



**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 *Lippia gracilis* E SEUS COMPOSTOS
MAJORITÁRIOS SOBRE FITOPATÓGENOS DO GÊNERO
Xanthomonas spp. RESISTENTES AO COBRE**

LARISSA DE SOUZA GOIS

2022



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

LARISSA DE SOUZA GOIS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE
Lippia gracilis E SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS SOBRE FITOPATÓGENOS
DO GÊNERO *Xanthomonas* spp. RESISTENTES AO COBRE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

Orientadora
Prof^a. Dra. Roberta Pereira Miranda Fernandes

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

G616a Gois, Larissa de Souza.
Atividade antimicrobiana e antibiofilme de óleos essenciais de *Lippia gracilis* e seus compostos majoritários sobre fitopatógenos do gênero *Xanthomonas* spp. resistentes ao cobre / Larissa de Souza Gois; orientadora Roberta Pereira Miranda Fernandes. – São Cristóvão, SE, 2022.
70 f.: il.

Dissertação (mestrado em Agricultura e Biodiversidade) – Universidade Federal de Sergipe, 2022.

1. Agrobiodiversidade. 2. Doenças bacterianas das plantas. 3. Metabólitos. 4. Essências e óleos essenciais. I. Lippia gracilis. II. Fernandes, Roberta Pereira Miranda, orient. III. Título.

CDU 582.929.3

LARISSA DE SOUZA GOIS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE
Lippia gracilis Schauer E SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS SOBRE
FITOPATÓGENOS DO GÊNERO *Xanthomonas* spp. RESISTENTES AO COBRE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

APROVADA em 29 de julho de 2022.

Prof^a. Dra. Camila de Souza Varize Lopes
SERGIPETEC

Prof^a. Dra. Itamara Bomfim Gois
UFS/PPGAGRI

Prof^a. Dra. Roberta Pereira Miranda Fernandes
UFS
(Orientador)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL

“Quando eu morrer e as minúsculas partes de mim forem recicladas, estarei em bilhões de outros lugares. Meus átomos estarão nas plantas, insetos, animais. Eu serei como as estrelas no céu. Aqui em um momento, depois espalhadas pelo cosmos”. (Missa da meia-noite). A Deus em primeiro lugar, a minha família, meus amigos, minha orientadora e aos professores que foram importantes para minha formação acadêmica.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à força primordial que move todo universo e todas as coisas que nele habitam, que denomino de Deus. Em seguida, a minha família por todo apoio e carinho nos momentos mais difíceis.

Em especial, a minha mãe Ana e minha voinha (Clemilda) e voinho (Everaldo), por me proporcionarem as oportunidades de poder estudar. As minhas irmãs Laisa e Carol a quem dedico todos meus esforços e a Wianeí, a pessoa que mais me apoiou a fazer o mestrado e sempre esteve ao meu lado, em todos os momentos a qual me senti triste, você me fez sorrir ou me trouxe comida (risos... sempre com muito carinho e paciência). Amo muito todos vocês!

E, em especial, às amigas/irmãs que a UFS e a vida me deram de presente que sempre estiveram ao meu lado e me ajudaram a chegar até aqui: Carol, Fernanda, Jacilene, Jéssica, Laís, Lázara, Mariana e Tamiris, e meus queridos amigos Nicolas, Juan, Maxwell e Matheus. A todos que fazem parte do laboratório de Enzimologia e, em especial, a nossa IC Ana e aos meus colegas que fazem parte do GPMACO: William, Carlos e Luís e, em especial, aos professores Dr. Arie Blank e Dr^a. Daniela Nizio. Aos professores do PPGAGRI e ao professor Dr. Euler Araújo do departamento de Engenharia de Materiais da UFS e, em especial, a minha orientadora Dr^a. Roberta Fernandes, que sempre me orientou com muito carinho me mostrando que no final "As coisas sempre dão certo quando há dedicação". Sou muito grata por ter oportunidade de ter sido sua orientada.

Agradeço a Dr^a. Itamara Gois e Dr^a. Camila Lopes que aceitaram fazer parte da minha banca de defesa. Por fim e não menos importante aos meus filhos de 4 patas. Não sei se fui eu que os salvei ou eles quem me salvaram. "Antes de ter amado um animal, parte da nossa alma permanece desacordada". Anatole France.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
4. ARTIGO 1: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Lippia gracilis</i> Schauer E SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS SOBRE FITOPATÓGENOS DO GÊNERO <i>Xanthomonas</i> spp. RESISTENTES AO COBRE	30
Resumo	30
Abstract	31
4.1. Introdução	32
4.2. Material e Métodos	33
4.3. Resultados	36
4.4. Discussão	40
4.5. Referências Bibliográficas	41
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44
Figuras e Tabelas do Artigo.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura

1. Foto de <i>Lippia gracilis</i> Schauer, banco de germoplasma da UFS.....	5
2. Sintomas da barriga d'água do melão. A) Sintomas de Pré-colheita e B) Sintomas no fruto maduro.....	6
3. Bacteriose da mandioca. A e B) Sintomas na folha da mandioca.....	7
4. Sintomas de <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. pruni em fruto. A) Pêssego, B) Folha de ameixeira e C) Frutos de ameixa.....	8
5. Sintomas de estrias bacterianas nas folhas de milho, incluindo: A) desenvolvimento de lesões de estrias precoces, B) desenvolvimento de lesões de pequenas manchas, C) e D) desenvolvimento de sintomas começando na base da planta progredindo resultando em E), F) e G) coalescendo lesões graves nas folhas superiores e H) sinais de gotículas bacterianas de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> desde o desenvolvimento inicial da lesão.....	9
6. Folhas de mudas de: A) Couve Manteiga e B) Couve brócolis inoculada com <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	11
7. Modo de ação dos óleos essenciais, timol e carvacrol sobre a membrana de bactérias.....	13
8. Esquema da formação e dispersão do biofilme de fitobactérias em plantas e comunicação entre as bactérias QS (Quorum sensing)	14

ARTIGO 1

	Página
1. Atividade bactericida de agentes antimicrobianos sobre fitobactérias do gênero <i>Xanthomonas</i> . A) <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>melonis</i> . B) <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> . C) <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i> . D) <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i> . E) <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	49
2. Efeito de agentes antimicrobianos sobre a viabilidade celular de fitobactérias do gênero <i>Xanthomonas</i> . A) <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>melonis</i> . B) <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> . C) <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i> . D) <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i> . E) <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	50
3. Permeabilidade celular de fitobactérias do gênero <i>Xanthomonas</i> em função do óleo essencial de <i>Lippia gracilis</i> Schauer e seus compostos majoritários. A) <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>melonis</i> . B) <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> . C) <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i> . D) <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i> . E) <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	52
4. Inibição (%) da formação do biofilme de fitobactérias do gênero <i>Xanthomonas</i> em função do óleo essencial dos diferentes acessos de <i>Lippia gracilis</i> Schauer, seus compostos majoritários e o óxido de cobre. A) <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>melonis</i> B) <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> . C) <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i> . D) <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i> . E) <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	53

5. Análise de componentes principais. A) As análises representam a distribuição dos óleos essenciais dos diferentes acessos de *Lippia gracilis*, timol, carvacrol, óxido e sulfato de cobre, estreptomicina, bem como a formação do biofilme, a Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Mínima Bactericida (CMB) para fitobactérias do gênero *Xanthomonas*. B) Dendrograma de similaridade demonstrando a similaridade entre os acessos de *Lippia gracilis* 54
6. Valores de coeficientes (VIP scores) obtidos com o método PLS-DA para os compostos presentes nos óleos essenciais dos acessos de *Lippia gracilis* em relação à Concentração Mínima Bactericida (CMB). A) *Xanthomonas campestris* pv. *melonis*. B) *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. C) *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. D) *Xanthomonas axonopodis* pv. *vasculorum*. E) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*..... 55
7. Ensaio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para demonstrar o efeito do óleo essencial de *Lippia gracilis* e do óxido de cobre sobre: 1- A) *Xanthomonas campestris* pv. *melonis* LGRA-202 1X CMI, B) 1/4x CMI, C) óxido de cobre (200 µg mL), D) controle. 2- A) e B) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* LGRA-107 1X CMI, C) óxido de cobre (200 µg mL), D) controle. *df (degradação celular), qs (quorum sensing), pfc (perfuração celular) bf (biofilme formado) abf (ausência de biofilme) dbf (degradação do biofilme) 24 horas de exposição..... 56
8. Experimento *in vivo* plantas da Couve Manteiga da Geórgia e Couve Brócolis Ramoso Santana, tratadas com óxido de cobre (2000 µg.mL⁻¹), e LGRA-107 (250 µg.mL⁻¹) e LGRA-107 (500 µg.mL⁻¹). A) Média plantas de Couve Manteiga de Georgia. B) Plantas de Couve brócolis. C) Escala de Couve Manteiga e Couve Brócolis..... 57

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela		Página
1.	Código, origem e informações geográficas dos sete acessos da coleção de <i>Lippia gracilis</i> , do Banco Ativo de Germoplasma de Plantas Medicinais e Aromáticas, Universidade Federal de Sergipe.....	45
2.	Isolados de <i>Xanthomonas</i> adquiridos da coleção de culturas de fitobactérias do Instituto Biológico (São Paulo, Brasil)	46
3.	Concentração inibitória mínima e concentração mínima bactericida dos óleos essenciais de <i>Lippia gracilis</i> , e seus compostos majoritários, estreptomicina, bem como o óxido e sulfato de cobre para atividade antimicrobiana sobre cinco fitobactérias do gênero <i>Xanthomonas</i>	47
4.	Biomassa fresca, biomassa seca e número de folhas de couve manteiga tratada com o óleo essencial de <i>Lippia gracilis</i> e o óxido de cobre.....	48
5.	Efeito do modo de infecção de couve brócolis com a fitobactéria <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> tratada com o óleo essencial de <i>Lippia gracilis</i> e o óxido de cobre.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

% inb	Porcentagem de inibição
% per	Porcentagem de permeabilidade da membrana plasmática
AGROFIT	Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários
CV	Cristal violeta
CV (%)	Coefficiente de variação
D.O.	Densidade ótica
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EP	Erro padrão
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IP	Iodeto de Propídio
LGRA	<i>Lippia gracilis</i> Schauer
CMB	Concentração Mínima Bactericida
CMI	Concentração Mínima Inibitória
OEs	Óleos essenciais
STR	Streptomycina
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
X1	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>melonis</i>
X2	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>
X3	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>
X4	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i>
X5	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
Xcc	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
OD contr.	Média das absorvâncias do crescimento das bactérias não tratadas
OD trat.	Média das absorvâncias de crescimento das bactérias tratadas

RESUMO

GOIS, Larissa de Souza. **Atividade antimicrobiana e antibiofilme de óleos essenciais de *Lippia gracilis* Schauer e seus compostos majoritários sobre fitopatógenos do gênero *Xanthomonas* spp. resistentes ao cobre.** São Cristóvão: UFS, 2022. 70p. (Dissertação–Mestrado em Agricultura e Biodiversidade).*

O gênero *Xanthomonas* é formado por fitobactérias gram-negativas que produzem biofilme e são responsáveis por causar doenças em plantas de importância econômica. Dentre estas doenças, destacam-se a podridão-negra das crucíferas, barriga d'água do melão, gomose da cana-de-açúcar, estria bacteriana do milho e bacterioses da mandioca e ameixa. Mediante a necessidade de novas alternativas para o tratamento dessas doenças, têm se estudado os óleos essenciais (OEs) que são metabólitos secundários de plantas que apresentam variadas atividades biológicas como a atividade antibacteriana. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme de óleos essenciais (OEs) de sete acessos de *Lippia gracilis* Schauer (LGRA-106, 107, 108, 109, 110, 201 e 202) obtidos por meio da técnica de hidrodestilação e de seus compostos majoritários timol e carvacrol, bem como a resistência ao cobre, sobre cinco espécies de fitobactérias do gênero *Xanthomonas*: *Xanthomonas campestris* pv. *melonis*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vasculorum*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Pela utilização de técnicas espectrofotométricas foram avaliados *in vitro* a CMI (Concentração Mínima Inibitória), CMB (Concentração Mínima Bactericida), atividade antibiofilme, viabilidade celular, permeabilização da membrana plasmática, resistência ao sulfato e óxido de cobre e a avaliação morfológica do biofilme em microscopia eletrônica de varredura. O estudo *in vivo* foi conduzido em estufa agrícola e foi avaliada a influência do óleo essencial do acesso LGRA-107 previamente selecionado por apresentar maior atividade bacteriostática e bactericida para *X. campestris* pv. *campestris* e o do óxido de cobre sobre as variáveis número de folhas, biomassa e incidência e severidade de plantas das variedades couve-manteiga (Geórgia) e couve-brócolis (Ramoso Santana) inoculadas com *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Os experimentos *in vitro* foram realizados em duplicata com três repetições. Para o experimento *in vivo*, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x3, dois métodos de inoculação (injetado e borrifado), três substâncias (duas concentrações do OE do acesso LGRA-107 – 250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; e uma concentração de óxido de cobre - 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$). DMSO a 1% foi utilizado como controle. Para análise de severidade e incidência da doença, utilizou-se uma escala de notas de 0 a 5 e as avaliações foram realizadas durante o período de 15 dias. A concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos OEs dos acessos de LGRA e os compostos majoritários timol e carvacrol nas concentrações entre 250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, demonstraram atividade bacteriostática e bactericida e promoveram aumento da permeabilidade da membrana plasmática das células bacterianas. Os OEs de todos os acessos, assim como os compostos majoritários e o óxido de cobre, apresentaram atividade antibiofilme para as cinco fitobactérias, no entanto esta atividade não foi observada para o sulfato de cobre. Como o resultado do experimento *in vivo*, a couve manteiga quando exposta ao óxido de cobre obteve maiores valores de biomassa fresca e a couve brócolis obteve maior número de folha. A partir dos resultados encontrados nesse estudo foi possível observar que os óleos essenciais dos acessos LGRA-109, LGRA-201 e LGRA-107 obtiveram maior atividade antimicrobiana e são promissores para o controle de fitobactérias do gênero *Xanthomonas* spp.

Palavras-chave: Verbenaceae, metabólitos secundários, biofilme bacteriano, bacterioses.

* Comitê Orientador: Roberta Miranda Pereira Fernandes – UFS (Orientador).

ABSTRACT

GOIS, Larissa de Souza. **Antimicrobial and antibiofilm activity of essential oils from *Lippia gracilis* and their major compounds against copper-resistant phytopathogens of the genus *Xanthomonas* spp.** São Cristóvão: UFS, 2022. 70p. (Thesis - Master of Science in Agriculture and Biodiversity).*

The genus *Xanthomonas* is formed by gram-negative phytophacteria that produce biofilms and that cause diseases in plants of economic importance. Prominent diseases include black rot of crucifers, water belly of melon, gummosis of sugar cane, bacterial leaf streak of corn, and bacteriosis of cassava and plum. Due to the need for new alternatives for treatment of these diseases, essential oils (EOs) have been studied, which are plant secondary metabolites that have different biological activities, such as antibacterial activity. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial and antibiofilm activity of EOs from seven accessions of *Lippia gracilis* Schauer (LGRA-106, 107, 108, 109, 110, 201, and 202) obtained through the hydrodistillation technique and their major compounds thymol and carvacrol, as well as evaluate copper resistance in five species of phytophacteria of the genus *Xanthomonas*: *Xanthomonas campestris* pv. *melonis*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vasculorum*, and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Using spectrophotometric techniques, Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC), antibiofilm activity, cell viability, plasma membrane permeabilization, and resistance to sulfate and copper oxide were evaluated; and the biofilm was morphologically examined under microscopy *in vitro*. scanning electronics. The *in vivo* study was carried out in an agricultural greenhouse. The effect of the EO from the LGRA-107 accession (previously selected for its greater bacteriostatic and bactericidal activity against *X. campestris* pv. *campestris*) and the effect of copper oxide were examined on two varieties of kale plants (Georgia and Ramoso Santana) inoculated with *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* regarding the following variables: number of leaves, biomass, and incidence and severity of disease. The *in vitro* experiments were performed in duplicate with three replications. For the *in vivo* experiment, a completely randomized design was used in a 2 × 3 factorial arrangement, constituted by two inoculation methods (injected and sprayed) and three substances (two concentrations of EO from the LGRA-107 accession – 250 and 500 µg mL⁻¹, and a copper oxide concentration – 2000 µg mL⁻¹). A control of 1% DMSO was also used. For analysis of disease severity and incidence, a scoring scale from 0 to 5 was used, and evaluations were carried out over a period of 15 days. The concentration of 1000 µg mL⁻¹ of EOs from LGRA accessions and the major compounds thymol and carvacrol at concentrations between 250 and 500 µg.mL⁻¹, respectively, demonstrated bacteriostatic and bactericidal activity and led to an increase in cell plasma membrane permeability bacterial. The EOs of all accessions, as well as the major compounds and copper oxide, showed antibiofilm activity for the five phytophacteria. However, this activity was not observed for copper sulfate. As the result of the *in vivo* experiment, kale, when exposed to copper oxide, obtained higher values of fresh biomass, and broccoli kale had higher leaf numbers. The results of this study showed that the essential oils of the accessions LGRA-109, LGRA-201, and LGRA-107 had greater antimicrobial activity and are promising for control of phytophacteria of the genus *Xanthomonas* spp.

Keywords: Verbenaceae, secondary metabolites, bacterial biofilm, resistance, bacteriosis.

* Advisory Committee: Roberta Miranda Pereira Fernandes – UFS (Advisor). Instituição.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A *Lippia gracilis* Schauer é uma espécie vegetal pertencente ao gênero *Lippia* e à família das verbenaceae. Este gênero possui aproximadamente 200 espécies que se distribui na América do Sul e Central, e na África tropical. No Brasil este gênero abriga cerca de 120 espécies que se distribuem principalmente no Nordeste e no Cerrado nos estados de Goiás, Minas Gerais, Bahia, Sergipe e Alagoas. Este vegetal é classificado botanicamente como um arbusto, herbáceo de 25 cm de altura, ramificado, com folhas pequenas e brancas odoríferas (LORENZI e MATOS *et al.*, 2002; MARRETO *et al.*, 2008; MORAES *et al.*, 2018).

Esta planta aromática é nativa do Nordeste brasileiro conhecida como alecrim-de-tabuleiro, seu óleo essencial possui diversas aplicações, algumas características desta espécie vêm sendo estudadas como seu potencial agrônomo, constituição química dos óleos essenciais e seu potencial no desenvolvimento de carrapaticidas, fungicidas e inseticidas biológicos (BLANK, 2013). Estudos recentes vêm demonstrando a atividade antimicrobiana de *L. gracilis* sobre bactérias, além da ação contra protozoários como a ameba e antileishmania, ação antitumoral e antidiabetes, provavelmente devido à presença de compostos como timol e carvacrol (RAGAGNIN *et al.*, 2014; PINHEIRO, 2021; NETO *et al.*, 2010; MELO *et al.*, 2013; MELO *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2016).

O gênero *Xanthomonas* é formado por fitopatógenos gram-negativos, uniflagelar, que produzem biofilme. Estes fitopatógenos podem causar doenças em pelo menos 124 monocotiledôneas e 268 eudicotiledôneas. Nas plantas, órgãos como caules, galhos, folhas, flores, brotos, frutos e sementes podem ser colonizados por *Xanthomonas* (HAYWARD, 1993 SHARMA; GAUTAM; WADHAWAN, 2014).

Dentre estas doenças se destacam a podridão-negra, principal doença que acomete a família das brássicas, cancro cítrico (*Xanthomonas citri* subs *citri*), uma das principais doenças do citrus, o crestamento do arroz (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*), estria bacteriana do milho e a gomose da cana-de-açúcar (*Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*) e a barriga d'água do meloeiro (*Xanthomonas campestris* pv. *melonis*), a bacteriose da mandioca (*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*) e ameixa (*Xanthomona arboricola* pv. *pruni*) (BERIAN e OCCHIENA, 2018; ORTIZ-CASTRO *et al.*, 2020; TIMILSINA *et al.*, 2020; DUBROW e BOGDANOVE, 2021).

Um dos grandes fatores de resistência destes fitopatógenos é o biofilme, formado por associações complexas entre bactérias, que conferem benefícios para estes organismos como proteção, resistência a antibióticos e maior virulência (O'TOOLET *et al.*, 2000). Atualmente os métodos de controle mais utilizados contra fitobactérias são os antibióticos e as formulações à base de cobre, porém o uso de forma errada destes compostos pode provocar maior resistência aos patógenos e problemas ambientais e de saúde pública (BAHARVAND-AHMADI *et al.*, 2017).

Silva *et al.* (2019) ao estudarem a ação do óleo essencial de *L. gracilis* sobre a fitobactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, agente casual da podridão negra das crucíferas, doença mais importante das brássicas, puderam confirmar a atividade antimicrobiana e antibiofilme destes óleos, assim como dos seus compostos majoritários timol e carvacrol sobre a membrana bacteriana.

Diante disto, uma alternativa a ser explorada são as moléculas oriundas do metabolismo secundário de plantas como os óleos essenciais, que são compostos voláteis que possuem atividade antimicrobiana e antibiofilme sobre bactérias patogênicas agindo sobre o metabolismo, regulação enzimática e alteração da membrana celular (CORDEIRO, 2014; TOFIÑO-RIVERA *et al.*, 2016).

Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme de óleos essenciais de diferentes acessos de *L. gracilis* e seus compostos majoritários, e diferentes fontes de cobre sobre cinco espécies de *Xanthomonas* spp.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Óleo essencial: produto oriundo do metabolismo secundário das plantas

Ao longo do período evolutivo as plantas desenvolveram mecanismos de adaptação e defesa oriundos do metabolismo secundário, os compostos produzidos através destes metabolismos estão associados ao seu mecanismo de defesa, proteção e atração de insetos polinizadores, algumas plantas desenvolveram alguns mecanismos de defesa contra insetos e adaptação ao estresse ambiental, toxinas contra a herbívora ou a disputa com outras plantas denominada alelopatia (BUCHBAUER e HEMETSBERGER, 2015; RIFFEL e COSTA, 2015; BRANCO, 2020).

O metabolismo secundário das plantas produz compostos denominados flavonoides, saponinas, taninos, alcaloides e terpenoides. Os óleos essenciais são ricos em terpenos, que são substâncias voláteis e podem ser classificadas como monoterpenos, sesquiterpenos benzenoides, fenilpropanoides, entre outros, a depender da quantidade de agrupamentos de carbonos denominados isoprenos (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

Os óleos essenciais são formados por um complexo de moléculas, que são produzidos em estruturas específicas como tricomas glandulares, estes fitoquímicos são derivados de correlações entre rotas metabólicas, primárias e secundárias. Podem ser extraídos de diversas estruturas da planta como folhas, caule, raízes, flores e frutos. Estas substâncias são produzidas por três vias do metabolismo secundário: ácido chiquímico, malonato e mevalonato (CORAZZA, 2010).

Plantas aromáticas são vegetais que exalam aromas de suas partes constituintes. São muito utilizadas na aromaterapia e indústrias de bebidas, alimentos e cosméticos, os compostos responsáveis pelo aroma são oriundos do metabolismo secundário e essas plantas produzem óleos denominados óleos essenciais, estes podem ser extraídos de várias partes da planta através de processos como a hidrodestilação e o arraste de vapor (HABER e CLEMENTE, 2013; EHLERT *et al.*, 2006).

Os óleos essenciais de diversas espécies têm sido estudados pelo aroma e por propiciar sabor aos alimentos e bebidas. Nos últimos anos, a visibilidade por essas substâncias é crescente, por serem produtos naturais, os quais são aceitos com mais facilidade pelos consumidores, pelo possível fato de não conferirem riscos à saúde e por apresentarem propriedades multifuncionais (BRITO *et al.*, 2014).

Estes apresentam grande importância econômica no Brasil e inúmeras aplicações para a indústria cosmética, farmacêutica, pois as diversas classes de metabólitos secundários conferem a este produto natural ações biológicas importantes. Dentre estes benefícios destaca-se a aromaterapia, em que o óleo essencial é utilizado para o tratamento de doenças e a fabricação de medicamentos naturais (CAVALEIRO, 2017).

O Brasil é o terceiro maior exportador de óleos essenciais do mundo, com foco na produção de óleos essenciais de laranja, limão, eucalipto, pau-rosa, capim-limão e outros (MORAIS *et al.*, 2012). Ainda assim, existem alguns problemas a serem considerados na produção nacional, como o extrativismo, a falta de manejo e sazonalidade na concentração e quantidade dos compostos presentes nos óleos essenciais (BIZZO *et al.*, 2009; FERRAZ *et al.*, 2009).

A produção de plantas aromáticas apresenta aspectos técnicos e requer estudos agronômicos relacionados à produção do óleo essencial que podem definir a sua viabilidade econômica. Estes estudos agronômicos são importantes, pois muitas dessas plantas têm sido alvo de demandas industriais e comerciais, constituindo uma nova fonte de renda para os agricultores (SANTOS *et al.*, 2016).

