



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

**(11) PI 1101176-9 B1**

**(22) Data do Depósito:** 31/03/2011

**(45) Data de Concessão:** 17/07/2018



---

**(54) Título:** USO DO COMPOSTO N-ACETIL-CISTEÍNA E SEUS ANÁLOGOS

**(51) Int.Cl.:** A01N 37/44; A01N 37/46; A01N 33/08; A01G 7/06; A01P 15/00

**(73) Titular(es):** INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS

**(72) Inventor(es):** ALESSANDRA ALVES DE SOUZA; LÍGIA SEGATTO MURANAKA; MARCO AURÉLIO TAKITA; HELVECIO DELLA COLETTA FILHO; MARCOS ANTONIO MACHADO

## “USO DO COMPOSTO N-ACETIL-CISTEÍNA E SEUS ANÁLOGOS”

### CAMPO DA INVENÇÃO

A presente patente de invenção de título em epígrafe e objeto de descrição e reivindicação nesta cártula trata de uma solução inventiva que encontra destacado benéfico no setor agrícola, com amplo espectro de aplicação, notadamente no cultivo de toda sorte de planta de interesse agrícola, colaborando para minimizar “*perda de produtividade*” e até mesmo “*quebra de safra*”, oriunda da ação nociva de bactérias fitopatógenas que uma vez instaladas na planta, promovem a formação de biofilme cuja ação converge para a interrupção do fluxo de água e nutrientes da raiz para a parte aérea da planta.

De forma mais ampla o “*composto de amino-ácido de cisteína (ou seus análogos)*” pode ser usado sozinho ou complexado a outro composto, como cobre ou zinco, para atuar na desestruturação de bio-filmes microbianos que causam doenças em plantas de forma geral, das quais encontram destaque:

1. Aplicação em plantas cítricas: para efeito do desenvolvimento do inédito “*composto de aminoácido de cisteína (ou seus análogos)*” o requerente adotou como norte a recuperação econômica da planta de citros quando atacada por clorose variegada dos citros (CVC), “cancro cítrico”, doença de huanglongbing (HLB) ou “greening”, dentre outras.

1a. Doença “CVC”: o requerente vis-lumbra o uso do “*composto de aminoácido de cisteína (ou seus análogos)*” mediante a reversão dos sintomas e consequentemente recuperação econômica de plantas acometidas da doença tecnicamente conhecida como clorose variegada dos citros (CVC), causada pela bactéria “*X. fastidiosa*” que forma biofilme microbiano que por sua vez leva ao bloqueio dos vasos de xilema da planta de citros;

1b. Doença do “cancro cítrico”: o requerente propõe o uso do “*composto de aminoácido de cisteína (ou seus análogos)*” como adjuvante para a posterior

aplicação de cobre, em folhas de plantas de citros, desta feita visando o combate de outra doença, conhecida como “cancro cítrico”, causada pela bactéria *Xanthomonas citri* pv. *citri*;

1c. Doença de huanglongbing (HLB): o requerente propõe o uso do “*composto de aminoácido de cisteína (ou seus análogos)*” que pode ser aplicado no controle da doença conhecida como huanglongbing (HLB) ou “greening”, que é uma doença cítrica de ocorrência mundial (exceto países do Mediterrâneo), visando à desestruturação de aglomerados bacterianos no floema de plantas cítricas afetadas;

2. Aplicação na planta de café, ameixa e oliveira: é beneficiada pelo uso do inédito “*composto de aminoácido de cisteína (ou seus análogos)*”, pois também é acometida por estirpes da bactéria “*X. fastidiosa*” causando atrofia dos ramos do cafeeiro, ameixeira e oliveira, e prejuízos econômicos a produção. Ressalta-se ainda o enorme prejuízo que essa bactéria vem causando nas Oliveiras do sul da Itália, comprometendo a produção do azeite nesse país.

3. Aplicação na planta videira e outras espécies vegetais: o “*composto de aminoácido de cisteína (ou seus análogos)*” pode beneficiar a cultura de videiras nos Estados Unidos cuja principal doença (doença de Pierce) também é causada pela bactéria *X. fastidiosa*.

[0003] Em derradeiro é possível afirmar que o “*composto de aminoácido de cisteína (ou seus análogos)*” pode beneficiar o tratamento praticamente toda sorte de plantas utilizadas como hospedeiros naturais de bactérias fitopatógenas (notadamente estirpes da bactéria *X. fastidiosa*), tal como em culturas de alfafa, , pêssegos, amendoeiras, entre outros inúmeros hospedeiros naturais (vide Hopkins & Purcell, Plant Disease, 86, 1056-1066, 2002).

### **DEMANDA DO INVENTO**

[0004] Do potencial econômico da citricultura: o agronegócio citrícola está presente em mais de 50% dos municípios do Estado de São Paulo, gerando divisas e ao mesmo tempo empregos. Só no Estado de São Paulo, essa atividade responde por aproximadamente 400.000 empregos diretos e indiretos,

gerando 1,5 bilhões de dólares na exportação de suco concentrado congelado, suco não concentrado e subprodutos (vide informação no sitio <http://www.abecitrus.com.br>.)

[0005] O Estado de São Paulo ocupa a posição de maior produtor de cultura citrícola com um parque citrícola instalado de aproximadamente 200 milhões de árvores, que em conjunto com o Triângulo mineiro responde por 84% da produção de laranjas doces no país, segundo dados do Instituto de Economia Agrícola (IEA).

[0006] Da produtividade no manejo da citricultura: mesmo sendo um dos principais exportadores de produtos citrícolas, o Brasil ainda possui uma *produtividade de citros considerada muito baixa* (80,4 Kg de frutas por árvore) dado a potencialidade da cultura. Essa baixa produtividade está associada, dentre outros fatores, à existência de pragas e doenças com significativo reflexo nos custos de produção. Um dos principais fatores bióticos limitante da produção dos citros em São Paulo é a Clorose Variegada dos Citros (CVC), doença causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*.

[0007] Os dados de levantamento da citada doença Clorose Variegada dos Citros (CVC) de 2009 realizado pelo Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) para o Estado de São Paulo demonstraram que aproximadamente 50% dos pomares das regiões citrícolas Norte, Noroeste e Centro deste Estado apresentam sintomas da doença, a qual aumentou vertiginosamente na região Sul (de 4,7 para 20%), aonde antes a doença não era considerada como grande problema. Vale ressaltar ainda os prejuízos que essa doença também causa na produção de citros no Nordeste do Brasil.

[0008] Diante deste quadro as estimativas dos danos econômicos causados pela Clorose Variegada dos Citros (CVC) são da ordem de 286 – 322 milhões de dólares anuais (Fernandes, 2003), na forma de replantio, poda de plantas infectadas e controle do vetor. Além disso, quando os sintomas são severos e a planta tem até 3 anos de idade, é necessária a erradicação da mesma, causando falta de uniformidade do pomar caso se opte por replantio de uma nova

muda, e conseqüentemente elevando as dificuldades no manejo fitotécnico da cultura, acarretando em mais gastos.

[0009] Da produtividade no manejo de outras culturas: embora os dados acima revelados sejam exclusivos para a atividade do agronegócio pertinente a citricultura, é possível afirmar que outras culturas agrícolas, tal como cafeicultura, por exemplo, apresentem sua produtividade fortemente comprometida pelo fato de apresentarem doenças análogas à Clorose Variegada dos Citros (CVC), ou mais especificamente, que acometem a planta pela ação bacteriana na formação de biofilmes microbianos que impedem o fluxo de água e nutrientes da raiz para a parte aérea da planta.

[0010] Da demanda identificada:

1. Do ponto de vista do agronegócio: com o exposto é fato concreto que a demanda do invento na forma de aplicação do “*composto de aminoácido de cisteína (ou seus análogos)*” reside em alavancar de forma contundente a produtividade do cultivo de toda sorte de plantas colaborando para o abastecimento das necessidades de consumo de alimentos da população mundial, que cresce a taxas em curva exponencial;

2. Do ponto de vista do consumidor final: garantir que os produtos alimentícios oriundos de culturas agrícolas que tenham embarcado única e exclusivamente matéria saudável, ou seja, minimizar a presença de agrotóxicos, ao menos da parcela de toxicidade pertinente ao uso de produtos agrotóxicos aplicados no trato e prevenção de doenças fitopatogénas, tal como Clorose Variegada dos Citros (CVC); cancro cítrico, doença de Huanglongbing (HLB) ou “Greening”, doença de Pierce dentre outras tantas que acometem toda sorte de cultura agrícola.

[0011] Em resumo o agronegócio anseia pela capacitação tecnológica de produtores agrícolas que permita a oferta de alimentos em condição ideal de consumo (comprovadamente saudáveis) e economicamente acessível a todas as camadas sociais da população do planeta.

## **REQUISITOS DO INVENTO**

[0012] Em consonância com a demanda do invento o requerente idealizou um inédito uso do “*composto de aminoácido de cisteína (ou seus análogos) usado na desestruturação de biofilmes microbianos quando do tratamento ou prevenção de doenças geradas por bactérias fitopatógenas que acometem plantas de interesse agrícola*” provido de novidade associada de atividade inventiva, pois não decorre de maneira óbvia ou evidente de outras soluções conhecidas no estado da técnica para resolver o problema de perda de produtividade de em culturas agrícolas, bem como uma vez utilizado traz em seu bojo o fato relevante de não afetar a integridade da saúde do consumidor dos alimentos oriundos da atividade agrícola.

[0013] Em adição o “*invento*” é provido de atividade inventiva e aplicabilidade industrial, sendo economicamente viável, atendendo ao rigor dos requisitos de patenteabilidade, notadamente como patente de invenção, conforme disposto nos ditames dos artigos 8º e 13º da Lei 9.279.

### **FUNDAMENTOS DA TÉCNICA**

[0014] A fim de propiciar veracidade, e consolidar o contexto explicitado nos tópicos do quadro introdutório será apresentada uma explanação sobre o estado da técnica ditado por soluções desenvolvidas e largamente utilizadas para o trato de doenças que acometem culturas de plantas em geral, não sendo objeto deste acultamento a explanação sobre produtos fertilizantes, o que não invalida a possibilidade de aplicação do inédito “*composto de aminoácido de cisteína (ou seus análogos)*” na composição deste tipo de produto ofertado pela agroindústria.

