



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA SOBRE FITOPATÓGENOS:
CHALCONAS METOXILADAS E ÓLEOS ESSENCIAIS DE
Lippia gracilis E SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS**

TAMIRIS APARECIDA DE CARVALHO SANTOS

2024



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

TAMIRIS APARECIDA DE CARVALHO SANTOS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA SOBRE FITOPATÓGENOS: CHALCONAS
METOXILADAS E ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia gracilis* E SEUS COMPOSTOS
MAJORITÁRIOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de Doutora em Ciências”.

Prof^a. Dra. Roberta Pereira Miranda Fernandes
Coorientador
Prof. Dr. Ricardo Scher

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2024

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S237a Santos, Tamiris Aparecida de Carvalho.
Atividade antimicrobiana sobre fitopatógenos : chalconas metoxiladas e óleos essenciais de *Lippia gracilis* e seus compostos majoritários / Fernanda Vieira Santana ; orientadora Roberta Pereira Miranda Fernandes. – São Cristóvão, SE, 2024.
84 f.; il.

Tese (doutorado em Agricultura e Biodiversidade) –
Universidade Federal de Sergipe, 2024.

1. Agricultura. 2. Fungos. 3. Essência e óleos essenciais. 4. Doenças bacterianas das plantas. I. Fernandes, Roberta Pereira Miranda, orient. II. Título.

CDU 632.4

TAMIRIS APARECIDA DE CARVALHO SANTOS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA SOBRE FITOPATÓGENOS: CHALCONAS
METOXILADAS E ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia gracilis* E SEUS COMPOSTOS
MAJORITÁRIOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de Doutora em Ciências”.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2024.

Dra. Camila de Souza Varize Lopes	(EMDAGRO)
Prof. Dr. Marcelo da Costa Mendonça	(UNIT-EMDAGRO)
Prof. Dr. Péricles Barreto Alves	(UFS)
Prof. Dr. Paulo Roberto Gagliardi	(UFS)

Profa. Dra. Roberta Pereira Miranda Fernandes
(Orientadora)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL

*A Deus pela dádiva da vida, à minha família
pelo apoio e amor*
Dedico

AGRADECIMENTOS

Hoje com muita alegria e lágrimas nos olhos escrevo estas palavras, agradeço primeiramente a DEUS, pela vida, força e saúde e por estar vivendo esse momento. Obrigada Senhor, por sonhar pra mim sonhos maiores que os meus. “Até aqui nos ajudou o Senhor”.

Nesta caminhada de 4 anos obtive um grande crescimento profissional e emocional. Agradeço a minha família pelo apoio e carinho, minha mãe Luciana Rodrigues, minha vó Margarida Rodrigues, minhas irmãs Joyce e Lunna Rodrigues, ao meu esposo Cleverton Carvalho pelo apoio e incentivo. Minha homenagem ao meu pai Enoque Carvalho e ao meu querido sogro José Chagas *in memoriam*. Agradeço aos queridos amigos Lázara Lopes, Joana Sueveny, Isabela Vasconcelos e Wandley Souza.

Agradeço a minha querida orientadora, Prof.^a Dra. Roberta Fernandes, já se vão 6 anos de orientação, e muitos ensinamentos e desafios superados, a minha admiração nesses anos só aumentou, a senhora se tornou meu referencial de profissional. Muito obrigada por tudo profe.

Agradeço ao Laboratório de Enzimologia, aos companheiros de estudo Nikolas Chaves, Jéssica Santos, Ana Paula Alves, Larissa Gois, Carol Alves e Sara Rani. Obrigada pelos cafés e pelas tardes de estudo.

Agradeço ao professor Ricardo Scher do Laboratório de Morfologia, agradeço por sempre contribuir com a minha qualificação profissional.

Agradeço ao professor Paulo Roberto Gagliardi do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Sergipe.

Agradeço à equipe do Laboratório de Química da UFS, a Cássia Ferreira e ao professor Péricles Barreto Alves.

Agradeço à banca presente por ter aceitado meu convite.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade.

Agradeço à Universidade Federal de Sergipe.

Agradeço à CAPES, por contribuir com a minha qualificação profissional.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS.....	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Fungos que causam doenças agrícolas	2
2.1.1 <i>Macrophomina phaseolina</i>	2
2.1.2 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	3
2.1.3 <i>Sclerotium</i> sp.....	5
2.2 Doença causada pela bactéria <i>Acidovorax citrulli</i>	6
2.2.1 Biofilme bacteriano	8
2.3 Doenças causadas pelos protozoários <i>Phytomonas</i> sp	10
2.4 Controle das doenças agrícolas	11
2.5 Metabólitos secundários de plantas.....	11
2.6 Metabólitos secundários da classe das chalconas	11
2.6.1 Atividades biológicas das chalconas no setor agrícola	14
2.7 Óleos essenciais e monoterpenos	15
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
4. ARTIGO 1: Síntese e caracterização de chalconas contendo grupos metoxilas com atividade antimicrobiana sobre fitopatógenos.....	27
Resumo	27
4.1. Introdução	29
4.2. Material e métodos	29
4.2.1 Síntese e caracterização das chalconas	29
4.2.1.1 Ponto de fusão (p.f.).....	30
4.2.1.2 Espectroscopia Infravermelho (FTIR)	30
4.2.1.3 Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN).....	30
4.2.1.4 Cromatografia gasosa/Espectrometria de massas (CG-EM/IVD)	30
4.2.2 Atividade antifúngica	33
4.2.2.1 Microscopia de fluorescência	33
4.2.3 Atividade antibacteriana	33
4.2.4 Atividade antiprotozoária.....	33
4.3. Resultados e discussão	34
4.3.1 Síntese das estruturas das chalconas	34
4.3.2 Avaliação antifúngica	34
4.3.2.1 Microscopia de fluorescência de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	35
4.3.3 Atividade antibacteriana	35
4.3.4 Atividade antiprotozoária	36
4.4. Conclusões	36
4.5. Referências Bibliográficas	37
5. ARTIGO 2: Efeito do óleo essencial de <i>Lippia gracilis</i> e dos compostos majoritários timol e carvacrol na inibição do crescimento, formação de biofilme, motilidade e na permeabilidade da membrana de <i>Acidovorax citrulli</i>	50
Resumo	50
5.1. Introdução	52
5.2. Material e métodos	53

5.2.1 Materiais vegetais	53
5.2.2 Material biológico	53
5.2.3 Seleção da atividade antimicrobiana de OEs de acessos de <i>Lippia gracilis</i> sobre <i>Acidovorax citrulli</i>	53
5.2.4 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB)	54
5.2.5 Crescimento bacteriano	54
5.2.6 Atividade antibiofilme	54
5.2.7 Atividade na permeabilidade da membrana plasmática	55
5.2.8 Atividade na motilidade natatória	55
5.2.9 Análises estatísticas	55
5.3. Resultados	55
5.3.1 Seleção da atividade antimicrobiana de OEs de acessos de <i>Lippia gracilis</i> em <i>Acidovorax citrulli</i>	55
5.3.2 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB).....	55
5.3.3 Crescimento bacteriano	56
5.3.4 Atividade antibiofilme	56
5.3.5 Atividade na permeabilidade da membrana plasmática.....	56
5.3.6 Atividade na motilidade natatória	56
5.4. Discussão	56
5.5. Conclusões	59
5.6. Referências Bibliográficas	59
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	70

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura		Página
1	Sintomas de antracnose em diversos frutos tropicais (A) goiaba, (B) pitaya, (C) banana, (D) manga e (E) mamão	4
2	Podridão dos frutos cobra (A) e podridão do caule da alface (B).....	5
3	Distribuição geográfica da bactéria <i>Acidovorax citrulli</i>	6
4	Ciclo de vida da bactéria <i>Acidovorax citrulli</i> no meloeiro	7
5	Sintomas gerais de mancha aquosa dos frutos causada por <i>Acidovorax citrulli</i> em meloeiro. (a) Lesões encharcadas de água nos cotilédones, (b) Manchas angulares variando do marrom claro para o marrom escuro, lesões necróticas em folhas verdadeiras limitadas pelas veias, (c) Lesões necróticas irregulares de coloração marrom avermelhada em folhas, (d, e) Polpa da fruta encharcada de água, aprofundada, escurecida, seguida de trincas, (f) Amolecimento e apodrecimento	8
6	Etapas de formação do biofilme	9
7	Estrutura fundamental da chalcona.....	12
8	Planta de alcaçuz (direita) e raiz (esquerda).	13
9	Biossíntese de terpenos a partir de pentacarbonados básicos Isopentenil difosfato (IPP) e Dimetilalil difosfato.	15
10	Monoterpenos timol (A) e carvacrol (B).	16

ARTIGO 1

Figura		Página
1	Estruturas químicas das chalconas.....	43
2	Microscopia de fluorescência de hifas de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . Fragmentos miceliais foram cultivados por 24 horas e expostos à CH0 por 12 horas. (A) Controle negativo: micélio tratado com 1% de DMSO, (B) 1X IC ₅₀ , (C) 2X IC ₅₀ , (D) 4X IC ₅₀ e (E) controle positivo: células expostas a 100 °C/10 min. As imagens foram adquiridas usando microscopia de campo claro combinada com fluorescência em uma objetiva de 10X	46
3	Seleção das chalconas com atividade antiprotzoária em <i>Phytomonas serpens</i> . Promastigotas a 5x10 ⁶ células/mL foram cultivadas na presença das chalconas na concentração de 25µM. Anfotericina B a 20µM foi usada como controle positivo (CP) e células não tratadas como controle negativo. A viabilidade celular foi determinada pelo método de Resazurina após 24 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata com três experimentos independentes. Os dados mostram a média ± erro padrão da média (SEM).....	48

ARTIGO 2

Figura		Página
1	Seleção da atividade antimicrobiana dos OEs de <i>Lippia gracilis</i> (acessos LGRA 106, LGRA 107, LGRA 108, LGRA 109, LGRA 110, LGRA 201 e LGRA 202) na concentração de 1.000 µg.mL ⁻¹ para a bactéria <i>Acidovorax citrulli</i>	62
2	Crescimento de células bacterianas de <i>Acidovorax citrulli</i> expostas a concentrações equivalentes a 2XCMI, 1XCMI, ½ CMI e ¼ CMI do timol (A), carvacrol (B) e OE LGRA 106 (C) nos tempos de 5, 30, 60, 120 e 180 min. Todos os dados foram expressos em média ± erro padrão da média de	64

- três experimentos independentes. Os dados diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett *p <0,05, ** p <0,01.....
- 3 Inibição do biofilme bacteriano de *Acidovorax citrulli* expostas a concentrações equivalentes a 2X CMI, 1XCMI ½ CMI de timol (A), carvacrol (B) e OE LGRA 106 (C). Todos os dados foram expressos em média ± erro padrão da média de três experimentos independentes. Os dados diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett *p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001, ****p<0,0001..... 65
- 4 Permeabilidade da membrana de *Acidovorax citrulli* expostas a concentrações equivalentes a 1XCMI de timol, carvacrol e OE LGRA 106 em 5 e 60 min. O controle negativo (CN) foi realizado com células bacterianas expostas à DMSO 1%. O controle positivo (CP) foi realizado com células expostas a 100°C/5min. Todos os dados foram expressos em média ± erro padrão da média de três experimentos independentes. Os dados diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett *p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001, ****p<0,0001..... 66
- 5 Motilidade natatória de *Acidovorax citrulli* expostas a concentrações equivalentes a 1XCMI, ½ CMI de timol (A) e carvacrol (B). O controle negativo (CN) foi realizado com células bacterianas expostas à DMSO 1%. Todos os dados foram expressos em média ± erro padrão da média de três experimentos independentes. Os dados diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett *p <0,05, ** p <0,01..... 67

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela		Página
1	Inibição do crescimento micelial (%) dos fungos <i>Sclerotium</i> sp, <i>Macrophomina phaseolina</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , expostos às chalconas na concentração de 1mM.	44
2	Concentração inibitória (IC ₅₀) das chalconas ativas sobre fungos <i>Sclerotium</i> sp, <i>Macrophomina phaseolina</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	45
3	Taxas de inibição do crescimento bacteriano de <i>Acidovorax citrulli</i> cepas CCRM 1.39 e CCRM 1.73 expostas às chalconas na concentração de 1mM	47
4	Concentração inibitória (IC ₅₀) das chalconas ativas sobre <i>Phytomonas serpens</i>	49

ARTIGO 2

Tabela		Página
1	Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) dos OEs dos acessos de <i>Lippia gracilis</i> e os compostos majoritários timol e carvacrol sobre <i>Acidovorax citrulli</i>	63
2	Composição dos óleos essenciais dos acessos de <i>Lippia gracilis</i> analisados por CG-EM	68
3	Código, origem e informações geográficas dos sete acessos da coleção de <i>Lippia gracilis</i> do banco ativo de germoplasma de plantas medicinais e aromáticas da Universidade Federal de Sergipe	69

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

DMSO	Dimetil sulfóxido
BDA	Batata Dextrose e ágar
YM	Yeast malt
LB	Luria Bertani
PIC	Porcentagem de inibição de crescimento
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50% do crescimento
CMI	Concentração mínima inibitória
CMB	Concentração mínima bactericida
PBS	Tampão fosfato salino
PI	Iodeto de propídeo
Dm	Diâmetro médio
MF	Microscopia de fluorescência
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas
IV	Infravermelho
OEs	Óleos essenciais
AIs	Autoindutores

RESUMO

SANTOS, Tamiris Aparecida de Carvalho. **Atividade antimicrobiana sobre fitopatógenos: chalconas metoxiladas e óleos essenciais de *Lippia gracilis* e seus compostos majoritários.** São Cristóvão: UFS, 2024. 84p. (Tese – Doutorado em Agricultura e Biodiversidade).*

O controle químico é frequentemente utilizado para o controle de doenças agrícolas, no entanto problemas como a contaminação ambiental e riscos à saúde humana tem impulsionado a busca por novas alternativas. Os metabólitos secundários (MS) das plantas possuem várias atividades biológicas, dentre elas o controle de microrganismos. As chalconas são produzidas no metabolismo secundário das plantas, mas também podem ser obtidas por reação de Claisen-Schmidt. Outros MS importantes são os óleos essenciais (OEs), misturas voláteis complexas com caráter hidrofóbico e odorífero. Os monoterpenos são constituintes de diversos OEs, sendo que os principais presentes nos OEs da espécie *Lippia gracilis* são o timol e o carvacrol. Estes monoterpenos apresentam diversas atividades biológicas, dentre elas a antimicrobiana. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antimicrobiano de 15 chalconas para os fungos *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotium* sp, *Colletotrichum gloeosporioides*, bactéria *Acidovorax citrulli* e o fitoparasita *Phytophthora parasitica*. Também foi determinada a atividade antimicrobiana dos OEs de sete acessos de *Lippia gracilis* e os compostos majoritários timol e carvacrol. As chalconas foram inicialmente submetidas a uma seleção para atividade antifúngica (1mM), antibacteriana (1mM) e antiprotozoária (25µM). Posteriormente, para as moléculas que apresentaram inibição superior a 50%, foi determinada a IC₅₀. Para o fungo *C. gloeosporioides*, a molécula com a menor IC₅₀ foi avaliada quanto a seu efeito na permeabilidade da membrana das hifas fúngicas. Na atividade antimicrobiana dos sete OEs e timol e carvacrol foi realizada a determinação da CMI e CMB. O inóculo bacteriano crescido em meio LB na D.O de 0,5 foi exposto aos OEs e monoterpenos e incubados por 24h (150 rpm/28°C). Foi avaliado crescimento, atividade antibiofilme, permeabilidade da membrana e motilidade bacteriana. Todos os dados foram expressos em média e erro padrão, a IC₅₀ foi calculada por equação logarítmica, os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Dunnett pelo programa GraphPad prism 8.1. As chalconas CH0, CH1, CH2, CH8 apresentaram maior potencial antifúngico. A menor IC₅₀ observada foi CH0 (47,3µM) em *C. gloeosporioides*. O tratamento com CH0 resultou em incremento na permeabilidade da membrana das hifas de *C. gloeosporioides*. As chalconas avaliadas reduziram por volta de 90% a viabilidade de *P. serpens*, as mais ativas foram CH2, CH3, CH5 e CH14. Todos os OEs avaliados apresentaram inibição (acima de 97,3%) da bactéria *A. citrulli*. As menores CMIs foram OE 106 (500 µg.mL⁻¹), timol e carvacrol (250µg.mL⁻¹). A concentração da CMI do OE 106, timol e carvacrol inibiram o crescimento bacteriano após 30 min de exposição. Com 60 min de exposição, o timol também inibiu o crescimento na concentração sub-inibitória (½ CMI). O timol apresentou melhor atividade antibiofilme, com inibição de 100% do biofilme na CMI. Foi constatado o aumento na permeabilidade da membrana após 5 min de exposição com a concentração da CMI das três moléculas estudadas. A motilidade natatória foi significativamente reduzida com as concentrações de ½ e CMI do timol e carvacrol. As chalconas, assim como os óleos essenciais de *Lippia gracilis* e seus compostos majoritários, apresentam potencial antimicrobiano para o controle de doenças agrícolas.

Palavras-chave: Antifúngica, Antiprotozoária, Antibiofilme, Membrana plasmática, Timol, Carvacrol.

* Comitê Orientador: Roberta Pereira Miranda Fernandes – UFS (Orientadora), Ricardo Scher – UFS (Coorientador).

ABSTRACT

SANTOS, Tamiris Aparecida de Carvalho. **Antimicrobial activity against phytopathogens: methoxylated chalcones and essential oils from *Lippia gracilis* and their major componentes.** São Cristóvão: UFS, 2024. 84p. (Thesis – Doctor of Science in Agriculture and Biodiversity).*

Chemical control is commonly employed for managing agricultural diseases; however, issues such as environmental contamination and human health risks have prompted the search for new alternatives. Plant secondary metabolites (SMs) exhibit various biological activities, including microorganism control. Chalcones are produced in plant secondary metabolism but can also be obtained via the Claisen-Schmidt reaction. Other important SMs include essential oils (EOs), complex volatile mixtures with hydrophobic and odorous characteristics. Monoterpenes are constituents of various EOs, with thymol and carvacrol being the principal components in the EOs of the *Lippia gracilis* species. These monoterpenes demonstrate diverse biological activities, including antimicrobial effects. The objective of this study was to assess the antimicrobial potential of 15 chalcones against the fungi *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotium* sp, *Colletotrichum gloeosporioides*, the bacterium *Acidovorax citrulli*, and the phytoparasite *Phytomonas serpens*. Additionally, the antimicrobial activity of EOs from seven *Lippia gracilis* accessions and the major compounds thymol and carvacrol were determined. Chalcones were initially screened for antifungal (1mM), antibacterial (1mM), and antiprotozoal (25µM) activities. Subsequently, molecules exhibiting inhibition above 50% were subjected to IC₅₀ determination. For the fungus *C. gloeosporioides*, the molecule with the lowest IC₅₀ was evaluated for its effect on fungal hyphal membrane permeability. MIC and MBC determination were conducted for the antimicrobial activity of the seven EOs, thymol, and carvacrol. A bacterial inoculum grown in LB medium at OD 0.5 was exposed to EOs and monoterpenes and incubated for 24 hours (150 rpm/28°C). Growth, antibiofilm activity, membrane permeability, and bacterial motility were evaluated. All data were expressed as mean and standard error; IC₅₀ was calculated using a logarithmic equation, and the data were analyzed using analysis of variance and Dunnett's test with GraphPad Prism 8.1 software. Chalcones CH0, CH1, CH2, and CH8 exhibited the highest antifungal potential. The lowest observed IC₅₀ was CH0 (47.3µM) against *C. gloeosporioides*. Treatment with CH0 resulted in increased permeability of *C. gloeosporioides* hyphal membranes. Evaluated chalcones reduced the viability of *P. serpens* by approximately 90%, with the most active being CH2, CH3, CH5, and CH14. All evaluated EOs inhibited the growth of *A. citrulli* (above 97.3%). The lowest MICs were OE 106 (500 µg/mL), thymol, and carvacrol (250µg/mL). Treatment with OE 106, thymol, and carvacrol at MIC inhibited bacterial growth after 30 minutes of exposure. With thymol also inhibiting growth at sub-inhibitory concentrations (½ MIC) after 60 minutes of exposure. Thymol exhibited superior antibiofilm activity, inhibiting 100% of biofilms at MIC. Increased membrane permeability was observed after 5 minutes of exposure to the MIC concentration of all three studied molecules. Swimming motility was significantly reduced with ½ and MIC concentrations of thymol and carvacrol. Chalcones, as well as the essential oils of *Lippia gracilis* and their major compounds, demonstrate antimicrobial potential for agricultural disease control.

Key-words: Antifungal, Antiprotozoal, Antibiofilm, Plasma Membrane, Thymol, Carvacrol.

* Guidance Committee: Roberta Pereira Miranda Fernandes – UFS (Advisor), Ricardo Scher – Universidade Federal de Sergipe.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Diversos microrganismos causam doenças em plantas. Essas doenças podem ser causadas por fungos, bactérias, vírus, protozoários. Dentre as principais espécies de fungos fitopatogênicos estão o *Colletotrichum gloeosporioides*, *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotium* sp. O gênero *Colletotrichum* é classificado como um dos gêneros fúngicos de maior importância econômica, sendo praticamente todas as espécies cultivadas suscetíveis a pelo menos uma espécie deste gênero fúngico (Dean *et al.*, 2012). A antracnose é causada por *C. gloeosporioides*, em frutos é considerada uma doença de relevância, pois causa danos irreversíveis, a infecção é persistente em toda as etapas de produção, podendo comprometer o fornecimento de frutos aos consumidores (Gonçalves *et al.*, 2021).

Macrophomina phaseolina é um fungo de solo com uma ampla lista de hospedeiros, este fungo causa na soja a doença denominada podridão do carvão. Ocorre em regiões tropicais de todo o mundo e em condições favoráveis pode causar perdas significativas na cultura da soja e sorgo, reduzindo o rendimento de agricultores. O controle deste fungo é dificultado devido à sua ampla variabilidade de hospedeiros e ao fato da produção de microescleródios que são estruturas de resistência que podem permanecer no solo por um período de até 15 anos (Marquez *et al.*, 2021).

Outro fungo fitopatogênico de importância econômica é o *Sclerotium* sp, este patógeno de solo pode causar doenças em diversas culturas. O fungo *Sclerotium* sp foi relatado como causador de graves danos na cultura da alface (Wonglom *et al.*, 2019). A espécie *Sclerotium rolfsii* causou surtos graves da podridão do pé e podridão da cabeça nas principais regiões produtoras de repolho da Índia (Tejaswini *et al.*, 2022).

A espécie *Acidovorax citrulli* é uma fitobactéria gram-negativa que infecta diversas cucurbitáceas como melão, melancia, e causa a doença denominada mancha aquosa dos frutos. Esta bactéria é categorizada pela EPPO (2024) na lista A1 devido ao seu potencial destrutivo. Não existem materiais resistentes a esta bacteriose, o controle da doença é preventivo e feito pelo uso de sementes sadias (Assunção *et al.*, 2019).

O gênero *Phytophthora* agrupa espécies de tripanossomatídeos que infectam as plantas, as espécies *Phytophthora staheli* e a *Phytophthora leptovascularum* são comprovadamente patogênicas, *Phytophthora staheli* causando as doenças Hartrot (coqueiro) e marchitez sorpressiva (palmeiras produtoras de óleo) e *P. leptovascularum* (necrose do cafeeiro), a erradicação das plantas infectadas e dos vetores têm sido a única medida de controle (Jaskowska *et al.*, 2015). A espécie *Phytophthora serpens* é um fitoparasita de tomate de fácil cultivo, considerado um modelo de estudos para espécies do gênero *Phytophthora* (Costa, 2006).

As chalconas podem ocorrer no metabolismo secundário de plantas, são precursoras dos flavonoides e estão ligadas à polinização e defesa contra patógenos. As chalconas também podem ser sintetizadas por reações orgânicas, sendo a mais utilizada a síntese de Claisen-Schmidt, estas moléculas apresentam diversas atividades biológicas documentadas (Díaz-Tielas *et al.*, 2016). Outros metabólitos secundários são os óleos essenciais, que são uma mistura complexa de caráter volátil e de aroma intenso, também estão ligados à defesa vegetal e apresentam diversas atividades biológicas (Bakkali *et al.*, 2008).

As chalconas, assim como óleos essenciais (OEs) e monoterpenos presente nos OEs, são metabólitos secundários de plantas que apresentam ampla atividade antimicrobiana documentadas (Guo *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2022; Jiang *et al.*, 2021; Hajian-Maleki *et al.*, 2019).

O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial antifúngico, antibacteriano e antiprotozoário de 15 chalconas sobre os fitopatógenos *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Sclerotium* sp, *Acidovorax citrulli* e *Phytophthora serpens*, além de avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de sete acessos de *Lippia gracilis* assim como dos seus compostos majoritários timol e carvacrol para o controle de *A. citrulli*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fungos que causam doenças agrícolas

2.1.1 *Macrophomina phaseolina*

Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid é um fungo ascomiceto que pertence à família Botryosphaeriaceae, é um patógeno de solo que infecta mais de 500 espécies de plantas e mais de 100 famílias. No Brasil as espécies mais comumente suscetíveis são feijão caupi, soja, sorgo, milho, amendoim, girassol e crotalária (Shirai; Eulgem, 2023; Gupta *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2014).

Esse fungo causa doenças como podridão de caule e raiz, carvão e ferrugem das mudas. Em condições de altas temperaturas (30-35 °C) e baixa umidade (abaixo de 60%) podem promover perdas de rendimento consideráveis em culturas como soja e sorgo (Marquez *et al.*, 2021). A espécie fúngica *M. phaseolina* ocorre em todos os continentes, principalmente em regiões de clima árido e semiárido. Dentre os fatores que contribuem para sua sobrevivência e ocorrência destacam-se as altas temperaturas e solos com estresse hídrico (Lodha; Mawar, 2020).

Infecções pelo fungo *M. phaseolina* já resultaram em perdas de 100% de rendimento em plantios de amendoim em fase de pré-emergência (Marquez *et al.*, 2021). As perdas no rendimento da soja foram de 1,9 a 2 milhões de toneladas no período de 2003-2012, sabe-se que leguminosas cultivadas em condições de sequeiro são altamente suscetíveis. Também foram relatadas perdas de 70% da produtividade de feijão em regiões semiáridas do Quênia (Lodha; Mawar, 2020). Devido à sua ocorrência em âmbito global, variedade de hospedeiros e impactos crescentes na agricultura, o fungo *M. phaseolina* foi mencionado como “Destruidor de colheitas” (Shirai; Eulgem, 2023).

O fungo *M. phaseolina* em soja causa a doença denominada podridão de carvão que afeta as raízes e caules. Em plantas jovens, na emergência ocorrem manchas marrom-escuras no colo, as plantas que sobrevivem apresentam amarelecimento no período de formação das vagens, o qual evolui para murcha, as folhas permanecem aderidas às plantas e caídas ao longo da haste, posteriormente secam e tornam-se marrom escura. A epiderme das raízes apresenta aspecto solto onde é possível observar pontos escuros que são os microescleródios fúngicos, estes também podem estar incrustados na camada externa do córtex, onde se é possível ver a medula com micélio (Almeida *et al.*, 2014). As sementes das plantas também são afetadas podendo ocorrer manchas pretas, os microescleródios podem ocorrer nas fissuras do tegumento das sementes (Gupta *et al.*, 2012).

O fungo *M. phaseolina* produz microescleródios que são estruturas de resistência formadas por uma massa compacta de micélio endurecido, os formatos podem variar de esférico, oval ou oblongo, em fase jovem a coloração é marrom clara, quando envelhecido a coloração passa para castanho escuro a preto (Marquez *et al.*, 2021). O fungo também produz picnídios que são estruturas de reprodução assexuada, no entanto em condições *in vitro* ocorrem raramente (Shirai; Eulgem, 2023).

Este patógeno apresenta quatro fases de ciclo, fase de germinação, penetração, fase parasitária e saprofítica. No solo o fungo pode sobreviver até 3 anos, podendo permanecer em restos de cultura na forma de microescleródios (Pandey; Basandrai, 2021).

Em condições favoráveis os microescleródios germinam na superfície da raiz e produzem hifas, os apressórios penetram as paredes celulares epidérmicas do hospedeiro por aberturas naturais. No período de semeadura e emergência, o fungo *M. phaseolina* também pode infectar por meio de cotilédones, radículas e lesões superficiais em raízes. As hifas colonizam o tecido cortical onde crescem de forma intercelular. O fungo se espalha pela raiz e infecta o sistema vascular produzindo micélios e escleródios. Dentro dos vasos promovem a obstrução dos tecidos do xilema e impedem a passagem de água da raiz para as folhas, provocando murcha ou morte do hospedeiro devido à infecção sistêmica. Durante a infecção

são produzidas toxinas como botriodiplodina e faseolinona que auxiliam no processo de desenvolvimento da doença (Pandey; Basandrai, 2021).

Com o avanço da doença as plantas hospedeiras secam e as raízes apresentam apodrecimento e aparência desfiada, é possível observar nas raízes e caules a presença de lesões de coloração marrom carvão com produção de micélios escuros e produção de microescleródios pretos. À medida que a planta começa a se decompor esses microescleródios são liberados no solo, o que faz com que o ciclo de infecção se reinicie (Pandey; Basandrai, 2021).

Este patógeno é de difícil controle devido à produção de microescleródios durante a decomposição de restos de cultura infectados e ainda não existem cultivares de soja resistentes, então a rotação de cultura é usada para redução do inóculo, mas não há eliminação (Lodha; Mawar, 2020). A rotação de cultura é pouco eficaz devido ao fato deste fungo apresentar ampla variedade de hospedeiros além de permanecer no solo por longos períodos em restos de cultura (microescleródios) (Short *et al.*, 1980). A localização da infecção, a ampla variedade de hospedeiros e a formação de microescleródios dificultam as estratégias de manejo. Não há produtos químicos registrados para o controle da doença, é crescente a busca por novas formas de controle (Marquez *et al.*, 2021).

2.1.2 *Colletotrichum gloeosporioides*

O gênero *Colletotrichum* engloba espécies com diversos modos de vida, incluindo principalmente formas hemibiotróficas, endofíticas e, mais notavelmente, fitopatogênicas. As espécies fitopatogênicas apresentam alta variabilidade genética, o que dificulta a manutenção da resistência nas plantas. Espécies desse gênero causam antracnose, importante doença que reduz a produção de várias culturas de importância econômica em todo mundo (Silva *et al.*, 2020). Devido a isso o gênero está entre os 10 gêneros com maior importância econômica, pois praticamente todas as espécies de plantas cultivadas são suscetíveis a uma ou mais espécies desse gênero (Dean *et al.*, 2012).

