



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

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE
ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Croton grewioides* SOBRE
FITOPATÓGENOS DO GÊNERO *XANTHOMONAS***

CAROLINE ALVES SOARES

2025



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

CAROLINE ALVES SOARES

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE
Croton grewioides SOBRE FITOPATÓGENOS DO GÊNERO *XANTHOMONAS***

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

Orientadora
Profa. Dra. Roberta Pereira Miranda Fernandes

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2025

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

S676a Soares, Caroline Alves.
Atividade antimicrobiana e antibiofilme de óleos essenciais de *Croton grewoides* sobre fitopatógenos do gênero *Xanthomonas*. / Caroline Alves Soares; orientadora Roberta Pereira Miranda Fernandes. – São Cristóvão, SE, 2025.
56 f.: il.

Tese (doutorado em Agricultura e Biodiversidade) – Universidade Federal de Sergipe, 2025.

1. Agrobiodiversidade. 2. Doenças bacterianas das plantas. 3. Produtividade agrícola. 4. Agricultura sustentável. 5. Essências e óleos essenciais. I. Fernandes, Roberta Pereira Miranda, orient. II. Título.

CDU 632.35

CAROLINE ALVES SOARES

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE
Croton grewoides SOBRE FITOPATÓGENOS DO GÊNERO XANTHOMONAS**

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

APROVADA em 23 de julho de 2025.

Dra. Daniela Aparecida de Castro Nizio	(IFS)
Dra. Itamara Bomfim Gois	(UFS)
Dra. Isabela da Silva Vasconcelos Rodrigues	(UNINASSAU)
Dr. Paulo Roberto Gagliardi	(UFS)

Profa. Dra. Roberta Pereira Miranda Fernandes
(Orientadora)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pelo seu infinito amor, pela proteção e pelas conquistas obtidas, e à Mãe Rainha, pela força concedida, por me amparar, ensinando-me a superar as dificuldades e mostrando-me o caminho nos momentos de insegurança.

Ao meu pai, José, e à minha amada mãe, Maria, por tranquilizarem meu coração, por todo incentivo, dedicação e amor. À minha amada vizinha, Magnolia, que sempre me apoia e reza por mim todas as noites. E ao meu sobrinho, Brayan, por toda a sua alegria.

Aos meus sogros, Carlos e Edleuza, que são como pais. Meu muito obrigada pelo apoio ao longo dessa caminhada.

À minha segunda família, Arlete, José, Vinicius e Aline. Em especial, Aline, um anjo que Deus colocou na minha vida e que sempre consegue tirar o que há de melhor em mim.

À minha orientadora, Dra. Roberta Pereira Miranda Fernandes, pela generosidade em compartilhar seus conhecimentos, pela paciência e pelo incentivo constante. Sua confiança no meu potencial foi essencial para que eu chegasse até aqui, assim como seu otimismo contagiante de que tudo daria certo. E a sua famosa frase “Vocês estão adiantadas, meninas!”

À minha coorientadora e amiga, Dra. Itamara Bomfim Gois, pelas conversas, pela paciência e por todas as valiosas contribuições em cada etapa deste trabalho. Meu muito obrigada pela disposição em esclarecer minhas dúvidas e por todas as sugestões. Além, é claro, da troca de receitas para conseguir fazer um bom biscoito de polvilho, mas até agora não consegui.

À professora Dra. Maria de Fátima Arrigoni-Blank, por todos os ensinamentos desde a graduação e pelo incentivo em fazer o doutorado. Apreendi muito com sua organização e exemplo de profissionalismo. Como também, ao grupo de pesquisa LCTMV, foram muitos anos de aprendizados, descontração e amizade. Meu muito obrigada!

À professora Daniela, por ter contribuído com toda minha formação acadêmica.

Ao professor Arie Fitzgerald e a todos do grupo GPMACO, em especial, Laura e Rose, pelo apoio e todos os almoços no Resun.

A todos do Laboratório de Enzimologia, Tamiris, Larissa e Jéssica. Em especial, Larissa e Jéssica, por toda ajuda e apoio ao longo do trabalho. A ajuda de vocês foi imprescindível.

Ao meu namorado, Luís Fernando, pelo apoio, cumplicidade e por todos os finais de semana que passou montando placa e avaliando experimentos comigo.

Aos amigos que ganhei durante essa trajetória acadêmica, em especial, ao Matheus, por cada conselho.

Aos colaboradores da Universidade Federal de Sergipe, em especial Seu Carlos, por nos ajudar com a água destilada, e a Jéssika, por nos ajudar com paciência.

Aos professores, professoras e colegas do Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade (PPGAGRI), pelas discussões enriquecedoras, ensinamentos e convivência ao longo desses anos.

À Universidade Federal de Sergipe e ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Sou grata por cada partilha e amizade construída nesse caminho e agradeço a todos aqueles que aqui não foram nomeados, mas que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, para minha formação e para o meu desenvolvimento pessoal.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10
4. ARTIGO 1: QUIMIOTIPOS E BIOATIVIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Croton grewioides</i> Baill.....	17
Resumo.....	17
4.1. Introdução	17
4.2. Material e Métodos	18
4.3. Resultados	20
4.4. Discussão.....	57
4.5. Conclusões.....	59
4.6. Referências Bibliográficas	60
5. ARTIGO 2: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Croton grewioides</i> Baill. E SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS CONTRA <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>melonis</i>	66
Resumo.....	66
5.1. Introdução	66
5.2. Material e Métodos	67
5.3. Resultados e Discussão	71
5.4. Conclusões.....	81
5.5. Referências Bibliográficas	82
6. ARTIGO 3: ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Croton grewioides</i> Baill. REDUZ A FORMAÇÃO DE BIOFILME DIMINUINDO A VIRULÊNCIA DE <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	86
Resumo.....	86
6.1. Introdução	86
6.2. Material e Métodos	87
6.3. Resultados	90
6.4. Discussão.....	97
6.5. Conclusões.....	98
6.6. Referências Bibliográficas	98
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	101

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura		Página
1	Sintoma característico da podridão negra em couve-manteiga. Fonte: Soares, C. A.	5
2	Sintomas característicos da barriga-d'água em melões. (A) Sintomas externos da doença em estágio avançado. (B) Bolsa de cavidade no interior dos frutos. Fonte: Soares, C. A.	6
3	Etapas de formação de biofilmes bacterianos. Fonte: Soares, C. A.	8

ARTIGO 1

Figura		Página
1	<i>Croton grewoides</i> Baill. (A) planta, (B) e (C) folhas, (D) inflorescência, (E) frutos e (F) sementes.....	18
2	Fluxograma de identificação e seleção de estudos. Scopus (<i>Croton grewoides</i> = 14, <i>Croton zehntneri</i> = 63, <i>Croton glycosmeus</i> = 0 e <i>Oxydictis grewoides</i> = 0). Web of Science (<i>Croton grewoides</i> = 13, <i>Croton zehntneri</i> = 80, <i>Croton glycosmeus</i> = 0 e <i>Oxydictis grewoides</i> = 0).....	19
3	Produção científica anual de estudos relacionados às atividades biológicas associadas aos OECGs.....	20
4	Perfil da publicação e impacto na comunidade científica de estudos relacionados às atividades biológicas associadas aos OECGs. (A) Periódicos. (B) Citação por publicação	21
5	Mapa mundial de colaboração para publicações relacionadas a atividades biológicas associadas aos OECGs	22
6	Explorando as relações entre palavras-chave. (A) Análise de correspondência múltipla. (B) Dendrograma. (C) Mapa temático.....	23
7	Principais atividades biológicas atribuídas aos OECGs	53
8	Composição química e distribuição dos genótipos dos estudos prospectados. (A) Análise de componentes principais dos genótipos. (B) Análise de componentes principais dos constituintes químicos	56
9	Listas de verificação para sugerir a validade e confiabilidade dos resultados obtidos.....	57

ARTIGO 2

Figura		Página
1	Triagem <i>in vitro</i> da atividade antimicrobiana de OECGs contra Xmel.....	73
2	Valores de coeficientes (escores VIP) obtidos através do método PLS-DA para os compostos químicos presentes dos OECGs em relação à CIM contra Xmel. Eug: Eugenol; MC: Metil chavicol; ME: Metil eugenol; BGerm: Bicyclergmacreno; E-Car: (E)-Cariofileno; GermD: Germacreno D; Xant: Xantoxilina; N.i.1579: não identificado; Spat: Espatuleno; EA: Acetato de eugenol; N.i.1580: não identificado; 2E,6EMF: (2E,6E)-farnesoato de metila	75
3	Cinética de morte de Xmel tratada com OECGs e seus principais compostos, juntamente com sulfato de cobre, sulfato de estreptomicina e casugamicina	76
4	Permeabilidade da membrana celular de Xmel após exposição aos OECGs e seus principais compostos, juntamente com sulfato de cobre, sulfato de estreptomicina e casugamicina	77
5	Atividade antibiofilme de OECGs e seus principais compostos, juntamente com sulfato de cobre, sulfato de estreptomicina e casugamicina	79

6	Análise de componentes principais de OECGs em relação à inibição do biofilme e permeabilidade de membrana de Xmel com CIM.....	80
7	Imagens de microscopia eletrônica de varredura de Xmel tratada ou não com CGR-106. Sem tratamento (A, B, C), 1/4x CIM (D, E, F), 1/2x CIM (G, H, I), 1x CIM (J, K, L). Biofilme formado (BF), células intactas (IC), células deformadas (DC).....	82

ARTIGO 3

Figura		Página
1	Atividade antibiofilme dos óleos essenciais de acessos de <i>Croton grewoides</i> Baill. contra XCC-629IBSBF	91
2	Valores de coeficientes (escores VIP) obtidos através do método PLS-DA para os componentes presentes nos óleos essenciais de acessos de <i>Croton grewoides</i> Baill. em relação à atividade antibiofilme contra XCC-629IBSBF. Eug: Eugenol; MC: Metil chavicol; ME: Metil eugenol; BGerm: Bicyclogermacreno; E-Car: (E)-Cariofileno; GermD: Germacrene D; Xant: Xantoxilina; N.i.1579: não identificado; Spat: Espatuleno; EA: Acetato de eugenol; N.i.1580: não identificado; 2E,6EMF: (2E,6E)-farnesoato de metila. Percentuais de inibição da atividade antibiofilme: CGR-107 (56,68%), CGR-108 (36,32%), CGR-204 (35,70%), CGR-220 (58,16%), CGR-311 (44,45%)	92
3	Cromatogramas de óleos essenciais dos acessos (A) CGR-107, (B) CGR-108, (C) CGR-204, (D) CGR-220 e (E) CGR-311 de <i>Croton grewoides</i> Baill.....	93
4	Cinética de crescimento (A) e viabilidade celular (B) de XCC-629IBSBF após exposição aos óleos essenciais de acessos de <i>Croton grewoides</i> Baill	94
5	Motilidade de XCC-629IBSBF (A) e halos formados após exposição aos tratamentos (B)	95
6	Área do halo de degradação de celulose (A), percentual de redução da atividade de celulase (B) e imagem dos halos de degradação formados após exposição aos tratamentos (C)	95
7	Área do halo de degradação de endoglucanase (A), percentual de redução da atividade de endoglucanase (B) e imagem dos halos de degradação formados após exposição aos tratamentos (C).....	96
8	Área do halo de degradação de protease (A), percentual de redução da atividade proteolítica (B) e imagem dos halos de degradação formados após exposição aos tratamentos (C)	96
9	Percentual de degradação do biofilme pré-formado de XCC-629IBSBF.....	97

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela		Página
1	Atividades biológicas associadas aos OECGs	24

ARTIGO 2

Tabela		Página
1	Código, município de origem, estado de origem e informações geográficas dos 25 acessos da coleção de <i>Croton grewoides</i> Baill. do Banco Ativo de Germoplasma de Plantas Medicinais e Aromáticas da Universidade Federal de Sergipe	68
2	Composição química dos OECGs.....	72
3	Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de OECGs e seus principais compostos, juntamente com sulfato de cobre, sulfato de estreptomicina e casugamicina, no crescimento <i>in vitro</i> de Xmel.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABTS Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)
ACM Análise de Correspondência Múltipla
ACP Análise de Componentes Principais
ANAVA Análise de Variância
CBM Concentração Bactericida Mínima
CIM Concentração Inibitória Mínima
CMC Carboximetilcelulose
CS Casca
DO Densidade óptica
DPPH 1,1-difenil-2-picril-hidrazila
DV Destilação a vapor
EP Erro padrão
EPS Exopolissacarídeos
FL Folhas
FRAP Poder Antioxidante Redutor Férrico
FSD Fator de Sinal Difusível
HD Hidrodestilação
HMDS Hexamethyldisilazane
IA Índice aritmético
IF Inflorescência
IP Iodeto de Propídio
IRRC Índice de Retenção Relativa calculado
IRRL Índice de Retenção Relativa literatura
ME Método de extração
MT Material
NI Composto não identificado
NIST National Institute of Standards & Technology
NO Óxido nítrico
NR Não Relatado
OECGs Óleos essenciais de *Croton grewoides*
OECz Óleo essencial de *Croton zehntneri*
OEs Óleos essenciais
ORAC Capacidade de Absorção de Radicais Livres de Oxigênio
p/v Peso por Volume
PA Parte Aérea
FF Folha Fresca
PBS Tampão fosfato-salino
PLS-DA Análise discriminante de mínimos quadrados parciais
ppm Partes por milhão
QQ Quorum quenching
QS Quorum sensing
RM Ramos
TL Talos
UFC Unidade Formadora de Colônia
XCC *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*
Xmel *Xanthomonas campestris* pv. *melonis*
YM Levedura-Malte
 λ em Comprimento de Onda de Emissão
 λ ex Comprimento de Onda de Excitação
 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ Microgramas por Mililitro

RESUMO

SOARES, Caroline Alves. **Atividade antimicrobiana e antibiofilme de óleos essenciais de *Croton grewoides* sobre fitopatógenos do gênero *Xanthomonas***. São Cristóvão: UFS, 2025. 103p. (Tese – Doutorado em Agricultura e Biodiversidade).*

Doenças bacterianas causadas por espécies do gênero *Xanthomonas*, como *X. campestris* pv. *campestris* (XCC) e *X. campestris* pv. *melonis* (Xmel), comprometem significativamente a produtividade agrícola em diversas culturas de importância econômica. Frente às limitações dos métodos tradicionais de controle, como o uso extensivo de agroquímicos sintéticos, os óleos essenciais (OEs) de plantas aromáticas têm se destacado como alternativas sustentáveis. Esta tese teve como objetivo avaliar os potenciais usos dos OEs de *C. grewoides* (OECGs), bem como a atividade antimicrobiana e antibiofilme sobre os fitopatógenos XCC e Xmel. O primeiro artigo da tese consistiu em uma revisão sistemática e bibliométrica da literatura sobre os OECGs, revelando 24 atividades biológicas atribuídas a esses óleos. Identificaram-se cinco possíveis quimiotipos (estragol, metil eugenol, eugenol, anetol e (E)-anetol), sendo metil chavicol e (E)-anetol propostos como marcadores químicos da espécie. Nos estudos experimentais, os compostos eugenol (81,67–84,92%), metil eugenol (70,10%) e metil chavicol (69,17%) foram identificados como majoritários. Avaliando o efeito dos OECGs sobre Xmel, observou-se que os acessos CGR-106, CGR-107, CGR-220 e a combinação dos compostos eugenol + metil chavicol apresentaram menor Concentração Inibitória Mínima (CIM) ($1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$). A Concentração Bactericida Mínima (CBM) para todos os OEs e seus compostos foi superior a $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Pela cinética de morte observou-se uma redução da viabilidade celular a partir de 120 min. Também foi possível observar que os OECGs foram capazes de permeabilizar a membrana celular e reduzir a formação de biofilme. Para XCC, observou-se que a formação de biofilme foi significativamente reduzida, sendo o eugenol o composto com maior correlação com a atividade antibiofilme (VIP = 2,54, PLS-DA). A erradicação de biofilmes pré-formados atingiu até 71,47% (CGR-220). A motilidade bacteriana também foi inibida, com o CGR-311 proporcionando a menor área de deslocamento ($0,35 \text{ cm}^2$). As atividades de celulase, endoglucanase e protease foram significativamente reduzidas, com inibições de 75,9% para endoglucanase (CGR-204), 59,0% para celulase (CGR-204) e 64,0% para protease (CGR-107). Esses resultados evidenciam o potencial dos OECGs como agentes antivirulência para o controle sustentável de fitopatógenos, contribuindo para a redução da dependência de agroquímicos sintéticos na agricultura.

Palavras-chave: Bioatividade, fitopatógenos, antivirulência, biofilme, agricultura sustentável.

* Comitê Orientador: Roberta Pereira Miranda Fernandes – UFS (Orientadora), Itamara Bomfim Gois – UFS (Coorientadora).

ABSTRACT

SOARES, Caroline Alves. **Antimicrobial and antibiofilm activity of essential oils of *Croton grewoides* on phytopathogens of the genus *Xanthomonas***. São Cristóvão: UFS, 2025. 103p. (Thesis - Doctor of Science in Agriculture and Biodiversity).*

Bacterial diseases caused by species of the genus *Xanthomonas*, such as *X. campestris* pv. *campestris* (XCC) and *X. campestris* pv. *melonis* (Xmel), significantly compromise agricultural productivity in several economically important crops. Given the limitations of traditional control methods, such as the extensive use of synthetic agrochemicals, essential oils (EOs) from medicinal plants are highlighted as sustainable alternatives. This thesis aimed to evaluate the potential use of *C. grewoides* EOs (CGEOs), as well as their antimicrobial and antibiofilm activity against the phytopathogens XCC and Xmel. The first article of the thesis consisted of a systematic and bibliometric review of the literature on CGEOs, revealing 24 biological activities attributed to these oils. Five possible chemotypes were identified (estragole, methyl eugenol, eugenol, anethole and (E)-anethole), with estragole and (E)-anethole proposed as chemical markers of the species. In subsequent experimental studies, the compounds eugenol (81.67–84.92%), methyl eugenol (70.10%), and methyl chavicol (69.17%) were identified as major. Evaluating the effect of CGEOs on Xmel, it was observed that the accessions CGR – 106, CGR – 107, CGR – 220 and the combination of eugenol + methyl chavicol compounds presented the lowest MIC ($1000\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$). The MBC for all CGEOs and their compounds was higher than $4000\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. The kinetics of death showed a reduction in cell prediction from 120 min. It was also possible to observe that CGEOs were able to permeabilize the cell membrane and reduce biofilm formation. For XCC, we observed that biofilm formation was significantly reduced, with eugenol being the compound with the highest antibiofilm activity (VIP = 2.54, PLS-DA). The eradication of preformed biofilms reached up to 71.47% (CGR – 220). Bacterial motility was also inhibited, with CGR – 311 presenting a smaller displacement area (0.35 cm^2). Cellulase, endoglucanase, and protease activities were significantly reduced, with inhibitions of 75.9% for endoglucanase (CGR – 204), 59.0% for cellulase (CGR – 204), and 64.0% for protease (CGR – 107). These results highlight the potential of CGEOs as antivirulence agents for the sustainable control of phytopathogens, contributing to the reduction of dependence on synthetic agrochemicals in agriculture.

Key-words: Bioactivity, phytopathogens, antivirulence, biofilm, sustainable agriculture.

* Guidance Committee: Roberta Pereira Miranda Fernandes (Advisor), Itamara Bomfim Gois (Adjunct advisor).

1. INTRODUÇÃO GERAL

As doenças bacterianas representam uma das principais ameaças à produtividade agrícola, causando perdas significativas em culturas de importância econômica em todo o mundo. Dentre os agentes fitopatogênicos, as bactérias do gênero *Xanthomonas* destacam-se por sua capacidade de infectar uma ampla gama de espécies vegetais (Timilsina *et al.*, 2020), incluindo crucíferas e cucurbitáceas, resultando em doenças como a podridão negra, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (XCC), e a barriga-d'água em melões, por *Xanthomonas campestris* pv. *melonis* (Xmel). Essas enfermidades comprometem a qualidade e a comercialização dos produtos agrícolas, demandando estratégias de controle mais eficazes e sustentáveis.

As medidas tradicionais de manejo, como o uso de agroquímicos sintéticos, rotação de culturas e eliminação de restos culturais (Ryan *et al.*, 2011), frequentemente apresentam limitações, incluindo alto custo, impacto ambiental e desenvolvimento de resistência bacteriana (Achari; Ramesh, 2019). Nesse contexto, os óleos essenciais (OEs) de plantas medicinais e aromáticas têm emergido como alternativas promissoras devido às suas propriedades antimicrobianas (Da Silva *et al.*, 2019; Da Silva *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2023), antibiofilme e antivirulência (Singh *et al.*, 2017; Vishakha *et al.*, 2022), aliadas à biodegradabilidade e menor toxicidade em comparação aos pesticidas convencionais (Borges *et al.*, 2021).

Dentre as espécies vegetais com potencial para esse fim, *Croton grewoides* Baill., uma planta endêmica do semiárido brasileiro pertencente à família Euphorbiaceae, destaca-se pela riqueza de compostos bioativos em seus OEs, como eugenol, metil eugenol e metil chavicol (Medeiros *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2021; Rodrigues *et al.*, 2023), que conferem atividades antibacterianas (Rodrigues *et al.*, 2023), antioxidantes (Oliveira *et al.*, 2021) e inseticidas (Santos *et al.*, 2023).

A formação de biofilmes por fitobactérias, como XCC e Xmel, é um fator crítico de virulência, pois facilita a adesão às superfícies vegetais, aumenta a resistência a agentes antimicrobianos e contribui para a disseminação do patógeno (Lo *et al.*, 2020). Além disso, a produção de exopolissacarídeos e enzimas extracelulares, como celulasas e proteases, desempenha um papel central na patogênese, degradando tecidos vegetais e obstruindo o fluxo de água no xilema (Lo *et al.*, 2020). Evidências indicam que os OEs podem interferir nesses fatores de virulência, reduzindo a formação de biofilmes e a motilidade bacteriana sem necessariamente comprometer a viabilidade celular (Singh *et al.*, 2017), o que sugere um mecanismo de ação antivirulência que minimiza a pressão seletiva e o desenvolvimento de resistência.

Esta tese teve como objetivo avaliar os potenciais usos dos OEs de *C. grewoides* (OECGs), bem como a atividade antimicrobiana e antibiofilme sobre os fitopatógenos XCC e Xmel, investigando sua composição química, eficácia inibitória e potencial como agentes antivirulência. Os resultados obtidos contribuem para o desenvolvimento de estratégias sustentáveis de controle de doenças bacterianas na agricultura, com foco na redução da dependência de agroquímicos sintéticos e na promoção de práticas ambientalmente responsáveis.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Croton grewioides*: Características botânicas, fitoquímica, usos tradicionais e potenciais

A família Euphorbiaceae apresenta distribuição pantropical e é reconhecida em diversas partes do mundo por sua importância econômica, especialmente na alimentação humana, produção de látex e óleos. Compreende cerca de 5.000 espécies, organizadas em aproximadamente 300 gêneros. No Brasil, ocorrem 63 gêneros e 940 espécies, com hábitos e habitats diferentes, distribuídas por todos os tipos de vegetação (Carneiro-Torres *et al.*, 2017). Relata-se que as espécies dessa família apresentam variadas atividades biológicas, atribuídas à diversidade de fitoquímicos, tais como flavonoides, saponinas, terpenos, ésteres, alcaloides, glicosídeos cianogênicos, taninos, lecitinas e glicoproteínas (Trindade; Lameira, 2014).

O gênero *Croton* é um dos mais importantes da família Euphorbiaceae, sendo o segundo maior e mais diverso dentro desse grupo. Composto por espécies arbóreas, arbustivas ou herbáceas, reúne cerca de 1.200 espécies, em sua maioria distribuídas pelas Américas. No território brasileiro, o gênero *Croton* apresenta grande diversidade, com aproximadamente 350 espécies, das quais 252 são endêmicas (Carneiro-Torres *et al.*, 2017). Entre essas espécies, destaca-se *Croton grewioides* Baill.

C. grewioides Baill. (sin. *Croton zehntneri* Pax & K. Hoffm; *Croton glycosmeus* Müll.Arg.; *Oxydectis grewioides* (Baill.) Kuntze) é uma planta medicinal e aromática endêmica do Brasil, encontrada nas regiões de Caatinga e Cerrado dos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe (SiBBR, 2025).

As plantas desta espécie são popularmente conhecidas como “marmeleiro”, “caatinga-de-cheiro”, “alecrim-de-cabocla” ou “canelinha”. São plantas monoicas, com hábito arbustivo (0,7-2 m), ramos esverdeados, tricomas estrelados e fasciculados. Suas folhas são alternadas, simples, com ápice agudo, base cuneada a levemente arredondada, simétrica e com a margem serrilhada. As inflorescências são terminais e contínuas (17–83 mm). Suas flores são estaminadas no ápice e pistiladas na base, com 5 sépalas e 5 pétalas. O fruto é verde-ferrugíneo e as sementes são oblongas, rugosas e amarronzadas (Silva *et al.*, 2009; Carneiro-Torres *et al.*, 2011).

Na medicina popular, *C. grewioides* é amplamente utilizada no tratamento de inflamações, distúrbios gástricos e intestinais (Trindade; Lameira, 2014). Além disso, propriedades bioativas têm sido atribuídas aos seus óleos essenciais (OEs), como antibacterianas (Rodrigues *et al.*, 2023), inseticidas (Santos *et al.*, 2023), antioxidantes (Oliveira *et al.*, 2021), anti-hepatotóxicas (Lima *et al.*, 2008), cicatrizantes (Cavalcanti *et al.*, 2012), ansiogênicas (Leite *et al.*, 2009), gastroprotetoras (Coelho-de-Souza *et al.*, 2013), antimaláricas (Mota *et al.*, 2012) e vasorrelaxantes (De França-Neto *et al.*, 2012), especialmente devido à diversidade química deles.

Os componentes químicos dos OECGs pertencem a diversas classes estruturais, como monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides (Medeiros *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2021). Oliveira *et al.* (2021) e Rodrigues *et al.* (2023) apontam que os compostos mais abundantes nos OECGs são metil chavicol, eugenol e metil eugenol. Adicionalmente, Lima *et al.* (2020) identificaram (*E*)-anetol e metil chavicol como os principais constituintes desses OEs.

O *C. grewioides* possui significativo potencial industrial, especialmente devido à presença de eugenol, metil chavicol e metil eugenol. É amplamente reconhecido que essas substâncias são utilizadas na indústria em produtos para cuidados pessoais, em alguns fármacos com propriedades anestésicas e anti-inflamatórias, bem como fragrâncias e saborizantes alimentícios. Isso torna *C. grewioides* uma fonte promissora para obtenção desses compostos.

Os OECGs podem ser utilizados na formulação de diversos medicamentos com propriedades antiespasmódicas (Lima *et al.*, 2020), antinociceptivas (Oliveira *et al.*, 2001) e cicatrizantes (Cavalcanti *et al.*, 2012). Além disso, os OEs dessa espécie podem ser úteis para as indústrias do agronegócio, devido às propriedades inseticidas atribuídas, principalmente, aos

compostos eugenol e metil eugenol (Santos *et al.*, 2023), o que reforça a relevância da espécie para o desenvolvimento de bioprodutos.

2.2. Óleo essencial

Os OEs são um grupo complexo de moléculas voláteis, lipofílicas e odoríferas, geralmente com odor agradável e coloração levemente amarelada. Possuem baixo peso molecular, são solúveis na maioria dos solventes orgânicos (éter, álcool, acetona) e insolúveis em água (De Sousa *et al.*, 2023). Podem ser extraídos de diversas estruturas vegetais, como folhas, flores, frutos, caules e raízes, sendo produzidos e armazenados em canais oleíferos, bolsas secretoras, tricomas glandulares ou em células de parênquimas florais e foliares, o que confere o aroma característico dessas estruturas (Moura *et al.*, 2019).

Esses fitoquímicos derivam da correlação entre as rotas metabólicas, de tal forma que as rotas primárias forneçam precursores para as rotas secundárias produzirem esses produtos (Tavares *et al.*, 2012; Wink, 2015). Os constituintes dos OEs são produzidos por três vias do metabolismo secundário: a via do chiquimato, a via do mevalonato e a via do metil eritritol fosfato, sendo estas duas últimas as mais relevantes (Corazza, 2010).

Quimicamente, os OEs são formados por uma mistura de terpenos, terpenoides e fenilpropanoides. Os terpenos mais comuns são os monoterpenos e sesquiterpenos, os quais são classificados de acordo com o número de unidades pentacarbonadas, sendo os mais abundantes os monoterpenos (10 carbonos) com duas unidades de isoprenos e os sesquiterpenos (15 carbonos) com três unidades de isoprenos (Maleck *et al.*, 2021). Os terpenoides são terpenos que apresentam oxigênio em sua estrutura química e podem ser classificados como álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas, éteres e fenóis. Já os fenilpropanoides, como eugenol e metil eugenol, derivam do aminoácido fenilalanina e são constituídos por um anel aromático ligado a uma cadeia de três carbonos (Tongnuanchan; Benjakul, 2014; Stevanović *et al.*, 2018).

A produção desses metabólitos está associada a fatores genéticos, em que a base genética determina a produção de um grupo específico de moléculas que são características de cada espécie vegetal. Além disso, as condições ambientais, juntamente com a idade das plantas, maturidade das folhas e o estágio de desenvolvimento, também podem interferir na composição química dos OEs, na concentração de cada um dos compostos, bem como na estabilidade e qualidade dessas moléculas (Gonçalves *et al.*, 2023).

Nos vegetais, os OEs exercem diversas funções relevantes, como a proteção contra patógenos, tais como bactérias, vírus e fungos; na defesa contra herbívoros, atraindo inimigos naturais e promovendo uma defesa indireta; e na atração de insetos polinizadores e dispersores de sementes. Adicionalmente, são atribuídas aos OEs outras funções biológicas, como a comunicação entre indivíduos da mesma espécie, mediando respostas coordenadas aos estresses e induzindo a produção de compostos defensivos. Os OEs também contribuem para a proteção contra estresses abióticos, como temperaturas extremas, bem como participam da regulação hormonal, influenciando processos fisiológicos como a germinação e o crescimento vegetal (Maleck *et al.*, 2021). Dessa forma, os OEs são parte de uma importante estratégia para a adaptação e sobrevivência das plantas.

Devido à sua diversidade química e às múltiplas funções ecológicas, os OEs tornaram-se objetos de pesquisa nos mais diversos setores industriais. No setor agrícola, em particular, os OEs vêm sendo amplamente investigados como alternativas sustentáveis aos agroquímicos convencionais. Seu potencial para atuar como agentes antimicrobianos, inseticidas, fungicidas e herbicidas, atuando em diversos sítios de ação, além de sua fácil degradação no ambiente, o que resulta em menor acúmulo de resíduos e riscos reduzidos à saúde humana, contribui para o desenvolvimento de práticas agrícolas mais seguras e ambientalmente responsáveis (Borges *et al.*, 2021).

2.3. Propriedades antibacterianas dos óleos essenciais

Os OEs são fontes promissoras de biomoléculas com potencial antibacteriano, cuja ação pode envolver múltiplos mecanismos. Esses mecanismos podem afetar tanto a estrutura do envoltório celular quanto componentes intracelulares, como o citoplasma, comprometendo funções vitais da célula bacteriana.

A ação dos OEs sobre as fitobactérias está frequentemente relacionada aos seus compostos majoritários, bem como às interações sinérgicas entre os diferentes constituintes presentes na mistura (Seow *et al.*, 2014). A atividade antimicrobiana dos OEs não se deve a um único mecanismo, mas sim a uma cascata de reações que envolvem toda a célula bacteriana (Nazarro *et al.*, 2013).

A eficácia dos OEs como agentes bactericidas pode ser atribuída a diversos fatores, incluindo inibição da síntese da parede celular; interferência na cadeia transportadora de elétrons nos processos respiratórios; modulação da atividade enzimática; alteração do equilíbrio iônico; indução de danos oxidativos; e, principalmente, perturbações na estrutura das membranas celulares. Essas alterações podem desorganizar a bicamada lipídica, promovendo despolarização e alterações na permeabilidade da membrana (Nazarro *et al.*, 2013).

Em vários trabalhos foi destacada a capacidade dos OEs extraídos de espécies vegetais como *Thymus* ssp., *Origanum* ssp., *Mentha* spp., *Citrus* ssp. e *Cinnamomum* ssp., contra fitobactérias de relevância agrícola, como *Pseudomonas* spp. e *Xanthomonas* spp (Marin *et al.*, 2024). Os OEs das espécies *Lippia gracilis* e *Varronia curassavica* também demonstraram resultados promissores. Da Silva *et al.* (2020) relataram que os OEs de cinco genótipos de *V. curassavica* e suas combinações apresentaram atividade bactericida para XCC, com concentração inibitória mínima (CIM) entre 500 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os OEs de *L. gracilis* também inibem o crescimento *in vitro* de XCC com valores de CIM entre 0,7 a 1,0 mg mL^{-1} (Da Silva *et al.*, 2019).

Os OECGs também apresentam atividade antimicrobiana contra XCC. Embora o mecanismo de ação desses OEs ainda não esteja completamente elucidado, há evidências de que sua principal forma de atuação envolva a interferência na permeabilidade da membrana celular. Rodrigues *et al.* (2023) demonstraram que os OECGs induzem a permeabilidade da membrana celular de XCC, por meio da formação de poros e do extravasamento do conteúdo intracelular. Esse efeito foi confirmado por meio do ensaio de permeabilidade celular utilizando iodeto de propídio, o que comprova que os OECGs atuam predominantemente sobre as membranas celulares.

Um número substancial de publicações descrevendo o potencial antimicrobiano de OEs tem sido observado nos últimos anos. Esse fato está relacionado, especialmente, à busca por novas moléculas e práticas amigáveis ao meio ambiente, tornando os OEs uma ferramenta valiosa para o controle de bactérias em diversas áreas.

2.4. Patogenicidade de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e *Xanthomonas campestris* pv. *melonis*

A agricultura, tanto no Brasil quanto no restante do mundo, é significativamente impactada por doenças causadas por espécies do gênero *Xanthomonas*, resultando em perdas substanciais em diversas culturas de grande importância econômica. *Xanthomonas* (do grego *xanthos*, que significa “amarelo”, e *monas*, que significa “entidade”) é um grande gênero de bactérias associadas exclusivamente a plantas. Essas bactérias apresentam formato de bastonete, possuem um único flagelo polar, estabelecem relações tanto epifíticas quanto patogênicas com os seus hospedeiros e produzem um exopolissacarídeo característico, o xantano, que confere aparência mucosa às colônias bacterianas e contribui para o aumento da virulência (Darrasse *et al.*, 2013; Büttner; Bonas, 2010).

O gênero *Xanthomonas* compreende 36 espécies de bactérias Gram-negativas (Parte, 2018), reconhecidas por causarem doenças em cerca de 400 espécies vegetais. Entre as principais enfermidades associadas a esse grupo bacteriano estão o cancro cítrico (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*), o crestamento bacteriano do arroz (*Xanthomonas oryzae* pv.

oryzae (XOO)), a estria bacteriana do milho (*Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*) e a podridão negra em crucíferas (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) (Timilsina *et al.*, 2020).

Xanthomonas campestris pv. *campestris* (Pammel) Dowson (XCC) foi descrita pela primeira vez por Garman em 1890, como agente causal de uma doença em repolhos no estado de Kentucky (Alvarez, 2000). Posteriormente, em 1895, Pammel comprovou a natureza patogênica da bactéria, demonstrando sua capacidade de causar doença em plantações de nabo no estado de Iowa, Estados Unidos (Vicente; Holub, 2013). Ainda no início do século XX, Russell concluiu que XCC era a responsável pela destruição de lavouras de repolho no sudeste do estado de Wisconsin (Williams, 1980). Desde então, a podridão negra tem sido relatada em todas as regiões do mundo onde se cultivam espécies da família Brassicaceae (Popović *et al.*, 2013), sendo considerada um sério problema em regiões tropicais, subtropicais e de clima continental úmido. Embora também ocorra em áreas de clima frio, a doença raramente se desenvolve a ponto de causar danos significativos às plantas (Williams, 2007; Lema *et al.*, 2012).

Essas bactérias penetram no tecido vegetal principalmente por meio de ferimentos mecânicos e de estruturas naturais como os hidatódios. Esses órgãos, localizados nas margens das folhas, são responsáveis pela liberação de água em estado líquido, processo conhecido como gutação (Pascholati; Dalio, 2018). Gotas de água contaminadas, presentes na superfície foliar, podem ser reabsorvidas pelos hidatódios, permitindo que a bactéria atinja a cavidade interna dessas estruturas e se desloque até o sistema vascular da planta. Uma vez no interior do hospedeiro, a bactéria coloniza os vasos do xilema, desencadeando o processo patogênico que compromete a qualidade e a comercialização dos produtos agrícolas, devido à baixa aceitação de plantas com sintomas visíveis da doença (Mansfield *et al.*, 2012).

Os sintomas da podridão negra em crucíferas podem ser observados em qualquer estágio fenológico da planta. No campo, é comum a formação de lesões amareladas em formato de “V”, que se iniciam nas margens das folhas e avançam em direção ao centro, acompanhando o tecido vascular até atingir a nervura central (Dubrow; Bogdanove, 2021). Ao alcançar o xilema, XCC coloniza os vasos e pode obstruí-los por meio da formação de colônias bacterianas aderidas às paredes vasculares, o que restringe o fluxo de água e resulta no escurecimento das nervuras. Com a progressão da doença, observa-se murcha e necrose nas áreas infectadas (Santos *et al.*, 2008). Em infecções mais severas, pode haver a queda parcial ou total das folhas, podendo culminar na morte da planta (Araújo; Tebaldi, 2019).



Figura 1. Sintoma característico da podridão negra em couve-manteiga. Fonte: Soares, C. A.

Outra doença, que acomete uma cultura agronomicamente importante e também é desencadeada por fitobactérias do gênero *Xanthomonas*, é a podridão mole que afeta melões e é causada pela *Xanthomonas campestris* pv. *melonis* (Xmel). Essa fitobactéria ficou conhecida como o agente causal da doença barriga-d'água em melões, observada pela primeira vez na

região de Presidente Prudente, em São Paulo, onde foi responsável por grandes perdas (Berian *et al.*, 2018).

Os sintomas dessa doença incluem a descoloração da polpa, seguida de uma decomposição dos tecidos, dando origem a uma bolsa de cavidade no interior dos frutos. Externamente não se observa qualquer sintoma, a não ser o aparecimento de uma anomalia logo abaixo da casca, provavelmente ponto de entrada do patógeno. Em estágios mais avançados, é comum a infestação por microrganismos secundários, comprometendo totalmente o fruto para consumo (Berian *et al.*, 2018).

Embora não se saiba muito sobre Xmel, alguns estudos evidenciam a presença constante dessa bactéria em cultivos de melão. Em campo, os sintomas dessa doença podem ser facilmente confundidos com distúrbios fisiológicos, causados por excesso de adubação nitrogenada, ou com doenças provocadas por outras fitobactérias, como *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* que, diferentemente de Xmel, exala mau cheiro característico nos frutos infectados (Barbosa *et al.*, 2010).

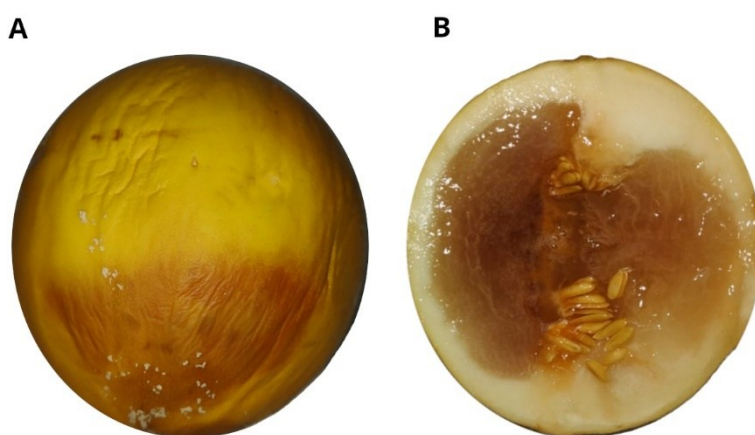


Figura 2. Sintomas característicos da barriga-d'água em melões. (A) Sintomas externos da doença em estágio avançado. (B) Bolsa de cavidade no interior dos frutos. Fonte: Soares, C. A.

Os principais fatores que favorecem a infecção e a progressão da doença barriga-d'água em melões incluem condições climáticas com altas temperaturas e elevada umidade relativa (Tavares, 2002), além de ferimentos na casca dos frutos. Esses ferimentos podem ser causados por tratos culturais inadequados, ataque de insetos, uso de ferramentas durante a colheita ou ainda pelo manuseio incorreto no armazenamento (Tavares, 2002). A doença manifesta-se com maior frequência durante os períodos de colheita e armazenamento, quando os frutos estão mais suscetíveis à infecção bacteriana, especialmente devido às alterações fisiológicas relacionadas ao processo de maturação (Tavares, 2002).

As fitobactérias do gênero *Xanthomonas* possuem vários nichos de sobrevivência, como sementes, em seu interior e/ou superfície (Maringoni, 2005), solo, matéria orgânica e restos culturais de plantas. A bactéria também pode sobreviver de forma epífita na superfície das plantas infectadas e em hospedeiros secundários que podem ocorrer de forma espontânea no campo (Silva *et al.*, 2021; Silva Júnior *et al.*, 2020). O patógeno pode ser disseminado à curta distância, por respingos de água da chuva e irrigação, insetos e máquinas contaminadas, e à longa distância, por sementes ou mudas infectadas (Amorim; Pascholati, 2018).