Outra característica importante é atribuída à composição do óleo essencial que pode mudar de acordo com fatores genéticos, onde a base genética determina a produção de um grupo específico de moléculas que são características de cada espécie vegetal. A composição dos óleos essenciais pode variar também de acordo com a idade da planta, a maturidade das folhas e o

estádio de desenvolvimento, as características ambientais e podem variar de acordo com a época colhida e a origem geográfica (CRUZ *et al.*, 2014; MASA *et al.*, 2016; SCHINDLER *et al.*, 2018).

Dentre as inúmeras propriedades conferidas aos óleos essenciais é possível destacar a antimicrobiana, antifúngica, antioxidante e inseticida (SAMPAIO *et al.*, 2020; SOUZA *et al.*, 2020; FRANÇA *et al.*, 2021). Destacando a atividade antimicrobiana, com estudos da atividade antibacteriana de OEs sobre fitobactérias do gênero *Xanthomonas* (SILVA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2020; MATA *et al.*, 2021; CHUNG *et al.*, 2022).

Os produtos naturais, oriundos do metabolismo secundário das plantas, puros como o óleo essencial ou em forma de extratos, são fonte de produção de novos produtos devido a sua diversidade química. Os antimicrobianos de origem vegetal diferem dos derivados de microrganismos por terem como características a regulação do metabolismo intermediário do patógeno, podendo agir sobre reações enzimáticas e sobre a estrutura de membranas (CORDEIRO, 2014; TOFIÑO-RIVERA *et al.*, 2016).

Desta forma, estudos relacionados à variedade de compostos oriundos do metabolismo secundário de plantas e suas aplicações no controle alternativo de fitopatógenos são uma ferramenta importante, visto que estas substâncias apresentam como vantagem amplas possibilidades de aplicação, menor contaminação ambiental, fornecendo menor risco à saúde animal e humana (BAHARVAND-AHMADI *et al.*, 2017).

Por conta disto, fazem-se necessários estudos de plantas aromáticas, suas aplicações, conservação e prospecção. Uma das técnicas de conservação são os BAGs (Bancos Ativos de Germoplasma). Um dos exemplos é o Banco Ativo de Germoplasma de Plantas Medicinais e Aromáticas da Universidade Federal de Sergipe que tem como intuito a conservação e o estudo de recursos genéticos da espécie *Lippia gracilis* Schauer, nativa do Nordeste brasileiro conhecida como alecrim-de-tabuleiro, seu óleo essencial possui diversas aplicações, algumas características desta espécie vêm sendo estudadas, como seu potencial agrônomo, constituição química dos óleos essenciais e seu potencial no desenvolvimento de carrapaticidas, fungicidas e inseticidas biológicos (BLANK, 2013).

2.2 Óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer

A *Lippia gracilis* é uma espécie vegetal pertencente ao gênero *Lippia* que pertence à família das verbenaceae. Este gênero possui aproximadamente 200 espécies que se distribui na América do Sul e Central, e também na África tropical. Um dos principais centros de distribuição deste gênero é o Brasil e o México (GOMES *et al.*, 2011; MORAES *et al.*, 2018).

No Brasil este gênero compreende cerca de 120 espécies que se distribuem principalmente no Nordeste e no Cerrado brasileiro, os principais estados em que se pode encontrar essa espécie são: Goiás, Minas Gerais, Bahia, Sergipe e Alagoas. Este vegetal é classificado botanicamente como um arbusto, herbáceo de 250 cm de altura, ramificado, com folhas pequenas e flores brancas odoríferas (LORENZI e MATOS *et al.*, 2002; MARRETO *et al.*, 2008; GOMES; NOGUEIRA; MORAIS, 2011).

Conhecida popularmente como alecrim-de-tabuleiro ou alecrim-de-chapada, esta espécie possui propriedades fitoterápicas amplamente utilizadas na medicina tradicional, no tratamento de enfermidades relacionadas às inflamações no trato respiratório como: sinusite, gripe, tosse e bronquite, suas folhas são amplamente utilizadas como antisséptico no tratamento de dermatites, acne, seborreia e queimaduras (MATOS, 1998, 1999, 2002; PASCUAL *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2011).

Suas folhas contêm grandes quantidades de óleos essenciais contendo fitoquímicos, como os monoterpenos estruturados γ -terpineno (25), *p*-cimeno (26), carvacrol (27), timol (28) e timol metil éter (29) e sesquiterpenos como (E)-cariofileno (30). A composição química desta espécie pode variar de acordo com sua distribuição geográfica, por exemplo, no Uruguai o composto majoritário mais frequente é o linalol, já na Colômbia os compostos majoritários mais

presentes são o citral, carvona e limoneno (LORENZO *et al.*, 2001; STASHENKO; JARAMILLO; MARTINEZ, 2004; MORAES *et al.*, 2018).

No Brasil os principais compostos majoritários encontrados em estudos são o carvacrol e timol, seguidos de outros compostos que podem variar de acordo com sua origem geográfica, genética, idade e época de colheita, por exemplo, nos estados do Nordeste os compostos majoritários variam entre carvacrol e timol (MORAES *et al.*, 2018).

No estado de Sergipe, na região de Tomar do Geru, os compostos majoritários mais encontrados são o carvacrol seguido do timol, porém os OEs do acesso LGRA-106 apresentam maior porcentagem de timol quando comparados aos demais acessos, isso se dá a fatores genéticos (SANTOS *et al.*, 2016a; CRUZ *et al.*, 2014). Estudos científicos demonstram diferença entre a composição dos OEs de *L. gracilis* de acordo com o local de origem e o modo de destilação. Já no estado do Maranhão, no Parque Nacional de Mesas, uma espécie atípica de *L. gracilis* apresentou como compostos majoritários o 1,8-cineol e γ -terpineol em altas concentrações (MORAES *et al.*, 2017; CRUZ *et al.*, 2014; DIAS *et al.*, 2015). Esta variação na composição química destes óleos se dá principalmente devido a fatores ambientais como época de plantio, sazonalidade, nutrição mineral, composição do solo e déficit hídrico (REZENDE *et al.*, 2011; CRUZ *et al.*, 2014; SOARES e TAVARES-DIAS, 2013; APARICÍO, 2022).

Estes compostos estão envolvidos na proteção da planta contra fatores ambientais, e contra o ataque de insetos e microrganismos fitopatogênicos. Além de ter ação nas interações planta-patógeno e na sua defesa como na liberação de voláteis que atraem inimigos naturais (ALBUQUERQUE *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2022).

Atualmente muitos estudos na área da biotecnologia e saúde vêm demonstrando a ação do óleo essencial de *Lippia* contra microrganismos como fungos como a *Candida* spp. (FARIAS *et al.*, 2012) e bactérias de alimentos (AZEVEDO *et al.*, 2014) e bactérias multirresistentes (SOARES, 2010; PINHEIRO, 2021), além da ação contra protozoários como a ameba e antileishmania, ação antitumoral e antidiabetes (NETO *et al.*, 2010; MELO *et al.*, 2013; MELO *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2016) provavelmente devido à presença de compostos como timol e carvacrol (ALBUQUERQUE *et al.*, 2012; RAGAGNIN *et al.*, 2014; CARVALHO *et al.*, 2013; CRUZ *et al.*, 2013). Além disso, estes óleos possuem atividade antibiofilme tanto para fungos como para bactérias, acredita-se que os óleos tenham ação na membrana desses organismos devido a sua natureza lipofílica, agindo assim na integridade da membrana deixando a membrana das células bacterianas mais fluidas, abrindo canais promovendo o extravasamento e a desorganização celular (BERTINI *et al.*, 2005; FERNANDES *et al.*, 2015). A ação antimicrobiana dos óleos essenciais também pode estar relacionada à inativação de algumas enzimas, incluindo aquelas envolvidas na produção de energia e síntese de componentes estruturais (LAMBERT *et al.*, 2001; ZAMORA *et al.*, 2018; TORRES NUÑEZ, 2018).

Nas ciências agrárias os estudos de *L. gracilis* estão associados à caracterização dos compostos químicos e suas aplicações na agricultura, assim como também a caracterização de diferentes fitoquímicos presentes no óleo essencial de diferentes acessos de *L. gracilis*, nos processos de obtenção e destilação destes óleos e na produção e conservação destas plantas. Uma das principais áreas de estudo dentro das ciências agrárias é a fitossanidade no combate a insetos (TELES *et al.*, 2010; MELO *et al.*, 2018) e fungos de pós-colheita como *Aspergillus* e *Penicillium* (PORTILLO-RUIZ *et al.*, 2012). Há também relatos de estudo do óleo essencial de *Lippia gracilis* sobre ácaros que são pragas de difícil controle na agricultura (MENEZES, 2016) e ectoparasitas que causam doenças em animais como o carrapato (CRUZ *et al.*, 2013; CHAGAS *et al.*, 2016).

O estudo de Oliveira *et al.* (2021) demonstrou que o óleo essencial de *L. gracilis* e os compostos majoritários timol e carvacrol apresentaram atividade antifúngica e antibiofilme sobre fungos fitopatogênicos de difícil controle como os das espécies: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum lindemuthianum*.

Trabalhos recentes vêm demonstrando a atividade antibacteriana e antibiofilme do extrato e do óleo essencial de *Lippia grata* sobre microrganismos patogênicos, em particular a bactéria patogênica *Pseudomonas aeruginosa* (MACÊDO, 2019). O trabalho realizado por Bitu *et al.* (2012) demonstrou que o óleo essencial de *L. gracilis* mostrou atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Dentre os microrganismos relacionados à infecção gastrointestinal, *E. coli* apresentou a maior sensibilidade aos compostos testados.

Outros trabalhos com óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer vem demonstrando sua atividade antimicrobiana e ação sobre o biofilme de bactérias que causam doenças humanas.



Figura 1: Foto de *Lippia gracilis* Schauer, banco de germoplasma da UFS. Fonte: autor (2022).

2.3 Doenças causadas pelo gênero *Xanthomonas*

O gênero *Xanthomonas* é formado por fitopatógenos gram-negativos, as bactérias deste gênero apresentam formato de bastonete, uniflagelar, apresentam colônias de coloração amarela e formação de biofilmes, com temperatura ótima de crescimento entre 25 e 30 °C, o gênero compreende 36 espécies que podem causar doenças graves em 400 espécies de vegetais (DARRASSE *et al.*, 2013; PARTE, 2018).

Estes fitopatógenos podem causar doenças em pelo menos 124 monocotiledôneas e 268 eudicotiledôneas (HAYWARD, 1993). Nas plantas, órgãos como caules, galhos, folhas, flores, brotos, frutos e sementes podem ser colonizados por *Xanthomonas* (SHARMA; GAUTAM; WADHAWAN, 2014).

Dentre estas espécies destacam-se algumas doenças bacterianas em plantas de grande importância agrícola como a podridão negra (*X. campestris* pv. *campestris*), principal doença que acomete a família das brássicas, o cancro cítrico (*X. citri* subs *citri*), uma das principais doenças do citrus, o crestamento do arroz (*X. oryzae* pv. *oryzae*), estria bacteriana do milho (*X. vasicola* pv. *vasculorum*) e a barriga d'água do meloeiro (*X. campestris* pv. *melonis*) (TIMILSINA *et al.*, 2020).

As principais formas de entrada das fitobactérias nas plantas são através dos hidatódios no processo denominado de gutação, através dos estômatos, aberturas naturais e ferimento (RYAN *et al.*, 2011; PASCHOLATI e DALIO, 2018). Após penetrar a planta, estas fitobactérias são capazes de colonizar os vasos do xilema, assim desencadeando todo o processo de patogenicidade, degradando a parede da célula vegetal através de enzimas como as PMGE (pectinas esterases) que são capazes de degradar a pectina presente na célula vegetal, impossibilitando a venda do produto devido a sua baixa aceitação comercial (UENOJO e PASTORE, 2007; MANSFIELD *et al.*, 2012).

Os sintomas dessa colonização podem incluir manchas, apodrecimento, hipertrofia, hiperplasia, cancos e até a morte foliar. Algumas doenças, como a podridão negra e murcha bacteriana apresentam sintomas característicos. A podridão negra, por exemplo, caracteriza-se por lesões amarelas em forma de “V”, iniciando-se nas margens das folhas e progredindo para

o centro através do tecido vascular, resultando geralmente em necrose das folhas (MORRONI *et al.*, 2013).

As principais formas de sobrevivência e disseminação destes patógenos estão relacionadas a sua sobrevivência em restos de culturas, podendo se alojar em sementes, no solo na matéria orgânica e na forma epífita na superfície de plantas infectadas e através de hospedeiros secundários (MARINGONI, 2005; SILVA JÚNIOR, 2020; SILVA *et al.*, 2021).

Em relação ao tipo e variedade do hospedeiro, cada espécie *Xanthomonas* é tipicamente restrita a uma única ou poucas plantas, geralmente da mesma família botânica, por exemplo, a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* que é exclusivamente um patógeno vascular do arroz. Poucos patovares apresentam uma ampla gama de hospedeiros como *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), que infecta espécies cultivadas, ornamentais e silvestres de toda a família Brassicaceae (RYAN *et al.*, 2011).

Barriga d'água do meloeiro (*Xanthomonas. campestris* pv. *melonis*)

O melão *Cucumis melo* L é um fruto de grande importância econômica, com produção de 29,46 milhões de toneladas e produtividade média de 24,85 tha⁻¹ (FAO, 2015). Mundialmente os maiores produtores de melão são a China, Turquia, Irã e os Estados Unidos. O Brasil ocupa a 10^a posição, com produção total de 565.900 t ha⁻¹, a região Nordeste correspondeu a 95,0% da produção total nacional, entre os estados brasileiros destaca-se o Rio Grande do Norte, e o Ceará mantêm a liderança em área e produção, tendo produzido juntos em 2013, 82,5% do total produzido no país, a maior parte dessa produção é destinada à exportação (COSTA e SALVIANO, 2017).

A barriga d'água do melão causada pela espécie *Xanthomonas. campestris* pv. *melonis* é uma doença ainda pouco estudada. Foi relatada pela primeira vez no Brasil no estado de São Paulo na região de Presidente Prudente onde ocasionou grandes perdas (ROBBS e RODRIGUES NETO, 1986). Porém esta doença já tem registro em todas as regiões do país, no Nordeste vem sendo relatada desde o ano de 1991, no estado do Rio Grande do Norte (VIANA *et al.*, 2001).

Os sintomas característicos da doença são a descoloração da polpa seguida por sintomas de apodrecimento, quando os frutos inteiros de melão são agitados, percebe-se, em seu interior, um ruído de substâncias aquosas com liquefação dos tecidos, formando uma bolsa no interior da cavidade. Em estágios mais avançados percebe-se a presença de outros microrganismos oportunistas. Visualmente a doença é difícil de identificar, tendo em vista que o único sintoma é a anomalia na casca proveniente da entrada do patógeno (VIANA *et al.*, 2010; BERIAN *et al.*, 2018).

Estudos moleculares recentes sobre estes fitopatógenos resistentes ao cobre isolados de folhas de brássicas contaminadas com a podridão negra das crucíferas por *X. campestris* pv. *campestris* demonstram sinergismo entre as duas fitobactérias e alguns genes envolvidos na virulência destes fitopatógenos (RAMNARINE; JAYARAMAN; RAMSUBHAG *et al.*, 2022). Porém existem ainda poucos estudos sobre *X. campestris* pv. *melonis* e os métodos de controle, os genes de resistência ao cobre e o uso de substância bioativas.

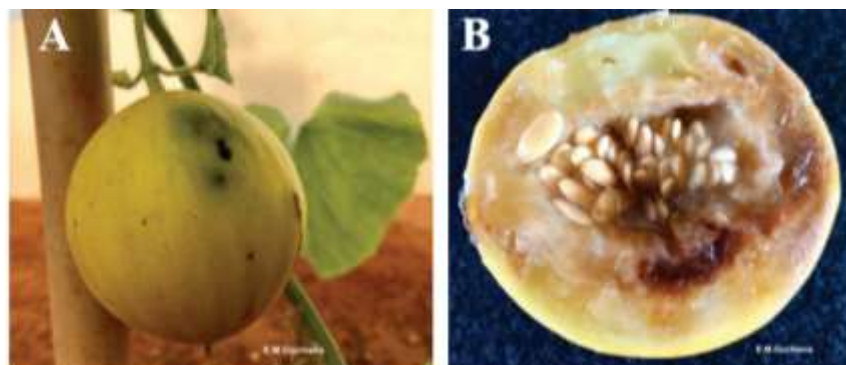


Figura 2: Sintomas da barriga d'água do melão. A) Sintomas pré-colheita e B) Sintomas no fruto maduro. Fonte: BERIAN e OCCHIENA (2018) <https://doi.org/10.7476/9786586383010.0008>

Bacteriose da mandioca (*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*)

A mandioca, *Manihot esculenta*, pertence à família Euphorbiaceae e seu centro de origem é a América do Sul. Ao longo dos anos a raiz da mandioca vem servindo como fonte de carboidratos para as populações. O Brasil já foi o segundo maior produtor de mandioca, ficando atrás apenas da Nigéria (MATTOS *et al.*, 2006). Hoje encontra-se em quarto lugar, ficando atrás da Tailândia e Indonésia (CONAB, 2018).

Segundo a FAO, é um dos alimentos mais consumidos do mundo, alimentando mais de 700 milhões de pessoas no mundo inteiro, principalmente nos países mais pobres como os do continente africano (FAO, 2018).

A bacteriose da mandioca, causada pelo fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, se destaca como a principal doença da mandioca. Seu primeiro registro foi no ano de 1911 no Brasil, atualmente esta doença pode ser observada em todas as regiões do país que produzem mandioca. Há relatos também na América Central, Ásia e África (LORENZI *et al.*, 2002). Os principais sintomas incluem exsudação de goma nos tecidos mais novos, manchas angulares e de aparência aquosa nos folíolos, murcha das folhas e pecíolos, requeima das folhas e morte descendente, assim como também a necrose dos feixes vasculares levando a morte da planta (FUKUDA, 2002; FIALHO e VIEIRA, 2013).

A principal forma de disseminação da doença está ligada à sua propagação através de manivas infectadas e da água da chuva, permitindo assim a entrada do fitopatógeno através dos estômatos e hidatódios. A bacteriose da mandioca tem caráter sistêmico, afetando principalmente o sistema vascular da planta, desta forma métodos de controle curativos não demonstram sucesso (FIALHO e VIEIRA, 2013). Estudos recentes demonstram a importância de novos métodos de controle preventivos, como a descoberta de variedades resistentes e os genes de resistência envolvidos, tendo em vista o difícil controle desta bacteriose (SANDINO *et al.*, 2015).

Os principais métodos de controle aplicáveis a esta doença são os métodos preventivos e de controle cultural como o plantio de variedades resistentes à rotação de cultura, erradicação de plantas doentes e eliminação dos restos de cultura (FIALHO e VIEIRA, 2013).

Alguns métodos de controle utilizando compostos bioativos como o extrato de plantas vêm sendo estudados, porém com pouco sucesso devido ao difícil controle do fitopatógeno (ROSENBERGER *et al.*, 2020). Já estudos com extrato de própolis *Apis mellifera* L. apresentaram atividade antibacteriana sobre *X. axonopodis* pv. *manihotis* (PEREIRA *et al.*, 2020). Com base na importância alimentar e econômica da mandioca para pequenos agricultores e para a agricultura familiar, faz-se necessário o estudo de formas alternativas de controle da bacteriose da mandioca.

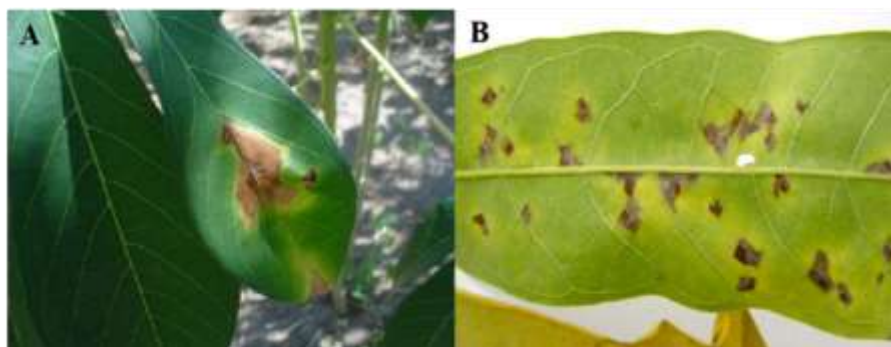


Figura 3: Bacteriose da mandioca. A e B) sintomas na folha da mandioca. Fonte: Halfeld-Vieira e Nechet (2010). Identificação e Manejo de Doenças da Mandioca em Roraima Embrapa

Mancha bacteriana da ameixa (*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*)

A bactéria *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, também chamada de Bacteriose, mancha bacteriana ou doença das rosáceas de caroço, é um fitopatógeno importante na produção de ameixeiras, pessegueiros e nectarineiras que pertencem ao gênero *Pruni* (EFSA, 2014).

No ano de 2021 a produção de ameixa no Brasil foi estimada em 50 mil toneladas, da qual o estado do Rio Grande do Sul é o maior produtor, respondendo por 42% do total nacional, enquanto o estado de Santa Catarina representa a segunda maior produção do país, responsável por 23,6%, isto é, com produção superior a 3,2 mil toneladas (EPAGRI, 2020). Quanto à produção nacional de pêssego, no ano de 2020 foi registrada a quantia de 201.880 toneladas, na qual o Rio Grande do Sul também representa o maior produtor, com 129.608 toneladas de frutos (IBGE, 2021).

Apesar da alta produção de ameixas e pessegueiros, a *X. arboricola* pv. *pruni* causa sintomas fitopatogênicos nos ramos, folhas e frutos que comprometem a produtividade das plantas na safra posterior. Quando os ramos são afetados, o desenvolvimento da bactéria é caracterizado pela formação inicial de lesões púrpuras, escuras, com aparência oleosa, que posteriormente formam fissuras longitudinais até se tornarem cancroses. Nas folhas, surgem pequenas manchas irregulares, encharcadas, que no decorrer do tempo mudam a coloração de verde escura para marrom escura, acarretando na formação de orifícios nas folhas, devido à queda do tecido necrosado, até causar a desfolha da planta. Enquanto nos frutos, observam-se manchas circulares, encharcadas, que se tornam marrom escura e deprimidas (Figura 4) (GARRIDO, 2016; NOGUEIRA *et al.*, 2016).



Figura 4. Sintomas de *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* em fruto. A) Pêssego, B) Folha de ameixeira e C) Frutos de ameixa. Fonte: Cambronerio *et al.* (2018).

<https://doi.org/10.1111/mpp.12679>

A severidade da *X. arboricola* pv. *pruni* no pomar depende principalmente de clima favorável para seu desenvolvimento e proliferação, como temperaturas altas, chuvas frequentes e ventos fortes. Para o controle da disseminação da fitobactéria, sugerem-se diversas práticas, como o uso de quebra-ventos na pré-instalação do pomar, evitar a escolha de locais suscetíveis a ventos fortes, plantio em solos arenosos, uso de variedades resistentes, além do controle químico recomendado para a cultura afetada (GARRIDO, 2016). Todos os anos a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) faz testes contínuos sobre a fenologia e características de variedades de ameixa, pêssego e nectarina resistentes à *X. arboricola* pv. *pruni* para a consulta em seu banco digital de dados (EPAGRI, 2020).

Estria do milho e gomose da cana-de-açúcar (*Xanthomonas*. *vasicola* pv. *vasculorum*)

O milho (*Zea mays*) e a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) são duas culturas de grande importância mundial, o Brasil se destaca como o maior produtor e exportador de cana-de-açúcar e o 3º maior produtor de milho e o 2º maior exportador de milho (USDA, 2020). Dentro destas culturas se destacam duas doenças importantes, a estria bacteriana do milho e a

gomose da cana-de-açúcar causadas pela fitobactéria *Xanthomonas. vasicola* pv. *vasculorum*, que causa doenças em diversas espécies da família das poaceas.

O primeiro relato de *X. vasicola* pv. *vasculorum* foi feito pelo cientista alemão F.M. Draenert no ano de 1863 no Brasil, especificamente no estado da Bahia na cultura da cana-de-açúcar, ela foi descrita também mais tarde no estado de Pernambuco em 1880 causando grandes prejuízos aos engenhos.

Na cana-de-açúcar a doença é denominada de gomose e os principais sintomas incluem presença de exsudação de goma no caule, deformação do colmo, descoloração interna e a formação de bolsas de goma contendo bactérias (MCFARLANE e COUTINHO 2010).

A primeira ocorrência documentada da estria do milho foi feita na África do Sul no ano de 1949 (DYER, 1949) e 1987 (COUTINHO, 1987). Nos Estados Unidos a sua ocorrência foi descrita no ano de 2016, porém relatos apontam sua ocorrência desde 2014, onde pode-se observar a estria bacteriana em milho de pipoca e milho verde (KORUS *et al.*, 2017). Apesar deste fitopatógeno ter sido documentado pela primeira vez no Brasil na cana-de-açúcar, apenas no ano de 2018 sua ocorrência no milho foi descrita (LEITE *et al.*, 2018).

Apesar de terem características distintas de infecção onde a *X. vasicola* pv. *vasculorum* em cana-de-açúcar pode infectar o tecido vascular, enquanto as cepas infectantes do milho são limitadas ao tecido foliar, estudos demonstram que as duas doenças são causadas por fitobactérias da mesma espécie (WASUKIRA *et al.*, 2014; KARAMURA *et al.*, 2015; LANG *et al.*, 2017).

