

ANA PAULA ALVES MATOS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Croton grewoides* SOBRE O FITOPATÓGENO *Xanthomonas*
campestris pv. *melonis***

São Cristóvão/Sergipe

Outubro de 2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE – UFS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS APLICADAS – CCAA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA AGRONÔMICA – DEA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DO ÓLEO ESSENCIAL
DE *Croton grewoides* SOBRE O FITOPATÓGENO *Xanthomonas campestris* pv.
*melonis***

**Monografia apresentada ao Departamento
de Engenharia Agrônômica – Universidade
Federal de Sergipe, como requisito parcial
para obtenção do título de Engenheiro
Agrônomo.**

APROVADO em: 04 de outubro de 2023

ORIENTADO: Ana Paula Alves Matos

Prof. Dr.

Roberta Pereira Miranda Fernandes

MSc.

Caroline Alves Soares

Dr.

Itamara Bomfim Gois

*Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida,
autor de meu destino, meu guia, ao meu pai Paulo Marcelo, minha mãe Anailta
Alves, meu irmão Hiago Samir e aos meus amigos família que se fizeram
presentes em todos estes momentos.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por toda a força e saúde, e agradeço a mim pela perseverança ao longo destes cinco anos.

Agradeço a minha família, por acreditar e me dar apoio, em especial Carlos que se tornou essencial neste processo e me deu uma família mesmo eu estando tão longe da minha.

A Prof. Dr. Roberta Pereira Miranda Fernandes, que me concedeu a oportunidade de trabalho, paciência, dedicação e orientação.

Agradeço também a Caroline que foi minha coorientadora e me auxiliou a ser a profissional que me tornei, juntamente com todos do Labenz.

Aos amigos que se tornaram irmãos Iago Irlan, Maria Regina, Ruana, Tamiris, Eduardo, Vitória, Clara, João Pedro e todos que sabem que estão no meu coração.

Agradeço ao departamento de Eng. Agrônômica pela disponibilização do material necessário para as pesquisas técnicas e por todo o apoio nesta jornada.

Sumário

LISTAS DE FIGURAS	VI
LISTAS DE TABELAS	VII
RESUMO	VIII
1- INTRODUÇÃO	1
2- REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 <i>Cucumis melo</i>	3
2.2 A fitobactéria <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>melonis</i>	4
2.2.1 Caracterização da doença: Barriga-d'água do melão	4
2.3 Biofilme bacteriano	5
2.4 Resistência e interação planta patógeno	6
2.5 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais	6
2.6 <i>Croton grewoides</i> Baill	7
3- MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1 Obtenção dos óleos essenciais	7
3.2 Cultivo do microrganismo alvo	8
3.3 Screening <i>in vitro</i> da atividade antibacteriana de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>melonis</i>	8
3.4 Determinação da Concentração Inibitoria Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)	9
3.5 Quantificação do Biofilme de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>melonis</i> tratada com os óleos essenciais de <i>Croton grewoides</i>	10
3.6 Permeabilidade da Membrana	10
3.7 Análise dos dados	11
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
4.1 Screening dos OEs de <i>Croton grewoides</i> Baill	11
4.2 Concentração Inibitoria Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)	13
4.3 Biofilme bacteriano	15
4.4 Permeabilidade da Membrana Bacteriana	16
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	18
6. REFERÊNCIAS	19

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Screening da inibição bacteriana dos acessos de *Croton grewioides* Baill testados sob o fitopatógeno *Xanthomonas Campestris* pv. *melonis*. Pg 12

Figura 2: Inibição do biofilme de *Xanthomonas campestris* pv. *melonis* com os óleos essenciais dos acessos de *Croton grewioides*. Pg 16

Figura 3: Permeabilidade celular do fitopatógeno *Xanthomonas campestris* pv. *melonis* após 30 minutos de exposição aos OEs de acessos de *Croton grewioides*. Pg 17

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1: Acessos e composição química dos óleos essenciais de *Croton grewoides* do banco ativo de germoplasma de plantas medicinais e aromáticas da Universidade Federal de Sergipe (RODRIGUES *et al.*, 2023). Pg 13

Tabela 2: Concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) dos óleos essenciais de *Croton grewoides* Baill sobre o crescimento *in vitro* de *Xanthomonas campestris* pv. *melonis*. Pg 14

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e na formação do biofilme produzido pelo fitopatógeno *Xanthomonas campestris* pv. *melonis* (XM) dos óleos Essenciais (OEs) de *Croton grewioides* (CGR). Foram conduzidos ensaios *in vitro* de screening, concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM), biofilme e permeabilidade da membrana. os acessos de *Croton grewioides*, no screening, demonstraram eficácia na inibição do crescimento bacteriano, destacando-se os OEs CGR-106, CGR-107, CGR-108, CGR-125 e CGR-220, que alcançaram 100% de inibição na concentração de 2000 µg/mL⁻¹. A análise da CIM e CBM demonstrou que os acessos CGR-106, CGR-107 e CGR-220 necessitam de 1000 µg/mL⁻¹ para inibir o crescimento bacteriano. Os acessos CGR-107 e CGR-220, ricos em Eugenol, se destacaram na inibição do biofilme bacteriano. Além disso, os tratamentos com OEs, especialmente CGR-106 e CGR-220, afetaram a permeabilidade da membrana bacteriana. Esses resultados sugerem o potencial dos OEs de *Croton grewioides*, particularmente aqueles ricos em Eugenol, como agentes eficazes na inibição da formação de biofilmes e no controle do fitopatógeno *Xanthomonas campestris* pv. *melonis*. Esta pesquisa, portanto, contribui para o desenvolvimento de estratégias de manejo de doenças de plantas com base em compostos naturais promissores.

Palavras-Chave: Quorum sensing, Quorum quenching, membrana plasmática.

1- INTRODUÇÃO

O melão é um fruto da família Cucurbitaceae expressivo na exportação brasileira, superando 127 mil toneladas por ano. O estado que apresenta maior produção no Brasil é o Rio Grande do Norte, responsável por cerca de 60% desta, devido às condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento da cultura. O maior desafio de cultivo são as doenças causadas por fitopatógenos, como bactérias e fungos.

Na natureza, as bactérias podem ser encontradas na forma planctônica ou em colônias. Ao se unirem em uma estrutura de biofilme, uma camada de proteção é formada por polímeros extracelulares. Nestas colônias, são compartilhadas informações genéticas, compostos e enzimas que podem auxiliar no desenvolvimento e resistência a fatores externos, como mudanças de pH, temperatura e agentes antimicrobianos.

As fitobactérias do gênero *Xanthomonas* sp. são conhecidas por causar doenças em plantas através do biofilme, a exemplo da espécie *Xanthomonas campestris* pv. *melonis* (XM), causadora da Barriga d'água no melão. Essa doença acomete plantas da cultura do melão em todo o Brasil, podendo causar prejuízo, uma vez que o diagnóstico desta doença ocorre, na maioria das vezes, na fase de pós colheita dificultando o controle e afetando vários produtores. Segundo o IBGE cerca de 607.047 toneladas de melão foram produzidas no ano de 2021, afetando famílias cujo comércio do fruto é a fonte de renda, movimentando 628.322 mil reais no ano de 2021.

A “Barriga d'água do melão” é causada pela fermentação interna dos frutos, provocada pela bactéria. Isso é favorecido por temperaturas e umidade relativa elevadas, juntamente com ferimentos na casca do fruto devido aos tratos culturais, ataque de insetos, uso de ferramentas contaminadas na colheita e manejo inadequado durante o armazenamento, favorecendo a contaminação de novos frutos.