Para o controle dessas doenças bacterianas são utilizadas algumas estratégias, tais como a eliminação de plantas sintomáticas e restos culturais, a rotação de cultura, a solarização e a aplicação de fungicidas/bactericidas (Ryan *et al.*, 2011). Apesar destas alternativas para controle ou tratamento de doenças associadas aos microrganismos, o controle químico é o método mais difundido. No entanto, o uso indiscriminado desses produtos acelera o desenvolvimento de resistência dos patógenos aos antimicrobianos (Achari; Ramesh, 2019), o

que torna cada vez mais difícil superar as perdas causadas por patógenos agrícolas e ainda ser capaz de atender às crescentes demandas por alimentos da população.

2.5. Biofilmes bacterianos

Os microrganismos foram tradicionalmente estudados como organismos planctônicos. No entanto, investigações mais aprofundadas de comunidades sésseis em diferentes ambientes revelaram que o crescimento planctônico é, na verdade, uma condição rara na natureza. Ainda no século XVII, Antonie van Leeuwenhoek, ao examinar a superfície dos dentes em seres humanos, observou que havia uma predominância de agregados microbianos em relação às células livres, constituindo o primeiro relato da existência de biofilmes microbianos (Donlan, 2002).

Biofilmes são comunidades microbianas complexas, organizadas e funcionalmente coordenadas, nas quais os microrganismos vivem encapsulados por uma matriz extracelular autoproduzida. Essa matriz, composta principalmente por polissacarídeos, proteínas, DNA e lipídeos, oferece diversos benefícios aos microrganismos, como proteção, maior capacidade de crescimento em ambientes oligotróficos, acesso a nutrientes e maior tolerância a biocidas (Muhammad *et al.*, 2020; Dang; Lovell, 2016).

Essas comunidades se aderem firmemente a superfícies bióticas ou abióticas e podem ser formadas por uma única espécie ou por uma combinação de diferentes grupos microbianos, como bactérias, arqueias, algas, protozoários, fungos filamentosos e leveduras (Raghupathi *et al.*, 2018 Costa-Orlandi *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2014; Bogino *et al.*, 2013; Tomaras *et al.*, 2003). Diferentemente das células planctônicas, que vivem isoladamente, os microrganismos em biofilmes assumem um modo de vida coletivo e cooperativo.

A formação do biofilme bacteriano é um processo dinâmico e complexo que pode ser dividido em cinco fases principais, conforme ilustrado na Figura 1: (i) adesão reversível, caracterizada por interações fracas e transitórias entre células bacterianas planctônicas e uma superfície; (ii) adesão irreversível, quando ocorre a ancoragem estável à superfície, por meio de estruturas como fímbrias e lipopolissacarídeos, acompanhada da perda de flagelos e da motilidade; (iii) produção da matriz extracelular, composta por substâncias poliméricas extracelulares, que conferem coesão e proteção à comunidade microbiana; (iv) maturação do biofilme, etapa em que ocorre a formação de microcolônias e a comunicação celular mediada por moléculas sinalizadoras, resultando na estruturação tridimensional do biofilme; e (v) dispersão, fase em que células bacterianas são liberadas do biofilme maduro e retornam ao estado planctônico, possibilitando a colonização de novos nichos (Dow *et al.*, 2003; Castiblanco; Sundin, 2016).

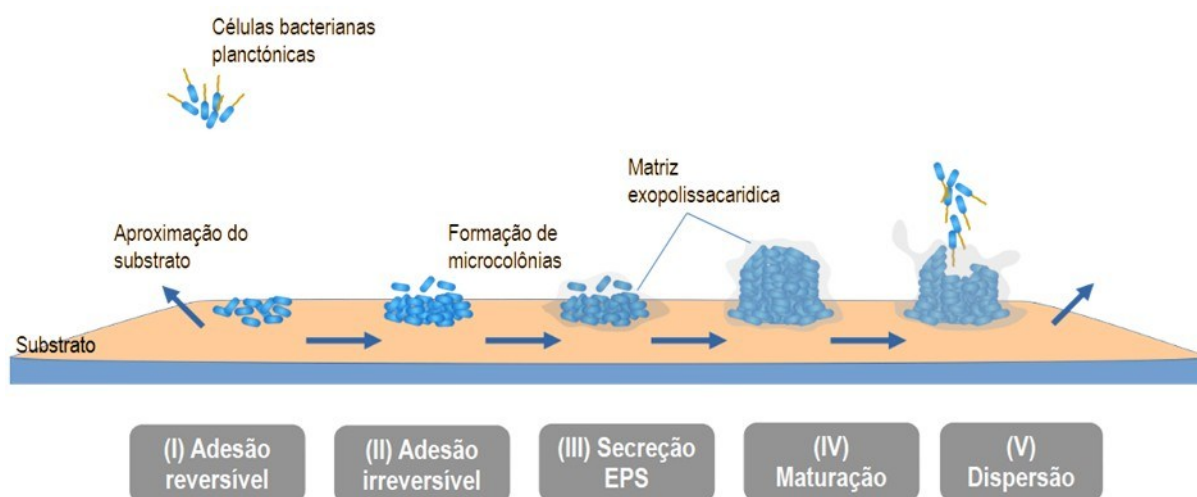


Figura 3. Etapas de formação de biofilmes bacterianos. Fonte: Soares, C. A.

Devido à sua complexidade, a formação de biofilmes é regulada por diferentes mecanismos ao longo de suas etapas. O mecanismo regulador mais estudado é o *quorum quenching* (QQ), definido como a ação de uma ou mais moléculas capazes de interferir ou inibir o *quorum sensing* (QS) (Ruiz *et al.*, 2008). O QS, por sua vez, corresponde à comunicação coordenada entre microrganismos dentro de uma colônia. Esse processo envolve a produção, liberação e detecção de moléculas sinalizadoras, permitindo que as células microbianas regulem coletivamente a formação do biofilme, a síntese de fatores de virulência e a produção de proteínas, enzimas e toxinas associadas à patogenicidade. Esses fatores atuam de forma integrada, e a interrupção de qualquer um deles pode comprometer todo o processo patogênico, tornando o microrganismo avirulento (Turan; Engin, 2018; Ye *et al.*, 2019).

O potencial do QQ no controle de microrganismos o destaca como uma promissora estratégia para o manejo microbiano. Esse mecanismo atua interferindo nos processos de patogenicidade por meio da interrupção da comunicação celular, exercendo menor pressão seletiva em comparação ao uso convencional de antibióticos. Enquanto os antibióticos atuam diretamente sobre alvos celulares, levando à morte bacteriana e promovendo uma forte pressão de seleção, o QQ apenas bloqueia a sinalização necessária para a expressão de fatores de virulência. Dessa forma, as bactérias deixam de causar danos às plantas, embora não sejam necessariamente eliminadas (Newman *et al.*, 2008; Achari; Ramesh, 2019).

Doenças associadas à formação de biofilmes têm sido relatadas em ambientes agrícolas. Diversas fitobactérias utilizam o biofilme como estratégia de colonização e virulência em plantas hospedeiras. Por exemplo, *Xanthomonas citri*, agente causal do cancro cítrico, forma biofilmes que contribuem para a adesão e persistência nas superfícies foliares (FERENCE *et al.*, 2018; Kyrkou *et al.*, 2018). Já *Xylella fastidiosa*, uma forte produtora de biofilme, é responsável pela doença de Pierce em videiras, bloqueando os vasos do xilema e interrompendo o fluxo de seiva (Rudrappa *et al.*, 2008; Kyrkou *et al.*, 2018). Os biofilmes também podem ser formados nas raízes de *Arabidopsis thaliana* e *Ocimum basilicum*, levando à morte das plantas em um curto período de tempo. *Ralstonia solanacearum*, reconhecida por formar biofilmes nas superfícies dos vasos do xilema, causa a murcha bacteriana em diversas espécies vegetais (Yao; Allen, 2007; Mori *et al.*, 2016).

Apesar da importância da formação de biofilme para a patogenicidade das fitobactérias, estratégias voltadas para o desenvolvimento de terapias antibiofilme ainda são pouco investigadas, especialmente no campo da agricultura. Nesse contexto, os OEs vêm sendo estudados por sua capacidade de inibir a formação dessas estruturas complexas, sem afetar diretamente a viabilidade celular. Essa característica é particularmente relevante, pois reduz a pressão seletiva associada ao uso de bactericidas convencionais. A ação antibiofilme dos OEs está frequentemente associada à interrupção do QS, sistema responsável pela regulação coordenada de genes relacionados à virulência, produção de exopolissacarídeos, motilidade e formação de biofilmes (Singh *et al.*, 2017).

Singh *et al.* (2017) relataram que o OE de *Thymus vulgaris* reduziu significativamente a formação de biofilme de XOO, sem afetar a atividade metabólica ou a cinética de crescimento bacteriano. Além disso, o tratamento com o OE suprimiu a motilidade celular, reduziu a síntese de substâncias essenciais para a estrutura do biofilme, como EPS e xantomonadina, e diminuiu significativamente a atividade de enzimas hidrolíticas. Esses resultados indicam que o OE de *T. vulgaris* atua na comunicação bacteriana por QS, sem comprometer o crescimento celular, o que aponta para uma nova estratégia promissora no controle de doenças de plantas. De forma semelhante, Vishakha *et al.* (2022) também evidenciaram a capacidade do OE de *Melaleuca alternifolia* em inibir a formação de biofilmes de XOO.

Os biofilmes representam estratégias complexas de sobrevivência bacteriana, e superar essa barreira é fundamental para garantir a produção sustentável de alimentos. Estudos têm demonstrado que os OEs, ao interferirem na comunicação celular bacteriana via QQ, podem reduzir a severidade de doenças causadas por fitopatógenos (Ye *et al.*, 2019). No caso do gênero

Xanthomonas, a redução na produção de xantana, um exopolissacarídeo essencial para a formação do biofilme, está diretamente relacionada à diminuição da virulência e dos efeitos deletérios das doenças (Achari; Ramesh, 2019). Assim, os OEs apresentam grande potencial para o controle de doenças de plantas, como a podridão negra das crucíferas e a barriga-d'água em melões.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHARI, G. A.; RAMESH, R. Recent advances in quorum quenching of plant pathogenic bacteria. **Advances in Biological Science Research**, p. 233-245, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817497-5.00015-X>
- ALVAREZ, A. M. Black rot of crucifers. In: SLUSARENKO, A.; FRASSER R. S. S.; VAN LOON, L. C. **Mechanisms of resistance to plant diseases**. Springer, 2000. p. 21-52. https://doi.org/10.1007/978-94-011-3937-3_2
- AMORIM, L.; PASCHOLATI, S. F. Ciclo de relações patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (org.). **Manual de Fitopatologia, Volume I, Princípios e Conceitos**. 5. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2018. p. 45-68.
- ARAÚJO, V. C.; TEBALDI, N. D. Intervalo de aplicação de óleos essenciais no controle da mancha bacteriana do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v. 45, n. 2, p. 210-212, 2019. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/187031>
- BARBOSA, M. A. G.; TERAÔ, D.; BATISTA, D. DA C. **Sistema de produção de melão: doenças**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. (Sistemas de Produção, 5). Disponível em: http://www.cpatas.embrapa.br:8080/sistema_producao/spmelao/doencas.html. Acesso em: 22 jun. 2025.
- BERIAN, L. O. S.; OCCHIENA, E.M. Doenças bacterianas. In: BRANDÃO FILHO, J. U. T.; FREITAS, P. S. L.; BERIAN, L. O. S.; GOTO, R. (Eds.). **Hortaliças-fruto** [online]. Maringá: EDUEM, 2018. pp. 209-240. ISBN: 978-65-86383-01-0. <https://doi.org/10.7476/9786586383010.0008>
- BOGINO, P. C.; DE LAS MERCEDES OLIVA, M.; SORROCHE, F. G.; GIORDANO, W. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 8, p. 15838-15859, 2013. <https://doi.org/10.3390/ijms140815838>
- BORGES, S.; ALKASSAB, A.T.; COLLISON, E.; HINAREJOS, S.; JONES, B.; MCVEY, E. Overview of the testing and assessment of effects of microbial pesticides on bees: strengths, challenges and perspectives. **Apidologie**, v. 52, p. 1256–1277, 2021. <https://doi.org/10.1007/s13592-021-00900-70.1007/s13592-021-00900-7>
- BÜTTNER, D.; BONAS, U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 2, p. 107-133, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00192.x>
- CARNEIRO-TORRES, D. S.; SILVA, O. L. M.; CORDEIRO, I. Flora da Bahia: *Euphorbia* (Euphorbiaceae). **Sitentibus**, v. 17, n. 1, p. 17-28, 2017. <https://doi.org/10.13102/scb2676>
- CARNEIRO-TORRES, D. S.; CORDEIRO, I.; GIULIETTI, A. M.; BERRY, P. E.; RINNA, R. Three new species of Croton (Euphorbiaceae s.s.) from the Brazilian Caatinga. **Brittonia**, v. 63, n. 1, p. 122-132, 2011. <https://doi.org/10.1007/s12228-010-9145-1>
- CASTIBLANCO, L. F.; SUNDIN, G. W. New insights on molecular regulation of biofilm formation in plant-associated bacteria. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 58, n. 4, p. 362-372, 2016. <https://doi.org/10.1111/jipb.12428>

CAVALCANTI, J. M.; LEAL-CARDOSO, J. H.; DINIZ, L. R. L.; PORTELLA, V. G.; COSTA, C. O.; LINARD, C. F. B. M.; COELHO-DE-SOUZA, A. N. The essential oil of *Croton zehntneri* and trans-anethole improves cutaneous wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 2, p. 240-247, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.08.030>

COELHO-DE-SOUZA, A. N.; LAHLOU, S.; BARRETO, J. E.; YUM, M. E.; OLIVEIRA, A. C.; OLIVEIRA, H. D.; LEAL-CARDOSO, J. H. Essential oil of *Croton zehntneri* and its major constituent anethole display gastroprotective effect by increasing the surface mucous layer. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 27, n. 3, p. 288-298, 2013. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2011.01021.x>

CORAZZA, S. **Aromacologia: uma ciência de muitos cheiros**. 3. ed. São Paulo: SENAC, 2010. 412 p.

COSTA-ORLANDI, C. B.; SARDI, J. C.; PITANGUI, N. S.; DE OLIVEIRA, H. C.; SCORZONI, L.; GALEANE, M. C.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Fungal biofilms and polymicrobial diseases. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 2, p. 22, 2017. <https://doi.org/10.3390/jof3020022>

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

DA SILVA, R. S.; DE OLIVEIRA, M. M. G.; SILVA, K. P.; RODRIGUES, I. DA S. V.; PINTO, V. DOS S.; BLANK, A. F.; FERNANDES, R. P. M. Synergistic effect of *Cordia curassavica* Jacq. essential oils association against the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 4376-4389, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06631-8>

DANG, H.; LOVELL, C. R. Microbial surface colonization and biofilm development in marine environments. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p. 91-138, 2016. <https://doi.org/10.1128/membr.00037-15>

DARRASSE, A.; CARRERE, S.; BARBE, V.; BOUREAU, T.; ARRIETA-ORTIZ, M. L.; BONNEAU, S.; JACQUES, M. A. Genome sequence of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* strain 4834-R reveals that flagellar motility is not a general feature of *xanthomonads*. **BMC Genomics**, v. 14, 2013. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-761>

DE FRANÇA-NETO, A.; CARDOSO-TEIXEIRA, A. C.; MEDEIROS, T. C.; DO SOCORRO QUINTO-FARIAS, M.; DE SOUZA SAMPAIO, C. M.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; LEAL-CARDOSO, J. H. Essential oil of *Croton argyrophyllloides*: toxicological aspects and vasorelaxant activity in rats. **Natural Product Communications**, v. 7, n. 10, p. 1934578X1200701040, 2012. <https://doi.org/10.1177/1934578X1200701040>

DE SOUSA, D. P.; DAMASCENO, R. O. S.; AMORATI, R.; ELSHABRAWY, H. A.; DE CASTRO, R. D.; BEZERRA, D. P.; LIMA, T. C. Essential oils: Chemistry and pharmacological activities. **Biomolecules**, v. 13, n. 7, p. 1144, 2023. <https://doi.org/10.3390/biom13071144>

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881, 2002. [10.3201/eid0809.020063](https://doi.org/10.3201/eid0809.020063)

DOW, J. M.; CROSSMAN, L.; FINDLAY, K.; HE, Y. Q.; FENG, J. X.; TANG, J. L. Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 19, p. 10995-11000, 2003. <https://doi.org/10.1073/pnas.1833360100>

DUBROW, Z. E.; BOGDANOVE, A. J. Genomic insights advance the fight against black rot of crucifers. **Journal of General Plant Pathology**, v. 87, n. 3, p. 127-136, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10327-021-00987-x>

ERENCE, C. M.; GOCHEZ, A. M.; BEHLAU, F.; WANG, N.; GRAHAM, J. H.; JONES, J. B. Recent advances in the understanding of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* pathogenesis and citrus canker disease management. **Molecular Plant Pathology**, v. 19, n. 6, p. 1302, 2018. [10.1111/mpp.12638](https://doi.org/10.1111/mpp.12638)

GONÇALVES, S.; MANSINHOS, I.; ROMANO, A. Influence of biotic and abiotic factors on the production and composition of essential oils. **Essential oils: extraction methods and applications**, p. 69-97, 2023. <https://doi.org/10.1002/9781119829614.ch4>

KYRKOU, I.; PUSA, T.; ELLEGAARD-JENSEN, L.; SAGOT, M. F.; HANSEN, L. H. Pierce's disease of grapevines: a review of control strategies and an outline of an epidemiological model. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2141, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02141>

LEITE, G. D. O.; PENHA, A. R. S.; COSTA, J. G. M. D.; CAMPOS, A. R. Anxiogenic like effect of *Croton zehntneri* Pax et Hoffm leaves essential oil in mice. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 12, n. 5, p. 546-550, 2009. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2009.10643755>

LEMA, M.; VELASCO, P.; SOENGAS, P.; FRANCISCO, M.; CARTEA, M. E. Screening for resistance to black rot in Brassica oleracea crops. **Plant Breeding**, v. 131, n. 5, p. 607-613, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2012.01974.x>

LIMA, F. C.; SOUSA, D. F.; FERREIRA, J. M.; LIMA JR, R. C.; TOMÉ, A. R.; CARDOSO, J. H. L.; CAMPOS, A. R. *Croton zehntneri* Essential Oil Prevents Acetaminophen-Induced Acute Hepatotoxicity in Mice. **Records of Natural Products**, v. 2, n. 4, 2008.

LIMA, C. C.; DE HOLANDA-ANGELIN-ALVES, C. M.; PEREIRA-GONÇALVES, Á.; KENNEDY-FEITOSA, E.; EVANGELISTA-COSTA, E.; BEZERRA, M. A. C.; LEAL-CARDOSO, J. H. Antispasmodic effects of the essential oil of *Croton zehntneri*, anethole, and estragole, on tracheal smooth muscle. **Heliyon**, v. 6, n. 11, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05445>

LO, H. H.; LIAO, C. T.; LI, C. E.; CHIANG, Y. C.; HSIAO, Y. M. The *clpX* gene plays an important role in bacterial attachment, stress tolerance, and virulence in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Archives of Microbiology**, v. 202, n. 3, p. 597-607, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01772-3>

MALECK, M.; DIAS, T. D.; CRUZ, I. L. S.; SERDEIRO, M. T.; NASCIMENTO, N. E.; CARRARO, V. M. Óleos essenciais—um breve relato. **Revista Eletrônica TECCEN**, v. 14, n. 2, p. 43-49, 2021. <https://doi.org/10.21727/teccen.v14i2.2970>

MANSFIELD, J.; GENIN, S.; MAGORI, S.; CITOVSKY, V.; SRIARIYANUM, M.; RONALD, P.; DOW, M.; VERDIER, V.; BEER, S. V.; MACHADO, M. A.; TOTH, I.; SALMOND, G.; FOSTER, G. D. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 6, p. 614-629, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>

MARIN, V. R.; ZAMUNÉR, C. F. C.; SANTOS, E. A. D.; FERREIRA, H.; SASS, D. C. Essential oils as alternatives in the control of phytopathogens: a systematic review of the last five years. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 27, n. 4, p. 903-937, 2024. [10.1080/0972060X.2024.2368629](https://doi.org/10.1080/0972060X.2024.2368629)

MARINGONI, A. C. Doenças das crucíferas. In: KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. cap. 31, p. 285-291.

MEDEIROS, V. M. DE; DO NASCIMENTO, Y. M.; SOUTO, A. L.; MADEIRO, S. A. L.; COSTA, V. C. DE O.; SILVA, S. M. P. M.; FALCÃO, S. V. DOS S.; AGRA, M. DE F.; DE SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; TAVARES, J. F. Chemical composition and modulation of bacterial drug resistance of the essential oil from leaves of *Croton grewoides*. **Microbial Pathogenesis**, v. 111, n. 1, p. 468-471, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.09.034>

MORI, Y.; INOUE, K.; IKEDA, K.; NAKAYASHIKI, H.; HIGASHIMOTO, C.; OHNISHI, K.; HIKICHI, Y. The vascular plant-pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum* produces biofilms required for its virulence on the surfaces of tomato cells adjacent to intercellular spaces. **Molecular Plant Pathology**, v. 17, n. 6, p. 890-902, 2016. <https://doi.org/10.1111/mpp.12335>

MOTA, M. L.; LOBO, L. T. C.; DA COSTA, J. M. G.; COSTA, L. S.; ROCHA, H. A., E SILVA, L. F. R.; DE ANDRADE NETO, V. F. *In vitro* and *in vivo* antimalarial activity of essential oils and chemical components from three medicinal plants found in northeastern Brazil. **Planta Medica**, v. 78, n. 7, p. 658-664, 2012. [10.1055/s-0031-1298333](https://doi.org/10.1055/s-0031-1298333)

MOURA, DE D. F.; MARTINS, R. D.; SILVA, M. DA V. Nerolidol: Fitoconstituinte de óleos essenciais de plantas da Caatinga. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 12, p.33402- 33416, 2019. <https://doi.org/10.34117/bjdv5n12-384>

MUHAMMAD, M. H.; IDRIS, A. L.; FAN, X.; GUO, Y.; YU, Y.; JIN, X.; HUANG, T. Beyond risk: bacterial biofilms and their regulating approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 928, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00928>

NAZARRO, F.; FRATIANNI, F.; MARTINO, DE L.; COPPOLA, R.; FEO, DE V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 6, n. 12, p. 1451-1474, 2013. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>

NEWMAN, K. L.; CHATTERJEE, S.; HO, K. A.; LINDOW, S. E. Virulence of plant pathogenic bacteria attenuated by degradation of fatty acid cell-to-cell signaling factors. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, n. 3, p. 326-334, 2008. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-3-0326>

OLIVEIRA, A. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; SANTOS, C. F.; MORAIS, S. M.; COELHO-DE-SOUZA, A. N. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton zehntneri* in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 1471-1474, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2001001100016>

OLIVEIRA, S. D. DA S.; SILVA, A. M. DE O.; BLANK, A.F.; NOGUEIRA, P. C.; NIZIO, D. A. C.; ALMEIDA-PEREIRA, C.S.; PEREIRA, R.; MENEZES-SÁ, T. S. A.; SANTANA, M. H.; ARRIGONI-BLANK, M. F. Radical scavenging activity of the essential oils from *Croton grewoides* Baill accessions and the major compounds eugenol, methyl eugenol and methyl chavicol. **Journal of Essential Oil Research**, v. 33, p. 94-103, 2021. <https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1779139>

PASCHOLATI, S. F.; DALIO, R. J. Fisiologia do parasitismo: como os patógenos atacam as plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Org). **Manual de Fitopatologia, Volume I, Princípios e Conceitos**. 5. ed. Minas Gerais: Agronômica Ceres, 2018. p. 389-421.

POPOVIĆ, T.; BALAZ, J.; STAROVIĆ, M.; TRKULJA, N.; IVANOVIĆ, Ž.; IGNJATOV, M.; JOŠIĆ, D. First report of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* as the causal agent of black rot on oilseed rape (*Brassica napus*) in Serbia. **Plant Disease**, v. 97, n. 3, p. 418-418, 2013. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-12-0506-PDN>

RAGHUPATHI, P. K.; LIU, W.; SABBE, K.; HOUF, K.; BURMOLLE, M.; SORENSEN, S. J. Synergistic interactions within a multispecies biofilm enhance individual species protection against grazing by a pelagic protozoan. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2649, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02649>

RODRIGUES, T. C.; GOIS, I. B.; FERNANDES, R. P. M.; BLANK, A. F.; SANDES, R. D. D.; NETA, M. T. S. L.; DE FÁTIMA ARRIGONI-BLANK, M. Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils from *Croton grewoides* Baill. accessions on the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 193, p. 105454, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2023.105454>

RUDRAPPA, T.; BIEDRZYCKI, M. L.; BAIS, H. P. Causes and consequences of plant-associated biofilms. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 64, n. 2, p. 153-166, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00465.x>

RUIZ, L. M.; VALENZUELA, S.; CASTRO, M.; GONZALEZ, A.; FREZZA, M.; SOULÈRE, L.; GUILIANI, N. AHL communication is a widespread phenomenon in biomining bacteria and seems to be involved in mineral-adhesion efficiency. **Hydrometallurgy**, v. 94, n. 1-4, p. 133-137, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2008.05.028>

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. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2558>

SANTOS, N. C.; SILVA, J. E. D.; SANTOS, A. C. C.; DANTAS, J. D. O.; TAVARES, S. R. S. A.; ANDRADE, V. S.; BACCI, L. Bioactivity of essential oils from *Croton grewoides* and its major compounds: toxicity to soybean looper *Chrysodeixis includens* and selectivity to the

- predatory stink bug *Podisus nigrispinus*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 7, p. 18798-18809, 2023. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23414-w>
- SANTOS, L. A. A. D.; BANDEIRA, D. D. A.; SILVA, J. P. D.; SILVEIRA, E. B. D.; GOMES, A. A. M. A.; MARIANO, R. D. L. R. Caracterização de isolados de *Xanthomonas campestris* pv *campestris* de sistemas de produção orgânico e reação de brássicas à podridão-negra. **Horticultura Brasileira**, v. 26, p. 486-491, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362008000400012>
- SEOW, Y. X.; YEO, C. R.; CHUNG, H. L.; YUK, H. G. Plant essential oils as active antimicrobial agents. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 1, p. 625-644, 2014. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.599504>
- SiBBBr. **Sistema da Informação sobre a Biodiversidade Brasileira: *Croton grewii* Baill.**, 2025. Disponível em: [Croton grewii : Alecrim-De-Cabocla | SiBBBr](#). Acesso em 21 jun. 2025.
- SILVA JÚNIOR, T. A. F.; SILVA, J. C.; GONÇALVES, R. M.; SOMAN, J. M.; PASSOS, J. R. S.; MARINGONI, A. C. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* associated with soil and cauliflower crop debris under Brazilian conditions. **European Journal of Plant Pathology**, v. 156, n. 2, p. 399-411, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01888-8>
- SILVA, J. C. DA; SILVA JÚNIOR, T. A. F. DA; SOMAN, J. M.; TOMASINI, T. D.; SARTORI, M. M. P.; MARINGONI, A. C. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the phyllosphere and rhizosphere of crops. **Plant and Soil**, v. 462, n. 1-2, p. 389-403, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11104-021-04832-0>
- SILVA, J. S.; SALES, M. F.; CARNEIRO-TORRES, D. S. O gênero *Croton* (Euphorbiaceae) na microrregião do Vale do Ipanema, Pernambuco, Brasil. **Rodriguésia**, v. 60, n. 4, p. 879-901, 2009. <https://doi.org/10.1590/2175-7860200960409>
- SILVA, V. O.; SOARES, L. O.; SILVA JUNIOR, A.; MANTOVANI, H. C.; CHANG, Y. F.; MOREIRA, M. A. Biofilm formation on biotic and abiotic surfaces in the presence of antimicrobials by *Escherichia coli* isolates from cases of bovine mastitis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 19, p. 6136-6145, 2014. <https://doi.org/10.1128/AEM.01953-14>
- SINGH, A.; GUPTA, R.; TANDON, S.; PANDEY, R. Thyme oil reduces biofilm formation and impairs virulence of *Xanthomonas oryzae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1074, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01074>
- STEVANOVIĆ, Z. D.; BOŠNJAK-NEUMÜLLER, J.; PAJIĆ-LIJKOVIĆ, I.; RAJ, J.; VASILJEVIĆ, M. Essential oils as feed additives - future perspectives. **Molecules**, v. 23, n. 7, p.1-20, 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23071717>
- TAVARES, S. I. B.; MOMENTÉ V. G.; NASCIMENTO I. R. *Lippia alba*: estudos químicos, etnofarmacológicos e agrônômicos. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v. 4, n. 1, p. 204-220, 2012.
- TAVARES, S. C. C. DE H. (Ed. técnica). **Melão. Fitossanidade: aspectos técnicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. 87 p. (Frutas do Brasil, 25). ISBN 85-7383-143-0.

TIMILSINA, S.; POTNIS, N.; NEWBERRY, E. A.; LIYANAPATHIRANAGE, P.; IRUEGAS-BOCARD, F.; WHITE, F. F.; GOSS, E. M.; JONES, J. B. *Xanthomonas* diversity, virulence and plant pathogen interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 8, p. 415-427, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0361-8>

TOMARAS, A. P.; DORSEY, C. W.; EDELMANN, R. E.; ACTIS, L. A. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. **Microbiology**, v. 149, n. 12, p. 3473-3484, 2003. [10.1099/mic.0.26541-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.26541-0)

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S. Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 7, p. 1231-1249, 2014. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12492>

TRINDADE, M. T.; LAMEIRA, O. A. Espécies úteis da família Euphorbiaceae no Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 19, n. 4, p. 1-19, 2014.

TURAN, N. B.; ENGIN, G. O. Quorum Quenching. In: **Comprehensive Analytical Chemistry**. Elsevier, v. 81, p. 117-149, 2018. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2018.02.003>

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, 2013. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00833.x>

VISHAKHA, K.; DAS, S.; DAS, S.K.; BANERJEE, S.; GANGULI, A. Antibacterial, anti-biofilm, and anti-virulence potential of tea tree oil against leaf blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* instigates disease suppression. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1-14, 2022. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00657-2>

WILLIAMS, P. H. Black rot. In: RIMMER, S.R.; SHATTUCK, V.I.; BUCHWALDT, L. (ed.). **Compendium of brassica diseases**. St. Paul, MN: APS Press, 2007. p. 60-62.

WILLIAMS, P. H. Black rot: a continuing threat to world crucifers. **Plant Disease**, v. 64, p. 736-742, 1980. [10.1094/PD-64-736](https://doi.org/10.1094/PD-64-736)

WINK, M. Modos de ação de medicamentos fitoterápicos e metabólitos secundários de plantas. **Medicamentos**, v. 2, n. 3, p. 251-286, 2015.

YAO, J.; ALLEN, C. The plant pathogen *Ralstonia solanacearum* needs aerotaxis for normal biofilm formation and interactions with its tomato host. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 17, p. 6415-6424, 2007. <https://doi.org/10.1128/jb.00398-07>

YE, T.; ZHOU, T.; FAN, X.; BHATT, P.; ZHANG, L.; CHEN, S. *Acinetobacter lactucae* strain QL-1, a novel quorum quenching candidate against bacterial pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2867, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02867>

4. ARTIGO 1

QUIMIOTIPOS E BIOATIVIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Croton grewoides* Baill.

Artigo formatado de acordo com as normas do periódico Pharmacological Research - Natural Products

RESUMO

Croton grewoides Baill. é uma planta medicinal e aromática nativa do nordeste brasileiro, reconhecida por suas diversas atividades biológicas, atribuídas principalmente ao seu rico perfil fitoquímico. Esta revisão explora sistematicamente a produção científica, os métodos de extração, a composição química e as propriedades biológicas dos óleos essenciais de *C. grewoides* (OECGs), destacando suas aplicações terapêuticas e agrícolas. Além disso, a qualidade metodológica dos estudos prospectados foi avaliada. Vinte e quatro atividades biológicas foram atribuídas aos OECGs, com efeitos farmacológicos predominantes, como anti-hepatotóxico, antidepressivo, cicatrizante, ansiogênico, gastroprotetor, antimalárico e vasorrelaxante. O estragol foi o composto com maior predominância entre os estudos revisados. Com base nos resultados, sugerimos que a espécie apresenta cinco quimiotipos (estragol, metil eugenol, eugenol, anetol e (E)-anetol) e os compostos estragol e (E)-anetol podem ser considerados marcadores químicos desta espécie. Esta revisão abrangente fornece informações essenciais para pesquisas futuras com OECGs nos setores agrícola, farmacêutico e cosmético, garantindo sua autenticidade e eficácia.

Palavras-chave: Planta medicinal; análise bibliométrica; atividade biológica; composto bioativo; produtos naturais.

4.1. Introdução

O uso de plantas com propriedades terapêuticas tem uma longa história, sendo parte intrínseca da evolução da medicina em diversas culturas ao redor do mundo. Essas plantas têm sido utilizadas como alternativas contra diversas doenças e condições clínicas. Com o advento da ciência e a capacidade de isolar compostos ativos de plantas, houve um aumento significativo no interesse da comunidade científica e de diferentes setores da indústria pelas propriedades biológicas das plantas aromáticas.

Croton grewoides Baill. (sin. *Croton zehntneri* Pax & K. Hoffm; *Croton glycosmeus* Müll.Arg.; *Oxydictis grewoides* (Baill.) Kuntze) é uma planta medicinal e aromática endêmica do Brasil, encontrada nas regiões de Caatinga e Cerrado dos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe e Minas Gerais. As plantas desta espécie (Figura 1A) são arbustos ou subarbustos, com ramos esverdeados e tricomas estrelados e fasciculados. Suas folhas são alternadas e simples, com ápice agudo, base cuneiforme a ligeiramente arredondada, simétricas e com margens serrilhadas (Figura 1B, Figura 1C). As flores possuem estames no ápice e pistilos na base, com 5 sépalas e 5 pétalas, e apresentam inflorescência terminal e contínua (Figura 1D). O fruto é verde-ferrugem (Figura 1E), com sementes oblongas, rugosas e amarronzadas (Figura 1F) [1-2].

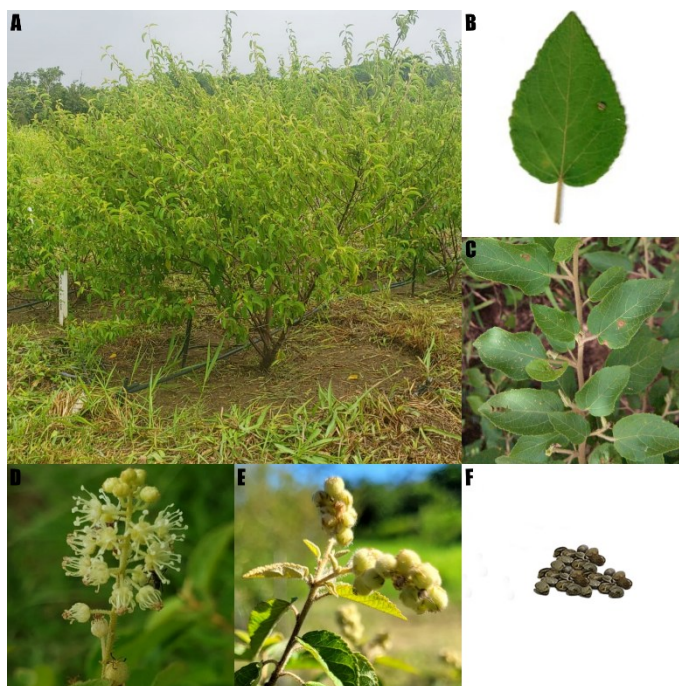


Figura 1. *Croton grewioides* Baill. (A) Planta, (B) e (C) folhas, (D) inflorescência, (E) frutos e (F) sementes.

A espécie é comumente utilizada na medicina tradicional, onde suas folhas e ramos são utilizados no preparo de chás, consumidos tanto como bebida aromática, devido ao forte aroma de cravo presente em algumas plantas, quanto como remédio. Além disso, os óleos essenciais (OEs) dessa espécie apresentam comprovadas propriedades bioativas, como atividade antibacteriana [3], inseticida [4] e antioxidante [5]. Além disso, demonstram atividades farmacológicas, como anti-hepatotóxica [6], antidepressiva [7], cicatrizante [8], ansiogênica [9], gastroprotetora [10], moduladora da neuropatia diabética [11-12], antimalárica [13] e vasorrelaxante [14].

Além de suas aplicações terapêuticas, *C. grewioides* possui significativo potencial industrial, especialmente devido à diversidade química de seus OEs. Os componentes químicos dos OECS pertencem a diversas classes estruturais, como monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides. Dada a aplicabilidade dos compostos presentes nos OECS, a espécie oferece uma base sólida para o desenvolvimento de produtos inovadores nos setores agrícola, farmacêutico e cosmético. Nesse sentido, a padronização química dos OECS é essencial para garantir a qualidade, a segurança e a eficácia dos produtos derivados, permitindo seu uso em biopesticidas e outros produtos sustentáveis.

A crescente demanda por produtos naturais com potencial terapêutico e agrícola tem impulsionado a investigação científica em plantas medicinais, como *C. grewioides*. No entanto, para promover o desenvolvimento de novos produtos e terapias, é crucial consolidar e analisar criticamente a produção científica existente sobre essa espécie. Assim, no presente trabalho, realizamos uma revisão abrangente do estado da arte, com foco em investigações fitoquímicas, biológicas e farmacológicas de *C. grewioides*, uma ação necessária para facilitar futuras pesquisas sobre a espécie.

4.2. Material e Métodos

4.2.1 Coleta de dados

Os dados utilizados neste estudo foram obtidos por meio de busca sistemática nas bases de dados *Web of Science* e *Scopus*. Para a pesquisa, foram utilizados os termos “óleo essencial” combinados com os diferentes sinônimos das espécies: “*Croton grewioides*”, “*Croton zehntneri*”, “*Croton glycosmeus*” e “*Oxydectis grewioides*”.

Os seguintes critérios de inclusão foram adotados: (a) O estudo deve estar relacionado à espécie *C. grewioides* ou seus sinônimos; (b) O estudo deve abordar o uso de OEs; (c) O uso de OEs deve estar associado a atividades biológicas. Os critérios de exclusão foram: (a) Publicações duplicadas; (b) Publicação não relacionada ao tema da pesquisa.

Os dados foram coletados em julho de 2024. A busca na base de dados *Scopus* resultou em 77 artigos (*C. grewioides* = 14, *C. zehntneri* = 63, *C. glycosmeus* = 0 e *O. grewioides* = 0). Destes, 38 foram excluídos por não atenderem aos critérios. A busca na *Web of Science* retornou 93 artigos (*C. grewioides* = 13, *C. zehntneri* = 80, *C. glycosmeus* = 0 e *O. grewioides* = 0), dos quais 55 foram removidos por não se adequarem ao tema. Após a eliminação de 36 artigos duplicados, um total de 41 publicações foram incluídas na análise final (Figura 2).

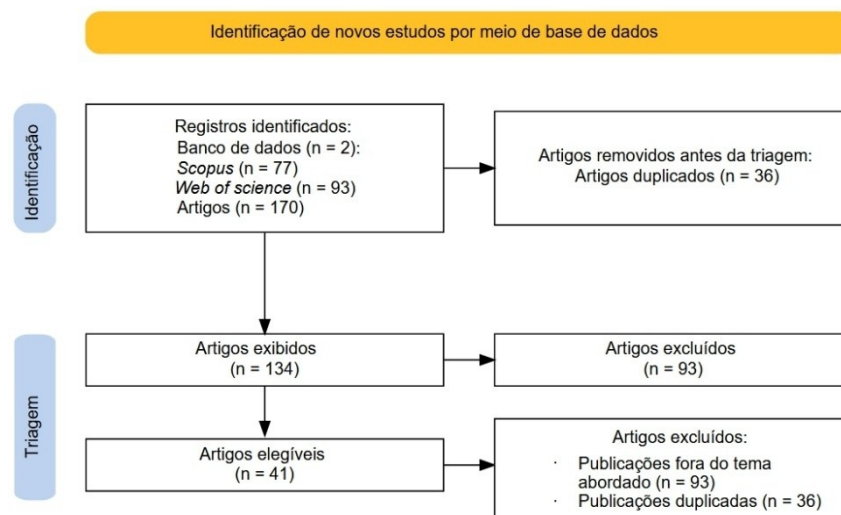


Figura 2. Fluxograma de identificação e seleção de estudos. *Scopus* (*Croton grewioides* = 14, *Croton zehntneri* = 63, *Croton glycosmeus* = 0 e *Oxydectis grewioides* = 0). *Web of Science* (*Croton grewioides* = 13, *Croton zehntneri* = 80, *Croton glycosmeus* = 0 e *Oxydectis grewioides* = 0).

4.2.2 Análise dos dados

A análise bibliométrica foi conduzida em duas etapas: (a) análise e visualização dos dados bibliométricos, utilizando o pacote Bibliometrix [15] no ambiente R [16]; (b) investigação das principais atividades biológicas associadas aos OECSs e seus principais compostos.

Inicialmente, foram analisadas as informações bibliométricas dos 41 estudos selecionados. A estrutura conceitual foi avaliada por meio de rede de co-palavras, mapeamento temático, análise de correspondência múltipla e dendrograma. A estrutura social foi examinada considerando produção científica por país, instituições mais relevantes, rede de colaboração entre autores e autores com maior impacto na área.

Na segunda etapa, foram sistematizadas as informações sobre atividades biológicas, principais compostos, métodos de extração dos OECSs, material vegetal utilizado, organismos-alvo, concentrações testadas e principais resultados obtidos nos estudos prospectados. Essas informações foram organizadas em uma tabela.

As análises químicas dos OECSs apresentadas nos 41 estudos prospectados foram submetidas à análise de componentes principais (ACP), conduzida no pacote stats [16] utilizando a função *prcomp*. Somente compostos com concentração igual ou superior a 5% foram incluídos na análise.

