



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102014013993-1 A2

(22) Data do Depósito: 09/06/2014

(43) Data da Publicação: 15/12/2015
(RPI 2345)



* B R 1 0 2 0 1 4 0 1 3 9 9 3 A

(54) **Título:** MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE UMA COMPOSIÇÃO SOBRE FITOPATÓGENOS E COMPOSIÇÃO ANTIBACTERIANA

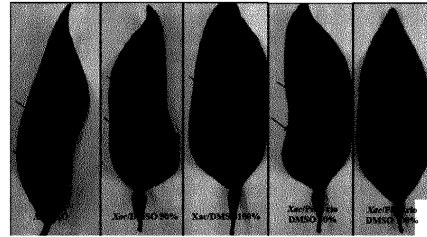
(51) **Int. Cl.:** A01N 65/36; A01P 1/00

(73) **Titular(es):** FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

(72) **Inventor(es):** MARIA TERESA MARQUES NOVO MANSUR, MARIA FÁTIMA DAS GRAÇAS FERNANDES DA SILVA, DANYELLA MARTINS GONÇALVES, KÁTIA ROBERTA PRIETO DE OLIVEIRA, RENATA CAROLINA ALVES

(74) **Procurador(es):** MARCELO FERRO GARZON

(57) **Resumo:** MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE UMA COMPOSIÇÃO SOBRE FITOPATÓGENOS E COMPOSIÇÃO ANTIBACTERIANA. Esta invenção refere-se a um método de avaliação da atividade antimicrobiana de uma composição sobre fitopatógenos; e à uma composição antibacteriana caracterizada por compreender entre 0,001 a 1 g/mL de ao menos um agente químico dissolvida em ao menos um excipiente.



**MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE UMA
COMPOSIÇÃO SOBRE FITOPATÓGENOS E COMPOSIÇÃO ANTIBACTERIANA**

CAMPO DA INVENÇÃO

[001]A presente invenção pertence ao campo da agricultura, especificamente, ao campo dos compostos biocidas; mais especificamente, ao campo dos compostos antimicrobianos de uso agrícola.

ESTADO DA TÉCNICA

[002]Diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas visando a obtenção de novos agentes antimicrobianos, principalmente os antimicrobianos provenientes de extratos vegetais, que possam ser aplicados tanto na indústria farmacêutica e de cosméticos, como na agroindústria.

[003] A atividade antimicrobiana de extratos vegetais é avaliada através da determinação de uma pequena quantidade da substância em estudo necessária para inibir o crescimento do microrganismo em teste; esse valor é conhecido como Concentração Mínima Inibitória (CMI), conforme proposto por MADIGAN, *et al* em 2000. Um aspecto bastante relevante na determinação da CMI de extratos vegetais é a preocupação, principalmente em relação aos aspectos toxicológicos, microbiológicos e legais pertinentes aos compostos naturais ou suas combinações.

[004] Atualmente existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos vegetais. Os mais conhecidos incluem método de difusão em ágar, teste da difusão em disco, método de macrodiluição e microdiluição, o método sensível de microdiluição para determinar a CMI ou a Concentração Mínima Bactericida (CMB) de extratos ativos de plantas, e outros.

[005] Todos estes métodos são realizados *in vitro* e nenhum em vegetais ou partes de vegetais *in vivo*.

[006]As plantas cítricas, compreendidas principalmente por laranjeiras, tangerinas, limoeiros e limeiras desempenham um papel de acentuada importância socioeconômica mundial. Esta importância deve-se à grande aceitação dos citros na alimentação humana, principalmente sob as formas de fruta fresca e de suco. O sabor é muito apreciado e seu valor nutritivo, como fonte de vitamina C, é conhecido universalmente e os citros também contêm outros nutrientes como glicídios, compostos nitrogenados e de cálcio, ferro e outros sais minerais.

[007]A citricultura movimenta R\$9,0 bilhões por ano e gera mais de 400 mil empregos no Brasil. O país exporta US\$1,77 bilhão em suco de laranja, o que representa a fatia de 86% do mercado mundial. O Brasil é responsável por 38% da produção mundial de laranja (19,1 milhões de toneladas) e 61% da produção mundial de suco de laranja (1,33 milhão de toneladas), exportando 98% da sua produção (USDA- United States Department of Agriculture). Dados indicam que 3 a cada 5 copos de suco de laranja comercializados no mundo, são produzidos no Brasil.

[008]Um dos principais riscos à citricultura brasileira é o avanço de pragas e doenças capazes de causar danos irreversíveis nas plantas, ameaçando a quantidade e qualidade das frutas cítricas, podendo levar à erradicação completa de pomares, configurando risco potencial de inviabilidade econômica da produção.

[009]Dentre as diversas pragas e doenças que incidem na citricultura mundial, temos o cancro cítrico, clorose

variegada dos citros (CVC), morte súbita, podridão floral dos citros (PFC, também conhecido como estrelinha), bicho furão, leprose, pinta preta, e mais recentemente o huanglongbing (HLB-greening).

