

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**EFICÁCIA DOS FLAVONÓIDES HESPERIDINA E
NARINGENINA E O FENOL ÁCIDO ISOVANÍLICO
COMPLEXADOS COM Mg (II), PARA O CONTROLE DA
BACTÉRIA *XANTHOMONAS CITRI* SSP. *CITRI***

Danielle Fernandes da Silva

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de DOUTOR EM
CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA
ANALÍTICA.

Orientador: Prof. Dr. Moacir Rossi Forim.

Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins

São Carlos - SP

2017.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Danielle Fernandes da Silva, realizada em 25/08/2017:

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim
UFSCar

Profa. Dra. Ana Maria Soares Pereira
UNAERP

Prof. Dr. Norberto Fegorine Lopes
FCRP/USP

Profa. Dra. Rose Maria Carlos
UFSCar

Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho
UFSCar

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais,
José Leonel Fernandes da Silva,
Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva,
à minha filha Bruna Silva de Freitas,
ao meu marido Eduardo Freitas e
irmãos Renato, Rogério e Rodrigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus.

Ao meu orientador Prof. Dr. Moacir Rossi Forim pelos ensinamentos, paciência, dedicatória ao seu tempo.

Co-orientador Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins, pelos ensinamentos de microbiologia e acolhimento em seu laboratório.

Profa. Dra. Ana Maria Pereria e Ediedia Pina, pelos ensinamentos em cultura de tecido, pela ajuda na Unaerp, e pelas suas simpatias.

Prof. Dra. Alessandra Alves de Souza, pelos ensinamentos

À Profa. Dra. Rose Carlos, pelos ensinamentos, confiança e acolhimento em seu laboratório.

Aos meus pais Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva e José Leonel Fernandes da Silva pelo apoio e acreditar na minha capacidade.

À minha filha, Bruna Silva de Freitas, a rezão por eu ter chegado até aqui, a motivação para que eu acordasse todos os dias cedo e muitas vezes pegar estrada com muito sono.

Ao meu marido Eduardo Freitas pela compreensão e ajuda.

Aos meus amigos que me ajudaram nos experimentos realizados, Jessica Amaral, Michelli Massaroli, Alani Ingrid Ribeiro, Edieidia Pina, Rafael Maechi, Edelman dos Santos.

LISTA DE ABREVIATURAS

HPLC = *High Performance Liquid Chromatography*

HPLC-UV = *High Performance Liquid Chromatography – Ultraviolet*

MeOH = Metanol

mg/mL = miligrama/miliLitro

min = minutos

NCCLS = *National Comitee for Clinical Laboratory Standarts*

Rpm = Rotação por Minuto

SM = Solução Mãe

UPLC – Qtof = *Ultra Performance Liquid Chromatography - Quadrupole
Time of Fly*

µL = micro Litro

CIM = Concentração Inibitória Mínima

CBM = Concentração Bactericida Mínima

CMB50 = Concentração Bactericida Mínima do Biofilme em 50%.

PBS = Phosphate Buffered Saline

LISTA DE TABELAS

TABELA 3. 1 - Isolados de bactérias fitopatogênica de <i>xanthomonas citri</i> ssp <i>citri</i> (causadora da doença do cancro cítrico) resistentes, tolerantes e sensíveis a produtos provenientes do cobre.	23
TABELA 3. 2 - Gradiente de eluição para quantificação dos complexos hesperidina (mg) e naringenina (mg) em HPLC-UV.....	42
TABELA 3. 3 - Gradiente de eluição para quantificação do complexo ác. isovanílico (mg) em HPLC-UV.....	43
TABELA 4. 1 - Resultado da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos complexos e seus ligantes livres frente à bactéria <i>Xanthomonas citri</i> ssp. <i>citri</i>	51
TABELA 4. 2 - Resultado da CBM dos complexos e seus ligantes livres com os 15 isolados da bactéria <i>Xantomonas citri</i> ssp. <i>citri</i>	56
TABELA 4. 3 - Resultado da quantificação dos complexos no meio de crescimento das plântulas de citros dos experimentos de inibição do cancro cítrico.....	101

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. 1 - Agressividade, Especificidade, e Evolução da interação patógeno hospedeiro em função do tipo de doença. Legenda: I = podridão de frutos, II = tombamento, III = podridão de raízes e colo, IV = doenças vasculares, V = manchas, e VI = viroses. Fonte: BEDENDO, 1995). 4
- FIGURA 3. 1 - Estruturas moleculares dos complexos ensaiados. 19
- FIGURA 3. 2 - Ilustração de uma placa de 96 orifícios com um teste de CIM. 26
- FIGURA 3. 3 - Revelação com resazurina da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos frente a bactéria em estudo. A = coloração azul, inibição bacteriana; B = coloração rosa, crescimento bacteriano. . Fonte: Moreira, 2011. 27
- FIGURA 3. 4 - Determinação CIMB. A, placa 1, que revelou a CIM dos compostos por resazurina; B, placa de CIM igual a placa 1, porém sem resazurina; C, resultados das CIMS da placa 2 levados para tubos contendo caldo nutriente estéril; D, após incubação de 48 hrs, solução do tubos foram semeados em placa..... 28
- FIGURA 3. 5 - Formação do biofilme na placa. A, placa com o meio de crescimento contendo o inóculo e controle; B, placa com ácido acético para realização da leitora em espectrofotômetro do biofilme. 31
- FIGURA 3. 6 - Ilustração dos testes de CIMB50 por contagem de UFC.mL⁻¹. A, placa com os 5 isolados de *X. citri* testados com cada complexo, utilizou-se uma placa a para cada complexo testado e o controle positivo; B, placa onde realizou-se a diluição seriada, cada placa B corresponde a um inóculo e um composto testado. 32
- FIGURA 3. 7 - Demonstração da produção de plântulas de citros *in vitro*. A) inoculação das sementes em meio MS; B) transferência das plântulas com 60 dias de crescimento para frascos maiores. 34

FIGURA 3. 8 - Preparo das amostras de folhas e caule-raiz das plântulas tratadas com o complexo hesperidina para visualização em microscópica de epifluorescência. A) plântula tratada com o meio/complexo via ação sistêmica; B) folha tratada via ação translaminar ; C) cortes verticais realizados na folha e caule; D), visualização em microscópio epifluorescência.....	35
FIGURA 3. 9 - A) Contaminação por imersão; B) diluição seriada e cultivo de cada concentração em placa em meio nutriente agar.....	37
FIGURA 3. 10 - Plântulas de citros tratadas com os complexos absorvidos pela raiz.	38
FIGURA 4. 1 - Via da síntese para a obtenção do complexo hesperidina. Fonte: OLIVEIRA, 2012.....	44
FIGURA 4. 2 - Espectro vibracional na região do infravermelho dos ligantes: hesperidina e complexo hesperidina.	46
FIGURA 4. 3 - Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo naringenina e naringenina livre.	47
FIGURA 4. 4 - Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo ácido isovanílico livre.	48
FIGURA 4. 5 - Resultado da CIM de uma placa de 96 orifícios com ensaio de uma cepa bacteriana com os complexos, os flavonóides e fenol livres.	50
FIGURA 4. 6 - Colônias da bactéria <i>X. citri</i> em placas de petri contendo apenas o meio nutriente agar.	55
FIGURA 4. 7 - Formação do biofilme no fundo da placa de 96 orifícios, que foi fixado com cristal violeta	60
FIGURA 4. 8 - Resultados dos cinco isolados da padronização do biofilme da bactéria <i>Xanthomonas citri ssp. citri</i> . as barras de erros indicam o desvio padrão.	62

- FIGURA 4. 9 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIBM) da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri* dos isolados 1644 e 1645 frente ao complexo ácido isovanílico, por absorbância e por por UFC.mL⁻¹ dos inóculos. As barras de erros indicam o desvio padrão. 66
- FIGURA 4. 10 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIBM) da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri* dos isolados 1670 e 621 frente ao complexo ácido isovanílico, por absorbância e por por UFC.mL⁻¹ dos inóculos. As barras de erros indicam o desvio. 67
- FIGURA 4. 11 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIBM) da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri* do isolado 75 frente ao complexo ácido isovanílico, por absorbância e por por UFC.mL⁻¹ dos inóculos. As barras de erros indicam o desvio padrão. 68
- FIGURA 4. 12 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIBM) da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri* dos isolados 1644 e 1645 frente ao complexo hesperidina, por absorbância e por por UFC.mL⁻¹ dos inóculos. As barras de erros indicam o desvio padrão. 69
- FIGURA 4. 13 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIBM) da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri* dos isolados 1670 e 621 frente ao complexo hesperidina, por absorbância e por por UFC.mL⁻¹ dos inóculos. As barras de erros indicam o desvio padrão 70
- FIGURA 4. 14 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIBM) da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri* do isolado 75 frente ao complexo hesperidina, por absorbância e por por UFC.mL⁻¹ dos inóculos. As barras de erros indicam o desvio padrão. 71
- FIGURA 4. 15 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIBM) da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri* dos isolados 1644 e 1645, frente ao complexo naringenina, por absorbância e por por UFC.mL⁻¹ dos inóculos. As barras de erros indicam o desvio padrão. 72

FIGURA 4. 16 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIMB) da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri* dos isolados 1670 e 621, frente ao complexo naringenina, por absorbância e por por UFC.mL⁻¹ dos inóculos. As barras de erros indicam o desvio padrão. 73

FIGURA 4. 17 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIMB) da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri* do isolado 75 frente ao complexo naringenina, por absorbância e por por UFC.mL⁻¹ dos inóculos. As barras de erros indicam o desvio padrão. 74

FIGURA 4. 18 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIMB) da bactéria *xanthomonas citri* ssp. *citri* dos isolados 1444 e 1645 frente ao controle positivo streptomina, por absorbância e por por UFC.mL⁻¹ dos inóculos. As barras de erros indicam o desvio padrão. 75

FIGURA 4. 19 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIMB) da bactéria *xanthomonas citri* ssp. *citri* dos isolados 1670 e 621 frente ao controle positivo streptomina, por absorbância e por por UFC.mL⁻¹ dos inóculos. As barras de erros indicam o desvio padrão. 76

FIGURA 4. 20 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIMB) da bactéria *xanthomonas citri* ssp. *citri* do isolado 75 frente ao controle positivo streptomina, por absorbância e por por UFC.mL⁻¹ dos inóculos. As barras de erros indicam o desvio padrão. 77

FIGURA 4. 21 - Desenvolvimento in vitro de plântulas de Citrus sinensis variedade laranja pêra. A, emissão da radícula da semente em meio de crescimento MS Basal ; B, plântula com aproximadamente 60 dias após inoculação da semente; C, plântulas com 90 dias, tamanho em que foram utilizadas para os ensaios com os complexos frente à bactéria *X. citri* e também para visualização em microscópio de epifluorescência das folhas..... 80

FIGURA 4. 22 - Imagem de uma folha de citros cortada verticalmente. onde pode ser observado o mesófilo da folha e suas faces adaxial e abaxial. A; imagem do mesófilo de uma folha retirada de uma plântula de citros presente em meio MS

líquido. B; imagem do mesófilo de uma folha retirada de uma plântula de citros presente em meio MS líquido contendo o complexo hesperida. 83

FIGURA 4. 23 - A, plântula com sintomas do cancro cítrico; B, tratamento das plântulas com os complexos. 87

FIGURA 4. 24 - Resultados das plântulas de citros com cancro tratadas preventivamente com os complexos. As barras de erros indicam o desvio padrão. 89

FIGURA 4. 25 - Tratamento curativo com os complexos em três doses e avaliado em três períodos. As barras de erros indicam o desvio padrão. 92

FIGURA 4. 26 - Resultado do tratamento curativo dos complexos e do tratamento positivo com uma dose selecionada. As barras de erros indicam o desvio padrão. 93

FIGURA 4. 27 - Curva de calibração para quantificação dos complexos adicionados no meio de crescimento das plântulas. 97

FIGURA 4. 28 - Cromatogramas HPLC - UV, bandas do complexo hesperidina no tempo de retenção de 13 min. Amostra A: meio de crescimento líquido contendo o complexo e plântula infectada com a bactéria *xanthomonas citri*; amostra B: meio de crescimento contendo o complexo e a plântula sadia ; C: apenas o meio de crescimento com o complexo..... 98

FIGURA 4. 29 - Cromatogramas HPLC - UV, bandas do complexo naringenina no tempo de retenção de 13 min. Amostra A: meio de crescimento líquido contendo o complexo e plântula infectada com a bactéria *Xanthomonas citri*; Amostra B: meio de crescimento contendo o complexo e a plântula sadia ; C: apenas o meio de crescimento com o complexo..... 99

FIGURA 4. 30 - Cromatogramas HPLC - UV, bandas do complexo isovanílico no tempo de retenção de 13 min. Amostra A: meio de crescimento líquido contendo o complexo e plântula infectada com a bactéria *Xanthomonas citri*; amostra B:

meio de crescimento contendo o complexo e a plântula sadia ; C: apenas o meio de crescimento com o complexo. 100

FIGURA 4. 31 - Concentração dos complexos absorvida pelas plântulas de citros. Amostra A: meio de crescimento líquido contendo o complexo e plântula infectada com a bactéria *Xanthomonas citri*; Amostra B: meio de crescimento contendo o complexo e a plântula sadia ; C apenas o meio de crescimento com o complexo. 102

RESUMO

EFICÁCIA DOS FLAVONÓIDES HESPERIDINA E NARINGENINA E O FENOL ÁCIDO ISOVANÍLICO COMPLEXADOS COM Mg (II), PARA O CONTROLE DA BACTÉRIA *XANTHOMONAS CITRI* SSP. *CITRI*. O presente trabalho descreve o estudo de produtos naturais complexados como agentes bactericidas, bacteriostático e inibidores de biofilme para o controle do cancro cítrico, também seu estudo em relação ao modo de ação desses complexos frente às plantas de citros. O Cancro Cítrico é uma das principais doenças da citricultura, onde seu agente etiológico é uma bactéria gram-negativa, a *Xanthomonas citri* ssp *citri*. Para o controle dessa doença é utilizado produtos químicos derivados de cobre, porém alguns isolados dessa bactéria já apresentam resistência. O uso de pesticidas na agricultura mundial, preocupa a segurança do meio ambiente e da saúde humana. Neste trabalho preparou-se e caracterizou-se os complexos hesperidina, naringenina e ácido isovanílico com íon metálico magnésio (Mg) e foram realizados ensaios microbiológico com os complexos avaliando sua Concentração Inibitória Mínima (CIM), sua Concentração Bactericida Mínima (CBM) e a Concentração Inibitória Mínima do Biofilme em 50% (CIMB₅₀) obtendo resultados tais como CIM e CBM de 50 e 50 µg.mL⁻¹ para o complexo de hesperidina; 12,5 e 50 µg.mL⁻¹ para o complexo de naringenina e de 6,25 e 6,25 µg.mL⁻¹ para o complexo isovanílico, respectivamente. Os flavonóides e fenol livres apresentaram resultados da CIM e CBM igual ou superior 400 µg.mL⁻¹. Através de estudos de atividade dos complexos em ensaios de inibição microbiana em plântulas de citros foi possível observar o controle do fitopatógeno. O mecanismo de ação dos complexos nas plantas foi investigado por imagens de epifluorescência sendo possível visualizar os compostos no mesófilo das folhas. A quantificação dos produtos complexados por HPLC-UV no meio de crescimento das plântulas de citros permitiu confirmar a proposta de ação dos complexos via ação sistêmica sendo fortemente absorvidos pela raiz.

ABSTRACT

EFFECTIVENESS OF FLAVONOIDS HESPERIDINE AND NARINGENIN AND ISOVANILIC ACID PHENOL COMPLEXED WITH Mg (II), FOR THE CONTROL OF BACTERIA *XANTHOMONAS CITRI* SSP. *CITRI*. The present work describes the study of natural products complexed as bactericidal, bacteriostatic and biofilm inhibitors for the control of citrus canker, as well as their study regarding the mode of action of these complexes against citrus plants. Citrus canker is one of the main diseases of citriculture, where its etiological agent is a gram-negative bacterium, *Xanthomonas citri* ssp *citri*. For the control of this disease is used chemicals derived from copper, but some isolates of this bacterium already have resistance. The use of pesticides in world agriculture is of concern to the safety of the environment and human health. In this work, the hesperidin, naringenin and isovanilic acid complexes with metal magnesium ion (Mg) were prepared and characterized, and microbiological tests were performed with the complexes evaluating their Minimum Inhibitory Concentration (MIC), their Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Minimum Inhibitory Concentration of Biofilm at 50% (CIMB50) obtaining results such as CIM and CBM of 50 and 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for the hesperidin complex; 12.5 and 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for the naringenin complex and 6.25 and 6.25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for the isovanil complex, respectively. The free flavonoids and phenol presented MIC and MBC results equal to or greater than 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Through studies of the activity of the complexes in microbial inhibition assays in citrus seedlings, it was possible to observe the control of the phytopathogen. The mechanism of action of the complexes in the plants was investigated by epifluorescence images being possible to visualize the compounds in the mesophyll of the leaves. The quantification of products complexed by HPLC-UV in the growth medium of the citrus seedlings allowed to confirm the proposal of action of the complexes via systemic action being strongly absorbed by the root.

SUMÁRIO

1.	Introdução	1
1.1	Economia agrícola brasileira	1
1.2	Economia da citricultura	2
1.3	Doenças da citricultura	3
1.4	Cancro citrico.	5
1.5	Controle da doença do cancro cítrico	6
1.6	Controle de insetos e microrganismos causadores de doenças na agricultura, o uso de agrotóxicos.	7
1.7	Produtos Naturais como Pesticidas.....	10
1.8	Compostos fenólicos em frutas cítricas	11
1.9	Hesperidina, Naringenina e Ácido isovanílico.	13
1.10	Complexos em insumos agrícolas.....	14
1.11	A importância dos produtos naturais complexados.	15
1.12	Propriedades físico-químicas dos complexos com Mg.....	16
2.	Objetivos	18
2.1	Objetivo Geral.....	18
2.2	Objetivos específicos.....	18
3.	Materiais e Métodos	19
3.1	Produtos Naturais complexados utilizados para os ensaios antimicrobianos e para os estudos da relação planta – complexos.	19
3.1.1	Preparação dos complexos	20
3.1.2	Síntese do Complexo Hesperidina	20
3.1.3	Síntese do Complexo Naringenina.....	21
3.1.4	Síntese do Complexo Ácido Isovanílico.	21
3.1.5	Caracterização dos complexos por Espectroscopia Vibracional na região do Infravermelho.	22

3.2 Ensaio microbiológicos <i>in vitro</i>	22
3.2.1 Isolados utilizados da bactéria <i>Xanthomonas citri</i> ssp. <i>citri</i> nos experimentos antimicrobianos <i>in vitro</i>	22
3.2.2 Crescimento e manutenção dos isolados.	23
3.2.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos em avaliação sobre a bactéria <i>Xanthomonas citri</i> ssp. <i>citri</i>	24
3.2.4 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) das amostras em teste sobre a bactéria <i>Xanthomonas citri</i> ssp. <i>citri</i>	27
3.2.5 Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIM).	29
3.3 Produções de plântulas de citros <i>in vitro</i>	33
3.3.1 Identificação do mecanismo sistêmico do Complexo Hesperidina nas plântulas de citros.	34
3.3.2 Ensaio antimicrobianos com os complexos nas plântulas de citros infectadas com a bactéria <i>Xanthomonas citri</i> ssp. <i>citri</i>	35
3.3.3 Infecção artificial das plântulas de citros sadias com a bactéria <i>X. citri</i> . .	36
3.3.4 Tratamento preventivo sistêmico, com 3 doses dos complexos.	37
3.3.5 Tratamento curativo sistêmico com três doses diferentes dos complexos.	39
3.3.6 Tratamento curativo sistêmico com a dose de melhor atividade dos complexos.	40
3.3.7 Análise quantitativa do consumo dos complexos acrescentados no meio de crescimento das plântulas.	41
3.3.8 Preparo das soluções padrão para construção da curva analítica.	41
3.3.9 Preparo das amostras a serem quantificadas.	43
4. Resultados e Discussões.	44
4.1 Obtenção dos complexos hesperidina, naringenina e ácido isovanílico e caracterizações por espectro de Infravermelho.	44
4.2 Ensaio Microbiológicos	48
4.2.1 Isolados da bactéria <i>Xanthomonas citri</i> ssp. <i>citri</i>	48

4.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima - CIM, frente à bactéria <i>Xanthomonas citri</i> ssp. <i>citri</i>	49
4.2.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos complexos e seus ligantes livres frente à bactéria <i>Xanthomonas citri</i> ssp. <i>citri</i>	54
4.2.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIMB)....	58
4.2.5 Padronização do biofilme	59
4.2.6 Realização da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme dos complexos frente aos 5 isolados selecionados.	63
4.3 Ensaios com os complexos frente à bactéria <i>Xanthomonas citri</i> ssp. <i>citri</i> em plântulas de citros cultivadas <i>in vitro</i>	79
4.3.1 Formação das plântulas de citrus.....	79
4.3.1 Visualização interna do complexo hesperidina nas plântulas de citrus tratadas com os complexos via sistêmico e translaminar.....	81
4.3.2 Tratamentos com os complexos frente às plântulas contaminadas pela bactéria <i>X. citri</i>	85
4.4 Quantificação dos complexos em HPLC-UV	94
5. Conclusões.....	105
6. Bibliografia.....	107

1. Introdução

1.1 Economia agrícola brasileira

O Brasil é um grande produtor e exportador de alimentos, fibra e energia renovável, tendo grande importância para a segurança alimentar do mundo. O agronegócio brasileiro representa quase dois terços do PIB nacional (Produto Interno Bruto), considerando a soma global da agricultura, processamento e insumos de setores industriais (CEPEA-USP e CNA, 2012; de PAULA, et al., 2017).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento confirmou que o ano 2017 registrou mais um recorde de registros de defensivos. De acordo com Mapa, foram liberados 326 produtos agroquímicos durante 2017, o que representou um aumento de 17,68% na comparação com o auge atingido no ano anterior (2016), quando haviam sido registrados 277 produtos (de PAULA, et al., 2017).

De acordo com o Secretário de Defesa Agropecuária do Ministério, Luís Eduardo Pacifici Rangel, um em cada três defensivos agrícolas aprovados no ano de 2017 foram biológicos. Segundo ele, é falsa a “imagem” de que o Mapa não visa a sustentabilidade no uso de pesticidas (Fonte: Agrolink, 2018)

O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) divulgou o resultado do Produto Interno Bruto (PIB) do ano de 2017. Após dois anos de retração, a economia voltou a crescer e esse avanço é puxado basicamente pela agropecuária, que cresceu 13%. A super safra do ano de 2017 foi o principal fator que impulsionou o crescimento do PIB. Segundo o IBGE, a alta na agropecuária decorreu principalmente do desempenho da agricultura, com destaque para as lavouras do milho (55,2%) e da soja (19,4%) (de PAULA, et al., 2017).

Destaca-se que setores como serviços e indústria ou apresentaram crescimento baixo, ou se mantiveram estáveis, reforçando a importância da

agropecuária na volta do crescimento da economia nacional. E com a perspectiva de alta produção na safra 2017/2018, a expectativa é de que o PIB de 2018 novamente seja puxado pela atividade agrícola.

Um indicativo disso já pode ser observado pela decisão estratégica dos produtores brasileiros. No Mato Grosso, maior produtor nacional de algodão, uma medida importante foi tomada: diminuir a área de milho (com preços baixos) e aumentar a área plantada de algodão, mais rentável.

O avanço do setor agrícola foi traduzido em um rápido aumento e diversificação das exportações. Hoje o Brasil é um dos principais exportadores de commodities como soja (ficou em 1º lugar mundial em 2013), açúcar (1º lugar), café (1º lugar) e milho (3º classificado), bem como um grande exportador de algodão, tabaco e suco de laranjas, entre outras culturas (faostat.fao.org, 2017).

1.2 Economia da citricultura.

A citricultura é um dos setores mais importantes do agronegócio brasileiro, e representa a maior parte da produção mundial de suco de laranja, gerando empregos diretos e indiretos. O consumo de laranja in natura também absorve parte da produção brasileira, sendo menor que 1% da quantidade destinada ao mercado internacional. Desde 1962, quando iniciaram as primeiras exportações, a citricultura tem contribuído de forma definitiva para com o desenvolvimento do Brasil. No estado de São Paulo, os pomares totalizam quase 191,69 milhões de plantas no setor, com uma produção estimada em 367,47 milhões de caixa (FUNDECITRUS, 2017).

A safra brasileira em 2016/2017 foi de 245 milhões de caixas, contra 67 milhões de caixas dos Estados Unidos, segundo maior produtor mundial. A estimativa para a safra do parque citrícola de São Paulo e Minas Gerais – maior centro produtor do país – para 2017/2018 é ainda mais alta, de 364 milhões de caixas, a melhor dos últimos cinco anos. O Brasil é responsável ainda por produzir 61% de todo o suco de laranja consumido no planeta. Os números brasileiros não são enormes apenas quando se fala de produção. O setor

citricola movimenta bilhões de dólares todos os anos e gera milhares de empregos diretos e indiretos (FUNDECITRUS, 2017).

Já na safra 2017/2018, que teve início em julho para efeito das exportações, o volume embarcado até novembro ficou em 372.380 toneladas, volume 32,7% superior às 280.621 toneladas embarcadas no mesmo período da safra 2016/2017, de acordo com os dados divulgados pela Secex.

A principal região produtora de laranja no Brasil é o cinturão citricola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste de Minas Gerais, composto por 349 municípios. Anualmente, são mais de US\$ 14,5 bilhões movimentados, gerando US\$ 6,5 bilhões de PIB (Produto Interno Bruto), US\$ 180 milhões em arrecadação de impostos e 200 mil empregos diretos e indiretos.

Segundo o Cadastro Geral de Empregados e Desempregados (Caged), ligado ao Ministério do Trabalho, nenhum outro segmento do agronegócio empregou mais do que a laranja no estado de São Paulo em 2016. A citricultura gera um emprego a cada nove hectares. A cana-de-açúcar precisa de 80 hectares para gerar um emprego (NEVES e TROMBIN, 2017).

1.3 Doenças da citricultura

Pode-se definir doença como um distúrbio fisiológico, resultado de uma irritação contínua causada por agentes bióticos ou abióticos e que pode levar ao aparecimento de sintomas, AGRIOS, 1997. Em consequência dessa definição, doença não pode ser confundida com o patógeno nem com os sintomas, nem com injúrias. Também por essa definição, fica claro que o mais importante não é a natureza do agente causal, mas, sim, a interação que ocorre com a planta.

Dentre os agentes bióticos, destacam-se os fungos e bactérias, além dos vírus, viróides e nematóides. Os agentes abióticos podem ser temperaturas muito altas ou muito baixas, intoxicação por pesticidas ou minerais, falta ou excesso de luz ou umidade do solo, poluição atmosférica, acidez ou alcalinidade do solo, etc.

Qualquer que seja o agente causal, as doenças podem ser tipificadas de acordo com o processo fisiológico que afetam, e a partir dele ter uma idéia da

evolução e do comportamento da interação patógeno-hospedeiro (BEDENDO, 1995).

Tipo de doença					
I	II	III	IV	V	VI
← Agressividade _____					
_____ Especificidade _____ →					
_____ Evolução do parasitismo _____ →					

FIGURA 1. 1 - Agressividade, Especificidade, e Evolução da interação patógeno hospedeiro em função do tipo de doença. Legenda: I = podridão de frutos, II = tombamento, III = podridão de raízes e colo, IV = doenças vasculares, V = manchas, e VI = viroses. Fonte: BEDENDO, 1995).

Segundo a FIGURA 1.1, as doenças do tipo I são as doenças de órgão de reserva, onde as principais são: a verrugose, que recebe esse nome devido a deformação severa que causa na casca dos frutos cítricos; a melanose, cujos sintomas são pequenas manchas circulares, marrom escuras ou pretas, salientes; a mancha preta ou pinta preta, que é uma doença fúngica e seus sintomas são lesões circulares, com centro claro, deprimidas, circundadas por borda escura; podridão de alternaria, onde os frutos afetados amadurecem prematuramente e podem apresentar cor marrom na casca, próximo a região estilar; e a podridão floral ou estrelinha.

As doenças do tipo II são aquelas que causam danos em tecidos jovens onde a principal é o tombamento ou *damping-off*.

As doenças do tipo III são as que causam podridões de colo e de raízes, a principal delas é a Gomose, causada por um fungo e seus sintomas mais comuns são as exsudações de goma em lesões no tronco e colo da planta.

As doenças do tipo IV são as vasculares, onde a principal é a Clorose variegada dos citros (CVC).

As doenças do tipo V são as que afetam a fotossíntese, onde as principais são: Cancro cítrico, cujos sintomas são lesões levemente salientes nas folhas e frutos, os frutos caem da planta antes de atingir a maturação; a fumagina, que não é considerada uma doença muito importante, mas pode afetar a fotossíntese, é a mais conhecida doença causada pelos “fungos de revestimento”, ou seja, fungos que crescem sobre tecidos das plantas, mas não os penetram; mancha da alternário, uma das doenças mais recentes do Brasil e vem se disseminando no mundo nos últimos anos, ataca folhas e frutos, seus sintomas são manchas marrons que afetam o crescimento dos ramos e qualidade dos frutos.

As doenças do tipo VI são aquelas que alteram o uso de fotossintatos, onde as principais são causadas por vírus. A principal é o *Greening*, que é uma das doenças mais destrutivas do citros, seus sintomas são manchas amarelas interernvais nas folhas, confundindo com deficiência nutricional, podem também apresentar má formação nas pontas, muitas vezes em forma de coração apresentando geralmente uma produção pequena, com frutos deformados (MATTOS JUNIOR et al., 2005).

1.4 Cancro cítrico.

O cancro cítrico voltou a ser uma grande preocupação do setor citrícola paulista desde que a legislação para o Programa de Erradicação do Cancro Cítrico foi amenizada, em meados de 2009, excluindo a exigência de erradicação de todo o talhão de plantas em situações que o índice de contaminação fosse 0,5% ou mais, e o convênio entre o Fundecitrus e a Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo não foi renovado.

Entre 2001 e 2009, a doença manteve baixas incidências de talhões contaminados, variando entre 0,08% e 0,20%. A partir de 2010, começou a avançar e chegou a 0,44% de talhões contaminados. Em 2012, atingiu 1,39%, registrando a maior incidência da doença desde seu primeiro relato, em 1957.

Historicamente, o cancro cítrico sempre apresentou maiores incidências

nas regiões Noroeste e Oeste, onde foi primeiro detectado e nas quais os citricultores sempre foram mais resistentes à aplicação do Programa de Erradicação do Cancro Cítrico. Nessas duas regiões, as altas incidências de talhões contaminados em 2012 são bastante preocupantes (11,5% na região Noroeste e 2,7% na Oeste). Outra região em que a doença cresceu bastante foi o Centro (0,8%), atingindo também a maior incidência registrada desde o início dos levantamentos nessa região, (<http://www.fundecitrus.com.br>).

O levantamento de 2017 relevou que o cancro cítrico está presente em 12,92% dos talhões e confirmou o crescimento da incidência da doença no parque citrícola paulista e Triângulo Mineiro. O levantamento também mensurou, pela primeira vez, a incidência de plantas com cancro cítrico. Atualmente, 8,68% das árvores têm cancro cítrico. Esta incidência equivale a mais de 16 milhões de árvores em todo estado. É importante ressaltar que em função da metodologia utilizada e do crescimento do cancro cítrico, a incidência de plantas doentes é a variável que retrata a ocorrência da doença com maior precisão. Devido à pequena quantidade de árvores avaliadas em cada talhão, o percentual de talhões afetados neste levantamento é subestimado (FUNDECITROS, 2017).

1.5 Controle da doença do cancro cítrico

O cancro cítrico não possui métodos de controle curativos, por isso as medidas de controle utilizadas se baseiam na exclusão para evitar a entrada de inóculo externo e erradicação na tentativa de diminuir o inóculo já existente (FEICHTENBERGER; MÜLLER, GUIRALDO, 1997).

O método de exclusão se baseia, principalmente, em evitar que a bactéria seja introduzida em áreas onde ainda não foi constatada a doença, utilizando métodos preventivos, como a aquisição de mudas sadias e certificadas. Também é prática necessária a restrição ao acesso de pessoal, máquinas e implementos provenientes de outras áreas citrícolas, bem como a desinfestação de veículos, materiais e implementos utilizados durante os tratamentos culturais e na colheita. Uma alternativa é a construção de “bins” na entrada da propriedade para armazenamento dos frutos colhidos, reduzindo a entrada e circulação de pessoas (FUNDECITRUS, 2006). A implantação de quebra ventos pode ser uma

boa alternativa para reduzir a velocidade deste no pomar, e assim diminuir os ferimentos causados por ele, bem como diminuir a distribuição de aerossóis (LEITE JUNIOR, 1990).

Bactericidas cúpricos para o controle são estritamente protetivos, não possuem atividade curativa nem ação sistêmica na planta. O cobre presente na grande maioria das formulações cúpricas está na forma fixa, como o hidróxido de cobre, oxicloreto de cobre e óxido cuproso. Ao contrário de cobres não fixos ou solúveis, como o sulfato e o nitrato de cobre, os cobres fixos são predominantemente insolúveis ou muito pouco solúveis. Essa característica proporciona maior período residual e menor fitotoxicidade às plantas. Uma vez aplicados, as partículas de cobre aderem à superfície vegetal e formam uma barreira protetora que funciona como um reservatório de cobre, liberando lentamente íons de cobre tóxicos para as bactérias. Exsudados da planta e microrganismos desempenham papel importante na solubilidade de cobre, formando ácidos fracos que reduzem o pH na superfície da planta, o que aumenta lentamente a solubilidade e disponibilidade de cobre iônico (BEHLAU e BELASQUE JR., 2014).

1.6 Controle de insetos e microrganismos causadores de doenças na agricultura, o uso de agrotóxicos.

Apesar do alto padrão tecnológico praticado pelos produtores brasileiros, nos últimos dez anos, a agricultura no País sofreu perdas econômicas consideráveis em razão dos ataques de pelo menos 35 novas pragas – insetos e microrganismos causadores de doenças. Além disso, cerca de 500 espécies de pragas quarentenárias ainda apresentam potencial para causar danos significativos às nossas lavouras. Segundo a Sociedade Brasileira de Defesa Agropecuária (SBDA), 150 pragas quarentenárias ausentes do Brasil, já estão em países da América do Sul próximos de nossas fronteiras. Isso significa que, a qualquer momento, uma nova praga pode chegar ao Brasil sem ser percebida, pois, além da transmissão por plantas, animais, microrganismos e por seus órgãos propagativos, podem ainda ser levadas pelo vento ou pelo ser humano,

em um mundo cada vez mais globalizado. A existência de um organismo quarentenário no território brasileiro submete os produtos agrícolas a barreiras sanitárias, impostas por parceiros comerciais, que podem interferir nas exportações e gerar um panorama de difícil reversão (LOPES-DA-SILVA et al., 2014).

A propagação por interferência humana é muito significativa, principalmente quando se considera que 90% do comércio mundial são marítimos, e a aviação é via de ingresso de maior disseminação de pragas (OLSON, 2006). Nos Estados Unidos, por exemplo, houve 725 mil intercepções entre 1984 e 2000, das quais 73% em carregamentos aéreos (OLSON, 2006). Este número temático da revista PAB (Revista Agropecuária Brasileira), especial para tratar das ameaças sanitárias à agricultura brasileira, traz importante alerta sobre pragas exóticas que causam perdas econômicas tanto aos produtores brasileiros quanto ao comércio internacional das commodities.

Os agrotóxicos foram desenvolvidos para matar e combater pragas agrícolas (SAÚDE, 1996). O DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano) foi o primeiro inseticida sintético usado em larga escala para prevenir e evitar a disseminação de diversas doenças causadas por vetores, como malária, febre amarela, doença do sono, dentre outras, sendo considerado inicialmente como forte aliado da sociedade (SPADOTTO, 2006).

Posteriormente os agrotóxicos passaram a ter aplicabilidade na agricultura, com o intuito de otimizar a produção e suprir a procura por alimentos (KICKBUSCH, 1996; DA SILVA et al., 2005; WAICHMAN et al., 2007). Esse aumento na produtividade levou o Brasil a ocupar o primeiro lugar no ranking de exportação de açúcar, soja, café, suco de laranja, tabaco e álcool, e a vice-liderança com o milho (SILVA, 2014). Apesar de trazer benefícios econômicos, a ampliação na produção também fez com que o país aumentasse o consumo de agrotóxicos, sendo considerado líder no mercado consumidor (PELAEZ et al., 2013).

Diante do aumento no consumo destes compostos químicos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), após a avaliação de estudos toxicológicos, estabeleceu o índice da ingestão diária aceitável (IDA) de cada

agrotóxico. No entanto, nem sempre o preceito de aplicação é seguido corretamente, e a contaminação ambiental e dos alimentos pode expor a população a doses mais altas, tornando o uso de praguicidas uma questão importantes de saúde pública (KOIFMAN E KOIFMAN, 2003; DOMINGUES et al., 2004).

Assim, o Brasil começou a se tornar um grande consumidor de agrotóxicos. Segundo a Organização para a Alimentação e Agricultura (FAO), em 1986 o país já era considerado um dos que mais exagerava na aplicação de agrotóxicos por hectares (ALVES, 1986). Só em 2004, foram utilizadas aproximadamente 187.000 toneladas de agrotóxicos, que correspondeu a 1 kg por habitantes/ano ou 6kg por habitante/ano da zona rural (PIGNATI, 2005). Esse uso intensivo de defensivos agrícolas manteve o país entre 1970 e 2007 entre os seis maiores consumidores do mundo (TERRA, 2008).

No entanto, recentemente, o Brasil se destacou como o maior consumidor mundial de agrotóxico, seguido dos Estados Unidos (PELAEZ et al., 2013). Um levantamento realizado pelo Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG) mostrou que as vendas de agrotóxicos no Brasil somaram US\$ 7,1 bilhões, enquanto que nos EUA, somaram US\$ 6,6 bilhões (ANDEF, 2009).

No entanto, apesar de trazer benefícios econômicos, o grande problema está na forma inapropriada que esses praguicidas estão sendo utilizados ultimamente, seja no tratamento prévio das sementes, durante o cultivo ou após a colheita (CAMAROTTO et al., 2004). Isto é um fato preocupante, pois a população pode ser exposta a resíduos de agrotóxicos por meio da ingestão de verduras, frutas ou legumes (ARAÚJO et al., 2000; CALDAS e DE SOUZA, 2000).

Dentre as conseqüências indesejáveis ao uso de pesticidas podem ser citadas a presença de resíduos no solo, água e ar, nos tecidos vegetais e animais, a destruição de microrganismos do solo, mortalidade de insetos benéficos ao equilíbrio do agroecossistema, efeitos prejudiciais sobre organismos não alvos, presença de resíduos nos alimentos e, ainda, contaminação ocupacional. Em meio aos organismos não alvos pode estar presente uma diversidade de aves, peixes e animais silvestres que fazem parte do ecossistema. Além disso, insetos, fungos e bactérias que são predadores

naturais de outras espécies também são afetados causando um completo desequilíbrio ao agroecossistema, pois reduzem o número de espécies, alteram a reprodução, o comportamento, além de suscetibilizá-los às doenças (DORES e FREIRE, 1999).

1.7 Produtos Naturais como Pesticidas

Segundo o EPA (Environmental Protection Agency), os pesticidas são separados em três categorias: antimicrobianos, biopesticidas e convencionais (CANTRELL et al., 2012).

Em geral, pesticidas antimicrobianos são substâncias ou misturas de substâncias utilizadas para destruir ou suprimir o crescimento de microrganismos nocivos, sejam eles bactérias, vírus ou fungos. A principal diferença em relação aos biopesticidas e os convencionais é o direcionamento indireto ou inespecífico (CANTRELL et al., 2012).

De acordo com a EPA, biopesticidas incluem substâncias de ocorrência natural que controlam pragas- insetos e microrganismos- (pesticidas bioquímicos), microrganismos que controlam pragas (pesticidas microbianos ou agentes de biocontrole), e substâncias pesticidas produzidas por plantas contendo material genético adicionado (Protetores Incorporados em Plantas ou PIPs), (U.S EPA, 2011). Os pesticidas convencionais são talvez os mais familiares, e provavelmente aqueles que não se enquadram nas categorias acima, mas nem sempre passam pelo caminho convencional de registro. Os pesticidas microbianos não são protegidos, a maioria destes são organismos vivos e não podem ser considerados produtos naturais no sentido químico.