4.2.3 Qualidade metodológica/risco de viés

A qualidade metodológica dos estudos prospectados foi avaliada com base em uma adaptação dos critérios propostos por Da Fonseca et al. 2024 [17]. A avaliação foi realizada

utilizando um checklist para estimar o risco de viés em três aspectos críticos: (a) precisão na identificação das espécies: verificação da correta determinação taxonômica da planta utilizada nos estudos; (b) caracterização química adequada: análise da descrição e quantificação dos compostos químicos dos OEs; (c) descrição clara e execução rigorosa dos procedimentos metodológicos: avaliação da transparência na condução dos experimentos e na apresentação dos resultados. A aplicação desses critérios teve como objetivo garantir a validade e a confiabilidade dos dados analisados.

4.3. Resultados

4.3.1 Bibliometria de estudos relacionados às atividades biológicas associadas aos OECGs

Foram identificados 170 documentos, dos quais 93 foram indexados na *Web of Science* e 77 na *Scopus*. Após a remoção de duplicatas e a triagem de títulos, palavras-chave e resumos elegíveis, 41 publicações foram selecionadas para revisão completa.

O número de artigos publicados anualmente entre 1995 e 2023, juntamente com a média móvel de cinco anos, é apresentado na Figura 3. A distribuição anual de artigos sugere um aumento significativo nas publicações a partir de 2008, com pico em 2021, com 5 artigos. A média móvel em 2023 é de 2,6 artigos e mostra uma tendência ascendente, confirmada pela taxa média de crescimento anual de 1,46%.

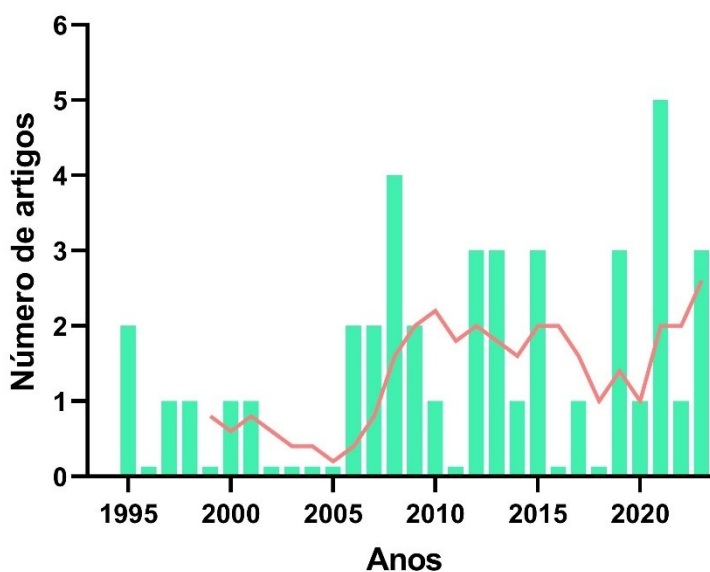


Figura 3. Produção científica anual de estudos relacionados às atividades biológicas associadas aos OECGs.

Os artigos foram distribuídos em 29 fontes (periódicos). *Journal of Ethnopharmacology*, *Natural Product Communications* e *Brazilian Journal of Pharmacognosy* foram os periódicos mais relevantes e apresentaram o maior índice H (H-3), respondendo por 21,95% das publicações. Seis outros periódicos publicaram dois estudos cada, representando 29,26% das publicações, enquanto os demais publicaram apenas um artigo cada (Figura 4A).

O número total de citações dos artigos foi de 1.033, com uma média de 25,19 citações por publicação. Embora o periódico *Veterinary Parasitology* tenha publicado apenas um artigo, ele foi citado 134 vezes. Os estudos publicados no *Journal of Ethnopharmacology* foram citados 132 vezes, com uma média de 44 citações por publicação, seguido pelo periódico *Phytomedicine*, que foi citado 101 vezes, com uma média de 50,5 citações por publicação (Figura 4B).

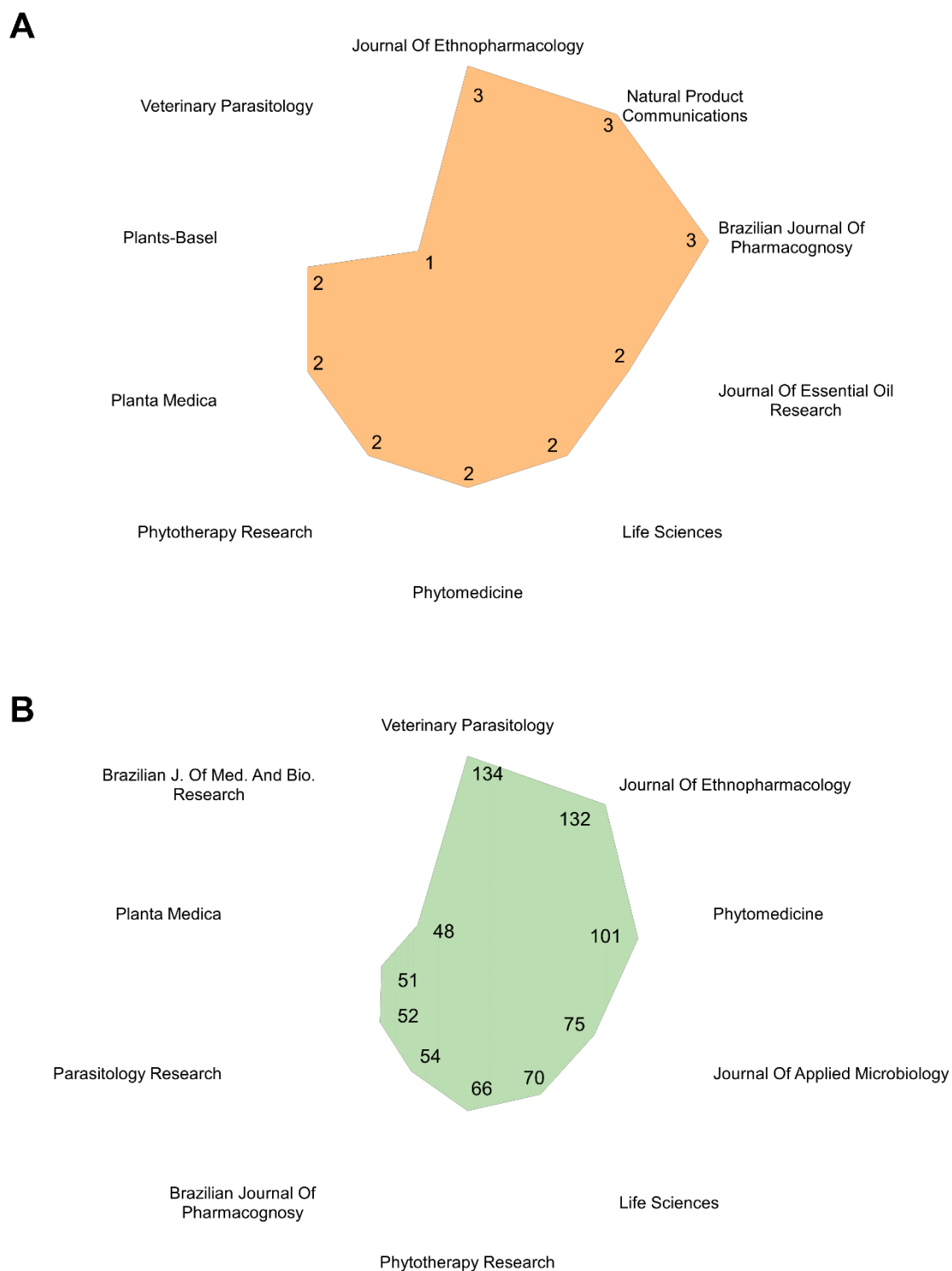


Figura 4. Perfil da publicação e impacto na comunidade científica de estudos relacionados às atividades biológicas associadas aos OECGs. (A) Periódicos. (B) Citação por publicação.

Duzentos e treze autores estiveram envolvidos na produção dos 41 artigos, com uma média de 0,192 documentos por autor. Todos os artigos têm múltiplos autores, com um índice de 6,41 coautores por documento. A rede de cocitação dos autores foi distribuída em 10 grupos. Cocitação refere-se à ocorrência de dois elementos, como documentos, autores ou periódicos,

sendo referenciados simultaneamente. Cocitação entre autores ocorre quando um terceiro os menciona em conjunto. Consequentemente, quanto mais frequentemente dois autores são co-citados, mais evidente se torna a relação de colaboração entre eles [15, 18].

Os líderes em publicações científicas foram Leal-Cardoso, J., com 13 colaborações, seguido por Coelho-De-Souza, com 7, e Lahlou, S., com cinco colaborações. Os autores Duarte, G., Magalhães, P., Santos, C. e Silva-Alves, K. colaboraram cada um em três estudos. Arrigoni-Blank, M. e Blank, A. colaboraram cada um em dois artigos. Um total de 11 redes de colaboração foram identificadas entre os estudos prospectivos. Redes de colaboração são formadas por autores que trabalham juntos para produzir um artigo [19]. Quanto mais espessa a linha que conecta dois autores, maior será o número de publicações conjuntas.

O Brasil lidera em número de publicações. Observou-se uma pequena rede de colaboração entre o Brasil e a Itália, Índia, Bangladesh e Canadá (Figura 5). A proporção de publicações com colaboração internacional é de 9,75%, indicando uma internacionalização limitada do tema estudado. Isso pode ser explicado pelo fato de *C. grewoides* ser uma espécie endêmica do Brasil.

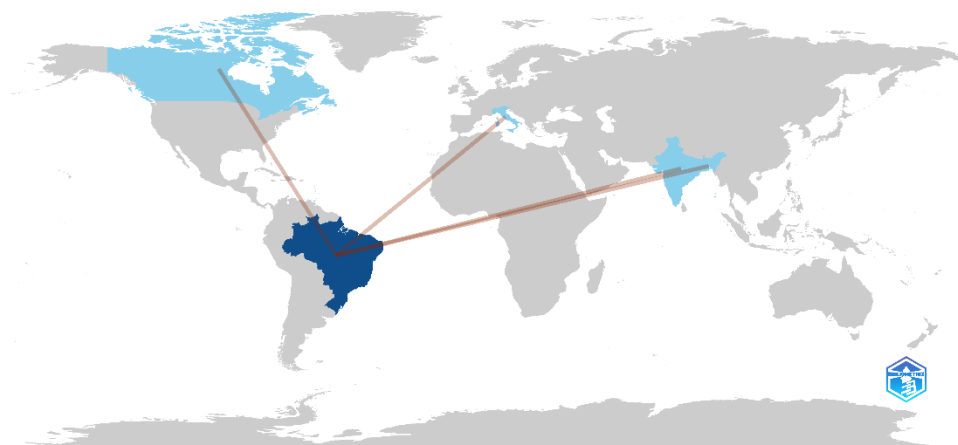


Figura 5. Mapa mundial de colaboração para publicações relacionadas a atividades biológicas associadas aos OECGs.

A análise das afiliações brasileiras sugere uma concentração significativa em poucas instituições, especialmente aquelas localizadas no Ceará e em outros estados do Nordeste, como Rio Grande do Norte, Piauí, Pernambuco e Sergipe. A Universidade Estadual do Ceará, juntamente com a Universidade Federal do Ceará e a Universidade Regional do Cariri, foram as instituições mais proeminentes no desenvolvimento de estudos relacionados às atividades biológicas associadas aos OECGs, com um total de 66 colaboradores. A Universidade Federal Rural de Pernambuco contribuiu com 19 colaborações, seguida pela Universidade Federal de Sergipe com 12 colaborações. A Universidade Federal do Piauí e a Universidade de Pádua (Itália) contribuíram cada uma com pelo menos quatro colaborações.

A análise de correspondência múltipla (ACM) gerou um gráfico bidimensional que explicou 73,44% da variabilidade total das palavras-chave mais frequentemente utilizadas. A primeira dimensão explicou 53,61% da variância total, enquanto a segunda dimensão explicou 19,23% da variância total (Figura 6A). Os termos "óleo volátil", "*Croton*", "*Croton grewoides*", "toxicidade", "atividade" e "Euphorbiaceae" apresentaram correlação positiva com a dimensão 1. Os termos "efeito cardiovascular", "óleo volátil", "toxicidade", "Euphorbiaceae" e "anetol" apresentaram correlação positiva com a dimensão 2.

A análise de similaridade é apresentada na Figura 6B. O dendrograma permitiu a classificação das palavras-chave em quatro grupos distintos. O posicionamento dos grupos e das palavras-chave auxilia na interpretação das relações entre as variáveis. Palavras que estão mais próximas no espaço são aquelas que compartilham características semelhantes ou ocorrem

em contextos semelhantes, permitindo a identificação de padrões nos dados. Por outro lado, palavras que estão mais distantes são menos associadas.

A análise temática examina grupos de palavras-chave dos autores e suas conexões para revelar temas abrangentes. Esses temas são diferenciados por características específicas, densidade e centralidade. A densidade é representada no eixo vertical, enquanto a centralidade é representada no eixo horizontal [20].

Considerando os parâmetros de centralidade e densidade, o mapa temático foi dividido em quatro quadrantes: (Q1) o quadrante superior direito indica temas totalmente desenvolvidos; (Q2) o quadrante superior esquerdo destaca temas altamente especializados; (Q3) o quadrante inferior esquerdo indica temas emergentes ou em declínio; (Q4) o quadrante inferior direito elucida temas cruciais [20].

O composto estragol foi comumente abordado em estudos com *C. grewioides* (Q4). No Q1, observa-se que a composição química desta espécie é amplamente estudada. Tópicos como "*in vitro*" e "lesão" são altamente especializados (Q2). No Q3, representando tópicos emergentes ou em declínio, observa-se que os termos "roedores" e "extratos" foram mencionados há mais de 10 anos, sugerindo um possível declínio. Por outro lado, os termos "resistência" e "óleos essenciais de plantas" apresentaram tendência crescente nos últimos 5 anos, sugerindo potenciais tópicos emergentes (Figura 6C).

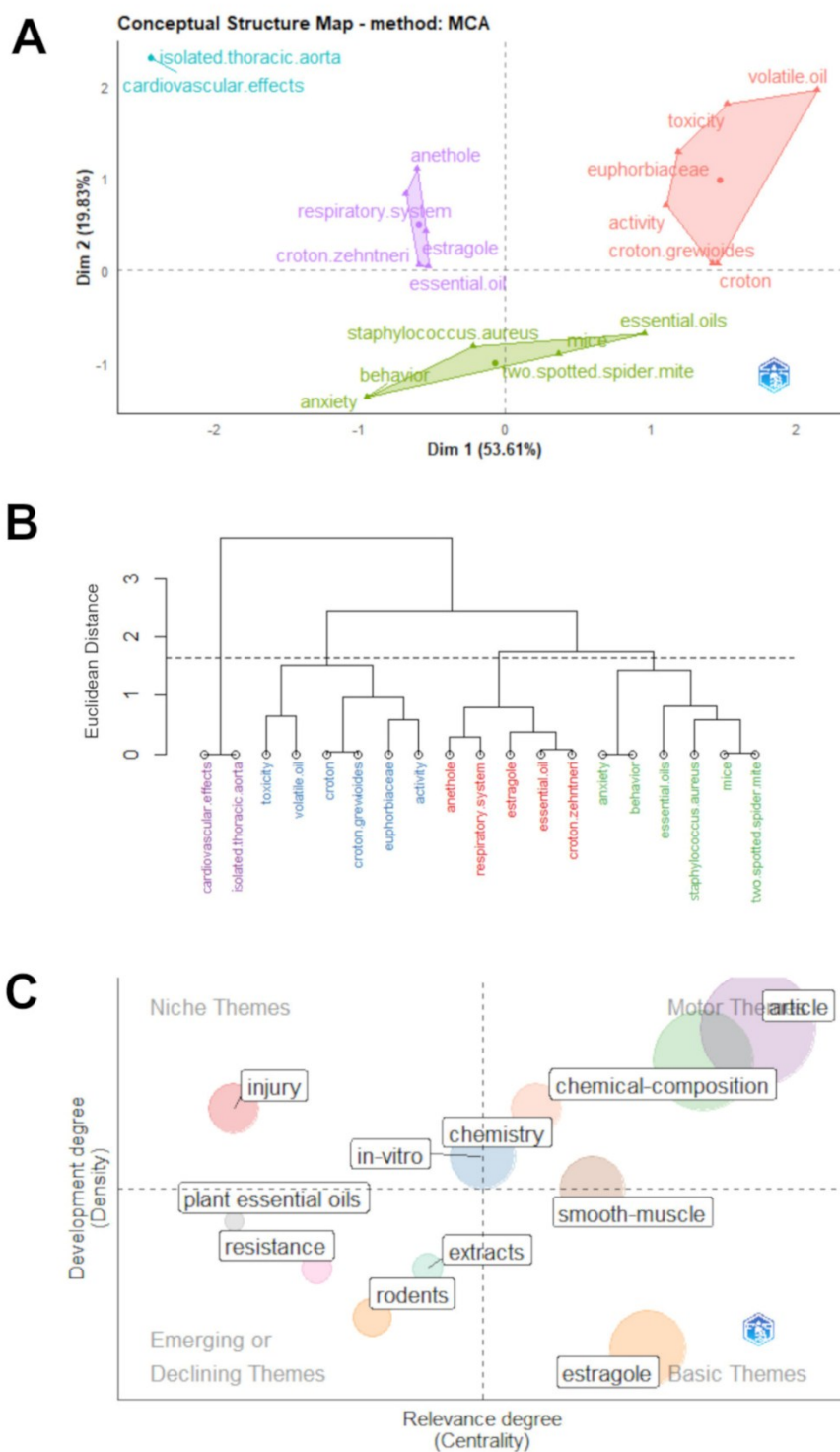


Figura 6. Explorando as relações entre palavras-chave. (A) Análise de correspondência múltipla. (B) Dendrograma. (C) Mapa temático.

4.3.2 Estudos relacionados às atividades biológicas associadas ao uso de OECGs

A Tabela 1 lista os principais compostos, métodos de extração e material vegetal utilizado para extração de OECGs, atividades biológicas, organismos-alvo, concentrações testadas e os principais resultados observados nos estudos selecionados.

Tabela 1. Atividades biológicas associadas aos OECGs.

Atividade biológica	Compostos principais	ME*	MT	Organismo	Concentrações utilizadas	Resumo dos resultados	Título	Referência
Cicatrização	85,7% anetol	DV	FL	Ratos suíços	Formulações em gel foram preparadas para sistemas de administração tópica, contendo OECz ou trans-anetol nas concentrações de 2% ou 20%, duas vezes ao dia, por 3 a 15 dias após a ferida nos camundongos.	Os dados fornecem evidências de que OECz e trans-anetol atuam nas fases inflamatórias e de remodelação do processo de cicatrização de feridas. Em relação ao percentual de regeneração tecidual, o tratamento com OECz não produziu melhora significativa na cicatrização de feridas ($42 \pm 1,68$ e $54 \pm 3,03\%$, 2 e 20% OECz), respectivamente, em comparação com os tratamentos controle e fibrinolisina ($51 \pm 1,67$ e $53 \pm 0,3\%$), respectivamente, após três dias de tratamento. Durante o mesmo período, foi observada uma redução na taxa de fechamento da ferida em camundongos tratados com trans-anetol ($39 \pm 1,82$ e $25 \pm 2,43\%$, 2 e 20% trans-anetol), o que não foi estatisticamente significativo. diferente do produzido pelo tratamento com dexametasona ($19 \pm 3,35\%$).	The essential oil of <i>Croton zehntneri</i> and trans-anethole improves cutaneous wound healing	[8]

Toxicidade inseticida e aguda em camundongos	91,29% trans-anetol	DV	FL	<i>Aedes aegypti</i> L. (Ovos; larvas; pupas; adultos) e camundongos Swiss fêmeas adultas	CL ₅₀ , CP ₅₀ e OC ₅₀ (Concentrações de óleo essencial que causam 50% da mortalidade de larvas, pupas e ovos, respectivamente). As seguintes concentrações foram preparadas: 1.000, 750, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63 e 7,81 µg mL ⁻¹ em DMSO a 1,5% (v/v). Soluções de OEs nas concentrações de 25, 50, 100, 150 e 200 µg mL ⁻¹ em DMSO a 1,5% foram avaliadas para determinar a atividade dissuasora de oviposição (OD). Para avaliar a toxicidade do OECz, camundongos fêmeas nulíparas, pesando em média 22,86 g, receberam diferentes doses orais únicas (2.000, 3.000, 4.000 e 6.000 mg.kg ⁻¹) usando óleo de milho como veículo.	OECz é uma fonte promissora de compostos bioativos contra várias fases da vida do <i>A. aegypti</i> . Os valores obtidos foram 26,2 µg mL ⁻¹ (CL ₅₀), 456,6 µg mL ⁻¹ (CP ₅₀), 45,7 µg mL ⁻¹ (OC ₅₀) e 45,3 µg mL ⁻¹ (DO ₅₀). Bem como toxicidade moderada para mamíferos (LD ₅₀ 3.464 mg.kg ⁻¹).	Further insecticidal activities of essential oils from <i>Lippia sidoides</i> and <i>Croton species</i> against <i>Aedes aegypti</i> L.	[31]
Neuropatia diabética autonômica	80,46% trans-anetol	DV	FL	<i>Rattus norvegicus</i>	Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos: controle (CT), diabéticos (DB) e diabéticos tratados com EOCz (DB + OECz). O tratamento com OECz foi iniciado 48 h após a administração de estreptozotocina (STZ) e a dose escolhida foi de 300 mg/kg/dia de massa corporal do animal, dissolvida em Tween 20 (v/v) a 1,80% e soro fisiológico, enquanto os grupos CT e DB receberam apenas veículo, por via oral e diária, durante 4 semanas. Durante o período de tratamento, a massa corporal, o nível glicêmico e o consumo de	Os resultados deste estudo demonstram que o diabetes mellitus (DM) diminuiu a excitabilidade e a velocidade de condução dos dois tipos de condutores mais rápidos de fibras mielinizadas do nervo vago e não afetou os outros tipos, incluindo fibras do tipo C e o tratamento com OECz preveniu completamente as alterações nervosas induzidas pelo DM, mas não a hiperglicemia.	Essential Oil of <i>Croton zehntneri</i> Prevents Conduction Alterations Produced by Diabetes Mellitus on Vagus Nerve	[11]

água e alimentos foram monitorados semanalmente e os animais foram eutanasiados na 12ª semana de vida (4 semanas de tratamento).								
Inseticida	74,5, 35,8, 90,5% trans-anetol em folhas, caules e inflorescências, respectivamente	HD	FL, TL, IF	<i>Aedes aegypti</i> L	Para determinar a CL ₅₀ (concentrações que causam mortalidade em 50% das larvas), as larvas de terceiro ínstar foram expostas a soluções de OE dissolvidas em H ₂ O/DMSO 1,5% (v/v) (20 mL) em concentrações variando de 12,5 a 500 µg mL ⁻¹ . Um controle negativo foi composto por H ₂ O/DMSO 1,5% (v/v). Temefos® (O, O'-(tiodi-4,1-fenileno) bis (O, fosforotioato de O-dimetilo)) foi usado como controle positivo.	Os resultados da avaliação larvicida mostraram que o OE e o E-anetol foram agentes muito ativos contra larvas de <i>A. aegypti</i> , com valores de CL para o óleo de folhas de 56,2 ± 0,3 µg/mL, do óleo do colmo 51,3 ± 0,3 µg/mL, do óleo da inflorescência 57,5 ± 0,1 µg/mL e do E-anetol 69,2 ± 0,5 µg/mL.	Chemical Composition and Larvicidal Activity against <i>Aedes aegypti</i> of Essential Oils from <i>Croton zehntneri</i>	[30]
Ansiogênico	78,0% estragol	HD	FL	Camundongos albinos suíços machos	Camundongos albinos suíços machos (20-25 g) foram utilizados para o teste de campo aberto, que avaliou a frequência de locomoção do animal. Além disso, um possível efeito ansiogênico foi testado em um aparelho de hole-board. As seguintes concentrações de OECz foram preparadas e administradas por via oral: 100 e 200 mg/kg, Tween 80 (3%, 10 mL/kg). O efeito do Diazepam (1 mg/kg; i.p.) também foi avaliado.	Os resultados deste estudo demonstram que o Diazepam na dose de 1 mg/kg aumentou significativamente o número de mergulhos de cabeça no teste de holeboard e diminuiu significativamente a atividade locomotora. <i>O OE de C. zehntneri</i> na dose de 100 mg/kg não teve efeito significativo sobre o comportamento no teste de hole-board, mas na dose de 200 mg/kg induziu um efeito ansiogênico, que foi	Anxiogenic Like Effect of <i>Croton zehntneri</i> Pax et Hoffm Leaves Essential Oil in Mice	[9]

						evidenciado por uma diminuição significativa no número de mergulhos na cabeça. O LSO não alterou a atividade locomotora espontânea no teste de campo aberto.		
Antibacteriano e toxicidade	76,8% estragol	HD	FL	3 bactérias Gram negativas: <i>Shigella flexneri</i> (ATCC 12022), <i>Salmonella typhimurium</i> (BM/PANAMA - TY2), <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) e 2 Gram-positivas: <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 10390), <i>Streptococcus β-haemolyticus</i> (ATCC 6314). A toxicidade foi avaliada contra <i>Artemia salina</i> Leac	A ação antimicrobiana e a concentração inibitória mínima foram determinadas pelo método de difusão em ágar, no qual discos de papel estéril (6 mm de diâmetro) foram impregnados com 20 μ L da solução oleosa, nas concentrações de 1000, 500, 100, 50 e 25 μ g/mL. Controles positivos: ampicilina (100 μ g/mL) e cloranfenicol (100 μ g/mL); e como controle negativo: Tween 80 e água destilada. A toxicidade foi avaliada com diferentes concentrações (250, 125, 100, 75 μ g/mL), acompanhada de um controle positivo preparado com água do mar e dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), e um controle negativo com água do mar e Tween 80.	Os resultados deste estudo demonstram que o OE das folhas de <i>C. zehntneri</i> apresentou atividade antibacteriana contra todas as bactérias testadas, exceto contra <i>Salmonella typhimurium</i> . A bactéria mais afetada pelo uso do OE foi <i>Shigella flexneri</i> com halo de inibição de 15 mm e concentração inibitória mínima de 50 μ g/mL. A avaliação da toxicidade foi realizada contra <i>Artemia salina</i> com resultado considerado promissor ($CL_{50} < 100$ μ g/mL).	Chemical composition and evaluation of antibacterial activity and toxicity of <i>Croton zehntneri</i> essential oil (estragole variety)	[22]
Antinociceptivo	85,7% anetol	DV	FF	Camundongos suíços machos	No presente estudo, os efeitos antinociceptivos do OE de <i>C. zehntneri</i> foram avaliados em camundongos machos (25-30 g). O OE nas doses de 100 e 300 mg/kg, administrado por via oral, foi solubilizado em água e Tween 80 1% (v/v). O controle foi composto apenas por água e	Quando administrado por via oral nas doses de 100 e 300 mg/kg, o OECz demonstrou uma redução no tempo de lambida das patas durante a segunda fase do teste da formalina, com valores decrescentes do valor de controle de	Antinociceptive effects of the essential oil of <i>Croton zehntneri</i> in mice	[39]

Tween 80 1% (v/v). Para o teste da formalina, foi necessário preparar 20 μl de solução aquosa de formalina a 0,1% (v/v), que foi injetada na região plantar da pata traseira direita do camundongo. Para o teste de contorção, foi administrada 0,1 mL/10 g do peso corporal do animal em solução aquosa de ácido acético 0,6% (v/v), por injeção intraperitoneal. Já para o teste da placa quente, um camundongo foi colocado em uma placa a $50,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e a latência da reação a esse estímulo nociceptivo foi quantificada.	$41,61 \pm 8,62$ para $12,01 \pm 7,97$ e $6,57 \pm 3,42$ segundos, respectivamente. Na primeira fase do teste da formalina, apenas a dose de 300 mg/kg induziu alteração significativa, reduzindo o tempo de $58,2 \pm 7,02$ segundos (controle) para $28,7 \pm 4,73$ segundos. O número de contorções em resposta às injeções intraperitoneais de ácido acético não diferiu significativamente entre o grupo controle ($80,6 \pm 9,01$) e o grupo experimental (animais que receberam 300 mg/kg de peso corporal) ($89,1 \pm 9,53\%$ do número de controles). No teste da placa quente, o OECz em doses de ≥ 100 mg/kg aumentou significativamente o tempo de latência em comparação com o grupo controle ($11,2 \pm 0,80$ segundos). Esse aumento persistiu por 180 e 240 minutos nas doses de 100 e 300 mg/kg, respectivamente. Esses achados indicam que o OECz é eficaz como agente antinociceptivo.
--	--

Antiespasmódico	57,0% estragol	NR	NR	Músculo liso intestinal de porquinhos-da-índia de ambos os sexos	Para investigar e quantificar a contração e relaxamento muscular no músculo liso do íleo (parte do intestino delgado) de cobaias expostas ao óleo essencial, o tecido do íleo foi dissecado e isolado, e as respostas mecânicas e potenciais elétricos transmembranares foram medidos com equipamentos como um quimógrafo e um eletrômetro. O protocolo também envolveu a exposição do tecido a vários medicamentos, incluindo histamina (0,1 a 100 µM) e acetilcolina (0,1 a 100 µM), para obter curvas dose-resposta e determinar o efeito de cada medicamento. Os efeitos do óleo essencial foram investigados em concentrações que variaram de 1 a 100 mg/mL.	Os dados do presente estudo demonstram que o OECz diminui o tom em 56%. Em concentrações acima de 10 mg/mL, induziu movimentos rítmicos espontâneos de pequena amplitude, e em concentrações de 1 a 100 mg/mL com potência semelhante, o OECz bloqueou as contrações induzidas por acetilcolina, histamina, 50 mM K ⁺ e Ca ⁺ , com valores de IC50 de 33,9 ± 2,5 mg/mL, 22,5 ± 4,0 mg/mL, 21,8 ± 2,4 mg/mL e 8,6 ± 1,8 mg/mL, respectivamente.	Effects of the Essential Oil of <i>Croton zehntneri</i> , and its Constituent Estragole on Intestinal Smooth Muscle	[38]
Antioxidante	95,24% estragol	HD	FL, RM		O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito antioxidante do OECz complexado com β-ciclodextrina (β-CD). O complexo de inclusão foi preparado pelo método de <i>spray drying</i> na proporção molar de 1:1, definida de acordo com a composição química do óleo essencial. Assim, quantidades equimolares de OECz e β-CD foram solubilizadas em etanol e água destilada (1:9). As misturas complexas e físicas de inclusão foram caracterizadas por espectroscopia de infravermelho	A formação do complexo de inclusão (Est/β-CD) obtido pelo método de secagem por atomização foi confirmada por espectroscopia de infravermelho e técnicas térmicas. OECz livre e seu Est/β-CD nas concentrações de 0,9, 1,8, 3,6, 7,2, 14,4 e 28,8 µg mL ⁻¹ mostraram a capacidade de remover DPPH (com valores de EC ₅₀ de 26,06 e 9,46 µg mL ⁻¹ , respectivamente) e	Antioxidant Properties of <i>Croton zehntneri</i> Essential Oil and Its Inclusion Complex with β-Cyclodextrin Prepared by Spray Drying	[32]

					com transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia Raman, calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG/DTG). Além disso, foram realizados ensaios de atividade antioxidante utilizando o óleo essencial e o complexo de inclusão contra DPPH, ABTS e radicais de óxido nítrico, bem como degradação e potencial redutor da desoxirribose.	ABTS + (com valores de EC ₅₀ de 22,73 e 4,47 µg mL ⁻¹ , respectivamente), inibir o óxido nítrico (com valores de EC ₅₀ de 17,65 e 2,68 µg mL ⁻¹ , respectivamente), neutralizar os radicais hidroxila (com valores de EC ₅₀ de 23,42 e 2,34 µg mL ⁻¹ , respectivamente) e exibem potencial redutor (com valores de EC ₅₀ de 46,48 e 12,47 µg mL ⁻¹ , respectivamente). Assim, o estudo demonstra que a formação do complexo de inclusão aumenta significativamente o potencial antioxidante do OECz.		
Excitabilidade nervosa	85,7% de anetol	DV	PA	Ratos Wistar de ambos os sexos (200–300 g)	No presente estudo, foram realizados experimentos em ratos Wistar, onde o nervo ciático foi dissecado e colocado em uma solução de Locke modificada. OECz e anetol nas concentrações de 0,01, 0,10, 0,30, 0,45, 0,60 e 1,00 mg/mL foram dissolvidos em DMSO a 0,2% (v/v). Para o anetol, a faixa de concentração foi a mesma que para o OECz, excluindo 1,00 mg/mL. A lidocaína também foi utilizada no estudo, com faixa de concentração de 0,02-0,7 mg/mL. Os registros eletrofisiológicos foram feitos medindo o potencial de ação do	OECz e anetol bloquearam potenciais de ação dos compostos, dependentes da concentração (IC ₅₀ : 0,32 ± 0,07 e 0,22 ± 0,11 mg/mL, respectivamente), em nervos ciáticos de ratos. As curvas de força-duração para ambos os agentes foram deslocadas para cima e para a direita em comparação com a curva de controle, e a reobase e a cronaxia foram aumentadas após a exposição ao óleo essencial e ao anetol. Os	Essential Oil of <i>Croton zehntneri</i> and Its Main Constituent Anethole Block Excitability of Rat Peripheral Nerve	[41]

					composto evocado (PAC) no nervo ciático. O PAC foi registrado antes e durante a exposição ao OECz, anetol e lidocaína, bem como durante um período de washout/recuperação. A velocidade de condução das ondas CAP, reobase e cronaxia também foram analisadas. Esses parâmetros estão relacionados à excitabilidade do nervo ciático.	curso de tempo de OECz e os efeitos do anetol nas amplitudes pico a pico dos potenciais de ação compostos seguiram um decaimento exponencial e atingiram um estado estacionário. Tanto o OECz quanto o anetol causaram uma redução semelhante nas velocidades de condução das ondas potenciais de ação do composto investigadas.		
Gastroprotetor	85,7% anetol	DV	FL	Ratos Wistar machos (150-250 g) e camundongos Swiss machos (25-30 g)	No presente estudo, camundongos e ratos, expostos ao OECz e anetol, foram avaliados em vários modelos de lesão gástrica. As soluções OECz e anetol foram preparadas diariamente adicionando essas substâncias diretamente ao veículo (0,1% Tween 80 em água) e agitando-as manualmente vigorosamente. A ranitidina foi usada como controle positivo. Os fármacos foram injetados em um volume de 0,1 mL/10 g e 0,1 mL/100 g de peso corporal para camundongos e ratos, respectivamente. As lesões gástricas foram avaliadas medindo-se a área da lesão calculada pelo programa Scion Image, e as áreas das lesões (mm ²) em um único animal foram somadas e expressas em	A administração oral de OECz e anetol em doses que variam de 30 a 300 mg/kg demonstrou efeitos gastroprotetores semelhantes e dependentes da dose contra danos gástricos induzidos por etanol e indometacina em roedores. No entanto, esses compostos não exibiram efeitos significativos nas úlceras induzidas por estresse por restrição a frio em ratos. Além disso, no modelo de úlcera induzida por etanol, tanto o OECz quanto o anetol nas doses de 30 e 300 mg/kg aumentaram significativamente a produção de muco na	Essential oil of <i>Croton zehntneri</i> and its major constituent anethole display gastroprotective effect by increasing the surface mucous layer	[10]

					porcentagem da área gástrica total.	mucosa gástrica, medida pela ligação do azul de Alcian. No entanto, nas mesmas doses, nem o OECz nem o anetol induziram alterações significativas na produção gástrica de grupos sulfidrila não proteicos. No modelo ligado ao piloro, nem o OECz nem o anetol nas doses de 30 e 300 mg/kg mostraram efeitos significativos no volume de suco gástrico, pH ou acidez total. Esses achados sugerem que o OECz possui potencial gastroprotetor, com os efeitos atribuídos principalmente à ação do anetol.		
Inseticidas	85,6% de metil eugenol para CGR112 e 46% de metil eugenol e 42,7% de eugenol para CGR126	HD	FL	<i>Chrysodeixis includens</i> e <i>Podisus nigrispinus</i>	No presente estudo, foram conduzidos experimentos em <i>C. includens</i> e <i>P. nigrispinus</i> expostos ao óleo essencial de dois acessos de <i>C. grewioides</i> e seus compostos majoritários, a fim de avaliar a toxicidade, seletividade e impacto nos parâmetros biológicos do inseto. Curvas dose-resposta foram utilizadas para determinar a toxicidade e seletividade dos compostos em favor do percevejo predador, com três doses preliminares (1, 5 e 10 µg de substâncias/mg de inseto). A DL₉₀ foi utilizada para	Os dados do presente estudo mostraram que houve diferença na resposta dos tratamentos entre a praga e o inimigo natural. O eugenol foi o composto mais tóxico para larvas de 2º instar de <i>C. includens</i> em DL₅₀, seguido pelo OE do acesso CGR126, que foi igualmente tóxico em doses mais altas. Os tempos letais estimados para os OEs causarem mortalidade em 50% da população de <i>C. includens</i>	Bioactivity of essential oils from <i>Croton grewioides</i> and its major compounds: toxicity to soybean looper <i>Chrysodeixis includens</i> and selectivity to the predatory stink bug <i>Podisus nigrispinus</i>	[4]

					determinar as curvas de sobrevivência e o tempo letal para matar 50% da população (TL₅₀). Efeitos subletais sobre parâmetros biológicos também foram avaliados, bem como parâmetros da tabela de vida.	foram inferiores a 15 horas. Houve seletividade do OE para o acesso CGR126 em doses letais acima de 90%. O óleo essencial do acesso CGR126 e seu composto majoritário eugenol foram mais seletivos ao inimigo natural em doses mais altas. Embora os tratamentos tenham causado redução no peso dos insetos e afetado os parâmetros reprodutivos, demográficos e a tabela de vida, apenas o composto metil eugenol apresentou efeitos deletérios significativos sobre o percevejo.		
Acaricida	83,59% e 95,38% de metil chavicol, coleção 1 e 2, respectivamente	HD	FL	<i>Rhipicephalus microplus</i>	No presente estudo, foram conduzidos experimentos com fêmeas ingurgitadas e larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> expostas ao OE de duas coleções de <i>C. grewioides</i>, a fim de avaliar a eclosão, o índice de produção de ovos, a redução da oviposição, a eficiência reprodutiva e a eficácia do produto, bem como determinar a CL₅₀ e a composição química do OE. As concentrações avaliadas variaram de 6,2 a 100,0 mg/mL de cada OE. Uma solução de etanol a 50% + Tween a 80% foi usada como controle negativo, e uma mistura de 0,18 mg/mL de	Os dados do presente estudo mostraram baixa eficácia do produto (48,7%) em fêmeas ingurgitadas induzidas por OE de <i>C. grewioides</i> (CG1) na dose de 100 mg/mL, baixa redução na oviposição (10,1%) e alta taxa de eclosão (52,0%). Esse resultado difere do OE de <i>C. grewioides</i> (CG2), que alcançou a máxima eficácia do produto (100%). Todos os OEs apresentaram eficácia contra larvas e fêmeas ingurgitadas de <i>R.</i>	Acaricidal potential of volatile oils from <i>Croton</i> species on <i>Rhipicephalus microplus</i>	[55]

					cipermetrina, 0,30 mg/mL de clorpirifós e 0,012 mg/mL de citronelal, diluída em água ultrapura (0,125%), foi usada como controle positivo.	<i>microplus</i> . O OE de <i>C. grewioides</i> (CG2) inibiu completamente a produção de ovos a 100 mg/mL. A concentração letal foi de 22,16 mg/ml (CG2) e 30,91 mg/ml (CG1).		
Antioxidante e antimicrobiano	72,64% estragol (casca) e 93,61% estragol (folha)	HD	CS, FL	2 bactérias Gram-negativas: <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) e 1 Gram-positiva: <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213) e 1 fungo <i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019)	No presente estudo, a atividade antioxidante foi avaliada pelo ensaio de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) e pelo ensaio de capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC), onde o OE foi dissolvido em acetona e depois diluído em β-ciclodextrina metilada a 7%. A atividade antimicrobiana da OECz também foi investigada.	Todos os OEs testados reduziram o radical DPPH. Os valores de IC ₅₀ para OECz (casca) foram de 36,38 mg/mL e para OECz (folhas) foram de 27,40 mg/mL. Para o ensaio ORAC, OECz da casca mostrou um efeito de eliminação mais forte do que OECz das folhas. O OECz não foi capaz de inibir o crescimento bacteriano, mas mostrou atividade antifúngica apreciável, comparável ao fluconazol, usado como controle positivo.	Radical scavenging and antimicrobial activities of <i>Croton zehntneri</i> , <i>Pterodon emarginatus</i> and <i>Schinopsis brasiliensis</i> essential oils and their major constituents: estragole, trans-anethole, β-caryophyllene and myrcene	[23]
Sistema nervoso central	Não relatado	DV	NR	Ratos Wistar machos (250-300 g) e camundongos Swiss Webster machos (30-35 g)	No presente estudo, as suspensões de OECz foram preparadas nas concentrações de 0,1, 0,3, 0,6, 1,0 e 10 µl/100 g. As suspensões foram administradas por via oral em ratos para realização de testes de campo aberto, estudos de hipnose induzida por pentobarbital, estudos de	A administração de suspensões de OECz afetou medidas comportamentais na arena de campo aberto. As suspensões OECz nas concentrações de 0,6, 1,0 e 10,0 µl/100 g reduziram significativamente a frequência de movimento	<i>Croton zehntneri</i> : possible central nervous system effects of the essential oil in rodents	[42]