Os sintomas característicos, na maioria dos casos são diagnosticados após a colheita, o fruto infectado não apresenta sintomas visíveis. No entanto, ao longo de alguns dias, quando armazenado, pode-se observar uma alteração em sua composição. Ao agitá-lo, percebe-se que está repleto de líquido em seu interior e ao realizar um corte transversal no início do processo patogênico, pequenas bolsas de água escura podem ser observadas na polpa. Conforme a doença progride, essas bolsas se unem e formam grandes áreas necróticas, resultando na liquefação de uma grande parte do endocarpo devido à ação de enzimas produzidas pela bactéria.

O controle desta doença é mais efetivo de forma preventiva, como o tratamento de sementes, uso de variedades resistentes, época de plantio no clima seco, rotação de culturas, regulação da irrigação e evitar adubação nitrogenada. Porém, uma vez que a doença encontra-se infestada na cultura, os controles existentes são pouco efetivos, o que torna cada vez mais necessário o estudo de novos métodos de controle alternativos, como os óleos essenciais (OEs).

Os óleos essenciais são compostos orgânicos produzidos pelo metabolismo secundário de plantas, constituídos principalmente de monoterpenos e sesquiterpenos. Os efeitos dos OEs podem afetar tanto o envelope externo da célula quanto o citoplasma, devido à natureza lipofílica dessas moléculas, sendo responsável pela ruptura das estruturas bacterianas, o que leva à perda da integridade e aumento da permeabilidade celular. Este processo interfere em vários sistemas na bactéria, incluindo a manutenção do estado energético da célula, transdução de energia acoplada à membrana, transporte de solutos e regulação metabólica.

Os óleos essenciais podem apresentar atividade antimicrobiana, por exemplo os de *Croton grewoides* (CGR). Uma Planta aromática e medicinal conhecida popularmente como “alecrim da cabocla” ou “canelinha”. Encontrada na região Nordeste do Brasil e no estado de Minas Gerais, os OEs desta espécie apresentam diferentes atividades biológicas. Estudos demonstram a ação do OE de *Croton sp.* sobre a formação de biofilme bacteriano, por exemplo Nader *et al.* (2018).

Na literatura, é relatado o potencial antimicrobiano das substâncias presentes no OE sobre fitobactérias do gênero *Xanthomonas sp.* Silva *et al.* (2019) observaram que OE de *Lippia gracilis* e seus principais constituintes apresentaram atividade antibacteriana, promovendo a perda da permeabilidade da membrana do fitopatógeno *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Assim, fomenta novos estudos que investigam a ação dos OEs produzidos por plantas medicinais no controle de fitobactérias.

Desta forma o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência dos OEs de *Croton grewoides* na atividade antimicrobiana e na formação do biofilme produzido por *Xanthomonas campestris* pv. *melonis*.

2- REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Cucumis melo*

Cucumis melo, popularmente conhecido como melão, é uma cultura pertencente a família das curcubitaceas, do gênero *Cucumis*. O centro de origem desta espécie é divergente entre os estudos existentes, que incluem possíveis locais na África, na região nordeste da Ásia e na Austrália (HORA *et al.*, 2018).

A cultura ocupou no Brasil uma área colhida de 23.858 hectares em 2021, movimentando cerca de 628.322 mil reais, superando 127 mil toneladas exportadas (IBGE, 2023; BARBIERI, 2023). O principal estado produtor no Brasil é o Rio Grande do Norte, com 60% da produção nacional. Essa espécie é uma hortícola de importância econômica mundial, muito apreciada por seus frutos comestíveis, que podem ser consumidos imaturos ou maduros (GRUMET, 2021).

O melão apresenta uma grande diversidade genética, que se manifesta em vários aspectos, como tamanho do fruto, formato, cor, comportamento de amadurecimento (climatérico e não climatérico), textura da casca (casca lisa e reticulada) e determinação do sexo (monóico e andromonóico) (ZHAO *et al.*, 2019).

Os fatores limitantes da produção de melão podem ser divididos em dois grupos, os climáticos que inclui condições climáticas adversas, como temperaturas abaixo de 15°C, umidade relativa do ar abaixo de 60%, geadas, secas e excesso de chuvas e o grupo que leva em consideração os fatores biológicos (LECHOLOCHOLO *et al.*, 2022), que inclui as doenças e pragas. As doenças são um dos fatores limitantes mais importantes da produção de melão. Elas podem causar danos significativos à cultura, levando à redução da produtividade, da qualidade dos frutos e do lucro dos produtores (PRESTON *et al.*, 2021).

As doenças do melão podem ser causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides. Os fungos são os agentes causadores de doenças mais comuns na cultura, sendo responsáveis por doenças como oídio, mildio, podridão de micosferela e fusariose (CUI *et al.*, 2022). Porém as bactérias também podem causar doenças significativas na cultura do melão, como a bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *melonis*, responsável pela Barriga-d'água (VIANA *et al.*, 2001).

2.2 A fitobactéria *Xanthomonas campestris* pv. *melonis*

A *Xanthomonas* é um fitopatógeno pertencente ao filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria, ordem *Xanthomonadales* e família *Xanthomonadaceae*. É uma bactéria gram-negativa e aeróbica, que possui forma de bastonete, móvel por um único flagelo polar, e são classificadas em seis patovares (BATISTA, 2020).

Xanthomonas é um dos gêneros mais importantes e difundidos de bactérias fitopatogênicas que infecta a maioria das culturas alimentares comerciais, árvores e plantas ornamentais (RYAN *et al.*, 2011; JACQUES *et al.*, 2016; AN *et al.*, 2020). Sendo um patógeno de amplo espectro, versátil e distribuído globalmente (LAMICHHANE *et al.*, 2018).

Esta distribuição ocorre devido as adaptações das mutações genéticas, e proporcionam evasão da defesa do hospedeiro, expressão de genes, enzimas degradativas e produção do biofilme. (RYAN *et al.*, 2011; VICENTE; HOLUB, 2012; ALVAREZ-MARTINEZ *et al.*, 2021). O gênero *Xanthomonas* adquiriu através destes sistemas a resistência ao cobre, principal controle utilizado para doenças bacterianas (RYAN *et al.*, 2011; BEHLAU *et al.*, 2013). *Xanthomonas campestris* pv. *melonis* (XM) responsável pela Barriga-d'água do melão é uma espécie deste fitopatógeno (VIANA *et al.*, 2001).

2.2.1 Caracterização da doença: Barriga-d'água do melão

Rodrigues Neto *et al.* (1984) descreveram uma nova doença do meloeiro, causada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *melonis*, que ainda não havia sido relatada em nível mundial. A doença foi inicialmente observada na região de Presidente Prudente, no Brasil, e causa sintomas de apodrecimento e liquefação dos tecidos.

Os frutos afetados apresentam um ruído de substâncias aquosas quando agitados, o que levou à denominação da doença de "Barriga d'Água". A ausência de odor desagradável é um importante diagnóstico diferencial para esta doença, que pode ser confundida com outras doenças bacterianas (PEREIRA *et al.*, 1975).

Os sintomas da doença são caracterizados por uma descoloração pardo-escuro de parte da polpa, seguida de uma decomposição dos tecidos. Em estágios mais avançados, a doença pode ser disseminada por microrganismos secundários, tornando o fruto impróprio para consumo. Externamente, a doença não apresenta sintomas, exceto por uma anomalia logo abaixo da casca, provavelmente o ponto de entrada da bactéria (BERIAN;

OCCHIENA, 2018). O desenvolvimento desta doença é favorecido pela resistência das bactérias e comunicação que ocorrem dentro do biofilme bacteriano.