Algumas espécies de *Colletotrichum* relacionadas à antracnose de frutos podem infectar múltiplos hospedeiros, no entanto outras apresentam especificidade em relação ao hospedeiro. Comumente a infecção acontece ainda no campo, nos estádios de floração e frutificação e, diversas espécies permanecem quiescentes ou latentes até que as condições ambientais e do hospedeiro estejam propícias ao desenvolvimento que ocorre geralmente no amadurecimento do fruto. A umidade, temperatura, condições do fruto e concentração do inóculo são fatores importantes que afetam a ocorrência de antracnose (Zakaria, 2021).

A maioria das espécies do gênero *Colletotrichum* apresenta modo de vida hemibiotrófico com fases biotrófica e necrótica. Na fase biotrófica o fungo sobrevive e adquire nutrientes sem que haja perturbação da célula vegetal viva e de modo assintomático. Após a colonização primária ocorre a transição para a fase necrótica, sendo que o período de transição varia mediante a espécie e as condições ambientais. Nessa fase o fungo secreta toxinas e enzimas que degradam o tecido celular (Silva *et al.*, 2020).

A antracnose é uma doença cosmopolita que ocorre em frutíferas de áreas tropicais e subtropicais (Bordoh *et al.*, 2020). Dentre as frutas mais afetadas estão a manga, mamão, banana, abacate, goiaba e pitaya, culturas economicamente importantes para países em desenvolvimento (Zakaria, 2021).

A quiescência é o período intermédio entre a penetração fúngica e a ativação da colonização. Quando os fungos estão quiescentes a fruta aparenta estar saudável, contudo, ao iniciar a fase necrótica, ocorre o aparecimento de lesões que se intensificam com a maturação. As lesões em frutos são manchas escuras e arredondadas na casca, na parte central das lesões podem ocorrer massa de acérvulos e conídios de cor laranja ou rosa (Fig. 1). A antracnose em frutos é considerada uma doença relevante, uma vez que afeta frutos após a maturação e seus danos são irreversíveis, sendo persistentes nas etapas da cadeia produtiva como

armazenamento, transporte e comercialização, o que pode dificultar o fornecimento de frutas aos consumidores (Gonçalves *et al.*, 2021).

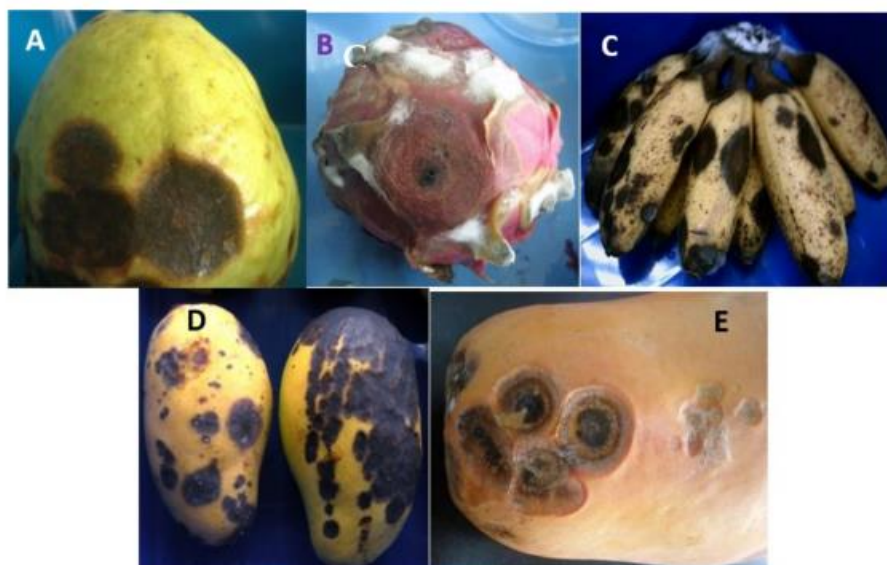


Figura 1. Sintomas de antracnose em diversos frutos tropicais (A) goiaba, (B) pitaya, (C) banana, (D) manga e (E) mamão. **Fonte:** Latiffah Zakaria.

Na China a podridão amarga causada pelo fungo *C. fructicola* promoveu perdas de 60 a 90% da produção de peras mesmo com a aplicação de fungicidas, as perdas foram de 10 a 20% com a intensa aplicação de fungicidas, assim a doença se espalhou por cerca de 40.000 hectares na região cultivada com maçã e resultou em um prejuízo econômico de 150.000 milhões de dólares em 2008 (Li *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2014).

A banana é um dos frutos mais consumidos do mundo, as bananeiras são infectadas por espécies de *Colletotrichum* ainda em campo e como a fruta é colhida verde, no processo de amadurecimento, as lesões necróticas aparecem. Danos mecânicos durante o beneficiamento e transporte também podem facilitar a infecção e a ocorrência da doença. A espécie *C. musae* é frequentemente associada à antracnose da banana, esta espécie pode causar lesões nas extremidades de caules e na coroa, assim como apodrecimento das flores (Zakaria, 2021).

Em mangas a espécie *C. gloeosporioides sensu lato* é relatada como causadora da antracnose em todo mundo, no entanto também pode ocorrer a presença da espécie *C. acutatum* em mangueiras. A incidência da doença pode chegar a 100% em áreas úmidas, as partes afetadas vão desde frutos a galhos e flores (Zakaria, 2021).

O mamão é uma fruta que também apresenta suscetibilidade a espécies de *Colletotrichum*. Inicialmente as espécies *C. gloeosporioides*, *C. capsici* foram relatadas como responsáveis pela antracnose em várias partes do mundo. Recentemente a espécie *C. dematium* foi relatada como causadora da antracnose em mamoeiro no México (Zakaria, 2021).

A antracnose não ocorre apenas em frutos, as espécies de *Colletotrichum* podem causar essa doença em soja e causar até 50% da perda de grãos. Inicialmente *C. acutatum* era a principal espécie associada à antracnose na soja, no entanto atualmente outras espécies têm sido relatadas. Os sintomas podem ocorrer na pré e pós-emergência e são observadas lesões necróticas e *damping-off*, além de lesões escuras e deprimidas em diferentes partes da planta como pecíolo, cotilédones, caules e vagens. Nas folhas são observadas veias necróticas que

resultam em desfolha, a vagem pode apresentar podridão, abertura prematura ou germinação de sementes (Bouffleur *et al.*, 2021).

Estima-se que de 30 a 50% das perdas de pitaya e mamão ocorram por antracnose causada pela espécie *C. gloeosporioides*, sendo imprescindível a adoção de medidas de controle (Bordoh *et al.*, 2020; Shi *et al.*, 2021). Dentre as formas de manejo da doença são utilizadas estratégias como controle biológico com bactérias como *Bacillus subtilis* e fungos filamentosos como *Aureobasidium pullulans*, *Trichoderma harzianum*, espécies de leveduras como *Pichia membranaefaciens* e *Saccharomyces cerevisiae* (Shi *et al.*, 2021). Aplicações de fungicidas como propiconazol, carbendazim benomil, maneb e captan são práticas bastante comuns utilizadas pelos agricultores (Bordoh *et al.*, 2020).

2.1.3 *Sclerotium* sp.

Dentre as espécies de *Sclerotium* sp a mais estudada é *Sclerotium rolfsii*, um fungo de solo capaz de infectar diversas espécies como tomate, batata, amendoim, maçã, além de plantas lenhosas e ornamentais. Esse fungo possui mais de 500 hospedeiros e sua infecção inicia-se pela parte inferior do caule próxima ao solo. Com o desenvolvimento da doença ocorre murcha e formação de uma massa de micélio e, por fim, o tombamento da planta devido à podridão do caule inferior com sinais de escleródios no local. A doença ocorre de forma global, sendo maior a incidência nas regiões quentes e úmidas (Mullen, 2001).

Sclerotium sp foi relatado como causador da severa podridão em frutos da cobra e graves danos na cultura da alface em províncias da Tailândia (Fig. 2) (Wonglom *et al.*, 2019).



Figura 2. Podridão dos frutos cobra (A) e podridão do caule da alface (B). **Fonte:** Wonglom *et al.* (2019).

Nas principais regiões produtoras de repolho da Índia, *Sclerotium rolfsii* foi relatado causando surtos graves da podridão do pé em 2017 e podridão da cabeça em 2019. Esses foram os primeiros relatos dessa doença causada pela espécie *Sclerotium rolfsii* (Tejaswini *et al.*, 2022).

Outra doença importante do ponto de vista agrícola é a podridão do caule do arroz causado por *Sclerotium oryzae*, a doença promoveu perdas de até 35% da colheita, o que é de relevância uma vez que o arroz é um produto de subsistência (Ghosh *et al.*, 2020).

Dentre os métodos de controle utilizado na gestão de doenças causados por *Sclerotium* sp estão a remoção de plantas doentes, tratamento do solo, rotação de cultura, tratamento das plantas e utilização de variedades resistentes (Mullen, 2001). Nos tratamentos das plantas infectadas por *Sclerotium oryzae* é utilizada a aplicação de fungicidas como propiconazol, tiofanato-metilico, tiofanato metil, carbendazim, benomyl, Domosan, entre outros (Ghosh *et*

al., 2020). Outra maneira de controle atualmente relatada é o controle biológico a partir do uso do fungo *Trichoderma* sp. (Wonglom *et al.*, 2019; Ghosh *et al.*, 2020).

2.2 Doença causada pela bactéria *Acidovorax citrulli*

Diversas bacterioses em plantas são documentadas na literatura, a espécie *Acidovorax citrulli* é uma bactéria fitopatogênica que pertence à classe β proteobactéria, ordem Burkholderiales, família Comamonadaceae, gênero *Acidovorax*, espécie *citrulli* (Burdman; Walcott, 2012). São fitobactérias gram-negativas aeróbicas, com formato de bastonetes com dimensões de 0,5 a 1,7 μm que apresentam flagelo polar de 5 μm responsável por sua mobilidade. Inicialmente nomeada como *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp *citrulli* (Schaad *et al.*, 1978) e posteriormente reclassificada de *Acidovorax avenae* subsp *citrulli* para *Acidovorax citrulli* (Schaad *et al.*, 2008).

Inicialmente a bactéria *A. citrulli* foi relacionada a doenças apenas das cucurbitáceas como melão, melancia, abóbora e pepino, no entanto posteriormente foram descobertas plantas hospedeiras alternativas como pimentão, beringela, tomate, além de outras cucurbitáceas nativas como melão de São Caetano, bucha e maxixe (Nascimento *et al.*, 2004). A bactéria *A. citrulli* em cucurbitáceas como melão (*Cucumis melo*) e melancia (*Citrullus lanatus*) causa a doença denominada mancha aquosa dos frutos (MBF), em regiões produtoras a doença tem alto potencial destrutivo (Burdman; Walcott, 2012).

No final dos anos 80 e início dos 1990, a mancha aquosa destacou-se de forma global após graves epidemias que ocorreram em plantações de frutas em alguns estados dos EUA (Latin; Rane, 1990; Somodi *et al.*, 1991). Em 2024 a bactéria *A. citrulli* permanece categorizada na lista A1 de pragas quarentenária da European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO, 2024), devido à sua importância econômica e social para cucurbitáceas. A espécie *A. citrulli* está presente em países da Ásia, América e Oceania, países como China, República da Coreia, Malaysia, Taiwan, Tailândia, México, EUA, Costa Rica, Trinidad e Tobago, Brasil, Austrália, norte das Ilhas Marianas, além da Grécia, Hungria e norte da Macedônia (Fig. 3) (EPPO, 2024).

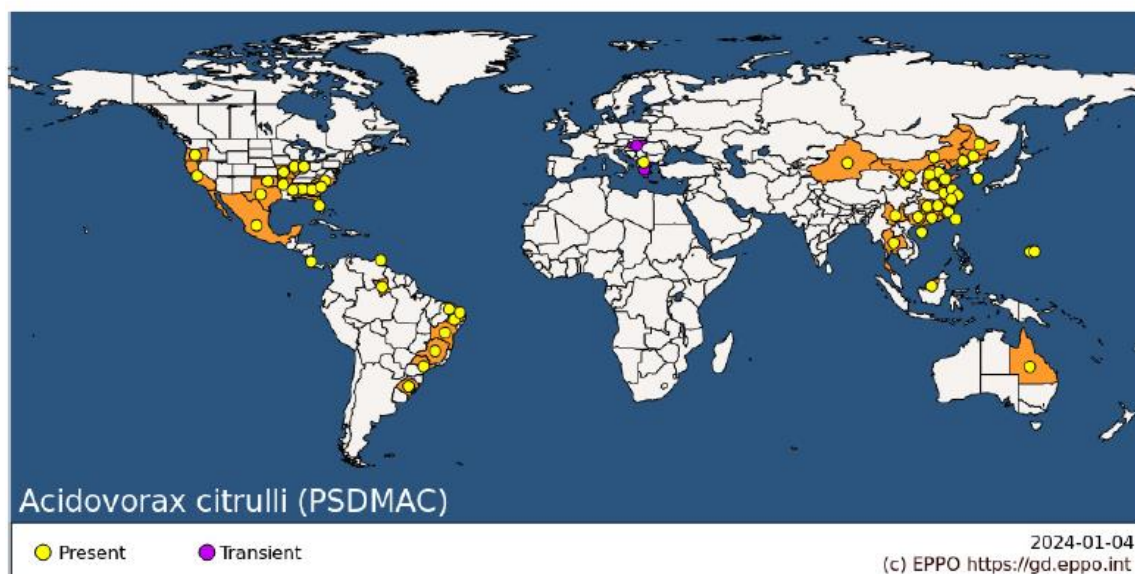


Figura 3. Distribuição geográfica da bactéria *Acidovorax citrulli*. **Fonte:** (EPPO, 2024).

A mancha aquosa dos frutos pode ocorrer em todos os estágios do desenvolvimento das plantas. O ciclo da doença é demonstrado na Figura 4, o ciclo se inicia com a semente infectada, a plântula doente quando não morre apresenta manchas encharcadas ou lesões necróticas no hipocótilo e cotilédones. Ocorre o desenvolvimento da doença nas folhas primárias e formação de uma planta infectada. A bactéria se dissemina por meio de respingos

de chuva, irrigação por aspersão e tratos culturais, a penetração ocorre pelos estômatos ou ferimentos de folhas e frutos. Folhas infectadas são a principal fonte de inóculo para o fruto, a doença se desenvolve na superfície dos frutos, sendo os jovens mais suscetíveis. As lesões necróticas se desenvolvem através da polpa até a cavidade das sementes por meio do sistema vascular do fruto (Mariano *et al.*, 2001).

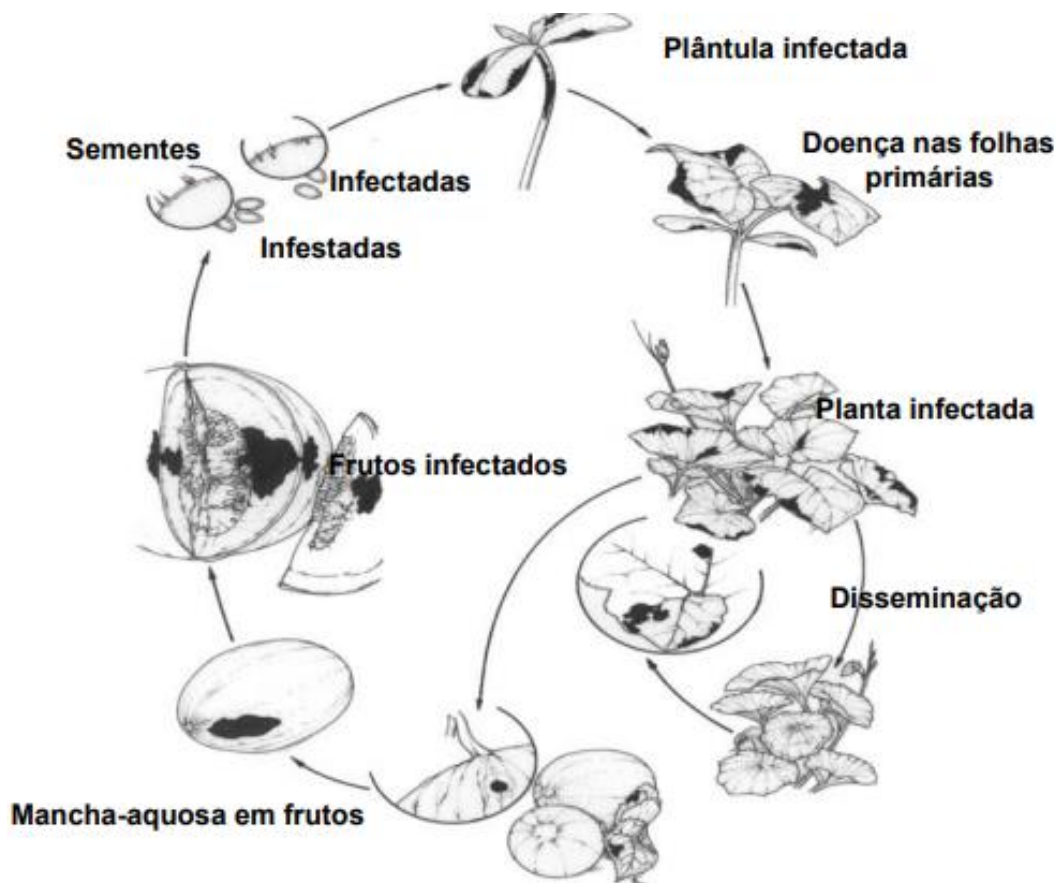


Figura 4. Ciclo de vida da bactéria *Acidovorax citrulli* no meloeiro. **Fonte:** Mariano *et al.* (2001).

Sementes e plântulas infectadas e restos de culturas são as principais fontes de inóculo, sendo as sementes infectadas a principal disseminação em longas distâncias (Mariano *et al.*, 2001). A infecção pela bactéria *A. citrulli* em frutos ocorre por meio de estômatos e lenticelas, frutos jovens são mais suscetíveis do que os maduros devido à camada de cera da superfície. Em frutos maduros com a camada de cera formada a infecção pela bactéria apenas ocorre por meio de ferimentos (Assunção *et al.*, 2019).

Os sintomas da mancha aquosa são observados na Figura 5, nas mudas ocorrem lesões escuras encharcadas de água nos cotilédones e hipocótilo que evoluem para necrose, nos casos mais graves a plântula morre. Nas folhas os sintomas são pequenas lesões angulares de coloração castanho escuro avermelhada circundadas por um halo amarelo, não ocorrendo a desfolha. Nos frutos são observadas manchas oleosas, lesões encharcadas de água nas cascas que se estendem pela polpa, a mancha necrótica interna aos frutos e evolui para podridão, o melão infectado pode demonstrar manchas encharcadas de água na superfície do fruto assim como rachaduras, amolecimento com exsudação e efervescente e apodrecimento (Husni *et al.*, 2021).

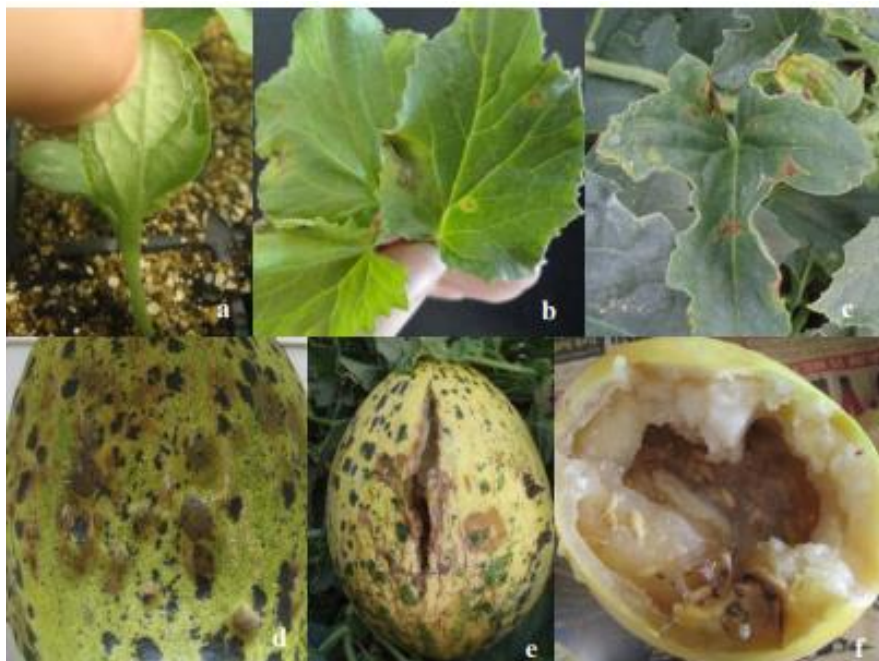


Figura 5. Sintomas gerais de mancha aquosa dos frutos causada por *Acidovorax citrulli* em meloeiro. (a) Lesões encharcadas de água nos cotilédones, (b) Manchas angulares variando do marrom claro para o marrom escuro, lesões necróticas em folhas verdadeiras limitadas pelas veias, (c) Lesões necróticas irregulares de coloração marrom avermelhada em folhas, (d, e) Polpa da fruta encharcada de água, aprofundada, escurecida, seguida de trincas, (f) Amolecimento e apodrecimento. **Fonte:** Horuz *et al.* (2014).

A bacteriose MBF afeta importantes culturas do ponto de vista econômico, como o meloeiro e melanciaira, ambas cucurbitáceas representaram significativos percentuais de exportação. Na produção de melão no Brasil em 2022 foram produzidas 699.281 toneladas em uma área de 27.457 hectares gerando uma receita de 877.273 mil reais, o maior estado produtor foi Rio Grande do Norte. No cultivo de melancia foram produzidas 1.912.909 toneladas em uma área de 85.729 hectares sendo o maior produtor o estado de Goiás, o valor da produção foi de 1.882.802 mil reais (IBGE, 2022).

Não existem materiais genéticos comerciais resistentes à *A. citrulli*, assim o manejo da mancha aquosa é realizado por um conjunto de medidas, dentre as recomendações estão a utilização de sementes e mudas saudáveis, práticas culturais adequadas, assim como o uso de bactericidas. A principal medida de controle é o uso de sementes livres do patógeno, que é a principal fonte de inóculo para disseminação da doença. Alguns tratamentos físicos e químicos para as sementes são utilizados, alguns são à base de hipoclorito de sódio, ácido clorídrico, estreptomicina, sulfato de estreptomicina, kasugamicina, oxicleto de cobre, ácido láctico, além de tratamento térmico por imersão em água a 52 °C, todas as medidas são aplicadas para reduzir a transmissão da mancha aquosa para as plântulas (Assunção *et al.*, 2019).

2.2.1 Biofilme bacteriano

Na natureza as células bacterianas podem ser categorizadas em duas formas distintas de vida, quando unitárias, flutuantes e independentes, são chamadas de células planctônicas, e quando ocorrem em organização formando agregados microbianos são denominadas de biofilme. O biofilme bacteriano é o conjunto ordenado e organizado de microrganismos (mesma espécie ou diferentes espécies), envolto em uma matriz exopolissacarídica (EPS). No ambiente, o estado de biofilme está relacionado à proteção contra tensão de cisalhamento, dessecação, agentes tóxicos e ataques de protozoários (Sauer *et al.*, 2022).

O desenvolvimento do biofilme (Fig. 6) envolve várias etapas e inicia com o contato de uma célula planctônica com uma superfície, processo que é subdividido em fixação reversível e irreversível. Durante o estágio reversível as células estão presas de forma frouxa e reversível à superfície, após as células mudam a orientação se aderindo de forma longitudinal na superfície, dando início ao estado de fixação irreversível (Rather *et al.*, 2021).

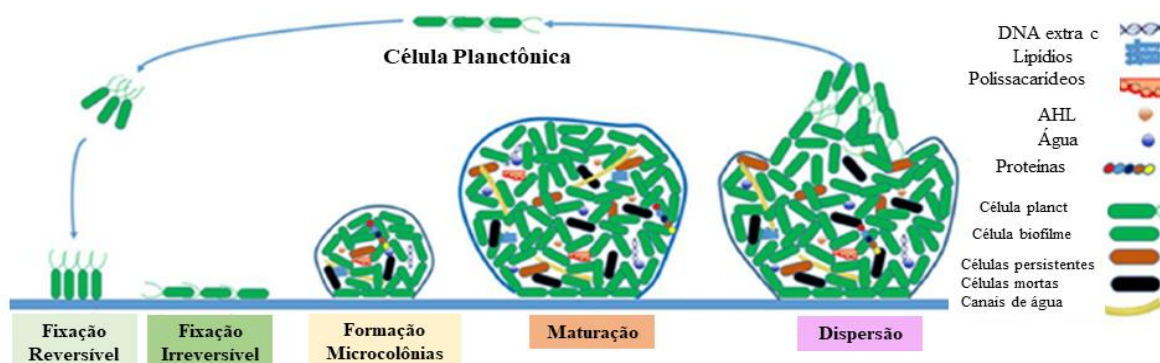


Figura 6. Etapas de formação do biofilme. **Fonte:** Rather *et al.* (2021).

Após a fixação ocorre a multiplicação e agregação envolta do EPS autoproduzido formando as microcolônias. Na maturação do biofilme a estrutura ocorre similar a um cogumelo onde as células estão organizadas em camadas de acordo com a aerotolerância e taxa de metabolismo, as camadas estão dispostas em camada interna, camada microbiana basal intermediária e camada externa composta por células em estado planctônico. Na dispersão o biofilme se rompe liberando células em estado planctônico (Rather *et al.*, 2021).

O processo de formação de biofilme é influenciado por fatores externos como pH, temperatura, movimentos brownianos, força gravitacional e hidrodinâmica, natureza da superfície habitada, além da detecção de quórum, sinalizadores secundários e outras moléculas sinalizadoras. O processo de dispersão do biofilme é afetado por alguns fatores como a população superada, intensa competição, falta de nutrientes, deficiência de oxigênio, acúmulo de metabólitos, temperatura, degradação do EPS, regulações positiva de genes ligados à motilidade e negativa para genes relacionados à produção de polissacarídeos (Rather *et al.*, 2021).

As bactérias se comunicam célula-célula quimicamente por meio de um mecanismo denominado quórum sensing (QS). O QS é mediado pela produção, acumulação e detecção de moléculas de sinalização extracelular conhecidos como autoindutores (Ais) (Mukherjee; Bassler, 2019). Em bactérias gram-negativas os Ais são compostos de várias classes químicas como N- acil homoserina lactona (AHL), alquilquinolonas e α -hidroacetonas e sinal difusível fator (compostos similares a ácidos graxos). Tais Ais são sintetizados por meio de compostos mais simples como ácidos graxos, antranilato e SAM S-adenosilmetionina (Grandclément *et al.*, 2015).

Por meio de QS um grupo de células bacterianas regula de forma síncrona a expressão gênica, o que é importante para comportamentos como a bioluminescência, produção e formação de biofilme, expressão de fatores de virulência, troca genética. Ao monitorar o acúmulo de Ais específicos as bactérias podem perceber alterações na densidade celular, complexidade de espécies em seu entorno e responder em grupo. Os comportamentos regulados por QS são essenciais para a sobrevivência, monitoramento e adaptação frente a mudanças ambientais (Hawver *et al.*, 2016).

A interrupção ou perturbação do QS é denominada quórum Quenching (QQ), que pode ocorrer por ação de enzimas (enzimas QQ), compostos químicos (inibidores de QS) que podem clivar ou inibir de forma competitiva os sinais QS. Todas as etapas podem ser afetadas como síntese, difusão, acumulação e percepção dos sinais QS, além destes, alguns parâmetros

físicos como temperatura e pH também podem alterar a meia vida dos sinais QS (Grandclément *et al.*, 2015).

Existem diferentes tipos de inibidores de QQ como enzimas como lactonases, acilases e oxirredutases. Metabólitos produzidos por plantas que sintetizam enzimas como óleos essenciais e compostos fenólicos, e antagonistas como furanonas e similares, estes compostos em doses subletais são capazes de inibir fatores de virulência (Kalia, 2013; Zhang; Li, 2016; Quecan *et al.*, 2019; Rivera *et al.*, 2019).

A investigação sobre a compreensão de mecanismos QQ é importante para o desenvolvimento de antibacterianos e estratégias anti-doenças que visam o controle de patógenos importantes na medicina, agronomia e engenharia hídrica (Grandclément *et al.*, 2015).

2.3 Doenças causadas pelos protozoários *Phytomonas* sp

O gênero *Phytomonas* pertence à família Trypanosomatidae, esse gênero é composto por protozoários que infectam plantas. Protozoários da família Trypanosomatidae foram documentados parasitando vegetais pela primeira vez em 1909 em látex de *Euphorbia pilulifera*, os protozoários *Leptomonas davidi* (Lafont, 1909). O estudo do gênero *Phytomonas* pela comunidade científica iniciou quando se constatou que as espécies de tripanossomatídeos deste gênero eram agentes patogênicos responsáveis por diversas doenças graves em cultivos de interesse econômico como hartrot, marchitez sorpreensiva e necrose do floema, principalmente na América Latina (Dollet, 1984). Dentre as espécies do gênero *Phytomonas* estão *Phytomonas staheli*, agente causal do hartrot em coqueiros e marchitez em palmeiras produtoras de óleo, outra espécie é a *P. leptovisorum* que causa a necrose do cafeeiro, *Phytomonas francai* causa a atrofia de raiz também chamada chocamento das raízes (Camargo, 1999).

A espécie *Phytomonas serpens* foi documentada por Gibbs em 1957, que observou na seiva de tomates maduros protozoários flagelados com alto grau de polimorfismo, estes tripanossomatídeos parasitas foram classificados como específicos de tomate e denominados como *Leptomonas serpens*, o qual posteriormente foi reclassificado por Podlipaev (1986) como *Phytomonas serpens* (Gibbs, 1957; Jankevicius *et al.*, 1989). Embora a patogenicidade não seja elucidada, a infecção por este parasita resulta na ocorrência de lesões amareladas, o que pode levar à depreciação do produto (Elias, 2009).

Os insetos vetores são organismos importantes no processo de disseminação de patógenos, *P. serpens* infectam as plantas através de duas espécies hemípteras fitófagas *Phthia picta* e *Nezara viridula* (Jankevicius *et al.*, 1989). Recentemente a espécie *P. serpens* foi isolada no intestino e em glândulas salivares de *Leptoglossus occidentalis* encontrados na República da Crimeia, até então não havia registro da ocorrência desta espécie na região da Crimeia (Ganyukova *et al.*, 2022).

As fitomonas durante todo seu ciclo de vida apresentam-se na forma promastigota pela definição de Hoare e Wallace (1966) e apresentam alto grau de polimorfismo com variações de tamanho, formato celular, extensão do flagelo e número de torções ao longo do corpo.

A transmissão ocorre por vetor (inseto) seguida da propagação nos tecidos vegetais, mais precisamente no floema, látex e frutos. O inseto infectado apresenta os parasitas por todo trato digestivo, hemolinfa e nas suas glândulas salivares (Zanetti, 2015). O ciclo de vida é planta-inseto, ou seja, a transmissão é feita do tomate para o inseto e via inseto contaminado para tomate (Costa, 2006).