As principais categorias de origem dos pesticidas foram modeladas através de categorias prévias usadas por, NEWMAN et al., 2012. As principais são: Biológicos, geralmente um grande peptídeo ou também proteínas Isolados de um organismo celular ou produzidos por meios biotecnológicos num hospedeiro substituto, também inclui biopesticidas; Produto natural, composto natural não modificado ou extratos brutos; Sintéticos, totalmente sintético na origem; Sintéticos Derivados de Produtos Naturais, desenvolvido tendo como base os produtos naturais.

Segundo a EPA, entre 1997 e 2010, dentre os pesticidas convencionais, 109 novos pesticidas foram registrados.

1.8 Compostos fenólicos em frutas cítricas

Os compostos fenólicos são antioxidantes amplamente encontrados no reino vegetal. São originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, além disso se formam em condições de estresse como, infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outros (NACZK e SHAHIDI, 2004).

Esses compostos encontram-se largamente em plantas e são um grupo muito diversificado de fitoquímicos derivados de fenilalanina e tirosina. Os fenólicos, em plantas, são essenciais no crescimento e reprodução dos vegetais, além de atuarem como agente antipatogênico e contribuir na pigmentação. Em alimentos, são responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa (NACZK e SHAHIDI, 2004).

As principais fontes de compostos fenólicos são frutas cítricas, como limão, laranja e tangerina, além de outras frutas à exemplo da cereja, uva, ameixa, pêra, maçã e mamão, sendo encontrados em maiores quantidades na polpa que no suco da fruta. Pimenta verde, brócolis, repolho roxo, cebola, alho e tomate também são excelentes fontes destes compostos (PIMENTEL et al., 2005).

Polifenóis compreendem uma variedade de compostos bioativos que são comumente divididos em diversas classes: ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinâmicos, antocianinas, proantocianidinas, flavonóides, estilbenos e lignanas (ZHOU, 2012). Entre os compostos fenólicos de frutas cítricas, as atividades antioxidantes de flavonóides, ácidos fenólicos e cumarinas são as mais estudadas na literatura existente (ZOU et al., 2015).

Os flavonóides têm um papel direto na eliminação de espécies reativas de oxigênio, que podem contrabalancear a oxidação lipídica *in vitro* e melhorar a atividade das enzimas antioxidantes do organismo e diminuir a formação de peróxido *in vivo* (NAKAO et al. 2011). Entre os flavonoides de citrus, a

antioxidação da naringina, hesperidina e naringenina são comumente estudadas (ZOU et al., 2015).

Naringina pode melhorar significativamente a eficácia do sistema imunológico para evitar lesões nos órgãos internos e nos tecidos ou doença causada por oxidação, aumentando a atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), paraoxonase (PON) e outras enzimas antioxidantes (ALI, e EL KADER, 2004). A quantidade de naringina em pomelo cristalizado [*Citrus grandis* (L.) Osbeck] pode ser alcançar 124 11,90 mg / 100 g (ZHOU, 2012).

Hesperidina tem capacidade sequestradora do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e pode induzir a oxidação do colesterol LDL , promove a regeneração de células pancreáticas, e preveni o estresse oxidativo nos embriões de ratos diabéticos (TOUMI et al., 2009). O teor de hesperidina em laranja doce cristalizada (*Citrus sinensis*), limão (*Citrus limon*) e pomelo (*Citrus grandis*) é 11 mg/100 g, 22 mg/100 g, 131 e 4,37 mg/100 g, respectivamente (ZHOU, 2012).

A naringenina pode inibir a β -oxidação de ácidos graxos no fígado, regulando as enzimas dos processos de oxidação de ácidos graxos, como carnitinepalmitoiltransferase (CPT, a enzima limitante da taxa de oxidação de ácidos graxos), 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase, PON e enzimas antioxidantes no plasma (JUNG, LEE, PARK, KANG E CHOI, 2006). Naringenina são mais eficazes do que hesperidina (JUNG, LEE, PARK, KANG e CHOI, 2006). O conteúdo da naringenina pode ser 75 mg/l em toranja Grapefruit (HO, SAVILLE, COVILLE E WANWIMOLRUK, 2000).

Os ácidos fenólicos são ricos em frutas cítricas e têm diferentes níveis de radicais livres. Os ácidos fenólicos citrinos apresentam fortes propriedades antioxidantes através da desidrogenação do grupo hidroxila e o efeito da orto-substituição em um anel de benzeno (DAI e MUMPER, 2010). O teor total de ácidos fenólicos citricos variaram de 180 mg/g peso seco (DW) na polpa da Toranja (*Citrus paradisi*) e 5060 mg/g DW em casca de Ponkan (*Citrus poonensis*), (XU, YE, LIU, MA e CHEN, 2008).

As cumarinas são outra classe de compostos fenólicos ricos em frutas cítricas. Elas são derivadas da via do metabolismo da fenilalanina, que leva em última análise, a síntese de furanocumarina (psoralina) (YU, WANG, WALZEM,

MILLER, PIKE, e PATIL, 2005). As cumarinas demonstraram possuir fortes atividades antioxidantes por causa de seus grupos hidroxila fenólicos (TYAGI et al., 2005). O teor de cumarinas no Pomelo (*Citrus grandis*) é de 2,2 mg/100 g (ZHOU, 2012).

1.9 Hesperidina, Naringenina e Ácido isovanílico.

Hesperidina e naringenina, FIGURA 1.5, são flavonóides amplamente encontrados em frutas cítricas. A hesperidina, por exemplo, é um dos flavonóides mais abundantes, sendo encontrado na casca e nas partes membranosas da laranja (*Citrus sinensis*), constituindo mais de 40% do peso seco dos frutos imaturos (GROHMANN et al., 2000).

Esses flavonóides possuem atividades biológicas especiais, tais como: antiinflamatória, anticarcinogênica, antitumoral, regulação de síntese de colesterol hepático. No entanto, como muitos outros flavonóides, apresentam fraca biodisponibilidade, devido principalmente à baixa solubilidade em água (EMIM et al., 1994; BENAVENTE-GARCIA et al., 1997; YEH et al., 2007; WILCOX et al., 2001; KALPANA et al., 2009 e SCHAL, 1992).

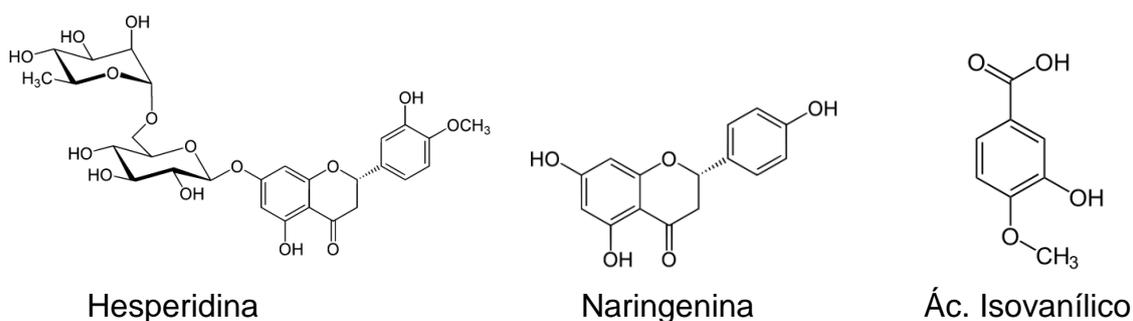


FIGURA 1.5 - Representação das estruturas dos flavonóides hesperidina e naringenina, e do fenol ácido isovanílico.

O ácido isovanílico, FIGURA 1.5, ou ácido 3-hidroxi-4-metoxibenzoico é um composto químico orgânico pertencente ao grupo dos ácidos fenólicos. A substância é derivada estruturalmente tanto do ácido benzóico como a partir

do guaiacol (*o*-metoxifenol). É um isômero da vanilina, a partir do qual difere apenas pelas posições do grupo metoxi e do grupo hidroxila, apresentando a inversão dos grupos entre a posição 4 e a posição 3. A isovanilina pode ser oxidada enzimaticamente a ácido isovanílico (PANOUTSOPOULOS e BEEDHAM, 2005).

1.10 Complexos em insumos agrícolas.

A coordenação de compostos metálicos em pesticidas pode ser utilizada como uma espécie de formulações de liberação controlada que tem a capacidade de aliviar a toxicidade e diminuir resíduos de pesticidas (ZHANG et al. 2003). Os pesticidas complexados com metais, também têm as vantagens de crescente eficácia na estabilidade da substância original, reduzindo a dosagem de pesticidas, bem como outras funções biológicas (KOEHLER et al., 2007 e PRASAD et al., 1990). A exploração de novos compostos de coordenação metálica para pesticidas tem um grande potencial para o seu desenvolvimento e sua utilização na agricultura (MURALI e DUNCAN, 1995).

Na literatura, encontraram-se fungicidas e inseticidas complexados principalmente com cobre, XIONG, et al., 2014, estudou a complexação de Cu (II) com um fungicida derivado do triazol, o 4-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil) ácido benzóico. O amplo espectro antifúngico destes fungicidas tem sido muito preocupante (PRAKASH et al., 2011 e MANCLÚS, et al., 2008). Hoje, os principais fungicidas no mercado são constituídos principalmente por derivados de triazol, tais como difenoconazol, diniconazol, tebuconazol, flutriafol, hexaconazol e ciproconazol. A complexação do fungicida com o metal aumentou a sua eficiência antifúngica (SINGH, 2012).

LI et al., 2015, relatou dois complexos de Cu (II) de triadimefon e descobriu que os complexos de cobre apresentaram potente atividade antifúngica em direção aos fungos *Gibberella nicotiancola*, *Gibberella saubinetii*, *Alternaria solani*, *Physalospora berengeriana* e *Glomerella cingulata*. Também estudou a síntese de quatro complexos de Cu (II) com tebuconazol outro fungicida derivado de triazol.

LIU, 2015, complexou alguns pesticidas com grupos terminais quinolina e piridina com metais Cu, Zn, Ag, Ni. Os pesticidas de eficiência contendo estrutura de quinolina e piridina foram amplamente utilizados na agricultura. Por exemplo, o fenoxi quinolona foi um pesticida eficiente para prevenir e controlar o oídio (HUBSCHWERLEN et al., 2008). Com o desenvolvimento da química de síntese orgânica, novos horizontes de compostos de quinolina foram ampliados no campo do agente pesticida (DU e FANG, 2007; YAMAMOTO, 2007).

A complexação de micronutrientes como Zn, Cu, Fe e aminoácidos em fertilizantes, são de extrema importância para o transporte desses nutrientes para as plantas. Principalmente o zinco, possui uma translocação lenta na planta e é de extrema importância para o metabolismo de carboidratos, proteínas é o precursor do triptofano e responsável pela resistência das plantas contra patógenos (MUSTAFA et al., 1994; ÇAKMAK, 2008; GAO et al., 2009).

1.11 A importância dos produtos naturais complexados.

As pesquisas com compostos de coordenação visando aplicabilidade biológica começaram no início de 1900. Desde então, a versatilidade desses compostos fez com que hoje os complexos metálicos possuem papel essencial nas indústrias farmacêuticas, químicas e agrícolas (KUMAR et al., 2009).

Em 1962 foi obtido o primeiro complexo de flavonóides com alumínio como um íon central. Desde o início dos anos 80, os cientistas têm investigado cerca de 40 complexos do tipo metal-flavonóide (GRAZUL e BUDZISZ, 2009), e foi verificado que o efeito da quelação, na maioria dos casos melhorou a biodisponibilidade e as várias atividades biológicas antes apresentadas pelos flavonóides livres (DE SOUZA et al., 2004).

Nos sistemas naturais, tem-se a complexação de antocianinas, uma subclasse de flavonóides, a íons Mg^{2+} , cujas moléculas são de fundamental importância para proteção das plantas contra organismos patogênicos e predadores (SHARVELLE, 1961).

Assim, utilizando-se os sistemas naturais como modelo, estudos têm revelado que a atividade inseticida e antifúngica de outras classes de compostos tais como os pirazóis e carboxina foram potencializadas quando complexados a

íons metálicos. Isto mostra que, o desenvolvimento de compostos de coordenação com aplicação pesticida é uma alternativa para o uso na agricultura (HARRISA e ETHERIDGE, 2001).

Vários elementos metálicos são essenciais no meio biológico, já que muitos compostos orgânicos utilizados em sistemas biológicos requerem íons metálicos para a ativação ou a biotransformação a fim de alcançar o seu modo de ação. Por exemplo, a hemoglobina, que se liga e proporciona oxigênio para os tecidos do corpo requer um átomo de ferro para a função. Uma abordagem com sucessos notáveis e crescente nos últimos anos vem sendo o desenvolvimento de complexos metálicos que incorporam ligantes biologicamente ativos. Tais compostos oferecem a possibilidade de desenvolvimento de moléculas bioativas, cuja atividade frente a um determinado alvo é melhorada pela combinação de uma especificidade do ligante ao interagir com um determinado sítio molecular com as propriedades inerentes ao centro metálico (ORVIG e ABRAMS, 1999).

1.12 Propriedades físico-químicas dos complexos com Mg.

A viabilidade de uso de muitos pesticidas, além de sua eficácia, depende de vários outros aspectos, dentre eles sua classe toxicológica; sua estabilidade quanto às intempéries do meio, como fotodegradação; estabilidade quanto a diferentes pHs e sua solubilidade em água (RIBAS e MATSOMURA, 2009).

OLIVEIRA, 2012, estudou as propriedades físico-químicas do complexo hesperidina-Mg quanto à estabilidade fotoquímica, efeito de pH, solubilidade em água e lipofilicidade. A estabilidade fotoquímica (efeito da luz) do complexo hesperidina-Mg em solução aquosa que foi analisada por mudanças em seus espectros de absorção, não houve nenhuma alteração significativa nos espectros eletrônicos deste complexo, nem sob irradiação fotoquímica (com lâmpada de 350 nm ou 420 nm e $I_0 = 1 \times 10^{-7}$ por um período de 1 hora), nem sob irradiação solar durante 30 dias, o que sugere a boa estabilidade deste composto no que se refere à formação de possíveis intermediários da fotodegradação sob estas condições. Sob este aspecto, a aplicação na agricultura em campo destes

compostos é bastante relevante. A estabilidade química (efeito do pH), deste complexo em diferentes pH's também foi avaliada por mudanças em seus espectros de absorção na região UV-Vis. Foi verificado que o complexo também não sofre degradação na faixa de pH 3 a 9.

A lipofilicidade e solubilidade de uma molécula com potencial aplicação biológica são fatores essenciais a serem levados em consideração na fase de desenvolvimento de sua formulação, já que ambos são os principais parâmetros que influenciam em sua absorção, distribuição, metabolismo, e propriedades toxicológicas. Assim, torna-se importante a avaliação de tais propriedades (SKOOG et al, 2006).

Os flavonóides hesperidina e naringenina são amplamente reconhecidos por suas propriedades em sistemas biológicos. No entanto, o fator limitante do uso desses compostos é a baixa solubilidade em solução aquosa (ZOU, 2015).

A solubilidade destes dois complexos em água pura são maiores do que seus respectivos ligantes flavonóides livres, a hesperidina livre possui solubilidade de 5,92 µg/mL, já o seu complexo com Mg possui solubilidade de 472 µg/mL, a naringenina livre solubilidade de 43,83 µg/mL e seu complexo com Mg 528,90 µg/mL. Neste sentido, vale ressaltar que a alta solubilidade em água apresentada pelos complexos, em comparação aos flavonóides livres, sugere que os complexos podem ser de uso potencial para melhorar a biodisponibilidade destes flavonóides em meio fisiológico (OLIVEIRA, 2012).

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo geral desenvolver e avaliar novos bactericidas para o controle do fitopatógeno causador do cancro cítrico *Xanthomonas citri* ssp. *citri*.

2.2 Objetivos específicos

- Melhorar a metodologia de síntese de complexos de flavonoides e fenóis com Mg^{2+} , diminuindo a quantidade de solvente, ou o eliminando tornando-a mais econômica para uma futura síntese em escala piloto.
- Preparar o complexo utilizando o fenol ácido isovanílico.
- Estudar o modo de ação dos complexos, inicialmente em plântulas de micropropagação. Este estudo permitirá confirmar que os complexos poderão ser utilizados como sistêmico.
- Desenvolver metodologia de quantificação desses complexos em plântulas, visando analisar se o rendimento de absorção pela plântula será viável, ou seja, se a perda para o meio é pequena.
- Estudar o modo de ação dos complexos, inicialmente em plântulas após a inoculação da bactéria e verificar a sua interação com o biofilme, usando a propriedade fluorescente do complexo.
- Ensaiair os complexos *in vitro* e *in vivo* com outras bactérias e fungos patogênicos de citros, iniciando com *Xanthomonas citri* ssp. *citri*, causadora da doença do cancro cítrico, e levando a grandes prejuízos para a citricultura.

3. Materiais e Métodos

3.1 Produtos Naturais complexados utilizados para os ensaios antimicrobianos e para os estudos da relação planta – complexos.

Os produtos naturais complexados utilizados nos experimentos foram: Hesperidina complexada ao íon magnésio (Mg) *cis*-[Mg(hesp)₂(phen)], Naringenina complexada ao íon magnésio (Mg) *cis*-[Mg(ngnina)₂(phen)(H₂O)₂], Ácido Isovanílico complexado ao íon Mg *cis*-[Mg(ác. isovanílico)₂(phen)], FIGURA 3.1.

Além dos complexos avaliou-se a viabilidade antimicrobiana dos ligantes livres, isto é, da hesperidina, a naringenina e o ácido isovanílico, para que houvesse comparação dos resultados com os seus complexos.

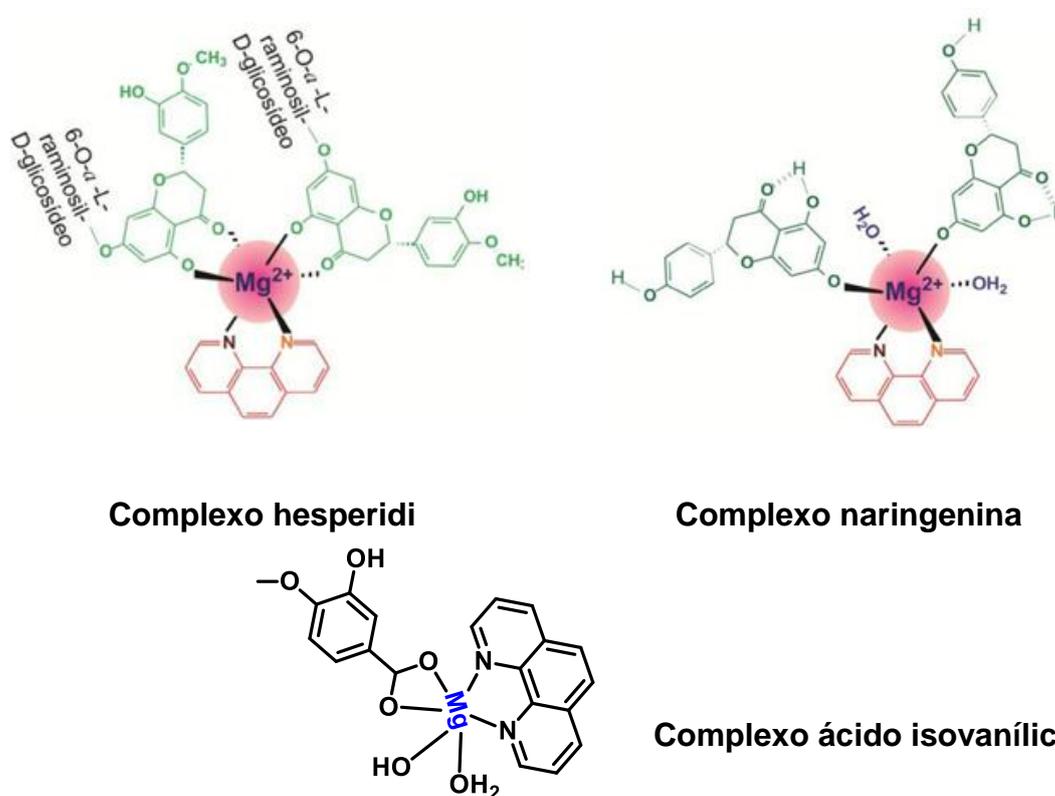
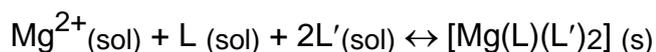


FIGURA 3. 1 - Estruturas moleculares dos complexos ensaiados.

3.1.1 Preparação dos complexos

Os complexos hesperidina, naringenina e ácido isovanílico foram sintetizados pela adição do sal $\text{Mg}(\text{OAc})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}(\text{s})$ seguida do ligante fenantrolina na solução metanólica do respectivo ligante flavonóide, ou fenol. As sínteses foram realizadas considerando-se uma relação estequiométrica de 1:1:2 Mg^{2+} /phen/flavonóide, de acordo com a Equação abaixo:



onde: L= 1,10'-fenantrolina e L' = flavonóide (hesperidina ou naringenina) ou ácido isovanílico.

3.1.2 Síntese do Complexo Hesperidina

Em um balão de três bocas, acoplado a um condensador e conectado a uma linha de gás nitrogênio e um agitador magnético, adicionou-se 20 mL de etanol, deixando por alguns minutos sob agitação e desaeração com N_2 gasoso. Em seguida, adicionou-se na seqüência 60 mg ($214,45 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) de $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 65 mg de 1'10 fenantrolina ($180,21 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), 400 mg ($610,56 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) de hesperidina e 300 μL ($101,19 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) de trietilamina, sempre sob agitação, desaeração e aquecimento. Após o início da condensação do etanol foi marcado um tempo de 2 horas para que a reação ocorresse, encerrando-a em seguida. A mistura foi filtrada a aproximadamente 25°C . A solução remanescente foi rotaevaporada para a redução do volume a aproximadamente 5 mL, sendo em seguida adicionada 10 mL de água gelada e armazenado sob refrigeração por 3 dias. O precipitado amarelo formado foi filtrado e lavado com 20 mL de água gelada. O composto foi seco à vácuo e armazenado em um dessecador.

3.1.3 Síntese do Complexo Naringenina.

Em um balão de três bocas, acoplado a um condensador e conectado a uma linha de gás nitrogênio e um agitador magnético, adicionou-se 20 mL de etanol, deixando por alguns minutos sob agitação e desaeração com N₂ gasoso. Em seguida, adicionou-se na seqüência 54 mg (214,45 g.mol⁻¹) de Mg(CH₃COO)₂·4H₂O, 45 mg de 1'10 fenantrolina (180,21 g.mol⁻¹), 305 mg (610,56 g.mol⁻¹) de naringenina e 300 µL de trietilamina, sempre sob agitação, desaeração e aquecimento de aproximadamente 100°C. Após o início de condensação do etanol foi marcado um tempo de 2,0 horas para que a reação ocorresse, encerrando-a em seguida. A mistura foi filtrada a aproximadamente 25°C. A solução remanescente foi rotaevaporada para a redução do volume a aproximadamente 5 mL, sendo em seguida adicionada 10 mL de água gelada e armazenado sob refrigeração por 3 dias. O precipitado amarelo formado foi filtrado e lavado com 20 mL de água gelada. O composto foi seco à vácuo e armazenado em um dessecador.

3.1.4 Síntese do Complexo Ácido Isovanílico.

Em um balão de três bocas, acoplado a um condensador e conectado a uma linha de gás nitrogênio e um agitador magnético, adicionou-se 20 mL de etanol, deixando por alguns minutos sob agitação e desaeração com N₂ gasoso, em seguida adicionou-se na seqüência 220 mg (214,45 g.mol⁻¹) de Mg(CH₃COO)₂·4H₂O, 170 mg de 1'10 fenantrolina (180,21 g.mol⁻¹), 238 mg (610,56 g.mol⁻¹) de Ácido Isovanílico e 200 µL de trietilamina, sempre sob agitação, desaeração e aquecimento de aproximadamente 100°C. Após o início de condensação do etanol foi marcado um tempo de 2 horas para que a reação ocorresse, encerrando-a em seguida. A mistura foi filtrada a aproximadamente 25°C. A solução remanescente foi rotaevaporada para a redução do volume a aproximadamente 5 mL, sendo em seguida adicionadas 10 mL de água gelada

e armazenada sob refrigeração por 3 dias. O precipitado amarelo formado foi filtrado e lavado com 20 mL de água gelada. O composto foi seco à vácuo e armazenado em um dessecador.

3.1.5 Caracterização dos complexos por Espectroscopia Vibracional na região do Infravermelho.

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos no estado sólido utilizando-se um espectrofotômetro Bomem-Michelson FT, modelo MB102 na região compreendida entre 4000 e 300 cm^{-1} . As amostras no estado sólido foram misturadas em Csl e mantidos em estufa a 120°C, na proporção 1/100 (amostra/Csl).

3.2 Ensaio microbiológicos *in vitro*.

3.2.1 Isolados utilizados da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri* nos experimentos antimicrobianos *in vitro*.

Para os experimentos microbiológicos *in vitro* e em plântulas de *Citrus sinensis*, utilizou-se 15 isolados da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri*, TABELA 3.1. Esses isolados foram fornecidos pela Fundecitrus de Araraquara sob supervisão do pesquisador Franklin Behlau.

TABELA 3. 1 - Isolados de bactérias fitopatogênica de *xanthomonas citri* ssp *citri* (causadora da doença do cancro cítrico) resistentes, tolerantes e sensíveis a produtos provenientes do cobre.

Isolado	Procedência/Origem	Data isolamento	Cu
1644	BELLA VISTA-CORRIENTES ARGENTINA	2003	Resistente
1645	TRES LAGUNA-FORMOSA ARGENTINA	08/11/2010	Resistente
1646	MONTE CASEROS-CORRIENTES ARGENTINA	25/07/2007	Resistente
1647	BELLA VISTA-CORRIENTES ARGENTINA	2003	Resistente
1648	SANTA ROSA-CORRIENTES ARGENTINA	01/10/2010	Resistente
1666	RONDON-PARANÁ	19/07/2011	Tolerante PR
1670	PARANÁ	20/09/2011	Tolerante PR
1705	PARANAÍ-PARANÁ	mai/13	Tolerante PR
1707	ALTO PARANÁ-PARANÁ	mai/13	Tolerante PR
1733	PARANÁ	31/01/2014	Tolerante PR
12	PARANAÍ-PARANÁ	1997	Sensível
75	CASA BRANCA-SP	1998	Sensível
316	PRESIDENTE PRUDENTE-SP	02/02/2002	Sensível
621	CHAPECÓ-SC	2001	Sensível
10	GUARARAPES-SP	jun/80	Sensível

3.2.2 Crescimento e manutenção dos isolados.

O crescimento dessa bactéria e sua manutenção para a promoção das atividades inibitórias foram feitas em meio de cultura Caldo Nutriente com ou sem ágar, dependendo da metodologia aplicada. A marca utilizada foi Kasvi, o qual possui na sua composição: 1,0 g.L⁻¹ de extrato de carne, 2,0 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 5,0 g.L⁻¹ de extrato de peptona e 5,0 g.L⁻¹ de cloreto de sódio. A dose utilizada foi 25 g.L⁻¹ e o pH aferido a 6.8. Os 15 isolados eram semeados a cada 72 horas para garantir que a bactéria estivesse em plena atividade metabólica.

3.2.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos em avaliação sobre a bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri*.

A CIM foi avaliada através do método de microdiluição em microplaca (NCCLS, 2003). A técnica do CIM foi realizada segundo a metodologia preconizada pelo “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS), atualmente denominado Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), com adaptações. Foram utilizadas microplacas para cultura celular com 96 orifícios estéreis. Utilizou-se um protocolo de diluição seriada iniciando-se em $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $0,195 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os ensaios antimicrobianos foram feitos em triplicata (n=3) com os 15 isolados da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri* da TABELA 3.1. Testou-se a atividade antimicrobiana com os 3 complexos; seus ligantes livres hesperidina, naringenina e ácido isovanílico; um controle positivo, streptomina, e o DMSO. Todos os testes realizados em triplicata.

Preparo da Solução Mãe (SM) que são as amostras a serem testadas:

As amostras preparadas foram: os complexos, os flavonóides e o fenol livres, todos chamamos de Solução Mãe (S.M). Pesou-se 1 mg de amostra que foi dissolvida em 125 μL de dimetilsulfóxido (DMSO), ficando essa solução com a concentração de $8.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Nesta acrescentou-se 500 μL de caldo nutriente, ajustando a concentração da solução para $1.600 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo esta classificada como Solução Mãe (SM).

Montagem da placa estéril de 96 orifícios e realização da diluição seriada:

Inicialmente preencheu-se os poços da placa estéril de 96 orifícios com caldo nutriente: 50 μL em todos os poços onde a SM seria testada; 59 μL em todos os poços onde testou-se o controle positivo (Streptomina); 80 μL em 3 poços para testar a viabilidade do inóculo; 90 μL em 3 poços para testar o controle de assepsia da SM ; 75 μL , 76 μL , 77 μL , 78 μL e 79 μL , em poços subseqüentes para testar a atividade antiséptica do DMSO. Após preenchimento da placa com o caldo, pipetou-se 50 μL da SM no primeiro poços onde as amostras seriam testadas, como a SM estava com $1.600 \mu\text{g.mL}^{-1}$, esta foi

ajustada a $800 \mu\text{g.mL}^{-1}$, ao ser colocada no poço que continha $50\mu\text{L}$ de caldo. Realizou-se uma diluição seriada do poço número 1 até o poço número 12, (FIGURA 3.2). O mesmo procedimento de diluição seriada foi feito para o controle positivo, porém pipetando no primeiro poço $59 \mu\text{L}$ de solução de streptomicina. Nos poços com caldo nutriente para o controle da SM pipetou-se $10 \mu\text{L}$ da mesma, para confirmar se não havia o crescimento de outros microrganismos. Nos poços onde continham caldo nutriente $75 \mu\text{L}$, $76 \mu\text{L}$, $77 \mu\text{L}$, $78 \mu\text{L}$ e $79 \mu\text{L}$, para o controle do DMSO, deste pipetou-se doses consecutivas de 5, 4, 3, 2 e $1 \mu\text{L}$. Depois desta etapa, completaram-se os poços testes da SM com $30 \mu\text{L}$ de caldo nutriente e os da streptomicina com $21 \mu\text{L}$ do caldo.

Preparo do inóculo:

O inóculo foi preparado a partir da suspensão de células de crescimento de 72 horas em solução salina 0,9% e a padronização foi feita através do Densimat®, um densitômetro que mede a densidade óptica de um inóculo microbiano. A leitura no Densimat® foi feita no comprimento de onda de 550 nm e a densidade óptica correspondente a 0,5 da escala McFarland é 1,2, que equivale a 10^8 UFC.mL^{-1} . Em seguida foram realizadas diluições para a concentração final de 10^5 UFC.mL^{-1} de onde destes 3 mL do inóculo em solução salina transferiu-se $500 \mu\text{L}$ para um tubo de $4,5 \text{ mL}$ de solução salina e deste tubo transferiu $2000 \mu\text{L}$ para um outro tubo contendo 10 mL de caldo de nutriente, ficando o inóculo com $5 \times 10^5 \text{ UFC}$.

Em seguida pipetou-se $20 \mu\text{L}$ do inóculo em cada poço com SM, streptomicina e naqueles de controle do teste de atividade do inóculo. A FIGURA 3.2 representa uma placa de 96 orifícios com um teste de CIM.

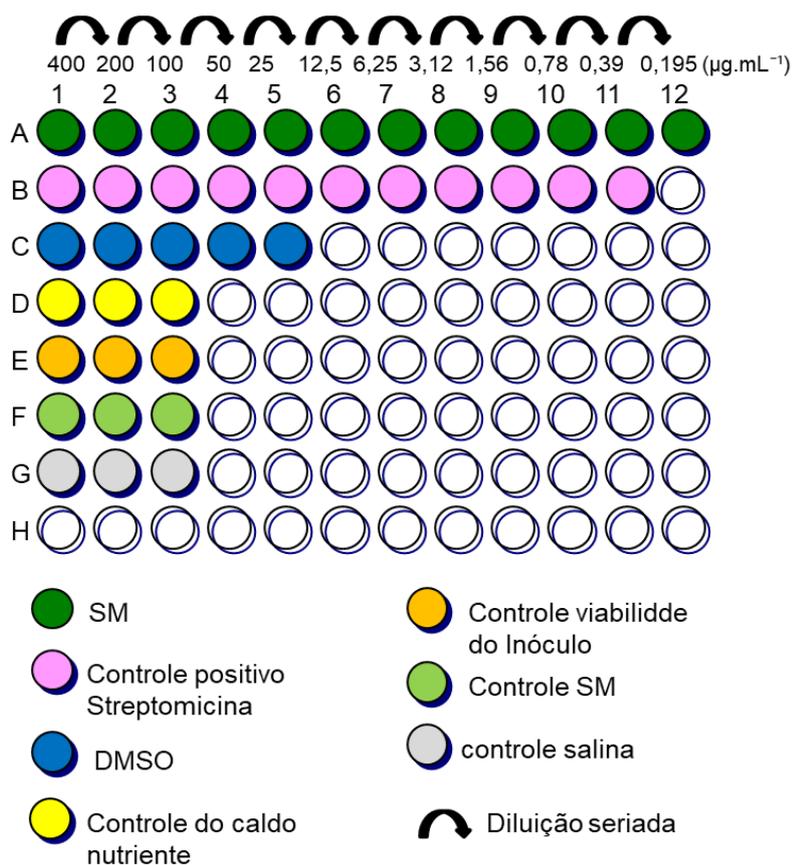


FIGURA 3. 2 - Ilustração de uma placa de 96 orifícios com um teste de CIM.

Após a realização da metodologia do CIM, as placas Elisa® foram guardadas em Câmara Incubadora BOD a temperatura de 28°C onde permaneceram por 72 horas.

Leitura da Concentração Inibitória Mínima das placas:

Após o período de incubação, a análise do CIM foi realizada pipetando-se em cada poço 30 µL de solução aquosa de resazurina (Sigma) 0,02% (m/v) (PALOMINO, et. al., 2002), como revelador do crescimento microbiano. A resazurina na presença de células bacterianas viáveis sofre uma reação de redução transformando-se em resofurina e mudando sua coloração de azul para rosa intenso.

Após adicionar a resazurina, as placas foram levadas à BOD novamente e, após 12 horas, realizou-se a leitura da CIM dos compostos frente à bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri*. Os poços que apresentaram coloração rosa foram os que ocorreram crescimento bacteriano e os que permaneceram em azul onde indica que houve inibição FIGURA 3.3.

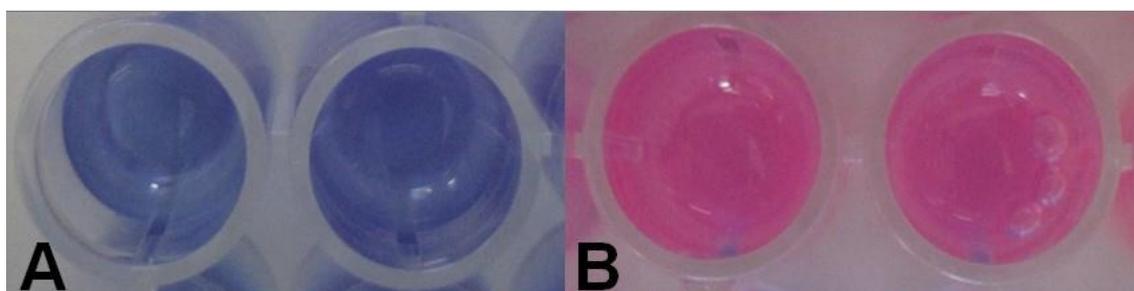


FIGURA 3. 3 - Revelação com resazurina da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos frente a bactéria em estudo. A = coloração azul, inibição bacteriana; B = coloração rosa, crescimento bacteriano. . Fonte: MOREIRA, 2011.

3.2.4 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) das amostras em teste sobre a bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri*.

Os ensaios de CBM foram feitos em triplicata com os mesmos isolados da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri* testados para a CIM. Os compostos testados também foram os mesmos, o controle positivo também foi o antibiótico streptomina.

Para realizar testes de CBM, primeiramente se faz os testes de CIM, pois os testes de CBM dos compostos dependem dos resultados da CIM, e alíquotas dos resultados da CIM são utilizados para os testes de CBM.

Portanto, primeiramente realizaram-se novamente os testes de CIM de cada complexo, dos flavonóides e fenol livres. Os testes de CIM foram feitos em

duas placas repetidas, pois em uma placa, chamada de placa 1, revelaria a CIM dos compostos com resazurina, e a outra placa, placa 2, igual, seria feita o teste de CBM, como mostra na FIGURA 3.4.

Após o tempo de incubação das placas, revelou-se a CIM dos compostos, com resazurina, da placa 1. Após o resultado da CIM dos compostos na placa 1 e sabendo-se que a placa 2 é igual à placa 1, isto é, apresenta o mesmo resultado de CIM, retirou-se uma alíquota de 50 μL de cada poço da placa 2 onde houve inibição bacteriana correspondente à placa 1 e transferiu para um tubo de ensaio contendo apenas o meio de cultura de crescimento caldo nutriente da marca Kasvi. Marcaram-se estes tubos com a CIM correspondente de cada poço onde foi retirada a alíquota. Todos os tubos, foram levados para uma B.O.D e ficaram por 48 horas sob agitação de 90 rpm. Após esse período, retirou-se uma alíquota de 10 μL de cada meio de crescimento, destes tubos de ensaio, semeando-as em placa de petri com meio de crescimento microbiano Agar Nutriente e marcadas com a CIM correspondente de cada tubo como mostra a FIGURA 3.4.

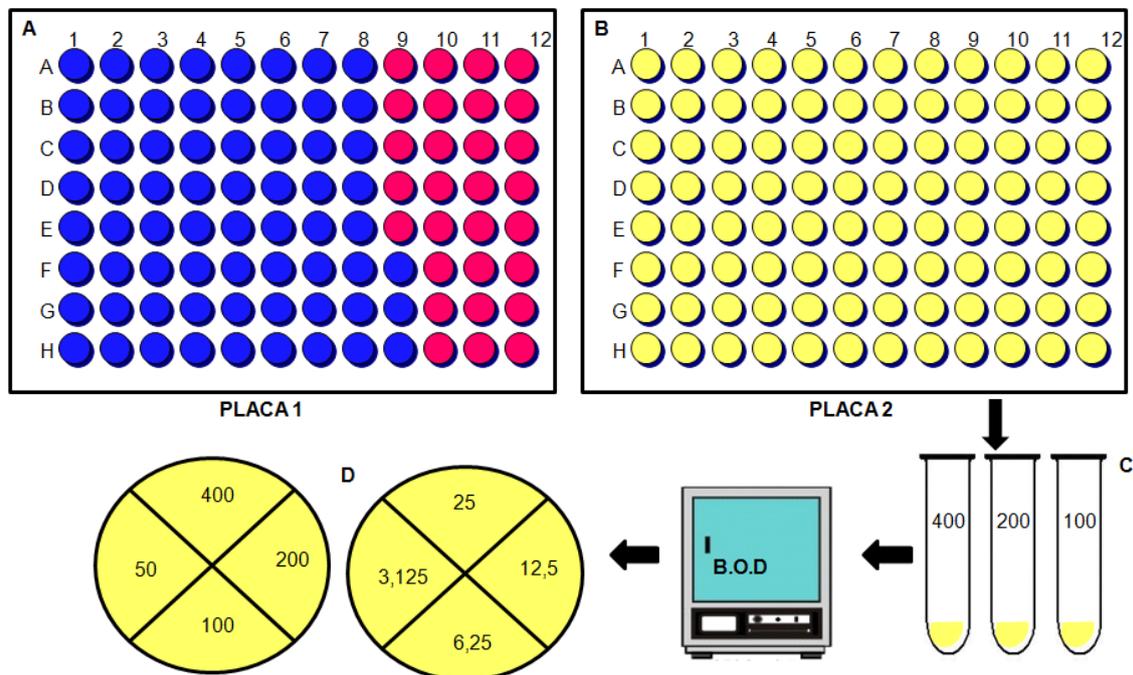


FIGURA 3. 4 - Determinação CIMB. A, placa 1, que revelou a CIM dos compostos por resazurina; B, placa de CIM igual a placa 1, porém sem resazurina; C, resultados das CIMs da placa 2 levados para tubos contendo caldo nutriente

estéril; D, após incubação de 48 hrs, solução do tubos foram semeados em placa.