No milho a doença é caracterizada pela presença de estrias internervais nas folhas, que evoluem para o centro da folha causando necrose no tecido foliar e consequentemente diminuição da área fotossintética da planta, os primeiros sintomas são observados nas folhas inferiores da planta e evoluem para o dossel médio a superior (ORTIZ-CASTRO *et al.*, 2020).

Além de sobreviver em restos de culturas, a bactéria sobrevive em diversos hospedeiros secundários assintomáticos como grama de trigo ocidental (*Pascopyrum smithii*), bromo felpudo (*Bromus tectorum*) e festuca alta (*Festuca arundinacea*). Além de causar doença em diversas espécies da família das poaceas de grande importância econômica como aveia (*Avena sativa*) e arroz (*Oryza sativa*) (HARTMAN *et al.*, 2020).

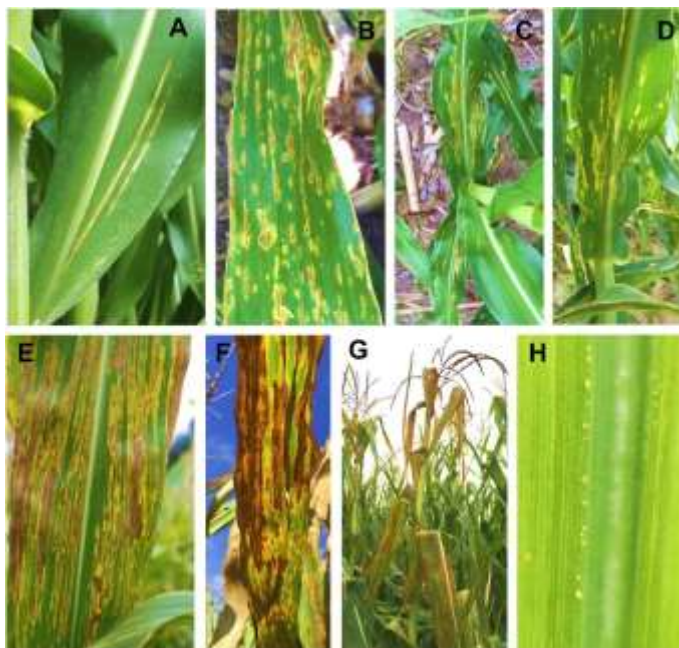


Figura 5: Sintomas de estrias bacterianas nas folhas de milho, incluindo: A) desenvolvimento de lesões de estrias precoces, B) desenvolvimento de lesões de pequenas manchas, C) e D) desenvolvimento de sintomas começando na base da planta progredindo resultando em lesões nas folhas E), F) e G) coalescendo lesões graves nas folhas superiores e H) sinais de gotículas

bacterianas de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* desde o desenvolvimento inicial da lesão. Fonte: Ortiz-Castro *et al.* 2020 <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-20-0018-PER>

Podridão negra das crucíferas (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)

A família das brassicaceae é considerada a família de vegetais que fornece maior diversidade de produtos usados pelo homem, todas as suas partes podem ser aproveitadas, folha, caule, flor e raízes, processados, frescos ou cozidos. Coletivamente, vegetais frondosos, florais e radiculares podem ser consumidos frescos, cozidos e processados (MELO *et al.*, 2019). Além disso, estes vegetais são ricos em minerais e vitaminas vitais para saúde do homem destacando-se pelo teor de fibras alimentares, cálcio, magnésio, manganês, fósforo, potássio e vitaminas A, B1, B2, B3 e C (LANA e TAVARES, 2021).

A produção mundial de couve brócolis foi de 26.918.570 t, com a produtividade média de 18,73 t/ha. A China se destaca como maior produtor mundial de couve comum e couve brócolis, no Brasil a produção de couve comum chegou a 161.986 t, e a produção de couve brócolis foi de 140.067 t, os estados com maior produção são: São Paulo, Rio de Janeiro e Paraná (SANTOS; CARMO; RIBEIRO, 2022; IBGE, 2017). Uma das grandes limitações da produção das brássicas são as pragas agrícolas, na cultura da couve comum e da couve brócolis podemos destacar a podridão negra das crucíferas.

A podridão negra das crucíferas é causada pela fitobactéria *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc), é a doença mais importante da família. O primeiro relato desta doença foi descrito por Garman em 1890, na cultura do repolho no estado de Kentucky (ALVAREZ, 2000). No ano de 1985 Pammel demonstrou em campos de nabo no estado de Iowa que esta fitobactéria tinha caráter fitopatogênico (VICENTE e HOLUB, 2013).

A Xcc é uma bactéria fitopatogênica Gram-negativa, com aspecto celular do tipo bastonete, são aeróbias, seu crescimento em meio de cultura é liso, circular e mucoide com coloração amarela devido à produção de pigmentos amarelos denominados xantomonadinas (ANDRADE *et al.*, 2005; MORRONI *et al.*, 2013).

No Brasil a doença está presente em todas as regiões em diferentes culturas da família das Brássicas, como o repolho *Brassica oleracea* var. *capitata*, a couve comum *Brassica oleracea* var. *acephala* e a couve-flor comum *Brassica oleracea* var. *botrytis* (MALAVOLTA *et al.*, 2008).

Uma das principais características da doença é a formação de lesões cloróticas e necróticas em formato de “V”, que tem início na borda das folhas e progride até a nervura central, se desenvolvendo no xilema da planta e causando a queda prematura de folhas, murcha em decorrência da obstrução dos vasos e necrose dos tecidos foliares (MONTEIRO *et al.*, 2005; DUBROW e BOGDANOVE, 2021).

Alguns estudos vêm demonstrando como esta fitobactéria infecta a planta e como a planta responde a essa infecção, ao entrar na planta a bactéria se estabelece nos feixes vasculares, retirando nutrientes da nervura causando hipertrofia ou hiperplasia na região infectada, formando assim um halo clorótico (VELASCO *et al.*, 2013).

Ao desenvolver-se sistemicamente na planta, estas fitobactérias desenvolvem colônias e formam agregados na parede interna dos vasos condutores de seiva, ocasionando a obstrução e bloqueando o transporte de seiva (AKIMOTO-TOMIYAMA; FURUTANI; OCHIAI, 2014).

Dentre os métodos de controle destacam-se o controle químico com aplicações de produtos à base de cobre na parte aérea das plantas, formando assim uma camada protetora (O'BRIEN, 2017). Uns dos exemplos são a calda bordalesa e sulfo-cálcica, óxidos cuprosos e antibióticos como a oxitetraciclina e estreptomicina (ANDREI, 2005).

Atualmente não existe nenhum produto registrado para controle da podridão negra das crucíferas na cultura da couve e dos brócolis (AGROFIT, 2022). Diante disto faz-se necessário o estudo de moléculas bioativas com atividade antimicrobiana e que causem menos danos à saúde do homem e ao meio ambiente para a cultura da couve comum e couve brócolis.



Figura 6: Folhas de mudas de: A) Couve manteiga e B) Couve brócolis inoculada com *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, Fonte: autor (2022).

2.4 Métodos de controle aplicados ao gênero *Xanthomonas*

Em todo mundo as perdas causadas por patógenos de plantas tem ocasionado uma grande redução na produtividade agrícola. Estima-se que esta perda seja de 7,7% da produção brasileira, ou o equivalente a 25 milhões de toneladas. De acordo com texto publicado no livro "Defesa Vegetal - Fundamentos, Ferramentas, Políticas e Perspectivas", as perdas do agronegócio brasileiro podem chegar a R\$ 55 bilhões ao ano (STANGARLIN *et al.*, 2011; SUGAYAMA, 2016). Neste sentido, torna-se importante o estudo de fontes alternativas no controle e tratamento de doenças fitopatogênicas, já que o uso de produtos químicos nas lavouras para tratamento e controle destas doenças é a principal forma de controle (QUEZADO-DUVAL *et al.*, 2006).

Em se tratando do controle das doenças causadas por *Xanthomonas*, algumas estratégias químico-físicas são necessárias, tais como: eliminação de plantas (ou partes) sintomáticas e restos culturais, rotação de cultura, solarização e aplicação de substâncias com atividade antibactericida como os antibióticos (AGUIAR *et al.*, 2003; RYAN *et al.*, 2011).

No entanto, no Brasil já existem diversos produtos naturais (299 produtos comerciais registrados) disponíveis no mercado e que são utilizados no controle de diferentes microrganismos, de acordo com dados da ABCBIO (ABCBIO, 2019). Destes produtos, até o presente ano, 145 (55,98%) são componentes extraídos de organismos pertencentes ao gênero *Bacillus*, sendo os demais à base de fungos, outras bactérias e vírus, além de feromônios, fitoterápicos, biopesticidas e biodefensivos de uso agrícola (ABCBIO, 2019).

Metabólitos secundários produzidos por organismos vivos vêm sendo estudados como forma de controle, um exemplo é o trabalho realizado com a bactéria *Paenibacillus* TCDT-08, um potencial produtor de metabolitos secundários com ação antimicrobiana. O extrato bruto extracelular desse isolado em estudo anterior inibiu a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (SILVA *et al.*, 2018).

O extrato de *Melaleuca alternifolia* está registrado no AGROFIT como substância com potencial para fungicida e bactericida no controle de algumas espécies de *Xanthomonas*, como mancha bacteriana do tomate, pimentão, maracujá e mancha angular da mangueira, no entanto não foram encontrados produtos registrados para o controle de *X. campestris* pv. *campestris* na cultura da couve comum e couve brócolis (AGROFIT, 2022). O que demonstra a importância de estudos sobre fontes de novas moléculas bioativas com potencial bactericida para o registro na cultura da couve.

As plantas são fontes promissoras de moléculas bioativas com atividade antimicrobiana, atualmente trabalhos com plantas nativas da caatinga tem mostrado atividade antimicrobiana e antibiofilme da espécie *Homalolepis ferrugíneas* sobre a fitobactéria *Xanthomonas citri* pv. *viticola* causadora do cancro bacteriano da videira, uma doença de grande importância na cultura da videira na região do Nordeste (SILVA *et al.*, 2020).

Fontana *et al.* (2021) puderam observar *in vitro* a atividade bactericida e bacteriostática ao submeterem a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, agente causadora da podridão negra, ao extrato de *Moringa oleifera* Lam, observou-se também uma redução na necrose nas raízes de rabanetes infectadas.

Ao estudarem as alterações estruturais e morfológicas causadas pela Geraniina extraída de folhas de boldo de açúcar (*Acer saccharum*) sobre o agente causal da mancha foliar bacteriana da alface *X. campestris* pv. *vitians*, estes autores puderam observar mudanças na estrutura bacteriana e em sua morfologia, assim como também o extravasamento do citoplasma, indicando que a geraniina causa mudanças na parede da bactéria causando o extravasamento do seu material genético (DELISLE-HOUDE *et al.*, 2021). A atividade antibacteriana de geraniina foi relatada também por outros autores sobre as bactérias *Ralstonia solanacearum* (OOSHIRO *et al.*, 2011) e *Streptomyces scabies* (USHIKI *et al.*, 1998).

Costa *et al.* (2017) observaram em seu trabalho que o extrato das folhas de *Artocarpus heterophyllus* e *Morinda citrifolia* possuem atividade antibacteriana sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, os produtos oxitetraciclina, fluazinam, mancozeb, oxicloreto de cobre, Fitoforce Cobre e Fitoforce Plus inibiram totalmente o crescimento *in vitro* e reduziram de 50 a 60% a severidade da mancha bacteriana do maracujazeiro em cada de vegetação.

Entre os compostos bioativos com atividade antimicrobiana destacam-se os óleos essenciais que são produzidos através do metabolismo secundário das plantas e tem como uma de suas funções a proteção contra microrganismos patogênicos (COSTA *et al.*, 2017; ALMEIDA *et al.*, 2020). O óleo essencial de botões de mastroz *Cleistocalyx operculatus* apresentou atividade antibacteriana *in vivo* sobre *Xanthomonas* spp., e *in vitro* contra as cepas Xoo KX019 e Xsp SK12, realizado em plantas de melão oriental cultivadas em estufa (*Cucumis melo* L. var. *makuwa*) (BAJPAI *et al.*, 2010).

Deberdt *et al.* (2018) comprovaram em seus estudos que o óleo essencial de *Pimenta racemosa* var. *racemosa* tem atividade antimicrobiana ao estudar seus efeitos sobre a fitobactéria *Ralstonia solanacearum*, causadora da murcha bacteriana do tomateiro.

O óleo essencial de tomilho e o seu composto majoritário timol apresentaram atividade e antibiofilme, inibindo assim a ação de alguns fatos de virulência e comunicação, demonstrando ação sobre o *Quorum sensing* e agindo na comunicação das bactérias, também foi indicada uma atividade antivirulência frente a alguns genes de virulência como o gene *rpff* em plantas de arroz inoculada com *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo), agente causador do crestamento bacteriano do arroz (*Oryzae sativa*) (SINGH *et al.*, 2017).

Ainda existem poucos trabalhos sobre a ação do óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer sobre fitobactérias e especificamente sobre o gênero *Xanthomonas*. Um trabalho bastante recente desenvolvido por Silva *et al.* (2019) demonstrou que o óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer acesso LGRA-106 rico em timol, apresentou atividade antimicrobiana e antibiofilme além de sua ação sobre a membrana bacteriana de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, bactéria causadora da podridão negra. No trabalho de Santos *et al.* (2014) o fitopatógeno *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* tratado com óleo essencial de *L. gracilis* obteve mais de 90% de redução da atividade antimicrobiana, demonstrando potencial antibacteriano maior que o oxicloreto de cobre que inibiu apenas 46,9% do crescimento bacteriano.

Flores *et al.* (2019) avaliaram o efeito dos compostos carvacrol, limoneno e linalool com a bactéria *S. aureus*, onde os compostos carvacrol, limoneno e linalool apresentaram efeito antibacteriano similar ao antibiótico cefalexina.

Qiao *et al.* (2020) ao estudarem as cepas de *Xanthomonas perforans*, resistentes ao cobre, puderam observar que a aplicação do carvacrol em plantas de tomateiro cultivadas em estufa agrícola reduziu a incidência da mancha bacteriana do tomateiro, consorciado com o cobre este efeito foi ainda maior, demonstrando assim que o carvacrol é um composto bioativo promissor para o controle da mancha bacteriana do tomateiro.

Estudos vêm demonstrando a importância de conhecer novas moléculas bioativas para o combate a *Xanthomonas*, tendo em vista a resistência desta bactéria aos métodos de controle químico tradicionais como o uso de formulações à base de cobre e antibióticos (QUEZADO-DUVAL *et al.*, 2003).

Redondo *et al.* (2015) demonstraram que bactericidas químicos como NaCl, CuSO₄ e NaClO apresentam atividade antibiofilme sobre *X. citri* subsp. *Citri*, porém não têm a capacidade de remover totalmente o biofilme em superfícies bióticas e abióticas. A literatura demonstra que bactericidas cúpricos diminuem a incidência do cancro cítrico causado por *X. citri* subsp. *Citri*, porém recomenda-se o uso de outras formas consorciadas de controle (FAVARO *et al.*, 2017).

O controle químico com o uso de produtos bactericidas que inibem o desenvolvimento de doenças é uma alternativa, porém a maioria dos bactericidas são à base de cobre, oferecendo apenas proteção superficial, sem serem absorvidos sistemicamente (GENT e SCHWARTZ, 2005). Sendo esta uma característica negativa, tendo em vista que muitas bactérias se desenvolvem sistemicamente além de poderem penetrar através dos estômatos que ficam na parte abaxial da folha, outro fator limitante é fato de que a água da chuva e irrigação podem lavar o cobre das folhas, sendo necessárias várias aplicações, o que se torna inviável economicamente.

Sendo assim, a descoberta de novos compostos produzidos por plantas é uma alternativa na busca por produtos naturais que possam ser registrados para controle e tratamento da doença causada por espécies de *Xanthomonas* sp.

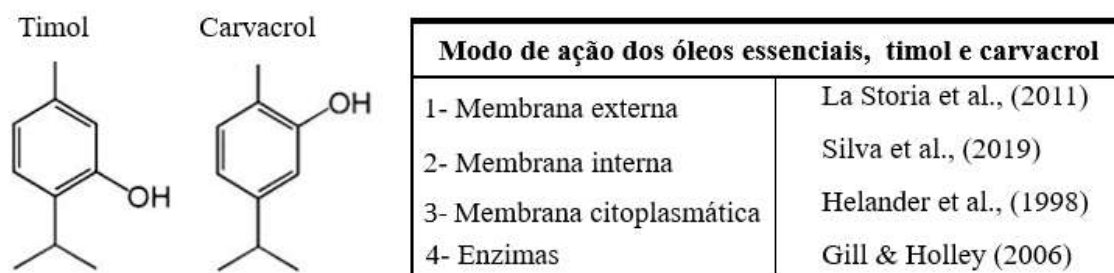


Figura 7: Modo de ação dos óleos essenciais, timol e carvacrol sobre a membrana de bactérias. Fonte: autor (2022).

2.5 Biofilme bacteriano: um fator de resistência

O biofilme bacteriano é formado por associações complexas entre bactérias, que conferem benefícios para estes organismos como proteção, resistência a antibióticos e maior virulência. As bactérias Gram-negativas possuem esta adaptação e para a formação e adesão deste biofilme são necessários vários tipos de mecanismos de transdução de sinais que podem ser afetados por fatores ambientais (O'TOOLET *et al.*, 2000).

Os biofilmes contêm partículas de lipídios, fosfolipídios, proteínas, carboidratos, vitaminas e sais minerais, formando camadas onde os microrganismos de uma ou mais espécies se desenvolvem, esta rede complexa de microrganismos é mais resistente que as bactérias de vida livre, pois possuem maior resistência física e química. Sabe-se que o biofilme é formado por vários microrganismos que possuem um sistema de organização e de comunicação denominado de quorum sensing (QS) célula-célula, na qual existe uma comunicação e resposta aos estímulos de forma unificada entre organismos de diferentes espécies (VU *et al.*, 2009; TURAN e ENGIN, 2018).

Alguns trabalhos vêm demonstrando como funciona a sinalização das bactérias através do RNAm e a síntese de três genes envolvidos na formação do biofilme bacteriano de algumas cepas bacterianas da espécie *Xcc* causadora da podridão negra das crucíferas (LU *et al.*, 2012).

Estudos demonstram que o biofilme é um fator de resistência quando se trata do uso de agentes antimicrobianos, pois a concentração necessária para eliminar bactérias que produzem

biofilme é 1000 vezes maior quando comparada às bactérias que se encontram em estado planctônico (FRANK e PATEL, 2007; HØIBY *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2018). A matriz polimérica confere proteção contra fatores externos como a desidratação, variação do pH, temperatura, entre outros (CHEN *et al.*, 2018). Outra característica importante é a comunicação mediada por enzimas e por fatores genéticos de adaptação como as barreiras de difusão e regulação da atividade metabólica (CAIXETA, 2008; SHARMA *et al.*, 2013).

Na literatura existem estudos que demonstram a ação antibiofilme de moléculas oriundas de compostos ativos de ervas, produtos químicos, antibióticos e agentes quelantes, assim como também seus mecanismos de ação e suas concentrações mínimas capazes de inibir a formação do biofilme bacteriano sem causar efeitos colaterais ao hospedeiro (ROY *et al.*, 2018).

Trabalhos vêm demonstrando a eficiência antimicrobiana do resíduo da casca de laranja como biofilme de proteção para frutos usando casca de laranja em pó em vez do óleo essencial extraído (MCKAY *et al.*, 2021). Isso pode estar relacionado à presença de alguns compostos químicos presentes no extrato como os flavonoides, saponinas, taninos e terpenos, os quais foram identificados como constituintes das espécies.

A utilização de extratos de plantas com atividade antimicrobiana e antibiofilme contra bactérias causadoras de doenças humanas é amplamente estudado, porém o que muitas das vezes pode-se observar é que apesar da inibição da atividade antimicrobiana, o extrato vegetal pode não possuir atividade satisfatória na inibição da formação do biofilme bacteriano (MISSEAL, 2019). Essa característica se dá pela alta resistência atribuída ao biofilme quando comparado à bactéria de forma isolada.

O uso de partículas de pratas fotosintetizadas (AgNPs) fabricadas a partir de extrato de *Mespilus germanica* contra multirresistente (MDR) cepas de *Klebsiella pneumoniae*, se mostraram eficientes na prevenção da formação do biofilme e matam bactérias em biofilmes estabelecidos (FOROOHIMANJILI *et al.*, 2019). Atualmente na literatura existem alguns trabalhos com estratégias para o controle da formação biofilme microbiano de Xcc como uso de ácidos graxos e bacteriógrafo (PAPAIANNI *et al.*, 2021).



Figura 8: Esquema da formação e dispersão do biofilme de fitobactérias em plantas e comunicação entre as bactérias QS (Quorum sensing). Fonte: autor (2022).

O processo de formação do biofilme bacteriano se inicia quando uma célula bacteriana na forma planctônica reconhece o substrato, que pode ser a superfície de uma folha ou um fruto. A fixação inicial é um processo reversível onde ocorre uma interação fraca entre a bactéria e o substrato. Na fase seguinte ocorre o processo de fixação irreversível na qual começa o processo de multiplicação celular, após o processo de fixação as bactérias produzem uma matriz de exopolissacarídeos extracelular (EPS) que constitui o biofilme, e por fim ocorre a fase de liberação de novas bactérias e a infecção de novos hospedeiros (CASTIBLANCO e SUNDIN, 2016).

No processo de comunicação entre as bactérias QS são liberadas substâncias que permitem a detecção de moléculas químicas e a regulação da formação do biofilme como também os fatores de virulência. Atualmente o mecanismo regulatório mais conhecido é o Quorum Quenching (QQ), no qual são liberadas substâncias capazes de regular a formação do

biofilme, contribuindo assim para diminuir a resistência bacteriana (RUIZ *et al.*, 2008; ACHARI e RAMESH, 2019).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCBIO - Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico. **Registro de Defensivos**. Disponível em: <https://ciorganicos.com.br/noticia-tag/associacao-brasileira-das-empresas-de-controle-biologico-abcbio/>. Acesso em: 08 jul. de 2022.

ACHARI, G. A.; E RAMESH, R. Recent advances in quorum quenching of plant pathogenic bacteria. **Advances in Biological Science Research**, p. 233-245, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817497-5.00015-X>

AGROFIT - **Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Banco de informações sobre os produtos agroquímicos e afins registrados No Ministério da Agricultura. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 08 jul. de 2022.

AGROFIT - **Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/DAS, 2022. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 01 jun. 2022.

AGUIAR, L. A.; KIMURA, O.; CASTILHO, A. M. C.; CASTILHO, K. S. C.; RIBEIRO, R. L. D.; AKIBA, F.; CARMO, M. G. F. Efeito de formulações cúpricas e cuprorgânicas na severidade da mancha-bacteriana e na população residente de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em pimentão. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 1, p. 44–50, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-05362003000100009>

AKIMOTO-TOMIYAMA, C.; FURUTANI, A.; OCHIAI, H. Real time live imaging of phytopathogenic bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* MAFF106712 in ‘plant sweet home’. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e94386, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094386>

ALBUQUERQUE, C. C.; CÂMARA, T. R.; MARIANO, R. L. R.; WILLADINO, L.; MARCELINO, C. J. R.; ULISSES, C. Ação antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer. **Braz Arch Biol Technol**, n. 49, p.527–535, 2006.

ALBUQUERQUE, C. C.; CAMARA, T. R.; SANT'ANA, A. E. G.; ULISSES, C.; WILLADINO, L.; MARCELINO JÚNIOR, C. Effects of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer on caulinary shoots of heliconia cultivated in vitro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 26-33, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000100005>

ALMEIDA, O. C.; NETO, T. F. D. S. C.; BARROSO, K. A.; QUEIROZ, M. F.; BOAS, T. A. V.; DA PAZ, C. D.; PEIXOTO, A. R. Óleos essenciais no manejo da podridão mole em pimentão. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 12, p. 101759-101770, 2020. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n12-607>

ALVAREZ, A. M. Black rot of crucifers. In: SLUSARENKO, A.; FRASER R. S. S.; VAN LOON, L. C. Black rot of crucifers. **Mechanisms of Resistance to Plant Diseases**, Springer, 2000. p. 21-52. DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-011-3937-3_2

APARICIO, R. M. **Efeitos da adubação fosfatada e de sombreamento na composição química e rendimento do óleo essencial de *piper tuberculatum* jack.** 2022. 31 p. Monografia (Graduação em...) - Universidade Federal do Amazonas, Amazonas-AM, 2022.

ARAUJO, L. V.; FREIRE, D. M. G.; NITSCHKE, M. Biossurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Química Nova**, v. 36, n. 6, p. 848-858, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000600019>

AZEVEDO, A. N.; BUARQUE, P. R.; CRUZ, E. M. O.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; NUNES, M. L.; DE AQUINO SANTANA, L. C. L. Response surface methodology for optimisation of edible chitosan coating formulations incorporating essential oil against several foodborne pathogenic bacteria. **Food Control**, v. 43, p. 1-9, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.02.033>

BAJPAI, V. K.; DUNG, N. T.; SUH, H. J.; KANG, S. C. Antibacterial activity of essential oil and extracts of *Cleistocalyx operculatus* buds against the bacteria of *Xanthomonas* spp. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, n. 11, p. 1341-1349, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11746-010-1623-9>

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. **Hortaliças-fruto** [online]. Maringá: EDUEM, 2018. pp. 209-240. ISBN: 978-65-86383-01-0. DOI: <https://doi.org/10.7476/9786586383010.0008>.