Comprovadamente duas espécies do gênero *Phytomonas* são patogênicas, *P. leptovisorum* (necrose do cafeeiro) e *P. staheli* (Hartrot e marchitez sorpreensiva), ambas podem causar danos letais às culturas, não há registros de produtos fitossanitários contra estas doenças, as alternativas de controle têm se baseado na erradicação de plantas infectadas e dos insetos vetores (Jaskowska *et al.*, 2015). *P. serpens* é de fácil isolamento e cultivo, assim é considerado um modelo de estudo para outras espécies do gênero *Phytomonas* (Costa, 2006).

2.4 Controle das doenças agrícolas

Para o controle de doenças são aplicados produtos à base de cobre, no entanto o uso contínuo ocasiona a ocorrência de resistência em patógenos, efeitos de contaminações diretas e indiretas em seres humanos, contaminações ambientais, além disso os resíduos químicos dos pesticidas em culturas são limitações do uso para o controle de doenças (Duman; Soylu, 2019). Para o controle de pragas e doenças é aplicado comumente o controle químico, no entanto, existe uma preocupação quanto ao uso de agroquímicos devido aos riscos ambientais, à saúde humana e aos ecossistemas (Majeed, 2018).

O *Codex Alimentarius* estabelece os limites máximos de resíduos químicos em alimentos, porém alguns países podem seguir suas próprias referências, o que pode dificultar a comercialização internacional de alimentos e até mesmo formar barreiras sanitárias, como a União Europeia, um dos parceiros de exportação do Brasil (Telteboim *et al.*, 2007). Além do desafio de produzir uma maior quantidade de alimentos, busca-se também produzir alimentos livres de resíduos que prejudiquem o meio ambiente e a saúde humana. O alto custo com aplicações contínuas de pesticidas, seleção de populações resistentes, restrições internacionais, além da questão da ambiental são fatores que impulsionaram a busca por novas alternativas de controle ecológicas (Bozkurt *et al.*, 2020).

2.5 Metabólitos secundários de plantas

Nos vegetais o metabolismo é dividido em primário e secundário, o metabolismo primário é o conjunto de reações químicas que ocorrem em processos essenciais ao crescimento e desenvolvimento vegetal, tais como a fotossíntese, respiração e transporte de fotoassimilados. Os metabólitos primários são comuns a todas as plantas, como carboidratos, proteínas, lipídios, ácidos nucleicos, clorofila. O metabolismo secundário por sua vez é específico, cada espécie apresenta um perfil de compostos químicos variados que tem diferentes funções mediante as necessidades do vegetal. É a partir do metabolismo glicose que são formados todos os metabólitos secundários, e as duas principais vias de formação são a via do ácido chiquímico e a via do acetato (Barreto *et al.*, 2020).

Os metabólitos secundários eram considerados compostos finais do metabolismo ou resíduos sem função aparente. No século XIX e XX esses compostos começaram a ser estudados por químicos orgânicos visando a busca de substâncias com uso medicinal, indústria, venenos, aromas. Após estudos diversas funções ecológicas foram relacionadas aos metabólitos, como a defesa das plantas contra herbivoria e ataques de microrganismos patogênicos, além de atuarem no processo de polinização e dispersão de sementes, e nas relações planta-planta e relações simbióticas com microrganismos (Taiz; Zeiger, 2009).

As plantas são capazes de sintetizar mais de 200.000 produtos naturais com funções distintas ligadas à sua defesa e reprodução (Shih; Morgan, 2020). A produção de metabólitos secundários é afetada por fatores como fisiologia vegetal, genótipo, clima, condições ambientais e patógenos. Os metabólitos produzidos por plantas são acumulados em tecidos e estruturas específicas como vacúolos, glândulas especializadas e tricomas. Tais moléculas são de interesse devido a propriedades medicinais, nutraceuticas e sensoriais (Isah *et al.*, 2018).

2.6 Metabólitos secundários da classe das chalconas

As chalconas são bioprecursoras dos flavonoides, sua estrutura básica (1,3-diaril-2-propan-1-ona) é composta por um sistema carbonila α,β -insaturada que une dois anéis aromáticos (Fig. 7).

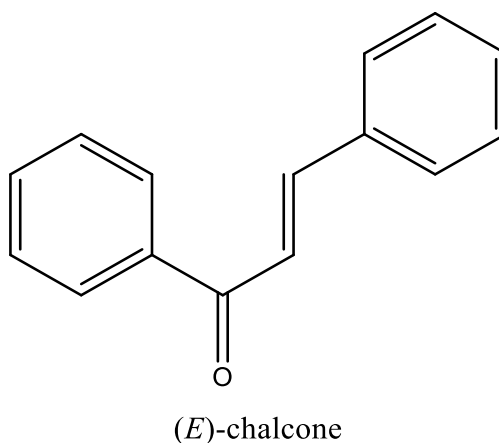


Figura 7. Estrutura fundamental da chalcona.

As chalconas ocorrem naturalmente em vegetais, mas também podem ser obtidas por meio de síntese orgânica (Ferreira *et al.*, 2018). Inicialmente as chalconas foram descobertas como pigmentos de flores amarelas de espécies de *Coreopsis* e outras Compositae (Asteraceae), mas já foram isoladas chalconas em famílias como Annonaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Piperaceae e Pteridaceae e em outras partes da planta como cerne, cascas, frutos, folhas e raízes (Rozmer e Perjési, 2016).

Nos vegetais a síntese de chalconas inicia com o aminoácido fenilalanina na rota do chiquimato, a enzima fenilalanina amonialiase catalisa a eliminação de uma molécula de amônia para a formação do ácido transcinâmico, após uma sequência de reações o produto formado é o *p*-cumaril-CoA (que corresponde ao anel B e a ponte de três carbonos), *p*-cumaril-CoA se une a 3 moléculas de malonil-CoA e constituição do anel A, a reação catalisada pela enzima chalcona sintase forma a naringenina chalcona (Taiz; Zeiger, 2009; Díaz-Tielas *et al.*, 2016).

As chalconas apresentam uma ampla diversidade estrutural em plantas, com chalconas contendo grupos metoxila, hidroxila, metila, glicosila, isoprenil e metilenodioxo, chalconas isopreniladas por meio de ciclização enzimática formam as furanochalconas e pinanochalconas (Cazarolli *et al.*, 2013).

Nos vegetais a presença de chalconas foi relatada por Adityachaudhury e colaboradores (1976) que isolaram 2'-hidroxi-4,6'-dimetoxi-3'-metilchalcona de *Didymocarpus aurentiaca*. A espécie *Glycyrrhiza glabra* (Fig. 8), planta conhecida popularmente como alcaçuz, também apresenta em sua composição diversas chalconas e é utilizada na medicina tradicional oriental por ter diversas propriedades terapêuticas (Fenwick *et al.*, 1990). De acordo com Abraham e Florentine (2021) o alcaçuz apresenta diversas atividades biológicas, é uma planta medicinal com propriedades antibacterianas, antivirais e anti-inflamatórias, podendo ser uma candidata a estudos com COVID-19.



Figura 8. Planta de alcaçuz (direita) e raiz (esquerda). **Fonte:** Abraham e Florentine (2021).

No metabolismo vegetal as chalconas apresentam três principais destinos, a primeira pode ocorrer a biossíntese de auronas pela enzima aureusidina sintase, a segunda é a formação de conjugados de glicosil que estão relacionados à pigmentação de flores amarelas, o terceiro e mais comum destino é a formação de naringenina chalcona por meio da enzima chalcona isomerase. Nas plantas superiores a enzima chalcona isomerase do tipo I é amplamente encontrada, com exceção de leguminosas (atual fabáceas), essa enzima produz a 5 hidroxiflavanona naringenina (naringenina), que é o precursor biossintético de praticamente todas as classes de flavonoides como flavonas, isoflavonas, flavonóis, taninos condensados e antocianinas (Díaz-Tielas *et al.*, 2016).

As chalconas assim como os flavonoides representam uma das principais classes de metabólitos secundários por desempenharem importantes papéis no desenvolvimento vegetal, incluindo processos de polinização, proteção contra luz UV, proteção contra patógenos de plantas, antialimentares de insetos, alelopatia e outros. Chalconas e dihidrochalconas podem ser bioestimuladas por fatores internos e externos como sinais de desenvolvimento, disposição de nutrientes, estímulos ambientais e indução de estresse, tanto a chalcona como a dihidrochalconas auxiliam as plantas no sucesso adaptativo de ambientes adversos (Cazarolli *et al.*, 2013).

Alguns dos entraves no uso das chalconas naturais são o seu baixo rendimento, processo de isolamento dificultoso e aleatoriedade de estruturas isoladas. As chalconas sintéticas por sua vez, apresentam bons rendimentos, processo de produção simplificado e relativo baixo custo, além disso é possível determinar as estruturas que serão produzidas facilitando o estudo da influência dos substituintes (Kerek, 2021).

As chalconas podem ser obtidas por várias sínteses orgânicas sendo a mais utilizada a condensação de Claisen-Schmidt, na reação de Claisen as chalconas são formadas pela reação de benzaldeídos e acetofenonas na presença de catalisadores ácidos ou básicos em solventes líquidos e temperaturas de 50 a 100°C, esse método apresenta tempo curto de síntese e bons rendimentos de chalconas (Gomes *et al.*, 2017).

Os derivados de chalconas são formados pela modificação na estrutura da chalcona, as modificações ocorrem por meio da adição de grupos químicos em um ou em ambos os anéis aromáticos. Tais modificações podem alterar a eficiência biológica da molécula. As chalconas representam uma classe promissora de compostos pela simples síntese e versatilidade de modificações na estrutura química (Blanco e Nascimento-Júnior, 2017).

Diversas atividades biológicas de chalconas já são conhecidas na literatura, tais como anti-inflamatória (ur Rashid *et al.*, 2019), antiviral (Duran *et al.*, 2021), anticâncer (Ouyang *et al.*, 2021), antioxidante (Okolo *et al.*, 2021), antifúngica (Konduru *et al.*, 2013), antiprotzoária (Espinoza-Hicks *et al.*, 2019), larvicida (Targanski *et al.*, 2021) e antibacteriana (Okolo *et al.*, 2021).

2.6.1 Atividades biológicas das chalconas no setor agrícola

As chalconas têm sido estudadas devido ao potencial de inibição de diversos microrganismos, incluindo espécies fitopatogênicas de interesse agrícola. Diversas atividades biológicas de chalconas foram relatadas na literatura, como atividade herbicida (Gomes *et al.*, 2018), nematocida (Yadav *et al.*, 2019), antibacteriana (Xia *et al.*, 2019), antiviral (Guo *et al.*, 2019), inseticida (Ali *et al.*, 2022) e fungicida (Zhou *et al.*, 2022).

A atividade antifúngica das chalconas têm sido reportada por diversos autores, Chen *et al.* (2016) que avaliaram o potencial antifúngico do derivado codificado como C1, que contém furano substituído ao Anel B e adições de cloro ao anel, a exposição à C1 promoveu altas taxas de inibição do crescimento de fungos de importância agrícola, tais como *Rhizoctonia solani*, *Bipolaria maydis*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Magnaporthe oryzae*, *Gibberella zeae*, *Botrytis cinerea*. Além disso, o micélio de *Magnaporthe oryzae* tratado 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de C1 apresentou encurtamento e deformação micelar.

Uma série de 20 novas chalconas contendo pipezina foi relatada por Zhou *et al.* (2022), os quais avaliaram a ação antifúngica das chalconas para o controle de diversos fungos fitopatogênicos, a chalcona codificada como D2 promoveu alta taxa para todos os fungos testados, nos testes com *Rhizoctonia solani* na concentração de 200 mg.L^{-1} o derivado D2 foi capaz de atuar como efeito curativo e protetor de folhas de arroz, o micélio de *Rhizoctonia solani* tratado com D2 apresentou aspecto murcho e deformado mostrando os efeitos de D2 na morfologia fúngica.

O potencial de uma série de chalconas foi testado para a inibição do fungo *Phytophthora infestans*, causador da doença requeima da batata. As chalconas codificadas como 7a, 8a e 9a promoveram taxas de lise da membrana celular fúngica acima de 50%. Dentre os três chalconas, 8a resultou em 100% de lise da membrana. Para os autores as pesquisas com compostos derivados de 2'-hidroxichalconas podem gerar novas aplicações e importantes impactos nos setores produtivos, principalmente aos cultivos de solanáceas (López *et al.*, 2020).

Em outros estudos, Morão *et al.* (2020) avaliaram o efeito de hidroxila chalcona (T9A) e metoxihidroxichalcona (BC1) em *Xanthomonas citri* e *Bacillus subtilis*, apesar do derivado (T9A) apresentar menores valores de CMI para ambas bactérias, este não é capaz de permeabilizar a membrana bacteriana, por outro lado, o derivado BC1 promoveu aumento da permeabilização em *B. subtilis*, e na concentração de 2XCMi promoveu a redução do ATP intracelular de *Xanthomonas citri*.

Bactérias fitopatogênicas que causam importantes doenças foram inibidas por chalconas. Guo *et al.* (2019) avaliaram o efeito de uma série de chalconas nas bactérias *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* e *Ralstonia solanacearum* e observaram chalconas promissoras (2l) IC_{50} de 11,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, (2f) 19,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e (2m) 11,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para os respectivos fitopatógenos, ainda neste estudo, foi constatado que o tratamento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri* com 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da chalcona 2l promoveu destruição da membrana bacteriana.

A atividade antiprotozoária de chalconas já foi documentada para os protozoários *P. serpens* e *L. amazonensis*. Souza *et al.* (2022) observaram valores de IC_{50} de 1.59 μM e 11.49 μM , respectivamente, com a chalcona codificada como (C5). Em outros estudos com o *P. serpens* esta molécula promoveu redução do crescimento, perda do flagelo, acúmulo de EROS, além de causar a morte do microrganismo, microscopias de transmissão demonstraram sinais de autofagia (Santos *et al.*, 2023).

As chalconas representam uma alternativa de interesse para a agricultura e dentre as vantagens está o aspecto sintético, este se baseia na utilização de reagentes de relativamente baixo valor comercial e simples métodos de produção, tais requisitos conferem às chalconas esta alternativa viabilidade econômica (Díaz-Tielas *et al.*, 2016; Gomes *et al.*, 2018).

2.7 Óleos essenciais e monoterpenos

Óleos essenciais (Oes) são produtos naturais complexos produzidos no metabolismo secundário de plantas. Seus componentes são aromáticos de baixo peso molecular que apresentam caráter odorífero, lipofílico, solúveis em solventes orgânicos. Os Oes são produzidos por uma ampla variedade de plantas aromáticas de países tropicais e temperados. Podem ser extraídos de diversas partes das plantas como folhas, botões, flores, raízes, frutos, sementes, caules, nas plantas estes compostos são armazenados em compartimentos como canais e cavidades, células secretoras e epidérmicas, além de tricomas glandulares (Bakkali *et al.*, 2008).

Os Oes assim como terpenos são de grande interesse comercial na indústria de cosméticos, são antioxidantes e melhoram a permeação, na indústria de alimentos podem ser utilizados como aromatizantes ou aditivos em embalagens que reduzem a oxidação e a deterioração. Também podem ser utilizados como pesticidas naturais agrícolas, compostos bioativos ou excipientes em produtos nutracêuticos e farmacêuticos (Soto *et al.*, 2023). São documentadas na literatura diversas atividades biológicas de Oes de diversas plantas aromáticas como inseticida (Oyedeeji *et al.*, 2020), antibacteriana (Hajian-Maleki *et al.*, 2019), fungicida (Hou *et al.*, 2020), herbicida, larvicida (Pandiyan *et al.*, 2019), nematocida (D'addabbo *et al.*, 2021).

A maioria dos Oes são formados por monoterpenos voláteis de baixo peso molecular. Os terpenos são formados na via do mevalonato ou metil eritritol fosfato que formam o precursor isopreno. Posteriormente as unidades de isopreno são unidas pela ligação conhecida cabeça-cauda, sendo a classificação dos isoprenoides de acordo com a quantidade de isopreno presentes na estrutura, monoterpenos (10 carbonos), sesquiterpenos (15 carbonos), diterpenos (20 carbonos), triterpenos (30 carbonos), tetraterpenos (40 carbonos). A biossíntese dos terpenos a partir de isoprenos é demonstrada na Figura 9 (Barreto *et al.*, 2020).

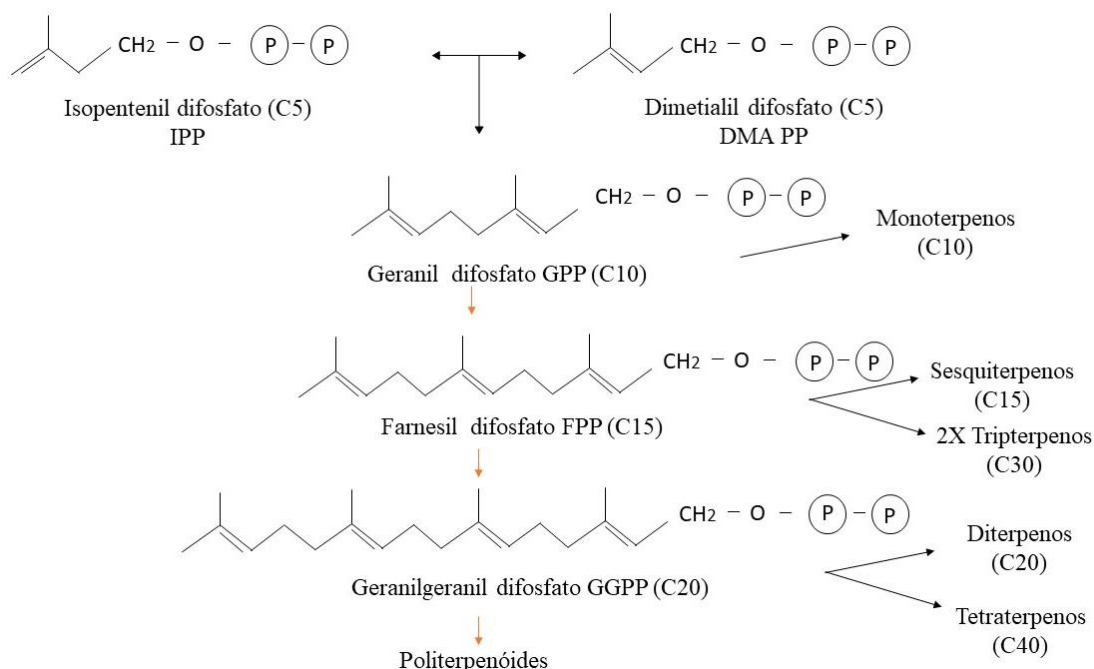


Figura 9. Biossíntese de terpenos a partir de pentacarbonados básicos Isopentenil difosfato (IPP) e Dimetilalil difosfato. **Fonte:** Santos, T.A.C. (2024).

Existe uma diversidade de monoterpenos que apresentam atividades biológicas pesticidas importantes como inseticida (Oyedeeji *et al.*, 2020), antibacteriana (Jiang *et al.*,

2021), fungicida (Hou *et al.*, 2020), herbicida (Kordali *et al.*, 2008), larvicida (Pandiyani *et al.*, 2019), nematocida (D'addabbo *et al.*, 2021), entre outras. Dentre os mecanismos de ação estão a destruição da integridade e permeabilidade da membrana, da estrutura celular, inibição de importantes enzimas, deformações de hifas, perda de proteínas, acúmulo de espécies reativas de oxigênio ROS, entre outros efeitos celulares (Liu *et al.*, 2022).

Os monoterpenos timol e carvacrol são componentes majoritários do OE de *Lippia gracilis*. O timol (2-isopropil-5-metilfenol) e o carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) (Fig. 10) são monoterpenos isômeros formados a partir de duas unidades de isopreno (Kachur; Suntres, 2020).

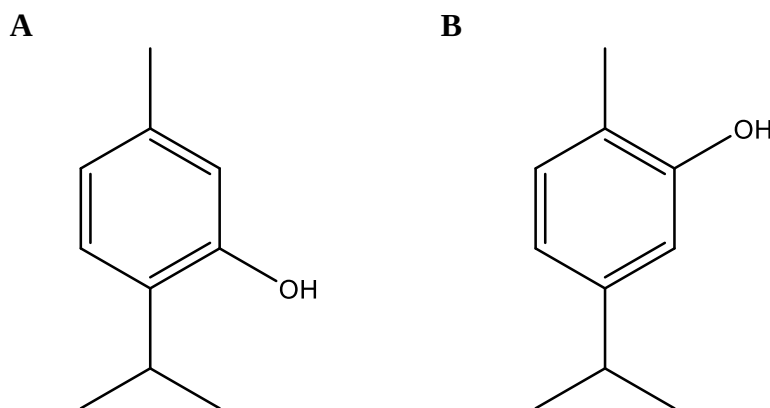


Figura 10. Monoterpenos timol (A) e carvacrol (B). **Fonte:** Santos, T.A.C. (2024).

A fitobactéria *Xanthomonas campestris* pv *campestris* exposta a concentrações do OE de *Lippia gracilis* rico em timol, apresentou inibição do crescimento, assim como aumento da permeabilidade da membrana (Da Silva *et al.*, 2019). Singh *et al.* (2017) observaram em *Xanthomonas oryzae* a redução do biofilme, motilidade bacteriana, expressão gênica do gene *rpF*, importante gene ligado à virulência. Com a exposição ao OE de tomilho, o timol foi observado como o principal componente do OE de tomilho, para os autores, tanto o OE como o timol podem ser candidatos para formulação de agentes-antivirulência.

A bactéria *Acidovorax citrulli* apresentou alta sensibilidade ao OE de *Cinnamomum verum* (canela), na concentração de $50\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi observada uma zona de inibição de 6 cm, superior ao controle Kanamicina (menor que 5cm), todos os componentes majoritários do OE de canela foram analisados, os compostos benzaldeído e cinamaldeído promoveram as maiores zonas de inibição, cerca de 8 e 6 cm, respectivamente (Choi *et al.*, 2016).

O carvacrol apresenta atividade inibitória sobre a bactéria causadora de podridão mole *Dickeya zeae*, a exposição ao carvacrol promoveu a redução do crescimento bacteriano e nos níveis de ATP intracelular, motilidade e biofilme. Também foi observado, por meio de microscopia de varredura, a destruição da membrana bacteriana, o que confirmou a perda de ácidos nucleicos e a redução do potencial de membrana. Para os autores o carvacrol é um agente antibacteriano eficaz, natural e seguro e uma alternativa sustentável ao químico para doenças relacionadas à *Dickeya zeae* (Jiang *et al.*, 2021).

Atividade inibitória do timol e carvacrol foi testada sobre um conjunto de cepas de bactérias gram-positivas e gram-negativas de origem alimentar. Ambos apresentaram potencial inibitório, sendo que o timol apresentou maior efeito inibitório em comparação ao carvacrol com CMIs variando de 32 a $64\mu\text{g.mL}^{-1}$. Também foi relatado o efeito na bomba de efluxo celular com a exposição aos dois monoterpenos, além disso, combinações entre timol e carvacrol e antibióticos como tetraciclina e cloreto de benzalcônio resultaram na redução do CMI dos antibióticos de 2 a 8 vezes (Miladi *et al.*, 2016).

O timol assim como outros componentes dos Oes, como carvacrol, carvona, cinamaldeído, citral, p-cimeno, eugenol, limoneno e mentol são registrados na comissão europeia para o uso como aromatizante na indústria alimentícia devido à ausência de riscos ao

consumidor, além disso, a FDA (Food and Drug Administration) dos EUA registrou os monoterpenos citados como substâncias “geralmente reconhecidas como seguras” (GRAS) ou como aditivos alimentares aprovados (Marchese *et al.*, 2016).

Oes e terpenos isolados são compostos de interesse comercial devido a diversas propriedades funcionais. São utilizados em diversas áreas como cosméticos onde melhoram a permeação e o efeito antioxidante, na indústria de alimentos onde são utilizados como aromatizantes e aditivos de embalagens para redução da oxidação e deterioração microbiana, como pesticidas naturais no setor agrícola e no setor farmacêutico onde participam como composto bioativo ou excipientes em nutracêuticos ou produtos farmacêuticos. É previsto que o interesse por terpenos possa aumentar devido ao incentivo por uso de produtos naturais nos setores alimentício, agrícola, farmacêutico e de consumo (Soto *et al.*, 2023).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, J.; FLORENTINE, S. Licorice (*Glycyrrhiza glabra*) extracts-suitable pharmacological interventions for covid-19: a review? **Plants**, v. 10, n. 2600, p. 1–24, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10122600>

ADITYACHAUDHURY, N.; DAS, A. K.; CHOUDHURY, A.; DASKANUNGO, P. L. Aurentiacin, a new chalcone from *Didymocarpus aurentiaca*. **Phytochemistry**, v. 15, p. 229–230, 1976.

ALI, A. M.; SALAH, H.; GAD, M. A.; YOUSSEF, M. A. M.; ELKANZI, N. A. A. Design, Synthesis, and SAR Studies of Some Novel Chalcone Derivatives for Potential Insecticidal Bioefficacy Screening on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **ACS Omega**, v. 7, p. 40091–40097, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c04814>

ALMEIDA, Á. M. R.; SEIXAS, C. D. S.; FARIAS, J. R. B.; OLIVEIRA, M. C. N. DE; FRANCHINI, J. C.; DEBIASI, H.; COSTA, J. M. DA; GAUDÊNCIO, C. A. **Macrophomina phaseolina em soja**. Londrina- PR: Embrapa Soja, 2014. 55p. (Embrapa Soja. Documentos, n. 346).

ASSUNÇÃO, E. F. DE.; CONCEIÇÃO, C. S. DA.; MARIANO, R. D. L. R.; SOUZA, E. B. DE. Situação Atual da Mancha Aquosa, Importante Bacteriose em Meloeiro e Melanciaira. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 16, n. 1, p. 51–73, 2019.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008. DOI:10.1016/j.fct.2007.09.106

BARRETO, S. F.; GASPI, F. O. G. DE; OLIVEIRA, C. F. DE. Estudo Químico Das Principais Vias Do Metabolismo Secundário Vegetal: Uma Revisão Bibliográfica. **Revista Científica da FHO, Fundação Hermínio**, v. 8, n. 1, p. 60–72, 2020.

BLANCO, V. R.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. Leishmaniose: Aspectos Gerais Relacionados com a Doença, o Ciclo do Parasita, Fármacos Disponíveis, Novos Protótipos e Vacinas. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 861–876, 2017. DOI: 10.21577/1984-6835.20170055

BORDOH, P. K.; ALI, A.; DICKINSON, M.; SIDDIQUI, Y.; ROMANAZZI, G. A review on the management of postharvest anthracnose in dragon fruits caused by *Colletotrichum* spp. **Crop Protection**, v. 130, p. 105067, 2020.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.105067>

BOUFLEUR, T. R.; CIAMPI-GUILLARDI, M.; TIKAMI, Í.; ROGÉRIO, F.; THON, M. R.; SUKNO, S. A.; MASSOLA JÚNIOR, N. S.; BARONCELLI, R. Soybean anthracnose caused by *Colletotrichum* species: Current status and future prospects. **Molecular Plant Pathology**, v. 22, p. 393–409, 2021. DOI: 10.1111/mpp.13036

BOZKURT, İ. A.; SOYLU, S.; KARA, M.; SOYLU, E. M. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils Isolated from Medicinal Plants against Gall Forming Plant Pathogenic Bacterial Disease Agents. **KSU J. Agric Nat**, v. 23, n. 6, p. 1474–1482, 2020. DOI: 10.18016/ksutarimdogavi.723544.

BURDMAN, S.; WALCOTT, R. *Acidovorax citrulli*: Generating basic and applied knowledge to tackle a global threat to the cucurbit industry. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 8, p. 805–815, 2012. DOI: 10.1111/J.1364-3703.2012.00810.x

CAMARGO, E. P. *Phytomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. **Advances in Parasitology**, v.42, p.29-112, 1999.

CAZAROLLI, L. H.; KAPPEL, V. D.; ZANATTA, A. P.; SUZUKI, D. O. H.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J.; PIZZOLATTI, M. G.; SILVA, F. R. M. B. Natural and Synthetic chalcones: Tools for the study of Targets of Action- Insulin Secretagogue or Insulin Mimetic?. In RAHMAN, A. U. (eds). **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 39, p. 47–89, 2013.

CHEN, H.; WANG, X.; JIN, H.; LIU, R.; HOU, T. Discovery of the molecular mechanisms of the novel chalcone-based *Magnaporthe oryzae* inhibitor C1 using transcriptomic profiling and co-expression network analysis. **SpringerPlus**, v. 5, p.1851, 2016. DOI 10.1186/s40064-016-3385-9

CHOI, O.; CHO, S. K.; KIM, J. Biological evaluation of 32 different essential oils against *Acidovorax citrulli*, with a focus on *Cinnamomum verum* essential oil. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 68–76, 2016. DOI 10.5897/AJB2015.15049

COSTA, P. M. DE O. **Exploração do genoma de *Phytomonas serpens***. 2006. 125 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) - Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro-RJ, 2006.

D’ADDABBO, T.; LAQUALE, S.; ARGENTIERI, M. P.; BELLARDI, M. G.; AVATO, P. Nematicidal activity of essential oil from lavandin (*Lavandula × Intermedia* emeric ex Loisel.) as related to chemical profile. **Molecules**, v. 26, p. 6448, 2021. DOI:10.3390/molecules26216448

DEAN, R.; KAN, J. A. L. VAN; PRETORIUS, Z. A.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; PIETRO, A. DI; SPANU, P. D.; RUDD, J. J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J.; FOSTER, G. D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 4, p. 414–430, 2012. DOI: 10.1111/J.1364-3703.2011.00783.X

DÍAZ-TIELAS, C.; GRAÑA, E.; REIGOSA, M. J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A. M. Biological Activities and Novel Applications of Chalcones. **Planta Daninha**, v. 34, n. 3, p. 607–616, 2016. DOI: 10.1590/S0100-83582016340300022

DOLLET, M. Plant diseases caused by flagellate protozoa (*Phytomonas*). **Annual Review of Phytopathology**, v. 22, n. 1, p. 115-132, 1984.

DUMAN, K., SOYLU, S. Characterization of plant growth-promoting traits and antagonistic potentials of endophytic bacteria from bean plants against *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. **Bitki Koruma Bülteni**, v.59, p.59–69, 2019. <https://doi.org/10.16955/bitkorb.597214>

DURAN, N.; POLAT, M. F.; AKTAS, D. A.; ALAGOZ, M. A.; AY, E.; CIMEN, F.; TEK, E.; ANIL, B.; BURMAOGLU, S.; ALGUL, O. New chalcone derivatives as effective against SARS-CoV-2 agent. **International Journal of Clinical Practice**, v. 75, p. 1–23, 2021. DOI: 10.1111/ijcp.14846

ELIAS, C. G. R. **Expressão de moléculas similares à cruzipaina em *Phytomonas serpens***. 2009. 116 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Microbiologia Profº Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ, 2009

EPPO. *Acidovorax citrulli*. EPPO datasheets on pests recommended for regulation, 2024. Available online. <https://gd.eppo.int>

ESPINOZA-HICKS, J. C.; CHACÓN-VARGAS, K. F.; HERNÁNDEZ-RIVERA, J. L.; NOGUEDA-TORRES, B.; TAMARIZ, J.; SÁNCHEZ-TORRES, L. E.; CAMACHO-DÁVILA, A. Novel prenyloxy chalcones as potential leishmanicidal and trypanocidal agents: Design, synthesis and evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 167, p. 402–413, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.02.028>

FENWICK, G. R.; LUTOMSKI, J.; NIEMAN, C. Liquorice, *Glycyrrhiza glabra* L.-Composition, uses and analysis. **Food Chemistry**, v. 38, p. 119–143, 1990.