As placas de petri foram levadas à B.O.D em temperatura de 28 °C e após um período de 72 horas avaliou-se os resultados identificando em quais concentrações houve crescimento bacteriano.

Sendo os experimentos com o biofilme laboriosos, estes foram feitos apenas com os complexos, e com 5 isolados da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri*. Os parâmetros de escolha foram as cepas de *X. citri* isoladas de diferentes regiões citrícolas e os resultados da CIM e da CBM dos compostos testados *in vitro*, portanto escolheu-se: 2 isolados resistentes aos fungicidas derivados de cobre, de cultura de citros da região da Argentina próximos ao Brasil; 1 isolado tolerante aos fungicidas derivados de cobre do citros da região do Paraná; 1 isolado de citros do estado de São Paulo, suscetível ao cobre e 1 isolado de citros do estado de Santa Catarina também suscetível ao cobre.

3.2.5 Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIM).

Por ser uma metodologia muito elaborosa e sabendo-se através dos resultados da CIM realizados anteriormente que todos os 15 isolados de *X. citri* obtiveram resultados iguais, escolheu-se 5 isolados, usando como parâmetro a resistência e tolerância aos fungicidas a base de cobre e as regiões onde foram isoladas as bactérias. Assim escolheram-se os isolados 1644, 1645, 1670, 621 e 75, como mostra a TABELA 3.1.

Os testes de CIMB₅₀ foram realizados com os 3 complexos e o controle positivo e em triplicata.

Para realização dos testes de CIMB, primeiramente realizou-se a padronização de formação do biofilme da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri*, verificando o melhor tempo de incubação e a melhor concentração do inóculo que irá formar uma maior massa de biofilme.

O ensaio adaptado de SANDBERG et al., 2008, propõe a formação do biofilme em placas de microdiluição esterilizadas de fundo chato, com 96 poços.

De acordo com as literaturas MENDES et al, 2010; LI e WANG, et al, 2014; ZIMARO, et al, 2014; SILVA et al, 2013; GRANATO, 2016, OLIVEIRA et al, 2016,

testes com biofilme da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri*, foram feitos utilizando concentrações bacterianas entre 10^8 , 10^7 e 10^6 UFC.mL⁻¹ e Densidade Óptica (D.O) em comprimento de onda entre 590 e 600 nm. Portanto, testou-se para a padronização, concentrações do inoculo de 10^8 , 10^7 e 10^6 em tempos de 24h, 36h, 48h, 60h, 72h, e 96h e a leitura da D.O em 595 nm.

Inicialmente preparou-se com 5 mL de meio de crescimento caldo nutriente da marca Kasvi, um inóculo bacteriano da *X. citri* de concentração 10^9 UFC.mL⁻¹ com colônias de 72 horas de incubação. A partir dessa concentração foi feita uma diluição seriada até 10^6 UFC.mL⁻¹, como mostra na FIGURA 3.6. Três alíquotas de 200 µL de cada concentração, foram transferidas em placa estéril de 96 orifícios, também pipetou 200 µL apenas do caldo nutriente estéril nos poços, FIGURA 3.5. Isto foi feito para os 5 isolados de *X. citri* e para os 6 tempos de crescimento do biofilme, que serão monitorados.

Após este procedimento, as placas foram incubadas em B.O.D e o crescimento do biofilme foi avaliado nos tempos de incubação de 24h, 36h, 48h, 60h, 72h, e 96h por absorvância através da sua densidade óptica onde a leitura foi feita em espectrofotômetro com leitor de microplaca da marca ASYS UVM 350.

O biofilme se estabelece no fundo do poço da placa de 96 orifícios, portanto, para a fixação e resuspensão desse biofilme e assim quantificá-lo por D.O foi adotado o método proposto por SANDBERG et al., 2008, com algumas modificações. Primeiramente aspirou-se, com o auxílio de uma pipeta, o excesso do caldo de crescimento nos poços das placas que estavam incubadas, deixou-as secarem e pipetou 150 µL de metanol, deixando em repouso por 20 min, em seguida retirou-se o metanol e adicionou-se 150 µL de cristal violeta (0,2% álcool etílico) esperando novamente por 20 min, finalmente o cristal violeta foi retirado e a placa lavada em água ultrapura. Após a secagem da placa, adicionou-se 200 µL de Ácido acético deixando por alguns minutos para a dissolução do biofilme e em seguida realizou-se a leitura no espectrofotômetro. A FIGURA 3.6 demonstra como foi feita a quantificação do biofilme por D.O. A placa A representa uma placa que foi incubada com os 5 inóculos da bactéria *X. citri* e em 3 diferentes concentrações (10^8 , 10^7 e 10^6) e também com o controle que seria apenas o caldo nutriente estéril; foi feita uma placa para cada tempo de incubação(24h, 36h, 48h, 60h, 72h, e 96h). A placa B seria a mesma placa,

porém já com o biofilme ressuspensionado para em seguida ser levado ao espectrofotômetro o qual a marca e modelo estão descrito na FIGURA 3.5.

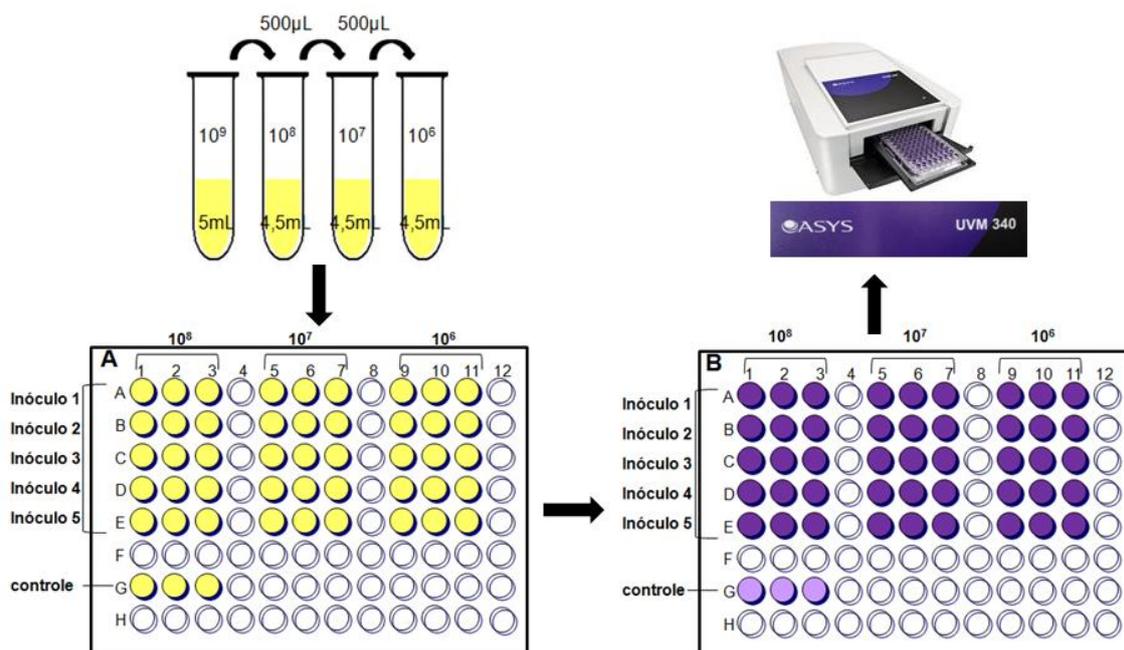


FIGURA 3. 5 - Formação do biofilme na placa. A, placa com o meio de crescimento contendo o inóculo e controle; B, placa com ácido acético para realização da leitura em espectrofotômetro do biofilme.

Após a escolha do tempo de crescimento e concentração do inóculo bacteriano que formaram melhor biofilme, iniciaram-se os testes de CIMB₅₀ dos complexos e seus ligantes livres, frente aos 5 isolados bacterianos de *X. citri*. Os testes de CIMB₅₀ iniciaram-se com o mesmo método da CIM dos compostos testados, metodologia descrita no Item 3.3.3, porém com apenas dois diferenciais: a concentração do inóculo bacteriano, que foi de 10^8 UFC.mL⁻¹ (formação do biofilme) e a não efetivação da revelação da CIM dos compostos nas placas por resazurina.

Esta metodologia feita em duplicata, em uma placa, avaliou-se a atividade antibiofilme por Densidade Óptica em espectrofotômetro e, a outra placa, igual, determinou-se a atividade antibiofilme através da contagem de colônias bacterianas presentes no biofilme formado, metodologias propostas por WEI et al., 2006, com adaptações.

Após o tempo de incubação das duas placas de 96 orifícios, estas foram retiradas da B.O.D e todo o meio de crescimento dos poços das placas foram

aspirados com o auxílio de uma pipeta, ficando apenas o biofilme fixado no fundo da placa, caso houvesse a formação deste.

Em uma placa, realizou-se o procedimento de fixação do biofilme descrito na página anterior e na FIGURA 3.5, e em seguida levadas para o espectrofotômetro, marca e modelo descritos também na FIGURA 3.5, para determinação da concentração do biofilme por absorbância.

Na segunda placa avaliou-se a inibição do biofilme por contagem de colônias bacterianas presentes através do seguinte procedimento:

Após a retirada dos sobrenadantes de todos os poços das placas incubadas, com o auxílio de uma pipeta, o biofilme no fundo dos poços das placas foram resuspendidas com 150 μL de caldo nutriente estéril e levadas para sonicação por 15 min. Uma segunda placa estéril com 96 orifícios foi preenchida com 180 μL de caldo nutriente estéril da marca Kasvi.

Após ressuspensão do biofilme, por sonicação, fez-se uma diluição seriada de cada biofilme diluído utilizando outra placa estéril de 96 orifícios preenchida com 180 μL de caldo nutriente estéril, utilizou-se uma placa para cada inoculo bacteriano. Com o auxílio de uma pipeta, transferiu-se uma alíquota 20 μL do biofilme diluído para a outra placa estéril nos poços da fileira A1 à A12 ficando os poços de A1 à A12 com 200 μL e a partir daí fez-se a diluição seriada de 20 μL de cada poço de 200 μL iniciando-se em 10^{-1} até 10^{-8} , como mostra na FIGURA 3.6.

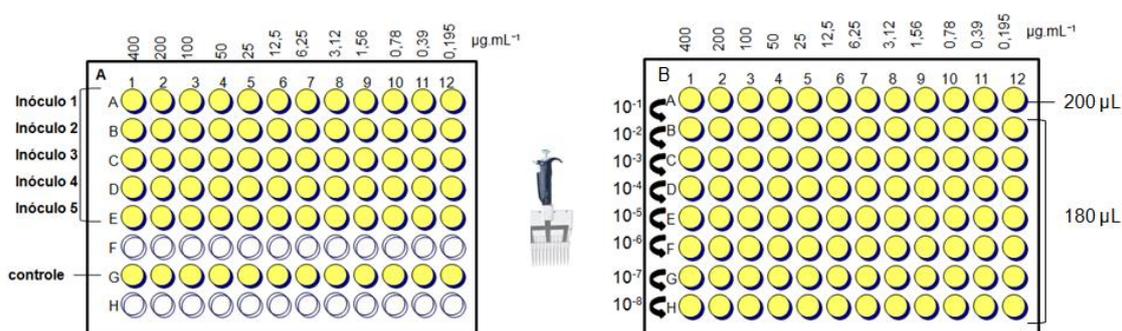


FIGURA 3. 6 - Ilustração dos testes de CIMB50 por contagem de UFC.mL⁻¹. A, placa com os 5 isolados de *X. citri* testados com cada complexo, utilizou-se uma placa a para cada complexo testado e o controle positivo; B, placa onde realizou-se a diluição seriada, cada placa B corresponde a um inoculo e um composto testado.

Após a diluição seriada, inoculou-se 50 µL de cada poço da placa B da FIGURA 3.6 em placa de petri contendo o meio Nutriente Agar. As placas foram incubadas por 72 horas e em seguida feita a contagem de colônias de cada diluição seriada.

3.3 Produções de plântulas de citros *in vitro*.

A formação das plântulas de citros foi feita via semente. As sementes foram doadas pelo Centro de Citricultura Silvio Moreia - IAC – Cordeirópolis.

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto.

Sementes de frutos maduros de laranja 'Pêra' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) foram deixados em solução de hipoclorito de sódio 0,5% por aproximadamente 2 horas. Após este tempo, seus tegumentos foram retirados e as sementes foram desinfetadas novamente em solução de hipoclorito de sódio 0,5% durante 20 minutos sob agitação. Em seguida, estas sementes foram lavadas três vezes em água autoclavada.

Após a desinfecção das sementes, estas foram inoculadas em cubetas de vidro, capacidade 30mL, com 15 mL de meio de cultura MS basal, suplementado com 25 g. L⁻¹ de sacarose e Phytigel 2,5 g.L⁻¹, de acordo com protocolo de MURASHIGE; SKOOG, 1962.

Em seguida, as cubetas contendo as sementes inoculadas, foram levadas para câmara de crescimento da marca Jeio Tech, modelo GC-300THL com umidade de 80%, temperatura 28°C e na ausência de luz por, 3 semanas. Após este período, onde as sementes já se encontravam em estágio de germinação, estas foram levadas para sala com fotoperíodo com 16 hrs de luz e 8 hrs no escuro, temperatura de aproximadamente 25°C com 60% de umidade. Com o desenvolvimento das plântulas, estas foram transferidas para vidros maiores, FIGURA 3.7.

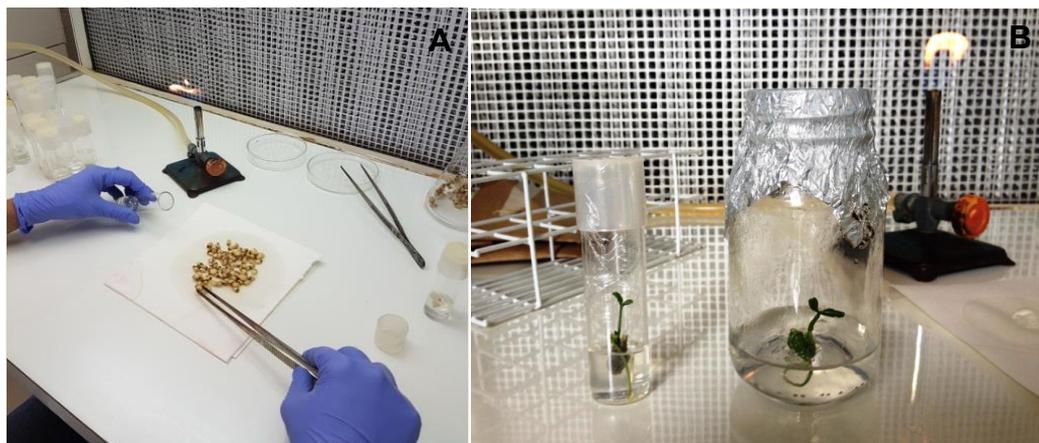


FIGURA 3. 7 - Demonstração da produção de plântulas de citros *in vitro*. A) inoculação das sementes em meio MS; B) transferência das plântulas com 60 dias de crescimento para frascos maiores.

3.3.1 Identificação do mecanismo sistêmico do Complexo Hesperidina nas plântulas de citros.

Após a formação das plântulas, estas foram submetidas a tratamento sistêmico (via raiz) e translaminar com o complexo hesperida. Primeiramente preparou-se o meio MS suplementado com 25 g.L⁻¹ de sacarose, mas sem ágar. Após autoclavagem e resfriamento deste meio, foi preparado uma solução de 0,3 mg.mL⁻¹ do complexo hesperidina em meio de cultivo, sendo as plântulas testadas transferidas para esse meio. Após 72 h, essas plântulas foram retiradas do complexo / meio e preparadas para visualização das suas folhas e caule-raiz (nesta fase os tecidos vegetais não se diferem entre caule e raiz) em um microscópio da marca Leica, modelo DM 5000B com Câmera de Fluorescência DFC340 FX. A fixação do material vegetal foi feita com o material fresco, isto é, cortes verticais translúcidos (cortes extremamente finos) de folhas e caules colocados em lâmina e lamínula para visualização, como mostra a FIGURA 3.8.

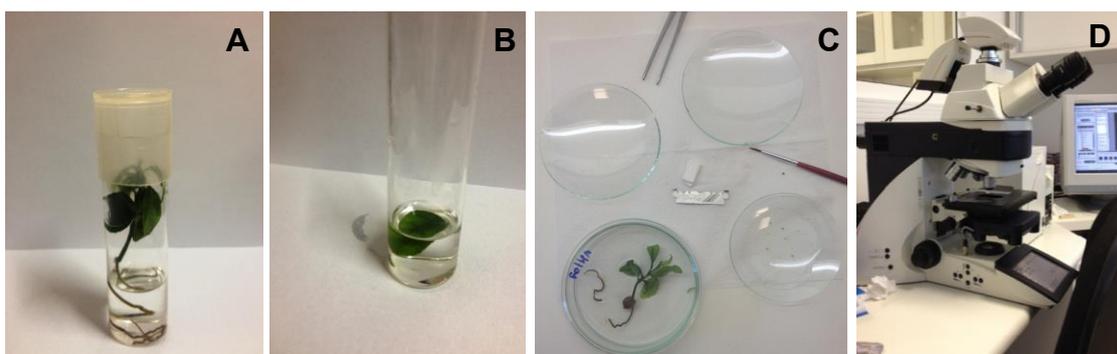


FIGURA 3. 8 - Preparo das amostras de folhas e caule-raiz das plântulas tratadas com o complexo hesperidina para visualização em microscópica de epifluorescência. A) plântula tratada com o meio/complexo via ação sistêmica; B) folha tratada via ação translaminar ; C) cortes verticais realizados na folha e caule; D), visualização em microscópio epifluorescência.

3.3.2 Ensaio antimicrobianos com os complexos nas plântulas de citros infectadas com a bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri*.

Os ensaios antimicrobianos foram realizados com 3 diferentes tratamentos. Primeiro realizou-se um experimento com tratamento preventivo sistêmico com três doses diferentes dos complexos, após a finalização deste, iniciou-se um segundo experimento com tratamento curativo sistêmico com três doses diferentes dos complexos e por último, um terceiro experimento curativo sistêmico com a melhor dose dos complexos.

A avaliação do efeito antimicrobiano dos complexos frente à bactéria *X. citri* nas plântulas foi realizada por contagem de lesões, isto é, sintomas nas folhas e hastes e contagem de colônias do inóculo bacteriano extraído dos sintomas da doença.

Para este estudo, escolheu-se a bactéria *X. citri* isolado 1645 por ser resistente aos produtos derivados de cobre e por ser o isolado mais novo comparado às outras cepas. Os testes foram realizados em triplicata.

3.3.3 Infecção artificial das plântulas de citros sadias com a bactéria *X. citri*.

Foram infectadas 60 plântulas sadias artificialmente com a bactéria *X. citri*. Antes de iniciar o experimento, realizaram-se testes infectando plântulas sadias, artificialmente, imergindo-as em soluções com inoculo bacteriano de *X. citri* e monitorando o tempo de aparecimento dos sintomas da doença.

Inicialmente preparou-se 10 mL de inoculo bacteriano em caldo nutriente da marca Kasvia através de uma cultura pura de *X. citri* ssp. *citri*, isolado 1645, semeada em meio de cultura nutriente ágar por 72 horas a 28 °C. O inoculo bacteriano foi ajustando a 10^9 UFC.mL⁻¹ através do espectrofotômetro marca ÚNICO, modelo UV 2150 com comprimento de onda de 595 nm, e Densidade Óptica = 1,0, em seguida esta solução bacteriana foi deixada overnight sob agitação de 90 rpm. Após este período, diluiu-se esses 10 mL em 90 mL de água autoclavada, ficando a suspensão bacteriana com 10^8 UFC.mL⁻¹. Em seguida, as plântulas sadias foram mergulhadas nesta solução bacteriana por 30 segundos, permitindo que a bactéria entrasse nas plantas através dos estômatos, como mostra a FIGURA 3.9. Após serem contaminadas pela bactéria, as plântulas foram levadas de volta para sala de crescimento com fotoperíodo, onde permaneceu por 15 dias, período onde se podem observar os sintomas da doença através dos cancrios formados nas folhas e hastes das plantas. Para confirmação da quantidade do inoculo bacteriano por UFC.mL⁻¹ utilizada para a contaminação das plântulas, retirou-se uma alíquota de 1 mL da solução bacteriana preparada de 10^8 fazendo uma diluição seriada de 10^8 à 10^1 UFC em tampão fosfato (0,075 M, pH7,0) em eppendorfs. Retiraram-se quatro alíquotas de 10 µL cada, por eppendorf, pipetando em placa de petri contendo meio ágar nutriente, como mostra na FIGURA 3.9.

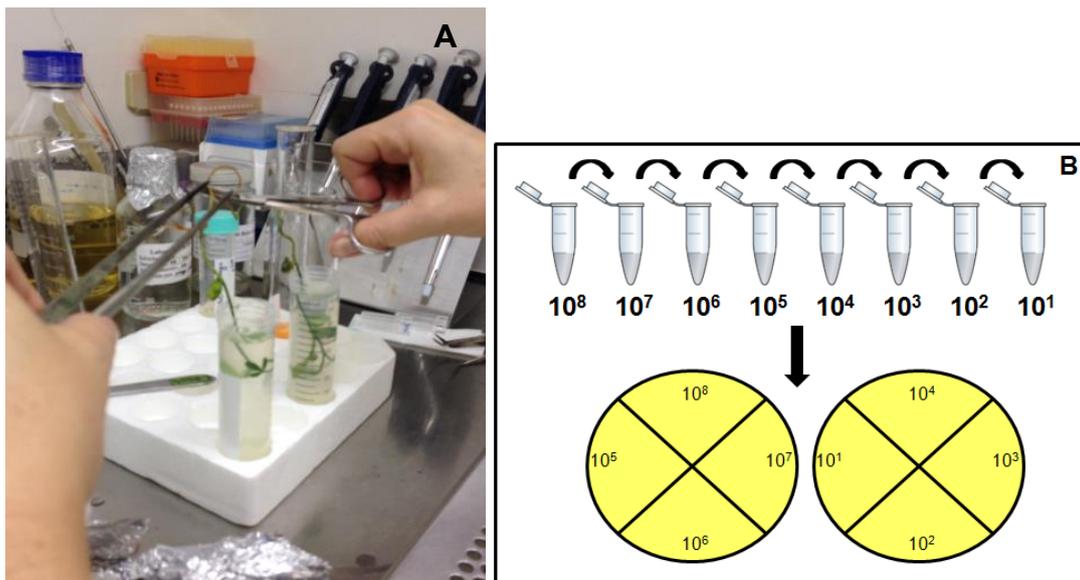


FIGURA 3. 9 - A) Contaminação por imersão; B) diluição seriada e cultivo de cada concentração em placa em meio nutriente agar.

3.3.4 Tratamento preventivo sistêmico, com 3 doses dos complexos.

O tratamento preventivo sistêmico consistiu em tratar as plântulas com os complexos antes da sua infestação pela bactéria *X. citri*, aplicando os complexos e o tratamento positivo, no caso o hidróxido de cobre, no meio de crescimento das plântulas, e estas absorvendo estes compostos via raiz.

66 plântulas sadias de *Citrus sinenses* variedade Carrizo, com 90 dias de crescimento em sala com fotoperíodo, foram utilizadas neste experimento.

O tratamento foi realizado com 6 repetições: 54 plantulas com 3 doses dos 3 complexos; 6 plantulas com tratamento positivo, neste caso o hidróxido de cobre; e 6 plantulas como testemunha, planta infectada com a bactéria porém sem tratamento.

Primeiramente preparou-se o meio MS suplementado com 25 g.L^{-1} de sacarose, sem ágar. Após autoclavagem e resfriamento do meio, preparou-se soluções de concentrações $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ dos complexos e o meio.

54 plântulas sadias foram transferidas para tubos de ensaio 25x20mm contendo 10 mL das soluções preparadas com o meio contendo os complexos nas 3 doses diferentes, 6 plântulas com o meio de cultura e cobre e 6 plântulas apenas com o meio de cultura MS. Em seguida todas essas plântulas foram retornadas à sala de crescimento com foto período. Após 72 horas estas plantas foram infectadas com a bactéria, como mostra no item 3.6.1, e retornadas ao tubo com meio e complexo, FIGURA 3.10.

As plântulas foram avaliadas 15 dias após sua contaminação com a bactéria. A forma de avaliação foi através da contagem de cancrios formado, isto é, através dos sintomas da doença.



FIGURA 3. 10 - Plântulas de citros tratadas com os complexos absorvidos pela raiz.

3.3.5 Tratamento curativo sistêmico com três doses diferentes dos complexos.

O tratamento curativo sistêmico consistiu em tratar as plântulas com os complexos e o tratamento positivo, neste caso o hidróxido de cobre, depois da infestação das plântulas pela bactéria *X. citri*, aplicando os complexos e o tratamento positivo, no meio de crescimento das plântulas, e estas absorvendo estes compostos via raiz.

Primeiramente, 66 plântulas sadias foram infectadas com a bactéria, como mostra a FIGURA 3.9.

Após 15 dias, com o aparecimento dos sintomas, iniciou-se o tratamento das plantas doentes com os complexos e o sulfato de cobre.

Antes do tratamento, preparou-se o meio MS suplementado com 25 g.L⁻¹ de sacarose, sem ágar. Após autoclavagem e resfriamento do meio, preparou-se soluções de concentrações 0,1 mg.mL⁻¹, 0,2 mg.mL⁻¹ e 0,3 mg.mL⁻¹ dos complexos e o meio de crescimento.

As 66 plântulas com sintomas do cancro cítrico foram transferidas para tubos de ensaio de 25 mL x 20mm, 55 plântulas para os tubos contendo 10 mL das soluções preparadas com o meio de crescimento e os complexos, nas 3 doses diferentes; 6 plântulas transferidas para os tubos contendo sulfato de cobre e meio de crescimento e 6 plântulas transferidas em tubos apenas com o meio de cultura MS. Em seguida todas as plântulas foram retornadas à sala de crescimento com fotoperíodo.

As plântulas foram avaliadas com 15, 26 e 40 dias após os tratamentos. . A forma de avaliação foi através da contagem de cancros formado, isto é, através dos sintomas da doença.

3.3.6 Tratamento curativo sistêmico com a dose de melhor atividade dos complexos.

A avaliação da atividade antimicrobiana dos complexos, deste tratamento, foi realizada não só através da contagem de cancos formados nas plântulas doentes, mas também pelo número de colônias bacterianas isoladas dos sintomas das folhas.

Foram feitos tratamento em triplicata. 30 plantulas sadias foram infectadas com a bactéria *X. citri*, por imersão em solução contendo o inóculo, FIGURA 3.9.

Após 15 dias, com o aparecimento dos sintomas, as 30 plântulas foram transferidas para tubos de ensaio de 25 mL x 20mm: 18 plântulas para os tubos contendo 10 mL das soluções preparadas com o meio de crescimento e os complexos, 6 plântulas para cada complexos; 6 plântulas transferidas para os tubos contendo sulfato de cobre e meio de crescimento e 6 plântulas transferidas em tubos apenas com o meio de cultura MS. Em seguida todas as plântulas foram retornadas à sala de crescimento com fotoperíodo.

Após 7 dias, realizou-se a primeira avaliação da atividade de inibição dos complexos frente à bactéria *X. citri*.

Das 18 plantas tratadas com os 3 complexos, 9 foram avaliadas através da contagem de cancos formados nas folhas e hastes das plântulas e 9 plântulas foram avaliadas por contagem de colônias bacterianas dos cancos isolado em meio de crescimento nutriente ágar.

A contagem das colônias bacterianas foi feita retirando de cada plântula em experimento, um cancro antes e depois dos tratamentos, para saber se houve diminuição da quantidade de colônias bacterianas. A bactéria foi isolada da seguinte forma:

Retirou-se um cancro de cada planta do experimento, aproximadamente do mesmo tamanho, e colocou-os em eppendorfs marcados contendo tampão fosfato (0,075 M, pH7,0). Os eppendorfs foram vortexados e feita uma diluição seriada de cada um, de 10^{-1} à 10^{-8} . Cada diluição foi semeada em meio de cultura nutriente ágar, e a contagem de colônias bacterianas feitas após 72 horas de incubação. O isolamento das colônias bacterianas das plântulas foi feito 14 dias após a contaminação artificial das plântulas pela bactéria, porém ainda sem

tratamento; 21 dias após contaminação com a bactéria e 7 dias de tratamento e 28 dias após a contaminação com a bactéria e 14 dias após tratamento com os complexos.

3.3.7 Análise quantitativa do consumo dos complexos acrescentados no meio de crescimento das plântulas.

Avaliou-se a absorção dos complexos Naringenina (Mg), Hesperidina (Mg) e Ácido Isovanílico (Mg), acrescentados no meio de crescimento MS das plântulas de citros *in vitro* infectadas com a bactéria *X. citri*.

9 plântulas sadias de *Citrus sinensis* variedade Pêra, foram infectadas artificialmente com a bactéria *X. citri*. Após um período de 10 dias, tempo de manifestação da doença, essas plântulas foram inseridas em tubos de ensaio 25x20mm contendo meio de crescimento MS acrescentado com os complexos citados acima, individualmente, cada um na concentração de 0,3 mg.mL⁻¹, portanto, 3 plântulas doentes para cada complexo em teste. O mesmo foi feito para 9 plântulas sadias, isto é, estas foram inseridas em meio de crescimento MS acrescentado com os complexos, a diferença é que com ausência da bactéria *X. citri*. Também separaram-se 9 tubos de ensaios, contendo apenas o meio de crescimento MS e os complexos, sem plântulas, em triplicata, para avaliar se houve ou não degradação dos complexos no meio de crescimento MS.

Após o período de 7 dias, todos os meios de crescimento MS contendo os complexos foram quantificados em HPLC – UV 1260 da Agilent.

3.3.8 Preparo das soluções padrão para construção da curva analítica.

Os padrões utilizados para construção da curva analítica foram os complexos Hesperidina (Mg), Naringenina (Mg) e Ác. Isovanílico (Mg).

Pesou-se 1 mg de cada padrão que foi dissolvido em 1 mL de MeOH grau HPLC, ficando cada padrão com uma concentração nominal de 1mg.mL^{-1} ou $1000\ \mu\text{g.mL}^{-1}$.

De cada padrão, partindo de $1000\ \mu\text{g.mL}^{-1}$, preparou-se soluções estoques de $100\ \mu\text{g.mL}^{-1}$, $80\ \mu\text{g.mL}^{-1}$, $60\ \mu\text{g.mL}^{-1}$, $40\ \mu\text{g.mL}^{-1}$, $20\ \mu\text{g.mL}^{-1}$, $10\ \mu\text{g.mL}^{-1}$, $5\ \mu\text{g.mL}^{-1}$, $2,5\ \mu\text{g.mL}^{-1}$, para a construção da curva analítica de calibração por padronização externa. Todas as soluções estoques foram feitas em triplicata.

Após o preparo de todas as soluções estoques, estas foram injetadas em um HPLC - UV 1260 marca Agilent.

As condições cromatográficas para quantificação das soluções estoques foram: fluxo = $1\ \text{mL.mim}^{-1}$; comprimento de onda = 285 nm; volume de injeção = $20\ \mu\text{L}$; Coluna C18, $4,6 \times 150\ \text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$, Phenomenex e gradiente de eluição com fase aquosa e orgânica. Para os complexos Hesperidina (Mg) e Naringenina (Mg) a porcentagens da fase orgânica e aquosa estão apresentadas na TABELA 3.2, sendo A = água ultra pura, B = acetonitrila e C = MeOH .

Para o complexo Ác. Isovanílico (Mg) a porcentagem de gradiente de eluição da fase aquosa e orgânica estão na TABELA 3.3.

TABELA 3. 2 - Gradiente de eluição para quantificação dos complexos hesperidina (mg) e naringenina (mg) em HPLC-UV.

Tempo (min)	% A	% B	% C
0	72	10	18
15	50	20	30
17	0	50	50
22	0	50	50
25	72	10	18
40	72	10	18

A = Fase aquosa; B = Acetonitrila; C = Metanol.

TABELA 3. 3 - Gradiente de eluição para quantificação do complexo ác. isovanílico (mg) em HPLC-UV.

Tempo (min)	% A	% B	% C
0	80	0	20
5	80	0	20
22	0	0	100
25	0	0	100
28	80	0	20
30	80	0	20

A = Fase aquosa; B = Acetonitrila; C = Metanol.

3.3.9 Preparo das amostras a serem quantificadas.

Todas as amostras (os meios de crescimento contendo os complexos) foram secos em capela de exaustão. Após a evaporação de todo meio líquido, as amostras foram dissolvidas em MeOH ultra puro. Como todas as amostras foram preparadas com 3 mg de complexo em 10 mL de meio MS por tubo de ensaio ($0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$), após evaporação da fase líquida, dissolveu-se a amostra seca em 3 mL de MeOH grau HPLC, ficando a amostra com 1 mg.mL^{-1} ou $1000 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$.

A concentração do meio que tratou as plântulas foi de 3 mg do complexo em 10 mL do meio, com a evaporação da fase líquida, preparou-se amostras de 1 mg.mL^{-1} , dissolvendo 3mg do complexo (concentração de partida) em 3 mL de Metanol grau HPLC.

A construção da curva analítica iniciou com a maior concentração em $100 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$, portanto, a concentração inicial nominal da amostra foi de $80 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$. Partindo da concentração preparada de $1000 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$, preparou-se concentrações de $80 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ e em seguida estas amostras foram injetadas no HPLC-UV 1260.

4. Resultados e Discussões.

4.1 Obtenção dos complexos hesperidina, naringenina e ácido isovanílico e caracterizações por espectro de Infravermelho.

O complexo hesperidina foi obtido seguindo o procedimento em materiais e métodos e mostrado resumidamente na FIGURA 4.1. Para a síntese dos complexos naringenina e ácido isovanílico seguiu-se o mesmo procedimento, porém, os ligantes da reação manteve uma estequiometria de duas moléculas de Naringenina e uma molécula do Ácido Isovanílico para cada átomo de magnésio e fenantrolina.

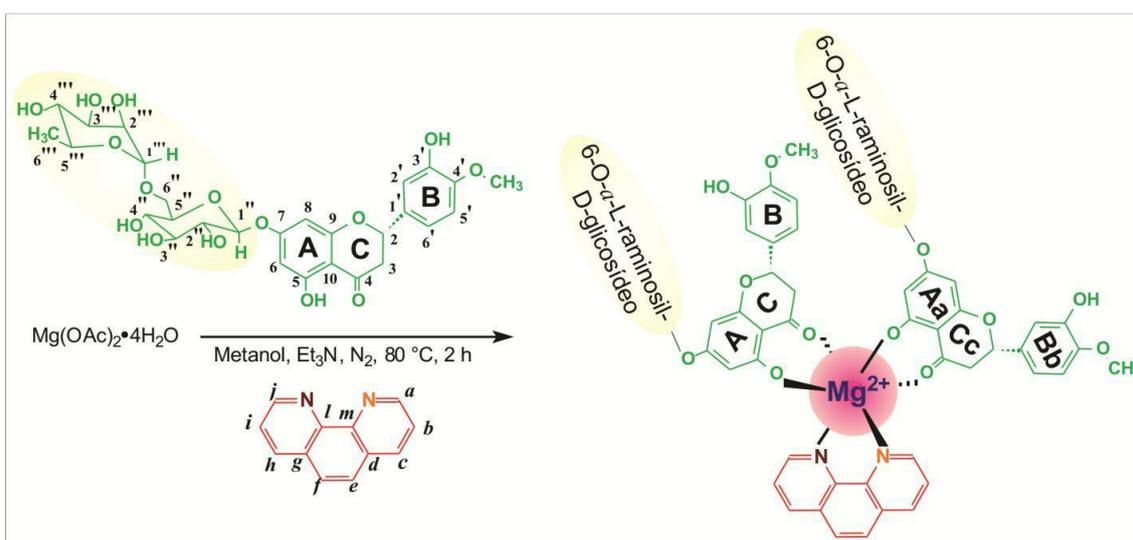


FIGURA 4. 1 - Via da síntese para a obtenção do complexo hesperidina. Fonte: OLIVEIRA, 2012.

Na caracterização do complexo hesperidina, já realizado anteriormente por OLIVEIRA, 2012, os espectros do ligante hesperidina e do complexo hesperidina, estão apresentados na FIGURA 4.2 e as atribuições para os principais modos vibracionais estão na TABELA 4.1.

A principal característica da complexação é o espectro vibracional do complexo hesperidina no pico da carbonila, que na hesperidina livre aparece em 1647 cm^{-1} , foi deslocado para menores frequências, aparecendo em 1606 cm^{-1} . Este deslocamento confirma que o grupo C=O perde suas características originais ao formar ligação coordenada com o metal segundo ZENG et al., 2003. Esta observação também é confirmada pela presença da banda larga $\nu(\text{Mg-O})$ em aproximadamente 573 cm^{-1} , segundo TAN et al., 2009, FIGURA 4.2.

Além disso, a fenantrolina coordenada exibe deslocamento de alguns modos vibracionais para maiores frequências em comparação ao ligante livre. Por exemplo, o modo vibracional do estiramento simétrico CC e CN, que na fenantrolina livre aparece em 1503 cm^{-1} foi deslocado para regiões de maior número de onda 1516 cm^{-1} , típico para o quelante fenantrolina localizado na esfera de coordenação interna do íon Mg^{2+} , segundo DIRNITROV e NEYKOV, 2007, indicando que a coordenação ao centro metálico levou a um fortalecimento dessas ligações. A complexação da fenantrolina também levou a deslocamentos de algumas vibrações para frequências mais baixas, como por exemplo as vibrações assimétricas CC e CN, que na fenantrolina livre aparece em 1419 cm^{-1} foi deslocado para 1400 cm^{-1} , assim como as deformações CH de aromáticos.

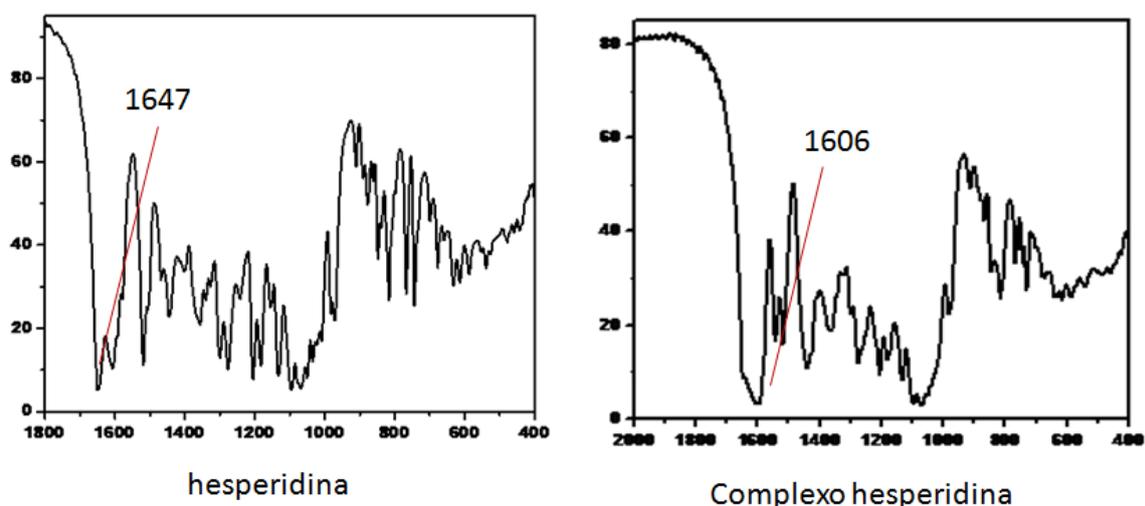


FIGURA 4. 2 - Espectro vibracional na região do infravermelho dos ligantes: hesperidina e complexo hesperidina.

Já realizado anteriormente por OLIVEIRA, 2012, a caracterização para confirmação do sucesso da síntese do complexo naringenina foi feita por meio da análise dos espectros de infravermelho (IV).

No complexo naringenina, também foi verificado o deslocamento do pico da carbonila para regiões de menor frequência, em 1606, comparação aos seus respectivos flavonóides livres. Este deslocamento confirma que o grupo C=O perde suas características originais ao formar ligação coordenada com o metal segundo ZENG et al., 2003. Esta observação também é confirmada pela presença da banda larga $\nu(\text{Mg-O})$ em aproximadamente 554 cm^{-1} , segundo TAN et al., 2009.