[0015] Dos tipos de cultivo de alimentos agrícolas:

1a. Produtos orgânicos: são uma alternativa ao uso de qualquer procedimento de modificação genética de plantas bem como descarta o uso de qualquer produto químico como agrotóxicos. Assim para o combate a pragas e doenças nos produtos orgânicos, a invenção pode ser considerada uma solução ideal;

1b. Problema identificado: embora os produtos de origem orgânica sejam uma tendência de consumo no mundo, é fato concreto que este tipo de produto não confere colheitas que se destacam pela alta produtividade, justamente pelo fato

de que a planta orgânica é vulnerável a ação de pragas e doença, convergindo assim para culturas de plantas embarcadas de alto custo e produção em escala limitada, que reflete diretamente no alto preço final ao consumidor;

2a. Produtos geneticamente modificados: tal como evidenciado no tópico de demanda do invento, o setor da agroindústria tem desenvolvido inúmeras soluções para alavancar a produtividade das culturas de plantas diversas, onde um dos expoentes reside no aperfeiçoamento genético da própria planta, que gera incremento de produtividade por hectare plantado e ainda cria na planta uma resistência contra a ação de pragas geradas por insetos e mesmo bactérias, resistência essa até então não observada em plantas não modificadas;

2b. Problema identificado: análise crítica deste tipo de solução remete para o fato concreto de que embora apresente resultados significativos em ganho de produtividade e qualidade da planta, ainda existe muita resistência ao produto final gerado, notadamente da comunidade internacional, pois ainda não existe estudo conclusivo se planta modificada geneticamente não traz em seu bojo algum perigo à saúde do consumidor (ser humano e animais);

Tratamentos corretivos à ação de pragas e doenças: a agroindústria disponibiliza inúmeros produtos apresentados na forma de “fármacos” ou “medicamentos”, em estado líquido (para pulverização) ou sólidos (pós, granulados, etc, . . .) que visam o combate de pragas e ou doenças que acometem plantações, dentre os quais encontra destaque:

1a. Produtos agrotóxicos: também conhecidos como defensivos agrícolas ou agroquímicos são produtos com formulação química, usados para exterminar pragas ou doenças que causam danos às plantações. Existem diversos tipos de agrotóxicos dentre os quais se destacam os que agem sobre plantas daninhas (herbicidas) e insetos (inseticidas). São também conhecidas outras classes de agrotóxicos, como a fungicida que é um pesticida que destrói ou inibe a ação dos fungos que geralmente atacam as plantas. A utilização de fungicidas sintéticos é muito comum na agricultura convencional;

1b. Problema identificado: embora os produtos agrotóxicos apresentem eficácia na erradicação de pragas e doenças, levando ao aumento de produtividade de toda sorte de cultura agrícola, é fato relevante que esse tipo de solução traz em seu bojo o aspecto negativo da toxicidade que é agregada ao produto alimentício final obtido, dado que parte do agrotóxico aplicado junto a planta é absorvido pela mesma.

[0016] Ademais a parte do agrotóxico que não é absorvida pela planta é absorvida tanto pelo solo do campo de cultivo como é levada pela precipitação de chuvas a desembocarem em mananciais de águas, como efluentes de rios e lagos, contaminando-os.

[0017] Em derradeiro, embora atualmente o uso de equipamentos de E.P.I. quando da manipulação de agrotóxicos seja difundido e obrigatório por lei específica, sempre existe a possibilidade de contaminação do indivíduo que o aplica;

2a. Produtos antibióticos: também conhecidos como agentes “bactericidas”, que são compostos que destroem a parede celular bacteriana ou a síntese de proteínas, eliminando assim a bactéria. Ainda dentro desse escopo são conhecidos os antibióticos “bacteriostáticos” que apenas impedem o crescimento de bactérias:

2b. Problema identificado: embora os produtos bactericidas também apresentem eficácia na erradicação de doenças, garantindo uma produtividade que torna o alimento economicamente viável, existe o aspecto negativo que reside no breve efeito obtido, pois as bactérias criam rapidamente resistência aos antibióticos ministrados, inviabilizando a repetitividade de um mesmo produto bactericida. Por sua vez o biofilme traz várias vantagens para as colônias de bactérias, dentre as quais tornando as colônias mais resistentes aos agentes antimicrobianos, o que faz com que para o combate de doenças bacterianas exijam-se altas doses de agentes antimicrobianos.

[0018] Tratamentos preventivos à ação de pragas e doenças:

1a. Procedimentos de prevenção: embora os produtos agrotóxicos, antibióticos

bactericidas sejam amplamente desenvolvidos pela agroindústria (dados apontam para cerca de 15.000 formulações para 400 agrotóxicos diferentes, segundo, vide sitio [www.wikipedia.com](http://www.wikipedia.com), palavra chave: agrotóxico), existe uma grande variedade de plantas às quais estes “produtos químicos” não se aplicam, tal como as plantas cítricas, cafezal, videiras, ameixeiras, pessegueiros, amendoeiras e cultura de alfafa, dentre outros, onde a condição comum a essas culturas de plantas reside no fato de que todas são acometidas por doença de natureza bacteriana, notadamente por estirpes da bactéria *X. fastidiosa* que as usa como hospedeiros (vide Hopkins & Purcell, Plant Disease, 86, 1056-1066, 2002).

[0019] Assim para o caso específico de plantas que são acometidas por doenças de natureza bacteriana, tal como a estirpes da bactéria *X. fastidiosa* e *Xanthomonas citri* subsp.. *citri*, dentre outras, nada mais resta ao agricultor senão tomar medidas preventivas, que são traduzidas na forma de um pacote *tecnológico de manejo*, que inclui procedimentos como:

- Poda dos ramos com sintomas da doença nas folhas e erradicação de plantas severamente afetadas;
- Controle do inseto vetor da bactéria, com o uso de agrotóxico do tipo inseticidas;
- Uso de mudas com certificado fitossanitário, produzidas em ambientes protegidos de vetores.

[0020] Este sistema adotado por força de lei específica no Estado de São Paulo a partir de 2003, direcionado para a atividade de citricultura:

1b. Problema identificado: embora tenha representado um avanço no trato de doenças acometidas pela ação bacteriana, este é um procedimento de controle de natureza paliativa, e que impõe ao agricultor danos econômicos pela necessidade de eliminação das plantas muito doentes, além do que a prática de poda emite brotações novas e vigorosas, sendo um atrativo para o vetor de outra doença, o HLB. Em derradeiro é o uso de agrotóxico do tipo inseticida para eliminar o inseto vetor da bactéria fitopatogena que impõe danos ao

ecossistema e um desequilíbrio ambiental nas plantações, com o surgimento de pragas secundárias.

### **PROPOSTA DO INVENTO**

[0021] O requerente ciente da lacuna que existe no trato de doenças de plantas de interesse agrícola, notadamente doenças de origem bacteriana, e especialmente àquelas que agregam estirpes da bactéria "*X. fastidiosa*", procedeu ao desenvolvimento de uma solução inventiva na forma de um "*composto de aminoácido de cisteína (ou seus análogos)*", que pode ser preparado de forma individual ou complexado a outro composto" sendo aplicado junto à planta doente por ação bacteriana fitopatogena.

[0022] Entendendo as doenças de planta causadas pela formação de biofilmes bacterianos: o requerente elegeu como fonte de estudos e desenvolvimento do presente invento a *ação das bactérias* fitopatogenas junto à estrutura da planta, onde para tal fez uso de dados científicos que traduzem dita ação na forma de geração de "*biofilme microbiano*" que por sua vez leva ao bloqueio dos vasos de xilema da planta impedindo o fluxo de nutrientes e água da raiz para a parte aérea da planta.

[0023] Dos objetivos do invento:

- a. Prover ação corretiva: desenvolver uma nova aplicação de um produto que uma vez aplicado à planta acometida de doença bacteriana, atue de forma a destruir progressivamente o biofilme microbiano liberando o fluxo de nutrição e hidratação da raiz para a parte aérea da planta e com conseqüente regressão dos sintomas da doença;
- b. Prover ação preventiva: a aplicação do produto, também pode ser usado de forma preventiva, ou seja, mesmo em planta sem a presença da doença e seus sintomas;
- c. Desenvolver uma nova aplicação de um produto que uma vez utilizado na planta não resulte ao final da colheita da cultura de planta desenvolvida, alimentos com resíduos tóxicos e ou com material genético modificado, garantindo a integridade da saúde do consumidor (ser humano e animais);

d. Desenvolver a tecnologia de aplicação de um produto que uma vez utilizado na planta não resulte ao final da colheita da cultura agrícola uma condição de diferenciada produtividade por hectares.

[0024] Do paradigma de desenvolvimento: para tornar factível os objetivos definidos para o presente invento o requerente elegeu o uso de “*agentes mucolíticos*” que atuam desestruturando o biofilme bacteriano, fazendo uso especificamente *do aminoácido de cisteína*”, e *todo o espectro de análogos deste*.

[0025] Estes agentes mucolíticos incluem a cisteína (L-cisteína, D-cisteína, DL-cisteína), e seus análogos e derivados tais como:

- DL-Homocisteína;
- L-cisteína metil éster;
- L-cisteína etil éster;
- N- carbamoil cisteína, cisteamine;
- N- (2-mercaptoisobutiril)-L-cisteína;
- N- (2-mercaptopropionil)- L-cisteína –A;
- N- (2-mercaptopropionil)-L-cisteína –B;
- N- (3-mercaptopropionil)-L-cisteína;
- L-cisteína etil éster hidrocloreto;
- L-cisteína metil éster hidrocloreto;
- nacistelina (um sal de lisina de N-acetilcisteína);
- N-acetilcisteína (NAC); e
- S-carbometil cisteína (carbocisteína).

[0026] Um dos mais conhecidos agentes mucolíticos é o N-acetil L-cisteína (NAC) que hidrolisa as pontes dissulfeto de resíduos de cisteína das proteínas bacterianas fitopatógenas, desestruturando o biofilme, sendo que este agente é eleito pelo requerente para consolidar uma forma de realização preferida do “*composto de análogos do aminoácido de cisteína*”, que será objeto de prolongada explanação no tópico de detalhamento do invento.

[0027] Dos Critérios de decisão de escolha: para a definição da escolha do

“aminoácido de cisteína (ou seus análogos)” no desenvolvimento do composto inventivo o requerente definiu como requisitos do produto: margem de segurança para o consumidor; margem de segurança para o meio ambiente e viabilidade econômica do produto, cujo enquadramento podese evidenciado:

1. Margem de segurança do consumidor: ao eleger os “agentes mucolíticos” que atuam desestruturando o biofilme bacteriano, e especificamente o “aminoácido de cisteína (ou seus análogos)”, o requerente garante o requisito de não toxicidade do produto quanto aplicado na planta acometida de doença oriunda de bactéria fitopatogena, bem como presente na forma de resíduo incorporado ao alimento por ela gerado, onde tal afirmativa é consolidada pelo fato concreto de que o “aminoácido de cisteína”, em especial o agente análogo N-acetil L-cisteína (NAC) vem sendo há muitos anos utilizado na composição de “medicamento de ação mucolítica” aplicado em adultos e crianças, onde para que este procedimento difundido seja realizado de forma legal, diga-se regulamento por órgão competentes como ANVISA, o requerente se apropria de todos os testes de toxicidade realizados em seres humanos e animais exaustivamente repetidos.

[0028] Para consolidar a afirmativa do parágrafo anterior o requerente evidencia o uso do agente análogo do aminoácido cisteína, N-acetil L-cisteína (NAC) que é utilizado na medicina animal para o tratamento de doenças congestivas e obstrutivas pulmonares associadas à hipersecreção da mucosa, como bronquite crônica e fibrose cística, e em intoxicações por paracetamol. Nesses casos, o N-acetil L-cisteína (NAC) atua como um agente mucolítico. Porém também foi reportada sua utilização para reduzir a adesão de bactérias patogênicas humanas, como *Streptococcus epidermidis*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis* em células epiteliais (ZHENG *et al.*, 1999) e em superfície abiótica (OLOFSSON *et al.*, 2003). Parry *et al.* (1976), onde em adição também demonstraram a eficiência do composto NAC sobre a adesão de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* e *Staphylococcus aureus*.

[0029] Esses trabalhos demonstram a ampla influência do N-acetil L-cisteína

(NAC) na formação do biofilme, tanto em bactérias patogênicas de humanos Gram positivas como Gram negativas, fato esse que inspirou o requerente a utilizar dito agente na inibição de biofilme presente em plantas de interesse agrícola acometidas de doenças bacterianas.

[0030] 2. Margem de segurança meio ambiente: uma das características do “*aminoácido de cisteína ou seus análogos*” reside no fato de que são de fácil absorção, bem como sua meia vida no meio ambiente é comprovadamente curta, o que faz com que a substância não apresente riscos de impacto ambiental.

