resistência

em novas espécies microbianas, conforme relatado por Shao et al. (2021). Existe uma grande preocupação do uso de antibióticos em larga escala na agricultura, sendo que essa aplicação constante de antibióticos pode levar a seleção de bactérias resistentes (MCKENNA, 2019). A União Europeia e o Brasil baniram o uso de estreptomicina e a oxitetraciclina na agricultura, porém nos EUA eles ainda são permitidos e no passado foram utilizados para controlar o cancro cítrico (GRAHAM et al., 2008). No entanto, cepas de *X. citri* resistentes à estreptomicina já foram isoladas do campo (HYUN et al., 2012; BEHLAU et al., 2012). Desta forma, além de um controle maior da aplicação de compostos antimicrobianos e antibióticos, torna-se necessário a busca por novas moléculas e compostos que possam ser aplicados frente aos micro-organismos, buscando controlar e combater as doenças causadas por esses patógenos. Porém, a descoberta de novos compostos antimicrobianos é lenta, e muitas vezes os processos são realizados ou analisados de forma incorreta, gerando valores de concentração inibitórios mínimos (MIC) errados ou produzindo compostos inviáveis para aplicação (KOWALSKA-KROCHMAL & DUDEK-WICHER, 2021). Um agente antimicrobiano pode atuar de diferentes formas para levar as células bacterianas à morte, agindo na superfície celular (parede celular e membrana citoplasmática), internamente (bloqueio direto ou indireto de biossínteses e divisão celular) ou em ambos os alvos tendo múltiplos mecanismos de ação (interna e externa) (DEVASAHAYAM et al., 2010; SILVER, 2011). Os compostos bactericidas mais promissores são aqueles que têm como alvo a divisão celular ou a membrana citoplasmática bacteriana (LOCK E HARRY, 2008; EPAND et al., 2016; MORÃO, 2018). No caso a divisão celular em procarióticos é bem distinta dos eucarióticos, sendo que as proteínas e enzimas envolvidas nesse processo são diferentes.

Recentemente, tem-se destacado cada vez mais a utilização de compostos naturais ou derivados de moléculas de origem natural para o desenvolvimento de agentes bioativos com atividade bactericida (CAVALCA, 2018; MORÃO, 2018; ÁLVAREZ-MARTÍNEZ et al., 2021; JOSHI et al., 2021; NG et al., 2021), sendo aplicados contra patógenos humanos (MORÃO, 2018; POLAQUINI et al., 2019), na sanitização de alimentos (BATTAGIN et al., 2021) ou contra fitopatógenos (CAVALCA, 2018; MORÃO, 2018; CAVALCA et al., 2020; CACCALANO et al., 2021). Esses agentes bioativos têm a vantagem de ser bactericida, apresentar baixa toxicidade, mecanismos de ação específicos para as células procarióticas, além de não induzir ou selecionar bactérias resistentes (CAVALCA, 2018; MORÃO, 2018; POLAQUINI et al., 2019; MORÃO et al., 2019). Os óleos essenciais são um exemplo de compostos bioativos aromáticos voláteis de origem vegetal que apresentam atividade inibitória frente a diversos micro-organismos, sendo bons candidatos para utilização na

indústria alimentícia (CALO et al., 2015). Battagin et al. (2021) descreveu a atividade bactericida do óleo essencial de cravo frente as células de *X. citri*, além de ter obtido sucesso na sanitização de limões contaminados com este fitopatógeno. Além dos óleos essenciais, moléculas bioativas de origem vegetal como o cinamaldeído também já foram relatados como sendo eficazes na inibição de células de *X. citri* (ZAMUNER et al., 2020). Dentre essas moléculas bioativas de origem natural podemos citar também os ésteres de ácidos gálicos (Galatos), que são sintetizados de matrizes orgânicas naturais e sintéticas. Os galatos têm sido estudados e aplicados como agentes inibidores de micro-organismos em diversas áreas, mas principalmente com foco em bactérias de interesse clínico (KUBO et al., 2002; GUPTA et al., 2021). Os ésteres de ácido gálico (Galatos) possuem vantagem de ter um efeito muito eficiente em inibir bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, podendo ser utilizados como um agente efetivo no combate de bactérias patogênicas humanas formadoras de biofilmes, como relatado por Kang et al. (2008). Esses compostos apresentam também atividade anticarcinogênica, tendo potencial de uso para combate de células tumorais (LOCATELLI et al., 2013). Nosso grupo de pesquisa obteve sucesso na síntese e aplicação de galatos no combate de *X. citri* subsp. *citri* *in vitro* e *in vivo* sob condições controladas (KRÓL et al., 2015; SILVA & FERREIRA 2013; SILVA et al., 2013; CAVALCA, 2018; CAVALCA et al., 2020). Porém, diferente do cobre fixo que apresenta uma fixação foliar muito eficiente devido sua baixa polaridade, assegurando uma proteção residual prolongada nas folhas de citros contra a infecção da *X. citri*, os galatos produzidos até agora não apresentam nenhum tipo de fixação ou efeito residual prolongado após a aplicação. Tornando assim inviável a sua aplicação em campo até o presente momento.

Os peptídeos antimicrobianos são conhecidos desde seu primeiro isolamento (BULET et al., 1999; BULET et al., 2004) como agentes eficientes na inibição de bactérias e células tumorais, sendo proteínas vitais para o sistema imunológico de diversos seres vivos como insetos, mamíferos, anfíbios, peixes e plantas de acordo com seus diferentes alvos, como relatado por Li et al. (2021). Os peptídeos antimicrobianos podem ser divididos em antivirais, antibacterianos, antifúngicos e peptídeos antiparasitários (BAHAR & REN, 2013; JENSSEN, et al., 2020). Diferentemente dos antibióticos tradicionais que têm como alvo proteínas específicas em bactérias para interromper a reação metabólica e o crescimento celular, os peptídeos antimicrobianos rompem a membrana citoplasmática bacteriana, causando a lise e conseqüentemente à morte celular (LI et al., 2021). Portanto, os peptídeos antimicrobianos não selecionam ou induzem o surgimento de bactérias resistentes a esses agentes, pois resistência necessitaria que a célula bacteriana passasse por diversos eventos de mutações

genéticas para alterar todos os componentes do alvo (membrana citoplasmática) (HUANG & CHARRON, 2017; LEE et al., 2019; ZASLOFF, 2019; LI et al., 2021). Por este motivo, os peptídeos antimicrobianos têm sido cada vez mais estudados como sendo uma alternativa para produção de novas drogas para o combate de patógenos humanos que têm desenvolvido resistência aos antibióticos tradicionais nos últimos anos (ROQUE-BORDA et al., 2021). Até o presente momento, existem mais de três mil peptídeos antimicrobianos identificados (LI et al., 2021), sendo sua aplicação já estudada e comprovada como agentes eficazes no combate a células tumorais (OLIVEIRA et al., 2021), patógenos bacterianos (KAZEMZADEH-NARBATA et al., 2021; ROQUE-BORDA et al., 2021) e contra fitopatógenos (DAS et al., 2019). Atualmente sete peptídeos antimicrobianos já são aprovados pela Administração de Comidas e Remédios dos EUA (FDA) para uso no mercado alimentício ou em desenvolvimento de fármacos para uso clínico, sendo uma tendência cada vez maior o desenvolvimento e aplicação desses peptídeos nas mais diversas áreas (DATTA & ROY, 2021; LI et al., 2021). No entanto, para o desenvolvimento de um protetivo agrícola, os peptídeos antimicrobianos também têm dificuldade de se fixar nas folhas, não conseguindo prolongar seu efeito antimicrobiano e protetivo foliar contra a infecção de fitopatógenos, inviabilizando a sua aplicação em campo agrícola como uma alternativa aos agroquímicos tradicionais.

Os peptídeos de ancoragem são proteínas estáveis às diversas condições ambientais naturais, com uma alta capacidade de fixação em diversas superfícies, tendo uma grande adesão em diversos materiais como folhas, polímeros, cerâmicas e cimento (RÜBSAM et al., 2017; SCHWINGES et al., 2019; JI et al., 2021). As interações entre os peptídeos e as superfícies cobrem um amplo espectro de forças intermoleculares (RUSMINI et al., 2007), sendo capazes de se aderir a diversas superfícies e não ser facilmente removido por ações de intempéries como calor, chuva e ventos (SCHWINGES et al., 2019). Diversos estudos tem obtido sucesso em diferentes aplicações desses peptídeos de ancoragem, sendo já comprovado sua eficiência na aplicação conjunta de outros compostos para o combate e controle de fitopatógenos (SCHWINGES et al., 2019), como um sistema de imobilização e liberação de enzimas (NÖTH et al., 2021), na degradação de reciclagem de plásticos (JI et al., 2021) e no revestimento e adesão de polímeros (RÜBSAM et al., 2017). O grupo de pesquisa do Prof. Dr. Ulrich Schwaneberg e Dr. Felix Jakob da RWTH Aachen University (Aachen, Alemanha), foi pioneiro na síntese e aplicação desses peptídeos de ancoragem nas mais diversas áreas. Além disso, são especialistas em evolução dirigida para a construção e

produção de peptídeos de ancoragem fusionados com peptídeos antimicrobianos. Esta tecnologia foi patenteada (DPMA-AKZ: 102015203317.1) pelo grupo Alemão.

O grupo de pesquisa do Prof. Dr. Andrij Pich da RWTH Aachen University (Aachen, Alemanha) tem desenvolvido microgéis supramoleculares, sendo a base da matriz polimérica feitas de ácido tânico (AT) (LÓPEZ & PICH, 2018) ou metacrilato de glicidil (GMA) (AGRAWAL et al., 2013). Esses microgéis possuem permeabilidade aquosa, não atrapalham a passagem da radiação solar, possibilitam atividades enzimáticas e são biodegradáveis (AGRAWAL et al., 2013). Esses microgéis supramoleculares podem atuar como carreadores ou imobilizar compostos para a liberação lenta e prolongada no ambiente, sendo veículos poliméricos ideais para encapsular compostos bioativos para aplicação em plantas. Além disso, o grupo do Prof. Dr. Pich já obteve sucesso na aplicação dos microgéis supramoleculares como carreadores de fertilizantes para a liberação controlada para a nutrição de plantas (MEURER et al., 2017). Os microgéis supramoleculares de AT e GMA são compatíveis com diversas moléculas, além de serem compatíveis também com os peptídeos de ancoragem, podendo imobilizar em sua matriz polimérica os galatos juntamente com os peptídeos de ancoragem para fixação nas folhas e liberação controlada do composto bactericida.

Desta forma, o presente trabalho teve como meta a produção e avaliação de duas diferentes frentes para o controle e proteção de plantas cítricas contra a *X. citri*. A primeira proposta foi à produção de microgéis de matriz polimérica de GMA contendo o peptídeo de ancoragem em sua superfície e os galatos imobilizados no interior de sua estrutura. Desta forma, os peptídeos de ancoragem iriam se fixar na lâmina foliar, enquanto que o galato seria liberado de forma controlada, mantendo uma atividade bactericida e protetiva prolongada nas folhas dos citros. A segunda frente protetiva avaliada foi à produção e aplicação de peptídeos antimicrobianos fusionados com peptídeos de ancoragem, permitindo a fixação dessas proteínas nas folhas de forma que a atividade bactericida continuasse presente sem ser facilmente lixiviada do limbo foliar. Utilizando e compartilhando tecnologia de diferentes universidades e países, o trabalho traz pela primeira vez duas plataformas nunca antes testadas contra a *X. citri*, propondo uma possível alternativa para o controle do cancro cítrico.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Imobilizar e aplicar agentes bactericidas nas partes aéreas de citros utilizando peptídeos e/ou microgel como ancoradores visando à proteção contra o fitopatógeno *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

3.2. Objetivos específicos

- Sintetizar peptídeos bactericidas fusionados com peptídeos fixadores (realizado em colaboração com DWI – Leibniz – Institute for Interactive Materials, RWTH Aachen University, Alemanha);
- Imobilizar galatos em microgéis com peptídeos de ancoragem (realizado em colaboração com Institute of Technical and Macromolecular Chemistry, RWTH Aachen University, Alemanha);
- Avaliação da atividade antimicrobiana dos materiais protetivos propostos frente às células de *X. citri*;
- Ensaios dos mecanismos de ação dos materiais protetivos propostos frente às células de *X. citri*;
- Teste em plantas, buscando avaliar a capacidade protetiva dos compostos propostos frente à infecção da bactéria *X. citri*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Micro-organismos

Utilizou-se neste trabalho a linhagem bacteriana selvagem de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 (IBSBF-1594) e o mutante *Xanthomonas citri amy::pPM2a-zapA* (*X. citri amy::pPM2a-zapA*) expressando GFP-ZapA (MARTINS et al., 2010). Ambas as linhagens se encontram armazenadas em freezer -80 °C no Laboratório de Genética de Bactérias pertencente à Universidade Estadual Paulista (UNESP) *campus* Rio Claro-SP.

4.2. Preparo e crescimento do inóculo

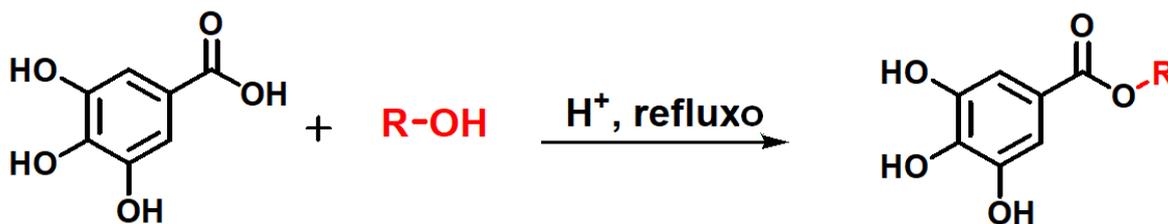
Os micro-organismos foram reativados do freezer -80 °C em meio de cultivo sólido NYG-Agar (5 g L⁻¹ de peptona bacteriológica, 3 g L⁻¹ de extrato de levedura, 20 mL de Glicerol e 15 g L⁻¹ de Agar), sendo encubados por 48 horas a 29 ± 1 °C (ZAMUNER et al., 2020). Após o crescimento das colônias bacterianas, o inóculo era preparado em 30 mL de meio de cultivo líquido NYG em potes coletores com volume total de 100 mL (potes de urina). Os potes foram incubados por 16 ± 2 horas a 29 ± 1 °C sob agitação constante de 200 rpm. O número de células por volume foi determinado por contagem de colônias em placa, sempre relacionando os valores de Unidade de Formação de Colônias (UFC) pelo volume do líquido com a densidade óptica (DO) do meio de cultivo através do espectrofotômetro UV-Vis Beckman Coulter DU 730 (Brea, EUA). Para todos os ensaios descritos neste trabalho, as células foram coletadas na fase de crescimento exponencial (DO_{600nm} ~ 0,4) e caso necessário, diluídas antes do uso.

4.3. Síntese dos galatos

Os galatos foram sintetizados nas dependências do Laboratório de Química Verde & Medicinal, Departamento de Química e Ciências Ambientais – UNESP *campus* São José do Rio Preto-SP, sob supervisão do Prof. Dr. Luis Octavio Regasini. Os galatos foram preparados por meio da reação de esterificação de Fischer entre o ácido gálico e alcoóis de cadeias alquílicas não ramificadas (G6 e G10), sob refluxo e catálise ácida (Figura 4). O composto foi purificado por meio da técnica de cromatografia em coluna de fase normal (gel de sílica), utilizando como fase móvel misturas de hexano e acetato de etila. A caracterização das substâncias foi realizada por meio de técnicas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e carbono treze (RMN ¹³C), e Espectrometria de Massas

(EM). Toda a parte de caracterização dos galatos utilizados no presente trabalho também foi realizada pelo grupo do Prof. Dr. Luis Octavio Regasini.

Figura 4. Reação geral para a síntese dos galatos de alquila G-6 e G-10 $(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$.



Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

4.4. Síntese dos microgéis

Os microgéis supramoleculares, com matriz polimérica composta por cadeias de GMA, biocompatíveis ao AT (composto polifenólico bioativo), foram sintetizados no Institute of Technical and Macromolecular Chemistry - RWTH Aachen University (Aachen, Alemanha), sob supervisão do Prof. Dr. Andrij Pich. Os microgéis foram sintetizados para atuar como nanocarreadores biodegradáveis e biocompatíveis com os compostos bioativos (galatos), peptídeo de ancoragem e o AT. Este polifenol serve como doador de hidrogênio e, portanto, pode ser usado como reticulante físico para a síntese de microgels. Por conseguir imobilizar em sua matriz polimérica qualquer substância orgânica de origem biológica, os microgéis supramoleculares de GMA são considerados como os carreadores biocompatíveis mais indicados para imobilização de peptídeos de ancoragem e os galatos.

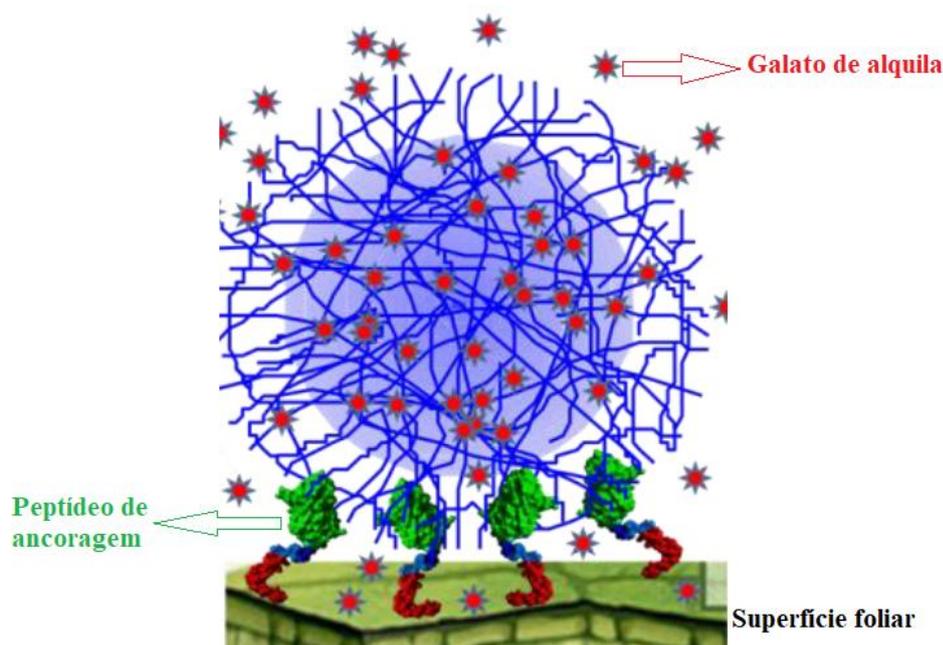
A incorporação do galato no microgel foi realizada de modo similar ao AT, onde as soluções dos compostos foram adicionadas na síntese do microgel em seu estado líquido. Devido ao fato de que o AT, bem como os galatos, são derivados do ácido gálico, suas estruturas químicas são baseadas na mesma unidade polifenólica. Isso permite interações semelhantes com as cadeias GMA, possibilitando a incorporação dos componentes antibacterianos como reticuladores adicionais. Devido à solubilidade do galato (G6 e G10) sua incorporação foi realizada em sulfóxido de dimetilo (DMSO), enquanto que o AT foi realizado em solução aquosa. Devido ao fato do AT e galatos terem estruturas químicas muito semelhantes, é difícil realizar a análise química seletiva para distinguir os dois componentes da estrutura do microgel. Dessa forma, a concentração do AT e dos galatos no microgel foi relacionada com as proporções de (v/v) utilizadas durante o processo da síntese orgânica dos microgéis.

4.5. Imobilização do peptídeo de ancoragem nos microgéis

O peptídeo de ancoragem escolhido para compor a estrutura do microgel foi o hDermcidin (hDerm), sendo um peptídeo já descrito como um bom fixador em folhas (SCHWINGES et al., 2019), além de ser um peptídeo estável e compatível com a estrutura do microgel de matriz polimérica de GMA. A produção do peptídeo de ancoragem hDerm foi realizada pelos colaboradores alemães da DWI – Leibniz – Institute for Interactive Materials, RWTH Aachen University (Aachen, Alemanha), sob a supervisão do Dr. Felix Jakob.

Para a imobilização na matriz polimérica, os microgéis foram dispersos em uma solução tampão de tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) a 50 mM com pH = 8. Em seguida a solução ficou sob agitação constante de 250 rpm a 25 ± 1 °C. Após 2 horas de agitação, adicionou-se o peptídeo hDerm para uma concentração final de 0,1% (v/v) na solução de microgel. A solução ficou em seguida sob agitação constante de 100 rpm por 18 horas, até a total homogeneização do microgel com o peptídeo. Para a purificação, os conjugados de microgel com o peptídeo hDerm foram centrifugados a 3500 rpm por 15 minutos com temperatura constante de 25 ± 1 °C. Descartou-se o sobrenadante, o microgel final foi pesado e ressuspenso novamente em água deionizada autoclavada. A Figura 5 mostra uma representação visual do microgel supramolecular com o galato de alquila imobilizado em sua matriz polimérica e o peptídeo de ancoragem hDerm revestindo sua parte externa.

Figura 5. Modelo esquemático dos microgéis com galatos imobilizados em sua matriz polimérica revestido em sua superfície com os peptídeos de ancoragem.

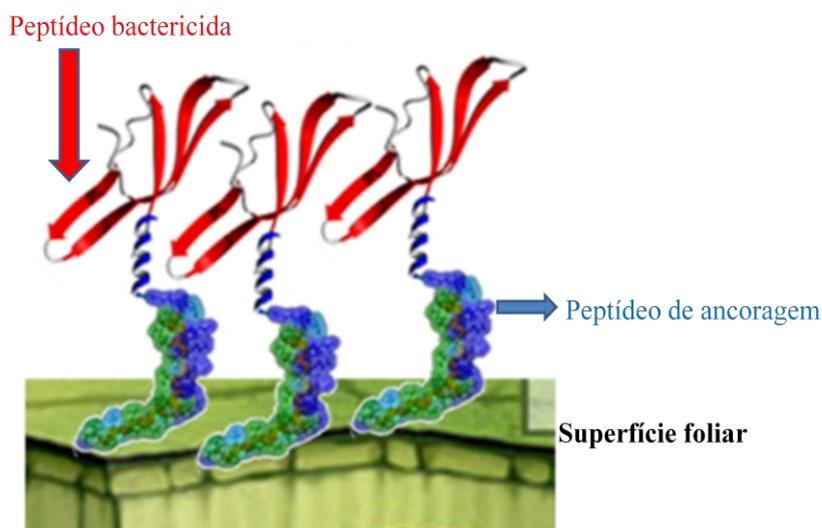


Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

4.6. Peptídeos bifuncionais

A produção dos peptídeos bifuncionais foi conduzida pelo grupo colaborador alemão da DWI – Leibniz – Institute for Interactive Materials na RWTH Aachen University (Aachen, Alemanha), sob a supervisão do Dr. Felix Jakob. Os peptídeos bifuncionais foram encomendados como genes sintéticos (GenScrip Biotech, Holanda) no vetor pet28a (+), que foram transformados em *Escherichia coli* BL21. Uma única colônia de cada construção foi transferida para 5 mL de meio de cultivo Luria-Bertani (LB) (10 g L⁻¹ de Triptona; 5 g L⁻¹ de extrato de levedura e 10 g L⁻¹ de cloreto de sódio) e incubada por 16 horas a 37 °C, sob agitação constante de 180 rpm. A pré-cultura (1 mL) foi usada para inocular a cultura principal (100 mL de meio LB, 37 °C, 180 rpm). A cultura principal foi cultivada até a DO₆₀₀ nm atingir 0,60. A superexpressão de proteínas foi induzida pela suplementação de isopropil β-d-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) com concentração final de 0,1 mM. Após a indução, a temperatura de cultivo foi reduzida para 20 °C. As células foram colhidas após 48 horas por centrifugação (4000 rpm por 20 minutos a 4 °C). O sobrenadante passou por filtração utilizando membrana porosa de 0,45 μm, composta de acetato de celulose (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). A construção contém um Strep-Tag e foi purificada utilizando um sistema de cromatografia líquida de proteína rápida (ÄKTAprime – GE Healthcare, Little Chalfont, UK) com uma coluna de cromatografia de afinidade Strep-Tactin pré-empacotada (Strep-Tactin Superflow Plus Cartridges 5 mL – Qiagen, Düsseldorf, Alemanha). As amostras foram dessalinizadas usando uma membrana de diálise (Spectra/Por®4 – Spectrum Inc., Breda, Holanda) e concentradas através de centrifugação por 15 minutos a 2000 xg usando filtros de centrífuga (Amicon Ultra-15, 15 mL - corte 3 KDa – Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). A quantificação dos peptídeos foi realizada através do kit colorimétrico BCA Protein Assays (Thermo-Scientific A53225, Waltham, EUA). Após a purificação e quantificação, os peptídeos bifuncionais foram mantidos no escuro a 8 °C. A Figura 6 mostra a conformação estrutural esperada dos peptídeos bifuncionais produzidos no presente trabalho.

Figura 6. Modelo esquemático dos peptídeos bifuncionais, sendo sua porção inferior um peptídeo de ancoragem fusionado com o peptídeo bactericida na parte superior.



Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

4.7. Avaliação da inibição do crescimento bacteriano pelo método de Microtitulação em Placa com Resazurina (REMA)

Utilizou-se a técnica de Microtitulação em Placa com Resazurina (REMA) com algumas adaptações descritas por Silva et al. (2013), para avaliar a capacidade inibitória dos compostos bioativos, peptídeos bifuncionais e dos microgéis. Placas de microtitulação com 96 poços foram usadas para os testes. Nestes poços foram colocados os compostos testados (galatos, peptídeos e microgéis), com concentrações máximas estabelecidas previamente para cada composto de acordo com sua singularidade, sendo esta dose diminuída nos poços subsequentes em diluição seriada (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128). As bactérias foram então inoculadas nos poços a uma concentração de 10^5 células por 100 μL . Utilizou-se também um controle negativo (sem composto), positivo (Canamicina á 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e o controle do veículo sendo água deionizada autoclavada com 50% v/v de concentração. As placas foram então incubadas durante 16 horas a 29 °C. Em seguida foi pipetado uma aliquota de resazurina (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) em cada poço, obtendo uma concentração final de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Após uma hora de reação, a conversão de resazurina para resorufina, composto fluorescente, foi medida utilizando-se o leitor de placas Synergy H1N1 (BioTek®, Winooski, EUA) e os comprimentos de onda de 530 nm de excitação e 590 nm de emissão. Aqui, a mudança de coloração do meio (azul para rosa) indica que houve a redução da resazurina para resorufina na presença de NADH (célula respirando), sendo possível determinar a porcentagem de células inibidas (CI) pelo composto. A porcentagem de inibição

de células dos tratamentos em relação ao controle negativo foi calculada segundo a Equação 1.

Equação 1:

$$CI(\%) = \frac{(UAFc - UAFt).100}{UAFc}$$

Onde $CI(\%)$ é a porcentagem de células inibidas, $UAFc$ é o valor médio das unidades arbitrárias de fluorescência do controle negativo, $UAFt$ é o valor médio das unidades arbitrárias de fluorescência das amostras.

Através dos gráficos de dose-resposta obtidos, aplicou-se uma regressão polinomial, derivando os valores de CI em relação às diferentes concentrações dos compostos testados, conforme descrito por Morão et al. (2019). Todos os testes foram realizados em triplicatas técnicas, com três repetições para cada composto nas placas de microtitulação e em três eventos independentes. Os resultados obtidos foram analisados e verificado seus valores através do modelo matemático de desvio padrão de acordo com a Equação 2.

Equação 2:

$$DS = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N \left(\frac{Qie - Qic}{Qie} \right)^2}$$

Onde Qie e Qic são dados experimentais e calculados respectivamente, DS é o desvio padrão e N é o número de medições.

4.8. Avaliação do efeito bactericida dos compostos

Para a avaliação do potencial bactericida ou bacteriostático dos compostos testados, um ensaio de MBC (Concentração Mínima Bactericida) foi realizado. Uma fração do teste de REMA foi inoculada em meio NYG sólido, antes da adição do agente revelador resazurina, com os inóculos transferidos por meio de um replicador de placa (96-replicador - 8×12 Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha). Em seguida, as placas foram incubadas em B.O.D. a 29 °C durante 48 horas. Após este período de incubação, as placas foram avaliadas quanto ao crescimento bacteriano em meio NYG, livre de quaisquer compostos.

4.9. Avaliação do mecanismo de ação dos compostos testados

Alguns dos possíveis mecanismos de ação dos peptídeos bifuncionais e microgéis foram avaliados através de técnicas de microscopia de fluorescência, analisando a permeabilidade da membrana citoplasmática e desestruturação do septo de divisão celular. Dessa forma, as células de *X. citri* foram expostas aos peptídeos bifuncionais e microgéis que apresentaram resultados positivos nos testes de REMA e MBC. Os compostos testados foram colocados em concentrações equivalentes às suas CI_{90} e CI_{50} em microtubos de 1,5 mL com 100 μ L de meio NYG e 10^5 células de *X. citri*. As células ficaram em contato com os compostos por 15 minutos. Ao final do tempo de exposição, 900 μ L de meio NYG foram adicionados em cada tubo para diluir o composto e interromper a reação deles com as células bacterianas. Em seguida, as células foram coradas com o kit Live/Dead BacLight (Thermo-Scientific L7012, Waltham, EUA), onde o corante de ácido nucléico SYTO9 (azul) cora todas as células, enquanto que o iodeto de propídeo (IP) (vermelho) penetra apenas as células com a membrana citoplasmática danificada (ZHOU et al., 2018). O controle negativo (células com a membrana citoplasmática intacta) e positivo (células com disrupção da membrana citoplasmática) foram feitos de acordo com Savietto et al. (2018), onde o controle negativo foram as células de *X. citri* sem ter tido exposição com qualquer um dos compostos, e o positivo foi feito através de estresse de temperatura. As células foram então imobilizadas em lâmina de agarose para em seguida serem observadas no microscópio de fluorescência (MARTINS et al., 2010).

Para analisar a atividade dos compostos testados quanto a sua capacidade em desestruturar o septo divisional da bactéria, utilizou-se o mutante de *X. citri amy::pPM2a-zapA* expressando GFP-ZapA, com marcação da proteína verde fluorescente (GFP), para o septo divisional (MARTINS et al., 2010). Cem microlitros de cultura da *X. citri amy::pPM2a-*

zapA com 10^5 células, em microtubos de 2,0 mL, foram tratados com os compostos testados em suas respectivas concentrações de CI_{90} e CI_{50} durante 15 minutos de contato com temperatura constante de 30 °C. Após esse período, as células foram então imobilizadas em lâminas de agarose e em seguida observadas para identificar a presença ou ausência do septo de divisão celular (MARTINS et al., 2010; SAVIETTO et al., 2018). Como controles negativos utilizaram-se as células de *X. citri amy::pPM2a-zapA* que não tiveram contato com os agentes testados.

Todas as observações foram realizadas no microscópio de fluorescência Olympus BX61 (Olympus, Tóquio, Japão), equipado com câmera monocromática OrcaFlash 2.8 (Hamamatsu, Japão) e as análises de imagens foram feitas com o software Cell Sens versão 11.0 (Olympus, Tóquio, Japão).

4.10. Fitotoxicidade

Para os testes de fitotoxicidade, utilizaram-se sementes de Rúcula (*Eruca sativa*) da marca ISLA (lote: 139547-003 S2, índice de germinação de 96%, safra 17/17, 100% de pureza, livre de transgênicos e agrotóxicos, com validade até 12/2022). Os procedimentos para os testes de fitotoxicidade seguiram de acordo com o método descrito e adaptado por Morais Jr & Bidoia (2015), onde papéis filtros estéreis foram colocados em placas de Petri de vidro (150×20 mm) autoclavadas. Em seguida, o papel filtro foi embebido com 3 mL de cada composto testado com diferentes concentrações. Logo após, 20 sementes da respectiva espécie testada foram colocadas nas placas de Petri com um espaçamento adequado de ~2 cm para a germinação, conforme ilustrado na Figura 7. As placas com as sementes foram incubadas em B.O.D. com temperatura constante de 21 ± 1 °C no escuro, por um período total de 5 dias. Como controle positivo foi utilizado sulfato de zinco heptahidratado $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (Número CE: 231-793-3, Fórmula química: $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, Massa molar: $287,54 \text{ g mol}^{-1}$, Chemical Abstract Service (CAS): 7446-20-0, Merck, Darmstadt, Alemanha) e como controle negativo água filtrada autoclavada.

Figura 7. Disposição das sementes de *E. sativa* nas placas de Petri, permitindo que as sementes tenham espaço suficiente para a sua germinação.



Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

Após período de incubação foram realizadas as contagens da quantidade de sementes germinadas em cada um dos tratamentos. Todas as sementes germinadas foram escaneadas e as medidas das radículas foram determinadas com o auxílio do software ImageJ.

Através dos cálculos de Germinação Relativa (%) (Equação 3) e Elongação Radicular Relativa (%) (Equação 4), pode-se analisar o Índice de Germinação % (IG) (Equação 5) fator entre a elongação da radícula e germinação de sementes, podendo assim calcular a toxicidade dos compostos determinando a concentração letal (CL) (PECORA et al., 2018).

Equação 3:

$$GR(\%) = \frac{(NSGa).100}{NSGc}$$

Equação 4:

$$ERR(\%) = \frac{(EMa).100}{EMc}$$

Equação 5:

$$IG(\%) = \frac{GR.ERR}{100}$$

Sendo o GR a Germinação Relativa, NSG_a é o Número de Sementes Germinadas na Amostra, NSG_c representa o Número de Sementes Germinadas no Controle, ERR é o valor da Elongação Radicular Relativa, EM_a representa o Elongamento Médio na Amostra, EM_c é o valor do Elongamento Médio no Controle, e o Índice de Germinação é o IG.

Os experimentos foram feitos em triplicatas. Os gráficos e os cálculos de alongação radicular, índice de germinação e desvio padrão foram feitos com o auxílio do software OriginPro 8.0. A validade do experimento foi atestada quando o IG (%) foi igual ou superior a 90% para o controle negativo e igual ou inferior a 10% para o controle positivo.

4.11. Teste de citotoxicidade

A linhagem celular de macrófago de monócitos BALB/c de camundongo, J774A.1 (ATCC® TIB-67™) usada neste estudo foi obtida da American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, EUA) e cultivada no meio de cultura complexo DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium (Thermo Fisher, Waltham, EUA) suplementado com FBS (Soro bovino fetal) a 10%, 1% de penicilina (100 Da mL⁻¹) e 100 mg mL⁻¹ de estreptomicina. As células foram mantidas em ambiente umidificado a 37 °C com 5% de CO₂, sendo cultivadas duas vezes por semana. A viabilidade das células foi verificada antes de conduzir os experimentos usando uma solução recém-preparada de azul de tripano (0,05%, 10 mL), onde apenas as células mortas são coradas permitindo assim a contagem das células vivas, que não devem ser inferiores a 90% para os ensaios de toxicidade.

A toxicidade celular dos compostos testados para as células J774.A1 foi avaliada conforme a técnica descrita por Silva et al. (2017), onde o ensaio é baseado na redução da resazurina, formando a resorufina, confirmando a atividade e viabilidade metabólica celular. As células inviáveis perdem rapidamente a capacidade metabólica de reduzir a resazurina, conseqüentemente, não ocorre à formação da resorufina. Para o experimento, $2,5 \times 10^4$ células J774.A1 foram cultivadas em uma placa de 96 poços de microtitulação e tratadas com os compostos em diferentes concentrações por 24 horas. Após a incubação, o meio foi removido e uma solução de resazurina em DMEM foi adicionada a cada poço, obtendo uma concentração final de 10 µg mL⁻¹ de resazurina em cada poço. Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C, sob 5% de CO₂ por 4 horas. A fluorescência foi medida em leitor de microplacas Synergy H1 (BioTek®, Winooski, EUA) usando um comprimento de onda de excitação de 530 nm e um comprimento de onda de emissão de 590 nm. Três ensaios independentes foram realizados. O valor da concentração letal (CL) de 50%, que representa a

concentração da amostra necessária para inibir 50% da proliferação celular, foi calculado a partir de uma curva de calibração por análise de regressão polinomial (SILVA et al., 2017).

4.12. Teste protetivo em casa de vegetação

Mudas de *Citrus sinensis* cultivar (cv) Pêra, com aproximadamente 50 cm de altura, foram mantidas em casa de vegetação com umidade e temperatura controladas (umidade média de 81,50%, com máximo de 93,10% e mínimo de 51,58%; temperatura média de 25,31 °C, com máximo de 37,66 °C e mínimo de 17,42 °C, durante todo o período experimental de 29/11/2020 a 06/01/2021). O potencial do peptídeo e dos microgéis em interferir na capacidade da *X. citri* de infectar e causar o cancro cítrico foi avaliado através de ensaio de aspersão dos compostos, seguindo a metodologia descrita por Caccalano et al. (2021).

Primeiramente, selecionaram-se duas plantas por grupo de tratamento. Marcou-se dois ramos de cada uma das plantas selecionadas, sendo escolhido os ramos com maiores números de folhas jovens de tamanho médio com aproximadamente 4 cm (fase V4) (FUNDECITRUS, 2019). Em seguida, pulverizaram-se os ramos marcados com cada um dos respectivos tratamentos, sendo eles: o controle negativo (solução salina com NaCl á 0,85%), a formulação comercial de cobre Difere (350 g L⁻¹ de cobre metálico e 588 g L⁻¹ de oxiclreto de cobre) na concentração recomendada na bula de 2 mL L⁻¹ (700 µg mL⁻¹ de cobre metálico) (Oxiquímica Agrociência Ltda. Jaboticabal, Brasil) (controle positivo), os microgéis e peptídeos em diferentes concentrações visando encontrar a dose mais adequada de aplicação. Os ramos foram pulverizados até o ponto de escorrimento durante 2 minutos (cobrindo a parte abaxial e adaxial das folhas), com 100 mL de cada um dos respectivos compostos testados, utilizando borrifadores manuais. Após 24 horas, as plantas foram pulverizadas com suspensão bacteriana de *X. citri* a 10⁸ UFC mL⁻¹ em solução salina (NaCl a 0,85%). Após esta etapa, as plantas foram cobertas com sacos plásticos transparentes por 24 horas, gerando uma câmara úmida, para auxiliar na infecção bacteriana (CACCALANO et al., 2021). As plantas foram observadas ao longo de 35 dias quanto ao aparecimento de sintomas. Os testes foram realizados com três repetições independentes. A eficácia protetora foi medida determinando-se a relação entre a área foliar total e o número de lesões formadas utilizando-se o software ImageJ Fiji e expressa como lesões por centímetro quadrado (CAVALCA et al., 2020; CACCALANO et al., 2021). Todos os dados obtidos neste experimento foram submetidos à análise estatística não paramétrica de Kruskal-Wallis (Dunn), considerando cada folha como um indivíduo, com três graus de liberdade utilizando o software BioEstat 4.

4.13. Teste protetivo em casa de vegetação com uma etapa de lavagem

Para avaliar a capacidade de fixação dos peptídeos de ancoragem utilizados nos microgéis e fusionados com os peptídeos bactericidas, realizou-se outro experimento em casa de vegetação, nos mesmos moldes do teste descrito anteriormente (4.12 Teste protetivo em casa de vegetação), porém com uma etapa de lavagem antes da aspersão do inóculo. Foram utilizadas para esse ensaio mudas de *C. sinensis* cv Pêra com altura de ~50 cm de altura, sendo mantidas em casa de vegetação com umidade e temperatura controladas (umidade média de 85,33%, com máximo de 94,02% e mínimo de 53,18%; temperatura média de 26,10 °C, com máximo de 38,04 °C e mínimo de 16,68 °C, durante todo o período experimental de 18/01/2021 a 12/03/2021). Como descrito na seção anterior (4.12 Teste protetivo em casa de vegetação), utilizou-se duas plantas por grupo de teste, marcando dois ramos de cada planta que continha o maior número de folhas na fase V4 (FUNDECITRUS, 2019), sendo realizados três repetições independentes deste ensaio. Em seguida pulverizaram-se os ramos por 2 minutos até o ponto de escoamento, com 100 mL de cada tratamento testado (I - solução salina com NaCl a 0,85% como controle negativo, II - 2 mL L⁻¹ de Difere como controle positivo, III - microgéis/peptídeos nas concentrações com melhores resultados no teste de aspersão da seção 4.11). Após 24 horas, as plantas foram aspergidas novamente com 100 mL de água filtrada e autoclavada, por 2 minutos até o ponto de escoamento, simulando assim uma lavagem decorrente das chuvas. Um dia após a etapa de lavagem, pulverizaram-se as plantas com o inóculo (*X. citri* a 10⁸ UFC mL⁻¹) em solução salina (0,85% de NaCl). As plantas foram então cobertas com sacos plásticos transparentes, removendo o mesmo após 24 horas. O teste teve duração total de 35 dias. A eficácia protetora foi medida novamente conforme descrito anteriormente, fazendo a relação da área foliar total e pelo número de lesões formadas com o auxílio do software ImageJ Fiji. Assim como no “Teste protetivo em casa de vegetação” (seção anterior), cada folha foi considerada como um indivíduo, submetendo os dados obtidos à análise estatística não paramétrica de Kruskal-Wallis (Dunn), com três graus de liberdade.

4.14. Microscopia de fluorescência confocal do microgel

O microgel que apresentou o melhor desempenho nos teste de casa de vegetação (seção 4.12 e 4.13) foi selecionado para as análises de fixação foliar utilizando o microscópio de fluorescência confocal. Para esse ensaio, folhas de *C. sinensis* foram aspergidas com o microgel na sua melhor concentração determinada no teste 4.12. As folhas foram pulverizadas até o ponto de escoamento em ambas as partes da lâmina foliar (abaxial e adaxial) por 2

minutos. Para simular a aplicação do inóculo e a etapa de lavagem (seção 4.13), uma solução salina (NaCl 0,85%) foi aspergida para cada uma das respectivas etapas, sendo borrifada por 2 minutos até o ponto de escorrimento em ambas as partes da lâmina foliar, reproduzindo o efeito do teste da seção 4.13. As folhas foram então destacadas para análises nas seguintes ordens: I – Após a aplicação do microgel; II – Após a primeira aplicação da solução salina (etapa do inóculo); III – Após a segunda aplicação da solução salina (etapa da lavagem); IV – 35 dias após a primeira aplicação da solução salina; V – 35 dias após a segunda aplicação da solução salina.

A microscopia de fluorescência confocal foi feita usando um microscópio de varredura a laser confocal Leica TCS SPspectral (microscópio Leica TCS SP8, Ex 485 nm, Em 520 nm, laser de argônio 20% de intensidade, ganho 500, Leica Microsystems GmbH, cubeA-513804, Excitação 340-380 nm, emissão de 425 nm) (Wetzlar, Alemanha). As fotos foram tiradas com uma câmera digital Leica (Wetzlar, Alemanha) acoplada ao equipamento. A fluorescência do eGFP foi registrada em 488 nm de excitação e 505-525 nm de emissão. Uma lente Leica x20 HCX PL FLUOTAR (abertura numérica 0,5) foi usada para a produção da micrografia. Uma série de seções ópticas (z-stack) foi adquirida por meio da varredura de várias seções. As imagens foram processadas e analisadas usando o software Leica confocal (Wetzlar, Alemanha).

4.15. Microscopia eletrônica de varredura do microgel

O microgel utilizado na etapa anterior (seção 4.14), também foi analisado quanto a sua fixação e recobrimento da superfície foliar através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para essa análise, folhas de *C. sinensis* foram aspergidas com o microgel na mesma concentração do ensaio descrito anteriormente (4.14). As folhas foram borrifadas com o microgel por 2 minutos, recobrando ambas as partes abaxiais e adaxiais da lâmina foliar, até o ponto de escorrimento. Para verificar o efeito da etapa de lavagem (simulação da chuva na folha), uma solução salina (NaCl 0,85%) foi aspergida após a aplicação do microgel. Assim como o microgel, a solução salina foi aspergida por 2 minutos em ambos os lados da folha até o ponto de escorrimento. Em seguida as folhas foram destacadas para análise no MEV.

As folhas foram fixadas a um esboço com fita adesiva de carbono. Ouro 20 nm foi usado para metalizar cada amostra com o auxílio do metalizador Bench Coater Desk V HP (Denton Vacuum, Moorestown, EUA) fazendo a deposição homogênea do metal. A superfície foi avaliada no MEV JEOL modelo JSM-6360LV (JEOL, Akishima, Japão), operando em alto vácuo com uma bomba mecânica para o primeiro vácuo de 10^{-3} Torr e vácuo secundário

em torno de 10^{-6} Torr. A microscopia eletrônica foi equipada com detectores de elétrons secundários retroespalhados acoplados a um analisador de energia dispersiva. As imagens foram obtidas com tensão de aceleração de 5 KV e aumento de 400x.

MICROGÉIS

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS MICROGÉIS

5.1. Galatos e microgéis sintetizados

Foram obtidos da síntese dos galatos 5 g do n-decil e n-hexil galato (G10 e G6) com rendimento de ~84%. Sendo estes compostos bioativos utilizados nos processos de imobilização dos microgéis e nos demais estudos. Os galatos G6 e G10 já são descritos como agentes antimicrobianos eficientes contra *X. citri*, apresentando uma CI bactericida para *X. citri* nas concentrações de 50 e 65 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (KRÓL et al., 2015; CAVALCA et al., 2020).

Os microgéis de matriz polimérica de GMA, com a presença ou ausência do peptídeo de ancoragem (hDerm) e compostos bioativos (AT, G6 e G10), foram sintetizados obtendo um total de oito variantes diferentes de microgéis (Microgel GMA; Microgel GMA_AT; Microgel GMA_hDerm; Microgel GMA_hDerm_AT; Microgel GMA_hDerm_G6; Microgel GMA_hDerm_AT_G6; Microgel GMA_hDerm_G10 e Microgel GMA_hDerm_AT_G10) (Figura 8). Podendo assim testar as diferentes variações e conformações possíveis dos microgéis de GMA, analisando qual combinação entre os compostos bioativos e o peptídeo de ancoragem são mais eficientes contra as células de *X. citri*. Todos os microgéis sintetizados se mostraram estáveis a temperatura ambiente, solúveis em água e com pH de ~6,00 (Figura 8).

Figura 8. Microgéis de matriz polimérica de GMA sintetizados no presente trabalho.



Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

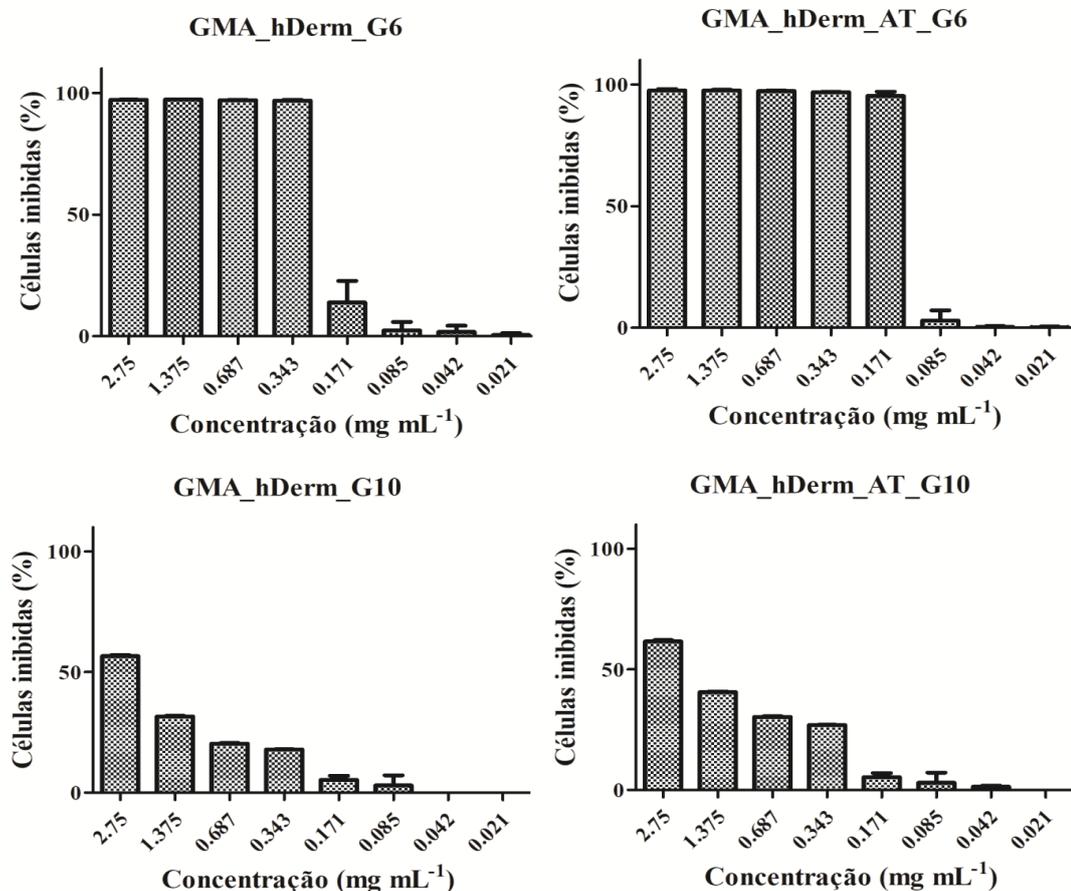
5.2. Avaliação da inibição do crescimento bacteriano pelo método de REMA

Através dos testes de REMA foi possível avaliar a resposta inibitória das células de *X. citri* para as diferentes composições e concentrações dos microgéis testados. Os resultados confirmaram que apenas o GMA_hDerm_G6 e o GMA_hDerm_AT_G6 apresentaram

atividade inibitória contra *X. citri*, com CI_{90} de $0,33 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,172 \text{ mg mL}^{-1}$, respectivamente (Figura 9).

Os outros microgéis que apresentavam o G10 em sua composição (GMA_hDerm_G10 e GMA_hDerm_AT_G10) não conseguiram alcançar valores inibitórios acima de 70%, mesmo nas maiores concentrações testadas ($2,75 \text{ mg mL}^{-1}$) (Figura 9). Esses resultados confirmaram que o galato G6 é o mais indicado para imobilização nos microgéis de GMA, sendo liberado mais facilmente da matriz polimérica, apresentando resultados superiores aos microgéis com o G10. Por apresentar uma cadeia carbônica maior, com 10 carbonos, o G10 deve estar tendo mais interações com os monômeros da matriz do microgel, tendo interações como pontes de hidrogênio ou até mesmo por forças de Van der Waals entre o galato e a matriz polimérica. Dessa forma, ele deve estar sendo liberado da matriz do microgel mais lentamente e com menores concentrações quando comparado com o G6, que por possuir uma cadeia menor, apenas 6 carbonos, é liberado da matriz polimérica mais facilmente.