BERTINI, L. M.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, C. D.; MENEZES, E. A.; MORAIS, S. D.; CUNHA, F. A.; CAVALCANTI, E. S. B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v. 17, n. 3-4, p. 80-83, 2005.

BITU, V.; BOTELHO, M. A.; COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; VERAS, H. N. H.; MARTINS, K. T.; LYRA, A.; COLUCHI, G. G.; RUELA, R. S.; QUEIROZ, D. B.; SIQUEIRA, J. S.; QUINTANS, L. J. Triagem fitoquímica e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia gracilis*. **Rev Bras Farmacog**, n. 22, p. 69–75, 2012.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, p. 588-594, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300005>

BLANK, A. F. Transformação de recursos genéticos de plantas aromáticas nativas em riqueza: o potencial do alecrim-de-tabuleiro (*Lippia gracilis*). **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 3, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-05362013000300029>

BRITO, A. M. G.; RODRIGUES, S. A.; BRITO, R. G.; XAVIER-FILHO, L. Aromatherapy: from genesis to today. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, p. 789-793, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000500021>

BUCHBAUER, G.; HEMETSBERGER, S. **Use of essential oils in agriculture. Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications**, 2 ed. p. 670–706, 2015.

CAIXETA, D. S. **Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável.** 2008. 75 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2008.

CARDOSO, J. C.; OLIVEIRA, M. E.; CARDOSO, F. D. C. Advances and challenges on the *in vitro* production of secondary metabolites from medicinal plants. **Horticultura Brasileira**, v. 37, p. 124-132, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-053620190201>

CARVALHO, R. R. D. C.; LARANJEIRA, D.; CARVALHO FILHO, J. L. S. D.; SOUZA, P. E. D.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; WARWICK, D. R. N. *In vitro* activity of essential oils of *Lippia sidoides* and *Lippia gracilis* and their major chemical components against *Thielaviopsis paradoxa*, causal agent of stem bleeding in coconut palms. **Química Nova**, v. 36, p. 241-244, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000200007>

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. DOI: <https://doi.org/10.1111/jipb.12428>

CAVALEIRO, C. Plantas aromáticas e óleos essenciais em farmácia e medicina. **Potencialidades e aplicações das plantas aromáticas e medicinais**, 2007.

CHEN, H.; WUBBOLTS, R. W.; HAAGSMAN, H. P.; VELDHUIZEN, E. J. Inhibition and eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by host defence peptides. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28842-8>

CHONG, J.; WISHART, D. S.; XIA, J. Using MetaboAnalyst 4.0 for comprehensive and integrative metabolomics data analysis. **Current protocols in bioinformatics**, v. 68, n. 1, p. e86, 2019. DOI:

CHUNG, M. Y.; KIM, H.; BEUCHAT, L. R.; RYU, J. H. Anticicrobial activities of plant essential oil vapours against *Acidovorax citrulli* and *Xanthomonas campestris* on Cucurbitaceae, Brassicaceae and Solanaceae seeds. **Journal of Applied Microbiology**, v. 132, n. 3, p. 2189-2202, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.15352>

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Análise mensal**, 28 Fevereiro. Brasília DF, 2018. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=526&t=>. Acesso em: 08 jul. 2022.

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

COSTA, N. D.; SALVIANO, A. M. **A cultura do melão**. 3. ed. rev. e atual. – Brasília, DF: Embrapa, 2017. 202 p. (Coleção Plantar, 76).

COSTA, P. S.; SOUZA, E. B. D.; BRITO, E. H. S. D.; FONTENELLE, R. O. D. S. Atividade antimicrobiana e potencial terapêutico do gênero *Lippia* sensu lato (Verbenaceae). **Hoehnea**, v. 44, p. 158-171, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/2236-8906-68/2016>

COSTA, R. C.; ISHIDA, A. K. N.; MIRANDA, V. S.; DAMASCENO FILHO, A. S.; DA SILVA, C. T. B.; RESENDE, M. L. V.; OLIVEIRA, L. C. Extratos vegetais, formulações a base de extrato vegetal e produtos químicos no controle da mancha bacteriana do maracujazeiro. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 7, n. 1, p. 26-33, 2017. DOI: [10.21206/rbas.v7i1.375](https://doi.org/10.21206/rbas.v7i1.375)

- COUTINHO, T. **Doença da raia bacteriana do milho: Especificidade e suscetibilidade de cultivares**. 1987. Mestre em Ciências pela Universidade de Natal, 1987.
- CRUZ, E. M. de O.; PINTO, J. A. O.; FONTES, S. S.; ARRIGONI-BLANK, M. de F.; BACCI, L.; JESUS, H. C. R. de; SANTOS, D. de A.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F. Water Deficit and Seasonality Study on Essential Oil Constituents of *Lippia gracilis* Schauer Germplasm. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p.1-9, 2014. doi.org/10.1155/2014/314626
- CRUZ, E. M.; COSTA-JUNIOR, L. M.; PINTO, J. A.; SANTOS, D. A.; ARAUJO, S. A.; ARRIGONI-BLANK, M F.; BACCI, L.; ALVES, P. B.; CAVALCANTI, S. C.; BLANK, A. F. Atividade acaricida do óleo essencial de *Lippia gracilis* e seus principais constituintes sobre o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus*. **Veterinário Parasitol**, n. 195, p. 198–202, 2013.
- 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. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-761>
- DEBERDT, P.; DAVEZIES, I.; CORANSON-BEAUDU, R.; JESTIN, A. Efficacy of leaf oil from *Pimenta racemosa* var. *racemosa* in controlling bacterial wilt of tomato. **Plant Disease**, v. 102, n. 1, p. 124-131, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0593-RE>
- DELISLE-HOUDE, M.; BLAIS, M.; TWEDDELL, R. J.; RIOUX, D. Antibacterial activity of geraniin from sugar maple leaves: an ultrastructural study with the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. **Journal of Plant Pathology**, v. 103, n. 2, p. 461-471, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42161-021-00743-2>
- DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; RODRIGUES, K. A. D. F.; BRITO, M. C. A.; ROSA, C. D. S.; AMARAL, F. M. M. D.; MORAES, D. F. C. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils extracted from Brazilian legal Amazon plants against *Aedes aegypti* L.(Diptera: Culicidae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/490765>
- 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. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10327-021-00987>
- DYER, R. A. Levantamentos botânicos e controle de doenças de plantas. Agricultura na África do Sul. **Anu. Rep. Dep. Agrícola**, n. 275, p. 119-121, 1949.
- EFSA Panel on Plant Health. Scientific Opinion on pest categorization of *Xanthomonas campestris* pv. *Pruni* (Smith). **EFSA Journal**, v.12, n.10, 25 p., 2014. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3857>
- EHLERT, P. A. D.; BLANK, A. F.; ARRIGONI-BLANK, M. D. F.; PAULA, J. W. A. D.; CAMPOS, D. D. A.; ALVIANO, C. S. Tempo de hidrodestilação na extração de óleo essencial de sete espécies de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, n.8, v. 2, p.79–80, 2006.
- EPAGRI. **Avaliação de cultivares para o estado de Santa Catarina 2020-2021**. Florianópolis: EPAGRI, 2020. 90. (Boletim técnico, 194).

FAO - **Agricultural production, primary crops**. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em: 09 jul. de 2022.

FAO, FIDA, UNICEF, PMA y OMS. 2018. **El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo. Fomentando la resiliencia climática en aras de la seguridad alimentaria y la nutrición**. FAO, Roma.

FARIAS, E. M. F. G.; XIMENES, R. M.; MAGALHÃES, L. P. M.; CHIAPETA, A. A.; SENA, K. X. F. R.; ALBUQUERQUE, J. F. C. Antifungal activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) against clinical isolates of *Candida* species. **Journal of Herbal Medicine**, v. 2, p. 63-67, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2012.06.002>

FAVARO, M. A.; ROESCHLIN, R. A.; RIBERO, G. G.; MAUMARY, R. L.; FERNANDEZ, L. N.; LUTZ, A.; GARIGLIO, N. F. Relationships between copper content in orange leaves, bacterial biofilm formation and citrus canker disease control after different copper treatments. **Crop Protection**, v. 92, p. 182-189, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.11.011>

FERNANDES, C. D. F.; VIEIRA JÚNIOR, J. R.; DA SILVA, D. S. G.; REIS, N. D.; ANTUNES JÚNIOR, H. **Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos**. Embrapa Rondônia, 2009, 14 p. (Embrapa Rondonia. Documentos, 133).

FERNANDES, L. C. B.; ALBUQUERQUE, C. C. D.; SALES JÚNIOR, R.; OLIVEIRA, F. F. M.; GURGEL, E. P.; MESQUITA, M. V. D.; SILVA, M. D. S. D. Fungitoxicidade dos extratos vegetais e do óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer sobre o fungo *Monosporascus cannonballus* Pollack e Uecker. **Summa Phytopathologica**, v. 41, p. 153-155, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-5405/1978>

FERRAZ, J.; BARATA, L. E.; SAMPAIO, P. D. T.; GUIMARÃES, G. P. Perfumes da floresta Amazônica: em busca de uma alternativa sustentável. **Ciência e Cultura**, v. 61, n. 3, p. 40-43, 2009.

FIALHO, J. F.; VIEIRA, E. A. **Mandioca no cerrado: orientações técnicas**. 2. ed. rev. Brasília: Embrapa, 2013. 203 p.

FLORES, P. I.; BAÑUELOS-VALENZUELA, R.; DELGADILLO-RUIZ, L.; MEZA-LÓPEZ, C.; ECHAVARRÍA-CHÁIREZ, F. Actividad antibacteriana de cinco compuestos terpenoides: carvacrol, limoneno, linalool, α -terpineno y timol. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 22, n. 2, p. 241-248, 2019.

FONTANA, R.; CAPRONI, A.; BUZZI, R.; SICURELLA, M.; BURATTO, M.; SALVATORI, F.; MARCONI, P. Effects of *Moringa oleifera* Leaf Extracts on *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Microrganisms**, v. 9, n. 11, p. 2244, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/microrganisms9112244>

FOROOHIMANJILI, F.; MIRZAIE, A.; HAMDÍ, S. M. M.; NOORBAZARGAN, H.; HEDAYATI, C. H. M.; REZAIE, H. M.; DOLATABADI, A.; BISHAK, F. M. Antibacterial, antibiofilm, and antiquorum sensing activities of phytosynthesized silver nanoparticles fabricated from *Mespilus germanica* extract against multidrug resistance of *Klebsiella pneumoniae* clinical strains. **Journal of Basic Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 216-230, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/jobm.201900511>

FRANK, K. L.; PATEL, R. Poly-N-acetylglucosamine is not a major component of the extracellular matrix in biofilms formed by icaADBC-positive *Staphylococcus lugdunensis* isolates. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 10, p. 4728-4742, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.00640-07>

FUKUDA, C. Principais doenças de mandioca. In: OTSUBO, A. A.; MERCANTE, F. M.; MARTINS, C. S. (Ed.). **Aspectos do cultivo da mandioca em Mato Grosso do Sul**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Campo Grande: UNIDERP, 2002. p. 191-204.

FURINI, T.; FURINI, S. C. S.; DE OLIVEIRA BARROS, J.; DE OLIVEIRA DOMINGUES, S. C.; KARSBURG, I. V. Alelopatia e genotoxicidade da erva de santa maria nos sistemas *Lactuca sativa* L. e *Allium cepa* L. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 7, n. 2, p. 105-116, 2020.

GARRIDO, L. R. **Manejo das doenças das prunoides (ameixa, nectarina e pêsego)**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2016. 21p. (Circular Técnica, 134).

GENT, D. H.; SCHWARTZ, H. F. Management of *Xanthomonas* leaf blight of onion with a plant activator, biological control agents, and copper bactericides. **Plant Disease**, v. 89, n. 6, p. 631-639, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1094/PD-89-0631>

GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Ecletica Química**, v. 36, p. 64-77, 2011. DOI: [10.1007/978-981-10-8548-2_2](https://doi.org/10.1007/978-981-10-8548-2_2)

HABER, L. L.; CLEMENTE, F. M. V. T. **Plantas aromáticas e condimentares: uso aplicado na horticultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2013, 152 p.

HARTMAN, T.; THARNISH, B.; HARBOUR, J.; YUEN, G. Y.; JACKSON-ZIEMS, T. A. Alternative hosts in the families Poaceae and Cyperaceae for *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, causal agent of bacterial leaf streak of corn. **Phytopathology**, v. 110, n. 6, p. 1147-1152, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-19-0132-R>

HAYWARD, A. C. The hosts of *Xanthomonas*. In: *Xanthomonas*. Springer, Dordrecht, 1993. p. 1-119. DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-011-1526-1_1

HØIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; CIOFU, O. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 4, p. 322-332, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011>

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção de couve no Brasil**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/couve/br>. Acesso em: 08 jul. de 2022.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal 2020**. Rio de Janeiro: IBGE, 2021. Acesso em: 08 de jul. de 2022.

ITO, A. G. T. P. **Biotecnologia e produção de alimentos**. Londrina: Editora e Distribuidora Educacional S.A., 2018. 192 p.

KARAMURA, G.; SHIMTH, J.; STUDHOLME, D.; KUBIRIBA, J.; KARAMURA, E. Comparative pathogenicity studies of the *Xanthomonas vasicola* species on maize, sugarcane

- and banana. **African Journal of Plant Science**, v. 9, n. 9, p. 385-400, 2015. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJPS2015.1327>
- KITAMURA, P. C. Biotecnologia e Meio Ambiente. Biotecnologia e Meio Ambiente. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, n. 3, 2004. DOI: [10.12702/1984-7033.v04n03r01](https://doi.org/10.12702/1984-7033.v04n03r01)
- KORUS, K. A.; LANG, J. M.; ADESEMOYE, A. O.; BLOCK, C. C.; PAL, N.; LEACH, J. E.; JACKSON-ZIEMS, T. A. First report of *Xanthomonas vasicola* causing bacterial leaf streak on corn in the United States. **Plant Disease**, n. 101, v. 6, p. 1030, 2017. DOI: [10.1094/PDIS-10-16-1426-PDN](https://doi.org/10.1094/PDIS-10-16-1426-PDN)
- LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J.; NYCHAS, G. J. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>
- LANA, M. M.; TAVARES, S. A. **50 Hortaliças: como comprar, conservar e consumir**. 2. ed. rev. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. 2021. 209 p. Embrapa Hortaliças, 2021.
- LANG, J. M.; DUCHARME, E.; IBARRA CABALLERO, J.; LUNA, E.; HARTMAN, T.; ORTIZ-CASTRO, M.; LEACH, J. E. Detection and characterization of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Cobb 1894) comb. nov. causing bacterial leaf streak of corn in the United States. **Phytopathology**, v. 107, n. 11, p. 1312-1321, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHTO-05-17-0168-R>
- LEITE, R. P.; CUSTÓDIO, A. A. P.; MADALOSSO, T.; ROBAINA, R. R.; DUIN, I. M.; SUGAHARA, V. H. First report of the occurrence of bacterial leaf streak of corn caused by *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in Brazil. **Plant Disease**, v. 103, n. 1, p. 145-145, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-18-1100-PDN>
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2002.
- LORENZI, J. O.; OTSUBO, A. A.; MONTEIRO, D. A.; VALLE, T. L. Aspectos fitotécnicos da cultura da mandioca em Mato Grosso do Sul. In: OTSUBO, A. A.; MERCANTE, F. M.; MARTINS, C. S. (Ed.). **Aspectos do cultivo da mandioca em Mato Grosso do Sul**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Campo Grande: UNIDERP, 2002. p. 77-108.
- LORENZO, D.; PAZ, D.; DAVIES, P.; VILA, R.; CAÑIGUERAL, S.; DELLACASSA, E. Composition of a new essential oil type of *Lippia alba* (Mill.) N. E: Brown from Uruguay. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 16, n. 5, p. 356-359, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1002/ffj.1011>
- LU, X. H.; AN, S. Q.; TANG, D. J.; MC CARTHY, Y.; TANG, J. L.; DOW, J. M.; RYAN, R. P. RsmA regula a formação de biofilme em *Xanthomonas campestris* por meio de uma rede regulatória envolvendo di-GMP cíclico e o fator de transcrição Clp. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. 1-11, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052646>
- MACÊDO, C. A. **Atividade antibacteriana e antibiofilme da *Lippia grata* frente a isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa***. 2019. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciências

Biológicas) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, 2019.

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>

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

MARRETO, R. N.; ALMEIDA, E. E. C. V.; ALVES, P. B.; NICULAU, E. S.; NUNES, R. S.; MATOS, C. R. S.; ARAÚJO, A. A. S. Thermal analyses and gás chromatography coupled mass spectrometry analyses of hidroxipropylmetry analyses of hidroxipropyl- β -cyclodextrin inclusion complex containing *Lippia gracilis* essential oil. **Thermochim Acta**, v. 475, p. 53-58, 2008.

MATA, T. C.; STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; LORENZETTI, E.; CARVALHO, J. C.; DEMARTELAERE, A. C. F.; ASSI, L. Antimicrobial activity of rosemary based formulates on *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and *Alternaria brassicae*. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 9, p. 94220-94236, 2021. DOI: [10.34117/bjdv7n9-540](https://doi.org/10.34117/bjdv7n9-540)

MATOS, F. J. **A Farmácias vivas**, 4ª ed. Fortaleza: Edições, UFC, 2002.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais da medicina popular do Nordeste**. Fortaleza: UFC, 1999.

MATOS, F. J. **Farmácias vivas—sistema de utilização de plantas medicinais para pequenas comunidades**. Fortaleza: UFC, 1998.

MCFARLANE, S.; COUTINHO, T. A. Gomose da cana-de-açúcar. In: **Doenças bacterianas de plantas na África do Sul**. 2010. p. 114-115.

MCKAY, S.; SAWANT, P.; FEHLBERG, J.; ALMENAR, E. Antimicrobial activity of orange juice processing waste in powder form and its suitability to produce antimicrobial packaging. **Waste Management**, v. 120, n. 1, p. 230–239, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.11.048>

MELO, C. R. **Insecticidal activity of *Lippia gracilis* chemotypes against *Diaphania hyalinata* and *Cryptolestes ferrugineus***. 2014. 57 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão-SE, 2014.

MELO, J. O. D.; SALTORATTO, A. L. F.; RIZO, W. F.; JESUS, H. C. R. D.; ARRIGONI-BLANK, M. D. F.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F. Cytotoxic effects of essential oils from three *Lippia gracilis* Schauer genotypes on HeLa, B16, and MCF-7 cells and normal human fibroblasts. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 2, 2014.

MELO, J. O.; BITENCOURT, T. A.; FACHIN, A. L.; CRUZ, E. M. O.; DE JESUS, H. C. R.; ALVES, P. B.; SCHER, R. Antidermatophytic and antileishmanial activities of essential oils from *Lippia gracilis* Schauer genotypes. **Acta Trop**, v. 128, n. 1, p. 110-1155, 2013. DOI: [10.1016/j.actatropica.2013.06.024](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.06.024)

MENEZES, M. S. **Caracterização química e efeito do óleo essencial de *Lippia gracilis* e seus constituintes majoritários sobre *Aceria guerreronis* (Acari: Eriophyidae)**. 2016. 39 p. Dissertação (Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão-SE, 2016.

MIRANDA, C. A. S. F.; CARDOSO, M. D. G.; BATISTA, L. R.; RODRIGUES, L. M. A.; FIGUEIREDO, A. C. D. S. Essential oils from leaves of various species: antioxidant and antibacterial properties on growth in pathogenic species. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, p. 213-220, 2016. DOI: <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20160025>

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000500029>

MORAES, V. R.; LIMA NOGUEIRA, P. C.; COSTA, E. V.; SOUZA SANTOS, L. D.; SILVA, V. R.; BOMFIM, L. M.; BEZERRA, D. P. **Propriedades fitoquímicas e biológicas de *Lippia gracilis***. In **Anticancer Plants: Properties and Application**, 2018, p. 37-55. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-10-8548-2_2

MORAES, V. R.; THOMASI, S. S.; SPRENGER, R. F.; PRADO, V. M.; CRUZ, E. M.; CASS, Q. B.; BLANK, A. F. Secondary metabolites from an infusion of *Lippia gracilis* Schauer using the LC-DAD-SPE/NMR hyphenation technique. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, p. 1335-1340, 2017. DOI: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20160299>

MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, S. M.; RESENDE, R. F.; SILVA, A. S. Applications of tissue culture in medicinal plants. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, p. 110-121, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000100016>

MORRONI, I. V.; SCHINKE, C.; GERMANI, J. C. Nova proposta para uso de bacteriófagos no controle de mancha foliar em repolho causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 8, n. 1, p.142-155, 2013.

NETO, R. M.; MATOS, F. J.; ANDRADE, V. S.; MELO, M. C. N.; CARVALHO, C. B.; GUIMARÃES, S. B.; VASCONCELOS, P. R. The essential oil from *Lippia gracilis* Schauer, Verbenaceae, in diabetic rats. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 2, p. 261-266, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000200021>

NOGUEIRA, E. M. C.; FERRARI, J. T.; TÖFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J.; ALMEIDA, I. M. G.; BERIAM, L. O. S. **Doenças em fruteiras de clima temperado: Ameixeira, Pessegueiro, Nectarineira e Nespereira**. Instituto Biológico - APTA, 2016. Disponível em: www.biológico.sp.gov.br. Acesso em: 14 jan. de 2022.

O'BRIEN, P. A. A. Biological control of plant diseases. **Australasian Plant Pathology**, v. 46, n. 4, p. 293-304, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13313-017-0481-4>

OLIVEIRA, T. N. S.; SILVA-FILHO, C. M. S.; MALVEIRA, E. A.; AGUIAR, T. K. B.; SANTOS, H. S.; ALBUQUERQUE, C. C.; VASCONCELOS, M. A. Antifungal and antibiofilm activities of the essential oil of leaves from *Lippia gracilis* Schauer against phytopathogenic fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, n. 4, p. 1117-1129, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.14857>

OOSHIRO, A.; KAJI, M.; KATOH, Y.; KAWAIDE, H.; NATSUME, M. Antibacterial activity of alkyl gallates and related compounds against *Ralstonia solanacearum*. **Journal of Pesticide Science**, v. 36, n. 2, p. 240-242, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1584/jpestics.G10-84>

ORTIZ-CASTRO, M.; HARTMAN, T.; COUTINHO, T.; LANG, J. M.; KORUS, K.; LEACH, J. E.; BROEDERS, K. Current understanding of the history, global spread, ecology, evolution, and management of the corn bacterial leaf streak pathogen, *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*. **Phytopathology**, v. 110, n. 6, p. 1124-1131, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-20-0018-PER>

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as Microbial development. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 49-79, 2000. DOI: [10.1146/annurev.MICro.58.030603.123654](https://doi.org/10.1146/annurev.MICro.58.030603.123654)

PAPAIANNI, M.; RICCIARDELLI, A.; CASILLO, A.; CORSARO, M. M.; BORBONE, F.; DELLA, V. B.; VELOTTA, R.; FULGIONE, A.; WOO, S. L.; TUTINO, M. L.; PARRILLI, E.; CAPPARELLI, R. The Union Is Strength: The Synergic Action of Long Fatty Acids and a Bacteriophage against *Xanthomonas campestris* Biofilm. **Microorganisms**, v. 9, n. 1, p. 60, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010060>

PARTE, A. C. LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, p. 1825–1829, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002786>

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**, 5a Ed. Minas Gerais: Agronômica Ceres, 2018. p. 389-421.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; MATA, D. S.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 201-214, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00234-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00234-3)

PEREIRA, D. S.; NAKASONE, A. K.; DE OLIVEIRA, M. S.; DE OLIVEIRA, L. C.; PEREIRA, N. S.; PORTS, P. D. S.; FREITAS, C. I. A. Potencial antimicrobiano de extratos de própolis amazônica de *Apis mellifera* L. em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* no estado do Pará, Brasil. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 11, e93191110239, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i11.10239>

PINHEIRO, L. G. **Potencial antimicrobiano do óleo essencial de *lippia sidoides* contra bactérias gram-negativas multidroga resistentes**. 2021. 61 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Campus de Sobral, Universidade Federal do Ceará, Sobral-CE, 2021.

PORTILLO-RUIZ, M. C.; SÁNCHEZ A. S.; RAMOS, S. V.; MUÑOZ, J. V. T.; NEVÁREZ-MOORILLÓN. Antifungal effect of Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) essential oil on a wheat flour-based medium. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 8, p.441-445, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02821.x>

QIAO, K.; LIU, Q.; HUANG, Y.; XIA, Y.; ZHANG, S. Management of bacterial spot of tomato caused by copper-resistant *Xanthomonas perforans* using a small molecule compound carvacrol. **Crop Protection**, v. 132, p. 105114, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105114>

QUEZADO-DUVAL, A. M.; GAZZOTO FILHO, A.; LEITE JÚNIOR, R. P.; CAMARGO, L. E. A. Sensibilidade a cobre, estreptomicina e oxitetraciclina em *Xanthomonas* spp. associadas à mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 670-675, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-05362003000400020>

RADAR. Agrojornalismo em tempo real. Milho: USDA estima produção mundial 2020/21 em 1,163 bilhão de toneladas. **Canal Rural**, 2020. Disponível em <https://www.canalrural.com.br/radar/milho-usda-estima-producao-mundial-2020-21-em-1163-bilhao-de-toneladas/>. Acesso em: 07 jul. de 2021.