[0010]O cancro cítrico apresenta grande potencial destrutivo, causando grandes perdas econômicas. O cancro cítrico é uma fitopatologia causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, atingindo ramos, folhas e frutos, sendo disseminada principalmente pelo homem, mas podendo ocorrer pela ação da natureza e pelo plantio de mudas contaminadas.

[0011]São vários os tipos de cancro cítrico, de acordo com o tipo de *Xanthomonas* envolvido. O Cancro Cítrico Asiático ou Cancrose A é causado por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac). É o grupo mais importante e severo, afeta um grande número de espécies da família Rutacea, principalmente do gênero *Citrus*. O cancro cítrico B, cancrose B ou "falso cancro", causado pela estirpe B de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B (Xau B), afeta um número menor de hospedeiros que a cancrose A e também apresenta sintomas mais brandos. É mais agressivo em limões verdadeiros (*Citrus limon*) e lima ácida "Galego" (*Citrus aurantifolia*). A cancrose C ou cancrose do limoeiro "Galego", causada pela *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C (Xau C), ocorre principalmente em lima ácida "Galego".

[0012]Não existindo método curativo para a doença cancro cítrico, a erradicação de plantas e material contaminado é o método escolhido de controle da doença no campo, aonde ainda não for endêmica. Aonde a doença for endêmica, árvores sadias são plantadas para limitar a propagação entre os

pomares.

[0013]Os primeiros sintomas do cancro cítrico aparecem principalmente nas folhas, quando comparado com a presença dos sintomas em outros locais afetados. Nas folhas as lesões surgem nos dois lados, podendo aparecer em apenas um lado, sem deformá-las. As lesões aparecem na cor amarela e logo se tornam marrons. Quando a doença está em estágio mais avançado, as lesões nas folhas ficam corticosas, com centro marrom e um anel amarelado em volta. Nos frutos a doença se manifesta pelo surgimento de pequenas manchas amarelas, com um ponto marrom no centro, que aos poucos vão crescendo e podem ocupar grande parte da casca do fruto. As manchas são salientes, parecidas com verrugas, de cor marrom no centro. Em estágio avançado, as lesões provocam o rompimento da casca. Nos ramos, as lesões são de forma de crosta de cor parda.

[0014]O estado da técnica recomenda para o controle de doenças agrícolas bacterianas que se realizem pulverizações de produtos cúpricos, como oxiclureto de cobre, sulfato de cobre, hidróxido de cobre e óxido cuproso. O cobre atua na proteção do tecido vegetal contra infecção por bactérias e na redução da população na superfície foliar. Entretanto são necessárias várias aplicações de produtos para alcançar controle adequado de doenças bacterianas. A época e o número de aplicações de cobre para controle eficiente do cancro cítrico dependem de vários fatores como susceptibilidade do cultivar, idade da planta, condições ambientais e adoção de outras medidas de controle. Mas com o uso prolongado de bactericidas cúpricos pode ocorrer o surgimento de linhagens de bactérias resistentes ao cobre, além do inconveniente da

disseminação de um metal pesado pelo meio-ambiente, aliado aos possíveis efeitos deletérios para a saúde humana.

[0015]A literatura também de patentes e técnica também descreve diversas metodologias de controle e/ou erradicação de bactérias fitopatogênicas. Motoyama, M.M. et al [Acta Scientiarum Agronomy. 509-512. (2003)] descrevem um extrato comercial com ação antimicrobiana sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, um patógeno que afeta as plantações de mandioca.

[0016]Espina, L., et al Food Control, [22 (2011) 896 e 902 (2010)], tratam de uma composição química de óleos essenciais de três citrinos comerciais: laranja (*Citrus sinensis*), limão (*Citrus limon*) e mandarim (*Citrus reticulata*), cuja atividade antimicrobiana contra *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella enterica subsp. enterica*; foi examinada contra alguns microrganismos patogênicos.

[0017]Pathan, R.K., et al. [Asian Pacific Journal of Tropical Disease, S328-S331 (2012)], avaliaram a eficácia antimicrobiana de *Citrus aurantifolia* Linn (CA) contra alguns microrganismos - bactérias e fungos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas spp*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumiga*, *Mucor spp* e *Pencillium*, por ensaios in vitro.

[0018]Ekwenye, U.N., et al [International Journal of Pharma and Bio Sciences. 0975-6299. (2010)]; antecipam a atividade antibacteriana in vitro de extratos aquoso e etanólico de folhas de *Citrus sinensis*, dissolvidos em água ou dimetilsulfóxido 50%; que foi avaliada em estirpes de bactérias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*,

Klebsiella pneumoniae e *Staphylococcus aureus* pelo método de difusão em disco. O maior efeito do extrato aquoso foi sobre *E. coli*; e indicam que os extratos hidroalcoólicos têm baixo potencial para uso em tratamento de doenças causadas por estes microrganismos.

[0019]Os documentos de patente PI8400179-8, PI9815339-0, PI0401559-2, tratam de compostos ou composições químicas sintéticas que são úteis no tratamento de doenças fitopatogênicas.