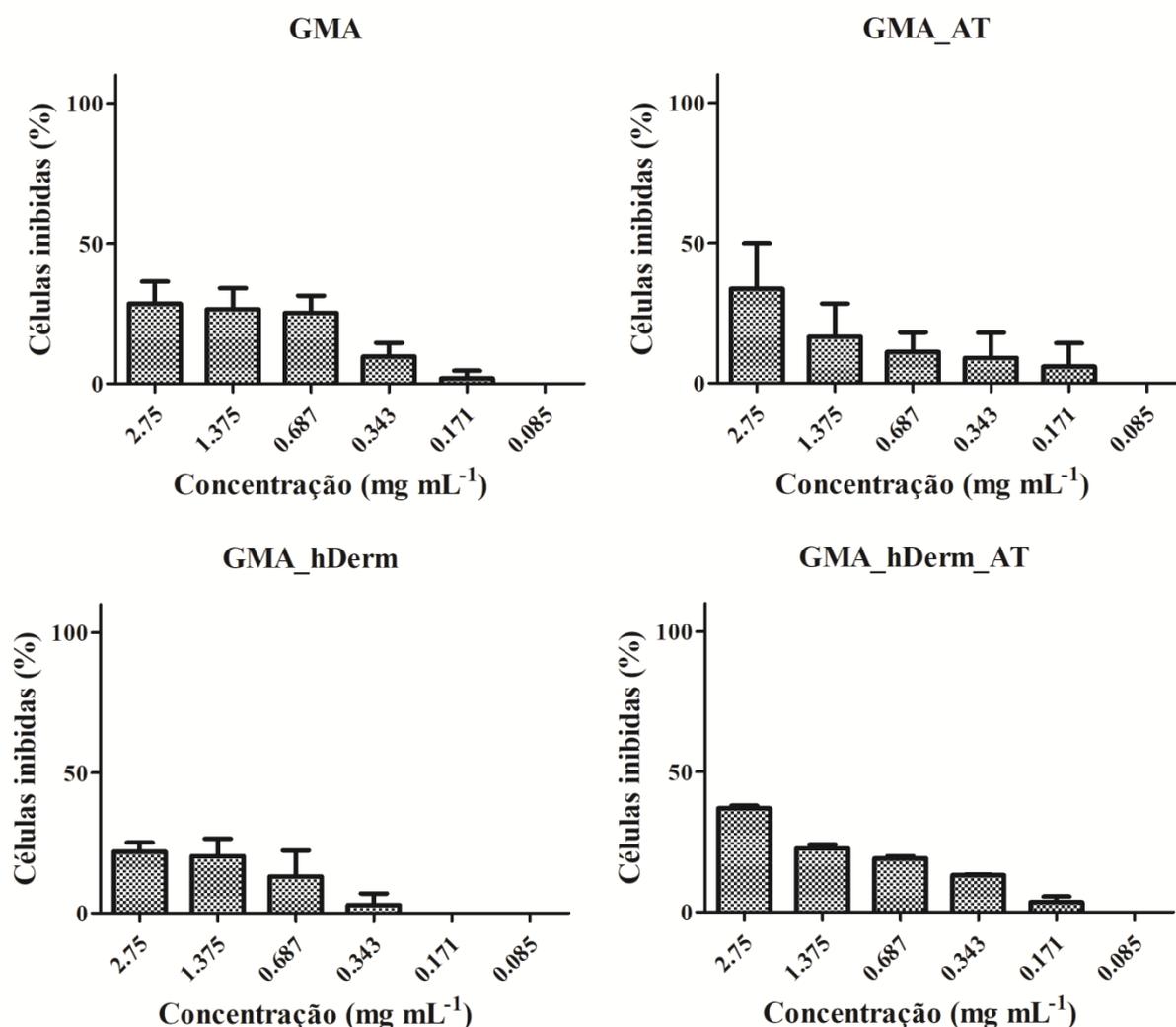
Figura 9. Gráficos das porcentagens de células de *X. citri* inibidas pelos microgéis contendo galatos em diferentes concentrações. Barras de erro representam os valores de DS .



Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

Os microgéis cujas construções não apresentavam os galatos mostraram os menores valores de inibição frente às células de *X. citri* (Figura 10). Alguns efeitos inibitórios observados nesse caso, como no microgel sem nenhum agente em sua estrutura (GMA) (Figura 10), não chegam a 20%, sendo mais um efeito físico, como pressão osmótica, proveniente da alta concentração de microgel aplicado no meio líquido. Conseqüentemente, o efeito observado acaba sendo o atraso do crescimento celular, inibindo apenas uma pequena porcentagem de células. Esses resultados corroboram que a ação antimicrobiana dos microgéis é proveniente dos galatos.

Figura 10. Gráficos das porcentagens de células de *X. citri* inibidas por diferentes concentrações de microgéis contendo apenas o peptídeo de ancoragem e o ácido tânico em sua composição. Barras de erro representam os valores de *DS*.

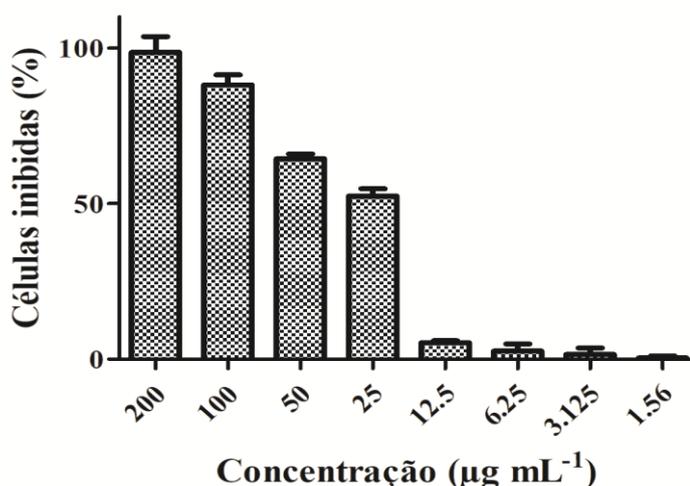


Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

Alguns peptídeos de ancoragem como o hDerm podem vir a ter uma segunda atividade ou ação dependendo da sua aplicação, sendo denominados de peptídeos multifuncionais (NÖTH et al., 2021), apresentando efeito inibitório bacteriano ou funcionalizando outras reações (RÜBSAM et al., 2017; JI et al., 2021). No entanto, ao testá-lo sozinho frente às células de *X. citri*, na maior concentração utilizada para imobilização dos microgéis (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$), o hDerm não apresentou qualquer efeito antimicrobiano para as células de *X. citri*.

O AT já foi descrito como um agente orgânico eficiente na inibição de uma ampla variedade de bactérias (CIPRIANO-SALAZAR et al., 2018), além de já ser comprovado sua eficácia contra bactérias de interesse clínico como o *Staphylococcus aureus* (DONG et al., 2018), e contra o *Penicillium digitatum* que é um importante fitopatógeno de citros (ZHU et al., 2019). Porém, a incorporação do AT nos microgéis sintetizados no presente trabalho teve como objetivo sua ação como um agente reticulante da matriz polimérica (LÓPEZ & PICH, 2018), não tendo foco na sua possível ação bactericida contra as células de *X. citri*. Ressalta-se que os microgéis GMA_AT e GMA_hDerm_AT na concentração de 2,75 mg mL^{-1} apresentaram valores de 33,67 e 36,99 % de células de *X. citri* inibidas, respectivamente. Essa inibição acima dos microgéis GMA e GMA_hDerm está relacionada com a ação do AT. Ao realizar o teste de REMA com o AT puro (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha), na maior concentração usada para a síntese dos microgéis (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$), comprovou-se o seu efeito inibitório para as células de *X. citri* (Figura 11), obtendo um valor de CI_{90} de 99,93 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 11. Gráfico da porcentagem de inibição das células de *X. citri* pelo ácido tânico em diferentes concentrações. Barras de erro representam os valores de *DS*.



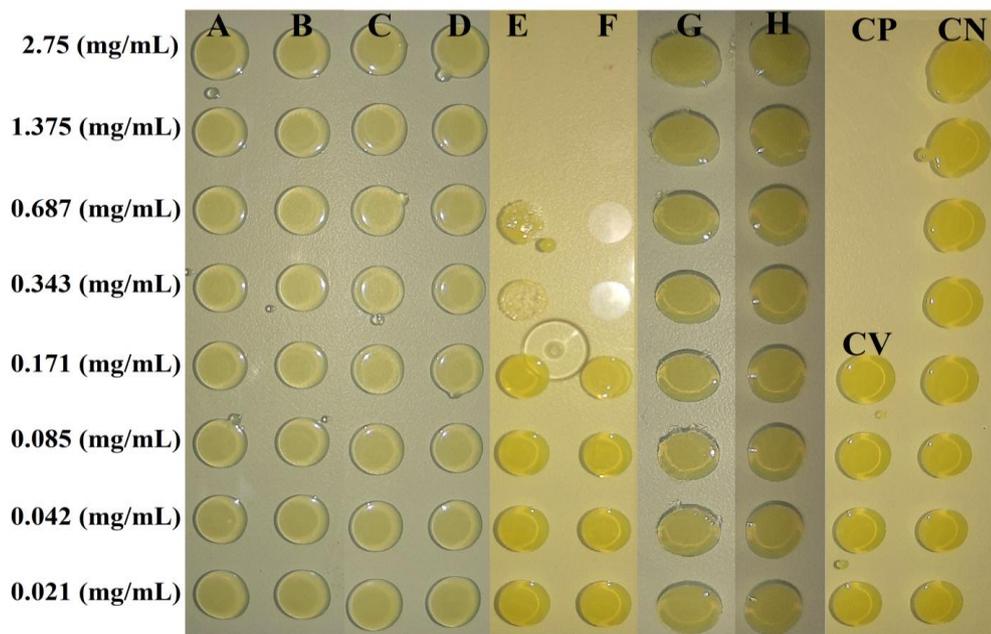
Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

5.3. Avaliação do efeito bactericida dos microgéis

Mesmo após a exposição a certos compostos, as células bacterianas podem voltar a crescer quando inoculados em um meio sem a presença do mesmo, classificando nesse caso a atividade do composto como bacteriostático. Desta forma, o teste de MBC confirma se a ação inibitória no REMA é bactericida ou bacteriostática.

Com isso, os resultados obtidos nos testes de MBC mostraram que ambos os microgéis GMA_hDerm_G6 e GMA_hDerm_AT_G6 na CI_{90} apresentam apenas atividade bacteriostática, já que ocorre o crescimento bacteriano, pós-tratamento, quando inoculado em meio sólido livre do composto (Figura 12). Entretanto, os microgéis GMA_hDerm_G6 e GMA_hDerm_AT_G6 apresentaram atividade bactericida nas concentrações elevadas de $1,375 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,343 \text{ mg mL}^{-1}$ respectivamente (Figura 12). Devido ao fato dos microgéis com G10 não apresentarem efeito bactericida frente às células de *X. citri*, sua produção não foi continuada e o mesmo não passou pelos testes seguintes.

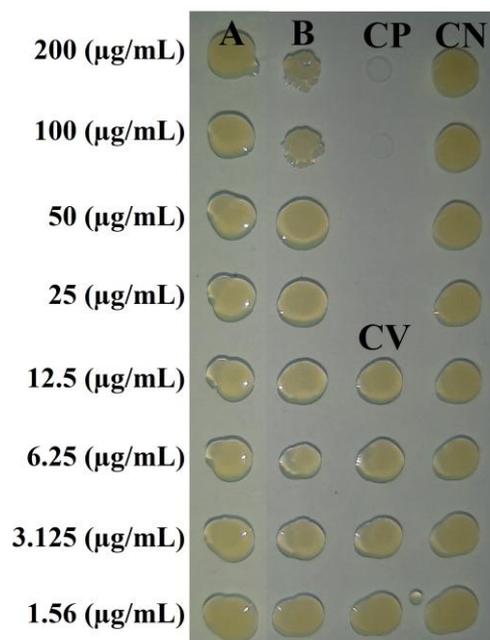
Figura 12. Teste de MBC dos microgéis. A = Microgel GMA; B = Microgel GMA_AT; C = Microgel GMA_hDerm; D = Microgel GMA_hDerm_AT; E = Microgel GMA_hDerm_G6; F = Microgel GMA_hDerm_AT_G6; G = Microgel GMA_hDerm_G10; H = Microgel GMA_hDerm_AT_G10; CP = Controle positivo com Canamicina ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$); CV = Controle do veículo (50% de água deionizada autoclavada no meio NYG (v/v)); CN = Controle negativo (apenas a bactéria no meio NYG).



Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

Os resultados dos testes de MBC para o AT também confirmaram que seu efeito para *X. citri* é apenas bacteriostático, mesmo quando utilizado na maior concentração necessária para a síntese dos microgéis ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Figura 13). Dessa forma, o efeito bactericida observado no microgel GMA_hDerm_AT_G6 é proveniente apenas do G6. Os resultados de REMA e MBC com o GMA_hDerm_AT e GMA_AT também corroboram essa afirmação, já que a presença do AT sozinho nessas construções poliméricas não apresentou qualquer efeito bactericida para as células de *X. citri*.

Figura 13. Teste de MBC dos compostos puros usados na construção dos microgéis. A = hDerm; B = AT; CP = Controle positivo (Canamicina á $20 \mu\text{g mL}^{-1}$); CV = Controle do veículo (50% de água deionizada autoclavada no meio NYG (v/v)); CN = Controle negativo (apenas a bactéria no meio NYG).



Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

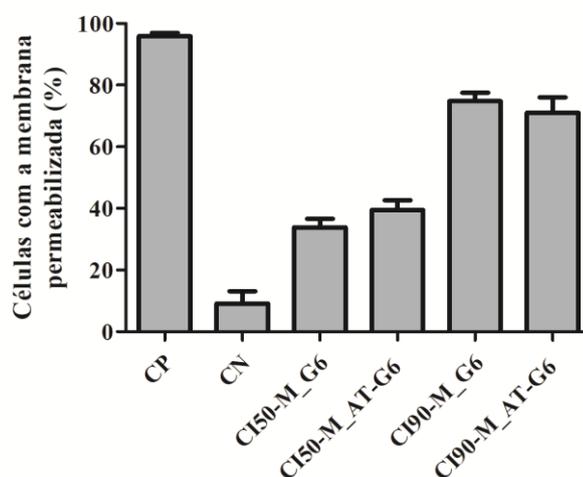
5.4. Avaliação do mecanismo de ação dos microgéis testados

Como confirmado nos testes de REMA e MBC, as atividades bactericidas dos microgéis GMA_hDerm_G6 e GMA_hDerm_AT_G6 foram provenientes do galato G6. O G6 já foi descrito na literatura como sendo um galato com múltiplos mecanismos de ação na célula de *X. citri*, causando perturbações na membrana citoplasmática e afetando os mecanismos divisionais da célula (CAVALCA et al., 2020). No entanto, como o galato foi imobilizado na matriz polimérica do GMA, torna-se necessário verificar novamente se os microgéis teriam o mesmo mecanismo de ação que o G6 livre. Os corantes SYTO9 (azul) e IP

(vermelho) ajudam na contagem de células viáveis, além de indicar se o efeito do composto é por ação na membrana citoplasmática. SYTO9 passa naturalmente pela membrana e cora o nucleóide bacteriano de todas as células, já o IP só consegue penetrar nas células se a membrana citoplasmática estiver corrompida (ZHOU et al., 2018).

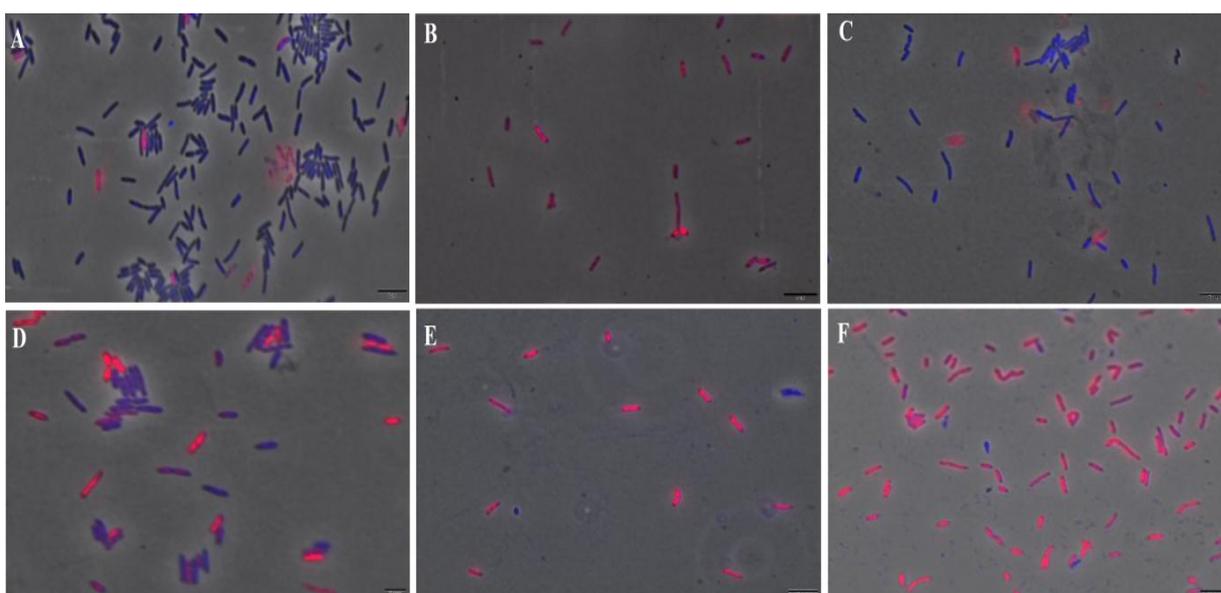
Os resultados utilizando o kit Live/Dead comprovaram que mesmo na CI_{50} após 15 minutos, mais de 30% das células de *X. citri* já apresentavam danos na estrutura da membrana citoplasmática para ambos os microgéis (Figura 14). Na concentração de CI_{90} após 15 minutos, mais de 70% das células de *X. citri* já estavam mortas e com a membrana citoplasmática rompida após o contato com o GMA_hDerm_G6 e GMA_hDerm_AT_G6 (Figura 14), sendo possível visualizar um grande número de células coradas com IP (vermelho) (Figura 15). Este resultado além de confirmar que o G6 continua afetando a estrutura superficial das células de *X. citri*, também mostra que seu efeito de ação inibitório é rápido, onde mais da metade do número de células já tinham sido afetadas pelo microgel nos primeiros 15 minutos de contato.

Figura 14. Gráfico da porcentagem de células de *X. citri* com a membrana citoplasmática danificada devido à exposição aos microgéis. CN são as células não tratadas, CP são as células com a membrana citoplasmática rompida por estresse térmico, CI_{50} -M_G6 é o microgel GMA_hDerm_G6 na concentração de CI_{50} , CI_{50} -M_AT-G6 é o microgel GMA_hDerm_AT_G6 na concentração de CI_{50} , CI_{90} -M_G6 é o microgel GMA_hDerm_G6 na concentração de CI_{90} , e o CI_{90} -M_AT-G6 é o microgel GMA_hDerm_AT_G6 na concentração de CI_{90} .



Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

Figura 15. Células de *X. citri* com a membrana citoplasmática afetada pelos microgéis GMA_hDerm_G6 e GMA_hDerm_AT_G6. As células foram expostas aos compostos nos seus respectivos valores de CI_{50} e CI_{90} durante 15 minutos de contato, sendo em seguida coradas com o SYTO9 e IP antes da observação ao microscópio de fluorescência. As células com membrana intacta são mostradas em azul, enquanto as células com membrana citoplasmática rompida são mostradas em vermelho. (A) Células não tratadas (CN); (B) Células com a membrana citoplasmática rompida por estresse de temperatura (CP); (C) Células tratadas com GMA_hDerm_AT_G6 na CI_{50} ($0,124 \text{ mg mL}^{-1}$); (D) células tratadas com GMA_hDerm_G6 na CI_{50} ($0,260 \text{ mg mL}^{-1}$); (E) Células tratadas com GMA_hDerm_AT_G6 na CI_{90} ($0,172 \text{ mg mL}^{-1}$); Células tratadas com GMA_hDerm_G6 na CI_{90} ($0,330 \text{ mg mL}^{-1}$). As imagens são a sobreposição de microscopia de contraste de fase e fluorescência. Os filtros TxRed e DAPI-Blue foram aplicados juntos e usados para visualizar IP e SYTO9. As barras correspondem a $5 \mu\text{m}$; ampliação de $100\times$, com um total de 100 células visualizadas por tratamento.

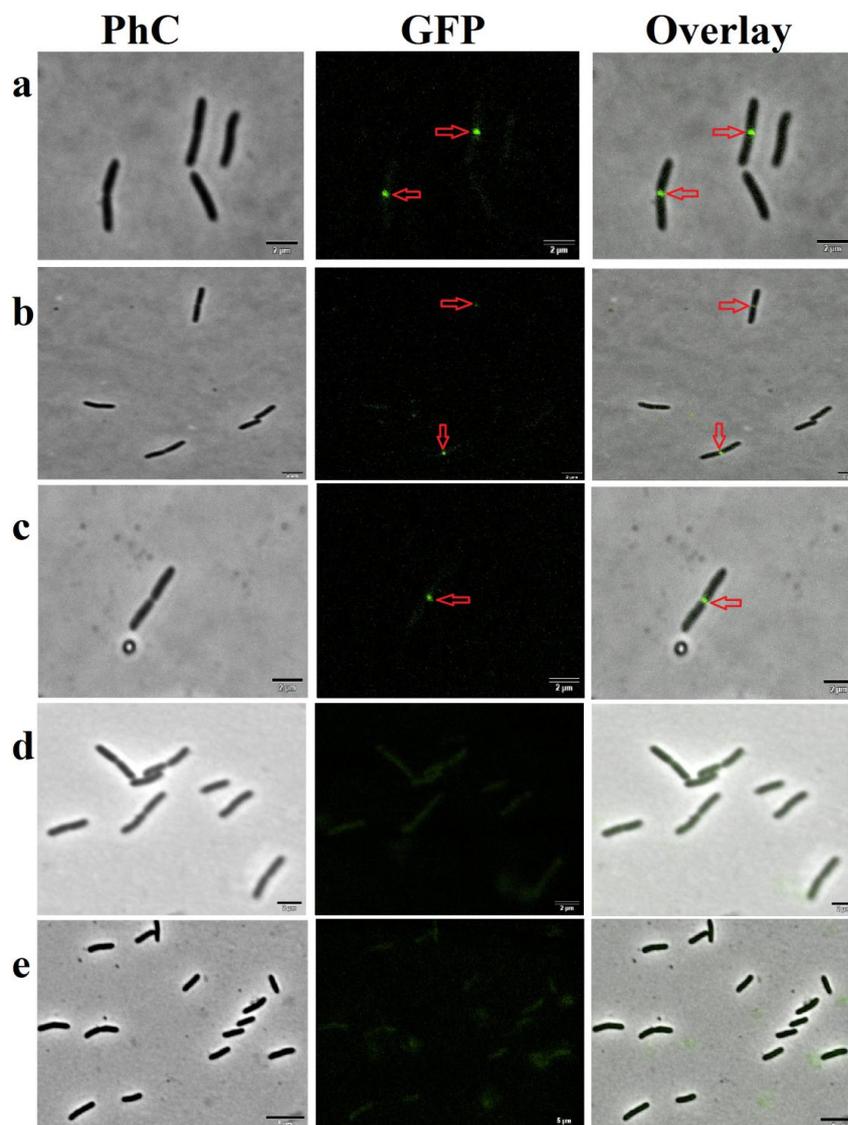


Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

Os testes com o mutante *X. citri amy::pPM2a-zapA* mostraram que na CI_{50} após 15 minutos ainda era possível visualizar o septo divisional (Figura 16). Isso confirma os resultados observados no Live/Dead, onde mais da metade das células de *X. citri* ainda estavam vivas após 15 minutos nesta concentração. No entanto, na concentração de CI_{90} já não era mais possível visualizar o septo divisional no mutante, sendo 15 minutos o tempo suficiente para o GMA_hDerm_G6 e GMA_hDerm_AT_G6 afetar a divisão da *X. citri*. Esses resultados constata os descritos por Cavalca et al. (2020), além de comprovar que o G6 está

sendo liberado da matriz do GMA sem alteração em seu mecanismo de ação. Esses resultados respaldam a inibição vista nos testes de REMA, onde apenas esses dois microgéis conseguiram alcançar valores de CI_{50} e CI_{90} , devido ao fato de apresentarem o G6 em sua construção.

Figura 16. GMA_hDerm_G6 e GMA_hDerm_AT_G6 causaram o rompimento do septo divisional das células de *X. citri amy::pPM2a-zapA*. (a) CN (células não tratadas); (b) células tratadas com GMA_hDerm_AT_G6 na CI_{50} ($0,124 \text{ mg mL}^{-1}$); (c) GMA_hDerm_G6 na CI_{50} ($0,260 \text{ mg mL}^{-1}$); (d) células tratadas com GMA_hDerm_AT_G6 na CI_{90} ($0,172 \text{ mg mL}^{-1}$); (e) GMA_hDerm_G6 na CI_{90} ($0,330 \text{ mg mL}^{-1}$). O septo divisional corresponde à barra verde no centro das células (indicados pelas setas vermelhas). Ampliação de $100\times$, barra de tamanho de $2 \mu\text{m}$, total de 100 células visualizadas por tratamento.



Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

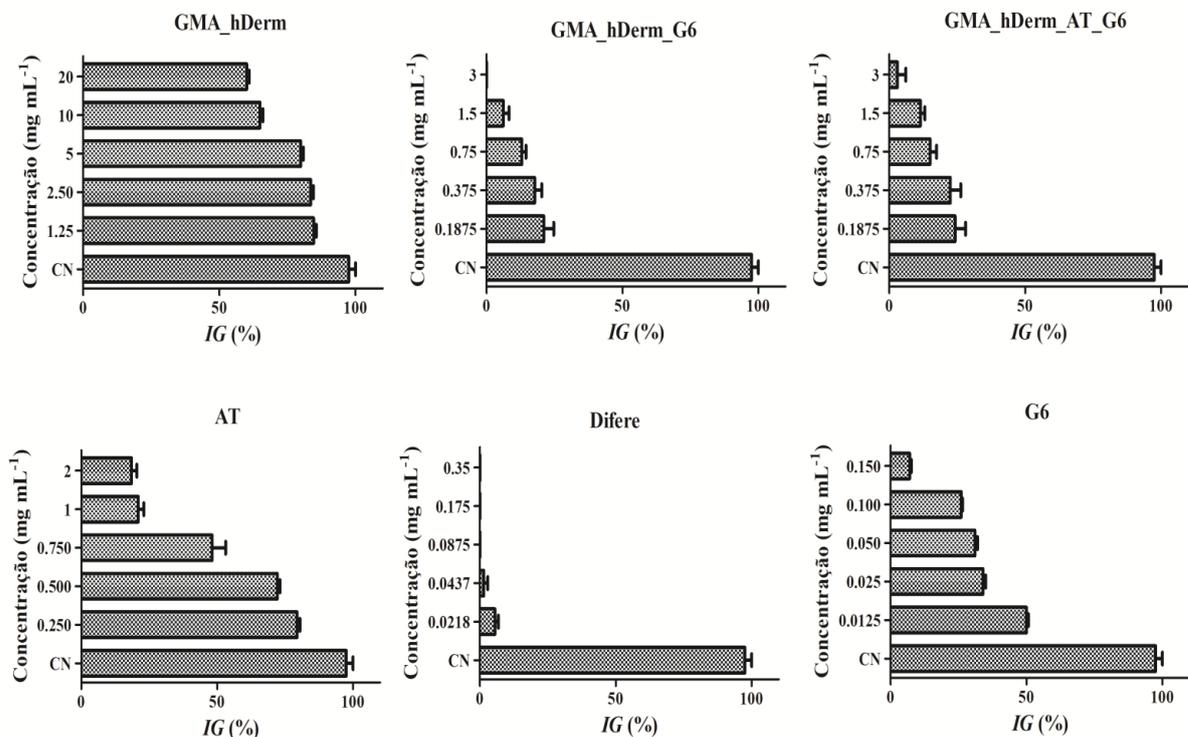
5.5. Fitotoxicidade dos microgéis

A *E. sativa* é considerada um organismo padrão para avaliar os efeitos tóxicos de compostos por meio do teste de toxicidade, analisando a germinação e desenvolvimento radicular (SOBRERO & RONCO, 2008). A redução da germinação e desenvolvimento da radícula pode ser avaliada relacionando esse efeito com diferentes concentrações do composto avaliado, podendo assim calcular sua CL_{50} para organismos vegetais sensíveis a compostos tóxicos como a *E. sativa* (SOBRERO & RONCO, 2008; PECORA et al., 2018; MENDES, 2019).

Todas as sementes conseguiram germinar independente da concentração do microgel testado, porém as radículas apresentaram um desenvolvimento incompleto quando comparado com o CN. Esse resultado confirma que os microgéis apresentam toxicidade para as sementes de *E. sativa*, sendo os microgéis contendo o G6 os mais tóxicos com LC_{50} nos valores de 0,0875 e 0,0931 $mg\ mL^{-1}$ para o GMA_hDerm_G6 e GMA_hDerm_AT_G6, respectivamente. Esses resultados são confirmados quando comparados com a fitotoxicidade do G6 testado no presente trabalho, onde a LC_{50} dele foi de 0,0133 $mg\ mL^{-1}$, sendo um valor de toxicidade superior aos microgéis GMA_hDerm_G6 e GMA_hDerm_AT_G6 (Figura 17). Ao realizar o teste com o AT e o microgel GMA_hDerm, constatou-se que todas as sementes apresentaram germinação e desenvolvimento da radícula, mesmo nas maiores concentrações testadas, confirmando uma baixa fitotoxicidade para o AT e o microgel contendo apenas o peptídeo de ancoragem (Figura 17). Logo é possível relacionar toda a toxicidade dos microgéis GMA_hDerm_G6 e GMA_hDerm_AT_G6 ao G6, sendo que o galato foi o composto presente nos microgéis que apresentou o maior nível tóxico para as sementes de *E. sativa*.

Dentre os compostos testados o Difere foi o que apresentou maior toxicidade para as sementes de *E. sativa*, com uma LC_{50} de 0,004 $mg\ mL^{-1}$, sendo observado a germinação das sementes apenas nas duas menores concentrações testadas (Figura 17). Ao comparar a LC_{50} dos microgéis GMA_hDerm_G6 e GMA_hDerm_AT_G6 com o Difere, é possível constatar que composto cúprico apresenta uma toxicidade para sementes vinte vezes maior que os microgéis.

Figura 17. Gráficos dos valores das porcentagens de *IG* para as sementes de *E. sativa* em contato com cada composto em diferentes concentrações. (GMA_hDerm - $LC_{50} = 27,6 \text{ mg mL}^{-1}$; GMA_hDerm_G6 - $LC_{50} = 0,0875 \text{ mg mL}^{-1}$; GMA_hDerm_AT_G6 - $LC_{50} = 0,0931 \text{ mg mL}^{-1}$; AT - $LC_{50} = 0,875 \text{ mg mL}^{-1}$; Difere - $LC_{50} = 0,004 \text{ mg mL}^{-1}$; G6 - $LC_{50} = 0,0133 \text{ mg mL}^{-1}$). Barras de erro representam os valores de *DS*.



Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

5.6. Teste de citotoxicidade dos microgéis

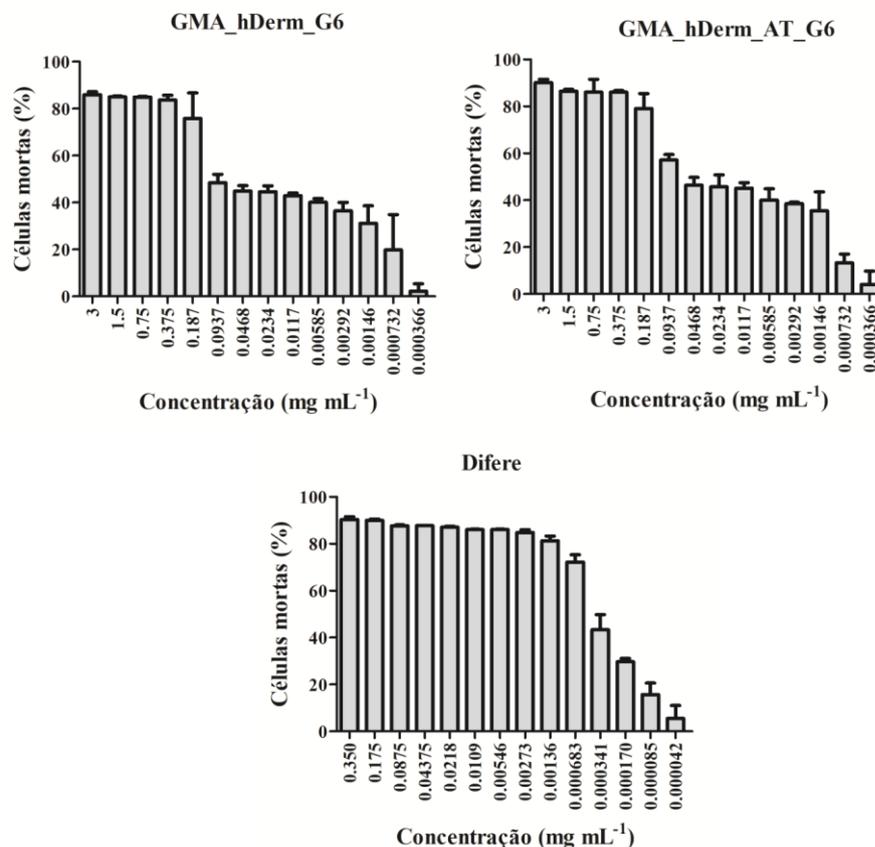
Os testes de citotoxicidade utilizando as células J774A.1 foram feitos com o objetivo de avaliar a toxicidade dos microgéis frente às células eucarióticas expostas a diferentes concentrações desses polímeros. A principal vantagem de testes utilizando as células J774A.1 é que ela serve como um sistema *in vivo* comparando os efeitos e respostas celulares de uma célula eucariótica animal à exposição a agentes exógenos (BANJANAC et al., 2012). Avaliou-se também a citotoxicidade do composto cúprico comercial Difere, podendo assim comparar o efeito citotóxico do cobre comercial com os microgéis produzidos no presente trabalho. Os resultados mostraram que novamente o Difere apresentou uma toxicidade muito superior aos microgéis, com uma LC_{50} de $0,0005 \text{ mg mL}^{-1}$, sendo 100 vezes mais tóxico que o GMA_hDerm_G6 e GMA_hDerm_AT_G6 (Figura 18).

Os microgéis GMA_hDerm_G6 e GMA_hDerm_AT_G6 apresentaram valores de LC_{50} muito próximos entre si, sendo $0,0592$ e $0,0495 \text{ mg mL}^{-1}$, respectivamente (Figura 18).

Esses resultados corroboram os dados obtidos no teste de fitotoxicidade, onde a diferença de toxicidade entre os microgéis foi muito baixa. Pode-se observar também que as células J774A.1 apresentaram uma sensibilidade maior que as sementes de *E. Sativa*.

Silva et al. (2017) realizaram diversos testes de citotoxicidade utilizando o galato puro G6, utilizando cinco diferentes tipos de células para em seus ensaios (HepG2, DU-145, A549, MDAMB-231, MRC-5). No respectivo trabalho foi observado que o G6 apresentou citotoxicidade para todos os tipos de células avaliadas, variando sua LC_{50} de 0,042 até 0,145 $mg mL^{-1}$ (SILVA et al., 2017). Apesar de não ter sido realizado os ensaios com o J774A.1 e o G6 puro, as células avaliadas nos estudos de Silva et al. (2017) apresentam sensibilidade muito próxima ao J774A.1, podendo estimar que a LC_{50} do G6 será no mínimo próximo de 0,042 $mg mL^{-1}$, podendo afirmar desta forma que em relação aos microgéis o G6 é mais tóxico quando não se encontra imobilizado na matriz polimérica dos microgéis de GMA.

Figura 18. Gráficos das porcentagens de células J774A.1 mortas nos ensaios de citotoxicidade. (GMA_hDerm_G6 - $LC_{50} = 0,0592 mg mL^{-1}$; GMA_hDerm_AT_G6 - $LC_{50} = 0,0495 mg mL^{-1}$; Difere - $LC_{50} = 0,0005 mg mL^{-1}$). Barras de erro representam os valores de *DS*.



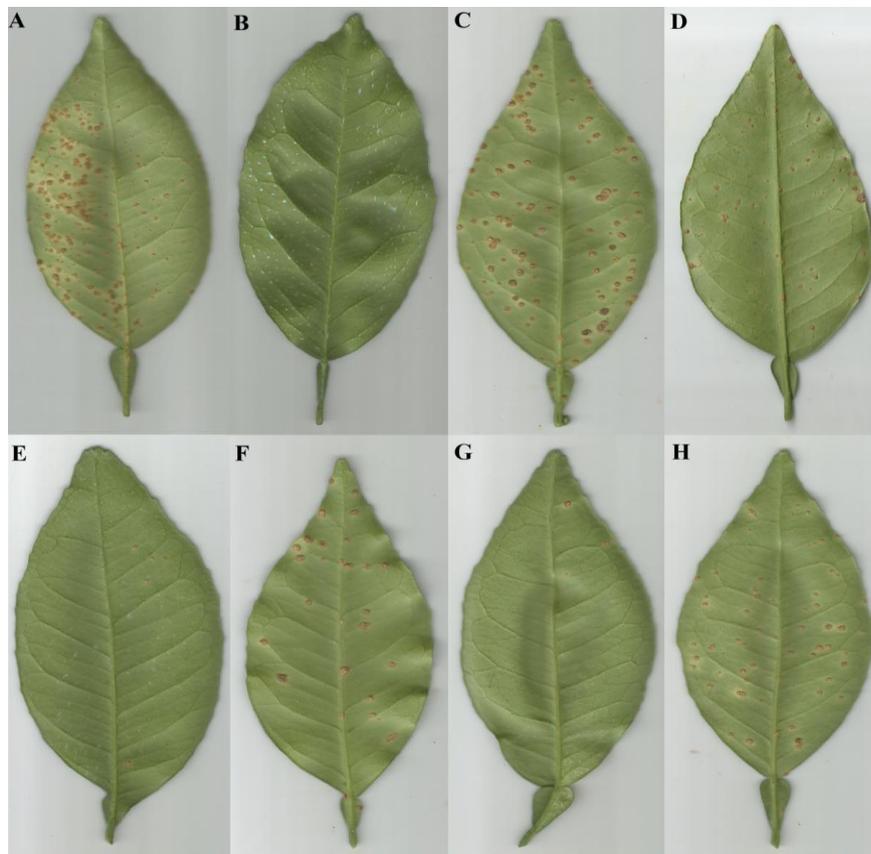
Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

5.7. Teste protetivo em casa de vegetação utilizando os microgéis

Mudas de *C. sinensis* foram utilizadas nos experimentos *in vivo* de casa de vegetação, para avaliar o efeito protetivo dos microgéis frente à infecção da *X. citri*. Avaliaram-se também diferentes concentrações de aplicação dos microgéis nesse teste, determinando assim a melhor concentração de aplicação dos géis para a proteção das plantas. Além dos microgéis GMA_hDerm_G6 e GMA_hDerm_AT_G6, foram avaliados também as demais construções sem a presença do G6, verificando assim se os outros géis teriam alguma atividade protetiva independente da presença do galato G6.

A diferença entre os tratamentos era visualmente distinta quando comparados nas maiores concentrações aplicadas nos testes ($2,75 \text{ mg mL}^{-1}$), sendo visível a proteção foliar do GMA_hDerm_AT_G6 e GMA_hDerm_G6 em relação aos demais géis e ao CN (Figura 19).

Figura 19. Comparação visual entre as folhas dos tratamentos utilizando os microgéis na concentração de $2,75 \text{ mg mL}^{-1}$ com os controles. Folhas de *C. sinensis* cv. Pêra com as lesões desenvolvidas ao final dos 35 dias de experimento (parte abaxial das folhas). A = CN; B = CP; C = GMA; D = GMA_hDerm; E = GMA_hDerm_G6; F = GMA_hDerm_AT; G = GMA_hDerm_AT_G6; H = GMA_AT.

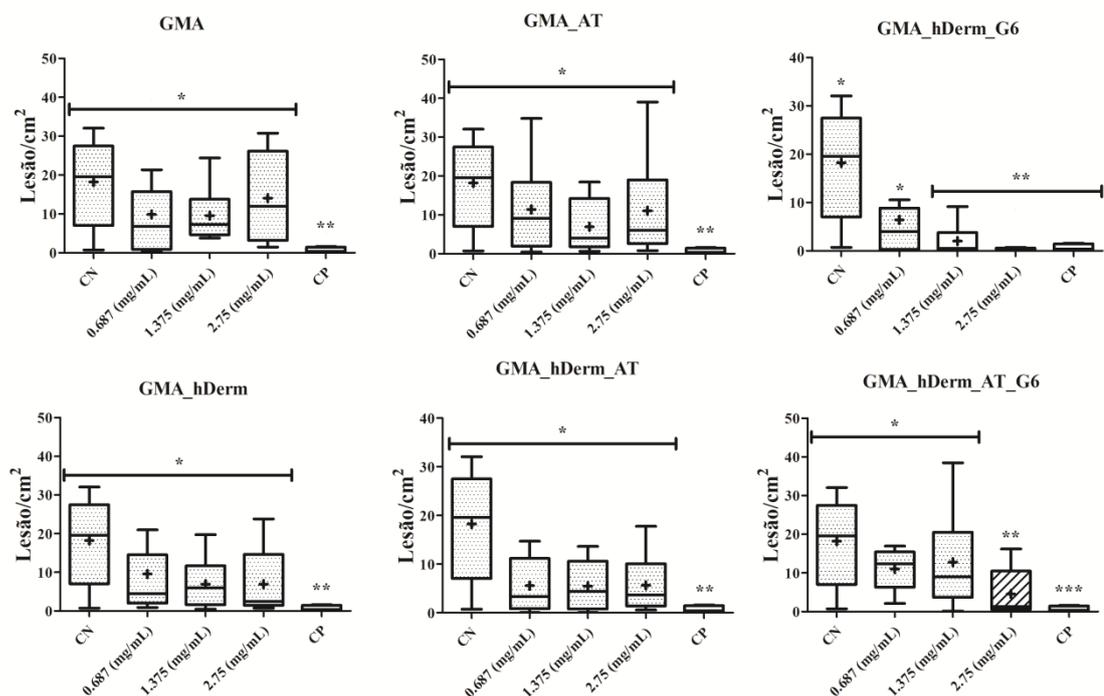


Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

Ao apurar os dados de números de lesões pela área foliar comprovou-se que apenas os microgéis GMA_hDerm_G6 e GMA_hDerm_AT_G6 apresentavam um efeito protetivo significativamente diferente do CN (Figura 20). Os demais microgéis sem a presença do G6 em sua construção foram estatisticamente iguais ao CN, não mostrando nenhum efeito protetivo contra a infecção da *X. citri* (Figura 20). Observou-se também que o CP apresentou uma média de 1,31 lesão/cm², não apresentando nenhuma diferença significativa do microgel GMA_hDerm_G6 nas concentrações de 1,375 e 2,75 mg mL⁻¹, onde o microgel apresentou médias de 2,03 e 1,90 lesão/cm², respectivamente (Figura 20).

O microgel GMA_hDerm_AT_G6 com concentração de 2,75 mg mL⁻¹ apresentou uma média de 4,55 lesão/cm², sendo estatisticamente diferente do CN (18,22 lesão/cm²) (Figura 20). Porém, esses valores também foram significativamente diferentes do CP, indicando que apesar de apresentar uma capacidade protetiva efetiva, o GMA_hDerm_AT_G6 é menos eficiente que o GMA_hDerm_G6 e o Difere.

Figura 20. Gráficos do número de lesão por área foliar de cada um dos tratamentos avaliados no presente trabalho. CP é a formulação comercial de cobre (Difere). Cada folha foi considerada como um indivíduo independente na distribuição do gráfico. Todos os dados e grupos foram submetidos à análise estatística não paramétrica de Kruskal-Wallis (Dunn), com três graus de liberdade. As barras de erro representam o erro padrão de cada grupo.



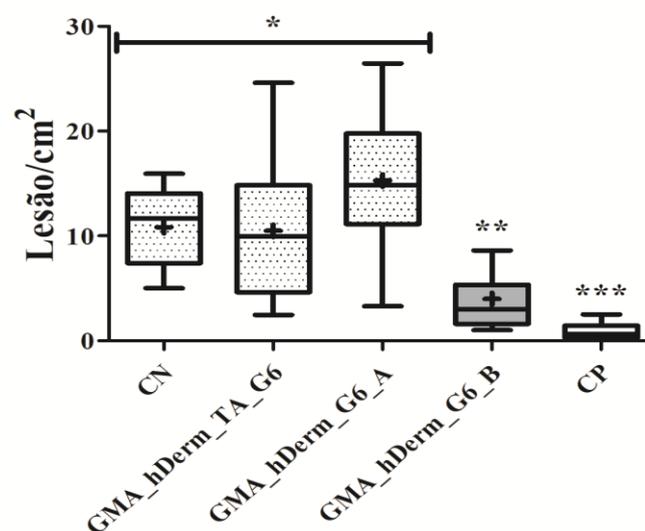
Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

5.8. Teste protetivo utilizando os microgéis em casa de vegetação com uma etapa de lavagem

Com o objetivo de avaliar a capacidade de fixação dos géis nas folhas, mesmo após uma chuva, o mesmo teste protetivo foi repetido com uma etapa de lavagem buscando mimetizar o efeito de uma chuva. Conforme mostrado nos resultados de casa de vegetação anterior, apenas os microgéis GMA_hDerm_G6 (1,375 e 2,75 mg mL⁻¹) e GMA_hDerm_AT_G6 (2,75 mg mL⁻¹) apresentaram um efeito significativo na proteção do citros contra a infecção da *X. citri*. Logo, apenas esses géis nas respectivas concentrações efetivas foram testados novamente com esta etapa de lavagem. Os resultados comprovaram que apenas o GMA_hDerm_G6 na concentração de 2,75 mg mL⁻¹ ainda era efetivo na proteção das folhas de citros, apresentando uma média de 3,98 lesão/cm² (Figura 21).

Figura 21. Gráfico do número de lesões por área foliar dos testes realizados em casa de vegetação com uma etapa de lavagem buscando simular o efeito de uma chuva no campo. O CP foi à formulação comercial de cobre (Difere), CN foram as folhas aspergidas apenas com solução salina (NaCl 0,85%), GMA_hDerm_AT_G6 com concentração de 2,75 mg mL⁻¹, GMA_hDerm_G6_A e GMA_hDerm_G6_B eram o microgel GMA_hDerm_G6 nas concentrações de 1,375 e 2,75 mg mL⁻¹ respectivamente. Cada folha foi considerada como um indivíduo independente na distribuição do gráfico. Todos os dados e grupos foram submetidos à análise estatística não paramétrica de Kruskal-Wallis (Dunn), com três graus de liberdade.

As barras de erro representam o erro padrão de cada grupo.



Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

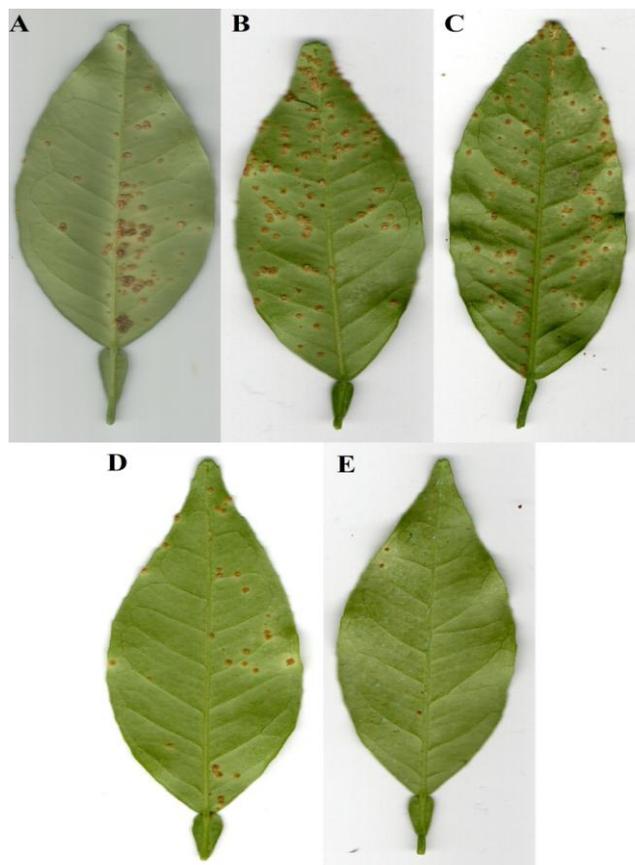
Esse resultado comprova que mesmo após a etapa de lavagem, o GMA_hDerm_G6 na concentração de $2,75 \text{ mg mL}^{-1}$ permanece fixo nas folhas, não sendo completamente lixiviado, apresentando um fator protetivo ainda eficiente. Apesar de ser estatisticamente diferente do CN ($10,83 \text{ lesão/cm}^2$), o CP ($0,94 \text{ lesão/cm}^2$) se mostrou mais eficiente que o GMA_hDerm_G6 á $2,75 \text{ mg mL}^{-1}$ (Figura 21), mesmo após a etapa de lavagem.

O cobre mostrou uma capacidade de fixação foliar maior que o microgel sintetizado, conseguindo manter seu efeito protetivo independente da simulação de chuva realizada nos experimentos, alcançando praticamente os mesmos valores que o teste em casa de vegetação anterior. Ainda assim, o microgel GMA_hDerm_G6 se mostrou como sendo a melhor construção polimérica sintetizada no presente trabalho, sendo um gel promissor para aplicação em campo, apresentando resultados protetivos muito similares a formulação cúprica comercial (Difere) utilizada como CP.

O microgel GMA_hDerm_AT_G6 apresentou uma média de $10,48 \text{ lesão/cm}^2$, sendo estatisticamente igual ao CN. Mesmo no comparativo visual, as folhas com o GMA_hDerm_AT_G6 eram indistinguíveis do CN (Figura 22, comparação do A com o B), diferentemente do GMA_hDerm_G6 e CP que mesmo após a simulação de chuva ainda apresentavam folhas visivelmente com um número menor de lesões (Figura 22 comparação do A com o D e E).

Apesar dos resultados positivos anteriores, a construção desses microgel se mostrou inferior em todos os testes *in vivo* realizados no presente trabalho quando comparado com o GMA_hDerm_G6. Todos os microgéis sintetizados no presente trabalho são solúveis em água, principalmente os géis reticulados com o AT que apresentam uma alta polaridade (LÓPEZ & PICH, 2018). Podendo estipular assim que a lixiviação maior do GMA_hDerm_AT_G6 tenha ocorrido principalmente pela incorporação e complexação com o AT neste microgel, diferente do GMA_hDerm_G6.

Figura 22. Comparação visual entre as folhas do teste protetivo com a etapa de lavagem. Folhas de *C. sinensis* cv Pêra com as lesões desenvolvidas ao final dos 35 dias de experimento (parte abaxial das folhas). A = CN; B = GMA_hDerm_AT_G6 com 2,75 mg mL⁻¹ de concentração; C = GMA_hDerm_G6 com 1,375 mg mL⁻¹ de concentração; D = GMA_hDerm_G6 com 2,75 mg mL⁻¹ de concentração; E = CP.



Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

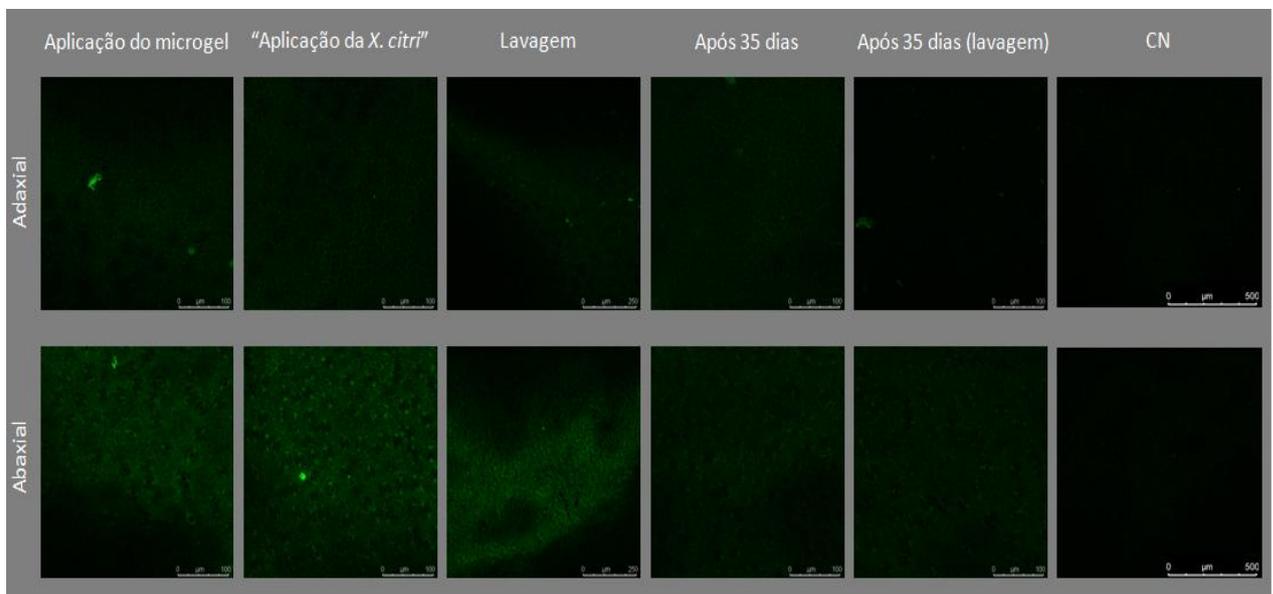
5.9. Microscopia de fluorescência confocal do microgel

Devido aos resultados positivos nos dois experimentos em casa de vegetação, selecionou-se o microgel GMA_hDerm_G6 para observação no microscópio de fluorescência confocal, buscando visualizar a fixação do gel na superfície foliar. Dessa forma, as folhas passaram pelas mesmas etapas de aspersão dos testes em casa de vegetação, e em seguida foram observadas no tempo zero e após 35 dias, analisando ambos os lados da lâmina foliar. O peptídeo hDerm carrega em sua extremidade C-terminal o eGFP, sendo possível observá-lo na folha devido a fluorescência verde da proteína GFP presente no microgel.

Através das imagens da microscopia pode-se visualizar o microgel fixo em ambos os lados da lâmina foliar logo após sua aplicação (Figura 23). As microscopias também mostraram que o microgel continuava fixo em ambos os lados da lâmina foliar, mesmo após

as etapas de aspersão da *X. citri* e da lavagem simulando uma chuva (Figura 23). No entanto ao final dos 35 dias a intensidade da fluorescência observada diminuiu, indicando a baixa presença do gel fixo nas folhas, não sendo mais observado o GMA_hDerm_G6 na parte adaxial da folha após etapa de lavagem no final do experimento (após 35 dias). Pode-se notar também que a fixação do microgel ocorre de forma mais eficiente na parte abaxial da lâmina foliar, sendo observado que mesmo no tempo zero, a fluorescência do gel na porção adaxial da lâmina foliar era sempre menor.

Figura 23. Microscopia confocal de folhas cobertas com o microgel GMA_hDerm_G6 com concentração de $2,75 \text{ mg mL}^{-1}$. Aplicação = Folha após uma única etapa de pulverização usando GMA_hDerm_G6 á $2,75 \text{ mg mL}^{-1}$; Aplicação da *X. citri* = Uma etapa de pulverização usando GMA_hDerm_G6 e seguindo-se a uma etapa de pulverização usando uma suspensão de células *X. citri*; Lavagem = Uma segunda etapa de pulverização usando solução salina (NaCl 0,85 %) logo após a etapa de aplicação da *X. citri*; Após 35 dias = O mesmo lado da folha com aplicação de *X. citri* 35 dias pós-inoculação; Após 35 dias (lavagem) = A folha com aplicação de *X. citri* seguida da etapa de lavagem após 35 dias. As fotos foram tiradas usando o canal GFP; Escala 500 μm ; Ampliação de 100 \times .



Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

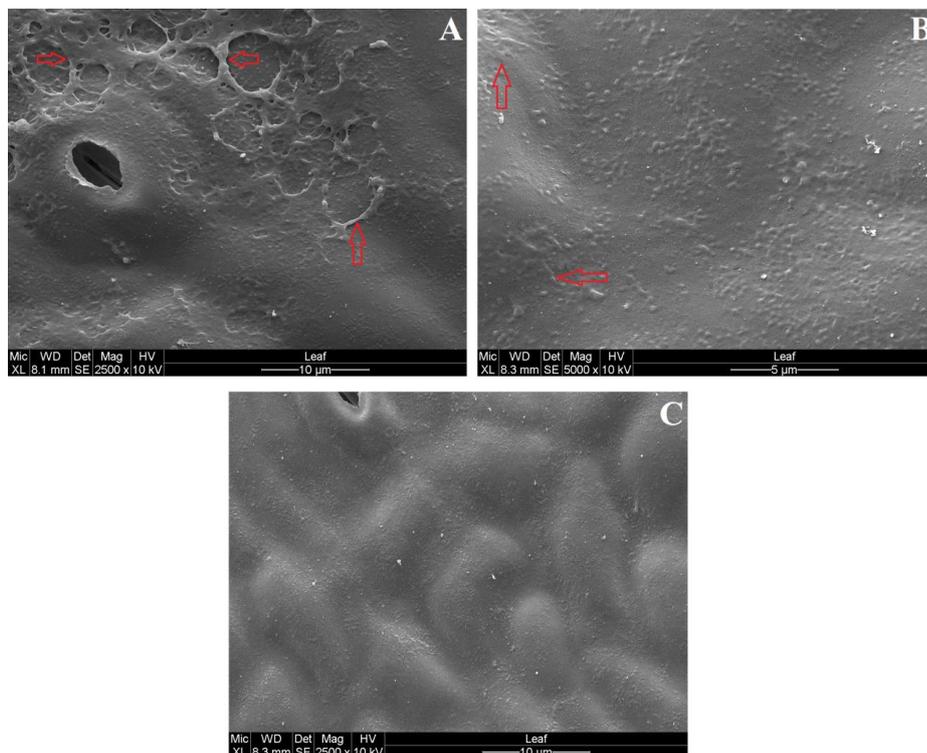
A ausência do microgel na lâmina foliar não ocorre logo após a etapa de inoculação ou de lavagem, mas ao longo do tempo, reduzindo muito a presença do GMA_hDerm_G6 na superfície foliar ao final dos 35 dias. Ressalta-se que a matriz polimérica utilizada na síntese dos microgéis é biodegradável (LÓPEZ & PICH, 2018). Logo, estipula-se que o gel não é

lixiviado por essas etapas de aspersão, mas por ações intempéricas do ambiente, diminuindo seu efeito protetivo ao longo do tempo.

5.10. Microscopia eletrônica de varredura do microgel

Para auxiliar a visualização da adesão do microgel GMA_hDerm_G6 na lâmina foliar utilizou-se o MEV para observação após a aspersão com o GMA_hDerm_G6 na concentração de $2,75 \text{ mg mL}^{-1}$. Comparou-se também o efeito da etapa de lavagem, visualizando a folha após esse ensaio de simulação de chuva. As imagens do MEV (Figura 24) mostraram a presença do GMA_hDerm_G6 nas folhas logo após a aspersão, recobrendo grande parte da lâmina foliar e de um estômato, que é uma das entradas naturais da *X. citri* para infecção (GRAHAM et al., 1992; FERENICE et al., 2018).

Figura 24. Microscopia eletrônica de varredura das folhas aspergidas com o GMA_hDerm_G6 (parte abaxial das folhas). Setas em vermelho indicam a presença do microgel. A = Folha após uma etapa de aspersão de GMA_hDerm_G6 com $2,75 \text{ mg mL}^{-1}$ de concentração; B = Folhas aspergidas com GMA_hDerm_G6 na concentração de $2,75 \text{ mg mL}^{-1}$, seguido por uma etapa de lavagem com solução salina (NaCl 0,85%); C = Folhas aspergidas apenas com uma solução salina de NaCl 0,85% (CN). As microscopias foram observadas na ampliação de $2500\times$, com $10 \mu\text{m}$ de escala da imagem.



Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

Após a etapa de lavagem ainda foi possível visualizar o GMA_hDerm_G6 fixo na folha, porém em menor quantidade (Figura 24). Outra observação foi a irregularidade da distribuição do microgel após a etapa de lavagem, mostrando que parte do GMA_hDerm_G6 foi lixiviado da folha, tendo áreas livres da presença do microgel e conseqüentemente suscetível à infecção.

Além disso, as imagens do MEV mostraram que algumas áreas da lâmina foliar não são preenchidas regularmente, estando partes da superfície desprotegidas da infecção por *X. citri*, mesmo na aspersão sem a etapa de lavagem (Figura 24-A). Uma das razões para isso é o fato da superfície da foliar não ser linear, conseqüentemente, quando o microgel é aplicado parte da superfície e estômatos não são revestidos uniformemente, permitindo a fixação e colonização das células de *X. citri* nas folhas.

6. CONCLUSÃO

Dos oito microgéis sintetizados no presente trabalho apenas o GMA_hDerm_G6 e GMA_hDerm_AT_G6 apresentaram efeito bactericida frente às células de *X. citri*. Através das microscopias de Live/Dead e ZapA, pode-se comprovar também que o G6 é o agente antimicrobiano responsável pelo efeito inibitório dos microgéis GMA_hDerm_G6 e GMA_hDerm_AT_G6.

Os testes de fitotoxicidade e citotoxicidade mostraram que ambos os microgéis apresentam um efeito tóxico para as sementes de *E. sativa* e para as células J774A.1, porém sua toxicidade acaba sendo menor que o composto cúprico comercial (Difere) utilizado como controle no presente trabalho.

Os testes em casa de vegetação comprovaram que ambos os microgéis GMA_hDerm_G6 e GMA_hDerm_AT_G6 são eficazes na proteção de citros contra a infecção da *X. citri*, quando aplicados em uma concentração mínima de $2,75 \text{ mg mL}^{-1}$. No entanto, após a etapa de lavagem simulando uma chuva, apenas o microgel GMA_hDerm_G6 a $2,75 \text{ mg mL}^{-1}$ ainda mantinha seu efeito protetivo frente a *X. citri*. Os testes de microscopia fluorescência confocal e o MEV confirmaram que parte do microgel GMA_hDerm_G6 foi lixiviado na simulação de chuva, além de confirmar que ao longo dos 35 dias de teste o gel acaba sendo perdido da superfície foliar ao longo do tempo por ações físicas do ambiente.

Apesar dos resultados inferiores ao composto cúprico, ressalta-se o sucesso na síntese e efetividade na proteção foliar contra o cancro cítrico, alcançando resultados satisfatórios, sendo um microgel inovador e menos tóxicos que os atuais agentes aplicados contra a bactéria *X. citri*. Portanto, é possível concluir que o GMA_hDerm_G6 é uma possível alternativa aos compostos cúpricos aplicados no campo para o controle do cancro cítrico.

PEPTÍDEOS BIFUNCIONAIS

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS PEPTÍDEOS BIFUNCIONAIS

7.1. Peptídeos bifuncionais produzidos e sua avaliação nos testes de REMA e MBC

O segundo material protetivo proposto no presente trabalho foram os peptídeos bifuncionais, sendo compostos por um peptídeo de ancoragem com capacidade de fixação na lâmina foliar fusionado com um peptídeo antimicrobiano (peptídeos killer). Dessa forma, uma vez aplicados na planta os peptídeos bifuncionais seriam capazes de se fixarem nas folhas e apresentarem atividade inibitória frente a *X. citri*, já que a porção aérea desse peptídeo exerceria uma ação bactericida.

Primeiramente, selecionou-se qual peptídeo antimicrobiano, seria o mais eficiente frente às células de *X. citri* para ser fusionado. Os peptídeos escolhidos para a avaliação foram a Tachyplesin I, SMAP-29, LL-37, Melittin, sendo todos eles já descritos como peptídeos antimicrobianos (STOVER et al., 2013). A Tachyplesin I é um peptídeo antimicrobiano produzido pelos hemócitos do artrópode límulo (*Tachypleus tridentatus*) (NAKAMURA et al., 1988), SMAP-29 é um peptídeo antifúngico e antibacteriano produzido pelos leucócitos de ovelhas (SKERLAVAJ et al., 1999), LL-37 é um eficaz peptídeo antibacteriano produzido e encontrado nos linfócitos, neutrófilos e monócitos dos humanos (SCHMIDTCHEN et al., 2002) e a Melittin que é encontrada no veneno de abelhas (*Apis mellifera*), sendo que 50% do veneno de abelha desidratado é composto por este peptídeo (MACKLER & KREIL, 1977). As características e propriedades dos peptídeos avaliados estão listadas na Tabela 2.

Tabela 2. Peptídeos antimicrobianos avaliados e suas propriedades

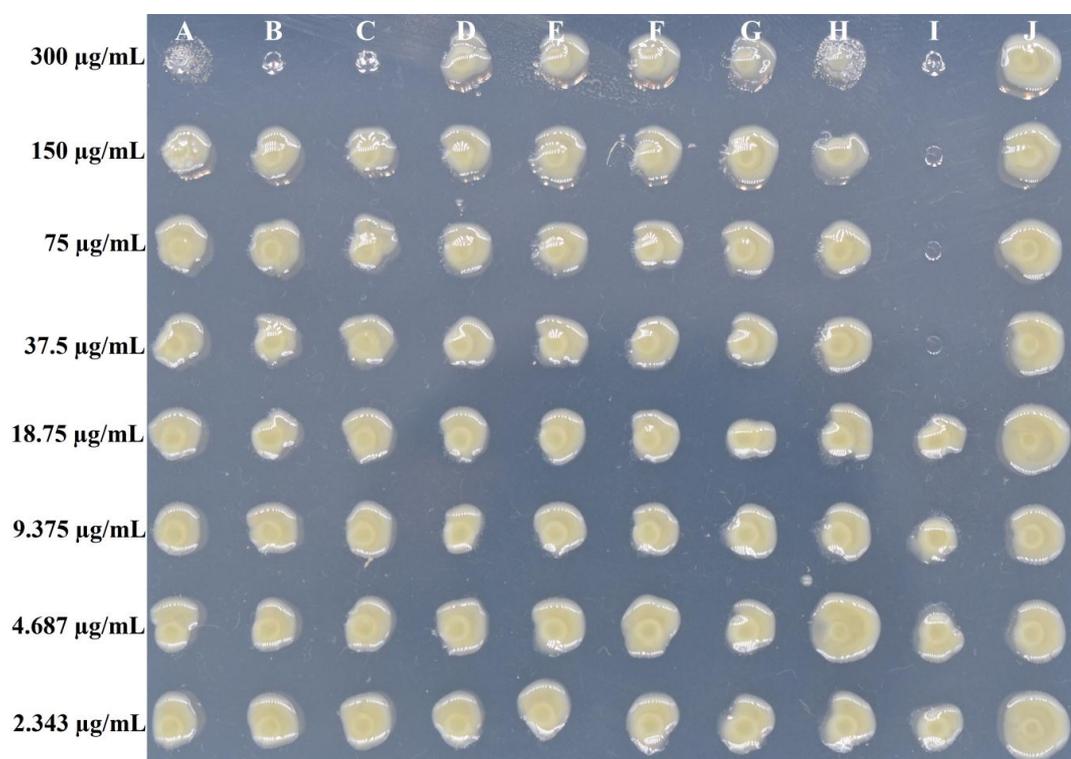
Peptídeo	Estrutura	Peso	Comprimento	Resíduos de cisteína	Carga	Hidrofobicidade
Tachyplesin I	Beta	2,36 kDa	17	4	+7	47%
SMAP-29	Helix	3,25 kDa	29	0	+9	37%
LL-37	Helix	4,49 kDa	37	0	+6	35%
Melittin	Helix	2,84 kDa	26	0	+6	46%

Os peptídeos antimicrobianos escolhidos foram produzidos com o GFP (28 kDa) fusionado na porção N- ou C-terminal das proteínas, o que nos permitiu avaliar sua capacidade bactericida mesmo fusionado à outra proteína, simulando assim sua eficácia com uma conformação mais próxima do protótipo final. Logo, produziu-se um total de 8 peptídeos

antimicrobianos fusionados com GFP (LL-37_GFP; GFP_LL-37; SMAP-29_GFP; GFP_SMAP-29; GFP_Tachyplesin; Tachyplesin_GFP; Melittin_GFP; GFP_Melittin).

Ao analisar os 8 peptídeos produzidos no teste de REMA, apenas os peptídeos bifuncionais Tachyplesin_GFP, Melittin_GFP e GFP_Melittin, com concentrações de 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$, apresentaram atividade inibitória frente a *X. citri*, inibindo 87,13, 95,42 e 90,88 % das células bacterianas, respectivamente. Os demais peptídeos não apresentaram qualquer valor inibitório nos testes de REMA, sendo ineficientes contra a *X. citri*. Os testes de MBC corroboram esses resultados, mostrando que apenas os peptídeos Melittin_GFP e GFP_Melittin apresentaram atividade bactericida para a *X. citri* (Figura 25).

Figura 25. Teste de MBC utilizando os peptídeos antimicrobianos selecionados. A = Tachyplesin_GFP; B = Melittin_GFP; C = GFP_Melittin; D = LL-37_GFP; E = GFP_LL-37; F = Tachyplesin_GFP; G = SMAP-29_GFP; H = GFP_SMAP-29; I = Controle positivo, Canamicina a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (linha 1 a 4); J = Controle do veículo, 50% de água deionizada no meio de cultivo NYG (linha 5 a 8); J = Controle negativo, bactérias sem exposição a qualquer composto.



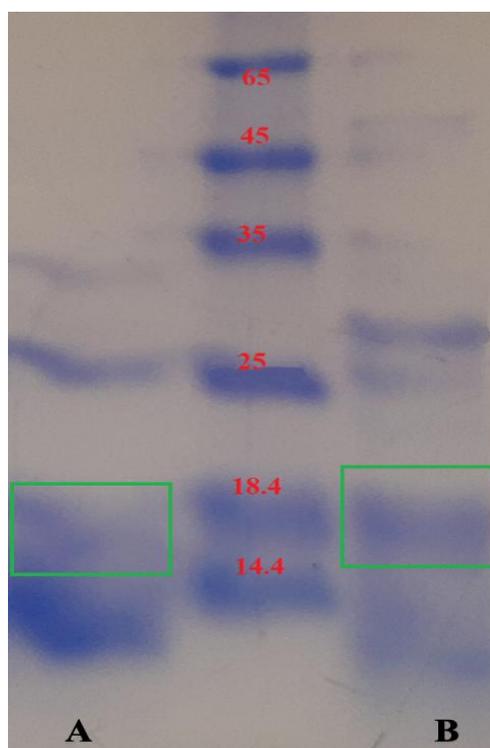
Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

O peptídeo Tachyplesin_GFP na concentração máxima produzida e testada não apresentou atividade bactericida no MBC como o Melittin_GFP e GFP_Melittin (Figura 25),

mesmo ao ter alcançado valores de inibição no REMA próximos de 90%. Consequentemente, apenas o peptídeo Melittin foi selecionado para a síntese com o peptídeo de ancoragem fusionado a ele, sendo o único peptídeo testado nas próximas etapas do presente trabalho, descartado assim os demais peptídeos.

Com o peptídeo Melittin selecionado como o único com efeito bactericida frente á *X. citri*, a próxima etapa foi produzi-lo novamente, porém fusionado com o peptídeo de ancoragem na sua porção N- ou C- terminal. O peptídeo de ancoragem selecionado foi o Cg-Def, sendo já descrito como um eficiente peptídeo de ancoragem em folhas (SCHWINGES et al., 2019). Logo, foram produzidos dois peptídeos bifuncionais, o Cg-Def_Melittin e Melittin_Cg-Def. Os novos peptídeos produzidos, apresentam peso molecular de 16,30 kDa (Figura 26). A inspeção visual do SDS-PAGE (Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil- sulfato de sódio) aliado à quantificação da proteína total de cada extrato nos permitiu inferir as concentrações de Melitina_Cg-Def e Cg-Def_Melitina em $\sim 500 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $\sim 380 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

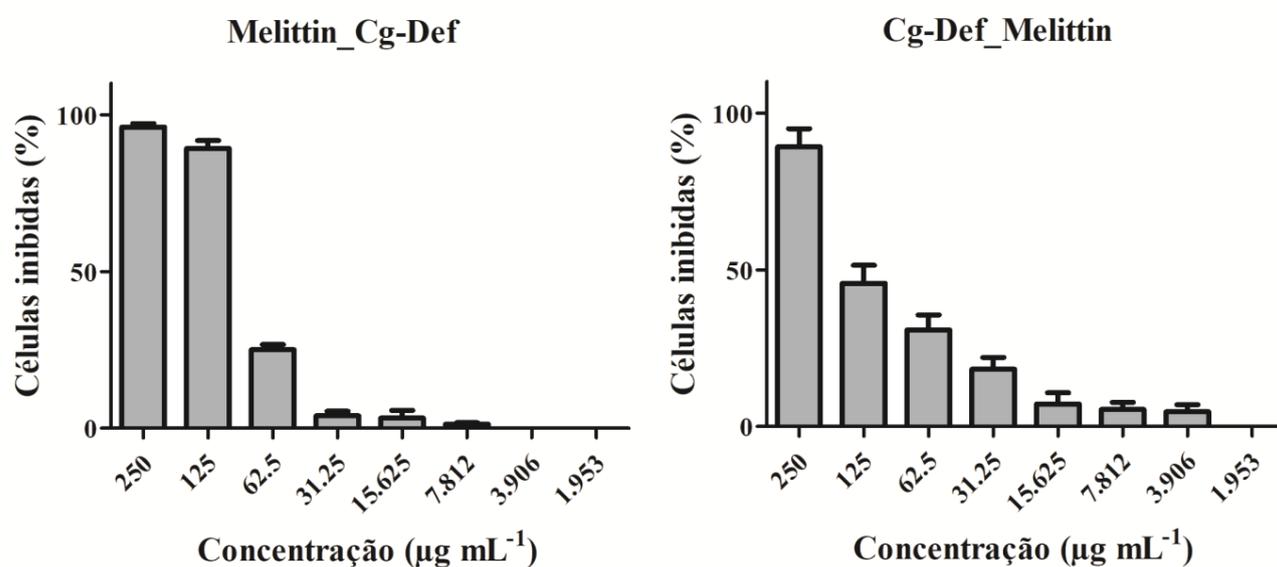
Figura 26. Gel de SDS mostrando o peptídeo Cg-Def_Melittin e Melittin_Cg-Def 16 kDa (canaleta A e B- caixa verde, respectivamente). Marcador Pierce™ Unstained Protein MW Marker (canaleta central).



Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

Ao repetir os ensaios de REMA com essas novas construções do peptídeo Melittin, foi possível confirmar que o Melittin_Cg-Def apresentou atividade inibitória frente às células de *X. citri*, com CI_{90} de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ e CI_{50} de $82,80 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 27).

Figura 27. Gráficos das porcentagens de células de *X. citri* inibidas pelos peptídeos Melittin_Cg-Def e Cg-Def_Melittin em diferentes concentrações. Barras de erro representam os valores de *DS*.

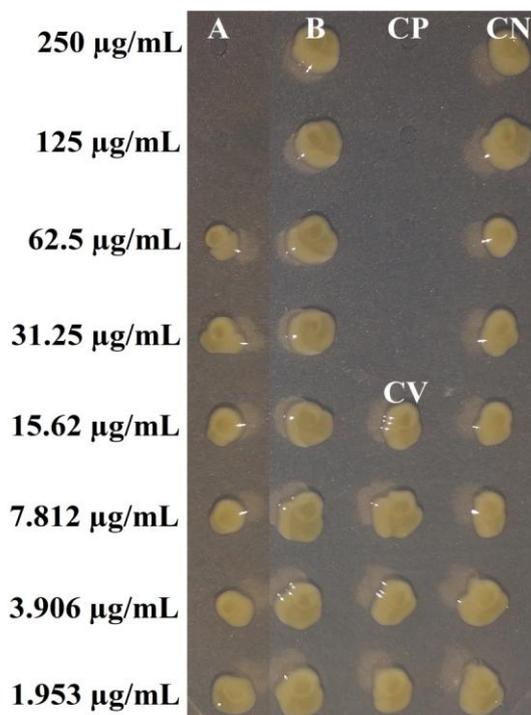


Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

O teste de MBC confirmou também a atividade bactericida do Melittin_Cg-Def na sua concentração de IC_{90} (Figura 28). No entanto, o peptídeo Cg-Def_Melittin, mesmo em sua concentração máxima de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$, não foi capaz de exibir qualquer efeito bactericida frente às células de *X. citri* (Figura 28).