FERREIRA, M. K. A.; FONTENELLE, R. O. S.; MAGALHÃES, F. E. A.; BANDEIRA, P. N.; MENEZES, J. S. E. A. DE; SANTOS, H. S. DOS. Chalcones pharmacological potential: A brief review. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 5, p. 1455–1473, 2018. DOI: 10.21577/1984-6835.20180099

GANYUKOVA, A. I.; MALYSHEVA, M. N.; CHISTYAKOVA, L. V.; FROLOV, A. O. A puzzling finding: the Brazilian tomato parasite *Phytomonas serpens* in the western conifer seed bug *Leptoglossus occidentalis* in Crimea. **Protistology**, v. 16, n. 1, p. 30–41, 2022. DOI:10.21685/1680-0826-2022-16-1-4

GIBBS, A. J. *Leptomonas-serpens* ns p., parasitic in the digestive tract and salivary glands of *Nezara-viridula* (Pentatomidae) and in the sap of *Solanum-lycopersicum* (tomato) and other plants. **Parasitology**, v. 47, n. 3–4, p. 297–303, 1957.

GHOSH, T.; PRADHAN, C.; DAS, A. B. Control of stem-rot disease of rice caused by *Sclerotium oryzae* catt and its cellular defense mechanism – A review. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 112, n. 2, p.1–13, 2020. DOI:[10.1016/j.pmpp.2020.101536](https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2020.101536)

GOMES, A. S.; OLIVEIRA, S. C. C.; MENDONÇA, I. S.; SILVA, C. C. DA; GUIOTTI, N. X.; MELO, L. R.; SILVA, W. A.; BORGHETTI, F. Potential herbicidal effect of synthetic chalcones on the initial growth of sesame, *Sesamum indicum* L., and brachiaria, *Urochloa decumbens* (Stapf) R. D. Webster. **Iheringia - Serie Botanica**, v. 73, n. 1, p. 46–52, 2018. DOI:10.21826/2446-8231201873106

GOMES, M. N.; MURATOV, E. N.; PEREIRA, M.; PEIXOTO, J. C.; ROSSETO, L. P.; CRAVO, P. V. L.; ANDRADE, C. H.; NEVES, B. J. Chalcone derivatives: Promising starting points for drug design. **Molecules**, v. 22, p. 1–25, 2017. DOI:10.3390/molecules22081210

GONÇALVES, D. DA C.; RIBEIRO, W. R.; GONÇALVES, D. C.; MENINI, L.; COSTA, H. Recent advances and future perspective of essential oils in control *Colletotrichum* spp.: A sustainable alternative in postharvest treatment of fruits. **Food Research International**, v. 150, p. 1–17, 2021. DOI:10.1016/j.foodres.2021.110758

GRANDCLÉMENT, C.; TANNIÈRES, M.; MORÉRA, S.; DESSAUX, Y.; FAURE, D. Quorum quenching: Role in nature and applied developments. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 40, n. 1, p. 86–116, 2015. DOI 10.1093/femsre/fuv038

GUO, T.; XIA, R.; CHEN, M.; HE, J.; SU, S.; LIU, L.; LI, X.; XUE, W. Biological activity evaluation and action mechanism of chalcone derivatives containing thiophene sulfonate. **RSC Advances**, v. 9, p. 24942–24950, 2019. DOI: 10.1039/c9ra05349b

GUPTA, G. K.; SHARMA, S. K.; RAMTEKE, R. Biology, Epidemiology and Management of the Pathogenic Fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with Special Reference to Charcoal Rot of Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Journal of Phytopathology**, v. 160, p. 167–180, 2012. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2012.01884.x

HAJIAN-MALEKI, H.; BAGHAEI-RAVARI, S.; MOGHADDAM, M. Efficiency of essential oils against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* causing potato soft rot and their possible application as coatings in storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 156, p. 1–15, 2019. 10.1016/j.postharvbio.2019.06.002

HAWVER, L. A.; JUNG, S. A.; NG, W. L. Specificity and complexity in bacterial quorum-sensing systems. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 40, p. 738–752, 2016. DOI: 10.1093/femsre/fuw014

HORUZ, S.; CETINKAYA-YILDIZ, R.; MIRIK, M.; AYSAN, Y. Occurrence, isolation, and identification of *Acidovorax citrulli* from melon in Turkey. **Plant Protection Science**, v. 50, n. 4, p. 179–183, 2014.

HOU, H.; ZHANG, X.; ZHAO, T.; ZHOU, L. Effects of *Origanum vulgare* essential oil and its two main components, carvacrol and thymol, on the plant pathogen *Botrytis cinerea*. **PeerJ**, p. 1–25, 2020. DOI:10.7717/peerj.9626

HUSNI, A. A. A.; ISMAIL, S. I.; JAAFAR, N.; ZULPERI, D. Etiology, diagnostic approaches and management strategies of *Acidovorax citrulli*, a bacterial fruit blotch pathogen of cucurbits. **Plant Protection Science**, v. 57, n. 2, p. 75–94, 2021. DOI: [10.17221/52/2020-PPS](https://doi.org/10.17221/52/2020-PPS)

IBGE. Produção de melão. 2022. Disponível em: <https://ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/melao/br>

ISAH, T.; UMAR, S.; MUJIB, A.; SHARMA, M. P.; RAJASEKHARAN, P. E.; ZAFAR, N.; FRUKH, A. Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant in vitro cultures: strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield. **Plant Cell, Tissue and**

Organ Culture, v. 132, p. 239–265, 2018. DOI: 10.1007/s11240-017-1332-2

JANKEVICIUS, J. V.; JANKEVFCIUS, S. I.; CAMPANER, M.; CONCHON, I.; MAEDA, L. A.; TELXEIRA, M. M. G.; FREYMULLER, E.; CAMARGO, E. P. Life Cycle and Culturing of *Phytomonas serpens* (Gibbs), a Trypanosomatid Parasite of Tomatoes. **The Journal of Protozoology**, v. 36, n. 3, p. 265–271, 1989.

JASKOWSKA, E.; BUTLER, C.; PRESTON, G.; KELLY, S. *Phytomonas*: Trypanosomatids Adapted to Plant Environments. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 1, p. 1–17, 2015. 10.1371/journal.ppat.1004484

JIANG, J.; ZHAI, H.; LI, H.; WANG, Z.; CHEN, Y.; HONG, N.; WANG, G.; CHOFONG, G. N.; XU, W. Identification and characterization of *Colletotrichum fructicola* causing black spots on young fruits related to bitter rot of pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) in China. **Crop Protection**, v. 58, p. 41–48, 2014. DOI: 10.1016/j.cropro.2014.01.003

JIANG, S.; ZHANG, J.; YANG, Q.; SUN, D.; PU, X.; SHEN, H.; LI, Q.; WANG, Z.; LIN, B. Antimicrobial Activity of Natural Plant Compound Carvacrol Against Soft Rot Disease Agent *Dickeya zeae*. **Current Microbiology**, v. 78, p. 3453–3463, 2021. 10.1007/s00284-021-02609-3

KACHUR, K.; SUNTRES, Z. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 18, p. 3042–3053, 2020. 10.1080/10408398.2019.1675585

KALIA, V. C. Quorum sensing inhibitors: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 224–245, 2013. 10.1016/j.biotechadv.2012.10.004

KEREK, A. L. **Síntese, Caracterização, estudo teórico e atividade biológica de chalconas hidroxiladas**. 2021. 157f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná-PR, 2021.

KONDURU, N. K.; DEY, S.; SAJID, M.; OWAIS, M.; AHMED, N. Synthesis and antibacterial and antifungal evaluation of some chalcone based sulfones and bisulfones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, p. 23–30, 2013.

KORDALI, S.; CAKIR, A.; OZER, H.; CAKMAKCI, R.; KESDEK, M.; METE, E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 18, p. 8788–8795, 2008. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.04.048

LAFONT, A. Sur La présence D'un parasite de la classe des Flagellés dans le Latex de l' *Euphorbia pilulifera*. **Société de Biologie**, n. 66, p. 1011–1013, 1909.

LATIN, R. X.; RANE, K. K. Bacterial Fruit Blotch of Watermelon in Indiana. **Plant Disease**, v. 74, p. 331, 1990. DOI: 10.1094/PD-74-0331B.

LI, H. N.; JIANG, J. J.; HONG, N.; WANG, G. P.; XU, W. X. First report of *colletotrichum fructicola* causing bitter rot of pear (*Pyrus bretschneideri*) in China. **Plant Disease**, v. 97, n. 7, p. 1000, 2013. DOI:10.1094/PDIS-01-13-0084-PDN

LIU, Z.; LI, Q. X.; SONG, B. Pesticidal Activity and Mode of Action of Monoterpenes.

- Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, p. 4556–4571, 2022. DOI:10.1021/acs.jafc.2c00635
- LODHA, S.; MAWAR, R. Population dynamics of *Macrophomina phaseolina* in relation to disease management: A review. **Journal of Phytopathology**, v. 168, n. 1, p. 1–17, 2020. DOI: 10.1111/jph.12854
- LÓPEZ, G.; MELLADO, M.; WERNER, E.; SAID, B.; GODOY, P.; CARO, N.; BESOAIN, X.; MONTENEGRO, I.; MADRID, A. Sonochemical Synthesis of 2'-Hydroxy-Chalcone Derivatives with Potential Anti-Oomycete Activity. **Antibiotics**, v. 9, p. 1–11, 2020. DOI: 10.3390/antibiotics9090576
- MAJEED, A. Application of Agrochemicals in Agriculture: Benefits, Risks and Responsibility of Stakeholders. **Journal of Food Science and Toxicology**, v. 2, n. 1, p. 1–2, 2018.
- MARCHESE, A.; ORHAN, I. E.; DAGLIA, M.; BARBIERI, R.; LORENZO, A. DI; NABAVI, S. F.; GORTZI, O.; IZADI, M.; NABAVI, S. M. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. **Food Chemistry**, v. 210, p. 402–414, 2016. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.04.111
- MARQUEZ, N.; GIACHERO, M. L.; DECLERCK, S.; DUCASSE, D. A. *Macrophomina phaseolina*: General Characteristics of Pathogenicity and Methods of Control. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 1–16, 2021. DOI: 10.3389/fpls.2021.634397
- MARIANO, R. L. R. DE.; SILVEIRA, E. B. DA.; ASSIS, S. M. P. DE.; GOMES, A. M. A.; OLIVEIRA, I. S.; NASCIMENTO, A. R. P. Diagnose e manejo de fitobacterioses de importância no nordeste brasileiro. In: MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. (eds). **Proteção de Plantas na Agricultura Sustentável**. 2001. p. 141–169.
- MILADI, H.; ZMANTAR, T.; CHAABOUNI, Y.; FEDHILA, K.; BAKHROUF, A.; MAHDOUANI, K.; CHAIEB, K. Antibacterial and efflux pump inhibitors of thymol and carvacrol against food-borne pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 99, p. 95–100, 2016. 10.1016/j.micpath.2016.08.008
- MORÃO, L. G.; LORENZONI, A. S. G.; CHAKRABORTY, P.; AYUSSO, G. M.; CAVALCA, L. B.; SANTOS, M. B.; MARQUES, B. C.; DILARRI, G.; ZAMUNER, C.; REGASINI, L. O.; FERREIRA, H.; SCHEFFERS, D. Investigating the Modes of Action of the Antimicrobial Chalcones BC1 and T9A. **Molecules**, v. 25, p. 1–14, 2020. 10.3390/molecules25204596
- MUKHERJEE, S.; BASSLER, B. L. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, p. 371–382, 2019. 10.1038/s41579-019-0186-5
- MULLEN, J. Southern blight, Southern stem blight, White mold. **The Plant Health Instructor**, 2001. DOI: 10.1094/PHI-I-2001-0104-01.
- NASCIMENTO, A. R. P.; MARIANO, R. L. R.; SILVA, E. I. Hospedeiros alternativos de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 345–349, 2004.
- OKOLO, E. N.; UGWU, D. I.; EZEMA, B. E.; NDEFO, J. C.; EZE, F. U.; EZEMA, C. G.;

EZUGWU, J. A.; UJAM, O. T. New chalcone derivatives as potential antimicrobial and antioxidant agent. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2021. DOI:10.1038/s41598-021-01292-5

OUYANG, Y.; LI, J.; CHEN, X.; FU, X.; SUN, S.; WU, Q. Chalcone derivatives: Role in anticancer therapy. **Biomolecules**, v. 11, p. 1–36, 2021. 10.3390/biom11060894

OYEDEJI, A. O.; OKUNOWO, W. O.; OSUNTOKI, A. A.; OLABODE, T. B.; AYO-FOLORUNSO, F. Insecticidal and biochemical activity of essential oil from *Citrus sinensis* peel and constituents on *Callosobrunchus maculatus* and *Sitophilus zeamais*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 168, p. 1–8, 2020. DOI: [10.1016/j.pestbp.2020.104643](https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104643)

PANDEY, A. K.; BASANDRAI, A. K. Will *Macrophomina phaseolina* spread in legumes due to climate change? A critical review of current knowledge. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 128, p. 9–18, 2021. DOI: 10.1007/s41348-020-00374-2

PANDIYAN, G. N.; MATHEW, N.; MUNUSAMY, S. Larvicidal activity of selected essential oil in synergized combinations against *Aedes aegypti*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 174, p. 549–556, 2019. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.03.019

PODLIPAEV, S. A. *Phytomonas elmanssiani* (Mastigophora: Trypanosomadina) from the plant *Cynanchumsibiricum* (Asclepiadaceae) in Central Asia and Kazakhstan. **Proc. Zool. Inst. Acad. Sci.**, v. 144, p. 61-65, 1986.

QUECAN, B. X. V.; SANTOS, J. T. C.; RIVERA, M. L. C.; HASSIMOTTO, N. M. A.; ALMEIDA, F. A.; PINTO, U. M. Effect of quercetin rich onion extracts on bacterial quorum sensing. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1–16, 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00867

RATHER, M. A.; GUPTA, K.; MANDAL, M. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 1701–1718, 2021. 10.1007/s42770-021-00624-x

RIVERA, M. L. C.; HASSIMOTTO, N. M. A.; BUERIS, V.; SIRCILI, M. P.; ALMEIDA, F. A. DE; PINTO, U. M. Effect of *Capsicum Frutescens* Extract, Capsaicin, and Luteolin on Quorum Sensing Regulated Phenotypes. **Journal of Food Science**, v. 84, n. 6, p. 1477–1486, 2019. 10.1111/1750-3841.14648

ROZMER, Z.; PERJÉSI, P. Naturally occurring chalcones and their biological activities. **Phytochemistry Reviews**, v. 15, n. 1, p. 87–120, 2016. DOI: 10.1007/s11101-014-9387-8

SANTOS, T. A. C.; SILVA, K. P.; SOUZA, G. B.; ALVES, P. B.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; SCHER, R.; FERNANDES, R. P. M. Chalcone Derivative Induces Flagellar Disruption and Autophagic Phenotype in *Phytomonas serpens* In Vitro. **Pathogens**, v. 12, n. 3, p. 1–13, 2023. DOI: 10.3390/pathogens12030423

SAUER, K.; STOODLEY, P.; GOERES, D. M.; HALL-STOODLEY, L.; BURMØLLE, M.; STEWART, P. S.; BJARNSHOLT, T. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, p. 608–620, 2022. DOI: 10.1038/s41579-022-00767-0

SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; SECHLER, A.; CLAFLIN, L. E.; VIDAVER, A. K.; JONES, J. B.; AGARKOVA, I.; IGNATOV, A.; DICKSTEIN, E.; RAMUNDO, B. A.

Reclassification of subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. avenae* (Manns 1905) emend., *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) comb. nov., *A. citrulli* Schaad *et al.*, 1978) comb. nov., and proposal of *A. oryzae* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 31, p. 434–446, 2008. DOI: 10.1016/j.syapm.2008.09.003

SCHAAD, N. W.; SOWELL, G. JR.; GOTH, R. W.; COLWELL, R. R.; WEBB, R. E. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* subsp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 28, n. 1, p. 117–125, 1978.

SHI, X. C.; WANG, S. Y.; DUAN, X. C.; WANG, Y. Z.; LIU, F. Q.; LABORDA, P. Biocontrol strategies for the management of *Colletotrichum* species in postharvest fruits. **Crop Protection**, v. 141, p. 1–12, 2021. DOI: 10.1016/j.cropro.2020.105454

SHIH, M. L.; MORGAN, J. A. Metabolic flux analysis of secondary metabolism in plants. **Metabolic Engineering Communications**, v. 10, p. 1–7, 2020. DOI: 10.1016/j.mec.2020.e00123

SHIRAI, M.; EULGEM, T. Molecular interactions between the soilborne pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* and its host plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1–15, 2023. DOI 10.3389/fpls.2023.1264569

SHORT, G. E.; WYLLIE, T. D.; BRISTOW, P. R. Survival of *Macrophomina phaseolina* in Soil and in Residue of Soybean. **Phytopathology**, 1980.

SOMODI, G. C.; JONES, J. B.; HOPKINS, D. L.; STALL, R. E.; KUCHARÉK, T. A.; HODGE, N. C.; WATTERSON, J.C. Occurrence of a bacterial watermelon fruit blotch in Flórida. **Plant Disease**, v. 75, p. 1053–1056, 1991.

SILVA, L. L. DA; MORENO, H. L. A.; CORREIA, H. L. N.; SANTANA, M. F.; QUEIROZ, M. V. DE. *Colletotrichum*: species complexes, lifestyle, and peculiarities of some sources of genetic variability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 1891–1904, 2020. DOI: 10.1007/s00253-020-10363-y

DA SILVA, R. S.; OLIVEIRA, M. M. G. DE; MELO, J. O. DE; BLANK, A. F.; CORRÊA, C. B.; SCHER, R.; FERNANDES, R. P. M. Antimicrobial activity of *Lippia gracilis* essential oils on the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and their effect on membrane integrity. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 160, p. 40–48, 2019. DOI: 10.1016/j.pestbp.2019.06.014

SINGH, A.; GUPTA, R.; TANDON, S.; PANDEY, R. Thyme Oil reduces biofilm formation and impairs virulence of *Xanthomonas oryzae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–16, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01074

SOTO, E. R.; RUS, F.; MIRZA, Z.; OSTROFF, G. R. Yeast Particles for Encapsulation of Terpenes and Essential Oils. **Molecules**, v. 28, p. 1–14, 2023. DOI: 10.3390/molecules28052273

SOUZA, G. B.; SANTOS, T. A. C.; SILVA, A. P. S.; BARREIROS, A. L. B. S.; NARDELLI, V. B.; SIQUEIRA, I. B.; DOLABELLA, S. S.; COSTA, E. V.; ALVES, P. B.; SCHER, R.; FERNANDES, R. P. M. Synthesis of chalcone derivatives by Claisen-Schmidt condensation and in vitro analyses of their antiprotozoal activities. **Natural Product Research**, p. 1–9, 2022. DOI:10.1080/14786419.2022.2140337

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Metabólitos secundários e defesa vegetal. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. (eds). **Fisiologia Vegetal**, 2009. p.343–372.

TARGANSKI, S. K.; SOUSA, J. R.; PÁDUA, G. M. S. DE; SOUSA, J. M. DE; VIEIRA, L. C. C.; SOARES, M. A. Larvicidal activity of substituted chalcones against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and non-target organisms. **Pest Management Science**, v. 77, p. 325–334, 2021. DOI :10.1002/ps.6021

TEJASWINI, G. S.; MAHADEVAKUMAR, S.; SOWMYA, R.; DEEPIKA, Y. S.; MEGHAVARSHINIGOWDA, B. R.; NUTHAN, B. R.; SHARVANI, K. A.; AMRUTHESH, K. N.; SRIDHAR, K. R. Molecular detection and pathological investigations on southern blight disease caused by *Sclerotium rolfsii* on cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata): A new record in India. **Journal of Phytopathology**, v. 170, p. 363–372, 2022. DOI: 10.1111/jph.13085

TELTEBOIM, M. C.; MIRANDA, S. H. G. DE; OLIVEIRA, L.; OZAKI, V. A. Limites máximos de resíduos e suas implicações no comércio internacional de frutas. **Revista de Política Agrícola**, p. 102–112, 2007.

UR RASHID, H.; XU, Y.; AHMAD, N.; MUHAMMAD, Y.; WANG, L. Promising anti-inflammatory effects of chalcones via inhibition of cyclooxygenase, prostaglandin E 2 , inducible NO synthase and nuclear factor κ b activities. **Bioorganic Chemistry**, v. 87, p. 335–365, 2019. DOI:10.1016/j.bioorg.2019.03.033

HOARE, C. A.; WALLACE, F. G. Developmental stages of Trypanosomatid Flagellates: a new Terminology. **Nature**, v. 212, p. 1385–1386, 1966.

WONGLOM, P.; DAENG SUWAN, W.; ITO, S. ICHI; SUNPAPAO, A. Biological control of *Sclerotium* fruit rot of snake fruit and stem rot of lettuce by *Trichoderma* sp. T76-12/2 and the mechanisms involved. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 107, p. 1–7, 2019. DOI: 10.1016/j.pmpp.2019.04.007

XIA, R.; GUO, T.; HE, J.; CHEN, M.; SU, S.; JIANG, S.; TANG, X.; CHEN, Y.; XUE, W. Antimicrobial evaluation and action mechanism of chalcone derivatives containing quinoxaline moiety. **Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly**, v. 150, p. 1325–1334, 2019. DOI: 10.1007/s0070 6-019-02449 -9

YADAV, D. K.; KAUSHIK, P.; PANKAJ; RANA, V. S.; KAMIL, D.; KHATRI, D.; SHAKIL, N. A. Microwave Assisted Synthesis, Characterization and Biological Activities of Ferrocenyl Chalcones and Their QSAR Analysis. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, p. 1–15, 2019. DOI: 10.3389/fchem.2019.00814

ZAKARIA, L. Diversity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease in tropical fruit crops - A review. **Agriculture**, v. 11, p. 1–23, 2021. DOI: 10.3390/agriculture11040297

ZANETTI, A. DOS S. **Diversidade, Relações Filogenéticas E Taxonomia De *Phytopomonas* Spp.** 2015. 38f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2015.

ZHANG, W.; LI, C. Exploiting quorum sensing interfering strategies in gram-negative

bacteria for the enhancement of environmental applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–15, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01535

ZHOU, Q.; TANG, X.; CHEN, S.; ZHAN, W.; HU, D.; ZHOU, R.; SUN, N.; WU, Y.; XUE, W. Design, Synthesis, and Antifungal Activity of Novel Chalcone Derivatives Containing a Piperazine Fragment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, p. 1029–1036, 2022. DOI: 10.1021/acs.jafc.1c05933

4. ARTIGO 1

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE CHALCONAS CONTENDO GRUPOS METOXILAS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA SOBRE FITOPATÓGENOS

Periódico submetido: *Molecular Diversity*

RESUMO

Uma série de 15 chalconas foram sintetizadas por meio da condensação aldólica de Claisen-Schmidt e caracterizadas por FTIR, CG/EM/DIC, RMN ¹D (¹H e ¹³C), RMN ²D (COSY, HSQC e HMBC) e técnicas de EMAR. Todas as moléculas foram testadas na concentração de 1mM para atividades antifúngica (*Sclerotium* sp., *Macrophomina phaseolina* e *Colletotrichum gloeosporioides*), antibacteriana (*Acidovorax citrulli*, duas cepas) e a concentração de 25µM foi utilizada para a atividade antiprotozoária (*Phytomonas serpens*). As chalconas CH0, CH1, CH2, CH8 se destacaram na atividade antifúngica. CH0 apresentou valores de IC₅₀ de 47,3 µM (9,8 µg.mL⁻¹) para o fungo *C. gloeosporioides*. Além disso, a microscopia de fluorescência indicou que CH0 promoveu a perda da integridade da membrana celular das hifas. As chalconas CH1 e CH2 promoveram a inibição de *Sclerotium* sp., com IC₅₀ de 127,5 µM (32,9 µg.mL⁻¹) e 110,4 µM (29,6 µg.mL⁻¹), respectivamente. Todas as moléculas testadas mostraram alta atividade sobre o fitoparasita *P. serpens*, com valores de IC₅₀ de 0,98, 2,40, 10,25 e 3,11 µM para as chalconas CH2, CH3, CH5 e CH14, respectivamente. Os resultados demonstraram que chalconas dimetoxiladas no anel A (CH2), chalconas com um anel de furano associado ao grupo metoxi no anel A (CH1 e CH8), bem como a chalcona não modificada (CH0), podem ser promissores fungicidas agrícolas para o controle dos fungos estudados.

Palavras-chave: Chalconas metoxiladas· Antifúngico· Antiprotozoária· Antibacteriana· ruptura membrana celular· Controle agricultura

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF CHALCONES CONTAINING METHOXYL GROUPS WITH ANTIMICROBIAL ACTIVITY AGAINST PHYTOPATHOGENS

ABSTRACT

A series of 15 chalcones were synthesized via Claisen-Schmidt aldol condensation and characterized using FTIR, GC/MS/DIC, ^1D NMR (^1H and ^{13}C), ^2D NMR (COSY, HSQC, and HMBC), and EMAR techniques. All molecules were tested at a concentration of 1 mM for antifungal activities (*Sclerotium* sp., *Macrophomina phaseolina*, and *Colletotrichum gloeosporioides*), antibacterial activities (*Acidovorax citrulli*, two strains) and at a concentration of 25 μM for antiprotozoal activity (*Phytomonas serpens*). Chalcones CH0, CH1, CH2, and CH8 exhibited noteworthy antifungal activity. CH0 showed IC_{50} values of 47.3 μM (9.8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) against the fungus *C. gloeosporioides*. Additionally, fluorescence microscopy indicated that CH0 caused loss of cellular membrane integrity in the hyphae. Chalcones CH1 and CH2 inhibited *Sclerotium* sp., with IC_{50} values of 127.5 μM (32.9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) and 110.4 μM (29.6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), respectively. All tested molecules showed high activity against the phytoparasite *P. serpens*, with IC_{50} values of 0.98, 2.40, 10.25, and 3.11 μM for chalcones CH2, CH3, CH5, and CH14, respectively. The results demonstrate that dimethoxylated chalcones on ring A (CH2), chalcones with a furan ring associated with a methoxy group on ring A (CH1 and CH8), as well as the unmodified chalcone (CH0), may serve as promising agricultural fungicides for controlling the studied fungi.

Key-words: Methoxylated chalcones· Antifungal· Antiprotozoal· Antibacterial· Cell membrane disruption· Agricultural control

4.1. Introdução

Doenças e pragas de plantas causam perdas agrícolas e, portanto, são importantes para a agricultura global [1]. O gênero *Colletotrichum* spp. compreende espécies fúngicas patogênicas na maioria das culturas cultivadas em todo o mundo. A infecção leva à ocorrência de lesões de antracnose, lesões em partes aéreas das plantas e podridões pós-colheita. Esses fungos causam perdas significativas em culturas economicamente importantes, especialmente em frutas, hortícolas e plantas ornamentais [2].

O aumento da demanda por alimentos, resultado do rápido crescimento populacional, contribuiu para a intensificação da agricultura e, conseqüentemente, para o uso de agroquímicos (fertilizantes e pesticidas). No entanto, há uma crescente preocupação em todo o mundo com o uso destes produtos devido à sua toxicidade para seres humanos, o meio ambiente e ecossistemas [3]. Assim, compostos naturais têm sido estudados como alternativas para obter produtos com alta eficiência e baixo impacto ambiental [4].

As chalconas são substâncias naturais produzidas no metabolismo secundário das plantas. São estruturas precursoras de flavonoides e estão envolvidas em processos de polinização e defesa das plantas [4]. Tais moléculas também podem ser obtidas por várias sínteses químicas, sendo a síntese de Claisen Schmidt a mais utilizada [5]. A estrutura fundamental da chalcona é formada por um sistema carbonílico α - β insaturado que liga dois anéis aromáticos [6]. Esta classe de compostos apresenta síntese simples e versatilidade para a formação de derivados a partir de modificações na estrutura química [7].

As chalconas têm sido utilizadas em estudos em farmacologia devido a atividades anticancerígenas [8], antiviral [9], anti-inflamatória [10], larvicida [11], antifúngicas [12], antibacterianas [13,14] e antiprotozoárias [15]. Na agricultura, as chalconas têm sido relatados com atividades inseticidas [16], herbicidas [17], antivirais [18], nematocidas [19,20], antibacterianas [21,22] e antifúngicas [23].

Estudos demonstraram que fungos fitopatogênicos como *Botrytis cinerea* e *Monilinia fructicola* foram inibidos com chalcona metoxilada [24]. Este potencial antifúngico das chalconas também foi relatado para *Rhizoctonia solani*, *Peronophythora litchi* e *Colletotrichum gloeosporioides* [25]. A chalcona contendo anel furano e adições de cloro ao anel A promoveu a inibição de *Rhizoctonia solani*, *Bipolaria maydis*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Magnaporthe oryzae*, *Gibberella zeae* e *Botrytis cinerea* [23].

Bactérias fitopatogênicas como *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* e *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*, além de *Ralstonia solanacearum*, foram inibidas por chalconas [18,22]. Em células de *Xanthomonas citri* subsp *citri* tratadas com chalcona, foi observada uma diminuição do ATP intracelular [26].

A atividade antiprotozoária de chalconas têm sido amplamente estudada em parasitas humanos, como *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania mexicana* e *Trypanosoma cruzi* [27,28]. No entanto, os estudos sobre parasitas de plantas são escassos. Uma série de chalconas contendo grupo metox foi estudada para a inibição do fitoparásita *P. serpens*, mostrando alto potencial inibitório com IC₅₀ variando de 15,54 a 1,59 μ M [29].

Neste trabalho, uma série de 15 chalconas foram sintetizadas, caracterizadas e avaliadas em três diferentes classes de microrganismos. A ação inibitória de todas as moléculas foi avaliada nos fungos *Sclerotium* sp, *Macrophomina phaseolina* e *Colletotrichum gloeosporioides*, assim como nas bactérias *Acidovorax citrulli* (duas cepas) e no protozoário *Phytomonas serpens*.