[0020]O PI0418380-0 trata de uma composição de tratamento/ prevenção de infecções de *Xanthomonas* sp., que consiste numa mistura de extratos de fungo (*Trichoderma* spp), extratos de folha e raiz de *Yucca schidigera* que são ricos em saponinas; e extratos da bactéria não fitopatogênica *Xanthomonas* sp., sendo aplicada por pulverização.

[0021]Já o PI0201249-9 trata de um processo de detecção do cancro cítrico pela observação da fluorescência em plantas, ou partes das plantas, no qual a planta é submetida a uma luz de baixo comprimento de onda onde é detectada a doença mesmo antes de sua manifestação visual.

[0022]O WO2010069021 antecipa um extrato bacteriano de *Xanthomonas*, contendo fragmentos de parede celular, membrana plasmática e proteínas citoplasmáticas, que é capaz de promover e/ou estimular defesas naturais de plantas contra patógenos.

[0023]Como pode ser verificado, o estado da técnica é rico em documentos relativos ao tratamento químico e biológico de plantas de interesse agrônômico, tal como as plantas cítricas, contra doenças bacterianas, bem como, a métodos de detecção do cancro cítrico, mas, no entanto, não

há nenhum relato referente a um método de avaliação *in vivo* da atividade antimicrobiana de extratos vegetais e/ou compostos químicos em geral.

OBJETIVO DA INVENÇÃO

[0024]O primeiro objetivo da presente invenção é propor um método de avaliação da atividade antimicrobiana de uma composição sobre fitopatógenos.

[0025]O segundo objetivo da presente invenção é propor uma composição antibacteriana que compreende ao menos um agente químico, e ao menos um excipiente; que é eficaz na prevenção, redução, e/ou eliminação da infestação de fitopatógenos em uma planta de interesse agrônômico.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0026]Para se obter uma completa visualização dos objetivos da presente invenção, é necessária a leitura deste documento e a análise dos desenhos que o acompanham e aos quais se faz referências conforme segue abaixo.

[0027]Figura 1 - Avaliação *in vitro* do efeito antimicrobiano de extratos de *Citrus sinensis* pelo método de difusão em disco

[0028].Figura 2 - Medidas dos diâmetros dos halos de inibição ao redor das colônias bacterianas pelo método de difusão em disco.

[0029]Figura 3 - Aspecto das folhas de limão galego (*Citrus aurantifolia*) após infiltração de DMSO 100%.

[0030]Figura 4 - Avaliação do desenvolvimento do cancro cítrico em folhas de *Citrus aurantifolia* inoculadas com células de *Xac* previamente mantidas em contato com o extrato cítrico.

[0031]Figura 5 - Avaliação do efeito de extratos cítricos

sobre a viabilidade das células de *Xac* inoculadas em *Citrus aurantifolia*.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0032]A presente invenção trata de propor um método de avaliação da atividade antimicrobiana de uma composição sobre fitopatógenos que compreende as etapas de:

(a)Desafiar as células de microrganismos de interesse diretamente com a composição dissolvida eficientemente em solvente inócuo às células bacterianas;

(b)Lavagem das bactérias desafiadas, seguida da suspensão das células em solvente inócuo à célula vegetal;

(c)Inocular a suspensão das bactérias desafiadas na epiderme vegetal;

(d)Análise da epiderme vegetal.

[0033]Na etapa (a), as células de uma cultura líquida do microrganismo de interesse é inicialmente desafiada com uma composição antibacteriana contendo uma quantidade eficaz do agente químico dissolvido no excipiente.

[0034]Pelo método da presente invenção, qualquer composição consistida de uma quantidade eficaz de ao menos um agente agroquímico; e, ao menos um excipiente pode ser testada para verificação de sua eficácia sobre microrganismos que são pragas agrícolas.

[0035]As bactérias alvo desta invenção são bactérias dos gêneros pertencentes ao grupo compreendido de: *Xanthomonas*, *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Xylella*, *Pseudomonas*, entre outras.

[0036]De acordo com o método de avaliação da atividade antimicrobiana da presente invenção, o ao menos um agente

químico é pertencente ao grupo compreendido de extrato vegetal, óleo essencial, um composto natural isolado, ou um composto químico sintético; o ao menos um excipiente é pertencente ao grupo consistido de dimetilssulfóxido (DMSO), acetonitrila (MeCN), acetona, etilacetato, tetrahidrofurano (THF), diclorometano (DCM), um álcool C₁ a C₄, ácido acético, água, polissorbato, sorbitol, ou uma misturas destes.

[0037]Entende-se por quantidade eficaz uma proporção peso/volume (p/v) de entre 0,01 e 1 g do agente químico por ml do excipiente.

[0038]Preferencialmente, o agente químico é um extrato vegetal, ou um composto natural isolado; o excipiente é pertencente ao grupo consistido de dimetilssulfóxido (DMSO), água, polissorbato, sorbitol, ou uma mistura destes.

[0039]Mais preferencialmente, no método da presente invenção, e agente químico é um extrato vegetal dissolvido em uma proporção de entre 0,05 a 0,8 g/l do excipiente DMSO.