					estereotipia, catalepsia, estudos de hipermotilidade induzida por metanfetamina e testes de convulsão induzidos por pentilenotetrazol.	das locomotivas. As frequências de elevação foram reduzidas (0,3, 0,6 e 10 $\mu\text{L}/100\text{ g}$), enquanto a duração da imobilidade foi maior após o tratamento com 0,6 e 10 $\mu\text{L}/100\text{ g}$.		
Acaricida	55,5% (E)-anetol	HD	FF	<i>Tetranychus urticae</i> e <i>Neoseiulus californicus</i>	No presente estudo, foram realizados um ensaio de contato residual e um ensaio ovicida. As concentrações testadas nos bioensaios variaram de 0,009 a 5,40 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de OE de <i>C. grewioides</i> diluído em DMSO (0,5%) e água. Inseticidas botânicos e convencionais foram usados como controles positivos (0,009 a 10 $\mu\text{L mL}^{-1}$), e a mistura água + DMSO foi usada como controle negativo. A mortalidade foi determinada em microscópio de dissecação, 24 horas após o início do tratamento para o ensaio de contato residual. Para o ensaio ovicida, a avaliação foi realizada 96 horas após a aplicação do OE.	Os dados do presente estudo mostraram que o OE de <i>C. grewioides</i> alcançou toxicidade satisfatória para os ovos e fêmeas de <i>T. urticae</i> , com valores de CL_{50} de 2,48 e 4,85 $\mu\text{L mL}^{-1}$ para fêmeas e ovos, respectivamente. O OE de <i>C. grewioides</i> foi seletivo para <i>N. californicus</i> com valores de RS de 17,32 e 28,82 $\mu\text{L mL}^{-1}$ para fêmeas e ovos, respectivamente.	Bioactivity of essential oils for the management of <i>Tetranychus urticae</i> Koch and selectivity on its naturale nemy <i>Neoseiulus californicus</i> (McGregor): A promising combination for agroecological systems	[28]
Acaricida	55,5% e 37,8% (E)-Anetol para folhas e caule, respectivamente	HD	FL, RM	<i>Tetranychus urticae</i>	No presente estudo, foi realizado um ensaio de contato por pintura de disco foliar para determinação da CL_{50} . Diferentes concentrações de óleo essencial (OE) foram aplicadas nas folhas e caules, além de inseticidas convencionais, como controle positivo. Para estimar a concentração que repeliu 50% e 90% dos ácaros (RC_{50} e RC_{90}),	Os dados deste estudo mostraram que os óleos essenciais (OEs) possuem propriedades repelentes e toxicidade contra <i>Tetranychus urticae</i> , variando em sua ação, dependendo da espécie de Croton e da parte da planta estudada. <i>C. adenocalyx</i> apresentou	New sources of botanical miticides from Croton species with potential use in the integrated management of <i>Tetranychus urticae</i>	[29]

					os discos foram tratados com 10 mg de OE ou inseticidas convencionais como controle positivo em 2 mL de água mais 0,1% de adjuvante espalhante (Tween-80).	maior toxicidade, enquanto <i>C. grewoides</i> foi menos tóxico, mas altamente repelente. No entanto, nenhum dos OEs investigados foi mais tóxico do que os acaricidas sintéticos (Ortus® e Azamax®) usados como controles.		
Bactericida	47,43% α -pineno	HD	FL	<i>Staphylococcus aureus</i> (SA-1199B e IS-58)	No presente estudo, foi realizado um ensaio de modulação de resistência. A solução de OE de <i>C. grewoides</i> e seu componente majoritário foi preparada em Tween-80. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada por diluição em meio de cultura solidificado, com concentrações variando de 0,25 a 128 $\mu\text{g/mL}$ para o OE e composto α -pineno, e de 0,03125 a 2% para os antibióticos norfloxacin e tetraciclina.	As CIMs de norfloxacin e tetraciclina foram de 64 $\mu\text{g/mL}$ e 32 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O OE de <i>C. grewoides</i> e o composto α -pineno não apresentaram atividade antibacteriana relevante; em vez disso, modularam a resistência a antibióticos. Na presença de OE de <i>C. grewoides</i> , a CIM de norfloxacin e tetraciclina foi de 16 $\mu\text{g/mL}$ (redução de 4 $\times$) e 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (redução de 64 $\times$), respectivamente.	Chemical composition and modulation of bacterial resistance to drugs by the essential oil from the leaves of <i>Croton grewoides</i>	[25]
Antioxidante	38,78% (E)-Isoosmorhizol (CGR-104), 59,85% metil chavicol (CGR-106), 85,58% metil eugenol (CGR-112) e 45,97% metil eugenol (CGR-126)	HD	FL		A capacidade antioxidante do OE de <i>C. grewoides</i> foi avaliada usando o sistema 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), 2,2'-azinobe (ácido 3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico) (ABTS), poder antioxidante redutor férrico (FRAP) e co-oxidação de β -caroteno/ácido linoléico.	Os dados deste estudo mostraram que o OE de <i>C. grewoides</i> exibe atividade antioxidante promissora em baixas concentrações (1 $\mu\text{L mL}^{-1}$). Com destaque para os tratamentos com CGR126 e CGR106, que contêm eugenol em sua composição, conforme confirmado pela análise	Radical scavenging activity of essential oils from accessions of <i>Croton grewoides</i> Baill and of the major compounds eugenol, methyl eugenol, and methyl chavicol	[5]

					de componentes principais, foi observada uma forte correlação entre o eugenol e os métodos DPPH, FRAP e β -caroteno.			
Inseticida	65,5% e 47,8% (E)-anetol na folha e no caule, respectivamente	HD	FL, RM	<i>Zabrotos subfaciatus</i>	Para o ensaio de fumigação, as quantidades de OE aplicadas na superfície de um papel de 5 x 2 cm ² foram de 5, 7,5, 10, 12,5 e 15 μ L, correspondendo a 2, 3, 4, 5 e 6 μ L/L de ar, respectivamente. Após 24 horas, a mortalidade dos insetos foi avaliada. Um inseto era considerado morto quando suas extremidades não se moviam após o contato com uma escova fina.	Os dados deste estudo mostraram que o OE de <i>C. grewioides</i> em ação fumigante contra o gorgulho do feijoeiro, com CL ₅₀ de 4,0 μ L/L de ar para o OE de <i>C. grewioides</i> obtido das folhas e de 13,7 μ L/L de ar para o OE de <i>C. grewioides</i> obtido do caule.	Composition and Insecticidal Activity of the Essential Oil of <i>Croton grewioides</i> Baill. against the Mexican Bean Weevil (<i>Zabrotos subfasciatus</i> Boheman)	[27]
Relaxamento dos corpos cavernosos	57% estragol e 28% anetol	DV	FL	Ratos Wistar machos adultos (250–300 g)	No presente estudo, foram realizados ensaios em corpos cavernosos de ratos pré-contráidos (CGR) com fenilefrina. Para isso, foram avaliadas a mensuração <i>in vitro</i> da geração de força isométrica, a mensuração <i>in vitro</i> da resposta de relaxamento induzida pelo LES (Transmural Stimulation of Electric Field) e os ensaios de AMPc e GMPc. Soluções de OECz (1 a 1000 μ g/mL) e anetol, estragol ou metil eugenol (10 ⁻⁹ a 10 ⁻³ M) foram preparadas adicionando essas substâncias diretamente ao veículo, diluídas em 1,80% de Tween em água.	Todos os compostos relaxaram o CCR. A concentração suficiente para induzir metade do relaxamento máximo (IC ₅₀) para OECz e metil eugenol foi de 62,67% (IC ₅₀ de 1,67 μ M) e 45,8% (IC ₅₀ de 1,7 μ M), respectivamente. O CCR foi relaxado com estragol com IC ₅₀ de 0,6 μ M (relaxamento máximo – 76,6%). Tanto o estragol quanto o anetol aumentaram o relaxamento obtido com a estimulação elétrica. Ambos os compostos	Effects of the essential oil of <i>Croton zehntneri</i> and its main components, anethole and estragole, on the cavernous bodies of rats	[43]

						aumentaram os níveis de AMPc. O estragol também aumentou os níveis de GMPc.		
Atividade anti-helmíntica	39,34% e 63,88% de anetol para Cz1 e Cz2, respectivamente	DV	PA	Ovos, larvas de <i>Haemonchus contortus</i> e camundongos albinos suíços fêmeas com infecção natural por nematoides intestinais	Para o teste de eclosão dos ovos, o OECz e seus constituintes majoritários foram diluídos em solução aquosa de DMSO a 0,5% nas seguintes concentrações: 0,31, 0,62 e 1,25 mg/mL. Para o teste de desenvolvimento larval, as concentrações finais variaram de 1,25 a 20 mg/mL. Para o composto anetol, foi preparada uma solução aquosa na mesma concentração presente nas plantas (64%). Para o ensaio <i>in vivo</i> , os camundongos foram tratados com água (controle negativo), 0,56 mg/kg de fenbendazol, 800 mg/kg de OE de <i>L. sidoides</i> e OECz (amostra Cz2).	A porcentagem média de eficácia nos testes de eclosão de ovos para OECz em Cz1 e Cz2 e anetol foi de 58%, 12,2% e 26,6%, respectivamente. A concentração efetiva para matar 50% dos ovos foi de 0,55 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (Cz1) e 0,74 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (Cz2). O OECz foi mais eficiente em inibir o desenvolvimento larval em concentrações mais baixas do que o OE de <i>L. sidoides</i> . A eficácia de 800 mg/kg de OE de <i>L. sidoides</i> e OECz contra nematoides de camundongos foi de 46,29% e 11,64%, respectivamente, enquanto a eficácia do fenbendazol foi de 99,37%.	Anthelmintic activity of the essential oils of <i>Croton zehntneri</i> and <i>Lippia sidoides</i>	[40]

Antibacteriano	Metil eugenol (90,32% em CGR-302, 87,09% em CGR-307, 82,76% em CGR-304, 84,56% em CGR-308, 82,19% em CGR-323 e 82,07% em CGR-210). Metil chavicol (88,13% em CGR-324) e eugenol (80,38% em CGR-108 e 80,37% em CGR-107)	HD	FL	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) dos óleos essenciais e do composto eugenol, foi utilizado o método de microdiluição em concentrações que variaram de 125 a 4000 µg/mL. O sulfato de estreptomicina foi usado como controle positivo (12,5 a 100 µg/mL). A cinética de crescimento e o ensaio de permeabilidade à membrana foram avaliados para concentrações de 2×, 1×, 1/2×, 1/4× e 1/8× CIM do óleo essencial CGR-108.	Os óleos essenciais de <i>C. grewoides</i> Baill. e o composto eugenol demonstram potencial antibacteriano contra <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> . O óleo essencial proveniente do acesso CGR-108 apresentou menor CIM (>500 e <1000 µg/mL) e CBM igual a <2000 µg/mL. Para o eugenol, a CIM foi obtida nas concentrações >250 e <500 µg/mL, e a CBM ficou entre >500 µg/mL e <1000 µg/mL. A perda da viabilidade celular bacteriana foi observada após 30 minutos de exposição ao óleo essencial do acesso CGR-108 nas concentrações de 2× e 1× CIM, o que foi confirmado pela intensidade da fluorescência com iodeto de propídio.	Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils from accessions of <i>Croton grewoides</i> Baill. against the phytopathogen <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Campestris</i>	[3]
Antibacteriano e antibiótico	Não relatado	HD	FL	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC15442) e <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC12692)	A atividade antibacteriana do OECz foi avaliada por contato com o gás. Uma quantidade de 50 µg de OE foi dissolvida em 50 µl de DMSO (1:1). Uma série de diluição dupla desta solução de OE foi preparada: 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,562 µg de óleo. A atividade modificadora de antibióticos do componente	Os dados deste estudo mostraram que o componente gasoso do OE inibiu o crescimento bacteriano de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> com CIM de 0,5 e <1 mg/L de ar, respectivamente. A	Synergistic effects of the antibiotics gentamicin and essential oil of <i>Croton zehntneri</i>	[21]

					gasoso foi determinada pelo mesmo método, mas apenas a solução com um total de 50 µg de óleo foi usada.	atividade do antibiótico gentamicina foi aumentada em 42,8% contra <i>P. aeruginosa</i> após contato com o componente gasoso, indicando que esse óleo influencia a atividade antibiótica.		
Disfunção renal	85,7% de anetol	DV	FL	Camundongos Swiss machos (8 semanas de idade)	Os camundongos foram divididos em quatro grupos distintos e tratados diariamente por sete dias consecutivos. Após esse período, foram realizadas análises bioquímicas de amostras de sangue e urina para avaliar a função renal. Parâmetros como níveis de sódio, creatinina, ureia e excreção de proteínas foram avaliados. Além disso, foram realizadas análises histológicas e imuno-histoquímicas nos rins para avaliar a presença de células inflamatórias (macrófagos), área do espaço intersticial e deposição de colágeno.	Os dados deste estudo mostraram que concentrações mais altas de OECz induziram lesão túbulo-intersticial, evidenciada pelo aumento da proteinúria, aumento do espaço túbulo-intersticial cortical, aumento da infiltração de macrófagos bem como aumento da deposição de colágeno. Também foi observada diminuição na reabsorção tubular de sódio.	High doses of essential oil from <i>Croton zehntneri</i> induce renal tubular damage	[44]
Antidepressivo	24,6% de metil eugenol e 10,3% de estragol	DV	FL	Ratos Wistar machos (250-300 g)	No presente estudo, foram realizados ensaios em ratos jovens com diferentes doses de OE ou água, seguidos de natação e testes de campo aberto. Além disso, ratos mais velhos foram submetidos a testes de interação social, labirinto em cruz elevado e holeboard. Esses experimentos envolveram o uso de vários testes comportamentais em ratos para avaliar os efeitos do OE em	Os resultados mostraram que a administração de OECz aumentou o tempo de imobilidade medido no teste de nado forçado em relação ao grupo controle (controle = $89,8 \pm 45,8$; 1 µl = $153,0 \pm 48,7$; 3 µl = $157,4 \pm 45,3$; 10 µl = $145,3 \pm 51,0$), reduziu a frequência de locomoção observada em campo	Essential oil of <i>Croton zehntneri</i> : effects on behavioral models related to depression and anxiety	[7]

					comportamentos relacionados à natação, interação social, ansiedade e atividade exploratória.	aberto (controle = $62,5 \pm 22,7$; $3 \mu\text{L} = 38,0 \pm 13,5$; $10 \mu\text{L} = 39,2 \pm 22,2$), não tiveram efeito sobre o grupo experimental ($1 \mu\text{L}$) observado em campo aberto, e também não tiveram efeito sobre os animais testados em interações sociais, testes de labirinto e holeboard.		
Atenuar lesões pulmonares	85,7% de anetol	DV	FL	Camundongos BALB/c machos (7–8 semanas de idade)	No presente estudo, os ensaios foram realizados em ratos tratados de forma diferente: alguns receberam ovalbumina para induzir asma, enquanto outros foram usados como grupo controle, recebendo solução salina. Após a indução da asma, esses grupos foram tratados com diferentes doses de OECz, administradas por gavagem. As análises foram realizadas 24 horas após a administração do OECz ou do veículo. A solução de OECz foi preparada diariamente e administrada nas doses de 100 mg/kg e 300 mg/kg. Foram realizadas avaliações de mecânica respiratória, estudos histológicos e análises bioquímicas.	Os dados deste estudo demonstraram alterações significativas em todas as variáveis analisadas da mecânica respiratória, mostrando a eficácia do OECz na atenuação da lesão pulmonar induzida por ovalbumina. Além disso, o uso de OECz na dose de 300 mg/kg mostrou um efeito antioxidante e reduziu as células inflamatórias no parênquima pulmonar.	Essential oil from <i>Croton Zehntneri</i> attenuates lung injury in a model of VA-induced asthma	[45]

Vasodilatador	26,6% de espatulenol	DV	PA	Camundongos Suíços (25-30 g) de ambos os sexos e ratos Wistar machos adultos (200-300 g), bem como letalidade contra <i>Artemia salina</i>	No presente estudo, ensaios de toxicidade aguda foram realizados em camundongos. Os grupos testes receberam uma dose oral única de OE em diferentes concentrações (5, 8, 10 ou 14 g/kg). O grupo controle recebeu apenas o veículo usado para dissolver o OE. Um teste de letalidade contra <i>Artemia salina</i> também foi realizado. A atividade contrátil da aorta foi medida por meio de um transdutor de força isométrico. As alterações na resistência vascular foram medidas comparando o fluxo de perfusão antes e após a administração do composto.	Os dados deste estudo demonstraram que o OE pode ser considerado não tóxico, uma vez que apresentou uma DL_{50} muito elevada ($9,84 \pm 0,01$ g/kg). No ensaio citotóxico utilizando artêmia (<i>Artemia salina</i>), a CL_{50} foi de 275 μ g/mL. OE (1-1000 μ g/mL) relaxou anéis aórticos isolados com endotélio íntegro pré-contraído com fenilefrina com IC_{50} de 126,7 μ g/mL. Em preparações de leito mesentérico de rato pré-contraído com fenilefrina, o OE (1-300 μ g/mL) também induziu um efeito vasodilatador reversível com um valor de IC_{50} de 46,0 μ g/mL.	Essential Oil of <i>Croton Argyrophylloides</i> : Toxicological Aspects and Vasorelaxant Activity in Rats	[14]
Neuropatia diabética	80,03% de anetol	DV	FL	Ratos Wistar de ambos os sexos	No presente estudo, ratos Wistar foram utilizados para induzir diabetes. O tratamento com OECz foi administrado por via oral por quatro semanas após a confirmação do diabetes. Os gânglios da raiz dorsal foram dissecados para os experimentos. Registros intracelulares foram realizados para avaliar as respostas transmembrana, enquanto o patch-clamp foi usado para investigar a corrente de sódio em neurônios dissociados.	Os dados deste estudo demonstraram que o diabetes mellitus (DM) causou despolarizações do potencial de membrana em repouso sem alterar a resistência de entrada da membrana celular. Também mostrou uma tendência à diminuição da reobase e aumento da excitabilidade, o que foi confirmado pelo aumento da corrente. OECz não reverteu a hiperglicemia	Essential oil of <i>Croton zehntneri</i> prevents electrophysiological alterations in the dorsal root ganglia of streptozotocin-induced diabetic rats	[12]

						do DM. No entanto, no tratamento oral, o OECz preveniu alterações neuronais.		
Modulação da atividade antibiótica	76,8% estragol	HD	FL	<i>Staphylococcus aureus</i> (SA 1199)	No presente estudo, foi realizado um ensaio para verificar a atividade modificadora de OECz sobre a norfloxacin (NorA). Para isso, 50 µg de óleo foram dissolvidos em 50 µl de DMSO (1:1). Uma série de diluições duplas desta solução de OECz foi preparada: 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,562 µg de óleo. Discos de NorA foram usados para determinar mudanças no diâmetro da zona de inibição bacteriana.	Os dados do presente estudo demonstram que os componentes gasosos do OE aumentaram a zona de inibição da norfloxacin em 39,5%. Este resultado mostra que este óleo influencia a atividade antibiótica da norfloxacin, possivelmente afetando o sistema de efluxo bacteriano de NorA e pode ser usado como adjuvante na antibioticoterapia de patógenos multirresistentes.	Enhanced Norfloxacin antibiotic activity by gaseous contact with <i>Croton zehntneri</i> essential oil	[46]
Atividade antimicrobiana e citotóxica	84,7% de estragol	HD	FL	4 bactérias Gram-positivas: <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e 7 bactérias Gram-negativas: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>S. sonnei</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>S. paratyphi</i> , <i>Vibrio cholerae</i> .	No presente estudo, a atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de difusão em disco contra 14 patógenos, seguida pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição. Além disso, um bioensaio de letalidade foi realizado usando <i>Artemia salina</i> para avaliar a atividade citotóxica do estragol isolado dos óleos essenciais (OEs). Posteriormente, foram realizados testes de citotoxicidade contra	O teste de sensibilidade antibacteriana e antifúngica revelou que o Estragol (ESL) apresentou maior zona de inibição contra <i>Microsporum</i> sp. a 50 µg/disco, enquanto a dose de 25 µg/disco produziu a maior inibição contra <i>C. neoformans</i> . Observou-se atividade potencial contra cepas Gram-positivas, embora limitada contra as Gram-negativas. O ESL também demonstrou atividade	Isolation, characterization, and evaluation of the antimicrobial and cytotoxic activity of estragole, obtained from the essential oil of <i>Croton zehntneri</i> (Euphorbiaceae)	[24]

				Além de 7 fungos patogênicos: <i>Aspergillus niger</i>, <i>Blastomyces dermatitidis</i>, <i>Candida albicans</i>, <i>Pityrosporum ovale</i>, <i>Trichophyton sp.</i>, <i>Microsporum sp.</i>, <i>Cryptococcus neoformans</i>. Um estudo de letalidade também foi conduzido em <i>Artemia salina</i> e atividade citotóxica contra três linhagens de células tumorais: MCF7 (carcinoma de mama), NCI H 292 (carcinoma de pulmão) e HEP-2 (carcinoma de laringe)	linhagens celulares tumorais MCF7, NCI H 292 e HEP-2.	antifúngica promissora. Além disso, os testes de toxicidade em <i>Artemia salina</i> mostraram uma resposta dose-dependente do ESL, sugerindo seu potencial como agente citotóxico ($CL_{50} = 4,54 \pm 0,21$ e $CL_{90} = 8,47 \pm 0,42$). No entanto, o estragol não exibiu atividade inibitória significativa contra células tumorais nas concentrações testadas.		
Antispasmodica	80,46% de trans-anetol	DV	FL	Ratos Wistar machos (<i>Rattus norvegicus</i>) (170 – 250 g)	No presente estudo, foram realizados ensaios para medir as contrações da musculatura traqueal, a dissociação da musculatura lisa traqueal e o registro da corrente iônica, bem como o efeito inibitório do anetol sobre a corrente de Ca^{2+} através do VDCC. Para tanto, as concentrações de OECz, anetol e estragol utilizadas foram: 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0, 10, 30,	Em anéis traqueais de ratos Wistar, o OECz e seus compostos majoritários (anetol e estragol) inibiram as contrações induzidas por 60mM [KCl], ACh (10μM), Ba^{+2+} e dibutirato de forbol (1 μM). Para OECz, anetol e estragol, os IC_{50} para inibição das contrações induzidas por KCl foram $145,8 \pm 14,8$,	Antispasmodic effects of the essential oil of <i>Croton zehnteneri</i>, anethole, and estragole, on tracheal smooth muscle	[37]

					100, 1000, 2000, 3000 e 5000 $\mu\text{g/mL}$.	89,9 $\pm$ 7,4 e 181,0 $\pm$ 23,3 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, e para contração induzida por ACh foram 606,1 $\pm$ 122,0, 160,5 $\pm$ 33,0 e 358,6 $\pm$ 49,2 $\mu\text{g/mL}$. O efeito direto do anetol sobre o VDCC mostrou inibição da corrente de Ca^{2+} .		
Gastrointestinal antiespasmódico	57% estragol	DV	FL	Cobaias machos (250–400 g)	No presente estudo, o OECz foi investigado na faixa de concentração de 1–200 $\mu\text{g/mL}$. A aorta foi preparada como anéis, a bexiga como tiras longitudinais e a veia porta e o íleo como pequenos segmentos. As contrações foram induzidas com cloreto de potássio 60 mM. As mudanças de tensão foram registradas usando transdutores de força isométricos. Nos experimentos com o íleo, as contrações foram registradas por deslocamento isotônico.	No íleo isolado, o OECz induziu uma resposta variável. Em 57% dos tecidos, o tônus basal estava reduzido (CE_{50} 5 $\mu\text{g/mL}$), enquanto o restante permaneceu inalterado. Concentrações acima de 10 $\mu\text{g/mL}$ desencadearam contrações espontâneas oscilatórias. O tônus basal na aorta, veia porta e bexiga não foi afetado pelo OECz. Na veia porta, o OECz diminuiu a amplitude das contrações espontâneas (IC_{50} de 109 $\mu\text{g/mL}$) e, na bexiga, essa atividade foi aumentada pelo OECz (EC_{50} de 44 $\mu\text{g/mL}$). No íleo pré-contraindo de KCl 60 mM, o OECz promoveu relaxamento completo dependente da concentração, com um valor de CI_{50} de	Selective modulatory effects of the essential oil of <i>Croton zehntneri</i> on isolated guinea pig smooth muscle preparations	[36]

						aproximadamente 26 µg/mL. O OECz não relaxou o tônus induzido por KCl na aorta ou bexiga e causou menos de 20% de relaxamento na veia porta pré-contraída.		
Toxicidade sistêmica	85,7% de anetol	DV	FL	Ratos Wistar machos (116–149 g)	Os ratos foram tratados com 250 mg/kg de OECz (p.o.) durante dez semanas até o final do experimento.	A investigação da toxicidade sistêmica de OECz (p.o.) em ratos demonstrou que todos os animais sobreviveram e nenhuma toxicidade maior foi observada na maioria dos órgãos analisados. O OECz não alterou o peso relativo ou absoluto da maioria dos órgãos analisados, exceto o peso relativo do rim, que foi aumentado em 11%. Não foram observadas anormalidades clínicas que sugerissem toxicidade. O tratamento com OECz não induziu alterações nos biomarcadores da função do pâncreas, rim, coração e fígado. Em relação ao rim, o OECz causou redução significativa do ácido úrico. Além disso, o perfil hematológico não foi alterado pelo OECz. No entanto, o OECz aumentou em sete vezes o	Subacute oral treatment with volatile oil from <i>Croton zehntneri</i> offers low toxicity: therapeutic use perspective	[56]

						biomarcador sérico da função hepática (gamaglutamil transpeptidase (GAMA-GT)). Em conclusão, o tratamento subagudo por via oral com OECz, não superior a dez semanas em ratos, oferece pequena toxicidade em doses inferiores a 250 mg/kg e tem potencial para uso terapêutico, desde que a análise risco/benefício endosse isso.		
Efeitos cardiovasculares	45,5% de estragol	DV	PA	Ratos Wistar machos (280–340 g)	No presente estudo, os efeitos cardiovasculares para experimentos <i>in vivo</i> foram determinados por meio do ensaio de redução máxima da pressão aórtica média (ΔMAP) e da frequência cardíaca. Para isso, os compostos anetol e estragol ($1-10 \text{ mg kg}^{-1}$) e OECz ($1-20 \text{ mg kg}^{-1}$) foram dissolvidos em Tween 80 (2%). Para os ensaios <i>in vitro</i>, foi investigada a contração induzida pela fenilefrina em concentrações de $1-1000 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de OECz, preparada diretamente na solução de Tyrode.	Os dados do presente estudo demonstram que o tratamento intravenoso induziu hipotensão dose-dependente e bradicardia (fase I), que foram seguidas por um efeito pressor significativo associado a bradicardia tardia (fase II). As respostas vasoconstritoras à fenilefrina foram aumentadas em concentrações mais baixas ($1-30 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) e reduzidas em concentrações mais altas ($300-1000 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) de EOCz.	Cardiovascular effects of the essential oil from <i>Croton zehntneri</i> leaves and its main constituents, anethole and estragole, in conscious normotensive rats	[33]

Efeitos cardiovasculares	42,09% de E-anetol e 45,95% de estragol	DV	FL	Ratos Wistar machos (280–350 g)	No presente estudo, diferentes séries de experimentos foram conduzidas para investigar os efeitos cardiovasculares do OECz e substâncias relacionadas, a fim de registrar a pressão arterial e a frequência cardíaca. Série 1: Experimentos para estabelecer uma relação dose-resposta com OECz (1, 5, 10 e 20 mg/kg) e anetol e estragol (10 mg/kg). Série 2: Avaliar o papel das fibras C sensoriais vagais na mediação das respostas cardiovasculares, com OECz, anetol e estragol (10 mg/kg) e capsaicina (1 µg/kg). Série 3: Avaliar o envolvimento das fibras aferentes primárias na mediação da resposta depressora, com OECz (10 mg/kg) e o antagonista seletivo de NK1 RP 67580 (7,8 nmol). Série 4: Avaliar o envolvimento da ativação do receptor vaniloide TRPV1 na mediação de alterações cardiovasculares, com OECz (10 mg/kg) e o antagonista competitivo do receptor TRPV1 capsazepina (1 mg/kg, i.v.).	Os dados deste estudo demonstram que o OECz causou hipotensão dose-dependente e bradicardia, bem como anetol e estragol. Após a bivotomia cervical ou tratamento perineural com capsaicina nos nervos vagos cervicais, as respostas cardiovasculares ao OECz foram abolidas. Além disso, a administração intra-arterial de OECz induziu hipotensão, que foi bloqueada pelo pré-tratamento neonatal com capsaicina ou o antagonista RP 67580, sugerindo mediação por fibras aferentes primárias contendo a substância P. As respostas cardiovasculares ao OECz também foram reduzidas pelo antagonista do receptor TRPV1, capsazepina.	Role of capsaicin-sensitive sensory nerves in mediating the cardiovascular effects of the essential oil from <i>Croton zehntneri</i> leaves in anesthetized rats	[34]
--------------------------	---	----	----	---------------------------------	---	---	--	------

Antifúngico	72,9% estragol	DV	FL	5 cepas de <i>Candida albicans</i> , 3 cepas de <i>Candida tropicalis</i> e 10 cepas de <i>Microsporum canis</i>	A atividade antifúngica foi avaliada pelos métodos de difusão em poço de ágar e microdiluição em caldo. Microrganismos foram isolados de cães e gatos sintomáticos. O crescimento fúngico nas placas foi verificado diluindo-se os OEs em óleo mineral nas concentrações de 25.000, 50.000, 75.000 e 100.000 µg/mL e aplicando-os em poços de 6 mm cortados do ágar. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo em placas de 96 poços. As microplacas foram incubadas a 37 °C e lidas após 2 dias para <i>Candida</i> spp. e 5 dias para <i>M. canis</i>. Os ensaios foram realizados em duplicata e repetidos pelo menos duas vezes. Camundongos Swiss foram usados para avaliar a toxicidade aguda dos OEs administrados por via oral ou intraperitoneal. Os resultados foram analisados por análise de variância e teste de Tukey. O DL₅₀ foi calculado usando o método probit.	Dentre as plantas estudadas, <i>C. argirofiloides</i> apresentou os melhores resultados, com CIM variando de 9 a 19 µg mL⁻¹. <i>C. zehntneri</i> inibiu o crescimento de <i>M. canis</i> em todas as concentrações (22 ± 7,3 mm) e o melhor efeito foi obtido com a maior concentração. A administração aguda do óleo essencial até 3 g kg⁻¹ por via oral a camundongos foi desprovida de toxicidade aparente.	Antifungal activity of essential oils from <i>Croton</i> species in the Brazilian Caatinga biome	[26]
Efeitos cardiovasculares	45,9% estragol	DV	PA	Ratos Wistar machos (280 – 340 g)	Os efeitos cardiovasculares do OECz foram investigados em ratos conscientes. Nessas preparações, foram administradas injeções intravenosas (i.v.) de OECz e seus principais constituintes anetol e estragol e, em seguida,	A administração de OECz (1–20 mg kg⁻¹) inicialmente induz hipotensão, seguida de pressão alta, mediada por anetol e estragol (ambos na dose de 1–10 mg kg⁻¹). A hipotensão parece ser	Cardiovascular effects of the essential oil from <i>Croton zehntneri</i> leaves in conscious hypertensive rats and hypertensive rats with	[35]

					as respostas cardiovasculares (frequência cardíaca e pressão aórtica máxima) foram registradas.	mediada colinérgica, enquanto a pressão alta resulta da ação vasoconstritora, provavelmente através da inibição da produção de óxido nítrico endotelial.	deoxycorticosterone acetate (DOCA) salt	
Efeito no músculo esquelético	58,8% de estragol	HD	FL	Foram utilizados sapos (<i>Bufo paracnemis</i> , 100-250 g) e ratos (Wistar, 180-350 g) de ambos os sexos	Os óleos foram geralmente administrados esvaziando a câmara muscular e reabastecendo-a com uma suspensão de óleo na solução de Ringer. Para experimentos <i>in vivo</i> , eles também foram administrados como uma suspensão em solução salina. A suspensão, para concentrações de até 1 mg/mL de um determinado óleo, foi estável durante o experimento, e foi preparada por 3-5 min de agitação manual vigorosa ou por vórtice dos óleos em solução de Ringer.	O OECz reduziu a amplitude de contração do gastrocnêmio provocada pela estimulação ciática. Isso diminui após a injeção arterial de 20-27 mg/kg de peso corporal. Na faixa de concentrações de 0,05 a 0,5 mg/ml, o OECz inibiu acentuadamente a resposta à estimulação indireta do diafragma do nervo frênico de rato. No caso da estimulação direta, a 0,25 mg/ml, o OECz (n = 6) sempre aumentou a contração ($29,0 \pm 5,2\%$; $P < 0,05$). Observou-se também que, a 0,5 mg/ml, o OECz reduziu a amplitude de contração (em mm) induzida pela ACh (1,7-2,8) de $56,0 \pm 3,8$ para $13,9 \pm 5,0$. Verificou-se que o OECz promoveu uma rápida contração de resfriamento.	Effects of the essential oil of <i>Croton zehntneri</i> , anethole, and estragole on skeletal muscle	[47]

Antimalárico	76,8% estragol	HD	FF	A atividade antimalárica foi testada contra <i>Plasmodium falciparum</i> , <i>Plasmodium berghei</i> . Bem como a atividade citotóxica <i>in vivo</i> em camundongos e <i>in vitro</i> em células HeLa e macrófagos	A atividade <i>in vitro</i> dos OEs e de componentes químicos individuais foi testada contra o parasita da malária humana <i>Plasmodium falciparum</i> (cepa K1), e a atividade <i>in vivo</i> dos OEs em camundongos infectados com <i>Plasmodium berghei</i> . A toxicidade aguda desses óleos foi avaliada em camundongos saudáveis, e a citotoxicidade <i>in vitro</i> foi determinada em diferentes concentrações contra células HeLa e macrófagos de camundongos.	O óleo essencial (OE) de <i>V. arborea</i> mostrou-se parcialmente ativo quando administrado por via subcutânea (inibido de 33 a 47%). Os OEs de <i>L. sidoides</i> e <i>C. zehntneri</i> foram ativos por via oral (por gavagem) e inibiram parcialmente o crescimento de <i>P. berghei</i> em 43 a 55% e mostraram boa atividade contra <i>P. falciparum in vitro</i> (IC ₅₀ = 7,00, 10,50 e 15,20 µg/mL, respectivamente). Os constituintes individuais do OE: ivisabolol, estragol e timol também apresentaram boa atividade contra <i>P. falciparum</i> (IC ₅₀ = 5,00, 30,70 e 4,50 µg/mL, respectivamente). Este é o primeiro estudo que mostra evidências da atividade antimalárica dessas espécies do nordeste brasileiro e da baixa toxicidade de seus OEs.	Antimalarial activity <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> of essential oils and chemical components of three medicinal plants found in northeastern Brazil	[13]
--------------	----------------	----	----	---	---	--	---	------

Anti-hepatotoxicidade	57,91% de anetol	HD	FL	Camundongos suíços machos (20-25 g)	30, 100 e 300 mg/kg de OECz em DMSO a 3% (v/v).	O número de células necróticas diminuiu visivelmente após a administração de <i>Croton zehntneri</i> . Os resultados deste estudo demonstram que o tratamento com <i>C. zehntneri</i> pode diminuir as lesões hepáticas induzidas por paracetamol em ratos. O perfil histopatológico do rato tratado com OECz não mostrou alterações visíveis, confirmando a segurança do óleo essencial no regime de dose selecionado. Além disso, de acordo com exames microscópicos, as lesões hepáticas graves induzidas pelo paracetamol foram notavelmente reduzidas pela administração crônica do OECz.	Essential oil of <i>Croton zehntneri</i> prevents acute hepatotoxicity induced by paracetamol in mice	[6]
-----------------------	------------------	----	----	-------------------------------------	---	--	---	-----

*ME= Método de extração, MT= Material, HD= Hidrodestilação, DV= Destilação a vapor, NR= Não relatado, FL= Folhas, TL= Talos, IF= Inflorescências, FF= Folhas frescas, PA= Parte aérea, RM= Ramos, CS= Casca.

Quatro tipos de material vegetal foram utilizados nos estudos para obtenção de OECGs: folhas, inflorescências, caules e casca. As folhas são uma fonte comum de OEs devido à sua alta concentração de glândulas secretoras. A frequência com que as folhas foram utilizadas para obtenção de OECGs foi de 39, presente em 95,12% dos estudos. Embora menos comuns, os caules também são ricos em OEs. Nos estudos investigados, os caules foram mencionados quatro vezes (9,75%). O uso de inflorescências e casca foi mencionado em apenas um estudo cada. Dois estudos não relataram o material vegetal utilizado para extração de OECGs (4,87%).

Dois métodos de extração de OECGs foram empregados nos estudos. A destilação a vapor foi o método predominante, ocorrendo 21 vezes, representando 51,21% dos estudos. A hidrodestilação foi o segundo método mais utilizado, ocorrendo 19 vezes, representando 46,34% dos estudos. Um estudo não relatou o método de extração de OECGs, representando 2,43% dos estudos.

Um total de 24 atividades biológicas foram atribuídas aos OECGs (Figura 7). As atividades mais frequentes foram antimicrobianas (7), inseticidas (4), acaricidas (3), efeitos cardiovasculares (3), antiespasmódicas (3) e antioxidantes (2).

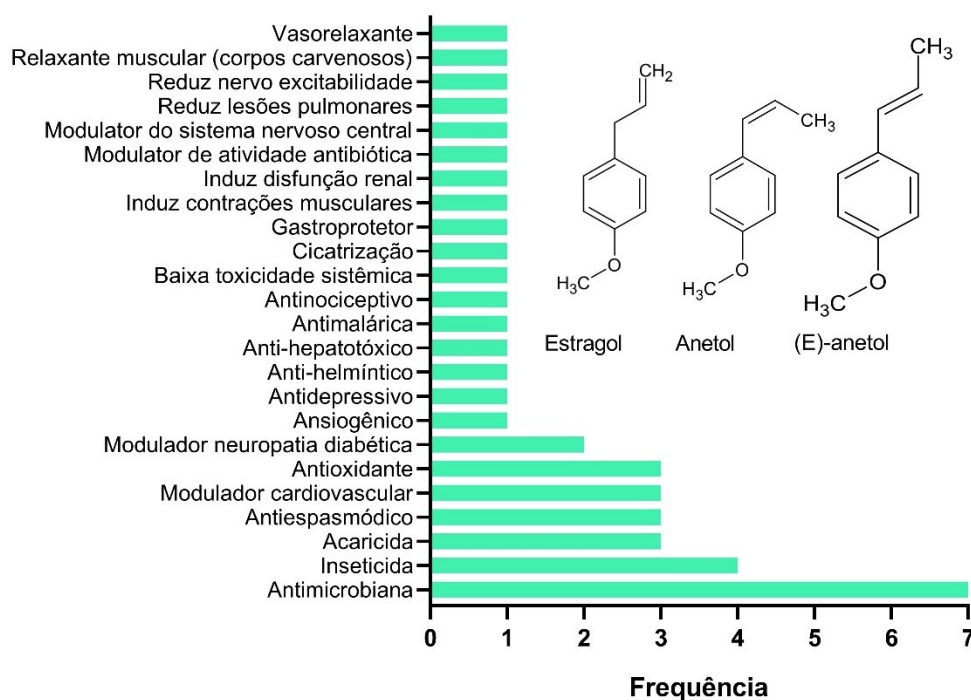


Figura 7. Principais atividades biológicas atribuídas aos OECGs.

A atividade antimicrobiana e a concentração inibitória mínima (CIM) dos OECGs foram determinadas por meio de diferentes métodos: contato gasoso [21], método de difusão em ágar (discos de papel estéreis impregnados com OECG) [22-23], difusão em disco [24], diluição em meio de cultura solidificado [25], difusão em ágar-poço [26] e microdiluição [26, 3].

Observou-se que os OECGs, especialmente aqueles que contêm compostos como estragol e eugenol, apresentam forte atividade antimicrobiana contra uma variedade de bactérias e fungos, incluindo *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella paratyphi*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Vibrio cholerae* (bactérias Gram-negativas), *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus β-hemolyticus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus* (bactérias Gram-positivas) e *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus niger*, *Blastomyces dermatitidis*, *Pityrosporum ovale*, *Trichophyton* sp., *Microsporum* sp., *Cryptococcus neoformans*, *Microsporum canis* (fungos).

A atividade inseticida dos OECGs foi categorizada em duas áreas principais: ciências agrárias e ciências biológicas. No grupo de ciências agrárias, o efeito inseticida dos OEs extraídos de folhas (65,5% (E)-anetol), com CL_{50} de 4,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ de ar, e daqueles extraídos de caules (47,8% (E)-anetol), com CL_{50} de 13,7 $\mu\text{L L}^{-1}$, foram eficientes contra *Zabrotes subfaciatus*. A variação na CL_{50} pode estar relacionada à concentração de (E)-anetol [27].

Em outro estudo na área de ciências agrárias, Santos et al. [4] relataram que os OECGs e seus principais compostos, metil eugenol e eugenol, foram mais tóxicos para larvas de *Chrysodeixis includens* e menos tóxicos para ninfas de *Podisus nigrispinus*. Assim, os OECGs podem ser considerados promissores para a síntese de novos inseticidas botânicos. A atividade acaricida de OECGs foi investigada contra *Tetranychus urticae*, *Neoseiulus californicus* e *Rhipicephalus microplus* [28-29].

Na área de ciências biológicas, dois estudos mencionaram o efeito prejudicial de OECGs sobre *Aedes aegypti* [30] e demonstraram que os OECGs de diferentes partes da planta e seu composto principal, (E)-anetol, reduziram a viabilidade de larvas de *A. aegypti*. Enquanto isso, De Lima et al. (2013) [31] relataram a inibição de OECGs contra *A. aegypti* em vários estágios de vida.

A atividade antioxidante dos OECGs foi determinada utilizando diferentes métodos: 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH), capacidade de absorção de radicais livres de oxigênio (ORAC), ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS), poder antioxidante redutor férrico (FRAP), co-oxidação de β -caroteno/ácido linoleico, óxido nítrico (NO), bem como degradação e potencial redutor da desoxirribose. Os estudos demonstraram que os OECGs de folhas e cascas, seus principais compostos (eugenol, estragol e metil eugenol), bem como os OECGs complexados com β -ciclodextrina, apresentam atividade antioxidante promissora [23, 5, 32].