[0031] 3. Viabilidade econômica: do ponto de vista da agroindústria o requerente consolidou conhecimento de que a produção em escala industrial do “composto de *aminoácido de cisteína (ou seus análogos)*”, nas mais variadas formas de apresentação é ancorada em baixo custo, ou seja, será de fácil acesso, tanto para o grande como para o pequeno agricultor.

[0032] Consolidação da atividade inventiva: em consulta nos diversos bancos de patente foram encontrados alguns pedidos de patente relacionados às possíveis aplicações do análogo de cisteína N-acetil L- cisteína (NAC) na área da farmacologia, onde este se notabiliza por atuar como agente antioxidante e para tratamento do envelhecimento.

[0034] Por sua vez a pesquisa realizada no banco de dados (Esp@cenet) identificou o pedido de patente KR20080007474 (A) com data de depósito 21/01/2008, cuja leitura atenta de seu texto evidência o uso do análogo de cisteína NAC-AMIDE como um agente antioxidante capaz de tornar as plantas mais resistentes ao estresse oxidativo causado por fatores bióticos e abióticos.

[0035] Por outro lado, a publicação de 1968 KODAMA, H. “3-(S-cystein)glutaric acid, S-(1-methyl-2-carboxyethyl)-cysteine in human urine”. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 165, issue 3, p. 432-437 não mostra o uso de N-acetil cisteína em agricultura, ou seja, em plantas, nem direciona qualquer pesquisa nesse sentido.

[0036] A publicação de 2000, RIISE, G.C. *et al.* “Inhibitory effect of N-acetylcysteine on adherence of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* to human oropharyngeal epithelial cells *in vitro*”. *Respiration*, n. 67, p. 552-558 descreve o uso de N-acetil-cisteína em humanos, não revelando qualquer pesquisa ou direcionamento para plantas.

[0037] A publicação de 2003 OLOFSSON, A. *et al.* “N-acetyl-cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solid surfaces”. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69, n. 08, p. 4814-4822 também não descreve o uso do N-acetil-cisteína na agricultura ou qualquer pesquisa nesse sentido.

[0038] A publicação de 2002 LEITE, B. *et al.* “Genomics and X-ray microanalysis indicate that  $Ca^{2+}$  and thiols mediate the aggregation and adhesion of *Xylella Fastidiosa*”. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, n. 35, p. 645-650, a exemplo das anteriores, não se volta ao uso do N-acetil-cisteína para plantas ou qualquer outro organismo.

[0039] Como se verifica do acima exposto nenhum dos documentos citados apresenta conceito inventivo que antecipa a matéria objeto de reivindicação de privilégio desta cártula, que por sua vez traz em seu bojo como *característica distintiva* o fato de que o “*composto de aminoácido de cisteína ou seus análogos*” atuar de forma decisiva na desestruturação de *biofilmes microbianos* gerados por bactérias fitopatógenas, garantindo assim a condição de ineditismo e atendimento ao requisito de atividade inventiva, que seja uma inédita prevenção ou inédito tratamento de doenças em plantas de interesse agrícola acometidas pela ação de bactérias fitopatogênicas, algo que até então nunca foi tentado, fazendo uso de produto não tóxico, de fácil absorção e meia vida no meio ambiente comprovadamente curta.

[0040] Em complemento, além do “*composto de aminoácido de cisteína ou seus análogos*” inibir a formação de biofilme, o mesmo se apresenta tóxico para as

células da bactéria fitopatogena, notadamente para a bactéria *X. fastidiosa* e *X. citri* in vitro e na planta; pois houve grande diminuição da massa celular e quantidade de células vivas, em comparação com o controle sem adição da substância (dados experimentais in vitro e na planta).

[0041] Da forma de apresentação do produto: a inédita aplicação do “*composto de aminoácido de cisteína ou seus análogos*” na agricultura poderá ser ofertado ao agricultor nas mais diversas formas de apresentação, onde, no entanto encontra destaque a forma de comercialização do produto encapsulado, que traz em seu bojo o benefício de garantir uma liberação gradual da N-acetil-cisteína, e conseqüentemente acompanhando o desenvolvimento da planta na quase totalidade do ciclo de desenvolvimento da planta de interesse agrícola, reduzindo a necessidade de reaplicação do composto inventivo.

[0042] Do modo de aplicação: a ação do “*composto de aminoácido de cisteína ou seus análogos*” na prevenção ou tratamento da planta doente é ancorada em sua aplicação no solo na forma de fertirrigação “drench” (inundação de pequena área próximo a planta) ou alternativamente aplicado como um fertilizante na forma encapsulada, o que leva a uma absorção lenta, onde o “*composto de N-acetil-cisteína*” poderia ser absorvido pela raiz e conduzido para o xilema das plantas passando a atuar na desestruturação do biofilme microbiano.

[0043] Em adição o requerente também prevê o uso do “*composto de aminoácido de cisteína ou seus análogos*” de forma sazonal visando diminuir o título de *X. fastidiosa* dentro da planta, sendo aplicado nos períodos de maior probabilidade de dispersão da bactéria pelo vetor, uma vez que os sintomas podem reaparecer quando o tratamento é interrompido.

[0044] O requerente prevê ainda a possibilidade de uso do “*composto de aminoácido de cisteína ou seus análogos*” associado com o zinco (que é um micronutriente comumente aplicado na cultura de plantas de interesse agrícola) e desta forma potencializar a capacidade antimicrobiana do composto inventivo.

### **BREVE DESCRIÇÃO DE GRÁFICOS E TABELAS**

[0045] A complementar a presente descrição do relatório descritivo de modo a obter uma melhor compreensão das características da presente patente de invenção, acompanha esta, em anexo, conjunto de gráficos e tabelas, não sendo intencionados a limitar o escopo do invento, este sim limitado apenas ao explicitado no quadro reivindicatório, onde:

A Figura 1 é uma representação do modelo do modo de ação de NAC *in vivo*;

Figura 2 é uma representação ilustrativa da reação de derivatização de NPM com NAC;

O gráfico 1 é uma representação da quantificação da massa celular formada nos tratamentos com adição de 1 mg/mL, 2 mg/mL e 6 mg/mL de NAC e controle (sem adição do composto). As letras diferentes indicam uma diferença estatisticamente significativa ao nível de 5 % de probabilidade;

O gráfico 2 é uma representação da quantificação da massa celular planctônica formada nos tratamentos com adição de 1 mg/mL, 2 mg/mL e 6 mg/mL de NAC e controle (sem adição do composto). As letras diferentes indicam uma diferença estatisticamente significativa ao nível de 5 % de probabilidade;

O gráfico 3 é uma representação do número de células viáveis no biofilme de *X. fastidiosa* submetido a 1 mg/mL, 2 mg/mL e 6 mg/mL de NAC em comparação com a situação controle (sem adição do composto). Letras diferentes indicam que houve uma diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% de probabilidade;

O gráfico 4 é uma representação da curva padrão para quantificação de EPS (mg/L) elaborada através da medida de diferentes concentrações de glicose. A partir dessa curva padrão é possível a realização da correlação em a OD (densidade ótica) medida em espectrofotômetro com a quantidade de EPS na amostra;

O gráfico 5 é uma representação da

quantificação de EPS no biofilme de *X. fastidiosa* submetido a 1 mg/mL, 2 mg/mL e 6 mg/mL de NAC em comparação com a situação controle (sem adição do composto). Letras diferentes indicam que houve uma diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% de probabilidade;

O gráfico 6 é uma representação da curva padrão para a quantificação de células de *X. fastidiosa*;

O gráfico 7 é uma representação do número de células bacterianas quantificadas por qPCR nas amostras dos diferentes tratamentos do experimento 1;

O gráfico 8 é uma representação do número de células bacterianas quantificadas por qPCR nas amostras dos diferentes tratamentos do experimento 2;

O gráfico 9 é uma representação da Curva padrão de NAC. A curva relaciona a concentração das amostras em µg/mL, no eixo X, com o valor da área dos picos referentes ao NAC apresentados no cromatograma, no eixo Y;

O gráfico 10 é uma representação do cromatograma mostrando a menor concentração utilizada para a elaboração da curva, em verde, em comparação com a maior concentração, em preto. O primeiro pico é referente ao produto de derivatização NAC-NPM e o segundo, ao NPM Restante;

O gráfico 11 é uma representação do cromatograma das amostras do experimento de degradação ambiental de NAC após 1 (verde), 7 (vermelho) e 14 dias (azul). O primeiro pico é referente ao produto de derivatização NAC-NPM e o segundo, ao NPM restante.

### **DESCRIÇÃO DETALHADA**

[0046] A seguinte descrição detalhada deve ser lida e interpretada com referência aos desenhos, gráficos e tabelas apresentados, representando formas de realização preferida para o inédito composto de aminoácido de cisteína usado

na desestruturação de biofilmes microbianos quando do tratamento ou prevenção de doenças geradas por bactérias fitopatógenas que acometem plantas de interesse agrícola, onde para tal realizou completo estudo da mesma em escala laboratorial, elegendo o análogo de cisteína conhecido por N-acetil L-cisteína (NAC), não sendo intencionados a limitar o escopo do invento, este sim limitado apenas ao explicitado no quadro reivindicatório.

[0047] Primeiramente foram realizados ensaios *in vitro* para averiguar os possíveis efeitos do N-acetil L-cisteína (NAC) em biofilmes de *X. fastidiosa*. Após a obtenção desses resultados foram realizados experimentos *in vivo* com plantas de laranja Pêra com sintomas da CVC. Para todos os experimentos foi utilizada a estirpe 9a5c, reisolada em meio PW (Davis et al., 1981) de plantas de laranja 'Pêra' com sintomas de CVC mantidas sob condições de telado. Um inóculo da bactéria foi feito utilizando células recém isoladas da planta hospedeira (isolada inicialmente em meio PW) e colocadas para crescer em meio definido XDM<sub>2</sub> (Lemos *et al.*, 2003) a 29°C com rotação de 130 rpm. As células ficaram nessa condição por 6 a 7 dias até obtenção da densidade óptica (DO) de 0,3, equivalente a uma população de 10<sup>8</sup> UFC/mL.

#### Experimentos *in vitro*:

[0048] Para avaliar o efeito da N-acetil L-cisteína (NAC) no biofilme de *X. fastidiosa in vitro*, foram utilizadas diferentes concentrações do composto 1 mg/mL, 2 mg/mL e 6 mg/mL. O pH do meio de cultura foi corrigido com NaOH 1M após a adição das diferentes doses do análogo de cisteína N-acetil L-cisteína (NAC). Três mL do inóculo e 18 mL de meio XDM<sub>2</sub> foram colocados em *erlenmeyers* de vidro para crescimento do biofilme na superfície líquido-ar, assim como as diferentes concentrações de N-acetil L-cisteína (NAC). Após 14 dias para crescimento do biofilme, que é o tempo em que este atinge seu estágio de máxima densidade celular, foram realizadas as análises. Controles sem adição do composto também foram utilizados. A massa celular dos biofilmes formados na superfície líquido-ar de cada *erlenmeyer* foi quantificada pelo

método do cristal violeta descrito por Espinosa-Urgel *et al.*, (2000). Aos biofilmes coletados, lavados com água, foi adicionado 1 mL de cristal violeta 0,1% e depois de 5 minutos foram realizadas diversas lavagens com água. Um volume de 1 mL de etanol 100% foi adicionado e a absorbância das amostras medida a 590 nm. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste *t* ( $P \leq 0.05$ ) com o programa *Assistat 7.3 beta software* (<http://assistat.sites.uol.com.br>). Foram realizadas 3 repetições biológicas. Os mesmos procedimentos e análises também foram realizados com as células recuperadas, após centrifugação para precipitação do *pellet*, do meio de cultura restante em cada *erlenmeyer*. Essas células restantes em suspensão no meio de cultura representariam a fração planctônica.