[0040]O excipiente pode ser usado em sua forma pura, ou diluído. A mistura de excipientes pode conter dois ou mais excipientes, desde que não afetem a proporção p/v final do agente químico.

[0041]Assim, na etapa (a), uma massa de microrganismos, obtida de cultivo em meio sólido, é suspensa em um volume de entre 1 a 10 ml de água destilada, preferencialmente até alcançar a densidade ótica de 0,3 e, em seguida três alíquotas iguais, de entre 100 a 500 µl, são coletadas e centrifugadas entre 12000 a 18000 g, até sedimentar as células. O sobrenadante é descartado e cada sedimento é ressuspenso com 100 a 500 µl de água destilada para controle do experimento; ou 100 a 500 µl de solvente para o

controle da composição; ou 100 a 500 µl da composição antibacteriana da invenção. Para facilitar o entendimento as alíquotas serão doravante identificadas da seguinte forma: (i) desafio com agente químico puro; (ii) desafio com excipiente puro; e (iii) desafio com a composição da invenção. As três alíquotas são mantidas em contato com os desafiantes durante entre 8 a 24 horas, à temperatura entre 20 a 30°C, para se verificar o nível de inibição dos microrganismos.

[0042]Na etapa (b), as células das suspensões (i), (ii) e (iii) são recolhidas por centrifugação, o sobrenadante é então descartado e o sedimento é ressuspenso com entre 100 a 500 µl de água destilada antes da etapa (c).

[0043]Na etapa (c), as folhas frescas do vegetal de interesse são recolhidas com o pecíolo e, limpas com uma solução solvente orgânica, tal como, uma solução de etanol 70%, mas não limitada a esta. São recolhidas entre 1 a 4 folhas para cada tipo de inóculo (i), (ii) e (iii) testado. Em seguida, na porção inferior de cada folha independente, são realizadas 3 aplicações de cada um dos inoculos (i), (ii) e (iii) sob a epiderme inferior das folhas, sendo aplicado um inóculo distinto por folha. As aplicações são realizadas com uma seringa de agulha fina pertencente ao estado da técnica, tal como, uma seringa de insulina.

[0044]Após a aplicação do inóculo, as folhas são colocadas em um recipiente adequado contendo água, com o pecíolo sendo parcialmente submerso na água. O recipiente adequado pode ser qualquer tubo ou vaso que possibilite a folha permanecer na posição vertical e que possua uma tampa que permita a realização de trocas gasosas entre o tubo e

meio, mas impeça a entrada de insetos. Por exemplo, o recipiente pode ser um tubo de centrifugação, tipo falcon.

[0045]As folhas permanecem no tubo durante entre 7 a 10 dias para que se possa visualizar o surgimento dos sintomas foliares causados pelo fitopatógenos, caso o mesmo permaneça viável.

[0046]A etapa (d) ocorre pela observação visual de lesões causadas pela proliferação do microrganismo inoculado que permaneceu viável. Por exemplo, a Figura 4 mostra a etapa (d) e podem ser observadas manchas escuras, marcas de ferrugem, cloroses e etc, dependendo do microrganismo sendo testado.

[0047]A presente invenção trata ainda de uma composição antibacteriana da presente invenção compreende entre 0,001 a 1 g/mL de ao menos um agente químico dissolvida em ao menos um excipiente.

[0048]O ao menos um agente químico é pertencente ao grupo compreendido de extrato vegetal, óleo essencial, um composto natural isolado, e um composto químico sintético; o ao menos um excipiente é pertencente ao grupo consistido de dimetilssulfóxido (DMSO), acetonitrila (MeCN), acetona, etilacetato, tetrahidrofurano (THF), diclorometano (DCM), água, polissorbato, sorbitol, ou uma misturas destes.

[0049]Preferencialmente, o agente químico é um extrato vegetal, tal como, um extrato obtido das folhas, pecíolos, casca, caule ou raiz de um vegetal do gênero *Citrus*. Mais preferencialmente ainda, o agente químico é um extrato das folhas e pecíolos de uma planta do gênero *Citrus*; ainda preferencialmente, o excipiente é pertencente ao grupo consistido de dimetilssulfóxido (DMSO), álcool C₁ a C₄, ácido

acético, água, polissorbato, sorbitol, ou uma mistura destes; e agente químico é dissolvido em uma proporção de entre 0,05 a 0,8 g/ml de excipiente.

[0050]Sabidamente, o DMSO é um bom adjuvante farmacêutico que auxilia o transporte de certas substâncias através da membrana celular; entretanto, o DMSO puro, ou seja, DMSO com 100% de concentração causa danos às folhas vegetais, gerando marcas semelhantes a queimado e ferrugem nas folhas, conforme pode ser visto na Figura 3. Na Composição antibacteriana da presente invenção, o DMSO 100% é mais preferencialmente usado como excipiente, e foi verificado que nesta pureza, ao ser usado para diluir o agente químico preferencial, o DMSO favorece a ação antimicrobiana do agente químico, fato que não ocorre ao se usar o DMSO com grau de pureza menor. As figuras 1, 2 e 4 mostram dados experimentais *in vitro* e *in vivo* que comprovam essa afirmativa. Os experimentos realizados serão melhor explicados nos exemplos que serão dados.