RAGAGNIN, R. C. G.; ALBUQUERQUE, C. C.; OLIVEIRA, F. F. M.; SANTOS, R. G.; GURGEL, E. P.; DINIZ, J. C.; VIANA, F. A. Effect of salt stress on the growth of *Lippia gracilis* Schauer and on the quality of its essential oil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 28, p. 346-351, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/0102-33062014abb3369>

RAMNARINE, S. D. B. J.; JAYARAMAN, J.; RAMSUBHAG, A. 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**, v. 9, p. e12632, 2022. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.12632>

REDONDO, C.; SENA-VÉLEZ, M.; GELL, I.; FERRAGUD, E.; SABUQUILLO, P.; GRAHAM, J. H.; CUBERO, J. Influence of selected bactericides on biofilm formation and viability of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Crop Protection**, v. 78, p. 204-213, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.09.010>

REGNAULT-ROGER, C.; HEMETSBERGER, S.; BUCHBAUER, G. Use of essential oils in agriculture. Use of Essential Oils in Agriculture. In: **Handbook of Essential Oils**, 2015. p. 670–706.

REZENDE, M. E. D.; JASMIM, J. M.; CAPRINI, G. P.; SOUSA, E. F. D.; SCHRIPSEMA, J.; THIÉBAUT, J. T. L. Teor e composição química do óleo essencial de alpinia em razão da adubação e da disponibilidade de água no solo. **Revista Ceres**, n. 58, p. 208-215, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2011000200012>

RIFFEL, A.; DA COSTA, J. G. **Os voláteis de plantas e o seu potencial para a agricultura**. Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2015, 48 p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documentos, 201).

ROBBS, C. F.; RODRIGUES NETO, J. Ocorrência de *Xanthomonas campestris* pv. *melonis* em melão no Estado do Rio Grande do Norte. **Fitopatologia Brasileira**, v. 11, p. 392, 1986.

ROSENBERGER, M. G.; DE ARAUJO AMATUZI, J. C.; ROSENBERGER, A. G.; DA COSTA ZONETTI, P.; PAULERT, R. Atividade antimicrobiana de extrato de Coix Lacryma-jobi SOBRE *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* e *Fusarium graminearum*. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 13, n. 1, p. 135-148, 2020. DOI: [10.17765/2176-9168.2020v13n1p135-148](https://doi.org/10.17765/2176-9168.2020v13n1p135-148).

ROY, R.; TIWARI, M.; DONELLI, G.; V, TIWARI. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 522–554, 2018. DOI: [10.1080/21505594.2017.1313372](https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1313372)

RYAN, R. P.; VORHÖLTER, F. J.; POTNIS, N.; JONES, J. B.; VAN SLUYS, M. A.; BOGDANOVE, A. J.; DOW, M. J. Pathogenomics of *Xanthomonas*: Understanding bacterium-plant interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 344-355, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrMICro2558>

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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2008.05.028>

SAMPAIO, T. S.; BLANK A. F.; GAGLIARDI P. R.; WISNIEWSKI, A.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; NIZIO, D. A. C.; ALVES, M. F.; NASCIMENTO, A. F. J. Antifungal activity of essential oils of *myrcia ovata* chemotypes and their major compounds on phytopathogenic fungi. **Bioscience Journal**, v. 36, n. 2, p. 364- 375, 2020. DOI: [10.14393/BJ-v36n2a2020-42315](https://doi.org/10.14393/BJ-v36n2a2020-42315)

SANDINO, T.; LÓPEZ-KLEINE, L.; LÓPEZ, C.; MARQUÍNEZ, X. Caracterización de la respuesta morfológica de variedades susceptibles y resistentes de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) a la bacteriosis vascular causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 2, p. 94-100, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-5405/2031>

SANTOS, C. P.; PINTO, J. A. O.; DOS SANTOS, C. A.; CRUZ, E. M. O; ARRIGONI-BLANK, M. F.; ANDRADE, T. M.; BLANK, A. F. Harvest time and geographical origin affect the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Industrial Crops and Products**, v. 79, p. 205-210, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.015>

SANTOS, C. R. Revista campo e negócios: **Couve-flor: Clima como desafio**. 2022. Disponível em <https://revistacampoenegocios.com.br/couve-flor-clima-como-desafio/>. Acesso em: 08 de jul de 2022.

SANTOS, I. G. D. A.; SCHER, R.; ROTT, M. B.; MENEZES, L. R.; COSTA, E. V.; CAVALCANTI, S. C. D. H.; DOLABELLA, S. S. Amebicidal activity of the essential oils of *Lippia* spp. (Verbenaceae) against *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. **Parasitology Research**, v. 115, n. 2, p. 535-540, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4769-4>

SANTOS, M. M.; PEIXOTO, A. R.; PESSOA, E. D. S.; NEPA, H. B. D. S.; PAZ, C. D. D.; SOUZA, A. V. V. D. Estudos de compostos químicos e atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia gracilis* contra *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* in vitro. **Summa Phytopathologica**, v. 40, p. 277-280, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-5405/1958>

SHARMA, A.; GAUTAM, S.; WADHAWAN, S. *Xanthomonas*. **Encyclopedia of Food microbiology: Second Edition**, 2014. p. 811–817. DOI: [10.1016/B978-0-12-384730-0.00359-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00359-1)

SHARMA, G.; RAO, S.; BANSAL, A.; DANG, S.; GUPTA, S.; GABRANI, R. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: potential therapeutic targets. **Biologicals**, v. 42, n. 1, p. 1-7, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2013.11.001>

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. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01888-8>

SILVA, A. D.; KOWALSKI, L.; PAGNO, A. R.; PIANA, M. atividade antimicrobiana de flavonoides: uma revisão de literatura. **Revista Interdisciplinar em Ciências da Saúde e Biológicas**, v. 4, n. 1, p. 51-65, 2020. DOI: <https://doi.org/10.31512/ricsb.v4i1.119>

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. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-021-04832-0>

SILVA, L. R.; ZACARONI, A. B.; PEREIRA, P. H.; MUNIZ, C.; BOTELHO, A. S.; DE MELLO, S. C. M. Trichoderma: Suas interações e uma abordagem metodológica aplicada ao estudo de compostos orgânicos voláteis para o mofo-branco e promoção de crescimento de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, n.28, p. 163-183, 2022. DOI: [10.31976/0104-038321v280007](https://doi.org/10.31976/0104-038321v280007)

SILVA, P. H. R.; DA CONCEIÇÃO, C. S.; LEAL, C. M.; DA SILVA, W. J.; DA GAMA, M. A. S.; DA SILVA, M. V.; DE SOUZA, E. B. Caatinga biome plant extracts affect the planktonic growth and biofilm formation of *Xanthomonas citri* pv. *Vitícola*. **Journal of Plant Pathology**, v. 102, n. 4, p. 1245-1250, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00585-4>

SILVA, R. S. **Bactérias de solos supressivos com atividade antimicrobiana sobre *Xanthomonas campestris* pv. *campestris***. 2016. 56 p. Dissertação (Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão-SE, 2016.

SILVA, R. S. D; MOUTINHO, B. L.; SANTOS, D. R.; VASCONCELO-RODRIGUES, I. S.; TALAMINI, V.; FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. Using antagonistic soil bacteria and their cell-free filtrates to control the black rot pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Journal of Phytopathology**, v. 166, n. 7-8, p. 494-501, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/jph.12709>

SILVA, R. S.; DE OLIVEIRA, M. M. G.; DE MELO, J. O.; BLANK, A. F.; CORRÊA, C. B.; SCHER, R.; FERNANDES, R. P. M. Antimicrobial activity of *Lippia gracilis* essential oils on the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and their effect on membrane integrity. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 160, p. 40-48, 2019. DOI: <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. Synergistic effect of *Cordia curassavica* Jacq. essential oils association against the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 4, p. 4376-4389, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06631-8>

SILVA, R. S.; OLIVEIRA, M. M. G.; SILVA, K. P.; RODRIGUES, I. D. S. V.; PINTO, V. D. 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, n. 4, p. 4376-4389, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06631-8>

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. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01074>

SOARES, B. V.; TAVARES-DIAS, M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazônia**, v. 3, n. 1, p. 109-123, 2013.

SOARES, L. D. E. **Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer**. 2010. 63 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 2010.

SOUZA, L. B.; GRINDRI, A. G.; FONTES, T. A.; KUBIÇA, T. F.; ENDERLE, J.; ROEHR, R.; SILVA, S. M.; MANFREDINI, V.; DENARDIN, E. L. G. Phytochemical Analysis, Antioxidant Activity, Antimicrobial Activity, and Cytotoxicity of *Chaptalia nutans* Leaves. **Adv Pharmacol Pharm Sci**, v. 1, n. 1, p. 1-15, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/3260745>

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; TOLEDO, M. V.; PORTZ, R. L.; PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n. 1, p. 18-46 2011. DOI: [10.18188/sap.v10i1.5268](https://doi.org/10.18188/sap.v10i1.5268)

STASHENKO, E. E.; JARAMILLO, B. E.; MARTÍNEZ, J. R. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown, grown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity. **Journal of Chromatography A**, v. 1025, n. 1, p. 93-103, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.10.058>

SUGAYAMA, R. L. **Defesa vegetal: fundamentos, ferramentas, políticas**. SBDA, Sociedade Brasileira de Defesa Agropecuária, 2015.

TELES, T. V.; BONFIM, R. R.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; JESUS, H. C. R.; QUINTANS-JR, L. J.; SERAFINI, M. R.; BONJARDIM, L. R.; ARAUJO, A. A. S. Composição e avaliação da letalidade do óleo essencial de *Lippia gracilis* para adultos de *Biomphalaria glabrata* e larvas de *Artemia salina*. **Afr J Biotechnol**, n.9, p.8800–8804, 2010.

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. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0361-8>

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

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, p. 388-394, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200028>

USHIKI, J.; TAHARA, S.; HAYAKAWA, Y.; TADANO, T. Medicinal plants for suppressing soil-borne plant diseases II. Suppressive effect of *Geranium pratense* L. on common scab of potato and identification of the active compound. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 44, n. 2, p. 157-165, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1080/00380768.1998.10414436>

VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A.; FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E.; VIDAL, J. C. **Recomendações para o controle das principais doenças que afetam a cultura do melão na**

Região Nordeste. Embrapa Agroindústria Tropical, 2001. 22 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Circular técnica, 12).

VIANA, F.; ANJOS, R. M.; de HOLANDA, V. O.; CARDOSO, J. **Ocorrência de *Xanthomonas cucurbitae* em meloeiro no Ceará.** Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico. 2010.4 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 156)

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

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C. R.; WEBER, G. E. B. **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância:** Embrapa Clima Temperado, 2010, 16p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 316).

VU, B.; CHEN, M.; CRAWFORD, R. J.; IVANOVA, E. P. Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation. **Molecules**, v. 14, n. 7, 2535-2554, 2009. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules14072535>

WASUKIRA, A.; COULTER, M.; AL-SOWAYEH, N.; THWAITES, R.; PASZKIEWICZ, K.; KUBIRIBA, J.; STUDHOLME, D. J.. Genome sequencing of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* reveals variation in plasmids and genes encoding lipopolysaccharide synthesis, type-IV pilus and type-III secretion effectors. **Pathogens**, v. 3, n. 1, p. 211-237, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens3010211>

ZAMORA, P. C. M.; TORRES, C. A.; NUÑEZ, M. B. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Verbenaceae species growing in South America. **Molecules**, v. 23, n. 3, p. 544, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23030544>

4. ARTIGO 1

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia gracilis* Schauer E SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS SOBRE FITOPATÓGENOS DO GÊNERO *Xanthomonas* spp. RESISTENTES AO COBRE

Periódico submetido (ou a ser submetido): nome do periódico

RESUMO

O gênero *Xanthomonas* é formado por fitobactérias que produzem biofilme e são responsáveis por causar danos econômicos em culturas de importância agrícola. Os métodos de controle mais utilizados são as formulações à base de cobre, porém tem sido demonstrado que algumas espécies desenvolveram resistência ao cobre. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme de óleos essenciais de sete acessos de *Lippia gracilis* Schauer obtidos através da técnica de hidrodestilação, e seus compostos majoritários timol e carvacrol, bem como a resistência ao cobre sobre cinco espécies de fitobactérias do gênero *Xanthomonas*: *Xanthomonas campestris* pv. *melonis*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vasculorum* e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Foram avaliados *in vitro* o CMI e CMB, atividade antibiofilme, viabilidade celular, permeabilização da membrana plasmática, resistência ao sulfato e óxido de cobre e a avaliação morfológica do biofilme em microscopia eletrônica de varredura. O experimento *in vivo* foi conduzido em estufa agrícola com as mudas de couve manteiga e couve brócolis, utilizou-se o esquema fatorial 2x3, dois métodos de inoculação injetado e borrifado e 3 substâncias OE de LGRA-107 (250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e uma concentração de óxido de cobre 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os OEs de *L. gracilis* demonstraram atividade antimicrobiana e antibiofilme. As plantas de couve tratadas com cobre e OEs do acesso LGRA-107 obtiveram maior incremento de biomassa, o que contribuiu para menor severidade da podridão negra, demonstrando assim ser uma fonte de estudo para formulações com ação antimicrobiana.

Palavras-chave: Verbenaceae, metabólitos secundários, biofilme bacteriano, resistência, bacterioses.

ABSTRACT

Título: ANTIMICROBIAL AND ANTIBIOFILM ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS FROM *Lippia gracilis* AND THEIR MARJORITARY COMPOUNDS ON COPPER-RESISTANT PHYTOPATOGENS OF THE GENUS *Xanthomonas* spp.

The genus *Xanthomonas* is formed by phyto bacteria that produce biofilms and are responsible for causing economic damage to crops of agricultural importance. The most used control methods are copper-based formulations, but it has been shown that some species have developed resistance to copper. The objective of this work was to evaluate the antimicrobial and antibiofilm activity of essential oils from seven accessions of *Lippia gracilis* Schauer obtained through the hydrodistillation technique, and its major compounds thymol and carvacrol, as well as the copper resistance, on five species of phyto bacteria of the genus *Xanthomonas*: *Xanthomonas campestris* pv. *melonis*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vasculorum*, and *Xanthomonas campestris* pv. *country*. CMI and CMB, antibiofilm activity, cell viability, plasma membrane permeabilization, resistance to sulfate and copper oxide and the morphological evaluation of the biofilm in scanning electron microscopy were evaluated in vitro. The *in vivo* experiment was carried out in an agricultural greenhouse with kale and broccoli kale seedlings, using a 2x3 factorial scheme, two inoculation methods injected and sprayed and 3 OE substances of LGRA-107 (250 and 500 µg mL⁻¹) and a copper oxide concentration of 2000 µg.mL⁻¹. *L. gracilis* OEs demonstrated antimicrobial and antibiofilm activity. Cabbage plants treated with copper and EOs from the LGRA-107 accession obtained a greater increase in biomass, which contributed to a lower severity of black rot, thus proving to be a source of study for formulations with antimicrobial action.

Keywords: Verbenaceae, secondary metabolites, bacterial biofilm, resistance, bacteriosis.

4.1. Introdução

A *Lippia gracilis* Schauer é uma espécie vegetal pertencente ao gênero *Lippia*, membro da família Verbenaceae. Este gênero possui aproximadamente 200 espécies distribuídas na América do Sul e Central, e na África tropical. No Brasil, a espécie é encontrada principalmente no Nordeste e no Cerrado, nos estados de Minas Gerais, Bahia, Sergipe e Alagoas. Este vegetal é classificado botanicamente como um arbusto, herbáceo de 25 cm de altura, ramificado, com folhas pequenas e flores brancas odoríferas (LORENZI e MATOS et al., 2002; MORRETO et al., 2008; MORAES et al., 2018). Seu óleo essencial possui diversas aplicações como a atividade antimicrobiana sobre bactérias e fungos, ação contra protozoários como a ameba e a leishmania, ação antitumoral e antidiabetes, provavelmente devido à presença de compostos como timol e carvacrol (BLANK, 2013; RAGAGNIN et al., 2014; PINHEIRO, 2021; NETO et al., 2010; MELO et al., 2013; MELO et al., 2014; SANTOS et al., 2016).

O gênero *Xanthomonas* é formado por fitopatógenos gram-negativos, uniflagelar, que produzem biofilme e que podem causar doenças em pelo menos 124 monocotiledôneas e 268 eudicotiledôneas. Nas plantas, órgãos como caules, galhos, folhas, flores, brotos, frutos e sementes podem ser colonizados por *Xanthomonas* (HAYWARD, 2011; SHARMA; GAUTAM; WADHAWAN, 2014).

Dentre estas espécies destacam-se algumas doenças bacterianas em plantas de grande importância agrícola como a podridão negra (*X. campestris* pv. *campestris*), principal doença que acomete a família das brássicas, o cancro cítrico (*X. citri* subs *citri*), uma das principais doenças do citrus, o crestamento do arroz (*X. oryzae* pv. *oryzae*), estria bacteriana do milho (*X. vasicola* pv. *vasculorum*) e a barriga d'água do meloeiro (*X. campestris* pv. *melonis*) (TIMILSINA et al., 2020).

Um dos grandes fatores de resistência destes fitopatógenos é o biofilme, formado por associações complexas entre bactérias, que conferem benefícios para estes organismos como proteção, resistência a antibióticos e maior virulência (O'TOOLET et al., 2000). Atualmente os métodos de controle mais utilizados contra fitobactérias são os antibióticos e as formulações à base de cobre, porém o uso de forma errada destes compostos pode provocar maior resistência aos patógenos e problemas ambientais e de saúde pública (BAHARVAND-AHMADI et al., 2017).

Silva et al. (2019) ao estudarem a ação do óleo essencial de *L. gracilis* sobre a fitobactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, agente casual da podridão negra das crucíferas, doença mais importante das brássicas, puderam confirmar a atividade antimicrobiana e antibiofilme destes óleos, assim como também dos seus compostos majoritários timol e carvacrol sobre a membrana bacteriana.

Diante disto, uma alternativa a ser explorada são as moléculas oriundas do metabolismo secundário de plantas como os óleos essenciais, que são compostos voláteis que possuem atividade antimicrobiana e antibiofilme sobre bactérias patogênicas, pois agem sobre o metabolismo, regulação enzimática e alteração da membrana celular destes organismos (CORDEIRO, 2014; TOFIÑO-RIVERA et al., 2016).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme de óleos essenciais de diferentes acessos de *L. gracilis* e seus compostos majoritários, e diferentes fontes de cobre sobre cinco espécies de *Xanthomonas* spp.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Obtenção do material vegetal, extração dos óleos essenciais e obtenção dos compostos majoritários

Foram avaliados sete acessos do óleo essencial (OEs) de *Lippia gracilis* (LGRA) implementados no Banco Ativo de Germoplasma de Plantas Medicinais e Aromáticas da Universidade Federal de Sergipe na 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, o registro da espécie estudada foi depositado no Herbário da Universidade Federal de Sergipe, Departamento de Biologia, número ASE 9404 (Tabela 1).

As folhas dos sete acessos de LGRA foram coletadas e submetidas à hidrodestilação em aparelho Clevenger modificado, utilizando amostras de 100g de folhas secas, com adição de 2L de água destilada, durante 140 minutos. Os óleos essenciais foram coletados e estocados em frasco âmbar, a -20°C até a realização dos experimentos.

Os compostos majoritários do OE de *L. gracilis*: carvacrol e timol, utilizados nos experimentos, foram adquiridos da empresa comercial Sigma-Aldrich (98% pureza) e (99% de pureza) (St. Louis, MO).

4.2.2. Condições de crescimento dos microrganismos

Os cinco isolados de *Xanthomonas* spp. (Tabela 2) foram adquiridos da coleção de culturas de fitobactérias do Instituto Biológico (São Paulo, Brasil). As bactérias foram cultivadas a 30°C ± 2° em meio de cultura YM padronizado (0,3% extrato de levedura; 0,5% peptona bacteriológica; 0,3% extrato de malte e 1% de sacarose), sob agitação orbital (150 rpm) a 28°C.

Os inóculos foram padronizados pela incubação *overnight* até se obter a concentração de células de (1 x 10⁶ UFC mL⁻¹) com DO_{600nm} = 0,5.

4.2.3. Atividade bacteriostática e bactericida

A determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e a Concentração Mínima Bactericida (CMB) foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido pelo NCCLS/CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (M7-A6). Foi utilizado o método de diluições seriadas em Microplacas de 96 poços.

Os OEs de sete acessos de *Lippia gracilis* e seus compostos majoritários, carvacrol e timol, foram adicionados em microplacas de 96 poços estéril (KASVI®), pela pipetagem de 100 µL com concentrações variando de (1000, 500, 250, 125 e 62,5 µg.mL⁻¹). Como controle positivo foram utilizados 200 µg.mL⁻¹ de óxido de cobre II (CuO²⁺) e Sulfato de cobre (CuSO₄), obtidos da empresa ACS Científica (99% de pureza) e 100 µg.mL⁻¹ do antibiótico sulfato de estreptomicina purex adquirido da empresa INLAB (99% de pureza). Os OEs e as moléculas foram diluídos com o solvente orgânico DMSO 100% de Dimetilsulfóxido (Sigma Aldrich 99,9% de pureza), sendo que a concentração nos poços nunca foi maior que 1%.

Em seguida, as placas foram inoculadas com o inóculo padronizado dos fitopatógenos (100 µL). As placas foram incubadas em shaker com agitação orbital de (150 rpm) com temperatura de 28°C por 24h. As amostras foram lidas no espectrofotômetro em Leitor de Microplacas Synergy™ H1 da Bio TekHybrid Technology utilizando o comprimento de onda de 600 nm. Para cálculo da % de inibição foi utilizada a fórmula 1.1 e a CMI foi definida como a concentração que inibiu 100 % do crescimento bacteriano.

$$\% \text{ inibição} = \frac{OD \text{ controle} - OD \text{ amostra}}{OD \text{ controle}} * 100$$

Onde, *OD amostra* (corresponde à média das absorvâncias de crescimento das bactérias tratadas), *OD controle* (corresponde à média das absorvância do crescimento do controle bactérias não tratadas).

Para avaliação da CMB, retirou-se 20 µL dos poços onde não houve crescimento após 24h e adicionados em placas de Petri com alça de drigalski e incubadas em estufa bacteriológica por 24h. A CMB foi definida como a concentração à qual foi observada a ausência de colônias bacterianas.

4.2.4. Teste de viabilidade celular

A atividade metabólica foi determinada através do corante de viabilidade celular resazurina (Sigma-Aldrich®). Essa atividade foi determinada para os OEs que apresentaram menor CMI para cada um dos cinco fitopatógenos.

Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados a cada poço 100 µL da CMI dos OEs selecionados e 100 µL da cultura padronizada dos fitopatógenos. Como controle negativo foi utilizado 100 µL de DMSO a 1% diluído em YM e como positivo 100 µL de estreptomicina (100 µg mL⁻¹). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica 28 ± 2 °C por 24h. Após o período de cultivo foi adicionado a cada poço 40 µL de resazurina (0,02% em PBS autoclavado). Seguido da incubação por 30 min 28 ± 2 °C. Após a incubação a fluorescência da resazurina foi lida em leitor de Microplacas (λ_{ex} = 560 nm e λ_{em} = 590 nm).

4.2.5. Ensaio de permeabilização de membrana

Para análise da permeabilidade da membrana plasmática foram utilizados os OEs que apresentaram menor CMI para cada um dos cinco fitopatógenos. Em tubos Falcon de 15 mL foram pipetados 2,5 mL da concentração ao CMI (Concentração Mínima Inibitória) dos OEs e dos compostos majoritários e inoculados com 2,5 mL de cultura padronizada dos fitopatógenos. As placas foram incubadas por 30, 60 e 120 min. Após a incubação, 1000 µL das amostras foram transferidas para eppendoffs de 2 mL e centrifugadas, lavadas e ressuspensas com tampão fosfato-salino (8 g/L de NaCl, 0,2 g.L⁻¹ de KCl, 1,44 g.L⁻¹ de Na₂HPO₄ e 0,24 g/L de KH₂PO₄ com pH 7.4) por 5 min. Após estes processos, uma alíquota de 200 µL foi transferida para placas de 96 poços estéril (KASVI®) em duplicata e incubadas com Iodeto de propídio (IP 3 mM) a 28°C por 15 minutos no escuro.

Como controles experimentais, foram utilizados os fitopatógenos não tratados com DMSO 1% e os fitopatógenos com tratamento térmico (banho-maria a 100°C por 5 minutos). A fluorescência foi lida em espectrofotômetro a 493/645nm (excitação/emissão). Os dados foram expressos em porcentagem de permeabilidade (% *viabilidade*) segundo a fórmula:

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

Onde, *fluorescência do tratamento* corresponde à média de fluorescência do tratamento, *fluorescência do controle* corresponde à média de fluorescência do controle com tratamento térmico.