Os efeitos cardiovasculares dos OECGs e seus constituintes, anetol e estragol, foram estudados em modelos animais para registrar a pressão arterial e a frequência cardíaca. O uso das moléculas relatadas resultou em hipotensão dose-dependente, seguida de hipertensão. Possíveis mecanismos de ação atribuídos às moléculas foram a mediação colinérgica e a influência na produção de óxido nítrico [33-35]. Os resultados destacam a importância desses compostos como alvos promissores para o desenvolvimento de novas terapias cardiovasculares.

A atividade antiespasmódica dos OECGs e seus constituintes (anetol e estragol) foi relatada em diferentes tipos de tecidos musculares, com efeitos dependentes da concentração. Observou-se que os OECGs reduzem o tônus basal em parte dos tecidos do íleo, promovem o relaxamento do íleo pré-contráido por cloreto de potássio, diminuem as contrações na veia porta e aumentam a atividade contrátil na bexiga [36]. Anéis traqueais de ratos tratados com OECG, anetol e estragol demonstraram inibição das contrações induzidas [37]. Os OECGs e o composto estragol reduziram o tônus muscular na musculatura lisa do íleo (parte do intestino delgado) e bloquearam as contrações induzidas por diferentes agentes [38]. Esses achados indicam o potencial terapêutico desses compostos em distúrbios de hipercontratibilidade muscular, como cólicas intestinais e broncoespasmos.

Com menor frequência de ocorrência, mas com resultados significativos, o potencial dos OECGs e seus principais compostos foi observado em outras áreas de estudo. Essas investigações abrangem propriedades antinociceptivas [39], efeitos anti-hepatotóxicos [6], atividade antidepressiva [7], efeitos anti-helmínticos [40], atividade antimalárica [13], cicatrização de feridas [8], efeitos ansiogênicos [9], propriedades gastroprotetoras [10], modulação da excitabilidade nervosa [41], efeitos no sistema nervoso central [42], neuropatia diabética [11-12], atividade vasorrelaxante [14], efeitos relaxantes do corpo cavernoso [43], disfunção renal [44], atenuação da lesão pulmonar [45], modulação da atividade antibiótica [46] e efeitos sobre a musculatura esquelética [47].

Essa gama de propriedades bioativas cientificamente comprovadas foi atribuída aos compostos presentes nos OECGs. Análises fitoquímicas conduzidas com OECGs levaram à identificação de compostos pertencentes a diferentes classes químicas, como monoterpenos,

sesquiterpenos e fenilpropanoides. Entre os 41 artigos revisados, o composto majoritário predominante foi o estragol, com uma frequência de ocorrência de 19 vezes (46,34%). O anetol foi o segundo composto majoritário mais encontrado, aparecendo 11 vezes (26,82%), seguido pelo (E)-anetol, com uma frequência de sete vezes (17,07%). Quatro estudos relataram o metil eugenol como o composto majoritário, e o eugenol foi mencionado duas vezes. Os compostos α -pineno e espatulenol foram mencionados como os compostos majoritários em apenas um estudo cada. Dois estudos não relataram a composição química.

Para a análise de componentes principais (ACP), 22 compostos foram considerados. A ACP explicou 61,63% da variância entre os constituintes químicos de 74 genótipos. O primeiro componente explicou 38,84% da variação total, enquanto o segundo componente foi responsável por 22,79% da variação total (Figuras 8A e 8B).

Considerando a composição química e a distribuição dos genótipos, foi possível observar a formação de cinco grupos distintos. O Grupo 1 foi composto por genótipos coletados nos estados da Bahia e Sergipe, caracterizados por alto teor de metil eugenol, variando de 40,93% (SE8) a 90,32% (BA1). O Grupo 2 foi composto por 20 genótipos coletados nos estados da Bahia, Ceará, Piauí e Sergipe, caracterizados por alto teor de estragol, variando de 45,90% (CE19) a 95,38% (PI12). Nove genótipos dos estados do Ceará e Minas Gerais formaram o Grupo 3, com anetol como composto majoritário, variando de 57,91% (CE3) a 85,7% (CE1, CE10, CE11, CE12, CE15 e MG1). Cinco genótipos coletados no estado do Ceará compuseram o Grupo 4, apresentando teor de (E)-anetol superior a 74,5%. O Grupo 5 foi composto por quatro genótipos do estado de Sergipe, apresentando alto teor de eugenol (> 73,80%). Os demais genótipos não se enquadraram em nenhum grupo, pois os compostos mais relevantes em sua caracterização foram uma mistura de metil eugenol, eugenol, anetol, estragol e/ou (E)-anetol. Um bom exemplo é o genótipo BA9, que contém 42,27% de metil eugenol e 48,74% de estragol em sua composição (Figuras 8A e 8B).

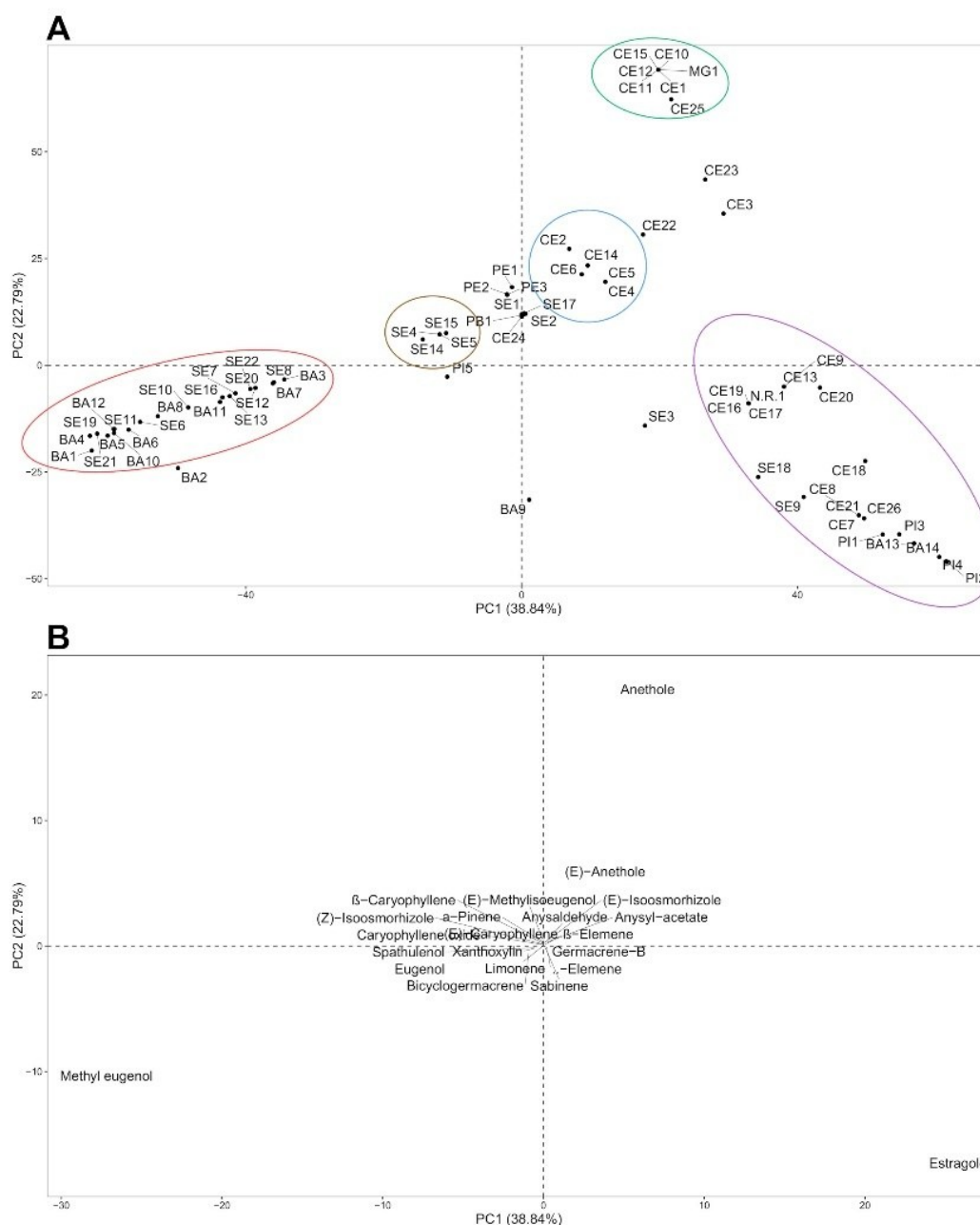


Figura 8. Composição química e distribuição dos genótipos dos estudos prospectados. (A) Análise de componentes principais dos genótipos. (B). Análise dos componentes principais dos constituintes químicos. Grupo 1: vermelho, grupo 2: roxo, grupo 3: verde, grupo 4: azul, grupo 5: marrom.

A caracterização química dos 41 estudos sugere que os compostos mais relevantes, como estragol, metil eugenol, eugenol, anetol e (E)-anetol, podem ser definidos como quimiotipos da espécie.

4.3.3 Qualidade metodológica/risco de viés de estudos relacionados ao uso de OECGs associados a atividades biológicas

Todos os artigos selecionados demonstram um bom grau de conformidade com critérios de qualidade específicos, como identificação correta das espécies, descrição clara dos métodos, inclusão de grupos de controle e conclusões alinhadas aos resultados e à discussão, bem como transparência quanto ao financiamento (Figura 9). No entanto, algumas lacunas podem ser observadas, como a ausência de aprovação do comitê de ética e a ausência de análises independentes para confirmar as propriedades biológicas dos OECGs. Esses aspectos devem

ser considerados em pesquisas futuras para garantir a validade e a confiabilidade dos resultados obtidos.

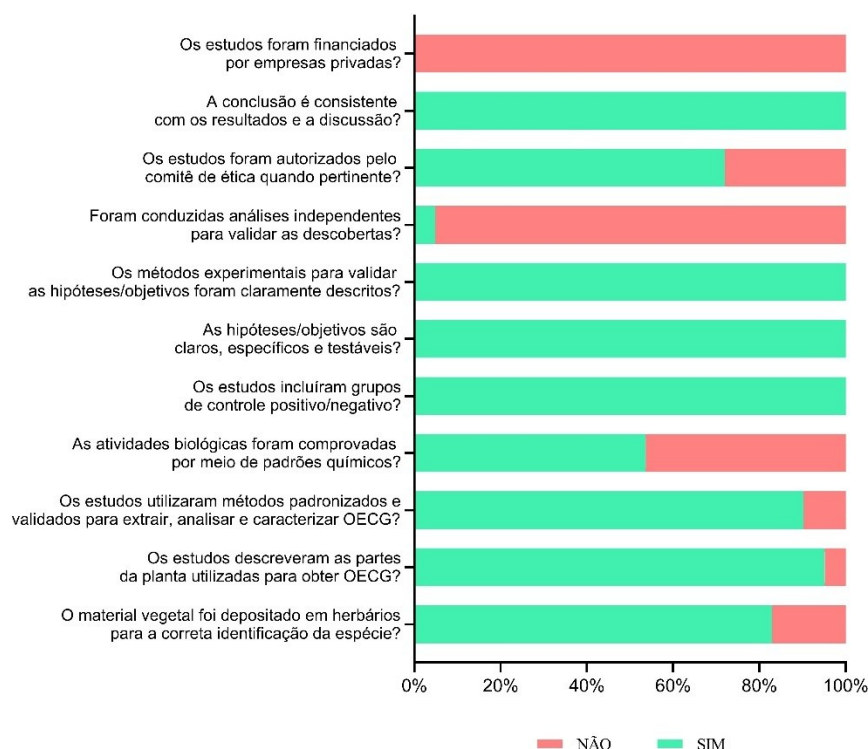


Figura 9. Listas de verificação para sugerir a validade e confiabilidade dos resultados obtidos.

4.4. Discussão

A análise bibliométrica das publicações sobre *C. grewioides* revela uma evolução positiva e significativa no campo de estudo de seus OEs e suas atividades biológicas. O aumento nas publicações e citações destaca o crescente interesse por pesquisas nas áreas de etnofarmacologia e produtos naturais, como demonstrado por métricas de citação e índices de impacto. Essa tendência ascendente é um forte indicador do potencial para a descoberta de novos compostos bioativos.

Estudos sobre OEs tendem a atrair o interesse de muitos pesquisadores. A alta diversificação de colaborações enfatiza a natureza colaborativa da pesquisa em produtos naturais. Redes de cocitação e colaboração são cruciais para o avanço científico, pois permitem a troca de conhecimento e técnicas entre diferentes grupos de pesquisa. Pesquisadores como Leal-Cardoso, J. e Coelho-De-Souza se destacam por sua produtividade acadêmica e influência na área, demonstrando a importância de centros de pesquisa bem estabelecidos.

A análise de palavras-chave revelou termos centrais como "óleo volátil", "*Aedes aegypti*", "*Croton*", "toxicidade" e "atividade", que são áreas-chave na pesquisa. A análise de similaridade e o mapa temático fornecem insights sobre o desenvolvimento do tópico e indicam um campo de pesquisa dinâmico e promissor. As lacunas identificadas e os temas emergentes oferecem caminhos claros para investigações futuras, com potencial para descobertas inovadoras que podem beneficiar a ciência e a medicina baseadas em produtos naturais.

A pesquisa sobre OECGs é essencial para explorar potenciais aplicações em diferentes segmentos da indústria, como farmacêutica e agrícola. Uma parte crucial desses estudos envolveu a identificação de materiais vegetais e os métodos de extração mais adequados para a obtenção desses OEs.

Um ponto destacado nos estudos revisados é a variedade de materiais vegetais utilizados para a obtenção de OECGs, como folhas, caules, cascas e inflorescências. A escolha do material vegetal é uma etapa importante no processo de obtenção desses OEs. Nas folhas de *C. grewoides*, o rendimento de OE (1,46%) foi maior em comparação ao rendimento nos caules (0,46%) e nas inflorescências (0,30%) [30]. Essa diferença de rendimento pode influenciar diretamente na escolha do material vegetal a ser utilizado. As folhas foram o material vegetal mais explorado para a obtenção de OECGs, presentes em mais de 90% dos estudos.

Outro aspecto importante é o método de extração de OECGs. Nos estudos revisados, observou-se que a destilação a vapor foi o método predominante, seguida pela hidrodestilação. Ambos os métodos apresentam vantagens e limitações, e a escolha entre eles pode afetar a composição e a qualidade dos OECGs obtidos. Em *Croton cajucara* Benth., [48] relatou que o método de extração de OEs da casca influenciou o rendimento, mas teve pouco efeito na composição química. Em outro estudo que comparou o efeito de métodos de extração em *Rosmarinus officinalis* L., observou-se uma mudança drástica na composição química do OE quando extraído por arraste a vapor (29,93% de γ -cadineno; 15,36% de eucaliptol) e por hidrodestilação (γ -cadineno não detectado; 12,59% de eucaliptol). O rendimento de OE do alecrim também foi alterado, 0,35% para hidrodestilação e 2,35% para arraste a vapor [49].

Os compostos químicos presentes em OEs podem desempenhar diferentes funções. Por meio de uma busca sistemática, foram encontradas 24 atividades biológicas para OECGs. As atividades biológicas mais estudadas foram antimicrobianas e inseticidas. Estudos indicam que uma variedade de bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas) e fungos sofrem danos significativos quando tratados com OECGs. Esses danos podem estar associados à inibição da síntese da parede celular, dano oxidativo, inibição da cadeia de transporte de elétrons, modificações na regulação enzimática, alterações no quorum sensing e, principalmente, alterações na membrana celular, que podem romper a bicamada lipídica, promovendo a despolarização e alterando a permeabilidade da membrana [50].

Compostos como estragol e eugenol são frequentemente associados a atividades bactericidas e fungicidas. [3] relataram que os OECGs e o composto eugenol exibiram potencial antibacteriano contra *X. campestris* pv. *campestris*, causando alterações estruturais na membrana celular.

Assim como o eugenol, o estragol também é eficaz no controle de microrganismos, como cepas de bactérias Gram-positivas (*B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. cereus* e *S. aureus*). No entanto, contra bactérias Gram-negativas (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. dysenteriae*, *S. sonnei*, *S. typhi*, *S. paratyphi* e *V. cholera*), o estragol apresentou capacidade de inibição reduzida ou ausente. O estragol também demonstra atividade antifúngica promissora contra *A. niger*, *B. dermatitidis*, *C. albicans*, *P. ovale*, *Trichophyton* sp., *Microsporum* sp e *C. neoformans* [24].

Os OECGs também apresentam potencial inseticida, com eficácia variável dependendo da parte da planta e da concentração dos compostos. Essa propriedade biológica pode ser atribuída à alta eficácia do composto (E)-anetol. Pragas agrícolas, como *Z. subfaciatus* [27] e *C. includens* [4], bem como o vetor de doenças *A. aegypti* [30-31] foram afetadas por OECGs.

Neste estudo, a análise de componentes principais (ACP) explicou 61,63% da variância entre os 74 genótipos analisados, revelando a formação de cinco grupos com base nos compostos principais: metil eugenol, estragol, anetol, (E)-anetol e eugenol. A capacidade da ACP de agrupar genótipos de acordo com seus perfis químicos facilita a identificação de quimiotipos para as espécies. Esses marcadores são compostos predominantes que podem indicar características desejáveis, como propriedades terapêuticas ou sensoriais, essenciais para a seleção e utilização de variedades específicas.

Os compostos estragol e (E)-anetol podem servir como marcadores químicos para as espécies, uma vez que estão presentes na maioria dos genótipos. Tais marcadores podem ser definidos como um composto ou classe de compostos químicos presentes em matérias-primas vegetais, fitoterápicos ou outros medicamentos à base de ingredientes ativos naturais, que podem ou não se correlacionar com propriedades terapêuticas [51]. O conhecimento dos

marcadores químicos das plantas é essencial para a identificação e autenticação precisas das espécies vegetais. Esses compostos específicos permitem que cientistas e profissionais distingam entre espécies ou subespécies morfologicamente semelhantes, facilitando a taxonomia e a classificação botânica [52].

Os marcadores químicos também desempenham um papel crucial para as indústrias, garantindo a qualidade e a autenticidade dos produtos derivados de plantas [52]. Eles garantem que o material vegetal utilizado seja da espécie correta e contenha os compostos ativos esperados, o que é essencial para a segurança e eficácia dos produtos. Na pesquisa científica, esses marcadores contribuem para estudos detalhados sobre os efeitos farmacológicos e bioativos específicos das plantas [53]. Esse conhecimento também é valioso em programas de conservação e melhoramento genético, auxiliando na identificação e preservação de populações de plantas com perfis químicos desejáveis [54].

A partir dos 41 estudos revisados, identificamos que, embora a diversidade química dos OECGs tenha sido amplamente explorada, a relação direta entre os quimiotipos identificados e suas respectivas atividades biológicas ainda requer mais investigação. A identificação de quimiotipos com base na ACP é um passo importante para a padronização das espécies, mas poucos estudos correlacionam sistematicamente a composição química com os mecanismos de ação dos compostos bioativos. Assim, estudos futuros devem investigar como variações na predominância de estragol, (E)-anetol, metil eugenol e eugenol influenciam a eficácia antimicrobiana, inseticida e antioxidante dos OECGs.

Outro ponto essencial é a necessidade de uma avaliação mais rigorosa da qualidade metodológica dos estudos revisados. Embora a revisão consolide um grande volume de informações sobre *C. grewioides*, a ausência de critérios formais para avaliar a confiabilidade dos dados pode comprometer a robustez das conclusões. Ensaio biológicos com diferentes organismos-alvo frequentemente utilizam protocolos experimentais distintos, dificultando comparações diretas entre os resultados. Além disso, há uma carência de estudos *in vivo* e clínicos que possam validar a segurança e a eficácia dos OECGs em condições mais próximas da aplicação no mundo real.

Apesar do reconhecimento do potencial industrial dos OECGs, os desafios práticos para sua aplicação comercial não têm sido amplamente discutidos. A estabilidade química dos compostos em formulações farmacêuticas, cosméticas ou agrícolas, bem como sua viabilidade econômica, são fatores críticos para a inserção desses produtos no mercado. Além disso, as regulamentações para a comercialização de biopesticidas e fitoterápicos variam entre os diferentes países, tornando essencial a realização de estudos toxicológicos detalhados para atender aos requisitos regulatórios.

Comparados a outras espécies do gênero *Croton* e aos OEs amplamente utilizados de espécies como *Cymbopogon* sp. e *Eucalyptus* sp., os OECGs ainda não são explorados comercialmente. Uma análise comparativa da eficácia e segurança desses óleos com produtos já estabelecidos pode fornecer insights valiosos sobre sua vantagem competitiva. Além disso, a pesquisa sobre possíveis sinergias entre os compostos dessa espécie e outros OEs pode ampliar suas aplicações terapêuticas e agrícolas. Portanto, estudos futuros devem adotar uma abordagem mais integrada, combinando análises químicas detalhadas, testes biológicos padronizados e investigações sobre sua viabilidade comercial.

4.5. Conclusões

Nossa revisão demonstrou que *C. grewioides* é uma espécie de grande interesse para a pesquisa científica, principalmente devido à diversidade química de seus OEs e suas propriedades bioativas. Sugerimos que a espécie apresenta cinco quimiotipos (estragol, metil eugenol, eugenol, anetol e (E)-anetol), e os compostos estragol e (E)-anetol podem ser considerados marcadores químicos desta espécie. Entre os 41 estudos prospectados, ainda existem lacunas que precisam ser preenchidas, como a falta de padronização nos métodos de

extração, falta de aprovação do comitê de ética, falta de análises independentes e uso de padrões para confirmar as propriedades biológicas dos OECGs. Investigações futuras podem se concentrar na validação experimental dos quimiotipos propostos, otimização dos métodos de extração e exploração do potencial industrial dos OEs. Além disso, estudos aprofundados sobre a estabilidade química, bioatividade e mecanismos de ação dos principais compostos são essenciais para garantir que *C. grewoides* possa ser efetivamente incorporado ao mercado.

4.6. Referências Bibliográficas

1. Silva JS, Sales MF, Carneiro-Torres DS. O gênero *Croton* (Euphorbiaceae) na microrregião do Vale do Ipanema, Pernambuco, Brasil. *Rodriguésia*. 2009; 60 (4) 879-901. <https://doi.org/10.1590/2175-7860200960409>
2. Carneiro-Torres DS, Cordeiro I, Giulietti AM, Berry PE, Rinna R. Three new species of *Croton* (Euphorbiaceae s.s.) from the Brazilian Caatinga. *Brittonia*. 2011; 63 (1) 122-132. <https://doi.org/10.1007/s12228-010-9145-1>
3. Rodrigues TC, Gois IB, Fernandes RPM, Blank AF, Sandes RDD, Neta MTS, Arrigoni-Blank MF. Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils from *Croton grewoides* Baill. accessions on the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2023; 193 - 105454. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2023.105454>
4. Santos NC, Silva JED, Santos ACC, Dantas JDO, Tavares SRSA, Andrade VS, Bacci L. Bioactivity of essential oils from *Croton grewoides* and its major compounds: toxicity to soybean looper *Chrysodeixis includens* and selectivity to the predatory stink bug *Podisus nigrispinus*. *Environmental Science and Pollution Research*. 2023; 30 (7) 18798-18809. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23414-w>
5. Oliveira SDDS, De Oliveira E Silva AM, Blank AF, Nogueira PCDL, Nizio DADC, Almeida-Pereira CS, Arrigoni-Blank MDF. Radical scavenging activity of the essential oils from *Croton grewoides* Baill accessions and the major compounds eugenol, methyl eugenol and methyl chavicol. *Journal of Essential Oil Research*. 2021; 33 (1) 94-103. <https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1779139>
6. Lima FC, Sousa DF, Ferreira JM, Lima Jr RC, Tomé AR, Cardoso JHL, Campos AR. *Croton zehntneri* Essential Oil Prevents Acetaminophen-Induced Acute Hepatotoxicity in Mice. *Records of natural products*. 2008; 2 (4) 135-140
7. Lazarini CA, Uema AH, Brandão GMS, Guimarães APC, Bernardi MM. *Croton zehntneri* essential oil: effects on behavioral models related to depression and anxiety. *Phytomedicine*. 2000; 7 (6) 477-481. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(00\)80033-1](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(00)80033-1)
8. Cavalcanti JM, Leal-Cardoso JH, Diniz LRL, Portella VG, Costa CO, Linard CFBM, Coelho-De-Souza AN. The essential oil of *Croton zehntneri* and trans-anethole improves cutaneous wound healing. *Journal of ethnopharmacology*. 2012; 144 (2) 240-247. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.08.030>
9. Leite GDO, Penha ARS, Costa JGMD, Campos AR. Anxiogenic like effect of *Croton zehntneri* Pax et Hoffm leaves essential oil in mice. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2009; 12 (5) 546-550. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2009.10643755>

10. Coelho-De-Souza AN, Lahlou S, Barreto JE, Yum ME, Oliveira AC, Oliveira HD, Leal-Cardoso JH. Essential oil of *Croton zehntneri* and its major constituent anethole display gastroprotective effect by increasing the surface mucous layer. *Fundamental & clinical pharmacology*. 2013; 27 (3) 288-298. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2011.01021.x>
11. Silva-Alves K S, Ferreira-Da-Silva FW, Coelho-De-Souza NA, Leal-Cardoso JH. Essential oil of *Croton zehntneri* prevents conduction alterations produced by diabetes mellitus on vagus nerve. *Plants*. 2021; 10 (5) 893. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10050893>
12. Ferreira-Da-Silva FW, Da Silva-Alves KS, Coelho-De-Souza AN, Leal-Cardoso JH. Essential oil of *Croton zehntneri* prevents electrophysiological alterations in dorsal root ganglia of streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. *Phytomedicine Plus*. 2023; 3 (2) 100443. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2023.100443>
13. Mota ML, Lobo LTC, Da Costa JMG, Costa LS, Rocha HA, E Silva LFR, De Andrade Neto VF. *In vitro* and *in vivo* antimalarial activity of essential oils and chemical components from three medicinal plants found in northeastern Brazil. *Planta medica*. 2012; 78 (7) 658-664. [10.1055/s-0031-1298333](https://doi.org/10.1055/s-0031-1298333)
14. De França-Neto A, Cardoso-Teixeira AC, Medeiros TC, Do Socorro Quinto-Farias M, De Souza Sampaio CM, Coelho-De-Souza NA, Leal-Cardoso JH. Essential oil of *Croton argyrophyllodes*: toxicological aspects and vasorelaxant activity in rats. *Natural Product Communications*. 2012; 7 (10)1934578X1200701040. <https://doi.org/10.1177/1934578X1200701040>
15. Aria M, Cuccurullo C. bibliometrix: An R-tool for comprehensive science mapping analysis. *Journal of Informetrics*. 2017; 11 (4) 959–975. <https://doi.org/10.1016/j.joi.2017.08.007>
16. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; 2022. <https://www.R-project.org/>.
17. Da Fonseca ASA, De Souza Monteiro I, Dos Santos CR, Carneiro MLB, Morais SS, Araújo PL, Joanitti GA. Effects of andiroba oil (*Carapa guianensis* Aublet) on the immune system in inflammation and wound healing: A scoping review. *Journal of Ethnopharmacology*. 2024; 327 118004. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2024.118004>
18. Oliveira BM, Nazareth LGC, Maia SC, De Almeida MS. Literature Map on valuation: A bibliometric analysis in the scopus database. *Journal of Management Analysis*. 2024; 13 (1) 87-103. <https://doi.org/10.12662/2359-618xregea.v13i1.p87-103.2024>
19. Vanz SADS, Stumpf IRC. Scientific collaboration: theoretical and conceptual review. *Perspectives in Information Science*. 2010; 15 42-55. <https://doi.org/10.1590/S1413-99362010000200004>
20. Cobo MJ, López-Herrera AG, Herrera-Viedma E, Herrera F. An approach for detecting, quantifying, and visualizing the evolution of a research field: A practical application to the Fuzzy Sets Theory field. *Journal of informetrics*. 2011; 5 (1) 146-166. <https://doi.org/10.1016/j.joi.2010.10.002>

21. Rodrigues FF, Costa JG, Coutinho HD. Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri*. Phytomedicine. 2009; 16 (11) 1052-1055.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.04.004>
22. Da Costa JG, Rodrigues FF, Angelico EC, Pereira CK, Souza EOD, Caldas GF, Santos PFD. Chemical composition and evaluation of the antibacterial activity and toxicity of the essential oil of *Croton zehntneri* (variety estragol). Brazilian Journal of Pharmacognosy. 2008; 18 583-586. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000400015>
23. Donati M, Mondin A, Chen Z, Miranda FM, Do Nascimento Jr BB, Schirato G, Frolidi G. Radical scavenging and antimicrobial activities of *Croton zehntneri*, *Pterodon emarginatus* and *Schinopsis brasiliensis* essential oils and their major constituents: estragole, trans-anethole, β -caryophyllene and myrcene. Natural product research. 2015; 29 (10) 939-946.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2014.964709>
24. Andrade TC, Lima SGD, Freitas RM, Rocha MS, Islam T, Silva TGD, Militao GC. Isolation, characterization and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activity of estragole, obtained from the essential oil of *Croton zehntneri* (Euphorbiaceae). Annals of the Brazilian Academy of Sciences. 2015; 87 (01) 173-182. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201520140111>
25. De Medeiros VM, Do Nascimento YM, Souto AL, Madeiro SAL, De Oliveira Costa VC, Silva SMP, Tavares JF. Chemical composition and modulation of bacterial drug resistance of the essential oil from leaves of *Croton grewoides*. Microbial pathogenesis. 2017; 111 468-471. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.09.034>
26. Fontenelle ROS, Morais SM, Brito EHS, Brilhante RSN, Cordeiro RA, Nascimento NRF, Rocha MFG. Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian Caatinga biome. Journal of Applied Microbiology. 2008; 104 (5) 1383-1390.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03707.x>
27. Silva CG, Zago HB, Júnior HJ, Da Camara CA, De Oliveira JV, Barros R, Lucena MF. Composition and insecticidal activity of the essential oil of *Croton grewoides* Baill. against Mexican bean weevil (*Zabrotes subfasciatus* Boheman). Journal of Essential Oil Research. 2008; 20 (2) 179-182. <https://doi.org/10.1080/10412905.2008.9699985>
28. De Santana MF, Monteiro VB, De Melo JPR, De Moraes MM. Bioactivity of essential oils for the management of *Tetranychus urticae*. Koch and selectivity on its natural enemy *Neoseiulus californicus* (McGregor): A promising combination for agroecological systems. Acarologia. 2021; 61 (3) 564-576. [10.24349/acarologia/20214451.hal-03263216](https://doi.org/10.24349/acarologia/20214451.hal-03263216)
29. Da Camara CA, De Araujo CA, De Moraes MM, De Melo JP, Lucena MF. New sources of botanical acaricides from species of *Croton* with potential use in the integrated management of *Tetranychus urticae*. Latin American and Caribbean Bulletin of Medicinal and Aromatic Plants. 2021; 20 (3) 244-259. [10.37360/blacpma.21.20.3.19](https://doi.org/10.37360/blacpma.21.20.3.19)
30. Santos HS, Santiago GMP, De Oliveira JPP, Arriaga AMC, Marques DD, Lemos TLG. Chemical Composition and Larvicidal Activity against *Aedes Aegypti* of Essential Oils from *Croton Zehntneri*. Natural Product Communications. 2007; 2 (12) 1233-1236.
[10.1177/1934578X0700201208](https://doi.org/10.1177/1934578X0700201208)

31. De Lima GPG, De Souza TM, De Paula Freire G, Farias DF, Cunha AP, Ricardo NMPS, Carvalho AFU. Further insecticidal activities of essential oils from *Lippia sidoides* and *Croton* species against *Aedes aegypti* L. Parasitology Research. 2013; 112 1953-1958. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3351-1>
32. Sousa AJ, Oliveira GL, Fonseca L, Rocha MS, Rai M, Santos FE, Lima SGD. Antioxidant properties of *Croton zehntneri* Pax et Hoffm. Essential oil and its inclusion complex with β -cyclodextrin prepared by spray drying. Journal of the Brazilian Chemical Society. 2022; 33 (10) 1244-1253. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20220051>
33. De Siqueira RJB, Magalhães PJC, Leal-Cardoso JH, Duarte GP, Lahlou S. Cardiovascular effects of the essential oil of *Croton zehntneri* leaves and its main constituents, anethole and estragole, in normotensive conscious rats. Life sciences. 2006; 78 (20) 2365-2372. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.09.042>
34. De Siqueira RJB, Leal-Cardoso JH, Couture R, Lahlou S. Role of capsaicin-sensitive sensory nerves in mediation of the cardiovascular effects of the essential oil of *Croton zehntneri* leaves in anaesthetized rats. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 2006; 33 (3) 238-247. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2006.04352.x>
35. Bezerra De Siqueira RJ, Duarte GP, Magalhães PJC, Lahlou S. Cardiovascular effects of the essential oil of *Croton zehntneri* leaves in DOCA-salt hypertensive, conscious rats. Natural Product Communications. 2013; 8 (8) 1934578X1300800836. <https://doi.org/10.1177/1934578X1300800836>
36. Coelho-De-Souza AN, Criddle DN, Leal-Cardoso JH. Selective modulatory effects of the essential oil of *Croton zehntneri* on isolated smooth muscle preparations of the guinea-pig. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives. 1998; 12 (3) 189-194. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199805\)12:3<189::AID-PTR222>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199805)12:3<189::AID-PTR222>3.0.CO;2-S)
37. Lima CC, De Holanda-Angelin-Alves CM, Pereira-Gonçalves Á, Kennedy-Feitosa E, Evangelista-Costa E, Bezerra MAC, Leal-Cardoso JH. Antispasmodic effects of the essential oil of *Croton zehntneri*, anethole, and estragole, on tracheal smooth muscle. Heliyon. 2020; 6 (11) e05445. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05445>
38. Coelho-De-Souza AN, Barata EL, Magalhaes PJ, Lima CC, Leal-Cardoso JH. Effects of the essential oil of *Croton zehntneri*, and its constituent estragole on intestinal smooth muscle. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Medical and Scientific Research on Plants and Plant Products. 1997; 11 (4) 299-304. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199706\)11:4<299::AID-PTR99>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199706)11:4<299::AID-PTR99>3.0.CO;2-A)
39. Oliveira AC, Leal-Cardoso JH, Santos CF, Morais SM, Coelho-De-Souza AN. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton zehntneri* in mice. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2001; 34 1471-1474. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2001001100016>
40. Camurça-Vasconcelos ALF, Bevilacqua CML, Morais SM, Maciel MV, Costa CTC, Macedo ITF, Vieira LS. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. Veterinary parasitology. 2007; 148 (3-4) 288-294. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.06.012>

41. Da Silva-Alves KS, Ferreira-Da-Silva FW, Coelho-De-Souza NA, Albuquerque AAC, Do Vale OC, Leal-Cardoso JH. Essential oil of *Croton zehntneri* and its main constituent anethole block excitability of rat peripheral nerve. Medicinal plant. 2015; 81 (04) 292-297. [10.1055/s-0034-1396309](https://doi.org/10.1055/s-0034-1396309)
42. Batatinha MJM, De Souza-Spinosa H, Bernardi MM. *Croton zehntneri*: possible central nervous system effects of the essential oil in rodents. Journal of Ethnopharmacology. 1995; 45 (1) 53-57. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(94\)01195-6](https://doi.org/10.1016/0378-8741(94)01195-6)
43. Cabral PHB, De Moraes Campos R, Fonteles MC, Santos CF, Cardoso JHL, Do Nascimento NRF. Effects of the essential oil of *Croton zehntneri* and its major components, anethole and estragole, on the rat corpora cavernosa. Life sciences. 2014; 112 (1-2) 74-81. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.07.022>
44. Silva KF, Peruchetti DB, Sirtoli GM, Takiya CM, Pinheiro AAS, Leal-Cardoso JH, Caruso-Neves C. High Doses of Essential Oil of *Croton Zehntneri* Induces Renal Tubular Damage. Plants. 2021; 10 (7) 1400. <https://doi.org/10.3390/plants10071400>
45. Serra DS, Gomes MDM, Cavalcante FSÁ, Leal-Cardoso JH. Essential oil of *Croton Zehntneri* attenuates lung injury in the OVA-induced asthma model. Journal of Asthma. 2019; 56 (1) 1-10. <https://doi.org/10.1080/02770903.2018.1430828>
46. Coutinho HDM, Matias EFF, Santos KKA, Tintino SR, Souza CES, Guedes GMM, Siqueira-Júnior JP. Enhancement of the norfloxacin antibiotic activity by gaseous contact with the essential oil of *Croton zehntneri*. Journal of Young Pharmacists. 2010; 2 (4) 362-364. <https://doi.org/10.4103/0975-1483.71625>
47. Albuquerque AAC, Sorenson AL, Leal-Cardoso J. Effects of essential oil of *Croton zehntneri*, and of anethole and estragole on skeletal muscles. Journal of Ethnopharmacology. 1995; 49 (1) 41-49. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(95\)01301-6](https://doi.org/10.1016/0378-8741(95)01301-6)
48. Silva FR, Junior AW, Cechinel Filho V, Nunes DS. Chemical composition of essential oil from the bark of *Croton cajucara* Benth. Acta Scientiarum Technology. 2012; 34 (3) 325-329. [10.4025/actascitechnol.v34i3.1171](https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v34i3.1171)
49. Conde-Hernández LA, Espinosa-Victoria JR, Trejo A, Guerrero-Beltrán JÁ. CO₂-supercritical extraction, hydrodistillation and steam distillation of essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis*). Journal of food engineering. 2017; 200 81-86. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.12.022>
50. Angane M, Swift S, Huang K, Butts CA, Quek SY. Essential oils and their major components: An updated review on antimicrobial activities, mechanism of action and their potential application in the food industry. Foods. 2022; 11 (3) 464. <https://doi.org/10.3390/foods11030464>
51. Brazil. Ministry of Health. National Health Surveillance Agency (ANVISA). Phytotherapeutic Formulary of the Brazilian Pharmacopoeia, 2nd ed. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/formulario-fitoterapico>). Accessed 12 July 2024.
52. Gao W, Liu K, Wang R, Liu XG, Li XS, Li P, Yang H. Integration of targeted metabolite profiling and sequential optimization method for discovery of chemical marker combination

to identify the closely-Related plant species. *Phytomedicine*. 2019; 61 152829.

<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152829>

53. De Bessa NGF, Borges JCM, Beserra FP, Carvalho RHA, Pereira MAB, Fagundes R, Alves A. Preliminary phytochemical prospecting of native plants from the Cerrado used for medicinal purposes by the rural community of the Vale Verde settlement in Tocantins.

Brazilian Journal of Medicinal. Plants. 2013; 15 692-707. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000500010>

54. Braga FC De. Phytochemical Research. In *Phytotherapy: scientific and technological bases*, 1st ed; Leite, J.P.V.; Editora Atheneu: São Paulo, São Paulo (Brazil); 2009. pp. 328.

55. de Carvalho Castro KN, de Souza Chagas AC, Costa-Júnior LM, Canuto KM, de Brito ES, Rodrigues THS, de Andrade IM. Acaricidal potential of volatile oils from *Croton* species on *Rhipicephalus microplus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2019; 29 6 811-815.

<https://doi.org/10.1016/j.bjp.2019.09.001>

56. Coelho-de-Souza AN, Rocha MVA, Oliveira KA, Vasconcelos YA, Santos EC, Silva-Alves, KS, Leal-Cardoso JH. Volatile oil of *Croton zehntneri* per oral sub-acute treatment offers small toxicity: perspective of therapeutic use. *Revista Brasileira de Farmacognosia*.

2019; 29 228-233. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.11.005>

5. ARTIGO 2

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Croton grewoides* Baill. E SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS CONTRA *Xanthomonas campestris* pv. *melonis*

Artigo formatado de acordo com as normas do periódico *Pesticide Biochemistry and Physiology*

RESUMO

A barriga-d'água do meloeiro, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *melonis* (Xmel), compromete significativamente a qualidade e a produtividade dos frutos, afetando diretamente a comercialização e o rendimento da cultura. O manejo atual dessa fitobactéria baseia-se, principalmente, na aplicação de produtos químicos à base de cobre, os quais representam riscos à saúde humana e ao meio ambiente. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana e a capacidade antibiofilme dos óleos essenciais de *Croton grewoides* (OECGs) e seus compostos majoritários contra *Xanthomonas campestris* pv. *melonis* (Xmel). Para isso, foram realizados ensaios *in vitro* para determinar a concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM), cinética de morte, permeabilidade de membrana e inibição da formação de biofilme. A composição química dos óleos essenciais (OEs) foi analisada por GC/MS e os principais compostos identificados foram metil chavicol, metil eugenol e eugenol. O CGR-106, CGR-107, CGR-220 e a combinação dos compostos eugenol + metil chavicol apresentaram menor CIM ($1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$). A CBM para todos os OEs e seus compostos foi superior a $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Pela cinética de morte observou-se uma redução da viabilidade celular a partir de 120 min. Essa redução pode estar associada a danos à membrana das células, evidenciada através do ensaio de permeabilidade de membrana e microscopia eletrônica de varredura, destacando o CGR-106 como o principal promotor desses danos. Em relação à atividade antibiofilme, o CGR-106 e o CGR-220 demonstraram maior capacidade de inibição. Assim, os OECGs representam uma alternativa promissora e sustentável para o manejo da barriga-d'água em melão, oferecendo uma abordagem ecologicamente segura e eficaz para o controle de Xmel.

Palavras-chave: Barriga-d'água do melão; Biopesticidas; Bactericida botânico; Antibiofilme; Planta aromática.

5.1. Introdução

O controle de doenças bacterianas é um desafio persistente e difícil de superar nas lavouras em todo o mundo. Isso se deve à rápida disseminação dos patógenos e a severidade das doenças, aliados às dificuldades de manejo, exigindo práticas como solarização, rotação de culturas e aplicação de doses elevadas de pesticidas sintéticos (Marin et al. 2019). Esse cenário tem levado ao uso indiscriminado de produtos amplamente reconhecidos por seus efeitos nocivos. A longo prazo, essas substâncias representam riscos significativos não apenas à saúde humana, mas também para os ecossistemas (Rodrigues et al. 2024).