[0049] A massa celular dos biofilmes submetidos às diferentes dosagens de NAC foi reduzida em relação à condição controle (vide gráfico 1). Nota-se que a maior diminuição da massa celular ocorreu com a maior dose de N-acetil L-cisteína (NAC), 6 mg/mL, chegando a uma redução de aproximadamente 100%.

[0050] Já a quantificação da massa celular das células planctônicas presentes em cada *erlenmeyer* evidencia um aumento de massa quando foram adicionadas as diferentes dosagens de NAC (vide gráfico 2).

[0051] Com a determinação da massa celular, no entanto, ambas as células, vivas e mortas são quantificadas, assim mesmo que exista um grande valor de massa celular, essa poderia ser composta apenas por células mortas. Com a diluição seriada e contagem do número de colônias é estimado o número de células vivas presentes nas amostras. O número de unidades formadoras de colônia (UFC) das células da bactéria em biofilme na presença das diferentes concentrações de N-acetil L-cisteína (NAC) foi avaliado após diluição seriada de três repetições biológicas e três placas por repetição. Controles sem adição de N-acetil L-cisteína (NAC) também foram avaliados. Os mesmos procedimentos e análises também foram realizados com as células da fração planctônica presente em suspensão no meio de cultura em cada *erlenmeyer*. No entanto, após centrifugação do meio de cultura restante em cada *erlenmeyer*

para recuperação das células planctônicas, as mesmas foram lavadas com água *mili-Q* por 3 vezes através de repetidas pipetagens antes da diluição seriada das mesmas. Esse procedimento foi adotado na tentativa de eliminar qualquer resíduo de N-acetil L-cisteína (NAC), e assim a possibilidade da substância estar agindo apenas como um agente bacteriostático.

[0052] Para o tratamento com 6 mg/mL de N-acetil L-cisteína (NAC) o número de células vivas presentes no biofilme teve uma redução de quase 100% (vide gráfico 3), o que condiz com os resultados de massa celular.

[0053] Pelos resultados da viabilidade celular e massa celular obtidos observou-se que o N-acetil L-cisteína (NAC) já na concentração de 1 mg/mL foi capaz de inibir o crescimento da bactéria, uma vez que a quantificação de UFC/mL foi menor do que no biofilme controle.

[0054] Com relação à diluição seriada das células planctônicas o que observamos foi o oposto do ocorrido com os resultados de massa celular. Apesar desta ter aumentado nos diversos experimentos com N-acetil L-cisteína (NAC), constatou-se que as células em suspensão estão mortas, já que em diluição seriada das mesmas não foi possível a contagem de nenhuma UFC (dados não mostrados). Já no experimento controle, foi possível a contagem de grande quantidade de células, o que mostra que no controle, apesar da maioria das células estarem formando o biofilme, também é possível encontrar parte delas na fase planctônica.

[0055] Ainda, foram quantificados os expopolissacarídeos (EPS) totais de cada amostra através do método fenol-ácido sulfúrico descrito por Dubois *et al* (1956). A curva padrão foi elaborada com a utilização de diferentes concentrações de glicose e a análise estatística foi realizada pelo teste  $t$  ( $P \leq 0.05$ ) com o programa *Assistat 7.3 beta software* (<<http://assistat.sites.uol.com.br>>). Foram realizadas 3 repetições biológicas e 6 medidas por repetição.

[0056] A regressão linear ( $y = 52.145x - 3.2503$ ) a partir da curva elaborada com concentrações conhecidas de glicose foi utilizada para o cálculo dos valores

de EPS em mg/L (vide gráfico 4). A quantidade de EPS total foi maior no controle em relação aos tratamentos com N-acetil L- cisteína (NAC), como pode ser visualizados no gráfico 5.

[0057] De acordo com os experimentos de cristal violeta, a massa celular do biofilme quando submetido às diferentes dosagens de N-acetil L-cisteína (NAC) foi menor, chegando a diminuir cerca de 100% com 6 mg/mL de N-acetil L-cisteína (NAC). Já a diminuição do EPS observada entre o controle e quando adicionada 6 mg/ml de N-acetil L-cisteína (NAC), por exemplo, foi apenas ao redor de 45%, logo, a média de produção de EPS por célula provavelmente aumentou, o que poderia ser uma tentativa das bactérias de dificultar a penetração do N-acetil L-cisteína (NAC) no biofilme. Indução do EPS como um mecanismo de resposta a compostos antimicrobianos já foi reportada como forma de aumentar a resistência de bactérias (Wai et al, 1998).

[0058] Pelos resultados obtidos nesse trabalho, também sugere-se uma possível ação tóxica do N-acetil L-cisteína (NAC) para as células bacterianas, já que através dos estudos com a diluição seriada de amostras de biofilme para contagem de UFC (unidades formadoras de colônia) foi possível verificar um menor ou não crescimento das bactérias quando submetidas ao tratamento com o N-acetil L-cisteína (NAC).

[0059] Esse resultado poderia ser explicado por uma ação bacteriostática do N-acetil L-cisteína (NAC) ou um efeito tóxico que resultaria na morte celular da bactéria. A hipótese do efeito bacteriostático foi descartada uma vez que novos experimentos de diluição seriada foram realizados depois de 3 lavagens com água (visando eliminar qualquer resíduo de NAC) e o não crescimento das células continuou sendo observado. Além disso, em uma situação *in vitro* na qual não existem as respostas de defesa da planta infectada nem a forte pressão do fluxo xilema e os nutrientes encontram-se disponíveis no meio de cultura, se a ação da molécula fosse apenas na desestruturação do biofilme, este apenas não se formaria mas as células poderiam continuar vivas na forma planctônica, porém isto não ocorreu.

[0060] Assim, presume-se que o N-acetil L-cisteína (NAC) possua uma ação tóxica para as células de *X. fastidiosa*. Risii e colaboradores (1999) também citam um possível efeito tóxico do N-acetil L- cisteína (NAC).

[0061] Como o N-acetil L-cisteína (NAC) se mostrou uma molécula promissora para o controle do biofilme de *X. fastidiosa in vitro*, foram realizados alguns estudos com plantas de laranja Pêra com sintomas de doença clorose variegada dos citros (CVC). Essas plantas foram submetidas ao tratamento com diferentes doses de N-acetil L-cisteína (NAC). Foram realizadas as seguintes análises:

1. Da sintomatologia das plantas: comparação visual dos sintomas foliares apresentados pelas plantas sem nenhum tratamento (plantas controle) e com a adição das diferentes doses de N-acetil L-cisteína (NAC);
2. Isolamento da bactéria: para obtenção de uma estimativa do número de bactérias presentes em cada amostra das plantas (com os diferentes tratamentos com N-acetil L-cisteína (NAC) e sem tratamento, as plantas controle);
3. Isolamento da bactéria: pois na técnica de qPCR, bactérias vivas e mortas podem ser quantificadas. Já com a técnica de isolamento apenas bactérias vivas crescem em placa com meio de cultura específico para *X. fastidiosa*;
4. Análise do N-acetil L-cisteína (NAC) por HPLC: foi desenvolvido um método de quantificação da substância por HPLC.

[0062] Através dessa metodologia quantificou-se a quantidade (concentração) inicial de N-acetil L-cisteína (NAC) utilizada em cada tratamento e após 1 dia na presença da planta. Essa análise foi realizada para que possibilitar averiguar se a substância estaria sendo translocada pela planta e assim, possibilita que possíveis resultados diferenciais obtidos através das análises anteriores sejam associados à presença do N-acetil L-cisteína (NAC).

[0063] Na sequencia desse tópico descritivo encontra-se uma descrição dos procedimentos realizados para cada uma dessas análises:

Experimentos in vivo:

1. Transmissão da CVC de plantas de laranja pêra infectadas para mudas sadias: a clorose variegada dos citros (CVC) foi transmitida para mudas sadias de laranja pêra (*Citrus sinenses*) através das técnicas de encostia e garfagem. Para a técnica da encostia, um segmento do caule de uma planta de laranja Pêra com os sintomas de CVC (planta fonte) foi cortado e o câmbio colocado em contato com o de uma muda sadia (muda receptora), sendo essa área de contato entre os câmbios de aproximadamente 5 cm. Já na técnica da garfagem um pedaço de ramo destacado (garfo) da planta fonte foi justaposto sobre a muda sadia e a região amarrada e recoberta com fita plástica usada em trabalhos de enxertia. As mudas foram mantidas em tubetes com um sistema de irrigação e sob condições de telado. Após 30 dias da inoculação as plantas foram avaliadas através da amostragem de folhas coletadas acima da região da encostia ou garfagem. Foi realizada a extração de DNA total para a detecção molecular de *X. fastidiosa* via PCR convencional com a utilização de *primers* específicos para *X. fastidiosa* dos citros (CVC1 / 272-2 int) (Hartung & Pooler, 1995). As mudas com diagnóstico positivo para a presença da bactéria foram então utilizadas para os experimentos com NAC;

2. Experimentos com NAC nas mudas infectadas: Foi realizada uma análise com PCR quantitativo, conforme descrito em seqüência, para quantificação da população inicial de bactéria nas plantas. As plantas foram então transferidas para vasos de Leonard, construídos a partir de garrafas de vidro de 750 mL cortadas e pintadas com tinta metálica para evitar a penetração de luz. Na parte de cima do vaso foram adicionadas vermiculita e areia, previamente autoclavadas, e na parte coletora, solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) (Figura 8). Foram realizados dois experimentos com as diferentes doses de N-acetil L-cisteína (NAC), ambos conduzidos em casa de vegetação (vide Tabela 1):

**Tabela 1.** Quadro resumo das análises realizadas em cada um dos experimentos realizados *in vivo*:

<b>Análises / Experimento</b>		<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Doses de NAC utilizadas</b>		120 e 600 mg	120, 600 e 1500 mg
<b>Quantificação da bactéria por qPCR</b>	<i>Tempo 0</i>	Sim	Sim
	<i>Após 1 mês</i>	Sim	Não
	<i>Após 3 meses</i>	Sim	Sim
<b>Quantificação do NAC por HPLC</b>		Sim	Sim
<b>Isolamento da bactéria após 3 meses de tratamento</b>		Não	Sim
<b>Avaliação visual dos sintomas folhares</b>		Sim	Sim
<b>Avaliação visual dos sintomas após interrupção do tratamento com NAC</b>		Não	Sim

[0064] O primeiro dos experimentos foi um piloto, no qual foram adicionadas 120 mg e 600mg de N-acetil L-cisteína (NAC) em 250 mL de solução de Hoagland & Arnon (1950), assim como foram mantidos plantas controle, sem adição de N-acetil L-cisteína (NAC). Já o segundo ensaio contou com plantas com adição de 120 mg, 600 mg e 1500 mg de N-acetil L-cisteína (NAC) junto com 250 mL da solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) e experimentos controle sem a adição do composto. Foram realizadas 4 repetições biológicas para cada tratamento em cada experimento;

3. Coleta das amostras para HPLC e PCR quantitativo em tempo real (qPCR): as amostras para análise em HPLC foram coletadas da solução nutritiva presente na parte coletora dos vasos e o restante da solução descartada. As amostras foram alocadas em freezer -80°C para posterior análise. No primeiro experimento realizado, após 30 e 90 dias de tratamento, foram coletadas folhas, escolhidas aleatoriamente, de cada planta. Já no segundo experimento foram

coletadas as primeiras folhas logo acima do ponto de encostia/ garfagem, mas apenas após 90 dias de tratamento com o N-acetil L-cisteína (NAC). O DNA foi extraído com o kit INVITEK (*Invisorb Spin Plant Mini Kit*) para a quantificação da bactéria por qPCR. Após a última coleta com 90 dias de tratamento as mudas do segundo experimento foram plantadas em solo e permaneceram na casa de vegetação para avaliação dos sintomas e desenvolvimento da planta após interrupção do tratamento com o N-acetil L-cisteína (NAC);

4. Sintomatologia da CVC nas plantas: no início dos experimentos *in vivo* quando o tratamento com NAC ainda não havia sido iniciado, todas as plantas apresentavam sintomas típicos da CVC, como pode ser observado na figura 9. A quantidade de células bacterianas presente nas amostras coletadas de cada planta foi determinada por qPCR e será apresentada no tópico seguinte. Após 3 meses de tratamento com o N-acetil L- cisteína (NAC) em ambos os experimentos, a redução visual dos sintomas foliares foi evidente, quando comparadas com as folhas coletadas após os 2 meses de interrupção do tratamento em que as plantas foram mantidas em casa de vegetação e plantadas em solo (amostras providas do experimento 2).