2.3 Biofilme bacteriano

O biofilme pode ser definido como uma comunidade de bactérias que são aderidas em uma superfície e podem estar envoltas por uma camada de exopolímeros, chamada EPS. Ele pode ser encontrado em forma sésil e agrupar alguns indivíduos como fungos, protozoários, algas e bactérias (SCHNEIDER, 2007).

A EPS é constituída por partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas. Essa matriz é secretada para o exterior com o objetivo de impedir a entrada de antimicrobianos no biofilme (KASNOWSKI *et al.*, 2010). Outra função é a comunicação entre as bactérias por mecanismos químicos chamados Quorum sensing (QS) e Quorum quenching (QQ).

O QS é um mecanismo de regulação química que depende da densidade de microrganismos dentro do biofilme. Esse mecanismo ocorre pela codificação de enzimas que são dispersas na matriz e, quando atingem quantidade suficiente, são recepcionadas em outros indivíduos que podem transcrever a enzima e adquirir a informação passada que pode ser utilizado para a resistência, produção de antibióticos para demais espécies e o recrutamento para a formação do biofilme (LE; OTTO, 2015).

O QQ tem função de inibição, como por exemplo, o da chegada das enzimas aos receptores, esse mecanismo não afeta o crescimento, mas regulamentam mecanismos antivirulência das bactérias e estão sendo cada vez mais testados (HEMMATI *et al.*, 2020).

Para a formação do biofilme três etapas são fundamentais, a primeira é chamada de fixação, onde ocorre a adesão primária, que pode ser reversível condicionada a forças físico químicas do meio e regulações do quórum sensing. Na fixação também ocorre a adesão secundária irreversível, onde começa a ser produzida a matriz de exopolissacarídeos (NUNES, 2019).

Uma vez consolidada esta etapa acontece a maturação do biofilme, quando a sua arquitetura é constituída, e os indivíduos se fortalecem através da secreção de enzimas na EPS (NUNES, 2019). Por fim ocorre a dispersão, quando o substrato já foi consumido e os organismos tendem a povoar outros ambientes. O biofilme então é constituído para

favorecer proteção contra radiação, fagocitose, desidratação, resistência a antimicrobianos e interações com a planta (BLANKENSHIP *et al.* 2006).

2.4 Resistência e interação planta patógeno

A resistência é um mecanismo natural de bactérias (BAPTISTA, 2013). Atualmente, é um dos maiores problemas da saúde pública, uma vez que o mau uso de antibióticos promove a estes indivíduos ambientes instáveis nos quais necessitam de evoluções genéticas para sobreviver (LOUREIRO, 2016).

Essa resistência pode ser adquirida por dois mecanismos, sendo eles intrínsecos dos microrganismos ou por mutações genéticas que acontecem *in loco* por aquisição de genes vindos de outros organismos que fizeram a mutação cromossômica ou transferência horizontal, onde ocorre a codificação de enzimas que inativam antibióticos (BAPTISTA, 2013).

As mutações são geradas por fatores como radiação, agentes alquilantes e espécies reativas de oxigênio. E caso sejam benéficas, serão codificadas em forma de enzimas dispersas na camada EPS do biofilme, transmitindo assim resistência a outros indivíduos do meio, sendo dificultado seu controle (BAPTISTA, 2013).

Para o controle da doença, a planta deve desenvolver resistência ao patógeno, que por sua vez a entende como substrato, o seu mecanismo de sobrevivência é feito por meio de substâncias químicas. O hospedeiro para se defender secreta outras substâncias que são produzidas por meio do metabolismo secundário (COSTA, 2019).

Segundo Agrios (1997), as plantas possuem dois mecanismos de defesas contra patógenos, sendo eles as estruturas que têm função de barreira física para inibir a entrada de patógenos e as reações bioquímicas que ocorrem no tecido da planta e produzem substâncias tóxicas provenientes do metabolismo secundário, como os óleos essenciais.

2.5 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais

Os OEs são compostos responsáveis pela defesa de plantas. Existem dois tipos de metabolismo nos vegetais, o metabolismo primário que é o responsável por funções vitais na planta, a exemplo, da respiração e transporte de seiva. Já o metabolismo secundário tem função de proteção, combatem o excesso de raios ultra violetas, microrganismos, insetos e animais, podendo apresentar como compostos majoritários: o eugenol, alicina, timol e carvacrol (REIS *et al.*, 2020; PERES, 2019).

Essas moléculas são do grupo terpenos e têm em sua composição o que pode ser definido como “alcenos naturais” pois possuem em sua estrutura dupla ligação entre carbono e são considerados hidrocarbonetos insaturados. Normalmente são constituídos por 5 carbonos, por serem moléculas leves, são voláteis, considerados aromáticos (FELIPE; BICAS, 2017)

Os OEs possuem eficácia comprovada pela ciência contra microrganismos. A literatura já demonstra essa atividade antimicrobiana, como por exemplo, o OE de *Croton grewioides*, que teve atividade contra *X. campestris* pv. *campestris* (RODRIGUES *et al.*, 2023). Além do alto rendimento, o óleo essencial de *Croton spp.* são fontes alternativas de formulações com atividade antimicrobiana.

2.6 *Croton grewioides* Baill

Croton grewioides, também chamada de alecrim da cabocla; canelinha (SIBBR, 2020) é uma espécie pertencente ao gênero *Croton*, tem porte arbustivo que pode chegar a 2 metros de altura, e é amplamente encontrada na região Nordeste do Brasil, em estados como Bahia, Alagoas, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe (ALVES, 2012).

Esta espécie vem sendo amplamente estudada pelo potencial do seu óleo essencial, cuja composição é majoritariamente constituída por Eugenol. No entanto esta composição pode variar dependendo de fatores externos como o clima, adubação, incidência de pragas e entre outros (SILVA, 2016).

Em relação à atividade microbiana desta espécie, SILVA (2016) relatou que a espécie pode inibir bactérias como *Bacillus subtilis*, e pode ter efeito em outras como a *Xanthomonas campestris*. Além disso, pode agir sobre a formação do biofilme podendo evitar sua virulência e sua resistência.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos óleos essenciais

Foram avaliados 25 acessos de *Croton grewioides* Baill. do Banco Ativo de Germoplasma de Plantas Medicinais e Aromáticas na Fazenda Experimental "Campus Rural" da Universidade Federal de Sergipe UFS, São Cristóvão, Sergipe, Brasil (11°00'S, 37 °12'W). O acesso ao material vegetal foi registrado sob o número de identificação A8CCB3B no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e

Conhecimento Tradicional (SisGen) de acordo com o artigo 4º da Portaria nº 8.772 / 2016 do Ministério do Meio Ambiente do Brasil.

As folhas de *Croton grewoides* Baill foram coletadas, secas em estufa de circulação de ar forçado (40°C por cinco dias), e submetidas à hidrodestilação em aparelho Clevenger modificado, utilizando amostras de 40g de folhas secas, com adição de 1,5L de água destilada, durante 140 minutos. Os OEs foram coletados e estocados em frasco âmbar, a - 20°C até a realização dos ensaios de atividade antimicrobiana, antibiofilme e de permeabilidade celular bacteriana.

3.2 Cultivo do microrganismo alvo

O fitopatógeno-alvo, *Xanthomonas campestris* pv. *melonis* (68), foi cedido pelo Instituto Biológico (São Paulo, Brasil). O patógeno foi cultivado em meio de cultura YM (Sacarose 10 g L⁻¹; Peptona 5 g L⁻¹; Extrato de levedura 3 g L⁻¹; Extrato de malte 3 g L⁻¹) em shaker orbital (28 ± 2 °C a 150 rpm) ou em meio YM sólido (Ágar 20 g L⁻¹) em estufa bacteriológica a 28 ± 2 °C. Para todas as análises realizadas neste estudo, a densidade ótica da cultura do patógeno foi padronizada para DO_{600nm}= 0,6. A leitura da absorvância foi realizada no leitor de microplaca Synergy™ H1 Hybrid (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA).