O melão (*Cucumis melo* L.) pertence à família *Cucurbitaceae* e tem grande relevância econômica no Brasil. Na safra 2023/24, a área colhida no país foi de 30.535 hectares, gerando aproximadamente 118 milhões de dólares e ultrapassando 130 mil toneladas exportadas (IBGE, 2025; Brasil, 2025). O Rio Grande do Norte é o principal estado produtor, representando 60% da produção nacional, devido às condições climáticas favoráveis ao cultivo. Essa espécie hortícola é muito apreciada por seus frutos refrescantes e adocicados. No entanto, o maior desafio para o cultivo dessa espécie é a ocorrência de doenças causadas por bactérias e fungos.

Xanthomonas é um dos gêneros mais importantes e difundidos de bactérias fitopatogênicas que infectam grande parte das culturas comerciais (Jacques et al. 2016; An et al. 2020). A espécie *Xanthomonas campestris* pv. *melonis* (Xmel) é relatada como um patógeno de podridão mole que afeta melões, sendo o agente causal da doença conhecida como barriga-d'água. Esse patógeno, ainda pouco estudado, foi relatado pela primeira vez na região de Presidente Prudente, São Paulo, causando grandes perdas aos produtores. Seus sintomas incluem descoloração da polpa, seguida de decomposição dos tecidos, ocasionando um acúmulo de líquidos no interior dos frutos, o que deu origem ao nome dessa doença. Externamente, os frutos não apresentam sintomas visíveis, exceto uma pequena anomalia, que indica o ponto de entrada do patógeno (Berian et al. 2018).

O controle de doenças causadas por Xmel envolve estratégias como a eliminação de plantas sintomáticas e restos culturais, rotação de culturas, solarização e aplicação de fungicidas/bactericidas (Ryan et al. 2011). O método mais usual é o controle químico, que quando feito de forma inadequada, seleciona indivíduos resistentes por pressão de seleção, comprometendo a eficácia do tratamento (Stephen Jr et al. 2022). Nesse contexto, produtos naturais, como os óleos essenciais (OEs), surgem como uma alternativa sustentável ao uso de pesticidas sintéticos, devido a sua baixa toxicidade aos organismos não-alvo, baixa persistência no ambiente, alta especificidade aos organismos-alvo e capacidade de agir sobre diferentes sítios de ação, o que dificulta o desenvolvimento de resistência microbiana (Borges et al. 2021). Os principais mecanismos de ação atribuídos aos OEs incluem a destruição da membrana plasmática, o que gera a exsudação de substâncias importantes, como aminoácidos e eletrólitos, regulação enzimática e inibição da síntese proteica (Liu et al. 2021).

Os OEs são reconhecidos por sua ação antimicrobiana e antibiofilme. Estudos anteriores relataram a eficácia dos OEs contra bactérias do gênero *Xanthomonas*. Por exemplo, pesquisas realizadas por Silva et al. (2019) e Silva et al. (2020) demonstraram o potencial antimicrobiano dos OEs de *Lippia gracilis* e *Varronia curassavica* no controle de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (XCC). Além disso, os estudos de Vishakha et al. (2022) e Singh et al. (2017) evidenciaram que os OEs de *Melaleuca alternifolia* e *Thymus vulgaris* inibem a formação de biofilme de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (XOO).

Uma espécie rica em OEs promissora para o controle de fitopatógenos é *Croton grewioides* Baill., uma planta aromática endêmica do Brasil, amplamente distribuída nos biomas Caatinga e Cerrado (SiBBR, 2025). Os OEs de *C. grewioides* (OECGs) possuem propriedades bioativas comprovadas, incluindo ação antibacteriana. Rodrigues et al. (2023) relataram que os OECGs apresentam atividade antimicrobiana contra XCC, reduzindo a viabilidade celular e alterando a membrana citoplasmática.

Atualmente, não há produtos registrados para o controle da barriga-d'água causada por Xmel, tampouco estudos sobre o efeito dos OECGs e seu mecanismo de ação contra esse fitopatógeno. Diante disso, torna-se essencial a busca por alternativas naturais e eficazes para o manejo da doença. Assim, com nosso estudo, buscamos avaliar a atividade antimicrobiana, antibiofilme e os mecanismos de ação dos OECGs sobre Xmel.

5.2. Material e Métodos

5.2.1 Material vegetal e extração de OEs

Foram estudados 25 acessos de *C. grewioides* Baill. conservados no Banco Ativo de Germoplasma de Plantas Medicinais e Aromáticas da Fazenda Experimental “Campus Rural” da 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 (Tabela 1).

As folhas de *C. grewioides* Baill foram coletadas e submetidas à hidrodestilação em aparelho Clevenger modificado, utilizando amostras de 40 g de folhas secas, com adição de 1,5

L de água destilada, durante 140 minutos. Após a extração, os OECGs foram armazenados em frasco âmbar a -20 °C até a análise da composição química e das atividades antibacteriana e antibiofilme.

Tabela 1. Código, município de origem, estado de origem e informações geográficas dos 25 acessos da coleção de *Croton grewoides* Baill. do Banco Ativo de Germoplasma de Plantas Medicinais e Aromáticas da Universidade Federal de Sergipe.

Código	Município de origem	Estado	Localização geográfica (latitude; longitude)
CGR-103	Poço Verde	Sergipe	S 10°55'17,8" W 37°06'04,1"
CGR-104	Poço Verde	Sergipe	S 10°55'17,8" W 37°06'04,1"
CGR-106	Poço Redondo-Serra da Guia	Sergipe	S 09°58'06,5" W 37°51'48,4"
CGR-107	Poço Redondo-Serra da Guia	Sergipe	S 09°58'06,5" W 37°51'48,4"
CGR-108	Poço Redondo-Serra da Guia	Sergipe	S 09°58'06,5" W 37°51'48,4"
CGR-124	Poço Redondo-Serra da Guia	Sergipe	S 09°57'55,6" W 37°51'49,8"
CGR-125	Poço Redondo-Serra da Guia	Sergipe	S 09°57'55,6" W 37°51'49,8"
CGR-204	Poço Redondo- Serra da Guia	Sergipe	S 09°58'06,7" W 37°51'48,6"
CGR-209	Poço Redondo- Serra da Guia	Sergipe	S 09°58'13,1" W 37°51'51,0"
CGR-210	Poço Redondo- Serra da Guia	Sergipe	S 09°58'08,8" W 37°51'50,5"
CGR-212	Poço Redondo- Serra da Guia	Sergipe	S 09°58'09,1" W 37°51'51,5"
CGR-215	Poço Redondo- Serra da Guia	Sergipe	S 09°58'06,9" W 37°51'49,0"
CGR-220	Poço Redondo- Serra da Guia	Sergipe	S 09°57'55,9" W 37°51'49,7"
CGR-222	Poço Redondo- Serra da Guia	Sergipe	S 09°57'56,5" W 37°51'48,4"
CGR-302	Conceição do Coité	Bahia	S 11°35'78,6" W 39°18'99,6"
CGR-304	Conceição do Coité	Bahia	S 11°35'78,6" W 39°19'00,2"
CGR-306	Conceição do Coité	Bahia	S 11°35'78,2" W 39°19'00,9"
CGR-307	Conceição do Coité	Bahia	S 11°35'79,0" W 39°19'01,2"
CGR-308	Conceição do Coité	Bahia	S 11°35'77,0" W 39°19'01,1"
CGR-309	Conceição do Coité	Bahia	S 11°35'76,2" W 39°19'00,8"
CGR-311	Conceição do Coité	Bahia	S 11°36'01,1" W 39°17'97,3"
CGR-312	Conceição do Coité	Bahia	S 11°35'78,3" W 39°18'99,1"
CGR-313	Conceição do Coité	Bahia	S 11°35'89,7" W 39°18'11,4"
CGR-318	Conceição do Coité	Bahia	S 11°36'01,3" W 39°17'97,5"
CGR-323	Conceição do Coité	Bahia	S 11°36'02,9" W 39°17'98,0"

5.2.2 Análise química de OEs

Os compostos presentes nos OECGs foram identificados por cromatografia gasosa (Agilent, modelo 7890B) acoplada a um espectrômetro de massas (Agilent, modelo 5977A MSD). O cromatógrafo gasoso foi equipado com uma coluna capilar de sílica fundida DB-5MS (30 m de comprimento × 0,25 mm de diâmetro interno × 0,25 µm de espessura, Agilent). O hélio foi utilizado como gás carreador, com vazão de 1 mL/min. A energia de ionização foi de 70 eV e a faixa de detecção de massa foi de 40 a 500 Da. Um amostrador automático (Agilent G4513A) foi utilizado para injetar 1 µL de cada amostra (10 mg de OE/mL de solução) no modo splitless. A temperatura inicial do forno foi de 35 °C (mantida por dois minutos), seguida de um aumento de 10 °C/min até 100 °C (mantida por um minuto). Em seguida, a temperatura foi elevada a 3 °C/min até 250 °C, e mantida por três minutos.

Os dados foram processados no *software* Mass Hunter (versão B 7.0, Agilent Technologies). A identificação dos compostos foi realizada por comparação de seus espectros de massa com aqueles presentes no banco de dados do NIST (National Institute of Standards & Technology). O índice aritmético (IA) de cada composto foi calculado com base no tempo de retenção de uma sequência de *n*-alcanos (C8–C24) e comparado com os valores reportados na literatura (Adams, 2017).

5.2.3 Isolado bacteriano

O fitopatógeno *Xanthomonas campestris* pv. *melonis* (Xmel) foi obtido na coleção de fitobactérias do Instituto Biológico de São Paulo (São Paulo, Brasil). A bactéria foi cultivada em meio de cultura YM (Levedura-Malte: 3 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 3 g.L⁻¹ de extrato de

malte, 5 g.L⁻¹ de peptona e 10 g.L⁻¹ de sacarose, pH 6,0) sob agitação orbital (150 rpm/28 ± 2 °C). Para todos os testes, foi utilizado um inóculo padronizado com densidade óptica equivalente a 0,5 na escala de McFarland (1 × 10⁶ UFC.mL⁻¹). As leituras foram realizadas em um leitor de microplacas Synergy™ H1 (BioTek Hybrid Technology) a um comprimento de onda de 600 nm.

5.2.4 Triagem *in vitro* da atividade antimicrobiana dos OECGs

Inicialmente, os OECGs (Tabela 1) foram avaliados para selecionar aqueles com maior porcentagem de inibição contra o isolado Xmel, utilizando um ensaio em microplacas. A solução de OE dos diferentes acessos de *C. grewioides* foi composta por OE (2000 µg.mL⁻¹), 1% DMSO (Dimetilsulfóxido – Sigma-Aldrich, 99,9% de pureza) e meio de cultura YM. Em microplacas de 96 poços, foram adicionados 100 µL da suspensão bacteriana padronizada de Xmel e 100 µL da solução de OE. Como controle negativo, foi utilizado 100 µL de meio YM com adição de DMSO (1%) em conjunto com o fitopatógeno. Em seguida, as microplacas foram incubadas sob agitação orbital (150 rpm, 28 °C ± 2) durante 24 horas. A atividade antimicrobiana foi determinada por leitura da absorbância em um leitor de microplacas Synergy™ H1 Hybrid (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA), utilizando um comprimento de onda de 600 nm. A inibição do crescimento bacteriano foi calculada pela fórmula: inibição (%) = ((Controle negativo – Células tratadas) / (Controle negativo)) × 100.

5.2.5 Determinação da concentração inibitória mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) para os OECGs e seus compostos majoritários foi determinada pelo método de microdiluição. Para isso, foram selecionados oito acessos baseados nas diferenças observadas entre os perfis químicos dos OEs. Os ensaios de microdiluição foram realizados em microplacas de 96 poços, em que foram adicionados, 100 µL da cultura do fitopatógeno padronizada e 100 µL da solução dos OEs ou seus majoritários em uma série de concentrações variando de 4000 µg.mL⁻¹ a 125 µg.mL⁻¹.

As soluções de OE e seus compostos majoritários foram compostas por OE/composto isolado, 1% de DMSO e meio de cultura YM. A concentração de OE na solução foi ajustada à concentração de interesse. Assim como para os OEs e seus compostos majoritários, também foi determinada a CIM para sulfato de cobre (4000 µg.mL⁻¹ a 125 µg.mL⁻¹), sulfato de estreptomicina (1000 µg.mL⁻¹ a 125 µg.mL⁻¹) (controle positivo) e Kasumin® (casugamicina) (376 µg.mL⁻¹ a 76 µg.mL⁻¹). No caso do Kasumin® (casugamicina), as concentrações testadas por microdiluição foram baseadas na dose recomendada pelo fabricante, e os resultados foram expressos em quantidade do ingrediente ativo.

Para o controle negativo, foi adicionado meio de cultura YM com adição de DMSO (1%) em conjunto com o fitopatógeno. As microplacas foram incubadas sob agitação orbital (150 rpm/28 °C ± 2) durante 24 horas. Em seguida, a absorbância a 600 nm foi medida usando o leitor de microplacas Synergy™ H1 Hybrid (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA). A concentração mínima inibitória foi definida como a menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento de Xmel.

5.2.6 Determinação da concentração bactericida mínima

Para determinar a concentração bactericida mínima (CBM) foram retirados 20 µL do conteúdo dos poços onde foram observadas as CIMs, os quais foram depositados em placas de Petri contendo meio de cultura YM sólido. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 28 °C ± 2 por 24 horas. Após a incubação, a ausência de crescimento microbiano indica atividade bactericida, enquanto o crescimento positivo indica atividade bacteriostática.

5.2.7 Cinética de morte

A cinética de morte do fitopatógeno Xmel foi determinada em microplacas. Para isso, 100 µL da cultura padrão foram adicionados a placas de microdiluição juntamente com 100 µL

da solução dos OEs ou seus compostos majoritários. A solução de OE ou seus compostos majoritários foi composta por OE, 1% DMSO e meio de cultura YM, em concentrações correspondentes a $1\times$, $1/2\times$ e $1/4\times$ da CIM.

Assim como para os OEs e seus compostos majoritários, também foi determinada a cinética de morte de Xmel em concentrações correspondentes a $1\times$, $1/2\times$ e $1/4\times$ da CIM para sulfato de cobre, casugamicina e sulfato de estreptomicina (controle positivo). O controle negativo consistiu em meio de cultura YM com adição de DMSO (1%) aos poços. As microplacas foram incubadas sob agitação orbital ($150\text{ rpm}/28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$) durante todo o ensaio e removidas para leitura nos tempos de 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 1200 e 1440 minutos. As absorbâncias foram lidas em leitor de microplacas Synergy™ H1 da BioTek Hybrid Technology usando um comprimento de onda de 600 nm.

5.2.8 Ensaio de permeabilização de membrana

A cultura padronizada de Xmel foi tratada por 30, 60, 120 e 180 min com os OECGs e seus majoritários nas concentrações correspondentes a $1\times$, $1/2\times$ e $1/4\times$ da CIM. Assim como para os OECGs e seus compostos majoritários, também foi verificado o potencial de permeabilização de membranas para sulfato de cobre, sulfato de estreptomicina e casugamicina em concentrações correspondentes a $1\times$, $1/2\times$ e $1/4\times$ da CIM. Após a exposição, a suspensão celular foi centrifugada ($14.000\text{ g}/25\text{ }^{\circ}\text{C}/5\text{ min}$) e, posteriormente, o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas e ressuspensas em PBS (Tampão fosfato-salino). Como controle negativo, foram utilizadas células não tratadas e, como controle positivo, células expostas ao banho-maria por 5 min a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ambas as células, tratadas e não tratadas, foram coradas com iodeto de propídio (IP) (3 mM) a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min no escuro. Em seguida, foi medida a fluorescência através do leitor de microplacas Synergy™ H1 (BioTek Hybrid Technology) usando um filtro de excitação de 493/20 nm e um filtro de emissão de 632 nm/40 nm.

5.2.9 Atividade antibiofilme

A porcentagem de inibição do biofilme de Xmel foi quantificada utilizando o cristal violeta. Para isso, 100 μL da cultura padrão foram adicionados a placas de microdiluição juntamente com 100 μL da solução dos OEs ou seus compostos majoritários. A solução foi composta por OE/majoritário, 1% DMSO e meio de cultura YM, em concentrações correspondentes a $1\times$, $1/2\times$ e $1/4\times$ da CIM. Assim como para os OEs e seus compostos majoritários, também foi determinada a ação antibiofilme de Xmel em concentrações correspondentes a $1\times$, $1/2\times$ e $1/4\times$ da CIM para sulfato de cobre, casugamicina e sulfato de estreptomicina (controle positivo).

Em seguida, as microplacas foram incubadas sem agitação orbital a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante 24 horas. Após a incubação, as microplacas foram centrifugadas ($2250\text{ g}/10\text{ min}/25\text{ }^{\circ}\text{C}$) 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. As microplacas foram secas ao ar em câmara de fluxo laminar por 5 minutos. Após esse período, o biofilme aderido aos poços foi corado com 200 μL de cristal violeta (0,01%) por 15 minutos em temperatura ambiente. Os poços foram gentilmente lavados com água destilada e autoclavada para remoção das células não aderidas. Então foram adicionados 300 μL de DMSO aos poços para a solubilização do corante aderido às células do biofilme, e logo após as microplacas foram incubadas em shaker sob agitação orbital por 5 minutos 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 BioTek Hybrid Technology usando um comprimento de onda de 562 nm. O controle negativo consistiu em meio de cultura YM com adição de DMSO (1%) aos poços. A inibição da formação do biofilme foi calculada com a seguinte fórmula: inibição (%) = $((\text{Controle negativo} - \text{Células tratadas}) / (\text{Controle negativo})) \times 100$.

5.2.10 Microscopia eletrônica de varredura

O fitopatígeno foi crescido em overnight e, posteriormente, a suspensão bacteriana foi padronizada. Aliquotas de 1000 μ L da cultura foram colocadas em placas de cultivo com 24 poços juntamente com 1000 μ L da solução do OE de CGR-106. A solução de CGR-106 foi composta por OE, 1% DMSO e meio de cultura YM, em concentrações correspondentes a 1 $\times$, 1/2 $\times$ e 1/4 $\times$ da CIM. Para o controle negativo, foi adicionado meio de cultura YM com adição de DMSO (1%) em conjunto com o fitopatígeno. Ao fundo de cada poço foi adicionada uma lamínula de vidro estéril para a fixação do biofilme bacteriano. Logo após, as placas de cultivo foram incubadas sem agitação em estufa bacteriológica a 28 ± 2 °C por 24 h. Após o período de incubação, as suspensões bacterianas foram removidas e os poços gentilmente lavados com PBS para a remoção das células bacterianas não aderidas ao biofilme formado na lamínula. As células do biofilme foram fixadas com glutaraldeído (4%), paraformaldeído (2%) e PBS na proporção (1:1:2) durante o período de 1 hora. A lamínula passou por uma nova lavagem em PBS e as células aderidas foram desidratadas através de uma série gradual de concentrações de etanol (50, 60, 70, 80, 90, 95 e 100%) a 4 °C por 10 min. Em seguida, as lamínulas foram incubadas em mistura de etanol e hexamethyldisilazane (HMDS) na proporção (1:1) por 10 min, e incubadas em overnight com HMDS em câmara de exaustão até a volatilização completa do composto.

Após esse processo, as lamínulas foram metalizadas com um filme de ouro de 15 nm através de revestimento por aspersão automática por 60 segundos. Metalizadas, as lamínulas foram observadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL (JEOL 5700).

5.2.11 Análise dos dados

Os ensaios para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM), bem como os testes de cinética de morte, permeabilidade de membrana e atividade antibiofilme, foram realizados em triplicata e repetidos em dias independentes. Os dados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EP) e analisados com o software GraphPad Prism (versão 8.0.1, CA, San Diego, EUA, 2018).

Os compostos relacionados à atividade bacteriostática foram identificados usando o método de análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA). O método foi utilizado para associar a porcentagem de ocorrência dos compostos presentes nos OECGs com a concentração inibitória mínima (CIM) observada. O método PLS-DA foi construído usando dois componentes que explicaram pelo menos 99% da variância do modelo. A análise foi realizada na plataforma Metaboanalyst (Chong et al. 2019).

A análise de componentes principais (ACP) foi realizada no pacote stats (R Core Team, 2022), com os dados dos compostos presentes nos OECGs e as variáveis CIM, permeabilidade de membrana e inibição de biofilme.

5.3. Resultados e discussões

5.3.1 Triagem *in vitro* da atividade antimicrobiana dos OECGs

A porcentagem de inibição dos OECGs sobre Xmel é apresentada na Figura 1. Todos os OECGs testados demonstraram inibição bacteriana superior a 50%, com valores médios variando de 57,23% (CGR-313) a 100% (CGR-104, CGR-106, CGR-107, CGR-108, CGR-210, CGR-212, CGR-220, CGR-302, CGR-304, CGR-306, CGR-307, CGR-308 e CGR-311).

NI: Composto não identificado, IRRC: Índice de Retenção Relativa calculado, IRL: Índice de Retenção Relativa literatura (Adams, 2017).

Pesquisas anteriores descreveram a diversidade química de *C. grewioides* Baill. Oliveira et al. (2021), ao estudarem um grupo de quatro acessos, verificaram que os compostos mais abundantes detectados nos OECGs foram: (*Z*)-isoosmorhizol, (*E*)-isoosmorhizol, metil chavicol, eugenol e metil eugenol, enquanto os compostos (*E*)-metil isoeugenol, (*Z*)-metil isoeugenol, α -santaleno, óxido de cariofileno, (*Z*)-anetol, δ -elemeno, germacreno D, (2E, 6E)-farnesoato de metila, α -humuleno, xantoxilina e linalol foram detectados em menores proporções. Nos estudos químicos de Lima et al. (2020), os principais componentes identificados no OECG extraído das folhas incluíram (*E*)-anetol e metil chavicol.

A variação na composição química dos OEs está, principalmente, relacionada a fatores genéticos da planta, embora aspectos ambientais e de manejo, como sazonalidade, fertilidade do solo, presença de pragas ou plantas daninhas, época de colheita e partes da planta, podem influenciar a produção de metabólitos secundários, resultando em diferentes concentrações desses compostos (Gonçalves et al. 2023). A interação desses fatores contribui para as variações na composição química dos OEs, o que pode explicar os diferentes perfis químicos de *C. grewioides* Baill encontrados em nosso estudo.

5.3.3 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

Para determinação da CIM e CBM foram selecionados oito acessos baseados nas diferenças observadas entre os perfis químicos dos OEs. Os valores de CIM e CBM dos OEs de diferentes acessos de *C. grewioides*, seus principais compostos, além do sulfato de cobre, sulfato de estreptomicina e casugamicina, sobre o crescimento *in vitro* de Xmel estão apresentados na Tabela 3.

O OE dos acessos CGR-106, CGR-107, CGR-220 e a combinação dos compostos eugenol + metil chavicol apresentaram CIM de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Para o eugenol e os acessos CGR-108, CGR-125 e CGR-210, a CIM foi de 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os valores de CIM para o OE dos acessos CGR-204, CGR-312 e as combinações dos compostos eugenol + metil eugenol e metil eugenol + metil chavicol, bem como para o metil eugenol foram de 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Em relação ao sulfato de cobre, a CIM foi superior às concentrações testadas neste estudo, indicando baixa eficácia contra Xmel. Para o sulfato de estreptomicina, a CIM foi de 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto para a casugamicina, a CIM foi de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de OECGs e seus principais compostos, juntamente com sulfato de cobre, sulfato de estreptomicina e casugamicina, no crescimento *in vitro* de Xmel.

Tratamento	CIM $\pm$ EP ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CBM $\pm$ EP ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
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
Eugenol	2000 $\pm$ 0,00	>4000 $\pm$ 0,00
Metil eugenol	4000 $\pm$ 0,00	>4000 $\pm$ 0,00
Eugenol + metil chavicol	1000 $\pm$ 0,00	>4000 $\pm$ 0,00
Eugenol + metil eugenol	4000 $\pm$ 0,00	>4000 $\pm$ 0,00
Metil eugenol + metil chavicol	4000 $\pm$ 0,00	>4000 $\pm$ 0,00
Casugamicina	200 $\pm$ 0,00	>376 $\pm$ 0,00
Sulfato de cobre	>4000 $\pm$ 0,00	>4000 $\pm$ 0,00
Sulfato de estreptomicina	125 $\pm$ 0,00	1000 $\pm$ 0,00

Os valores correspondem à média $\pm$ erro padrão (EP) de três experimentos independentes.

A CBM para todos os OEs, combinações de compostos e compostos isolados foi superior a $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, indicando que, embora alguns tratamentos inibam o crescimento bacteriano, nenhum apresentou atividade bactericida nas condições testadas. Para sulfato de cobre e casugamicina, a CBM foi superior às testadas no presente estudo, indicando baixa eficácia contra Xmel. Apenas para sulfato de estreptomicina foi possível estimar a CBM ($1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$), inibindo 100% do crescimento bacteriano.

O método PLS-DA foi utilizado para identificar os compostos presentes nos OECSs que podem estar correlacionados com a atividade antibacteriana contra Xmel (Figura 2). Os componentes 1 e 2 explicaram, pelo menos, 99,9% da variância do modelo (Componente 1: 69,4%, Componente 2: 30,5%). O composto mais fortemente correlacionado com a atividade bacteriostática foi o eugenol, evidenciado pelo maior Vipscore (valor do coeficiente: 2,79), assim como pela alta concentração desse composto em OECSs que apresentaram CIM de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O composto metil eugenol esteve mais correlacionado com OECSs em que foi necessário $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para inibir completamente o crescimento bacteriano (valor do coeficiente: 1,09) e o composto metil chavicol apresentou correlação com a classe de OECSs que apresentaram CIM de $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (valor do coeficiente: 1,72).

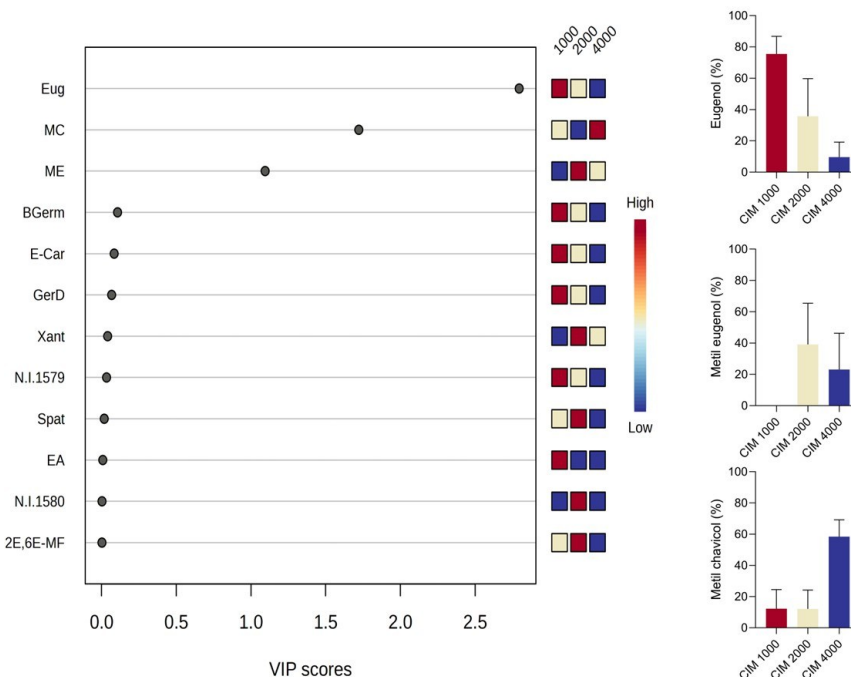


Figura 2. Valores de coeficientes (escores VIP) obtidos através do método PLS-DA para os compostos químicos presentes dos OECSs em relação à CIM contra Xmel. Eug: Eugenol; MC: Metil chavicol; ME: Metil eugenol; BGerm: Bicyclergmacreno; E-Car: (E)-Cariofileno; GerD: Germacreno D; Xant: Xantoxilina; N.i.1579: não identificado; Spat: Espatulenol; EA: Acetato de eugenol; N.i.1580: não identificado; 2E,6E-MF: (2E,6E)-farnesoato de metila.

A atividade inibitória dos OEs pode ser classificada como alta (CIM de 50 a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$), moderada (CIM de 600 a $1500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e baixa (CIM $>1500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Sartoratto et al. 2004). Com base nessa classificação, os OEs CGR-106, CGR-107, CGR-220 e a combinação dos compostos eugenol + metil chavicol apresentaram atividade inibitória classificada como moderada.

Os OEs dos acessos CGR-107 (82,86% de eugenol; 3,4 de (E)-Cariofileno e 6,94% de bicyclergmacreno), CGR-220 (84,92% de eugenol; 2,77% de (E)-Cariofileno e 6,49% de bicyclergmacreno) e CGR-106 (49,95% de eugenol; 36,85% de metil chavicol e 0,64% de

eugenol acetato) foram mais eficazes que o composto eugenol testado isoladamente. Esse fenômeno pode ser atribuído à presença de compostos minoritários, como (E)-Cariofileno, biciclogermacreno, germacreno D e eugenol acetato, que, ao interagirem entre si ou com os demais compostos, podem ter potencializado a resposta observada.

A menor eficácia antimicrobiana foi observada para os OEs dos acessos CGR-204, CGR-312, as combinações eugenol + metil eugenol e metil eugenol + metil chavicol e metil eugenol testado isoladamente. Essa resposta pode estar relacionada à ausência do grupo hidroxila (-OH) em alguns compostos, como o metil eugenol. Compostos que apresentam em sua estrutura química grupos OH, como é o caso do eugenol, apresentam maior potencial antimicrobiano, pois a hidroxila favorece interações mais efetivas com a membrana bacteriana. Estudando outros compostos encontrados em OEs, Burt (2004) observou que a presença de hidroxilas pode ter um papel fundamental na atividade biológica.

Nesse estudo observamos que a presença de metil eugenol em combinação com outros compostos pode ter resultado em um efeito antagônico. Em alguns casos, os compostos podem competir pelo mesmo sítio de ação em células bacterianas, o que pode diminuir a intensidade da resposta. Dessa forma, nota-se que a interação entre os constituintes é um fator determinante para o potencial antimicrobiano das moléculas (Vaou et al. 2022).

5.3.4 Cinética de morte

A cinética de morte das células bacterianas de Xmel na presença dos compostos antibacterianos revelou diferenças no perfil de inibição ao longo do tempo, variando conforme a concentração dos compostos testados (Figura 3). Para as concentrações de 1x CIM e 1/2x CIM, foi observada uma redução dos valores de densidade óptica a partir de 120 min, fenômeno que pode ser observado, principalmente, quando Xmel foi exposta aos OEs do acesso CGR-107 (Figura 3G), CGR-108 (Figura 3H), CGR-220 (Figura 3D) e a combinação dos compostos eugenol + metil chavicol (Figura 3L). A ação dos compostos, exceto sulfato de cobre em que as células apresentaram estabilidade de crescimento (Figura 3M), segue um padrão de decréscimo progressivo da população bacteriana para as maiores concentrações, isso indica uma relação direta entre o tempo de exposição e a redução do crescimento bacteriano.

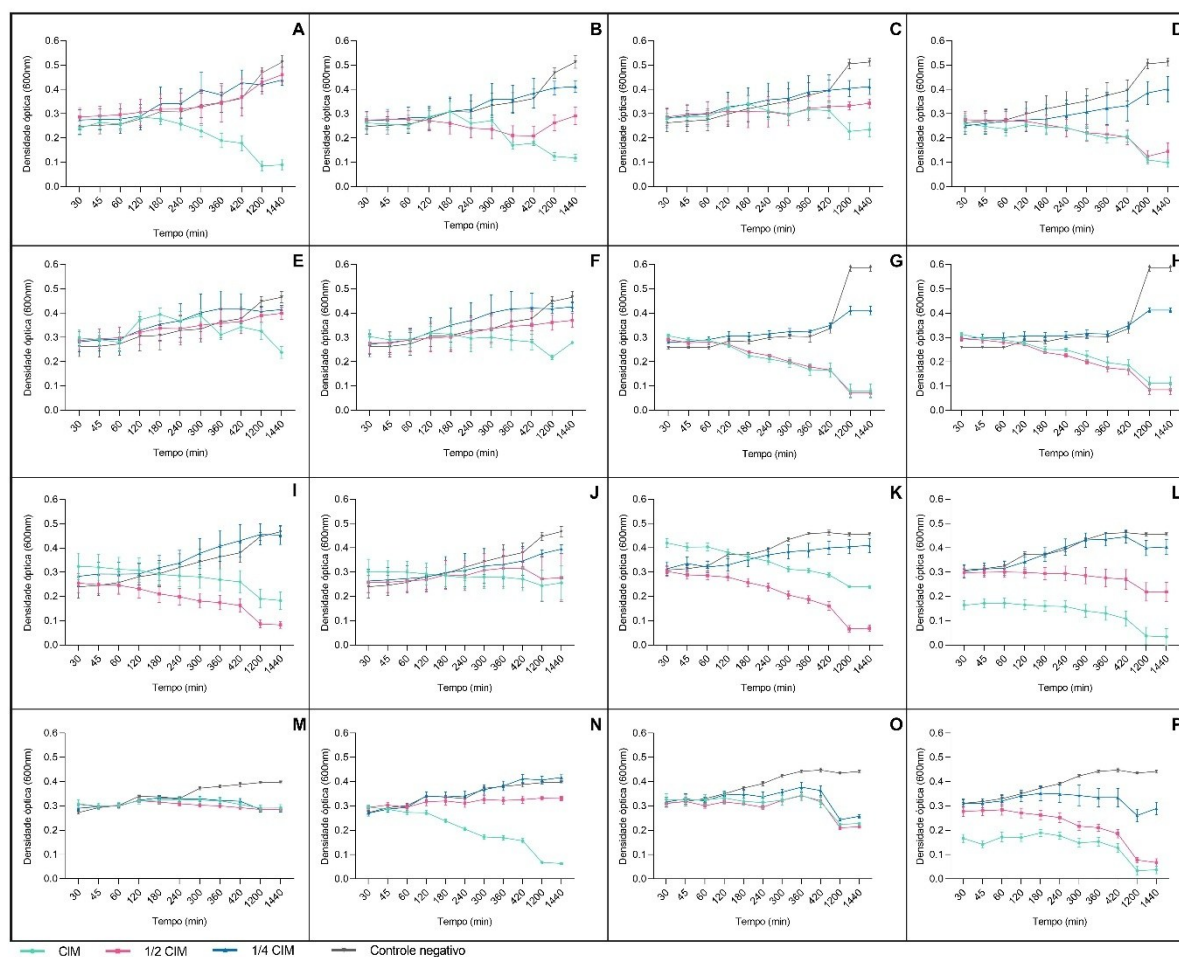


Figura 3. Cinética de morte de Xmel tratada com OECGs e seus principais compostos, juntamente com sulfato de cobre, sulfato de estreptomicina e casugamicina. CGR-106 (A), CGR-125 (B), CGR-210 (C), CGR-220 (D), CGR-204 (E), CGR-312 (F), CGR-107 (G), CGR-108 (H), Eugenol (I), Metil eugenol (J), Eugenol + Metil eugenol (K), Eugenol + Metil chavicol (L), Sulfato de cobre (M), Casugamicina (N), Sulfato de estreptomicina (O), Metil eugenol + metil chavicol (P).

5.3.5 Permeabilidade de membrana

Para avaliar a integridade da membrana celular, utilizou-se o IP, um corante fluorescente impermeável a células viáveis, mas que penetra facilmente em células com membranas comprometidas.

Conforme ilustrado na Figura 4, células de Xmel tratadas por 30, 60, 120 e 180 minutos com OEs de diferentes acessos de *C. grewoides*, seus compostos majoritários, além de sulfato de cobre, sulfato de estreptomicina e casugamicina, apresentaram variações na permeabilização da membrana celular, dependendo da concentração e do tempo de exposição. Concentrações mais elevadas resultaram em maior permeabilização, enquanto concentrações menores mantiveram o efeito, porém com menor intensidade. O tempo de exposição também influenciou a permeabilização, aumentando a taxa conforme o tratamento se prolongava.

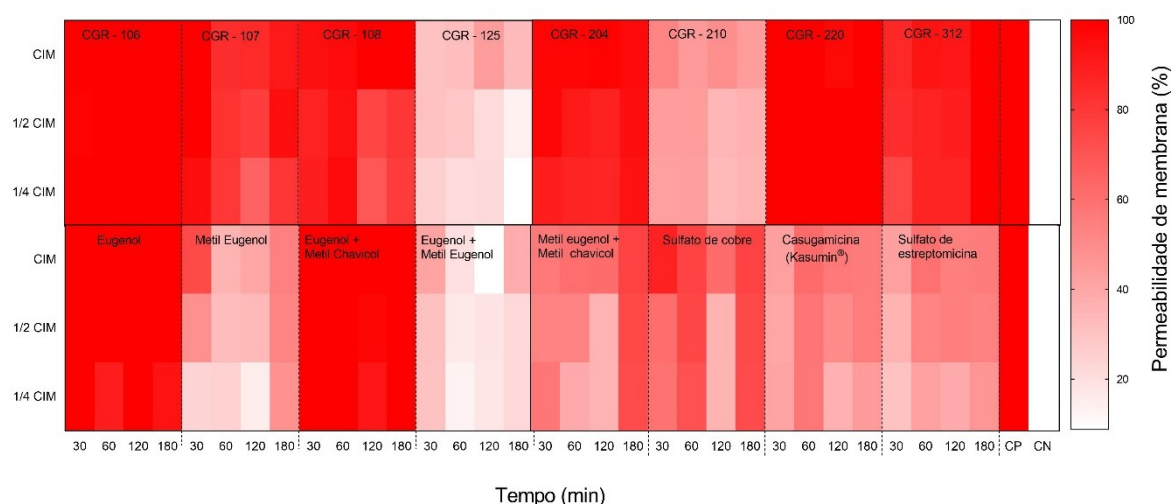


Figura 4. Permeabilidade da membrana celular de Xmel após exposição aos OECGs e seus principais compostos, juntamente com sulfato de cobre, sulfato de estreptomicina e casugamicina.

Os OEs dos acessos CGR-106 e CGR-220, o eugenol isolado e a combinação eugenol + metil chavicol demonstraram uma maior permeabilização celular, atingindo aproximadamente 100% em todas as concentrações testadas. O OE de CGR-106 promoveu 100% de permeabilização nas concentrações de $1\times$ e $1/4\times$ CIM em todos os tempos, enquanto a concentração de $1/2\times$ CIM atingiu 99,2% em 30 minutos e 100% nos tempos subsequentes. De forma semelhante, o OE de CGR-220 resultou em permeabilização total em todas as concentrações e tempos, exceto na concentração de $1\times$ CIM em 30 minutos, onde a taxa foi de 97,08%. O eugenol isolado também promoveu 100% de permeabilização nas concentrações de $1\times$ e $1/2\times$ CIM, independentemente do tempo de exposição. Já a combinação eugenol + metil chavicol promoveu 100% de permeabilização na concentração de $1\times$ CIM e com valores superiores a 95,38% nas demais concentrações.

Outros OEs, incluindo CGR-107, CGR-108, CGR-312 e CGR-204, também apresentaram alta taxa de permeabilização, variando entre 73,56% e 100% em todas as condições testadas.

O metil eugenol isolado teve taxas de permeabilização entre 50,06% e 84,23%, dependendo da concentração e do tempo de exposição. A combinação eugenol + metil eugenol apresentou permeabilização entre 46,15% e 65,54%, nas concentrações de $1\times$ e $1/2\times$ da CIM, sugerindo que a associação pode reduzir a eficácia do eugenol isolado. De forma semelhante, os OEs dos acessos CGR-125 e CGR-210, assim como a combinação metil eugenol + metil chavicol, exibiram taxas entre 31,76% e 65,82% em todas as concentrações e tempos avaliados.

Os antibióticos casugamicina e sulfato de estreptomicina, assim como o sulfato de cobre, demonstraram menor capacidade de permeabilização em comparação a alguns OEs. As células tratadas com casugamicina e sulfato de estreptomicina apresentaram taxas de 42,53% a 61,78% na concentração de $1\times$ CIM, 35,76% a 58,37% na concentração de $1/2\times$ CIM e 30,32% a 57,52% na concentração de $1/4\times$ CIM. Já o sulfato de cobre apresentou valores entre 35,47% e 87,48%, dependendo da concentração e do tempo de exposição. Esses resultados indicam que, embora os antibióticos não permeabilizem 100% das células de Xmel, essas substâncias foram capazes de reduzir a viabilidade celular, indicando que a morte celular pode estar associada a outros processos.

Nosso estudo confirma que os OEs promoveram danos e alterações estruturais na membrana celular de Xmel, especialmente os acessos CGR-106 e CGR-220, o eugenol isolado e a combinação eugenol + metil chavicol, que atingiram aproximadamente 100% de permeabilização. Esses achados corroboram os resultados do ensaio de cinética de morte, que demonstrou redução nas taxas de crescimento após o tratamento com concentrações de $1\times$ e $1/2\times$ CIM (Figura 3A, 3D, 3I, 3L).

A eficiência dos OEs está diretamente associada à sua capacidade de alterar a membrana celular, promovendo despolarização e aumento da permeabilidade, resultando em ruptura e morte celular (Hou et al. 2022). Essa ação ocorre devido à natureza lipofílica e hidrofóbica desses compostos, facilitando sua interação com a bicamada lipídica bacteriana e induzindo modificações no perfil de ácidos graxos, comprometendo a homeostase celular (Nazzaro et al. 2013).

A membrana bacteriana é fundamental para a manutenção do estado energético, transporte de solutos, regulação metabólica e controle da pressão de turgescência, tornando-se um alvo estratégico no desenvolvimento de novos antimicrobianos (Nazzaro et al. 2013). Assim, os OECS surgem como uma alternativa promissora para o controle de *Xmel*, podendo reduzir os impactos ambientais causados pelo uso indiscriminado de pesticidas sintéticos.