Mesmo tendo apresentado uma inibição de 89,25% de células nos ensaios de REMA (Figura 27), este efeito pode ser considerado apenas como bacteriostático. Ressalta-se ainda que a produção do Cg-Def_Melittin foi menor que a do Melittin_Cg-Def, mesmo ambos tendo sido expressados e purificados da mesma maneira.

Figura 28. Teste de MBC dos peptídeos Melittin fusionado com o peptídeo de ancoragem Cg-Def. A = Melittin_Cg-Def; B = Cg-Def_Melittin; CP = Controle positivo com Canamicina ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$); CV = Controle do veículo (50% de água deionizada autoclavada no meio NYG (v/v)); CN = Controle negativo (células de *X. citri* sem exposição a qualquer composto).



Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

Por ter mostrado uma atividade inibitória inferior, não apresentando ação bactericida contra a *X. citri*, além da sua expressão e purificação ser mais difícil, a produção do Cg-Def_Melittin não foi continuada. Todos os testes seguintes foram realizados apenas com o Melittin_Cg-Def.

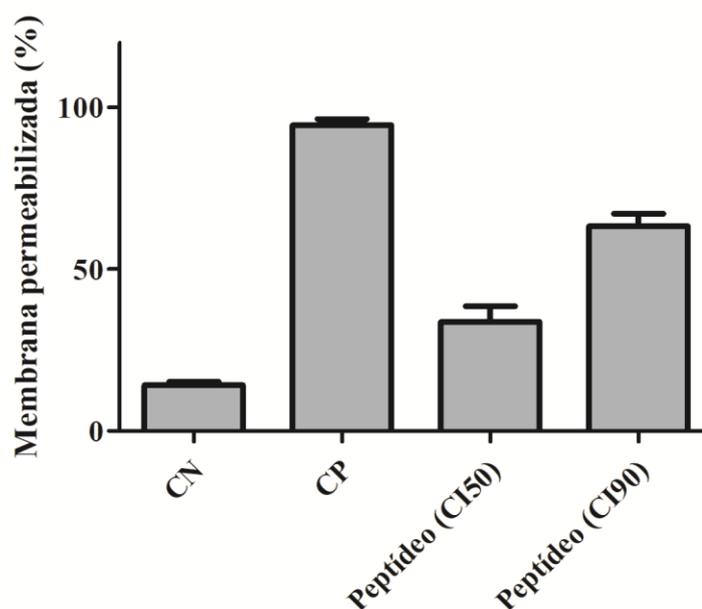
7.2. Avaliação do mecanismo de ação do peptídeo bifuncional testado

O Melittin é descrito como um peptídeo bactericida, cujo alvo celular é a membrana citoplasmática (RAGHURAMAN & CHATTOPADHYAY, 2007; LEE & LEE 2014). No entanto, como o Melittin produzido no presente trabalho foi fusionado com o peptídeo de ancoragem Cg-Def, seu mecanismo de ação ou alvos celulares podem ter sofrido alteração. Desta forma, realizaram-se análises em microscopia de fluorescência, monitorando o efeito do peptídeo na membrana citoplasmática da bactéria utilizando os corantes SYTO9 (azul) e IP (vermelho). O SYTO9 irá penetrar naturalmente em todas as células, corando o nucleóide celular, enquanto que o IP só consegue corar a célula se a membrana citoplasmática estiver

rompida indicando à perturbação dessa estrutura e consequentemente a morte celular (ZHOU et al., 2018).

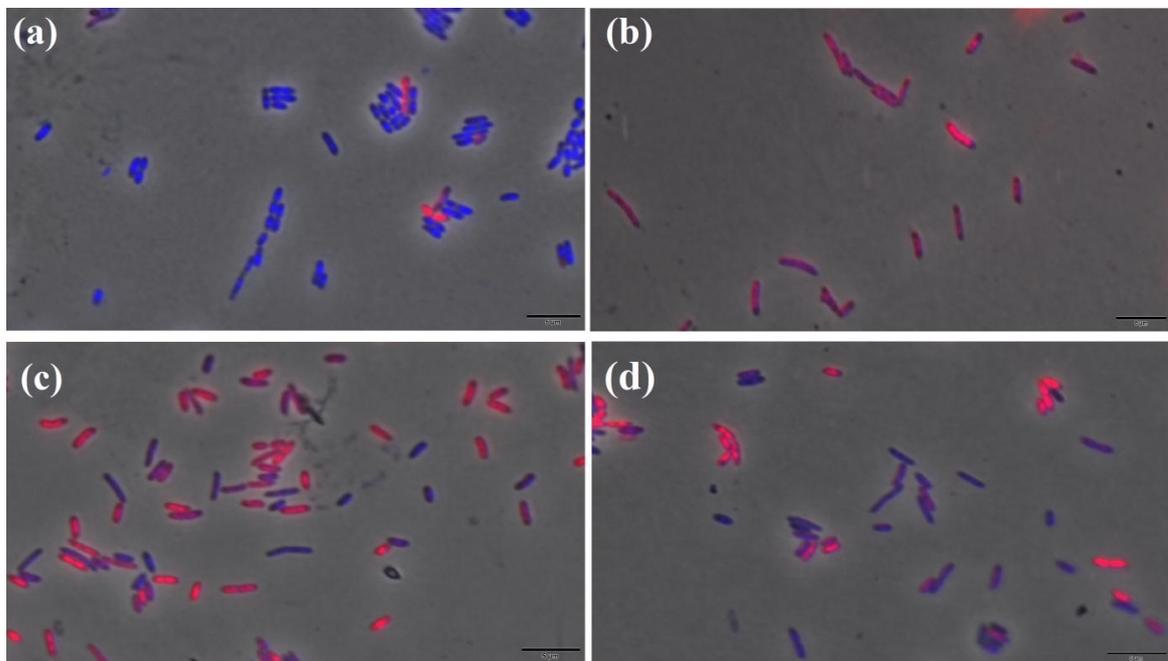
O Melittin_Cg-Def na CI_{50} mostrou que apenas 33,80% das células de *X. citri* estavam mortas e com a membrana citoplasmática afetada após 15 minutos de contato (Figura 29), exibindo um grande número de células vivas nas imagens da microscopia (Figura 30). Porém, quando aplicado na concentração de CI_{90} , o peptídeo afetou 63,37% das células de *X. citri* nos primeiros 15 minutos de contato (Figura 29), mostrando mais da metade das células mortas com danos na membrana citoplasmática nas imagens da microscopia fluorescente (Figura 30). Efeitos de ação antimicrobiana rápida são uma das características quando um composto afeta a membrana citoplasmática, levando as células à morte nos primeiros minutos de contato (MORÃO et al., 2019). Esses resultados confirmam que mesmo após ser fusionado com um peptídeo de ancoragem, alterando assim a conformação inicial da proteína, seu mecanismo de ação celular continua inalterado.

Figura 29. Porcentagem do número de células de *X. citri* com a membrana citoplasmática afetada após 15 minutos de contato com o Mellitin_Cg-Def nas concentrações de CI_{50} e CI_{90} . O CN é o controle negativo (células não tratadas), CP é o controle positivo (células com a membrana rompida por estresse térmico), Peptídeo (CI_{50}) é o Mellitin_Cg-Def na concentração de CI_{50} e o Peptídeo (CI_{90}) é o Mellitin_Cg-Def na concentração de CI_{90} .



Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

Figura 30. Células de *X. citri* com a membrana citoplasmática afetada após o contato com o Melittin_Cg-Def. As células foram expostas ao peptídeo na sua respectiva concentração de CI_{50} e CI_{90} durante 15 minutos de contato. As células de *X. citri* foram então coradas com SYTO9 e IP. As células com membrana citoplasmática rompida são mostradas em vermelho, enquanto que as células com membrana citoplasmática intacta são mostradas em azul. (a) CN (células não tratadas); (b) CP (células com a membrana citoplasmática rompida por estresse de temperatura); (c) Células tratadas com o Melittin_Cg-Def na CI_{50} ; (d) células tratadas com Melittin_Cg-Def na CI_{90} . As imagens são a sobreposição de microscopia de contraste de fase e fluorescência. Os filtros TxRed e DAPI-Blue foram aplicados juntos e usados para visualizar IP e SYTO9. As barras correspondem a 5 μm ; ampliação de 100 \times , com um total de 100 células visualizadas por tratamento.

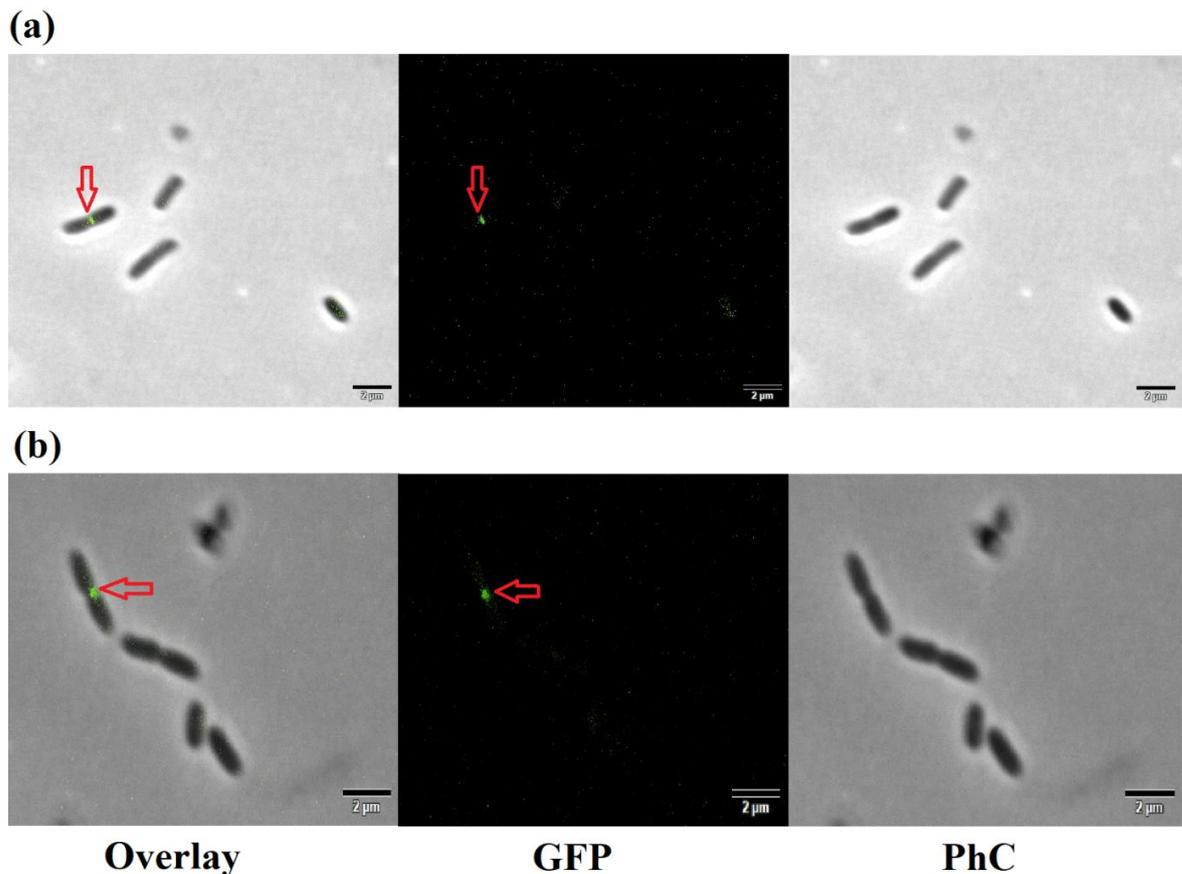


Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

Alguns estudos relatam que a Melittin apresenta um efeito de múltiplos alvos, atuando não apenas na membrana citoplasmática, mas em outros sítios celulares como DNA, divisão celular ou aparato enzimático (LÉONARD et al., 2016; MEMARIANI & MEMARIANI, 2020). Para investigar essa possível ação do Melittin utilizou-se o mutante *X. citri amy::pPM2a-zapA* com o anel Z marcado com GFP para visualização no microscópio. Desta forma, qualquer perturbação ou ação no anel divisional causada pelo peptídeo poderia ser observada.

O monitoramento do anel divisional nas células de *X. citri* provou que o Melittin_Cg-Def não afeta a divisão celular da bactéria. Sendo que ao ser exposto ao peptídeo por 15 minutos na CI₉₀ ainda era possível visualizar células com o septo divisional intacto (Figura 31). Provavelmente, se o tempo de exposição fosse prolongado, talvez fosse possível observar o total desaparecimento do septo. Porém esse seria um efeito secundário, sendo que com 15 minutos de contato na mesma concentração, mais de 60% das células de *X. citri* já tiveram a membrana citoplasmática rompida pelo peptídeo. Desta forma, o rompimento do anel divisional é apenas uma consequência desse efeito. Logo, pode-se concluir que o primeiro alvo do peptídeo é a membrana celular da bactéria, sendo os demais alvos apenas efeitos secundários.

Figura 31. O peptídeo Melittin_Cg-Def não afeta a divisão celular da *X. citri*. (a) CN (células não tratadas); (b) células tratadas com Melittin_Cg-Def na CI₉₀. O septo divisional corresponde à barra verde no centro das células (indicados pelas setas vermelhas). Ampliação de 100×, barra de tamanho de 2 µm, total de 100 células visualizadas por tratamento.



Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

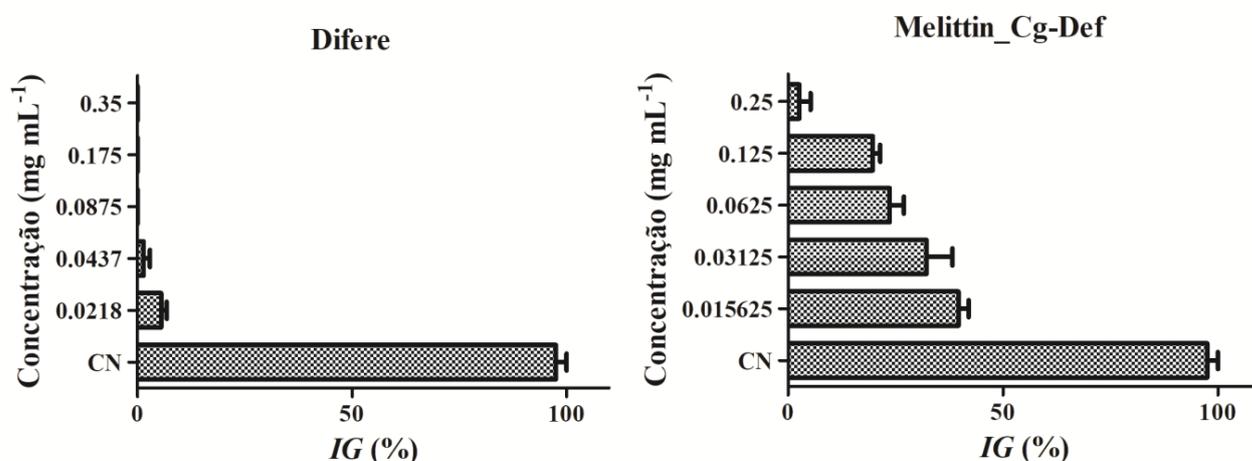
7.3. Fitotoxicidade do peptídeo bifuncional

O teste de fitotoxicidade permite o monitoramento do período germinativo e desenvolvimento da radícula do vegetal, sendo estas umas das principais etapas fisiológicas do crescimento e desenvolvimento da planta (MENDES, 2019). Com isso, ao expor as sementes de *E. sativa* ao peptídeo em diferentes concentrações, será possível avaliar seu efeito fitotóxico, calculando sua CL_{50} , observando assim as consequências que essa proteína exerce nesse grupo de organismos.

Após contato com o peptídeo as sementes de *E. sativa* apresentaram uma germinação e desenvolvimento radicular incompleto ao se comparar com o CN. Através dos valores de IG (%) determinou-se uma CL_{50} de $0,0103 \text{ mg mL}^{-1}$ para o Melittin_Cg-Def (Figura 32). O Melittin é descrito como um eficiente agente contra células eucarióticas como fungos e leveduras (LEE & LEE, 2014; MEMARIANI & MEMARIANI, 2020), logo é esperado que ele apresente um efeito tóxico para células eucarióticas vegetais. A etapa de germinação é caracterizada como um dos períodos mais sensíveis para o organismo vegetal (MENDES, 2019), estando às células das *E. sativas* mais suscetíveis ao peptídeo. No entanto, o Difere se mostrou ser três vezes mais tóxico que o Melittin_Cg-Def (Figura 32), confirmando que mesmo o peptídeo exibindo uma certa fitotoxicidade, seus valores são muito menores ao comparar com o composto cúprico comercial já utilizado em campo.

Figura 32. Gráfico da fitotoxicidade do peptídeo Melittin_Cg-Def e Difere para as sementes de *E. sativa*. (Difere - $LC_{50} = 0,004 \text{ mg mL}^{-1}$; Melittin_Cg-Def - $LC_{50} = 0,0103 \text{ mg mL}^{-1}$).

Barras de erro representam os valores de DS .



Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

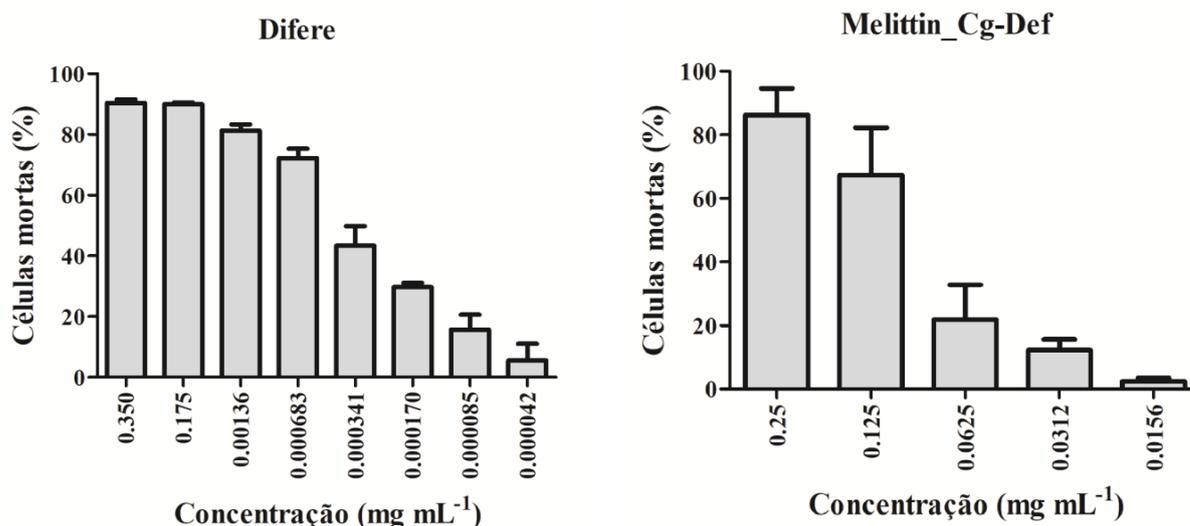
7.4. Teste de citotoxicidade do peptídeo bifuncional

As células J774A.1 foram utilizadas nos testes de citotoxicidade para verificar o efeito tóxico do peptídeo bifuncional frente a uma célula eucariótica animal. O composto cúprico comercial no presente trabalho também foi testado e comparado ao peptídeo, quantificando assim o efeito tóxico de ambos os agentes testados.

Os resultados mostraram que o peptídeo Melittin_Cg-Def apresenta toxicidade para as células J774A.1, com uma CL_{50} de $0,102 \text{ mg mL}^{-1}$ (Figura 33). Apesar de apresentar citotoxicidade, os valores do Melittin_Cg-Def são muito inferiores ao composto cúprico avaliado (Difere), que apresentou uma CL_{50} de $0,0005 \text{ mg mL}^{-1}$ (Figura 33).

Em uma comparação direta, o peptídeo se mostrou cem vezes menos tóxico que o Difere para as células eucariontes avaliadas no presente trabalho. Desta forma, pode-se confirmar que o peptídeo produzido no presente trabalho é menos tóxico que a formulação cúprica aplicada em campo.

Figura 33. Porcentagem de células J774A.1 mortas por diferentes concentrações do peptídeo bifuncional produzido e pelo composto cúprico comercial aplicado em campo. (Melittin_Cg-Def - $LC_{50} = 0,102 \text{ mg mL}^{-1}$; Difere - $LC_{50} = 0,0005 \text{ mg mL}^{-1}$). Barras de erro representam os valores de *DS*.



Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

7.5. Teste protetivo em casa de vegetação utilizando o peptídeo bifuncional

Buscando comparar e avaliar o efeito protetivo do peptídeo bifuncional produzido no presente trabalho, mudas de *C. sinensis* cv Pêra foram aspergidas com diferentes concentrações do Melittin_Cg-Def. Sendo em seguidas aspergidas com o inóculo de *X. citri*, avaliando assim sua proteção contra a infecção bacteriana. As comparações dos resultados foram feitas com a formulação cúprica utilizada em campo (Difere), analisando a eficácia do peptídeo bifuncional frente ao produto comercial.

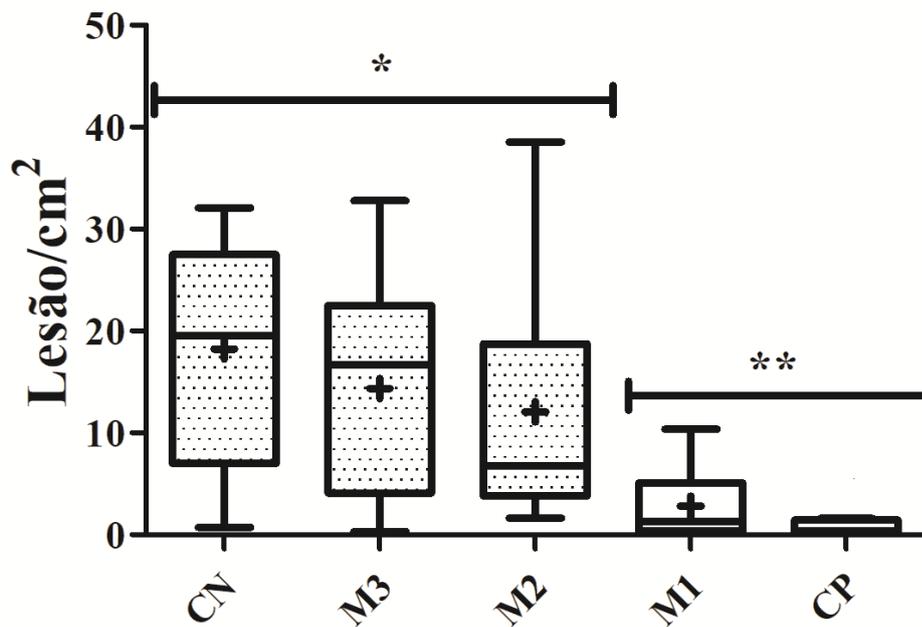
A média do número de lesões por área foliar do Melittin_Cg-Def nas concentrações de 62,50 e 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram de 14,37 e 12,06, respectivamente (Figura 34). Esses resultados comprovam que o peptídeo bifuncional nessas concentrações não protege as plantas de citros contra a infecção da *X. citri*, sendo que o CN apresentou uma média de 18,22 lesões por área foliar. Mesmo em um comparativo visual, as folhas do CN apresentavam muita semelhança com as do peptídeo nessas duas concentrações, sendo indistinguíveis visualmente (Figura 35).

No entanto, na concentração de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ o Melittin_Cg-Def apresentou uma média de 2,82 lesão por área foliar, apresentando uma proteção significativa contra a infecção da *X. citri* (Figura 34). Esse resultado também confirmou que o peptídeo bifuncional nessa concentração é estatisticamente igual ao Difere (1,31 lesão/área), sendo possível observar um baixo número de lesões nas folhas que foram aspergidas os dois compostos (Figura 35).

O Melittin é um peptídeo antimicrobiano conhecido pela sua atividade inibitória frente à formação de biofilme bacteriano (PICOLI et al., 2017), desta forma uma das principais características para a infecção da *X. citri* é a colonização e formação do biofilme na lâmina foliar, que provavelmente foi inibido pela atividade protetiva do Melittin_Cg-Def.