[0051]Os objetos desta invenção, acima descritos têm suas concretizações ilustradas pelos exemplos abaixo. Entretanto, cabe ressaltar que os exemplos apresentados são meramente ilustrativos e não devem ser empregados na limitação dos direitos dos inventores, que se restringem somente àquilo contido nas reivindicações em anexo.

[0052]Finalmente, embora a invenção tenha sido amplamente descrita, é óbvio para aqueles versados na técnica que várias alterações e modificações podem ser feitas sem que as referidas alterações não estejam cobertas pelo escopo da invenção.

Exemplos - teste contra o cancro cítrico

Exemplo 1 - Obtenção do extrato de folhas de laranjeira (*Citrus sinensis*).

[0053] Folhas frescas e os pecíolos de *C. sinensis* variedades Pêra-rio e Hamlin são lavadas em água corrente, cortadas e colocadas em um recipiente adequado (aproximadamente 50 g de cada), as quais foram destacadas dos ramos juntamente com o pecíolo no mesmo dia em que se realizou a extração. As folhas foram lavadas em água corrente, cortadas e colocadas em um erlenmeyer, ao qual foram adicionados 800 mL de etanol absoluto (Synth), de maneira a cobrir as folhas. Estas foram processadas com um triturador (modelo: T25 digital ULTRA-TURRAX Brazil Power, marca: IKA) a 20 rpm. Após 48 horas de repouso realizou-se a filtração em gaze e em papel de filtro. O procedimento descrito de extração com etanol, repouso e filtração foi repetido por mais duas vezes.

[0054] Foram utilizadas 44 gramas de folhas de laranja Hamlin e 50 gramas de folhas de laranja Pêra-rio. Após extração obteve-se massas de 3,78 gramas de extrato Hamlin e 4,03 gramas de extrato Pêra-rio, sendo que para o uso destes nos ensaios biológicos uma quantidade de 0,051g foi solubilizada em 300µL de DMSO 100%.

[0055] Considerando-se que o rendimento (R) pode ser calculado pela seguinte fórmula:

$$R = \frac{\text{massa de extrato} \times 100\%}{\text{massa de folhas}}$$

[0056] temos que os valores de R foram calculados para ambos os extratos (Tabela 1).

	Extrato Pêra-rio	Extrato Hamlin
Massa de folhas (g)	50	44
Massa de extrato obtida (g)	4,03	3,78
Rendimento (%)	8,1	8,6

Exemplo 2 - Efeito do extrato de laranjeira in vitro sobre culturas de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac)

[0057]A Figura 1 mostra o efeito dos extratos de laranjeira variedades Pêra-rio e Hamlin dissolvidos em DMSO ~100% (Sigma), sobre culturas de bactérias *X. citri* crescidas *in vitro*; onde pode ser visto a variação no tamanho do disco bacteriano, de acordo com o método de difusão em disco. Na Figura 1 DMSO e água são controles e EP = extratos de folhas de laranja variedade Pêra-rio, e EH extrato de folhas de laranja variedade Hamlin, sendo os extratos previamente diluídos em DMSO. Nesta Figura pode ser verificado o efeito antibacteriano satisfatório dos extratos.

Exemplo 3 - Inoculação direta dos extratos com as células: efeito deletério do DMSO nas folhas:

[0058]Para se avaliar o efeito dos extratos sobre a fitopatogenicidade e viabilidade bacterianas *in vivo*, foram realizados testes com folhas de limão galego (*Citrus aurantifolia*), sendo as mesmas infiltradas diretamente com as células de Xac suspendidas em água, DMSO ~100% ou extratos cítricos solubilizados em DMSO ~100%, mas este contato direto da folha com o solvente ocasionou lesões às folhas (Figura 3).

[0059]Aspecto das folhas de limão galego (*Citrus aurantifolia*) após infiltração de DMSO 100%. As folhas mostradas foram documentadas após 1 a 8 dias, sendo que a lesão se inicia no mesmo dia da infiltração.

Exemplo 4 - Efeito do extrato de laranjeira in vitro sobre de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac).

[0060]A Figura 4 mostra o teste *in vivo* realizado para a avaliação do desenvolvimento do cancro cítrico em folhas

de *Citrus aurantifolia* (limão galego) infiltradas com *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) após contato prévio (*in vitro*) das células bacterianas em repouso com os controles água, DMSO 50% e DMSO 100%; extrato de *C. sinensis* variedade Pêra-rio solubilizado em DMSO 50%; e extrato de *C. sinensis* Pêra-rio solubilizado em DMSO 100%. As setas indicam os locais de inoculação das células bacterianas. O experimento foi realizado em folhas destacadas, mantidas em tubos Falcon contendo água, segundo metodologia já descrita (Belasque Jr. et al 2003; Francischini et al., 2003). Os resultados obtidos apontam que foram observados sinais de cancro cítrico nas folhas que foram infiltradas com células de Xac previamente expostas ao extrato de *C. sinensis* Pêra-rio solubilizado com DMSO 50% e, no entanto, com este mesmo extrato solubilizado com DMSO 100% não houve manifestação de cancro cítrico, indicando que o DMSO 100% é o mais indicado para ser usado na solubilização dos agentes químicos, para a aplicação do método de avaliação da atividade antimicrobiana da presente invenção.