4.2. Material e métodos

4.2.1 Síntese e caracterização das chalconas

As chalconas foram sintetizadas por meio da condensação aldólica (Claisen-Schmidt), e a identificação e caracterização foram realizadas por espectrometria de absorção na região

infravermelha (FTIR), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa e detector de ionização de chama (CG/EM/DIC), espectroscopia de ressonância magnética nuclear 1D (^1H e ^{13}C) e ^2D (COSY, HSQC e HMBC), e espectrometria de massa de alta resolução (EMAR).

4.2.1.1 Ponto de fusão (p.f.)

Os pontos de fusão foram determinados em um equipamento Micro Química MQAPF-301.

4.2.1.2 Espectroscopia Infravermelho (FTIR)

Os espectros de infravermelho (pelotas de KBr) foram coletados em um espectrômetro de infravermelho Perkin Elmer com o modelo Spectrum Two de Fourier Transform da PerkinElmer. Os espectros foram obtidos na faixa de 4000 a 600 cm^{-1} .

4.2.1.3 Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)

Experimentos de RMN 1D (^1H e ^{13}C) e 2D (COSY, HSQC e HMBC) foram realizados em CDCl_3 (clorofórmio- d) a 298 K em um espectrômetro de RMN Bruker AVANCE III HD operando a 11,75 T (^1H e ^{13}C a 500 e 125 MHz, respectivamente). Todos os deslocamentos químicos (δ) de ^1H e ^{13}C na RMN são apresentados em ppm em relação ao sinal de tetrametilsilano a 0,00 ppm como referência interna, e as constantes de acoplamento (J) são fornecidas em Hz.

4.2.1.4 Cromatografia gasosa/Espectrometria de massas (CG-EM/IVD)

Os espectros de massa foram obtidos em um sistema CG-EM/IVD (QP2010 Ultra, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) e coluna Rtx-5MS de 30 m $\times$ 0,25 mm $\times$ 0,25 μm . Os espectros de massa foram determinados com uma energia de elétrons de 70 eV.

(E)-1,3-difenil-prop-2-en-1-ona (CH-0)

Sólido amarelo, rendimento de 90%, p.f. 54-55 °C. IV: ν_{max} / cm^{-1} 3052, 1666, 1603. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 8,02 (dt; J=7,7 e 1,2 Hz; 2H), 7,81 (d; J=15,7 Hz; 1H), 7,64 (m; 2H), 7,58 (tt; J=7,3 e 1,3 Hz; 1H), 7,51 (m; 3H), 7,41 (m; 3H). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 190,55, 144,84, 138,21, 134,88, 132,78, 130,54, 128,96, 128,62, 128,50, 128,45. EIMS: m/z (%) 208 [$\text{M}^+\bullet$] (61), 207 (100), 131 (36), 103 (33), 77 (54). [$\text{M}^+\bullet$] 208 m/z $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}$ [38].

(E)-1-(3,4-dimetoxifenil)-3-(furan-2-il) prop-2-en-1-ona (CH-1)

Sólido marrom, rendimento de 75%, p.f. 79-83°C. IV: ν_{max} / cm^{-1} 3121, 3031, 1655, 1600, 1572, 1264, 1027. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7,69 (dd; J=8,4 e 2,0 Hz; 1H), 6,93 (d; J=8,4 Hz; 1H), 7,63 (d; J=2,0 Hz; 1H), 7,53 (d; J=1,6 Hz; 1H), 6,70 (d; J=3,4 Hz; 1H), 6,52 (dd; J=3,4 Hz e 1,6 Hz; 1H), 7,59 (d; J=15,3 Hz; 1H), 7,48 (d; J=15,3 Hz; 1H), 3,97 (s, 3H), 3,96 (s, 3H). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 188,1, 153,3, 151,9, 149,3, 144,8, 131,4, 130,1, 123,1, 119,1, 115,9, 112,7, 110,7, 110,1, 56,1. EIMS: m/z (%) 258 [$\text{M}^+\bullet$] (100), 227(9), 204 (15), 165(47), 121 (22). [$\text{M}^+\bullet$] 258 m/z $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_4$ [39].

(E)-1-(3,4-dimetoxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona (CH-2)

Sólido amarelo, rendimento de 85%, p.f. 83-86°C. IV: ν_{max} / cm^{-1} 3059, 1641, 1606, 1250, 1027. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7,69 (dd; J=8,3 e 2,0 Hz; 1H), 6,93 (d; J=8,3 Hz; 1H), 7,65 – 7,62 (m; 3H), 7,43 – 7,37 (m, 3H), 7,81 (d; J=15,6 Hz; 1H), 7,55 (d; J=15,6 Hz; 1H), 3,96 (s, 3H), 3,95 (s, 3H). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 188,56, 153,2, 149,2, 143,9, 135,0, 130,3, 131,3, 128,3, 128,9, 123,0, 121,6, 110,7, 109,9, 56,0. EIMS: m/z (%) 268 [$\text{M}^+\bullet$] (100), 253(13), 237 (25), 165(42), 103 (26). [$\text{M}^+\bullet$] 268 m/z $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_3$ [40].

(E)-1-(3,4-dimetoxifenil)-3-(tiofeno-2-il) prop-2-en-1-ona (CH-3)

Sólido amarelo, rendimento de 75%, ponto de fusão 107-109°C. IV: ν_{max} / cm^{-1} 3115, 1662, 1600, 1271, 1104. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7,66 (dd; $J=8,3$ e $2,0$ Hz; 1H), 6,93 (d; $J=8,3$ Hz; 1H), 7,63 (d; $J=2,0$ Hz; 1H), 7,41 (d; $J=5,0$ Hz; 1H), 7,36 (d; $J=3,6$ Hz; 1H), 7,09 (dd; $J=5,0$ Hz e $3,6$ Hz; 1H), 7,94 (d; $J=15,2$ Hz; 1H), 7,35 (d; $J=15,2$ Hz; 1H), 3,98 (s, 3H), 3,97 (s, 3H). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 187,9, 153,3, 149,3, 140,6, 131,8, 136,4, 128,3, 122,5, 122,9, 120,4, 110,7, 109,9, 56,1. EIMS: m/z (%) 274 $[\text{M}+\bullet]$ (100), 243(45), 165 (21), 137(30), 109 (22). $[\text{M}+\bullet]$ 274 m/z $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_3\text{S}$ [41].

(E)-1-(3,4-dimetoxifenil) -3-(4-metoxifenil) prop-2-en-1-ona (CH-4)

Sólido amarelo, rendimento de 90%, ponto de fusão 84-86°C. IV: ν_{max} / cm^{-1} 3087, 1655, 1586, 1271, 1020. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 6,93 (d; $J=8,4$ Hz; 1H), 6,94 (d; $J=8,8$ Hz; 2H), 7,68 (dd; $J=8,4$ e $2,0$ Hz; 1H), 7,59 – 7,62 (m; 3H), 7,79 (d; $J=15,5$ Hz; 1H), 7,28 (d; $J=15,5$ Hz; 1H), 3,97 (s, 6H), 3,85 (s, 3H). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 188,6, 161,5, 153,1, 149,2, 143,8, 131,6, 130,1, 127,8, 122,8, 119,4, 114,4, 110,8, 109,9, 56,0, 55,4. EIMS: m/z (%) 298 $[\text{M}+\bullet]$ (100), 283 (33), 267 (50), 165 (21), 161 (20). $[\text{M}+\bullet]$ 298 m/z $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_4$ [42].

(E)-1-(3,4-dimetoxifenil) -3-(4-(dimetilamino) fenil) prop-2-en-1-ona (CH-5)

Sólido laranja, rendimento de 80%, ponto de fusão 110-112°C. IV: ν_{max} / cm^{-1} 3003, 1641, 1564, 1264, 1138. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7,67 (dd; $J=8,3$ e $1,9$ Hz; 1H), 7,62 (d; $J=1,9$ Hz; 1H), 6,92 (d; $J=8,3$ Hz; 1H), 7,56 (d; $J=9,8$ Hz; 2H) e 6,90 (d; $J=8,8$ Hz; 2H), 7,79 (d; $J=15,4$ Hz; 1H) e 7,36 (d; $J=15,4$ Hz; 1H), 3,97 (s, 3H), 3,96 (s, 3H), 3,04 (s, 6H). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 188,8, 152,7, 151,9, 149,1, 144,9, 130,3, 122,9, 122,5, 116,5, 111,8, 110,8, 109,9, 56,0, 40,2. EIMS: m/z (%) 342 $[\text{M}+\bullet]$ (100), 296 (25), 280 (27), 174 (21), 121 (66). $[\text{M}+\bullet]$ 311 m/z $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_3$ [42].

(E)-1-(4-metoxifenil) -3-(naftalen-1-il) prop-2-en-1-ona (CH-6)

Sólido amarelo, rendimento de 70%, ponto de fusão 75-77°C. IV: ν_{max} / cm^{-1} 3038, 1648, 1578, 1264, 1020. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 8,65 (d; $J=15,3$ Hz; 1H), 8,26 (d; $J=8,4$ Hz; 1H), 7,91 (d; $J=8,2$ Hz; 1H), 7,89 (d; $J=7,3$ Hz; 2H), 7,73 (dd; $J=8,3$ e $1,9$ Hz; 1H), 7,67 (d; $J=1,9$ Hz; 1H), 7,63 (d; $J=15,3$ Hz; 1H), 7,60 - 7,63 (m; 3H), 6,94 (d; $J=8,3$ Hz; 1H), 3,98 (s, 3H), 3,97 (s, 3H). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 188,5, 153,4, 149,3, 141,0, 133,8, 131,3, 130,6, 128,8, 126,9, 125,5, 125,0, 124,5, 123,6, 123,2, 110,9, 110,1, 56,2. EIMS: m/z (%) 318 $[\text{M}+\bullet]$ (55), 317 (46), 237 (100), 135 (33), 107 (10). $[\text{M}+\bullet]$ 311 m/z $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_3$ [43].

(E)-3-(4-isopropilfenil) -1-(4-metoxifenil) prop-2-en-1-ona (CH-7)

Sólido marrom, rendimento de 82%, ponto de fusão 70-72°C. IV: ν_{max} / cm^{-1} 3045, 1648, 1264, 1020. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 8,02 (d; $J=8,8$ Hz; 2H), 7,79 (d; $J=15,6$ Hz; 1H), 7,56 (d; $J=8,2$ Hz; 2H), 7,50 (d; $J=15,6$ Hz; 1H), 7,25 (d; $J=8,2$ Hz; 2H), 6,95 (d; $J=8,8$ Hz; 2H), 3,83 (s, 3H), 2,87 (hep; $J=6,9$ Hz; 1H), 1,25 (hep; $J=6,9$ Hz; 6H). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 188,5, 163,0, 151,4 153,3, 143,8, 132,5, 130,9, 130,5, 128,3, 126,8, 120,7, 113,5, 55,2, 33,8, 23,5. EIMS: m/z (%) 280 $[\text{M}+\bullet]$ (59), 317 (48), 265 (46), 237 (100), 135 (31). $[\text{M}+\bullet]$ 280 m/z $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_2$.

(E)-3-(furan-2-il) -1-(4-metoxifenil) prop-2-en-1-ona (CH-8)

Sólido marrom, rendimento de 86%, ponto de fusão 76-78°C. IV: ν_{max} / cm^{-1} 3135, 1655, 1613, 1564, 1229, 1013. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 8,05 (dd; $J=8,9$ Hz; 2H), 7,58 (d; $J=15,3$ Hz; 1H), 7,52 (d; $J=1,7$ Hz; 1H), 7,46 (d; $J=15,3$ Hz; 1H), 6,70 (d; $J=3,4$ Hz; 1H), 6,98 (d; $J=8,9$ Hz; 2H), 6,52 (dd; $J=3,4$ Hz e $1,6$ Hz; 1H), 3,88 (s, 3H). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 188,1, 163,4, 151,8, 144,7, 131,1, 130,7, 129,9, 119,2, 115,7, 113,8, 112,6, 55,5. EIMS: m/z (%) 228 $[\text{M}+\bullet]$ (100), 185 (14), 174 (30), 157 (13), 135 (84). $[\text{M}+\bullet]$ m/z 228 $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_3$ [44].

(E)-1-(4-metoxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona (CH-9)

Sólido amarelo, rendimento de 74%, ponto de fusão 73-75°C. IV: ν_{max} / cm^{-1} 3065, 1662, 1592, 1264, 1180. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 8,05 (dd; $J=7,9$ Hz; 2H), 7,80 (d; $J=15,6$ Hz; 1H), 7,65 – 7,63 (m; 2H), 7,54 (d; $J=15,6$ Hz; 1H), 7,43 – 7,39 (m; 3H), 6,98 (d; $J=7,9$ Hz; 2H), 3,88 (s, 3H). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 188,7, 163,4, 143,9, 135,1, 131,1, 130,3, 130,8, 128,9, 128,3, 125,3, 121,9, 113,8, 55,5. EIMS: $[\text{M}+\bullet]$ m/z 238 $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_2$ [40].

(E)-1-(4-metoxifenil) -3-(4-metoxifenil) prop-2-en-1-ona (CH-10)

Sólido amarelo, rendimento de 67%, ponto de fusão 100-102°C. IV: ν_{max} / cm^{-1} 3017, 1662, 1592, 1250, 1020. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 8,04 (d; $J=8,9$ Hz; 2H), 7,77 (d; $J=15,6$ Hz; 1H), 7,60 (d; $J=8,7$ Hz; 2H), 7,42 (d; $J=15,6$ Hz; 1H), 6,97 (d; $J=8,9$ Hz; 2H), 6,93 (d; $J=8,7$ Hz; 2H), 3,88 (s, 3H), 3,85 (s, 3H). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 188,8, 163,3, 161,5, 143,8, 131,4, 130,7, 130,1, 127,8, 119,6, 114,4, 113,8, 55,5, 55,4. EIMS: m/z (%) 268 $[\text{M}+\bullet]$ (100), 253 (38), 225 (19), 160 (18), 135 (30). $[\text{M}+\bullet]$ m/z 268 $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_3$ [39].

(E)-1-(4-metoxifenil) -3-(4-(dimetilamino) fenil) prop-2-en-1-ona (CH-11)

Sólido alaranjado, rendimento de 68%, ponto de fusão 109-111°C. IV: ν_{max} / cm^{-1} 3010, 1600, 1306, 1160. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 8,03 (d; $J=8,8$ Hz; 2H), 7,78 (d; $J=15,4$ Hz; 1H), 7,54 (d; $J=8,8$ Hz; 2H), 7,34 (d; $J=15,4$ Hz; 1H), 6,69 (d; $J=8,8$ Hz; 2H), 6,97 (d; $J=8,8$ Hz; 2H), 3,88 (s, 3H), 3,03 (s, 6H). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 188,9, 162,9, 151,8, 144,9, 131,8, 130,5, 130,2, 122,8, 116,7, 113,6, 111,8, 55,4, 40,1. EIMS: m/z (%) 281 $[\text{M}+\bullet]$ (100), 280 (36), 266 (29), 250 (18), 121 (55). $[\text{M}+\bullet]$ m/z 281 $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{NO}_2$ [42].

(E)-1-(4-metoxifenil) -3-(tiofeno-2-il) prop-2-en-1-ona (CH-12)

Sólido amarelo, rendimento de 70%, ponto de fusão 103-106°C. IV: ν_{max} / cm^{-1} 3101, 1655, 1592, 1264, 1166. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 8,01 (d; $J=8,9$ Hz; 2H), 7,93 (d; $J=15,3$ Hz; 1H), 7,39 (d; $J=5,0$ Hz; 1H), 7,34 (d; $J=15,3$ Hz; 1H), 7,33 (d; $J=3,6$ Hz; 1H), 7,09 (dd; $J=5,0$ e $3,6$ Hz; 1H), 6,67 (d; $J=8,9$ Hz; 2H), 3,88 (s, 3H). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 188,1, 163,4, 140,5, 136,4, 131,7, 131,0, 130,7, 128,4, 120,6, 113,8, 55,5. EIMS: m/z (%) 244 $[\text{M}+\bullet]$ (100), 229 (15), 201(19), 135 (37), 109 (26). $[\text{M}+\bullet]$ m/z 244 $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_2\text{S}$ [44].

(E)-1-(3,4-dimetoxifenil) -3-(3,4-diclorofenil) prop-2-en-1-ona (CH-13)

Sólido branco, rendimento de 88%, ponto de fusão 120–122 °C. IV: ν_{max} / cm^{-1} 3073, 1662, 1592, 1264, 1160. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7,72 (d; $J=1,9$ Hz; 1H), 7,68 (d; $J=15,6$ Hz; 1H), 7,61 (d; $J=1,9$ Hz; 1H), 7,53 (d; $J=15,6$ Hz; 1H), 7,48 (d; $J=8,25$ Hz; 1H), 7,46 (d; $J=1,9$ Hz; 1H), 7,44 (d; $J=1,9$ Hz; 1H), 3,97 (s, 6H). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 187,8, 153,5, 149,4, 141,0, 135,2, 134,1, 133,3, 130,9, 129,6, 127,5, 123,2, 123,1, 110,7, 109,9, 56,14. EIMS: m/z (%) $[\text{M}+\bullet]$ 336 (55), (46), (100), (33), (10). $[\text{M}+\bullet]$ m/z 336 $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{O}_3$ [45]."

(E)-1-(3,4- dimetoxifenil) -3-(2,4,5-trimetoxifenil) prop-2-en-1-ona (CH-14)

Sólido amarelo, rendimento de 60%. IV: ν_{max} / cm^{-1} 3017, 1648, 1592, 1299, 1020. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 8,08 (d; $J=15,7$ Hz; 1H), 7,68 (d; $J=8,3$ e $1,9$ Hz; 1H), 7,62 (d; $J=1,9$ Hz; 1H), 7,53 (d; $J=15,6$ Hz; 1H), 7,48 (d; $J=8,25$ Hz; 1H), 7,46 (d; $J=1,9$ Hz; 1H), 7,48 (d; $J=15,7$ Hz; 1H), 7,13 (s; 1H), 6,93 (d; $J=8,3$ Hz; 1H), 6,53 (s; 1H) 3,97 (s; 6H), 3,94 (s; 3H), 3,91 (s; 6H). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 189,3, 154,5, 152,8, 152,3, 149,1, 143,3, 139,4, 131,9, 122,8, 120,1, 115,7, 111,6, 110,95, 109,9, 96,9, 56,6, 56,3, 56,0. EIMS: m/z (%) 358 $[\text{M}+\bullet]$ (4), 327 (100), 311 (14), 283 (5), 165 (6). $[\text{M}+\bullet]$ m/z 358 $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_6$.

4.2.2. Atividade antifúngica

As chalconas foram dissolvidas em Dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração de 1% e armazenados a 4°C. A inibição do crescimento micelial foi realizada por meio do teste de contato, as chalconas foram incorporadas ao meio de cultura PDA em uma concentração de 1mM. Um disco de micélio de 5mm foi adicionado ao centro das placas. O controle negativo foi realizado com DMSO a uma concentração de 1%, e para o controle positivo, o fungicida thiabendazol foi utilizado a 12,4 mM. As avaliações foram realizadas diariamente, até que o controle negativo atingisse o ponto máximo de crescimento. As placas foram incubadas no escuro a 28 °C±2. Os diâmetros dos micélios foram medidos, e as porcentagens de inibição de crescimento para cada derivado foram calculadas em comparação com o controle negativo. Os dados mostram média ± erro padrão da média (EP). O IC₅₀ foi determinado para as chalconas que inibiram acima de 50% do crescimento micelial a 1mM. Concentrações de 1 a 0,0625 mM foram testadas, e o IC₅₀ foi obtido por equação logarítmica. As análises foram processadas pelo software GraphPad Prism 8.0.1. Experimentos foram realizados em duplicata em três dias independentes.

4.2.2.1 Microscopia de fluorescência

Fragmentos de micélio foram cultivados em meio BDA e incubados em um agitador a 150 rpm a 28 °C por 24 horas. Após a incubação, o micélio foi tratado com CH0 em concentrações de 1X, 2X e 4X do IC₅₀; o controle negativo foi DMSO a uma concentração de 1%, e as células do controle positivo foram incubadas em 100 °C por 10 minutos e posteriormente incubadas por 12 horas nas mesmas condições descritas. Após a exposição, os micélios foram centrifugados a 3400 g por 5 minutos a 4 °C e corados com iodeto de propídio (15 µM) por 15 minutos na ausência de luz a 37 °C. Após a incubação, foram lavados três vezes com solução de PBS. Os micélios foram analisados no microscópio de fluorescência invertido Olympus IX81 com lente de 10X. Os experimentos foram realizados em três dias independentes.

4.2.3 Atividade antibacteriana

As cepas das bactérias *Acidovorax citrulli* CCRM 1.39 e CCRM 1.73 foram cultivadas em meio líquido YM (Yest malte) sob agitação orbital a 150 rpm a uma temperatura de 28 °C±2. O inóculo bacteriano foi padronizado em uma densidade óptica (DO) de 0,5 (λ 600nm), equivalente a 10⁸ UFC. Em cada poço, foram adicionados 100 µL do inóculo e 100 µL da solução de chalconas a uma concentração final de 1 mM. O controle positivo foi estreptomicina (500 µg.mL⁻¹) e o controle negativo 1% de DMSO. As placas foram incubadas com agitação orbital a 150 rpm e 28 °C±2 por 24 horas. A absorbância foi medida em λ 600 nm utilizando um espectrofotômetro leitor de microplacas modelo Synergy H1, BIOTEK. A atividade inibitória foi calculada em comparação com o controle negativo, e os dados foram expressos em média da porcentagem de inibição e ± erro padrão da média (SEM). Os experimentos foram realizados em triplicata em três dias independentes.

4.2.4 Atividade antiprotozoária

O isolado 9T de *Phytomonas serpens* foi obtido por doação da Coleção de Tripanossomatídeos da Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ. As formas de promastigotas de *P. serpens* foram cultivadas em meio de cultura Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina-estreptomicina, e subsequentemente incubadas em uma estufa B.O.D a 24 °C±2. Promastigotas de *Phytomonas serpens* (5 x 10⁶ células/mL) foram tratadas com as soluções de chalconas na concentração de 25µM. O controle negativo foi realizado com células não tratadas cultivadas em meio Schneider, e o controle positivo com células expostas a 10 µM de anfotericina B. As placas foram incubadas em uma estufa B.O.D a 24 ± 1 °C por 24 horas. A viabilidade celular foi determinada pelo método fluorimétrico de resazurina

(50 μ M). A fluorescência foi medida pelo leitor de microplacas espectrofotômetro modelo Synergy H1, BIOTEK, λ 560-590 (excitação/emissão) usando o programa Gen52.06.

Para as chalconas que mostraram inibição da viabilidade celular acima de 90%, a IC₅₀ foi determinada. Células foram tratadas com as chalconas em concentrações variando de 50 a 1,56 μ M, e as placas foram incubadas em estufa B.O.D a 24 °C $\pm$ 1 por 24 horas. Para determinar a viabilidade celular, foi utilizado o método de resazurina descrito anteriormente. Os dados foram processados usando o software GraphPad Prism 8.0.1. Os experimentos foram realizados em triplicata em três dias independentes.

4.3. Resultados e discussão

4.3.1 Síntese das estruturas das chalconas

Uma solução de cetona metoxilada (1,0 mmol) e aldeído aromático (1,0 mmol) em etanol (10 mL) foi adicionada gota a gota a uma solução agitada de NaOH (1,0 g) em água (12 mL), resfriada a 0 °C em um banho de gelo. A mistura reacional foi mantida à temperatura ambiente por 3 horas. A mistura reacional obtida foi mantida sob refrigeração por 12 horas, em seguida, filtrada a vácuo e recristalizada com etanol. O rendimento, ponto de fusão e dados espectrais dos compostos foram elucidados. As estruturas das chalconas estão listadas na Figura 1.

4.3.2 Avaliação antifúngica

A atividade antifúngica das chalconas foi avaliada pelo método de inibição do crescimento micelial e comparada ao controle negativo. Considerando três fungos avaliados, observou-se inibição em algum grau por uma ou mais moléculas. As chalconas CH0, CH1, CH2 e CH8 apresentaram melhores inibições do crescimento micelial (Tabela 1).

O fungo *C. gloeosporioides* foi o mais suscetível entre os fungos avaliados, a molécula CH0 promoveu taxa de inibição de (85,3%), a maior taxa de inibição observada, seguida por CH12 (76,5%), CH8 (76,3%), CH13 (63,6%) e CH1 (57,1%). Para o fungo *Sclerotium* sp., a maior taxa de inibição foi obtida com CH2 (77,6%), seguido por CH1 (61,0%). O fungo *M. phaseolina* foi o menos suscetível às moléculas testadas. No entanto, uma taxa de inibição de 56,2% foi observada com a chalcona CH8. Apenas as chalconas CH4 e CH14 foram completamente inativas para os três fungos testados.

Para compreender melhor a atividade antifúngica, a IC₅₀ das chalconas mais ativa foi calculada. Os valores estão apresentados na Tabela 2.

Os valores correspondem à média e $\pm$ erro padrão da média de três experimentos.

Neste trabalho, a chalcona CH0 mostrou alta atividade antifúngica sobre o fungo *C. gloeosporioides*, com IC₅₀ de 47,3 μ M equivalente a (9,8 μ g.mL⁻¹). A ação antifúngica da chalcona CH0 foi estudada anteriormente em outros fungos fitopatogênicos, como *Botrytis cinerea* e *Monilinia fructicola*, com valores de IC₅₀ de 43,9 e 48,5 μ g.mL⁻¹, respectivamente [24]. A atividade antimicrobiana da chalcona CH0 pode ser devido à presença de uma cetona reativa α , β -insaturada que pode se ligar ao grupo tiol de proteínas essenciais [6]. Em estudos anteriores, foram observados efeitos como uma redução de 100% no teor de ergosterol e interferência na síntese de ácidos graxos em cepas do fungo dermatófito *Trichophyton rubrum* tratadas com chalcona CH0 na concentração de CIM [30].

A chalcona CH2 apresentou um IC₅₀ de 110,4 μ M equivalente a 29,6 μ g.mL⁻¹ para o fungo *Sclerotium* sp. (Tabela 2). A adição de grupos metoxi ao anel A (CH2) aumentou a atividade antifúngica em 100% em comparação com a chalcona não modificada (CH0). No entanto, para todos os demais fungos, a combinação de dois grupos metoxi no anel A e a adição de grupos metoxi ao anel B resultou na perda de atividade antifúngica, como observado nas chalconas CH4 e CH14, que têm a mesma composição de grupos metoxi ligados ao anel A, mais adições de grupos metoxi ao anel B, indicando que os grupos metoxi ligados ao anel B reduziram a atividade antifúngica desses compostos. Uma estrutura análoga

à chalcona CH2, com grupos metoxi nas posições 2 e 5 no anel A e anel B não substituído, promoveu inibições de 100%, 69,27% e 85,02% a uma concentração de 250 μ M para os fungos *Phytophthora cinnamomi*, *Botrytis cinerea* e *Gibberella fujikuroi*, respectivamente [31].

Até o momento este é o primeiro relato de atividade antifúngica para a molécula CH1. As chalconas CH1 e CH8 têm um anel de furano não substituído no anel B e a adição de grupos metoxi no anel A nas posições 3 e 4 (CH1) e posição 4 (CH8). Ambas as estruturas mostraram boa atividade antifúngica, a molécula CH1 foi ativa para os fungos *Sclerotium* sp. e *C. gloeosporioides*, e CH8 para os fungos *M. phaseolina* e *C. gloeosporioides*. Nossos dados corroboram com um trabalho anterior que mostrou que a presença de um anel de furano é importante para melhorar a atividade antifúngica, já que a estrutura CH8 promoveu taxas de inibição de 100%, 78,97%, 73,61%, 54,85% e 83,51% para os fungos *Rhizoctonia solani*, *Bipolaris maydis*, *Phytophthora infestans*, *Gibberella zeae* e *Sclerotinia sclerotiorum* a uma concentração de 200 mg.L⁻¹, equivalente a 200 μ g.mL⁻¹, os valores de IC₅₀ para os fungos foram *Rhizoctonia solani* 4,02 mg.L⁻¹, *Bipolaris maydis* 38,88 mg.L⁻¹, *Gibberella zeae* 42,03 mg.L⁻¹ e *Sclerotinia sclerotiorum* 45,77 mg.L⁻¹ [32].

Outra chalcona contendo anel de furano no anel B e adições de átomos de cloro nas posições 2 e 4 do anel A promoveu taxas de inibição de 100% para *Rhizoctonia solani* e 60% a 80% para os fungos *Bipolaris maydis*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Magnaporthe oryzae*, *Gibberella zeae* e *Botrytis cinerea* [23]. Além disso, essas moléculas mostraram causar encurtamento e deformação no micélio de *M. oryzae*. Em outro estudo, essa estrutura exibiu potente atividade antifúngica sobre o fungo *Rhizoctonia solani*, com um IC₅₀ de 1,20 mg.L⁻¹.

A chalcona CH1 inibiu *Sclerotium* sp. e *C. gloeosporioides*, mas exibiu inatividade sobre *M. phaseolina*. Por outro lado, a chalcona CH8 foi inativa sobre *Sclerotium* sp., mas mostrou atividade sobre os fungos *M. phaseolina* e *C. gloeosporioides*. Isso sugere que a mesma molécula pode exercer efeitos distintos em várias espécies de fungos. Esses achados estão alinhados com observações feitas por [32], a estrutura de chalcona codificada como III3 contendo adições de cloro ao anel A nas posições 2 e 4 e anel furano no anel B apresentou alto potencial antifúngico sobre os fungos *Rhizoctonia solani*, *Bipolaris maydis*, *Gibberella zeae* e *Sclerotinia sclerotiorum*, no entanto, III3 apresentou inatividade sobre o fungo *Phytophthora infestans*, consistente com as observações neste estudo [32].

4.3.2.1 Microscopia de fluorescência de *Colletotrichum gloeosporioides*

O efeito do CH0 na integridade da membrana plasmática de *C. gloeosporioides* foi avaliado usando o iodeto de propídio (PI), um marcador de morte celular que emite fluorescência vermelha ao se ligar ao DNA de células com membrana plasmática danificada. O CH0 promoveu a incorporação de (PI) nas hifas após o tratamento com concentrações equivalentes a 1X, 2X e 4X a concentração de IC₅₀ (Fig. 2). Isso indica que um dos mecanismos de morte é distúrbio na membrana plasmática do fungo. A ruptura da integridade da membrana plasmática em hifas, já foi observada anteriormente no fungo fitopatogênico *Phomopsis* sp. exposto à chalcona com atividade antifúngica [33].

4.3.3 Atividade antibacteriana

A maioria das chalconas testadas mostrou atividade inibitória baixa ou nula no crescimento de duas cepas da bactéria gram-negativa *Acidovorax citrulli* (Tabela 3). As chalconas CH6 e CH7 apresentaram atividade antibacteriana moderada, as demais chalconas obtiveram taxas de inibição abaixo de 30% ou não tiveram efeito nas cepas estudadas.