[0065] No controle, sem tratamento com o N-acetil L- cisteína (NAC), foi visualizado um maior número de folhas com manchas cloróticas e necróticas além de sua incidência dos sintomas por folha também ter sido maior.

[0066] Por sua vez nos tratamentos com 120 e 600 mg de N-acetil L-cisteína (NAC) ainda foi possível a visualização de alguns pontos cloróticos nas folhas, mas em menor quantidade.

[0067] A doença foi mais severa nas plantas que não receberam o tratamento com N-acetil L-cisteína (NAC).

[0068] Já nas plantas que receberam 1500 mg de N-acetil L-cisteína (NAC), quase não foi possível a visualização de sintomas, mas o desenvolvimento da planta foi claramente afetado. As folhas estavam sempre com a aparência de murcha e uma coloração amarela, que indica falta de micronutrientes, e que dificultou a identificação de sintomas típicos da CVC, efeitos similares ao

descritos acima são proporcionados pelo PEG, agente capaz de induzir estresse osmótico em plantas. Após 2 meses plantadas em solo essas plantas voltaram a brotar e crescer.

[0069] Após 2 meses de cultivo em solo, e sem tratamento com o N-acetil L-cisteína (NAC), foi possível averiguar que nas plantas que não haviam sido tratadas com o N-acetil L-cisteína (NAC), os sintomas da CVC apresentaram-se mais severos. As manchas cloróticas ocupavam a maior parte das folhas provocando lesões mais graves. Além disso, a quantidade de folhas apresentando os sintomas da doença foi maior nas plantas sem tratamento com o N-acetil L-cisteína (NAC).

[0070] Já nas plantas que foram expostas à 120 e 600 mg de N-acetil L-cisteína (NAC), mesmo após 2 meses sem o tratamento, foram observados sintomas menos severos. As plantas que foram submetidas ao tratamento com 1500 mg de N-acetil L-cisteína (NAC) mantiveram-se menos desenvolvidas, no entanto, várias brotações foram observadas. As folhas geralmente apresentavam-se menores e de coloração mais clara, indicando serem folhas novas. Nas mesmas não foram visualizadas manchas cloróticas;

5. Quantificação absoluta da população bacteriana por qPCR: para quantificação absoluta foi necessário inicialmente estabelecer uma curva padrão (vide gráfico 6). Para tal, foi extraído DNA de *X. fastidiosa* e o número de células presente na amostra determinado de acordo com o seguinte raciocínio: uma fita de DNA de *X. fastidiosa* possui 2679310pb, que foi multiplicado por 660 daltons, que é o peso molecular referente a 2 bases de nucleotídeos. Foi realizada então a conversão de Daltons para nanogramas (ng) e o número de células de cada amostra então calculado. Também foi realizada a extração e cálculo da quantidade de células presentes em cada amostra de DNA das folhas de laranja Pêra sadia. Foi feita uma diluição seriada de uma amostra de DNA de *X. fastidiosa* com número de células previamente determinado como descrito anteriormente. Essa diluição foi misturada a uma amostra de DNA de folhas de laranja Pêra sadia.

[0071] O DNA extraído das folhas das plantas submetidas aos diferentes tratamentos com N-acetil L-cisteína (NAC) foi quantificado por espectrofotômetro e sua quantidade padronizada. As amostras foram então analisadas pelo qPCR em triplicata utilizando o aparelho ABI 7500 (Applied Biosystems).

[0072] Após a elaboração da curva o número de células bacterianas em cada amostra foi calculado, plotando-se o valor de Ct de cada amostra na curva padrão anteriormente gerada. O número médio de células de *X. fastidiosa* em cada amostra do experimento 1 pode ser visualizado na no gráfico 7 e do experimento 2, no gráfico 8. O tempo zero é referente à primeira coleta das folhas das plantas antes do início do tratamento com N-acetil L-cisteína (NAC) e os tempos 1 e 3 referentes às coletas realizada após 1 e 3 meses de tratamento.

[0073] Pelos resultados do experimento 1 é possível averiguar que não existe uma grande diferença entre o número de células bacterianas quantificadas com 1 ou 3 meses após o tratamento com o N-acetil L- cisteína (NAC), assim, no experimento 2 foram realizadas análises apenas após de 3 meses de tratamento. Durante os três meses do experimento foi observada uma diminuição do número inicial de bactérias nas plantas independente do tratamento avaliado, até mesmo no controle e, de modo geral, a quantidade de bactérias em cada planta parece não ter sido afetada pela presença do N-acetil L-cisteína (NAC);

6. Isolamento de bactérias dos pecíolos das folhas através de diluição seriada: como as bactérias quantificadas através da técnica do qPCR poderiam estar mortas, foi realizado um isolamento, através de diluição seriada, das amostras do segundo experimento após 3 meses de tratamento com o N-acetil L-cisteína (NAC). Para isso a nervura principal e pecíolo de cada folha foram esterilizados, cortados e macerados junto com 1 mL de tampão PBS. Foram retirados 100 µL desse tampão contendo as partes foliares maceradas e realizada uma diluição serial dessa amostra. Cada diluição foi plaqueada em

placa contendo meio PW sólido com BSA (*bovineserum albumin*) (Davis et al., 1981). Foram plaqueadas as seguintes diluições de todas as amostras:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ . Após 30 dias, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi contado.

[0074] Para as plantas do experimento 2, também foi realizado o isolamento das bactérias presentes nas amostras de folhas coletadas após 3 meses de tratamento com o N-acetil L-cisteína (NAC). Para algumas repetições dos tratamentos utilizados não pode ser visualizada nenhuma colônia, mesmo após 30 dias do isolamento, tal como evidenciado através da tabela 2.

Tabela 2. Número de UFC/mL em cada amostra do experimento 2:

I	Controle	--- <sup>a</sup>
II	Controle	2,6E+06
III	Controle	2,58E+05
IV	Controle	2,96E+05
I	120 mg	9E+04
II	120 mg	--- <sup>a</sup>
III	120 mg	--- <sup>a</sup>
IV	120 mg	--- <sup>a</sup>
I	600 mg	3E+04
II	600 mg	--- <sup>a</sup>
III	600 mg	--- <sup>a</sup>
IV	600 mg	4,8E+04
I	1500 mg	5E+04
II	1500 mg	6E+03
III	1500 mg	2E+04
IV	1500 mg	--- <sup>a</sup>

<sup>a</sup> não crescimento em meio de cultura.

[0075] A não determinação do número de colônias pode ser decorrente da não presença dessas células vivas nas amostras coletadas das plantas ou à própria técnica do isolamento. No entanto, como todos os procedimentos foram

realizados no mesmo dia, com as mesmas soluções e pela mesma pessoa, são fortes os indícios de que a não detecção de células seria decorrente da não presença (ou morte), ou severa redução da bactéria na planta. Através dos dados obtidos é possível observar uma diminuição do número de células de *X. fastidiosa* com o tratamento com o N-acetil L-cisteína (NAC). Além disso, para as amostras em que foi possível determinar o número de UFC, os dados resultantes da técnica de isolamento foram condizentes com aqueles encontrados utilizando-se qPCR;

7. Quantificação do NAC por HPLC: para o desenvolvimento do método de quantificação do N-acetil L-cisteína (NAC) foi utilizado um cromatógrafo Agilent Serie 1200 Modular, com um degaseificador (G1322A), bomba quaternária (DE62964634), auto-injetor (DE64766244), forno de coluna (DE63072817) e um detector UV-Vis (DE 7161511). Os cromatogramas foram registrados através do *software* EZCrom. A separação cromatográfica foi realizada no modo reverso de eluição, utilizando uma coluna analítica octadecilsilica (C18) Luna<sup>®</sup> (II) Phenomenex<sup>®</sup> (250 x 4,6 mm, 5µm, 100 Å - Torrance, CA, U.S.A.), acoplada a uma coluna de segurança (Pré-coluna) utilizando um cartucho HOLDER<sup>®</sup> bicompartilhado contendo, em seu interior, um cartucho de segurança C18 (4x3 mm, de 5 µm, 100 Å) também adquirido da Phenomenex<sup>®</sup>. Foi realizada a derivatização do N-acetil L-cisteína (NAC) com N-(1-pyrenyl) maleimide (NPM) como proposto por Wu et al. (2006), vide figura 1.

[0076] Por sua vez o limite de detecção calculado foi de 1,5 µg/mL e o limite de quantificação foi de 4,5 µg/mL. O limite de quantificação encontra-se abaixo do primeiro ponto da curva (5 µg/mL) o que mostra que a curva do N-acetil L-cisteína (NAC) gerada esta adequada.

[0077] Foram verificadas a precisão e exatidão intra e interdia. Para isso, foram avaliadas 3 concentrações de N-acetil L-cisteína (NAC): uma baixa (correspondente a 120% da primeira concentração da curva analítica) de 6 µg/mL, uma média (41,67% da concentração mais alta da curva analítica) de 50

µg/mL, e outra alta (90% da maior concentração da curva analítica) de 90 µg/mL. A precisão e exatidão intradia foi avaliada através de análises em quintuplicata das respectivas soluções em um mesmo dia e a interdia foi obtida nas mesmas condições através de análises feitas em 3 dias não consecutivos. Como os coeficientes de variação medidos para os testes de precisão e exatidão ficaram abaixo de 2,0, que é o valor máximo permitido, o método desenvolvido para a quantificação do N-acetil L-cisteína (NAC) mostrou-se preciso, exato e robusto. [0078] A partir da curva elaborada, a concentração de N-acetil L-cisteína (NAC) presente em cada uma das amostras coletadas da parte coletora dos vasos de Leonard pôde então ser determinada, tal como evidencia a Tabela 3:

Tabela 3. Quantificação de NAC nas amostras coletadas

<b>NAC total*</b>	<b>Conc. esperada **</b>	<b>Conc. medida</b>	<b>desv. Pad.</b>
<b>120 mg</b>	0,48 mg/mL	0,288 mg/mL	0,0811
<b>600 mg</b>	2,4 mg/mL	1,98 mg/mL	0,4577
<b>1500 mg</b>	6 mg/mL	6,156 mg/mL	0,1818

\*Quantidade total de NAC adicionado em cada um dos tratamentos

\*\*Concentração de NAC calculada dividindo-se a quantidade total de NAC por 250 mL de solução nutritiva.