3.3 Screening *in vitro* da atividade antibacteriana de *Xanthomonas campestris* pv. *melonis*

Inicialmente foram realizados screenings com os OEs dos acessos de *Croton grewoides* CGR-103, CGR-104, CGR- 106, CGR- 107, CGR- 108, CGR- 124, CGR- 125, CGR-204, CGR-209, CGR-210, CGR-212, CGR-215, CGR-220, CGR-222, CGR- 302, CGR-304, CGR- 306, CGR- 307, CGR-308, CGR- 309, CGR-311, CGR- 312, CGR-313, CGR-318, CGR-323, a fim de selecionar aqueles com maior porcentagem de inibição para o isolado XM. A solução de OE para cada acesso foi composta por OE dissolvido em sulfóxido de dimetilo (DMSO, 1% v/v) e diluídos em meio de cultura YM líquido para uma concentração de 4000 µg.mL⁻¹. Os ensaios foram realizados em placas de microdiluição de 96 poços, sendo adicionados 100 µL da solução de OE e 100 µL da suspensão bacteriana XM padronizada, obtendo-se uma concentração final de 2000 µg.mL⁻¹. Como controle positivo foi utilizada estreptomicina na concentração de 100 µg.mL⁻¹, dissolvida em meio de cultura YM, e como controle negativo foi utilizado o meio YM acrescido de DMSO (1% v/v). As

microplacas foram incubadas sob agitação orbital (150 rpm/ 28°C ± 2) durante 24 horas. A determinação da atividade antimicrobiana foi avaliada por leitura da absorvância num leitor de microplaca Synergy™ H1 Hybrid (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA) utilizando um comprimento de onda de 600 nm.

3.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A caracterização química dos óleos essenciais de *Croton grewioides* foi realizada anteriormente por Rodrigues (2023). Na qual foram testados os óleos essenciais nas concentrações de 2000 µL e selecionados os OEs que possuem melhor resultado quanto a inibição do crescimento bacteriana, juntamente que representam cada grupo químico dos OEs. Obtivemos então os OEs dos acessos CGR- 106, CGR- 107, CGR- 108, CGR- 125, CGR-204, CGR-210, CGR-220, CGR-312, testados juntamente com a estreptomicina.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os OEs de *Croton grewioides* foram determinadas pelo método de microdiluição. Dessa maneira, foram selecionados os OEs de acordo com a porcentagem de inibição observada no Screening. Os ensaios de microdiluição foram realizados em microplacas de 96 poços, em que foram adicionados, 100 µL da cultura do fitopatógeno padronizada e, logo após foi acrescido 100 µL dos OEs em uma série de concentrações que variaram de 500 µg.mL⁻¹ a 4000 µg.mL⁻¹. Para o controle positivo foi utilizado estreptomicina nas concentrações que variam de 125 µg.mL⁻¹ a 1000 µg.mL⁻¹ e para o controle negativo, 100 µL de meio YM + DMSO foi adicionado aos poços em conjunto com o fitopatógeno. Logo após, as placas de cultivo foram incubadas em estufa bacteriológica à 28 ± 2°C por 24h. Em seguida, foi lida a absorvância em Leitor de microplacas Synergy™ H1 Hybrid (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA) utilizando um comprimento de onda de 600 nm. A concentração mínima inibitória foi definida como a menor concentração do OE que foi capaz de inibir 100% do crescimento do fitopatógeno.

Para a avaliação do CBM retirou-se 20 µL dos poços onde não houve crescimento após 24 h, os quais foram adicionados em placas de Petri contendo meio de cultura ym SÓLIDO, esalhados com o auxílio de alça de driagalski e incubados em estufa bacteriológica por 24 h. A CBM foi definida como a concentração à qual foi observada a ausência de colônias bacterianas.

3.5 Quantificação do Biofilme de *Xanthomonas campestris* pv. *melonis* tratada com os óleos essenciais de *Croton grewoides*

A formação do biofilme do fitopatógeno sob o efeito dos OEs foi quantificado utilizando o cristal violeta. Para isso, foram adicionadas às microplacas de 96 poços, 100 µL da cultura do fitopatógeno padronizada e, logo após foram acrescidos 100 µL dos OEs previamente selecionados nas concentrações de 1x, ½x e ¼ x da CIM. Para o controle negativo, 100 µL de meio YM+ DMSO. Logo após o período de incubação, as microplacas foram centrifugadas (2250 G/ 10 min/ 25°C) e, em seguida, o sobrenadante foi removido dos poços. Posteriormente foi acrescido aos poços 200 µL de etanol 95% durante 15 min para auxiliar na fixação das células, e em seguida, as microplacas foram secas ao ar em câmara de fluxo laminar por aproximadamente 5 min. Após esse período, foi adicionado aos poços 200 µL de cristal violeta (0,01%) por 15 min em temperatura ambiente, e em seguida o sobrenadante foi removido, e os poços foram gentilmente lavados com água destilada para remoção das células não aderidas. Então foram adicionados 300 µL de DMSO aos poços para a solubilização do corante aderido as células do biofilme, e logo após as microplacas foram incubadas em shaker sob agitação orbital por 5 min e, em seguida 200 µL de cada poço foram transferidos para uma nova microplaca e as absorbâncias foram lidas em Leitor de microplacas Synergy™ H1 da Bio TekHybrid Technology usando um comprimento de onda de 595 nm.

3.6 Permeabilidade da Membrana

Para a análise da permeabilidade da membrana plasmática células bacterianas padronizadas foram tratadas por 30 min com OE (1x, 1/2x, 1/4x CIM) dos acessos de *C. grewoides*, previamente selecionado. Após exposição ao OE, as células foram centrifugadas (14.000 g/26 °C/10 min), lavadas e ressuspensas com tampão fosfato salino (8 g/L⁻¹ de NaCl, 0,2 g/L⁻¹ de KCl, 1,44 g/L⁻¹ de Na₂HPO₄ e 0,24 g/L⁻¹ de KH₂PO₄ com pH 7,4) e incubadas com Iodeto de propídio (3 mM) a 30 °C por 15 min no escuro. Em seguida, 200 µl da suspensão de células marcadas foram adicionadas a poços de placas de microdiluição. A intensidade de fluorescência do iodeto de propídio foi medida através do leitor de microplacas Synergy™ H1 (BioTekHybrid Technology) usando um filtro de excitação de 493 e emissão de 645 nm. Como controle negativo foram usadas células não tratadas e para o controle positivo por células aquecidas a 100°C por 5 minutos. Os dados foram expressos em porcentagem de permeabilidade celular segundo a fórmula:

3.7 Análise dos dados

Os ensaios foram realizados em triplicata em dias independentes e os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média com o auxílio do software Excel, e para os cálculos de inibição e permeabilidade foram utilizadas as respectivas fórmulas:

Os dados foram expressos em porcentagem de inibição segundo a fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{controle negativo} - \text{tratamento})}{\text{controle negativo}} * 100$$

Onde, tratamento corresponde à fluorescência das células tratadas com os OEs ou com a estreptomicina (controle positivo), e o controle negativo corresponde à fluorescência das células não tratadas.

$$\% \text{ permeabilidade celular} = \frac{\text{fluorescência do tratamento}}{\text{fluorescência do controle}} * 100$$

Onde, fluorescência do tratamento corresponde à média de fluorescência dos tratamentos com os OEs e o controle negativo, e fluorescência do controle corresponde à média do controle positivo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Screening dos OEs de *Croton grewoides* Baill

Um screening foi realizado a fim de selecionar os OEs com maior atividade antibacteriana (Figura 1), e observou-se que, os OEs dos 25 acessos de *Croton grewoides* apresentaram inibição do crescimento de XM acima dos 50%, que demonstra o potencial antibacteriano dessa espécie. Com exceção dos OEs dos acessos CGR-204 (66,30%), CGR-210 (65,22%), CGR-312 (63,48%), CGR-313 (57,27%) e CGR-323 (66,76%), os demais acessos inibiram mais de 80% do crescimento de XM *in vitro*. E, com a utilização dos OEs CGR-104, CGR-106, CGR-107, CGR-108, CGR-212, CGR-220, CGR-302, CGR-304, CGR-306, CGR-307, CGR-308 e CGR-311 a inibição do crescimento de XM *in vitro* foi de 100%.