Além disso, a fenantrolina coordenada exibe deslocamento de alguns modos vibracionais para maiores frequências em comparação ao ligante livre. Por exemplo, o modo vibracional do estiramento simétrico CC e CN, que na fenantrolina livre aparece em 1503 cm^{-1} foi deslocado para regiões de maior número de onda 1516 cm^{-1} , típico para o quelante fenantrolina localizado na esfera de coordenação interna do íon Mg^{2+} , segundo DIRNITROV e NEYKOV, 2007, indicando que a coordenação ao centro metálico levou a um fortalecimento dessas ligações. A complexação da fenantrolina também levou a deslocamentos de algumas vibrações para frequências mais baixas, como por exemplo as

vibrações assimétricas CC e CN, que na fenantrolina livre aparece em 1419 cm^{-1} foi deslocado para 1400 cm^{-1} , assim como as deformações CH de aromáticos, FIGURA 4.3.

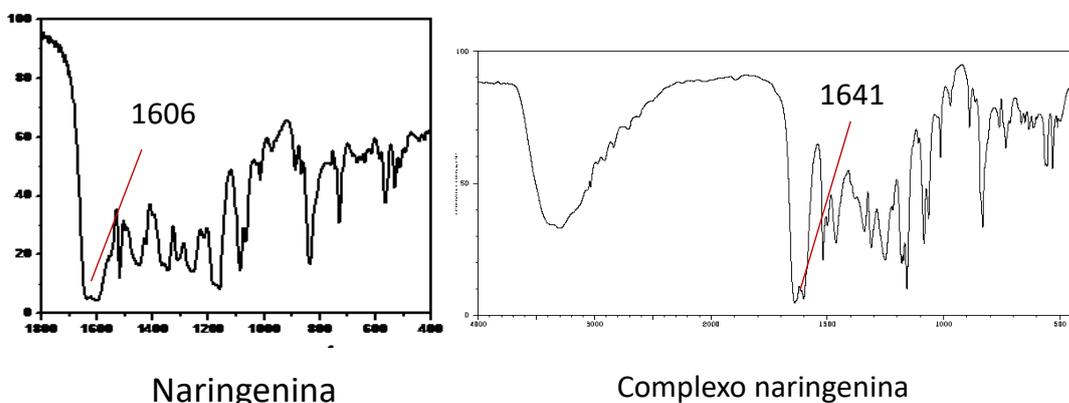


FIGURA 4. 3 - Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo naringenina e naringenina livre.

A caracterização para confirmação do sucesso da síntese do complexo isovanílico foi feita por meio da análise dos espectros de infra-vermelho (IV).

No complexo isovanílico, foi verificado o desaparecimento do estiramento de O-H de 1698 cm^{-1} em comparação aos seus respectivos flavonóides livres. Esta observação também é confirmada pela presença da banda larga $\nu(\text{Mg-O})$ em aproximadamente 480 cm^{-1} , FIGURA 4.4.

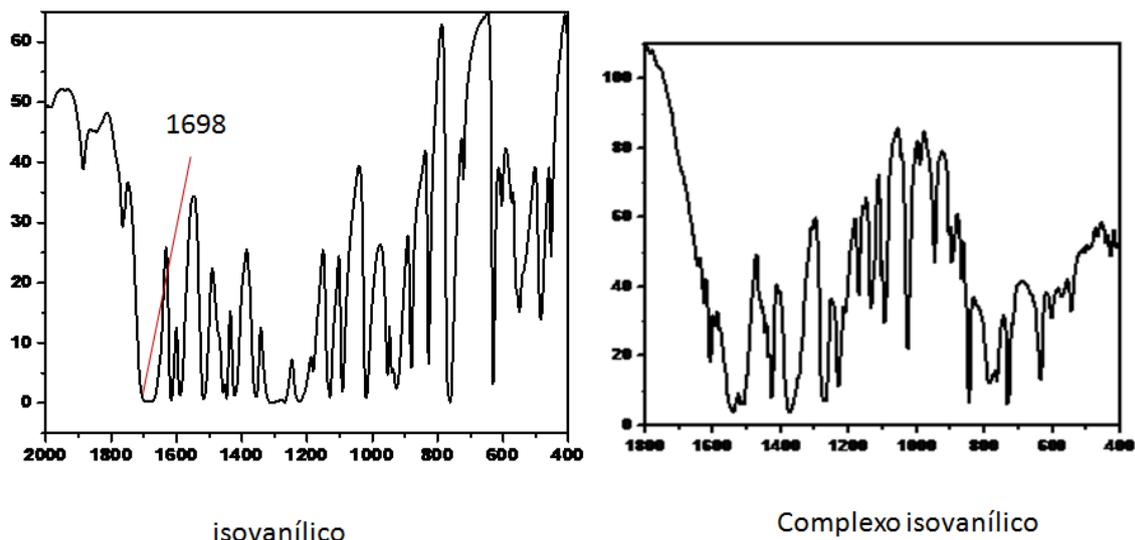


FIGURA 4. 4 - Espectro vibracional na região do infravermelho do complexo ácido isovanílico livre.

4.2 Ensaios Microbiológicos

4.2.1 Isolados da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri*

Todos os 15 isolados da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri* foram mantidos em atividade durante todo os experimentos. Segundo BEHLAU e BELASQUE JR, 2014, para cultivo em laboratório da bactéria, a faixa ótima de temperatura é 28°C e 32°C e nessas temperaturas as colônias são visíveis a olho nu geralmente após 48 a 72 horas. Por isso todos os experimentos de MIC, CBM, e CIMB₅₀ foram realizados com a bactéria em 72 horas de crescimento, como pode ser observados também em diversas literaturas como por exemplo, LI e WANG, 2014.

4.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima - CIM, frente à bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri*.

A metodologia REMA (Resazurin Microtiter Assay), para leitura da CIM de compostos antimicrobianos, foi realizada previamente por PALOMINO et al., 2002 e MARTIM et al., 2003. CIM foi realizada visualmente com a adição da resazurina. O corante resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona 10-óxido) é amplamente utilizado como um indicador de viabilidade celular em vários tipos de proliferação e ensaios citotóxicos (AHMED et al., 1994 e NOCIARI et al., 1998).

A resazurina, de cor azul intensa, na presença de células viáveis sofre um processo de redução passando para resofurina de coloração rosa. A reação de redução da resazurina está correlacionada o número de organismos vivos, como bactérias, fungos e células de mamíferos. Enzimas mitocondriais como transportadoras da atividade diaforase, como NADPH desidrogenase, provavelmente são responsáveis pela transferência de elétrons de NADPH + H + à resazurina, que é reduzida a resorufin, O'BRIEN et al., 2000.

Sendo a Concentração Inibitória Mínima (CIM) a menor quantidade do antimicrobiano necessária para inibir o crescimento de um organismo *in vitro*, (PELCZAR et al., 1980), os princípios ativos, testados frente aos 15 isolados da bactéria *X. citri*, o complexo hesperidina, complexo naringenina, complexos AC. Isovanílico e os flavonóide e fenol livres, para este teste de CIM nos mostraram resultados em concentrações em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ capaz de inibir o crescimento da bactéria, isto é, o resultado da CIM definiu o papel bacteriostático dos princípios ativos testados.

A FIGURA 4.5 mostra os resultados da CIM dos complexos hesperidina, naringenina e ácido isovanílico. As placas A e B são as mesmas, a placa A representa a coloração azul da resazurina no início da sua adição nos poços, a placa B representa o resultado da reação de redução da resazurina em resofurina onde ocorreu a mudança de cor azul para rosa intenso; reação ocorrida após um tempo de 4 horas. Como mostra na FIGURA 4.5, na linha A da placa B, os poço de 1 a 6 representam resultados de inibição bacteriana onde a CIM do complexo naringenina foi de $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, seus poços 7 e 8 estavam

virando a cor para rosa, apesar de não aparecer na foto quando esta foi obtida. Na linha B da placa B, os poços de 1 a 4 representam os resultados de inibição bacteriana do complexo hesperidina e sua CIM foi de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, neste também, o poço 5 estava mudando de cor quando a foto foi obtida, apesar de não aparecer nessa imagem. Na linha C da placa B, os poços de 1 a 7 representam os resultados de inibição bacteriana do complexo isovanílico e sua CIM foi de $6,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, também seus poços 8 e 9 estavam começando a mudar da cor azul para rosa. A placa da figura refere-se aos resultados de uma cepa bacteriana. Este mesmo teste foi feito com os 15 isolados da bactéria *X. citri* em triplicata.

Os resultados da CIM do complexo hesperidina, complexo naringenina, complexo isovanílico, hesperidina livre, naringenina livre e ácido isovanílico livre dos 15 isolados bacterianos podem ser visto na TABELA 4.1.

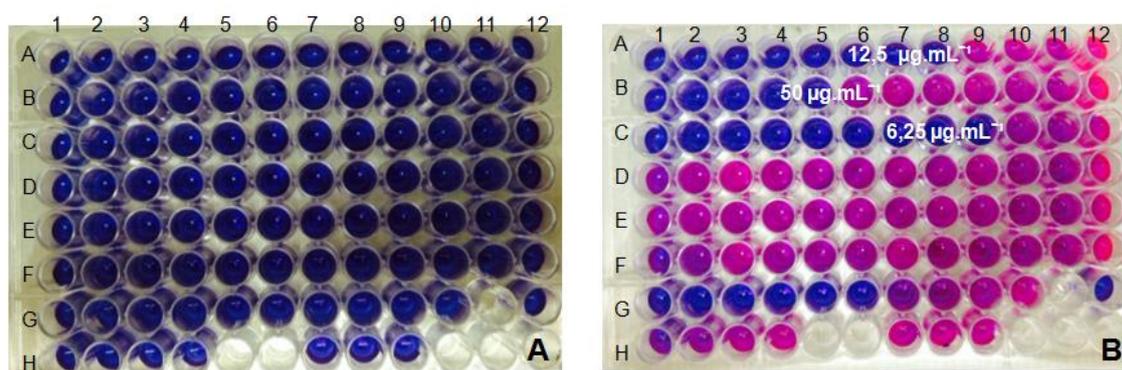


FIGURA 4. 5 - Resultado da CIM de uma placa de 96 orifícios com ensaio de uma cepa bacteriana com os complexos, os flavonóides e fenol livres.

TABELA 4. 1 - Resultado da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos complexos e seus ligantes livres frente à bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri*.

Isolado	Complexo isovanílico MIC $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Complexo hesperidina MIC $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Complexo naringenina MIC $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Isovanílico MIC $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Hesperidina MIC $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Naringenina MIC $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Controle positivo MIC $\mu\text{g.mL}^{-1}$
1644	6,25	50	12.5	400	400	200	0,1844
1645	6,25	50	12.5	400	400	200	0,0922
1646	6,25	50	12.5	400	400	200	0,0922
1647	6,25	50	12.5	>400	>400	200	0,1844
1648	6,25	50	12.5	400	>400	200	0,1844
1666	6,25	50	12.5	400	>400	200	0,0922
1670	6,25	50	12.5	400	400	400	0,0922
1705	6,25	50	12.5	>400	400	400	0,0922
1707	6,25	50	12.5	>400	>400	400	0,0922
1733	6,25	50	12.5	>400	>400	400	0,0922
12	6,25	50	12.5	400	400	200	0,0922
75	6,25	50	12.5	400	400	400	0,0922
316	6,25	50	12.5	400	>400	400	0,0922
621	6,25	50	12.5	400	>400	200	0,0922
10	6,25	50	12.5	>400	>400	>400	0,0922
Média	6,25	50	12.5	400	400	400	0,092

O composto que obteve melhor resultado foi o complexos Ácido Isovanílico, todas as cepas de *X citri*, obtiveram os mesmos resultados, uma CIM de 6,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, demonstrando confiabilidade nos resultados pois foi possível observar a mesma concentração inibitória nas 3 repetições e com os 15 isolados.

O complexo Hesperidina obteve uma CIM de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo este resultado bastante promissor, uma vez que RIBEIRO et.al., 2008, testaram a Hesperidina como inibidor da bactéria *X. fastidiosa*, causadora da Clorose Variegada do Citrus (CVC), e seu resultado foi uma CIM de 2.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, mostrando assim a importância da complexação desse flavonóide. Observou-se na literatura outros produtos naturais que foram testados como antimicrobianos

da bactéria *X. citri*, SILVA et al., 2013, testou a atividade antimicrobiana do Ácido Gálico frente à bactéria *X. citri* ssp. *citri* e sua CIM foi de 500 µg.mL⁻¹, utilizando a mesma técnica deste trabalho, a de microdiluição em microplaca e a leitura da CIM pelo mesmo método resazurina.

PICCHI et al., 2016, ensaiou o N-acetilcisteína (NAC) como inibidor da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri*. O NAC é usado em medicina para diminuir a formação de biofilmes, o composto é um análogo de cisteína, mais conhecido como um agente mucolítico que possui propriedades antibacterianas e inibe a formação de biofilmes em uma variedade de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (PERÉZ-GIRALDO et al., 1997; RUBIN, 2007; HAFEZ et al., 2009). O resultado da CIM do NAC para *X. citri* foi a partir de 2.000 µg.mL⁻¹.

O complexo naringenina obteve melhor resultado que o da hesperida, 12,5 µg.mL⁻¹. MADDOX, 2010 ensaiou o efeito antimicrobiano de alguns flavonóides frente à bactéria *Xylella fastidiosa*, causadora da doença Mal de Pierce na videira, e a naringenina foi uma dessas moléculas entre estes flavonóides, e sua CIM frente a essa bactéria foi de 110 µg.mL⁻¹, utilizando o mesmo método, o de diluição em microplaca. A *X. fastidiosa* é o agente etiológico também causador da Clorose Variegada do Citros (CVC), doença da citricultura, porém uma outra cepa bacteriana.

Dos flavonóides livres, a naringenina entre os 15 isolados, para 8 obteve uma CIM de 200 µg.mL⁻¹, 6 isolados CIM de 400 µg.mL⁻¹ e apenas 1 isolado, a cepa 10, a CIM foi maior que 400 µg.mL⁻¹. Da Hesperidina 7 isolados bacterinas obtiveram CIM maior que 400 µg.mL⁻¹ e 8 isolados uma CIM de 400 µg.mL⁻¹, do Ácido Isovanílico a maioria dos isolados obtiveram CIM de 400 µg.mL⁻¹ e alguns isolados CIM maior que 400 µg.mL⁻¹. Este resultado demonstra a importância da complexação dos flavonóides e do ácido fenólico. Estes complexos, avaliados por OLIVEIRA, 2012, apresentaram maior estabilidade frente a diferentes pH e luminescência, solubilidade em água aproximadamente 100 vezes maior que o ligante livre e também maior lipofilicidade.

Sabe-se que os flavonóides e outros polifenólicos, possuem baixa biodisponibilidade, devido principalmente à sua baixa solubilidade em água e que compostos simples, de efeito antifúngico ou inseticida, podem ser potencializados quando complexados a metais. Como os flavonóides e ácidos fenólicos possuem especiais atividades biológicas, os resultados da CIM da

TABELA 4.1, nos mostra exatamente isso, a potencialização antimicrobiana da hesperidina, naringenina e ácido isovanílico quando complexados ao metal magnésio.

PRASAD et al., 1990, ensaiou a complexação de dois pesticidas, o diazinon e o clorpirifós com dois metais, o cobre (Cu) e o cobalto (Co). Estes pesticidas apresentam baixa estabilidade quando aplicados no ambiente para controle de pragas. Os dois pesticidas quando complexados com metais, apresentaram maior estabilidade com relação a diferentes pH, maior tempo de toxicidade com relação ao seu controle frente à pragas, liberação mais lenta e com isso maior tempo de eficiência dos pesticidas.

NAGESH et al., 2015, ensaiou fungicidas a base de triazol complexados com Cu, Co, Ni e Zn. Seus ensaios antimicrobianos com os complexos e com o triazol livre demonstraram resultados de Concentração Inibitória Mínima (CIM) bastante diferenciados. Enquanto o triazol livre apresentou CIM para algumas espécies de bactérias e fungos de $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$, quando este era complexado com Cu, Zn e Ni, apresentava CIM de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e complexado com Co $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

LIU et al., 2017, realizou a complexação metálica do Chitosan visando o aumento de sua solubilidade em água e da sua atividade antifungal. O quitosano é o segundo biopolímero mais abundante, próximo da celulose, e é de ocorrência natural, um polissacarídeo [14-16]. Devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade [17, 18], a quitosana tem sido amplamente estudada e empregada em muitas áreas, como medicamentos, alimentos, tratamento de água e agricultura [19-22]. No entanto, a baixa solubilidade em água é um dos principais fatores que limitam a aplicação de quitosana. Por isso, muitos pesquisadores estão tentando apresentar radicais hidrofílicos para o esqueleto de quitosana. Diversos metais complexados com quitosana por LIU et al., 2017 demonstraram maior solubilidade em água e maior eficiência antifungal.

XIONG et al., 2014, ensaiou a atividade antifugal do Cu (II) complexado com triazol, onde o triazol complexado apresentou melhor atividade antimicrobiana que o convencional.

4.2.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos complexos e seus ligantes livres frente à bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri*.

A concentração Inibitória Mínima (CIM) é a menor concentração de um produto químico que impede o crescimento visível de uma bactéria, ou seja, que tem atividade bacteriostática, enquanto que a Concentração Bactericida Mínima (CBM) é a concentração que resulta na morte microbiana, ou seja, a concentração que é bactericida (TRIPATHI, 2013).

Sendo a Concentração Bactericida Mínima a menor concentração do princípio ativo capaz de matar 99,9% da bactéria (KONEMAN et al., 2001), através dos resultados da CIM, foi possível determinar a CBM de cada composto frente a cada cepa de *X. citri*. Os valores encontrados para a Concentração Inibitória Mínima (CIM), nos mostram que houve a inibição do crescimento bacteriano, isto é, através do reagente revelador resazurina foi possível dizer apenas se a bactéria está em atividade ou não. Dentro dos valores de CIM, existiria a possibilidade de a bactéria estar presente, esperando apenas condições favoráveis para se desenvolver novamente. Devido às estas circunstâncias, se fez necessária a determinação da CBM de cada complexo e seus ligantes livres com as 15 cepas de *X. citri*.

Portanto, para determinar a CBM, foi necessário refazer a CIM de todos os compostos testados com cada cepa da bactéria. A CIM é feita em duplicata, pois em uma das placas seria necessário pipetar resazurina para revelar a CIM, chamada de placa 1, apesar de a resazurina manter as células intactas (ZHI-JUN et al., 1997), e com a outra placa faria o teste de CBM, placa 2.

Após o teste de revelação da CIM, a placa 2, sem resazurina, foi utilizada para avaliar a CBM dos compostos, caso houvesse, pois os compostos poderiam apresentar apenas atividade inibitória da bactéria.

Assim, retirando uma alíquota dos poços da placa 2 que obtiveram inibição bacteriana (CIM) e semeando em meio de crescimento Caldo Nutriente, nas condições favoráveis de temperatura 28 °C e sob agitação num período de 48 horas; caso houve alguma atividade bacteriana naquele meio de CIM, ela iria se

manifestar nas condições favoráveis de crescimento dessa bactéria. Nestas condições, seria possível determinar em qual das concentrações de inibição houve uma morte de 99,9% das bactérias.

A FIGURA 4.6 representa os resultados dos complexos hesperidina, naringenina e ácido isovanílico. A figura A é o resultado do complexo hesperidina e naringenina que obtiveram uma CMB de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A figura B é o resultado do complexo ácido isovanílico, que obteve uma CBM de $6,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Portanto, confirma-se que na figura A, a menor concentração do complexo hesperidina e complexo naringenina que matou 99,9% da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri* foi de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Na figura B a menor concentração do complexo ácido isovanílico que matou 99,9% da bactéria foi de $6,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

A TABELA 4.2 representa todos os resultados de CBM dos três complexos, os flavonóides livres e o fenol livre, para as 15 cepas da bactéria *X. citri*.

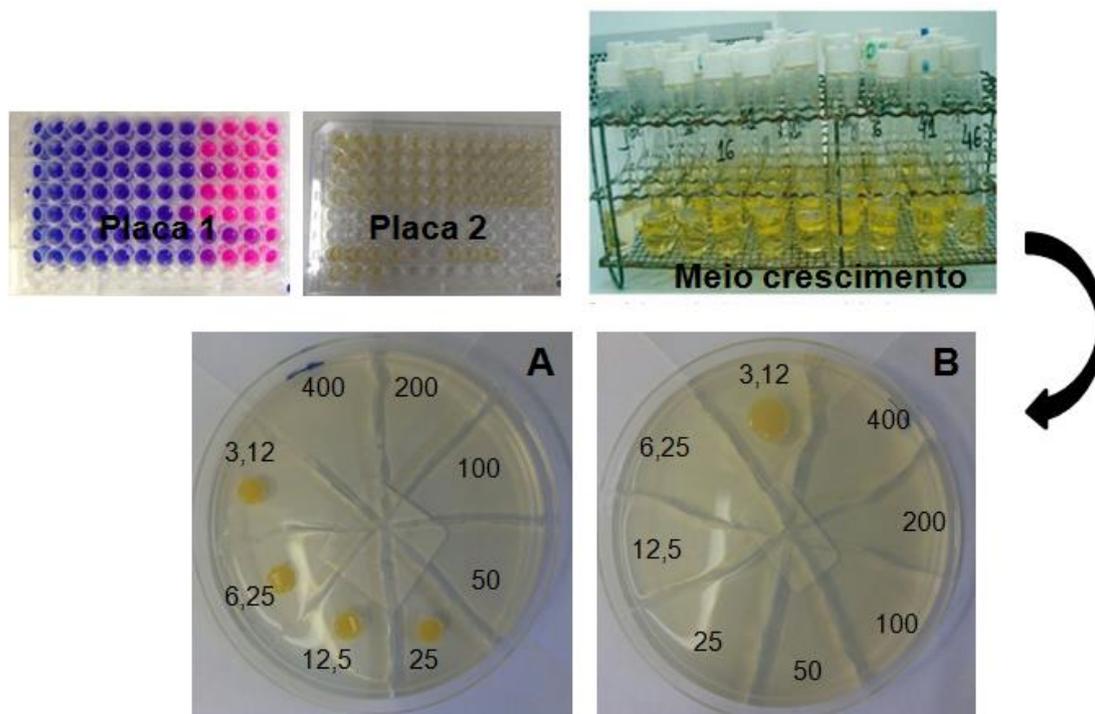


FIGURA 4. 6 - Colônias da bactéria *X. citri* em placas de petri contendo apenas o meio nutriente agar.

TABELA 4. 2 - Resultado da CBM dos complexos e seus ligantes livres com os 15 isolados da bactéria *Xantomonas citri* ssp. *citri*.

Isolado	Complexo isovanílico CMB $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Complexo hesperidina CMB $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Complexo naringenina CMB $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Isovanílico CMB $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Hesperidina CMB $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Naringenina CMB $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Controle positivo
1644	6,25	50	50	400	>400	>400	2,95
1645	6,25	50	50	400	>400	>400	2,95
1646	6,25	50	50	400	>400	>400	2,95
1647	6,25	50	50	400	>400	>400	2,95
1648	6,25	50	50	400	>400	>400	2,95
1666	6,25	50	50	400	>400	>400	2,95
1670	6,25	50	50	400	>400	>400	2,95
1705	6,25	50	50	400	>400	>400	2,95
1707	6,25	50	50	400	>400	>400	2,95
1733	6,25	50	50	400	>400	>400	2,95
12	6,25	50	50	400	>400	>400	2,95
75	6,25	50	50	400	>400	>400	2,95
316	6,25	50	50	400	>400	>400	2,95
621	6,25	50	50	400	>400	>400	2,95
10	6,25	50	50	400	>400	>400	2,95
Média	6,25	50	50	>400	>400	>400	2,95

Comparando-se os resultados da TABELA 4.1, resultados da CIM, com os da TABELA 4.2, resultados da CBM, observa-se que os valores em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da CMB de cada complexo, com exceção do complexo hesperidina, foi do poço subsequente ao de CIM.

Portanto a CIM do complexo isovanílico foi de $3,12 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e sua CMB de $6,25$; do complexo hesperidina a CIM foi de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e a CBM $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$; do complexo naringenina a CIM foi de $6,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e a CBM $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, dos flavonóides livre hesperidina, naringenina e do fenólico ácido isovanílico tanto a CIM e a CBM foram maior que $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Como nos resultados de CIM, os valores em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de CBM para os complexos foi muito maior (não seria menor ??) em relação aos seus flavonóides livres e fenólico não complexados, demonstrando mais uma vez o aumento da eficiência dos flavonóides e fenólico quando estão complexados com o metal Mg.

PICCHI et al., 2016, ensaiou o N-acetilcisteína (NAC) como inibidor da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri*. O resultado que inibiu completamente o crescimento da bactéria *X. citri* no meio de cultura de crescimento foi de 8.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

SAVIETTO, 2016, testou a atividade antimicrobiana, frente à bactéria *X. citri*, de moléculas de galatos de alquila modificados, os galatos de alquila acetilados, e moléculas provenientes do ácido gálico. O ácido gálico (ácido 3,4,5-triidroxibenzóico) é um intermediário no metabolismo especial vegetal sendo um componente de taninos hidrolisáveis (GRUNDHOFER et al.; MUIR et al.; WANG, S. et al., 2010) e, juntamente com seus derivados semissintéticos, tem sido associado a um amplo espectro de ações biológicas como antioxidante, antiviral, antitumoral (ARUOMA et al., 1993; DODO et al., 2008; KRATZ et al.; LOCATELLI et al., 2008; MORAIS et al., 2010; ROSSO et al., 2006), antifúngico (FUJITA; KUBO, 2002) e antibacteriano, inclusive contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos (KUBO et al., 2004; KUBO, XIAO e FUJITA, 2002; MERKL et al., 2010). Os galatos de alquila acetilados obtiveram uma Concentração Inibitória Mínima de 90% (CIM₉₀) de 45,73 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 34,65 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 31,97 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 27,92 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Apesar de suas concentrações de inibição bacteriana serem promissoras, essas inibições corresponde a 90 % da bactéria morta e não 99,9 %, como dos complexos ensaiados nesse trabalho. Estas moléculas também apresentam uma síntese complexa, um tanto quanto laboriosa, já os complexos deste trabalho apresentam uma síntese simples.

4.2.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIMB).

Avaliou-se também se os complexos possuíam potencial de inibição da formação do biofilme da bactéria *X. citri*. A formação do biofilme em *X. citri* é importante para a sobrevivência epífita antes do desenvolvimento dos sintomas da doença, bem como um fator de virulência em plantas, RIGANO et al., 2007. Além disso, as mutações levam à redução de movimento dessas bactérias, resultando na diminuição ou ausência de doença (MALAMUD et al., 2011e 2012), sugerindo que a capacidade de formar biofilmes e a aderência ao seu hospedeiro, são características importantes para a sobrevivência e virulência no hospedeiro.

Apesar da importância da formação de biofilmes para a patogenicidade de patógenos bacterianos de plantas, estratégias para o controle de microrganismos em biofilmes são muito mal explorados na agricultura, ZHAO & LIU, 2010.

A bactéria do cancro cítrico é considerada um patógeno hemibiotrófico, isto é, vive em células vivas e mortas e cresce inicialmente de forma epífita (na superfície da folha, sem retirar seus nutrientes, apenas como um apoio) e depois entra no hospedeiro através de estômatos ou ferimentos. Entre os fatores de virulência, biofilmes foram sugeridos para desempenhar um papel importante nos estágios iniciais da infecção, aumentando a epífita persistência nas folhas do hospedeiro. Isso nos levou a hipotetizar que os compostos que inibem a formação de biofilmes podem reduzir sua infecção e melhorar o controle da doença do cancro (GOTTIG, et al., 2009; GOTTWALD, et al., 2009; GUO et al., 2010; LI e WANG, 2011; RIGANO et al., 2007; YAN e WANG, 2011). Estudos mostram que a bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri* forma o biofilme apenas para se aderir nas folhas e sobreviver por mais tempo ante de penetrar no mesófilo, onde a partir daí não produziria mais o biofilme (BRUNINGS e GABRIEL, 2003; DA SILVA et al., 2002; LAIA, 2009; YAN e WANG, 2012).

Por isso a grande importância de realizar também os testes de CIMB com os complexos.

Antes de iniciar os testes de inibição do biofilme com os complexos, realizou-se uma padronização do biofilme da bactéria *X. citri*, isto é, avaliou-se a formação do biofilme em diferentes concentrações de inoculo bacteriano em diferentes tempos de incubação para verificar em qual concentração de UFC.mL⁻¹ e em qual tempo de incubação ocorreria uma melhor formação de biofilme para os 5 isolados bacterianos.

4.2.5 Padronização do biofilme

PICCHI, et al., 2016, ensaiaram a interferência de N-acetylcysteine (NAC) na formação do biofilme da bactéria *X. citri* ssp. *citri*. Como dito no item 4.2.2, O NAC é usado em medicina para diminuir a formação de biofilmes de bactérias patogênicas, é um agente mucolítico. Nestes ensaios, para avaliar os resultados do NAC frente ao biofilme da bactéria *X. citri*, a autora utilizou para quantificar o biofilme uma concentração do inoculo bacteriano de D.O_{600nm} = 0,08, isso seria aproximadamente 1 a 2 x10⁸ UFC, num tempo de incubação de 72 h. Neste trabalho também foi avaliado a interferência do NAC na produção de EPS. EPS são polissacarídeos extracelulares que são produzidos como um mecanismo de resistência causando alterações na expressão gênica e metabólica tornando as células no biofilme difíceis de controlar (RODRIGUES et al., 2008; MURANAKA et al., 2013; YEOM et al., 2013). Para avaliar o efeito do NAC em EPS, utilizou-se uma concentração de inoculo bacteriano de 10⁷ UFC num tempo de incubação de 72 h.

LI e WANG, 2013, investigaram a atividade de alguns aminoácidos frente a formação do biofilme da bactéria *X. citri*. Este utilizou para os ensaios de inibição do biofilme em superfície abiótica, uma concentração bacteriana de O.D_{600nm} = 1,0, isso equivale aproximadamente 10⁹ UFC e tempo de incubação de 48 h.

REDONDO et al., 2015, estudaram a influência de alguns bactericidas, na formação do biofilme da bactéria *X. citri*, utilizando para os ensaios, inoculo numa concentração bacteriana de D.O_{600nm} = 0,1 que corresponde uma média de 10⁸ UFC e tempo de incubação de 72 h. Para os ensaios em superfícies bióticas, no

caso em folhas de citrus, o autor utilizou um comprimento de onda de D.O para concentração bacteriana de 595 nm.

GRANATO et al., 2016 estudaram a função do gene *hrpB* em *Xanthomonas citri* ssp. *Citri* investigando seus papéis na formação de biofilmes em superfícies abióticas e folhas do hospedeiro, da bactéria do cancro cítrico. Para os ensaios *in vitro*, utilizou-se para a leitura da absorbância da concentração bacteriana um comprimento de onda de 590 nm e tempo de incubação de 72 h.

Portanto, segunda as literaturas citadas, para a padronização do biofilme deste trabalho, utilizou-se concentrações bacterianas para os ensaios de 10^8 , 10^7 e 10^6 UFC em tempos de incubação de 24 h, 36 h, 48 h, 60 h, 72 h e 96 h, e os ensaios realizados em microplacas com poços de 96 orifícios.

Para quantificar o biofilme de *X. citri* desenvolvido na superfície abiótica, utilizou-se o teste de Cristal Violeta, MALAMUD et al., 2011.

Como mostra na FIGURA 4.7, a formação do biofilme ocorreu no fundo dos poços das placas de 96 orifícios. A fixação desse biofilme formado no fundo dos poços foi através de metanol e cristal violeta (0,2% em álcool) e que depois foi ressuspendido em ácido acético. A quantificação das células bacterianas ressuspendidas do biofilme foi medida por densidade óptica em 595 nm em espectrofotômetro.



FIGURA 4. 7 - Formação do biofilme no fundo da placa de 96 orifícios, que foi fixado com cristal violeta

Através da FIGURA 4.8, é possível visualizar melhor os resultados de formação do biofilme dos 5 isolados bacterianos.

A concentração bacteriana de 10^8 foi a que obteve uma melhor formação do biofilme. A cepa 1644 formou muito mais biofilme comparando com as outras cepas bacterianas, pode-se observar valores de absorvância próximos de 2,000, nos tempos de incubação de 60h e 96 h.

A cepa 1645 teve uma absorvância máxima em 0,603 no tempo de inoculação de 60 h. Na cepa 1670, a maior quantidade de biofilme formado foi em 60 h e obteve uma absorvância de 0,820. Para as cepas 621 e 75, a maior absorvância foi de 0,549 e 0,991 respectivamente, também no tempo de incubação de 60 h.

ZIMARO et al., 2014 e REDONDO et al., 2015, em ensaios com biofilme da bactéria *X. citri* obtiveram valores de absorvância de $D.O_{590 \text{ e } 600} = 0,500$ até próximo de 0,700, para os tratamentos controle. Portanto, os valores encontrados dentro da padronização do biofilme em 60 h na concentração de 10^8 UFC, foram satisfatórios para o início dos ensaios de Concentração Inibitória Mínima do Biofilme em 50% (CIMB₅₀) com os complexos.

PICCHI et al., 2016, em ensaios com biofilme da bactéria *X. citri*, obteve na quantificação das células do biofilme, valores de absorvância = 1,4, para a cepa 306.

A cepa 1644 foi a única cepa que apresentou um valor maior de absorvância para todos os tempos de incubação e para todas as concentrações bacterianas inoculadas. Uma hipótese seria; por este isolado ter criado resistência ao cobre, pode ter ocorrido alterações em seu biofilme. Estes mecanismos de resistência envolvem a produção de um polissacarídeo extracelular (EPS), que promove alterações na expressão gênica e metabólica tornando as células no biofilme de difícil controle (RODRIGUES et al., 2008; MURANAKA et al., 2013; YEOM et al., 2013).

Apesar de a cepa 1644 apresentar, na concentração de 10^8 UFC, melhor formação de biofilme em 96 h, resolveu-se padronizar o tempo de incubação para 60 horas para todas as cepas ensaiadas para CIMB₅₀ e concentração 10^8 UFC.

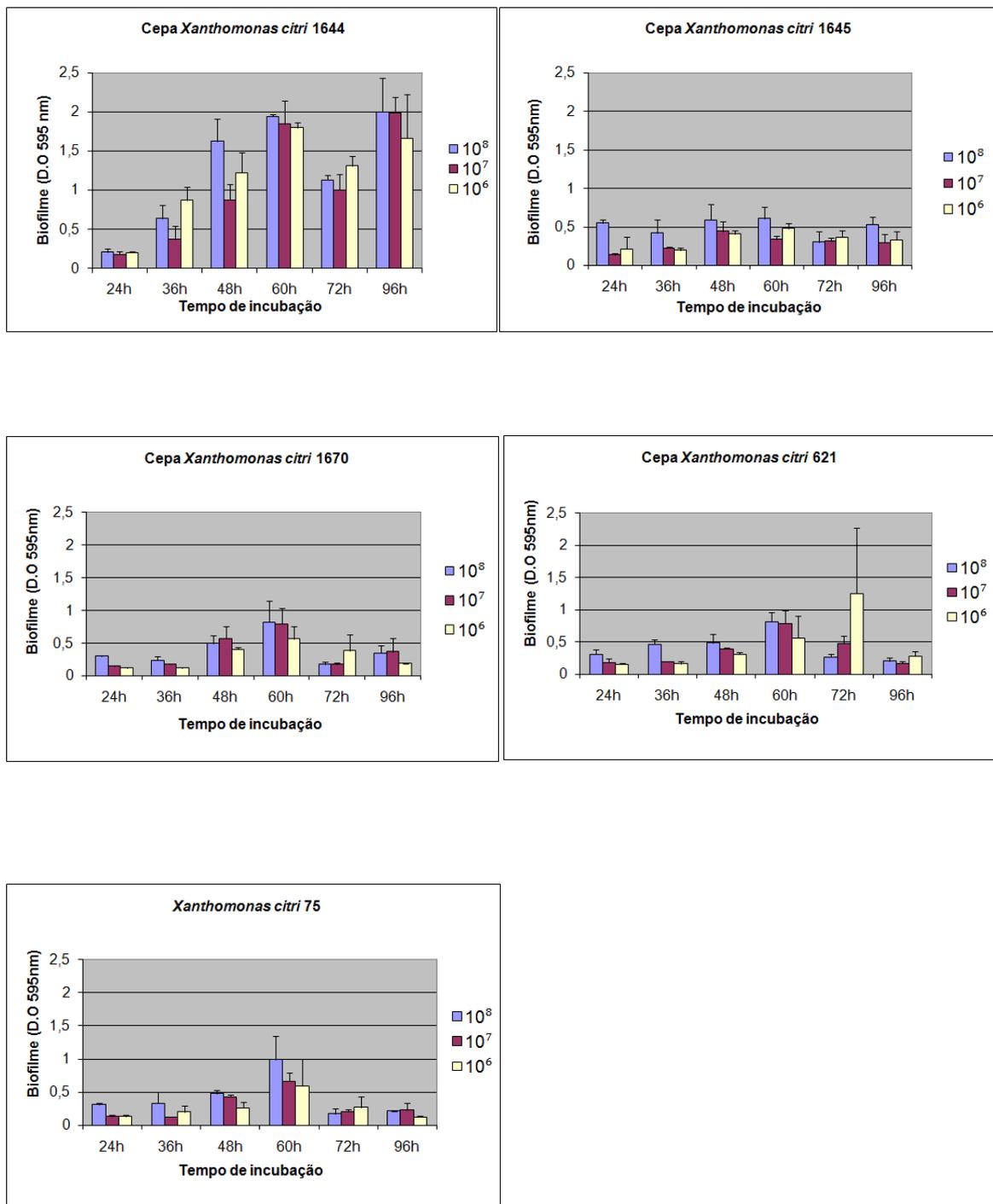


FIGURA 4. 8 - Resultados dos cinco isolados da padronização do biofilme da bactéria *Xanthomonas citri ssp. citri*. as barras de erros indicam o desvio padrão.

4.2.6 Realização da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme dos complexos frente aos 5 isolados selecionados.

A CIMB₅₀ dos complexos frente à bactéria *X. citri* foi realizada em duplicata, permitindo a obtenção dos resultados de quantificação das células do biofilme por método de contagem de UFC.mL⁻¹ e por D.O em espectrofotômetro.

O resultado por absorvância foi obtido no mesmo dia em espectrofotômetro através da fixação e ressuspensão do biofilme resultante da incubação de 60 horas das placas com 96 orifícios com o inoculo. O resultado por UFC.mL⁻¹, foi obtido em 48, pois as células do biofilme ressuspendido do resultado de incubação de 60 horas, foram semeadas em Ágar Nutriente e levadas para incubação por 48 h.

Por meio dos resultados de quantificação do biofilme por D.O dos tratamentos de inibição do biofilme da bactéria *X. citri* e utilizando como comparação o controle (apenas meio de crescimento e bactéria), foi possível calcular a porcentagem de concentração inibitória mínima em 50% (CIMB₅₀) de cada concentração do complexo frente às cepas bacterianas, e também sua porcentagem máxima de inibição do biofilme.

As concentrações dos complexos testados para inibição do biofilme, variou de 0,195 a 400 µg.mL⁻¹. E para a streptomicina 0,0115 à 5,9.

Os isolados bacterianos foram 1644, 1645, 1670, 621 e 75.

As FIGURAS 4.9 à 4.17 representam as concentrações que inibiram o biofilme bacteriano próximo de 50% e as concentrações que inibiram o biofilme bacteriano próximo de 100%.

A CIMB do complexo ácido isovanílico, com exceção do isolado 1644 que teve a CIMB₅₀ = 1,56 µg.mL⁻¹, mostrou resultados semelhantes. A CIMB mais próxima de 50% foi na menor concentraçã, 0,195 µg/mL, para os isolados 1645, 1670 e 621. Para o isolado 75 a CIMB mais próximo a 50 % foi 0,39. A porcentagem máxima de inibição do biofilme bacteriano foi na média de 75 %, na maior concentração, 400 µg.mL⁻¹, com exceção do isolado 75, onde o complexo conseguiu inibir 84 %.