[0061]No experimento da Figura 4, é mostrada a avaliação do desenvolvimento do cancro cítrico em folhas de *Citrus aurantifolia* (limão galego) infiltradas com *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) após contato prévio por 15 horas das células bacterianas com: água (controle), DMSO 50% ou DMSO~ 100% (controles) e extrato Pêra-rio, solubilizado com DMSO 50% ou com DMSO~100%. Após cada tratamento e centrifugação, o pellet resultante foi ressuspensionado em água antes da infiltração. As setas indicam os locais de inoculação nas folhas.

Exemplo 5 - Efeito dos extratos sobre a viabilidade

bacteriana in vivo:

[0062] Na Figura 5 pode ser visto o gráfico contendo a contagem das células viáveis de *Xac* recuperadas a partir das folhas infectadas; foi realizada após oito dias da inoculação, por meio de excisão de discos foliares de 8,0 mm de diâmetro, nas imediações das infiltrações, seguida de maceração e plaqueamento (ANDRADE et al., 2008) para quantificação das células viáveis, como detalhado a seguir.

[0063] Os três discos da mesma folha foram retirados e armazenados em um mesmo microtubo (Eppendorf), sendo então realizadas as etapas de desinfecção das folhas em condições estéreis.

[0064] Os três discos de cada folha foram macerados em almofariz contendo 3,0 mL de água destilada estéril, sendo o sobrenadante transferido para um tubo Eppendorf, e em seguida diluído (10^{-2}) para plaqueamento (100 μ L) em meio Agar Nutriente. Após incubação das placas por 2 dias a 28°C, foi realizada a contagem de colônias para determinação do número de UFC (Unidades Formadoras de Colônias).

[0065] Pode ser visto que nas placas de *Xac* tratada previamente com os extratos Pêra-rio ou Hamlim não foram detectadas células viáveis de *Xanthomonas*, enquanto que para o tratamento com DMSO foi observado número de células viáveis comparável com a água (controle), o que confirma o efeito bactericida sobre *Xac* de ambos os extratos (Pera-Rio e Hamlin) de *Citrus sinensis*.

REIVINDICAÇÕES:

1 - Método de avaliação da atividade antimicrobiana de uma composição sobre fitopatógenos **caracterizado** por compreender as etapas de:

(a) Desafiar a cultura de microorganismos de interesse;

(b) Lavagem das bactérias desafiadas e ressuspensão em água;

(c) Inocular as suspensões de bactérias desafiadas na epiderme vegetal;

(d) Análise da epiderme vegetal.

2 - Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de na etapa (a), uma cultura líquida do microrganismo de interesse ser, inicialmente desafiada com uma composição contendo uma quantidade eficaz de um agente químico dissolvido no excipiente; a composição consistida de uma quantidade eficaz de ao menos um agente agroquímico; e, um ao menos um excipiente pode ser testada para verificação de sua eficácia sobre bactérias que são pragas agrícolas.

3 - Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de o ao menos um agente químico ser pertencente ao grupo compreendido de extrato vegetal, óleo essencial, um composto natural isolado, ou um composto químico sintético; o ao menos um excipiente ser pertencente ao grupo consistido de dimetilssulfóxido (DMSO), acetonitrila (MeCN), acetona, etilacetato, tetrahydrofurano (THF), diclorometano (DCM), um álcool C₁ a C₄, ácido acético, água, polissorbato, sorbitol, ou uma misturas destes.

4 - Método de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de o agente químico ser um extrato vegetal, ou um

composto natural isolado; o excipiente ser pertencente ao grupo consistido de dimetilssulfóxido (DMSO), álcool C₁ a C₄, ácido acético, água, polissorbato, sorbitol, ou uma mistura destes.

5 - Método de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de a quantidade eficaz ser uma proporção peso/volume (p/v) de entre 0,01 e 1 g do agente químico por ml do excipiente.

6 - Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de uma massa de microrganismos ser retirada de uma cultura de microrganismos e suspendida em um volume de entre 1 a 10 ml água destilada preferencialmente até alcançar a densidade ótica de 0,3 e, em seguida três alíquotas iguais, de entre 100 a 500 µl, são coletadas e centrifugadas entre 12000 a 18000 g, até sedimentar as células; o sobrenadante ser descartado e o sedimento ressuspendido com 100 a 500 µl de água destilada para controle do experimento; ou 100 a 500 µl de solvente para o controle da composição; ou 100 a 500 µl da composição antibacteriana.

7 - Método de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de as três alíquotas serem mantidas em contato com o desafiante e os controles durante entre 8 a 24 horas, a temperatura entre 20 a 30°C para se verificar o nível de inibição do crescimento dos microrganismos.