[0079] Também foi realizado um estudo para verificar a degradação do N-acetil L-cisteína (NAC) na solução nutritiva de Hoagland nas mesmas condições em que o experimento *in vivo* foi realizado. A solução nutritiva de Hoagland foi preparada e colocada na parte receptora dos vasos de Leonard (sem as plantas), assim como 600 mg de N-acetil L-cisteína (NAC). Os vasos de Leonard foram mantidos em casa de vegetação e após 1, 7 e 14 dias amostras recolhidas para quantificação do N-acetil L-cisteína (NAC) em HPLC. Após a derivatização e análise das amostras esperava-se obter 187,5 µg/mL (750µg/mL dividido por 4, fator de diluição da amostra durante

a reação de derivatização) de NAC se este não tivesse sofrido nenhuma degradação, no entanto, após 1 dia a concentração de N-acetil L-cisteína (NAC) foi de 143,14µg/mL e após 7 e 14 dias, esta diminuiu para 63,22 µg/mL e 3,15 µg/mL, respectivamente (vide gráfico 11). A degradação da substância não seguiu uma taxa padrão, no entanto esse fato pode ser atribuído às diferentes temperaturas médias diárias, uma vez que durante as semanas de realização dos experimentos a flutuação de temperatura foi alta entre os di.

[0080] Assim, os experimentos *in vivo* também apontaram o N-acetil L-cisteína (NAC) como sendo uma molécula promissora para o controle do biofilme de *X. fastidiosa*. Os sintomas da CVC foram visivelmente menores quando as plantas foram submetidas ao tratamento com o N-acetil L- cisteína (NAC). Além disso, os resultados obtidos pelo isolamento de *X. fastidiosa* em meio de cultura sólido mostraram diminuição do número de bactérias nas plantas submetidas ao tratamento com o N-acetil L-cisteína (NAC). Com o uso da técnica de HPLC foi possível averiguar que o N-acetil L- cisteína (NAC) poderia ser translocado pela planta, já que as concentrações medidas do composto estavam abaixo daquelas esperadas, e assim, chegar aos vasos de xilema afetados pela bactéria. No entanto, com a adição de 1500 mg de N-acetil L- cisteína (NAC) a absorção da substância pela planta não ocorre. A adição de alta concentração do N-acetil L-cisteína (NAC) (1500 mg em 250 mL da solução nutritiva) possivelmente foi responsável por causar um estresse salino (osmótico) na planta que por sua vez ativaria alguns mecanismos para evitá-lo. Visualmente a quantidade de solução de Hoagland absorvida por essas plantas foi muito baixa, o que também acreditamos ser responsável pela murcha das folhas e menor desenvolvimento fisiológico das plantas, já que a planta também enfrentou o estresse hídrico.

[0081] Com 1500 mg de N-acetil L-cisteína (NAC), apesar da técnica de HPLC mostrar que a substância não estaria sendo absorvida pela planta, houve uma diminuição do número de bactérias e de sintomas visíveis nas amostras das

folhas. Podemos associar essa diminuição do número de bactérias e sintomas ao estresse osmótico, que por sua vez gerou um estresse hídrico na planta. O grande estresse proporcionado à planta pela alta concentração de NAC (1500 mg em 250 mL) causou uma queda das folhas, murcha e grande prejuízo visível para o desenvolvimento fisiológico da planta, assim essa talvez seja uma explicação do porque o número de bactérias quantificado tenha diminuído. Com as doses mais baixas (120 e 600 mg) de N-acetil L-cisteína (NAC), também foi observado uma grande diminuição dos sintomas e número de células bacterianas nas amostras das folhas, mas as plantas apresentaram o desenvolvimento fisiológico esperado para a idade e condições de crescimento. Assim, nessas doses o N-acetil L-cisteína (NAC) mostrou-se eficiente para o controle da bactéria não causando problemas para o desenvolvimento da planta.

[0082] Pelas evidências obtidas através da diminuição visual dos sintomas nas plantas submetidas ao tratamento com o N-acetil L-cisteína (NAC), acreditamos que a substância de fato esteja sendo translocada através dos vasos condutores de seiva bruta, no entanto, a concentração que de fato é apresentada às bactérias poderia ser bem menor do que a esperada.

[0083] Com base nos dados obtidos através dos experimentos realizados com as plantas, acreditamos que a substância possa ser absorvida e translocada através do xilema. Ao entrar em contato com a bactéria, por competição, evitar que as pontes dissulfeto célula-célula e célula-superfície, se formem e assim impede a formação eficiente do biofilme. Apesar de prevenir a formação do biofilme, como a dose de N-acetil L-cisteína (NAC) apresentada para a bactéria deve ser bem menor do que as testadas *in vitro* provavelmente devido ao modo de apresentação e translocação, o efeito tóxico da substância pode ter sido menor. Mesmo assim através da técnica de isolamento foi visto que as células bacterianas provavelmente diminuiriam dentro da planta. Desse modo, o N-acetil L-cisteína (NAC) não mataria todas as células, o que explicaria a pequena diferença observada no número de bactérias quantificadas, e não evitaria também que as bactérias se espalhassem pela planta.

No entanto, como os sintomas da doença têm sido associados à obstrução de vasos condutores, a não formação do biofilme evitaria que os sintomas aparecessem, tal como ilustrado na figura 2, onde em A, está ilustrado o modo de evolução normal da doença com o bloqueio dos vasos (Va) do xilema (X) e o aparecimento dos sintomas. As bactérias (Ba) começam um processo de adesão entre si e na superfície do xilema (X), com a formação do biofilme (Mf), responsável pela obstrução de vasos condutores (Va) e aparecimento de sintomas.

[0084] Já em B, o N-acetil L-cisteína (NAC) atua evitando a adesão e consequente formação do biofilme (Mf). A substância (NAC), por competição, se liga aos radicais das adesinas (fimbriais ou afimbriais) e do próprio xilema (X) não permitindo assim que as pontes dissulfeto entre as adesinas das bactérias (Ba) se realizem, evitando a formação do biofilme (Mf). Assim sintomas visíveis não seriam observados ou observados em menor grau de severidade, evitando os danos na produção dos frutos da planta de interesse agrícola.

[0085] Além disso, pelo modelo proposto, a ação do N-acetil L-cisteína (NAC) depende de sua disponibilidade para desfazer as pontes dissulfeto. Portanto, uma vez interrompida a apresentação da N-acetil L-cisteína (NAC) para a bactéria (Ba), como muitas ainda estariam vivas, poderiam formar o biofilme (Mf) e novamente os sintomas apareceriam.

[0086] Quando o tratamento com N-acetil L-cisteína (NAC) foi interrompido, durante os primeiros dois meses ainda foi possível observar uma diferença na quantidade de sintomas apresentada entre as plantas controle e as tratadas, no entanto após esse tempo observou-se o ressurgimento dos sintomas. Esse tempo entre o interrompimento do tratamento e o surgimento de novos sintomas seria o tempo que as bactérias, ainda presentes nas plantas levariam para formar seu biofilme e obstruir os vasos condutores.

[0087] Conclusão do estudo: ao final do experimento e com a análise e interpretação dos resultados obtidos é possível afirmar que fica comprovada a eficácia efetiva do N-acetil L-cisteína (NAC) que é um análogo de cisteína no

tratamento de doenças oriundas de bactérias fitopatológicas, especificamente pelo fato relevante de que foi observada expressiva inibição na formação de biofilme.

[0088] Ademais os experimentos revelam que dita eficácia no trato das doenças pela substância a base de N-acetil L-cisteína (NAC) no biofilme de *X. fastidiosa* em plantas de laranja Pêra com sintomas da clorose variegada dos citros (CVC), independente da dose de N-acetil L- cisteína (NAC) utilizada, pois para doses de 1,0, 2,0 ou 6,0 mg/mL o composto inibiu a formação de biofilme e foi tóxico para as células da bactéria, já que houve grande diminuição da massa celular e quantidade de células vivas, em comparação com a amostra de controle (este sem adição da substância). Os experimentos *in vivo* nas doses de 120 e 600 mg/ml também evidenciaram a ação da substância, proporcionando grande redução de sintomas nas plantas tratadas.

[0089] A escolha do análogo de aminoácido de cisteína N-acetil L-cisteína (NAC) como uma forma de realização preferida do “composto” ou “substância” objeto de reivindicação nesta cártula, bem como as formas de realização para os experimentos, “*in vitro*” e “*in vivo*” descritas neste tópico de detalhamento do invento são fornecidas apenas a título de exemplo. Alterações, modificações e variações podem ser realizadas para outras quaisquer formas de realização do “composto de aminoácido de cisteína (ou seus análogos)” por aqueles com habilidade na arte sem, no entanto divergir do objetivo revelado no pleito da presente patente, o qual é exclusivamente definido pelas reivindicações anexas.

[0090] Dentro do escopo do parágrafo anterior é possível afirmar que também se enquadra ao conceito inventivo do composto de aminoácidos de cisteína (L-cisteína, D-cisteína, DL-cisteína) na inibição da formação de biofilme microbiano em plantas de interesse industrial, toda sorte de derivados deste agente mucolítico, tais como ésteres, amidas, anidridos, e tiol-ésteres e tiol-éteres do grupo sulfidril da molécula. Exemplos incluem, mas não estão limitados a, metil-N-acetilcisteína, etil N-acetilcisteína, estearil N- cetilcisteína, N-acetilcisteína methiltioéter, N, S- diacetilcisteína, N- acetilcis- teína amida,

N-mercaptopetil-L- cisteína, e o mix de anidrido de N-acetilcisteína e ácido acético.

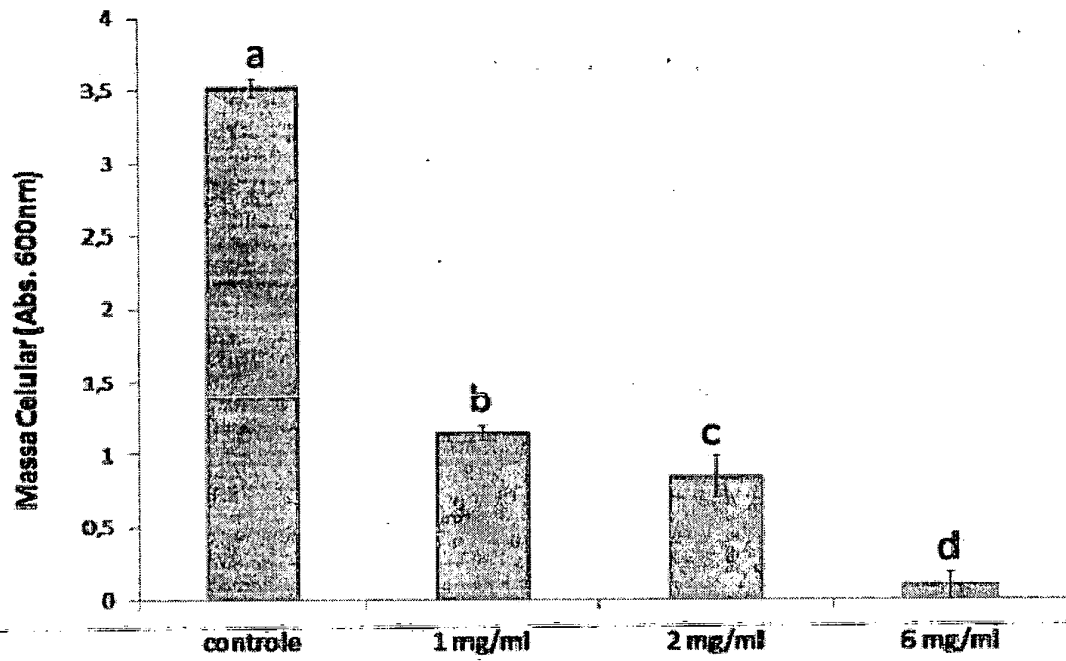
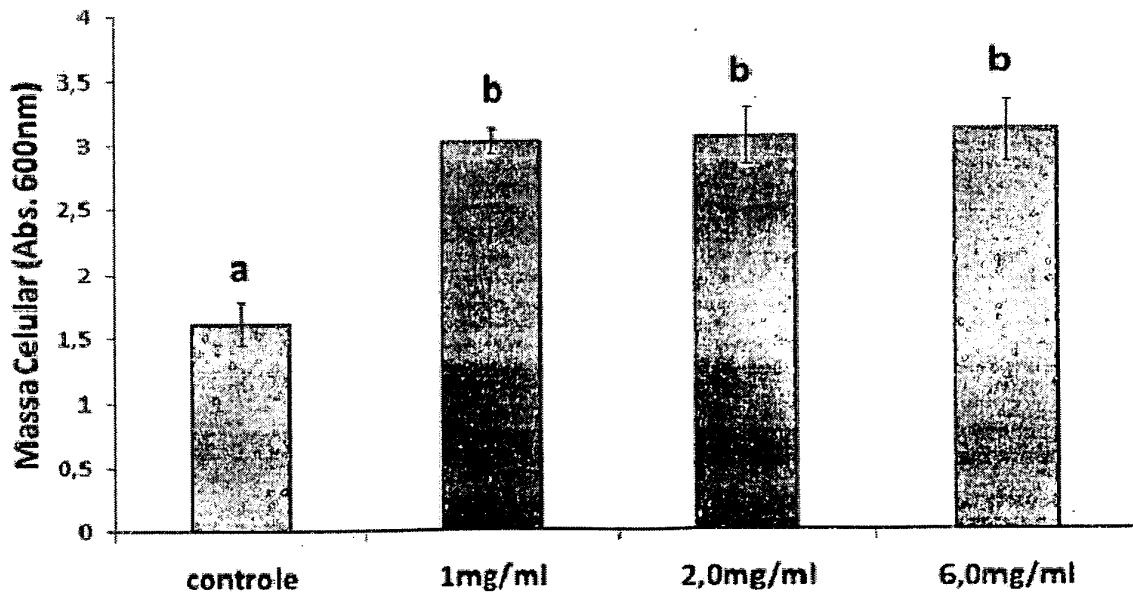
[0091] Sais de N-acetilcisteína e seus derivados também podem ser usados para desestruturação de biofilme. Exemplos destes sais incluem sais de sódio, tal como N-acetil-L-cisteína sódio zinco monohidratado, sais de potássio, de magnésio, de cálcio, de amônio, dentre outros.