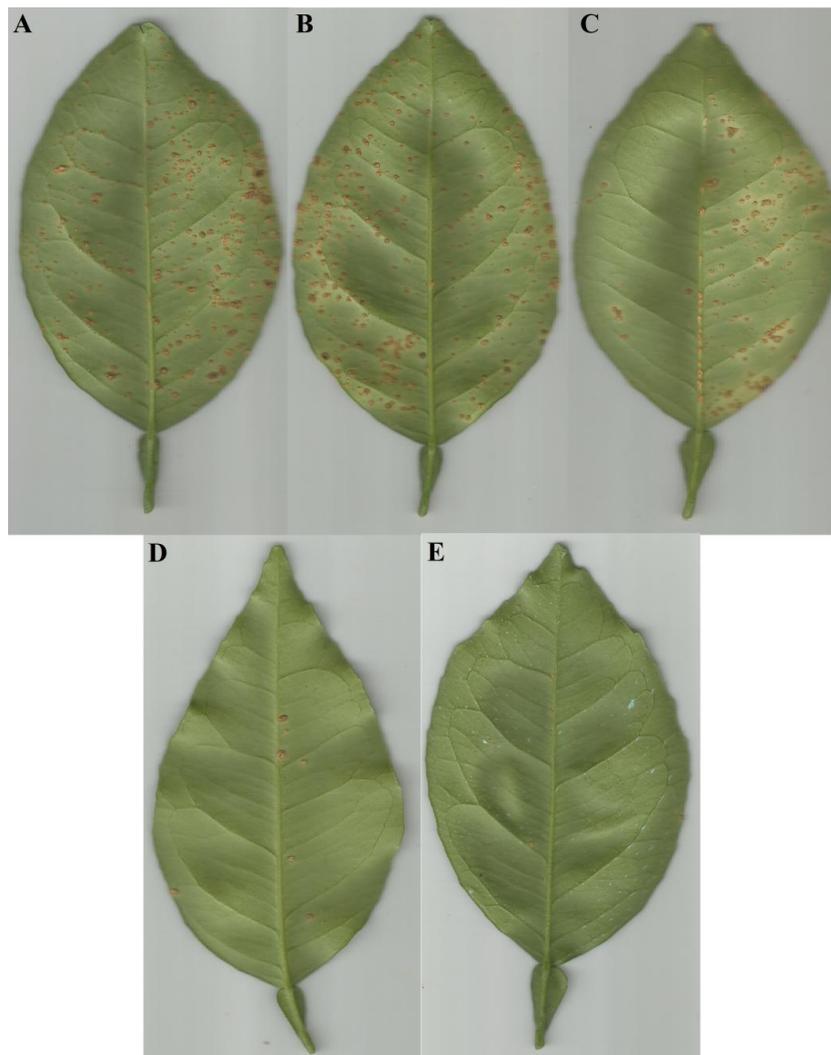
Figura 34. Gráficos do número de lesão por área foliar dos tratamentos utilizando o Melittin_Cg-Def em diferentes concentrações. Plantas de *C. sinensis* cv Pêra foram pulverizadas com o peptídeo bifuncional variando sua concentração de aplicação. CP é a formulação de cobre comercial (Difere), CN eram as folhas aspergidas apenas com uma solução salina (NaCl a 0,85%), M3 é o Melittin_Cg-Def com 62,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de concentração, M2 é o Melittin_Cg-Def com 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de concentração, M1 é o Melittin_Cg-Def com 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de concentração. Vinte e quatro horas após o tratamento, as folhas foram aspergidas com *X. citri* (10^8 UFC mL^{-1}) e mantidas sob observação até o tempo final de 35 dias para analisar o desenvolvimento dos sintomas da doença. Cada folha foi considerada como um indivíduo independente na distribuição do gráfico. Todos os dados e grupos foram submetidos à análise estatística não paramétrica de Kruskal-Wallis (Dunn), com três graus de liberdade.

As barras de erro representam o erro padrão de cada grupo.



Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

Figura 35. Comparativo visual das folhas tratadas com o peptídeo bifuncional em diferentes concentrações após o teste de aspersão em casa de vegetação. Folhas de *C. sinensis* cv Pêra com as lesões desenvolvidas ao final dos 35 dias de experimento (parte abaxial das folhas). A = CN; B = Melittin_Cg-Def com $62,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de concentração; C = Melittin_Cg-Def com $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de concentração; D = Melittin_Cg-Def com $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ de concentração; E = CP.



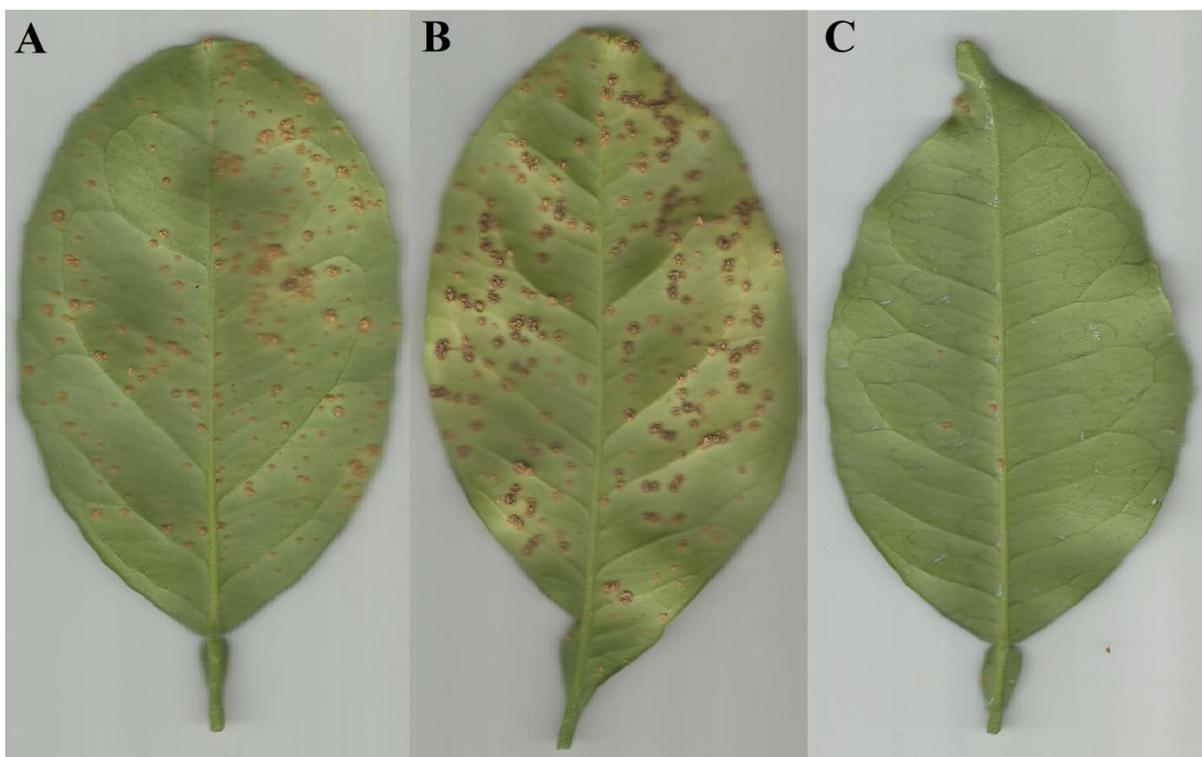
Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

7.6. Teste protetivo utilizando os peptídeos bifuncionais em casa de vegetação com uma etapa de lavagem

Para simular o efeito de uma chuva em campo após a aplicação do Melittin_Cg-Def foi realizado o teste de aspersão com uma etapa de lavagem nas folhas um dia após a aplicação do peptídeo bifuncional. Como apenas o Melittin_Cg-Def na concentração de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou uma proteção significativa, apenas essa concentração foi testada neste experimento.

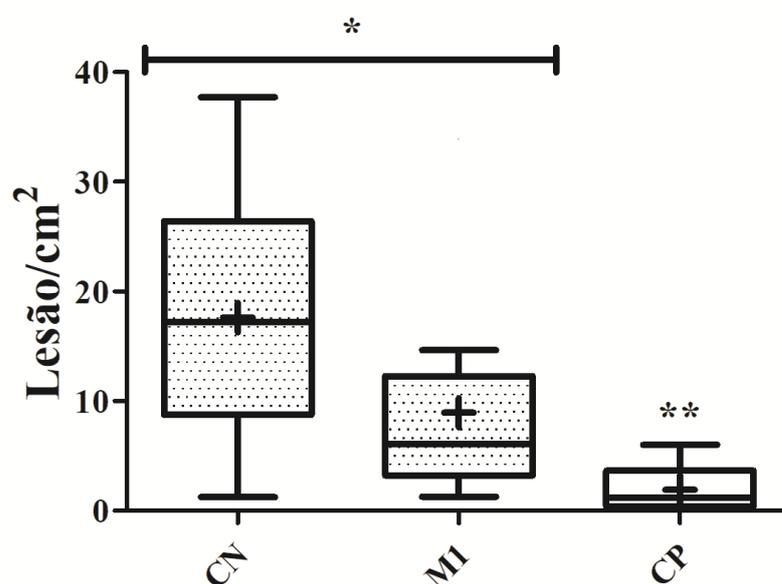
Apesar do número de lesões nas folhas tratadas com o peptídeo serem visualmente menores que o CN (Figura 36), a análise estatística dos dados comprovou que o peptídeo bifuncional não apresentou uma proteção significativamente diferente do CN. A média de lesão por área foliar do tratamento com Melittin_Cg-Def á 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi de 8,96, sendo uma média próxima do CN (13,63 lesão/área) (Figura 37). Novamente o CP se mostrou eficaz mesmo após a simulação da chuva, com uma média de 1,93 lesão/área (Figura 37).

Figura 36. Comparação visual entre as folhas dos tratamentos após o teste de aspersão com uma etapa de lavagem. Folhas de *C. sinensis* cv Pêra com as lesões desenvolvidas ao final dos 35 dias de experimento (parte abaxial das folhas). A = CN; B = Melittin_Cg-Def com 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de concentração; C = CP.



Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

Figura 37. Gráfico dos resultados dos testes em casa de vegetação simulando uma chuva. Plantas de *C. sinensis* cv Pêra foram pulverizadas com os respectivos microgéis, após 24 horas foram aspergidas com 100 mL de água filtrada e autoclavada por 2 minutos. Após 24 horas, ocorreu a aspersão do inóculo de *X. citri* (10^8 UFC mL⁻¹). As plantas foram observadas até o tempo final de 35 dias. O CN foram as folhas aspergidas apenas com solução salina (NaCl 0,85%), CP foi à formulação de cobre comercial (Difere), M1 é o Melittin_Cg-Def com 250 µg mL⁻¹ de concentração. Cada folha foi considerada como um indivíduo independente na distribuição do gráfico. Todos os dados e grupos foram submetidos à análise estatística não paramétrica de Kruskal-Wallis (Dunn), com três graus de liberdade. As barras de erro representam o erro padrão de cada grupo.



Fonte: figura elaborada pelo próprio autor.

O oxiclreto de cobre (Difere) é apolar, não sendo facilmente lixiviado pela água, apresentando uma resiliência e adesão maior às folhas de citros quando comparados com o peptídeo bifuncional produzido. No entanto, vale destacar que o Melittin_Cg-Def á 250 µg mL⁻¹ apresentou uma proteção estatisticamente igual ao CP nos ensaios de aspersão sem a etapa de lavagem, além de ser menos tóxico que o composto cúprico. No caso de uma aplicação em campo, o recomendado seria aspergir novamente o Melittin_Cg-Def após a chuva para garantir seu efeito protetivo frente a infecção da *X. citri*.

8. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que dos quatro peptídeos antimicrobianos avaliados apenas o Melittin se mostrou bactericida contra as células de *X. citri*. Ao fusionar o Melittin com o peptídeo de ancoragem (Cg-Def), apenas a construção Melittin_Cg-Def continuou apresentando atividade bactericida para as células de *X. citri*. A análise de microscopia de fluorescência confirmou que seu mecanismo de ação continuava inalterado, afetando a membrana citoplasmática da bactéria.

Os ensaios de toxicidade comprovaram que o Melittin_Cg-Def apresenta efeito tóxico para as células J774A.1 e para as sementes de *E. sativa*. No entanto, concluiu-se que essa toxicidade era muito menor que o composto cúprico comercial (Difere), sendo que a CL_{50} do peptídeo era proporcionalmente 3 vezes maior que a formulação utilizando o cobre para as sementes e 100 vezes maior para as células mutantes de rato. Dessa forma, concluiu-se que o peptídeo bifuncional apresenta uma baixa toxicidade quando comparado com o oxiclreto de cobre.

Os testes em casa de vegetação confirmaram que o Melittin_Cg-Def é eficaz na proteção de citros contra a infecção da *X. citri*, apresentando uma proteção estatisticamente igual ao Difere quando aplicado na concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$. Porém, ao realizar a etapa de lavagem buscando simular o efeito de uma chuva, o peptídeo era lixiviado das folhas, perdendo toda sua eficácia na proteção das plantas contra o cancro cítrico. Logo, concluiu-se que para um contínuo efeito protetivo, o peptídeo deve ser aplicado novamente após uma chuva.

Concluiu-se também que o composto cúprico é mais eficiente, resiliente e com maior capacidade de fixação nas folhas de citros que o Melittin_Cg-Def. No entanto, ressalta-se que o peptídeo bifuncional apresentou números similares na proteção do citros nos testes em casa de vegetação quando comparado com a formulação cúprica comercial (Difere), sendo um sucesso sua produção e aplicação, podendo vir a ser uma alternativa inovadora e menos tóxica aos compostos cúpricos.

CONCLUSÃO GERAL

9. CONCLUSÃO GERAL

As duas plataformas protetivas propostas e sintetizadas no presente trabalho apresentaram atividade bactericida frente às células de *X. citri* (peptídeo bifuncional Melittin_Cg-Def a $0,125 \text{ mg mL}^{-1}$; microgéis GMA_hDerm_G6 e GMA_hDerm_AT_G6 a $1,375 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,343 \text{ mg mL}^{-1}$, respectivamente). Além de se mostrarem menos tóxicos que o cobre para sementes de rúcula e para células mutantes eucariontes. As duas plataformas propostas (peptídeo bifuncional Melittin_Cg-Def a $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$; microgéis GMA_hDerm_G6 e GMA_hDerm_AT_G6 a $2,75 \text{ mg mL}^{-1}$) também foram eficientes na proteção de citros contra a infecção da *X. citri* nos experimentos de casa de vegetação, apresentando resultados satisfatórios quando comparados com o cobre metálico a $0,7 \text{ mg mL}^{-1}$. No entanto, após a etapa de lavagem, confirmou-se que o peptídeo bifuncional e o microgel eram lixiviados das folhas de citros, diferente do cobre que continuava fixo e mantendo seu efeito protetivo. O microgel GMA_hDerm_G6 na concentração de $2,75 \text{ mg mL}^{-1}$ ainda apresentava um efeito protetivo significativo mesmo após a etapa de lavagem, porém inferior ao cobre. Vale destacar que os peptídeos e os microgéis são solúveis em água além de serem biodegradáveis, diferente do cobre que é apolar e bioacumulativo no solo. Apesar das plataformas propostas não terem tido a mesma fixação do cobre nas folhas, mesmo tendo um peptídeo de ancoragem em sua estrutura, vale destacar a possibilidade deles serem uma possível alternativa a este metal.

Substituir o cobre na agricultura é algo muito difícil. O cobre é eficaz na proteção contra a *X. citri* e diversos outros fitopatógenos que acometem o citros, além de apresentar um bom custo-benefício para o agricultor. A aplicação constante e muitas vezes excessiva faz com que o cobre se torne prejudicial. Sendo tóxico para o solo e para os organismos daquele ambiente, além de prejudicar o desenvolvimento do próprio citros quando este metal está em grande quantidade no solo. Nesse sentido, uma aplicação mais racional do cobre ou reduzida com outros protetivos ambientalmente mais seguros e sustentáveis já seria uma solução para o problema atual do descomedimento no uso deste metal na agricultura. As plataformas propostas podem vir a ter um custo de produção maior e ter uma atividade protetiva residual menor (por serem biodegradáveis e solúveis em água), porém se aplicados concomitantemente com o cobre ou de forma alternada com este metal, seria uma solução viável para o atual impacto da aplicação exagerada do cobre nos solos agrícolas.

Apesar do microgel ter sido desenvolvido para ser de fácil produção, apresentando um baixo custo de síntese, o peptídeo bifuncional exige muita tecnologia e tem um custo de

produção mais elevado. Além disso, as duas plataformas ainda precisam ser avaliadas quanto a sua produção em escala industrial e eficácia protetiva em campo.

Ainda assim o projeto foi uma prova de conceito, conseguindo confirmar que ambas as plataformas inovadoras são eficazes na proteção do citros contra o cancro cítrico. Logo, a teoria juntamente com o desenvolvimento das plataformas protetivas foi um sucesso, alcançando o objetivo proposto no presente trabalho. Futuramente e com mais estudos, existe a possibilidade da aplicação e uso dessas plataformas para substituir, ou ao menos reduzir, a aplicação de compostos cúpricos no campo.

10. BIBLIOGRAFIA

ADLER, C.; CORBALÁN, N. S.; SEYEDSAYAMDOST, M. R.; POMARES, M. F.; CRISTÓBAL, R. E.; CLARDY, J.; KOLTER, R.; VICENT, P. A. Catecholate Siderophores Protect Bacteria from Pyochelin Toxicity. **PLoS ONE**, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046754>

AGRAWAL, G.; WANG, J.; BRUSTER, B.; ZHU, X.; MOLLER, M.; PICH, A. Degradable microgels synthesized using reactive polyvinylalkoxysiloxanes as crosslinkers. **Soft Matter**, v. 22, p. 5380-5390, 2013.

ALFEREZ, F. M.; GERBERICH, K. M.; LI, J-L.; ZHANG, Y.; GRAHAM, J. H.; MOU, Z. Exogenous nicotinamide adenine dinucleotide induces resistance to citrus canker in citrus. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1472, 2018.

ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, F. J.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; HERRANZ-LÓPEZ, M.; MICOL, V. Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. **Phytomedicine**, v. 90, p. 153626, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153626>

AMARAL, S. F. Providências para a erradicação do cancro cítrico. **O Biológico**, v. 23, p. 112-123, 1957.

BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial peptides. **Pharmaceuticals**, v. 28, p. 1543-1575, 2013. <https://doi.org/10.3390/ph6121543>

BANJANAC, M.; KOS, V. M.; NUJIC, K.; VRANCIC, M.; BELAMARIC, D.; CRNKOVIC, S.; HLEVNJAK, M.; HABER, V. E. Anti-inflammatory mechanism of action of azithromycin in LPS-stimulated J774A.1 cells. **Pharmacological Research**, v. 66, p. 357-362, 2012.

BATTAGIN, T. S.; CACCALANO, M. N.; DILARRI, G.; ZAMUNER, C. F. C.; ALLEONI, N.; SALDANHA, L. L.; BACCI Jr, M.; FERREIRA, H. *Syzygium aromaticum* (clove) essential oil: An alternative for the sanitization of citrus fruit in packinghouses. **Journal of**

Food Processing and Preservation, v. 45, p. e15496, 2021.
<https://doi.org/10.1111/jfpp.15496>

BEHLAU, F. An overview of citrus canker in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 46, p. 1-12, 2021. <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00377-2>

BEHLAU, F. **Cancro cítrico: medidas essenciais de controle**, 4th ed. Fundecitrus, Araraquara, 2019. Disponível em:
https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/manual_detalhes/manual-de-cancro-citrico/79.
Accessed on February 21, 2020

BEHLAU, F.; BELASQUE Jr, J.; LEITE Jr, R. P.; FILHO, A. B.; GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; SCANDELAI, L. H. M.; PRIMIANO, I. V.; BASSANEZI, R. B.; AYRES, A. J. Relative Contribution of Windbreak, Copper Sprays, and Leafminer Control for Citrus Canker Management and Prevention of Crop Loss in Sweet Orange Trees. **Plant Disease**, 2021. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-20-2153-RE>

BEHLAU, F.; CANTEROS, B. I.; MINSAVAGE, G. V.; JONES, J. B.; GRAHAM, J. H. Molecular characterization of copper resistance genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*. **Applied and Environmental Microbiology**, 2011. <https://doi.org/10.1128/AEM.03043-10>

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

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.

BITTANCOURT, A.A. O cancro cítrico. **O Biológico**, v. 23, p. 101-111, 1957.

BOCK, C. H.; GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; COOK, A. Z.; PARKER, P. E. Wind Speed Effects on the Quantity of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Dispersed Downwind from Canopies of Grapefruit Trees Infected with Citrus Canker. **Plant Disease**, v. 94, p.725–736, 2010. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-6-0725>

BULET, P.; HETRU, C.; DIMARCQ, J.; HOFFMANN, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 23, p. 329-344, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(99\)00015-4](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(99)00015-4)

BULET, P.; STÖCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunological Reviews**, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0124.x>

CACCALANO, M. N.; DILARRI, G.; ZAMUNER, C. F. C.; DOMINGUES, D. S.; FERREIRA, H. Hexanoic acid: a new potential substitute for copper-based agrochemicals against citrus canker. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, p. 2488-2499, 2021. <https://doi.org/10.1111/jam.15125>

CALO, J. R.; CRANDALL, P. G.; O'BRYAN, C. A.; RICKE, S. C. Essential oils as antimicrobials in food systems — A review. **Food Control**, v. 54, p. 111–119, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodc ont.2014.12.040>

CANTEROS, B. I.; MINSAVAGE, G. V.; JONES, J. B.; STALL, R. E. Diversity of plasmids in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Molecular Plant Pathology**, v. 85, p. 1482-1486, 1995.

CANTÓN, R.; MOROSINI, M. I. Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, p. 977-991, 2011. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00295.x

COELHO, F. C.; SQUITTI, R.; VENTRIGLIA, M.; CERCHIARO, G.; DAHER, J. P.; ROCHA, J. G.; RONGIOLETTI, M. C. A.; MOONEN, A-C. Agricultural Use of Copper and Its Link to Alzheimer's Disease. **Biomolecules**, v. 10, p. 897, 2020. <https://doi.org/10.3390/biom10060897>

CALVINO, D. F.; NÓVOA-MUNOZ, J. C.; DÍAZ-RAVINA, M.; ARIAS-ESTÉVEZ M. Copper accumulation and fractionation in vineyard soils from temperate humid zone (NW Iberian Peninsula). **Geoderma**, v. 153, p. 119–129, 2009.

CAVALCA, L. B.; ZAMUNER, C. F. C.; SALDANHA, L. L.; POLAQUINI, C. R.; REGASINI, L. O.; BEHLAU, F.; FERREIRA H. Hexyl gallate for the control of citrus canker caused by *Xanthomonas citri* subsp *citri*. **MicrobiologyOpen**, v. 9, p. e1104, 2020.

CAVALCA, L. B. Efeito bactericida do galato de hexila sobre *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e seu potencial no controle do cancro cítrico. (Dissertação de Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Rio Claro – SP, 2018.

CHAGAS, M. C. M.; PARRA, J. R. P. *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae): técnica de criação e biologia em diferentes temperaturas. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, p. 227-235, 2000.

CIPRIANO-SALAZAR, M.; ROJAS-HERNÁNDES, S.; OLIVARES-PÉREZ, J.; JIMÉNEZ-GUILLEN, R.; CRUZ-LAGUNAS, B.; CAMACHO-DÍAZ, L. M.; UGBOGU, A. E. Antibacterial activities of tannic acid against isolated ruminal bacteria from sheep. **Microbial Pathogenesis**, v. 117, p. 255-258, 2018.

CUBERO, J.; GELL, I.; JOHNSON, E. G.; REDONDO, A.; GRAHAM, J. H. Unstable green fluorescent protein for study of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* survival on citrus. **Plant Pathology**, v. 60, p. 977–985, 2011.

CURTOLO, M.; CRISTOFANI-YALY, M.; GAZAFFI, R.; TAKITA, M. A.; FIGUEIRA, A.; MACHADO, M. A. QTL mapping for fruit quality in Citrus using DArTseq markers. **BMC Genomics**, v. 18, p. 289, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3629-2>

DAS, K.; DATTA, K.; KARMAKAR, S.; DATTA, S. K. Antimicrobial Peptides - Small but Mighty Weapons for Plants to Fight Phytopathogens. **Protein and Peptide Letters**, 2019. <https://doi.org/10.2174/0929866526666190619112438>

DATTA, S.; ROY, A. Antimicrobial Peptides as Potential Therapeutic Agents: A Review. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 27, p. 555–577, 2021.

DELWAIDE, A.; NALLEY, L. L.; DIXON, B. L.; DANFORTH, D. M.; NAYGA Jr, R. M.; LOO, E. J. V.; VERBEKE, W. Revisiting GMOs: Are There Differences in European Consumers' Acceptance and Valuation for Cisgenically vs Transgenically Bred Rice? **Plos ONE**, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126060>

DEVASAHAYAM, G.; SCHELD, M.; HOFFMAN, P. S. Newer antibacterial drugs for a new century. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, 19, 215–234, 2010.

DEVOS, Y.; REHEUL, D.; SCHRIJVER, A. The co-existence between transgenic and non-transgenic maize in the European Union: a focus on pollen flow and cross-fertilization. **Environmental Biosafety Research**, 2005. <https://doi.org/10.1051/ebr:2005013>

DONG, G.; LIU, H.; YU, X.; ZHANG, X.; LU, H.; ZHOU, T.; CAO, J. Antimicrobial and anti-biofilm activity of tannic acid against *Staphylococcus aureus*. **Natural Product Research**, v. 32, p. 2225-2228, 2018.

DUARTE, A.; FERNANDES, J.; BERNARDES, J.; MIGUEL, G. Citrus as a Component of the Mediterranean Diet. **Journal of Spatial and Organizational Dynamics**, v. 4, p. 289-304, 2016a.

DUARTE, A.; CARVALHO, C.; MIGUEL, M. Bioactive Compounds of Citrus as Health Promoters. **Natural Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables as Health Promoters**, 2016b. DOI: 10.2174/97816810823941160101

DUCIC, T.; POLLE, A. Transport and detoxification of manganese and copper in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, p. 103-112, 2005.

EPAND, R. M.; WALKER, C.; EPAND, R. F.; MAGARVEY, N. A. Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1858, p. 980–987, 2016.

ESPITIA, P. J. P.; SOARES, N. F. F.; COIMBRA, J. S. R.; ANDRADE, N. J.; CRUZ, R. S.; MEDEIROS, E. A. A. Zinc Oxide Nanoparticles: Synthesis, Antimicrobial Activity and Food Packaging Applications. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 1447–1464, 2012.

FAOSTAT - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura. Disponível em:
http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity (Acesso em 29/09/2021).
<https://www.nationmaster.com/nmx/ranking/citrus-production> (Acesso em 29/09/2021).