Tanto em bactérias gram-positivas quanto em gram-negativas, a introdução de grupos metoxi em ambos os anéis aromáticos reduziu a atividade antibacteriana das chalconas, com uma concentração inibitória mínima (CMI) superior a 2.000 μ g.mL⁻¹ em comparação com chalconas que apresentavam grupos hidroxila e prenil em sua estrutura [34]. De acordo com os autores, a presença de um grupo hidroxila na posição C4 ou C2 no anel B, bem como a

presença de prenilação, que aumenta a lipofilicidade, são cruciais para a atividade antibacteriana de chalconas.

Uma chalcona contendo um grupo metoxi na posição 4 do anel A e um grupo hidroxila na posição C4 do anel B exibiu atividade antimicrobiana sobre a levedura *Rhodotorula rubra* e a bactéria *Staphylococcus aureus*. No entanto, a substituição do grupo hidroxila por átomos de halogênio, como Cl, Br, grupo nitro (NO₂), grupo etoxi (OCH₂CH₃) ou substituintes alifáticos como CH₃, CH₂, CH₃, resultou na perda de atividade antimicrobiana [35].

Em outros estudos, a hidroxichalcona (T9A) apresentou valores de CMI mais baixos sobre a bactéria gram-negativa *Xanthomonas citri* e a gram-positiva *Bacillus subtilis* em comparação com a hidroxi-metoxichalcona (BC1). No entanto, apenas BC1 induziu a perda de permeabilidade da membrana em *Bacillus subtilis*, sugerindo que as chalconas podem afetar de maneira diferente as bactérias gram-negativas e gram-positivas. Em *X. citri*, BC1 (2XCMI) levou a uma redução nos níveis intracelulares de ATP [26]. Neste estudo, uma investigação do metabolismo energético bacteriano não foi conduzida, destacando a necessidade de análises futuras.

4.3.4 Atividade antiprotozoária

Todas as chalconas mostraram atividade antiprotozoária sobre *Phytomonas serpens*, com percentagens de inibição variando de 48,01% a 98,91% (Fig. 3). Entre as chalconas testadas, CH₂, CH₃, CH₅ e CH₁₄ foram as mais ativas, com taxas de inibição de viabilidade acima de 90% dos promastigotas de *P. serpens*.

Para confirmar o efeito antiprotozoário, foram calculados os valores de IC₅₀ das chalconas mais ativas, variando de 0,98 a 10,25 µM (Tabela 4).

A chalcona CH₂ apresentou o valor mais baixo de IC₅₀, seguido por CH₃, CH₅ e CH₁₄. Este é o primeiro relato de atividade antiprotozoária para as moléculas CH₂, CH₃ e CH₅. A atividade antiprotozoária de chalconas sobre tripanossomatídeos foi documentada na literatura [27, 29, 36]. A chalcona contendo grupos metoxi em um ou ambos os anéis aromáticos reduziram a viabilidade celular em promastigotas de *P. serpens*, com valores de IC₅₀ de 3,47 µM e 4,79 µM para as moléculas C₃ e C₇, respectivamente [29].

De acordo com os resultados, a atividade antiprotozoária não está apenas associada à presença de 3,4 metoxi no anel A, mas também à sua combinação com o anel B composto pelos seguintes grupos: benzaldeído não substituído (CH₂), tiofeno (CH₃), dimetilamino (CH₅) e benzaldeído trimetoxilado (CH₁₄). A chalcona CH₁₄ contém grupos metoxi nas posições 3,4 do anel A e 2,4,5 do anel B, esta estrutura inibiu a viabilidade celular com uma taxa de 97,36% e IC₅₀ de 3,11 µM. Estudos envolvendo chalconas metoxiladas têm constatado que a exposição a essas moléculas induziu alterações estruturais em mitocôndrias, extensa vacuolização e encolhimento celular e nuclear em *Leishmania (Viannia) braziliensis* [37].

4.4. Conclusões

As chalconas CH₀, CH₁, CH₂ e CH₈ demonstraram alta atividade antifúngica sobre *Sclerotium* sp., *Macrophomina phaseolina* e *Colletotrichum gloeosporioides*. A chalcona não modificada CH₀ foi capaz de permeabilizar as hifas do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, o que indica que a CH₀ tem um efeito na permeabilidade da membrana plasmática do fungo. As chalconas série apresentaram baixo ou nenhum potencial antibacteriano para as cepas de *Acidovorax citrulli* CCRM 1.39 e CCRM 1.73. O protozoário *Phytomonas serpens* mostrou-se altamente sensível às chalconas metoxiladas, sendo as chalconas mais ativas CH₂, CH₃, CH₅ e CH₁₄.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio e colaboração da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia (INCT/CNPq, projeto: 465357/2014-8), Universidade Federal de Sergipe (UFS), Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade (PPGAGRI), Fundação Oswaldo Cruz, RJ (FIOCRUZ), Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e Centro Analítico da Universidade Federal do Amazonas (CA/UFAM) pelas análises espectroscópicas.

Declarações

Conflitos de interesse: Os autores declaram que não há interesses financeiros concorrentes.

4.5. Referências Bibliográficas

1. Savary S, Teng PS, Willocquet L, Nutter FW (2006) Quantification and modeling of crop losses: A review of purposes. *Annu Rev Phytopathol* 44:89–112. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143342>
2. Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J, Foster GD (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 13(4):414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
3. Majeed A (2018) Application of Agrochemicals in Agriculture: Benefits, Risks and Responsibility of Stakeholders. *J Food Sci Toxicol* 2(1):1–2.
4. Díaz-Tielas C, Graña E, Reigosa MJ, Sánchez-Moreiras AM (2016) Biological Activities and Novel Applications of Chalcones. *Planta Daninha* 34(3):607–616. <https://doi.org/10.1590/s0100-83582016340300022>
5. Farooq S, Ngaini Z (2019) Recent Synthetic Methodologies for Chalcone Synthesis (2013-2018). *Curr Organocatalysis* 6:(3)184–192. <https://doi.org/10.2174/2213337206666190306155140>
6. Yazdan SK, Sagar DV, Shaik AB (2015) Organic & Medicinal Chemistry Chemical and Biological Potentials of Chalcones: A Review. *Org Med Chem Int J* 1(1):1–9.
7. Blanco VR, Nascimento-Júnior NM (2017) Leishmaniose: Aspectos Gerais Relacionados com a Doença, o Ciclo do Parasita, Fármacos Disponíveis, Novos Protótipos e Vacinas. *Rev Virtual Quim* 9(3):861–876. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170055>
8. Cabrera M, Cerecetto H, González M (2016) New hybrid bromopyridine-chalcones as in vivo phase II enzyme inducers: potential chemopreventive agents. *Medchemcomm* 7:2395–2409. <https://doi.org/10.1039/c6md00456c>
9. Duran N, Polat MF, Aktas DA, Alagoz MA, Ay E, Cimen F, Tek E, Anil B, Burmaoglu

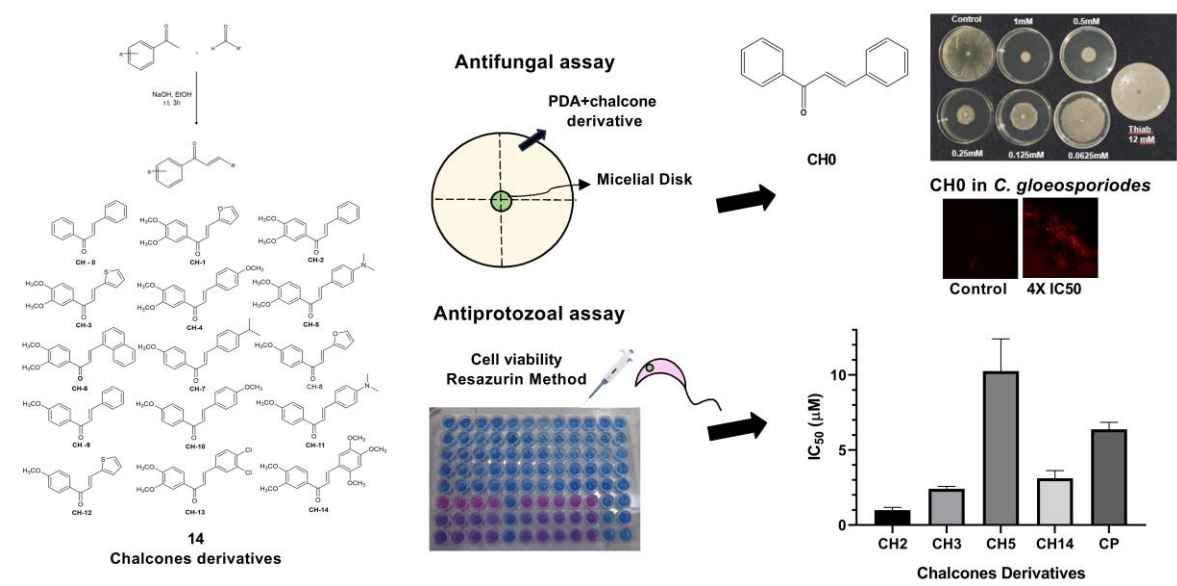
- S, Algul O (2021) New chalcone derivatives as effective against SARS-CoV-2 agent. *Int J Clin Pract* 75:1–23. <https://doi.org/10.1111/ijcp.14846>
10. Ur Rashid H, Xu Y, Ahmad N, Muhammad Y, Wang L (2019) Promising anti-inflammatory effects of chalcones via inhibition of cyclooxygenase, prostaglandin E 2 , inducible NO synthase and nuclear factor κ b activities. *Bioorg Chem* 87:335–365. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.03.033>
 11. Targanski SK, Sousa JR, de Pádua GMS, de Sousa JM, Vieira LCC, Soares MA Larvicidal activity of substituted chalcones against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and non-target organisms. *Pest Manag Sci* 77:325–334. <https://doi.org/10.1002/ps.6021>
 12. Konduru NK, Dey S, Sajid M, Owais M, Ahmed N (2013) Synthesis and antibacterial and antifungal evaluation of some chalcone based sulfones and bisulfones. *Eur J Med Chem* 59:23–30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.09.004>
 13. Okolo EN, Ugwu DI, Ezema BE, Ndefo JC, Eze FU, Ezema CG, Ezugwu JA, Ujam OT. (2021) New chalcone derivatives as potential antimicrobial and antioxidant agent. *Sci Rep* 11:1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01292-5>
 14. Pola S, Banoth KK, Sankaranarayanan M, Ummani R, Garlapati A (2020) Design, synthesis, in silico studies, and evaluation of novel chalcones and their pyrazoline derivatives for antibacterial and antitubercular activities. *Med Chem Res* 29:1819–1835. <https://doi.org/10.1007/s00044-020-02602-8>
 15. Hernández-Rivera JL, Espinoza-Hicks JC, Chacón-Vargas KF, Carrillo-Campos J, Sánchez-Torres LE, Camacho-Dávila AA (2022) Synthesis, characterization and evaluation of prenylated chalcones ethers as promising antileishmanial compounds. *Mol Divers* 27:2073–2092. <https://doi.org/10.1007/s11030-022-10542-1>
 16. Ali AM, Salah H, Gad MA, Youssef MAM, Elkanzi NAA (2022) Design, Synthesis, and SAR Studies of Some Novel Chalcone Derivatives for Potential Insecticidal Bioefficacy Screening on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *ACS Omega* 7:40091–40097. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c04814>
 17. Gomes AS, Oliveira SCC, Mendonça IS, da Silva CC, Guiotti NX, Melo LR, Silva WA, Borghetti F (2018) Potential herbicidal effect of synthetic chalcones on the initial growth of sesame, *Sesamum indicum* L., and brachiaria, *Urochloa decumbens* (Stapf) R. D. Webster. *Iheringia - Ser Bot* 73(1):46–52. <https://doi.org/10.21826/2446-8231201873106>
 18. Guo T, Xia R, Chen M, He J, Su S, Liu L, Li X, Xue W (2019) Biological activity evaluation and action mechanism of chalcone derivatives containing thiophene sulfonate. *RSC Adv* 9:24942–24950. <https://doi.org/10.1039/c9ra05349b>

19. Pankaj, Rana VS, Kaushik P, Kumar H, Devaraja KP, Gowda A, Shakil NA (2021) Bioefficacy evaluation of chalcone derivatives against *Meloidogyne graminicola* infecting rice, *Oryza sativa* L. J Environ Sci Heal - Part B Pestic Food Contam Agric Wastes 56(9):801–808. <https://doi.org/10.1080/03601234.2021.1956249>
20. Yadav DK, Kaushik P, Tripathi KP, Rana VS, Yeasin M, Kamil D, Khatri PD, Shakil NA (2022) Bioefficacy evaluation of ferrocenyl chalcones against *Meloidogyne incognita* and *Sclerotium rolfsii* infestation in tomato. J Environ Sci Heal - Part B Pestic Food Contam Agric Wastes, 1–9. <https://doi.org/10.1080/03601234.2022.2042154>
21. Wang YH, Jiang SC, Chen Y, Guo T, Xia RJ, Tang X, He M, Xue W (2019) Synthesis and antibacterial activity of novel chalcone derivatives bearing a coumarin moiety. Chem Pap 73:2493–2500. <https://doi.org/10.1007/s11696-019-00802-0>
22. Xia R, Guo T, He J, Chen M, Su S, Jiang S, Tang X, Chen Y, Xue W (2019) Antimicrobial evaluation and action mechanism of chalcone derivatives containing quinoxaline moiety. Monatshefte fur Chemie 150:1325–1334. <https://doi.org/10.1007/s00706-019-02449-9>
23. Chen H, Wang X, Jin H, Liu R, Hou T (2016) Discovery of the molecular mechanisms of the novel chalcone-based *Magnaporthe oryzae* inhibitor C1 using transcriptomic profiling and co-expression network analysis. Springerplus 5:1851 <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3385-9>
24. Mellado M, Espinoza L, Madrid A, Mella J, Chávez-Weisser E, Diaz K, Cuellar M (2020) Design, synthesis, antifungal activity, and structure–activity relationship studies of chalcones and hybrid dihydrochromane–chalcones. Mol Divers 24:603–615. <https://doi.org/10.1007/s11030-019-09967-y>
25. Zhou Q, Tang X, Chen S, Zhan W, Hu D, Zhou R, Sun N, Wu Y, Xue W (2022) Design, Synthesis, and Antifungal Activity of Novel Chalcone Derivatives Containing a Piperazine Fragment. J Agric Food Chem 70:1029–1036. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c05933>
26. Morão LG, Lorenzoni ASG, Chakraborty P, Ayusso GM, Cavalca LB, Santos MB, Marques BC, Dilarri G, Zamuner C, Regasini LO, Ferreira H, Scheffers DJ (2020) Investigating the Modes of Action of the Antimicrobial Chalcones BC1 and T9A. molecules 25:1–14. <https://doi.org/doi:10.3390/molecules25204596>
27. de Mello TFP, Bitencourt HR, Pedroso RB, Aristides SMA, Lonardoni MVC, Silveira TGV (2014) Leishmanicidal activity of synthetic chalcones in *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Exp Parasitol 136:27–34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2013.11.003>

28. Espinoza-Hicks JC, Chacón-Vargas KF, Hernández-Rivera JL, Nogueda-Torres B, Tamariz J, Sánchez-Torres LE, Camacho-Dávila A (2019) Novel prenyloxy chalcones as potential leishmanicidal and trypanocidal agents: Design, synthesis and evaluation. *Eur J Med Chem* 167:402–413. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.02.028>
29. Souza GB, Santos TAC, Silva APS, Barreiros ALBS, Nardelli, VB, Siqueira IB, Dolabella SS, Costa EV, Alves PB, Scher R, Fernandes RPM (2022) Synthesis of chalcone derivatives by Claisen-Schmidt condensation and in vitro analyses of their antiprotozoal activities. *Nat Prod Res* 0:1–8. <https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2140337>
30. Bitencourt TA, Komoto TT, Massaroto BG, Miranda CES, Beleboni RO, Marins M, Fachin AL (2013) Trans-chalcone and quercetin down-regulate fatty acid synthase gene expression and reduce ergosterol content in the human pathogenic dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *BMC Complement Altern Med* 13:229. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-229>
31. Vásquez-Martínez YA, Osorio ME, San Martín DA, Carvajal MA, Vergara AP, Sanchez E, Raimondi M, Zacchino SA, Mascayano C, Torrent C, Cabezas F, Mejias S, Montoya M, Cortez-San Martín M (2019) Antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant activities of polyoxygenated chalcones. *J Braz Chem Soc* 30(2):286–304. <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20180177>
32. Zhang H, Jin H, Ji LZ, Tao K, Liu W, Zhao HY, Hou TP (2011) Design, synthesis, and bioactivities screening of a diaryl ketone-inspired pesticide molecular library as derived from natural products. *Chem Biol Drug Des* 78:94–100. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2011.01082.x>
33. Zhan W, Zhou R, Mao P, Yuan C, Zhang T, Liu Y, Tian J, Wang H, Xue W (2023) Synthesis, antifungal activity and mechanism of action of novel chalcone derivatives containing 1,2,4-triazolo-[3,4-b]-1,3,4-thiadiazole. *Mol Divers*. <https://doi.org/10.1007/s11030-022-10593-4>
34. Ávila HP, Smânia E de FA, Monache FD, Smânia AJ (2008) Structure–activity relationship of antibacterial chalcones. *Bioorg Med Chem* 16:9790–9794. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.09.064>
35. Stompor M, Zarowska B (2016) Antimicrobial activity of xanthohumol and its selected structural analogues. *Molecules* 21:608. <https://doi.org/10.3390/molecules21050608>
36. Ortalli M, Ilari A, Colotti G, De Ionna I, Battista T, Bisi A, Gobbi S, Rampa A, Di Martino RMC, Gentilomi GA, Varani S, Belluti F (2018) Identification of chalcone-

- based antileishmanial agents targeting trypanothione reductase. *Eur J Med Chem* 152:527–541. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.04.057>
37. de Mello TFP, Cardoso BM, Bitencourt HR, Donatti L, Aristides SMA, Lonardoni MVC, Silveira TGV (2016) Ultrastructural and morphological changes in *Leishmania (Viannia) braziliensis* treated with synthetic chalcones. *Exp Parasitol* 160:23–30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2015.11.005>
 38. Ritter M, Martins RM, Rosa SA, Malavolta JL, Lund RG, Flores AFC, Pereira CMP (2015) Green synthesis of chalcones and microbiological evaluation. *J Braz Chem Soc* 26(6):1201–1210. <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20150084>
 39. Das BC, Mariappan G, Saha S, Bhowmik D, Chiranjib (2010) Anthelmintic and anti-microbial activity of some novel chalcone derivatives. *J Chem Pharm Res* 2(1):113–120
 40. Tiwari MK, Yadav L, Kumar Shyamlal BR, Chaudhary S (2019) Weak Bases-Mediated Modified Favorskii Reaction-Type Direct Alkynylation/(E)-Alkenylation: A Unified Rapid Access to α,β -Unsaturated Ketones and Propargyl Alcohols. *Asian J Org Chem* <http://dx.doi.org/10.1002/ajoc.201900601>
 41. Singh JV, Sharma S, Rahar S (2015) Synthesis and spermicidal activity of substituted (E)-3-(aryl/heteroaryl)-1-phenylprop-2-en-1-ones. *Der Pharma Chem* 7:93–103.
 42. Wu J, Li J, Cai Y, Pan Y, Ye F, Zhang Y, Zhao Y, Yang S, Li X, Liang G (2011) Evaluation and discovery of novel synthetic chalcone derivatives as anti-inflammatory agents. *J Med Chem* 54:8110–8123. <https://doi.org/10.1021/jm200946h>
 43. Jin QH, Chen HH, Chen WB, Fu ZY, Guan LP, Jiang HY (2020) Synthesis and biological effects of naphthalene-chalcone derivatives. *Med Chem Res* 29:877–886. <https://doi.org/10.1007/s00044-020-02525-4>
 44. Zheng CJ, Jiang SM, Chen ZH, Ye BJ, Piao HR (2011) Synthesis and anti-bacterial activity of some heterocyclic chalcone derivatives bearing thiofuran, furan, and quinoline moieties. *Arch Pharm (Weinheim)* 344:689–695. <https://doi.org/10.1002/ardp.201100005>
 45. Kumar R, Sharma P, Shard A, Tewary DK, Naadda G, Sinha AK (2012) Chalcones as promising pesticidal agents against diamondback moth (*Plutella xylostella*): Microwave-assisted synthesis and structure-activity relationship. *Med Chem Res* 21:922–931. <https://doi.org/10.1007/s00044-011-9602-8>

Resumo gráfico



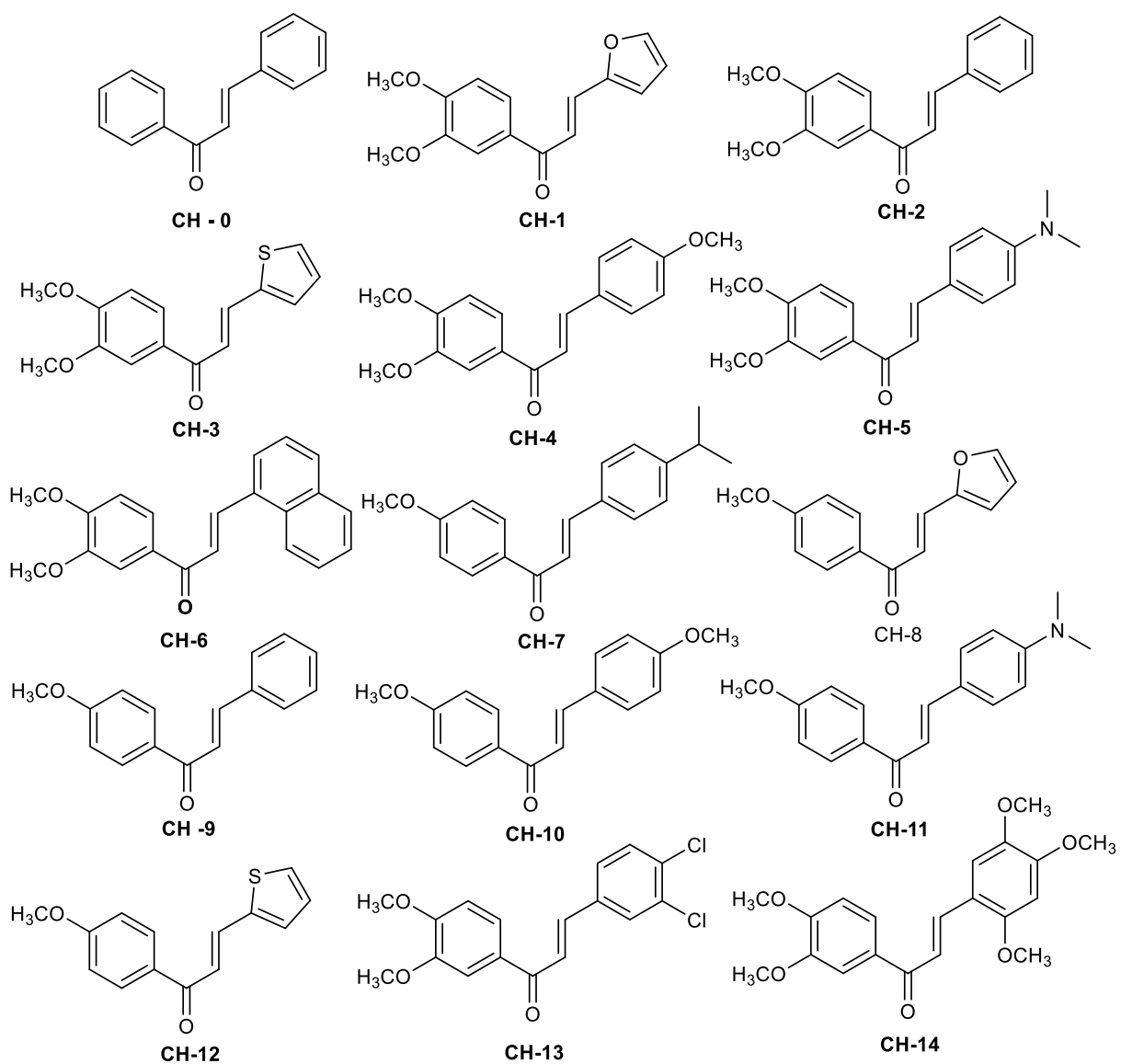


Figura 1. Estruturas químicas das chalconas.

Tabela 1. Inibição do crescimento micelial (%) dos fungos *Sclerotium* sp, *Macrophomina phaseolina* e *Colletotrichum gloeosporioides*, expostos às chalconas na concentração de 1mM.

Inibição do Crescimento micelial (%)			
Chalconas	<i>Sclerotium</i> sp	<i>M. phaseolina</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
CH0	36,85 ± 3,058	48,00 ± 7,70	85,31 ± 2,395
CH1	61,02 ± 1,782	24,98 ± 2,685	57,08 ± 1,458
CH2	77,66 ± 0,353	10,16 ± 0,165	46,87 ± 3,542
CH3	31,61 ± 0,385	<i>I</i>	24,30 ± 0,490
CH4	<i>I</i>	<i>I</i>	<i>I</i>
CH5	<i>I</i>	9,30 ± 1,000	<i>I</i>
CH6	19,03 ± 2,718	<i>I</i>	33,18 ± 4,815
CH7	<i>I</i>	<i>I</i>	44,59 ± 10,905
CH8	24,17 ± 1,758	56,18 ± 0,485	76,36 ± 3,310
CH9	19,90 ± 3,763	12,15 ± 2,850	<i>I</i>
CH10	<i>I</i>	<i>I</i>	40,22 ± 3,385
CH11	<i>I</i>	<i>I</i>	37,66 ± 4,682
CH12	47,82 ± 3,820	<i>I</i>	76,50 ± 0,1667
CH13	31,60 ± 5,637	<i>I</i>	63,64 ± 0,105
CH14	<i>I</i>	<i>I</i>	<i>I</i>
Thiab 0.5%	<i>I</i>	97,61 ± 1,055	100,00 ± 0,00

I= Composto inativo

Os valores correspondem à média e ± erro padrão da média (ER) de três experimentos.

Tabela 2. Concentração inibitória (IC₅₀) das chalconas ativas sobre fungos *Sclerotium* sp, *Macrophomina phaseolina* e *Colletotrichum gloeosporioides*.

Chalconas	IC ₅₀ (μM) 24 h		
	<i>Sclerotium</i> sp	<i>M. phaseolina</i>	<i>C.gloeosporioides</i>
CH0	<i>u</i>	<i>u</i>	47,31 ± 0,745
CH1	127,5 ± 3,40	<i>u</i>	446,60 ± 27,2
CH2	110,4 ± 4,85	<i>u</i>	<i>u</i>
CH8	<i>u</i>	117,7±3,80	131,05 ± 0,650
CH12	<i>u</i>	<i>u</i>	238,30 ± 6,7
CH13	<i>u</i>	<i>u</i>	193,10 ± 14,3

u= Não determinado

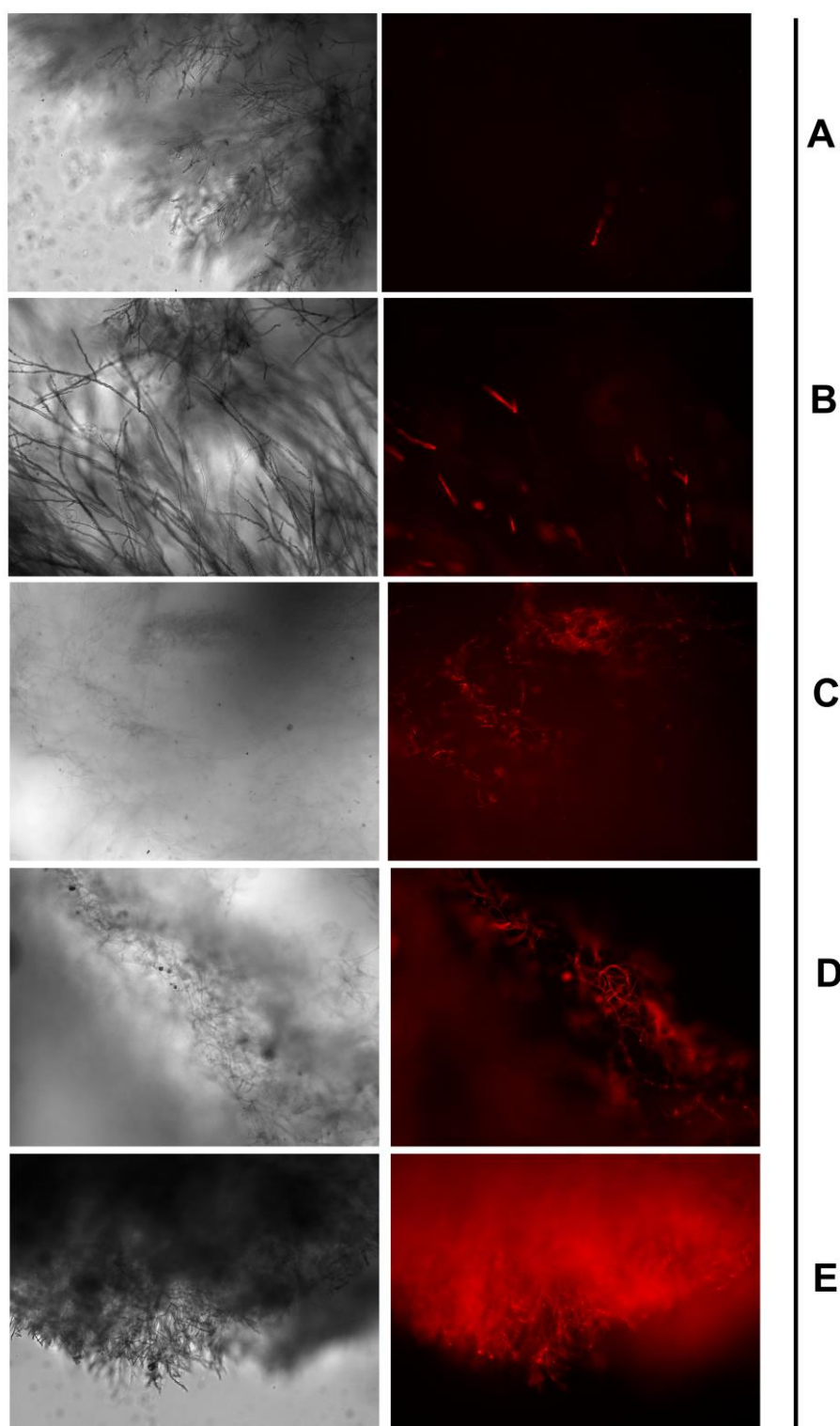


Figura 2. Microscopia de fluorescência de hifas de *Colletotrichum gloeosporioides*. Fragmentos miceliais foram cultivados por 24 horas e expostos à CH0 por 12 horas. (A) Controle negativo: micélio tratado com 1% de DMSO, (B) 1X IC₅₀, (C) 2X IC₅₀, (D) 4X IC₅₀ e (E) controle positivo: células expostas a 100 °C/10 min. As imagens foram adquiridas usando microscopia de campo claro combinada com fluorescência em uma objetiva de 10X.