O complexo Hesperida com relação à CIMB, também com exceção do isolado 1644, mostrou resultados semelhantes, onde a CIMB mais próxima a

50% para os isolado 1645 e 1670 foi em $0,39 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e para os isolados 621 e 75 foi a concentração mínima do complexo, $0,195 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e a concentração máxima do complexo, $400 \mu\text{g/mL}$, inibiu o biofilme na média de 78%. As diferenças de valores entre os isolados 1645, 1670 e 621, 75, não são relevantes, uma vez que o valor da concentração de um poço para outro, da placa de 96 orifícios, pode estar relacionado com pequenos erros de pipetação.

O complexo Naringenina, com relação à CIMB, também com exceção do isolado 1644, mostrou resultados semelhantes, onde a CIMB mais próxima a 50% de inibição foi na concentração mínima do complexo, $0,195 \mu\text{g.mL}^{-1}$, com exceção do isolado 621 que teve sua concentração mais próxima de 50% de inibição em $0,39 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e a concentração máxima do complexo, $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$, inibiu o biofilme na média de 81,5%. Essa diferença de resultado com o isolado 621 também é irrelevante.

O isolado 1644, para todos os complexos, precisou de uma concentração maior para inibir o biofilme próximo a 50%. O complexo ácido isovanílico inibiu próximo a 50% o biofilme na concentração de $1,56 \mu\text{g/mL}$, o complexo hesperida em $3,12 \mu\text{g/mL}$ e o complexo naringenina em $0.39 \mu\text{g/mL}$. Esta diferença de resultado da cepa 1644 com relação aos outros isolados, provavelmente se refere ao seu fator de virulência no parâmetro resistência aos fungicidas derivados do cobre. Agregação e formação de biofilmes por bactérias patogênicas em plantas, incluindo *X. citri*, CUBERO et al., 2011; RIGANO et al., 2007, ocorre em estágios iniciais da colonização da planta quando a bactéria está sob estresse biótico e abiótico, DANHORN e FUQUA, 2007. Sendo o cobre um bactericida de contato, ele vai agir apenas na superfície da folha, onde a bactéria *X. citri* forma o seu biofilme, antes de penetrar no mesófilo da folha, onde ela se multiplicará e não formará mais biofilmes. Portanto, sua resistência ao cobre, pode ter muito haver com a sua evolução na formação desse biofilme, tornando-o provavelmente mais resistente.

BEHLAU et al., 2011, 2012, relatam que o uso excessivo e prolongado de cobre como bactericida pode causar riscos da bactéria *X. citri* subsp. *Citri* desenvolver resistência ao cobre, o que já ocorreu na Argentina, que seria o caso do isolado 1644 que veio desse país.

PICCHI et. al., 2016 ensaiou o N-acetylcysteine (NAC) *in vitro* para o controle do biofilme da bactéria *X. citri* ssp. *citri*. Nas concentrações de 4000

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $5000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ o NAC controlou o biofilme bacteriano em até aproximadamente 78 %. De acordo com seus resultados, o controle apresentava um biofilme de $\text{D.O}_{600} = 1,4$ e o tratamento com o NAC um biofilme de $\text{D.O}_{600} = 0,30$.

LI e WANG, 2013, ensaiaram *in vitro* alguns compostos inibidores do biofilme da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri*, os que apresentaram atividade promissora foram a D-leucina e 3-indolilacetoneitrile (IAN). Comparando com o controle, que foi a bactéria crescendo em meio de cultura sem tratamento, a D-leucina na concentração de 10 mM, apresentou uma inibição de 58 % do biofilme, e a IAN na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, inibiu o biofilme bacteriano em 65 %.

Após a incubação de 60 h do inoculo bacteriano de 10^8 UFC para formação do biofilme, além da sua quantificação por espectrofotômetro, estes foram ressuspensos e a solução ressuspensa semeada em meio de crescimento ágar nutriente e levadas para incubação por 48 horas.

Após 48 h de incubação, os resultados do crescimento das colônias bacterianas provenientes do biofilme podem ser vistos nas FIGURAS 4.9, 4.10 e 4.11, onde o resultado da quantidade de UFC.mL^{-1} do biofilme foi demonstrado em \log_{10} . Estas apresentam resultados de inibição do biofilme dos 5 isolados bacterianos de *X. citri*, quantificado por absorvância, e por UFC.mL^{-1} , de acordo com as concentrações utilizadas dos complexos, que foi de 0,195 a $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Os resultados da quantificação por D.O estão representados nos gráficos através de colunas de cor azul escuro. Os resultados por UFC.mL^{-1} estão representados por linhas vermelhas. FIGURAS 4.9 à 4.20.

As barras nos gráficos em azul de três tons representam as concentrações de acordo com a porcentagem de inibição do biofilme, a mais clara a porcentagem mais próxima de 50 % e a outra barra a porcentagem de inibição mais próxima a 100 %.

A streptomina na concentração $5,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ inibiu o biofilme numa média de 70 % para todas as cepas bacterianas.

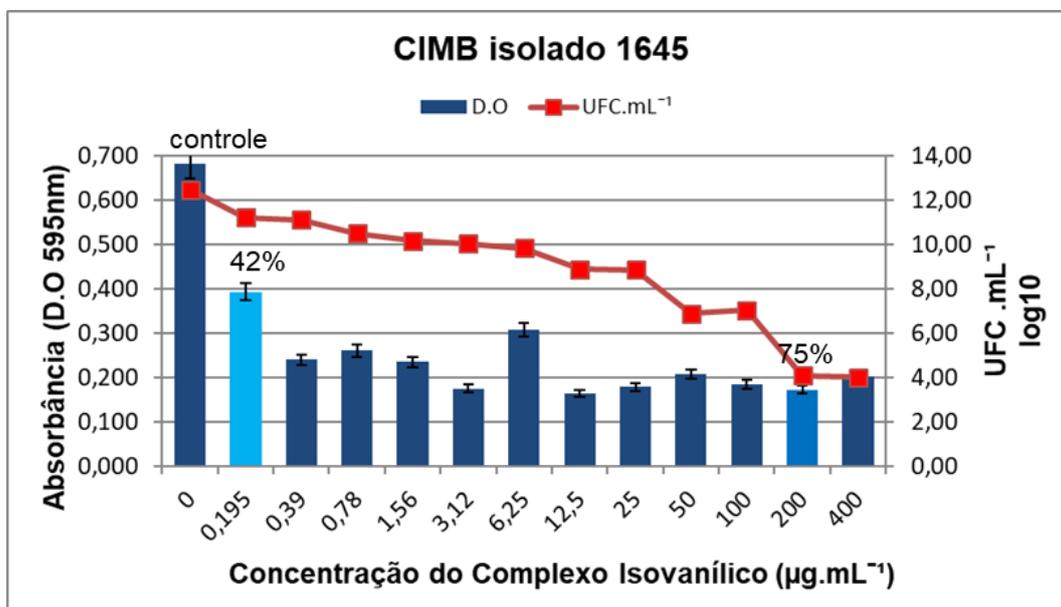
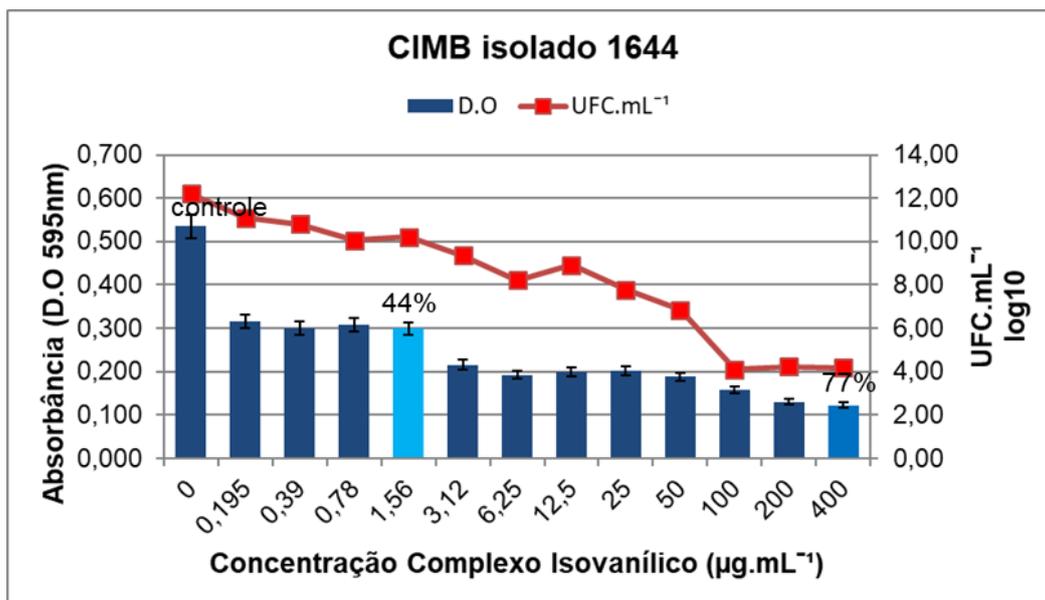


FIGURA 4. 9 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIMB) da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri* dos isolados 1644 e 1645 frente ao complexo ácido isovanílico, por absorbância e por por UFC.mL⁻¹ dos inóculos. As barras de erros indicam o desvio padrão.

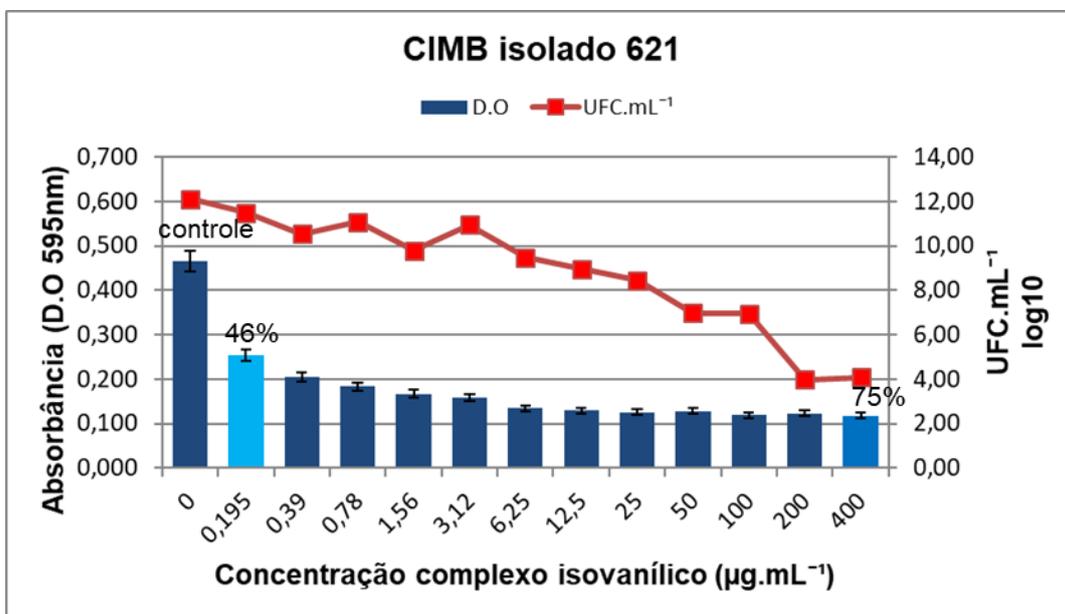
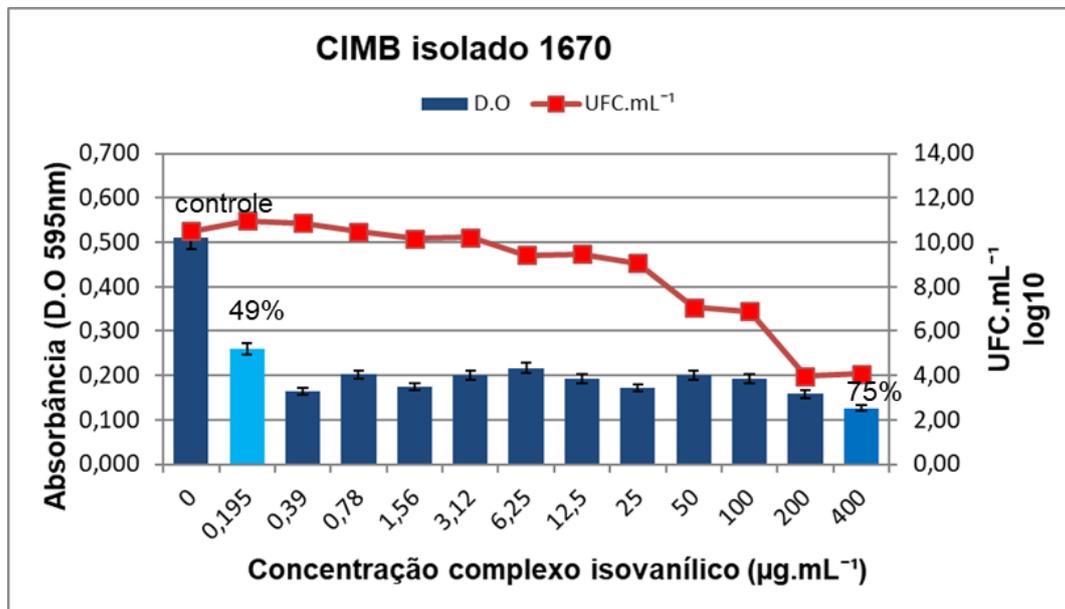


FIGURA 4. 10 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIMB) da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri* dos isolados 1670 e 621 frente ao complexo ácido isovanílico, por absorbância e por por UFC.mL⁻¹ dos inóculos. As barras de erros indicam o desvio.

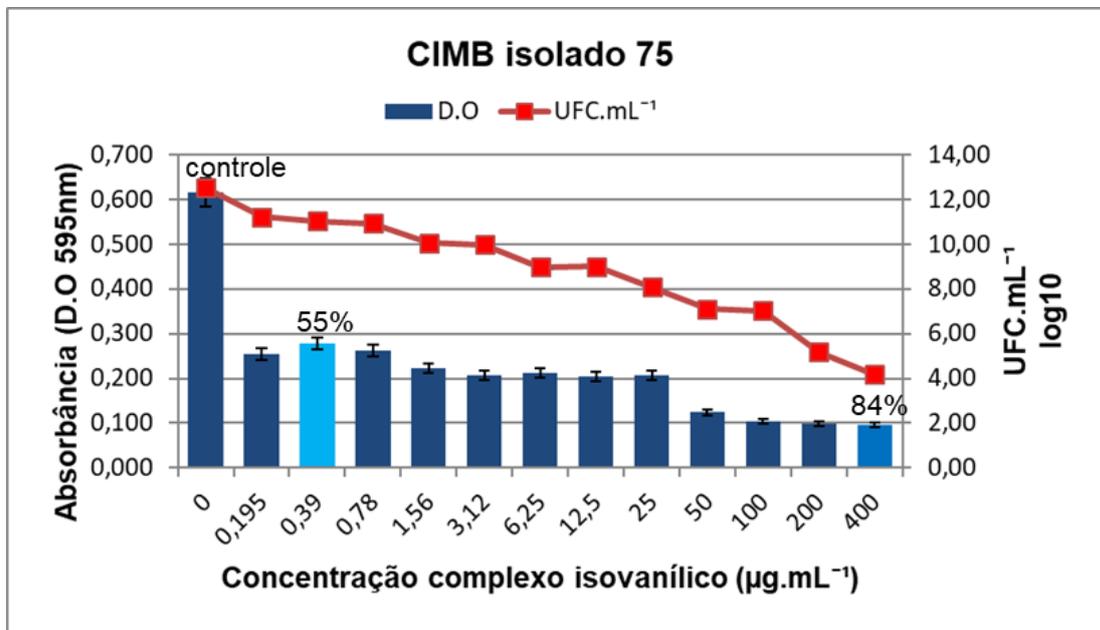


FIGURA 4. 11 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIMB) da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri* do isolado 75 frente ao complexo ácido isovanílico, por absorbância e por por UFC.mL⁻¹ dos inóculos. As barras de erros indicam o desvio padrão.

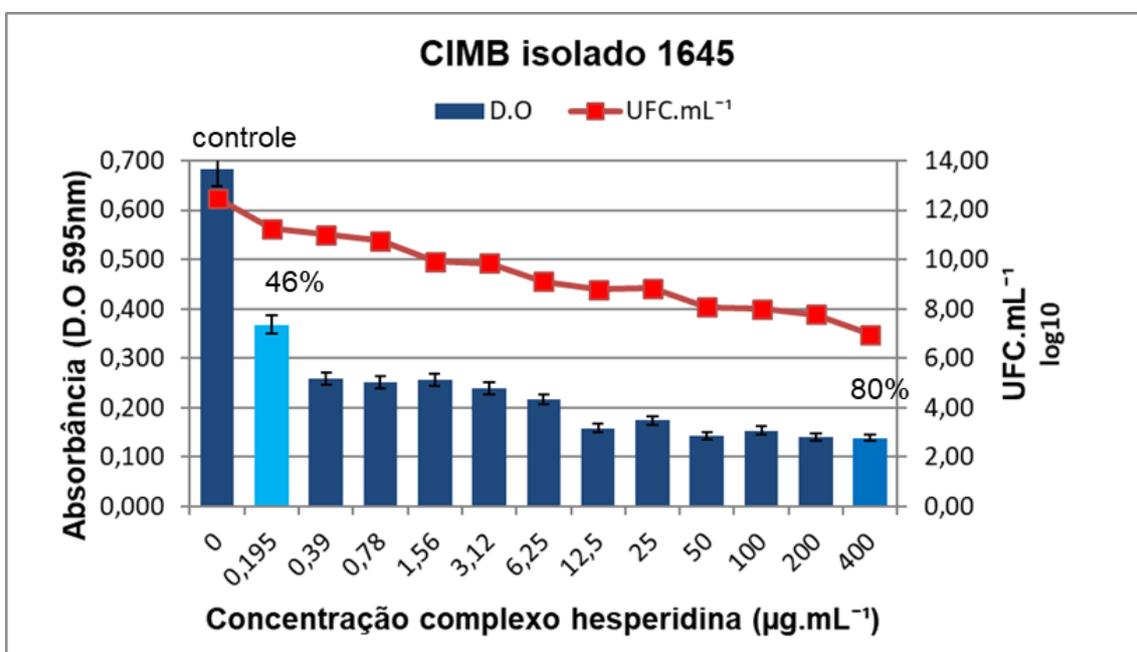
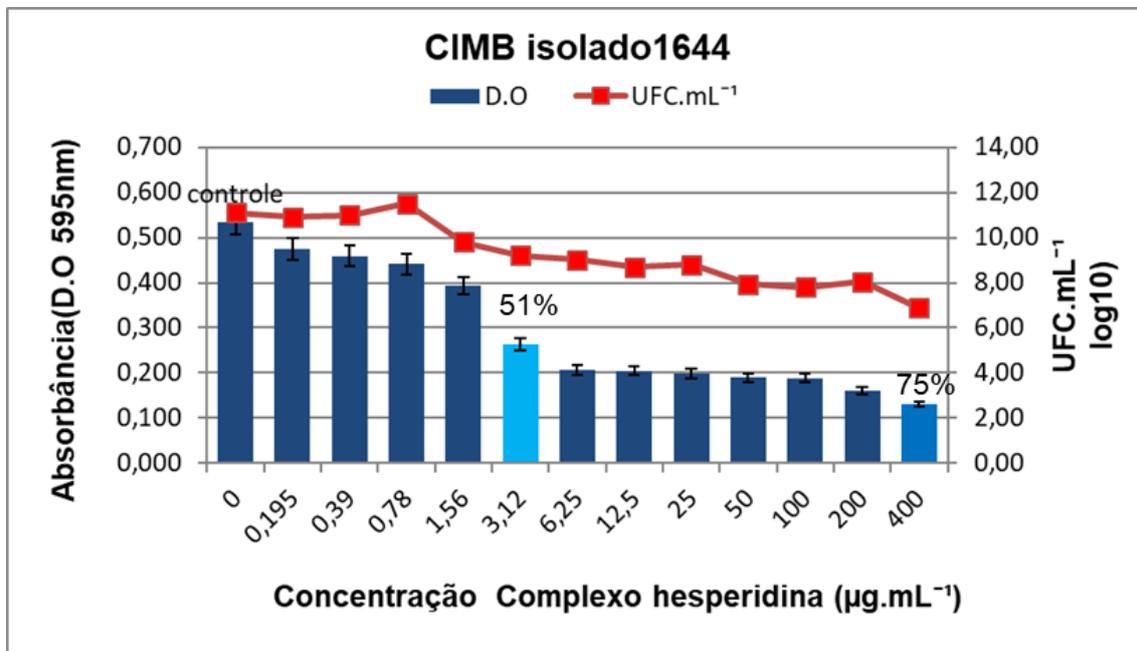


FIGURA 4. 12 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIMB) da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri* dos isolados 1644 e 1645 frente ao complexo hesperidina, por absorbância e por por UFC.mL⁻¹ dos inóculos. As barras de erros indicam o desvio padrão.

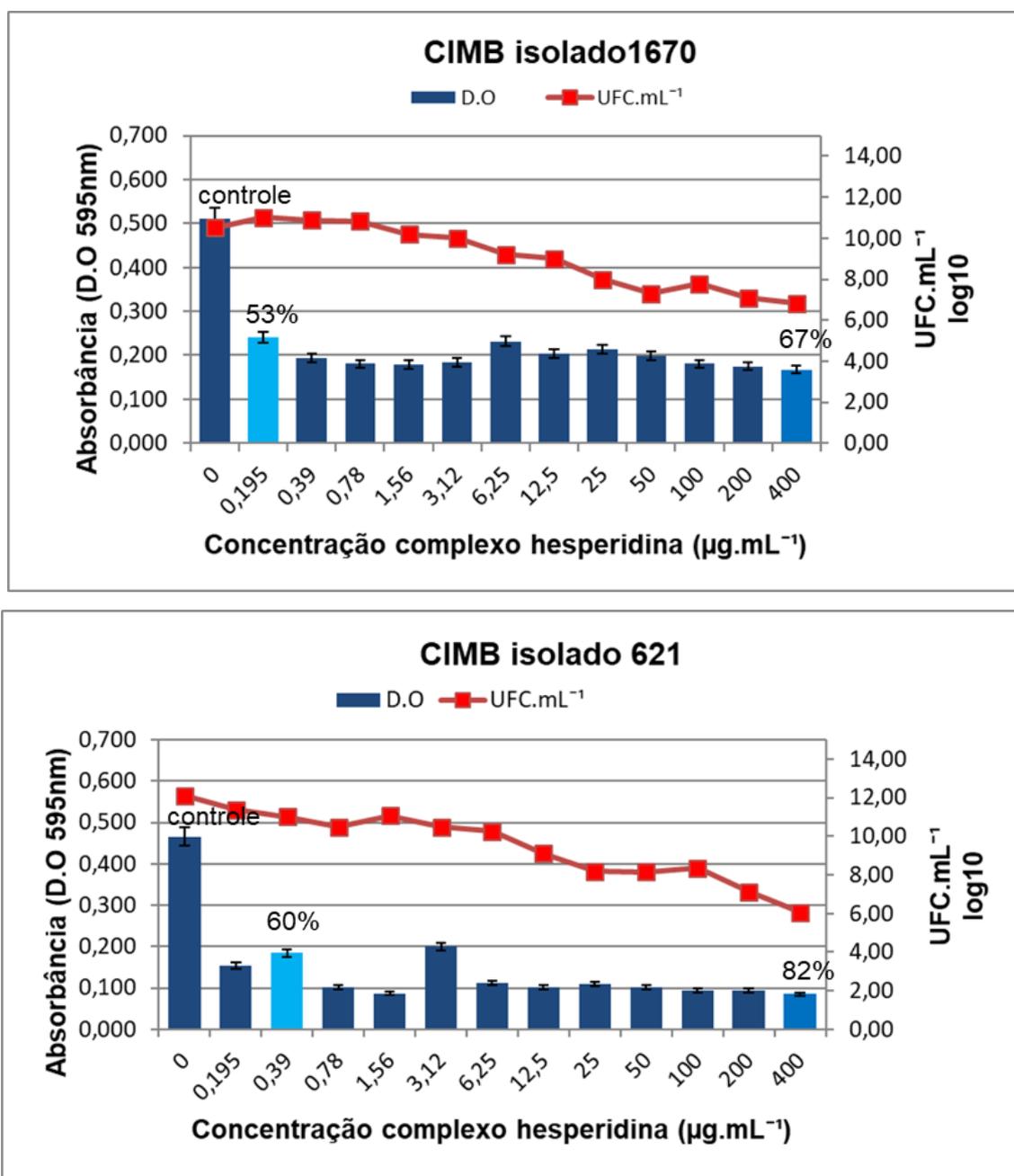


FIGURA 4. 13 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIMB) da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri* dos isolados 1670 e 621 frente ao complexo hesperidina, por absorbância e por por UFC.mL⁻¹ dos inóculos. As barras de erros indicam o desvio padrão

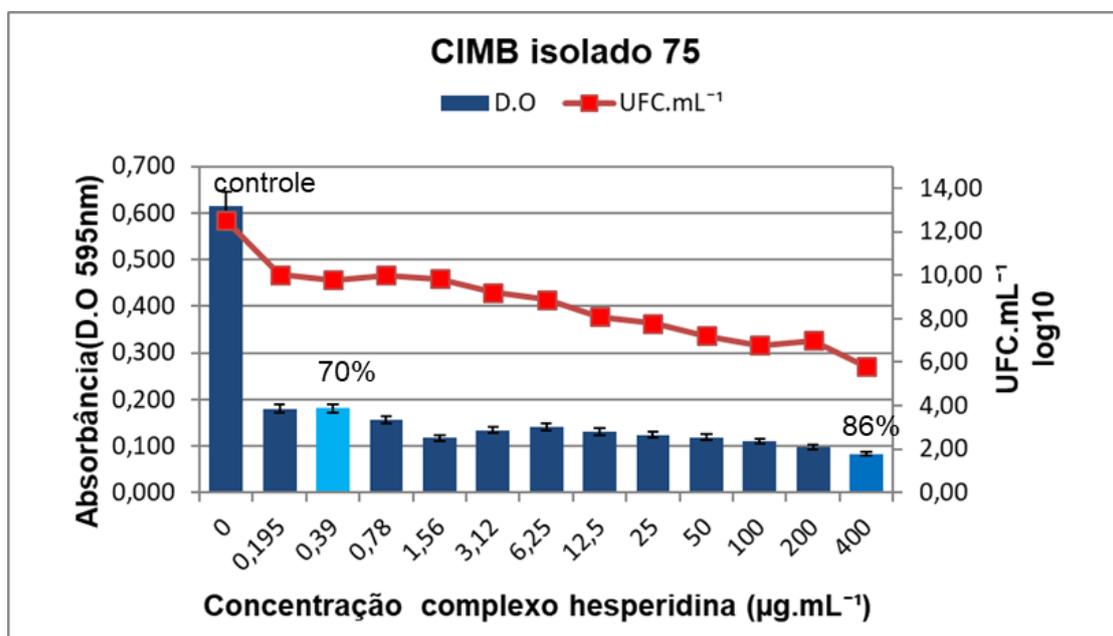


FIGURA 4. 14 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIMB) da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri* do isolado 75 frente ao complexo hesperidina, por absorbância e por por UFC.mL⁻¹ dos inóculos. As barras de erros indicam o desvio padrão.

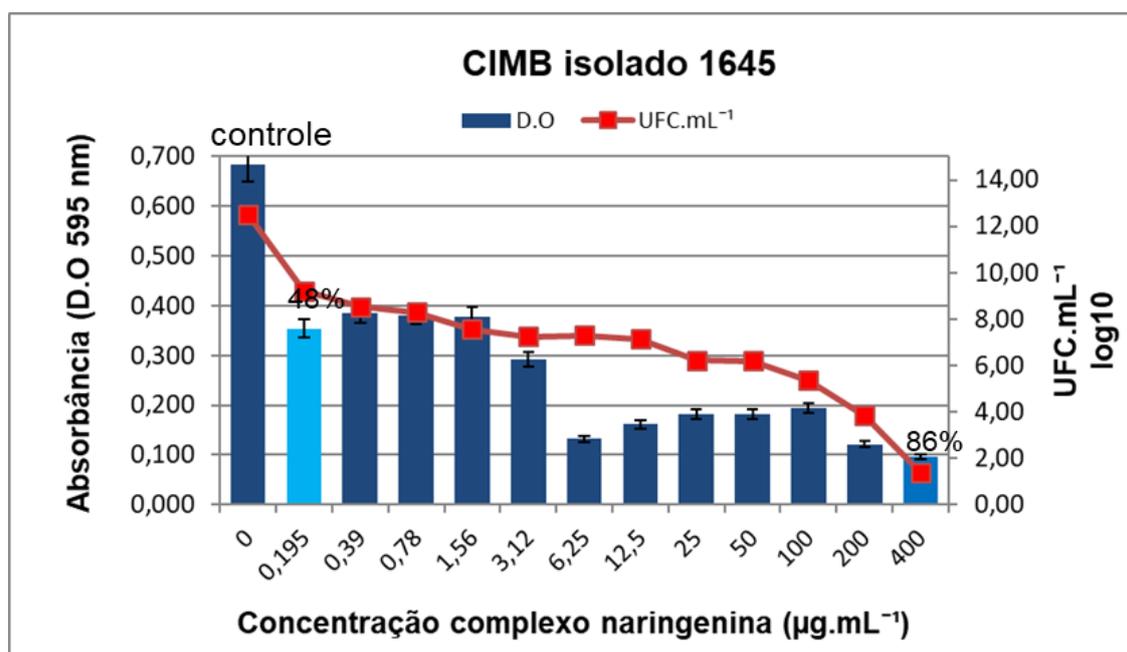
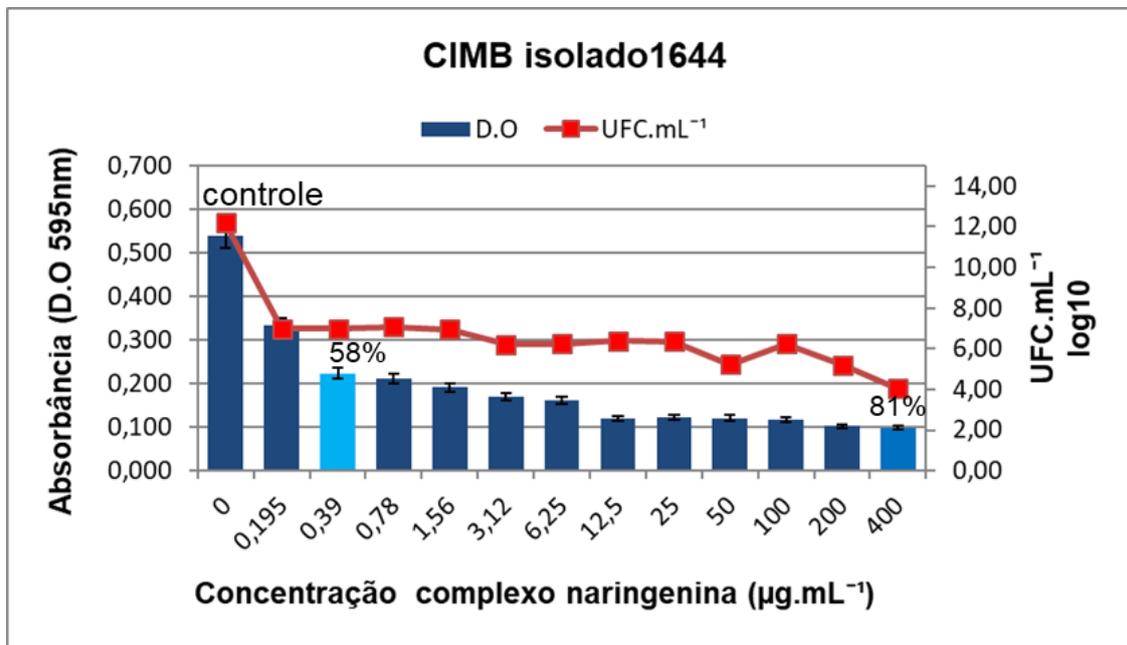


FIGURA 4. 15 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIMB) da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri* dos isolados 1644 e 1645, frente ao complexo naringenina, por absorbância e por por UFC.mL⁻¹ dos inóculos. As barras de erros indicam o desvio padrão.

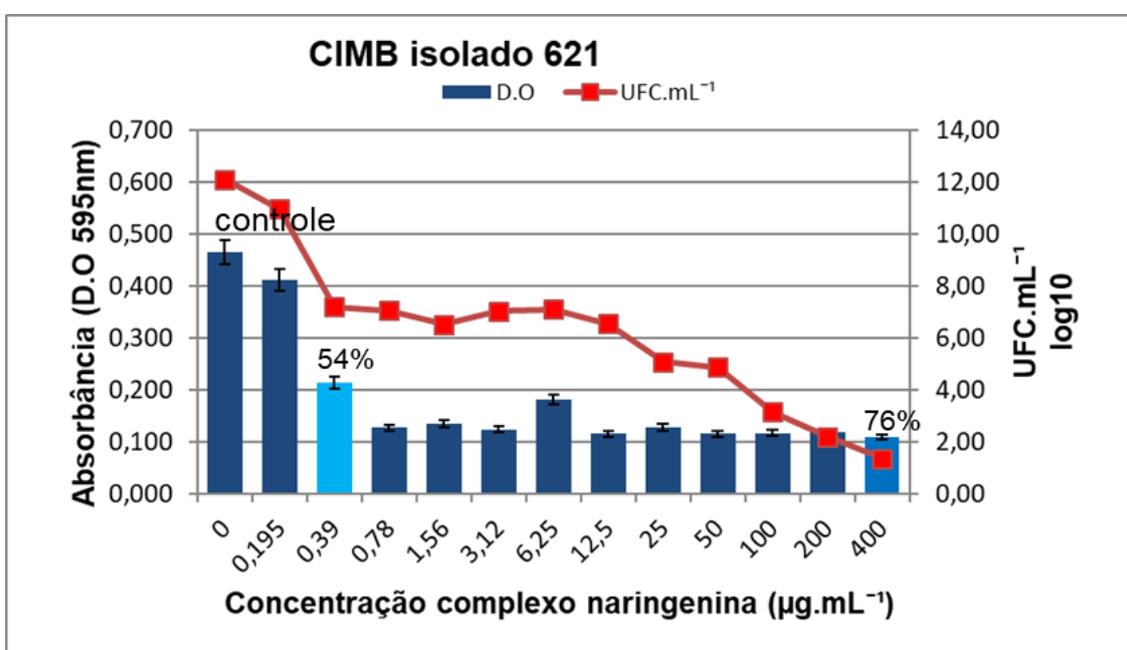
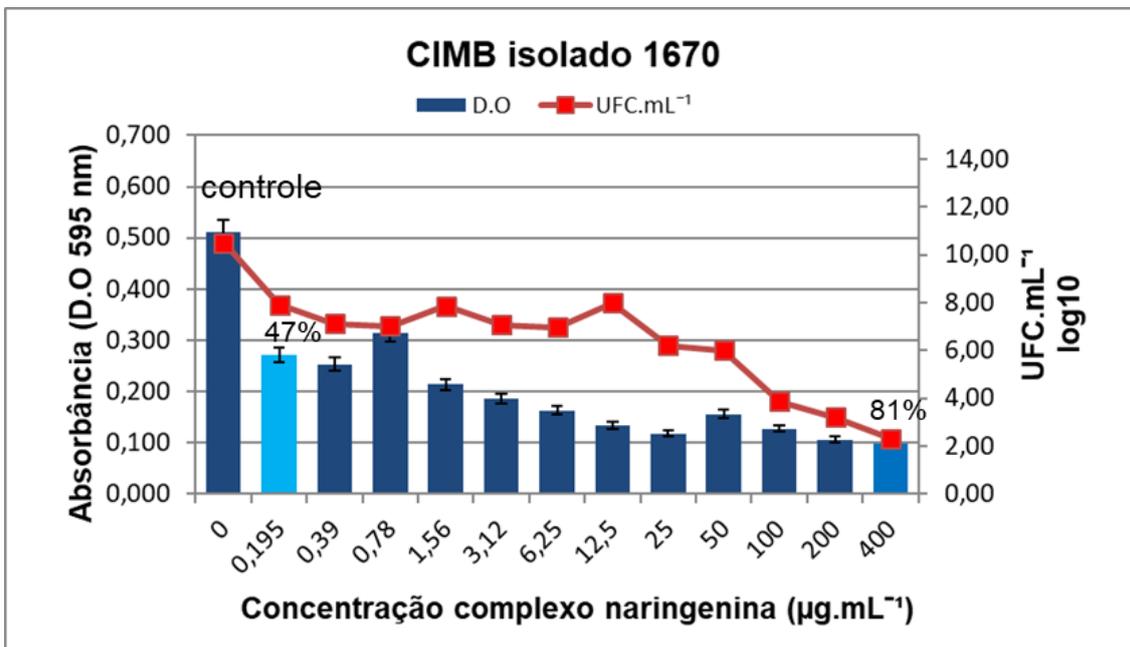


FIGURA 4. 16 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIMB) da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri* dos isolados 1670 e 621, frente ao complexo naringenina, por absorbância e por por UFC.mL⁻¹ dos inóculos. As barras de erros indicam o desvio padrão.

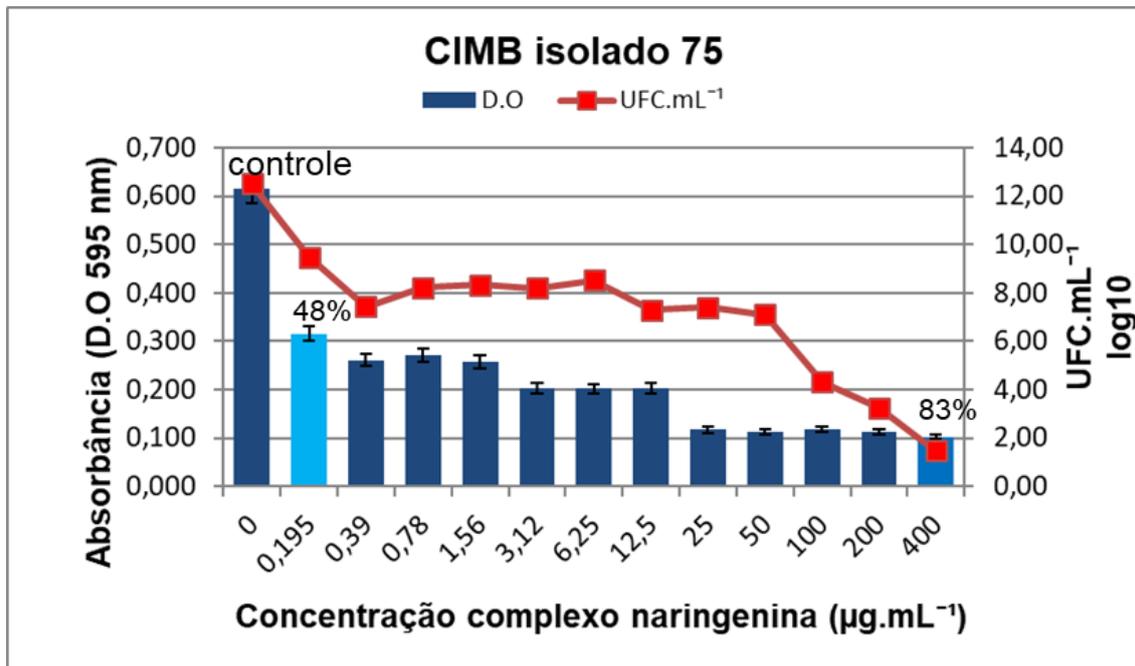


FIGURA 4. 17 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIMB) da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri* do isolado 75 frente ao complexo naringenina, por absorbância e por por UFC.mL⁻¹ dos inóculos. As barras de erros indicam o desvio padrão.