Fungicidas cúpricos e antibióticos registrados para uso agrícola são amplamente utilizados em lavouras, mas nem sempre garantem controle eficaz das bacterioses, devido, em parte, ao surgimento de estirpes resistentes. Estudos anteriores (Quezado-Duval et al. 2003) relataram resistência de fitobactérias do gênero *Xanthomonas* ao sulfato de cobre e à estreptomicina, o que corrobora os achados deste estudo, que demonstram a menor capacidade desses compostos em comprometer a integridade da membrana celular quando comparados a determinados OEs, como o CGR-107 e CGR-108. Uma possível explicação para tal fato é a capacidade dos OEs de atuar em mais de um sítio de ação. Já que os antibióticos convencionais são limitados por seu estreito espectro de atividade, que geralmente visam um único alvo ou via molecular (Visan e Negut, 2024).

5.3.6 Ação antibiofilme de *Xmel*

Em ambientes naturais, a maioria das bactérias sobrevive em comunidades estruturadas, coordenadas e funcionais, envoltas em uma matriz autoproduzida denominada biofilme (Liu et al. 2024). Os biofilmes conferem as bactérias, principalmente, proteção contra agentes antimicrobianos e escassez de nutrientes e água, assim como auxiliam na comunicação célula a célula, desempenhando uma importante função ecológica (Vestby et al. 2020). Apesar da importância da formação de biofilme para a patogenicidade bacteriana, estratégias para o desenvolvimento de uma terapia antibiofilme são pouco investigadas, especialmente no campo da agricultura.

Os resultados revelaram que os OECS, seus principais compostos, além do sulfato de cobre, sulfato de estreptomicina e casugamicina, reduziram a formação de biofilme, conforme demonstrado na Figura 5. Dentre os acessos avaliados, CGR-107 e CGR-220 demonstraram uma maior inibição da formação do biofilme de *Xmel*. Na concentração 1x CIM, inibiram a formação do biofilme em 87,34% e 85,32%. Com 1/2x CIM, a inibição foi de 63,34% para CGR-107 e 80,49% para CGR-220, e com 1/4x CIM a inibição foi de 50,62% (CGR-107) e 74,8% (CGR-220).

Os OEs dos acessos CGR-106, CGR-108, CGR-125, CGR-204, CGR-210 e CGR-312 também inibiram a formação do biofilme, variando entre 4,15% e 68,61% nas concentrações testadas. Com 1x CIM, as inibições foram de 63,21%, 56,24%, 65,06%, 68,61%, 51,79% e 46,91%, respectivamente. Para 1/2x CIM, os valores foram 57,55% (CGR-106), 34,04% (CGR-108), 52,08% (CGR-125), 67,55% (CGR-204), 55,28% (CGR-210) e 25,02% (CGR-312). Já com 1/4x CIM, o OE do acesso CGR-312 apresentou menor eficácia, inibindo apenas 4,15% da formação do biofilme de *Xmel*, seguido por CGR-106 (27,50%) e CGR-204 (29,10%).

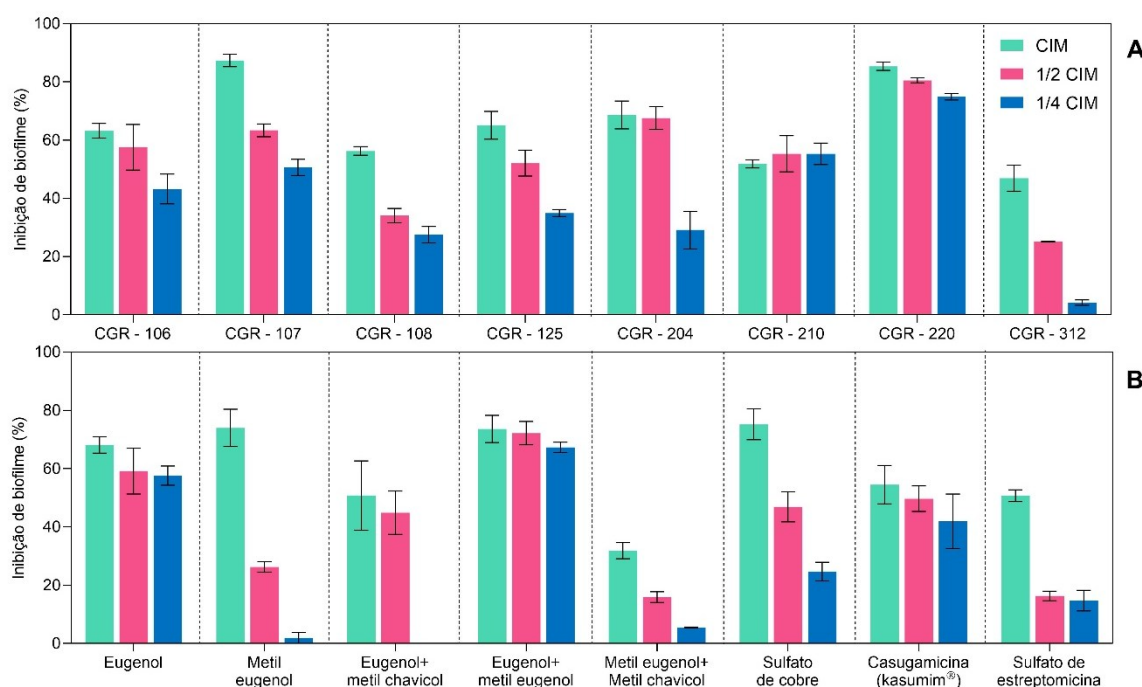


Figura 5. Atividade antibiofilme de OECEs e seus principais compostos, juntamente com sulfato de cobre, sulfato de estreptomicina e casugamicina.

O composto eugenol, isoladamente, demonstrou uma inibição de 68,06% com 1x CIM, 59,15% em 1/2x CIM e 57,59% em 1/4x CIM. Em contrapartida, a combinação de eugenol + metil eugenol resultou em um aumento da inibição quando comparado ao eugenol, atingindo 73,61% na 1x CIM, 72,16% na 1/2x CIM e 67,32% em 1/4x CIM, sugerindo uma ação sinérgica entre esses compostos.

O metil eugenol isolado inibiu 73,98% da formação de biofilme em 1x CIM, mas sua eficácia foi reduzida para 26,25% com 1/2x CIM e apenas 1,89% em 1/4x CIM, evidenciando uma perda significativa da atividade e indicando um efeito dose-dependente. De forma similar, a mistura de eugenol + metil chavicol apresenta uma inibição de 50,76% para 1x CIM e 44,83% em 1/2x CIM, mas perde completamente sua atividade em 1/4x CIM (0,00%). Já a mistura metil eugenol + metil chavicol inibiu a formação do biofilme em 31,83% na 1x CIM, 15,92% na 1/2x CIM e 5,49% na 1/4x CIM, indicando uma baixa eficácia dessa associação na inibição da formação do biofilme de Xmel, quando comparado às demais combinações.

As substâncias com ação antimicrobiana comprovada também apresentaram ação antibiofilme. O sulfato de cobre inibiu 75,17% da formação do biofilme em 1x CIM, seguido por 46,85% em 1/2x CIM e 24,64% em 1/4x CIM. A casugamicina inibiu a formação do biofilme em 54,49% (1x CIM), 49,66% (1/2x CIM) e 41,91% (1/4x CIM). O sulfato de estreptomicina inibiu a formação do biofilme de Xmel em 50,70% na 1x CIM, 16,30% na 1/2x CIM e 14,70% em 1/4x CIM.

Foi estabelecido que, para induzir a redução ou erradicação dos biofilmes, os compostos antimicrobianos devem penetrar nas camadas profundas da estrutura do biofilme, danificar a matriz de exopolissacarídeos e romper a membrana citoplasmática ou atuar por outros mecanismos de ação (Bernal-Mercado et al. 2022). Os resultados deste estudo corroboram com essa premissa, demonstrando que os OEs dos acessos CGR-106, CGR-107 e CGR-220 degradam inicialmente o biofilme de Xmel e, em seguida, alteram a permeabilidade da membrana celular, atingindo aproximadamente 100% de permeabilização em todas as condições testadas para CGR-106 e CGR-220, e acima de 70% para CGR-107 (Figura 4). Essa condição também foi confirmada a partir da ACP, onde foi verificada uma forte correlação entre as variáveis biofilme e permeabilidade de membrana, assim como para os acessos supracitados (Figura 6).

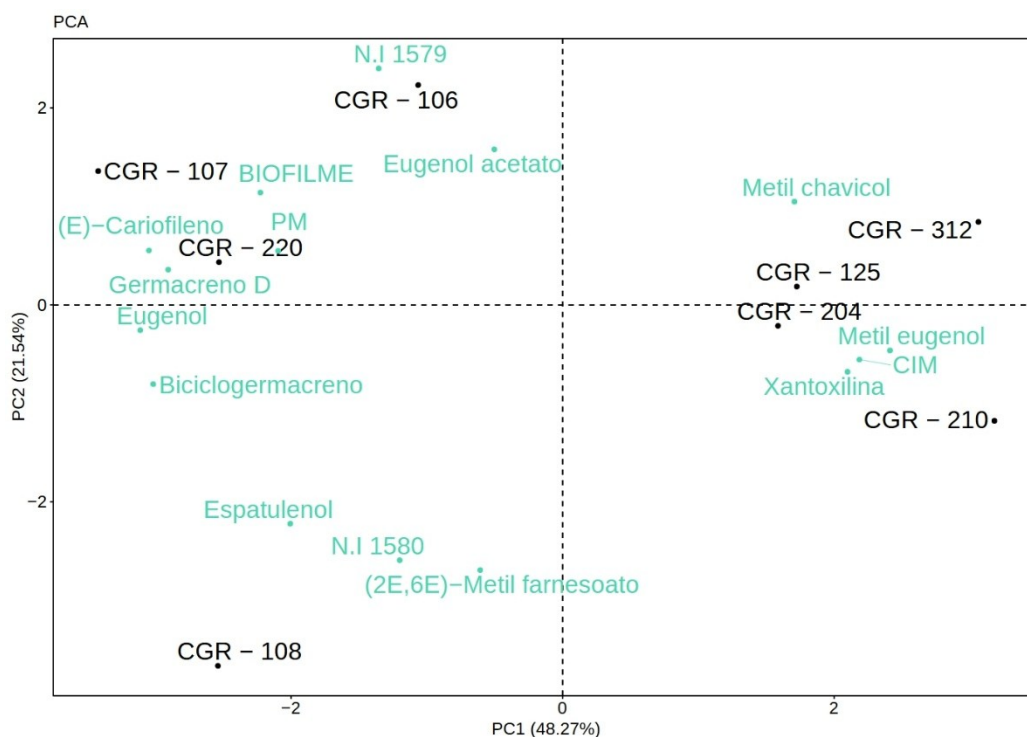


Figura 6. Análise de componentes principais de OECGs em relação à inibição do biofilme e permeabilidade de membrana de Xmel com MIC.

A formação de biofilme tem sido correlacionada com a virulência de muitas bactérias patogênicas de plantas, como XOO e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Singh et al. 2017; Gottig et al. 2009). Singh et al. (2017) investigaram o potencial do OE de tomilho e seu componente ativo, o timol, como agentes antivirulência contra XOO, responsável pela queima bacteriana do arroz. Os pesquisadores descobriram que o OE de tomilho inibe a formação de biofilme e reduz a produção de fatores de virulência, diminuindo significativamente a natação, o enxameamento, a produção de enzimas hidrolíticas, exopolissacarídeos e secreção de xantomonadina, sem afetar o crescimento bacteriano.

Como foi possível observar para alguns OECGs, como o OE do acesso CGR-220, que em 1/4x CIM não foi capaz de suprimir o crescimento de Xmel (Figura 3D), embora tenha reduzido a formação do biofilme em 74,86%, o que poderia ser usado como estratégia para amenizar a patogenicidade de Xmel. Resultado semelhante foi observado em outros OECGs, como CGR-107 (Figura 3G) e CGR-210 (Figura 3C), bem como na combinação dos compostos eugenol + metil eugenol (Figura 3K) e o eugenol isoladamente (Figura 3I), os quais reduziram a formação de biofilme variando de 50,62% a 67,31%, evidenciando o potencial dos recursos genéticos de *C. grewoides* Baill. para formulações de produtos mais sustentáveis e eficazes no manejo da resistência de patógenos de plantas.

5.3.7 Microscopia eletrônica de varredura

As imagens analisadas por MEV evidenciam as alterações no aspecto das colônias provocadas pelos tratamentos avaliados (Figura 7). Nas imagens, é clara a presença de uma matriz em volta das células não tratadas (Figura 7A, 7B e 7C). Além disso, as células apresentam estruturas intactas, com superfícies regulares e lisas em formato de bastonete. No entanto, após a exposição ao OE do acesso CGR-106, na concentração 1/4x CIM, houve uma redução da matriz de exopolissacarídeos, assim como uma redução do número de células bacterianas, contudo não foram observadas alterações morfológicas nelas. Esse comportamento confirma o resultado obtido no ensaio antibiofilme, onde o CGR-106, na concentração 1/4x CIM inibiu a formação do biofilme em 43,19% (Figura 5A). As células bacterianas tratadas

com OE do acesso CGR-106, na concentração 1x CIM e 1/2x CIM apresentaram alterações morfológicas em comparação com as células não tratadas. As células bacterianas foram deformadas, encolhidas e enrugadas, também não foi notada a presença da matriz de exopolissacarídeos. Esses resultados condizem com os ensaios anteriores, onde foi verificada inibição do crescimento (Figura 3), danos a membrana (Figura 4) e redução do biofilme (Figura 5).

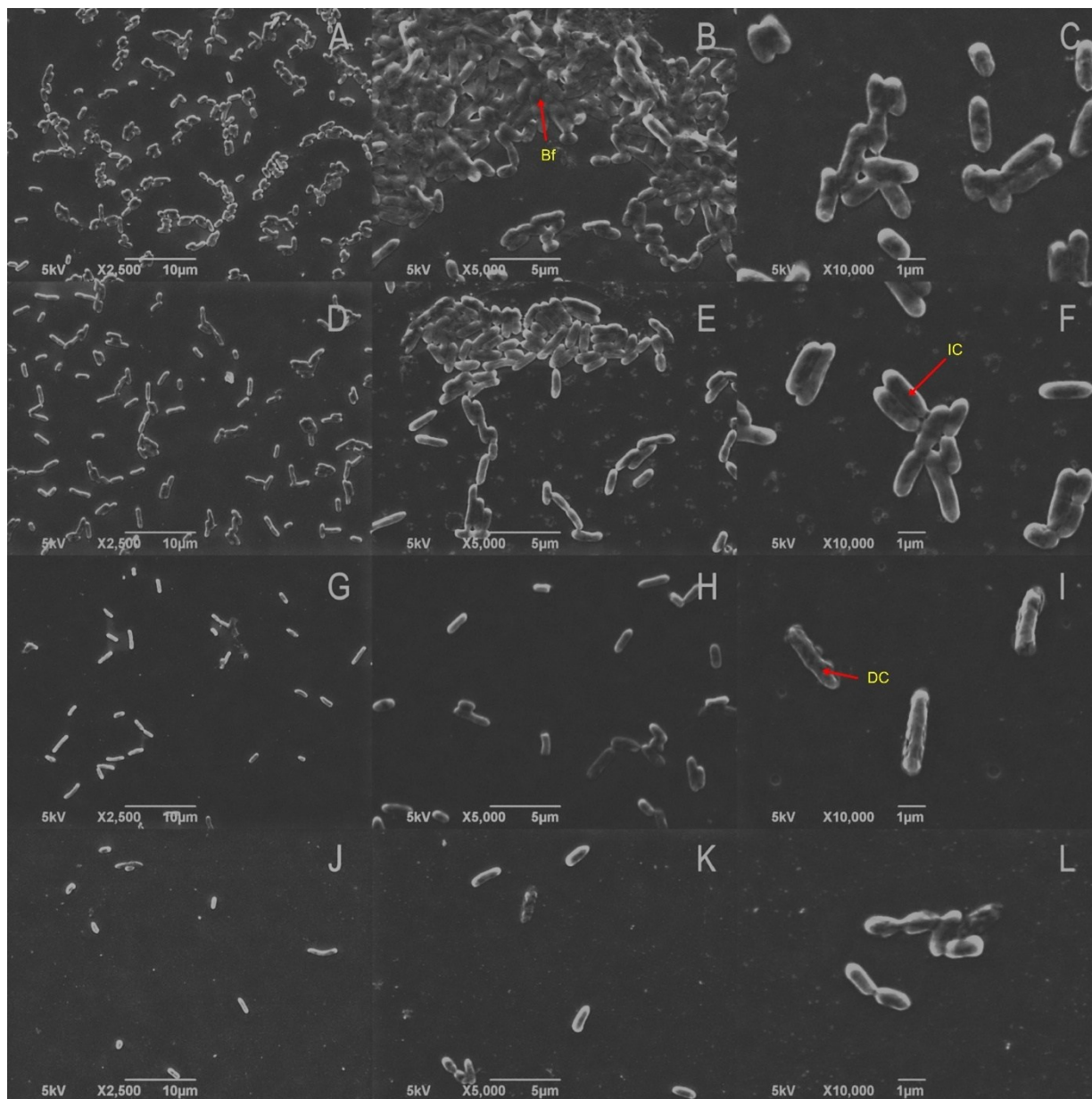


Figura 7. Imagens de microscopia eletrônica de varredura de Xmel tratada ou não com CGR-106. Sem tratamento (A, B, C), 1/4x CIM (D, E, F), 1/2x CIM (G, H, I), 1x CIM (J, K, L). Biofilme formado (BF), células intactas (IC), células deformadas (DC).

5.4. Conclusões

Os OE CGs apresentam atividade antimicrobiana e antibiofilme contra Xmel, com destaque para os acessos CGR-106, CGR-107 e CGR-220, que demonstraram CIM de 1000 µg.mL⁻¹. Esses mesmos acessos também promoveram alterações na permeabilidade da membrana celular e inibiram mais de 85% da formação de biofilme na concentração correspondente à CIM, sugerindo atuação por múltiplos mecanismos. Tais resultados

evidenciam o potencial dos OECGs para o desenvolvimento de biopesticidas vegetais como alternativa sustentável ao controle químico da barriga-d'água do melão.

5.5. Referências Bibliográficas

Adams, R.P., 2017. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, fifth edition, Carol Stream, Illinois.

An, S.Q., Potnis, N., Dow, M., Vorhölter, F.J., HE, Y.Q., Becker, A., Tang, J.L., 2020. Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. FEMS Microbiol. Rev. 44(1), 1-32. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz02>

Berian, L.O.S., Occhiena, E.M., 2018. Doenças bacterianas. In: Brandão Filho, J.U.T., Freitas, P.S.L., Berian, L.O.S., Goto, R. Hortaliças-fruto [online]. Maringá: EDUEM, pp. 209-240. ISBN: 978-65-86383-01-0. <https://doi.org/10.7476/9786586383010.0008>

Bernal-Mercado, A.T., Juarez, J., Valdez, M.A., Ayala-Zavala, J.F., Del-Toro-Sánchez, C.L., Encinas-Basurto, D., 2022. Hydrophobic chitosan nanoparticles loaded with carvacrol against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Molecules. 27(3), 699. [10.3390/molecules27030699](https://doi.org/10.3390/molecules27030699)

Borges, S., Alkassab, A.T., Collison, E., Hinarejos, S., Jones, B., McVey, E., 2021. Overview of the testing and assessment of effects of microbial pesticides on bees: strengths, challenges and perspectives. Apidologie. 52, 1256–1277. <https://doi.org/10.1007/s13592-021-00900-7>

Brasil., 2025. Ministério do Desenvolvimento, Indústria, Comércio e Serviços. Comex Stat: estatísticas de comércio exterior. <https://www.gov.br/siscomex/pt-br/servicos/aprendendo-a-exportar/onde-buscar-apoio-ou-informacoes-1/comex-stat>. (Acesso 19 Fevereiro 2025).

Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. Int. J. Food Microbiol. 94(3), 223-253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>

Chong, J., Wishart, D.S., Xia, J., 2019. Using MetaboAnalyst 4.0 for comprehensive and integrative metabolomics data analysis. Curr. Protoc. Bioinformatics. 68(1), e86. <https://doi.org/10.1002/cpbi.86>

Gonçalves, S., Mansinhos, I., Romano, A., 2023. Influence of biotic and abiotic factors on the production and composition of essential oils. Essential oils: extraction methods and applications. 69-97. <https://doi.org/10.1002/9781119829614.ch4>

Gottig, N., Garavaglia, B.S., Garofalo, C.G., Orellano, E.G., Ottado, J., 2009. A filamentous hemagglutinin-like protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the phytopathogen responsible for citrus canker, is involved in bacterial virulence. PLoS One. 4, e4358. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004358>

GraphPad Software., 2018. GraphPad Prism version 8.0.0 for Windows. GraphPad Software, San Diego, California, USA. Retrieved from <https://www.graphpad.com>

Hou, T., Sana, S.S., Li, H., Xing, Y., Nanda, A., Netala, V.R., Zhang, Z., 2022. Essential oils and its antibacterial, antifungal and anti-oxidant activity applications: A review. Food Biosci. 47, 101716. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101716>

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção de melão. 2025. Disponível em: < [Produção de Melão no Brasil | IBGE](#) >. (Acesso 19 Fevereiro 2025).

Jacques, M.A., Arlat, M., Boulanger, A., Boureau, T., Carrère, S., Cesbron, S., Vernière, C., 2016. Using ecology, physiology, and genomics to understand host specificity in *Xanthomonas*. *Annua Rev Phytopathol.* 54, 163-187. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100147>

Jibirin, M.O., Liu, Q., Garrett, T.J., Jones, J.B., Zhang, S., 2022. Potential and Metabolic Pathways of Eugenol in the Management of *Xanthomonas perforans*, a Pathogen of Bacterial Spot of Tomato. *Int. J. Mol. Sci.* 23(23), 14648. <https://doi.org/10.3390/ijms232314648>

Kolozsváriné Nagy, J., Móricz, Á. M., Böszörményi, A., Ambrus, Á., Schwarczinger, I., 2023. Antibacterial effect of essential oils and their components against *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* revealed by microdilution and direct bioautographic assays. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 13, 1204027. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1204027>

Lima, C.C., de Holanda-Angelin-Alves, C.M., Pereira-Gonçalves, Á., Kennedy-Feitosa, E., Evangelista-Costa, E., Bezerra, M.A.C., Leal-Cardoso, J.H., 2020. Antispasmodic effects of the essential oil of *Croton zehnteneri*, anethole, and estragole, on tracheal smooth muscle. *Heliyon.* 6(11). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05445>

Liu, H.Y., Prentice, E.L., Webber, M.A., 2024. Mechanisms of antimicrobial resistance in biofilms. *npj Antimicrob Resist.* 2(1), 27. <https://doi.org/10.1038/s44259-024-00046-3>

Liu, X., Cao, A., Yan, D., Ouyang, C., Wang, Q., Li, Y., 2021. Overview of mechanisms and uses of biopesticides. *Int. J. Pest Manag.* 67(1), 65-72. <https://doi.org/10.1080/09670874.2019.1664789>

Marin, V.R., Ferrarezi, J.H., Vieira, G., Sass, D.C., 2019. Recent advances in the biocontrol of *Xanthomonas* spp. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 35(5), 1-11. 10.1007/s11274-019-2646-5

Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., De Feo, V., 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals.* 6(12), 1451-1474. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>

Oliveira, S.D.D.S., De Oliveira E Silva, A.M., Blank, A.F., Nogueira, P.C.D.L., Nizio, D.A.D.C., Almeida-Pereira, C.S. Arrigoni-Blank, M.D.F., 2021. Radical scavenging activity of the essential oils from *Croton grewoides* Baill accessions and the major compounds eugenol, methyl eugenol and methyl chavicol. *J. Essent.Oil Res.* 33(1), 94-103. <https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1779139>

Quezado-Duval, A.M., Gazzoto Filho, A., Leite Júnior, R.P., Camargo, L.E.A., 2003. Sensitivity to copper, streptomycin and oxytetracycline in *Xanthomonas* spp. associated with bacterial spot in tomatoes for industrial processing. *Hortic. Bras.* 21, 670-675. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362003000400020>

R Core Team, 2022. R: A language and environment for statistical computing. R. Foundation for Statistical Computing, v4.4.1. Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.

Rodrigues, T.C., Gois, I.B., Fernandes, R.P.M., Blank, A.F., Sandes, R.D.D., Neta M.T.S.L., Arrigoni-Blank, M.F., 2023. Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils from *Croton grewoides* Baill. accessions on the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Pestic. Biochem. and Physiol. 193, 105454. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2023.105454>

Rodrigues, S.V., Silva, A.V., Medrado, C.L., Quintanilha, K.C.S., Neto, O.C., 2024. Impactos do uso de agrotóxicos na saúde humana e ambiental. Multidiscip. J. Northeast Minas Gerais. 9(1).

Ryan, R.P., Vorhölter, F.J., Potnis, N., Jones, J.B., Van Sluys, M.A., Bogdanove, A.J., Dow, J.M., 2011. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium–plant interactions. Nat. Rev. Microbio. 9(5), 344-355. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2558>

Sartoratto, A., Machado, A.L.M., Delarmelina, C., Figueira, G.M., Duarte, M.C.T., Rehder, V.L.G., 2004. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. Braz. J. Microbiol. 35, 275-280. [10.1590/S1517-83822004000300001](https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000300001)

SiBBR, 2025. Brazilian biodiversity information system: *Croton grewoides* Baill. <https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/289263#names> (Acesso 19 Fevereiro 2025).

Silva, R.S., de Oliveira, M.M.G., de Melo, J.O., Blank, A.F., Corrêa, C.B., Scher, R., Fernandes, R.P.M., 2019. Antimicrobial activity of *Lippia gracilis* essential oils on the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and their effect on membrane integrity. Pestic. Biochem. Physiol. 160, 40-48. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.06.014>

Silva, R.S., De Oliveira, M.M.G., Silva, K.P., Da Silva Vasconcelos Rodrigues, I., Dos Santos Pinto, V., Blank, A.F., Fernandes, R.P.M., 2020. Synergistic effect of *Cordia curassavica* Jacq. essential oils association against the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Environ. Sci. Pollut. Res. 27, 4376-4389. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06631-8>

Singh, A., Gupta, R., Tandon, S., Pandey, R., 2017. Thyme oil reduces biofilm formation and impairs virulence of *Xanthomonas oryzae*. Front. Microbiol. 8, 1074. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01074>

Stephen J.R., D.B., Jayaraman, J., Ramsubhag, A., 2022. Comparative genomics of the black rot pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and non-pathogenic co-inhabitant *Xanthomonas melonis* from Trinidad reveal unique pathogenicity determinants and secretion system profiles. Peer J. 9, e12632. <https://doi.org/10.7717/peerj.12632>

Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsakris, Z., Rozos, G., Tsigalou, C., Bezirtzoglou, E., 2022. Interactions between medical plant-derived bioactive compounds: focus on antimicrobial combination effects. Antibiotics. 11(8), 1014. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081014>

Vestby, L.K., Grønseth, T., Simm, R., Nesse, L.L., 2020. Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. Antibiotics. 9(2), 59. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020059>

Visan, A.I., Negut, I., 2024. Coatings based on essential oils for combating antibiotic resistance. Antibiotics. 13(7), 625. [10.3390/antibiotics13070625](https://doi.org/10.3390/antibiotics13070625)

Vishakha, K., Das, S., Das, S.K., Banerjee, S., Ganguli, A., 2022. Antibacterial, anti-biofilm, and anti-virulence potential of tea tree oil against leaf blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* instigates disease suppression. Braz. J. Microbiol. 1-14.
<https://doi.org/10.1007/s42770-021-00657-2>

6. ARTIGO 3

ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton grewoides* Baill. REDUZ A FORMAÇÃO DE BIOFILME DIMINUINDO A VIRULÊNCIA DE *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Artigo formatado de acordo com as normas do periódico *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*

RESUMO

Xanthomonas campestris pv. *campestris* (XCC) é um patógeno bacteriano e o agente causal da podridão negra em crucíferas, doença que ocasiona perdas significativas na produtividade de culturas de *Brassica oleracea* L. em diversas regiões do mundo. Neste estudo, os óleos essenciais (OEs) de *Croton grewoides* Baill. foram avaliados quanto à sua capacidade de inibir fatores de virulência do fitopatógeno XCC, com foco na inibição da formação de biofilme, motilidade bacteriana e atividade de enzimas extracelulares. Folhas de 25 acessos de *C. grewoides* foram submetidas à hidrodestilação e os OEs de 5 acessos, selecionados a partir de triagem da ação antibiofilme, foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Eugenol foi identificado como composto majoritário nos acessos CGR-107 (82,86%), CGR-108 (81,67%) e CGR-220 (84,92%), enquanto metil eugenol (70,10%) e metil chavicol (69,17%) predominaram em CGR-311 e CGR-204, respectivamente. A formação de biofilme foi significativamente reduzida, sendo o eugenol o composto com maior correlação com a atividade antibiofilme (VIP = 2,54, PLS-DA). A erradicação de biofilmes pré-formados atingiu 71,47% (CGR-220). A motilidade bacteriana também foi inibida, com o CGR-311 apresentando a menor área de deslocamento (0,35 cm²). As atividades de celulase, endoglucanase e protease foram significativamente reduzidas, com inibições de 75,9% para endoglucanase (CGR-204), 59,0% para celulase (CGR-204) e 64,0% para protease (CGR-107). O acesso CGR-204 não comprometeu a viabilidade celular, sugerindo ação antivirulência sem efeito bactericida. Esses resultados indicam que os OEs de *C. grewoides* são promissores como agentes antivirulência para o controle sustentável de XCC, com potencial para reduzir a dependência de agroquímicos sintéticos.

Palavras-chave: Antibiofilme; Fatores de virulência; Eugenol; Enzimas extracelulares; Podridão negra; Crucífera.

6.1. Introdução

A produção agrícola pode ser severamente comprometida pela incidência de fitopatógenos, como *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (XCC), o agente causal da podridão negra em crucíferas. Esse patógeno penetra no tecido vegetal por meio de ferimentos e hidatódios e se desloca até os vasos do xilema, onde se multiplica ativamente. Como consequência do processo de colonização, é possível observar a formação de lesões amareladas em formato de “V”, que têm início na margem das folhas e progridem para o centro através do tecido vascular, até atingir a nervura central da folha. Com o agravamento da doença pode ocorrer a queda prematura de folhas, murcha e morte das plantas afetadas (Dubrow e Bogdanove, 2021).

XCC é conhecida por produzir exopolissacarídeos (EPS) e enzimas extracelulares, como celulases, endoglucanases, pectinases e proteases, que coletivamente desempenham um papel importante na patogênese (Lo et al., 2020). Os EPS contribuem para a necrose tecidual e a murcha das folhas, obstruindo o fluxo de água nos vasos do xilema. As enzimas extracelulares, por sua vez, degradam os componentes das células vegetais, facilitando a degradação dos tecidos (Mulungu, 2024). Além disso, evidências experimentais indicam que a capacidade das

fitobactérias de formar e dispersar biofilmes pode favorecer sua sobrevivência em superfícies foliares e em tecidos hospedeiros, contribuindo para sua disseminação (Li et al., 2019).

As principais medidas de controle contra a podridão negra em crucíferas ainda são pouco eficientes ou onerosas, sendo as principais estratégias a rotação de culturas, uso de cultivares resistentes, eliminação de restos culturais e o controle químico (Lopes e Albuquerque, 2018). Dado que não há registros de produtos para controle da podridão negra causada por XCC, o desenvolvimento de estratégias inovadoras e econômicas e com menor impacto ambiental se faz necessário. Uma dessas estratégias é o uso de agentes antivirulência ou *antiquorum sensing* que não matam as bactérias, mas restringem a produção de fatores de virulência associados à patogenicidade (Tay e Yew, 2013).

Um exemplo de substância antivirulência são os óleos essenciais (OEs), que são uma mistura de compostos produzidos pelo metabolismo secundário de plantas. Os OEs de *Thymus vulgaris* podem atuar como agente antivirulência contra *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, pois, em concentrações de 500 ppm e 1000 ppm, reduziram significativamente a formação de biofilme, sem afetar a atividade metabólica e a cinética de crescimento bacteriano, além de suprimir a motilidade e reduzir a síntese de EPS e de xantomonadina. Também foi observada uma diminuição significativa na atividade das enzimas hidrolíticas, endoglucanase e xilanase. Esses resultados sugerem que os compostos presentes no OEs de *T. vulgaris* podem ser úteis para o manejo da ferrugem bacteriana no arroz (Singh et al., 2017).

Outras espécies produtoras de OEs podem apresentar propriedades antivirulência contra bactérias que causam danos econômicos a diferentes culturas agrícolas. *Croton grewoides* Baill. é uma espécie da família Euphorbiaceae, nativa do semiárido brasileiro, conhecida popularmente como “alecrim-de-cablocas” e é utilizada na medicina tradicional para tratar infecções e inflamações. Os OEs de suas folhas, obtidos por hidrodestilação, são ricos em compostos fenólicos, como eugenol, metil eugenol e metil chavicol, que os conferem propriedades antimicrobianas (Rodrigues et al., 2023), antioxidantes (Oliveira et al., 2021) e inseticidas (Santos et al., 2023).

Tendo em vista essas descobertas, levantamos a hipótese de que o OE de *C. grewoides* pode atuar como agente antivirulência sem comprometer a viabilidade celular. Para testar a hipótese, a presente investigação foi realizada com o objetivo de identificar a capacidade dos OEs de diferentes acessos de *C. grewoides* em inibir a formação de biofilmes, a motilidade e a atividade de enzimas extracelulares de *X. campestris* pv. *campestris*, visando contribuir para o desenvolvimento de estratégias sustentáveis de manejo da podridão negra em crucíferas.

6.2. Material e Métodos

6.2.1 Obtenção e análise química dos óleos essenciais (OEs)

Os OEs de *C. grewoides* foram obtidos a partir de 25 acessos que são mantidos no Banco Ativo de Germoplasma de Plantas Medicinais e Aromáticas da Universidade Federal de Sergipe (UFS), localizado na fazenda experimental “Campus Rural”, São Cristóvão, SE, Brasil (10°55' S, 37°11' W, 18 m de altitude).

Para extração dos OEs, amostras de 40 g de folhas secas foram submetidas à hidrodestilação em aparelho Clevenger modificado, com adição de 1,5 L de água destilada, durante 140 minutos. O OE obtido de cada amostra foi armazenado em frasco âmbar e mantido em freezer a -20 °C.

A identificação e quantificação dos compostos presentes nos OEs com maior porcentagem de inibição de biofilme contra XCC foram realizadas por cromatografia gasosa (Agilent, modelo 7890B) acoplada a um espectrômetro de massas (Agilent, modelo 5977A MSD) (para mais detalhes, ver Rodrigues et al. 2023). O eugenol, composto majoritário encontrado nos OEs dos acessos estudados, foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, EUA).

6.2.2 Isolado bacteriano

O fitopatógeno *X. campestris* pv. *campestris* 629IBSBF (XCC-629IBSBF) foi obtido na coleção de fitobactérias do Instituto Biológico de São Paulo (São Paulo, Brasil). A bactéria foi cultivada em meio de cultura YM (Levedura-Malte: 3 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 3 g.L⁻¹ de extrato de malte, 5 g.L⁻¹ de peptona e 10 g.L⁻¹ de sacarose, pH 6,0) sob agitação orbital (150 rpm/28 ± 2 °C). Para todos os testes, foi utilizado um inóculo padronizado com densidade óptica equivalente a 0,5 na escala de McFarland (1 × 10⁶ UFC.mL⁻¹). As leituras foram realizadas em um leitor de microplacas Synergy™ H1 (BioTek Hybrid Technology) a um comprimento de onda de 600 nm.

6.2.3 Atividade antibiofilme

A inibição do biofilme de XCC-629IBSBF foi quantificada utilizando o cristal violeta. Para isso, 100 µL da cultura padrão foram adicionados a placas de microdiluição, juntamente com 100 µL da solução dos OEs. A solução do OE dos diferentes acessos de *C. grewoides* foi composta por OE (500 µg.mL⁻¹), 1% DMSO (Dimetilsulfóxido – Sigma-Aldrich, 99,9% de pureza) e meio de cultura YM. Em seguida, as microplacas foram incubadas a 28 °C ± 2 durante 24 horas. Após a incubação, as microplacas foram centrifugadas (2250 g/10 min/25 °C) e, em seguida, o sobrenadante foi removido. Posteriormente, foi acrescido aos poços 200 µL de etanol 95% durante 15 min para auxiliar na fixação das células. Após esse período, o biofilme foi corado com 200 µL de cristal violeta (0,01%) por 15 minutos em temperatura ambiente. 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 às células do biofilme, e 200 µL de cada poço foram transferidos para uma nova microplaca e as absorbâncias foram lidas em leitor de microplacas Synergy™ H1 da BioTek Hybrid Technology usando um comprimento de onda de 562 nm. O controle negativo consistiu em células cultivadas em meio de cultura YM com adição de DMSO (1%) aos poços, enquanto as células cultivadas na presença de sulfato de estreptomicina foram tomadas como controle positivo. A inibição da formação do biofilme foi calculada com a seguinte fórmula: inibição (%) = ((Controle negativo – Células tratadas) / (Controle negativo)) x 100.

6.2.4 Viabilidade celular e cinética de crescimento

No ensaio de viabilidade celular, foi utilizada uma solução estoque de resazurina a 0,002% (p/v) (Sigma, Reino Unido). A cultura XCC-629IBSBF padronizada foi cultivada em meio YM, em microplacas de 96 poços, com e sem a adição da solução dos OEs CGR-107, CGR-108, CGR-204, CGR-220 e CGR-311, por 24 h. As soluções dos OEs foram preparadas como descrito no item 2.3. Individualmente, foram adicionados a cada poço 40 µL de solução de resazurina. A fluorescência da resazurina (λ_{ex} : 560 nm e λ_{em} : 590 nm) foi medida após 20 minutos de incubação no escuro.

Para avaliar o efeito inibitório dos OEs sobre o crescimento bacteriano, a cepa XCC-629IBSBF foi cultivada em meio YM na presença e ausência das soluções com os diferentes OEs, sob agitação orbital (150 rpm/28 °C ± 2). A absorbância a 600 nm foi registrada em um leitor de microplacas Synergy™ H1 Hybrid, nos tempos de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 horas. A cultura não tratada foi utilizada como controle negativo, enquanto as células cultivadas na presença de sulfato de estreptomicina foram tomadas como controle positivo.

6.2.5 Deslocamento bacteriano (Swarming)

Para os ensaios de deslocamento bacteriano, células padronizadas de XCC-629IBSBF foram cultivadas em meio YM, com e sem a adição da solução dos OEs CGR-107, CGR-108, CGR-204, CGR-220 e CGR-311, por 24 h. As soluções dos OEs foram preparadas como descrito no item 6.2.3. Assim como para os OEs, também foi determinada a motilidade para eugenol (250 µg.mL⁻¹), sulfato de cobre (500 µg.mL⁻¹) e sulfato de estreptomicina (25 µg.mL⁻¹). Posteriormente, 2 µL das células tratadas foram cuidadosamente colocadas em placas

de Petri (90 x 15 mm) contendo meio YM solidificado com 0,05% de ágar e incubadas a 28 ± 2 °C. A motilidade foi avaliada após 48 horas por meio da medição da área de crescimento com o auxílio do software ImageJ (Schneider, Rasband, Eliceiri, 2012). O halo de crescimento da cultura não tratada foi utilizado como controle negativo, enquanto as células cultivadas na presença de sulfato de estreptomicina foram tomadas como controle positivo.

6.2.6 Ensaios enzimáticos extracelulares

Células padronizadas de XCC-629IBSBF foram cultivadas em 10 mL de meio líquido YM, na presença ou ausência da solução dos OEs CGR-107, CGR-108, CGR-204, CGR-220 e CGR-311, por 24 h. As soluções dos OEs foram preparadas como descrito no item 6.2.3. Assim como para os OEs, também foram realizados ensaios enzimáticos para eugenol ($250 \mu\text{g.mL}^{-1}$), sulfato de cobre ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e sulfato de estreptomicina ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Após a incubação, a cultura de XCC-629IBSBF foi ajustada para $\text{DO}_{(600\text{nm})}$ de 1,0, centrifugada a 12.000 rpm por 12 minutos, e o sobrenadante obtido foi utilizado para os ensaios enzimáticos.

A atividade enzimática extracelular foi determinada por ensaio de difusão radial em placas de Petri contendo meio de cultura e substrato específico. O meio foi vertido nas placas e, após a solidificação, poços de 8 mm de diâmetro foram perfurados. Para a atividade da protease extracelular foram utilizadas placas contendo meio YM, 0,5% de leite desnatado como substrato e 2% (p/v) de ágar. Após 48 horas de incubação a 28 ± 2 °C, as áreas de lise ao redor das colônias, decorrentes da degradação do substrato, foram medidas.

A atividade da celulase extracelular foi determinada em meio de cultura contendo ágar e 2% de carboximetilcelulose (CMC) (Perfyl Tech) como substrato. Para a atividade da endoglucanase, placas de ágar com 0,125% CMC (ágar 1%, em tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 6,0) foram utilizadas como substrato. As placas foram incubadas por sete dias a 28 °C e depois reveladas com corante vermelho Congo (1%) nos ensaios de celulase e endoglucanase. A cultura não tratada foi utilizada como controle negativo, enquanto as células cultivadas na presença de sulfato de estreptomicina foram tomadas como controle positivo.