Tabela 3. Taxas de inibição do crescimento bacteriano de *Acidovorax citrulli* cepas CCRM 1.39 e CCRM 1.73 expostas às chalconas na concentração de 1mM.

Inibição de Crescimento (%) 1Mm		
Chalconas	1.39	1.73
CH0	<i>I</i>	<i>I</i>
CH1	<i>I</i>	<i>I</i>
CH2	<i>I</i>	<i>I</i>
CH3	<i>I</i>	<i>I</i>
CH4	<i>I</i>	<i>I</i>
CH5	<i>I</i>	<i>I</i>
CH6	11,1±0,72	46,5±3,71
CH7	<i>I</i>	41,2± 1,83
CH8	<i>I</i>	<i>I</i>
CH9	<i>I</i>	17,1±2,15
CH10	<i>I</i>	<i>I</i>
CH11	17,1±2,31	27,3±0,432
CH12	<i>I</i>	<i>I</i>
CH13	<i>I</i>	<i>I</i>
CH14	<i>I</i>	<i>I</i>
Estreptomicina 500µg.mL ⁻¹	80,060±0,99	77,75±3,39

i = Composto inativo

Os valores correspondem à média e ao ± erro padrão da média (ER) de três experimentos.

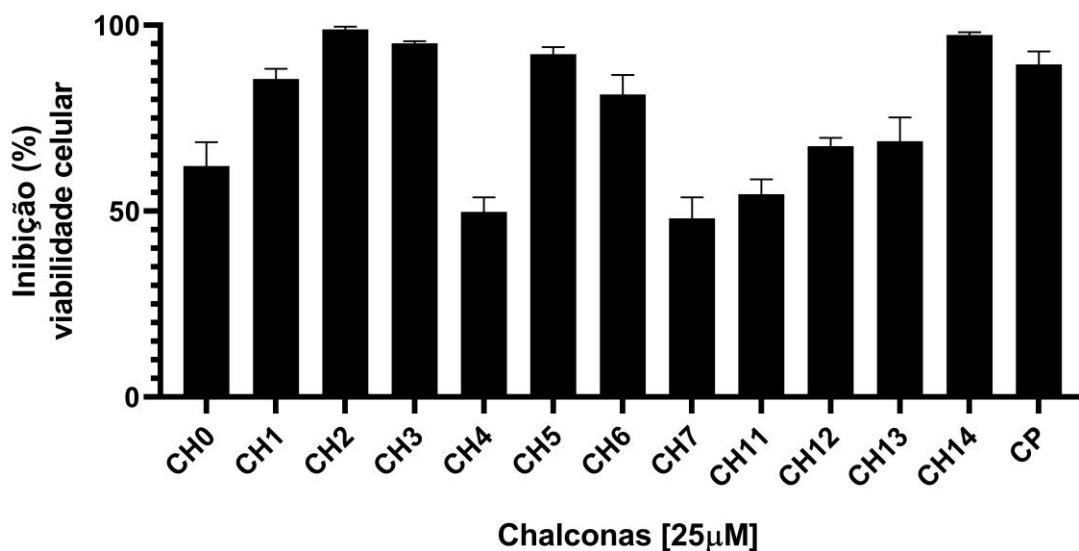


Figura 3. Seleção das chalconas com atividade antiprotozoária em *Phytomonas serpens*. Promastigotas a 5×10^6 células/mL foram cultivadas na presença das chalconas na concentração de $25 \mu\text{M}$. Anfotericina B a $20 \mu\text{M}$ foi usada como controle positivo (CP) e células não tratadas como controle negativo. A viabilidade celular foi determinada pelo método de Resazurina após 24 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata com três experimentos independentes. Os dados mostram a média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

Tabela 4. Concentração inibitória (IC₅₀) das chalconas ativas sobre *Phytomonas serpens*.

Chalconas	IC ₅₀ (μM±SEM)
CH2	0,989 ± 0,111
CH3	2,409 ± 0,096
CH5	10,257 ± 1,236
CH14	3,114 ± 0,294
Anfotericina B	6,381 ± 0,264

5. ARTIGO 2

EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia gracilis* E DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS TIMOL E CARVACROL NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO, FORMAÇÃO DE BIOFILME, MOTILIDADE E NA PERMEABILIDADE DA MEMBRANA DE *Acidovorax citrulli*

Periódico a ser submetido: **Pesticide Biochemistry and Physiology**

RESUMO

Acidovorax citrulli é uma bactéria gram-negativa que causa a doença mancha aquosa dos frutos em culturas de cucurbitáceas. Esta doença é de alto poder destrutivo e até o momento não existem materiais resistentes. Os óleos essenciais (OEs) são misturas voláteis complexas com caráter oleoso e odorífero, formados principalmente por monoterpenos. Os OEs de *Lippia gracilis* possuem os monoterpenos timol e carvacrol como principais constituintes. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antimicrobiano dos OEs de sete acessos de *Lippia gracilis* e seus componentes majoritários timol e carvacrol em *Acidovorax citrulli*. Foi determinada a CMI e CMB para os OEs, timol e carvacrol e seus efeitos no crescimento, formação do biofilme, permeabilidade da membrana e motilidade bacteriana. O inóculo foi crescido em meio LB até a D.O de 0,5 e exposto às concentrações que variaram de 1.000 a 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Todos os OEs apresentaram inibições acima de 97,3% na concentração de 1.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As menores CMIs foram OE LGRA 106 (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), timol e carvacrol (250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). O OE LGRA106, timol e carvacrol na concentração 2XCMI e 1XCMI reduziram o crescimento significativamente a partir de 30 min. O timol inibiu 100% da formação de biofilme na CMI. Tratamento com as moléculas na CMIs resultou no aumento da permeabilidade da membrana após exposição de 5 min. A motilidade foi significativamente reduzida na concentração de $\frac{1}{2}$ e CMI do timol e carvacrol. O uso de óleos essenciais e seus compostos majoritários podem ser alternativas promissoras para estudos para o controle de *Acidovorax citrulli*.

Palavras-chave: Monoterpenos, Metabólitos secundários, Bacteriose, Controle, Cucurbitáceas, Compostos fenólicos

EFFECT OF THE ESSENTIAL OIL FROM *Lippia gracilis* AND ITS MAJOR COMPOUNDS THYMOL AND CARVACROL ON THE INHIBITION OF GROWTH, BIOFILM FORMATION, MOTILITY, AND MEMBRANE PERMEABILITY OF *Acidovorax citrulli*

ABSTRACT

Acidovorax citrulli is a gram-negative bacterium that causes bacterial fruit blotch disease in cucurbit crops. This disease is highly destructive, and, thus far, no resistant materials have been identified. Essential oils (EOs) are complex volatile mixtures with an oily and odorous character, primarily composed of monoterpenes. The EOs from *Lippia gracilis* contain the monoterpenes thymol and carvacrol as their main constituents. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial potential of EOs from seven *Lippia gracilis* accessions and their major components, thymol and carvacrol, against *Acidovorax citrulli*. MIC and MBC were determined for the EOs, thymol, and carvacrol, along with their effects on bacterial growth, biofilm formation, membrane permeability and bacterial motility. The inoculum was grown in LB medium until reaching OD 0.5 and exposed to concentrations ranging from 1.000 to 62.5 µg/mL. All EOs exhibited inhibitions above 97.3% at the concentration of 1.000 µg/mL. The lowest MICs were OE LGRA 106 (500 µg/mL), thymol, and carvacrol (250 µg/mL). OE LGRA 106, thymol, and carvacrol at 2X MIC and 1X MIC significantly reduced growth after 30 minutes. Thymol inhibited 100% of biofilm formation at MIC. Treatment with the molecules at MICs resulted in increased membrane permeability after 5 minutes of exposure. Motility was significantly reduced to ½ and MIC concentrations of thymol and carvacrol. The use of essential oils and their major compounds may serve as promising alternatives for controlling *Acidovorax citrulli*.

Key-words: Monoterpenes, Secondary metabolites, Bacteriosis, control, Cucurbits, Phenolic compounds

5.1. Introdução

Acidovorax citrulli é uma bactéria que pertence à classe β proteobactéria, ordem Burkholderiales, família Comamonadaceae, gênero *Acidovorax*, espécie *citrulli* (Burdman & Walcott, 2012). São fitobactérias gram-negativas aeróbicas, bastonetes com dimensões de 0,5 a 1,7 μm e um flagelo polar de 5 μm (Schaad *et al.*, 1978). Essa bactéria em cucurbitáceas como melão (*Cucumis melo*) e melancia (*Citrullus lanatus*) causa a doença denominada mancha aquosa dos frutos (MBF). Essa doença em regiões produtoras tem alto potencial destrutivo (Burdman & Walcott, 2012).

Em 2024 *A. citrulli* permaneceu categorizada na lista A1 de pragas quarentenárias da European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO, 2024), devido à sua importância econômica e social das cucurbitáceas. Não existem materiais genéticos comerciais resistentes à *A. citrulli*, a principal medida de controle é o uso de sementes livres do patógeno que é a principal fonte de inóculo para disseminação da doença. Para o tratamento de sementes são utilizados antibióticos como estreptomicina, kasugamicina e oxicloreto de cobre (Assunção *et al.*, 2019).

Doenças bacterianas em plantas são de difícil controle e a depender da intensidade das doenças pode ser inviável o uso de produtos cúpricos. Esse é o tratamento mais comumente utilizado, no entanto, o uso contínuo resulta em populações de patógenos resistentes, culturas com resíduos, efeitos indiretos e diretos na saúde humana e na natureza (Duman & Soyulu, 2019). Fatores como o alto custo com aplicações contínuas de pesticidas, ocorrência de populações resistentes, restrições internacionais, além da questão ambiental levaram a busca de alternativas de controle ecológicos, intensificaram-se então estudos do potencial bactericida de produtos derivados de plantas e suas possíveis aplicações na agricultura (Bozkurt *et al.*, 2020).

Os óleos essenciais (OEs) são misturas complexas, voláteis e semivoláteis com caráter odorífero, produzidas pelo metabolismo secundário das plantas. São obtidos por hidrodestilação, destilação a seco ou a vapor, entre outros métodos. A composição química dos OEs varia de acordo com fatores intrínsecos (sexuais, sazonais e variações genéticas e ontogenéticos) e externos (propriedades ecológicas e ambientais) (Kachur & Suntres, 2020). Os OEs têm sido amplamente estudados para diversas atividades biológicas, já foram documentadas atividades como inseticida (Oyediji *et al.*, 2020), fungicida (Hou *et al.*, 2020), nematocida (D'addabblo *et al.*, 2021), larvicida (Pandiyani *et al.*, 2019), bactericida (Da Silva *et al.*, 2020; Hajian-Maleki *et al.*, 2019; Rodrigues *et al.*, 2023).

O OE de *Lippia gracilis* apresenta atividade antibacteriana, e em sua composição existem dois monoterpenos amplamente estudados em ensaios antimicrobianos, o timol e o carvacrol (Da Silva *et al.*, 2019). O timol (2-isopropil-5-metilfenol) e o carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) são monoterpenos isômeros formados a partir de duas unidades de isopreno (Kachur & Suntres, 2020). Estes apresentam diversas atividades biológicas como inseticida, fungicida, herbicida, larvicida, nematocida, antibacteriano, entre outras. São documentados mecanismo de ação envolvendo perturbações na membrana plasmática como destruição da integridade e permeabilidade da membrana, destruição da estrutura celular, inibição enzimática, acúmulo de espécies reativas de oxigênio EROs, perda de proteínas, deformação de hifas, entre outros efeitos celulares (Liu *et al.*, 2022).

O timol é principal composto presente em OEs extraídos da espécie de *Thymus vulgaris* (tomilho), podendo também ser obtido de outras plantas como *Ocimum gratissimum* L., *Origanum* L., *Trachyspermum ammi* (L.), diferentes espécies do gênero *Satureja* L. e *Monarda* L. (Lamiaceae), *Carum copticum* L. e *Oliveria decumbens* Vent (Apiaceae), *Anemopsis californica* (Saururaceae) e espécies de verbenaceae, Scrophulariaceae e

Ranunculaceae. Em temperatura ambiente se apresenta como cristais de coloração branca e com odor (Escobar *et al.*, 2020).

Diversas atividades biológicas têm sido relatadas para o timol, tais como antioxidantes, anti-inflamatória, cicatrizante, antisséptica, além de antifúngica e antibacteriana (Marchese *et al.*, 2016; Miladi *et al.*, 2016). A atividade do timol foi estudada para o controle de diferentes bactérias fitopatogênicas, *Ralstonia solanacearum*, *Xylella fastidiosa* (Oluoch *et al.*, 2021; Baldassarre *et al.*, 2023).

O timol e o carvacrol apresentaram atividade inibitória para um painel de cepas de bactérias de origem alimentar, bactérias gram-positivas e gram-negativas, no entanto, o timol apresentou maior efeito inibitório em comparação ao carvacrol. Também foi observado nesse estudo, efeito na bomba de efluxo celular principalmente para o timol e que as combinações entre estes monoterpenos e antibióticos como tetraciclina e cloreto de benzalcônico resultaram em interações sinérgicas e a redução do CMI dos antibióticos de 2 a 8 vezes (Miladi *et al.*, 2016).

Em outros estudos a exposição da bactéria *Dickeya zeae* ao carvacrol afetou a membrana bacteriana, com diminuição do ATP intracelular, vazamento de ácidos nucleicos, diminuição do potencial de membrana, além da redução da motilidade bacteriana e da formação do biofilme (Jiang *et al.*, 2021). Tais estudos indicam o potencial desses compostos para o controle de bactérias fitopatogênicas. Logo o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antimicrobiano do OE do acesso LGRA 106 e do timol e carvacrol e para o controle de *Acidovorax citrulli*.

5.2. Material e métodos

5.2.1 Materiais vegetais

A espécie *Lippia gracilis* foi o material vegetal utilizado para a extração dos OEs, está registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) com o número de A8CCB3B. O material vegetal foi coletado do BAG (Banco Ativo de Germoplasma), localizado no Campos Rural da Universidade Federal de Sergipe. Para extração dos OEs, 75 g de folhas frescas e jovens foram coletadas e secas em estufa de ar 40 °C por cinco dias. A extração do OE foi realizada com auxílio do hidrodestilador Clevenger, os OEs foram caracterizados de acordo com Da Silva *et al.* (2019). Os compostos majoritários timol e carvacrol são isolados comerciais proveniente da empresa (Sigma-Aldrich®). OEs foram acondicionados em freezer -4 °C. Nos experimentos foi preparado um estoque em DMSO de 100 µg.mL⁻¹, assim como timol e carvacrol. A Casugamicina foi utilizada como controle padrão, obtida do produto comercial Kasumin na concentração de 20 µg.mL⁻¹.

5.2.2 Material biológico

A cepa bacteriana de *Acidovorax citrulli* CCRM 1.39 foi obtida da Coleção de Culturas Rosa Mariano (CRM) do Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco. O cultivo de *A. citrulli* foi realizado meio LB (10g.L⁻¹ extrato de tripton, 5g.L⁻¹ de extrato de levedura, 10 g.L⁻¹ de NaCl em 1 L de água destilada e pH 7,0) ou LB sólido (15g.L⁻¹ de ágar). Para os bioensaios o inóculo foi crescido em meio LB líquido sob agitação orbital (150 rpm/28 °C±2) e foram padronizados pela densidade ótica de 0,5 a (1x10⁶ UFC. mL⁻¹). A densidade ótica foi mensurada no comprimento de onda de 600nm no espectrofotômetro leitor de microplaca Synergy™ H1 (BIO TEK Hybrid Technology) e programa Gen5 2.06.

5.2.3 Seleção da atividade antimicrobiana de OEs de acessos de *Lippia gracilis* sobre *Acidovorax citrulli*

Foram adicionados 100 μL do inóculo padronizado (D.O 0,5) e 100 μL da solução contendo os OEs na concentração final de $1.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em placas de 96 poços. O controle negativo foi realizado com DMSO (1%). As placas foram incubadas sob agitação orbital (150 rpm/28 $^{\circ}\text{C}\pm 2$) por 24 h. A inibição foi calculada a partir da diferença entre as absorbâncias inicial (0 h) e final (24 h). A densidade ótica foi mensurada no comprimento de onda de 600nm no espectrofotômetro leitor de microplaca Synergy TM H1 (BIO TEK Hybrid Technology), pelo programa Gen52.06.

5.2.4 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB)

CMI e CMB dos OEs dos acessos LGRA 106, 107, 108, 109, 110, 201, 202 e dos compostos majoritários timol e carvacrol (Sigma-Aldrich®) e do antibiótico Casugamicina foram determinados pelo método de microdiluição seriada em placas de 96 poços. Os OEs e os compostos majoritários foram diluídos em LB líquido em concentrações finais que variaram de $1.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $31,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A Casugamicina foi testada nas concentrações de $5.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $78,12 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Em cada placa de teste foram adicionados 200 μL das soluções contendo os tratamentos na primeira linha de poços, as demais fileiras foram preenchidas com LB líquido, foram retirados 100 μL da primeira linha e diluído de forma seriada até a menor concentração testada. Após a montagem da placa foram adicionados 100 μL do inóculo padronizado. O controle negativo foi realizado 1% de DMSO (referente a mais alta concentração de DMSO usada que não afetou o crescimento bacteriano). As microplacas foram incubadas sob agitação orbital (150 rpm/28 $^{\circ}\text{C}\pm 2$) por 24 h. A inibição foi calculada a partir da diferença entre as absorbâncias inicial (0) e final (24 h). A absorbância foi mensurada, comprimento de onda de 600nm no espectrofotômetro leitor de microplaca Synergy TM H1 (BIO TEK Hybrid Technology), pelo programa Gen52.06. Para determinação da CMB foram retiradas dos poços com ausência de crescimento bacteriano 10 μL e transferidos para placas de Petri (90 x15 mm) de diâmetro contendo meio de cultura LB sólido (15 g.L^{-1} de ágar). As placas foram incubadas em estufa 28 $^{\circ}\text{C}\pm 2$ por 24 h. A concentração dos OEs e dos compostos majoritários e antibiótico que não apresentaram crescimento bacteriano visível em placa após 24 h foram considerados bactericidas.

5.2.5 Crescimento bacteriano

A análise do crescimento bacteriano foi realizada com OE do acesso que apresentou maior efeito antimicrobiano e os compostos timol e carvacrol. Foram adicionados em placas de 96 poços 100 μL do inóculo de *A. citrulli* padronizado a 0,5 e 100 μL das soluções de OE LGRA 106 e timol e carvacrol nas concentrações correspondentes a 2X, 1X, 1/2X, 1/4X CMI. O controle negativo foi usado DMSO (1%), as microplacas foram incubadas sob agitação orbital (150 rpm/28 $^{\circ}\text{C}\pm 2$). A absorbância foi mensurada nos intervalos de 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 180 min, com o comprimento de onda de 600 nm por meio do espectrofotômetro leitor de microplaca modelo Synergy TM H1 (BIO TEK Hybrid Technology), pelo programa Gen52.06.

5.2.6 Atividade antibiofilme

O biofilme foi quantificado com o método do cristal violeta. Para a avaliação do biofilme bacteriano de *A. citrulli* foram adicionados em placas de 96 poços 100 μL do inóculo de *A. citrulli* padronizado a 0,5 e 100 μL das soluções de OE LGRA 106 e timol e carvacrol nas concentrações correspondentes a 2X, 1X, 1/2X, 1/4X CMI. O controle negativo foi usado DMSO (1%), as microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica sem rotação a 28 $^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 24h. Após as placas foram centrifugadas 2250 g por 10 min para a retirada do sobrenadante, em seguida o biofilme foi fixado com 200 μL de etanol 95% por 15 min à temperatura de 5 $^{\circ}\text{C}$. O etanol foi retirado e as placas secas por 10 min a 25 $^{\circ}\text{C}$. O biofilme foi corado por 15 min com cristal violeta 0,1 % (diluído em água destilada estéril). Após, as

placas foram lavadas duas vezes com água destilada e foi adicionado 200 µL de DMSO 100% e a placa foi colocada sob agitação de 150 rpm por 5 min a 28°C ±2. A absorbância foi lida no comprimento de onda de 562nm por meio do espectrofotômetro leitor de microplaca modelo Synergy™ H1 (BIO TEK Hybrid Technology), pelo programa Gen52.06.

5.2.7 Atividade na permeabilidade da membrana plasmática

O inóculo de *A. citrulli* foi crescido em meio de cultura LB e padronizado 0,5 e tratado com o CMI de timol, carvacrol e OE LGRA 106 por 5, 30, 60, 120 e 180 min. Como controle negativo foram usadas células tratadas com DMSO (1%) e como positivo células bacterianas submetidas ao aquecimento (100 °C/5min). Após a exposição as células foram centrifugadas (14.000 rpm/25°C/10 min), retirado o sobrenadante e as células foram lavadas em tampão PBS (tampão fosfato salino, pH=7,4). Após tríplice lavagem as células foram incubadas com iodeto de propídeo na concentração de 3mM à temperatura de 37°C por 15 min em ausência de luz. Após incubação foram transferidos 200 µL da suspensão bacteriana corada para a placa de 96 poços e a intensidade de fluorescência do iodeto de propídeo foi lida em espectrofotômetro leitor de microplaca modelo Synergy™ H1 (BIO TEK Hybrid Technology), no comprimento de onda de excitação/emissão de 493/632nm.

5.2.8 Atividade na motilidade natatória

A motilidade foi avaliada previamente pelo método descrito por Jiang *et al.* (2021) com algumas modificações. Foram inoculados 2µL de suspensão bacteriana (OD₆₀₀=1) em placas de meio LB (0,25% ágar) expostas 24 h às concentrações equivalentes a 1X CMI, ½ MIC, CMI do timol e carvacrol, o controle negativo foi realizado com células não tratadas e expostas à DMSO 1%. As placas foram incubadas em estufa na temperatura de 28°C±2 por 24 h. O halo de crescimento bacteriano formado foi medido. A motilidade natatória foi calculada em relação ao controle negativo.

5.2.9 Análises estatísticas

Os dados foram expressos em média e erro padrão da média. Os experimentos foram realizados em triplicada em três tempos independentes. A análise dos dados foi realizada através do software GraphPad Prisma 8.0. (Versão 8 CA, San Diego, EUA, DATA). Os dados foram analisados estatisticamente one-way ANOVA seguida de teste de Dunnett's, foi realizado para determinar diferenças significativas entre as médias, os dados foram considerados estatisticamente significativos quando *p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001, ****p<0,0001.

5.3. Resultados

5.3.1 Seleção da atividade antimicrobiana de OEs de acessos de *Lippia gracilis* em *Acidovorax citrulli*

Os OEs dos acessos de *Lippia gracilis* apresentaram efeito antimicrobiano sobre o fitopatógeno *A. citrulli*. Todos os OEs apresentaram altas taxas de inibição do crescimento bacteriano na concentração de 1.000 µg.mL⁻¹. As taxas inibitórias variaram de 100±0,000 a 97,3 ±2,30 (Fig. 1).

5.3.2 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB).

Os valores de CMI e CMB dos OEs, timol e carvacrol são demonstrados na Tabela 1. De forma geral, os OEs dos acessos de *Lippia gracilis* apresentaram concentração mínima inibitória (CMI) de 1.000 µg.mL⁻¹, exceto o acesso LAGRA 106 que apresentou CMI de 500 µg.mL⁻¹. Os componentes majoritários dos OEs, timol e carvacrol, apresentaram CMI de 250

$\mu\text{g.mL}^{-1}$. O antibiótico Casugamicina apresentou CMI de $2.500 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A maioria dos OEs apresentaram CMB de $1.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

O timol apresentou CMB de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, menor do que a do carvacrol e dos OEs. A CMB do controle positivo da Casugamicina foi $>5.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Assim é possível observar o potencial antibacteriano dos OEs dos acessos de *L. gracillis* e do timol e carvacrol pois demonstraram atividade inibitória 2 vezes maior e bactericida cerca de 4 a 5 vezes quando comparadas à Casugamicina.

5.3.3 Crescimento bacteriano

O crescimento bacteriano foi avaliado em diferentes tempos após tratamento com timol (A), carvacrol (B) e OE LGRA 106 (C). O timol nas concentrações equivalentes à CMI e 2X CMI promoveu redução significativa do crescimento bacteriano a partir de 30 minutos, a partir de uma hora de exposição a concentração de $\frac{1}{2}$ CMI inibiu o crescimento bacteriano juntamente com 1XCMI e 2XCMI em todos os demais tempos avaliados. O carvacrol na concentração equivalente a 1CMI e 2XCMI inibiu o crescimento bacteriano a partir de 30 minutos, a inibição foi observada até 180 min, diferente do timol a concentração equivalente a $\frac{1}{2}$ CMI do carvacrol não apresentou efeito inibitório no crescimento bacteriano. O OE do acesso LGRA 106 também inibiu o crescimento bacteriano na concentração equivalente a 1CMI e 2XCMI, a concentração equivalente a $\frac{1}{2}$ CMI inibiu o crescimento em relação ao controle nos tempos de 60 e 120 min, mas não apresentou efeito no tempo de 180 min (Fig. 2).

5.3.4 Atividade antibiofilme

O timol e carvacrol, assim como o OE LGRA 106, apresentaram atividade antibiofilme com inibições acima de 90% (Fig. 3). O timol apresentou maior potencial antibiofilme já que houve redução significativa do biofilme bacteriano com valores de inibição de 98,12% com 2XCMI e 96,03% 1XCMI. O carvacrol também inibiu de forma significativa o biofilme, porém apenas quando foi utilizada a concentração equivalente a 2X CMI a taxa de inibição foi de 94,37%. OE LGRA 106 apresentou taxas de inibição do biofilme bacteriano de 98,84% com concentração equivalente a 2XCMI e 93,61% (1XCMI).

5.3.5 Atividade na permeabilidade da membrana plasmática

O tratamento na concentração equivalente a 1XCMI do timol, carvacrol e OE LGRA 106 resultou no incremento da fluorescência de iodeto de propídeo, o que indica a permeabilização da membrana bacteriana (Fig. 4). A taxa de permeabilização de timol foi de 100, carvacrol 93,27 e OE LGRA106 98,03%, as taxas de permeabilização não diferiram do controle positivo, no qual as células foram expostas ao nível extremo de dano por calor, no tempo de 60 min as taxas de permeabilização se mantêm acima de 90%. Este resultado indica o potencial de dano dos monoterpenos e do OE estudados em promover danos nas células bacterianas.

5.3.6 Atividade na motilidade natatória

A motilidade bacteriana de *A. citrulli* foi afetada em concentrações equivalentes a 1XCMI e $\frac{1}{2}$ CMI de ambos monoterpenos estudados (Fig. 5). O timol e o carvacrol, na concentração equivalente a 1X CMI, reduziram a motilidade natatória em até timol (3 vezes), carvacrol (4 vezes) em relação às células não expostas aos monoterpenos.

5.4. Discussão

Acidovorax citrulli é um fitopatógeno de alto poder destrutivo e pertence à lista A1 na lista de pragas quarentenária internacionais (EPPO, 2024). Não existem materiais genéticos resistentes a esta bactéria, então a única forma de controle das infecções é o tratamento de

sementes com antibióticos (Assunção *et al.*, 2019). OEs e monoterpenos como timol e carvacrol são produtos naturais provenientes do metabolismo secundário de plantas e possuem ampla atividade antimicrobiana com potencial uso na agricultura (Bakkali *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2022). Os OEs dos acessos de *Lippia gracilis* apresentaram CMI de 1.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, com exceção do OE de LGRA 106 para o qual a CMI foi de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os monoterpenos timol e carvacrol apresentaram valores de CMI equivalente a 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O valor de CMB para o timol foi de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e para o carvacrol e OE 106 de 1.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Estes dados corroboram com os valores de CMI observados para *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, um importante fitopatógeno que afeta crucíferas, os valores de CMI de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o timol e carvacrol e 700 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o OE LGRA 106. Por outro lado os valores de CMB para o timol e carvacrol foram de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 700 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o OE LGRA 106 (Da Silva *et al.*, 2019).

A ação antibacteriana dos OEs de diversas plantas aromáticas sobre bactérias fitopatogênicas são relatadas na literatura (Koložsváriné Nagy *et al.*, 2023; Vishakha *et al.*, 2022). O efeito de 32 OEs foi estudado para inibição de *A. citrulli*. Dentre os OEs testados o OE de canela (*Cinnamomum verum*) apresentou maior efeito antibacteriano na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os compostos majoritários desse OE, benzaldeído e cinamaldeído, promoveram zonas de inibição maiores do que o antibiótico Canamicina. Além disso, tanto os OEs como os seus compostos majoritários foram capazes de reduzir a densidade de bactérias nas sementes de melancia, demonstrando potencial para aplicação como produto natural na prevenção e tratamento de mancha aquosa dos frutos (Choi *et al.*, 2016).

Estudos anteriores também demonstraram a atividade antimicrobiana dos OEs de *Croton grewoides* Baill (Rodrigues *et al.*, 2023) e *Varronia curassavica* jacq (Da Silva *et al.*, 2020) sobre *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Outras bactérias importantes para a agricultura como a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* também foram inibidas por OEs das espécies *Hyssopus officinalis*, *Satureja khuzistanica* e *Zataria multiflora* (Hajian-Maleki *et al.*, 2019).

Neste trabalho, o timol apresentou alto potencial de inibição do crescimento de *A. citrulli*. Na avaliação do crescimento foi possível constatar que a absorbância da cultura bacteriana foi significativamente reduzida nos primeiros 30 min com $\frac{1}{2}$ X CMI. O timol é componente principal dos OEs das espécies *Lippia sidoides* e *Lippia gracilis* (Liu *et al.*, 2022). A maior atividade antibacteriana do OE LGRA 106 é atribuída à alta quantidade de timol presente neste OE (60,47) (Tabela 2). Outro estudo mostrou que a bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* também teve o crescimento significativamente reduzido quando tratada com concentrações equivalentes a 2XCMI, 1XCMI, a CMI OE LGRA106 (Da Silva *et al.*, 2019). A atividade antibacteriana do timol tem sido atribuída à porção hidroxila na porção C1 do núcleo do monoterpeno, uma vez que quando este grupo foi esterificado, não foram observadas atividades antibacterianas significativas (Escobar *et al.*, 2020).

Assim como *Xanthomonas campestris*, a bactéria *A. citrulli* infecta sementes (Amini *et al.*, 2018). Os OEs de *Zataria multiflora* que também apresentam como compostos majoritários timol e carvacrol inibiram o crescimento de *Xanthomonas campestris*, e a impregnação de sementes com o OE na concentração de 463,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ por duas horas, preveniu a ocorrência da doença causada por *Xanthomonas campestris* em *Brassica oleracea* com danos mínimos às mudas. Em outros estudos, vapores dos OEs de cascas de canela e alho inibiram o crescimento de *A. citrulli*, promovendo zonas de inibição de 5,5 e 5,43, respectivamente (Chung *et al.*, 2021).