8 - Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de na etapa (b), as células das suspensões (i), (ii) e (iii) são recolhidas por centrifugação, o sobrenadante é então descartado e o sedimento é ressuspenso com entre 100 a 500 µl de água destilada.

9 - Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado**

pelo fato de etapa (c), as folhas frescas do vegetal de interesse serem recolhidas com o pecíolo e, limpas com uma solução solvente orgânica; em seguida, na porção inferior de cada folha independente, serem realizadas 3 aplicações de cada um dos 3 inoculos sob a epiderme inferior das folhas, com uma seringa de agulha fina.

10 - Método de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de a solução solvente orgânica ser uma solução de etanol 70%.

11 - Método de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de após a aplicação do inóculo, as folhas serem colocadas na posição vertical em um recipiente adequado contendo água, com o pecíolo sendo parcialmente submerso na água; as folhas permanecem no tubo durante entre 7 a 10 dias.

12 - Método de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de etapa (d) ocorrer pela observação visual de manchas causadas pela proliferação do microrganismo inoculado que permaneceu viável.

13 - Composição antibacteriana caracterizada por compreender entre 0,001 a 1 g/mL de ao menos um agente químico dissolvida em ao menos um excipiente.

14 - Composição de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado** pelo fato de o ao menos um agente químico ser pertencente ao grupo compreendido de extrato vegetal, óleo essencial, um composto natural isolado, e um composto químico sintético; o ao menos um excipiente ser pertencente ao grupo consistido de dimetilssulfóxido (DMSO), acetonitrila (MeCN), acetona, etilacetato, tetrahidrofurano (THF), diclorometano (DCM), um álcool C₁ a C₄, ácido acético, água, polissorbato,

sorbitol, ou uma misturas destes.

15 - Composição de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de o agente químico ser um extrato vegetal.

16 - Composição de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de ainda preferencialmente, o excipiente ser pertencente ao grupo consistido de dimetilssulfóxido (DMSO), álcool C₁ a C₄, ácido acético, água, polissorbato, sorbitol, ou uma mistura destes; e agente químico ser dissolvido em uma proporção de entre 0,05 a 0,8 g/l de excipiente.