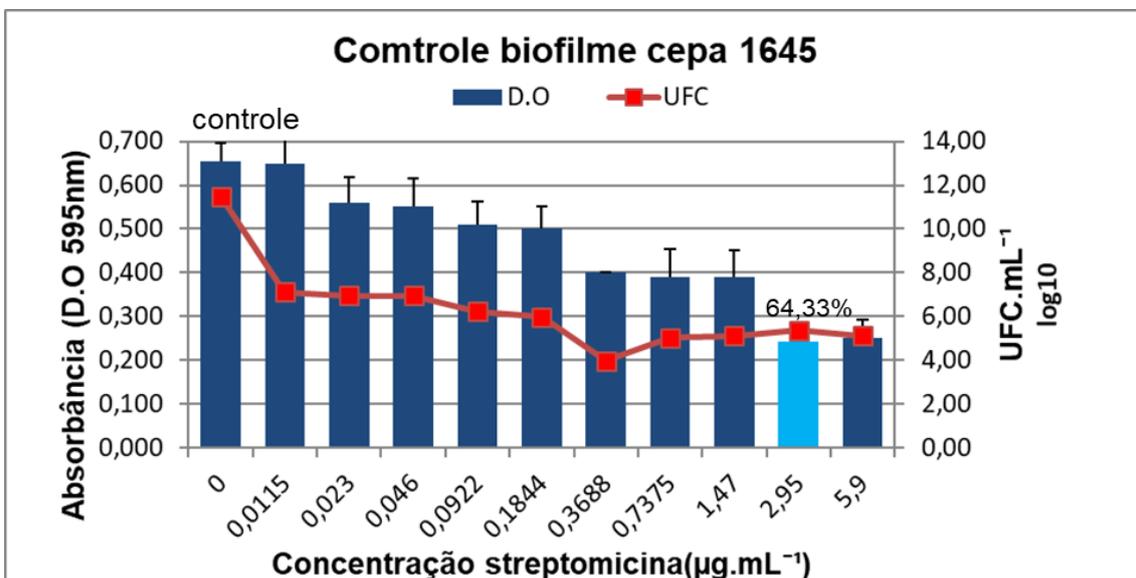
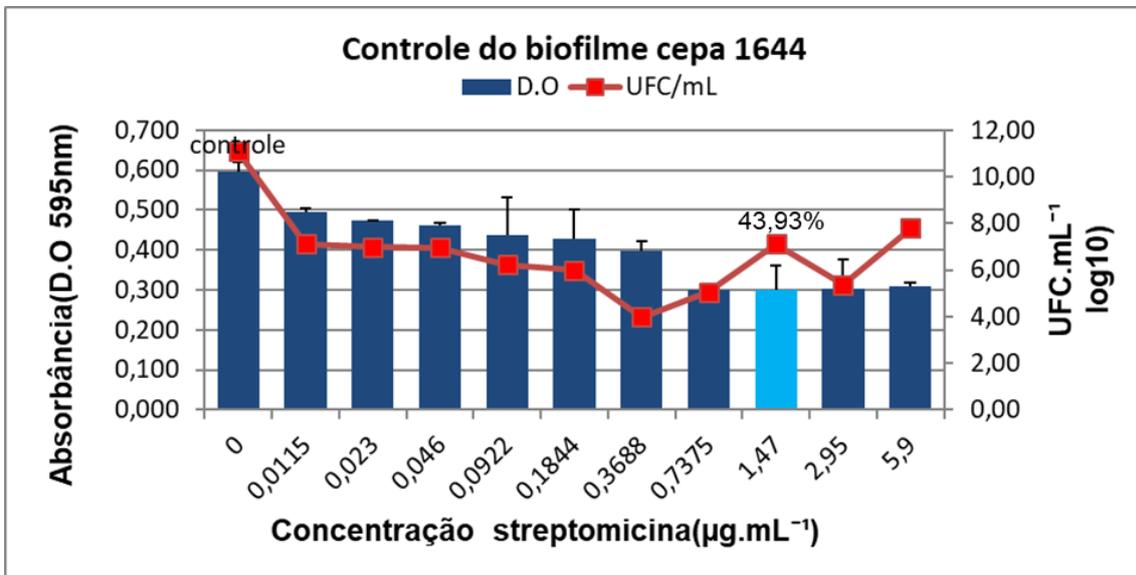


FIGURA 4. 18 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIMB) da bactéria *xanthomonas citri* ssp. *citri* dos isolados 1444 e 1645 frente ao controle positivo streptomicina, por absorbância e por por UFC.mL⁻¹ dos inóculos. As barras de erros indicam o desvio padrão.

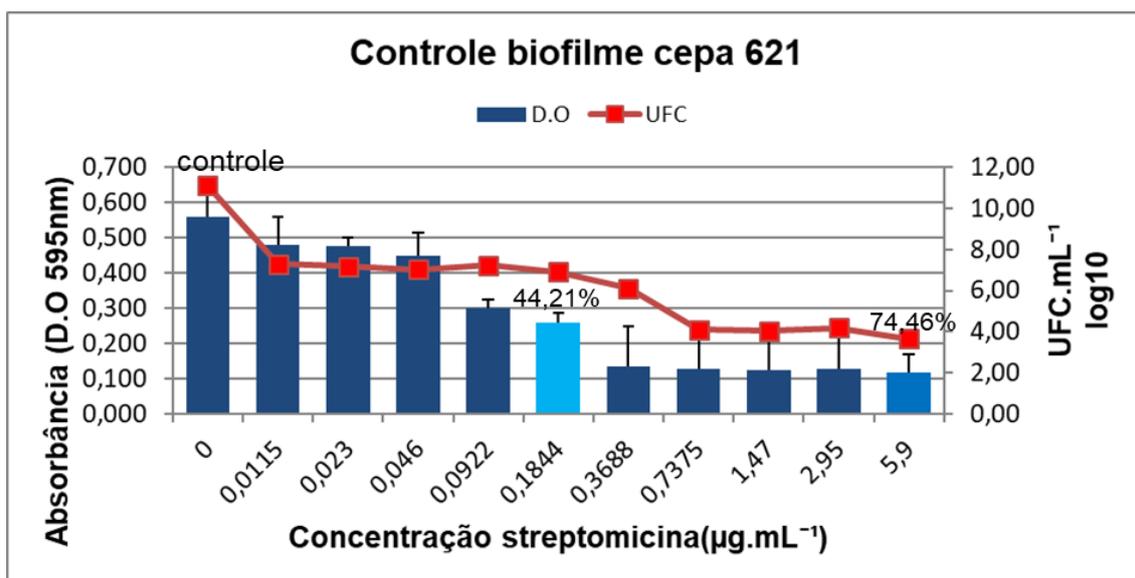
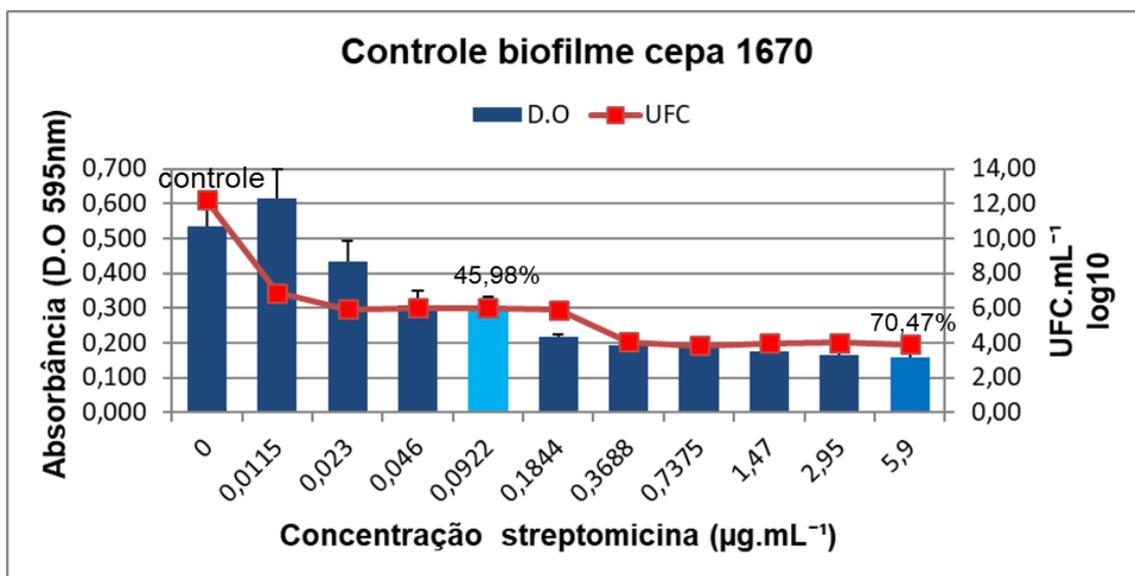


FIGURA 4. 19 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIMB) da bactéria *xanthomonas citri* ssp. *citri* dos isolados 1670 e 621 frente ao controle positivo streptomicina, por absorbância e por por UFC.mL⁻¹ dos inóculos. As barras de erros indicam o desvio padrão.

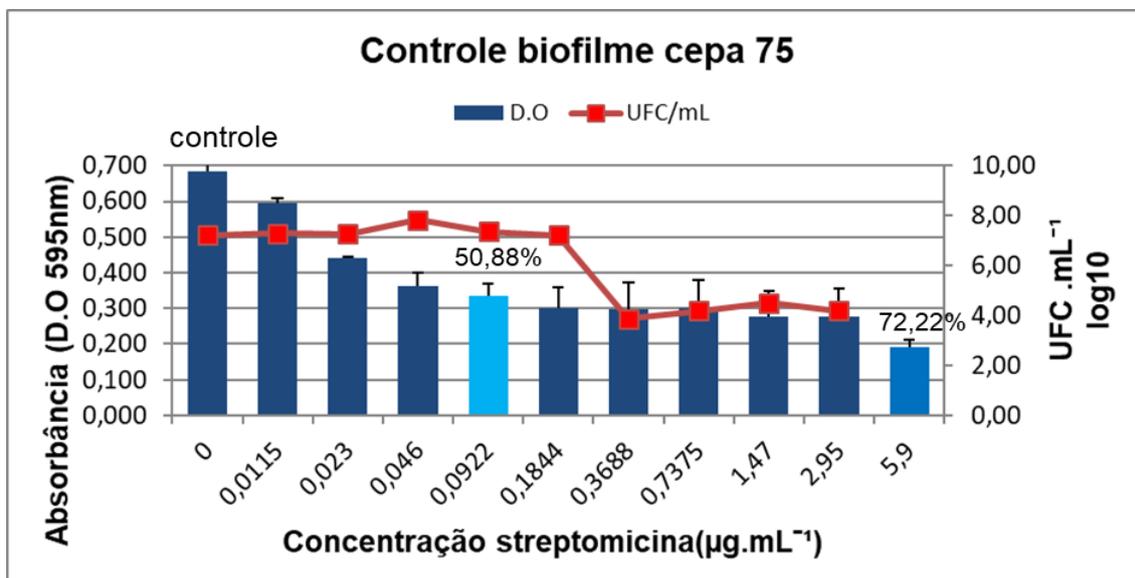


FIGURA 4. 20 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIMB) da bactéria *xanthomonas citri* sp. *citri* do isolado 75 frente ao controle positivo streptomicina, por absorbância e por por UFC.mL⁻¹ dos inóculos. As barras de erros indicam o desvio padrão.

Nos resultados por UFC.mL⁻¹, nos resultados dos controles, o valor de contagem de colônias em log₁₀ ficou numa média de 12. Para os complexos, houve um controle do biofilme onde pode observar que nas concentrações de 50 µg.mL⁻¹ ou 25 µg.mL⁻¹ o número de colônias em log₁₀, decaiu próximo à metade do controle, em valores entre 6 e 7.

LI e WANG, 2013, testaram aminoácidos misturados com cobre para o controle da bactéria *Xantomonas citri* ssp. *citri*. Para o controle (bactéria + meio de crescimento) a quantidade de células do biofilme foi de 9 em log₁₀, já os resultados de inibição dos aminoácidos misturados com Cu frente à bactéria foram de números de colônias em log₁₀ entre 7 e 7,5. Estes resultados demonstram que não houve alta eficiência no controle do biofilme. Os aminoácidos misturados com Cu inibiram o biofilme em apenas 23 %. Já os complexos ensaiados neste trabalho controlaram o biofilme em 70 a 80 %.

PICCHI et al., 2016, utilizou o N-acetilcisteína (NAC) para o controle do biofilme da bactéria *X. citri*. As doses utilizadas para inibição do biofilme foram 2.500,00 µg.mL⁻¹, 4.000,00 µg.mL⁻¹, 5.000,00 µg.mL⁻¹, 6.000,00 µg.mL⁻¹, 7.000,00 µg.mL⁻¹ e 8.000,00 µg.mL⁻¹. O resultado foi avaliado por UFC.mL⁻¹ em Log 10. Utilizando o controle, isto é, a bactéria sem o tratamento como referência, este apresentou 7,5 UFC.mL⁻¹ em Log 10, e os resultados com os tratamentos foram respectivamente de acordo com as concentrações que ela utilizou acima 6,7 UFC.mL⁻¹, 6,0 UFC.mL⁻¹, 3,2 UFC.mL⁻¹, 2,2 UFC.mL⁻¹, 0,3 UFC.mL⁻¹ e 0,0 UFC.mL⁻¹. Observou-se que a concentração que inibiu o biofilme em 50% foi a partir de 5.000,00 UFC.mL⁻¹. Para o controle do biofilme da bactéria *X. citri*, há a necessidade de uma alta dose do NAC.

Comparando a inibição do biofilme bacteriano pelos complexos medido por absorvância e por UFC.mL⁻¹ em log₁₀, nas FIGURAS 4.9 à 4.20, pode-se observar que há um acompanhamento no decréscimo da quantidade de biofilme por absorvância e UFC com o aumento das concentrações dos complexos. Nas barras, que representam os resultados da absorvância, pode-se observar que conforme aumentamos a concentração, as barras decrescem, e o mesmo pode ser visto nas linhas vermelhas que mede a quantidade de colônias da bactéria em log₁₀. Conforme ocorre o aumento da concentração dos complexos, ocorre um decréscimo nas linhas de UFC. Isto pode ser observado em todas as figuras. Como foram testados 5 isolados bacterianos com 3 complexos, e todos os testes

em triplicata, pode-se dizer que estes resultados apresentam grande confiabilidade, uma vez que pode-se observar a uniformidade dos resultados.

Estudos anteriores mostraram que a *X. citri* forma biofilmes na superfície da folha (RIGANO et al., 2007 e LI J., 2011), o que aumenta a epífita sobrevivência da bactéria e desempenha um papel importante na invasão dos espaços intercelulares do hospedeiro pela *X. citri* (RIGANO et al., 2007 e LI J., 2014). Os resultados apresentados neste ensaio, demonstraram que os complexos possuem eficiência também no controle do biofilme, uma vez que este é de grande importância para a sobrevivência da bactéria e no desenvolvimento da doença nas plantas de citrus.

4.3 Ensaio com os complexos frente à bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri* em plântulas de citros cultivadas *in vitro*.

4.3.1 Formação das plântulas de citros

As sementes de citros submetidas à assepsia antes de serem inoculadas no meio de crescimento MS para formação das plântulas foram desinfectadas apenas com hipoclorito de sódio e lavadas com água autoclavada. No protocolo de desinfecção de sementes antes de serem semeadas em meio de crescimento é feita a assepsia também com solução de Captan (Orthocide® 500) e Tiofanato-metilico (Cercobin® 700WP) a 1% e mantidas sob agitação à 90 rpm por 30 min. A exclusão destes dois fungicidas, de classe toxicológica alta, é de grande importância, uma vez o objetivo deste trabalho foi desenvolver moléculas de produtos naturais visados como pesticidas verdes.

Assim como as sementes tratadas com cercobin e captan, as sementes desinfectadas apenas com hipoclorito, apresentaram baixa porcentagem de contaminação, quando semeadas ao meio de crescimento MS suplementado com sacarose.

A emissão da radícula nas sementes pode ser observada 3 semanas após estas permanecerem no escuro. Depois das 3 semanas no escuro, estas plântulas foram levadas para sala com fotoperíodo.¹ Num período de 90 dias corridos, após estarem expostas em fotoperíodo, em temperatura de aproximadamente 25 °C e umidade 60 %, as plântulas apresentavam um tamanho de aproximadamente 10 cm, como mostra na FIGURA 4.21 C. Foi nesse estágio de desenvolvimento das plântulas que iniciaram-se os ensaios com os complexos e com a bactéria *X. citri*.

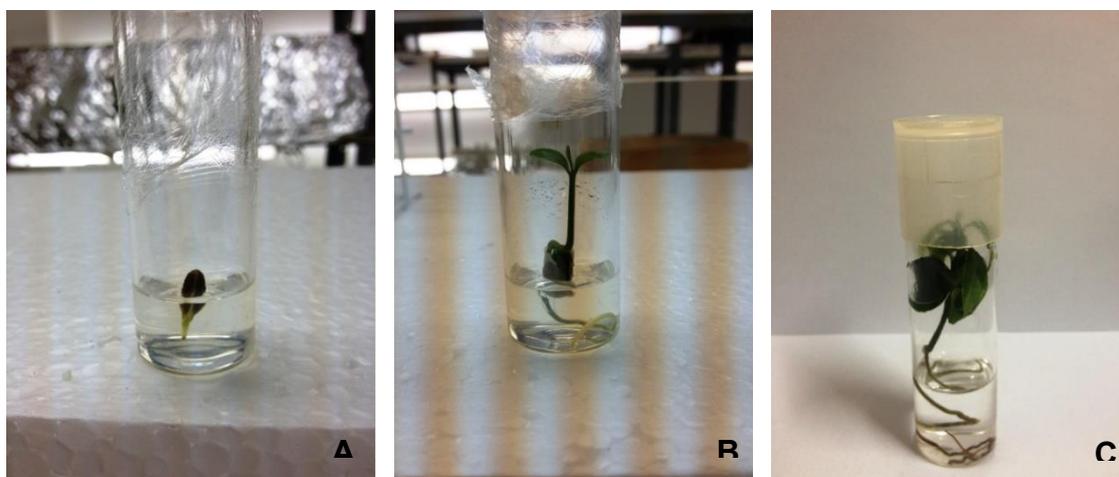


FIGURA 4. 21 - Desenvolvimento in vitro de plântulas de *Citrus sinensis* variedade laranja pêra. A, emissão da radícula da semente em meio de crescimento MS Basal ; B, plântula com aproximadamente 60 dias após inoculação da semente; C, plântulas com 90 dias, tamanho em que foram utilizadas para os ensaios com os complexos frente à bactéria *X. citri* e também para visualização em microscópio de epifluorescência das folhas.

4.3.1 Visualização interna do complexo hesperidina nas plântulas de citrus tratadas com os complexos via sistêmico e translaminar.

Após as plantas atingirem tamanhos de aproximadamente 10 cm e já apresentavam uma quantidade maior de folhas, estas foram tratadas com o complexo hesperidina via seu meio de crescimento por ação sistêmica e translaminar com o objetivo de descobrir o modo de ação destes complexos nas plântulas.

Estudos pré-liminares feitos por DA SILVA, 2013, haviam mostrado o efeito inibitório destes complexos frente à bactéria *Xylella fastidiosa*, agente etiológico da doença Clorose Variegada do Citrus (CVC), onde plantas de citros em casa de vegetação foram tratadas com os complexos e após realização de PCR em Tempo Real, observou-se uma grande diminuição na quantidades de células desta bactéria. Por isso também o interesse em estudar o modo de ação desses complexos. Caso estes apresentassem ação sistêmica, isso seria de grande importância para plantas infectadas com a bactéria *Xylella fastidiosa*, uma vez que essa bactéria coloniza o xilema das plantas e bactericidas que não possuem via de ação sistêmica, não teria eficácia contra essa doença do citros e outras que colonizem os vasos condutores de plantas, como por exemplo o Greening, doença do citros causada pelas bactérias *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Candidatus Liberibacter americanus* que colonizam o floema das plantas de citros. Já para a bactéria *Xanthomonas citri*, esta coloniza o mesófilo das folhas, portanto tanto a ação sistêmica como translaminar seria eficaz no seu controle.

Para esse estudo, escolheu-se o complexo hesperidina, visto que este na presença de luz UV emite fluorescência, possibilitando as análises através do uso de um microscópio de epifluorescência caso este penetrasse na planta por alguma via.

Nos cortes verticais feitos nas plântulas tratadas com o complexo hesperidina, no microscópio Leica DM 5000B com Câmera de Fluorescência DFC340 FX, foi possível verificar a presença do complexo no mesófilo das folhas

das plântulas que foram tratadas via ação sistêmica, como mostra a FIGURA 4.22. No tratamento translaminar, não foi encontrado sinais do organometálico no mesófilo das folhas.

Na Figura 4.22, a imagem A representa a visualização do mesófilo da folha de uma plântula de citros tratada apenas com o meio de crescimento MS. A imagem B representa a visualização do mesófilo da folha de uma plântula de citros tratada com o complexo hesperidina. A emissão de luz do microscópio de epifluorescência está com a mesma intensidade para as imagens A e B. A planta de citros também emite luminescência azul, porém comparando as imagens pode-se dizer que em B a intensidade de luminescência foi muito maior.

Foram feitos 2 tratamentos com 5 repetições, plântulas só no meio de crescimento MS e plântulas tratadas com o complexo hesperidina pela raiz. As imagens foram visualizadas em todas as 10 plântulas. Portanto, através da imagem B, podemos afirmar que o complexo hesperidina está presente no mesófilo das folhas, e por este ter sido aplicado via raiz e ter sido encontrado nas folhas, podemos afirmar que a sua via de ação é sistêmica.

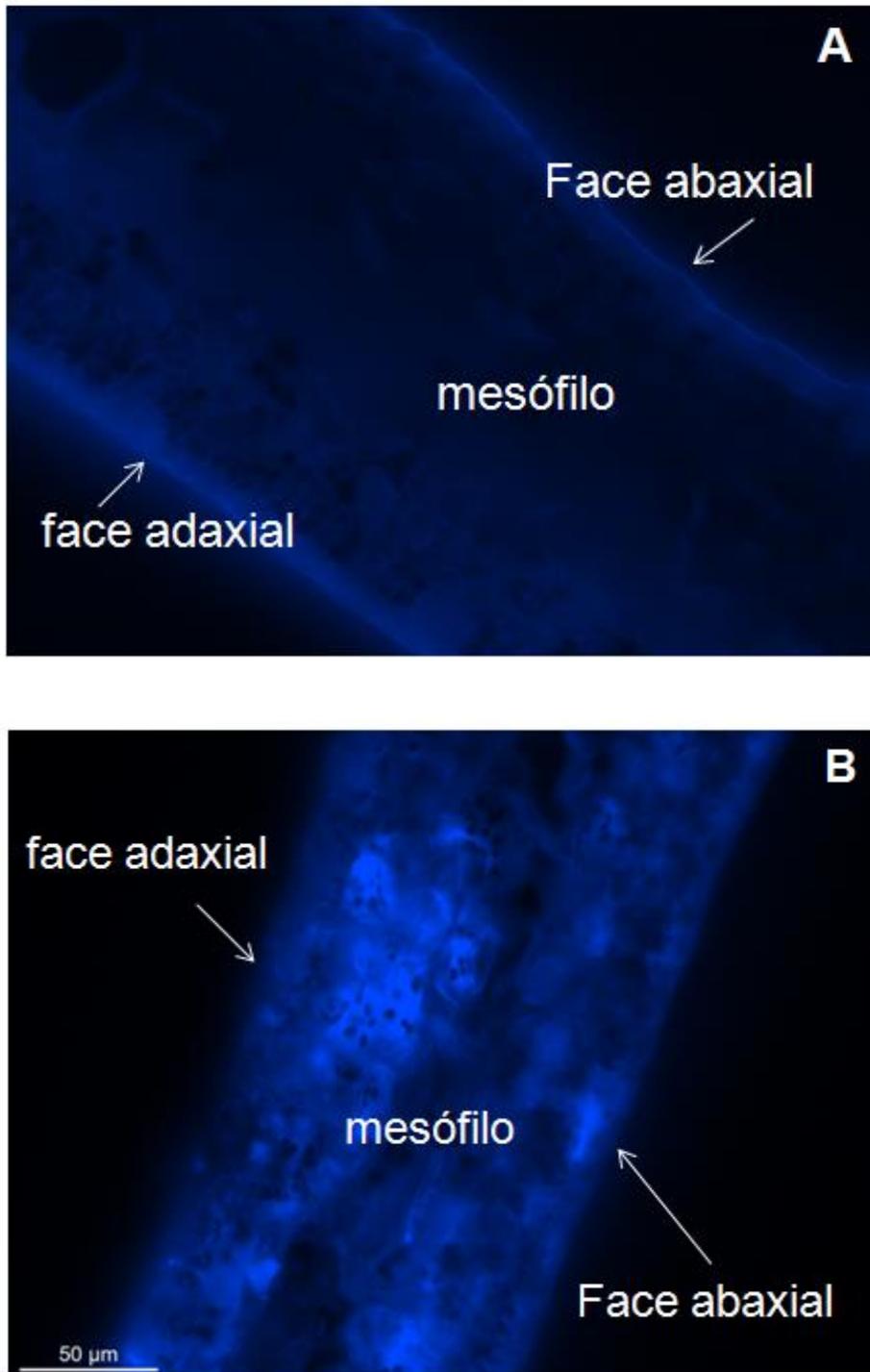


FIGURA 4. 22 - Imagem de uma folha de citros cortada verticalmente. onde pode ser observado o mesófilo da folha e suas faces adaxial e abaxial. A; imagem do mesófilo de uma folha retirada de uma plântula de citros presente em meio MS líquido. B; imagem do mesófilo de uma folha retirada de uma plântula de citros presente em meio MS líquido contendo o complexo hesperida.

SURESH et al., 2015, visualizou imagens por fluorescência de acetamiprida, inseticida neonicotinoide sistêmico, em folhas de repolho através de uma sonda ligada ao inseticidas. A molécula de acetamiprida ligada à sonda foi aplicada nas raízes das plantas de repolho e visualizada nas folhas por microscópio confocal para imagens de fluorescência.

YANG, et al., 2017, avaliou por imagens de fluorescência o comportamento de dois fungicidas, o triabendazol que é sistêmico e o não sistêmico Ferban, comparando a penetração e persistência desses dois fungicidas nas plantas. As moléculas dos fungicidas foram ligadas a uma sonda e suas imagens visualizadas por um microscópio DXR Raman. A visualização dos fungicidas por imagens de fluorescência permitiu o monitoramento destes por toda a parte da planta, verificando a profundidade de penetração, no caso do fungicida não sistêmico e a área atingida por esses fungicidas na planta.

Compreender o comportamento dos pesticidas nas plantas é importante para haver uma aplicação efetiva. O controle bem-sucedido de ervas daninhas, pragas e doenças depende do agroquímicos alcançar o local-alvo específico em particular para cada organismo. Melhoria da retenção e cobertura de pesticidas na superfície da planta após a aplicação foliar é um atributo importante, porque pode potencialmente aumentar a bioeficácia de compostos, GENT et al., 2003. Isto é especialmente verdadeiro para inseticidas e fungicidas, onde a distribuição dos compostos em uma maior área da superfície da planta provavelmente proporcionará melhorias na proteção das culturas contra pragas e doenças.

Aplicações sistêmicas podem ser realizadas através de gotejamento (incluir pesticidas na irrigação por gotejo), drench, irrigação por sulco na base das plantas. Todos estes métodos dependem do agroquímico movimentar-se sistemicamente das raízes para partes foliares das plantas protegendo-as contra pragas e doenças, CAMERON et al., 2016.

Devido à automatização na agricultura, praticidade e a importância da economia e preservação da água no planeta, muitas culturas em todo o mundo atualmente possuem irrigação por gotejo. Dados recentes publicados indicam que de 2003 a 2008, a área sob irrigação por gotejamento nos Estados Unidos aumentaram de 729.108 ha para 953.552 ha, NASS, 2008b. A irrigação por gotejamento tem muitos benefícios sobre a irrigação por aspersão, como manter a folhagem seca e, portanto, reduzir potencialmente doenças fúngicas e

bacterianas, além de diminuir em 40% o uso da água, BISCONER, 2010. Porém, para tudo isso, é necessário que os pesticidas tenham o seu modo de ação sistêmico.

4.3.2 Tratamentos com os complexos frente às plântulas contaminadas pela bactéria *X. citri*.

4.3.2.1 Contaminação artificial das plântulas pela bactéria *X. citri*.

Para os ensaios em plântulas de citros, escolheu-se o isolado da *X. citri* 1645, por ser um isolado resistente ao cobre.

A inoculação da bactéria nas plântulas foi feita imergindo a parte aérea destas na solução bacteriana de concentração 10^8 UFC.mL.

Os métodos de inoculação da bactéria *X. citri* em plantas de citros são diversos (BELASQUE et al., 2008), por exemplo, em um experimento onde quantificava o diâmetro de leões de cancro cítrico, a contaminação das plantas pela bactéria foi de duas formas: ferimento no limbo foliar com agulha de 0,55x0,20 mm imediatamente após a imersão da mesma na suspensão bacteriana e por aspersão da suspensão bacteriana nas folhas até o ponto de escorrimento, em todas as folhas das plantas. A concentração do inoculo utilizada foi de 10^6 UFC.mL⁻¹.

LI E WANG, 2013, em seus ensaios de inibição da bactéria *X. citri*, inocularam a bactéria nas folhas por aspersão da suspensão bacteriana numa concentração de 10^8 UFC.mL⁻¹, e segundo os autores é o método que mimetiza uma infecção natural, pois a entrada da bactéria ocorre através da abertura dos estômatos.

SILVA, et al., 2013, que ensaiou a atividade antimicrobiana do ácido gálico, utilizou o método de inoculação da bactéria por seringa epidérmica na face abaxial da planta utilizando uma concentração bacteriana de 10^8 UFC.mL.

Portanto, nota-se que são diversas as forma de inoculação bacteriana em experimentos com *Xanthomonas citri* em citros.

Para este experimento com plântulas, o método por ferimento seria inviável, pois as folhas das plântulas são pequenas e finas, comparadas a plantas de citros grandes de casa de vegetação. O método mais viável seria a inoculação por aspersão, porém, por estas plântulas estarem sendo mantidas *in vitro* em meio de cultura de crescimento e este, rico em macro e micronutrientes, existiriam o risco da bactéria desenvolver nesse meio de crescimento. Portanto, adotou-se uma metodologia que mais aproximasse do método de aspersão, que foi mergulhando a parte aérea das plântulas em solução bacteriana e retornadno-as ao seu meio de crescimento.

LLORENS, et al., 2015, em um experimento em casa de vegetação, promovia a inoculação da bactéria *X. citri* em mudas de citros nos horários entre 9:00 à 12:00, horário em que os estômatos estão abertos.

No experimento desenvolvido na presente tese, as plântulas foram mergulhadas na solução bacteriana perto das 12 h, horário em que estas estavam expostas por um longo tempo sob a luz, e, portanto com os estômatos abertos.

As plântulas sadias de citros que foram contaminadas artificialmente com a bactéria *X. citri* manifestaram os sintomas 15 dias após a imersão destas em meio de concentração bacteriana de 10^8 UFC.mL⁻¹, apresentando pústulas salientes de coloração marron-clara, como mostra na FIGURA 4.23.

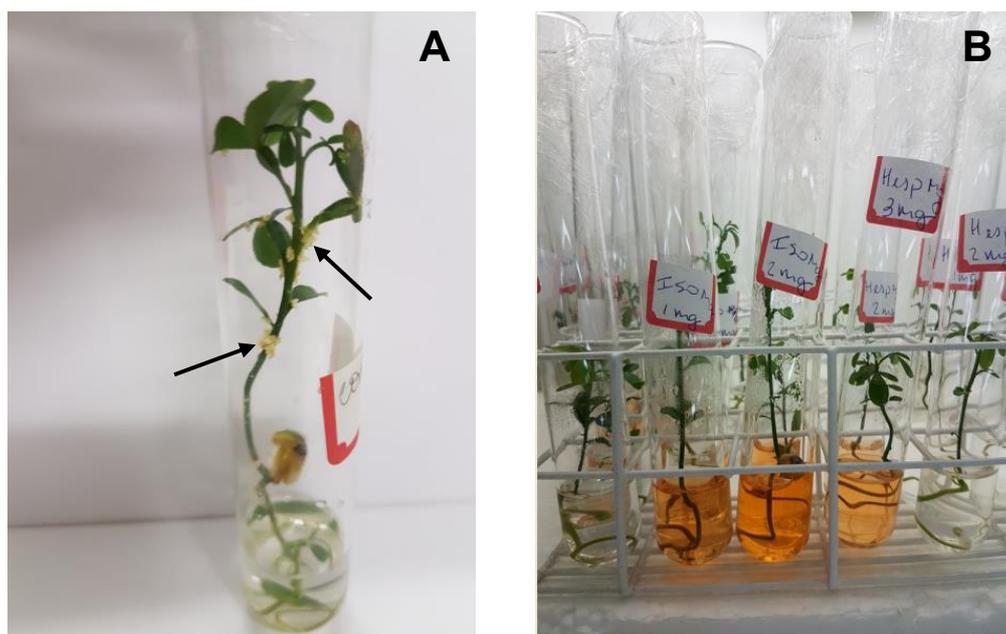


FIGURA 4. 23 - A, plântula com sintomas do cancro cítrico; B, tratamento das plântulas com os complexos.

4.3.2.2 Tratamento preventivo com os complexos.

O tratamento preventivo é uma medida de controle baseada na proteção. A proteção, prevenção do contato direto do patógeno com o hospedeiro, é comumente obtida pela aplicação de fungicidas ou bactericidas visando diretamente o patógeno. A proteção química torna-se uma medida indispensável de controle, apesar de nem sempre suficientemente eficaz (BERGAMIN et al., 1995). Portanto o tratamento preventivo consistiu na aplicação dos complexos via ação sistêmica, antes que as plântulas tivessem o contato com o patógeno. Após 3 dias corridos dos tratamentos, as plântulas foram imersas em solução bacteriana de 10^8 UFC.mL⁻¹ e retornadas para sala de crescimento com fotoperíodo.

LLORENS et al., 2015, ensaiou o ácido hexanóico como um indutor de resistência em plantas de citros contra a bactéria *X. citri* utilizando 2 tipos de tratamentos preventivos, em plantas de 6 meses em casa de vegetação, 1 via

pulverização nas folhas o outro via drench no solo onde as mudas estavam plantadas. Nos seus resultados, os dois métodos foram eficazes, porém o método sistêmico, que seria o drench, protegeu a planta por mais tempo da doença.

SILVA, et al., 2013, avaliou o efeito antimicrobiano do ácido gálico frente a bactéria *X. citri*, onde plantas de citros foram inoculadas com a bactéria via seringa epidérmica e após 4 semanas, com o aparecimento dos sintomas, uma solução preparada com ácido gálico foi pipetada em cima da lesão. Portanto, este autor utilizou um tratamento curativo via ação de contato.

OLIVEIRA et al., 2016, avaliou a atividade antimicrobiana de metabólitos extraídos de *Pseudomonas aeruginosa* frente à bactéria *X. citri*. Este avaliou dois tipos de tratamentos, um preventivo, pulverizando as folhas de citros sadias com os antimicrobianos em teste, e 24 h depois pulverizando a solução bacteriana dev d *X. citri* na concentração de 10^8 UFC.mL e o outro tratamento, o curativo, onde pulverizou a solução bacteriana e depois de 24 h pulverizou os metabólitos. Seus resultados foram avaliados por contagem de número de lesões, onde o tratamento preventivo foi mais eficaz que o curativo.

A FIGURA 4.24 representa os resultados deste tratamento. Os tratamentos foram feitos em 3 doses diferentes e avaliados após 15 dias da inoculação bacterina sobre as plântulas.

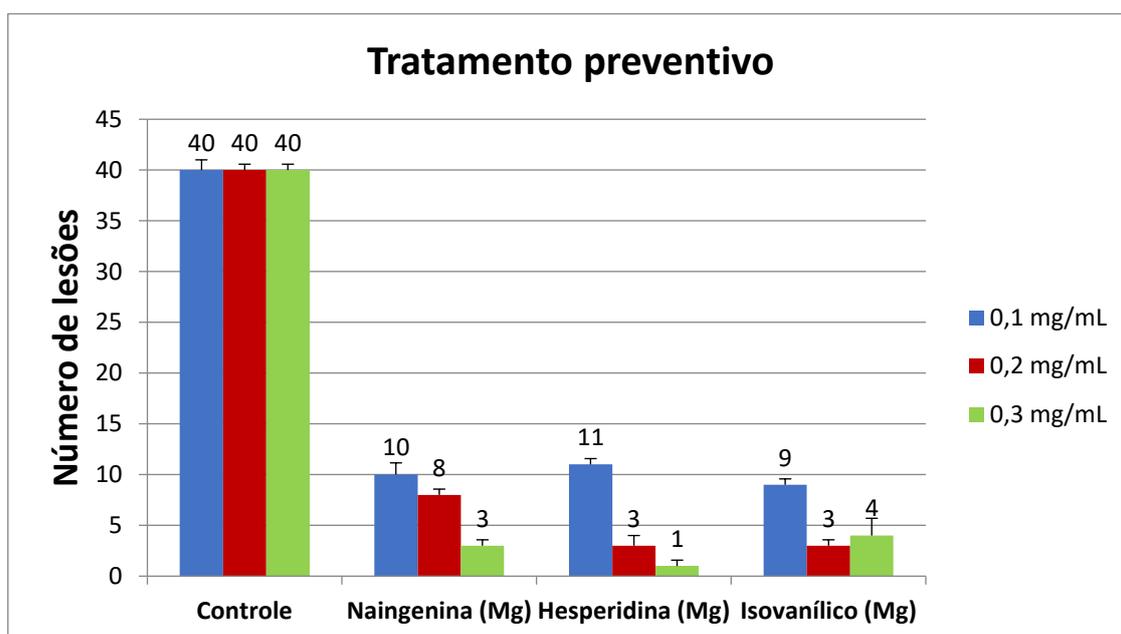


FIGURA 4. 24 - Resultados das plântulas de citros com cancro tratadas preventivamente com os complexos. As barras de erros indicam o desvio padrão.

Para cada tratamento, utilizou-se 3 plantas controle, lembrando que as plantas controle foram aquelas que apresentavam a doença do cancro cítrico e não foram tratadas com os complexos, apenas mantidas no seu meio de crescimento.

Nos resultados da FIGURA 4.24, pode-se observar que as plantas controle, apresentaram uma média de 40 lesões (cancros) por planta. Nos tratamentos com os complexos, houve o aparecimento de algumas lesões, porém em quantidade inferior ao controle.

O aparecimento de alguns cancos nas plântulas tratadas é aceitável, pois como mostra a Figura 4.22 nas imagens de fluorescência do complexo hesperidina, este não ocupa totalmente o mesófilo da folha, permitindo que as bactérias entrem nos espaços onde não tem o complexo. É o que se espera dos outros complexos, ou de qualquer outro produto sistêmico, porém estes impediram que a bactéria se proliferasse. Também, a parte aérea da plântula foi imersa totalmente na solução bacteriana, deixando-a muito mais exposta à bactéria.

CAMERON, et al., 2016, conduziram um experimento onde para determinar a redução da mosca branca em folhas de algodão, quando aplicado imidaclopride, um inseticida sistêmico, os autores utilizaram uma solução de sal de sódio que ao ser absorvida pela planta emite fluorescência, e ao se alimentar destas folhas, a mosca branca emitia fluorescência, sendo possível o seu monitoramento. O sal foi absorvido pela planta por via sistêmica, e nas imagens, por microscópio de fluorescência, foi possível observar nas folhas do algodão os espaços em que não estavam sendo ocupados pelo sal fluorescente. Portanto, são nestes espaços das folhas, hastes ou frutos, que estão desprotegidos, que quando aplicado um fungicida sistêmico, os microrganismos vão penetrar, porém a eficácia do produto utilizado impedirá a proliferação do fitopatógeno.

4.3.2.3 Tratamento curativo sistêmico com complexos.

Uma vez a planta já doente, o último princípio de que se pode lançar mão é a terapia ou cura, isto é, a recuperação da sua saúde mediante a eliminação do patógeno infectante ou propiciando condições favoráveis para a reação do hospedeiro. A terapia é ainda, apesar da descoberta dos quimioterápicos, de aplicação muito restrita em fitopatologia, por suas limitações técnico-econômicas, contrapondo-se ao uso mais generalizado de todos os outros princípios que, no conjunto, recebem a denominação de prevenção ou profilaxia. No controle de doenças de plantas é ainda válido o ditado “Melhor prevenir do que remediar”. Um exemplo de método terapêutico é o uso de fungicidas sistêmicos (BERGAMIN et al., 1995). Porém, essas definições sugerem uma precisão inexistente no mundo real de manejo de doenças (EVERSMeyer e KRAMER, 1987). Portanto, sabemos que é impossível um controle apenas preventivo, uma vez que sempre há o aparecimento da doença.

As plântulas foram infectadas com a bactéria *X. citri* por imersão da parte aérea na solução bacteriana e retornadas ao seu meio de crescimento e em sala de fotoperíodo. Após 15 dias com o aparecimento dos sintomas, iniciou-se os tratamentos curativos aplicando as doses de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ de cada complexo.