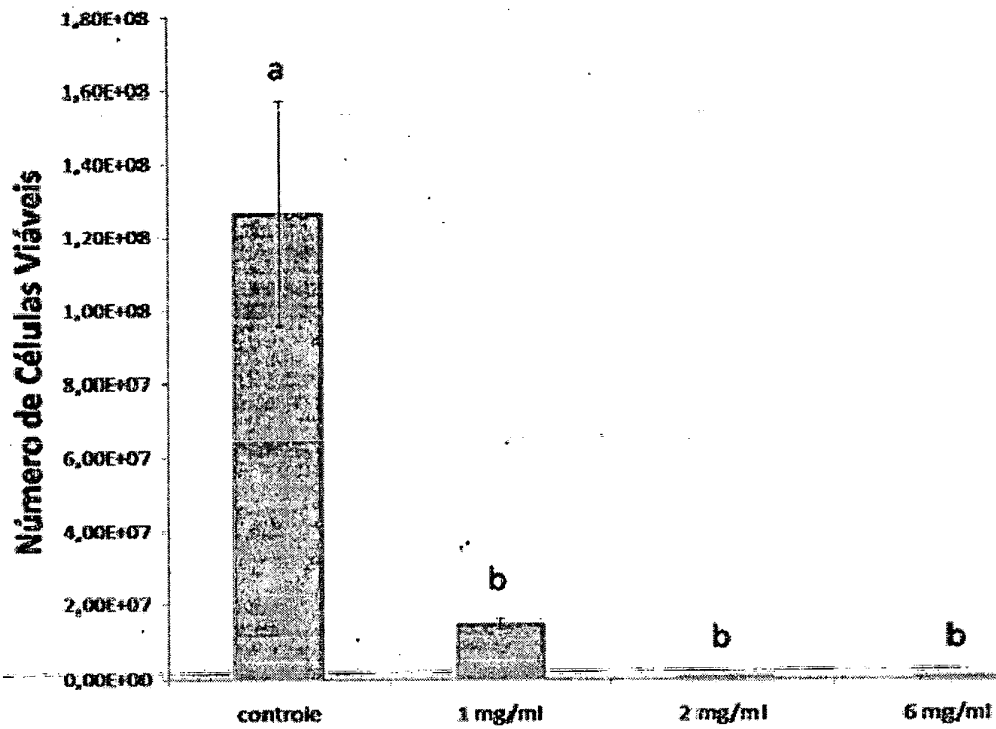
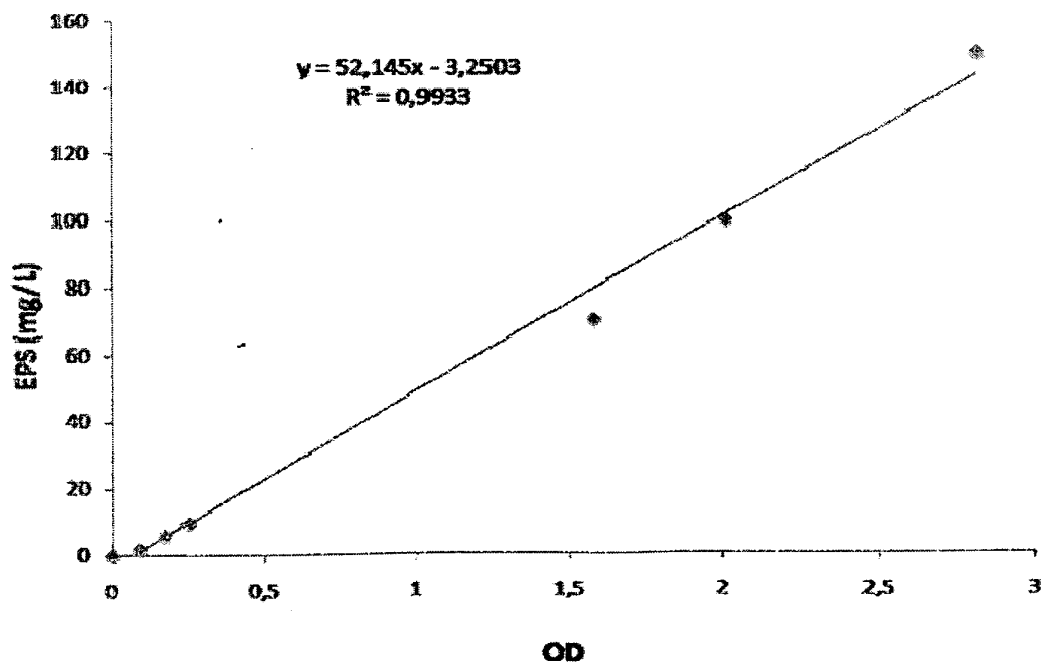
[0092] Verifica-se pelo que foi descrito e ilustrado que o “COMPOSTO DE N-ACETIL-CISTEINA PARA USO NA AGRICULTURA VISANDO O TRATAMENTO E PREVENÇÃO DE DOENÇAS GERADAS POR BACTÉRIAS QUE CAUSAM DOENCAS EM PLANTAS” ora reivindicado se enquadra às normas que regem a patente de invenção à luz da Lei de Propriedade Industrial, merecendo pelo que foi exposto e como consequência, o respectivo privilégio.

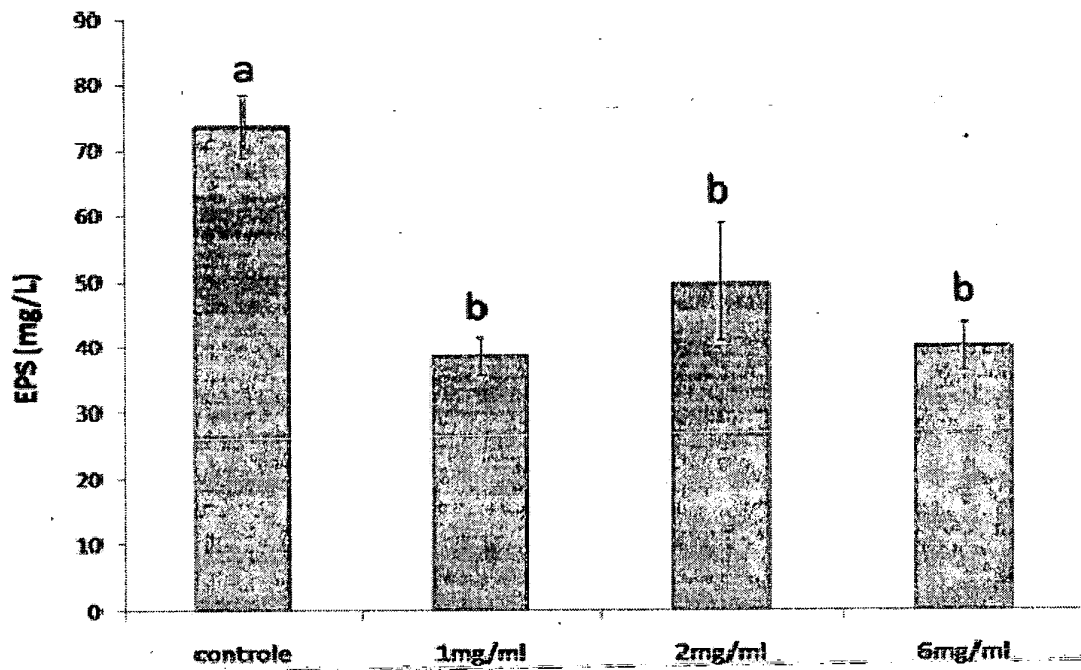
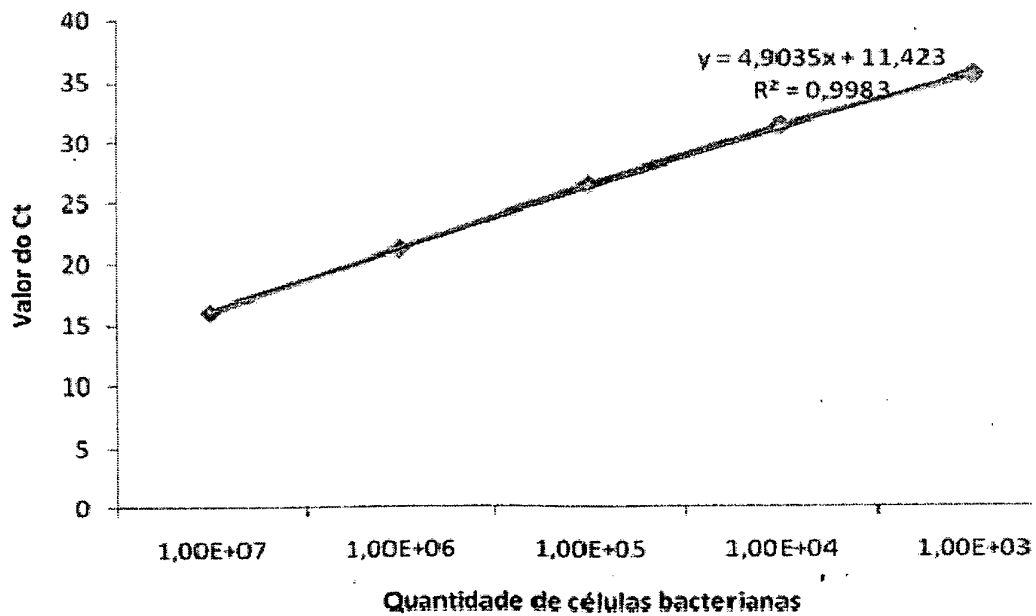
## REIVINDICAÇÕES

1) Uso do composto N-acetil-cisteína e seus análogos caracterizado por ser na desestruturação de biofilmes de bactérias, tratando e prevenindo a clorose variegada dos citros (CVC); o cancro cítrico; e a doença de huanglongbing (HLB) ou *greening*, em que os referidos compostos análogos podem ser selecionados de DL-Homocisteína; L-cisteína metil éster; L-cisteína etil éster; N-carbamoil cisteína; N-(20mercaptoisobutiril)-L-cisteína; N-(2-mercaptopropionil)-L-cisteína A; N-(2-mercaptopropionil)-L-cisteína B; N-(3-mercaptopropionil)-L-cisteína; L-cisteína etil éster hidrocloreto; L-cisteína metil hidrocloreto; nacistetelina (um sal de lisina de N-acetilcisteína); N-acetilcisteína (NAC); e S-acetilcisteína (carbocisteína).