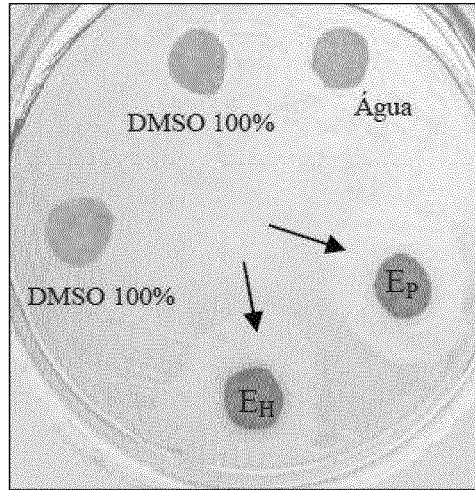


FIGURA 1

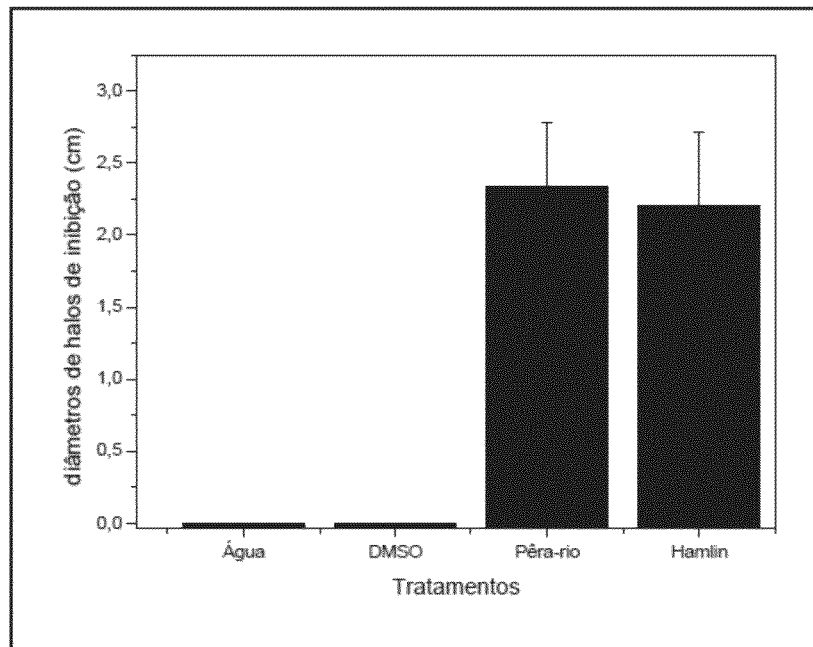


FIGURA 2

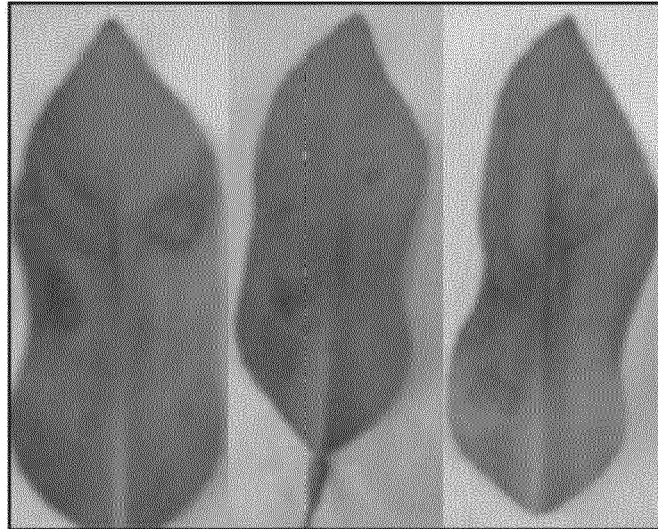


FIGURA 3

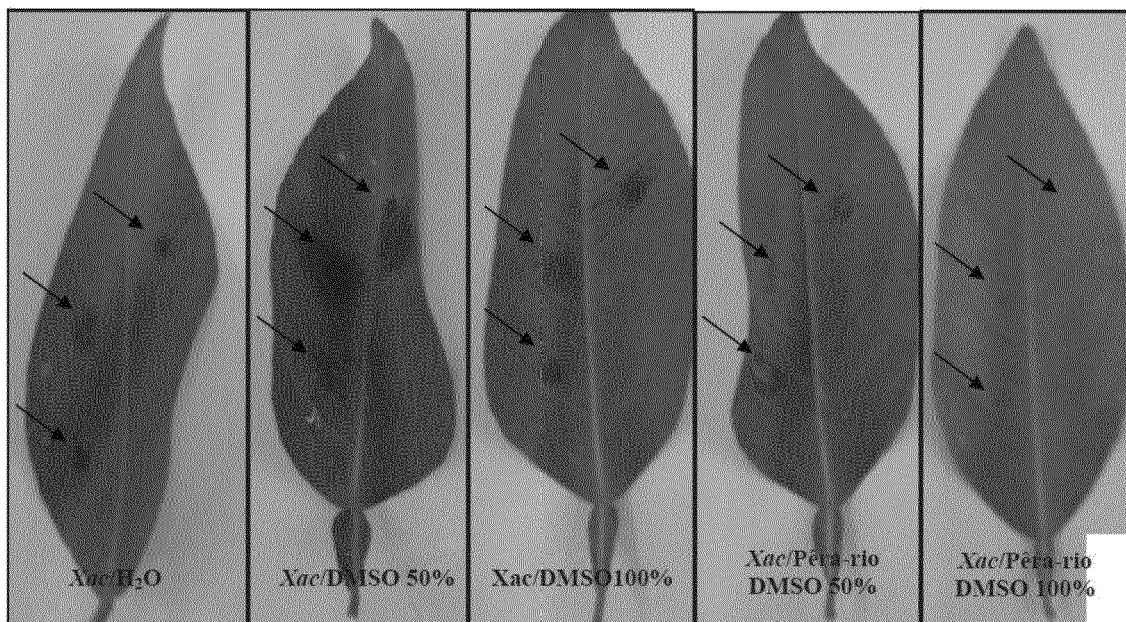


FIGURA 4

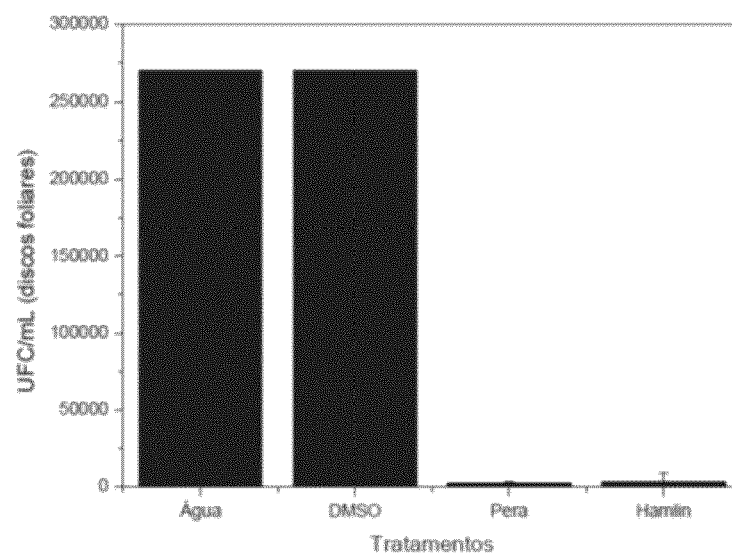


FIGURA 5

RESUMO

MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE UMA
COMPOSIÇÃO SOBRE FITOPATÓGENOS E COMPOSIÇÃO ANTIBACTERIANA

Esta invenção refere-se a um método de avaliação da
atividade antimicrobiana de uma composição sobre
fitopatógenos; e à uma composição antibacteriana caracterizada
por compreender entre 0,001 a 1 g/mL de ao menos um agente
químico dissolvida em ao menos um excipiente.