No presente estudo obteve-se um número alto de acessos com inibição para a XM, desta forma, para selecionar os acessos que foram utilizados nos estudos subsequentes, foi utilizada a caracterização química dos óleos essenciais como critério de seleção (Tabela 1).

No ensaio de *screening* realizado por Rodrigues (2023), os acessos CGR-107, CGR-108, apresentaram inibição para *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* de 86,52% e 85,15% respectivamente, enquanto no presente estudo foi obtido 100% de inibição para os mesmos acessos, demonstrando que os OEs de CGR são eficazes em ambas as bactérias do gênero *Xanthomonas*.

Os OEs do grupo 5 (Tabela 1) demonstraram as menores inibições dentre os acessos selecionados, isto pode ser devido aos componentes marjoritários dos OEs.

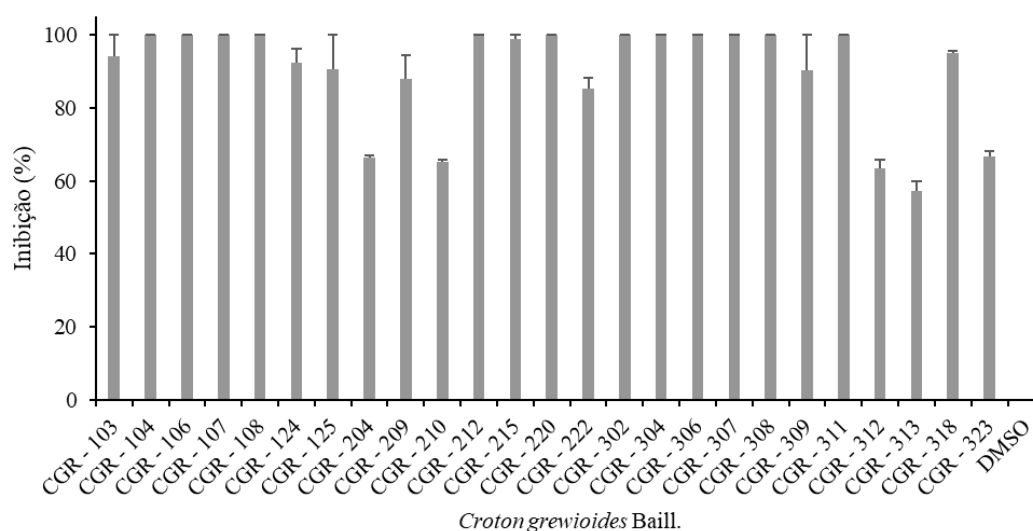


FIGURA 1: Screening da inibição bacteriana dos acessos de *Croton grewoides* Baill testados sob o fitopatógeno *Xanthomonas. Campestris* pv. *melonis*.

TABELA 1: Acessos e composição química dos óleos essenciais de *Croton grewoides* do banco ativo de germoplasma de plantas medicinais e aromáticas da Universidade Federal de Sergipe (RODRIGUES *et al.*, 2023).

Acesso	Grupo químico	Componentes majoritários		
CGR- 106	Grupo 4	Eugenol: 46,7%	+	Metil Chavicol: 38,38%
CGR- 107	Grupo 4	Eugenol: 80,37%	+	(E) - cariofileno: 4,96%
CGR- 108	Grupo 4	Eugenol: 80,38%	+	Biciclogermacleno: 4,97%
CGR-125	Grupo 3	Eugenol: 43,99%	+	Metil eugenol: 40,94%
CGR-204	Grupo 5	Metil Chavicol: 68,23%	+	Eugenol: 18,05%
CGR-210	Grupo 3	Metil eugenol: 82,07%	+	Biciclogermacleno: 3,62%
CGR-220	Grupo 4	Eugenol: 78,80%	+	Biciclogermacleno: 5,50%
CGR-312	Grupo 5	Metil Chavicol 48,74%	+	Metil eugenol: 42,27%

4.2 Concentração Inibitoria Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A determinação da concentração inibitória mínima de OE contra o fitopatógeno foi determinada para os acessos selecionados a partir do screening e da composição química. Valores menores para CIM significam que menor quantidade de OE é utilizada para inibir o crescimento bacteriano. Neste estudo foi observado que o óleo essencial dos acessos CGR - 106, CGR - 107 e CGR - 220 apresentaram CIM de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Para os acessos CGR – 108, CGR – 125 e CGR – 210 a CIM foi de 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Já para os OEs dos acessos CGR – 204 e CGR – 312 a CIM foi de 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Para o sulfato de estreptomicina (controle positivo) a CIM foi de 125 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, pelo teste anterior, de screening, é possível notar essas diferenças, uma vez que os acessos CGR-204 e CGR-312 inibiram 66,30%, 62,4% respectivamente com uma concentração de 2000 $\mu\text{g/mL}^{-1}$. Já para o sulfato de estreptomicina (controle positivo) a CIM foi de 125 $\mu\text{g/mL}^{-1}$.

Em relação a concentração bactericida mínima (CBM) para todos os acessos foi superior a 4000 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, assim demonstraram que não foi observada atividade bactericida para as concentrações testadas, como demonstrado na Tabela 2. Já para o sulfato de

estreptomicina (controle positivo) foi possível determinar a concentração bactericida ($1000 \mu\text{g/mL}^{-1}$), como demonstrado na tabela 2.

Como abordado por Freire *et al.* (2014) diversos estudos mostram que os OEs apresentam efeito bactericida e bacteriostático contra variadas espécies de bactérias. E valores com concentração inibitória inferiores a 100 000 micrograma por mililitro [$\mu\text{g/ml}$] apresentam atividade antimicrobiana adequada. No presente estudo foram obtidas concentrações abaixo de $4000 \mu\text{g/mL}^{-1}$ (Menezes *et al.* 2009).

TABELA 2: Concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) dos óleos essenciais de *Croton grewoides* Baill. sobre o crescimento *in vitro* de *Xanthomonas campestris* pv. *melonis*.