SPAGO, et al, 2014, ensaiaram metabólitos secundários com atividade antimicrobiana frente à bactéria *X. citri*, avaliando tratamentos preventivo e curativo. Plantas de citros de 6 meses em casa vegetação foram inoculadas pela bactéria via pulverização de suspensão bacteriana onde sua penetração no mesófilo aconteceria pela abertura dos estômatos. Os autores avaliaram os resultados por contagem de lesões da doença. Porém o tratamento preventivo consistiu em pulverizar 3 doses dos metabólitos e 24 h depois pulverizar a bactéria na planta, no tratamento curativo o inoculo bacteriano foi pulverizado 24 horas e depois pulverizou os metabólitos nas 3 diferentes doses. Seu tratamento preventivo teve uma diminuição das lesões em 85 %, e os resultados quanto às diferentes doses aplicadas não houve diferenças significativas, já seu tratamento curativo, não teve eficiência, sugerindo que estes metabólitos seriam indutores de resistência.

OLIVEIRA et al., 2016, ensaiaram compostos bioativos com organocobres frente à bactéria *X. citri*, avaliando ensaios preventivos e curativos em casa de vegetação com mudas de citros, onde pulverizou-se os compostos nas folhas de citros e 24 horas depois pulverizou o inoculo bacteriano e no tratamento curativo pulverizou o inoculo e depois de 24 h pulverizou os composto. Os resultados foram avaliados 21 dias após os tratamentos. Os dois tratamentos obtiveram resultados satisfatórios, porém o preventivo apresentou número menor de lesões comparado com o curativo.

A FIGURA 4.25 apresenta os resultados do tratamento curativo com os complexos. As plântulas foram tratadas pelos complexos e controle positivo sulfato de cobre via raiz, após 15 dias da inoculação da bactéria, período em que os sintomas já estão bem visíveis.

Na FIGURA 4.25 as barras em azul representam as médias do número de lesões em que as plantas apresentavam no dia que iniciou o tratamento, isto é, no dia em que estas foram colocadas no meio de crescimento com os complexos. Note que após 15 dias da contaminação, algumas plântulas apresentavam número maior de lesões, porém a comparação se ocorreu o controle da doença ou não, deve ser feita a partir do ponto de partida do número de lesões de cada plântula do seu respectivo tratamento. A avaliação dos resultados foi por contagem de lesões da doença em 15, 26 e 40 dias. O controle foi plântulas tratadas apenas com seu meio de crescimento MS.

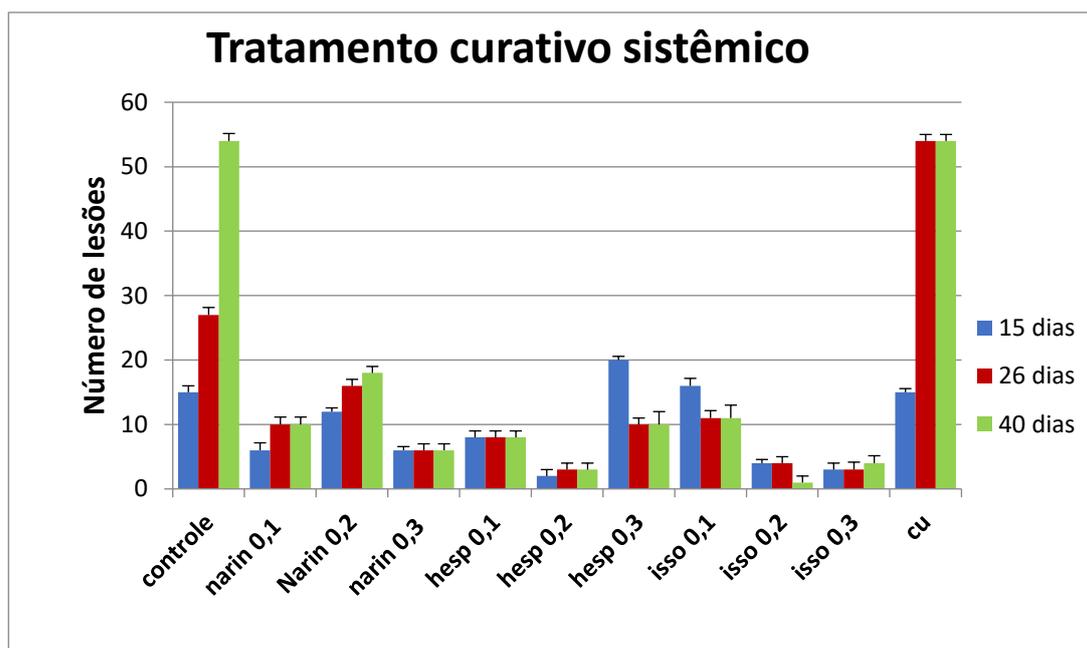


FIGURA 4. 25 - Tratamento curativo com os complexos em três doses e avaliado em três períodos. As barras de erros indicam o desvio padrão.

Os resultados demonstraram eficiência dos complexos frente à bactéria *X. citri*. No tratamento controle, as plantas infectadas com a bactéria sem tratamento com os complexos, no início apresentava sintomas com número de 15 lesões, no final do experimento, em 40 dias, este número foi para 54 lesões, demonstrando o desenvolvimento da doença nas plântulas. Com o tratamento positivo, o cobre, também houve um aumento no número de lesões, já no 26º dia, o número de lesões passou de 14 para 54. Nos tratamentos com os complexos, observou-se que não houve desenvolvimento da doença, isto é, o número de lesões permaneceu constante do início ao fim do experimento, em alguns casos um pequeno aumento das lesões durante os tratamentos, como no caso da naringenina nas doses de 0,1 e 0,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

A concentração que obteve melhor resultado, foi a concentração de 0,3 mg.mL^{-1} para os três complexos.

Após o experimento com as 3 doses dos complexos, realizou-se um terceiro experimento utilizando a dose de maior eficiência de controle da doença, 0,3 mg.mL^{-1} . Os resultados foram avaliados pelos sintomas da doença através da contagem do número de lesões e também pela contagem de UFC.mL^{-1} ,

quantificando o número de células bacterianas presentes nas folhas das plantas de citros após o tratamento com os complexos.

Desta vez a eficiência dos complexos frente à bactéria *X. citri*, foi avaliada por contagem do número de lesões e por Unidade Formadora de Colônia (UFC) isolando a bactéria das plantas a partir dos cancrs formados antes e depois dos tratamentos.

A FIGURA 4.26 representa os resultados por contagem de número de lesões das plantas controle, tratamento positivo (cobre) e tratamento com os complexos.

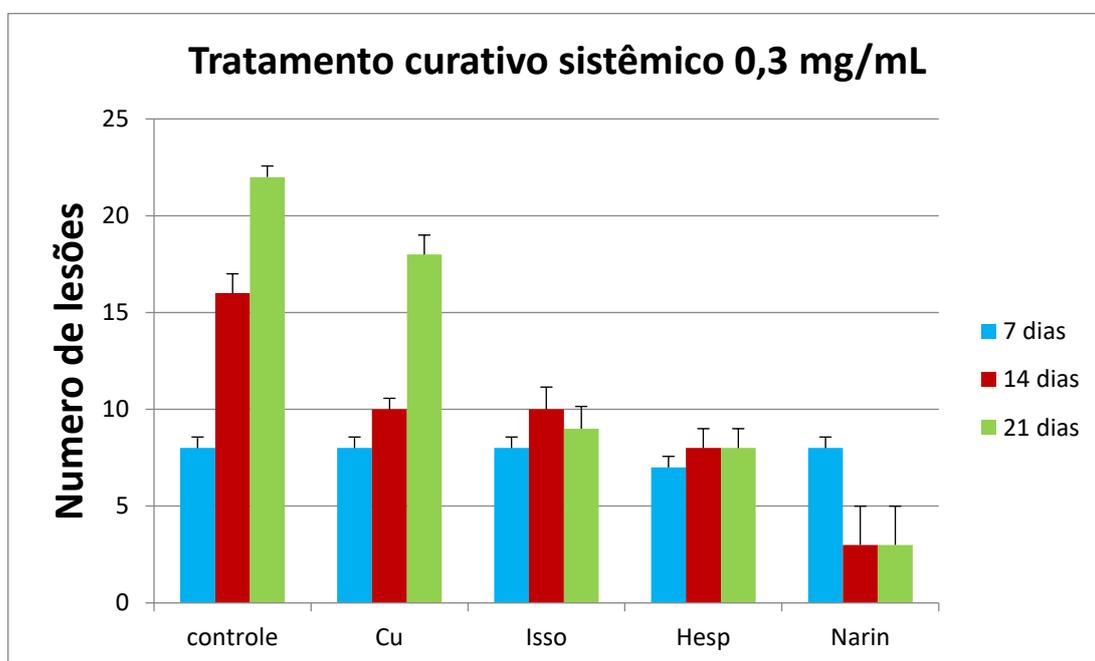


FIGURA 4. 26 - Resultado do tratamento curativo dos complexos e do tratamento positivo com uma dose selecionada. As barras de erros indicam o desvio padrão.

As barras em azul representam a quantidade de bactéria no início do tratamento com os complexos. Depois de 7 dias realizou-se a avaliação e depois de 14 dias a última avaliação de controle.

Estes resultados mostram, assim como na FIGURA 4.25, a eficiência dos complexos frente ao controle da bactéria *X. citri*. No controle, onde a planta

estava contaminada com a bactéria, porém não sofreu nenhum tipo de tratamento quimioterápico, apenas permanecendo em seu meio de crescimento, o número de lesões de 8 subiu para 22, isto é 137,5% a mais que o início. O cobre, também não apresentou eficiência no controle da bactéria, lembrando que o cobre não tem ação sistêmica. Os complexos mantiveram o número de lesões, com uma pequena porcentagem de aumento ao 15º dias, mas em seguida mantendo-se constante. No tratamento com o complexo naringenina houve diminuição das lesões, provavelmente isto se deve a união de uma lesão próxima à outra, pois uma vez formada a lesão, por mais que a bactéria morra naquele local, a lesão irá permanecer. Mesmo que o complexo tenha um efeito cicatrizante, que é uma das funções benéficas dos flavonóides, ainda assim teria um sinal da lesão.

4.4 Quantificação dos complexos em HPLC-UV.

Através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foi possível quantificar o consumo dos complexos inseridos ao meio de crescimento das plântulas durante os tratamentos contra a bactéria *X. citri*.

As imagens de epifluorescência realizadas com amostras de folhas das plântulas de citros tratadas via raiz com o complexo hesperidina, demonstraram que este complexo possui via de ação sistêmica, isto é, pode ser absorvido via raiz e alcançar as folhas das plantas, preenchendo o seu mesófilo e oferecendo proteção contra a penetração de microrganismos, neste caso a bactéria *X. citri*, que foi o alvo do estudo.

Não se sabe se os outros dois complexos estudados neste trabalho possuem via de ação sistêmica como o complexo hesperidina. Por estes outros complexos não emitirem fluorescência frente à luz UV não foi possível suas visualizações por microscópio de epifluorescência.

DA SILVA, 2013, estudou o complexo hesperidina e naringenina como antimicrobianos frente à bactéria *Xylella fastidiosa*, causadora da doença Clorose Variegada do Citros (CVC). A metodologia utilizada para o tratamento das plantas, uma vez que esta bactéria coloniza o seu xilema, consistiu no acoplamento de uma seringa na base do tronco de mudas de citros de 9 meses

contaminadas com a bactéria *X. fastidiosa*, contendo os complexos diluídos em água. O objetivo da metodologia foi que a planta absorvesse essas soluções presentes nas seringas estando em condições de estresse hídrico. Os resultados através de quantificação por qPCR das células de *X. fastidiosa*, depois dos tratamentos com os complexos, foram promissores. Por isso o interesse no comportamento da via de ação desses complexos nas plantas.

Portanto, o HPLC irá certificar, através da quantificação dos complexos inseridos no meio de crescimento das plântulas se estes possuem ação sistêmica ou não.

MURANAKA et al., 2013, quantificou N-Acetylcysteine(NAC) em HPLC – UV, com o objetivo de certificar se a molécula NAC era absorvida pelas plantas. O NAC foi adicionado em solução nutritiva que tratava as plantas de citros. A concentração do NAC em solução nutritiva foi quantificada antes e depois do tratamento com as plantas em HPLC – UV. Através de uma quantificação nominal pode-se calcular a concentração do NAC no meio nutritivo e assim avaliar sua absorção pela planta.

As condições cromatográficas utilizando uma coluna C18, 4,6 x 150 mm, 5 μ m; volume de injeção de 20 μ L e gradiente de eluição com fase aquosa e orgânica, baseou-se, com algumas mudanças, em SOARES et al., 2015, que quantificou os flavonóides hesperidina e rutina em folhas de citros.

Para quantificar os complexos nos meios de crescimento, inicialmente construiu-se uma curva analítica injetando seus padrões com as concentração de 100 μ g.mL⁻¹, 80 μ g.mL⁻¹, 60 μ g.mL⁻¹, 40 μ g.mL⁻¹, 20 μ g.mL⁻¹, 10 μ g.mL⁻¹, 5 μ g.mL⁻¹, 2,5 μ g.mL⁻¹. Para quantificação das amostras utilizou-se uma concentração inicial nominal 80 μ g.mL⁻¹. A regressão foi obtida pelo método dos mínimos quadrados, a partir da relação entre as áreas das bandas cromatográficas e a concentração dos padrões.

A relação entre o sinal medido (área ou altura da banda) e a massa ou concentração do analito é expressa por uma equação matemática, designada Curva de Calibração. Para definir a reação entre a concentração e a resposta, é necessário recorrer a um número suficiente de padrões (5 a 8 padrões, sem incluir o branco, ou seja, o ponto zero), devendo abranger toda a gama de concentrações esperadas (SHAH, 1992 e EMEA, 1995). O procedimento analítico de modelo de calibração mais comum é o modelo linear, através do

Método dos Mínimos Quadrados. Nesta abordagem, a variável independente (x) é a concentração e a variável (y) a resposta cromatográfica (BRESSOLLE, 1996).

De acordo com as condições cromatográficas utilizadas, foi possível obter a banda cromatográfica de cada complexo com seus respectivos tempos de retenção. Primeiramente, para visualizar a banda e o tempo de retenção de cada padrão, foi feita uma rampa com 97% de água e 3% de fase orgânica. A partir daí construiu-se o gradiente de eluição onde o tempo de análise foi de 40 minutos, e a fase móvel foi aquosa e orgânica. As porcentagens do gradiente de eluição e tempo de retenção estão representados em materiais e métodos.

As curvas de calibração dos complexos hesperidina, naringenina e ácido isovanílico, estão representados na FIGURAS 4.27.

Após a construção das curvas de calibração dos complexos, as amostras contendo os meios de crescimento foram injetadas no HPLC numa concentração inicial nominal de $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Injetando todos os padrões e identificando a banda cromatográfica e o tempo de retenção de cada complexo, foi possível montar a curva analítica, identificar e quantificar cada complexo nas amostras injetadas no HPLC

As FIGURAS 4.28, 4.29 e 4.30 representam as bandas cromatográficas de cada complexo com seus respectivos tempo de retenção:

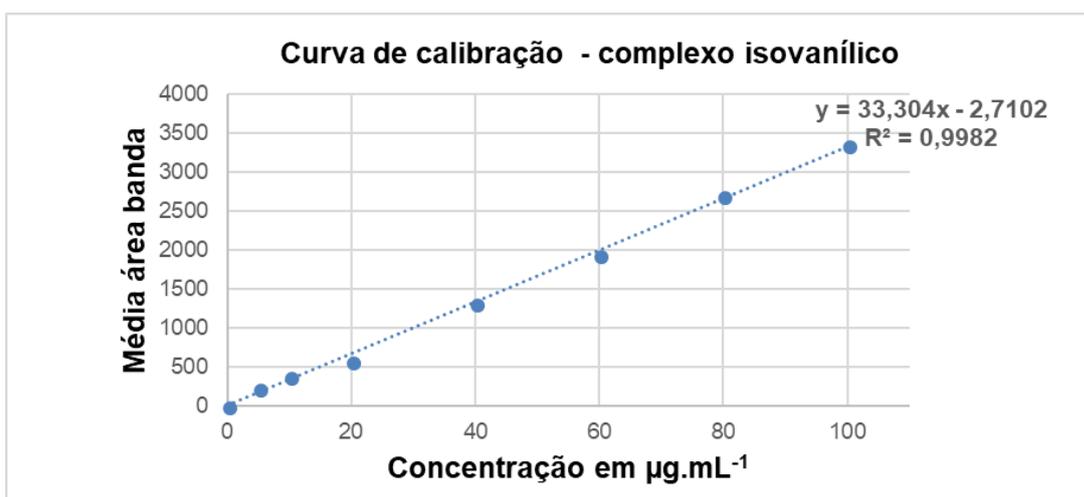
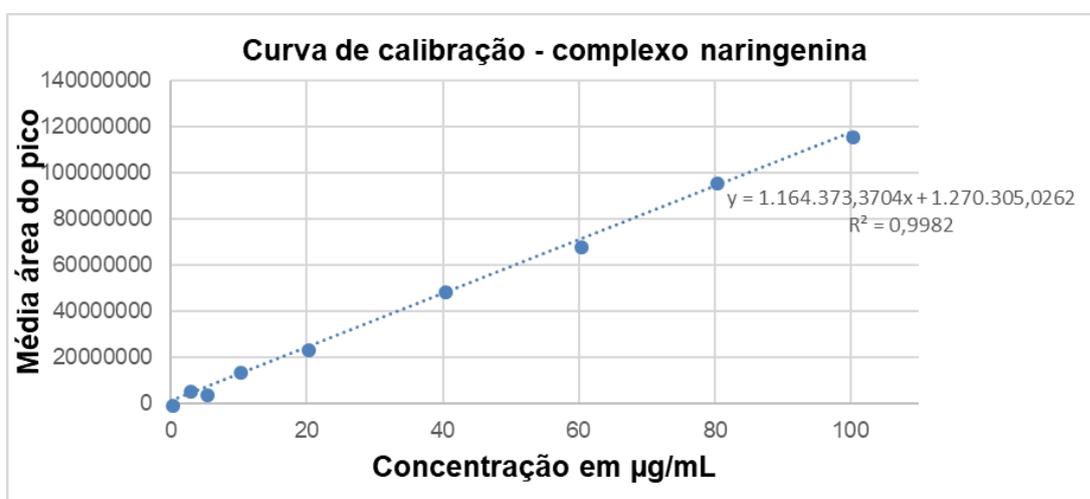
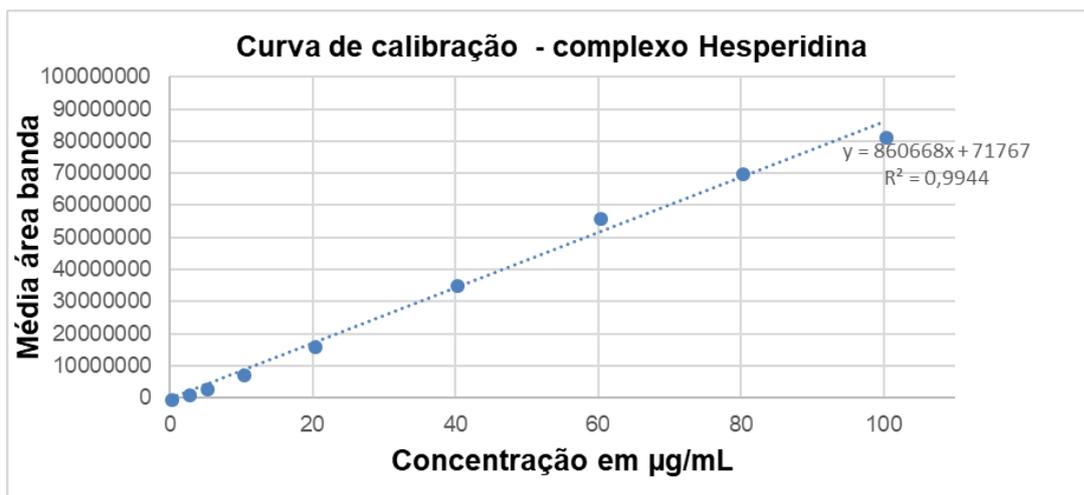


FIGURA 4. 27 - Curva de calibração para quantificação dos complexos adicionados no meio de crescimento das plântulas.

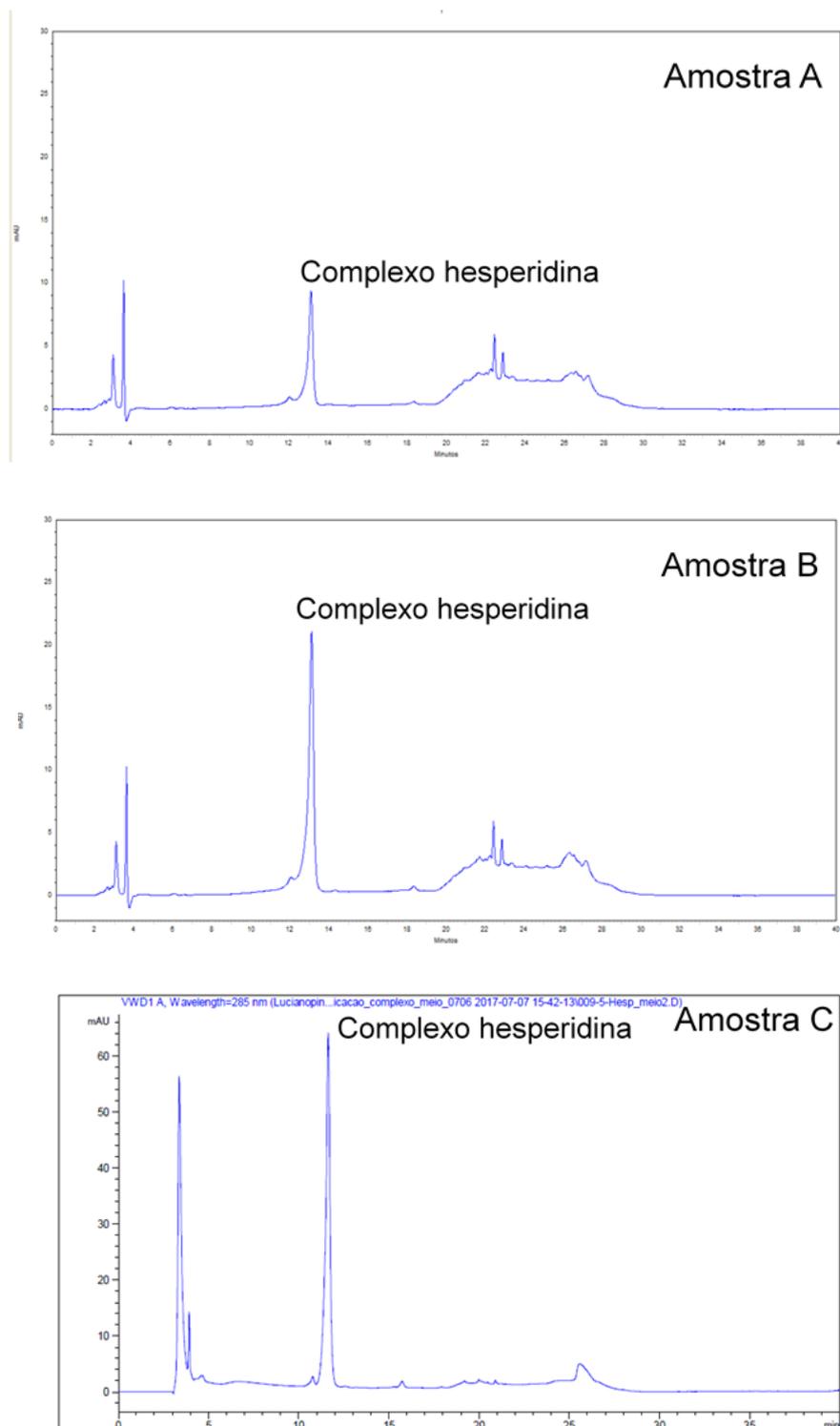


FIGURA 4. 28 - Cromatogramas HPLC - UV, bandas do complexo hesperidina no tempo de retenção de 13 min. Amostra A: meio de crescimento líquido contendo o complexo e plântula infectada com a bactéria *xanthomonas citri*; amostra B: meio de crescimento contendo o complexo e a plântula sadia ; C: apenas o meio de crescimento com o complexo.

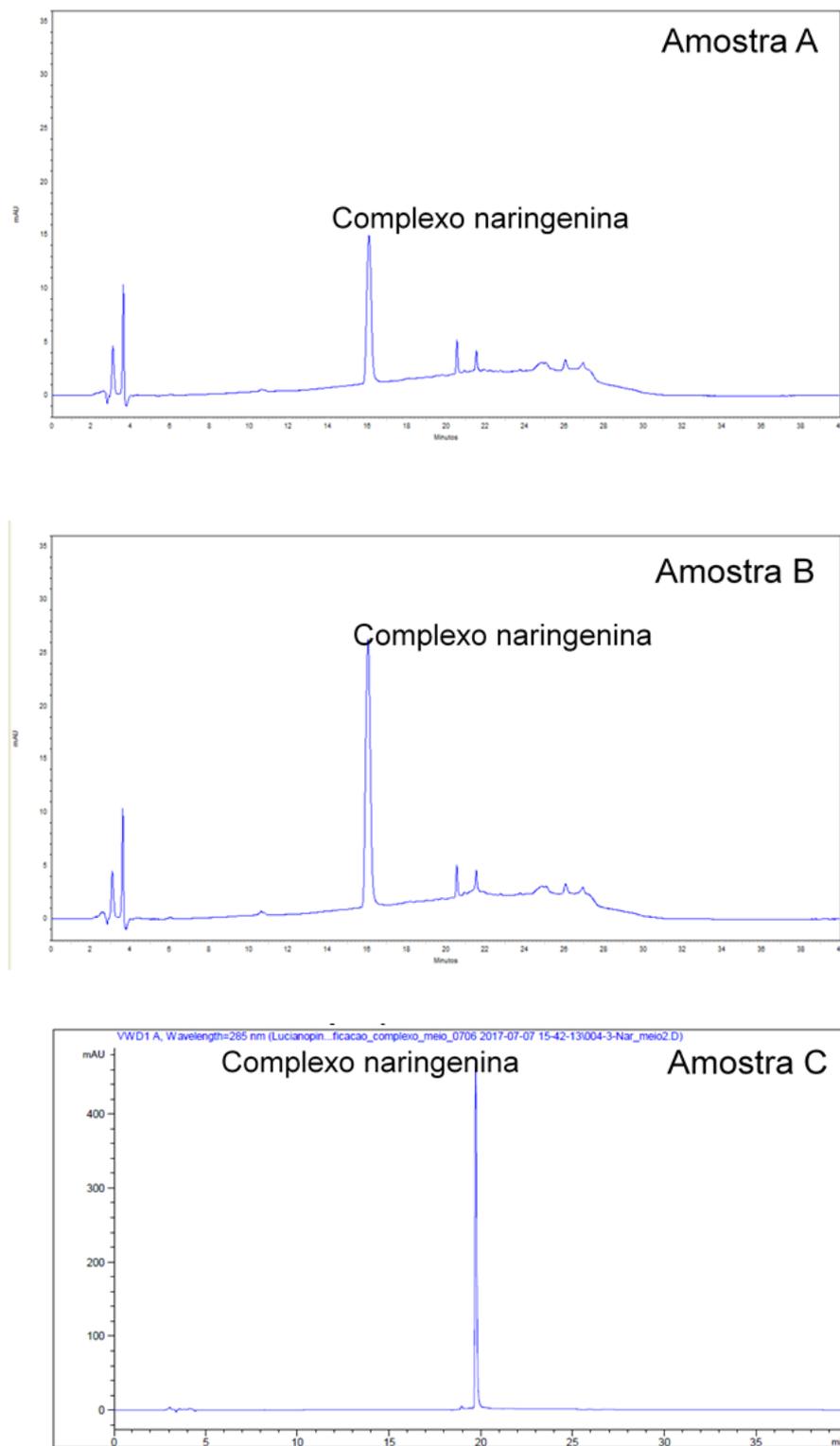


FIGURA 4. 29 - Cromatogramas HPLC - UV, bandas do complexo naringenina no tempo de retenção de 13 min. Amostra A: meio de crescimento líquido contendo o complexo e plântula infectada com a bactéria *Xanthomonas citri*; Amostra B: meio de crescimento contendo o complexo e a plântula sadia ; C: apenas o meio de crescimento com o complexo.

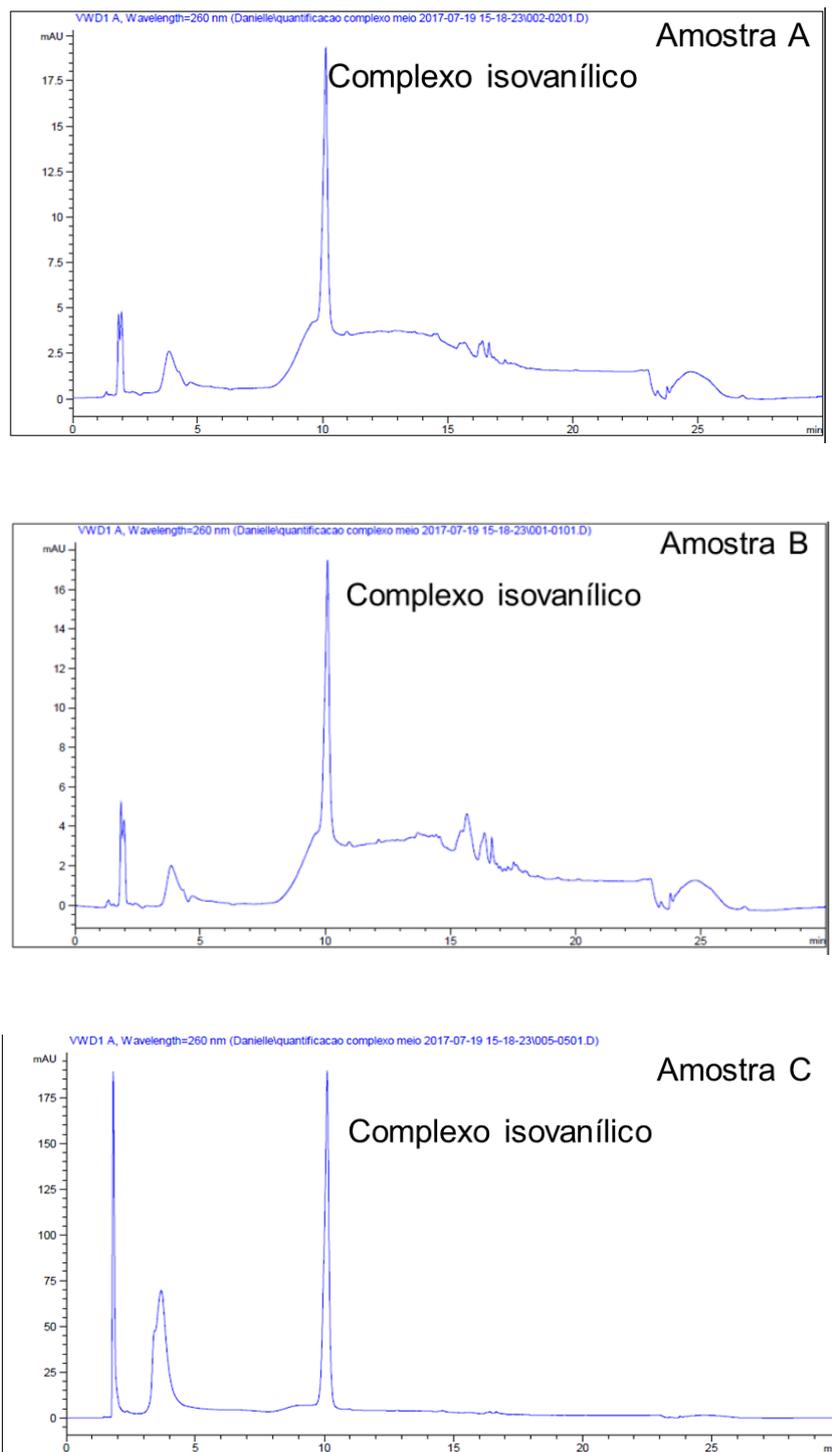


FIGURA 4. 30 - Cromatogramas HPLC - UV, bandas do complexo isovanílico no tempo de retenção de 13 min. Amostra A: meio de crescimento líquido contendo o complexo e plântula infectada com a bactéria *Xanthomonas citri*; amostra B: meio de crescimento contendo o complexo e a plântula sadia ; C: apenas o meio de crescimento com o complexo.

Através da banda cromatográfica das amostras A, B e C de cada complexo, foi possível obter suas áreas e através da curva de calibração de cada complexo calcular a concentração em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dos complexos presentes no meio de crescimento das plântulas.

A TABELAS 4.3 representam as médias: das áreas de cada banda cromatográfica dos complexos e seus tratamentos, concentração em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dos complexos encontrados em cada meio e a concentração teórica absorvida pelas plântulas.

TABELA 4. 3 - Resultado da quantificação dos complexos no meio de crescimento das plântulas de citros dos experimentos de inibição do cancro cítrico.

Amostras	Area	Conc. Inicial ($\mu\text{g/mL}$)	Conc. / meio ($\mu\text{g/mL}$)	Conc. Teorica abs
A - Hesperidina (Mg)	3498408	80	39,81	40,19
A - Naringenina (Mg)	3603265	80	2,01	77,99
A - Ác. Isovanílico (Mg)	389,45	80	11,62	68,38
B - Hesperidina (Mg)	6145470	80	70,57	9,43
B - Naringenina (Mg)	7126457	80	5,03	74,97
B - Ác. Isovanílico (Mg)	322,85	80	9,61	70,39
C - Hesperidina (Mg)	7035798	80	80,92	0,00
C - Naringenina (Mg)	10900000	80	125,81	0,00
C - Ác. Isovanílico (Mg)	2275,7	80	68,25	11,75

Através da área de cada banda, e atribuindo esse valor na fórmula da curva analítica, foi possível calcular a concentração que continha nas amostras de cada complexo.

As amostras com os meios contendo os complexos partiram de uma concentração inicial de $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e através da equação da curva de cada um, calculou-se a concentração que continha na amostra. Sabendo a concentração da amostra, foi possível calcular o valor absorvido pelas plantas.

Partindo da concentração que foi utilizada nos tratamentos com as plântulas, que foi $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de cada complexo, através de cálculos de regressão foi possível calcular a concentração absorvida pelas plântulas.

Quantificaram-se os complexos nos meios onde havia plântulas com cancro cítrico e plantas sadias separadamente. O objetivo de quantificar os complexos identificar se a planta estava absorvendo os complexos via raiz e se havia diferença no aproveitamento dos complexos quando as plântulas estavam infectadas com a bactéria.

A FIGURA 4.30 representa os resultados da quantidade dos complexos absorvidos pelas plântulas referente à quantidade de $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ que foi aplicada nos ensaios antimicrobianos.

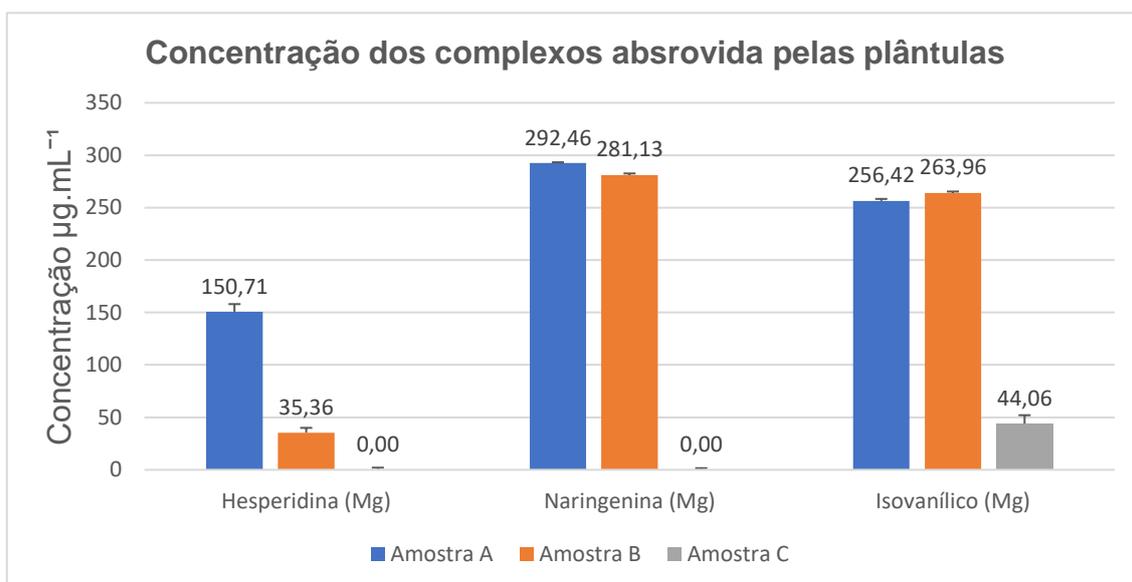


FIGURA 4. 31 - Concentração dos complexos absorvida pelas plântulas de citros. Amostra A: meio de crescimento líquido contendo o complexo e plântula infectada com a bactéria *Xanthomonas citri*; Amostra B: meio de crescimento contendo o complexo e a plântula sadia ; C apenas o meio de crescimento com o complexo.

A quantidade do complexo hesperidina absorvida pelas plântulas sadias e a quantidade do mesmo absorvido pelas plantas doentes apresentam uma diferença de 76 %, onde as plântulas com cancro cítrico absorveram muito mais do complexo do que as sadias. A quantidade do complexo naringenina absorvido pelas plântulas sadias e doentes teve uma diferença de apenas 3,8 %, onde as plântulas doentes absorveram um pouco mais que as sadias. A absorção pelas plântulas foi alta, as plântulas contaminadas com a bactéria absorveram 97,5 % do complexo e as plântulas sadias 92,5%. O resultado de absorção com o complexo isovanílico foi semelhante ao da naringenina. A absorção pelas plantas foi alta, as plântulas contaminadas com a bactéria absorveram 85,5 % do complexo e as plântulas sadias 88 %.

Sabendo a porcentagem de absorção desses complexos pelas plântulas, podemos avaliar a quantidade do produto que deve ser aplicado, não havendo o seu desperdício e chegando a uma dose correta de aplicação.

Com estes resultados pode-se comprovar que não só o complexo hesperidina, que foi observado nas folhas por imagem, possui via de ação sistêmica, mas também os outros complexos testados.

Pode-se afirmar que o modo de aplicação dos complexos para o controle preventivo ou curativo da bactéria *X. citri* em citros pode ser feito via ação sistêmica, pelo menos em plântulas. Porém, este trabalho continuará com ensaios *in vivo*, avaliando seu modo de ação sistêmico em plantas de casa de vegetação com pelos menos 9 meses de vida.

O resultado de absorção do complexo hesperidina é diferente dos outros complexos. As plantas contaminadas com a bactéria absorveram aproximadamente 50 % do complexo, já as plântulas sadias apenas 11 %. A hipótese de que as plântulas absorveram menor quantidade do complexo hesperidina, comparando com os outros, seria que vários autores já comprovaram que o citros apresenta grande quantidade de hesperidina, principalmente em folhas e frutos, não tendo assim a necessidade de absorver o complexo. Outro resultado muito relevante seria a diferença de absorção entre as plântulas doentes e as plântulas sadias, seria como se a planta tivesse um mecanismo de aviso de necessidade desse antimicrobiano.

Aplicações sistêmicas Incluem quimigação por gotejamento (incluir pesticidas na irrigação por gotejo), drench, irrigação por sulco na base das

plantas. Todos estes métodos dependem do agroquímico movimentar-se sistemicamente das raízes para partes foliares das plantas protegendo-as contra pragas e doenças (CAMERON et al., 2016). Muitas culturas em todo o mundo atualmente possuem irrigação por gotejo. Dados recentes publicados indicam que de 2003 a 2008, a área sob irrigação por gotejamento nos Estados Unidos aumentaram de 729.108 ha para 953.552 há (NASS, 2008). A irrigação por gotejamento tem muitos benefícios sobre a irrigação por aspersão, como manter a folhagem seca e, portanto, reduzir potencialmente doenças fúngicas e bacterianas, além de diminuir em 40% o uso da água (BISCONER, 2010).