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

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

FERNANDES, J. C.; HENRIQUES, F. S. Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants. **The Botanical Review**, v. 57, p. 246-273, 1991.

FRAMPTON, R. A.; PITMAN, A. R.; FINERAN, P. C. Advances in Bacteriophage-Mediated Control of Plant Pathogens. **International Journal of Microbiology**, 2012.
<https://doi.org/10.1155/2012/326452>

FRANCIS, M. I.; REDONDO, A.; BURNS, J. K.; GRAHAM, J. H. Soil application of imidacloprid and related SAR-inducing compounds produces effective and persistent control of citrus canker. **European Journal of Plant Pathology**, v. 124, p. 283–292, 2009.

FUNDECITRUS. **Guia de fases de desenvolvimento vegetativo da planta de citros**, v. 1, p. 2. 2019. Disponível em:
https://www.fundecitrus.com.br/index.php/comunicacao/manual_detalhes/guia-de-fases-de-desenvolvimento-vegetativo-da-planta-de-citros/36 (Acesso em 15/08/2019).

FUNDECITRUS – Fundo de Defesa da Citricultura. Disponível em:

<https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/safra-de-laranja-202122-do-cinturao-citricola-de-sp-e-mg-e-estimada-em-29417-milhoes-de-caixas/1041> - Acesso em 26/08/2021.

GE, H.; LI, Y.; FU, H.; LONG, G.; LUO, L.; LI, R.; DENG, Z. Production of sweet orange somaclones tolerant to citrus canker disease by in vitro mutagenesis with EMS. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 123, p. 29-38, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0810-7>

GHOLAMI, D.; GOODARZI, T.; AMINZADEH, S.; ALAVI, S. M.; KAZEMIPOUR, N.; FARROKHI, N. Bacterial secretome analysis in hunt for novel bacteriocins with ability to control *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 13, p. 10–19, 2015.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; SCHUBERT T. S. Citrus Canker: The Pathogen and Its Impact. **Plant Health Progress**, 2002. doi:10.1094/PHP-2002-0812-01-RV.

GOTTWALD, T.R.; MCGUIRE, R.G.; GARRAN, S. Asiatic Citrus canker: spatial and temporal spread in simulated new planting situations in Argentina. **Phytopathology**, v. 78, p. 739-745, 1988.

GOTTWALD, T.R.; TIMMER, L.W.; MCGUIRE, R.G. Analysis of disease progress of Citrus canker in nurseries in Argentina. **Phytopathology**, v. 79, p. 1276-1283, 1989.

GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; RILEY, T. D.; ACHOR, D. Penetration through leaf stomata and growth of strains of *Xanthomonas campestris* in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. **Phytopathology**, v. 82, p. 1319–1325, 1992.

GRAHAM, J. H.; JOHNSON, E. G.; MYERS, M. E.; YOUNG, M.; RAJASEKARAN, P.; DAS, S.; SANTRA, S. Potential of nano-formulated zinc oxide for control of citrus canker on grapefruit trees. **Plant Disease**, v. 100, p. 2442–2447, 2016.

GRAHAM, J. H.; MYERS, M. E. Soil application of SAR inducers imidacloprid, thiamethoxam, and acibenzolar-S-methyl for citrus canker control in young grapefruit trees. **Plant Disease**, v. 95, p. 725–728, 2011.

GRASS, G.; RENSING, C.; SOLIOZ, M. Metallic Copper as an Antimicrobial Surface. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 77, p. 1541-1547, 2010. <https://doi.org/10.1128/AEM.02766-10>

GUPTA, R. D.; MAHANT, S. A.; WANKHADE, P. R.; HEMKE, A. T.; WADHER, K. J.; UMEKAR, M. J. Gallic Acid: A Versatile Molecule with Promising Pharmacological Effect. **International Journal of Pharmacognosy and Life Science**, v. 2, p. 45-56, 2021.

HIPPLER, F. W. R.; CIPRIANO, D. O.; BOARETTO, R. M.; QUAGGIO, A. J.; GAZIOLA, S. A.; AZEVEDO, A. R.; MATTOS-Jr, D. Citrus rootstocks regulate the nutritional status and antioxidant system of trees under copper stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 130, p. 42-52, 2016.

HUANG, H. W.; CHARRON, N. E. Understanding membrane-active antimicrobial peptides. **Quarterly Reviews of Biophysics**, 2017. <https://doi.org/10.1017/S0033583517000087>

HYUN, J. W.; KIM, H. J.; YI, P. H.; et al. Mode of action of streptomycin resistance in the citrus canker pathogen (*Xanthomonas smithii* subsp. *citri*) in Jeju island. **The Plant Pathology Journal**, v. 28, p. 207–211, 2012.

IFOAM. **Report of the copper application in organic agriculture in Europe**, 2018.

Diponível em: [ifoam_eu_copper_minimisation_in_organic_farming_may2018_0.pdf](#)
(Acessado em 30 de Janeiro de 2020)

Diponível em: https://www.ifoam-eu.org/sites/default/files/ifoam_eu_copper_minimisation_in_organic_farming_may2018_0.pdf
(Acessado em 30/01/2020).

IBRAHIM, Y. E.; SALEH, A. A.; AL-SALEH, M. A. Management of asiatic citrus canker under field conditions in Saudi Arabia using bacteriophages and acibenzolar-s-methyl. **Plant Disease**, v. 101, p. 761–765, 2017.

IRENO, M. T.; SILVA, V. C.; CONEGUNDES, G. J.; SILVA, J. A.; COVENTO, A. B.; EUZEBIO, L. P. S.; BERMEJO, L. Doença do Citros. Cancro Cítrico. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v. 25, p. 34-37, 2014.

JENSSEN, H.; HAMIL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, 2020. <https://doi.org/10.1128/CMR.00056-05>

JI, Y.; LU, Y.; PUETZ, H.; SCHWANEBERG, U. Chapter Thirteen - Anchor peptides promote degradation of mixed plastics for recycling. **Methods in Enzymology**, v. 648, p. 271-292, 2021. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2020.12.027>

JOSHI, T.; JOSHI, T.; SHARMA, P.; CHANDRA, S.; PANDE, V. Molecular docking and molecular dynamics simulation approach to screen natural compounds for inhibition of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* by targeting peptide deformylase. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 39, p. 823-840, 2021.

KANG, M.; OH, J.; KANG, I.; HONG, S.; CHOI, C. Inhibitory effect of methyl gallate and gallic acid on oral bacteria. **The Journal of Microbiology**, v. 46, p. 744-750, 2008.

KAZEMINEZHAD, I.; MOSIVAND, S. Elimination of copper and nickel from wastewater by electrooxidation method. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 422, p. 84-92, 2017.

KAZEMZADEH-NARBATA, M.; CHENG, H.; CHABOK, R.; ALVAREZ, M. M.; FUENTE-NUNEZ, C.; PHILLIPS, K. S.; KHADEMHOSEINI, A. Strategies for antimicrobial peptide coatings on medical devices: a review and regulatory science perspective. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 41, p. 94-120, 2021. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1828810>

KERING, K. K.; KIBII, B. J.; WEI, H. Biocontrol of phyto-bacteria with bacteriophage cocktails. **Pest Management Science**, v. 75, p. 1775–1781, 2019.

KOWALSKA-KROCHMAL, B.; DUDEK-WICHER, R. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. **Pathogens**, v. 10, p. 165, 2021. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020165>

KRÓL, E.; BORGES, A. S.; SILVA, I.; POLAQUINI, C. R.; REGASINI, L. O.; FERREIRA, H.; SCHEFFERS D. Antibacterial activity of alkyl gallates is a combination of direct targeting of FtsZ and permeabilization of bacterial membranes. **Frontiers in Microbiology**. 2015. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00390>

KUBO, I.; FUJITA, K.; NIHEI, K. Anti-Salmonella activity of alkyl gallates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6692–6696, 2002.

LAMICHHANE, J.R.; OSDAGHI, E.; BEHLAU, F.; KÖHL, J.; JONES, J.B.; AUBERTOT, J. Thirteen decades of antimicrobial copper applied compounds in agriculture. The review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 38, p. 28, 2018. <https://doi.org/10.1007/s13593-018-0503-9>

LEE, J.; LEE, D. G. Melittin triggers apoptosis in *Candida albicans* through the reactive oxygen species-mediated mitochondria/caspase-dependent pathway. **FEMS Microbiology Letters**, v. 355, p. 36–42, 2014. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12450>

LEE, T.; HOFFEREK, V.; SEPAROVIC, F.; REID, G. E.; AGUILAR, M. The role of bacterial lipid diversity and membrane properties in modulating antimicrobial peptide activity and drug resistance. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 52, p. 85-92, 2019.

LÉONARD, L.; CHUIBANE, L. B.; BOUHEDDA, B. O.; DEGRAEVE, P.; OULAHAL, N. Recent Advances on Multi-Parameter Flow Cytometry to Characterize Antimicrobial Treatments. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1225, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01225>

LI, S.; WU, F.; DUAN, Y.; SINGERMAN, A.; GUAN, Z. Citrus Greening: Management Strategies and Their Economic Impact. **HortScience**, v. 55, p. 604-612, 2020. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI14696-19>

LI, S.; WANG, Y.; XUE, Z.; JIA, Y.; LI, R.; HE, C.; CHEN, H. The structure-mechanism relationship and mode of actions of antimicrobial peptides: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 109, p. 103-115, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.005>

LOCATELLI, C.; FILIPPIN-MONTEIROC, F. B.; CRECZYNSKI-PASAC, T. B. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, p. 233–239, 2013.

LOCK, R. L.; HARRY, E. J. Cell-division inhibitors: new insights for future antibiotics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, p. 324–338, 2008.

LÓPEZ, C. M.; PICH, A. Supramolecular Stimuli-Responsive Microgels Crosslinked by Tannic Acid. **Macromolecular rapid communications**, v. 39, p. 1700808, 2018. <https://doi.org/10.1002/marc.201700808>

MACKLER, B. F.; KREIL, G. Honey bee venom melittin: correlation of nonspecific inflammatory activities with amino acid sequences. **Inflammation**, v. 2, p. 55-65, 1977.

MARTINEZ, J. G.; PARAN, G. P.; RIZON, R.; MEESTER, N. D.; MOENS, T. Copper effects on soil nematodes and their possible impact on leaf litter decomposition: A microcosm approach. **European Journal of Soil Biology**, v. 73, p. 1-7, 2016.

MARTINS, P. M.; ANDRADE, M. O.; BENEDETTI, C. E.; SOUZA, A. A. *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: host interaction and control strategies. **Tropical Plant Pathology**, v. 45, p. 213–236, 2020.

MARTINS, P. M.; LAU, I. F.; BACCI, M.; BELASQUE JR, J.; DO AMARAL, A. M.; TABOGA, S. R.; FERREIRA H. Subcellular localization of proteins labeled with GFP in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*: targeting the division septum. **FEMS Microbiology Letters**, v. 310, p. 76-83, 2010.

MAYA, S. R.; LÓPEZ-LÓPEZ, I.; MUNUERA, J. L. Organic food consumption in Europe: International segmentation based on value system differences. **Ecological Economics**, v. 70, p. 1767-1775, 2011.

MCKENNA, M. Antibiotics set to flood Florida's troubled orange orchards. **Nature**, v. 567, p. 302–303, 2019.

MCMANUS, P. S.; STOCKWELL, V. O.; SUNDIN, G. W.; JONES, A. L. Antibiotic use in plant agriculture. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 443–465, 2002.

MEMARIANI, H.; MEMARIANI, M. Anti-fungal properties and mechanisms of melittin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 6513–6526, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10701-0>

MENDES, C. R. Avaliação de esferas de quitosana como adsorvente do corante Acid Blue 25. (Dissertação de Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Rio Claro – SP, 2019.

MENDONÇA, L. B. P.; ZAMBOLIM, L.; BADEL, J. L. Bacterial Citrus Diseases: Major Threats and Recent Progress. **Journal of Bacteriology & Mycology**, v. 5, p. 00143, 2017. DOI: 10.15406/jbmoa.2017.05.00143

MITCHELL, A. M.; STROBEL, G. A.; MOORE, E.; ROBISON, R.; SEARS, J. Volatile antimicrobials from *Muscodor crispans*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, p. 156, p. 270–277, 2010.

MEURER, R. A., Kemper, S., Knopp, S., Eichert, T., Jakob, F., Goldbach, H. E., Schwaneberg, U., Pich, A. (2017). Biofunctional Microgel-Based Fertilizers for Controlled Foliar Delivery of Nutrients to Plants. **Angewandte Chemie**, 56, 1-7.

MORAES Jr., J. R.; BIDOIA, E. D. Colour Degradation of Simulated Textile Effluent by Electrolytic Treatment and Ecotoxicological Evaluation. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, p. 402, 2015.

MORÃO, L. G.; POLAQUINI, C. R.; KOPACZ, M.; TORREZAN, G. S.; AYUSSO, G. M.; DILARRI, G.; CAVALCA, L. B.; ZIELINSKA, A.; SCHEFFERS, D.; REGASINI, L. O.;

FERREIRA, H. A simplified curcumin targets the membrane of *Bacillus subtilis*. **MicrobiologyOpen**, v. 8, p. e00683, 2019.

MORÃO, L. G. Chalconas e curcuminoides como novas alternativas para combater o cancro cítrico e alguns patógenos de interesse clínico. (Tese de Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Rio Claro – SP, 2018.

NAKAMURA, T.; FURUNAKA, H.; MIYATA, T.; TOKUNAGA, F.; MUTA, T.; IWANAGA, S.; NIWA, M.; TAKAO, T.; SHIMONISHI, Y. Tachypleisin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). Isolation and chemical structure. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 16709-16713, 1988.

NEVES, M. F.; LOPES, F. F. **Estratégias para laranja no Brasil**, 1ª edição, São Paulo-SP: Atlas, p. 225, 2005.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MARQUES, V. N.; MARTINEZ, L. F. Global orange juice market: a 16-year summary and opportunities for creating value. **Tropical Plant Pathology**, v. 45, p.166–174, 2020. <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00378-1>

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; PEREIRA, F. C.; KALAKI, R. B. **O Retrato da Citricultura Brasileira**, 1ª edição, Ribeirão Preto-SP: FEA/USP, p. 135, 2011.

NG, W.; SHIT, C.; EE, K.; CHAI, T. Plant Natural Products for Mitigation of Antibiotic Resistance. **Sustainable Agriculture Reviews**, 2021. https://doi.org/10.1007/978-3-030-58259-3_3

NILSSON, A. S. Phage therapy-constraints and possibilities. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v. 119, p. 192–198, 2014.

NÖTH, M.; ZOU, Z.; EL-AWAAD, I.; NOVAES, L. C. L.; DILARRI, G.; DAVARI, M. D.; FERREIRA, H.; JAKOB, F.; SCHWANEBERG, U. A peptide-based coating toolbox to

enable click chemistry on polymers, metals, and silicon through sortagging. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 118, p. 1520-1530, 2021.

OLIVEIRA, A. G.; SPAGO, F. R.; SIMIONATO, A. S.; et al. Bioactive organocopper compound from *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Frontiers in Microbiology**, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00113>

OLIVEIRA, G. S.; COSTA, R. P.; GOMES, P.; GOMES, M. S.; SILVA, T.; TEIXEIRA, C. Antimicrobial Peptides as Potential Anti-Tubercular Leads: A Concise Review. **Pharmaceuticals**, 2021. <https://doi.org/10.3390/ph14040323>

PECORA, H. B.; DILARRI, G.; MENDES, C. R.; CORSO, C. R. Bioassays and coagulation studies using *Moringa oleifera* seeds for the removal of textile dyes. **Water Science & Technology**, v. 78, p. 1679–1692, 2018.

PICOLI, T.; PETER, C. M.; ZANI, J. L.; WALLER, S. B.; LOPES, M. G.; BOESCHE, K. N.; VARGAS, G. D., HÜBNER, S. O.; FISCHER, G. Melittin and its potential in the destruction and inhibition of the biofilm formation by *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from bovine milk. **Microbial Pathogenesis**, v. 112, p. 57-62, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.09.046>

POLAQUINI, C. R.; MORÃO, L. G.; NAZARÉ, A. C.; TORREZAN, G. S.; DILARRI, G.; CAVALCA, L. B.; et al. Antibacterial activity of 3,3'-dihydroxycurcumin (DHC) is associated with membrane perturbation. **Bioorganic Chemistry**, v. 90, p. 103031, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103031>

RAGHURAMAN, H.; CHATTOPADHYAY, A. Melittin: a Membrane-active Peptide with Diverse Functions. **Bioscience Reports**, v. 27, p. 189–223, 2007.

RAVET, K.; PILON, M. Copper and iron homeostasis in plants: the challenges of oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, p. 919-932, 2013.

REHMAN, F.; KALSOOM, M.; AHMAD, S.; IQBAL, M. A.; JUNAID, S.; TARIQ, M. A.; SULTAN, A.; HAYAT, Q.; KHAN, J. Citrus Leprosis and its Impacts on Citrus Food Industry: A Review. **EC Agriculture**, v. 6, p. 34-39, 2020.

ROQUE-BORDA, C. A.; SILVA, P. B.; RODRIGUES, M. C.; AZEVEDO, R. B.; FILIPPO, L.; DUARTE, J. L.; CHORILLI, M.; VICENTE, E. F.; PAVAN, F. R. Challenge in the Discovery of New Drugs: Antimicrobial Peptides against WHO-List of Critical and High-Priority Bacteria. **Pharmaceutics**, 2021. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060773>

ROSSETTI, V. V.; MULLER, G. W.; COSTA, A. S. Doenças dos citros causadas por algas, fungos, bactérias e vírus. **Fundação Cargill**, p. 84, 1993.

RÜBSAM, K.; STOMPS, B.; BÖKER, A.; JAKOB, F.; SCHWANEBERG, U. Anchor peptides: A green and versatile method for polypropylene functionalization. **Polymer**, v. 116, p. 124-132, 2017.

RUSJAN, D.; STRLIC, M.; PUCKO, D.; KOROSK-KORUZA, Z. Copper accumulation regarding the soil characteristics in Sub-Mediterranean vineyards of Slovenia. **Geoderma**, v. 141, p. 111–118, 2007.

RUSMINI, F.; ZHONG, Z.; FEIJEN, J. Protein immobilization strategies for protein biochips. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 1775-1789, 2007.

SÃO PAULO (Estado). Resolução da Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SAA) nº 43, 25 de Junho de 2009. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, 27 de Junho de 2009. Seção 1. p. 47.

SÃO PAULO (Estado). Resolução da Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SAA) nº 147, de 31 de Outubro de 2013. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, 1 de Novembro de 2013, Seção 1. p. 50.

SÃO PAULO (Estado). Resolução da Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SAA) nº 21, de 25 de Abril de 2018. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, 25 de Abril de 2018, Seção

1. p. 31. <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/instrucao-normativa-mapa-n-21-de-25-de-abril-de-2018,1152.html>

SAVIETTO, A.; POLAQUINI, C. R.; KOPACZ, M.; SCHEFFERS, D.; MARQUES, B. C.; REGASINI, L. O.; FERREIRA, H. Antibacterial activity of monoacetylated alkyl gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Archives of Microbiology**, v. 200, p. 929–937, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1502-6>

SCHMIDTCHEN, A.; FRICK, I.; ANDERSSON, E.; TAPPER, H.; BJÖRCK, L. Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. **Molecular Microbiology**, v. 46, p. 157-168, 2002.

SCHREUDER, W.; PLOOY, W.; ERASMUS, A.; SAVAGE, C.; BASSON, E.; LENNOX, C.; FOURIE, P. H. Postharvest fungicide treatments and cold storage control citrus black spot infections. **Crop Protection**, v. 112, p. 332-342. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.06.020>

SCHWINGES, P.; PARIYAR, S.; JAKOB, F.; RAHIMI, M.; APITIUS, L.; HUNSCHE, M.; SCHMITT, L.; NOGA, G.; LANGENBACH, C.; SCHWANEBERG, U.; CONRATH, U. A bifunctional dermaseptin–thanatin dipeptide functionalizes the crop surface for sustainable pest management. **Green Chemistry**, v. 21, p. 2316-2325, 2019.

SENA-VÉLEZ, M.; REDONDO, C.; GRAHAM, J. H.; CUBERO, J. Presence of extracellular DNA during biofilm formation by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strains with different host range. **PLoS ONE**, v. 11, p. 0156695, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156695>

SHAO, Y.; WANG, Y.; YUAN, Y.; XIE, Y. A systematic review on antibiotics misuse in livestock and aquaculture and regulation implications in China. **Science of The Total Environment**, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149205>

SILVA, I. C.; FERREIRA, H. Drug Sensitivity Assay of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Using REMA Plate Method. **Bio-Protocol**, v. 3, p. 861, 2013.

SILVA, I. C.; POLAQUINI, C. R.; REGASINI, L. O.; FERREIRA, H. Evaluation of cytotoxic, apoptotic, mutagenic, and chemopreventive activities of semi-synthetic esters of gallic acid. **Food and Chemical Toxicology**, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.04.033>

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

SILVER, L. L. Challenges of antibacterial discovery. **Clinical Microbiology Reviews**, 24, 71–109, 2011.

SKERLAVAJ, B.; BENICASA, M.; RISSO, A.; ZANETTI, M.; GENNARO, R. SMAP-29: a potent antibacterial and antifungal peptide from sheep leukocytes. **FEBS Letters**, v. 463, p. 58-62, 1999.

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. p. 55-67. IN: ROMERO, P. R. & CANTÚ, A. M. **Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo**. La experiencia en México. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología, México, D.F., 2008.

STOCKWELL, V. O.; DUFFY, B. Use of antibiotics in plant agriculture. **The Scientific and Technical Review**, v. 31, p. 199–210, 2012.

STOVER, E.; STANGE Jr, R. R.; MCCOLLUM, T. G.; JAYNES, J.; IREY, M.; MIRKOV, E. Screening Antimicrobial Peptides *In Vitro* for Use in Developing Transgenic Citrus Resistant to Huanglongbing and Citrus Canker. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 2013. <https://doi.org/10.21273/JASHS.138.2.142>

TÓTH, G.; HERMANN, T.; SILVA, M. R. Heavy metals in agricultural soils of the European Union with implications for food safety. **Environment International**, v. 88, p. 299–309, 2016.

USDA - United States Department of Agriculture. **Citrus: World Markets and Trade**, 2015.

Disponível em:

<https://www.fas.usda.gov/data/citrus-world-markets-and-trade> (Acesso em 07/02/2019).

VAN ZWIETEN, L.; RUST, J.; KINGSTON, T.; MERRINGTON, G.; MORRIS, S. Influence of copper fungicide residues on occurrence of earthworms in avocado orchard soils. **Science of the Total Environment**, v. 329, p. 29–41, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.02.014>

VIEIRA, G.; PURIC, J.; MORÃO, L. G.; SANTOS, J. A.; INFORSATO, F. J.; SETTE, L. D.; FERREIRA, H.; SASS, D. C. Terrestrial and marine Antarctic fungi extracts active against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 67, p. 64–71, 2018.

VOJNOV, A. A.; AMARAL, A. M.; DOW, J. M.; CASTAGNARO, A. P.; MARANO, M. R. Bacteria causing important diseases of citrus utilise distinct modes of pathogenesis to attack a common host. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 467–477, 2010.

WANG, P.; GAO, M.; ZHOU, L.; WU, Z.; HU, D.; HU, J.; YANG, S. Synthesis and antibacterial activity of pyridinium-tailored aromatic amphiphiles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, p. 1136–1139, 2016.

YRUELA, I. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. **Functional Plant Biology**, v. 36, p. 409-430, 2009.

YOSHIKAWA, G.; ASKORA, A.; BLANC-MATHIEU, R.; KAWASAKI, T.; LI, Y.; NAKANO, M.; OGATA, H.; YAMADA, T. *Xanthomonas citri* jumbo phage XacN1 exhibits a wide host range and high complement of tRNA genes. **Scientific Reports**, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22239-3>

YU, X.; ARMSTRONG, C. M.; ZHOU, M.; DUAN, Y. Bismertiazol inhibits *Xanthomonas citri* subsp. *citri* growth and induces differential expression of citrus defense-related genes. **Phytopathology**, v. 106, p. 693–701, 2016.

ZAMUNER, C. F. C.; DILARRI, G.; BONCI, L. C.; SALDANHA, L. L.; BEHLAU, F.; MARIN, T. G. S.; SASS, D. C.; BACCI, JR. M.; FERREIRA, H. A cinnamaldehyde-based formulation as an alternative to sodium hypochlorite for post-harvest decontamination of citrus fruit. **Tropical Plant Pathology**, 2020. <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00338-9>

ZASLOFF, M. Antimicrobial Peptides of Multicellular Organisms: My Perspective. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 2019. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3588-4_1

ZHANG, X.; FRANCIS, M. I.; DAWSON, W. O.; GRAHAM, J. H.; ORBOVIC, V.; TRIPLETT, E. W.; MOU, Z. Overexpression of the Arabidopsis NPR1 gene in citrus increases resistance to citrus canker. **European Journal of Plant Pathology**, v. 128, p. 91–100, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9633-x>

ZHANG, M.; MENG, Q. Automatic citrus canker detection from leaf images captured in field. **Pattern Recognition Letters**, v. 32, p. 2036-2046, 2011.

ZHOU, J.; TAO, Q. Q.; WANG, P. Y.; SHAO, W.; WU, Z.; LI, Z.; YANG, S. Antimicrobial evaluation and action mechanism of pyridinium-decorated 1,4-pentadien-3-one derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 28, p. 1742–1746, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.04.034>

ZHU, C.; LEI, M.; ANDARGIE, M.; ZENG, J.; LI, J. Antifungal activity and mechanism of action of tannic acid against *Penicillium digitatum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 107, p. 46-50, 2019.