Tratamento	CIM $\pm$ DP ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	CBM $\pm$ DP ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)
CGR - 106	$1000 \pm 0,00$	$>4000 \pm 0,00$
CGR - 107	$1000 \pm 0,00$	$>4000 \pm 0,00$
CGR - 108	$2000 \pm 0,00$	$>4000 \pm 0,00$
CGR - 125	$2000 \pm 0,00$	$>4000 \pm 0,00$
CGR - 204	$4000 \pm 0,00$	$>4000 \pm 0,00$
CGR - 210	$2000 \pm 0,00$	$>4000 \pm 0,00$
CGR - 220	$1000 \pm 0,00$	$>4000 \pm 0,00$
CGR - 312	$4000 \pm 0,00$	$>4000 \pm 0,00$
Sulfato de Estreptomicina	$125 \pm 0,00$	$1000 \pm 0,00$

4.3 Biofilme bacteriano

No ensaio de biofilme (Figura 2) foi obtido que os OEs dos acessos CGR - 106, CGR - 107, CGR - 220, na concentração de 1x a CIM, inibiram a formação do biofilme em 63,2%, 82,3%, 74,8%, respectivamente. Para a concentração de $\frac{1}{2}$ x da CIM a porcentagem de inibição foi de 57,5% (CGR - 106), 63,3% (CGR - 107), 62,1% (CGR - 220). Observou-se maior formação de biofilme quando XM foi tratada com o OE do acesso CGR - 106 na concentração de $\frac{1}{4}$ x da CIM, inibindo apenas 28,5%. Os OEs dos acessos CGR - 107 e CGR - 220, na concentração de $\frac{1}{4}$ x da CIM inibiram em 50,6% e 50,5% a formação do biofilme.

Para os acessos que tiveram CIM de $2000 \mu\text{g/mL}^{-1}$, CGR-108; CGR-125; CGR-210, a porcentagem de inibição com 1x CIM foi de 56,24%, 65,06%, 50,57% respectivamente. Para a concentração de $\frac{1}{2}$ x da CIM a porcentagem de inibição 34,04%, 52,08% e 60,50% respectivamente, e com $\frac{1}{4}$ x CIM foi de 27,50%, 34,93% e 55,26%. É possível observar que o acesso 210 com $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ x CIM teve maior inibição que 1x CIM, demonstrando que sub dosagens de CIM podem ser eficazes por apresentarem resultados parecidos com os de 1x de CIM.

Para os acessos com $4000 \mu\text{g/mL}^{-1}$ de CIM, sendo eles CGR-204 e CGR-312, é possível notar que o CGR-204 obteve valores próximos de 1x e $\frac{1}{2}$ x CIM (68,61% e 67,55%) também demonstrando eficácia na redução do biofilme apesar dos efeitos de mortalidade da bactéria não foram confirmados com as concentrações testadas (CBM), e que concentrações abaixo de 1x CIM também podem causar a ruptura da EPS causando redução no efeito de QS e diminuindo a capacidade de comunicação e patogenicidade da bactéria.

O acesso CGR-312, com 1x de CIM, obteve 46,91 % de inibição, enquanto que com $\frac{1}{4}$ x da CIM, obteve 2,07% de inibição. Os valores mais próximos a zero observados para esse acesso, sugerem que o OE desse possui menor potencial bactericida, quando comparado aos demais acessos. Em geral os OEs CGR-107 (1x de CIM), e CGR-220 (1x de CIM) obtiveram melhores resultados (Figura 2), que apresentam como componente majoritário, o eugenol (Rodrigues, 2023). Em seu estudo, Rodrigues (2023) e Silva *et al.* (2019), concluíram que os acessos ricos nesse componente demonstraram eficácia na inibição bacteriana.

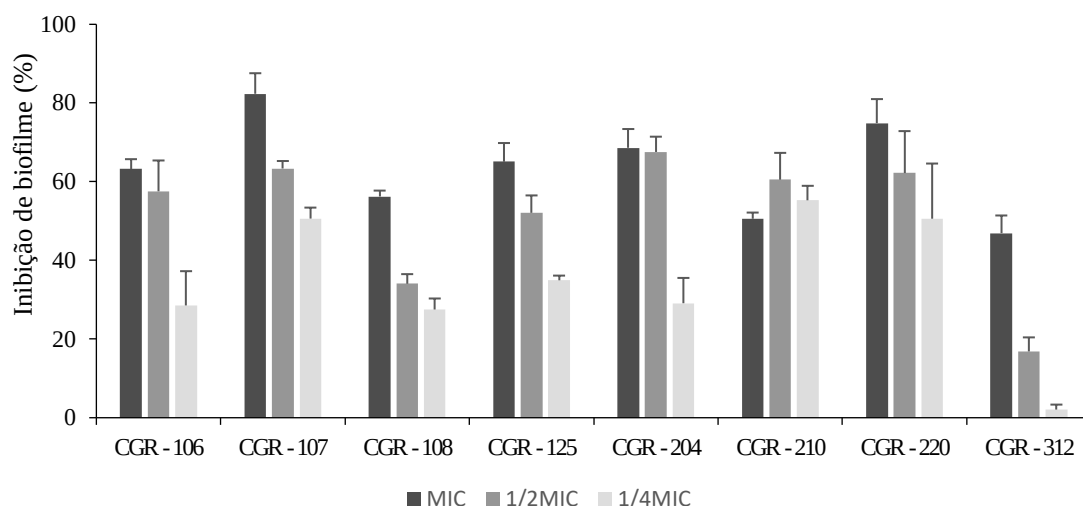


FIGURA 2: Inibição do biofilme de *Xanthomonas campestris* pv. *melonis* com os óleos essenciais dos acessos de *Croton grewoides*.

4.4 Permeabilidade da Membrana Bacteriana

Observou-se (Figura 3) que o o tratamento com o controle positivo resultou 100% de permeabilidade da célula bacteriana. Este resultado também foi obtido para os acessos CGR- 106 e CGR-220 nas concentrações de 1x, $\frac{1}{2}$ x e $\frac{1}{4}$ x da CIM., demonstrando que mesmo que a inibição do biofilme seja menor que a do OE CGR-107 a membrana bacteriana foi danificada, de modo que a bactéria não consegue se multiplicar como explicam Valeriano *et al.* (2012) e Ribeiro *et al.* (2012).

O acesso CGR-108, obteve permeabilidade da membrana de 96,92%, 95,45% e 97,24% com 1x $\frac{1}{2}$ x e $\frac{1}{4}$ x CIM respectivamente, os acessos 107 com 1x (87,50%) $\frac{1}{2}$ x (86,93%) e $\frac{1}{4}$ x (85,12%) de CIM e CGR-312 com 1x (92,71 %) $\frac{1}{2}$ x (87,3%) e $\frac{1}{4}$ x (86,98%) de CIM permearam a membrana com valores próximos a 100%.

A porcentagem de permeabilidade celular de 1x, $\frac{1}{2}$ x e $\frac{1}{4}$ x da CIM para o OE CGR – 210 foram de 44,8%, 44,5% e 43,2, respectivamente e para o OE CGR-125 foram de 49,21%, 46,58% e 41,31% para 1x, $\frac{1}{2}$ x e $\frac{1}{4}$ x da CIM. Sendo os acessos com menor permeabilidade da membrana.

A permeabilidade ocorre devido à presença de compostos terpênicos no OE, que possuem uma natureza lipídica que facilita o transporte das moléculas para o interior da célula bacteriana. Esse processo resulta na modificação da permeabilidade da membrana citoplasmática o que leva à perda da integridade e aumento da permeabilidade celular (RIBEIRO *et al.*, 2012).