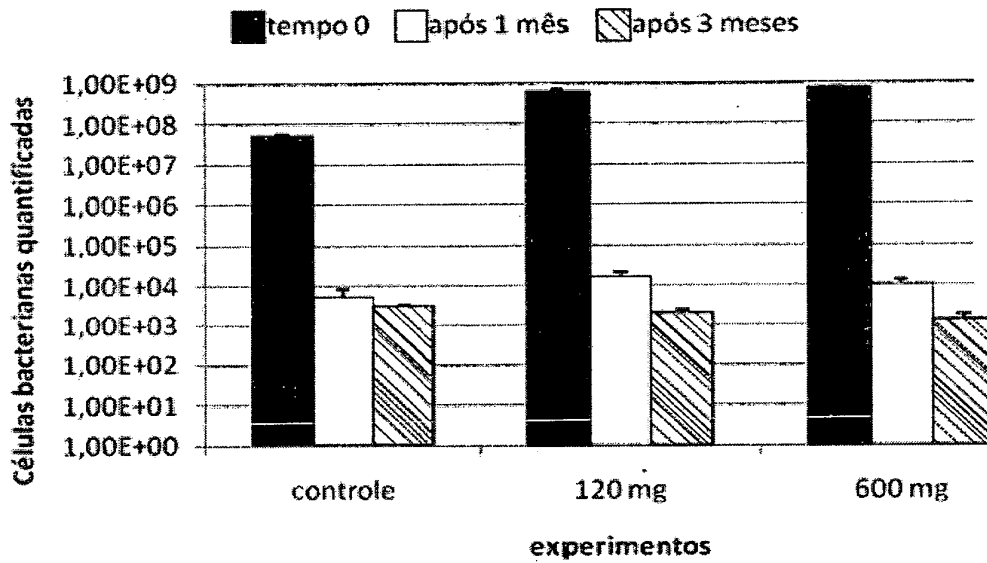
2) Uso do composto N-acetil-cisteína e seus análogos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por uso na forma de fertirrigação ou “drench” – inundação de pequena área próxima a planta ou encapsulada.

**Grafico .1****Gráfico .2**

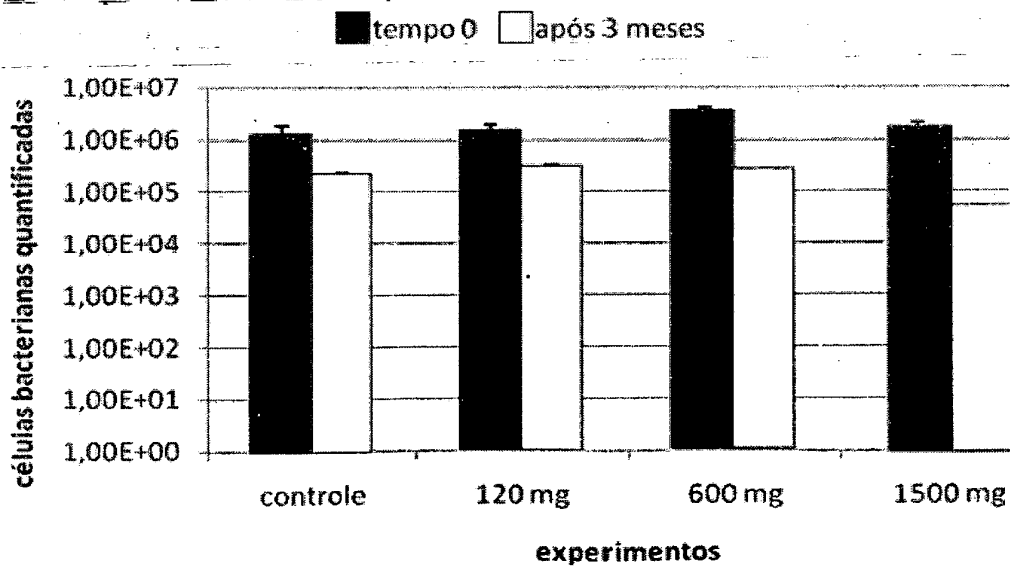
**Gráfico .3****Gráfico .4**

**Gráfico .5****Gráfico .6**

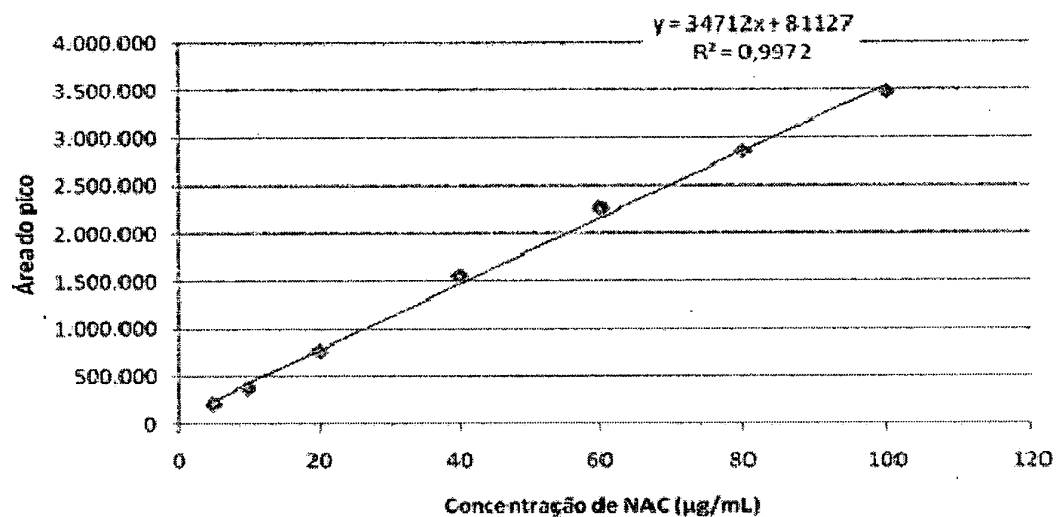
## Gráfico .7



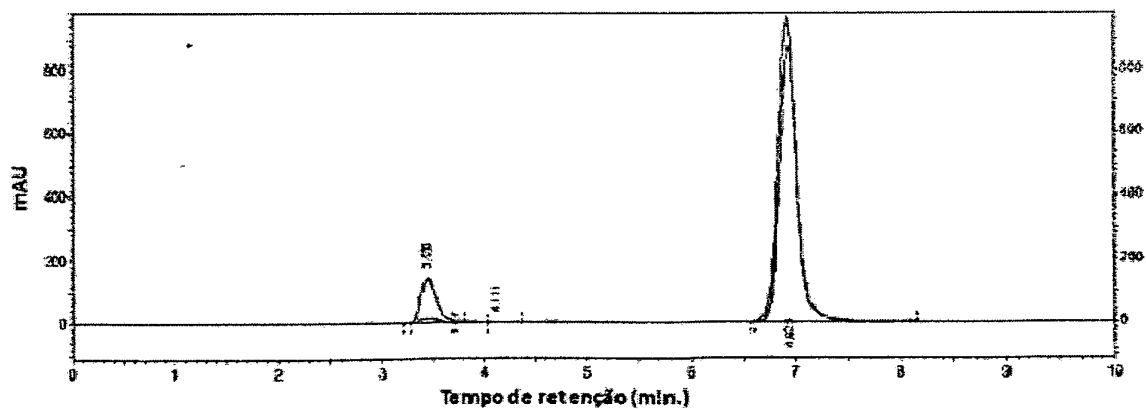
## Gráfico .8



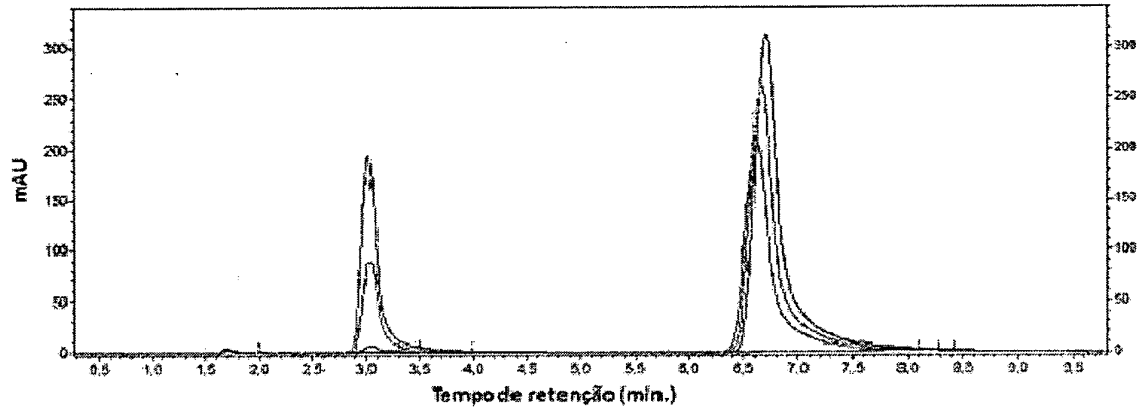
## Gráfico .9



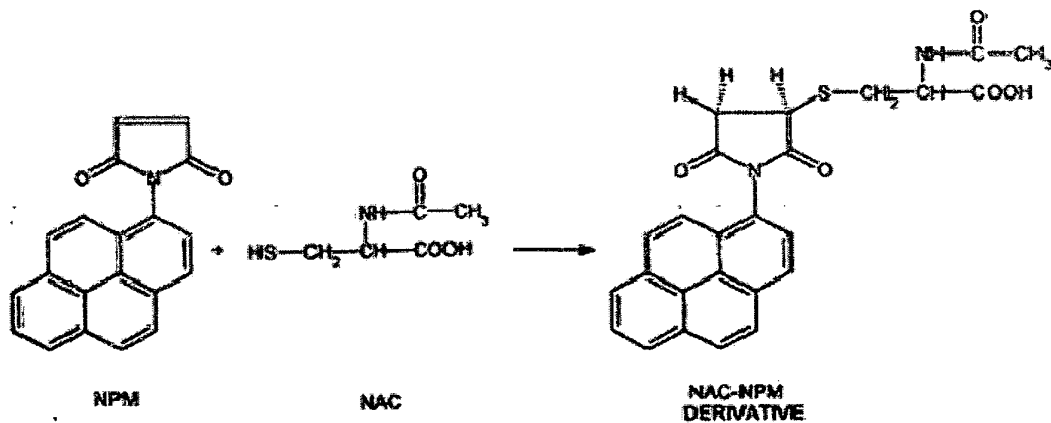
## Gráfico .10



## Gráfico .11



## Figura .1



**Figura .2**