4.2.6. Atividade antibiofilme

O efeito dos óleos essenciais sobre a formação de biofilme dos fitopatógenos foi realizado utilizando-se o corante cristal violeta. Os fitopatógenos foram tratados com: sete acessos de OEs, os compostos majoritários carvacrol e timol, nas concentrações equivalentes a 1x, 1/2, 1/4 e 1/8 da CMI e duas concentrações de Óxido de cobre II com 200 µg.mL⁻¹. Utilizou-se como controle positivo o antibiótico Estreptomicina 200 µg.mL⁻¹, como controle negativo o inóculo bacteriano com DMSO a 1%.

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica 28 ± 2 °C por 24h e então foram centrifugadas (14.000 g/ 10 min/ 25 °C) e, em seguida, o sobrenadante foi removido dos poços. Posteriormente, foram acrescidos aos poços 200 µL de etanol (95%) durante 15 min para auxiliar na fixação das células, após, as microplacas foram secas ao ar em câmara de fluxo laminar por aproximadamente 5 min. Em seguida, foi adicionado aos poços 200 µL de cristal

violeta na concentração 0,01% por 15 min em temperatura ambiente e, em seguida, o sobrenadante foi removido e os poços foram 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 min e, em seguida, 200 μL de cada poço foram transferidos para uma nova microplaca e as absorbâncias foram lidas em leitor de microplacas Synergy™ H1 da Bio TekHybrid Technology usando um comprimento de onda de 562 nm.

4.2.7. Avaliação do efeito dos OEs de LGRA por microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

Para determinar as alterações morfológicas em células de X1- *Xanthomonas campestris* pv. *melonis* e X5- *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, foram utilizados os OEs com menor CMI em concentrações equivalentes a CMI e 1/4x da CMI dos OEs e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do CuO . Um alíquotas de 500 μL do inóculo padronizado (10^6 UFC mL^{-1}) foram distribuídas em poços de placas de cultura celular de 24 poços e tratados com os OEs por 24h. Após o período de incubação, o meio de cultura foi removido dos poços e lavados com 1000 μL de tampão PBS (0,1 M pH = 7,4) para a remoção das células bacterianas não aderentes à lâmina. Em seguida, as células de Xcc aderidas à lâmina foram fixadas com 1:1:2 (v/v) de glutaraldeído 4%, paraformaldeído 2% e PBS 0,1 M (pH=7,4) por 1h em temperatura ambiente.

Após a incubação, as células aderidas foram lavadas duas vezes em PBS 0,1 M (pH=7,4) e desidratadas em séries graduadas de etanol glacial nas concentrações percentuais de (50, 70, 80, 90, 95 e 100%) a 4°C por 10 min. Após as lavagens o etanol foi substituído por uma mistura de 1:1 de etanol e HMDS (Hexamethyldisilazane) por 10 min.

Após a secagem, as células aderidas foram revestidas com filme de ouro de 15 nm através de revestimento automático por aspersão, durante 60s. Finalmente as células foram visualizadas através de MEV (JEOL 5700) sob aumento de 10.000 e 5000x.

4.2.8. Ensaio da atividade antimicrobiana do OE de LGRA *in vivo* sobre *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em couve manteiga e couve brócolis

O experimento *in vivo* foi conduzido em estufa agrícola no Departamento de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal de Sergipe.

Foram utilizadas as espécies de couve manteiga (*Brassica oleracea* var. *acephala* L.) cultivar Manteiga de Geórgia e couve-brócolis (*Brassica oleracea* var. *italica* DC) cultivar Ramoso Santana da empresa ISLA, as mudas foram produzidas em copos de plástico de 180 mL, com substrato comercial MAXXI composição: composto, orgânico, calcário, cascas prensadas e decompostas e vermiculita expandida. As mudas foram transplantadas para sacos de polietileno 1kg e substrato comercial.

Foram utilizados os seguintes tratamentos: couve manteiga e couve brócolis tratadas com duas dosagens do OE de LGRA-107 (250 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), as moléculas foram diluídas em DMSO a 1% e uma dose de óxido de cobre (2 mg.mL^{-1}) e um controle na qual as plantas foram tratadas apenas com água destilada.

O esquema experimental foi o DIC (delineamento inteiramente casualizado) com 2x3 fatores: 2 modos de inoculação, 3 substâncias e 3 repetições. Após 60 dias de germinação, as plantas foram tratadas com óleos nas duas concentrações de OE de LGRA-107 e o óxido de cobre, como efeito protetivo, e após 2 dias inoculou-se a fitobactéria na concentração de células de 1×10^9 UFC mL^{-1} , com $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,8$. As plantas permaneceram em câmara úmida durante 24h para criação de um microclima e a manifestação dos sintomas da doença, após este período foi avaliada a cada dois dias, durante o período de 15 dias, a progressão da doença de acordo com os sintomas característicos da podridão negra.

Para análise de severidade adotou-se a escala de notas proposta por Sidhu e Webster (1977) onde: 0 a 5%, onde 0= foram as folhas com ausência de sintomas, 1= 0 a 15% da Área foliar lesionada (AF) lesionada 2= 16 a 30% AF lesionada, 3= 31 a 60% AF lesionada, 4= 61

a 90% AF lesionada e de 5= 91 a 100% AF lesionada. Também foram avaliados os parâmetros biométricos: biomassa fresca da parte aérea (BMF), biomassa seca da parte aérea (BMS) gramas por planta e número de folhas (NF), após 15 dias da inoculação.

4.2.9 Análise dos dados

Os ensaios para a determinação das Concentrações Mínima Inibitória (CMI) e Mínima Bactericida (CMB), viabilidade celular e permeabilidade de membrana foram realizados em triplicata e repetidos em dois dias independentes. Os dados gerados foram plotados com o auxílio do software Graph Pad Prism (versão 7, CA, San Diego, EUA, 2012).

A identificação dos compostos relacionados com a atividade bactericida foi realizada usando o método de Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). O método foi utilizado para associar a porcentagem de ocorrência dos compostos presentes nos óleos essenciais com a concentração bactericida mínima (CMB) 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 resultados do experimento *in vivo* foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey ($p \leq 0,05$) utilizando o programa estatístico SISVAR® versão 5.6 (FERREIRA, 2011). A análise multivariada de componentes principais (PCA) com os dados da composição química dos óleos essenciais foi realizada por meio do *software* Statistica® 6.0.

4.3. Resultados

4.3.1. Atividade bacteriostática e bactericida

Os óleos de *L. gracilis* apresentaram atividade antimicrobiana comprovada por meio dos ensaios de CMI e CMB (Tabela 3). A CMI dos óleos dos acessos LGRA-106, LGRA-109, LGRA-110 e LGRA-202 foi de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, exceto para os óleos dos acessos LGRA-107, LGRA-108 e LGRA-201 que apresentaram CMI maior que $>1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, para as espécies de fitobactérias *X. axonopodis* pv. *manihotis*, *X. arboricola* pv. *pruni* e *X. campestris* pv. *melonis*, respectivamente. Os acessos que apresentaram atividade bacteriostática sobre todas as espécies de bactérias testadas foram os óleos dos acessos LGRA-106, LGRA-109, LGRA-110 e LGRA-202 na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Na concentração de 500 $\mu\text{g mL}$ apenas os óleos LGRA 107 e LGRA-110 apresentaram atividade sobre a espécie *X. campestris* pv. *campestris* e o acesso LGRA-110 sobre a espécie *X. axonopodis* pv. *manihotis*. Os compostos majoritários isolados, timol e carvacrol apresentaram maior atividade bacteriostática com o CMI variando entre 250 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As bactérias *X. arboricola* pv. *pruni* apresentaram maior sensibilidade ao carvacrol com CMI de 250 $\mu\text{g mL}$. Já para o timol a bactéria que apresentou maior sensibilidade foi a *X. campestris* pv. *melonis* com 250 $\mu\text{g mL}$. Os compostos óxido de cobre, sulfato de cobre e estreptomicina nas dosagens de 200 $\mu\text{g mL}$, demonstraram ação bacteriostática apenas para a espécie *X. vasicola* pv. *vascularum*.

A maioria dos OEs dos acessos de LGRA apresentaram atividade bactericida. O OE do acesso LGRA-109 e o carvacrol apresentou atividade sobre todas as espécies testadas, porém os óleos LGRA-106 e LGRA-201 não apresentaram atividade bactericida sobre a fitobactéria *X. campestris* pv. *melonis* e *X. arboricola* pv. *pruni*. Os acessos LGRA-108 e LGRA-109 apresentaram atividade bacteriostática sobre LGRA-108 e LGRA-109. Os OEs dos acessos LGRA-106 e LGRA-201 não apresentaram atividade bactericida sobre a fitobactéria *X. campestris* pv. *melonis* e *X. arboricola* pv. *pruni*. Esta fitobactéria apresentou atividade apenas com os OEs dos acessos LGRA-109 e os compostos timol e carvacrol, sendo que o carvacrol demonstrou maior ação que os demais compostos. Assim como também os óleos LGRA-107 e LGRA-201 não apresentaram atividade sobre a espécie *X. axonopodis* pv. *vascularum*. Em relação à espécie *X. campestris* pv. *campestris*, apenas o óleo essencial do acesso LGRA-108 não demonstrou atividade bactericida. As substâncias óxido de cobre e sulfato de cobre com 200 $\mu\text{g mL}$ não apresentaram atividade bactericida, em contrapartida, o composto carvacrol

apresentou atividade sobre todas as bactérias com $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a *X. arboricola* pv *pruni*. Porém, o timol só apresentou atividade sobre as espécies *X. arboricola* pv. *pruni* e *X. axonopodis* pv. *manihotis* (Figura 1).

4.3.2 Determinação da viabilidade celular

No teste de viabilidade celular (Figura 2) pode-se observar uma baixa ou nula atividade metabólica das células, tendo em vista que a viabilidade da maioria das espécies de fitobactérias não foi observada ou quando observadas foram muito baixas, indicando a alta atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *L. gracilis*. Para o isolado *X. campestris* pv. *melonis*, pode-se observar que os OEs do acesso LGRA-202, o timol e carvacrol apresentaram 6,1, 2,9 e 7,3%, respectivamente. A espécie *X. axonopodis* pv. *manihotis* apresentou comportamento semelhante com viabilidade de 11,46% com o uso do OEs do acesso LGRA-110 e 21,55% com o uso do timol e sem viabilidade para as células tratadas com o carvacrol, no entanto as espécies *X. arboricola* pv. *pruni*, *X. axonopodis* pv. *vasculorum* e *X. campestris* pv. *campestris* não apresentaram atividade metabólica quando submetidas aos OEs dos acessos LGRA-107 e LGRA-106, carvacrol e timol, respetivamente, apenas as células bacterianas da espécie *X. axonopodis* pv. *vasculorum* não apresentaram viabilidade celular com o uso do antibiótico estreptomicina e uma viabilidade de 80% quando tratadas com óxido de cobre. Em relação ao óxido de cobre e sulfato de cobre com concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, as bactérias apresentaram alta viabilidade celular.

4.3.3 Efeitos dos OEs de LGRA sobre a permeabilização de membrana

O ensaio de permeabilidade de membrana demonstrou que todos os compostos testados: carvacrol, timol e os OEs dos acessos de LGRA-202, LGRA-110, LGRA-107 e LGRA-106 apresentaram maior fluorescência indicando permeabilização da membrana bacteriana nos tempos de 30, 60, 90 e 120 min em relação ao controle negativo (CN) para todas as espécies de fitobactérias estudadas (Figura 3). Ao analisar o isolado *X. campestris* pv. *melonis* em relação ao tempo de exposição pode-se perceber que o tempo de maior ação foi o de 120 min, onde as fluorescências variaram de 74,86 e 82,49%, não diferindo do controle positivo (CP) na qual as células foram expostas ao maior nível de dano à membrana. Enquanto o isolado *X. axonopodis* pv. *manihotis* não apresentou diferença entre os tempos de exposição testados e entre os tratamentos LGRA-110, carvacrol e o timol, que demonstram fluorescência de 49,66 52,39 e 49,98% em relação às células não tratadas.

Já o isolado *X. arboricola* pv. *pruni* demonstrou fluorescência de 78 a 100% quando tratado com o OE do acesso LGRA-107, não diferindo do controle positivo, os compostos timol e carvacrol diferiram estatisticamente do controle positivo, porém não diferiram do OE do LGRA-107, com permeabilidade no tempo de 90 min com fluorescência de 100, 95,14 e 93,14%. O isolado *X. axonopodis* pv. *vasculorum* demonstrou permeabilização da membrana quando tratado com o timol com fluorescência de 62,78% no tempo de 90 min e de 77,68% com OE do acesso LGRA-106, bem como para o carvacrol com 72,52% no tempo de 120 min, respectivamente, em relação às células. Os tratamentos e os diferentes tempos de exposição às substâncias não diferiram estatisticamente entre si nos tempos avaliados. Os dados obtidos demonstram que para o isolado *X. campestris* pv. *campestris* não houve diferença entre os tratamentos testados, a partir do tempo de exposição 60 min observou-se que o OE do LGRA-107, carvacrol e timol permeabilizaram a membrana com fluorescência de 63,23 a 91,03%, indicando danos na membrana das células bacterianas desta espécie. No geral todos os tratamentos demonstraram ação sobre a membrana das espécies de bactérias testadas quando comparadas ao controle.

4.3.4 Atividade antibiofilme

Todos os óleos essenciais apresentaram atividade antibiofilme sobre o isolado X1, com mais de 70% de inibição da formação do biofilme na concentração de $1 \times \text{CMI}$ ($1000 \mu\text{g.mL}$),

apenas o OE do acesso LGRA-107 que apresentou 1x CMI de (500 µg mL) e inibição de até 77,5% (Figura 4). Os OEs dos acessos que apresentaram inibição acima de 50% na dosagem de 1/8x CMI (125 µg.mL) foram os OEs dos acessos LGRA-109, LGRA-201 e LGRA-202, que demonstraram maior atividade com inibição de 100% de formação de biofilme na dosagem de 1x CMI e 1/4x CMI (250 µg mL). O timol apresentou maior atividade com variação de 89,61% na concentração de 1x CMI e 51,88% na concentração de 1/8x CMI, já o carvacrol apresentou inibição de 54% 1x CMI e não apresentou atividade antibiofilme na concentração de 1/8x CMI. O isolado X2 demonstrou redução do biofilme nas maiores concentrações com redução de mais de 70 % para todos os OEs dos acessos, exceto para o OE do acesso LGRA-110, timol e o carvacrol, que apresentou redução maior ou igual a 50%. Os OEs dos acessos que demonstraram maiores valores de redução na formação do biofilme foram o LGRA-109 com 82%, LGRA-202 74% e o LGRA-202 73%, foi observado nos mesmos OEs dos acessos que a dosagem de 1/8x CMI também promoveu redução do biofilme com as porcentagens de 72%, 61% e 45%. O OE do acesso LGRA-110, carvacrol e timol não demonstraram ação sobre a formação do biofilme na concentração de 1/8x CMI.

A espécie X3 apresentou redução de mais de 70% na maioria dos OEs dos acessos na concentração de 1x CMI, com destaque para o OEs dos acessos LGRA-107 com 80% e LGRA-202 70% e o composto majoritário carvacrol 85%, exceto para os OEs dos acessos LGRA-201 e LGRA-106 que apresentaram valores de 65% e 45%, respectivamente. A concentração de 1/8x CMI do carvacrol e os OEs dos acessos LGRA-107 e LGRA-202 apresentaram redução na formação de biofilme de 50, 40 e 26%. Em relação à espécie X4, os OEs dos acessos com concentração de 1x CMI que apresentaram redução na formação do biofilme acima de 50% foram os OEs dos acessos LGRA-106, LGRA-202, LGRA-107 com percentual de redução de 75, 71 e 65%, o timol e carvacrol apresentaram redução acima de 75% na concentração de 1/8x CMI, o carvacrol e o OE do acesso LGRA-106 e o timol apresentaram redução de 50, 34 e 28%.

A estreptomicina promoveu uma redução de mais 50% do biofilme nas cinco espécies de fitobactérias estudadas na concentração de 1x CMI e dosagem 1/8x CMI, exceto para a bactéria X1 que não apresentou redução do biofilme com 1/8x CMI. O óxido de cobre demonstrou comportamento semelhante com inibição de biofilme acima de 50% nas concentrações de 1x CMI e 1/8x CMI. O sulfato de cobre com 200 µg mL não apresentou atividade antibiofilme em nenhuma das espécies testadas, por conta disto os dados não foram mostrados no gráfico.

4.3.5 Análises multivariada PCA, dendrograma de similaridade e PLS-DA

De acordo com a análise multivariada de componentes principais (Figura 5A), o componente principal primário representa 51,24% da variância total e indica que os óleos essenciais dos acessos LGRA-108 e LGRA-201 influenciaram na concentração inibitória mínima e na concentração bactericida mínima, no entanto foi menos determinante para a variável formação de biofilme. O componente principal secundário representa 17,11% da variação total, onde o composto timol apresenta maior influência sobre a concentração bactericida mínima para as fitobactérias X1, X4 e X5, porém esse comportamento não foi observado quando analisado o óleo essencial do acesso LGRA-108.

A análise de similaridade está apresentada na (Figura 5B). O dendrograma demonstra a similaridade entre os OEs dos acessos de *L. gracilis* considerando as variáveis CMI, CMB, atividade antibiofilme e concentrações dos compostos majoritários, timol e carvacrol, no qual os OEs dos acessos LGRA-202 e LGRA-108 possuem menor nível de similaridade, enquanto os OEs dos acessos LGRA-202 e LGRA-109 são mais semelhantes.

Através da análise PLS-DA (Análise discriminante por mínimos quadrados parciais) foi possível identificar os compostos presentes no óleo essencial de *L. gracilis* correlacionados com a atividade bactericida (CMB) sobre as cinco fitobactérias estudadas (Figura 6). O método PLS-DA foi construído usando dois componentes que explicaram pelo menos 96% da variância do modelo. Para o isolado X1 o composto que apresentou maior atividade bactericida com maior

importância na projeção (VIP Score-valor de coeficiente) foi o *p*-cimeno 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e timol com a concentração bactericida de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Valor de coeficiente média e alta correlação: 1,5 e 3). O isolado X2 e X4 demonstraram alta correlação com o timol na dosagem de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Valor de coeficiente, alta correlação: 3) para ambos. Já o isolado X3 no carvacrol apresentou maior atividade bactericida na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (valor de coeficiente, alta correlação: 3) para ambos. Para o isolado X5 os compostos variaram em timol 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e carvacrol 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Valor de coeficiente de correlação: 2,5 e 3), respectivamente, indicando que o timol e carvacrol são os compostos que apresentam maior influência sobre a atividade bactericida do óleo essencial de diferentes acessos de *L. gracilis*.

4.3.6 Avaliação do efeito do OE de LGRA e o óxido de cobre por microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

A MEV foi utilizada para observar alterações morfológicas nas células bacterianas e na formação do biofilme de X1 e X5 após a exposição aos OE dos acessos LGRA-202 1x CMI e 1/4x CMI e LGRA-107 1x CMI e 1/2x CMI, e óxido de cobre (200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) por 24h. Foi possível observar células degradadas e a ausência de biofilme nas espécies X1 e X5 tratadas com 1x CMI LGRA-202 e 1x CMI LGRA-107. Para a espécie X1 a concentração de 1/4x CMI de óleo essencial do acesso LGRA-202 demonstrou formação de biofilme bacteriano e de estruturas de comunicação entre as bactérias (QS), indicando que provavelmente as células bacterianas identificaram um fator externo e estão em processo regulatório.

O uso do óxido de cobre (200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) na espécie X1 permitiu observar uma redução na formação do biofilme em relação ao controle, assim como também demonstrou deformações na estrutura bacteriana e pequenas perfurações na membrana externa. Já para X5, apenas foi observado a redução do biofilme (Figura 7.1 e 7.2).

4.3.7 Ensaio da atividade antimicrobiana do OE de *L. gracilis* e óxido de cobre *in vivo* sobre *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em couve manteiga e couve brócolis

No experimento *in vivo*, mesmo com a aplicação dos tratamentos com o óxido de cobre (2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), LGRA-107 (250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e LGRA-107 (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), as plantas de couve manteiga e couve brócolis foram suscetíveis à podridão negra de acordo com a escala criada para severidade (Figura 8). Porém ao avaliar os parâmetros biométricos, pode-se observar que a mudas de couve manteiga tratadas com o óxido de cobre (2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) obtiveram maiores médias de incrementos de BMF (Biomassa fresca por planta) com valor de 15,97g, diferindo em relação ao controle com média de 8,84g, porém não houve diferença significativa quando aplicado o teste de Tukey entre os tratamentos entre o óxido de cobre e os OEs do acesso LGRA-107 (250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e entre o LGRA-107 (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e o controle, indicando que a aplicação com o óxido de cobre reduz a severidade da podridão negra sobre a área foliar da couve manteiga, quando avaliada BMF, não houve diferença para os parâmetros BMS (Biomassa seca) e NF (Número de folhas) (Tabela 5).

As plantas de couve brócolis demonstraram diferença significativa a 0,05% de probabilidade através do teste de Tukey, no tratamento controle em relação ao modo de inoculação da *X. campestris* pv. *campestris* através de injeção nos vasos condutores e borrifado sobre a planta para o parâmetro de BMS. Em relação ao NF as plantas inoculadas tratadas com o óxido de cobre (2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentaram maior número de folhas com a média de 9,33 folhas por planta em relação ao controle, que obteve média de 5,66 folhas por planta, porém não houve diferença significativa para os tratamentos utilizando os OEs dos acessos LGRA-107 (250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e LGRA-107 (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) variando de 6,0 a 8,33 folhas por planta assim como também não houve diferença entre o óxido de cobre e o OE do acesso LGRA-107 (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Este dado indica que a inoculação sistêmica causa maior severidade em relação à inoculação superficial através do borrifo. O efeito dos óleos essenciais pode ter sido mascarado pelo modo de aplicação nas plantas ou pelo tempo de efeito e a concentração, já que os OEs possuem alta volatilização sendo necessários estudos sobre o modo de aplicação e sobre a

concentração necessária de OEs de *L. gracilis* para o controle da podridão negra em couve manteiga e brócolis.

4.4. Discussão

Os resultados deste estudo demonstram que todos os acessos de *Lippia gracilis* Schauer testados apresentaram atividade antimicrobiana sobre as cinco espécies de fitobactérias do gênero *Xanthomonas* spp. Com base nos dados de atividade bacteriostática (CMI) e bactericida (CMB) com dosagem variando de 500 a 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ com destaque para os acessos que demonstraram maior atividade bactericida LGRA-107 sobre os isolados X1 e X5 (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e LGRA-109 (1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) com ação sobre todos os isolados (Tabela 4) (Figura 1). A análise de viabilidade celular também demonstrou que a maioria das bactérias não apresentaram viabilidade quando submetidas ao tratamento com os OE de *L. gracilis* e com os compostos timol e carvacrol (Figura 4), indicando uma alta atividade antimicrobiana (Sartoratto et al., 2004).

Em relação à inibição da formação de biofilme, os OEs dos acessos LGRA-109 e LGRA-202 e LGRA-201 apresentaram inibição de até 100% da formação. A análise de PCA (Análise de componentes principais) demonstra como estes OEs estão correlacionados positivamente com a atividade bacteriostática, bactericida e antibiofilme, assim como também o dendrograma demonstra a similaridade entre os OE dos acessos LGRA-109 e LGRA-202 (Figura 5A e 5B). Em relação aos compostos majoritários carvacrol e timol o CMI variou de (250 a 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e CMI (500 a 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), respectivamente (Tabela 4). Estes dados corroboram com o estudo de Silva et al. (2019).

Nas imagens de microscopia de varredura (MEV) para a espécie *X. campestris* pv. *Melonis* foi possível observar que o OE do acesso LGRA-202 e óxido de cobre 1X CMI demonstrou redução na formação do biofilme de 100% em relação ao controle, além de causar a degradação das células bacterianas quando tratadas com o OE do acesso LGRA-202 e perfurações nas células tratadas com o óxido de cobre. Este é um resultado importante tendo em vista que não há relatos e nem imagens na literatura sobre a ação de óleos essenciais sobre esta fitobactéria que causa a doença da barriga d'água do melão. O OE do acesso LGRA-107 1x CMI e o óxido de cobre também demonstraram ação sobre a formação do biofilme da espécie *X. campestris* pv. *campestris* causadora da podridão negra. É possível observar deformações nas células bacterianas e redução do biofilme em relação às células não tratadas (Figura 7.1 e 7.2), essas observações também foram relatadas por Silva et al. (2020) com a fitobactéria *Xcc* tratada com o óleo de *Varronia curassavia*.

Esta atividade se dá devido à presença dos compostos terpenoides presentes nos OE de *L. gracilis*, como o carvacrol com variação de 35,02% para o acesso LGRA-201 e 49,25% para acesso LGRA-109. O composto timol apresentou variação de 3,09% para o acesso LGRA-108 e 60,47% para LGRA-106, outros compostos também foram relatados como o *p*-cimeno e β -cariofileno (Moraes et al., 2018; Silva et al., 2019). Através da análise PLS-DA (Análise Discriminante por Quadrados Mínimos) foi possível identificar que o timol e carvacrol foram os compostos presentes no OE de *L. gracilis* que obtiveram maior correlação com a atividade bactericida (CMB) nas concentrações de (500 a 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) sobre as cinco fitobactérias estudadas (Figura 6).