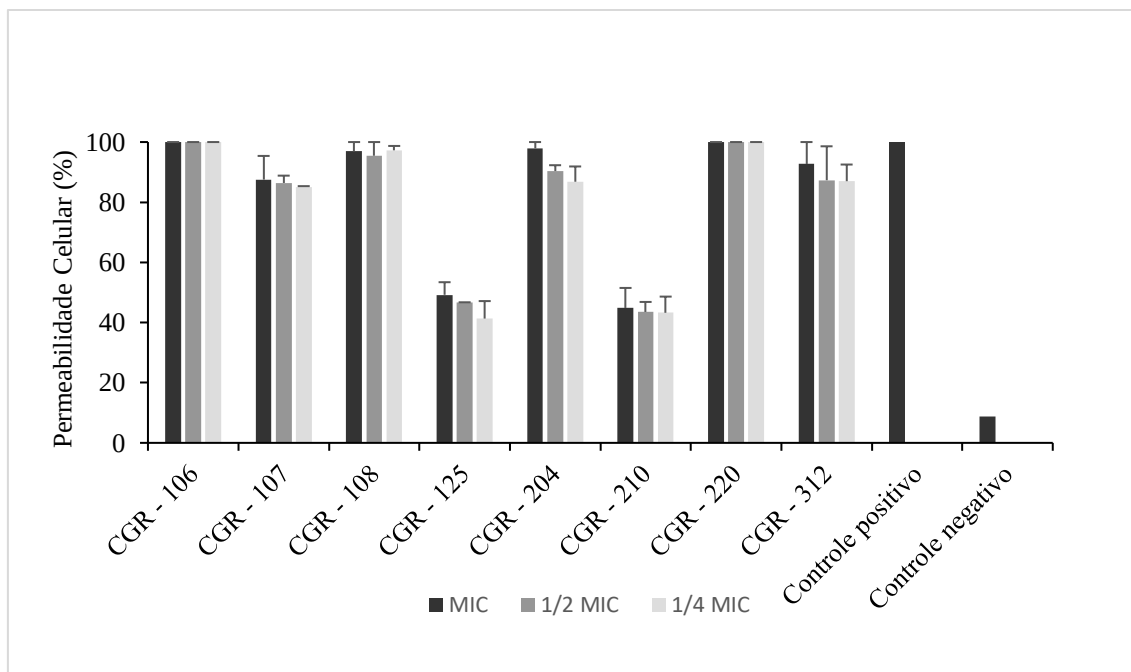


FIGURA 3: Permeabilidade celular do fitopatógeno *Xanthomonas campestris* pv. *melonis* após 30 minutos de exposição aos OEs de acessos de *Croton grewiioides*.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os acessos apresentaram eficácia na inibição do crescimento bacteriano, com destaque para os OEs dos acessos CGR-106, CGR-107 e CGR-220 que inibiram 100% do crescimento com $1000 \mu\text{g/mL}^{-1}$.
- A análise da CIM demonstrou que os acessos CGR-106, CGR-107 e CGR-220 necessitam de $1000 \mu\text{g/mL}^{-1}$ para inibir o crescimento bacteriano.
- Com exceção do sulfato e da estreptomicina, para todos os OEs e concentrações estudadas, não foi possível a determinação da CBM.
- Os OEs CGR-107 e CGR-220, ricos em Eugenol, destacaram-se na inibição do biofilme bacteriano.
- A permeabilidade da membrana bacteriana foi afetada pelos tratamentos com OEs, especialmente CGR-106 e CGR-220.
- Os OEs de *Croton grewoides* apresentam potencial como agentes antibacterianos e antibiofilme sobre XM.

Mais pesquisas são necessárias para entender melhor esses mecanismos e otimizar o uso desses OEs no controle de doenças bacterianas em plantas.

6. REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. New York: Academic Press, 1997. 635 p.

ALVAREZ-MARTINEZ, C. E.; SGRO, G. G.; ARAUJO, G. G.; PAIVA, M. R.N.; MATSUYAMA, B. Y.; GUZZO, C. R.; ANDRADE, M. O.; FARAH, C. S. Secrete or perish: the role of secretion systems in xanthomonas biology. **Computational And Structural Biotechnology Journal**, v. 19, p. 279-302, 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.csbj.2020.12.020>.

ALVES, A. S. A. **Taxonomia de *croton* sect. *ocalia* (klotzsch) baill. no Brasil e *Croton* sect. *geiseleria* (a. gray) baill. s.l. (euphorbiaceae) no nordeste do Brasil**. 2012. 92 p. (Dissertação Mestrado). Universidade Federal Rural de Pernambuco – Recife.

AN, S. Q.; POTNIS, N.; DOW, M.; VORHÖLTER, F.-J.; HE, Y. Q.; BECKER, A.; TEPPER, D.; LI, Y.; WANG, N.; BLERIS, L. Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. **Fems Microbiology Reviews**, v. 44, n. 1, p. 1-32, 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/femsre/fuz024>.

BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos**. 2013. 51 p. (Dissertação de Mestrado) Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia – Lisboa.

BATISTA, J. N. G. **Podridão negra das crucíferas no brasil: etiologia e estratégias de manejo em couve-flor**. 2020. (Tese de doutorado) – Universidade de Brasília, Brasília.

BARBIERI, M. C. N. P. M. **MELÃO/CEPEA: Exportações da parcial da safra 2022/23 estão limitadas**. 2023. HF Brasil - ESALQ - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" USP, Piracicaba, SP, Brasil. Disponível em: [https://www.hfbrasil.org.br/br/melao-cepea-exportacoes-da-parcial-da-safra-2022-23-estao-limitadas.aspx#:~:text=Tomando%20como%20base%20os%20dados,\)%2C%20recuo%20de%2011%25](https://www.hfbrasil.org.br/br/melao-cepea-exportacoes-da-parcial-da-safra-2022-23-estao-limitadas.aspx#:~:text=Tomando%20como%20base%20os%20dados,)%2C%20recuo%20de%2011%25). Acesso em: 15 ago. 2023.

BEHLAU, F.; HONG, J. C.; JONES, J. B.; GRAHAM, J. H. Evidence for Acquisition of Copper Resistance Genes from Different Sources in Citrus-Associated *Xanthomonads*. **Phytopathology**, v. 103, n. 5, p. 409-418, 2013. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-06-12-0134-r>.

BERIAN, L. O. S.; OCCHIENA, E. M. Doenças bacterianas. **Hortaliças-Fruto**, p. 209-240, 2018. <http://dx.doi.org/10.7476/9786586383010.0008>.

BLANKENSHIP, J. R.; MITCHELL, A. P. How to build a biofilm: a fungal perspective. **Current Opinion In Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 588-594, dez. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2006.10.003>.

COSTA, G. A. **Noções sobre interação planta-patógeno e indução de resistência em plantas. 2019. 45 p. (monografia)** Universidade Federal Rural de Pernambuco - Garanhuns – Pernambuco. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.06.014>.

CUI, L.; SISKOS, L.; WANG, C.; SCHOUTEN, H. J.; VISSER, R. G. F.; BAI, Y. Breeding melon (*Cucumis melo*) with resistance to powdery mildew and downy mildew. **Horticultural Plant Journal**, v. 8, n. 5, p. 545-561, 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hpj.2022.07.006>.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, v. 39, n. 2, p. 120-130, 2017. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0104-8899.20160068>.

FREIRE, I. C. M.; PÉREZ, A. L. A. L.; CARDOSO, A. M. R.; MARIZ, B. A. L. A.; ALMEIDA, L. F. D.; CAVALCANTI, Y. W.; PADILHA, W. W. N. Atividade antibacteriana de Óleos Essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 21, p. 372-377, 2014. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/12_053.

GRUMET, R.; MCCREIGHT, J. D.; MCGREGOR, C.; WENG, Y.; MAZOUREK, M.; REITSMA, K.; LABATE, J.; DAVIS, A.; FEI, Z. Genetic Resources and Vulnerabilities of Major Cucurbit Crops. **Genes**, v. 12, n. 8, p. 1222, 7 ago. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/genes12081222>.

HEMMATI, F.; SALEHI, R.; GHOTASLOU, R.; KAFIL, H. S.; HASANI, A.; GHOLIZADEH, P.; NOURI, R.; REZAEE, M. A. Quorum Quenching: a potential target for antipseudomonal therapy. **Infection And Drug Resistance**, v. 13, p. 2989-3005, 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/idr.s263196>.