6.2.7 Degradação do biofilme pré-formado

A erradicação do biofilme de XCC-629IBSBF foi quantificada utilizando o corante cristal violeta. Para isso, 200 μL da cultura padrão foram adicionadas às placas de microdiluição e incubados a 28 °C, sem agitação, por 24 horas. Após esse período, a solução de XCC-629IBSBF foi descartada e os poços foram lavados com PBS. Em seguida, 200 μL da solução dos OEs CGR-107, CGR-108, CGR-204, CGR-220 e CGR-311 ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$), bem como de eugenol ($250 \mu\text{g.mL}^{-1}$), sulfato de cobre ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e sulfato de estreptomicina ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$), foram adicionados aos poços e incubados novamente a 28 °C, sem agitação, por 24 horas. A cultura não tratada foi utilizada como controle negativo, enquanto as células cultivadas na presença de sulfato de estreptomicina foram tomadas como controle positivo. Posteriormente, as amostras foram avaliadas conforme descrito no item 6.2.3. A erradicação do biofilme foi calculada com a seguinte fórmula: $\text{inibição (\%)} = ((\text{Controle negativo} - \text{Células tratadas}) / (\text{Controle negativo})) \times 100$.

6.2.8 Análise dos dados

As médias dos percentuais de inibição da formação de biofilme foram submetidas à análise de variância (ANAVA), e ao teste de Scott-Knott ($P < 0,05$), utilizando o programa estatístico SISVAR® versão 5.6 (Ferreira, 2011). Os compostos relacionados à atividade antibiofilme foram identificados usando o método de análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA). O método foi utilizado para associar a porcentagem de ocorrência dos componentes presentes nos OEs com a porcentagem de inibição da formação de biofilme observada. O método PLS-DA foi construído usando dois componentes que explicaram pelo menos 99% da variância do modelo. A análise foi realizada na plataforma Metaboanalyst (Chong et al., 2019).

Os dados referentes a viabilidade celular e à cinética de crescimento foram plotados como a média $\pm$ erro padrão da média (EP), com o auxílio do programa GraphPad Prism (versão 8.0.1, CA, San Diego, EUA, 2018).

A motilidade bacteriana (cm^2) e a erradicação de biofilmes pré-formados (%), e a atividade enzimática extracelular foram submetidas à ANAVA, seguida do teste de Dunnett ($p < 0,05$), para verificação de diferenças entre os tratamentos e o controle negativo.

Todos os experimentos foram conduzidos com, no mínimo, três réplicas técnicas e três réplicas biológicas.

6.3. Resultados

6.3.1 Triagem dos acessos de *Croton grewioides* com ação antibiofilme

Em uma triagem inicial realizada com OEs de 25 acessos de *C. grewioides*, foi percebido que a capacidade de formação de biofilme por XCC-629IBSBF foi significativamente reduzida ($P < 0,05$), com valores médios de inibição variando de 0,00% (CGR-308) a 58,16% (CGR-220) (Figura 1). Os OEs dos acessos CGR-220 (58,16%) e CGR-107 (56,68%) apresentaram maiores percentuais de inibição, seguidos dos acessos CGR-311 (44,45%), CGR-212 (41,36%), CGR-108 (36,32%), CGR-204 (35,70%), CGR-125 (35,15%), CGR-124 (33,70%), CGR-304 (33,53%), CGR-307 (32,43%), CGR-302 (32,38%) e CGR-106 (29,98%).

A partir dessa triagem, cinco OEs (CGR-107, CGR-108, CGR-204, CGR-220 e CGR-311) foram selecionados para realização dos demais ensaios.

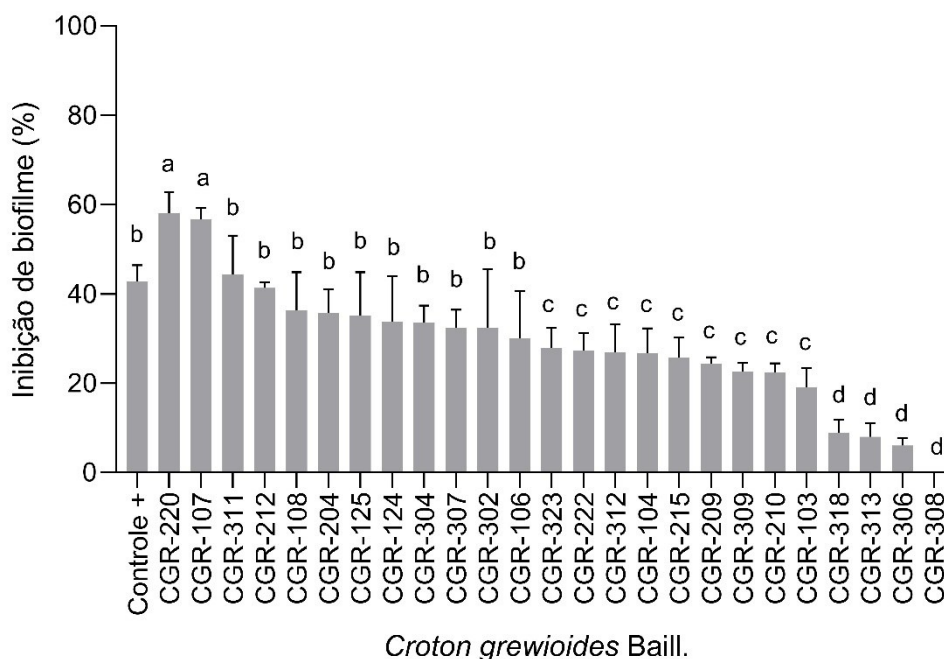


Figura 1. Atividade antibiofilme dos óleos essenciais de acessos de *Croton grewioides* Baill. contra XCC-629IBSBF.

O método PLS-DA foi utilizado para correlacionar os compostos presentes nos OEs dos acessos de *C. grewioides* selecionados com a atividade antibiofilme contra XCC-629IBSBF (Figura 2). Para essa análise, foram utilizados dois componentes que, juntos, explicaram pelo menos 99% da variância do modelo (Componente 1: 64,8%, Componente 2: 35,1%). O composto mais fortemente correlacionado com a atividade antibiofilme foi o eugenol, evidenciado pelo maior *Vip score* (valor do coeficiente: 2,54), composto majoritário dos OEs de *C. grewioides* que inibiram a formação do biofilme em mais de 50% (CGR-107 e CGR-220).

Já o composto metil chavicol (valor do coeficiente: 2,12) apresentou maior correlação com os OEs de *C. grewioides* que promoveram menor inibição da formação de biofilme de XCC-629IBSBF.

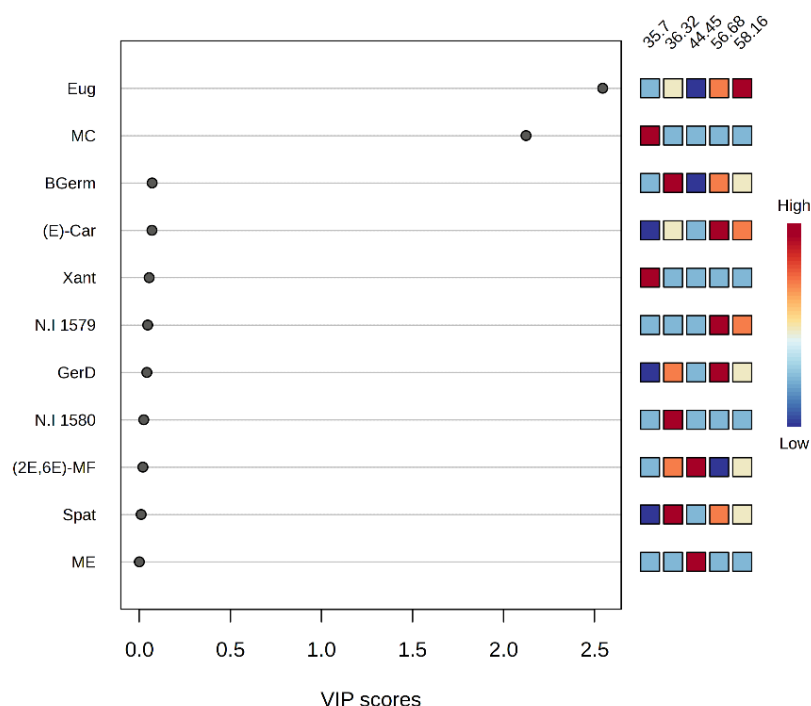


Figura 2. Valores de coeficientes (escores VIP) obtidos através do método PLS-DA para os componentes presentes nos óleos essenciais de acessos de *Croton grewioides* Baill. em relação à atividade antibiofilme contra XCC-629IBSBF. Eug: Eugenol; MC: Metil chavicol; ME: Metil eugenol; BGerm: Bicclogermacreno; E-Car: (E)-Cariofileno; GermD: Germacrene D; Xant: Xantoxilina; N.i.1579: não identificado; Spat: Espatulenol; EA: Acetato de eugenol; N.i.1580: não identificado; 2E,6EMF: (2E,6E)-farnesoato de metila. Percentuais de inibição da atividade antibiofilme: CGR-107 (56,68%), CGR-108 (36,32%), CGR-204 (35,70%), CGR-220 (58,16%), CGR-311 (44,45%).

6.3.2 Composição química dos OEs

Nos acessos CGR-107, CGR-108 e CGR-220 de *C. grewioides* foram identificados sete compostos e nos acessos CGR-204 e CGR-311 foram identificados oito compostos, com porcentagem relativa acima de 98,3%. O eugenol foi o composto majoritário para os acessos CGR-107 (82,86%), CGR-108 (81,67%) e CGR-220 (84,92%). Para o acesso CGR-311, o composto predominante foi o metil eugenol (70,10%), enquanto para o CGR-204, o metil chavicol (69,17%) e o eugenol (19,21%) (Figura 3).

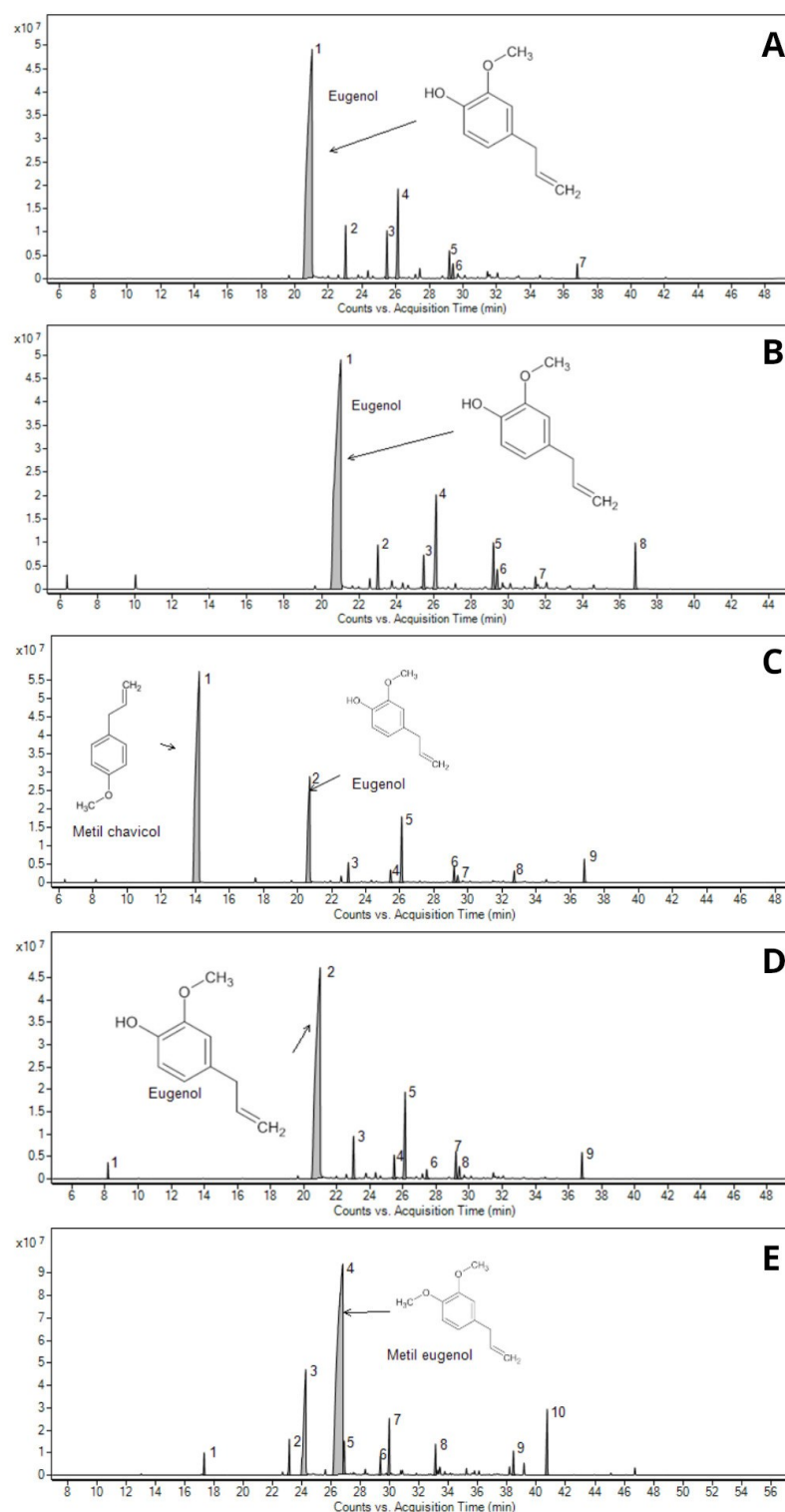


Figura 3. Cromatogramas de óleos essenciais dos acessos (A) CGR-107, (B) CGR-108, (C) CGR-204, (D) CGR-220 e (E) CGR-311 de *Croton grewoides* Baill.

6.3.3 Viabilidade celular e cinética de crescimento

Uma vez que o objetivo era identificar um agente antivirulência que afetasse os fatores de virulência sem comprometer a viabilidade celular, os efeitos dos OEs de *C. grewoides* sobre XCC-629IBSBF, tanto na cinética de crescimento inicial quanto na atividade metabólica, foram investigados. A curva de crescimento de XCC-629IBSBF tratada com diferentes OEs de *C. grewoides* é mostrada na Figura 4A. Os OEs dos acessos CGR-204 e CGR-311 destacaram-se por não afetarem o crescimento inicial de XCC-629IBSBF em todos os tempos de incubação

analisados, em comparação ao controle negativo, indicando ausência de efeito bactericida. Por outro lado, os OEs dos acessos CGR-107, CGR-108 e CGR-220 apresentaram menores valores de absorbância, sugerindo um possível efeito inibitório sobre o crescimento bacteriano. O sulfato de estreptomicina, utilizado como controle positivo na concentração de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, não reduziu o crescimento de XCC-629IBSBF.

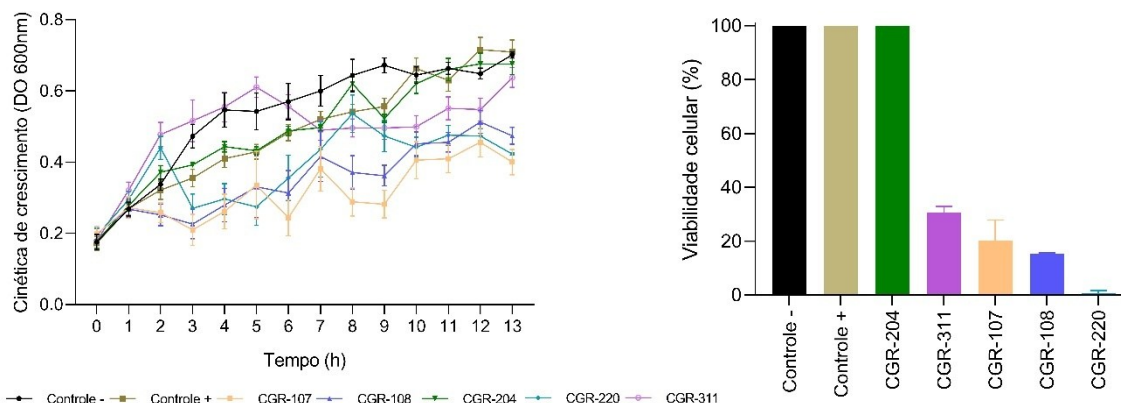


Figura 4. Cinética de crescimento (A) e viabilidade celular (B) de XCC-629IBSBF após exposição aos óleos essenciais de acessos de *Croton grewoides* Baill. Os resultados são médias $\pm$ erro padrão de três réplicas técnicas e três réplicas biológicas.

Analisando a viabilidade celular, observou-se que o OE do acesso CGR-204 não comprometeu a viabilidade das células. Por outro lado, os OEs dos acessos CGR-311 (30,67%), CGR-107 (20,31%), CGR-108 (15,43%) e CGR-220 (0,83%) reduziram a viabilidade celular, conforme apresentado na Figura 4B.

6.3.4 Deslocamento bacteriano

Para investigar os efeitos dos tratamentos sobre a motilidade de XCC-629IBSBF, avaliou-se a área de deslocamento em meio semissólido. Os resultados demonstraram que todos os tratamentos reduziram significativamente ($p < 0,01$) a motilidade de XCC-629IBSBF em comparação ao controle negativo (Figura 5A).

Os OEs dos acessos CGR-107, CGR-108, CGR-204, CGR-220 e CGR-311, bem como o composto eugenol, promoveram uma inibição mais acentuada da motilidade bacteriana, com áreas variando de $0,35 \text{ cm}^2$ a $0,61 \text{ cm}^2$. O OE do acesso CGR-311 apresentou a menor área de motilidade ($0,35 \text{ cm}^2$), seguido do eugenol ($0,36 \text{ cm}^2$). O sulfato de cobre ($3,76 \text{ cm}^2$) e o controle positivo, sulfato de estreptomicina ($3,22 \text{ cm}^2$), também reduziram significativamente ($p < 0,01$) a motilidade de XCC-629IBSBF em relação ao controle negativo ($8,49 \text{ cm}^2$).

As colônias formadas sob o tratamento dos diferentes OEs de *C. grewoides* foram pequenas e pouco difusas (Figura 5B), contrastando com a dispersão observada na placa do controle negativo, o que sugere uma limitação efetiva do movimento bacteriano. O controle negativo apresentou a maior área de motilidade ($8,49 \text{ cm}^2$), indicando alta capacidade de deslocamento das bactérias.

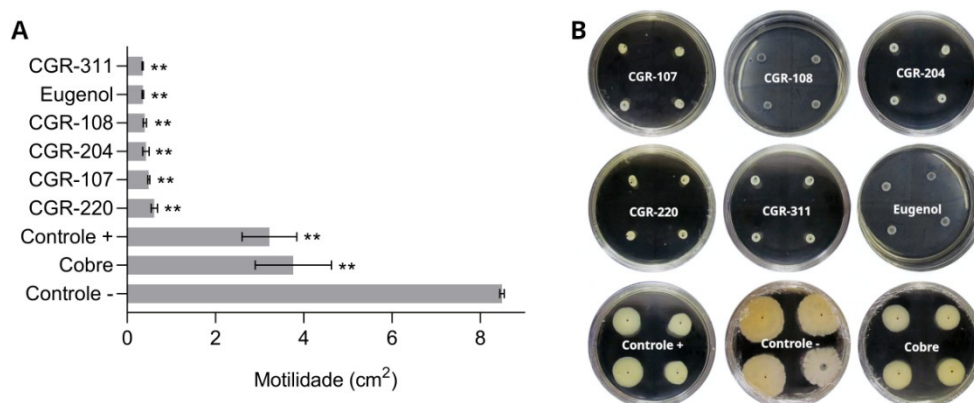


Figura 5. Efeito dos tratamentos na motilidade de XCC-629IBSBF (A) e halos formados após exposição aos tratamentos (B).

6.3.5 Ensaios enzimáticos extracelulares

Conforme mostrado na Figura 6A, todos os tratamentos reduziram significativamente a atividade de celulase em comparação ao controle negativo ($p < 0,05$). Os OEs CGR-108, CGR-204 e CGR-220, assim como eugenol, sulfato de estreptomicina (controle positivo) e sulfato de cobre apresentaram inibição superior a 50% contra XCC-629IBSBF (Figura 6B). Na Figura 6C, pode-se observar os halos de degradação formados após o tratamento com os diferentes OEs, eugenol, sulfato de estreptomicina e sulfato de cobre, que apresentaram halos visivelmente reduzidos em comparação ao controle negativo.

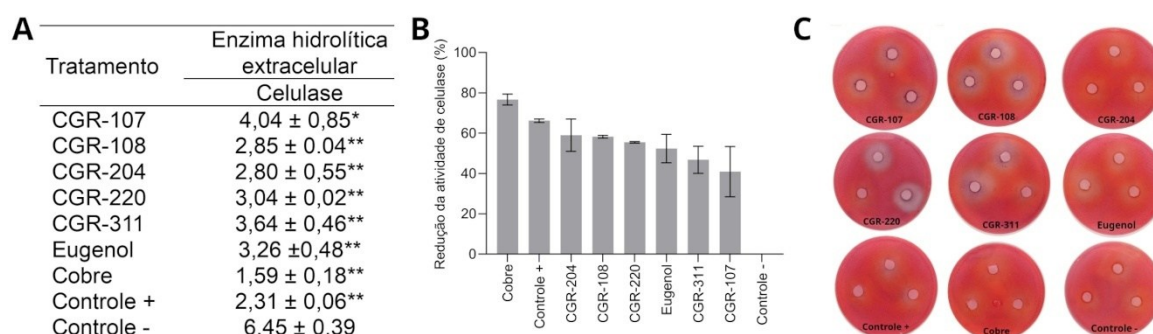


Figura 6. Área do halo de degradação de celulose (A), percentual de redução da atividade de celulase (B) e imagem dos halos de degradação formados após exposição aos tratamentos (C).

Os OEs CGR-204, CGR-107, CGR-220 e sulfato de estreptomicina reduziram significativamente a atividade de endoglucanase (halos de 2,82, 4,78, 6,58 e 5,78 cm², respectivamente) em comparação ao controle negativo (11,04 cm²) (Figura 7A). Por outro lado, os OEs CGR-108, CGR-311, bem como eugenol e sulfato de cobre não promoveram redução significativa da atividade de endoglucanase. O OE CGR-204 apresentou a maior redução percentual da atividade enzimática (75,9%), seguido por CGR-107 (62,4%). Essa redução também pode ser observada a partir da Figura 7C, corroborando dados quantitativos apresentados nas Figuras 7A e 7B.

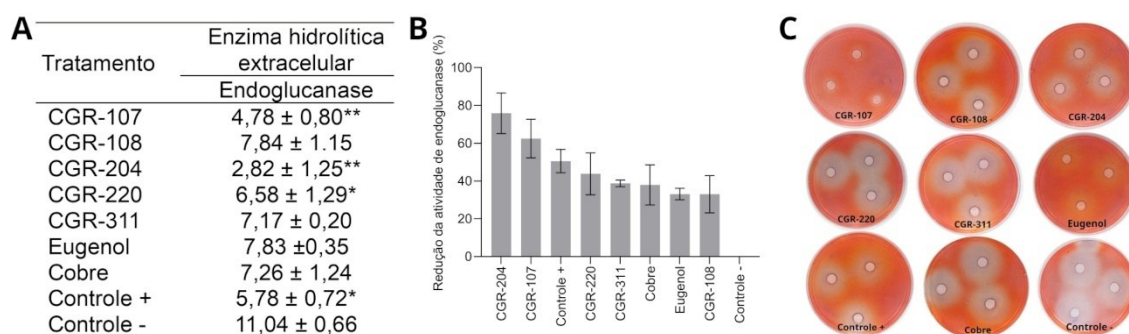


Figura 7. Área do halo de degradação de endoglucanase (A), percentual de redução da atividade de endoglucanase (B) e imagem dos halos de degradação formados após exposição aos tratamentos (C).

Nos ensaios de degradação de protease, os OEs CGR-107 (4,44 cm²), CGR-108 (5,04 cm²), CGR-204 (7,17 cm²) e o composto eugenol (4,88 cm²) reduziram significativamente a atividade proteolítica em comparação ao controle negativo (11,94 cm²) (Figura 8A). As reduções mais expressivas da atividade proteolítica foram observadas para CGR-107 (64,0%) e eugenol (60,4%) (Figura 8B). A menor formação de halos de degradação nos tratamentos supracitados reforça a inibição da atividade proteolítica bacteriana observada nas análises quantitativas (Figura 8C).

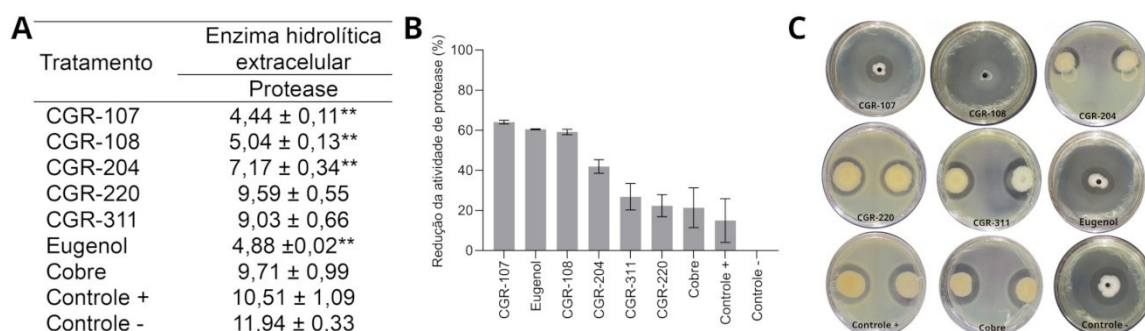


Figura 8. Área do halo de degradação de protease (A), percentual de redução da atividade proteolítica (B) e imagem dos halos de degradação formados após exposição aos tratamentos (C).

6.3.6 Degradação do biofilme pré-formado

Em todos os tratamentos, o percentual de erradicação de biofilmes pré-formados de XCC-629IBSBF aumentou significativamente em comparação ao controle negativo ($p < 0,05$) (Figura 9). Dentre os tratamentos, os OEs dos acessos CGR-220 (71,47%), CGR-108 (70,38%), CGR-107 (69,73%) e CGR-311 (67,89%) apresentaram os maiores valores médios da taxa de erradicação. Esses valores foram superiores aos obtidos no controle positivo, sulfato de estreptomicina (62,74%) e eugenol (63,55%). Os tratamentos com menor percentual foram CGR-204 (47,61%) e sulfato de cobre (49,61%).

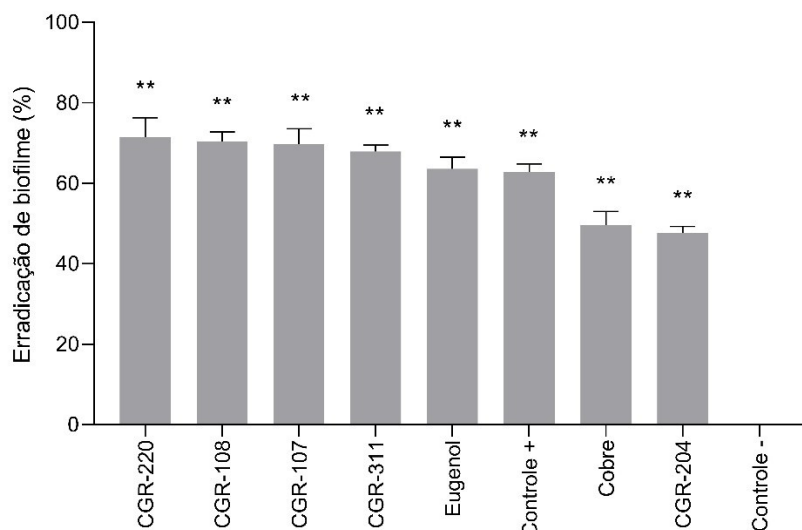


Figura 9. Percentual de degradação do biofilme pré-formado de XCC-629IBSBF.

6.4. Discussão

A patogênese das fitobactérias, como XCC, é regulada por mecanismos de comunicação intercelular, como o *quorum sensing* (QS), que coordenam a expressão de fatores de virulência em resposta à densidade populacional e à presença de moléculas sinalizadoras, como os autoindutores (Feng et al., 2023). Nesta investigação, os OEs de *C. grewiioides* Baill., particularmente dos acessos CGR-107, CGR-108, CGR-204, CGR-220 e CGR-311, foram avaliados quanto à sua capacidade de interferir nos fatores de virulência de XCC-629IBSBF, incluindo formação de biofilme, motilidade, secreção de enzimas extracelulares e erradicação de biofilmes pré-formados.

A formação de biofilme é um fator determinante na virulência das fitobactérias, pois facilita a adesão a superfícies vegetais, protege contra estresses ambientais e contribui para a resistência a agentes antimicrobianos (Lo et al., 2020). Os OEs de *C. grewiioides* reduziram significativamente a formação de biofilme, com inibições de até 58,16% (CGR-220) (Figura 2), e erradicaram biofilmes pré-formados em até 71,47% (CGR-220) (Figura 9). A análise PLS-DA revelou que o eugenol é o principal composto correlacionado com essa atividade (coeficiente VIP de 2,54) (Figura 3). O composto eugenol pode atuar por meio de múltiplos mecanismos de ação e em diferentes estágios da formação e manutenção do biofilme, reduzindo a densidade celular, interferindo nas interações intracelulares responsáveis pela organização do biofilme, dificultando a formação de estruturas coesas e facilitando sua remoção mecânica (Yadav et al., 2015).

Mesmo em biofilmes maduros, o eugenol consegue penetrar na matriz extracelular devido às suas propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas, reduzindo significativamente a biomassa e o número de bactérias viáveis (Melo et al., 2019; Wijesinghe et al., 2021; Kim e Chin, 2023). Essa ação também inclui a diminuição dos principais componentes da matriz extracelular, como carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, além da possibilidade de regulação negativa de genes responsáveis pela produção de polissacarídeos, essenciais para a integridade e proteção dos biofilmes (Ni et al., 2022; Kim e Chin, 2023; Yadav et al., 2015; El-Far et al., 2021; Mastoor et al., 2022).

A redução significativa da motilidade de XCC-629IBSBF (Figura 5) é outro aspecto relevante, uma vez que a motilidade bacteriana é essencial para a colonização de superfícies vegetais e a disseminação do patógeno (Ryan et al., 2011). O OE de CGR-311, com predominância de metil eugenol, apresentou a maior inibição da motilidade (0,35 cm²), seguido pelo eugenol (0,36 cm²). Esses resultados sugerem que compostos fenólicos derivados do eugenol podem interferir nos mecanismos de motilidade, possivelmente pela inibição de

flagelos ou pela alteração da expressão de genes, como *motA*, *motB* e *flgE* (Singh et al., 2017). A comparação com o sulfato de cobre (3,76 cm²) e o controle positivo, sulfato de estreptomicina (3,22 cm²) reforça a eficácia dos OEs de *C. grewioides*, sugerindo seu potencial como alternativa aos agentes químicos tradicionais.

As enzimas extracelulares, como celulase, endoglucanase e protease, desempenham papéis cruciais na patogênese de XCC, degradando componentes da parede celular vegetal e facilitando a invasão do hospedeiro (Lo et al., 2020). Os OEs de *C. grewioides* reduziram significativamente a atividade dessas enzimas, com o acesso CGR-204 inibindo a endoglucanase em 75,9% (Figura 7) e o CGR-107 reduzindo a atividade proteolítica em 64,0% (Figura 8). A inibição dessas enzimas pode ser mediada pela supressão de genes regulatórios, como os do grupo *rpf* (*regulation of pathogenicity factors*), que controlam a produção de FSD (Fator de sinal difusível) e a produção de fatores de virulência (Li et al., 2019). Embora a expressão gênica não tenha sido diretamente avaliada neste estudo, a redução observada nas atividades enzimáticas e na formação de biofilme sugere uma possível repressão de genes *rpf*, como *rpfF* e *rpfC*, semelhante ao observado em estudos com *X. oryzae* pv. *oryzae* tratados com OE de *Thymus vulgaris* (Singh et al., 2017).

A análise da cinética de crescimento inicial e de viabilidade celular (Figura 4A e 4B) revelou que os OEs de *C. grewioides* podem atuar como agentes antivirulência, sem comprometer significativamente a viabilidade celular de XCC-629IBSBF, especialmente para o acesso CGR-204. Esse perfil é altamente desejável no desenvolvimento de estratégias de controle de fitopatógenos, uma vez que a inibição de fatores de virulência, sem matar as células bacterianas, reduz a pressão seletiva, retardando o desenvolvimento de resistência (Murugaiyan et al., 2022). Por outro lado, os OEs de CGR-107, CGR-108 e CGR-220 apresentaram inibição do crescimento bacteriano inicial e viabilidade celular, o que pode ser atribuído à alta concentração de eugenol nesses acessos. O acesso CGR-311 não afetou o crescimento inicial de XCC-629IBSBF, embora em períodos mais longos foi possível observar uma redução da viabilidade celular.

A variabilidade química entre os acessos de *C. grewioides* (Figura 1) indica que a eficácia dos OEs depende da composição química, sendo necessário padronizar os quimiotipos para aplicações práticas. Além disso, a ausência de análises de expressão gênica neste estudo limita a compreensão dos mecanismos moleculares pelos quais os OEs modulam o QS e os fatores de virulência. Estudos futuros devem investigar a expressão de genes como *rpfF*, *rpfC* e outros associados à quimiotaxia, motilidade e secreção de exoenzimas.

6.5. Conclusões

Os OEs de *C. grewioides* apresentam potencial significativo como agentes antivirulência contra XCC-629IBSBF, atuando na inibição da formação e erradicação de biofilmes, redução da motilidade e supressão de enzimas extracelulares. Esses resultados posicionam os OEs de *C. grewioides* como candidatos promissores para o desenvolvimento de estratégias sustentáveis no controle de fitopatógenos, especialmente contra a podridão negra em crucíferas causada por XCC. O OE do acesso CGR-204 destaca-se por não comprometer a viabilidade celular, sugerindo ação antivirulência sem efeito bactericida.

6.6. Referências Bibliográficas

Chong, J., Wishart, D.S., Xia, J., 2019. Using MetaboAnalyst 4.0 for comprehensive and integrative metabolomics data analysis. Curr. Protoc. Bioinformatics. 68(1), e86.
<https://doi.org/10.1002/cpbi.86>

- Dubrow, Z. E., Bogdanove, A. J. (2021). Genomic insights advance the fight against black rot of crucifers. *Journal of General Plant Pathology*, 87(3), 127-136. <https://doi.org/10.1007/s10327-021-00987-x>
- El-Far, A., Samir, S., El-Gebaly, E., Taha, N. Y., Fahmy, E. M., Diab, T. M., El-Shenawy, A. (2021). Assessment of eugenol inhibitory effect on biofilm formation and biofilm gene expression in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Egypt. *Infection, Genetics and Evolution*, 89, 104722. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104722>
- Feng, Y. M., Long, Z. Q., Xiang, H. M., Ran, J. N., Zhou, X., Yang, S. (2023). Research on diffusible signal factor-mediated quorum sensing in *Xanthomonas*: a mini-review. *Molecules*, 28(2), 876. <https://doi.org/10.3390/molecules28020876>
- Ferreira, D. F. (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e agrotecnologia*, 35, 1039-1042. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>
- GraphPad Software., 2018. GraphPad Prism version 8.0.0 for Windows. GraphPad Software, San Diego, California, USA. Retrieved from <https://www.graphpad.com>
- Kim, J., Chin, Y. W. (2023). Antimicrobial agent against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm monitored using Raman spectroscopy. *Pharmaceutics*, 15(7), 1937. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071937>
- Li, L., Li, J., Zhang, Y., Wang, N. (2019). Diffusible signal factor (DSF)-mediated quorum sensing modulates expression of diverse traits in *Xanthomonas citri* and responses of citrus plants to promote disease. *BMC genomics*, 20, 1-22. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5384-4>
- Lo, H. H., Liao, C. T., Li, C. E., Chiang, Y. C., Hsiao, Y. M. (2020). The clpX gene plays an important role in bacterial attachment, stress tolerance, and virulence in *xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Archives of Microbiology*, 202(3), 597-607. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01772-3>
- Lopes, C. V. A., Albuquerque, G. S. C. D. (2018). Agrochemicals and their impacts on human and environmental health: a systematic review. *Saúde em Debate*, 42, 518-534. <https://doi.org/10.1590/0103-1104201811714>
- Mastoor, S., Nazim, F., Rizwan-ul-Hasan, S., Ahmed, K., Khan, S., Ali, S. N., Abidi, S. H. (2022). Analysis of the antimicrobial and anti-biofilm activity of natural compounds and their analogues against *Staphylococcus aureus* isolates. *Molecules*, 27(20), 6874. <https://doi.org/10.3390/molecules27206874>
- Melo, R. S., Albuquerque Azevedo, Á. M., Gomes Pereira, A. M., Rocha, R. R., Bastos Cavalcante, R. M., Carneiro Matos, M. N., Carneiro, V. A. (2019). Chemical composition and antimicrobial effectiveness of *Ocimum gratissimum* L. essential oil against multidrug-resistant isolates of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Molecules*, 24(21), 3864. <https://doi.org/10.3390/molecules24213864>
- Mulungu, E. (2024). Unmasking the hidden threat: a review of damage and losses due to phytopathogenic bacteria. *Journal of Current Opinion in Crop Science*, 5(4), 250-263. <https://doi.org/10.62773/jcocs.v5i4.277>

- Murugaiyan, J., Kumar, P. A., Rao, G. S., Iskandar, K., Hawser, S., Hays, J. P., van Dongen, M. B. (2022). Progress in alternative strategies to combat antimicrobial resistance: focus on antibiotics. *Antibiotics*, 11(2), 200. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020200>
- Ni, K., Cai, D., Lu, J., Tian, J. (2022). Eugenol-Mediated inhibition of biofilm formed by *S. aureus*: a potent organism for pediatric digestive system diseases. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1-19. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03682-x>
- Oliveira, S. D. D. S., De Oliveira E Silva, A. M., Blank, A. F., Nogueira, P. C. D. L., Nizio, D. A. D. C., Almeida-Pereira, C. S., Arrigoni-Blank, M. D. F. (2021). Radical scavenging activity of the essential oils from *Croton grewoides* Baill accessions and the major compounds eugenol, methyl eugenol and methyl chavicol. *Journal of Essential Oil Research*, 33(1), 94-103. <https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1779139>
- Rodrigues, T. C., Gois, I. B., Fernandes, R. P. M., Blank, A. F., Sandes, R. D. D., Neta, M. T. S. L., de Fátima Arrigoni-Blank, M. (2023). Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils from *Croton grewoides* Baill. accessions on the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 193, 105454. <https://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. (2011). Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium–plant interactions. *Nat. Rev. Microbio.* 9(5), 344-355. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2558>
- Santos, N. C., Silva, J. E. D., Santos, A. C. C., Dantas, J. D. O., Tavares, S. R. S. A., Andrade, V. S., Bacci, L. (2023). Bioactivity of essential oils from *Croton grewoides* and its major compounds: toxicity to soybean looper *Chrysodeixis includens* and selectivity to the predatory stink bug *Podisus nigrispinus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(7), 18798-18809. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23414-w>
- Singh, A., Gupta, R., Tandon, S., Pandey, R. (2017). Thyme oil reduces biofilm formation and impairs virulence of *Xanthomonas oryzae*. *Front. Microbiol.* 8, 1074. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01074>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Tay, S. B., Yew, W. S. (2013). Development of quorum-based anti-virulence therapeutics targeting Gram-negative bacterial pathogens. *International journal of molecular sciences*, 14(8), 16570-16599. <https://doi.org/10.3390/ijms140816570>
- Wijesinghe, G. K., Feiria, S. B., Maia, F. C., Oliveira, T. R., Joia, F., Barbosa, J. P., Höfling, J. F. (2021). In-vitro antibacterial and antibiofilm activity of *Cinnamomum verum* leaf oil against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 93, e20201507. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120201507>
- Yadav, M. K., Chae, S. W., Im, G. J., Chung, J. W., Song, J. J. (2015). Eugenol: a phyto-compound effective against methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* clinical strain biofilms. *PloS one*, 10(3), e0119564. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119564>

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta tese demonstrou o potencial dos OECGs como uma alternativa sustentável para o controle de fitopatógenos do gênero *Xanthomonas*, XCC e Xmel. A revisão sistemática realizada no Artigo 1 revelou 24 atividades biológicas associadas aos OECGs, destacando cinco quimiotipos (estragol, metil eugenol, eugenol, anetol e (E)-anetol), com estragol e (E)-anetol propostos como marcadores químicos da espécie. Esses dados reforçam a versatilidade química e biológica de *C. grewoides*, consolidando seu potencial para aplicações agrícolas e industriais.

Os ensaios experimentais dos Artigos 2 e 3 evidenciaram a eficácia antimicrobiana e antibiofilme dos OECGs. Para Xmel, os acessos CGR-106, CGR-107, CGR-220 e a combinação eugenol + metil chavicol apresentaram CIM de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, com redução significativa da viabilidade celular a partir de 120 minutos e permeabilização da membrana bacteriana. Para XCC, os OECGs, especialmente o acesso CGR-220, reduziram a formação de biofilme em até 58,16% e erradicaram biofilmes pré-formados em 71,47%. A inibição da motilidade bacteriana (CGR-311, 0,35 cm^2) e das atividades enzimáticas (endoglucanase, celulase e protease) reforça o papel dos OECGs como agentes antivirulência, capazes de interferir em fatores críticos de patogenicidade sem necessariamente exercer efeito bactericida, como observado no acesso CGR-204.

Estudos futuros devem avaliar a eficácia dos OECGs em condições de campo, visando validar os efeitos observados em laboratório e determinar sua viabilidade como alternativa prática e econômica no manejo fitossanitário de culturas agrícolas. Além disso, devem investigar a estabilidade dos OECGs em formulações comerciais, incluindo o desenvolvimento de nanoemulsões ou encapsulamentos que aumentem sua solubilidade, estabilidade e liberação controlada, bem como elucidar os mecanismos moleculares de ação antivirulência, com foco nos genes e vias regulatórias afetadas pelos compostos majoritários, como eugenol, metil eugenol e metil chavicol, especialmente no contexto da comunicação celular (quorum sensing). Por fim, recomenda-se a expansão das investigações para outros fitopatógenos bacterianos e fúngicos, bem como a análise de possíveis efeitos sinérgicos com os bactericidas convencionais, com vistas à redução do uso de agroquímicos sintéticos e ao desenvolvimento de novos bioprodutos para a agricultura.