Na literatura diversos estudos vêm demonstrado a ação dos OEs do gênero *Lippia* e compostos como timol e carvacrol sobre fitobactérias do gênero *Xanthomonas* sp. e bactérias multirresistentes que possuem resistência a antibióticos e ao cobre (Quezado-Duval et al., 2003; Santos et al., 2014; Flores et al., 2019; Qiao et al., 2020).

A avaliação da permeabilidade de membrana demonstrou que o OE do acesso LGRA-202 sobre a fitobactéria (X1), LGRA-110 (X2), LGRA-107 (X3), LGRA-106 (X4) e LGRA-107 (X5), timol e carvacrol permeabilizaram a membrana para os cinco isolados, a partir de 30 min de exposição e com maior tempo de ação de 120 min variaram de 50% a 100% de permeabilização em relação às células não tratadas. Esta permeabilização pode ter sido a causa

dos danos à membrana externa e interna das bactérias, devido à característica anfifílica dos óleos essenciais, que podem penetrar a bicamada lipídica causando alterações nos ácidos graxos e, consequentemente, aumento da permeabilidade da membrana. Agindo assim em diferentes mecanismos de ação na estrutura celular bacteriana como danificação da membrana citoplasmática e o extravasamento de íons, a redução da síntese de ATP, a perda de componentes intracelulares vitais (Nazzaro et al., 2013; Rao, Chen, McClements, 2019). Esta ação também é vista nos compostos timol e carvacrol que fazem parte do grupo dos fenilpropanoides e possuem uma alta atividade antimicrobiana devido a sua ligação dupla e a ligação lateral com o grupo OH (hidroxila livre), o que permite uma série de mecanismos de ação como alteração na permeabilidade das membranas interna, externa e citoplasmática, e ação sobre enzimas (Helander et al., 1998; Gill e Holley, 2006; La Stora et al., 2011; Nazzaro et al., 2013).

O experimento *in vivo* demonstrou que a aplicação do óxido de cobre ($2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$) pode auxiliar na redução da severidade da podridão negra em relação às plantas não tratadas e pode ser utilizado como controle preventivo. Essa característica se dá pelo cobre aderir à superfície das folhas e impedir a proliferação de fitobactérias sobre a planta (Costa et al., 2017; Favaro et al., 2017; Redondo et al., 2017). Este fato também pode estar relacionado à capacidade do cobre em reduzir a formação do biofilme bacteriano, estrutura importante para a proliferação e virulência do patógeno sobre o vegetal. O óleo essencial se mostrou promissor no controle da podridão negra causada por *Xcc*, mais estudos devem ser feitos com formulações de produtos à base de óleo essencial que aumentem o tempo de exposição da planta ao óleo e a melhor dosagem para impedir que as fitobactérias se desenvolvam sobre as espécies couve manteiga e couve brócolis, já que não existem produtos registrados para o controle da podridão negra nestas culturas (Agrofit, 2022).

Os OEs de *L. gracilis* se mostraram promissores para o controle de bactérias do gênero *Xanthomonas* spp. causadoras de doenças de importância econômica. Os dados deste trabalho são importantes pois confirmam a alta atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Lippia gracilis* Schauer e dos compostos timol e carvacrol sobre *Xanthomonas campestris* pv *campestris*, conforme Silva et al. (2019), e ainda demonstram que esses OEs e compostos majoritários também possuem atividade antimicrobiana e antibiofilme sobre outras espécies do gênero *Xanthomonas* incluindo isolados resistentes ao cobre. Nesse trabalho apresentamos pela primeira vez a atividade antimicrobiana e antibiofilme dos OEs de *Lippia gracilis* e de seus compostos majoritários sobre *X. campestris* pv *melonis*, *X. axonopodis* pv. *manihotis*, *X. arboricola* pv. *pruni* e *X. axonopodis* pv. *vasculorum*.

4.5 Referências Bibliográficas

AGROFIT - Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Banco de informações sobre os produtos agroquímicos e afins registrados No Ministério da Agricultura. <https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> (acessado em 08 de julho de 2022).

Costa, RC, Ishida, AKN, Miranda, VS, Damasceno Filho, AS, Da Silva, CTB, Resende, MLV, Oliveira, LC, 2017. Extratos vegetais, formulações a base de extrato vegetal e produtos químicos no controle da mancha bacteriana do maracujazeiro. Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável. 7, 1, 26-33. [10.21206/rbas.v7i1.375](https://doi.org/10.21206/rbas.v7i1.375)

Favaro, MA, Roeschlin, RA, Ribero, GG, Maumary, RL, Fernandez, LN, Lutz, A, Gariglio, NF, 2017. Relationships between copper content in orange leaves, bacterial biofilm formation and citrus canker disease control after different copper treatments. Crop Protection. 92, 182-189. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.11.011>

Ferreira, DF, 2011. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. Reunião anual da região brasileira da sociedade internacional de biometria, 45, 255-258.

Flores, PI, Bañuelos-Valenzuela, R., Delgadillo-Ruiz, L, Meza-López, C, Echavarría-Cháirez, F, 2019. Actividad antibacteriana de cinco compuestos terpenoides: carvacrol, limoneno, linalool, α -terpineno y timol. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 22, 2, 241-248.

Gill, AO, Holley, RA, 2006. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. Int. J. Food Microbiol. 111, 170–174. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.046>

Helander, IM, Alakomi, HL, Latva-Kala, K, Mattila-Sandholm, T, Pol, I, Smid, EJ, Gorris, LGM, Von Wright, A, 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. J. Agric. Food. Chem. 46, 3590–3595. <https://doi.org/10.1021/jf980154m>

Jiajia, R, Bingcan, C, David Julian, C, 2019. Improving the Efficacy of Essential Oils as Antimicrobials in Foods: Mechanisms of Action. Annual Review of Food Science and Technology. 10, 365-387. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121727>

La Stora, A, Ercolini, D, Marinello, F, Di Pasqua, R, Villani, F, Mauriello, F, 2011. Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cells. Res. Microbiol. 162, 164-172. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.11.006>

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

Qiao, K, Liu, Q, Huang, Y, Xia, Y, Zhang, S, 2020. Management of bacterial spot of tomato caused by copper-resistant *Xanthomonas perforans* using a small molecule compound carvacrol. Crop protection. 132, 105114. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105114>

Quezado-Duval, AM, Gazzoto Filho, A, Leite Júnior, RP, Camargo, LE. A, 2006. Sensitivity to copper streptomycin and oxitetracyclin of xanthomonads associated to bacterial spot in processing tomatoes. Horticultura Brasileira. 21, 4, 670-675. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362003000400020>

Redondo, C, Sena-Vélez, M, Gell, I, Ferragud, E, Sabuquillo, P, Graham, JH, Cubero, J, 2015. Influence of selected bactericides on biofilm formation and viability of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Crop Protection. 78, 204-213. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.09.010>

Santos, MM, Peixoto, AR, Pessoa, EDS, Nepa, HBDS, Paz, CDD, Souza, AVVD, 2014. Estudos de compostos químicos e atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia gracilis* contra *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* in vitro. Summa Phytopathologica. 40, 277-280. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/1958>

Sartoratto, A, Machado, ALM, Delarmelina, C, Figueira, GM, Duarte, MCT, Rehder, VLG, 2004. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. Environmental and Soil Microbiology, 35, 4, 275–280. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000300001>

Sidhu, GS, Webster, JM, 1977. The use of aminoacid fungal auxotrophs to study the predisposition phenomena in the root-knot: wilt fungus disease complex. *Physiological Plant Pathology*. 11, 117-127. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(77\)90050-9](https://doi.org/10.1016/0048-4059(77)90050-9)

Silva, RS, De Oliveira, MMG, Silva, KP, Da Silva, Vasconcelos Rodrigues, I, Dos Santos Pinto, V, Blank, AF., Fernandes, RPM, 2020. Synergistic effect of *Cordia curassavica* Jacq. essential oils association against the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Environmental Science and Pollution Research*. 27, 4, 4376-4389. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06631-8>

Silva, RS., De Oliveira, MMG, De Melo, JO, Blank, AF, Corrêa, CB, Scher, R, Fernandes, RPM, 2019. AntiCMicrobial activity of *Lippia gracilis* essential oils on the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and their effect on membrane integrity. *Pesticide biochemistry and physiology*. 160, 40-48. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.06.014>

VELASCO PAZOS, P.; LEMA MÁRQUEZ, M.; FRANCISCO CANDEIRA, M.; SOENGAS FERNÁNDEZ, M. D. P.; CARTEA GONZÁLEZ, M. E. *In Vivo* and *in Vitro* Effects of Secondary Metabolites against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, v.18, n. 9, 11131-11143, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules180911131>

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os óleos essenciais de *L. gracilis*, o timol e o carvacrol se mostraram promissores para o controle de fitobactérias do gênero *Xanthomonas* spp. causadoras de doenças de importância econômica como: barriga d'água do meloeiro, bacteriose da mandioca, mancha bacteriana da ameixa, estria do milho e gomose da cana-de-açúcar e a podridão negra das crucíferas, levando em consideração os ensaios de atividade bacteriostática e bactericida (CMB) que variou de (250 a 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e CMB (500 a 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

A viabilidade celular das bactérias tratadas com os acessos de LGRA-106, LGRA-107, LGRA-110, LGRA-202 foram baixas ou não existentes. A permeabilidade de membrana das células bacterianas expostas ao óleo e os compostos timol e carvacrol foi alta chegando a 100% de dano à membrana, com maior tempo de ação na exposição de 120 min.

A atividade antibiofilme variou entre 50 a 100% de inibição da formação do biofilme. Assim como também foi demonstrado que o cobre na concentração de 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ reduz a severidade da podridão negra sobre a couve manteiga e couve brócolis, levando em consideração os parâmetros de Biomassa fresca das plantas e número de folhas. Os resultados deste trabalho demonstram que o óleo essencial de *Lippia gracilis* é uma fonte promissora para o controle de fitobactérias do gênero *Xanthomonas* spp com destaque para os acessos LGRA-107, LGRA-109, LGRA-201 e LGRA-202, que apresentaram maior correlação com a atividade antimicrobiana e antibiofilme, abrindo assim possibilidade para o estudo de formulações à base de óleo essencial de *Lippia gracilis*.

Tabela 1. Código, origem e informações geográficas dos sete acessos da coleção de *Lippia gracilis*, do Banco Ativo de Germoplasma de Plantas Medicinais e Aromáticas, Universidade Federal de Sergipe.

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

Tabela 2. Isolados de *Xanthomonas* adquiridos da coleção de culturas de fitobactérias do Instituto Biológico (São Paulo, Brasil).

Nº isolado	Identificação	Hospedeiro alvo
68	X1- <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>melonis</i>	Melão
1182	X2- <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	Mandioca
1948	X3- <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Ameixa, pêssego
1970	X4- <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i>	Cana de açúcar, milho
CA-110	X5- <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Crucíferas

Tabela 3. Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) dos óleos essenciais de *Lippia gracilis* Schauer, e seus compostos majoritários, estreptomomicina, bem como o óxido e sulfato de cobre para atividade antimicrobiana sobre cinco fitobactérias do gênero *Xanthomonas*.

	CMI (µg/mL)					CMB (µg/mL)				
	*X1	X2	X3	X4	X5	X1	X2	X3	X4	X5
LGRA- 106	1000	1000	1000	1000	1000	>1000	1000	>1000	1000	1000
LGRA- 107	1000	>1000	1000	1000	500	500	1000	>1000	>1000	500
LGRA- 108	1000	>1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	>1000	1000	>1000
LGRA- 109	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
LGRA- 110	1000	500	1000	1000	1000	1000	>1000	>1000	1000	1000
LGRA- 201	>1000	1000	1000	1000	1000	>1000	1000	>1000	>1000	1000
LGRA- 202	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	>1000	1000	1000
Carvacrol	250	500	500	250	500	1000	1000	500	1000	1000
Timol	250	500	500	1000	500	>1000	1000	1000	>1000	>1000
Óxido de cobre II	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Sulfato de cobre	>200	>200	>200	200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Estreptomomicina	>200	>200	>200	200	>200	>200	>200	>200	>200	>200

*Isolados fitobacterianos X1- *Xanthomonas campestris* pv. *melonis*, X2- *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, X3- *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, X4- *Xanthomonas axonopodis* pv. *vasculorum*, X5- *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Tabela 4. Biomassa fresca (BMF), biomassa seca (BMS) e número de folhas (NF) de couve manteiga tratada com o óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer LGRA-107 e o óxido de cobre.

	BMF (g)	BMS (g)	NF
Controle	8,84 b	1,58 a	6,50 a
OE250	12,63 ab	2,23 a	8,00 a
OE500	9,94 b	1,54 a	8,16 a
Cobre	15,97 a	2,13 a	8,16 a
Média	11,84	1,87	7,70
CV (%)	28,49	23,75	22,47

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, e maiúscula, na linha, não diferem estatisticamente entre si, teste de Tukey, $p < 0.05$.

Tabela 5. Efeito do modo de infecção de couve brócolis com a fitobactéria *Xanthomonas campestris* pv *campestris* tratada com o óleo essencial de *Lippia gracilis* e o óxido de cobre.

Tratamentos	Modo de inoculação	
	Injetado	Borrifado
	BMF (g)	
Controle	9,42 aA	14,28 aA
OE250	15,03 aA	13,74 aA
OE500	12,68 aA	12,51 aA
Cobre	13,80 aA	15,74 aA
	CV (%) = 26,61	
	BMS (g)	
Controle	1,49 aB	2,53 aA
OE250	2,37 aA	2,58 aA
OE500	2,29 aA	1,71 aA
Cobre	2,26 aA	2,47 aA
	CV (%) = 25,82	
	NF (pl)	
Controle	5,66 bA	7,33 aA
OE250	6,00 bA	7,33 aA
OE500	8,33 abA	6,33 aA
Cobre	9,33 aA	8,00 aA
	CV (%) = 16,08%	

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, e maiúscula, na linha, não diferem estatisticamente entre si, teste de Tukey, $p < 0.05$, onde as siglas significam BMF (Biomassa fresca) BMS (Biomassa seca) e NF (número de folhas).



Figura 1: Atividade bactericida de agentes antimicrobianos sobre fitobactérias. *Xanthomonas campestris* pv. *melonis*. *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihots*. *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *Xanthomonas axonopodis* pv. *vasculorum*. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

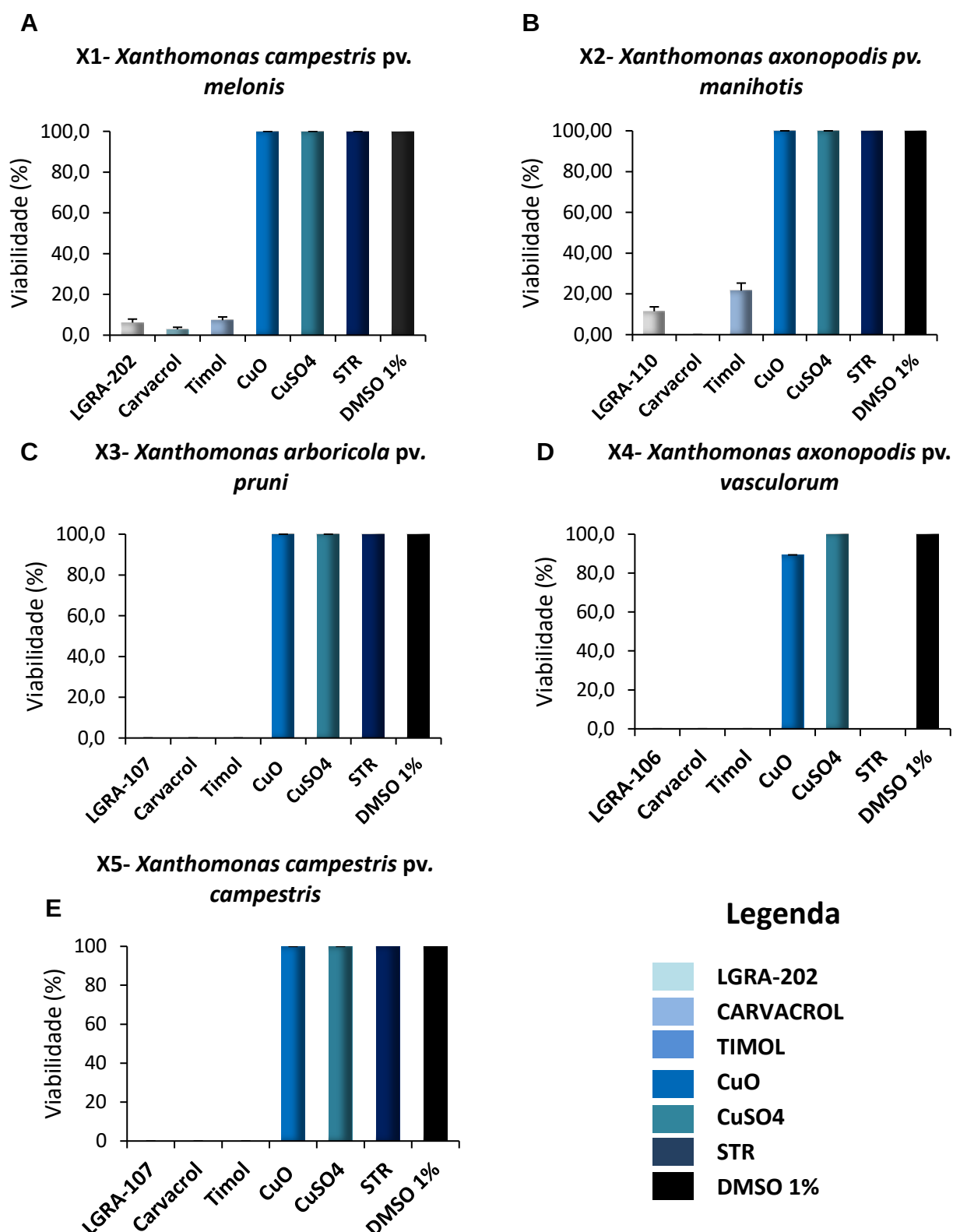
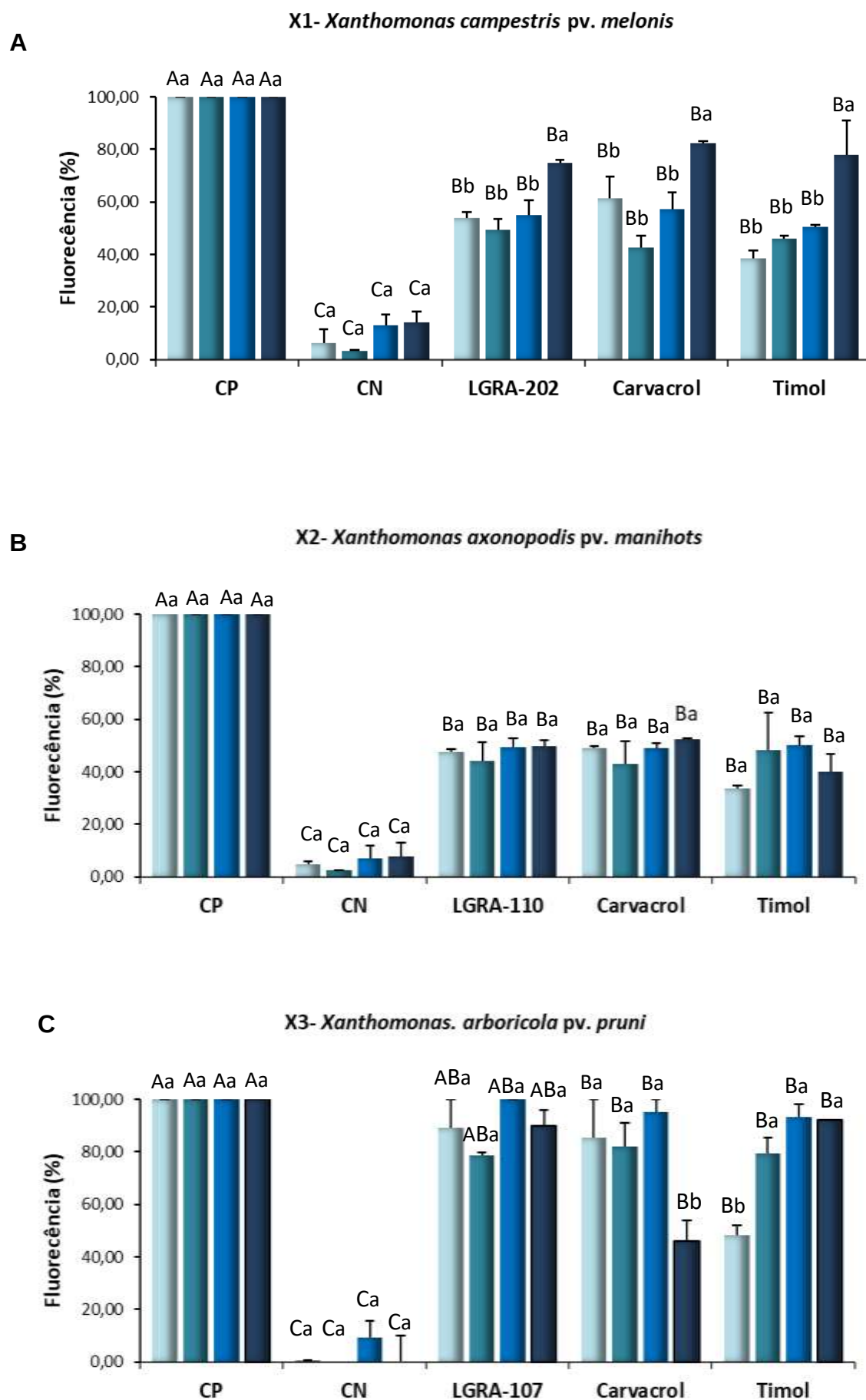
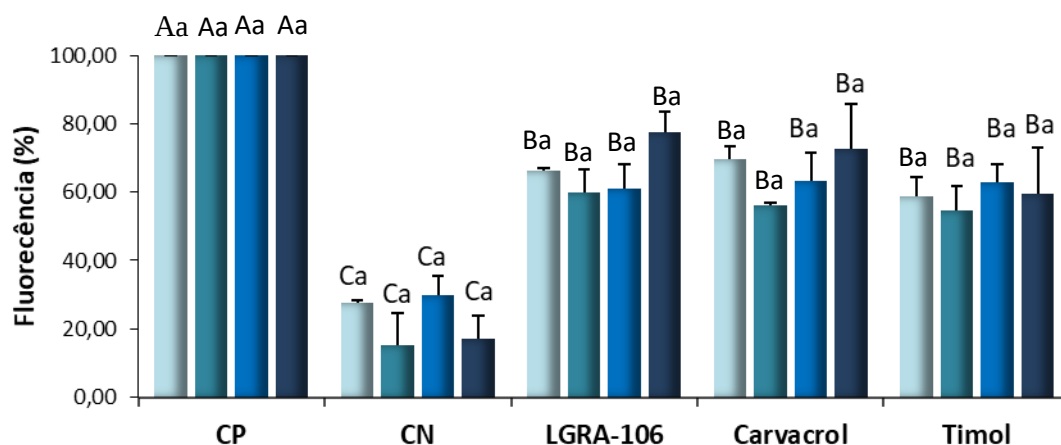


Figura 2: Efeito de agentes antimicrobianos sobre a viabilidade celular de fitobactérias do gênero *Xanthomonas*. A) *Xanthomonas campestris* pv. *melonis*. B) *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. C) *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. D) *Xanthomonas axonopodis* pv. *vasculorum*. E) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.



D

X4- *Xanthomonas axonopodis* pv. *vasculorum*

E

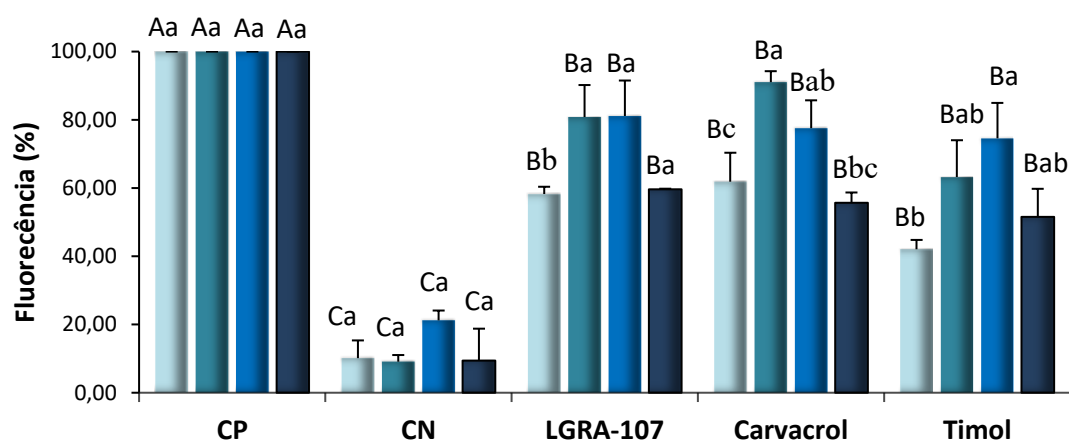
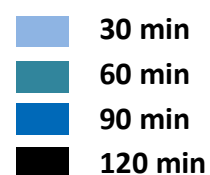
X5- *Xanthomonas campestris* pv. *campestris***Legenda**

Figura 3: Permeabilidade celular de fitobactérias do gênero *Xanthomonas* em função do óleo essencial de *Lippia gracilis* e seus compostos majoritários. A) *Xanthomonas campestris* pv. *melonis*. B) *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. C) *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. D) *Xanthomonas axonopodis* pv. *vasculorum*. E) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Células não tratadas representam o controle negativo (CN). Células expostas ao banho maria representam o controle positivo (CP).