HORA, R. C.; CAMARGO JUNIOR, O. A.; BUZANINI, A. C. Cucurbitáceas e outras. **Hortaliças-Fruto**, p. 71-111, 2018. EDUEM. <http://dx.doi.org/10.7476/9786586383010.0005>.

IBGE. **Produção de Melão**. 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/melao/br>. Acesso em: 15 ago.

2023.

JACQUES, M. A.; ARLAT, M.; BOULANGER, A.; BOUREAU, T.; CARRÈRE, S.; CESBRON, S.; CHEN, N. W. G.; COCIANCICH, S.; DARRASSE, A.; DENANCÉ, N. Using Ecology, Physiology, and Genomics to Understand Host Specificity in *Xanthomonas*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 54, n. 1, p. 163-187, 4 ago. 2016. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100147>.

KASNOWSKI, M. C.; MANTILLA, S. P. S.; OLIVEIRA, L. A. T.; FRANCO, R. M. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, v. 3, n. 15, 2010.

LAMICHHANE, J. R.; OSDAGHI, E.; BEHLAU, F.; KÖHL, J.; JONES, J. B.; AUBERTOT, J.N. Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. **Agronomy For Sustainable Development**, v. 38, n. 3, p. 28-38, 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13593-018-0503-9>.

LE, K. Y.; OTTO, M. Quorum-sensing regulation in staphylococci — an overview. **Frontiers In Microbiology**, v. 6, 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.01174>.

LECHOLOCHOLO, N.; SHOKO, T.; MANHIVI, V. E.; MABOKO, M. M.; AKINOLA, S. A.; SIVAKUMAR, D. Influence of different rootstocks on quality and volatile constituents of cantaloupe and honeydew melons (*Cucumis melo*. L) grown in high tunnels. **Food Chemistry**, v. 393, p. 133388, 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133388>.

LOUREIRO, R. J.; ROQUE, F.; RODRIGUES, A. T.; HERDEIRO, M. T.; RAMALHEIRA, E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rpsp.2015.11.003>.

MENEZES, T. O. A.; ALVES A. C. B. A.; VIEIRA, J. M. S.; MENEZES, S. A. E.; ALVES, B. P.; MENDONÇA, L. C. V. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v.38, p.184-191, 2009.

NADER, T. T.; COPPEDE, J. S.; TALEB-CONTINI, S. H.; AMARAL, L. A.; PEREIRA, A. M. S. Pesquisa Veterinaria Brasileira. Rio Janeiro: **Revista Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 39, n. 9, p. 1713-1719, 2018.

NUNES, E. A. C. **Isolamento de uma fração com atividade fosfolipásica do veneno da serpente *Bothrops erythromelas***. 2019. 67 p. (Dissertação de mestrado)

Universidade Federal Da Paraíba, João Pessoa.

PEREIRA, A. L. G.; QUEIROZ, M. H. T.; MELO, J. F.; SANTOS, J. C.; AZEVEDO, J. B.; OLIVEIRA, J. F. Ocorrência de uma nova doença bacteriana em melão (*Cucumis melo* L.) causada por *Xanthomonas* sp. **O Biológico**, São Paulo, v. XLV, p. 89-90, 1975.

PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário**. 2019. Disponível em: <https://www2.ufpel.edu.br/biotecnologia/gbiotec/site/content/paginadoprofessor/uploads/professor/ce5449dfcf0e02f741a5af86c3c5ae9a.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2023.

PRESTON, H. A. F.; NUNES, G. H. S.; PRESTON, W.; SOUZA, E. B.; MARIANO, R. L. R.; DATNOFF, L. E.; NASCIMENTO, C. W. A. Slag-based silicon fertilizer improves the resistance to bacterial fruit blotch and fruit quality of melon grown under field conditions. **Crop Protection**, v. 147, p. 105460, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105460>.

REIS, J. B.; FIGUEREDO, L. A.; CASTORANI, VEIGA, G. M.; MORAES, S. M. O. Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra patógenos alimentares. **Brazilian Journal of health Review**, v. 3, n. 1, p. 342-363, 2020. <http://dx.doi.org/10.34119/bjhrv3n1-025>.

RIBEIRO, D. S.; MELO, D. B.; GUIMARAES, A. G.; VELOZO, E. S. Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 687-696, 2012. Universidade Estadual de Londrina. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33n2p687>.

RODRIGUES NETO, J.; SUGIMORI, M. H.; OLIVEIRA, A. R. Podridão bacteriana dos frutos do melão (*Cucumis melo* L.) causada por *Xanthomonas campestris* pv. melonis, pv. nov. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 10, n. 3, p. 217-233, 1984.

RODRIGUES, T. C.; GOIS, I. B.; FERNANDES, R. P. M.; BLANK, A. F.; SANDES, R. D. D.; NETA, M. T. S. L.; NARAIN, N.; ARRIGONI-BLANK, M. F. Caracterização química e atividade antimicrobiana de óleos essenciais de Croton growioides Baill. acessos sobre o fitopatógeno *Xanthomonas campestris* pv. campestris. **Bioquímica e fisiologia de pesticidas**, v. 193, p. 105454, 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2023.105454>.

RYAN, R. P.; VORHÖLTER, F. J.; POTNIS, N.; JONES, J. B.; VAN SLUYS, M. A.; BOGDANOVE, A. J.; DOW, J. M. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 344-355, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2558>.

SCHNEIDER, R. P. **Biofilmes Microbianos**. Microbiologia in foco, v. 1, n. 2 p. 4-12, 2007.

SIBBR - Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira, 2020. **Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil e Lista da Flora do Brasil** Disponível em: <https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/289263>. Acesso em: 13 de Outubro de 2023

SILVA, M. H. M. **Óleos essenciais de *Croton adamantinus* Müll. Arg. e *C. grewioides* Baill. (Euphorbiaceae): Composição química e atividades antibacteriana e antioxidante**. 2016. 64 p. (Dissertação Mestrado). Universidade Federal Rural de Pernambuco – Recife.

SILVA, R. S.; OLIVEIRA, M. M. G.; MELO, J. O.; BLANK, A. F.; CORRÊA, C. B.; SCHER, R.; FERNANDES, R. P. M. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Lippia gracilis* sobre o fitopatógeno *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e seu efeito na integridade da membrana. **Bioquímica e Fisiologia de Pesticidas**, v. 160, p. 40-48, 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.06.014>.

VALERIANO, C.; PICCOLI, R.H.; CARDOSO, M.G.; ALVES, E. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 1, p. 57-67, 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-05722012000100009>.

VICENTE, J. G.; HOLUB, E. B. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, n. 1, p. 2-18, 11 out. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00833.x>.

VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A.; CARDOSO, J. E.; FREIRE, F. C. Oliveira; VIDAL, J. C. **Recomendações para o Controle das Principais Doenças que Afetam a Cultura do Melão na Região Nordeste**: circular técnica. 12. ed. Fortaleza: Embrapa, 2001. 22 p. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT/7815/1/ct_12.pdf. Acesso em: 15 ago. 2023.

ZHAO, G.; LIAN, Q.; ZHANG, Z.; FU, Q.; HE, Y.; MA, S.; RUGGIERI, V.; MONFORTE, A. J.; WANG, P.; JULCA, I. A comprehensive genome variation map of melon identifies multiple domestication events and loci influencing agronomic traits. **Nature Genetics**, v. 51, n. 11, p. 1607-1615, 2019. <http://dx.doi.org/10.1038/s41588-019-0522-8>.