O biofilme de *A. citrulli* foi fortemente reduzido com concentrações equivalentes a 2XCMI e 1XCMI do timol, 2X CMI do carvacrol e OE LGRA 106. Em outros estudos os OEs do sândalo e patchouli apresentaram CMI equivalente a 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ sobre a bactéria *Xylella fastidiosa*, a concentração equivalente à CMI de ambos os OEs também inibiu o biofilme bacteriano (Santiago *et al.*, 2018). Para a bactéria *Chromobacterium violaceum* o

tratamento com timol não apenas reduziu significativamente a formação e viabilidade do biofilme, mas também comprometeu a estrutura organizada, além disso foi observada diminuição significativa na produção de exopolissacarídeos, assim como a redução da expressão de genes ligados à formação do biofilme como *hmsH* e *hmsR* (Saptami *et al.*, 2022).

Em concentrações sub-inibitórias o carvacrol afetou a formação do biofilme da bactéria causadora de podridão mole *Dickeya zeae* (Jiang *et al.*, 2021). Porém neste estudo as concentrações sub-inibitórias do carvacrol não apresentaram efeito inibitório, uma vez que o biofilme só foi inibido com concentrações equivalentes a 2X CMI. O biofilme bacteriano é um agregado microbiano envolvido de uma matriz ou hidrogel composta de polímeros extracelulares denominada EPS, diferente das células em estado planctônico, as células do biofilme bacteriano apresentam a maior tolerância a antibióticos (Sauer *et al.*, 2022). As células agrupadas em biofilme podem ser 10 a 1000 vezes mais resistentes a antibióticos quando comparadas ao seu estado planctônico (Sharma *et al.*, 2019).

A permeabilidade da membrana de *A. citrulli* foi afetada com a concentração equivalente a 1XCMI, dos monoterpenos e OE estudados a partir de 5 min de exposição. Esse resultado também foi obtido em estudos com *Xanthomonas campestris* pv *campestris* após exposições ao OE LGRA 106 de *Lippia gracilis* em concentrações equivalentes a 2X, 1X e ½ X CMI/5 min (Da Silva *et al.*, 2019) e de *Croton grewioides* Baill acesso 108 com 2X, CMI/30 min (Rodrigues *et al.*, 2023). A atividade antibacteriana do timol é atribuída principalmente a perturbações na membrana plasmática bacteriana através da interação com a bicamada lipídica, o que faz com que ocorra extravasamento de materiais intracelulares importantes ao metabolismo microbiano, além de interações com o DNA genômico e desestabilização da estrutura secundária do DNA. Assim o timol pode alterar a fluidez, ordem estrutural, densidade de empacotamento lipídico alterando a morfologia da membrana (Escobar *et al.*, 2020).

O timol na concentração equivalente a 1X e ½ CMI (sub-inibitória) promoveu a redução da motilidade de *A. citrulli*. O timol também é o principal componente presente em OE extraído da espécie de *Thymus vulgaris* conhecido como tomilho (Escobar *et al.*, 2020). Em *Xanthomonas oryzae* o OE de tomilho na concentração de 500 ppm não apresentou efeito significativo no crescimento e metabolismo bacteriano, porém reduziu a motilidade natatória, expressão de genes de enzimas extracelulares e expressão do gene *rpff*, um importante gene ligado à virulência em bactérias. Para os autores, o OE de tomilho assim como o timol são importantes candidatos para formulação de agentes anti-virulência (Singh *et al.*, 2017). A exposição ao timol da bactéria *Chromobacterium violaceum* resultou em redução da motilidade por enxameação, além de reduzir a expressão de genes ligados à motilidade como *pilB* e *pilT*. O carvacrol, em concentrações sub-inibitórias (equivalente a ½ CMI), também reduziu a motilidade natatória de *A. citrulli*. Esses resultados corroboram com os observados anteriormente por Jiang *et al.* (2021), que relataram reduzida motilidade natatória em *Dickeya zeae* tratadas com concentrações sub-inibitórias de carvacrol.

O timol e o carvacrol também foram avaliados como inibidores do Quórum sensing (QS). A bactéria *Chromobacterium violaceum* exposta ao timol teve a produção da violaceína inibida nas concentrações de 64 e 128 µg.mL⁻¹. Apesar de ocorrer crescimento foi observado a completa ausência do pigmento, e redução significativa na produção de exopolissacarídeos (Saptami *et al.*, 2022). Os mesmos resultados foram obtidos com o carvacrol e além desses efeitos também foi observada a redução na expressão do gene *Cvil* (que codifica uma N-acil-L-homosserina lactona sintase) e na atividade da enzima quitinase. Esses processos são controlados por QS e sugere-se que a atividade do carvacrol na inibição da formação do biofilme pode estar relacionada com a ruptura do QS (Burt *et al.*, 2014). Os resultados observados neste estudo indicam o potencial do timol e do carvacrol, assim como do OE LGRA 106 de *Lippia gracilis* para o desenvolvimento de agentes antibacteriano para o controle de *Acidovorax citrulli*.

5.5. Conclusões

Os OEs de acessos de *Lippia gracilis* apresentam atividade antimicrobiana sobre o fitopatógeno *A. citrulli*. O OE LGRA 106, assim como os compostos majoritários timol e carvacrol, reduziram o crescimento bacteriano, promoveram a inibição da formação do biofilme, reduziram a motilidade natatória bacteriana, além de afetar a permeabilidade na membrana plasmática bacteriana.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio e colaboração da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Universidade Federal de Sergipe (UFS), Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade (PPGAGRI) e Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Declarações

Conflitos de interesse: Os autores declaram que não há interesses financeiros concorrentes.

5.6. Referências Bibliográficas

- Amini, L., Soudi, M.R., Saboor, A., Mobasheri, H., 2018. Effect of essential oil from *Zataria multiflora* on local strains of *Xanthomonas campestris*: An efficient antimicrobial agent for decontamination of seeds of *Brassica oleracea* var. *capitata*. Sci. Hortic. (Amsterdam). 236, 256–264. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.03.046>
- Assunção, E.F.DE., Conceição, C.S.DA., Mariano, R.D.L.R., Souza, E.B.DE., 2019. Situação Atual da Mancha Aquosa, Importante Bacteriose em Meloeiro e Melancieira. AAPCA. 16, 51–73.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils - A review. Food Chem. Toxicol. 46, 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Baldassarre, F., Schiavi, D., Ciarroni, S., Tagliavento, V., De Stradis, A., Vergaro, V., Suranna, G.P., Balestra, G.M., Ciccarella, G., 2023. Thymol-Nanoparticles as Effective Biocides against the Quarantine Pathogen *Xylella fastidiosa*. Nanomaterials 13, 1285. <https://doi.org/10.3390/nano13071285>
- Bozkurt, İ.A., Soylu, S., Kara, M., Soylu, E.M., 2020. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils Isolated from Medicinal Plants against Gall Forming Plant Pathogenic Bacterial Disease Agents. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Derg. 23, 1474–1482. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdoga.vi.723544>
- Burdman, S., Walcott, R., 2012. *Acidovorax citrulli*: Generating basic and applied knowledge to tackle a global threat to the cucurbit industry. Mol. Plant Pathol. 13, 805–815. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00810.x>
- Burt, S.A., Ojo-Fakunle, V.T.A., Woertman, J., Veldhuizen, E.J.A., 2014. The natural antimicrobial carvacrol inhibits quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations. PLoS One 9, e93414. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093414>
- Choi, O., Cho, S.K., Kim, J., 2016. Biological evaluation of 32 different essential oils against *Acidovorax citrulli*, with a focus on *Cinnamomum verum* essential oil. African J. Biotechnol. 15, 68–76. <https://doi.org/10.5897/ajb2015.15049>
- Chung, M.Y., Kim, H., Beuchat, L.R., Ryu, J.H., 2021. Antimicrobial activities of plant essential oil vapours against *Acidovorax citrulli* and *Xanthomonas campestris* on Cucurbitaceae, Brassicaceae and Solanaceae seeds. J. Appl. Microbiol. 132, 2189–2202.

- <https://doi.org/10.1111/jam.15352>
- D'addabbo, T., Laquale, S., Argentieri, M.P., Bellardi, M.G., Avato, P., 2021. Nematicidal activity of essential oil from lavandin (*Lavandula* × *Intermedia* emeric ex Loisel.) as related to chemical profile. *Molecules* 26, 6448. <https://doi.org/10.3390/molecules26216448>
- Da Silva, R.S., de Oliveira, M.M.G., de Melo, J.O., Blank, A.F., Corrêa, C.B., Scher, R., Fernandes, R.P.M., 2019. Antimicrobial activity of *Lippia gracilis* essential oils on the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and their effect on membrane integrity. *Pestic. Biochem. Physiol.* 160, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.06.014>
- Da Silva, R.S., De Oliveira, M.M.G., Silva, K.P., Da Silva Vasconcelos Rodrigues, I., Dos Santos Pinto, V., Blank, A.F., Fernandes, R.P.M., 2020. Synergistic effect of *Cordia curassavica* Jacq. essential oils association against the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 4376–4389. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06631-8>
- Duman, K., Soyulu, S., 2019. Characterization of plant growth-promoting traits and antagonistic potentials of endophytic bacteria from bean plants against *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Bitki Koruma Bülteni* 59, 59–69. <https://doi.org/10.16955/bitkorb.597214>
- Escobar, A., Pérez, M., Romanelli, G., Blustein, G., 2020. Thymol bioactivity: A review focusing on practical applications. *Arab. J. Chem.* 13, 9243–9269. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.11.009>
- EPPO (2024) *Acidovorax citrulli*. EPPO datasheets on pests recommended for regulation. Available online. <https://gd.eppo.int>
- Oluoch, G., Mamati, E.G., Matiru, V., Nyongesa, M., 2021. Efficacy of thymol and eugenol against bacterial wilt bacterium *Ralstonia solanacearum*. *African J. Biotechnol.* 20, 256–265. <https://doi.org/10.5897/ajb2021.17353>
- Hajian-Maleki, H., Baghaee-Ravari, S., Moghaddam, M. 2019. Efficiency of essential oils against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* causing potato soft rot and their possible application as coatings in storage. *Postharvest Biol. Technol.* 156, 110928. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.06.002>
- Hou, H., Zhang, X., Zhao, T., Zhou, L., 2020. Effects of *Origanum vulgare* essential oil and its two main components, carvacrol and thymol, on the plant pathogen *Botrytis cinerea*. *PeerJ* 8, e9626. <https://doi.org/10.7717/peerj.9626>
- Jiang, S., Zhang, J., Yang, Q., Sun, D., Pu, X., Shen, H., Li, Q., Wang, Z., Lin, B., 2021. Antimicrobial Activity of Natural Plant Compound Carvacrol Against Soft Rot Disease Agent *Dickeya zeae*. *Curr. Microbiol.* 78, 3453–3463. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02609-3>
- Kachur, K., Suntres, Z., 2020. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 60, 3042–3053. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1675585>
- Kolozsváriné Nagy, J., Móricz, Á.M., Böszörményi, A., Ambrus, Á., Schwarczinger, I., 2023. Antibacterial effect of essential oils and their components against *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* revealed by microdilution and direct bioautographic assays. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 13, 1204027. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1204027>
- Liu, Z., Li, Q.X., Song, B., 2022. Pesticidal Activity and Mode of Action of Monoterpenes. *J. Agric. Food Chem.* 70, 4556–4571. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c00635>
- Marchese, A., Orhan, I.E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S.F., Gortzi, O., Izadi, M., Nabavi, S.M., 2016. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chem.* 210, 402–414. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.111>
- Miladi, H., Zmantar, T., Chaabouni, Y., Fedhila, K., Bakhrouf, A., Mahdouani, K., Chaieb,

- K., 2016. Antibacterial and efflux pump inhibitors of thymol and carvacrol against food-borne pathogens. *Microb. Pathog.* 99, 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.008>
- Oyedepi, A.O., Okunowo, W.O., Osuntoki, A.A., Olabode, T.B., Ayo-folorunso, F., 2020. Insecticidal and biochemical activity of essential oil from *Citrus sinensis* peel and constituents on *Callosobruchus maculatus* and *Sitophilus zeamais*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 168, 104643. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104643>
- Pandiyan, G.N., Mathew, N., Munusamy, S., 2019. Larvicidal activity of selected essential oil in synergized combinations against *Aedes aegypti*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 174, 549–556. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.03.019>
- Rodrigues, T.C., Gois, I.B., Fernandes, R.P.M., Blank, A.F., Sandes, R.D.D., Leite Neta, M.T.S., Narain, N., Arrigoni-Blank, M. de F., 2023. Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils from *Croton grewoides* Baill. accessions on the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 193, 105454. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2023.105454>
- Santiago, M.B., Moraes, T. da S., Massuco, J.E., Silva, L.O., Lucarini, R., da Silva, D.F., Vieira, T.M., Crotti, A.E.M., Martins, C.H.G., 2018. In vitro evaluation of essential oils for potential antibacterial effects against *Xylella fastidiosa*. *J. Phytopathol.* 166, 790–798. <https://doi.org/10.1111/jph.12762>
- Saptami, K., Arokia Balaya Rex, D., Chandrasekaran, J., Rekha, P.D., 2022. Competitive interaction of thymol with cviR inhibits quorum sensing and associated biofilm formation in *Chromobacterium violaceum*. *Int. Microbiol.* 25, 629–638. <https://doi.org/10.1007/s10123-022-00247-8>
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D.M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P.S., Bjarnsholt, T., 2022. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nat. Rev. Microbiol.* 20, 608–620. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>
- Schaad, N.W., Sowell, G., Goth, R.W., 1978. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 28, 117–125. <https://doi.org/10.1099/00207713-28-1-117>
- Sharma, D., Misba, L., Khan, A.U., 2019. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 8, 76. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0533-3>
- Singh, A., Gupta, R., Tandon, S., Pandey, R., 2017. Thyme Oil reduces biofilm formation and impairs virulence of *Xanthomonas oryzae*. *Front. Microbiol.* 8, 1074. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01074>
- Vishakha, K., Das, S., Das, S.K., Banerjee, S., Ganguli, A., 2022. Antibacterial, anti-biofilm, and anti-virulence potential of tea tree oil against leaf blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* instigates disease suppression. *Brazilian J. Microbiol.* 53, 19–32. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00657-2>

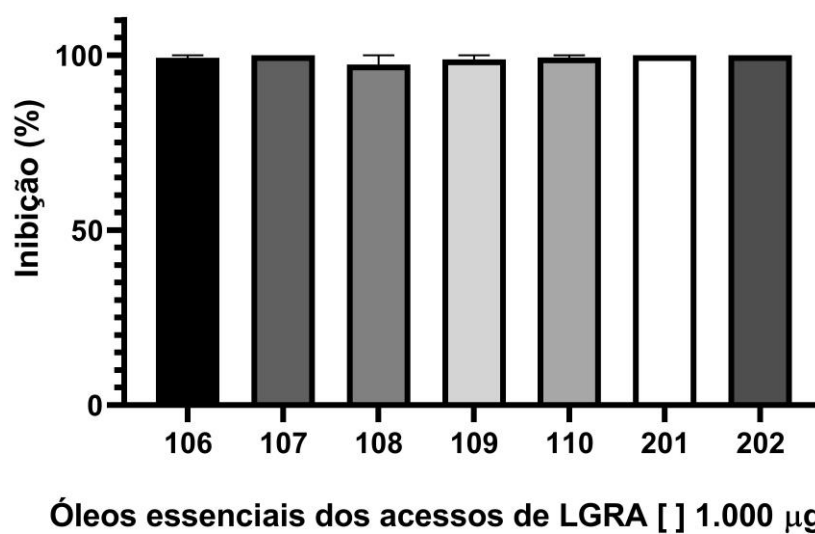
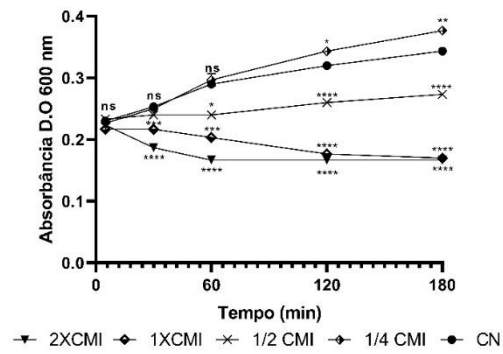


Figura 1. Seleção da atividade antimicrobiana dos OEs de *Lippia gracilis* (acessos LGRA 106, LGRA 107, LGRA 108, LGRA 109, LGRA 110, LGRA 201 e LGRA 202) na concentração de 1.000 µg.mL⁻¹ para a bactéria *Acidovorax citrulli*.

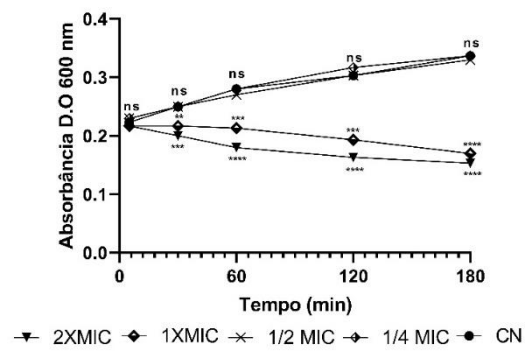
Tabela 1. Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) dos OEs dos acessos de *Lippia gracilis* e os compostos majoritários timol e carvacrol sobre *Acidovorax citrulli*.

Acessos	CMI $\pm$ SEM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CMB $\pm$ SEM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
LGRA 106	500 $\pm$ 1,736	1.000 $\pm$ 0,000
LGRA 107	1.000 $\pm$ 0,000	1.000 $\pm$ 0,000
LGRA 108	1.000 $\pm$ 0,000	>1.000 $\pm$ 0,000
LGRA 109	1.000 $\pm$ 0,000	1.000 $\pm$ 0,000
LGRA 110	1.000 $\pm$ 0,000	1.000 $\pm$ 0,000
LGRA 201	1.000 $\pm$ 0,000	>1.000 $\pm$ 0,000
LGRA 202	1.000 $\pm$ 0,000	>1.000 $\pm$ 0,000
Timol	250 $\pm$ 0,000	500 $\pm$ 000
Carvacrol	250 $\pm$ 0,000	1.000 $\pm$ 000
Casugamicina	2.500 $\pm$ 0,000	>5.000 $\pm$ 0,000

A



B



C

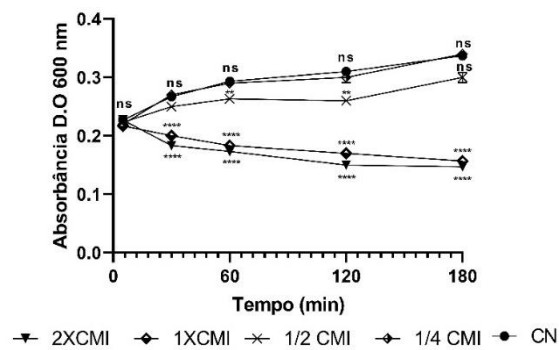


Figura 2. Crescimento de células bacterianas de *Acidovorax citrulli* expostas a concentrações equivalentes a 2XCMi, 1XCMi, 1/2 CMi e 1/4 CMi do timol (A), carvacrol (B) e OE LGRA 106 (C) nos tempos de 5, 30, 60, 120 e 180 min. Todos os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes. Os dados diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett *p < 0,05, ** p < 0,01.

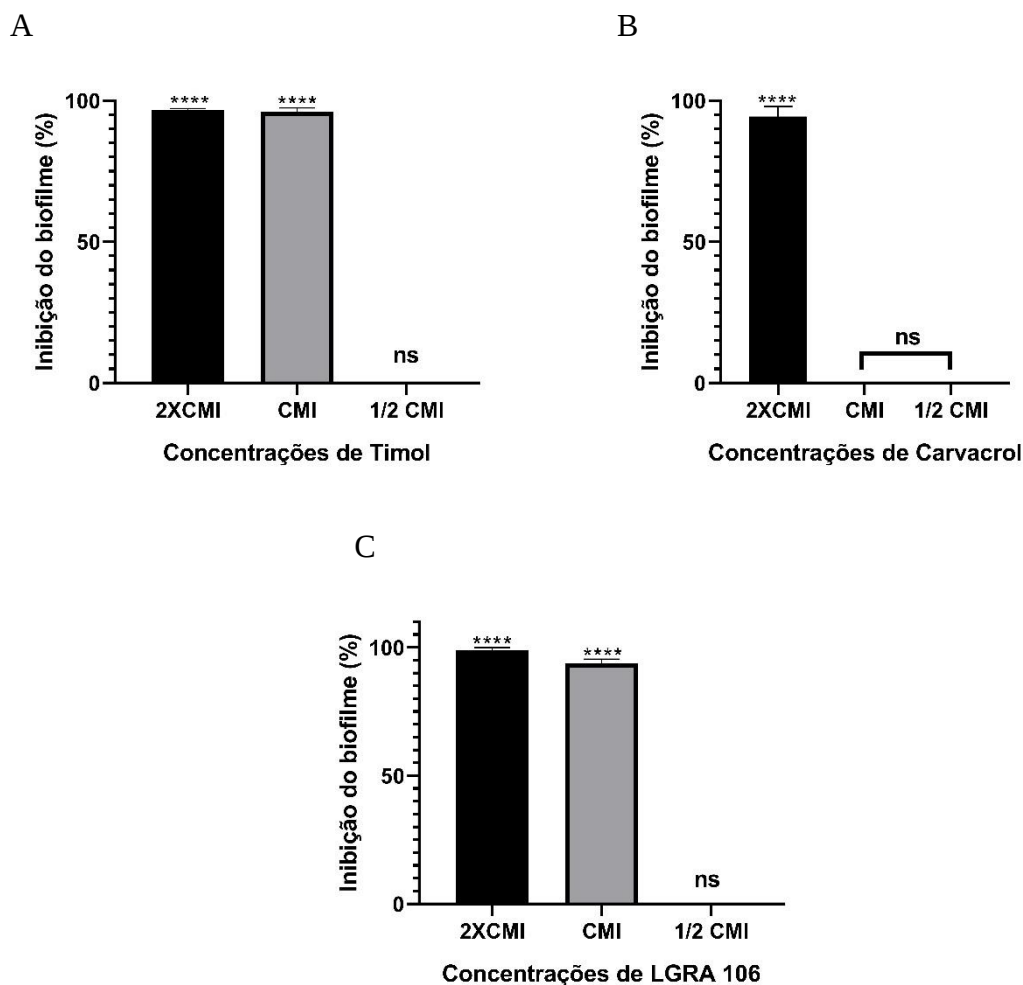


Figura 3. Inibição do biofilme bacteriano de *Acidovorax citrulli* expostas a concentrações equivalentes a 2X CMI, 1XCMI ½ CMI de timol (A), carvacrol (B) e OE LGRA 106 (C). Todos os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes. Os dados diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett *p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001, ****p < 0,0001.

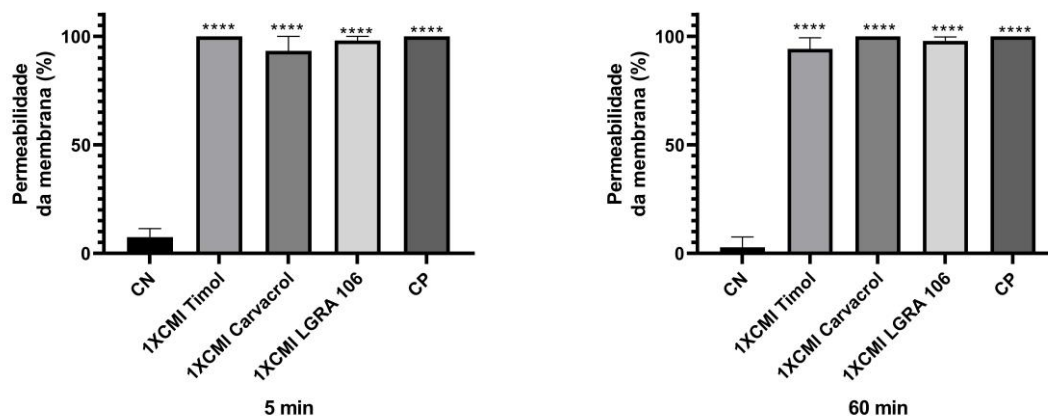


Figura 4. Permeabilidade da membrana de *Acidovorax citrulli* expostas a concentrações equivalentes a 1XCM de timol, carvacrol e OE LGRA 106 em 5 e 60 min. O controle negativo (CN) foi realizado com células bacterianas expostas à DMSO 1%. O controle positivo (CP) foi realizado com células expostas a 100°C/5min. Todos os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes. Os dados diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

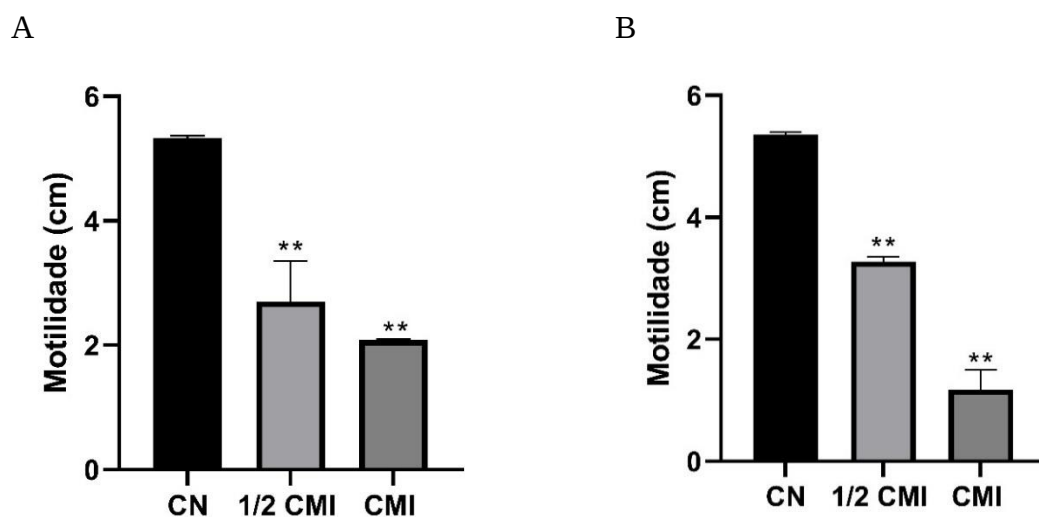


Figura 5. Motilidade natatória de *Acidovorax citrulli* expostas a concentrações equivalentes a 1XCMI, ½ CMI de timol (A) e carvacrol (B). O controle negativo (CN) foi realizado com células bacterianas expostas à DMSO 1%. Todos os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes. Os dados diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett *p <0,05, ** p <0,01.

Tabela 2. Composição dos óleos essenciais dos acessos de *Lippia gracilis* analisados por CG-EM.

Constituinte	IRR	LGRA 106	LGRA 107	LGRA 108	LGRA 109	LGRA 110	LGRA 201	LGRA 202
α -tujeno	924	0,44	0,25	0,56	1,04	1,01	1,38	1,55
α - pecimeno	931	0,21	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Mirceno	976	2,18	1,64	1,61	1,89	2,43	2,79	2,96
α -terpineno	988	0,94	1,39	1,33	1,94	1,56	2,92	2,01
p- cimeno	1016	6,31	12,59	14,44	15,27	20,09	14,91	18,98
Limoneno	1023	0,50	0,34	0,58	0,26	0,35	0,48	0,45
1,8 cineole	1028	3,80	1,33	3,21	0,0	2,32	2,06	0,0
γ - terpineno	1031	4,37	8,89	6,68	8,89	6,98	18,88	9,55
Linalol	1057	0,44	1,03	0,22	0,66	0,44	0,14	0,62
Terpinen-4-ol	1100	0,66	0,81	0,75	0,70	0,72	0,66	0,64
Metil-timol	1180	9,81	5,51	7,43	6,25	6,10	0,23	7,20
Timol	1195	60,47	5,43	3,09	3,23	3,51	6,29	3,68
Carvavrol	1228	0,38	48,15	46,10	49,25	48,70	35,02	40,29
β - cariofileno	1291	6,55	4,11	2,93	5,34	2,51	6,83	3,66
α - humuleno	1298	0,34	0,55	0,71	0,0	0,0	0,55	0,29
Viridifloreno	1418	0,32	0,76	0,51	0,40	0,0	0,0	0,26
Biciclogermacreo	1432	0,39	0,97	1,63	0,54	0,0	1,28	0,65
Espatulenol	1437	0,0	1,08	1,85	1,04	0,39	0,65	0,78
Óxido de cariofileno	1454	1,15	1,30	1,03	0,46	1,38	0,99	1,16
Monoterpenos		90,51	87,36	86,00	89,38	94,21	85,76	87,93
Sesquiterpenpos (%)		8,75	8,77	8,66	7,80	4,28	10,30	6,80
Total (%)		99,26	96,13	94,66	97,18	98,49	96,06	94,73
Teor de óleo essencial (%)		1,42	2,02	2,17	1,85	2,15	2,37	2,70

Fonte: Da Silva *et al.* (2019).

Tabela 3. Código, origem e informações geográficas dos sete acessos da coleção de *Lippia gracilis* do banco ativo de germoplasma de plantas medicinais e aromáticas da Universidade Federal de Sergipe.

Código da planta	Origem (cidade, estado, país)	Nº de registro (herbário UFS)	Coordenadas Geográficas
LGRA-106	Tomar do Geru, Sergipe, Brasil	14733	11 19' 16,7" S; 37 55' 09,2" W
LGRA-107	Tomar do Geru, Sergipe, Brasil	14737	11 19' 20,1" S; 37 55' 13,5" W
LGRA-108	Tomar do Geru, Sergipe, Brasil	14734	11 19' 22,4" S; 37 55' 12,6" W
LGRA-109	Tomar do Geru, Sergipe, Brasil	14735	11 19' 20,7" S; 37 55' 16,9" W
LGRA-110	Tomar do Geru, Sergipe, Brasil	14732	11 19' 21,1" S; 37 55' 14,9" W
LGRA-201	Rio Real, Bahia, Brasil	14736	11 23' 38,7" S; 38 00' 54,1" W
LGRA-202	Rio Real, Bahia, Brasil	14731	11 23' 45,3" S; 38 00' 51,3" W

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos demonstram o potencial antifúngico das chalconas CH0, CH1, CH2 e CH8 sobre os fungos *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Sclerotium* sp, além do potencial antiprotozoário sobre fitoparasita *Phytophthora blight*, sendo as chalconas mais ativas CH2, CH3, CH5 e CH14. Neste estudo também foram testados óleos essenciais (OEs) de *Lippia gracilis* e dos compostos majoritários timol e carvacrol para o controle da fitobactéria *Acidovorax citrulli*. Os compostos timol e carvacrol e o OE LGRA 106 apresentam efeitos significativos sobre diversos parâmetros do crescimento de *A. citrulli*.

Diante disso, ambas moléculas podem ser consideradas promissoras para o desenvolvimento de agentes de controle de doenças agrícolas.