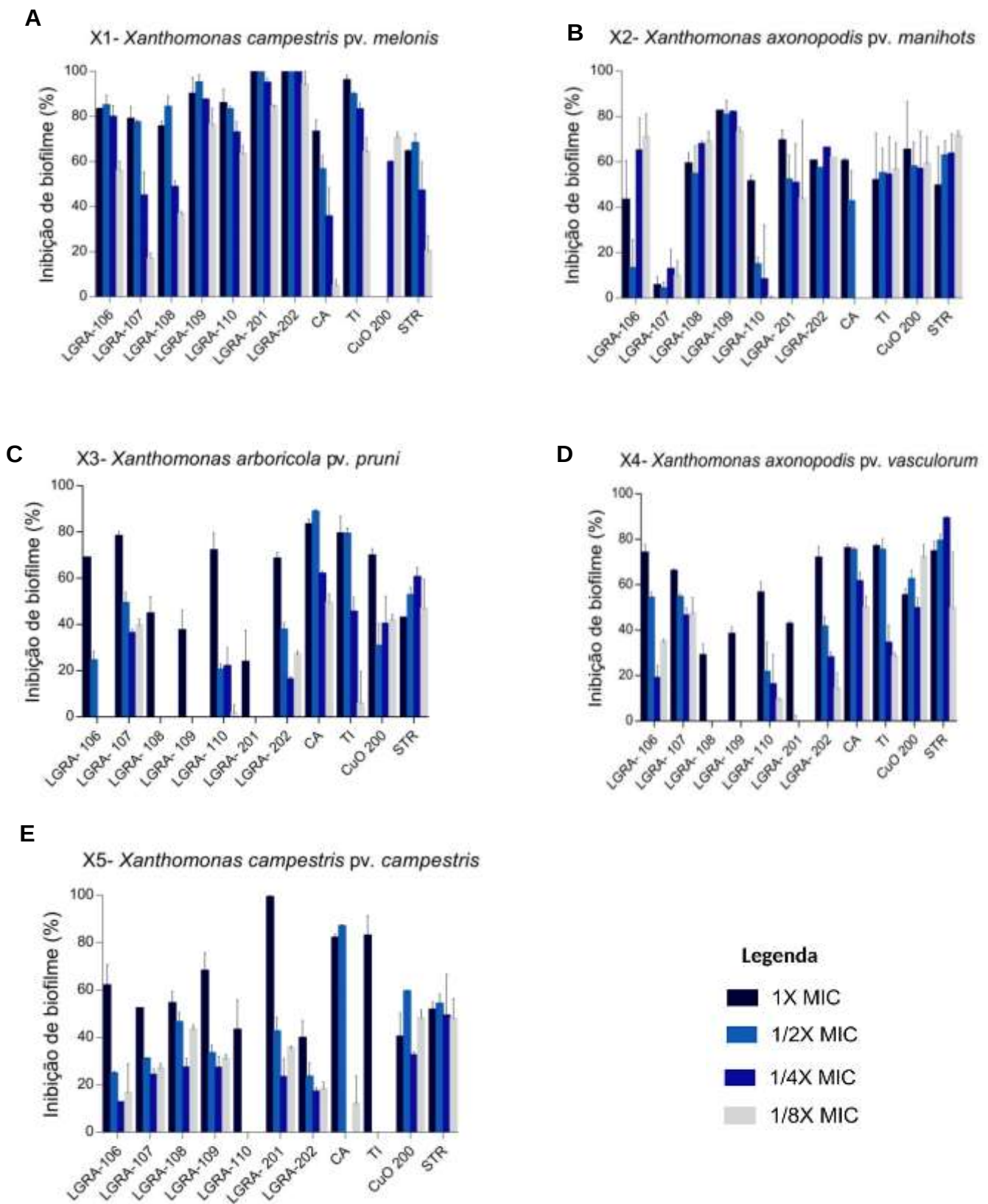
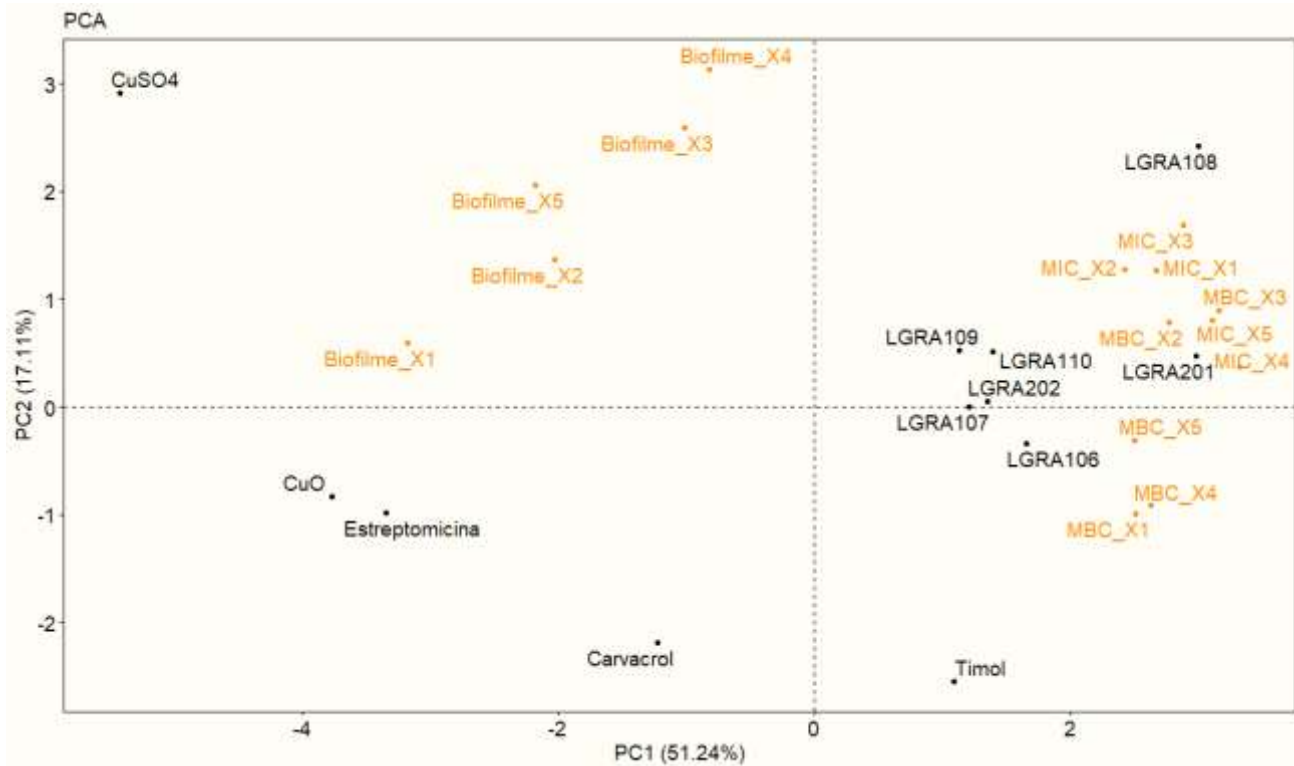


Figura 4. Inibição da formação do biofilme de fitobactérias do gênero *Xanthomonas* em função do óleo essencial dos diferentes acessos de *Lippia gracilis*, seus compostos majoritários e o óxido de cobre. A) *Xanthomonas campestris* pv. *melonis* B) *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. C) *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. D) *Xanthomonas axonopodis* pv. *vasculorum*. E) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

A



B

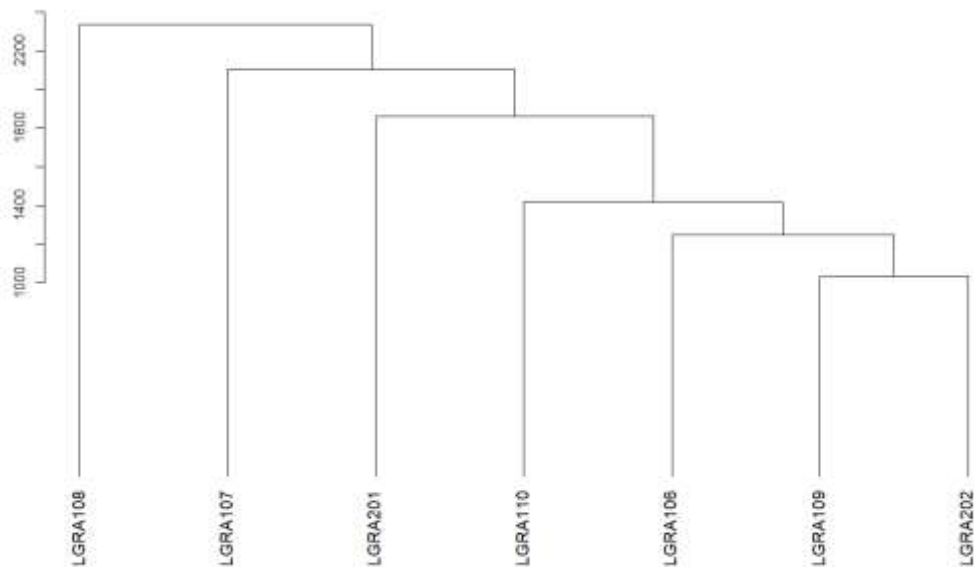


Figura 5: A) Análise de componentes principais. As análises representam a distribuição dos óleos essenciais dos diferentes acessos de *Lippia gracilis*, timol, carvacrol, óxido e sulfato de cobre, estreptomicina, bem como a formação do biofilme, a Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Bactericida (CMB) para fitobactérias do gênero *Xanthomonas*. B) Dendrograma de similaridade demonstrando a similaridade entre os acessos de *L. gracilis*.

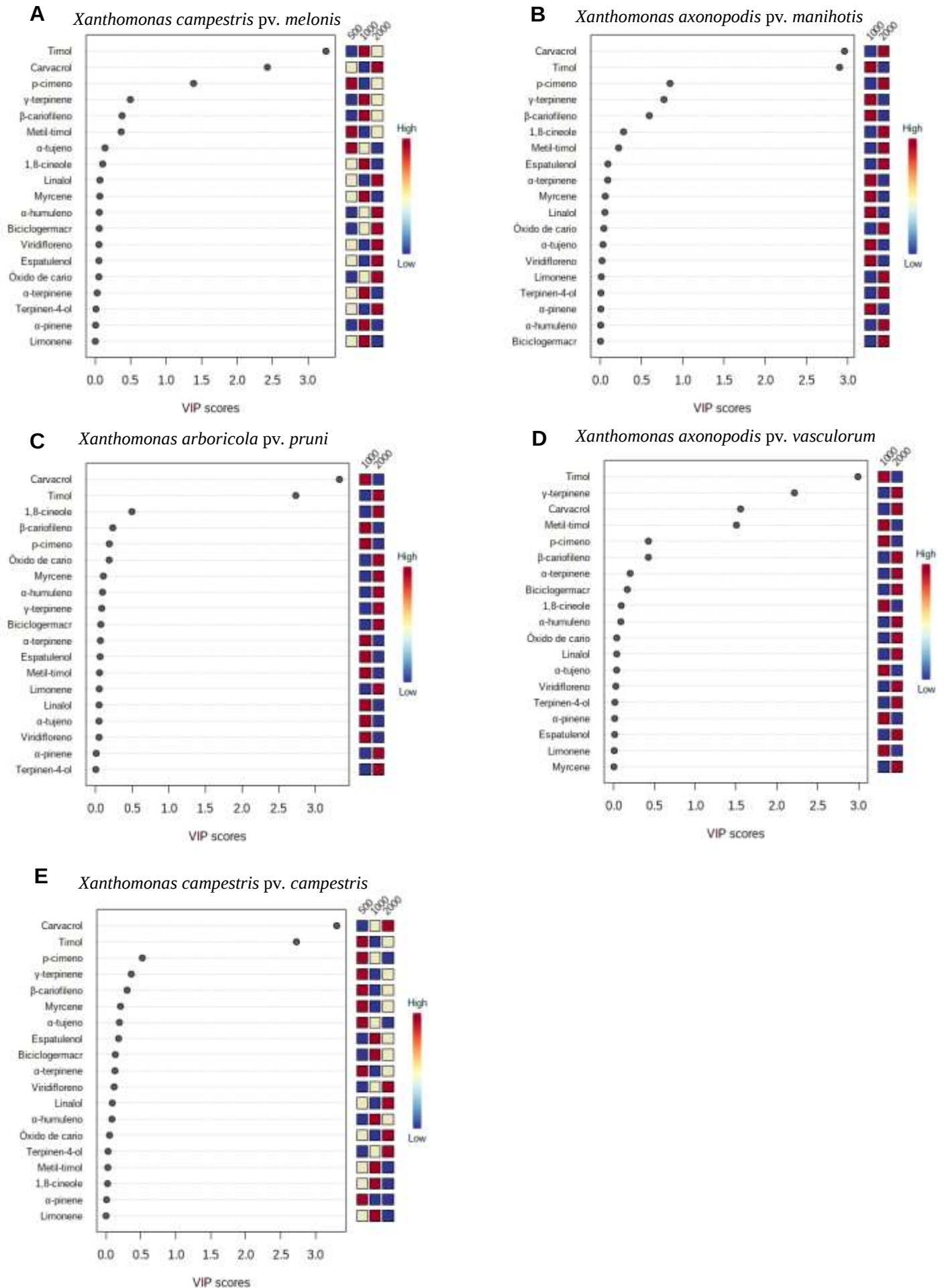
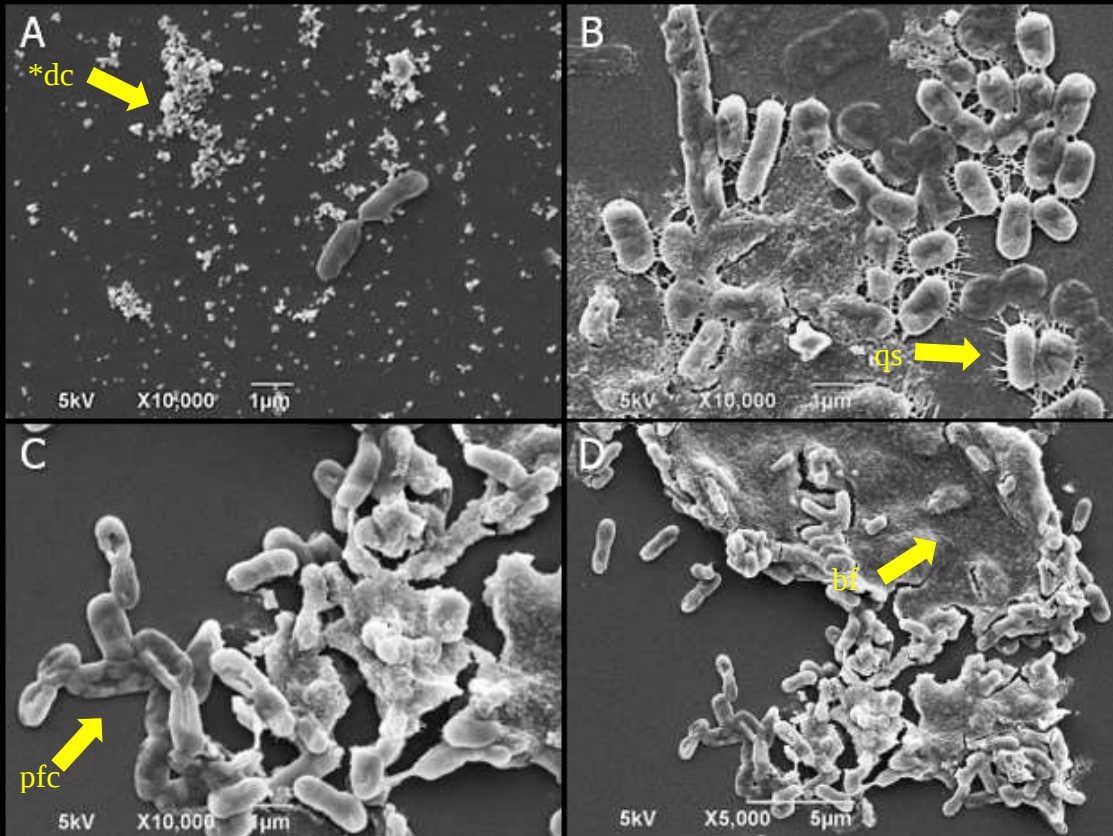


Figura 6: Valores de coeficientes (VIP scores) obtidos com o método PLS-DA para os compostos presentes nos óleos essenciais dos acessos de *Lippia gracilis* em relação à Concentração Mínima Bactericida (CMB). A) *Xanthomonas campestris* pv. *melonis*. B) *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. C) *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. D) *Xanthomonas axonopodis* pv. *vasculorum*. E) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Xanthomonas campestris pv. *melonis*

1



Xanthomonas campestris pv. *campestris*

2

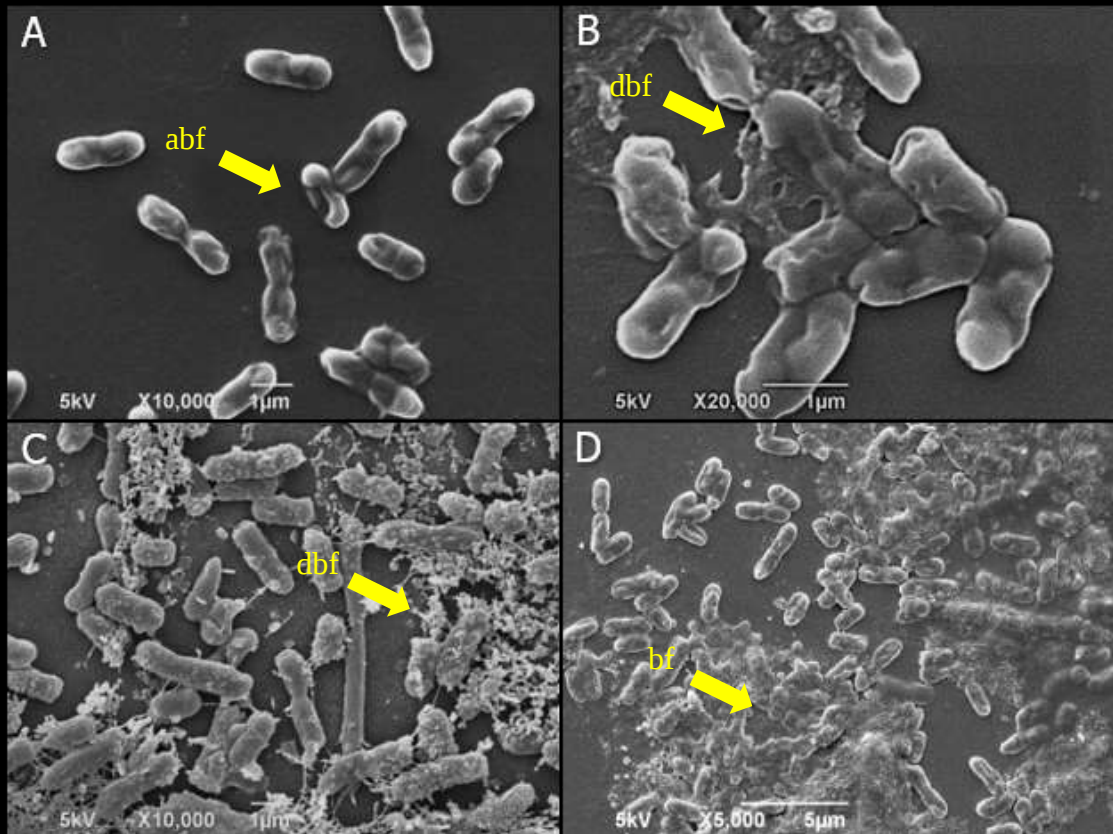


Figura 7: Ensaio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para demonstrar o efeito do óleo essencial de *Lippia gracilis* e do óxido de cobre sobre: 1- A) *Xanthomonas campestris* pv. *melonis* LGRA-202 1X CMI, B) 1/4x CMI, C) óxido de cobre ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$), D) controle. 2- A) e B) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* LGRA-107 1X CMI, C) óxido de cobre ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$), D) controle. *df (degradação celular), qs (quorum sensing), pfc (perfuração celular) bf (biofilme formado) abf (ausência de biofilme) dbf (degradação do biofilme) 24 horas de exposição.

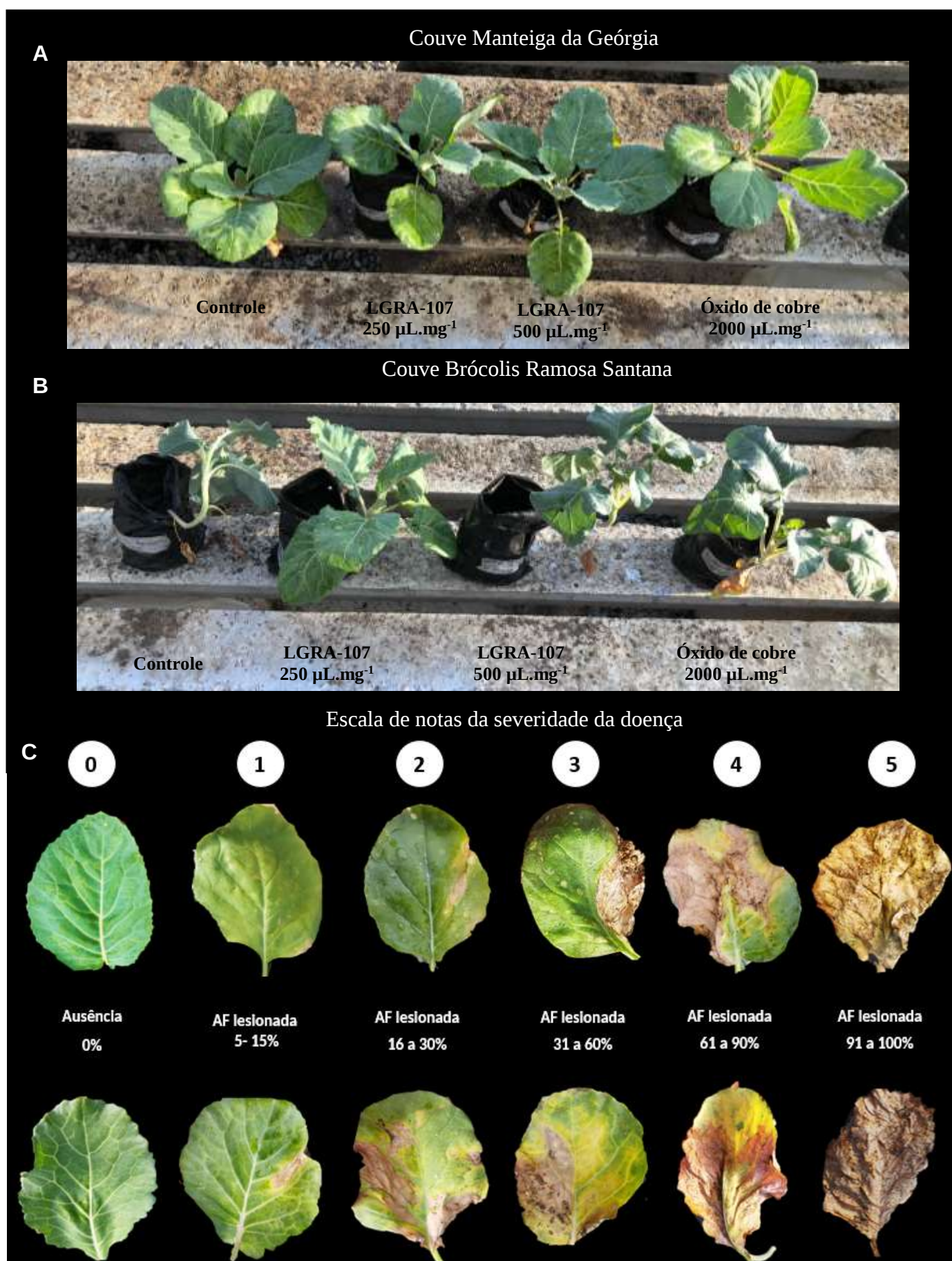


Figura 8: Experimento *in vivo* plantas da Couve Manteiga da Geórgia e Couve Brócolis Ramoso Santana, tratadas com óxido de cobre ($2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$), e LGRA-107 ($250 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e LGRA-107 ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$). A) média plantas de couve manteiga de Georgia B) Plantas de couve brócolis, C) Escala de severidade couve manteiga e couve brócolis.