Pesticidas agrícolas que podem ser absorvidos pelas plantas via raiz são poucos no mercado e a busca por moléculas com essas características é grande, segundo informação obtida por uma entrevista realizada pela autora deste trabalho com o engenheiro agrônomo Marcio Lima da Bayer CropScience.

5. Conclusões

Através dos valores de CIM e CMB obtidos podemos afirmar a confiabilidade dos resultados. Primeiramente porque todas as cepas apresentaram os mesmos resultados, com exceção de duas, podendo atribuir a um erro de pipetagem na diluição seriada, pois a diferença é de um poço de concentração ou essas duas cepas são mais suscetíveis aos complexos.

Os testes microbiológicos realizados em microplacas com 96 orifícios nos permitiram a realização de um maior número de experimentos e com maior número de repetições utilizando menor quantidade de material, reagentes, inóculo e dos princípios ativos testados. Para os testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Inibitória do Biofilme em 50% (CIMB₅₀) utilizava-se na faixa de 1 mg do princípio ativo para testar 15 cepas da bactéria.

Todos os testes foram realizados em triplicata, porém o teste de CIM foi realizado com 6 repetições, pois para fazer o teste de CBM teria que ter o resultado primeiramente de CIM, aumentando assim o grau de confiabilidade dos resultados de Concentração Inibitória Mínima dos princípios ativos testados.

Os testes com os 15 isolados da bactéria *X. citri* permitiu também obter resultados de maior confiabilidade.

Nos ensaios *in vitro*, MIC, CBM E CIMB₅₀, o complexo que obteve melhor resultado foi o complexo isovanílico.

As concentrações obtidas de MIC, CBM são valores bastante promissores, uma vez que segundo a literatura, alguns produtos naturais foram testados frente a essa bactéria e outra do citrus, a *Xylella fastidiosa*, porém seus MICs foram na faixa de 500 e 1000 µg/mL, algumas combinações de cobre com aminoácido obtiveram um MIC de 100 a 200 µg/mL. No CIMB a inibição do biofilme para todos os complexos foi maior que 50%, na sua maioria a inibição foi de até 80%, e concentrações bem menores que estas acima.

Nos ensaios com plântulas *in vitro*, através das imagens de epifluorescência e da quantificação dos complexos via HPLC-UV pode-se observar que os complexos possuem via de ação sistêmica.

Com a quantificação dos complexos em HPLC-UV, pode-se avaliar a quantidade de complexo que a planta absorve, podendo assim chegar a uma dose a utilizar no tratamento não causando desperdício do produto ou tendo excesso jogado ao meio ambiente.

Os resultados dos complexos frente ao controle da bactéria nas folhas das plântulas foram bastante satisfatórios, pois se observou que a bactéria não proliferou (lesões não aumentara ou até mesmo diminuíram de tamanho), comparada com o controle.

A quantidade de colônias bacterianas diminuiu drasticamente após o tratamento das plântulas com os complexos, comparadas com as colônias isoladas do controle. Mostrando que os complexos mataram as bactérias presentes nas folhas.

O experimento com plântulas nos permitiu um monitoramento maior em relação ao comportamento da planta frente aos complexos, uma vez que foi possível o controle mais minucioso da quantidade que a planta absorve dos complexos. Os sintomas da doença aparecem mais rápido que uma planta adulta.

Porém pelo fato de a planta ser mais sensível que uma planta adulta, houve necessidade de várias repetições dos experimentos devida: à morte das plântulas por contaminação do seu meio de crescimento, inoculação excessiva com a bactéria causando morte das plântulas antes de iniciar os tratamentos antimicrobianos ou quantidade em dose elevada dos complexos e do controle positivo.

Portanto, até chegar a uma dose correta dos tratamentos com os complexos, uma concentração bacteriana adequada, pois na literatura as concentrações bacterianas usadas em inoculação artificial eram para plantas adultas, foi necessária a produção de mudas por várias vezes e repetir o experimento por várias vezes também. Contudo, esses resultados já garantem qualidade e aplicabilidade dos compostos estudados.

6. Bibliografia

AGRIOS, G. N. Plant pathology. 4. Ed. San Diego: Academic press. 635 p., 1997.

AHMED SA, GOGAL RM JR, WALSH JE. A new rapid and simple non radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. J Immunol Methods. Apr 15;170(2):211- 24, 1994.

ALVES, A. Defensivos agrícolas ou agrotóxicos? Consumo: usos e abusos. Ciência Hoje, São Paulo, v. 4, n. 22, p. 49-52, 1986.

ANDEF, A. N. D. D. V. Tecnologia em primeiro lugar: o Brasil a caminho de se tornar o maior produtor mundial de grãos. Revista Defesa Vegetal, 2009.

ANDEF. www.andef.com.br. 2018.

ARAÚJO, A. C.; NOGUEIRA, D. P.; AUGUSTO, L. G. Pesticide impact on health: a study of tomato cultivation. Revista de Saúde Pública, v. 34, n. 3, p. 309-313,. ISSN 0034-8910, 2000.

ARUOMA, O. I. et al. Evaluation of the Antioxidant and Prooxidant Actions of Gallic Acid and Its Derivatives. J. Agric. Food & Chem., v. 41, p. 1880-1885, 1993.

BEDENDO, I. P. Ambiente e doença. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, K; AMORIM, L. (Ed.). Manual de Fitopatologia. São Paulo: Agronomica Ceres, p. 331-342, 1995.

BEHLAU, F., CANTEROS, B. I., JONES, J. B., AND GRAHAM, J. H.. Copper resistance genes from different xanthomonads and citrus epiphytic bacteria confer resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Eur. J. Plant Pathol. 133:949-963, 2012.

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 alfafae* subsp. *citrumelonis*. Applied and Environmental Microbiology 77:4089-4096, 2011.

BEHLAU,F.; BELASQUE Jr, J. Cancro cítrico, a doença e seu controle. Fundecitrus, 1ª Edição, 94p. Araraquara (SP) – 2014.

BELASQUE JR, J., JACIANI, F.J., MARIN, D.R., BARBOSA, J.C. Tamanho da amostra para quantificação do diâmetro de lesões de cancro cítrico. Tropical Plant Pathology, v.33, p.317-322, 2008.

BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; MARIN, F. R.; ORTUNO, A.; DEL RIO, J. A. Uses and properties of Citrus flavonoids. J. Agric. Food Chem., **45**: 4505, 1997.

BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H., AMORIN L. Manual de Fitopatologia, Princípios e Conceitos, v.1. 3. ed. – São Paulo: Agronômica Ceres: 919p, 1995.

BISCONER, I.,. Why field crop growers love drip irrigation: alfalfa, corn, cotton, onions, potatoes and processing tomatoes. In: ASABE Annual International Meeting. Paper number 1008764. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Exportações do agronegócio crescem quase 37% em fevereiro: vendas somam US\$ 6,71 bi. Carne bovina, soja, açúcar e álcool, cereais e produtos florestais puxaram embarques. 2016. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br> . Acesso em: 22 jun. 2016.

BRESSOLLE, F. Validation of liquid chromatographic and gás chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. J. Chromatogr. B. 686, p.3-10, 1996.

BRUNINGS, A., AND GABRIEL, D.. *Xanthomonas citri*: Breaking the surface. Mol. Plant Pathol. 4:141-157, 2003.

CAKMAK, I. Enrichment of cereal grains with zinc: Agronomic or genetic biofortification?. *Plant Soil*, 302: 1-17, 2008.

CALDAS, E.; DE SOUZA, L. [Assessment of the chronic risk for ingestion of pesticide residues in the Brazilian diet. *Revista de saude publica*, v. 34, n. 5, p. 529-537, ISSN 0034-8910, 2000.

CAMAROTTO, J. A. C., D. M.; BRASIL, F. Riscos no setor, alimentação e trabalho rural: A saúde do trabalhador rural e o risco invisível dos agrotóxicos. Engenharia de Produção Química, 2004.

CAMERON, R., HOPPER, L., ALVAREZ, J. M. Use of fluorescence to determine reduction in Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae) nymph feeding when exposed to cyantraniliprole and imidacloprid through systemic applications. *Crop Protection*, 84, 21e26,,2016.

CANTRELL, C.L., DAYAN, F.E., DUKE, S.O. Natural Products As Sources for New Pesticides. *Journal of Natural Products*. v.75, p.1231-1242, 2012.

CASERTA, R., PICCHI, S.C., TAKITA, M.A., TOMAZ, J.P., PEREIRA, W.E.L., MACHADO, M.A., IONESCU, M., LINDOW, S., DE SOUZA, A.A. Expression of *Xylella fastidiosa* RpfF in Citrus Disrupts Signaling in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and Thereby Its Virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. V. 27, No. 11, p.1241-1252, 2014.

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 Pathol*. 60, 977e985, 2011.

DA SILVA, A. C., FERRO, J. A., REINACH, F. C., FARAH, C. S., FURLAN, L. R., QUAGGIO, R. B., MONTEIRO-VITORELLO, C. B., VAN SLUYS, M. A., ALMEIDA, N. F., ALVES, L. M., DO AMARAL, A. M., BERTOLINI, M. C., CAMARGO, L. E., CAMAROTTE, G., CANNAVAN, F., CARDOZO, J., CHAMBERGO, F., CIAPINA, L. P., CICARELLI, R. M., COUTINHO, L. L., CURSINO-SANTOS, J. R., EL-DORRY, H., FARIA, J. B., FERREIRA, A. J., FERREIRA, R. C., FERRO, M. I., FORMIGHIERI, E. F., FRANCO, M. C., GREGGIO, C. C., GRUBER, A., KATSUYAMA, A. M., KISHI, L. T., LEITE, R. P., LEMOS, E. G., LEMOS, M. V., LOCALI, E. C., MACHADO, M. A., MADEIRA, A. M., MARTINEZ-ROSSI, N. M., MARTINS, E. C., MEIDANIS, J., MENCK, C. F., MIYAKI, C. Y., MOON, D. H., MOREIRA, L. M., NOVO, M. T., OKURA, V. K., OLIVEIRA, M. C., OLIVEIRA, V. R., PEREIRA, H. A., ROSSI, A., SENA, J. A., SILVA, C., DE SOUZA, R. F., SPINOLA, L. A., TAKITA, M. A., TAMURA, R. E., TEIXEIRA, E. C., TEZZA, R. I., TRINDADE DOS SANTOS, M., TRUFFI, D., TSAI, S. M., WHITE, F. F., SETUBAL, J. C., AND KITAJIMA, J. P. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417:459-463, 2002.

DA SILVA, J. M. et al. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. *Ciência Saúde Coletiva*, v. 10, n. 4, p. 891-903, 2005.

DA SILVA, D. F. Investigade da ação bactericida de produtos naturais sobre a bactéria *Xylella fastidiosa*. Tese de mestrado. Universidade Federal de São Carlos. 89p. 2003.

DAI, J., & MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352. . 2010.

DANHORN, T., FUQUA, C. Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* V.61, p.401e422, 2007.

DE PAULA, N. Q.; BISCOLA, P. H. N.; FIGUEIREDO, J. C.; BUNGENSTAB, D. J. E GUILHERMINO, J. F. Network and innovation at the Brazilian agricultural research Corporation. *Organizações Rurais & Agroindustriais*, Lavras, v. 19, n. 3, p. 192-203, 2017.

DE SOUZA, R. F. V.; DE GIOVANI, W. F. Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Redox Rep.*, **9**: 97, 2004.

DIRNITROV, G. D.; NEYKOV, M. V. Alkaline earth metal ions mediated self-assembly in the presence of 1,10-phenanthroline, nitrate and tetrafluoroborate anions. *Spectroc. Acta Pt. A-Molec. Biomolec. Spectr.*, **68**: 399, 2007.

DODO, K. et al. Antiproliferative and apoptosis-inducing activities of alkyl gallate and gallamide derivatives related to (-)-epigallocatechin gallate. *Bioorg Med Chem.*, v. 16, n. 17, p. 7975-82. Epub 2008 Jul 29, 2008.

DOMINGUES, M. R. et al. Agrotóxicos: risco à saúde do trabalhador rural. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 25, n. 1, p. 45-54. ISSN 1679-0367, 2004.

DU, D.; FANG J. X.; The latest progress of biological activity of quinoline compounds, *J. Org. Chem.* 27, 11, 1318-1336, 2007.

EMA – Validation of Analytical Methods: Methodology (CPMP/ICH/281/09). The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Human Medicines Evaluation Unit. London, 1995.

EMIM, J. A. D. S.; OLIVEIRA, A. B.; LAPA, A. J. Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the Isoflavonoids, dauricin and claussequinone, in rats and mice. *J. Pharm. Pharmacol.*, 46: 118, 1994.

EVERSMAYER, M.G. E KRAMER, G.L. Componentes and techniques of integrated pest management threshold determinations for aerial pathogens. *Plant Disease* 71: p.456-459, 1987.

FAOSTAT.FAO.ORG. Retrieved March 1, 2017.

FEICHTENBERGER, E.; MÜLLER, G. W. ; GUIRADO, N. Doenças dos citros (*Citrus spp*) In: KIMATE, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed). *Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. 5 ed. São Paulo: Agronomia Ceres. V. 2, p261-296. 1997.

FUJITA, K.; KUBO, I. Antifungal activity of octyl gallate. *Int J Food Microbiol.*, v. 79, n. 3, p. 193-201, 2002.

FUNDECITRUS. Relatório de Atividades.
<http://www.fundecitrus.com.br/busca/2017>.

FUNDECITRUS. Levantamento de doenças dos citros: HLB, CVC e Cancro cítrico / Fundo de Defesa da Citricultura. – Araraquara, SP: Fundecitrus. 56 p. 2017

GAO, X.P., F. ZHANG AND E. HOFFLAND. Malate exudation by six aerobic rice genotypes varying in zinc uptake efficiency. *J. Environ. Qual.*, 38: 2315-2321, 2009.

GENT, D. H.; SCHWARTZ, H. F.; NISSEN, S. J. Effect of commercial adjuvants on vegetable crop fungicide coverage, absorption, and efficacy. *Plant Dis.* 87, 591–597, 2003.

GOTTIG, N., GARAVAGLIA, B. S., GAROFALO, C. G., ORELLANO, E. G., AND OTTADO, J. A filamentous hemagglutinin-like protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the phytopathogen responsible for citrus canker, is involved in bacterial virulence. *PLoS ONE* 4:e4358, 2009.

GOTTWALD, T. R., GRAHAM, J. H., BOCK, C., BONN, G., CIVEROLO, E., IREY, M., LEITE, R., MCCOLLUM, G., PARKER, P., RAMALLO, J., RILEY, T., SCHUBERT, T., STEIN, B., AND TAYLOR, E. The epidemiological significance

of postpackinghouse survival of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* for dissemination of Asiatic citrus canker via infected fruit. *Crop Prot.* 28:508-524, 2009.

GRANATO, L.M., PICCHI, S.C., ANDRADE, M.O., TAKITA, M.A., SOUZA, A.A., WANG, N., MACHADO, M.A. The ATP-dependent RNA helicase HrpB plays an important role in motility and biofilm formation in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *BMC Microbiology*, 16:55, 2016.

GRANATO, L. M. Functional characterization of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* genes involved with exopolysaccharides production, biofilm formation and pathogenicity. Tese doutorado, Universidade Estadual de Campinas, s.n, 2016.

GRAZUL, M., BUDZISZ, E. "Biological activity of metal ions complexes of chromones, coumarins and flavones". *Coord. Chem. Rev.*, **253**: 2588, 2009.

GROHMANN, K., MANTHEY, J. A., CAMERON, R. G. "Acid-catalyzed hydrolysis of hesperidin at elevated temperatures". *Carbohydr. Res.*, **328**: 141, 2000.

GRUNDHOFER, P. et al. Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolyzable tannins. n. 0031-9422 (Print), 20010625 DCOM- 20011004.

GUO, Y., SAGARAM, U. S., KIM, J. S. e WANG, N. Requirement of the galu gene for polysaccharide production by and pathogenicity and growth in planta of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Appl Environ Microbiol* 76, 2234–2242, 2010.

HAFEZ, M.M, ABOULWAFI, M.M, YASSIEN, M.A, HASSOUNA, N.A,. Activity of some mucolytics against bacterial adherence to mammalian cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 158, 97–112, 2009.

HARRISA, R. J., ETHERIDGE, N. D. "Comparison of baits containing fipronil and sulfluramid for the control of *Vespula* wasps". *New Zeal. J. Zool.*, 28: 39, 2001.

HO, P. C., SAVILLE, D. J., COVILLE, P. F., & WANWIMOLRUK, S. Content of CYP3A4 inhibitors, naringin, naringenin and bergapten in grapefruit and grapefruit juice products. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 74(4), 379-385. 2000.

HUBSCHWERLEN, C.; PANCHAUD, P.; SPECKLIN, J. Preparation of oxazolidinones linked to quinolones or naphthyridinones as antibacterials. WO 2008056335 A1 20080515.

IBGE. (2016). www.sidra.ibge.gov.br. Retrieved December 27, 2016 in March 1, 2017.

KALPANA, K. B., SRINIVASAN, M., MENON, V. P. Evaluation of antioxidant activity of hesperidin and its protective effect on H₂O₂ induced oxidative damage on pBR322 DNA and RBC cellular membrane. *Mol. Cell. Biochem.*, 323: 21, 2009.

KICKBUSCH, I. Promoción de la salud: una perspectiva mundial. Promoción de la salud: una antología, p. 15-24, 1996. KOEHLE H., MASCIANICA M.P., EVERSON A.C. W02007093535, 2007.

KOIFMAN, S., KOIFMAN, R. J. Environment and cancer in Brazil: an overview from a public health perspective. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, v. 544, n. 2, p. 305-31. ISSN 1383-5742, 2003.

KONEMAN, E.W, ALLEN, S.D, JANDAN, W.M, SCHRECKENBERGER, P. C, WINN W. C. JR. Diagnóstico Microbiológico. Quinta Edição, 14665 p. 2001.

KRATZ, J. M. et al. Anti-HSV-1 and anti-HIV-1 activity of gallic acid and pentyl gallate. n. 1678-8060 (Electronic), 20080917 DCOM- 20081117.

KUBO, I. et al. Antibacterial activity of alkyl gallates against *Bacillus subtilis*. J Agric Food Chem., v. 52, n. 5, p. 1072-6., 2004.

KUBO, I.; XIAO, P.; FUJITA, K. Anti-MRSA activity of alkyl gallates. Bioorg Med Chem Lett., v. 12, n. 2, p. 113-6, 2002.

KUMAR, S., DHAR, D. N., SHAXENA, P. N. Applications of metal complexes of schiff bases-A review. J. Sci. Ind. Res., 68: 181, 2009.

LAIA, M., MOREIRA, L., DEZAJACOMO, J., BRIGATI, J., FERREIRA, C., FERRO, M., SILVA, A., FERRO, J., AND OLIVEIRA, J. New genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by a transposon-based mutant library. BMC Microbiol. 9:12, 2009.

LEITE JR., R.P., MOHAN, S.K. Integrated management of the citrus bacterial canker disease caused by *Xanthomonas campestris* pv.*citri* in the State of Paraná. Braz. Crop Prot. 9, 3e7, 1990.

LI, J. & WANG, N. Genome-wide mutagenesis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* reveals novel genetic determinants and regulation mechanisms of biofilm formation. PLoS ONE 6, e21804, 2011b.

LI, J. & WANG, N. The *wxacO* gene of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* encodes a protein with a role in lipopolysaccharide biosynthesis, biofilm formation, stress tolerance and virulence. Mol Plant Pathol 12, 381–396, 2013.

LI, J. e WANG, N. Foliar Application of Biofilm Formation–Inhibiting Compounds Enhances Control of Citrus Canker Caused by *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*. Phytopathology. Vol. 104, N 2, 2014.

LI, J., e WANG, N. Genome-wide mutagenesis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* reveals novel genetic determinants and regulation mechanisms of biofilm formation. PLoS ONE 6:e21804, 2011.

LI, J.; XI, T.; YAN, B.; YANG, M.Y.; SONGAD, J.R.; e MA, H.X. Two Cu(II) complexes of triadimefon: crystal structure, antifungal activities and structure–activity relationship. *New J. Chem* 2015.

LIN, B.; YU Y., LI R., CAO, Y, GUO M. Turn-on sensor for quantification and imaging of acetamidipridresidues based on quantum dots functionalized with aptamer. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 229 100–109, 2016.

LIU, W., QIN Y., LIU S., XING R., YU H., CHEN X., LI K., LI, P. C-coordinated O-carboxymethyl chitosan metal complexes: Synthesis, characterization and antifungal efficacy. *International Journal of Biological Macromolecules.*, p. 1-36, 2017.

LIU, Y.J., ZHANG, J.A., ZHANG, L.J., ZOU, X-Z., LI, N. E LI, Y. Study on pesticide activities of four ligands and their transition metal complexes with 8-mercaptoquinoline and pyridine terminal groups. *Inorganic Chemistry Communications*. 10.1016/j.inoche. 2015.

LLORENS, E., VICEDO, B., LOPEZ, M.M., LAPENA, L., GRAHAM, J.H., GARCIA-AGUSTIN, P. Induced resistance in sweet orange against *Xanthomonas citri subsp. citri* by hexanoic acid. *Crop Protection*, v.74, p.77-84, 2015.

LOCATELLI, C. et al. Ester derivatives of gallic acid with potential toxicity toward L1210 leukemia cells. *Bioorg Med Chem.*, v. 16, n. 7, p. 3791-9. Epub 2008 Jan 31, 2008.

LOPES-DA-SILVA, M., SANCHES, M.M., STANCIOLI, A.R., ALVES, G., SUGAYAMA, R. The role of natural and human mediated pathways for invasive agricultural pests: a historical analysis of cases from Brazil. *Agricultural Sciences*, v.5, p.634- 646, 2014.

MADDOX, C. E., LAUR, L. M., TIAN, L. Antibacterial Activity of Phenolic Compounds Against the Phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Curr Microbiol* 60:53–58, 2010.

MALAMUD F, CONFORTE VP, RIGANO LA ET AL.,. hrpM is involved in glucan biosynthesis, biofilm formation and pathogenicity in *Xanthomonas citri ssp. citri*. *Molecular Plant Pathology* 13, 1010–8, 2012.

MALAMUD, F., HOMEM, R.A., CONFORTE, V.P., YARYURA, P.M., CASTAGNARO, A.P., MARANO, M.R., AMARAL, A.M., VOJNOV, A.A. Identification and characterization of biofilm formation-defective mutants of *Xanthomonas citri subsp. citri*. *Microbiology*. V.159, p.1911–1919, 2013.

MALAMUD, F., TORRES, O.S., ROESCHLIN, R. et al.,. The *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* flagellum is required for mature biofilm and canker development. *Microbiology* 157, 819–29, 2011.

MALAMUD, F.; TORRES, P. S.; ROESCHLIN, R.; RIGANO, L. A.; ENRIQUE, R.; BONOMI, H. R.; CASTAGNARO, A. P.; MARANO, M. R. & VOJNOV, A. A. The *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* flagellum is required for mature biofilm and canker development. *Microbiology* 157, 819–829, 2011.

MANCLÚS J.J., MORENO M.J., PLANA E., MONTOYA A., *J. Agric. Food Chem.* 56: 8793, 2008.

MARTIN A, CAMACHO M, PORTAELS F, PALOMINO JC. Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: rapid, simple, and inexpensive method. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:3616–3619, 2003.

MURANAKA, L. S.; GIORGIANO, T.; TAKITA, M.; FORIM, M.; SILVA, L. F.C.; FILHO, H. D. C.; MACHADO, M.; DE SOUZA, A. N-Acetylcysteine in Agriculture, a Novel Use for an Old Molecule: Focus on Controlling the Plant–Pathogen *Xylella fastidiosa*. *Plos One*, v.8, 2013.

MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R. *Citros*, p.33, 2005.

MENDES, B.M.J., CARDOSO, S.C., BOSCARIOL-CAMARGO, R.L., CRUZ, R.B., MOURÃO FILHO, F.A.A., BERGAMIN FILHO, A. Reduction in susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* expressing the Rice Xa21 gene. *Plant Pathology*, v.59, p.68–75, 2010.

MERKL, R. et al. Antimicrobial and Antioxidant Properties of Phenolic Acids Alkyl Esters. *Czech J. Food Sci.*, v. 28, n. 4, p. 275-279, 2010.

MORAIS, M. C. et al. Suppression of TNF-alpha induced NFkappaB activity by gallic acid and its semi-synthetic esters: possible role in cancer chemoprevention. *Nat Prod Res*, v. 24, n. 18, p. 1758-65, 2010.

MOREIRA, C. A. Atividade *in vitro* de agentes antimicrobianos contra biofilmes de *Staphylococcus* spp de otite canina. Dissertação Mestrado. Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica; Fortaleza-CE, 2011

MUIR, R. M. et al. Mechanism of gallic acid biosynthesis in bacteria (*Escherichia coli*) and walnut (*Juglans regia*). n. 1573-5028 (Electronic), 20110315 DCOM-20110517.

MURALI T.P, DUNCAN, E.J. *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnolog. Sci. Hortic.* 64: 243, 1995.

MURANAKA LS, GIORGIANO TE, TAKITA MA et al., 2013. N-acetylcysteine in agriculture, a novel use for an old molecule: focus on controlling the plant-pathogen *Xylella fastidiosa*. *PLoS ONE* 8, e72937.

MUSTAFA, W.A.; MODAISH A. A.E. e ELSHALL, A.A. Evaluation of some complexes in estimating available Zn for soybean in calcareous soils. *J. Plant Nutr. Soil. Sc.*, 157: 415-441,1994.

NACZK M., SHAHIDI F. Extraction and analysis of phenolic in food. *J Chromatogr A*; 1054 (1/2): 95-111, 2004.

NAGESH, G.Y., MAHADEV, U.D e MRUTHYUNJAYASWAMY, B.H.M. Mononuclear Metal (II) Schiff Base Complexes Derived from Thiazole and O-Vanillin Moieties: Synthesis, Characterization, Thermal Behaviour and Biological Evaluation. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*; Article No. 38, Pages: 190-197, 2015.

NAKAO, K., MURATA, K., ITOH, K., HANAMOTO, Y., MASUDA, M., MORIYAMA, K. Anti-hyperuricemia effects of extracts of immature *Citrus unshiu* fruit. *Journal of Traditional Medicines*, 28(1), 10-15. 2011.

NASS (National Agricultural Statistics Service) USDA, 2008a. Land Irrigated by Drip, Trickle or Low-flow Microsprinklers: 2008 and 2003. [http://www.agcensus.usda.gov/Publications/2007/Online Highlights/Farm and Ranch Irrigation](http://www.agcensus.usda.gov/Publications/2007/Online%20Highlights/Farm%20and%20Ranch%20Irrigation). 2014.

NCCLS; Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Sixth Edition.; NCCLS document M7-A6. NCCLS, USA; 2003.

NEVES, M.F., TROMBIN, V.G., MILAN, P., LOPES, F.F., CRESSONI, F., KALAKI, R. – FEA /USP Ribeirão Preto. O retrato da citricultura brasileira, 2014.

NEVES, M.F., TROMBIN, V.G. Anuário da Citricultura. 1º Edição, São Paulo, CitrusBR. 2017

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. J. *Nat. Prod.*, 75, 311–335, 2012.

NOCIARI M.M, SHALEV A., BENIAS P., RUSSO C. A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods*. Apr 15;213(2):157- 67, 1998.

O'BRIEN J., WILSON .I, ORTON T., POGNAN F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*. Sep;267(17):5421-6, 2000.

OLIVEIRA, R. M. M. Novos complexos de Ru(II) e Mg (II) com flavonoides: Atividade tóxica, sítios ativos e mecanismos de ação. Tese de doutorado. 2012.

OLIVEIRA, A. G.; SPAGO, R. F.; SIMIONATO, A. S.; NAVARRO, M. O. P; SILVA, C.; BARAZETTI, S. A.; CELY, M. V. T.; TISCHER, C. A.; SANMARTIN, J. A. B.; ANDRADE, C. G. T.; NOVELLO, C. R.; MELLO, J. C. P e ANDRADE, G. Organocopper Antibiotic Compound Against *Xanthomonas citri*. *Frontiers in Microbiology*. Volume 7, Article 113. February 2016.

OLSON, L.J. The economics of terrestrial invasive species: a review of the literature. *Agricultural and Resource Economics Review*, v.35, p.178-194, 2006.

ORVIG, C.; ABRAMS, M. J. *Medicinal inorganic chemistry: Introduction*. 1999.

PALOMINO J.C, MARTIN A., CAMACHO M., GUERRA H., SWINGS J., PORTAELS F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 46:2720-2722, 2002.

PANOUSOPOULOS, G., BEEDHAM, C. Enzymatic Oxidation of Vanillin, Isovanillin and Protocatechuic Aldehyde with Freshly Prepared Guinea Pig Liver Slices, in: Cell. Physiol. Biochem., 15 (1–4), S. 89–98, 2005.

PELAEZ, V., DA SILVA, L. R., ARAÚJO, E. B. Regulation of pesticides: A comparative analysis*. *Science and Public Policy*, v. 40, n. 5, p. 644-656, ISSN 0302-3427, 2013.

PELCZAR, M., REID, R., CHAN, E.C.S. *Microbiologia*. Vol I. 566p. 1980.
PEREZ-GIRALDO, C, RODRIGUEZ-BENITO, A, MORAN, F.J, HURTADO, C, BLANCO, M.T, GOMEZ-GARCIA, A.C. Influence of N-acetylcysteine on the formation of biofilm by *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 39, 643–6, 1997.

PICCHI , S. C.; TAKITA, M. A.; COLETTA-FILHO H. D.; MACHADO M. A. AND SOUZA, A. A. DE. N-acetylcysteine interferes with the biofilm formation, motility and epiphytic behaviour of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Plant Pathology* 65, 561–569, 2016.

PIGNATI, W.A. Saúde - doença dos trabalhadores rurais e os agrotóxicos. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br>. Acesso em: 13 fevereiro, 2005.
PIMENTEL C.V.M.B, FRANCKI VM, GOLLÜCKE A.P.B. Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos. São Paulo: Varela; 2005.

PRAKASH O., ANEJA D.K., HUSSAIN K., LOHAN P., RANJAN P., ARORA S., SHARMA,C. ANEJA K.R., *EUR. J. Med. Chem.* 46: 5065, 2011.

PRASAD ,R.E., KANTAM M.L., CHOUDRY B.M., *Pestic. Sci.* 28: 157, 1990.

PRASAD, B. P., KANTAM, M. L., CHOUDARY, B. M., SUKUMAR, K. e SATYANARAYANA, K. New Pesticide Metal Complexes for Controlled Release. *Pcsric. Sci.*, 28, 157-165, 1990.

REDONDO, C., SENA-VELEZ, M., GELL, I., FERRAGUD, E., SABUQUILLO, P., GRAHAM, J.H., CUBERO, J. Influence of selected bactericides on biofilm formation and viability of *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*. *Crop Protection*, v.78, p.204-213, 2015.

RIBAS, P. P., MATSUMURA, A. T. S. A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. Revista Liberato, Novo Hamburgo, v. 10, n. 14, p. 149-158, jul./dez. 2009.

RIBEIRO, A. B.; ABDELNUR, P. V.; GARCIA, C. F.; BELINI, A.; SEVERINO, V. G. P.; DA SILVA, M. F. G.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; CARVALHO, S.; DE SOUZA, A. A. e MACHADO, M. A. Chemical Characterization of Citrus sinensis Grafted on C. limonia and the Effect of Some Isolated Compounds on the Growth of Xylella fastidiosa. J. Agric. Food Chem., 56, 7815–7822, 2008.

RIGANO, L. A., SICILIANO, F., ENRIQUE, R., SENDI'N, L., FILIPPONE, P., TORRES, P. S., QU' ESTA, J., DOW, J. M., CASTAGNARO, A. P. & OTHER AUTHORS. Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in Xanthomonas axonopodis pv. citri. Mol Plant Microbe Interact 20, 1222–1230, 2007.

RODRIGUES CM, TAKITA MA, COLETTA-FILHO HD ET AL. Copper resistance of biofilm cells of the plant pathogen Xylella fastidiosa. 2008

ROSSO, R. et al. Relationship between the lipophilicity of gallic acid n-alkyl esters' derivatives and both myeloperoxidase activity and HOCl scavenging. Bioorg Med Chem., v. 14, n. 18, p. 6409-13. Epub 2006 Jun 8, 2006.

RUBIN, B.K. Mucolytics, expectorants, and mucokinetic medications. Respiratory Care 52, 859–65, 2007.

SAÚDE, O. P.-A. D. Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos: Secretaria de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde Brasília, 1996.

SAVIETTO, A. Atividade antibacteriana de galatos de alquila acetilados sobre *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*. Tese de mestrado. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biciência, Rio Claro, 80p., 2016.

SCHAL, C. Sulfluramid resistance and vapor toxicity in field-collected German cockroaches. J. Med. Entomol., 29: 207, 1992.

SHAH, V.P. Analytical methods validation: bioavaliability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. J. Pharm. Sci.81. p.309-312, 1992.

SHARVELLE, E. G., The nature and uses of modern fungicides. Minneapolis: Burgess, p 308, 1961.

SILVA, I.C., REGASINI, L.O., PETRÔNIO, M.S., SILVA, V.S., BELASQUE J. Jr., SACRAMENTO, L.V.S., FERREIRA, H. Antibacterial Activity of Alkyl Gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*. Journal of Bacteriology. v.195, p.85-94, 2013.

SILVA, R. H. C. Mapa agrícola brasileiro registrou alterações relevantes nos últimos 20 anos, em busca de espaço para expansão da fronteira agrícola com

custos mais competitivos. Departamento de pesquisas e estudos econômicos. Disponível em: <http://www.economiaemdia.com.br>. Acesso em: 12 de março, 2014.

SINGH P.K.. J. Agric. synthesis and fungicidal activity of novel 3-(substituted/unsubstituted phenylselenonyl)-1-ribose/deoxyribose-1h-1,2,4-triazole. Food chem. 60: 5813, 2012.

SKOOG, D. A. W.; DONALD M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S.R. Fundamentos da química Analítica. 8.ed São Paulo: Thomson Learning, 2006.

SOARES, M. S.; DA SILVA, D. F.; FORIM, M. R.; DA SILVA, M. F. G. F. S.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, D. B.; PEPORINE, N.; CARVALHO, A. S.; DE SOUZA, A. A.; MACHADO, M. M. Quantification and localization of hesperidin and rutin in Citrus sinensis grafted on C. limonia after Xylella fastidiosa infection by HPLC-UV and MALDI imaging mass spectrometry. Phytochemistry, 2015.

SPADOTTO, C. A. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. Revista Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar, São Miguel, 2006.

SURESH P. ANNANGUDI, KYUNG MYUNG,* CRUZ AVILA ADAME, AND JEFFREY R. GILBERT. MALDI-MS Imaging Analysis of Fungicide Residue Distributions on Wheat Leaf Surfaces. Environmental Science & Technology. 2015.

TAN, M. X., ZHU, J. C., PAN, Y. M., CHEN, Z. F., LIANG, H., LIU, H. G., WANG, H. S. Synthesis, Cytotoxic Activity, and DNA Binding Properties of Copper (II) Complexes with Hesperetin, Naringenin, and Apigenin. Bioinorg. Chem. Appl., 347872: 1, 2009.

TERRA, F. H. B. A indústria de agrotóxicos no Brasil. Curitiba: UFPR, 2008.

TRIPATHI, K.D. Essentials of Medical Pharmacology 7th ed. New Delhi, India: Jaypee Brothers Medical Publishers. pp. 696,697, 2013.

TYAGI, Y. K., KUMAR, A., RAJ, H. G., VOHRA, P., GUPTA, G., KUMARI, R. Synthesis of novel amino and acetyl amino-4-methylcoumarins and evaluation of their antioxidant activity. *European journal of medicinal chemistry*, 40(4), 413-420. 2005.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada; CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL. PIB do agronegócio. São Paulo, 2012. Available from: . Access in: 28 Apr. 2013.

XIONG P., LI J., BU H., WEI Q., ZHANG R. CHEN S. Copper(II) complexes with 4-(1H-1, 2, 4-triazol-1-ylmethyl) benzoic acid: Syntheses, crystal structures and antifungal activities. Journal of Solid State Chemistry, 215, 292–299, 2014.

XU, G., YE, X., LIU, D., MA, Y., & CHEN, J. Composition and distribution of phenolic acids in Ponkan (*Citrus poonensis* Hort. ex Tanaka) and Huyou (*Citrus paradisi* Macf. Changshanhuoyou) during maturity. *Journal of food composition and analysis*, 21(5), 382-389. 2008.

WAICHMAN, A. V., EVE, E., DA SILVA NINA, N. C. Do farmers understand the information displayed on pesticide product labels? A key question to reduce pesticides exposure and risk of poisoning in the Brazilian Amazon. *Crop Protection*, v. 26, n. 4, p. 576-583,. ISSN 0261-2194, 2007.

WANG, S. et al. Actin-like cytoskeleton filaments contribute to cell mechanics in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010.

WILCOX, L. J.; BORRADAILE, N. M.; DE DREU, L. E.; HUFF, M. W. Secretion of hepatocyte apoB is inhibited by the flavonoids, naringenin and hesperetin, via reduced activity and expression of ACAT2 and MTP". *J. Lipid Res.*, 42 725, 2001.

WHO. WHO Specifications and Evaluations for Public Health Pesticides Dimethoate, 1-33. Acedido através do site: http://www.who.int/whopes/quality/en/Dimethoate_eval_specs_WHO_June_2012.pdf?ua=1, último acesso a 16 de Março de 2015.

YAMAMOTO, K.; MATSUMURA, M.; SHIMANO, S. Quinoline derivatives as fungicides for agricultural and horticultural applications. WO 2007088978 A1 20070809.

YAN, Q., AND WANG, N.. High-throughput screening and analysis of genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in citrus canker symptomdevelopment. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25:69-84, 2012.

YAN, Q., AND WANG, N.. The ColR/ColS two-component system plays multiple roles in the pathogenicity of the citrus canker pathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *J. Bacteriol.* 193:1590-1599, 2011.

YAN, Q., HU, X. & WANG, N. The novel virulence-related gene nlxA in the lipopolysaccharide cluster of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* is involved in the production of lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide, motility, biofilm formation and stress resistance. *Mol Plant Pathol* 13, 923–934, 2012.

YANG, T.; ZHAO, B.; KINCHLA, A.; CLARK, M. J.; HE, L. Investigation of pesticide penetration and persistence on harvested and live basil leaves using surface-enhanced Raman Scattering Mapping. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017.

YEH, C. C., KAO, S. J., LIN, C. C.; WANG, S. D., LIU, C. J., KAO, S. T. The immunomodulation of endotoxin-induced acute lung injury by hesperidin *in vivo* and *in vitro*. *Life Sci.*, 80 1821, 2007.

YEOM J, SHIN J-H, YANG J-Y, KIM J, HWANG G-S, 2013. ¹H NMR-based metabolite profiling of planktonic and biofilm cells in *Acinetobacter baumannii* 1656-2. PLoS ONE 8, e57730

ZENG, Y. B.; YANG, N.; LIU, W. S.; TANG, N. Synthesis, characterization and DNA-binding properties of La(III) complex of chrysin. J. Inorg. Biochem., 97: 258, 2003.

ZHANG P. Z., FU Q. Y., CHI R. X., YANG C. X., XU J. G., Zhejiang, J. Univ. Sci. Technol. 15: 143, 2003.

ZHAO, T., LIU, Y. N-acetylcysteine inhibit biofilms produced by *Pseudomonas aeruginosa*. BMC Microbiology 10, 140, 2010.

ZHI-JUN Y, SRIRANGANATHAN N, VAUGHT T, ARASTU SK, AHMED SA. A dye-based lymphocyte proliferation assay that permits multiple immunological analyses: mRNA, cytogenetic, apoptosis, and immunophenotyping studies. J Immunol Methods. Dec 15; 210(1): 25-39,1997.

ZHOU, Z. Q. *Citrus* Fruits Nutrition. Science Press, Beijing , China. 2012.

ZIMARO, T., THOMAS L., MARONDEDZE, C., SGRO, G.G., GAROFALO, C.G., FICARRA, F.A., GEHRING, C., OTTADO, J., GOTTIG, N. The type III protein secretion system contributes to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* biofilm formation. BMC Microbiology. p.1471-2180/14/96, 2014.

ZOU, Z.; XI, W.; HU, Y.; NIE, C.; ZHOU, Z. Antioxidant activity of Citrus fruits, Food Chemistry 2015.